



泰山白首乌内生真菌多样性及其抗肿瘤活性研究

冯坤苗, 吴思佳, 陈文华, 代威, 徐凌川, 韩婷

Anti-tumor activities of endophytes from *Cynanchum bungei* Decne.

FENG Kunmiao, WU Sijia, CHEN Wenhua, DAI Wei, XU Lingchuan, HAN Ting

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202108089>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

沙蟾毒精酯类衍生物的合成和抗肿瘤活性研究

Design, synthesis and antitumor activity of 3-arenobufagin esters

药学实践杂志. 2021, 39(1): 35-37, 57 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202007022

13-酰胺基取代苦参碱衍生物的合成及抗肿瘤活性研究

Synthesis and antitumor activity of 13-acylmatine derivatives

药学实践杂志. 2017, 35(1): 12-16 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.004

双氢青蒿素抗癌药理作用机制的研究进展

Research progress on anti-tumor mechanisms of dihydroartemisinin

药学实践杂志. 2019, 37(3): 206-211, 278 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.003

上海常用儿童抗肿瘤药物说明书存在的问题与对策研究

Problems and countermeasures of the package inserts for children's anti-tumor medications in Shanghai

药学实践杂志. 2017, 35(1): 78-81 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.020

非核苷类NEDD8活化酶抑制剂的设计、合成与活性研究

Design, synthesis and biological activity of non-nucleoside NEDD8-activating enzyme inhibitors

药学实践杂志. 2020, 38(1): 35-41 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201901012

黄芩素抗肿瘤作用及其机制研究新进展

New advances in baicalein's antitumor effects and mechanisms

药学实践杂志. 2021, 39(1): 9-12, 43 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202004030



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 研究报告 ·

泰山白首乌内生真菌多样性及其抗肿瘤活性研究

冯坤苗¹, 吴思佳¹, 陈文华², 代威³, 徐凌川³, 韩婷¹ (1. 海军军医大学药学院, 上海 200433; 2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 3. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250399)

[摘要] 目的 分析白首乌内生真菌多样性及其种群结构分布规律, 挖掘潜在的微生物资源及功能, 为寻找新的抗肿瘤内生真菌提供理论基础。方法 通过传统的内生菌分离法以及 18sRNA 高通量测序技术, 对不同组织部位、不同物种和不同产地白首乌内生真菌群落组成进行多样性分析; 采用 MTT 法检测泰山白首乌内生真菌的细胞毒活性。结果 从泰山白首乌的根、茎、叶中共分离得到 90 个形态的内生真菌, 其中, 镰刀菌属 *Fusarium* 和链格孢属 *Alternaria* 为优势菌属; 泰山白首乌根、茎、叶分别有 8、9 和 13 个属, 链格孢属 *Alternaria* 和炭疽菌属 *Colletotrichum* 为共有属; 13 株泰山白首乌内生真菌对 HEPG2、HGC27、HT-29 和 HeLa 肿瘤细胞株产生抗肿瘤活性, 占总数的 14.4%, 极细链格孢菌 *A. tenuissima* LTJ2 和链格孢菌 *A. alternata* LTJ6 抗肿瘤活性显著。结论 泰山白首乌内生真菌具有丰富的多样性, 部分菌株具有显著的抗肿瘤活性, 为寻找新的抗肿瘤药物提供了菌株资源。

[关键词] 泰山白首乌; 链格孢菌; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R285; R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)06-0542-07

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202108089

Anti-tumor activities of endophytes from *Cynanchum bungei* Decne.

FENG Kunmiao¹, WU Sijia¹, CHEN Wenhua², DAI Wei³, XU Lingchuan³, HAN Ting¹ (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. School of Pharmacy, Shandong Chinese Medical University, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the taxonomic structure and diversity of endophytic fungi from *Cynanchum bungei* Decne., explore the potential microbial resources and functions and provide the theoretical basis for new antitumor endophytic fungi. **Methods** The diversities of endophytic fungi community in different tissues, species and habitats were analyzed with traditional endophytic bacteria separation method and 18sRNA high-throughput sequencing technology. MTT assay was used to detect the cytotoxic activity of endophytic fungi from Radix *Polygoni multiflori*. **Results** 90 strains of endophytic fungi were isolated and identified from roots, stems, and leaves of *C. bungei*. Among them, *Fusarium* and *Alternaria* were the dominant genera. There were 8, 9 and 13 genera from roots, stems and leaves of *C. bungei* respectively. Among which *Alternaria* and *Colletotrichum* were the common genera in different tissues. Further studies showed that 13 endophytic fungi of *C. bungei* had good anti-tumor activity in vitro, accounting for 14.4% of the total genera. Among them, *A. tenuissima* LTJ2 and *A. alternata* LTJ6 had significant anti-tumor activity. **Conclusion** The endophytic fungi in *Cynanchum bungei* Decne. have rich diversity. Some strains have significant anti-tumor activity, which can be potential resources for the development of new antitumor agents.

[Key words] *C. bungei*; *Alternaria*; anti-tumor activity

泰山白首乌来源于为萝藦科(Asclepiadaceae) 鹅绒藤属(*Cynanchum* Linn.) 植物戟叶牛皮消 *Cynanchum bungei* Decne. 的干燥块根,《本草备要》记载:“具有养血补血、补肝肾、强筋骨和润肠通便

的作用”, 也被誉为泰山四大名药之首^[1-2]。研究表明, 泰山白首乌的主要活性成分为苯乙酮和 C₂₁ 甾体皂苷^[3-7]。泰山白首乌的主要药理活性有抗肿瘤、保肝、抗炎、抗菌、抗病毒、抗抑郁、降血糖等^[5-7]。

植物内生菌是一类广泛存在于宿主植物体内, 且不引起宿主明显病症的真菌, 是一类具有多样性的微生物类群。植物内生菌通过“协同进化”作用, 以促进宿主植物生长, 增强抗逆性, 促进药用植物中有效成分的积累^[8-9], 植物内生菌已成为国内外学者的研究热点。顾晓洁等^[10] 2018 年报道了滨

[作者简介] 冯坤苗, 硕士, 助教, 研究方向: 中药活性物质, Email: Fengkm1103@163.com

[通信作者] 徐凌川, 学士, 教授, 研究方向: 中药、生药鉴定与质量评价及药用真菌资源开发, Email: xulingchuan518@sina.com; 韩婷, 博士, 教授, 中药资源与品质调控, Email: hanting@smmu.edu.cn

海白首乌块根中内生细菌的分离鉴定。Li等^[11]从滨海白首乌中分离出一株产红色素具有抗氧化作用的内生真菌 *Stemphylium lycopersici*。Gu等^[12]从滨海白首乌中分离得到的内生真菌 *Plectosphaerella cucumerina* YCTA2Z1 中分离鉴定得到 13 种化合物,分离得到与宿主滨海白首乌相同的次级代谢产物单体告达庭(caudatin)、白首乌二苯酮、cynandione B 和 2',5'-二羟基苯乙酮^[11-12]。但是,目前没有关于泰山白首乌内生真菌的传统分离纯化培养报道。同时,有研究表明,泰山白首乌的粗提物和单体化合物对多种肿瘤细胞株均具有显著活性^[6],目前已有从植物中分离得到具有抗肿瘤活性的内生真菌^[13-14]的研究,但对泰山白首乌内生真菌的相关分离鉴定、活性成分及抗肿瘤等生物活性的研究还未开展。

本实验以泰山白首乌内生真菌为研究对象,通过传统分离培养法,将分离鉴定得到的泰山白首乌内生真菌进行液体发酵,并进行抗肿瘤活性菌株筛选。一方面探讨泰山白首乌内生真菌能否产生与宿主相似的次级代谢产物,另一方面为研发新的抗肿瘤活性药物提供科学依据。

1 材料

1.1 药用植物

3个产地的健康泰山白首乌植株各5株,包含根、茎、叶。济南的泰山白首乌叶(JTY)、泰山白首乌茎(JTJ)、泰山白首乌根(JTG),均采自山东中医药大学长清校区植物园内(36°56' N, 116°79' E);临沂的泰山白首乌叶(LTY)、泰山白首乌茎(LTJ)、泰山白首乌根(LTG),均采自临沂费县御华景宸农业生态园内(35°27' N, 117°97' E);泰安的泰山白首乌叶(TTY)、泰山白首乌茎(TTJ)、泰山白首乌根(TTG),均采自泰山(35°78' N, 117°45' E)。植物样品经山东中医药大学中药鉴定教研室徐凌川教授鉴定为泰山白首乌 *C. bungei* Decne.。采集的样品用无菌塑料袋包装,置于 4 °C 冰箱保存备用,48 h 内进行样品处理。

1.2 仪器与试剂

T100™梯度 PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 伯乐 T100 梯度 PCR 仪);电泳仪(上海天能科技有限公司);凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);Qubit® 2.0 荧光计(赛默飞 Invitrogen);SW-CJ-1D 超净工作台(苏州净化设备有限公司);E.Z.N.A. 真菌 DNA 提取试剂盒(美国 Omega Bio-Tek);Taq DNA Polymerase(赛默飞 Thermo);Agencourt

AMPure XP(Beckman);2×Trans Taq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix I(北京全式金生物技术有限公司);ddH₂O(北京全式金生物技术有限公司);琼脂糖(超纯)(北京天根生物技术有限公司);50×TAE 缓冲液(北京索莱宝科技有限公司 Solarbio);DNA Maker(日本 TaKaRa);Goldview 核酸染料(10 000×);6×Loading buffer(日本 TaKaRa);XD-101 CO₂ 细胞培养箱(日本 SANYO 公司);奥林巴斯 IX51 倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司 OLYMPUS);ELX800 光吸收酶标仪(美国 BioTek);细胞培养瓶(美国 FALCON);青、链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司);PBS(北京索莱宝科技有限公司);RPMI-1640(美国 GIBCO);DMEM(美国 GIBCO);L15(美国 GIBCO);FBS(美国 ExCell Biology FBS500);MTT(美国 Amresco);DMSO(溶解受试药品)(美国 SIGMA D2650);土豆(沃尔玛);葡萄糖(源叶生物);琼脂粉(源叶生物);无水乙醇,分析纯(上海泰坦);次氯酸钠(分析纯,国药集团)。

1.3 供试肿瘤菌株

人肝癌细胞 HEPG2、人胃癌细胞 HGC27、人结肠癌细胞 HT-29、人宫颈癌细胞 HELA(中国科学院上海细胞库)。

2 方法

2.1 分离鉴定

2.1.1 传统分离培养

表面消毒:将采集新鲜济南、临沂和泰安产的戟叶牛皮消的根、茎和叶用自来水冲洗干净,转移至超净台,进行“75%乙醇-2.5%次氯酸钠-75%乙醇”的3步表面消毒处理。处理过后继续用无菌水冲洗5遍,灭菌滤纸将表面水分吸干。

组织块培养:超净台中操作,用消毒的剪刀和镊子分别将根、茎与叶剪切成小的组织块(0.5 cm×0.5 cm),分别从3个部位中各随机挑取20个组织块,每组设置4~5个组织块,分组好的组织块置于含有青霉素(50 mg/L)马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)的平板中,于温度25 °C,湿度80%的恒温恒湿培养箱中进行内生真菌菌丝的生长情况的定期观察。挑取尖端菌丝转移到新的PDA培养基中培养,至菌丝形态单一,即得到纯化的菌株^[15-16]。根据内生真菌菌株的培养的形态特征初步划分为不同的形态型,拍照留存。根据菌株群落的培养特征,划分为不同的形态型,继续将分离纯化后的菌株接种至PDA固体试管斜面培养基上进行培养,

4℃ 冰箱保存。

2.1.2 内生菌鉴定

观察培养的内生真菌菌落形态,对照《真菌鉴定手册》进行形态学特征鉴定。将“2.1.1”项下形态一致的泰山白首乌内生真菌菌株进行合并^[16],参考 E.Z.N.A.真菌 DNA 提取试剂盒说明书提取菌株 DNA。以提取的 DNA 为模板,采用真菌 ITS 通用引物 TIS4(5'-TCC TCC GCT TTA TTG ATA TGC-3')和 ITS5(5'-GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG-3')对菌株的 rDNA-ITS 区域进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:2×Trans Taq Fidelity (HiFi) PCR SuperMix 15 μl, Primer(10 μmol/L)各 1 μl, Genomic DNA 10 ng; 补充双蒸水至 30 μl。反应条件:94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 40 s, 52℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。5 μl PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。将合格的 PCR 扩增产物送上海生工生物有限公司进行测序。内生真菌菌株测序得到的 ITS 序列去除载体序列,利用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)BLAST 进行比对,根据所得分子鉴定结果并结合形态学特征确定菌株。

2.2 代谢产物抗肿瘤活性

2.2.1 代谢产物的提取

按“2.1”项下方法分离得到的 90 个形态型泰山白首乌内生真菌菌株为供试菌株, PDA 固体培养基中接种活化。待菌丝覆盖培养基表面时,用直径 5 mm 打孔器制备 10 个菌饼,放入装有 100 ml 的 PDA 培养基的锥形瓶中,每个菌种接种 6 瓶。接种后于 25℃、180 r/min 振荡培养 7 d。发酵完成后,抽滤并收集发酵培养液,1:1 乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相,减压浓缩,即得乙酸乙酯提取物^[17]。干燥后于 4℃ 冰箱中避光保存。

2.2.2 抗肿瘤活性测试

二甲基亚砜(DMSO)溶解乙酸乙酯粗提物后,用 PBS 分别稀释至 0.001、0.01、0.1、1.0、10.0、100.0 μg/ml。采用 MTT 法测定样品抗肿瘤活性^[17]。以人肝癌细胞 HEPG2,人胃癌细胞 HGC27,人结肠癌细胞 HT-29,人宫颈癌细胞 HELA 为受试对象,阳性对照采用阿霉素。将细胞放置于含 10% FBS、青霉素和链霉素各 100 U/ml 的 DMEM 细胞培养液中,于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养,48 h 换液传代。消化传代后显微镜下观察细胞的生长情况。取对数生长期的细胞,胰酶消化后,10% 小牛血清的完全培养液洗涤、悬浮,将 100 μl 悬浮细胞液(2~4×10⁴ 个/ml)接种于 96 孔板

中,培养 24 h。吸弃培养液,每孔加入 100 μl 含有不同药物的完全培养基(含 10% 小牛血清,1% 双抗),每种浓度设 3 个平行孔,设空白对照组,培养 72 h 后,每个孔加入 5 mg/ml 的 MTT 10 μl,培养 4 h,吸弃培养液后加入 100 μl DMSO,振荡至结晶完全溶解,用酶联免疫检测仪在波长为 570 nm 处测定 A 值,计算各浓度下的细胞抑制率,计算方法如下:

$$\text{细胞抑制率} = 1 - \frac{\text{药敏孔相对A值}}{\text{阴性对照孔相对A值}}$$

阴性对照孔相对 A 值=阴性对照孔绝对 A 值—空白对照孔绝对 A 值

药敏孔相对 A 值=药敏孔绝对 A 值—空白对照孔绝对 A 值

本研究采用 SPSS 17.0 通过机率单位加权回归法(Bliss 法)计算 IC₅₀。

3 结果与分析

3.1 内生真菌的分离鉴定及种群组成

将分离到的 869 株内生真菌,根据培养特征划分为 90 个形态型,对不同形态型菌株 ITS 基因与 GenBank 中的参考序列进行分子系统学分析,结果见表 1,有结果可知,鉴定得到的内生真菌属于 3 门、12 纲、14 目、14 科、18 属和 30 种。

3.1.1 组织类型对内生真菌种群结构的影响

组织因素在影响内生真菌的多样性和分布规律发挥着重要的作用^[18],在属的水平上,其对泰山白首乌内生真菌的组成影响也较为显著,如图 1 所示。泰山白首乌根部内生真菌主要分布于 8 个属,其中,优势菌属为镰刀菌属 *Fusarium*,占根中内生真菌的 64.29%;泰山白首乌茎部内生真菌分布于 9 个属,优势菌属为链格孢属 *Alternaria*,占茎中内生真菌的 60%;泰山白首乌叶部内生真菌分布 13 个属,优势菌属为链格孢属 *Alternaria*,占叶中内生真菌的 56.25%;泰山白首乌内生真菌的叶丰度大于茎和根。3 个不同的组织部位中,链格孢属 *Alternaria* 和炭疽菌属 *Colletotrichum* 为三者共有属,其他具有差异。结果表明,在不同组织部位中,泰山白首乌的内生真菌的分布差异显著。

3.1.2 产地对泰山白首乌内生真菌种群结构的影响

地理位置会影响内生真菌的多样性^[19]。在 90 个形态型内生真菌菌株中,产地济南的泰山白首乌分离 39 个菌株,产地泰安分离得到 26 个菌株,产地临沂分离得到 25 个。如图 2 结果所示,3 个产地的泰山白首乌优势菌属为链格孢属 *Alternaria* 和镰刀菌属 *Fusarium*,产地济南的泰山

表1 根据BLAST序列分离得到的泰山白首乌内生真菌

属名	基因库中接近种(登录号)	相似度 (%)	组织部位			菌株数
			根	茎	叶	
链格孢属	<i>A. alternata</i> (MH368103.1)	99		1	2	3
	<i>A. alternata</i> (MH716004.1)	99			4	4
	<i>A. alternata</i> (MG669159.1)	99			1	1
	<i>A. alternata</i> (MK07593.1)	99			1	1
	<i>A. alternata</i> (MK392122.1)	99		1		1
	<i>A. alternata</i> (MK659949.1)	99		2		2
	<i>A. alternata</i> (KY859403.1)	99			2	2
	<i>A.alternata</i> (KJ739880.1)	99	2	2	1	5
	<i>A. alternata</i> (KY859403.1)	99			1	1
	<i>A. alternata</i> (LN835252.1)	99		1	1	2
	<i>A. alternata</i> (EF504974.1)	78		1		1
	<i>A. arborescens</i> (MK460794.1)	99	1			1
	<i>A. brassicicola</i> (MF167294.1)	99	1	1		2
	<i>A. burnsii</i> (KR604840.1)	100		1		1
	<i>Alternaria</i> sp.(KC139509.1)	99			1	1
	<i>Alternaria</i> sp.(KC110624.1)	99			1	1
	<i>Alternaria</i> sp.(KC147581.1)	99		2		2
	<i>Alternaria</i> sp.(KU556507.1)	99		1		1
	<i>A.tenuissima</i> (MG602685.1)	99		3	3	6
	<i>A. tenuissima</i> (MK675103.1)	99		2		2
子囊菌属	<i>Ascomycota</i> sp.(FJ999646.1)	99	1			1
曲霉属	<i>A. terreus var.floccosus</i> (KP987086.1)	99	1			1
小檗属	<i>B. fortunei</i> (MK850215.1)				1	1
葡萄座腔菌属	<i>B. dothidea</i> (HM156069.1)				1	1
	<i>B. dothidea</i> (KF294012.1)		1			1
双极霉属	<i>B. sorokiniana</i> (HF934936.1)				1	1
	<i>B. micropus</i> (LT837454.1)	82		1		1
生赤壳属	<i>B. ochroleuca</i> (EU273558.1)			1		1
棒孢属	<i>C.cassiola</i> (MH569606.1)				1	1
炭疽菌属	<i>C. acutatum</i> (MG661733.1)			1		1
	<i>C. capsici</i> (EF016299.1)			1		1
	<i>C. gloeosporioides</i> (KM044004.1)				1	1
	<i>C. nymphaeae</i> (MH863840.1)		1			1
间座壳属	<i>D. phaseolorum</i> (MF379339.1)				1	1
	<i>D. phaseolorum</i> (KX866874.1)		1			1
<i>Emmia</i>	<i>E. lacerate</i> (MF101401.1)			1		1
突脐蠕孢属	<i>E. rostratum</i> (MH746929.1)			1	1	2
	<i>E. rostratum</i> (MH746928.1)				1	1
镰刀菌属	<i>F. nematophilum</i> (KF577906.1)		2			2
	<i>F. nematophilum</i> (KX621959.1)		1			1
	<i>F. oxysporum</i> (MK673882.1)		1			1

(续表 1)

属名	基因库中接近种(登录号)	相似度 (%)	组织部位			菌株数
			根	茎	叶	
<i>F. oxysporum</i> (KM005080.1)			1			1
<i>F. oxysporum</i> (KY910845.1)			1			1
<i>F. oxysporum</i> (GU724513.1)			1			1
<i>F. solani f. batatas</i> (AF178407.1)			6			7
<i>F. solani batatas</i> (EU625405.1)				1		1
<i>F. solani batatas</i> (MK571197.1)			1			1
<i>F. solani f. batatas</i> (KM235740.1)			1			1
<i>F. solani f. batatas</i> (KJ676962.1)		98	1			1
<i>F. solani f. batatas</i> (KU382502.1)		98	2			2
<i>Fusarium</i> sp.(FJ008989.1)				1		1
<i>Fusarium</i> sp. (MH884151.1)				1		1
小丛壳属 <i>G. cingulata</i> (EF423544.1)				2		2
球座菌属 <i>G. mangiferae</i> (EU677803.1)					1	1
孢菌属 <i>Pleosporaceae</i> sp. (HQ832799.1)					1	1
腔菌属 <i>Pleosporales</i> sp. (APBSDSF25)					1	1
<i>P. cablin</i> (MK568502.1)		98	1			1
毛球腔菌属 <i>Setosphaeria</i> sp. (LT837842.1)		92			1	1
踝节菌属 <i>T. purpureogenus</i> (KU981069.1)					1	1
炭角菌属 <i>Xylariaceae</i> sp. (MG669156.1)				1		1
			28	30	32	90

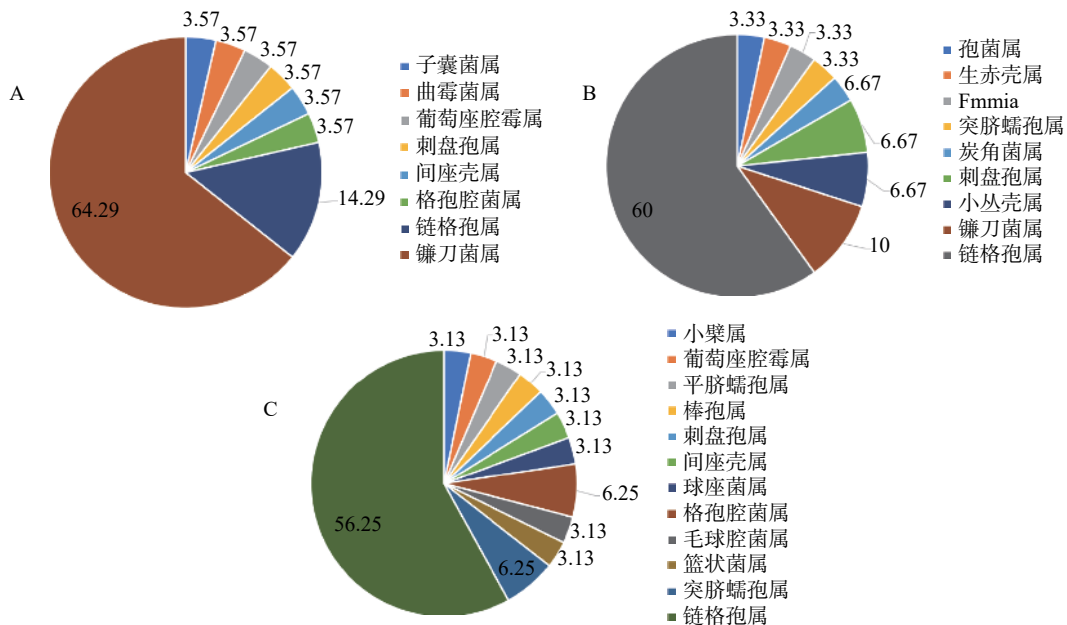


图 1 泰山白首乌不同部位中内生真菌组成及占百分比 (%，属)

A 泰山白首乌根内生真菌组成(属); B 泰山白首乌茎内生真菌组成(属); C 泰山白首乌叶内生真菌组成(属)

白首乌内生真菌主要分布在 12 个属, 优势菌属链格孢属占 38.46%, 镰刀菌属占 28.21%; 产地泰安的泰山白首乌内生真菌主要分布在 5 个属, 优势菌属

链格孢属占 61.54%, 镰刀菌属占 26.92%; 产地临沂的泰山白首乌内生真菌主要分布在 11 个属, 优势菌属链格孢属占 48.00%, 镰刀菌属占 32.00%。由

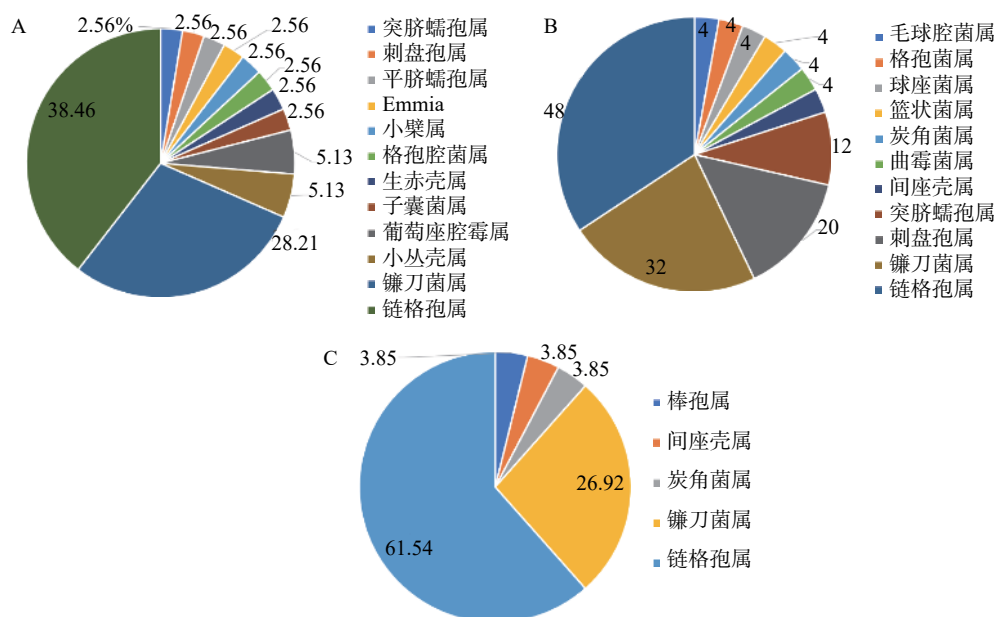


图2 不同产地泰山白首乌内生真菌组成及所占百分比 (%)

A 济南产泰山白首乌内生真菌组成(属); B 临沂产泰山白首乌内生真菌组成(属); C 泰安产泰山白首乌内生真菌组成(属)

此可知,产地对泰山白首乌内生真菌的群落组成和优势菌群均有影响,群落组成影响较大。

3.2 泰山白首乌内生真菌的抗肿瘤活性

MTT 结果表明,有 13 株内生真菌菌株代谢产物对 HEPG2、HGC27、HT-29、HeLa 肿瘤细胞株表现抗肿瘤活性,占总数的 14.4%。如表 2 所示, *B. sorokiniana* JTY6、*A. alternata* JTY10、*A. brassicicola* JTY11、*B. ochroleuca* JTY18、*Xylariaceae* sp. LTJ1、*A. tenuissima* LTJ2、*C. acutatum* LTJ3 和 *A. alternata* LTJ6 抗肿瘤活性较明显。链格孢属 *Alternaria* 是泰山白首乌内生真菌中筛选出抗肿瘤活性菌株的优势菌属,其中, *A. tenuissima* LTJ2 和 *A. alternata* LTJ6 的抗肿瘤活性尤其显著,能够显著抑制 HEPG2、HGC27、HT-29 和 HeLa 肿瘤细胞株。*A. tenuissima* LTJ2 对 HEPG2、HGC27、HT-29、HeLa 4 种肿瘤细胞株的 IC₅₀ 值分别为 (2.21±0.61)、(3.11±0.46)、(8.25±1.11)、(3.85±0.60) μg/ml; *A. alternata* LTJ6 为 (1.58±0.38)、(1.46±0.39)、(3.63±1.23)、(6.24±0.49) μg/ml。以上结果表明, *A. tenuissima* LTJ2 和 *A. alternata* LTJ6 是泰山白首乌具有显著抗肿瘤活性的内生真菌株,可以进一步研究其产生抗肿瘤活性的单体成分。

4 讨论

泰山白首乌与“泰山黄精”、“泰山紫草”和“泰山四叶参”并称为泰山四大名药^[2],但因其自然繁殖率低等因素,导致资源匮乏,市场上供不应求。植

表 2 泰山白首乌内生菌菌株的抗肿瘤活性

菌株	抗肿瘤活性 (IC ₅₀ , μg/ml)			
	HGC27	HEPG2	HT-29	HELA
JTY6	6.34±1.10	11.05±1.15	29.84±5.78	>40
JTY10	7.87±1.09	6.53±0.28	18.57±5.15	>40
JTY11	9.92±1.13	6.59±0.56	5.94±0.88	21.37±5.99
JTY18	2.61±0.35	3.20±0.42	3.55±0.30	9.96±2.38
LTJ1	1.69±0.32	2.96±0.24	13.23±1.66	7.41±1.47
LTJ2	2.21±0.61	3.11±0.46	8.25±1.11	3.85±0.60
LTJ3	5.34±0.89	5.10±1.21	13.01±1.63	5.87±1.36
LTJ6	1.58±0.38	1.46±0.39	3.63±1.23	6.24±0.49
JTY13	21.76±0.68	>40	20.07±1.38	>40
LTJ5	21.43±0.35	33.43±1.31	>40	>40
LTJ10	21.34±0.65	29.81±0.32	>40	>40
TTY7	27.89±1.08	38.53±0.28	>40	>40
TTY18	18.25±0.24	>40	>40	31.41±1.49
阿霉素	0.022±0.003	0.034±0.01	0.030±0.003	0.039±0.006

物内生真菌与宿主长期协同进化,可以产生相同或相似的活性代谢产物^[9],通过对泰山白首乌内生真菌的深入研究将有效的缓解其资源匮乏,而内生真菌有可能成为开发泰山白首乌的新资源。

本研究表明泰山白首乌中内生真菌资源丰富,具有较丰富的多样性,泰山白首乌内生真菌的分布在不同组织部位差异显著,以丰度比较叶大于茎和根,具有明显的组织特异性,产地对泰山白首乌的优势菌群和群落组成有影响。除优势属、种外,分

离得到的大豆疫霉、炭角菌和淡色赤壳菌等内生真菌菌株,也具有良好生物活性^[20-22]。

植物内生真菌能产生与宿主相同或相似的活性成分及生物活性,本研究首次报道了筛选得到的13株泰山白首乌内生真菌具有抗肿瘤活性,占总数的14.4%,其中,从叶中筛选到4株抗肿瘤活性菌株,茎中筛选得到9株抗肿瘤活性菌株,根中无,同时, *A. tenuissima* LTJ2 和 *A. alternata* LTJ6 两种抗肿瘤活性尤其显著,值得深入研究。然而,泰山白首乌的药用部位为块根,由于内生真菌在植物组织中的定殖不同,导致在不同组织部位的分布存在差异,具体原因还需要进一步深入研究。另外,从产地上来看,不同产地所筛选得到的抗肿瘤活性菌株数量及品种不同,济南产泰山白首乌筛选到5株抗肿瘤活性菌株,临沂产泰山白首乌筛选到6株活性菌株,泰安产泰山白首乌筛选到2株活性菌株,综上,泰山白首乌中内生真菌的种群结构的抗肿瘤活性是否存在与产地相关,需要进一步深入研究,而已经分离得到的活性菌株的次生代谢产物及其作用机制的研究也是下一个重要目标。

【参考文献】

- [1] 彭蕴茹, 丁永芳, 李友宾, 等. 白首乌研究现状[J]. *中草药*, 2013, 44(3): 370-378.
- [2] 王光辉, 王琦, 时元林. 泰山四大名药[J]. *山东中医杂志*, 2006, 25(3): 203-204.
- [3] KIM Y, CHOI H, SHIN J, et al. Molecular discrimination of *Cynanchum wilfordii* and *Cynanchum auriculatum* by InDel markers of chloroplast DNA[J]. *Molecules*, 2018, 23(6): 1337.
- [4] SUN Y S, LIU Z B, WANG J H, et al. Aqueous ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of four acetophenones from the Chinese medicinal plant *Cynanchum bungei* Decne[J]. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20(1): 180-186.
- [5] HAN L, ZHOU X P, YANG M M, et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacological effects of plants in genus *Cynanchum* Linn. (Asclepiadaceae)[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1194.
- [6] CHEN W H, ZHANG Z Z, BAN Y F, et al. *Cynanchum bungei* Decne and its two related species for "Baishouwu": a review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 243: 112110.
- [7] 孙彦敏, 王辉, 徐凌川. 近10年白首乌研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2015, 27(7): 131-136.
- [8] CUI J L, VIJAYAKUMAR V, ZHANG G. Partitioning of fungal endophyte assemblages in root-parasitic plant *Cynomorium songaricum* and its host *Nitraria tangutorum*[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 666.
- [9] JIA M, CHEN L, XIN H L, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 906.
- [10] 顾晓洁, 解卓学, 吕嘉东, 等. 白首乌内生细菌分离鉴定及系统发育树分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(6): 52-56.
- [11] LI F, XUE F, YU X. GC-MS, FTIR and Raman analysis of antioxidant components of red pigments from *Stemphylium lycopersici*[J]. *Curr Microbiol*, 2017, 74(4): 532-539.
- [12] GU X J, REN K, YAO N, et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Plectosphaerella cucumerina* YCTA2Z1 of *Cynanchum auriculatum*[J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(1): 95-98.
- [13] 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.[LinkOut].
- [14] CHEN L, ZHANG Q Y, JIA M, et al. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2014: 1-20.
- [15] 沈湛云, 朱波, 张泉龙, 等. 不同产地玄参内生真菌种群结构的比较分析[J]. *中草药*, 2019, 50(4): 957-962.
- [16] 惠建超, 翟梅枝, 李梦歌, 等. 不同陕西生境核桃内生真菌多样性研究[J]. *河南农业大学学报*, 2018, 52(6): 956-966, 982.
- [17] 贾敏. 薏苡内生真菌多样性及其与薏苡药材品质相关性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [18] SUN Y, WANG Q, LU X D, et al. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China[J]. *Mycol Prog*, 2012, 11(3): 781-790.[LinkOut].
- [19] WU L, HAN T, LI W, et al. Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China[J]. *Curr Microbiol*, 2013, 66(1): 40-48.
- [20] SEBASTIANES F L, CABEDO N, EL AOUAD N, et al. 3-hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*[J]. *Curr Microbiol*, 2012, 65(5): 622-632.
- [21] XU Y M, BASHYAL B P, LIU M X, et al. Cytotoxic cytochalasins and other metabolites from Xylariaceae sp. FL0390, a fungal endophyte of Spanish moss[J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(10): 1655-1658.
- [22] LI Y, GUO S, ZHU H. Statistical optimization of culture medium for production of exopolysaccharide from endophytic fungus *Bionectria ochroleuca* and its antitumor effect *in vitro*[J]. *Excli J*, 2016, 15: 211-220.

[收稿日期] 2021-08-18 [修回日期] 2021-10-25

[本文编辑] 李睿旻