

- [1] Wang B X. *The Studies of Deer Pilose* (鹿茸的研究) [M]. Changchun: Jilin Press, 1997.
- [2] Kuehn R, Schroeder W, Pirchner F, et al. *C. elaphus* microsatellite sequence [J]. *Conserv Genet*, 2003, 4(2): 157-166.
- [3] Sambrook J. *Molecular Cloning* [M]. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor, 1998.
- [4] Tejedor F, Ballesta J P. Components of the macrolide binding site on the ribosome [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 1985, 16 (Suppl A): 5.
- [5] Lin C H, Palma J F, Solomon W B, et al. Phorbol ester induction of differentiation and apoptosis in the K562 cell line is accompanied by marked decreases in the stability of globin mRNAs and decreases in the steady state level of mRNAs encoding for ribosomal proteins L35, L31, L27, and L21 [J]. *Cell Mol Biol Res*, 1994, 40(1): 13-26.
- [6] Maguire B A, Manuilov A V, Zimmernann R A, et al. Differential effects of replacing *Escherichia coli* ribosomal protein L27 with its homology from *Aquifex aeolicus* [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(22): 6565-6572.

一株产长春新碱内生真菌的初步研究

杨显志¹, 张玲琪^{2*}, 郭波², 郭仕平^{2*}

(1. 电子科技大学物理电子学院, 四川 成都 610054; 2. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091)

摘要:目的 通过长春花叶内生真菌的分离, 筛选产生长春新碱的菌株。方法 从长春花叶中分离内生真菌, 对其发酵提取物进行 TLC 和 HPLC 分析。结果 从长春花叶中分离筛选到一株无孢菌群菌株: 97CY₃。它能产生长春新碱, HPLC 测定其长春新碱含量约为 0.205 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。结论 长春花内生真菌中, 有的菌株可产生与宿主所产相同的抗癌物质长春新碱。

关键词: 长春花; 无孢菌群; 内生真菌; 长春新碱

中图分类号: R282.15

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0079-03

Preliminary study of a vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*

YANG Xian-zhi¹, ZHANG Ling-qi^{2*}, GUO Bo², GUO Shiping²

(1. College of Physical Electronics, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China; 2. School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: **Object** To select the endophytic fungi which produce vincristine by isolating fungi from the leaves of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Methods** The endophytic fungi were isolated from the leaves of *C. roseus* and the zymotic extracts were analyzed by TLC and HPLC. **Results** An endophytic fungus which is *Mycelia sterilia* 97CY₃ can produce vincristine. The content of vincristine in the fungus was determined as 0.205 $\mu\text{g}/\text{L}$ by HPLC. **Conclusion** Some endophytic fungi isolated from *C. roseus* can produce the anticancer substance vincristine which is the same as that of host plant producing.

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; *Mycelia sterilia*; endophytic fungi; vincristine

长春新碱(vincristine, VCR)具有抗肿瘤活性, 尤其对白血病具有显著疗效, 通过干扰癌细胞纺锤体形成, 使细胞有丝分裂停止于中期, 从而阻止癌细胞的扩散^[1]。目前长春新碱主要是从夹竹桃科(Apocynaceae)植物长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中分离提取。但该生物碱在植物体内含量极低, 仅为百万分之几, 分离提取困难, 且植物生长缓慢, 资源短缺, 故限制了该药的进一步开发利用。因此, 寻找长春新碱新的药源, 已成为摆在人类

面前的一项重大研究课题。近年来国内外学者主要从 3 个方面来探索这类课题, 即化学合成法^[2,3]、植物细胞及组织培养法^[4]和微生物发酵法^[5-8]。目前人们普遍认为微生物发酵法是一种最具潜力的方法。本实验即采用微生物发酵方法, 在以前工作基础^[7,8]上, 首次报道从长春花植株的叶中分离产长春新碱内生真菌菌株的结果。

1 材料和方法

1.1 材料: 新鲜长春花(2~3年生)采自云南大理

* 收稿日期: 2003-05-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860005)

作者简介: 杨显志(1968—), 男, 四川安岳人, 硕士, 讲师, 曾在中学任教多年, 2002年7月毕业于云南大学生命科学学院微生物学专业, 主要从事微生物次生活性代谢产物及生物电磁学方面的研究, 正式发表论文6篇。

Tel: (028) 83201064 E-mail: yangbos158@sohu.com

* 通讯作者 Tel: (0871) 5033159 E-mail: yin401@public.yn.cn

弥渡县和西双版纳州。长春新碱(vincristine)对照品购自 Sigma 公司。

1.2 培养基: 马铃薯葡萄糖培养基(PDA), 查氏培养基, 促孢培养基, 改良MM 液体培养基。

1.3 内生真菌的分离和纯化: 取长春花不同部位的叶, 按下列程序表面消毒: 自来水冲洗→75% 酒精漂洗(3~ 5 min)→无菌水冲洗 3~ 4 次→0.1% 升汞漂洗(10~ 30 s)→无菌水冲洗 5 次。

将上述处理过的叶片在无菌条件下剪切成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小片, 然后将小片种植于 PDA 平板上, 置于 28 ℃ 温箱培养 3~ 7 d 后, 即可见样品剪切过的边缘有菌丝长出, 经纯化后转接到 PDA 斜面上备用。经处理而不剪切的对照叶片上则一直无任何微生物长出。

1.4 内生真菌的液体培养: 将改良MM 液体培养基 100 mL 装在 250 mL 三角瓶中, 每个菌号 5 瓶, 共计 500 mL, 灭菌, 用接种钩挑取少许菌丝或孢子接种于培养瓶中, 置于 28 ℃ 摇床(110 r/min)培养 3~ 5 d, 待菌丝体长好后进行提取。

1.5 提取方法: 发酵液 500 mL → 碱化(pH ≥ 8) → 离心(2 500 r/min, 15 min) → 沉淀 → 加 CHCl₃ 200 mL → 浓缩至 3 mL → 置干净青霉素小瓶中备用。

1.6 对照品溶液的制备: 5 mg 包装的长春新碱对照品, 溶于 10 mL CHCl₃ 中, 用移液管吸取该溶液并转移至 20 mL 量瓶中, 再定容至刻度备用。

1.7 分析检测方法

1.7.1 TLC 分析: 硅胶板: 自制和购自青岛海洋化工厂; 展开剂: 苯-甲醇(9:1); 苯-丙酮(8:2); 显色: 碘显色。

1.7.2 HPLC 分析检测: Beckman 421A 控制器, 110B 溶剂导入组件, 163 可变波长检测器, 427 积分仪。检测波长为 238 nm, 吸光度 0.5; 泵 A (重蒸水) (1~ 1.5) × 69 Pa; 泵 B (甲醇) (1~ 1.5) × 69 Pa; 流速为 0.5 mL/min; 泵 A 30%; 泵 B 70%; 柱温 25 ℃。

2 结果

2.1 产长春新碱内生真菌的分离: 从云南不同地点生长的长春花叶中分出 15 株真菌菌株, 结果见表 1。

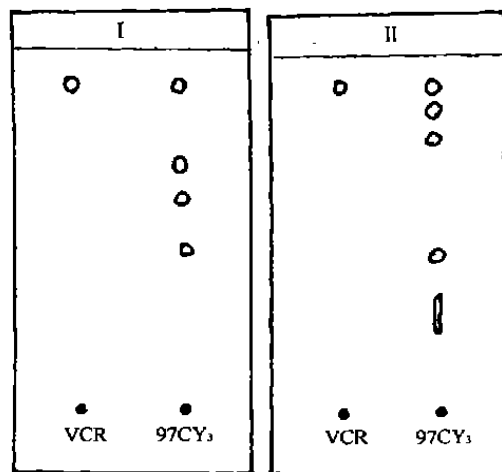
从表 1 可见, 不同来源的长春花叶中分离到的内生真菌在种类和数量上都存在差异, 体现了植物内生真菌的多样性, 其中无孢菌属为优势种。TLC 初步分析结果显示, 仅来自弥渡县编号 97CY₃ 的一株内生真菌发酵提取物出现了与对照品迁移率(R_f)相同、颜色一致的斑点(图 1), 97CY₃ 可能产生长春新碱。故以 97CY₃ 为实验菌株进行形态观察和

HPLC 分析检测。

表 1 长春花叶中内生真菌的分离结果

Table 1 Results of isolating endophytic fungi from leaves of *C. roseus*

内生真菌的属	分离菌株数	采集地
无孢菌属	4	弥渡县
毛壳菌属	1	弥渡县
短梗霉属	1	弥渡县
无孢菌属	8	西双版纳
黑孢属	1	西双版纳



I-展开剂为苯-甲醇(9:1) II-展开剂为苯-丙酮(8:2)

I-solvent system is benzene-methanol (9:1)

II-solvent system is benzene-acetone (8:2)

图 1 97CY₃ 提取物的 TLC 图谱

Fig 1 Chromatogram of TLC of 97CY₃ extract

2.2 内生真菌 97CY₃ 的生长及形态特征: 97CY₃ 菌株的菌落白色, 不产色素, 菌丝多分枝, 有横隔, 不产孢子, 经初步鉴定为无孢菌属 *Mycelia sterilia*。

97CY₃ 在 PDA 平板上生长较快, 28 ℃, 72 h, 菌落直径可达 3.5 cm 左右。在改良MM 液体培养基中, 刚开始(前 24 h)生长较缓慢, 有一个生长延迟期, 但随后却表现出很强的生活力, 48 h 后逐渐达到生长高峰, 72 h 培养物提取液中长春新碱的量已达较高水平。

2.3 HPLC 分析测定: 为了进一步证实 97CY₃ 能产长春新碱, 采用 HPLC 对该菌发酵提取物进行分析检测, 结果见图 2。

由图 2 可见, 在上述设定条件下, 样品中峰 II 与对照品中峰 I 的保留时间一致, 即 $t_R = 2.60 \text{ min}$, 可判断样品中峰 II 为长春新碱的吸收峰, 根据峰 II 的积分面积计算得出样品中长春新碱的含量, 再根据发酵液总量可计算出 97CY₃ 菌株液体培养物中长春新碱含量约为 $0.205 \mu\text{g/L}$ 。

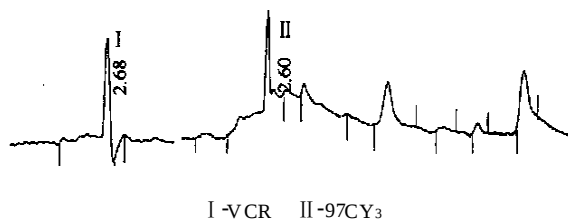
I-VCR II-97CY₃

图 2 HPLC 图谱

Fig 2 Chromatogram of HPLC

3 讨论

从内生真菌的分离和筛选结果来看,植物内生真菌具有一定多样性,有可能利用药用植物内生真菌来生产与宿主所产相同或相似的生理活性物质,只是目前所分离到的内生真菌合成天然活性物质的量很少,有待于利用现代生物技术手段改造菌种,优化发酵条件及在培养物中添加前体物质等方法来提高其有效成分的产量。随着科技进步和研究的不断深入,开发利用药用植物内生真菌无疑应是解决药用植物资源短缺的最佳途径之一。

References:

- [1] Li C. General research aspect of antitumour drugs obtained from plant [J]. *Bull Pharm*, 1982, 17(2): 19-23.
- [2] Buechi G, Kulsa P, Rosati R L. The total synthesis of velbanamine [J]. *J Amer Chem Soc*, 1968, 90(9): 2448-2449.
- [3] Kutney J P, Bylsma F. Synthesis of monomeric and dimeric Vinca alkaloids The total synthesis of isovelbanamine, velbanamine, cleavamine, 18 β -carbomethoxycleavamine, and catharanthine [J]. *J Amer Chem Soc*, 1970, 92(20): 6090-6092.
- [4] Schiel O, Berlin J. Large scale fermentation and alkaloid production of cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 1987, 8(2): 153-161.
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [6] Strobel G, Yang X S, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. *Microbiology*, 1996, 142: 435-440.
- [7] Zhang L Q, Guo B, Shao H, et al. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(11): 805-807.
- [8] Guo B, Li H, Zhang L. Isolation of a fungus producing vinblastine [J]. *J Yunnan Univ* (云南大学学报), 1998, 20(3): 214-215.

不同采收期溪黄草中 2 α -羟基熊果酸含量的动态研究

吴剑峰¹, 刘 斌², 祝晨³, 赖小平^{3*}

(1. 广东省佛山职工医学院, 广东 佛山 528000; 2. 天津医学高等专科学校, 天津 300052;

3. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要:目的 为确定溪黄草最佳采收期提供依据,为按中药材 GAP 原则制定相关标准操作规程(SOP)并实施推广应用,提供基础研究资料。方法 采用 RP-HPLC 法测定 GAP 基地产溪黄草药材不同采收期 2 α -羟基熊果酸的含量。色谱条件: Kromasil RP-C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液(70.5 : 29.5)为流动相; 流速 0.8 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 210 nm。结果 不同采收期狭基线纹香茶菜药材中 2 α -羟基熊果酸的含量以 8 月份为高,即开花前期。结论 建议狭基线纹香茶菜药材在开花前枝叶繁盛时采收。

关键词: 溪黄草; 采收期; HPLC; 2 α -羟基熊果酸

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0081-03

Determination of 2 α -hydroxy-ursolic acid from *Herba Rabdosiae Serrae* in various collecting periods

WU Jian-feng¹, LIU Bin², ZHU Chen-chen³, LAI Xiaoping³

(1. Foshan Medical College for Personnel of Guangdong, Foshan 528000, China; 2. Tianjin Medical Training College, Tianjin 300052, China; 3. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Object** To supply the basis for the optimal collecting period for *Herba Rabdosiae Serrae* (HRS). To lay down relevant Standard Operating practice (SOP) in accordance with GAP of Chinese medicinal materials and put them into practice with providing basic researching data. **Methods** To deter-

* 收稿日期: 2003-04-15

基金项目: “十五”国家科技攻关计划资助项目(99-929-01-23)

作者简介: 吴剑峰,女,江苏省无锡市人,副主任药师,硕士学位,一直从事药学专业的教学、科研和实践工作,现任广东省佛山职工医学院药学教研室主任,1994年获广东省“南粤教坛新秀”称号,同年获佛山市教育基金会颁发的二等奖,1999年获佛山市市优秀教师奖,主持了广东省立项科研课题《日本汉方制剂柴苓汤质量控制模式应用于中成药的研究》等3项,参加了国家攀登计划课题《补阳还五汤治疗脑中风作用机理研究》、国家重点科技攻关项目《中药规范化种植(GAP)研究》——溪黄草子课题等多项研究,发表论文10余篇,主编了卫生部规划教材《天然药物化学》和《天然药物化学学习指导》,担任《医学论文写作》副主编,研究方向为天然活性成分和新药开发。Tel: (0757) 2816702 13612540388