

三尖杉内生真菌次生代谢产物的活性成分分析

陈文强^{1,2*}, 刘兆迪¹, 程贤利³, 解修超^{1,2}, 邓百万^{1,2}, 彭浩^{1,2}, 乔艳明¹

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001;

2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001;

3. 汉中职业技术学院 药学与医学技术系, 陕西 汉中 723000)

[摘要] 目的:研究三尖杉内生真菌次生代谢产物的活性成分。方法:采用滤纸片扩散法和噻唑蓝比色法对三尖杉内生真菌 CEP18 发酵液的乙酸乙酯提取物进行抑菌和细胞毒活性测试,利用 GC-MS 分析活性成分。结果:三尖杉内生真菌次生代谢产物对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及人早幼粒急性白血病细胞 HL-60 的生长抑制作用明显。乙酸乙酯提取物中组分 Fr2 活性最强,主要成分为乳酸丁酯(2.96%),2-氯杀鼠灵酮(8.65%),(*Z*)-11-二十烯酰胺(13.90%),1-甲基芘(3.51%)及丁二酸二甲酯(6.34%)、对羟基苯乙酸(8.27%)、反油酸甲酯(10.07%)、亚油酸(5.60%)、棕榈酸(7.54%)。结论:对羟基苯乙酸在三尖杉属植物的相关研究中属首次报道,为微生物药物的研发和三尖杉的资源利用提供参考。

[关键词] 三尖杉; 内生真菌; 次生代谢产物; 对羟基苯乙酸

[中图分类号] R284.1;R945;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0054-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120054

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150428.1013.004.html>

[网络出版时间] 2015-04-28 10:13

Active Constituents Analysis of Secondary Metabolites in Endophytic Fungus from *Cephalotaxus fortunei*

Root CHEN Wen-qiang^{1,2*}, LIU Zhao-di¹, CHENG Xian-li³, XIE Xiu-chao^{1,2}, DENG Bai-wan^{1,2}, PENG Hao^{1,2}, QIAO Yan-ming¹ (1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China; 2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong 723001, China; 3. Department of Pharmaceutical and Medical Technology, Hanzhong Vocational and Technical College, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] **Objective:** To study active constituents of secondary metabolites in endophytic fungus from *Cephalotaxus fortunei* root. **Method:** Antibacterial and antitumor activity of ethyl acetate extracts from fermentation liquor of an endophytic fungus (CEP18) in *C. fortunei* root were tested by filter paper diffusion method and MTT, active ingredients were analyzed by GC-MS. **Result:** Secondary metabolites in endophytic fungus from *C. fortunei* root significantly inhibited growth of *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and Human promyelocytic leukemia cells (HL-60). After silica gel column chromatography analysis and activity test, five components (Fr1-Fr5) were isolated from ethyl acetate extracts, the Fr2 was identified as active component, which was mainly composed of butyl lactate (2.96%), 2-chloro ketone warfarin (8.65%), (*Z*)-11-eicosenamide (13.90%), 1-methyl pyrene (3.51%), dimethyl succinate (6.34%), 4-hydroxyphenylacetic acid (8.27%), elaidic acid-methyl ester (10.07%), linoleic acid (5.60%) and hexadecanoic acid (7.54%). **Conclusion:** 4-Hydroxyphenylacetic acid is reported for the first time in *C. genus* at present research and is worthy of further development and utilization.

[Key words] *Cephalotaxus fortunei*; endophytic fungus; secondary metabolites; 4-hydroxyphenylacetic acid

[收稿日期] 20140928(016)

[基金项目] 陕西省教育厅专项科研项目(14JK1150)

[通讯作者] * 陈文强,教授,硕士生导师,从事微生物资源的保护、开发和利用研究,Tel:0916-2642832,E-mail:wenqiang@126.com

三尖杉分布于陕西南部、甘肃南部等地,散生于海拔 800 ~ 2 000 m 的山林边缘、路旁及山涧潮湿地带^[1-2]。三尖杉的杀菌、抗肿瘤作用早有记载:嫩枝或全株治内脏出血、抗癌(《滇药录》)。但该药材药用价值体现始于其提取物中抗肿瘤成分的发^[3],经过对各种成分的化学、药理及临床等方面的深入研究,发现有 10 种成分具有药理活性,其中三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱已用于临床治疗急性白血病及部分实体瘤^[4]。药用植物内生真菌及其产生的次生代谢产物中活性成分的探索可很好地解决植物资源短缺的问题,更有利于微生物药物的开发和利用。本实验选择秦巴山区特殊地理环境条件下的三尖杉为研究材料,在菌株分离及筛选的基础上,将活性较好的菌株 CEP18 进行发酵,利用气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)分析其次生代谢产物,为微生物药物的研发和三尖杉资源的合理开发提供理论依据。

1 材料

LRH-250-GS 型数显式恒温培养箱(广东省医疗器械厂), ZHWY-210 2C 型数显式恒温摇床(上海志成公司), NIB-100 型倒置生物显微镜(苏州南光电子), 3110 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司), 680 型酶标分析仪(美国 Bio-rad 公司), GCMS-QP2010Plus 型气相色谱-质谱联用仪(日本岛津)。三尖杉内生真菌 CEP18 分离自秦巴山区陕西留坝县三尖杉科植物野生三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* 的根部,保存于陕西省资源生物重点实验室菌种保藏中心。大肠埃希菌(*Escherichia coli*, ATCC8739),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, ATCC6633),白色念珠菌(*Monilia albican*, ATCC10231),沙门氏菌(*Salmonella typhi*, ATCC14028)均购自美国菌种保藏中心,保存于陕西省食药菌工程技术研究中心。人早幼粒急性白血病细胞 HL-60(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),马铃薯葡萄糖培养基(PDA,马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 15.0 g,加水定容至 1 L, pH 自然),马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB,马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,加水定容至 1 L, pH 自然),LB 培养基(胰蛋白胨 10.0 g,酵母膏 5.0 g, NaCl 10.0 g,琼脂 12.0 g,加水定容至 1 L, pH 7.0 ~ 7.2),肿瘤细胞培养基(RPMI-1640,含 10% 胎牛血清),二甲基亚砜(DMSO,天津科密欧公司),噻唑蓝(MTT,美国 Amresco 公司),柱色谱用硅胶(200 ~ 300 目,青岛海洋化工),GC-MS 用溶剂为农

残级甲醇,水为无菌水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 菌株的发酵及萃取 将三尖杉内生真菌 CEP18 经 PDA 培养基活化后,接种于装有 PDB 培养基 300 mL 的 1 L 锥形瓶中,于 28 °C, 160 r·min⁻¹ 振荡培养 3 d,作为种子液备用。无菌条件下取种子液 10 mL 接种至 500 mL 锥形瓶中,每瓶装有 PDB 培养基 200 mL,共接种 50 L,同等条件下振荡培养 7 d。培养结束后,将菌液真空抽滤,滤液用等量乙酸乙酯重复萃取 3 次,合并乙酸乙酯相,减压浓缩得粗提物 10.2 g。

2.2 乙酸乙酯提取物的分离 利用硅胶柱色谱法对乙酸乙酯提取物进行分离,湿法上样,采用石油醚-乙酸乙酯(12:1, 8:1, 4:1, 0:1)和乙酸乙酯-甲醇(16:1, 8:1, 4:1, 0:1)为洗脱剂不连续梯度洗脱,粗分成 Fr1 (105.0 mg), Fr2 (387.0 mg), Fr3 (29.0 mg), Fr4 (16.0 mg), Fr5 (22.0 mg) 共 5 个组分。

2.3 抗菌活性测试^[5] 采用滤纸片扩散法。取干燥后的组分 Fr1 ~ Fr5 各 1.0 mg,分别溶于甲醇 1 mL 中,作为待测品备用。指示菌株分别活化培养(白色念珠菌采用 PDA 培养基,28 °C 恒温培养;大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和沙门氏菌采用 LB 培养基,37 °C 恒温培养)后,加水稀释成 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU·mL⁻¹ 的菌悬液(CFU 为菌落形成单位),均匀涂布于供试无菌平板。无菌条件下将灭菌滤纸片浸泡于待测样品中 30 min,取出挥干,置于含菌平板上,每种指示菌株 3 个重复,空白滤纸片为阴性对照,恒温培养 24 h 后观察,测量抑菌圈直径,结果取平均值,见表 1。表明组分 Fr2 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的生长具有较明显的抑制作用,抑菌圈直径分别为 23.0, 26.0 mm,对沙门氏菌的活性较弱,而对大肠埃希菌和白色念珠菌则无抑制活性。其他 4 个组分对 5 种指示菌株均无明显抑制活性。

2.4 体外细胞毒活性测试 取干燥的组分 Fr1 ~ Fr5 各 2.0 mg,分别溶于适量 DMSO 中,加磷酸盐缓冲液配成 1.0 g·L⁻¹ 的溶液或均匀的混悬液,作为待测样品备用(DMSO 终质量分数 < 1%)。选取对数期生长的 HL-60 细胞,用 RPMI-1640 培养基制成 5×10^4 个/mL 的单细胞悬液,每孔 100 μL 接种于 96 孔板,取待测样品 10 μL 加入各孔,每种样品 5 孔重复,同时设置空白对照,置于 37 °C,含 5% CO₂ 和 95% 空气饱和湿度的培养箱中培养 72 h,取出,每孔加入 5.0 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μL,同一条件下培

表 1 三尖杉内生真菌 CEP18 发酵液乙酸乙酯提取物各组分的抑菌圈直径

Table 1 Inhibition zone diameters of each component in ethyl acetate extracts from fermentation liquor produced by endophytic fungi CEP18 in *Cephalotaxus fortunei* root

组分	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	沙门氏菌
Fr1	-	-	+	-	+
Fr2	+++	-	+++	-	+
Fr3	+	-	-	-	+
Fr4	-	-	-	-	+
Fr5	-	-	-	-	-

注：“+”表示 < 10 mm，“++”表示 10 ~ 20 mm，“+++”表示 > 20 mm，“-”表示无抑菌活性。

养 4 h 后取出,向各孔加入 DMSO 100 μ L 充分溶解,运用酶标仪于 490 nm 测定各孔吸光度 A ,按抑制率 = $(1 - A_{\text{试验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 计算组分 Fr1 ~ Fr5 对肿瘤细胞生长的抑制率分别为 22.51%, 50.65%, 13.92%, 13.67%, 7.12%, 说明组分 Fr2 对人早幼粒急性白血病细胞 HL-60 显示出了较明显的抑制作用,组分 Fr1 的细胞毒活性较弱,而其他

表 2 三尖杉内生真菌 CEP18 发酵液乙酸乙酯提取物 Fr2 组分的 GC-MS 分析

Table 2 GC-MS analysis of Fr2 in ethyl acetate extracts from fermentation liquor produced by endophytic fungi CEP18 in *Cephalotaxus fortunei* root

No.	化合物		分子式	相对分子质量	相对质量分数/%
	英文名	中文名			
1	butyl lactate	乳酸丁酯	$C_7H_{14}O_3$	146	2.96
2	methyl 3-methylbenzoate	3-甲基苯甲酸甲酯	$C_9H_{10}O_2$	150	1.72
3	2(3H)-benzofuranone	2-氯杀鼠灵酮	$C_8H_6O_2$	134	8.65
4	dimethyl succinate	丁二酸二甲酯	$C_6H_{10}O_4$	146	6.34
5	4-hydroxyphenethyl alcohol	对羟基苯乙醇	$C_8H_{10}O_2$	138	0.62
6	4-hydroxyphenylacetic acid	对羟基苯乙酸	$C_8H_8O_3$	152	8.27
7	cis-11-eicosenamide	(Z)-11-二十烯酰胺	$C_{20}H_{39}NO$	309	13.90
8	benzeneacetic acid, methyl ester	苯乙酸甲酯	$C_9H_{10}O_2$	150	0.63
9	elaidic acid, methyl ester	反油酸甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	296	10.07
10	octadecanoic acid, methyl ester	硬脂酸甲酯	$C_{19}H_{38}O_2$	298	5.90
11	ethyl oleate	油酸乙酯	$C_{20}H_{38}O_2$	310	2.03
12	isoamyl laurate	月桂酸异戊酯	$C_{17}H_{34}O_2$	270	2.28
13	1-methylpyrene	1-甲基芘	$C_{17}H_{12}$	216	3.51
14	diisooctyl phthalate	邻苯二甲酸二异辛酯	$C_{24}H_{38}O_4$	390	0.62
15	squalene	角鲨烯	$C_{30}H_{50}$	410	0.16
16	linoleic acid	亚油酸	$C_{19}H_{34}O_2$	294	5.60
17	docosanoic acid, methyl ester	二十二烷酸甲酯	$C_{23}H_{46}O_2$	354	0.36
18	hexadecanoic acid	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	256	7.54

组分则未表现出明显的细胞毒活性。取适量组分 Fr2 稀释成 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6 $mg \cdot L^{-1}$ 共 6 个质量浓度,方法同上,测试该组分在不同质量浓度下的细胞毒活性,计算半抑制浓度 (hemi-inhibitory concentration, IC_{50}) 8.721 $mg \cdot L^{-1}$ 。提示菌株 CEP18 发酵液乙酸乙酯提取物的抑菌和细胞毒活性成分较好地集中在组分 Fr2。

2.5 组分 Fr2 的 GC-MS 分析 取 Fr2 组分 30.0 mg 溶于甲醇中,经滤纸过滤后进行 GC-MS 分析。气相色谱条件为 Agilent DB-5 ms 毛细管柱 (0.25 mm \times 30 m, 0.25 μ m), 程序升温 (60 $^{\circ}C$ 开始,保持 3 min; 以 15 $^{\circ}C \cdot min^{-1}$ 升至 270 $^{\circ}C$, 保持 10 min), 载气 He, 柱流量 1 $mL \cdot min^{-1}$, 进样口温度 250 $^{\circ}C$, 分流比 40:1。质谱条件为接口温度 270 $^{\circ}C$, EI 源, 电离电压 70 eV, 离子源温度 200 $^{\circ}C$, 扫描范围 m/z 28 ~ 400, 进样量 1 μ L。利用 NIST08 谱库检索质谱数据,对机检结果和保留时间与标准图谱核对,利用峰面积归一化法确定化合物的相对质量分数,见表 2。结果共检出 27 种成分,经多重比对鉴定了其中 18 种化学成分,占总量的 94.37%,对羟基苯乙酸在三尖杉属植物的相关研究中属首次发现。

3 讨论

近年有关三尖杉内生真菌次生代谢产物的文献报道相继增多。例如对羟基苯乙醇一般作为重要的医药和香料中间体,用于合成美多洛尔、倍他洛尔、红景天苷等药物^[6]。解修超等^[7]于2013年首次在三尖杉种仁挥发油中发现角鲨烯,该成分可用于肝炎和癌症的防治,尤其在癌切除外科手术或采用放疗化疗时使用,效果显著,其最大的特点是防止癌症向肺部转移。研究发现从植物组织中提取的棕榈酸、肉豆蔻酸、亚油酸等脂肪酸可对存在于肉制品中的金黄色葡萄球菌显示出较高的抑制作用^[8-9]。

通过对秦巴山区生长的野生三尖杉内生真菌进行次生代谢产物分析,发现对羟基苯乙酸可用于生产抗高血压药物——阿替洛尔及 β -受体阻滞药、抗癌药、抗过敏药和消炎药,合成抗生素药物拉氧头孢钠和心血管药物葛根黄豆苷元的有效成分4,7-二羟基异黄酮,还可用作农药中间体。另外,对羟基苯乙酸在分子、光电子、生化领域也有一定应用^[10-11]。本文通过对抑菌和细胞毒活性相对较强的组分Fr2进行GC-MS分析,鉴定了其中18种化学成分,主要为酯类物质,占全部鉴定成分的32.91%。含量相对较高的2-氯杀鼠灵酮、(Z)-11-二十烯酰胺等化学成分用途和作用机制尚不明确,需利用多种柱色谱技术对组分Fr2继续分离和纯化,并结合波谱数据和理化性质做进一步分析确认。

[参考文献]

[1] 傅立国. 三尖杉属的研究[J]. 植物分类学报, 1984,

22(4):277-288.

- [2] 解修超,陈文强,邓百万,等. 三尖杉种仁挥发油的化学成分及生物活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(10):76-80.
- [3] Powell R G. Structures of homoerythrina alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia* [J]. *Phytochemistry*, 1972, 11(4):1467-1472.
- [4] 刘兆迪,解修超,陈文强,等. 三尖杉属植物内生真菌及此生代谢产物活性研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013,41(8):11-14.
- [5] 丁小维,刘开辉,邓百万,等. 中国红豆杉内生细菌的分离鉴定及活性研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10):1577-1580.
- [6] 陈苹,吴娇,戴好富,等. 海南粗榧内生真菌 S26 化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(4): 279-283.
- [7] 解修超,陈文强,邓百万,等. 三尖杉内生真菌 SR1-26 挥发油成分及抑菌活性研究[J]. 陕西理工学院学报. 2013,29(4):56-60.
- [8] 王筱菁,李万根,苏杭,等. 棕榈酸及亚油酸对人成骨肉瘤细胞 MG63 作用的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(8):542-546.
- [9] 李强,刘军,周东坡,等. 植物内生菌的开发与研究进展[J]. 生物技术通报, 2006(3):33-37.
- [10] 林燕青,林森,洪伟. 中国海岸带研究文献的统计及其分析[J]. 海洋开发与管理, 2011, 28(9):74-79.
- [11] 王志伟,陈永敢,纪燕玲,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.

[责任编辑 刘德文]