

# 海南粗榧内生真菌抗肿瘤抗菌活性的筛选

戴文君 戴好富 陈 苹 吴 娇 梅文莉\*

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所 农业部热带作物生物技术重点开放实验室 海南 海口 571101)

**摘 要:** 对 72 株海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis* Li)内生真菌进行了抗肿瘤和抗菌活性筛选。结果显示,有 9 株内生真菌至少对一种指示瘤株具有细胞毒活性,5 株内生真菌对金黄色葡萄球菌有较强的抑菌活性,1 株内生真菌对辣椒疫霉有抑制作用。这表明海南粗榧内生真菌是寻找有价值的生物活性成分的潜在资源,其生物活性成分值得进一步研究。

**关键词:** 海南粗榧, 内生真菌, 细胞毒活性, 抗菌活性

## Screening of Antitumor and Antimicrobial Activities of the Endophytic Fungi Isolated from *Cephalotaxus hainanensis* Li

DAI Wen-Jun DAI Hao-Fu CHEN Ping WU Jiao MEI Wen-Li\*

(Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

**Abstract:** Seventy-two endophytic fungi isolated from *Cephalotaxus hainanensis* Li were screened for anti-tumor and antimicrobial activities. The results showed that 9 strains presented cytotoxic activities to at least one of the tested tumor cells, five strains exhibited strong antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, one strain had inhibitory effect on *Phytophthora parasitica*. It was evidently that the endophytic fungi of *C. hainanensis* are potential resources to find valuable bioactive components.

**Keywords:** *Cephalotaxus hainanensis* Li, Endophytic fungi, Cytotoxic activity, Antimicrobial activity

海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis* Li)为三尖杉科(Cephalotaxaceae)三尖杉属(*Cephalotaxus*)植物,该属植物因含有抗癌活性的三尖杉酯类生物碱成分而倍受关注,其中高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱已成为治疗白血病的临床药物<sup>[1]</sup>。海南粗榧是三尖杉属植物中分布最南的一个种,研究表明其抗癌活性成分含量在国产种中是最高的<sup>[2]</sup>,但因其生长缓慢,加之过度采伐,目前数量稀少,已成为国家二级保护植物。近年来,植物内生真菌的次生代谢产物研究发展迅速,已经分离得到生物碱、甾体、萜类、

醌类、木脂素等多种类型化合物,并多具有抗肿瘤、抗菌、促进宿主植物生长、生物防治等生物活性<sup>[3]</sup>。我们已从海南粗榧的树皮、枝和叶中分离得到 72 株内生真菌<sup>[4]</sup>,本文对这些内生真菌的抗肿瘤和抗菌活性进行了初步筛选,为进一步研究活性菌株中的活性成分奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 内生真菌:海南粗榧内生真菌 72 株,由本实

实验室自海南省尖峰岭海南粗榧的树皮、枝和叶中分离获得,保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

**1.1.2 肿瘤细胞株:** SMMC-7721(人肝癌细胞)、SGC-7901(人胃癌细胞)和 K562 (慢性髓原白血细胞)均购于中科院上海生命科学研究院细胞库。

**1.1.3 人体病原菌:** 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 51650、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) ATCC 9551 和白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所洪葵教授提供。

**1.1.4 植物病原菌:** 辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)、瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)、钟器腐霉(*Pythium vexans*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)由中国热带农业科学院热带生物技术研究所曾会才研究员提供。

**1.1.5 培养基:** 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 定容至 1 L, pH 自然; 马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 定容至 1 L, pH 自然; 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 定容至 1 L, pH 7.4~7.6; 酵母粉胨葡萄糖琼脂培养基(YPD): 葡萄糖 20 g, 胰蛋白胨 20 g, 酵母粉 10 g, 定容至 1 L, pH 7.0; 肿瘤细胞株采用 RPMI1640 完全培养基。

## 1.2 方法

**1.2.1 待测样品制备:** 将试管斜面保存的内生真菌种经 PDA 培养基活化后,切取黄豆粒大小的菌丝块,接种于 400 mL/L 的三角瓶 PDB 培养基中,室温,160 r/min 培养 7 d 后,静置培养 21 d,以不接种 PDB 培养基为阴性对照。无菌条件下取发酵液 15 mL 于离心管中,12000 r/min 离心 30 min 后取上清液,用 0.2 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20°C 保存备用。

**1.2.2 抗肿瘤活性测定:** 以 SMMC-7721、SGC-7901 和 K562 细胞为指示瘤株,采用 MTT<sup>[5]</sup>法测定体外细胞毒活性。选取对数生长期的细胞,用 RPMI1640 完全培养基制成单细胞悬浮液,血球计数板计数,按 50000 个/mL 接种 90 μL 于 96 孔平底细胞培养板, K562 中直接加入真菌发酵液样品 10 μL, SMMC-7721 和 SGC-7901 经培养 24 h 后,再加入样品 10 μL; 以无菌生理盐水为阴性对照,培养条件为 5% CO<sub>2</sub>、

湿度 90%以上、37°C,加入样品后继续培养 72 h,之后取出,置于显微镜下观察每孔细胞形态。然后加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 15 μL,37°C 反应 4 h 后,吸弃上清,再向各孔加入 100 μL DMSO,充分溶解,用 ELX-800 酶标仪测量各孔的 OD 值(测量波长为 490 nm),按下式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

**1.2.3 抗人体病原菌活性测定:** 采用杯碟法<sup>[6]</sup>测定样品抗菌活性。*S. aureus* 和 MRSA 采用 NA 培养基,*C. albicans* 采用 YPD 培养基。将 *S. aureus*、MRSA 和 *C. albicans* 分别制成一定浓度的菌悬液(10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup> CFU/mL),用棉签将其均匀涂布于供试无菌平板,制成含菌平板,每个平板放置 4 个牛津杯,分别取样品 200 μL 加入其内,每处理重复 3 次,以 PDB 培养基为阴性对照,*S. aureus* 和 MRSA 37°C 恒温培养,*C. albicans* 28°C 恒温培养。24 h 后观察结果,测量并记录抑菌圈直径。

**1.2.4 抗农业病原菌活性测定:** 采用杯碟法初步测定样品抗菌活性。自 4 种植物病原真菌的固体纯培养物中截取圆形(Φ=8 mm)的小块分别置于 PDA 平板中心,在其周围等距放置 3 个牛津杯,分别取样品 200 μL 加入其内,每处理重复 3 次,以 PDB 培养基为阴性对照,28°C 恒温培养。钟器腐霉和瓜果腐霉培养 1 d,尖孢镰刀菌和辣椒疫霉培养 7 d,测量并记录抑菌带的宽度。选取具有抑菌活性的样品,采用生长速率法<sup>[7]</sup>测定其抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{实验组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - 8} \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 海南粗榧内生真菌的抗肿瘤活性

采用 MTT 法对 72 株内生真菌的抗肿瘤活性进行了初步筛选,有 9 株分离自海南粗榧树皮部位的内生真菌至少对一种指示瘤株显示了细胞毒活性,活性结果见表 1。其中,菌株 S8 对 3 株细胞的生长均有抑制作用(图 1),对 SMMC-7721 和 SGC-7901 的抑制率较高,分别为 75%和 81%;菌株 S16 的抗肿瘤活性具有一定的选择性,仅对 SGC-7901 显示出较强的抑制作用,抑制率为 87%。

表 1 海南粗榧内生真菌的细胞毒活性  
Table 1 The cytotoxic activity of endophytic fungi from *C. hainanensis*

属/纲 Genus/Class	菌株编号 Strain No.	抑制率 Inhibitory rate (%)		
		SMMC-7721	SGC-7901	K562
刺盘孢属 <i>Colletotrichum</i>	S3	60	—	75
镰孢霉属 <i>Fusarium</i>	S16	—	87	—
	S24	62	72	—
担子菌纲 Basidiomycetes	S81	52	—	—
	S27	61	70	—
无孢菌群 <i>Mycelia sterilia</i>	S1	58	62	—
	S8	75	81	60
	S15	60	68	—
	S36	56	51	—

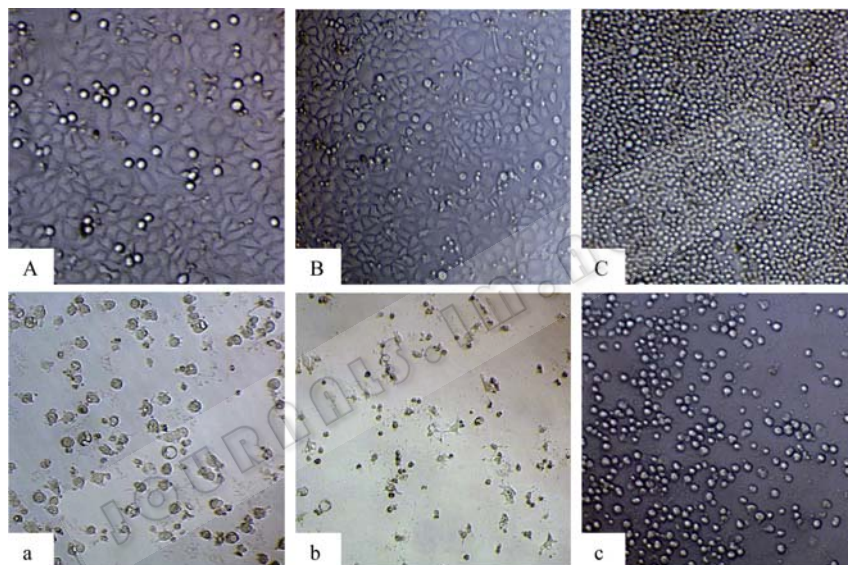


图 1 内生真菌 S8 的抗肿瘤活性图片( $\times 150$ )

Fig. 1 The photos of antitumor activities of endophytic fungus S8 ( $\times 150$ )

注: A, a: SMMC-7721 细胞; B, b: SGC-7901 细胞; C, c: K562 细胞; A, B, C: 对照; a, b, c: 以 S8 发酵上清液处理过的细胞。

Note: A, a: SMMC-7721 cell; B, b: SGC-7901 cell; C, c: K562 cell; A, B, C: CR; a, b, c: The cells treated with the culture filtrate of S8.

## 2.2 抗人体病原菌活性

采用杯碟法测定了 72 株内生真菌的发酵上清液对 *S. aureus* 等 3 种人体病原菌的抑菌活性。有 5 株内生真菌对 *S. aureus* 有较强的抑制作用(图 2), 抑菌圈直径均在 10 mm 以上, 其中 1 株葡萄孢属 (*Botrytis*) 内生真菌还对 MRSA 显示了抑菌活性; 所有菌株均未表现有抑制 *C. albicans* 的活性。活性菌株分离自海南粗榧的枝和树皮部位, 抑菌活性结果见表 2。

## 2.3 抗农业病原菌活性

采用杯碟法初步测定了 72 株内生真菌的发酵

上清液对辣椒疫霉等 4 种植物病原真菌的抑菌活性。发现仅分离自海南粗榧树皮部位的刺盘孢属 (*Colletotrichum*) 菌株 S3 对辣椒疫霉有抑制作用, 抑菌带宽为 9 mm(图 3)。通过生长速率法测定了 S3 发酵上清液对辣椒疫霉的生长抑制率(图 4), S3 的发酵上清液对辣椒疫霉的抑菌作用较强, 抑制率为 70.4%。

## 3 讨论

本研究对 72 株海南粗榧内生真菌的抗肿瘤和抗菌活性进行了初步筛选, 结果显示有 9 株内生真

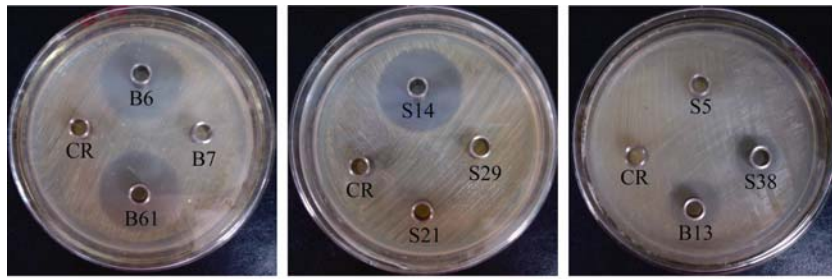


图2 海南粗榧内生真菌对 *S. aureus* 的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of endophytic fungi from *C. hainanensis* on *S. aureus*

注: S38: 葡萄孢属; S14, B6, B61, B13: 无孢菌群; B7, S21, S29, S5: 部分未显示出抗菌活性的菌株。

Note: S38: *Botrytis* sp.; S14, B6, B61, B13: Mycelia sterilia; B7, S21, S29, S5: Some of the strains showed no antibacterial activity.

表2 海南粗榧内生真菌对 *S. aureus* 和 MRSA 的抑菌活性

Table 2 The antibacterial activity of endophytic fungi from *C. hainanensis* against *S. aureus* and MRSA

属 Genus	菌株编号 Strain No.	抑菌直径 Inhibit diameters (mm)	
		金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA
		葡萄孢属 <i>Botrytis</i>	S38
无孢菌群 <i>Mycelia sterilia</i>	S14	31	—
	B6	30	—
	B61	30	—
	B13	14	—

注: —: 无抑菌活性。

Note: —: No antibacterial activity.

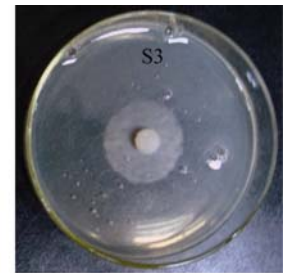
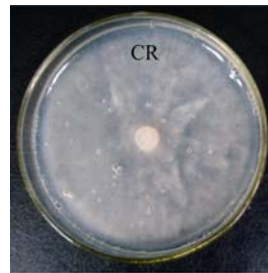
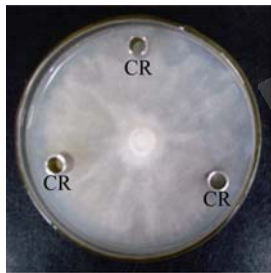


图3 内生真菌 S3 对辣椒疫霉的抑制作用(杯碟法)

Fig. 3 Inhibitory effect of endophytic fungus S3 on *P. parasitica* (Cylinder plate method)

注: S3: 刺盘孢属; S1, S7: 部分未显示出抗菌活性的菌株。

Note: S3: *Colletotrichum* sp.; S1, S7: Some of the strains showed no antibacterial activity.

图4 内生真菌 S3 对辣椒疫霉的抑制作用(生长速率法)

Fig. 4 Inhibitory effect of endophytic fungus S3 on *P. parasitica* (Mycelium growth rate method)

菌具有细胞毒活性, 6 株内生真菌具有抗菌活性, 这为我们在其中寻找生物活性成分奠定了基础。本课题组已有的研究表明从海南粗榧分离得到的内生真菌具有一定的组织专一性, 其中树皮部位的内生真菌在数量和种群组成上均较丰富, 并与枝、叶中的内生真菌存在明显差异<sup>[4]</sup>。本研究发现活性菌株的分布也具有一定的组织专一性, 其中具有细胞毒活

性的内生真菌均分离自树皮部位, 具有抗菌活性的菌株则分离自树皮和枝条部位, 而从叶中分离得到的菌株未筛选出任何活性。有研究表明, 处于生物多样性丰富、生长竞争激烈的环境下的内生真菌产生活性次生代谢产物的可能性较大<sup>[8]</sup>。本次试验筛选出的活性菌株主要分布在树皮部位, 可能与树皮中较为丰富的微生物种群组成有关。

研究表明, 植物内生真菌能够产生与宿主植物相同或相似的次生代谢产物, 如红豆杉属植物及其

内生真菌 *Taxomyces andreanae*、*Pestalotiopsis microspora* 等均能合成抗癌药物紫杉醇<sup>[9,10]</sup>。海南粗榧树皮中生物碱的含量较高, 而枝及叶的生物碱含量很低<sup>[2]</sup>, 这表明海南粗榧中生物碱的产生, 可能与其内生真菌存在一定的关系。目前, 我们正在对本次试验筛选到的抗肿瘤活性菌株进行次生代谢产物的研究, 上述活性菌株是否能够产生三尖杉酯类生物碱, 还有待进一步研究确证。

此外, 分离自海南粗榧树皮部位的刺盘孢属 (*Colletotrichum*) 内生真菌 S3, 不仅具有抗 SMMC-7721 和 K562 的细胞毒活性, 而且对辣椒疫霉有较强的抑制作用, 抑菌率为 70.4%。有文献报道, 已从黄花篙的刺盘孢属内生真菌的发酵液中分离到对辣椒疫霉等多种植物病原真菌具有抑菌活性的甾体类化合物<sup>[11]</sup>。由此推测, 刺盘孢属内生真菌在生物防治方面有着潜在的利用价值。因此, 内生真菌 S3 的活性成分值得深入地研究。

## 参 考 文 献

- [1] 梅文莉, 吴 娇, 戴好富. 三尖杉属植物化学成分与药理活性研究进展. 中草药, 2006, 37(3): 452-458.  
[2] 中国医学科学院药物研究所编著. 中草药现代研究. 第

二卷. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996, p.143, 128.

- [3] Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep*, 2006, 23: 753-771.  
[4] 陈 苹, 戴好富, 解修超, 等. 海南粗榧内生真菌的分离与初步鉴定. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1455-1460.  
[5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.  
[6] 秦 盛, 陈有为, 邢 珂, 等. 一株仙人掌植物内生真菌的分离鉴定及活性研究. 微生物学通报, 2006, 33(4): 95-99.  
[7] 申屠旭萍, 俞晓平, 夏湛恩, 等. 一株银杏内生真菌代谢产物抗菌活性初步研究. 植物保护, 2006, 32(3): 55-57.  
[8] Owen NL, Hundley N. Endophytes—the chemical synthesizers inside plants. *Sci Prog*, 2004, 87(2): 79-99.  
[9] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260: 214-216.  
[10] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod*, 2004, 67: 257-268.  
[11] Lu H, Zou WX, Meng JC, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci*, 2000, 151(1): 67-73.

## 栏目介绍

### 教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2~5 张, 文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版 (1974~2006) 一张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王 闯

电子信箱: gg@im.ac.cn