

DOI:10. 3724/SP. J. 1008. 2009. 00699

· 论 著 ·

人参内生真菌的分离及其体外抗真菌、抗肿瘤活性

徐丽莉, 韩 婷, 李 琳, 秦路平*
第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 分离人参内生真菌, 并探讨其代谢产物粗提物的体外抗真菌、抗肿瘤活性。**方法:** 首次对 5 年生园参和 15 年生移山参内生真菌进行了分离, 以稻瘟霉(*Pyricularia oryzae* P-2b)为筛选模型, 采用微量稀释法筛选人参内生真菌体外抗病原真菌活性, MTT 法检测其体外抗肿瘤活性。**结果:** 从人参中共计分离得到内生真菌 48 株, 其中 16 株(33.3%)能完全抑制稻瘟霉活性, 16 株具有活性的内生真菌中 11 株(22.9%, 11/48)抗白念珠菌(*Candida albicans*)、新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)、薰烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)活性较好; 5 株(10.4%, 5/48)抗胃癌细胞(MKN45)、肠癌细胞(LOVO)、肝癌细胞(HepG2)、白血病细胞(HL-60)活性较好。其中, 以园参-25(Yuan-25)抗真菌活性最佳, 其抗红色毛癣菌的 MIC₈₀ 为 4 mg/L, 与阳性对照氟康唑的抗菌活性相当; 园参-27(Yuan-27)抗肿瘤活性最优, 其抗肿瘤细胞的 IC₅₀ 均与阳性对照阿霉素较接近。**结论:** 分离得到的人参内生真菌具有潜在的抗肿瘤、抗真菌活性, 值得进一步研究和开发。

[关键词] 人参; 内生真菌; 分离; 生物活性
[中图分类号] R 978 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0699-04

Isolation of endophytic fungi from *Panax ginseng* and their antifungal and antitumor activities *in vitro*

XU Li-li, HAN Ting, LI Lin, QIN Lu-ping*
Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To isolate endophytic fungi from *Panax ginseng* and study their antifungal and antitumor activities. **Methods:** Endophytic fungi were isolated from 5-year-old garden *ginseng* and 15-year-old transplanted *ginseng*. The antifungal active endophytes were screened with *Pyricularia oryzae* P-2b model using microdilution method, and the activities of endophytes against pathogenic fungi were tested *in vitro*. The antitumor activities of the endophytes were examined by MTT method *in vitro*. **Results:** Sixteen (33.3%) of the 48 endophytic fungi fully suppressed the activity of *P. oryzae* P-2b; 11 (22.9%) colonies showed satisfactory antifungal activities against *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Aspergillus fumigatus*; and 5 (10.4%) colonies showed satisfactory antitumor activities against tumor cell lines MKN45, LOVO, HepG2, and HL-60. Among the bioactive colonies, Yuan-25 showed best antifungal activity, with its MIC₈₀ against *Trichophyton rubrum* being 4 mg/L, which was similar to that of fluconazole. Yuan-27 showed the best antitumor activity, with its IC₅₀ similar to that of doxorubicin. **Conclusion:** Isolated endophytic fungi of *Panax ginseng* has antifungal and antitumor activities and is worth further exploring.

[KEY WORDS] *Panax ginseng*; endophytic fungi; isolation; bioactivity
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6):699-702]

人参为五加科(Araliaceae)人参属植物人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)的根, 始载于《神农本草经》, 是传统名贵中药^[1]。人参含有人参皂苷、氨基酸、肽多糖、维生素、脂肪酸、甾醇及挥发油等成分。人参对中枢神经系统、心血管系统、消化系统、免疫系统、内分泌系统及泌尿生殖系统有广泛的作用, 能增强机体对有害刺激的非特异性抵抗力^[2]。内生真菌(endophytic fungi)是指那些在其生活史中

某一段时期生活在植物组织内, 对植物组织没有引起明显病害症状的真菌, 包括那些在其生活史中的某一阶段营表生的腐生真菌和对宿主暂时没有伤害的潜伏性病原真菌和菌根菌^[3]。植物内生真菌能产生新的天然产物, 甚至可以产生与宿主植物相同或相近的代谢产物, 因而成为天然产物的重要来源^[4]。为了从药用植物内生真菌中寻找更多的活性菌株, 同时进一步探讨活性菌株与其宿主植物的相关

[收稿日期] 2008-12-19 **[接受日期]** 2009-01-13
[作者简介] 徐丽莉, 硕士, E-mail: XLL1982@163.com
* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871300, E-mail: qinmmu@126.com

性,本研究从园参、移山参中分离了内生真菌并进行了体外抗真菌、抗肿瘤活性的研究,筛选出具有显著生物活性的菌株,为发现新型药物提供更多资源。

1 材料和方法

1.1 样品 药材于2007年6月采自吉林省抚松县,经第二军医大学药学院生药学教研室秦路平教授鉴定为5年生园参和15年生移山参,拉丁名为 *Panax ginseng* C. A. Meyer。

1.2 菌株及细胞株 稻瘟霉(*Pyricularia oryzae* P-2b)由第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室提供;白念珠菌(*Candida albicans*)、新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)、熏烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)由第二军医大学长海医院真菌室提供;胃癌细胞(MKN45)、肠癌细胞(LOVO)、肝癌细胞(HepG2)、白血病细胞(HL-60)由第二军医大学药学院药理学教研室提供。

1.3 培养基及培养液 PDA培养基(土豆,葡萄糖);KN培养基[(NH_4)₂SO₄,KH₂PO₄,MgSO₄·7H₂O,Ca(NO₃)₂·4H₂O,MnSO₄·H₂O,FeSO₄·7H₂O,蔗糖];查氏培养基(FeSO₄,NaNO₃,NaCl,MgSO₄,KH₂PO₄,蔗糖);萨氏培养基(蛋白胨,麦芽糖);PY培养基(KH₂PO₄,MgSO₄·7H₂O,蛋白胨,酵母粉,葡萄糖);真菌发酵培养基(马铃薯,葡萄糖,蔗糖);SDA培养基(氯霉素,蛋白胨,葡萄糖);YEPD培养液(氯霉素,酵母浸膏,蛋白胨,葡萄糖);RPMI 1640培养液(RPMI 1640,NaHCO₃,吗啡,丙磺酸)。

1.4 药品、试剂与仪器 酮康唑(ketoconazole)、氟康唑(fluconazole)、多柔比星(doxorubicin)均由第二军医大学药学院有机化学教研室提供;二甲亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司)。TS100型倒置显微镜(Nikon);SW-CJ-1D型单人净化工作台(江苏苏净集团);HYG-A型全温摇瓶柜(江苏太仓试验设备厂);隔水式电热恒温培养箱、THZ-82A台式恒温振荡器(上海跃进医疗器械厂);Multiskan MK3酶标分析仪(Labsystems Dragon)。

1.5 内生真菌的分离 挑选新鲜、健康园参及移山参,去掉参须、芦头,将根的表面洗净、晾干水分后,进行如下表面消毒:在无菌操作台中用75%乙醇漂洗(20~30 s)→无菌水冲洗4次→5%NaClO溶液或0.1%升汞溶液漂洗(1、3、5、7、10 min)→无菌水冲洗4次→75%乙醇漂洗(20~30 s)→无菌水冲洗4次。无菌滤纸片吸干水分,切成5 mm×5 mm×1

mm的小块接种于培养基上,每个培养皿中接种4块,置28℃恒温培养箱中培养3~30 d,观察到培养基上从各植物组织块内部向周围长出菌丝时,采用尖端菌丝挑取法把真菌转移到新的培养基上继续培养、转接,待纯化后转移到PDA(最常用的真菌培养基,广泛用于保存菌种)斜面试管中,编号,备用^[5]。分离过程中设置对照组,采用经表面消毒的组织块在空白培养基上滚动,使组织块各表面接触到培养皿,与接种好的培养皿一起培养,对照培养皿上未长出菌落,说明表面消毒彻底。

经过预实验,选择75%乙醇漂洗(20~30 s)→无菌水冲洗4次→5%NaClO溶液漂洗5 min→无菌水冲洗4次→75%乙醇漂洗(20~30 s)→无菌水冲洗4次为最佳表面消毒条件,进行内生真菌的分离。

1.6 内生真菌代谢产物粗提物的制备 于250 ml的三角瓶中加入80 ml液体培养基,将内生真菌接种在培养液中,摇床(28℃、180次/min)振荡培养6~7 d。待真菌发酵成熟,过滤去菌丝体,滤液用乙酸乙酯萃取3次,合并、浓缩后称质量,即为乙酸乙酯粗提液供试样品。

1.7 稻瘟霉模型筛选 稻瘟霉菌种接种在PDA斜面上,28℃培养7~10 d。每支试管分次加入约15 ml双蒸水,刮下孢子,振摇片刻,用双层纱布过滤,镜检调整至孢子数为4×10⁴ CFU/ml(CFU,菌落形成单位),孢子液中加2%酵母提取液300 μl。将样品分别用10%甲醇溶液稀释,取50 μl加入96孔微量板第一行中;以甲醇为阴性对照,阴性对照孔每孔加10%甲醇50 μl;空白对照孔每孔加50 μl无菌水;阳性对照为50 μl酮康唑。所有孔均加孢子悬液50 μl,上述试样及对照均进行倍半稀释,使最终浓度分别为500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8 μg/ml。将96孔板于培养箱中27℃、85%湿度培养14~16 h,在倒置显微镜下观察稻瘟霉孢子萌发、菌丝生长及形态变化情况^[6]。根据稻瘟霉模型筛选结果,选择完全抑制稻瘟霉孢子萌发的菌株进行抗真菌、抗肿瘤活性筛选。

1.8 抗病原真菌实验 取处于指数生长期后期的新生隐球菌、白念珠菌菌液至1 ml YEPD培养液中,于35℃、250次/min振荡培养,活化16 h后,用血细胞计数板计数,以RPMI 1640培养液调整菌液浓度至1×10³~5×10³/ml。

将熏烟曲霉菌、红色毛癣菌接种至SDA斜面,于30℃,熏烟曲霉菌培养1周,红色毛癣菌培养2周。以上2种菌按本方法活化2次后,加适量RPMI 1640培养液于SDA斜面,用吸管吹打菌落,使真菌

孢子游离于 RPMI 1640 培养液中,然后经四层无菌纱布过滤。培养液经血细胞计数板计数后,加 RPMI 1640 培养液调整孢子浓度至 $1\times 10^3\sim 5\times 10^3$ /ml。

受试药物分别用 DMSO 配成 6.4 g/L 溶液, -20℃ 保存。实验前,将药液取出置 35℃ 温箱融化备用。取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加 RPMI 1640 100 μl 作空白对照;3~12 号孔各加新鲜配制的菌液 120 μl;2 号孔分别加菌液 160 μl 和受试化合物溶液 1.6 μl。2~11 号孔 10 级 4 倍稀释,使各孔中的药物终浓度分别为 64、16、4、1、0.25 和 0.062 5、0.015 6、0.003 9、0.000 97、0.000 24 mg/L,各孔中 DMSO 含量均低于 1%;12 号孔不含药物,作阳性对照。各药敏板于 35℃ 培养^[7]。

白念珠菌、新生隐球菌、红色毛癣菌及熏烟曲霉菌的药敏板分别于 35℃ 培养 24 h、72 h、7 d 和 4 d 后,用 MK-3 全自动酶标仪测各孔 630 nm 光密度(D)值,计算 MIC₈₀。

1.9 抗肿瘤活性检测 样品用 DMSO 溶解后,加入 PBS(-)配成 1 mg/ml 的溶液或均匀的混悬液,然后用含 DMSO 的 PBS(-)稀释。

选择胃癌细胞(MKN45)、肠癌细胞(LOVO)、肝癌细胞(HepG2)及白血病细胞(HL-60)作为检测

细胞株,用 MTT 法测定样品抗肿瘤活性。96 孔板每孔加入密度为 $4\times 10^4\sim 6\times 10^4$ /ml 的细胞悬液 100 μl,置 37℃、5%CO₂培养箱内。24 h 后加入样品液 10 μl/孔,设双复孔,于 37℃、5%CO₂作用 72 h。

96 孔板的每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,作用 4 h 后加入溶解液 100 μl/孔,置培养箱内,溶解后用 MK-3 全自动酶标仪测 570 nm D 值,计算 IC₅₀。

2 结 果

2.1 内生真菌分离结果 本实验从人参中共计分离到内生真菌 48 株,园参中分离得到 27 株,移山参中分离到 21 株,所占比例分别为 56%、44%。2 种人参中分离到的真菌形态各异,但都存在着内生真菌分离较缓慢、最适培养基为 PDA 培养基的特点,从接种的组织块上长出真菌的时间为 10~30 d。

2.2 稻瘟霉模型筛选结果 能完全抑制稻瘟霉孢子萌发的有 16 株真菌代谢产物,表明这些内生真菌具有潜在的生物活性。活性菌株占菌株总数的 33.3%,其中园参菌株 9 株,移山参菌株 7 株。结果见表 1。

表 1 稻瘟霉模型筛选结果
Tab 1 Anti-*Pyricularia oryzae* activity of the endophytic fungi

Samples	Concentration ρ _B /(mg · L ⁻¹)						
	500.0	250.0	125.0	62.5	31.3	15.6	7.8
Yuan-4	×	+	-	-	-	-	-
Yuan-8	×	×	×	×	⚡	⚡	⚡
Yuan-22	×	×	×	⚡	⚡	-	-
Yuan-23	×	×	×	×	×	×	⚡
Yuan-25	×	×	×	×	×	×	×
Yuan-27	×	×	⚡	⚡	⚡	⚡	-
Yuan-29	×	×	⚡	-	-	-	-
Yuan-30	×	×	⚡	⚡	⚡	-	-
Yuan-31	×	⚡	⚡	⚡	-	-	-
YSS-1	×	×	⚡	-	-	-	-
YSS-3	×	⚡	⚡	-	-	-	-
YSS-4	×	⚡	-	-	-	-	-
YSS-7	×	⚡	⚡	⚡	-	-	-
YSS-8	×	-	-	-	-	-	-
YSS-13	×	×	⚡	-	-	-	-
YSS-20	×	+	-	-	-	-	-
Blank control	-	-	-	-	-	-	-
Methanol	-	-	-	-	-	-	-
KCZ ^a	×	×	×	×	×	×	×

^a:Ketoconazole (KCZ) serving as positive control. Symbols -:No antagonistic action; +:Presence of antagonistic action; ⚡:Moderate antagonistic action; ⚡:Strong antagonistic action; ×:The growth was inhibited

2.3 抗病原真菌实验结果 结果(表 2)表明,共计 11 株内生真菌粗提物具有抗真菌活性。其中,

园参-25(Yuan-25)、园参-27(Yuan-27)、园参-31(Yuan-31)活性较显著。

表 2 体外抗真菌活性实验结果 MIC₈₀
Tab 2 *In vitro* antifungal activity of endophytic fungi MIC₈₀
[ρ_B/(mg·L⁻¹)]

Sample	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Yuan-4	128	>128	>128	>128
Yuan-8	128	128	>128	>128
Yuan-23	128	>128	>128	>128
Yuan-25	8	2	4	>64
Yuan-27	15	64	>128	>128
Yuan-29	128	>128	>128	>128
Yuan-30	>128	>128	128	>128
Yuan-31	>128	8	128	>128
YSS-1	>128	128	>128	>128
YSS-13	>128	128	>128	>128
YSS-20	>128	>128	64	>128
AMB ^a	0.25	0.5	4	>64

^a:Amphotericin B(AMB) serving as positive control

2.4 抗肿瘤实验结果 表 3 数据显示,5 株内生真菌抗肿瘤活性较好,其中园参-27(Yuan-27)的抗肿瘤细胞活性较显著。

表 3 抗肿瘤实验筛选结果 IC₅₀
Tab 3 *In vitro* antitumor activity of endophytic fungi IC₅₀
[ρ_B/(mg·L⁻¹)]

Samples	MKN45	LOVO	HepG2	HL-60
Yuan-25	39.35	27.36	100	31.78
Yuan-27	0.083 4	1.358 0	0.069 5	0.006 7
Yuan-31	>100	84.53	>100	0.331
YSS-3	78.52	50.72	92.74	0.0780
YSS-8	7.80	10.33	60.10	8.05
DOX ^a	0.062 2	0.012 5	0.035 0	<0.001

^a:Doxorubicin(DOX) serving as positive control

3 讨论

抗稻瘟霉实验结果显示:16 株内生真菌具有潜在的抗真菌、抗肿瘤活性,占菌株总数的 33.3%,其中园参内生真菌 9 株,移山参内生真菌 7 株。将这 16 株真菌代谢产物进行抗病原真菌实验及抗肿瘤细胞实验,数据显示园参-25(Yuan-25)、园参-27(Yuan-27)、园参-31(Yuan-31)等 11 株(22.9%)内生真菌的抗病原真菌活性较好,园参-27(Yuan-27)、移山参-3(YSS-3)、移山参-8(YSS-8)等 5 株(10.4%)内生真菌的抗肿瘤活性较好。其中,以园参-25(Yuan-25)次生代谢产物抗真菌活性最佳,其抗红色毛癣菌的 MIC₈₀ 为 4 mg/L,与阳性对照氟康

唑的抗菌活性相当;园参-27(Yuan-27)次生代谢产物抗肿瘤活性最好,其抗 4 种肿瘤细胞株的 IC₅₀ 均与阳性对照多柔比星较接近,且发酵培养后产量较大,目前正在对其进行柱色谱分离,希望能从中发现具有抗肿瘤活性的化合物。

近年来,关于内生真菌产生的重要生物活性物质的筛选是目前内生真菌研究领域的一个热点。植物内生真菌由于其所处的特殊环境,有次生代谢过程的复杂性与灵活性,会产生一些结构新颖、活性显著的成分^[8],可以缓解植物资源的短缺、生态平衡的破坏。药用植物内生真菌开发较少,是应用前景广阔的微生物资源,相关研究将有利于我国微生物药物、天然产物的开发和珍稀植物资源的保护^[9]。

本研究首次对园参及移山参的内生真菌进行了分离及活性测试,利用稻瘟霉模型、抗真菌实验及抗肿瘤实验,筛选出了若干活性较好菌株,下一步研究工作是进行活性菌株代谢产物的积累,并进行化学分离,期望能得到结构新颖、生物活性显著的单体化合物,扩大药用资源。

[参考文献]

[1] 吴锦忠,李向高,杨继祥.红参与鲜人参挥发油成分比较研究[J].海峡药学,1996,8:5-6.

[2] Cho K M,Hong S Y, Lee S M, Kim Y H, Kahng G G, Lim Y P, et al. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens[J]. Micr Ecol,2007,54:341-351.

[3] 庞蕾,严铸云,梁俊玉,李晓华.内生真菌在中药中的应用前景[J].时珍国医国药,2005,16:242-243.

[4] 黎万奎,胡之璧.内生菌与天然药物[J].中国天然药物,2005,3:193-199.

[5] Huang W Y,Cai Y Z,Xing J, Harold C,Sun M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants[J]. Economic Botany,2007,61:14-30.

[6] Kobayashi H, Namikoshi M, Yoshimoto T, Yokochi T. A screening method for antimitotic and antifungal substances using conidia of *P. oryzae*, modification and application to tropical marine fungi[J]. J Antibiot,1996,49:873-879.

[7] 欧阳小方,曹永兵,孙青葵,王彦,姜远英.一种三唑醇类化合物的体内外抗真菌活性研究[J].第二军医大学学报,2008,29:813-816.

Ouyang X F,Cao Y B,Sun Q Y,Wang Y,Jiang Y Y. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of a triadimenol compound[J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2008,29:813-816.

[8] Weber R W,Kappe R, Paululat T, Mösker E, Anke H. Anti-*Candida metabolites* from endophytic fungi[J]. Phytochemistry,2007,68:886-892.

[9] Li W C,Zhou J,Guo S Y,Guo L D. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China[J]. Fungal Diversity,2007,25:69-80.