

移和复发有密切关系^[11,12]。近来的研究也发现 SRC-3 在白血病细胞系 K562 中呈现高表达,并且与细胞耐药性相关,诱导 SRC-3 表达下调后可能促进白血病细胞的凋亡^[13]。在转基因小鼠中, SRC-3 基因高表达明显促进肿瘤发生^[14],而在基因敲除小鼠模型中, SRC-3 缺乏抑制小鼠肿瘤形成^[15]。因此,有报道认为 SRC-3 可以成为新的化疗靶点。本实验的初步结果显示,在 RPMF8226 细胞中 SRC-3 呈高表达,经不同浓度的鱼藤素处理后,其蛋白和基因表达水平均以浓度依赖性方式逐渐递减。而且发现在 RPMF8226 细胞中, SRC-3 主要位于细胞核内,经鱼藤素干预后, SRC-3 的表达明显减弱,其细胞定位没有明显改变。然而,鱼藤素是如何影响 SRC-3 表达,它又改变了哪些重要蛋白或基因仍不清楚,有待进一步的研究去发现。

综上所述,本实验表明鱼藤素作为一种高效低毒的抗肿瘤活性成分,具有显著抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用,而该作用可能与其抑制 SRC-3 的表达有关,因此有望成为一种新型的高效的抗肿瘤药物。

参考文献:

- [1] Udeani G O, Gerhauser C, Thomas C F, *et al.* Cancer chemopreventive activity mediated by deguelin, a naturally occurring rotenoid [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(16): 3424-3428.
- [2] Zhou G, Hashimoto Y, Kwak I, *et al.* Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(21): 7742-7755.
- [3] Weber A L, Rahemtullah A, Feery J A. Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma of the head and neck: clinical, pathologic, and imaging evaluation [J]. *Neuroimaging Clin N Am*, 2003, 13(3): 371-392.
- [4] Murillo G, Salti G I, Kosmeder J W, *et al.* Deguelin inhibits the growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest [J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(18): 2446-2454.
- [5] Lee H Y, Oh S H, Woo J K, *et al.* Chemopreventive effects of deguelin, a novel Akt inhibitor, on tobacco-induced lung tumorigenesis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(22): 1695-1669.
- [6] Chen W H, Chen Y, Cui G H. Deguelin inhibits expression of IkappaBalpha protein in Raji and U937 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(4): 485-490.
- [7] Liu H L, Chen Y, Cui G H, *et al.* Deguelin regulates the nuclear pore complex proteins Nup98 and Nup88 in U937 cells *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(10): 1265-1273.
- [8] Shu W X, Chen Y, Wu Q, *et al.* Deguelin represses both the expression of nucleophosmin and some nucleoporins: Nup88 and Nup214 in Jurkat cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(1): 27-32.
- [9] Yan J, Tsai S Y, Tsai M J. SRC-3/AIB1: transcriptional co-activator in oncogenesis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(4): 387-394.
- [10] Henke R T, Haddad B R, Kim S E, *et al.* Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(18 Pt 1): 6134-6142.
- [11] Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, *et al.* Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers [J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(3): 217-223.
- [12] Wang Y, Wu M C, Sham J S, *et al.* Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray [J]. *Cancer*, 2002, 95(11): 2346-2352.
- [13] Colo G P, Rosato R R, Grant S, *et al.* RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(26): 5075-5081.
- [14] Torres-Arzayus M I, De Mora J F, Yuan J, *et al.* High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 263-274.
- [15] Kuang S Q, Liao L, Zhang H, *et al.* AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-Ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1875-1885.

利用稻瘟霉模型筛选粗疣合叶苔内生真菌中的活性菌株

郭 蕾¹, 吴锦忠², 许强芝³, 韩 婷¹, 秦路平^{1*}

(1. 第二军医大学药学院 生药教研室, 上海 200433; 2. 福建中医学院 中西医结合研究院, 福建 福州 350003; 3. 第二军医大学 生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

摘要:目的 利用稻瘟霉模型快速筛选粗疣合叶苔内生真菌中具有生物活性的菌株, 并对活性菌株 T11 进行鉴定。方法 首次对粗疣合叶苔内生真菌进行了分离, 通过观察内生真菌醋酸乙酯提取物引起稻瘟霉分生孢子或菌

* 收稿日期: 2008-11-19

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2008J0097)

作者简介: 郭 蕾 (1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为内生真菌活性代谢产物。

Tel.: (021) 81871311 E-mail: guoleialice28@163.com

* 通讯作者 秦路平 Tel/Fax: (021) 25070394 E-mail: qinsmmu@126.com

丝形态生长异常或生长抑制的情况,初步确定具有生物活性的菌株,进一步进行体外抗真菌及抗肿瘤活性筛选,对活性最好的 T11 菌株进行了分类鉴定。结果 粗疣合叶苔分离得到 47 株内生真菌,具有抗稻瘟霉活性的活性菌株 40 株,占总分离菌株的 85.1%。其中 T11 号菌株可明显抑制真菌生长和肿瘤细胞增殖。结论 粗疣合叶苔内生真菌具有明显的抗真菌和细胞毒作用,是潜在的抗菌、抗肿瘤药物资源。

关键词:粗疣合叶苔;内生真菌;稻瘟霉;抗真菌

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)07-1090-05

Screening of active strains in endophytic fungi from *Scapania verrucosa* using biological model of *Pyricularia oryzae*

GUO Lei¹, WU Jin-zhong², XU Qiang-zhi³, HAN Ting¹, QIN Lu-ping¹

(1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. Academy of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional

Chinese Medicine, Fujian 350003, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular

Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract : Objective To rapidly screen the bioactive strains in endophytic fungi from *Scapania verrucosa* by *Pyricularia oryzae* P-2b model and to identify the active strain T11. **Methods** The endophytic fungi were firstly isolated from *S. verrucosa* and the morphological deformation induced by ethyl acetate extract of bioactive fungi or growth inhibition of mycelia germinated from the conidia of *P. oryzae* were observed to screen the bioactive strains whose *in vitro* antifungal activity and cytotoxic effect on tumor cell lines were studied furtherly. The active strain T11 with the best activity was identified by morphological method. **Results** A total of 47 endophytic fungi were isolated from liverwort *S. verrucosa*. Among them, 40 strains (85.1%) of endophytes could induce morphological abnormality of *P. oryzae*. The strain T11 could inhibit tumor cells proliferation and fungal mycelia growth effectively. **Conclusion** Endophytes from *S. verrucosa* have antifungal activity and cytotoxic effect and could be a potential resource for the development of antifungal and antitumor agent.

Key words: *Scapania verrucosa* Heeg.; endophytes; *Pyricularia oryzae*; antifungal activity

苔藓植物是潜在的天然活性产物宝库,其次生代谢物中含有萜类、黄酮类及多种生物活性物质,具有细胞毒、抑制细胞生长、调节植物生长、升压、强心、抗菌、松弛肌肉、释放过氧化物、昆虫拒食及酶抑制等作用,应用前景广阔^[1,2]。但有限的植物资源已成为开发其活性产物的巨大障碍^[3]。近年来发现,植物内生真菌能产生大量新的天然产物^[4,5],有些内生真菌还可以产生与宿主植物相同或相近的代谢产物^[6],是新的天然产物的重要来源。东京大学岩崎成夫以稻瘟霉 *Pyricularia oryzae* P-2b 为模型筛选海洋真菌活性成分时发现,以菌丝念珠状、膨大变形及孢子萌发抑制为指标筛选抗真菌活性成分,和以菌丝卷曲变形为指标筛选抗肿瘤活性成分是可行的。其作用机制与抑制微管蛋白活性,干扰细胞有丝分裂有关^[7]。其中 rhizoxin 和 fusarielin A 已分别开发为抗肿瘤和抗真菌新药^[8,9]。本研究对粗疣合叶苔内生真菌进行了分离,用稻瘟霉模型初筛,对活性较好的菌株进行抗真菌和细胞毒研究,旨在开发新的抗真菌、抗肿瘤药物,开发苔藓类药用植物活性成分的新来源。

1 材料

1.1 样品:粗疣合叶苔 *Scapania verrucosa* Heeg. 于 2006 年 10 月采自浙江雁荡山,由上海师范大学曹同教授鉴定,标本存于第二军医大学药学院生药教研室。取 10 g 样品,室温干燥,用甲醇提取 3 次,合并滤液,浓缩,4 °C 冰箱内保存备用。

1.2 供试菌株和肿瘤细胞:稻瘟霉 *Pyricularia oryzae* P-2b 菌株由复旦大学分子生物学研究所提供;白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC76615、新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) ATCC32609 由长征医院菌种保存中心赠送,红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、熏烟曲霉菌 (*Aspergillus fumigatus*) 由长海医院真菌室提供。A549 (人肺癌细胞)、LOVO (人肠癌细胞)、HL-60 (人白血病细胞)、QGY7703 (人肝癌细胞) 均由上海医药工业研究院药理实验室冻存和传代。

1.3 培养基:分离培养基 PDA 组成为土豆 20%、葡萄糖 2%、琼脂 2%;发酵培养基组成为土豆 20%、葡萄糖 1%、蔗糖 1%;沙堡葡萄糖琼脂培养基 (SDA) 组成为蛋白胨 10 g、葡萄糖 40 g、琼脂

18 g,加入 2 mg/mL 氯霉素水溶液 50 mL,用于培养供试真菌;RPMI 1640 培养液 RPMI 1640 10 g、NaHCO₃ 2.0 g、吗啡啉丙磺酸 34.5 g,加三蒸水 900 mL 溶解,0.5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 (25 °C,定容至 1 000 mL)。YEPD 培养液:酵母浸膏 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g,加三蒸水 900 mL 溶解,加入 2 mg/mL 氯霉素水溶液 50 mL,定容至 1 000 mL。

1.4 仪器:Nikon TS100 倒置显微镜;上海跃进集团 SPX-250B 生化培养箱;太仓市实验设备厂 HYG-A 摇床;苏净集团 SW-CJ-1D 超净工作台;上海博迅实业有限公司 YXQ-LS-75S II 蒸汽灭菌器。

2 方法

2.1 内生真菌的分离纯化:取新采集的粗疣合叶苔用自来水冲洗 30 min,置于 75% 乙醇中消毒 5 min,无菌水冲洗多次,再将样品放入 0.1% HgCl₂ 溶液中进一步消毒 5 min,无菌水冲洗 3 次,贴放于 PDA 平板上,每个平板放置 4 片,25 °C 培养,待菌丝长出后,挑取尖端菌丝移到新的固体平板上继续培养,几次纯化后得到内生真菌。为了检查表面消毒是否彻底,进行对照实验。将最后一次表面消毒后的无菌水涂抹于空白培养基上,置于相同条件下培养。一直无任何菌丝长出,多次重复相同,证明表面消毒彻底。

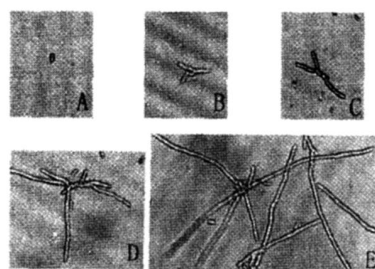
2.2 内生真菌的发酵培养:取斜面培养物 1 cm² 左右,转接入 250 mL 摇瓶装的 100 mL 发酵培养基中,26 °C、180 r/min 摇床振荡培养 5 d,得到发酵液。发酵液经滤过后得到上清液,用等体积的醋酸乙酯萃取 3 遍,浓缩后于 4 °C 保存备用。

2.3 抗稻瘟霉活性检测

2.3.1 稻瘟霉活性检测方法^[10]:将稻瘟霉 P-2b 菌株接种于斜面土豆培养基上,27 °C 培养 12~14 d,用适量无菌水刮取孢子,滤过除去菌丝,得到孢子悬浮液,然后加入 2% 酵母提取物,并用无菌水调节使其最终孢子浓度为 4 × 10⁴ 个/mL,以每孔 50 μL 的量加入 96 孔培养板各孔中。用 10% 甲醇超声配制供试样品使成 10 mg/mL,各取 50 μL 加入 96 孔板第 1 行各孔中,每一列从第一行开始依次倍半稀释到最后孔(即 8 个浓度);以酮康唑和 10% 甲醇溶液作为阳性和阴性对照,同法操作。将加好样品的 96 孔板在 27 °C 培养 16 h,用倒置显微镜观察孢子生长和菌丝变形的情况,以不再抑制稻瘟霉生长作为判断终点,得到最小抑制浓度(MIC)。上

述实验均平行操作 3 次。

2.3.2 活性指标:根据菌丝的卷曲、膨胀、分枝过多或念珠状等形态生长异常现象,可分为 5 个等级(图 1),记录下生长完全抑制的最低浓度 MIC。



A-菌丝完全抑制,孢子不萌发 B-菌丝强烈抑制
C-菌丝中度抑制 D-菌丝轻度抑制 E-正常生长的菌丝
A-growth inhibition B-strong morphological deformation
C-moderate morphological deformation D-slight morphological deformation E-control

图1 稻瘟霉生长状态示意图

Fig.1 Morphological deformation of *P. oryzae*

2.4 抗真菌活性测定

2.4.1 真菌液制备:从 SDA 培养基上挑取新生隐球菌、白色念珠菌、球状菌少量,接种至 1 mL YEPD 培养液,于 35 °C、250 r/min 振荡培养,活化 16 h,使真菌处于指数生长期后期。取该菌液至 1 mL YEPD 培养液中,用上述方法再次活化,16 h 后,用血细胞计数板计数,以 RPMI 1640 培养液调整菌液浓度至 1 × 10³~5 × 10³ 个/mL。将丝状菌接种至 SDA 斜面,烟曲霉菌 35 °C,培养 1 周;红色毛癣菌 28 °C,培养两周。活化两次后,加适量 RPMI 1640 培养液于 SDA 斜面,用吸管吹打菌落,使真菌孢子游离于 RPMI 1640 培养液中,然后经 4 层无菌纱布滤过。培养液经血细胞计数板计数后,加 RPMI 1640 培养液调整孢子浓度至 1 × 10³~5 × 10³ 个/mL。

2.4.2 检测方法:取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加 RPMI 1640 100 μL 作空白对照;3~12 号孔各加新鲜配制的菌液 120 μL;2 号孔分别加菌液 160 μL 和样品溶液(分别用 DMSO 配成 12.8 g/L) 1.6 μL。2~11 号孔 10 级 4 倍稀释,使各孔中的药物终质量浓度分别为 128、32、8、2、0.5、0.125、0.0313、0.0078、0.0020、0.00049 mg/L,各孔中 DMSO 体积分数均低于 1%;12 号孔不含药物,作阳性对照。各药敏板于 35 °C 培养。念珠菌、新生隐球菌及丝状菌分别于 35 °C 培养 24、72 h 和 1 周后,用酶标分析仪于 630 nm 测各孔吸光度(A)值。与阳性对照孔比较,以 A 值下降 50% 以上的最低浓度孔中的药物浓度为 MIC₅₀(真菌生长 50% 被抑制时

的药物浓度)。当药物的 MIC₅₀ 值超过测定浓度范围时,按以下方法进行统计:MIC₅₀ 值高于最高浓度 128 mg/L 时,计为“ > 128 mg/L ”;MIC₅₀ 值为最低浓度或在最低浓度以下时,不作区别,均计为“ ≤ 0.000 49 mg/L ”。上述实验均平行操作 3 次。

2. 5 抑制肿瘤细胞增殖实验

2. 5. 1 肿瘤细胞培养与供试样品配制:将肿瘤细胞培养于 RPMI 1640 培养液中,加入 15 % 胎牛血清,1 % 抗生素 (1 × 10⁷ U/L 青霉素、10 μg/L 链霉素)于 37 °C、5 % CO₂ 的湿热培养箱中培养。每 2 天继代培养,使细胞保持在对数生长期。对具有较好抗稻瘟霉活性的 10 种内生菌提取物均分别用 DMSO (Merck) 溶解后,加入 PBS 配成 1 000 μg/mL 的溶液。

2. 5. 2 细胞毒活性测定:96 孔板每孔加入浓度为 4 × 10⁴ ~ 6 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液 100 μL,置 37 °C、5 % CO₂ 培养箱内。24 h 后加入样品液,10 μL/孔,设双复孔,同时设阳性对照、空白对照,在 37 °C、5 % CO₂ 作用 72 h。然后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,作用 4 h 后加入溶解液,100 μL/孔,置培养箱内,溶解后用 MK-2 全自动酶标仪于 570 nm 处测 A 值,计算 IC₅₀ 值。

2. 6 内生真菌的鉴定:真菌鉴定按常规方法进行。将 PDA 培养基薄片置于载玻片上。挑取纯化的菌株尖端菌丝,接种后盖上盖玻片培养,真菌即在载玻片与盖玻片之间有限的空间内沿盖玻片横向生长。培养一段时间后,将载玻片置于显微镜下观察。结合菌落形态、颜色、生长速率及显微镜下分生孢子的结构及大小,分生孢子梗的形态等,将菌鉴定到属^[11,12]。

3 结果

3. 1 抗稻瘟霉活性:从粗疣合叶苔中分离出 47 株真菌 (T1~T47),以稻瘟霉孢子形态异常或生长抑制为活性指标,对真菌进行初步筛选,得到 40 株有活性的菌株,占总分离菌株的 85. 1 %。经过多次反复筛选得到活性较好的 8 株,其中 T27 菌株能引起稻瘟霉孢子畸形为变形活性。见表 1。

3. 2 抗真菌活性:进一步考察对稻瘟霉有较好活性的 8 株菌的抗真菌活性,酮康唑为阳性对照,结果见表 2。可见,大多菌株都有较好的抗病原真菌作用,且比原植物本身的活性好。

3. 3 抑制肿瘤细胞增殖:对于具有较好抗稻瘟霉活性的 8 种内生真菌提取物,采用 MTT 法^[13],以两性霉素为阳性对照,进行细胞毒性测定,结果见表 3。从粗疣合叶苔中分离得到的 8 株内生菌对体外培养

的 4 种肿瘤细胞生长均有不同程度的抑制作用。

表 1 粗疣合叶苔及其内生菌抗稻瘟霉活性 (n = 3)

Table 1 Anti-*P. oryzae* activity of *S. verrucosa* and its endophytic fungi (n = 3)

样品	MIC (μg · mL ⁻¹)	样品	MIC (μg · mL ⁻¹)	样品	MIC (μg · mL ⁻¹)	样品	MIC (μg · mL ⁻¹)
T1	500.0	T13	> 500.0	T25	500.0	T37	500.0
T2	500.0	T14	250.0	T26	250.0	T38	250.0
T3	125.0	T15	500.0	T27	125.0	T39	250.0
T4	250.0	T16	250.0	T28	62.5	T40	250.0
T5	250.0	T17	250.0	T29	125.0	T41	500.0
T6	> 500.0	T18	500.0	T30	125.0	T42	250.0
T7	250.0	T19	500.0	T31	7.8	T43	250.0
T8	> 500.0	T20	250.0	T32	125.0	T44	> 500.0
T9	> 500.0	T21	> 500.0	T33	250.0	T45	125.0
T10	125.0	T22	500.0	T34	> 500.0	T46	250.0
T11	62.5	T23	500.0	T35	31.2	T47	500.0
T12	62.5	T24	62.5	T36	62.5	粗疣合叶苔	500.0

表 2 粗疣合叶苔及其内生菌的抗真菌活性 (n = 3)

Table 2 Antifungal activity of *S. verrucosa* and its endophytic fungi (n = 3)

样品	MIC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)			
	白色念珠菌	新生隐球菌	红色毛癣菌	蕈烟曲霉菌
粗疣合叶苔	> 128.0	64.0	64.0	> 128.0
T11	8.0	8.0	8.0	8.0
T12	32.0	8.0	32.0	> 128.0
T24	32.0	128.0	128.0	> 128.0
T28	32.0	32.0	32.0	> 128.0
T31	> 128.0	32.0	32.0	32.0
T32	32.0	32.0	128.0	> 128.0
T35	32.0	32.0	32.0	32.0
T36	32.0	32.0	32.0	128.0
酮康唑	0.25	0.5	4.0	64.0

表 3 粗疣合叶苔及其内生菌对人体肿瘤细胞的体外增殖抑制作用 (n = 3)

Table 3 Inhibition of *S. verrucosa* and its endophytic fungi on proliferation of human tumor cells in vitro (n = 3)

样品	IC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)			
	A549	LOVO	HL-60	QGY7703
粗疣合叶苔	> 100.00	> 100.00	42.00	> 100.00
T11	5.79	12.63	1.26	7.89
T12	13.51	63.40	10.34	47.20
T24	39.62	53.55	34.64	> 100.00
T28	9.14	18.63	1.13	40.25
T31	> 100.00	9.11	4.06	31.23
T32	9.12	30.13	6.78	> 100.00
T35	43.96	> 100.00	62.77	> 100.00
T37	> 100.00	> 100.00	39.79	> 100.00
两性霉素	0.020 7	0.734 0	0.020 7	0.011 0

3. 4 T11 菌株的遗传稳定性:抑制稻瘟霉分生孢子生长活性较强的 T11 号菌株,同时又有最好的抗真菌活性,并且有较好的抑制肿瘤细胞作用。为此,考察了其遗传稳定性情况,将 T11 菌株传 3 代,每 1

代分别进行发酵培养,其提取物抑制稻瘟霉生长的MIC均为62.5 $\mu\text{g/mL}$,证明稳定性良好。

3.5 T11的分类鉴定:菌丝淡灰色,早期不明显,子囊壳表生,球形,壁初期半透明,成熟后色暗,膜质,四周有毛。子囊棍棒形,内有8个子囊孢子,子囊壁早期胶化,使子囊散在子囊壳内,子囊孢子单细胞,柠檬形,橄榄色。菌落初期白色,后为褐色,可见针头大小的颗粒。鉴定其属为毛壳属 *Chaetomium* sp.。

4 讨论

从天然产物中筛选生物活性成分或先导化合物是研究创制新药的有效途径之一。目前已证实,许多来自植物的天然产物与植物内生真菌有密切关系,甚至也是内生真菌的次生代谢产物。近年来,植物内生真菌化学成分的研究备受关注,发现了许多具有新颖结构和独特生理活性的化合物^[14]。由于苔藓植物生境特殊,其内生真菌的生境较种子植物内生真菌生境更为特殊。鉴于苔藓植物尤其是苔类植物具有独特的细胞或油体,富含萜类和酚类等多种活性成分,体现抗肿瘤、抗菌等多种生理活性作用,而且植物株型小,资源蕴藏量少,因此,从苔类植物中筛选能够合成具有抑制真菌和肿瘤细胞生长活性成分的内生真菌意义重大。

本实验利用这一简单、快速的生物检测模型和方法从粗疣合叶苔内生真菌中筛选出多株产生抗真菌、细胞毒活性物质的菌株。通过对抗稻瘟霉活性与体外细胞毒活性比较发现,具有较好的抗稻瘟霉活性的真菌提取物,大多也能够抑制肿瘤细胞增殖,这说明稻瘟霉体系与细胞水平的抗癌筛选体系具有较好的平行性。由于该方法具有快速、重现性好、用样量少、费用低、操作简单、易于观察和判断活性等特点,因此是较好的初筛模型,对于寻找抗真菌、抗癌先导化合物具有很好的指导作用。

T11菌株具有良好的活性及稳定性,对其二次代谢产物进行活性跟踪分离,可望从中得到强抑制真菌活性的新的化合物,为研制开发新的有效的抗真菌药物提供必要的先导化合物。通过对其次级代谢产物初步进行活性跟踪分离,已得到了3个活性

化合物,其结果将随后报道。

粗疣合叶苔本身具有抗真菌和细胞毒作用,其内生菌发酵液对真菌和肿瘤细胞也有抑制作用,二者是一致的,这也再次证明了植物内生菌可产生与寄主类似药理活性物质的理论。如果内生菌产生的活性物质和苔藓的化学成分一致,那么采用发酵培养内生菌就可以解决因苔藓难以人工栽培将导致资源短缺的问题。

参考文献:

- [1] Atta-urRahman. *Studies in Natural Products Chemistry* [M]. Vol. 2. Amsterdam: Elsevier, 1988.
- [2] Chopra R N, Bhatla S C. *Bryophytes Development: Physiology and Biochemistry* [M]. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- [3] 范庆书, 赵建成, 于树宏. 中国苔藓植物资源应用价值分析及保护对策 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(8): 1555-1559.
- [4] 王兴红. 内生真菌与天然产物研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 140-143.
- [5] Gurney K A, Mantle P G. Biosynthesis of 1-N-methylalbonoursin by an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from perennial ryegrass [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56: 1194-1198.
- [6] 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.
- [7] Kobayashi H, Namikoshi M, Yoshimoto T, et al. A screening method for antimitotic and antifungal substances using conidia of *Pyricularia oryzae*, modification and application to tropical marine fungi [J]. *J Antibiot*, 1996, 49(9): 873-879.
- [8] Tsuruo T, Ohhara T, Lida H, et al. Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine resistant sublines [J]. *Cancer Res*, 1986, 46(1): 381-385.
- [9] Kobayashi H, Sunaga K, Furihata K, et al. Isolation and structures of an antifungal antibiotic, fusarielin A, and related compounds produced by a *Fusarium* sp [J]. *J Antibiotics*, 1995, 48(1): 42-52.
- [10] 赵玲玲, 张惠平. 9F系列海洋真菌代谢产物分离纯化及稻瘟霉活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 677-680.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1979.
- [12] Richard T H. *Illustrated Genera of Ascomycetes* [M]. St. Paul: APS Press, 1990.
- [13] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [14] 舒莹, 郭顺星, 张东明, 等. 植物内生真菌活性成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 772-776.