

## 研究报告

## 雷公藤内生真菌的分离鉴定及活性研究

谢少朵<sup>1</sup> 陈向东<sup>1\*</sup> 汪辉<sup>1</sup> 魏洪璇<sup>1</sup> 潘云<sup>1</sup> 纪乃琪<sup>1</sup> 栗飞红<sup>1</sup> 汪伟宸<sup>2</sup>

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009)

(2. 南京第十三中学 江苏 南京 210008)

**摘要:**【背景】雷公藤是一种传统中药,具有多种药理活性和较高的应用价值。但由于产量少、提取过程复杂而限制了其在临床上的应用。植物内生真菌的次级代谢产物能够产生相似的药理活性,有望解决植物资源匮乏的难题,成为新药筛选的潜在资源。【目的】从卫矛科植物雷公藤中分离内生真菌,对其产物的体外抗菌活性及抗肿瘤活性进行测定,并利用活性菌株对雷公藤粗提物进行转化,以达到增效减毒的作用。【方法】采用组织块法从雷公藤茎中分离内生真菌;打孔法测定发酵产物对金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌的抑菌活性;MTT(噻唑蓝)比色法测定发酵产物及转化产物的抗肿瘤活性;ITS (Internal transcribed spacer)序列测序分析确定活性菌株的种属。【结果】从雷公藤茎中分离得到43株内生真菌,其中5株对金黄色葡萄球菌有抑菌作用,LGT7几乎与1 μg/mL青霉素钠的作用效果相当;6株对MCF-7、SKOV3细胞有抗肿瘤活性,LGT7、LGT41对肿瘤细胞生长抑制率达90%以上;4株对雷公藤粗提物具有转化活性。活性菌株分别被鉴定为拟茎点霉和腐皮壳属。【结论】雷公藤内生真菌具有抗菌抗肿瘤作用,并可以通过转化产生增效减毒作用。

**关键词:** 雷公藤, 内生真菌, 抗菌, 抗肿瘤, 转化

## Isolation and bioactivity studies of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* Hook.f.

XIE Shao-Duo<sup>1</sup> CHEN Xiang-Dong<sup>1\*</sup> WANG Hui<sup>1</sup> WEI Hong-Xuan<sup>1</sup>  
PAN Yun<sup>1</sup> JI Nai-Qi<sup>1</sup> LI Fei-Hong<sup>1</sup> WANG Wei-Chen<sup>2</sup>

(1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(2. Nanjing No.13 High School, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

**Abstract:** [Background] *Tripterygium* is a traditional Chinese medicine with great value of clinical application for its diversity pharmacological activity. However, its lack of output and complicated extraction process limit the clinical application. Secondary metabolites of plant endophytic fungi can produce similar pharmacological activity, which is expected to solve the problem of lack of plant and become a potential resource for screening new drugs. [Objective] To isolate endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* Hook.f., and screen their anti-microbial and anti-tumor activities *in vitro*. To transform the crude extracts of

**Foundation item:** The Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PPZY2015A057)

\*Corresponding author: E-mail: chenxd@cpu.edu.cn

Received: March 22, 2017; Accepted: May 17, 2017; Published online (www.cnki.net): May 25, 2017

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PPZY2015A057)

\*通信作者: E-mail: chenxd@cpu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-22; 接受日期: 2017-05-17; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-05-25

*Tripterygium wilfordii* Hook.f. with active strains to achieve increasing efficiency and reducing toxicity. [Methods] Endophytic fungi were isolated from *Tripterygium wilfordii* Hook.f. with tissue block method; antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was tested with disk diffusion method; anti-tumor activity to two cell lines (MCF-7/SKOV3) was tested with MTT (Thiazolyl blue) assay. The ITS (Internal transcribed spacer) sequence sequencing analysis was used to identify the active strains species. [Results] 43 strains of endophytic fungi were isolated from *Tripterygium wilfordii* Hook.f. Five of them showed bacteriostasis to *Staphylococcus aureus* and the activity of LGT7 was similar to that of 1 µg/mL of penicillin sodium; 6 of them showed cytotoxicity to MCF-7 as well as SKOV3 and the growth inhibition ratio of LGT7 and LGT41 was above 90%; 4 of them showed transforming activity to crude extracts from *Tripterygium wilfordii*. The active strains were identified as *Phomopsis* sp. and *Diaporthe* sp.. [Conclusion] Endophytic fungi isolated from *Tripterygium wilfordii* Hook.f. have anti-microbial and anti-tumor activity *in vitro*. They can enhance the activity and reduce the toxicity by transformation.

**Keywords:** *Tripterygium wilfordii* Hook.f., Endophytic fungi, Anti-microbial, Anti-tumor, Biotransformation

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook.f.)是一种传统的中草药,属卫矛科雷公藤属木质藤本植物,其主要活性成分有倍半萜、二萜、三萜、生物碱等<sup>[1]</sup>,主要用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮、阿尔兹海默症。近年来发现其还有抗肿瘤的作用,尤其是从雷公藤中提取的雷公藤红素(Celastron),对于非小细胞肺癌<sup>[2]</sup>、肝癌<sup>[3]</sup>、乳腺癌<sup>[4]</sup>、前列腺癌<sup>[5]</sup>等多种癌症有显著的疗效。

雷公藤味苦,性寒,有大毒,容易产生腹泻、血细胞减少、血小板减少、皮肤色素沉着、肝肾损伤及不孕不育等不良反应。雷公藤产量少,有效成分提取过程复杂,限制了其在临床上的应用。

内生真菌(Endophytic fungi)是长期寄生于植物组织而不产生明显症状的真菌。由于和植物宿主的共生,使得内生真菌能够产生与植物相同或相似的次级代谢产物,从而产生与宿主相似的药理作用<sup>[6-7]</sup>。1993年,Stierle等从短叶红豆杉中分离出一株产紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanae*<sup>[8]</sup>,逐渐引起了国内外学者对药用植物内生真菌的关注。我国植物内生真菌的研究主要集中于医药和农业方面,医药方面又以抗菌、抗肿瘤为研究热点<sup>[9]</sup>。国内外学者对雷公藤内生真菌也进行了一定的研究。Kumar等<sup>[10]</sup>从雷公藤中分离得到 *Pestalotiopsis leucothès*,具有免疫调节作用;宋萍等<sup>[11]</sup>、王家明等<sup>[12]</sup>、申屠旭萍等<sup>[13]</sup>分别从雷公藤中筛选出了

多种内生真菌,其次级代谢产物具有抗菌、抗肿瘤等活性,但并没有测定其转化活性。本文从雷公藤茎中分离内生真菌,对内生真菌的抗菌抗肿瘤活性进行了测定,并利用活性菌株对雷公藤粗提物进行了转化,希望从中筛选出高效低毒的活性菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药材

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook.f.)于2015年4月30日采自中国药科大学中药植物园,整株采集;雷公藤粗提物购自陕西信瑞生物科技有限公司。

#### 1.1.2 细菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、大肠埃希菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853)均保存于中国药科大学微生物学教研室,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA10)、耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE1)购于南方医院。

#### 1.1.3 细胞

乳腺癌细胞 MCF-7、卵巢癌细胞 SKOV3、正常肝细胞 L-02 均保存于中国药科大学微生物学教研室。

### 1.2 主要试剂和仪器

MH 肉汤培养基,北京三药科技开发公司;

RPMI-1640 培养基、DMEM 高糖不完全培养基, 南京凯基生物科技发展有限公司; MTT, 南京森贝伽生物科技有限公司; 顺铂, 合肥博美生物科技有限责任公司。CO<sub>2</sub> 培养箱, 赛默飞世尔科技有限公司; 酶标仪, 美国伯乐实验室有限公司。

### 1.3 雷公藤内生真菌的分离及活性菌株的鉴定

采用组织块法<sup>[14]</sup>对雷公藤茎内生真菌进行分离。取无病无害的雷公藤茎, 在自来水下冲洗 30 min, 晾干。75%乙醇浸泡 2 min, 次氯酸钠溶液浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3-4 次, 无菌纱布擦干, 去韧皮部。将木质部切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 接种于含双抗的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)<sup>[15]</sup>培养基上(青霉素钠 150 μg/mL, 硫酸链霉素 120 μg/mL), 28 °C 培养 7 d。设两类表面消毒对照。最后一次冲洗的无菌水涂布于相同的培养基作为表面消毒对照, 消毒后的组织在培养基表面放置 30 min, 作为组织印迹法对照。新鲜 PDA 平板作为空白对照。

待组织块周围培养基上长出菌落后, 根据菌落形态, 采用平板划线法接种于新鲜沙氏<sup>[15]</sup>琼脂培养基上, 28 °C 纯化培养, 挑取单菌落接种于沙氏斜面, 用 20% (体积比)甘油保存于-80 °C。

插片法观察菌丝形态。从斜面挑取一环菌体, 平板划线法接种于沙氏平板。将无菌盖玻片倾斜 45°插入培养基中, 并与划线方向垂直。28 °C 培养 7 d。取出盖玻片, 在显微镜下观察基内菌丝与气生菌丝形态。

用新型植物 DNA 基因组提取试剂盒提取活性菌株的基因组 DNA, 以 ITS1 (5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGC-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3')为引物、全基因组为模板, 扩增活性菌株的 ITS 序列。PCR 反应体系(20 μL): 模板 DNA (400 pg/μL) 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, 2×PCR Taq MasterMix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.2 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。对获得的 ITS (Internal transcribed spacer)序列进行测序, 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLAST 比对, 确定种

属关系。

### 1.4 抑菌活性测定

从斜面挑取一环菌体接入 9 mL 沙氏液体培养基, 培养 7 d, 取 1 mL 接种于 100 mL 的沙氏液体培养基中, 28 °C、200 r/min 摇瓶培养 7 d, 中速滤纸过滤后, 用 0.22 μm 无菌过滤器过滤。采用平板打孔法(Disk diffusion method)测定雷公藤内生真菌发酵产物对金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠埃希菌(ATCC25922)、MRSA10、MRSE1、铜绿假单胞菌(ATCC27853)的抑菌活性, 以 1 μg/mL 青霉素钠和 10 μg/mL 硫酸链霉素为阳性对照。

### 1.5 抗肿瘤活性测定

从斜面挑取一环菌体接入 9 mL 沙氏液体培养基, 培养 7 d, 取 1 mL 接种于 100 mL 的沙氏液体培养基中, 28 °C、200 r/min 摇瓶培养 7 d, 中速滤纸过滤后用 0.22 μm 无菌过滤器过滤。MTT 法<sup>[16]</sup>测定其对 MCF-7、SKOV3、L-02 三株细胞的抑制率, 以 5 μg/mL 顺铂为阳性对照, 同样条件培养的沙氏液体培养基为阴性对照。重复 3 次, 结果取平均值。样品对细胞生长的抑制率计算公式如下:

生长抑制率=

$$\frac{\text{生长对照组 } OD_{490} - \text{实验组 } OD_{490}}{\text{生长对照组 } OD_{490} - \text{空白对照组 } OD_{490}} \times 100\%$$

### 1.6 转化活性测定

从斜面挑取一环菌体接入 9 mL 沙氏液体培养基, 培养 7 d 后取 1 mL 接种于 100 mL 含 1% (质量体积比)雷公藤粗提物的沙氏液体培养基中, 28 °C、200 r/min 摇瓶培养 7 d, 中速滤纸过滤后用 0.22 μm 无菌过滤器过滤。MTT 法测定其对 MCF-7、SKOV3、L-02 的抑制率, 以 5 μg/mL 顺铂为阳性对照, 同样条件培养的含 1% (质量体积比)雷公藤粗提物的沙氏液体培养基为雷公藤提取物干扰对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 雷公藤内生真菌的分离及活性菌株的鉴定

采用组织块法及平板划线法对雷公藤内生真菌进行分离纯化, 从雷公藤茎中筛选出 43 株内生真菌。其中 5 株发酵产物对金黄色葡萄球菌具有抑制作用,

6 株菌的发酵产物具有抗肿瘤活性。平板接种法观察 6 株菌的菌落形态发现 接种 2-3 d, 菌落大小 20 mm 左右, 菌丝体白色; 6 d 铺满平板, 菌丝体呈白色蓬松绒毛状; 8 d 后基内菌丝颜色开始出现差异, LGT7、LGT34 呈浅褐色, LGT24 呈深褐色, LGT30 呈微黄色, LGT41 呈绿色, 从中心向四周逐渐变淡; 13 d

后气生菌丝颜色发生变化, LGT7 呈黄色, LGT13 呈浅绿色, LGT24 呈褐色, LGT7、LGT13、LGT41 产生青色孢子, LGT24 产生褐色孢子。插片法观察基内菌丝和气生菌丝的形态(图 1)。结合 BLAST 比对结果, LGT7、LGT13、LGT24、LGT30、LGT41 均属于子囊菌门半知菌腔孢纲球壳孢目球壳孢科

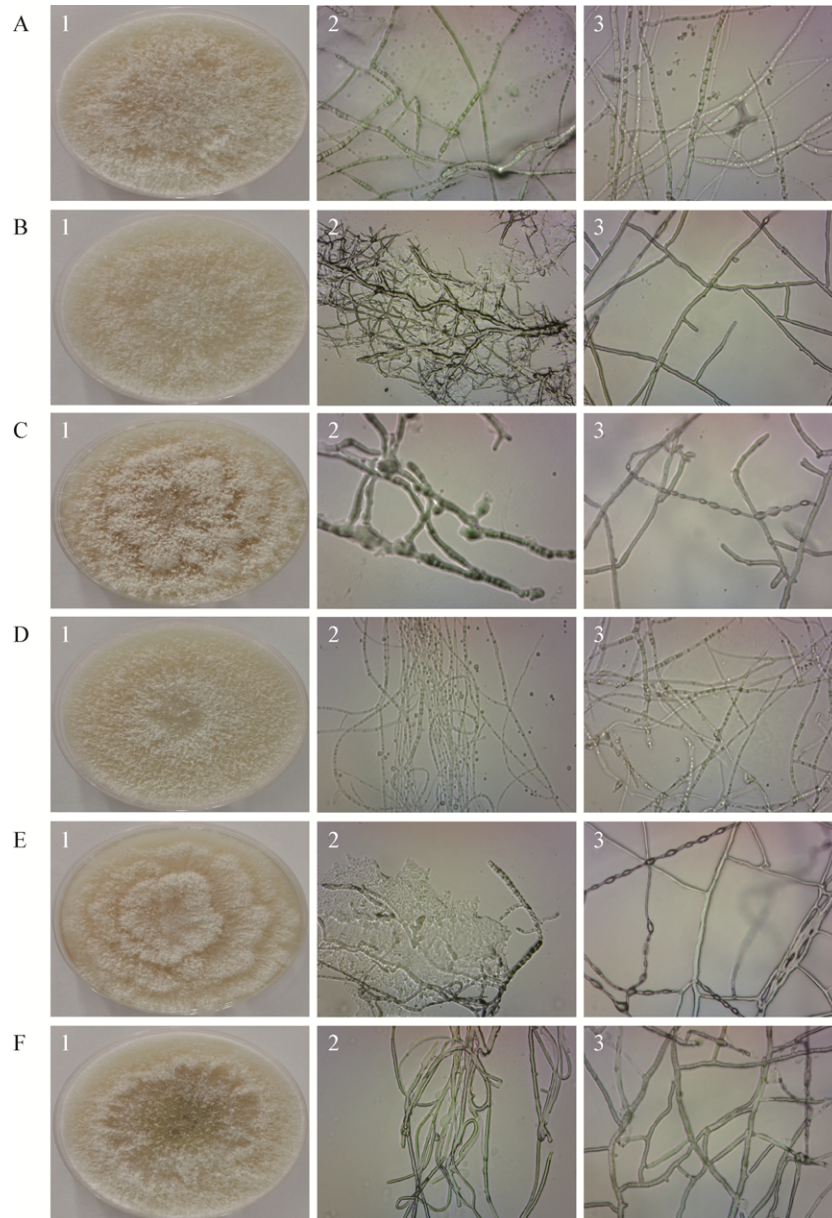


图 1 6 株活性菌株的菌丝形态

Figure 1 Mycelial morphology of 6 active strains

注: A: LGT7; B: LGT13; C: LGT24; D: LGT30; E: LGT34; F: LGT41. 1: 菌落形态; 2: 基内菌丝; 3: 气生菌丝.

Note: A: LGT7; B: LGT13; C: LGT24; D: LGT30; E: LGT34; F: LGT41. 1: Colony morphology; 2: Substrate mycelia; 3: Aerial mycelia.

拟茎点霉属,但不属于同种;LGT34 属于子囊菌门半知菌腔孢纲间座壳菌目间座壳菌科腐皮壳属。腐皮壳属(*Diaporthe* sp.)是拟茎点霉属(*Phomopsis* sp.)的有性态。

## 2.2 抑菌活性测定

采用打孔法对 43 株内生真菌的抗菌活性进行测定,共筛选出 5 株具有抗金黄色葡萄球菌(ATCC25923)活性的内生真菌。其中 LGT7 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最强,抑菌圈直径达到 20 mm,与 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素钠活性相当,且对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA10)、耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE1)具有抑制作用。LGT24 对铜绿假单胞菌(ATCC27853)具有抑制作用(表 1)。

## 2.3 抗肿瘤活性测定

采用 MTT 法对 43 株内生真菌发酵产物的抗

肿瘤活性进行测定,共筛选出 6 株具有抗肿瘤活性的内生真菌。其中 LGT7、LGT13、LGT41 对 MCF-7 的生长抑制率分别为 96.42%、91.88%、96.72%,LGT7、LGT34、LGT41 对 SKOV3 的生长抑制率分别为 92.33%、96.44%、90.41%。这些菌株的发酵产物对正常肝细胞 L-02 有一定的毒性(表 2),可能存在肝损伤的风险。

## 2.4 转化活性测定

用 6 株具有抗肿瘤活性的内生真菌对雷公藤粗提物进行转化后,LGT24、LGT30、LGT34 对 MCF-7 抑制率升高,LGT7、LGT41 活性降低;LGT13 对 SKOV3 抑制率升高,LGT7、LGT41 活性明显降低;其中 LGT24、LGT30 对雷公藤粗提物进行转化后,对 MCF-7 的抑制率升高,且对 L-02 的细胞毒性降低(表 3)。

表 1 内生真菌发酵产物的抑菌圈直径

Table 1 The diameter of inhibition zone of endophytic fungi fermented products (mm)

Drugs and samples	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	MRSA10	MRSE1	<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)
Penicillin sodium (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	25	—	—	—	—
Streptomycin sulphate (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	—	—	—	20	10
LGT7	20	10	9	—	—
LGT13	14	—	—	—	—
LGT24	18	—	—	—	8
LGT30	10	—	—	—	—
LGT34	12	—	—	—	—

注:—: 没有抑菌圈。

Note: —: No inhibition zone.

表 2 内生真菌发酵产物对 MCF-7、SKOV3、L-02 的抑制率

Table 2 The inhibitory ratio to MCF-7, SKOV3, L-02 of endophytic fungi fermented products (%)

Drugs and samples	MCF-7	SKOV3	L-02
Control medium	15.59	4.02	4.94
Crude extracts from <i>Tripterygium wilfordii</i>	33.88	-22.34	1.54
Cisplatin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	33.39	48.39	37.15
LGT7	96.42	92.33	83.22
LGT13	91.88	49.39	75.97
LGT24	13.84	71.78	85.87
LGT30	13.89	36.16	9.05
LGT34	13.45	96.44	64.96
LGT41	96.72	90.41	83.43

表3 菌产物与转化产物对 MCF-7、SKOV3、L-02 的抑制率

Table 3 The inhibitory ratio to MCF-7, SKOV3, L-02 of endophytic fungi transformation products (%)

Drugs and samples	MCF-7		SKOV3		L-02	
	Products of fungi	Products of transformation	Products of fungi	Products of transformation	Products of fungi	Products of transformation
Control medium		15.59		4.02		4.94
Crude extracts from <i>Tripterygium wilfordii</i>		18.01		16.63		-32.05
Cisplatin (5 µg/mL)		33.39		48.39		37.15
LGT7	96.42	53.34	92.33	10.27	83.22	80.90
LGT13	91.88	91.80	49.39	98.12	75.97	98.17
LGT24	13.84	50.76	71.78	55.08	85.87	50.56
LGT30	13.89	64.58	36.16	18.16	9.05	00.21
LGT34	13.45	33.57	96.44	50.27	64.96	38.14
LGT41	96.72	18.01	90.41	16.63	83.43	-32.05

### 3 讨论与结论

植物内生真菌数目庞大,种类繁多。目前,研究者们已经从红豆杉、紫杉、银杏等多种药用植物中分离到镰孢霉属、拟盘多孢霉属、青霉、木霉、丝核菌属等多种内生真菌。植物内生真菌不仅种类繁多,其次级代谢产物的生理活性也是多种多样的,在医药领域主要集中于抗菌抗肿瘤的药物治疗方面。

本文从传统中药雷公藤中分离纯化出 43 株内生真菌,说明雷公藤内生真菌数量可观。王家明等曾在雷公藤的根、茎、叶中分离到青霉属、镰孢霉属、丝核菌属等 11 属 64 种内生真菌<sup>[1]</sup>。本文 6 株活性菌株的鉴定结果表明,其中 5 株属于拟茎点霉属,1 株属于腐皮壳属。虽然分离的内生菌数目众多,但种类单一,可能是由于只对茎部的内生真菌进行了分离,具有一定的局限性。

在分离到的 43 株内生真菌中,5 株具有抑菌活性,其中 LGT7 活性最强,对金黄色葡萄球菌(ATCC25923)的抑制作用接近于 1 µg/mL 青霉素钠的活性,表现出对耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA10)、耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE1)的抑制作用,可以作为抑制耐药菌的潜在药物进一步研究。

研究表明,在 6 株具有抗肿瘤活性的菌株中,LGT7、LGT13、LGT41 发酵产物对 MCF-7 的抑制

率及 LGT7、LGT34、LGT41 发酵产物对 SKOV3 的抑制率均达 90% 以上,具有高效的抗肿瘤作用。但此 4 株菌的发酵产物对 L-02 的抑制率也在 65% 以上,说明其发酵产物对细胞的生长抑制不具有特异性。

本文首次利用雷公藤内生真菌对雷公藤粗提物进行转化活性研究。结果表明,LGT24、LGT30 对雷公藤粗提物进行转化后,对 MCF-7 的生长抑制率提高近 40%,且对 L-02 的生长抑制率降低 35%,LGT24、LGT34 转化产物表现出相似的特性。说明转化产物可能具有选择性的细胞毒性,特异性地作用于肿瘤细胞。

以上研究表明雷公藤内生真菌不仅具有抗菌、抗肿瘤的活性,而且可以对雷公藤粗提物进行转化,产生高效低毒的抗肿瘤产物,具有增效减毒的作用,可以作为药物开发的一个新思路。关于发酵条件的优化以及有效成分的分离纯化工作正在积极地进行中,希望能够尽快应用于实践。

### REFERENCES

- [1] Xue J, Jia XB, Tan XB, et al. Chemical constituents of *Tripterygium wilfordii* Hook. F and its toxicity[J]. Journal of Chinese Medicine, 2010, 25(5): 726-733 (in Chinese)  
薛璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤化学成分及其毒性研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 726-733
- [2] Fan XX, Li N, Wu JL, et al. Celestrol induces apoptosis in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells via Caspases-dependent pathways and Hsp90 client protein

- degradation[J]. *Molecules*, 2014, 19(3): 3508-3522
- [3] Li PP, He W, Yuan PF, et al. Celastrol induces mitochondria-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2015, 43(1): 1-23
- [4] Kim Y, Kang H, Jang SW, et al. Celastrol inhibits breast cancer cell invasion via suppression of NF- $\kappa$ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2011, 28(2): 175-184
- [5] Yao D, de Sano J, Tang WH, et al. Natural proteasome inhibitor celastrol suppresses androgen-independent prostate cancer progression by modulating apoptotic proteins and NF-kappaB[J]. *PLoS One*, 2010, 12(5): e14153
- [6] Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges[J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(7): 1208-1228
- [7] Kaul S, Gupta S, Ahmed M, et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive Metabolites[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2012, 11(4): 487-505
- [8] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew[J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216
- [9] Wang ZW, Chen YG, Wang QC, et al. Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 482-496 (in Chinese)  
王志伟, 陈永敢, 王庆璨, 等. 中国植物内生微生物研究的发展和展望[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(3): 482-496
- [10] Kumar DSS, Lau CS, Wan JMF, et al. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothēs*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*[J]. *Life Science*, 2005, 78(2): 147-156
- [11] Song P, Hong W, Wu CZ, et al. Antibacterial and antifungal activity of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(5): 262-266 (in Chinese)  
宋萍, 洪伟, 吴承祯, 等. 雷公藤内生真菌的抑菌活性研究[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(5): 262-266
- [12] Wang JM, Song YQ, Liu HL, et al. Isolation of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* and the screening of its antitumor activities[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2011, 26(5): 145-148 (in Chinese)  
王家明, 宋亚琼, 刘宏亮, 等. 雷公藤内生真菌的分离鉴定及抗肿瘤活性菌株筛选[J]. *西北林学院学报*, 2011, 26(5): 145-148
- [13] Shentu XP, Chen XF, Yu XP. The isolation of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* Hook and the screening of its active strain[J]. *Acta Agriculture Zhejiangensis*, 2006, 18(5): 308-312 (in Chinese)  
申屠旭萍, 陈宵峰, 俞晓平. 雷公藤内生真菌的分离及活性菌株的筛选[J]. *浙江农业学报*, 2006, 18(5): 308-312
- [14] Xiong ZQ, Yang YY, Zhao N, et al. Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media*[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 71
- [15] He J, Liu XJ, Zhao QM, et al. Isolation of endophytes from *Pseudolarix kaempferi* Gord[J]. *Food Science*, 2009, 30(15): 180-183 (in Chinese)  
何佳, 刘笑洁, 赵启美, 等. 植物内生真菌分离方法的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(15): 180-183
- [16] Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*[M]. Zhang QB, Xu CL, Trans. 6th ed. Beijing, Science Press, 2016: 482-495 (in Chinese)  
弗雷谢尼. 动物细胞培养: 基础技术和特殊应用指南[M]. 章静波, 徐存隆, 译. 6版. 北京, 科学出版社, 2016: 482-495