

产冬凌草甲素菌株筛选鉴定及其抗肿瘤活性研究

魏 硕¹, 董诚明^{1,2*}, 朱昀昊^{1,2}, 乔毅琳³, 李 璐¹

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450008

2. 呼吸疾病河南省协同创新中心, 河南 郑州 450008

3. 天津大学药学院, 天津 300072

摘要: 目的 对冬凌草内生真菌进行筛选鉴定, 并研究其体外抗肿瘤活性, 以期得到冬凌草甲素高产抗肿瘤活性菌株。方法 采用 TLC 法和 HPLC 法对前期从冬凌草中分离出的 256 株内生真菌进行筛选, HPLC-MS 测定菌株发酵液中的冬凌草甲素。结合形态学特征、ITS 序列对筛选出的菌株进行鉴定。MTT 法测定筛选菌株的体外抗肿瘤活性。结果 从冬凌草中分离出的 256 株内生真菌经筛选, 获得 1 株冬凌草甲素高产菌株 M-J-5, 鉴定为青霉属草酸青霉菌 *Penicillium oxalicum* Currie et Thom, 其对人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞活性具有一定抑制作用。结论 从冬凌草内生真菌中筛选得到产冬凌草甲素且具抗肿瘤活性的菌株 M-J-5。

关键词: 冬凌草甲素; 内生真菌; 抗肿瘤; 草酸青霉菌; 人乳腺癌细胞系 MCF-7

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)15-3127-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.018

Selection and identification of oridonin high yield strain and its antitumor activity

WEI Shuo¹, DONG Cheng-ming^{1,2}, ZHU Yun-hao^{1,2}, QIAO Yi-lin³, LI Lu¹

1. Henan University of Chinese Medicine College of Pharmacy, Zhengzhou 450008, China

2. Henan Innovation Centre for Respiratory Diseases, Zhengzhou 450008, China

3. Tianjin University College of Pharmacy, Tianjin 300072, China

Abstract: Objective To select and identify the endophytic fungi of *Rabdosia rubescens* as well as study on its antitumor activity *in vitro* in order to obtain the high yield strains of oridonin. **Methods** Using the methods of TLC and HPLC, the oridonin high yield strain was selected from 256 strains of endophytic fungi which were isolated from the previous experiments. Oridonin of fermentation broth was determined by HPLC-MS. The strain was identified by morphological characteristics and ITS sequence methods and its antitumor activity *in vitro* was detected by MTT assay. **Results** An oridonin high yield strain M-J-5 was obtained and identified as *Penicillium oxalicum*, which can inhibit the activity of human breast cancer cell line MCF-7. **Conclusion** a oridonin high yield strain is obtained with antitumor activity and provides scientific basis for microbial production of oridonin and the development of new anticancer drugs.

Key words: oridonin; endophytic fungi; antitumor; *Penicillium oxalicum* Currie et Thom; MCF-7 cell line

药用植物一直以来是筛选天然药物的主要原料, 但是具有活性的物质有时在植物组织中的量并不高, 有的只存在于植物的某个生长阶段或者某个组织中^[1]。植物内生真菌是指在其生活史的一定阶段或全部阶段, 生活于健康植物的各种组织和器官细胞间隙或细胞内的菌株, 包括菌根真菌和植物病原菌^[2]。植物内生菌具有丰富的生物多样性, 能产生与宿主植物相同或相近的代谢产物, 从而具有很

高的开发利用价值。自从 1993 年 Stierle 等^[3]首次从短叶紫杉的树皮中分离出 1 株对乳腺癌、卵巢癌等有显著疗效的产紫杉醇和其他紫杉烷类化合物的内生真菌后, 从植物中分离产活性成分的菌株一直成为学者研究的重点。

冬凌草为唇形科植物碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的干燥地上部分。二萜类成分是冬凌草的主要成分, 主要骨架构型包括对映贝壳杉烷型

收稿日期: 2017-02-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603232)

作者简介: 魏 硕 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与开发。Tel: 13783674540 E-mail: hnzywei@163.com

*通信作者 董诚明, 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药资源与开发。Tel: 13592508163 E-mail: dcm371@hactcm.edu.cn

(*ent*-kaurane) 和螺断贝壳杉烷型 (*seco-ent*-kaurane) 两大类^[4], 其中四环贝壳杉烷类二萜成分, 具有抗肿瘤活性^[5-7], 一直受到国内外学者的关注, 冬凌草甲素 (oridonin) 为其中的主要成分。迄今, 国内外对于冬凌草内生真菌的研究集中于分离鉴定, 将活性成分、抗肿瘤活性结合起来的研究鲜有报道, 因此本实验以冬凌草内生真菌为研究对象, 旨在筛选出具有抗肿瘤活性的冬凌草甲素高产菌株, 为研发新型抗肿瘤药物提供基础。

1 材料

1.1 菌株

所用菌株为本课题组前期实验从冬凌草中分离出的 256 株内生真菌^[8], 冬凌草植物采自河南中医药大学药用植物园, 经河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为唇形科植物碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara。

1.2 供试细胞株

人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞购自中国科学院上海细胞所。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 自制: 马铃薯 200 g (去皮煮汁, 取滤液), 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 6.5 g, 蒸馏水 1 L; 马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB) 即为 PDA 不加琼脂粉; RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司。

1.4 试剂和仪器

普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; 氨苄青霉素 (北京 Biosharp 生物有限公司, 批号 2016-04); 10×PCR Buffer 及质粒载体、dNTP、pMD19-T Vector、Taq DNA 聚合酶 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; 冬凌草甲素 (中国食品药品检定研究院, 批号 111871-201502, 质量分数 99.5%)。Waters e2695 高效液相色谱仪; Thermo LTQ 三重四级杆液质联用仪 (德国赛默飞公司)。

1.5 引物

引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 具体序列 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

2 方法

2.1 产冬凌草甲素菌株的筛选

2.1.1 冬凌草内生真菌发酵培养 将前期培养好的 256 株内生真菌分别接种于 PDB 培养基中发酵

培养 7 d。发酵液滤去菌丝, 滤液离心 15 min (10 000 r/min), 取上清并加入 1 g 醋酸铅, 静置, 离心, 再次收集上清液, 重复上述步骤 2 次, 将所有上清液合并后, 加入 1.5 mol/L 的氯化钠溶液静置过夜, 留取上清。

2.1.2 冬凌草甲素对照品溶液的制备 取冬凌草甲素对照品, 精密称定, 加甲醇制成 60 μg/mL 的溶液, 即得。

2.1.3 TLC 法筛选 取“2.1.1”项下制备的上清液 80 °C 浓缩至 10 mL 制得供试品溶液。以二氯甲烷-乙醇-丙酮 (36:3:1) 为展开剂进行 TLC 检测。

2.1.4 HPLC 法筛选^[9] 将 TLC 方法得到的产冬凌草甲素的菌株发酵液按“2.1.1”项下方法处理, 吸取 10 mL 上清液, 用 50 mL 甲醇超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 滤过, 取 10 mL 续滤液 80 °C 水浴浓缩, 残渣用流动相溶解, 定容至 10 mL, 摇匀, 即为供试品溶液。C₁₈ 色谱柱 (250 mm×2.0 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (55:45) 为流动相, 体积流量为 0.8 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温 30 °C, 检测波长为 239 nm。

2.1.5 HPLC-MS 法测定^[10] 色谱条件: C₁₈ 色谱柱 (250 mm×2.0 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (55:45), 体积流量 0.2 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温 25 °C。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 曲型脱溶剂装置 (CDL) 温度 300 °C, 鞘气体积流量 275.8 kPa (40 psi), 喷雾电压 3.5 kV, 负离子方式检测, 选择离子监测 (SIM) 模式。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态学鉴定 经过 TLC 和 HPLC 筛选出的产冬凌草甲素的活性菌株, 接种至新的 PDA 培养基中培养 3 d, 采用显微技术, 参照《真菌鉴定手册》^[11], 根据孢子结构及外部形态进行初步鉴定。

2.2.2 分子生物学鉴定 用真菌核糖体 DNA 间隔转录区 (internal transcribed spacer, ITS) 通用引物对真菌目标区域进行扩增, 经过电泳、纯化及克隆之后进行测序。

2.3 抗肿瘤活性测定

人乳腺癌 MCF-7 细胞, 在 37 °C、5% CO₂ 的条件下, 用含 10% 小牛血清的有酚红 RPMI 1640 培养液培养。取保存的 M-J-5 菌株经平皿活化后, 在 PDB 培养基中震荡 6 d, 滤过, 取滤液 5 mL 经 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 挥干, 用二甲基亚砜溶解, 并稀释 1×10³、1×10⁴、1×10⁵ 倍, 备用。

参考文献方法^[12], 进行 MTT 细胞增殖实验。运用酶标仪在 570 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值, 计算平均 A 值和细胞增殖抑制率。

增殖抑制率 = $1 - (\text{实验组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值}) / \text{空白组 } A \text{ 值}$

3 结果

3.1 TLC 检测结果

利用 TLC 法对分离出的 256 株内生真菌进行定性检测, 结果显示有 1 株内生真菌发酵液提取物斑点与冬凌草甲素对照品接近, 其 R_f 值均在 0.57 左右, 故推测这株内生真菌的次生代谢产物中可能产冬凌草甲素类化合物, 为进一步确定实验结果的准确性, 继续采用 HPLC 法对这株内生真菌 (编号为 M-J-5) 进行定量检测。

3.2 HPLC 法检测结果

HPLC 法对经过 TLC 筛选出的疑似产冬凌草甲素类化合物的菌株进行检测, 结果显示, 菌株 M-J-5 发酵液中含冬凌草甲素, 质量浓度为 0.211 g/L。

3.3 HPLC-MS 法检测结果

对比冬凌草甲素对照品以及菌株发酵液样品质谱图 (图 1), 二者出峰时间相同, 均有 m/z 为 363 的离子峰, 为冬凌草甲素的分子离子峰。

3.4 菌株 M-J-5 鉴定结果

3.4.1 形态学鉴定结果 经过初步的形态学鉴定, 菌株 M-J-5 可能为青霉属真菌, 其特征如下: 菌落

青绿色, 孢子粉呈绿色粉末状, 分生孢子梗紧密直立, 从菌丝垂直生出, 有横隔膜, 顶端生, 排列成呈扫帚状 (图 2), 分生孢子椭圆形, 单孢 (图 2)。

3.4.2 分子生物学鉴定结果 以 ITS1/ITS4 为引物, M-J-5 的总 DNA 为模板, 扩增出一条 544 bp 的序列。通过 BLAST 程序检索, 该片段与草酸青霉菌 *Penicillium oxalicum* Currie et Thom、*P. swiecickii* K. M. Zalessky、*P. ribeum* J. Nat、羊毛状青霉 *P. kojigenum* G. Sm 的 DNA 序列相似度最高, 一致性分别为 97%、93%、91%、91%。利用在线 BLAST 程序对内生真菌 M-J-5 的 ITS 序列进行同源性分析, 从中选取亲缘关系最近的菌株序列, 使用 MEGA 5.0 软件进行 Clustal W 比对, 采用 Neighbor-joining 方法, 构建进化树, 结果见图 3。可知, 青霉属草酸青霉菌 *P. oxalicum* 多条序列与菌株 M-J-5 具有很好的相似度, 因此本实验将菌株 M-J-5 鉴定为青霉属草酸青霉菌 *Penicillium oxalicum* Currie et Thom。

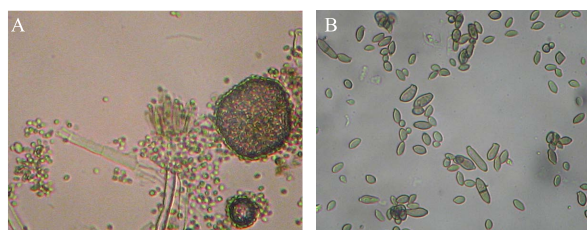


图 2 菌株 M-J-5 的分生孢子梗 (A) 和单孢子 (B) (10×40)
Fig. 2 Conidiophores (A) and monospore (B) of endophytic fungi strain M-J-5 (10×40)

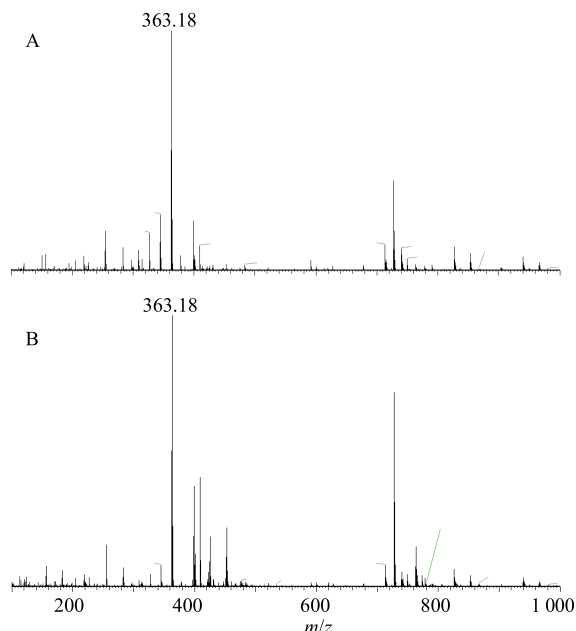


图 1 冬凌草甲素对照品 (A) 和菌株发酵液样品 (B) 质谱图
Fig. 1 Mass spectra of oridonin standard substance (A) and endophytic fungi sample (B)

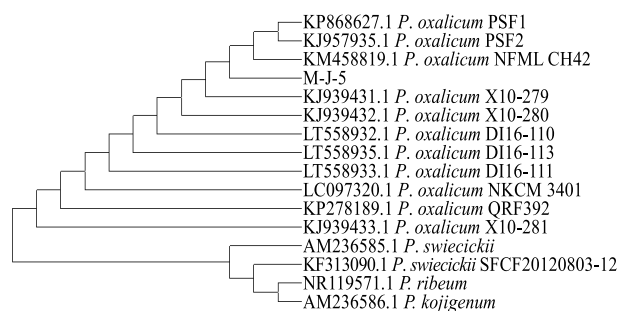


图 3 M-J-5 菌株系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of M-J-5

3.5 MTT 细胞增殖实验结果

随着 M-J-5 发酵稀释液浓度不断增加以及作用时间不断延长, 活细胞数目呈递减趋势, 呈现出时间-剂量依赖性。不同稀释倍数的 M-J-5 发酵液作用 24、48、72 h 后细胞增殖抑制率结果见表 1。可以

表 1 M-J-5 发酵稀释液对 MCF-7 细胞的增殖抑制率
($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 1 Inhibition of M-J-5 on growth of MCF-7 cells
($\bar{x} \pm s, n=5$)

样品	稀释 倍数	增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
M-J-5	1×10^3	$78.27 \pm 4.02^{**}$	$83.62 \pm 2.52^{**}$	$83.96 \pm 3.46^{**}$
	1×10^4	$3.13 \pm 0.02^{**}$	$3.66 \pm 0.15^{**}$	$5.36 \pm 0.20^{**}$
	1×10^5	$0.00 \pm 0.00^{**}$	$1.88 \pm 0.16^{**}$	$3.99 \pm 0.17^{**}$

M-J-5 各浓度间两两比较: $^{**}P < 0.01$ $^{**}P < 0.01$ vs various concentrations

看出, 处理 24、48、72 h 后, 菌液稀释 1×10^3 倍下 M-J-5 菌株发酵液的增殖抑制率显著大于 1×10^4 和 1×10^5 稀释倍数, 当培养 72 h 后其最大增殖抑制率可达 83.96%。

4 讨论

实验采用 TLC 法对前期实验从冬凌草中分离出的 256 株内生真菌进行初步筛选, 发现有 1 株产生的斑点的 Rf 值与冬凌草甲素对照品相近, HPLC 法分析其发酵液样品的出峰时间与冬凌草甲素对照品一致。为了进一步证实菌株发酵液中是否存在冬凌草甲素, 本实验结合了液质联用技术, 对比冬凌草甲素对照品与样品, 发现在相同出峰时间时, 均有冬凌草甲素分子离子峰 m/z 363 存在, 因此确认菌株 M-J-5 产冬凌草甲素, 进一步经真菌形态和 ITS 序列比对, M-J-5 鉴定为草酸青霉菌。

并采用 MTT 法进行了抗肿瘤实验, 结果验证本实验筛选出的菌株 M-J-5 冬凌草甲素的量较高, 但是尚无法满足工业化生产, 因此利用基因工程和发酵调控等手段实现菌株的改良和代谢产物产量的提高将是今后研究的重点。

参考文献

- [1] Sati S C, Pargaen N, Belwal T. Three species of aquatic hyphomycetes as new root endophytes of temperate forest plants [J]. *Nat Acad Sci India*, 2006, 29(2): 9-10.
- [2] Andrews J H, Hirano S S. *Microbial Ecology of Leaves* [M]. New York: Springer, 1991.
- [3] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxant production by Taxomyces and reanaean endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(9): 214-216.
- [4] 郭萍, 李玉山, 郭远强. 冬凌草化学成分和药理活性研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(2): 144-147.
- [5] 张典瑞, 任天池. 冬凌草甲素的药理学研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2003, 38(11): 817-820.
- [6] 王汉楚, 沙丽晓, 陈小燕, 等. 冬凌草甲素对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的拮抗作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 534-539.
- [7] 季宇彬, 江剑, 高世勇. 冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2051-2055.
- [8] 张丽平, 孟林, 杜真辉. 冬凌草内生真菌的分离研究 [J]. *河南中医*, 2015, 35(10): 2562-2564.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015
- [10] 杨桂芹, 房世红, 董欣, 等. LC-MS 法测定犬血浆中冬凌草甲素含量 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(5): 912-916.
- [11] 魏景超. *真菌鉴定手册* [M]. 上海: 上海科技出版社, 2003.
- [12] 戴子敬, 杨小生, 朱海燕. 植物内生真菌的研究现状 [J]. *江西中医学院学报*, 2007, 2(1): 98-100.