

贝加尔唐松草内生真菌的分离及抗氧化活性研究

马建苹^{1,2}, 康银霞^{1,2*}, 郭涛^{1,2}, 李善家¹, 晋玲³

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050;

2. 甘肃省中藏药筛选评价及深加工重点实验室, 兰州理工大学, 甘肃 兰州 730050;

3. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要:目的 分离和鉴定贝加尔唐松草内生真菌,并检测其次级代谢产物的抗氧化活性。方法 采用组织分离法从其根、茎、叶和种子中分离内生真菌,根据形态进行初步鉴定;用 DPPH 自由基清除法评价贝加尔唐松草内生真菌发酵产物的抗氧化活性。结果 从贝加尔唐松草中共分离得到 18 株内生真菌,它们分属于曲霉属、顶孢霉属、镰刀菌属、香柱菌属、链格孢菌属、匍柄霉属。菌株发酵液的乙酸乙酯部位普遍具有抗氧化活性,其中 Y-3 对 DPPH 自由基清除活性较强,达到 91.04%,仅次于 Vc。结论 贝加尔唐松草内生真菌的次级代谢产物具有抗氧化活性,是一种较好的天然抗氧化剂。

关键词: 贝加尔唐松草; 内生真菌; 分离; 抗氧化活性

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2017.10.025

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2017)10-2378-02

Studies on isolation and antioxidant activities of endophytic fungi from *Thalictrum baicalense* Turcz.

MA Jian-ping^{1,2}, KANG Yin-xia^{1,2*}, GUO Tao^{1,2}, LI Shan-jia¹, JIN Ling³

(1. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2. Key Lab of Screening, Evaluation and Advanced Processing of Traditional Chinese Medicine and Tibetan Medicine, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 3. College of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective Isolation and identification of endophytic fungi from *Thalictrum baicalense* Turcz., then studies on antioxidant activities of their secondary metabolites. **Methods** The endophytic fungi were isolated by using tissue isolation method from the roots, stems, leaves and seeds of the plant and identified preliminarily based on morphological characteristics. Antioxidant activities were evaluated by DPPH radical scavenging. **Results** Totally 18 fungi were obtained, identified and classified to be *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Epichloe*, *Alternaria*, *Stemphylium*. The ethyl acetate extracts of the fermentation from various fungi exhibited antioxidant activities. Strain Y-3 showed the best DPPH radical scavenging activity with clearance rate of 91.04%, which is closing to that of Vc. **Conclusion** The secondary metabolites of endophytic fungi from *Thalictrum baicalense* Turcz. had powerful antioxidant activities, which are effective and natural antioxidants.

Key words: *Thalictrum baicalense* Turcz.; Endophytic fungi; Isolation; Antioxidant activity

贝加尔唐松草 *Thalictrum baicalense* Turcz. 为毛茛科(Ranunculaceae)唐松草属(*Thalictrum* L.)多年生草本植物,别名马尾黄连、土黄连等。以根及根茎入药,有抗菌消炎、清热燥湿、凉血解毒、清心除烦之功效,具有抗癌、降压、利尿、抗心律失常等药理作用,主要用于治疗痢疾、肠炎、湿热黄疸、传染性肝炎、咽喉肿痛、疮疖、脚癣等症^[1,2]。内生菌普遍存在于健康植物组织中,是植物微生态系统的重要组成部分。内生菌产生的活性物质,在生物制药、农业生产、发酵等方面都表现出良好的应用前景,受到广泛关注^[3,4]。目前国内外关于贝加尔唐松草内生真菌的研究鲜有报道,本研究利用组织分离法对贝加尔唐松草内生真菌进行分离

纯化,并进一步根据形态对 18 株内生真菌进行初步鉴定,对其发酵产物进行抗氧化活性测定,为更好地开发利用甘肃当地药材和寻找新的抗氧化活性生物资源提供参考和科学依据。

1 材料

1.1 材料 2015 年 9 月 10 日,本实验所用植物材料采集于甘肃省兰州市石佛沟,经甘肃中医药大学晋玲教授鉴定为贝加尔唐松草 *Thalictrum baicalense* Turcz.。超净工作台、光学显微镜、恒温振荡培养箱、高压灭菌锅等均为常用仪器;实验所用药品试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基配制 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):去皮马铃薯 200 g,煮沸 30 min,纱布过滤,加入葡萄糖 20 g,定容至 1000 ml 为液体培养基,121℃灭菌 30 min。固体培养基则随葡萄糖加入 1.5%~2%的琼脂。

2 方法

2.1 内生真菌的分离 组织分离法:取新鲜洗净的贝加尔唐松草的根、茎、叶和种子,用解剖刀将根、茎、种子切成 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小片。在无菌条件下利用 75%乙醇(1 min)、0.1%升汞(2 min)进行表面消

收稿日期:2017-03-23; 修订日期:2017-06-10

基金项目:甘肃省自然科学基金(1606RJZA207)

作者简介:马建苹(1973-),女(回族),甘肃张家川人,兰州理工大学生命科学与工程学院副教授,博士学位,主要从事天然药物资源的综合开发利用研究工作。

* 通讯作者简介:康银霞(1990-),女(藏族),甘肃武威人,兰州理工大学硕士研究生,主要从事天然药物内生菌的研究工作。

毒, 每种消毒剂消毒后都用无菌水冲洗 3 次, 放在无菌的滤纸上吸干。用无菌的镊子将消毒后的材料接入 PDA 培养基, 最后 1 次表面消毒冲洗后的无菌水作为无菌操作参照, 28℃ 恒温培养 3 ~ 7 d^[5, 6]。待内生真菌长出后, 观察菌落形态特征, 分别进行划线纯化。

2.2 内生菌的保藏 斜面低温保藏法: 将分离所得菌株接种至斜面培养基上, 4℃ 保藏。

2.3 内生真菌的初步鉴定 插片法: 将真菌接种到平板上, 插上灭菌的盖玻片, 28℃ 培养, 生长完全后放于载玻片上, 在光学显微镜下观察菌落、菌丝体、孢子形态^[7]。根据《真菌鉴定手册》初步鉴定。

2.4 内生真菌次级代谢产物 DPPH 自由基的清除能力

2.4.1 试样的制备 挑取少许内生真菌, 在 PDA 培养基上划线活化 1 ~ 2 次, 适量接种于液体培养基 (200 mL), 28℃、120 r/min 培养 7 d。分离发酵液和菌丝体, 发酵液用乙酸乙酯和正丁醇分别萃取 3 次, 合并、减压蒸干, 得到乙酸乙酯和正丁醇萃取部位; 菌丝体冷冻干燥后用乙醇加热回流提取 2 ~ 3 h, 提取液减压蒸干, 得到乙醇提取部位。

2.4.2 DPPH 自由基清除活性测定 在试管中分别加入 2 ml 0.025 mg/ml 的 DPPH 乙醇溶液和 2 ml 0.1 mg/ml 样品溶液, 避光反应 30 min, 用无水乙醇做参比溶液, 在 517 nm 处测定吸光度 A_{样品}。为了排除乙醇和水对实验结果的影响, 水和乙醇作为阴性对照, Vc 水溶液作为阳性对照^[8, 9]。每个样品平行做两次, 计算平均值。

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

式中: A_{样品} - 加入样液后 DPPH 乙醇溶液的吸光度; A_{对照} - 无水乙醇和样液混合后的吸光度; A_{空白} - 未加样液的 DPPH 乙醇溶液的吸光度。

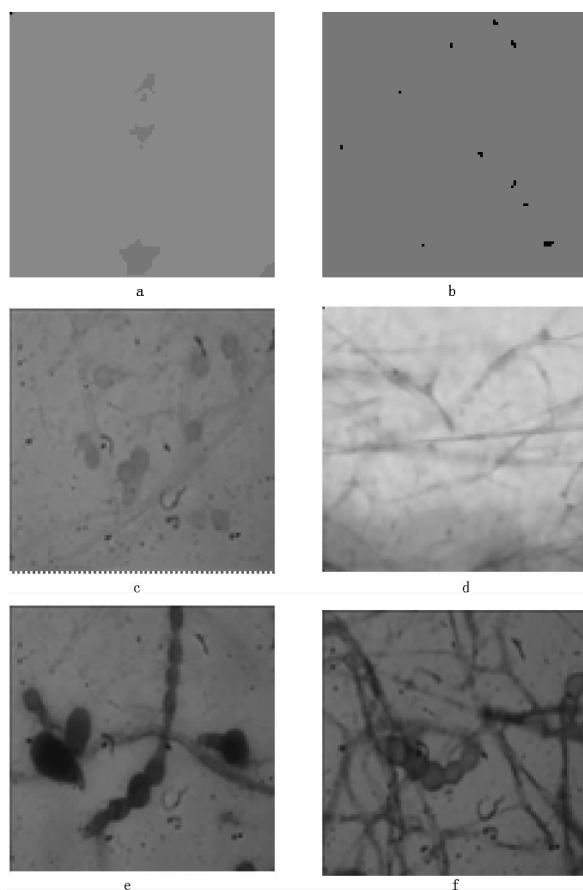
3 结果

3.1 内生真菌的分离 从贝加尔唐松草的根、茎、叶和种子中, 共分离出 18 株内生真菌, 其中根中有 2 株 (G-1, G-2), 占 11.11%, 茎中有 2 株 (J-1, J-2), 占 11.11%, 叶中有 6 株 (Y-1 ~ Y-5), 占 33.33%, 种子中有 8 株 (Z-1 ~ Z-8), 占 44.44%。结果表明贝加尔唐松草组织中存在丰富的内生真菌资源。

3.2 内生真菌的初步鉴定 对分离纯化的内生真菌进行形态鉴定, 结果见表 1。其内生真菌菌落及显微形态见图 1。初步判断为曲霉属 (*Aspergillus*) 1 株、顶孢霉属 (*Acremonium*) 1 株、镰刀菌属 (*Fusarium*) 6 株、香柱菌属 (*Epichloe*) 2 株、链格孢菌属 (*Alternaria*) 4 株、匍柄霉属 (*Stemphylium*) 4 株, 其中镰刀菌属为优势菌群。

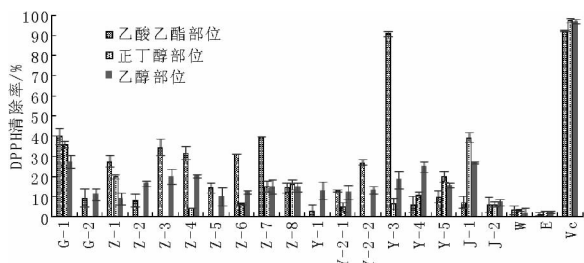
表 1 贝加尔唐松草内生真菌形态特征描述

属	菌落特征	显微形态特征
曲霉属	绿色、灰绿色, 絮状	孢子头呈疏松放射状, 单个分生孢子为球形
顶孢霉属	灰色, 反面黑色, 绒状	菌丝较细, 有横隔, 菌丝多次二叉分枝, 无孢子
镰刀菌属	灰白色, 反面黄色, 绒状、絮状	厚垣孢子顶生或间生, 球形
香柱菌属	白色, 反面黄色、棕色, 絮状	菌丝体少分枝, 子囊孢子丝状, 无色, 有隔膜
链格孢菌属	黑色、墨绿色, 边缘不整齐, 绒状	分生孢子梗分枝暗色, 倒棒状, 淡青褐色至深青褐色, 有隔, 多横隔, 长卵圆形或球形, 分生孢子成链状
匍柄霉属	灰色、黑色, 絮状	分生孢子梗短, 单生, 淡褐色, 圆柱状, 2 ~ 5 个隔膜



a - 曲霉属分生孢子梗及分生孢子; b - 顶孢霉属菌丝; c - 镰刀菌属厚垣孢子; d - 香柱菌属分生孢子; e - 链格孢菌属分生孢子; f - 匍柄霉属分生孢子
图 1 贝加尔唐松草内生真菌菌落及显微形态照片

3.3 内生真菌次级代谢产物 DPPH 自由基的清除能力 通过测定贝加尔唐松草 18 株内生真菌次级代谢产物的 DPPH 自由基的清除率, 结果见图 2: 水和乙醇的清除率分别为 3.13% 和 2.52%, 对实验样品干扰较小; 有 48 个样品对 DPPH 自由基具有不同程度的清除活性, 其中 Y-3 对 DPPH 自由基清除活性较强, 达到 91.04%, 仅次于 Vc (92.39%)。正丁醇萃取部位和乙醇提取部位对 DPPH 自由基清除能力较弱。



G - 根; Y - 叶; J - 茎; Z - 种子; W - 水; E - 乙醇
图 2 贝加尔唐松草内生菌次级代谢产物 DPPH 自由基清除率测定结果

4 讨论

目前, 有关唐松草属植物内生菌的研究鲜有报道。本研究从贝加尔唐松草的根、茎、叶和种子中, 共分离出 18 株内生真菌, 初步判断为曲霉属、顶孢霉属、镰刀菌属、香柱菌属、链格孢菌属、匍柄霉属, 其中镰刀菌属为优势菌群。敖恩宝力格等^[10]采用 T -

AOC 法测定了瓣蕊唐松草的抗氧化能力,发现其根茎提取物具有抗氧化活性,用乙醇与乙酸乙酯提取时抗氧化活性较高。刘敏洁等^[11]采用超临界 CO₂ 萃取法提取了盾叶唐松草叶的挥发油,通过 GC-MS 分析其成分,利用 DPPH 法测定挥发油的抗氧化活性,发现盾叶唐松草叶的挥发油具有较好的抗氧化活性。本研究采用 DPPH 法测定贝加尔唐松草内生真菌次级代谢产物抗氧化活性,结果表明,抗氧化活性物质主要集中在发酵菌液的乙酸乙酯部位。从研究结果来看,唐松草属植物及其内生菌,是具有抗氧化活性的一类生物资源,有待于在抗氧化活性物质方面进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 杨永健,丁博儒,贺朝旭. 唐松草野生变家种的初步研究 [J]. 西北植物学报, 1997, 17(6): 119.
- [2] 李圣各,苏钰清,马冬珂,等. 唐松草属植物中生物碱类化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 312.
- [3] 魏宝阳,曹亮,李顺祥,等. 内生菌与药用植物的关系及对次级代谢产物的影响 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(19): 83.
- [4] Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, et al. Endophytic fungi from Nerium oleander L. (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007, 23: 1253.
- [5] Lu Y, Chen C, Chen H, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from Actinidia macrosperma and investigation of their bioactivities [J]. Evid Based Complement Alternative Med, 2012, (1): 1.
- [6] 丁海娥. 五种药用植物内生真菌的分离纯化及其次级代谢产物生物活性研究 [D]. 兰州理工大学硕士学位论文, 2014.
- [7] 刘建玲,陈宝宝,刘永红,等. 半夏内生菌的分离与初步鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2305.
- [8] Zhu KX, Lian CX, Guo XN, et al. Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ [J]. Food Chem, 2011, 126: 1122.
- [9] 曾军,石国荣. 天然产物抗氧化活性的测定方法和原理 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(22): 35.
- [10] 敖恩宝力格,邵丽华,胡日都胡. 瓣蕊唐松草根茎中抗氧化性物质的提取研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 872.
- [11] 刘敏洁,赵琦,梁娜,等. 黔产盾叶唐松草叶挥发油 GC-MS 分析及生物活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 135.

华蟾素对两株子宫内 膜癌细胞生物学行为的影响

郑剑波,王贤和*

(湖北医药学院附属人民医院,湖北 十堰 442000)

摘要:目的 研究华蟾素对体外培养的两株子宫内 膜癌细胞(PTEN 表达完整的 HEC-1A 细胞和 PTEN 缺失的 Ishikawa 细胞)生物学行为影响并探讨分子机制。方法 以不同浓度华蟾素作用两株子宫内 膜癌细胞,MTT 和克隆形成法检测细胞增殖;流式细胞法检测细胞周期及凋亡率;Transwell 法检测侵袭;RT-PCR 和 Western blot 法检测胰岛素生长因子-1 受体(IGF-1R)基因和蛋白表达。结果 PTEN 基因缺失的 Ishikawa 细胞随华蟾素浓度升高,增殖和侵袭能力明显降低,凋亡率显著升高,G1 期细胞比例明显增多,IGF-1R 基因和蛋白表达显著下降,HEC-1A 细胞对华蟾素作用不敏感。结论 PTEN 基因缺失可增强子宫内 膜癌细胞对华蟾素的敏感性。

关键词:华蟾素; 子宫内 膜癌; PTEN 基因

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2017.10.026

中图分类号: R285.6 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2017)10-2380-03

子宫内 膜癌是女性常见恶性肿瘤之一,主要采用手术为主的综合治疗模式,由于子宫内 膜癌近年来发病呈年轻化趋势,更多有生育需求的患者要求保留子宫,因而,针对子宫内 膜癌患者实施保守性治疗的研究受到了越来越多的关注^[1]。

传统中医中药在肿瘤治疗中发挥着越来越大的作用,华蟾素就是抗肿瘤中药中疗效确切,具有代表性的中药制剂,除具有抗肿瘤作用外,还具有抗病毒、强心、镇痛、增强机体免疫力等多种药理活性^[2,3]。临床上使用的华蟾素注射液主要活性成分有蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾素毒基等,能对肿瘤细胞产生抑制增殖、诱

导凋亡、促进分化、阻止转移等作用。华蟾素在临床主要用于白血病、膀胱癌、肝癌、胃癌、肺癌等恶性肿瘤的治疗^[4,5],尤其对消化道恶性肿瘤具有较好的疗效^[6],华蟾素对子宫内 膜癌的研究目前报道还较少,本文选择了 PTEN 基因表达不同的两株子宫内 膜癌细胞株,体外观察了华蟾素对其生物学行为的影响。

1 材料与仪器

1.1 细胞及培养 PTEN 基因缺失和表达完整的两株子宫内 膜癌细胞株 Ishikawa 和 HEC-1A 购自中科院上海细胞库。在 37℃、饱和湿度 5% CO₂ 条件下培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中,每天更换培养液,每 3 天胰酶消化传代。

1.2 试剂及仪器 华蟾素注射液为安徽金蟾生化股份有限公司生产(生产批号:120811-3);四甲基偶氮唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)及二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;Transwell 小室购自美国 Costar 公司;鼠抗人胰岛素生长因子-1 受体(IGF-1R)单克隆抗体购自美国 Bioworld 公司。BMP 型倒置相差显微

收稿日期:2017-02-23; 修订日期:2017-05-30

基金项目:湖北省自然科学基金(Q20132401)

作者简介:郑剑波(1973-),男(汉族),湖北十堰人,湖北医药学院附属人民医院副主任医师,硕士学位,主要从事肿瘤药理研究工作。

* 通讯作者简介:王贤和(1968-),男(汉族),湖北十堰人,湖北医药学院附属人民医院主任技师,硕士学位,主要从事肿瘤放疗研究工作。