被专利制度有效保护。

曾有一种观点认为，中药是我国拥有自主知识产权的少数领域之一。这是不了解知识产权制订所造成的误解。知识产权是依法定程序产生的权利，除版权等是自动产生的之外，专利权和商标权都必须经过申请和审批程序才能获得权利。根据对美国中药专利的分析，在美国很大一部分中药专利是由美国和日本等发达国家获得的。这使我们不得不思考，在这个制药业的技术竞争很大程度上表现为专利权的竞争的时代，作为中药的起源地，我国如何能够更好地保护并利用我国的中药文化遗产。

References:

[1] Wang J Y. *US Drug Submission Procedures and Regulations* (美国药品申请与法规管理) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2005.

[2] Li G X. Study on the intellectual property protection of traditional Chinese medicine [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine* (成都中医药大学博士论文) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2004.

内生真菌与天然产物研究进展

王兴红

(云南大学微生物研究所，云南 昆明 650091)

摘 要：内生真菌生境独特，分布广泛，是发现新颖结构化合物的理想资源。植物是药用植物的主要材料，药用植物体内有大量内生真菌分布，内生真菌对药用植物的生长及活性成分的形成都有影响，如名贵中药血竭的形成需要内生真菌的参与，中药材的道地性可能也与内生真菌有密切关系。从内生真菌中发现活性成分所面临的一个重要问题是：随着野生中药资源及其生境遭到破坏，伴生的内生真菌也会随着大量消失，由此可能对中药长远发展产生重大影响，但这一现象尚未引起人们足够的重视。

关键词：内生真菌；药用植物；天然产物

中图分类号：R282 **文献标识码**：A **文章编号**：0253 - 2670(2007)01 - 0140 - 04

Advances in studies on endophytic fungi and natural products

WANG Xing-hong

(Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Key words: endophytic fungi; medicinal plant; natural products

所有植物都不是一个单一的个体，是由多种内生物所组成的共生体。内生真菌(endophytic fungus)是植物体内最主要的生物类群，存在于所有健康的植物组织中，广泛分布于藻类、苔藓、蕨类、单子叶及双子叶被子植物中。药用植物在体内同样分布着大量的内生真菌[1]。目前，内生真菌的研究受到了全球性的广泛关注，每年有数百篇论文报道新发现的内生菌[2]。从内生真菌寻找活性成分日益成为研究的热点[3]。

1 内生真菌是寻找生物活性物质的良好资源

内生真菌能增强宿主的抗逆性，主要就是通过内生真菌产生各种不同的生物活性物质来实现的，这些活性物质对于药物开发来说，具有巨大的应用价值[3~6]。然而，相对于病原菌和土壤真菌，目前从内生真菌中发现的化合物要少得多。对于活性成分的研究，人们长期依赖于土壤真菌和放线菌，做了很多重复工作，筛选这些重复的菌株是一个费用高而且费时的工作，对于从生长于特殊环境的内生真菌中发现活性成分人们尚未予以足够的重视[3]。

80%的内生真菌会产生具有抗细菌、抗真菌和除草效果的生物活性物质。Schulz 等[6]从不同植物中分离了 6 500 株内生真菌，与 2 800 个土壤真菌进行比较，通过测定发现 80%～83%的内生真菌有一种或一种以上的活性，而只有 64%土壤真菌具有活性。同时，43%的内生真菌株有除草活性，而植物病原菌只有 27%，表生菌只有 25%，土壤微生物只有 18%，大型藻类只有 13%具有除草活性。Petrini 等[7]分到 81 个鹿角菌 *Xylaria nigripes* 的单孢子和内生真菌菌株，它们中的 75%具有各种不同的活性，最高活性菌株中内生真菌菌株占了 79%。木本植物内生真菌有 49%的菌株有活性，而其他来源的菌株则只有 28%有活性。器官专一性内生真菌能产生专一性的抗虫化合物。一株非产孢的云杉 *Picea meyeri* Rehd. et Wils 内生真菌产生的皱褶青霉素 (rugulosin)具有抗云杉蚜虫的作用，已能商业化生产[7]。黄

收稿日期：2006-04-28

基金项目：云南省自然科学基金资助项目(2003C0005M)

作者简介：王兴红，男，博士，副研究员，主要从事中药相关的微生物学研究和活性成分的微生物转化研究。

Tel：(0871)6231218 E-mail：wxihong@sina.com，wangxh@yun.edu.cn

耀坚等[8]从三尖杉 *Cephalotaxus fortune* Hook. f. 、南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng. et L. K. Fu、香榧 *Torreya grandis* Fort. ex Lindl. 中分到内生真菌 172 株，共有 25 株对 KB 或 HL-60 细胞有抑制作用，占总供测菌株的 14.5%；172 种内生真菌中，共有 90 株内生真菌对一种或多种指示菌有抑制作用，占总分离菌株数的 52.3%，3 种植物内生真菌中具有抗菌活性的菌株的比例均超过 40%。从青蒿中分到 39 株内生真菌，其中有 21 株能在体外产生抑制病原菌的物质。王兴红等[9]在鬼臼类植物内生真菌的研究中发现，几乎所有的内生真菌都具有不同程度的抗卤虫活性，抗细菌和抗真菌的活性菌株都在 20%以上，30%～50%的菌株具有抗肿瘤细胞的活性。

2 从内生真菌中分离新化合物

内生真菌几乎能无限地合成次生代谢产物。Schulz 等[3]从内生真菌中获得了 135 个化合物，新化合物占 51%，而土壤微生物产生的新化合物只占 38%，表明内生真菌确实是寻找新次生代谢产物的重要源泉。其中的原因可能有两个方面：内生真菌研究的深度没有土壤真菌高；内生真菌和宿主的相互作用有利于活性化合物的合成。

内生真菌的代谢产物具有结构、合成途径和活性多样性，包括类固醇、氧杂蒽酮(xanthones)、酚类、异香豆素类、二萘嵌苯(perylene)衍生物、醌类、呋喃二酮类、萜类、depsipeptides 和细胞松驰素。这些成分主要是通过聚酮类化合物(polyketide)途径合成，是 C_5 的甲羟戊酸衍生物，用非核糖体蛋白系统合成[6]。

自从 Stierle 等报道了红豆杉内生真菌紫杉霉 *Taxomyces andreanae* 能产紫杉醇后，从红豆杉中寻找产紫杉醇的真菌曾引起了人们利用内生真菌替代原植物的研究热潮，虽未达到代替原植物的目标，但引起了人们对内生真菌产抗癌活性成分的广泛兴趣。张玲琪等[4]在鬼臼亚科 3 个不同属植物桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying (Berberidaceae)、川八角莲 *Dysosma veitchii* (Hemsl. et Wils.) Fu、南方山荷叶 *Diphylleia sinensis* L. 中都分到了产鬼臼毒素的内生真菌；从美登木中分到了一株产球毛壳甲素的内生菌并分离得到了单体化合物；从长春花韧皮部分到一株尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 产长春新碱。

关于内生真菌产与宿主相同化学成分的报道，大部分是推论，很少有直接的证据。这些研究的结果中，都没有分到纯化合物并且是通过结构解析进行确认，其可靠性值得怀疑。从目前大多数资料来看，抗癌植物内生真菌产生的抗癌成分是其独立产生的，与宿主的抗癌成分在结构上基本上没有相关性。

微生物易于培养、易于繁殖、易于工业化生产的一系列特征使真菌成为寻找有益于人类的新天然活性成分的最佳途径。如调控青霉素产生菌的培养条件可以提高青霉素的产量达 6 000 倍[6]。

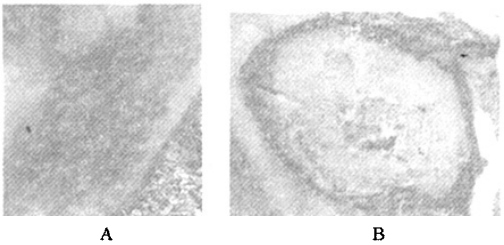
对于有望成为药物的天然产物，其对动物和人的毒性是关键的问题之一。植物是真核细胞生物，其产生的抗生素必须是低毒的，否则，宿主细胞会死亡。植物本身就是一个天然的对微生物进行选择的系统，它使活性分子具有较低的毒性。因此，从植物内生真菌中得到的天然产物一般具有较低毒性，如 mevinolin 就是一种由内生真菌分泌的除草剂[6]。

3 内生真菌与中药资源开发关系密切

中药产业是我国具有比较优势的少数几个产业之一，但由于中药研究手段相对落后，使中药资源的开发潜力受到极大的阻碍。将现代生物学知识应用到中药研究中来，对促进中药的发展具有极其重要的意义。内生真菌作为一种广泛分布于植物体内的真菌，与中药有多方面的关系。由于内生真菌的研究只是最近 20 多年来才引起人们广泛关注，所以，内生真菌在中药中的应用尚未引起我国科学家的广泛注意，将内生真菌和中药研究特别是在解决资源和活性成分问题上结合起来，会有广阔的发展前景[10]。

3.1 内生真菌与一些名贵中药的形成：血竭的形成与龙血树内生真菌有密切关系。研究表明：无论在活体或离体灭活植物茎上接种分离自无症状的龙血树体内的真菌都会诱发血竭的形成，通过诱导，血竭的形成量可以增加 3.4 倍；甚至在离体条件下，一些内生真菌也能转化龙血树的木质形成血竭[11]。

病原菌感染会导致宿主酚类防御物质浓度下降，而内生真菌则会增加宿主酚类物质的量[3]。这一现象可以在龙血树血竭的形成过程中得到比较直观的体现。在一些内生真菌感染龙血树时，会诱导宿主产生大量的血竭，阻止这种真菌在体内的扩散，导致真菌在宿主体内的扩散范围有限，形成的血竭将真菌的扩散限制在一个小的局部。而病原真菌引起病斑时，则看不到任何血竭的形成，病原真菌在植物体内大范围扩散，严重时致宿主枯死(图 1)。接种病原真菌(图 1-A)时，龙血树不形成任何红色的血竭，植物组织大量坏死，扩散的面积很大；而接种内生真菌(图 1-B)时，形成了大量的血竭阻止了真菌的进一步扩散，从图中可见接种的白色内生真菌菌丝受损的组织面积较小，受损程度也较轻。



A B

图 1 剑叶龙血树树干对接种病原菌和内生真菌的不同反应

Fig. 1 Different reactions on trunk of *Dracaena Cochin Chinensis* inoculated by pathogen and endophytic fungi

其他一些珍稀名贵中药形成的机制也与其体内真菌有关，如沉香、降香的形成。黄绿墨耳真菌 *Menanotus flavolivens* 感染白木香植物后，能加速沉香的形成。在健康白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 树上接种黄绿墨耳真菌培养液，1 个月后即可检测到沉香色酮化合物的苄基丙

酮，未感染真菌的木材组织中无苄基丙酮成分[12]。人工接种真菌已成为人工生产沉香的常规方法。

3.2 内生真菌对中药材生长的影响：一些内生真菌与植物的生长、发育、定植、抗病性有关，深入研究可能对中药材的人工种植有重要作用。如 DSE (dark septate endophyte)类内生真菌可提高中药材种植的成活率；开唇兰小菇 *Mycena anoectochila* Sp. nov. Guo、石斛小菇 *M. dendrobii* Fan et Guo、兰小菇 *M. orchidicola* Fan et Guo 3 种小菇属内生真菌对兰科濒危药用植物铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl、金钱莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl 的生长有促进作用。接种 3 种内生真菌后，铁皮石斛苗的生长量高于对照3～5倍，石斛小菇、兰小菇对铁皮石斛原球茎的增殖也有明显促进作用；接种 3 种真菌的金钱莲苗、侧芽及侧根数均显著高于对照。在植物试管苗培养基中分别加入 20%真菌菌丝及 10 mg/L 发酵液的醋酸乙酯提取物，结果发现 3 种菌的菌丝体及兰小菇的醋酸乙酯提取物均能显著提高铁皮石斛原球茎的增殖率；石斛小菇的菌丝体对金钱莲的生长和侧芽增殖有显著促进作用；开唇兰小菇和兰小菇的醋酸乙酯提取物对增加金线莲侧芽发生数及其生长有显著促进作用，说明 3 种内生真菌对铁皮石斛、金线莲的促生长作用与菌丝内及分泌到菌丝外的代谢产物有关[13,14]。

病原菌的侵染是制药中药材种植业发展中的一个重要问题，通过接种内生真菌可以提高宿主的抗病能力。一些内生真菌可以限制病原菌的发展[15,16]。三七人工种植时，根腐病的发病率很高，一般需要 3～7 年的间隔才能进行下一次轮作。通过筛选获得有效的内生真菌，有可能对三七的根腐病有一定的抑制作用。

3.3 内生真菌与中药材的道地性：对于中药的道地性，人们常常笼统地将这种现象归因于地理因素或气候因素，很少从生物因素方面进行考虑，停留在和古人一样的看法上。鉴于植物的一些活性成分形成与内生菌有密切的关系，内生菌的分布有明显的地域性，笔者推测内生真菌可能与中药的道地性有密切的关系，即不同地方的中药材内生真菌群落组成不同可能是导致中药具有不同药效成分的原因之一。

植物体内的一些活性成分实际上是内生真菌形成的，一些次生代谢产物的形成会受到内生真菌的影响。在比较含和不含内生真菌同一基因型的黑麦草时，发现含内生真菌的植株蚜虫数量减少了 1/4，采食这种牧草的牲畜生育性和产奶量减少了 1/3。感染 *Neotyphodium typhnium* 的早熟禾 *Poa ampla* Merr. 乙醇提取物能抗蚊子的幼虫，而未感染的植株则没有这种功能，*N. typhnium* 的提取物没有抗虫的效果。*Rhabdocline parkeri* 可以保护花旗松不被瘿蚊幼虫采食，该真菌的提取物对花旗松的蚜虫也是有毒的。内生真菌可以刺激宿主在受损后增加真菌毒素的合成和诱导抗生素的产生。*N. typhnium* 或香柱菌主要是通过其产生的毒性生物碱波氨和黑麦草碱对脊椎动物和昆虫有毒性。内生真菌在根部的定植甚至会减少害虫对叶的损害。这些活性物质对人也会产生生理作用，如一些麦角菌产生的麦角碱对人体具有强烈的生理活性[3,5,6]。

内生真菌的分布不是随机的，会随着生境的变化而变化。高山植物内生真菌感染的程度取决于生态条件，如内生真菌定植率与雪覆盖的时间成正相关，与宿主的营养状况呈负相关[7,17]。在不利于内生共生体形成的生态环境中内生真菌种类较少，生长在沼泽或干燥地区的热带植物内生真菌较少，而在热带雨林阴凉处的植物内生真菌的种类、数量都较多。热带地区比温带地区分布有更广泛的内生真菌。内生真菌的分布与地理上的物理距离有明显的相关性，地理位置相距越远，内生真菌的组成越不相同(图 2)。随着地理距离的增加，内生真菌的物种相似度越来越低[18]。

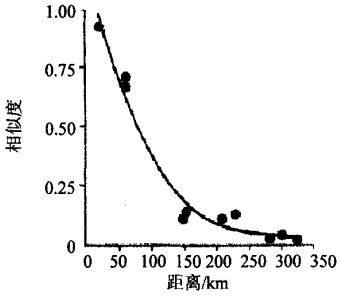


图 2 可可内生真菌相似度与距离的关系

Fig. 2 Relationship between similarity and distance of endophytic fungi of *Theobroma cacao*

内生真菌产生活性物质与生态环境有密切的关系。植物内生真菌抗虫活性的表达受多个因子的影响，如化感物质(allelochemical)的数量、植物的基因型、土壤肥力、内生菌的浓度、内生菌基因型。水分、温度、土壤 pH 值、害虫抗性和其他因子也影响内生真菌的密度和活性化合物的产生。有些内生真菌的次生代谢产物只有在宿主体内才能合成，如皱褶青霉素(rugulosin)只有在宿主体内才能合成[3]。不同地域具有不同的物理因子，有可能是这些物理因子通过影响内生真菌的分布和形成活性成分的能力，从而影响宿主体内的活性成分，进一步影响中药的药效。

Wang 等[19]报道，内生真菌的寡糖提取物可以刺激其宿主黄花蒿发根产生青蒿素。丹参等植物组织培养过程中，加入某种真菌或真菌培养物有利于目的代谢产物的形成。由此提示：可能由于内生真菌存在于宿主体内，会刺激宿主产生某些次级代谢产物。

4 内生真菌研究面临的问题

原始森林蕴含着极其丰富的内生菌资源。据估计，现在热带雨林面积只有 2 000 年前的 40%～50%。由于人类活动引起地球上许多物种以令人担忧的速度正遭到灭绝，当一种植物消失时，与其相关的全部内生真菌也都会跟着消失。在这些资源消失之前，应该采取多种手段保护这些生命形式和信息，将有代表性的地区保护起来，建立生物多样性的信息基地，同时，国家应该收集生活在这些地方的微生物[5,20]。

很多中药传统上来源于野生，当这些野生的中药生存环境受到严重破坏，资源急剧减少，意味着中药内生真菌也会大量地消失，一些人工栽培的中药药效不如野生品种，可能

与缺失其固有的内生真菌有密切关系。中药作为国粹，国家应当从战略高度给予足够的重视，及时保护中药野生生境及中药中的内生菌，这对中药资源的持续发展具有十分重要的意义。

5 结语

内生真菌是寻找活性成分的理想资源，更容易得到新颖结构的化合物。内生真菌与中药资源开发有密切的关系。中药的成分形成、种植、抗病性、道地性可能都与内生真菌有密切的关系。作为中药的发源地，国家应该高度重视中药材内生真菌的研究，特别是加强对中药野生生境的保护，对生境破坏严重的中药，及时保存其内生真菌资源，以利于中药的长远发展。

References:

[1] Gao X X, Zhou H, Xu D Y, *et al*. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 249: 255-266.

[2] Arnold A E, Maynard Z, Gilbert G S. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity [J]. *Mycol Res*, 2001, 105: 1502-1507.

[3] Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum [J]. *Mycol Res*, 2005, 109(6): 661-686.

[4] Yang C Y, Wang X H, Yang H Y, *et al*. Progress in research of activity chemicals in endophytic fungi [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(Suppl): 219-222.

[5] Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products [J]. *Microb Infect*, 2003(5): 535-544.

[6] Schulz B, Boyle C, Draeger S, *et al*. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites [J]. *Mycol Res*, 2002, 106: 996-1004.

[7] Petrini O, Sieber T, Toti L, *et al*. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi [J]. *Nat Toxins Metab Prod Subs Utiliz*, 1992(1): 185-196.

[8] Huang Y J, Wang J F, Li C L, *et al*. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis* [J]. *Immunol Med Microbiol*, 2001, 31: 163-167.

[9] Wang X P, Zhong J, Wang X H, *et al*. Study on the bioactivity of the endophytic fungi isolated from *Sinopodophyllum hexandrum* and *Diphylleia sinensis* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18(1): 15-19.

[10] Yang H Y, Wang X H, Peng Q. Application of microbes in modernization of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(11): 1728-1731.

[11] Jiang D F, Ma P, Yang J, *et al*. Formation of blood resin in abiotic *Dracaena cochinchinensis* inoculated with *Fusarium* 9568D [J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2003, 14(3): 477-478.

[12] Qi S Y, Lin L D, Hu H C. Formation of Chromone chemicals in *Aquilaria sinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(9): 658-659.

[13] Gao W W, Guo S X. Effect of three endophytic fungi on growth of *Dendrobium candidum* and *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 543-545.

[14] Gao W W, Guo S X. Effect of endophytic fungal hyphae and their metabolites on the growth of *Dendrobium candidum* and *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 2001, 3(6): 556-559.

[15] Barbara S, Christine B. The endophytic continuum [J]. *Mycol Res*, 2005, 109(6): 661-686.

[16] Hashiba T, Narisawa K. The development and endophytic nature of the fungus *Heteroconium chaetosphira* [J]. *FEMS Mcrobiol Lett*, 2005, 252: 191-196.

[17] Hadacek F, Kraus G F. Plant root carbohydrates affect growth behaviour of endophytic microfungi [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 41: 161-170.

[18] Arnold A E, Mejia L C, Kyllo D. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tres [J]. *Ecology*, 2003, 100(26): 15649-15654.

[19] Wang J W, Xia Z H, Tan R X. Elicitation on artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy roots by the oligosaccharide extract from the endophytic *Colletotrichum* sp. B501 [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2002, 44(10): 1233-1238.

[20] Gloer J B. *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships* [M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidlberg, 1997.

醛固酮对心室重构的影响及中药干预

郭 娟，陈长勋*，杜 军

（上海中医药大学 药理教研室，上海 201203）

摘 要：近期的研究提示醛固酮介导长期不良刺激引起心室重构。醛固酮促进心肌和血管的纤维化，激活交感神经活性，与其他神经内分泌因子，如血管紧张素 Ⅱ、内皮素等共同加剧心室重构的过程。拮抗醛固酮已成为防治心室重构、慢性心功能不全的有效途径。已初步发现有些中药和中药复方具有拮抗醛固酮和防治心室重构的作用，进一步发掘疗效可靠的拮抗醛固酮和防治心室重构的中药及其复方中药具有重要研究价值。

关键词：醛固酮；心室重构；中药

中图分类号：R286.2 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2670(2007)01-0143-05

收稿日期：2006-04-28

作者简介：郭 娟(1974—)，女，四川绵阳人，上海中医药大学 2004 级在读博士，研究方向为中药药理学。
Tel：(021)51322398 E-mail：guojuan338@yahoo.com.cn

*通讯作者 陈长勋 Tel：(021)51322200 E-mail：cxchen6@hotmail.com