

昆明山海棠内生真菌 α -糖苷酶抑制活性的 筛选及菌株鉴定

郑喜¹, 李国红², 王芯², 祁燕¹, 李小丝¹, 万春平^{1*}

(1. 云南中医学院 第一附属医院, 昆明 650021;

2. 云南大学 云南省生物资源保护与利用重点实验室, 昆明 650021)

[摘要] **目的:** 评价昆明山海棠内生真菌 α -糖苷酶抑制活性。**方法:** 以昆明山海棠分离所得的 98 株内生真菌为研究对象, 通过建立体外 α -糖苷酶抑制剂筛选模型, 以阿卡波糖为阳性药, 对分离自昆明山海棠的 98 株内生真菌发酵液正丁醇提取物进行活性筛选, 并对活性菌株 ThF-63 进行鉴定。**结果:** 在底物 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)浓度为 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶浓度 $0.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 反应时间 15 min 条件下, 98 株内生真菌中, 15 株菌正丁醇提取物表现出 α -糖苷酶抑制活性 ($\text{IC}_{50} < 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), ThF-63 最为显著 ($\text{IC}_{50} 1.034 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 且呈现浓度依赖性关系; 经 ITS 鉴定活性菌株 ThF-63 为链革孢属真菌 (*Alternaria*)。 **结论:** 昆明山海棠内生真菌中筛选出具有抑制 α -糖苷酶作用的菌株链革孢属真菌 (*Alternaria*)。

[关键词] 昆明山海棠; α -糖苷酶抑制剂; 阿卡波糖; 内生真菌; 活性筛选; 链格孢属

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0122-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230122

Screening and Strains Identification of α -Glucosidase Inhibitory Activity from Endophytes of *Tripterygium hypoglaucum* ZHENG Xi¹, LI Guo-hong², WANG Xin², QI Yan¹, LI Xiao-si¹, WAN Chun-ping^{1*} (1. First Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China; 2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resource, and Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650021, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the inhibitory activity of α -glucosidase from the endophytes of *Tripterygium hypoglaucum*. **Method:** With 98 endophytes isolated from *T. hypoglaucum* as the research objects and acarbose as positive medicine, α -glucosidase *in vitro* screening models were established to conduct activity screening of n-butanol extracts from 98 endophytes fermentation liquor of *T. hypoglaucum*. The active strain ThF-63 was identified based on fungal ITS sequence. **Result:** In the substrate, under the conditions where 4-nitropheny- α -D-glucopyranoside (PNPG) concentration was of $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, enzyme concentration of $0.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ and response time of 15 min, n-butanol extracts from 15 strains of 98 endophytes showed significant α -glucosidase inhibitory activity ($\text{IC}_{50} < 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). ThF-63 was one of the most significant strain against α -glucosidase ($\text{IC}_{50} 1.034 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), with concentration dependence relations. The endophyte ThF-63 was identified as *Alternaria* by ITS method. **Conclusion:** *Alternaria* with α -glucosidase inhibitory activity were screened from the endophytes of *T. hypoglaucum*.

[Key words] *Tripterygium hypoglaucum*; α -glucosidase inhibitor; acarbose; endophyte; activity screening; *Alternaria*

[收稿日期] 20141016(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460624); 云南省教育厅科学研究项目重点项目(22012Z004)

[第一作者] 郑喜, 硕士, 助理研究员, 从事微生物活性天然产物化学研究, Tel:0871-63623051, E-mail:zhengxi138@163.com

[通讯作者] * 万春平, 博士, 讲师, 硕士生导师, 从事天然产物药效学及机制研究, Tel:0871-63623051, E-mail:wanchunping1012@163.com

糖尿病是严重威胁人类健康的慢性病之一,其发病率仅次于心脑血管疾病、癌症而居第 3 位^[1]。目前针对 2 型糖尿病的口服降糖药主要有以下四类:磺酰脲类、双胍类、噻唑烷二酮类及 α -葡萄糖苷酶抑制剂类,其中 α -糖苷酶抑制剂作为一类有效的口服降糖药受到广泛关注。周晓玲^[2]从桑树中分离得到两株产 α -糖苷酶抑制剂 1-脱氧野尻霉素(DNJ)的内生菌 Y1 和 Y2,并对其活性物质发酵产物分离、纯化;Stratmann 等^[3]从游动放线菌 *Actinoplanes* 中获得了阿卡波糖;海洋微生物^[4]和海藻^[5]也是 α -糖苷酶抑制剂的重要来源。因此,利用微生物获得 α -糖苷酶抑制剂成为糖尿病药物研究的重要方向。

药用植物是微生物的主要寄主,从药用植物内生菌中获得治疗糖尿病的活性物质是一条重要途径。目前,国内、外对药用植物昆明山海棠的研究主要集中在化学成分及免疫抑制、抗肿瘤活性的研究方面,而对其内生真菌以及其内生真菌来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究较少^[6-9]。本研究基于“药用植物-内生菌-活性成分”的研究思路,对从昆明山海棠中分离所得到的 98 株内生真菌进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选,为抗糖尿病药物研究和拓展民族药昆明山海棠药物价值提供基础。

1 材料

1.1 药物及试剂 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, EC 3.2.1.20), 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, PNPG, 美国 Sigma 公司,批号 BCBL2222V), 牛血清白蛋白(BSA, MP Biomedicals 生物学公司,批号 2035), 阿卡波糖(Acarbose, 商品名:拜唐苹, 美国 Sigma 公司,批号 P500253), 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 DHZ-052D 型恒温摇床(上海博彩生物科技有限公司), DHP-9052 型恒温培养箱(上海一恒科技有限公司), Heidolph 型旋转蒸发器(德祥科技有限公司), Epoch 型连续波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 实验用培养基 马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA)(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL), 马铃薯葡萄糖培养基(PDB)(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL)。

2.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

2.2.1 菌株来源、培养及粗提物制备 98 株内生

真菌分离自昆明山海棠,菌株于 PDA 培养基上纯化培养后,接种于 PDB 培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$, 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 5~8 d。各菌株发酵液过滤后用等量正丁醇萃取 3 次,合并后减压浓缩得各粗提物,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 反应体系的优化

2.2.2.1 最适底物浓度 反应体积为 160 μL , 在反应体系中加入 20 μL 0.4 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -葡萄糖苷酶液,再各加入 20 μL 不同浓度(0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 PNPG 底物,实验重复 3 次,观察不同浓度底物对 PNP 生成量(以反应后平均吸光度 A 表示)的影响。

2.2.2.2 最适酶浓度 在反应体系中加入 20 μL 各浓度(1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) α -葡萄糖苷酶液,以最适浓度 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PNPG 为底物,重复 3 次,观察不同浓度酶液对 PNP 生成量(以反应后平均 A 表示)的影响。

2.2.2.3 最佳反应时间 在反应体系中加入 20 μL 0.8 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶液,20 μL 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PNPG,分别于加入 PNPG 后 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 时加入 Na_2CO_3 溶液终止反应,重复 3 次,观察不同反应时间对 PNP 生成量(以反应后平均 A 表示)的影响。

2.2.3 内生菌提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 本检测在 96 孔板上进行,参考刘超等^[10-13]的方法,进行优化后为:磷酸钾缓冲液(pH 6.8) 20 μL , 0.8 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -Glucosidase 20 μL , 样品溶液 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 15 min, 加入 20 μL 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNPG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 15 min, 再加入 80 μL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCO_3 溶液,于 405 nm 波长下测定 A 。对 98 株内生真菌正丁醇提取物进行初筛,据初筛结果对具明显活性的菌株复筛,每个样本设 3 个复孔,试验重复 3 次。按以下公式计算抑制率并用 Origin 软件求出相应的半数抑制浓度(IC_{50})。

$$\text{抑制率} = [1 - (\text{样品测定组} - \text{样品对照组}) / (\text{对照组} - \text{空白组})] \times 100\%$$

酶活力单位定义为:在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.8 的条件下,1 min 内水解 PNPG 释放 1 μmol 对硝基苯酚(PNP)所需的酶量^[14]。

抑制剂活力单位定义为:在相同的条件下降低 1 个酶活力单位所需的抑制剂量。

2.3 活性菌株 ThF-63 的鉴定

2.3.1 DNA 的提取^[15] 将活性菌株 ThF-63 菌丝 0.5~1 g, 在液氮中迅速研磨成粉;加入 500 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 DNA 提取缓冲液,快速振荡混匀 65 $^{\circ}\text{C}$

水浴 30 min, 期间混匀 2 ~ 3 次; 加入 1 mL $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KAc, 冰浴 20 min; 用酚 (pH 8.0): 三氯甲烷: 异戊醇 (25:24:1) 和三氯甲烷: 异戊醇 (24:1) 各抽提 1 次 ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 5 min); 取上清, 加入 2/3 倍体积的 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷异丙醇, 混匀, 静置约 30 min; 用毛细玻璃棒挑出絮状沉淀, 用 75% 乙醇反复漂洗 2 次, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 弃上清, 吹干沉淀, 重悬于 $500 \text{ } \mu\text{L}$ TE buffer 中; 加入 $1 \text{ } \mu\text{L}$ RNaseA ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 处理 1 h, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。(DNA 提取缓冲液: $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0), $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 2% CTAB, 4% PVP40 和 2% 巯基乙醇, PVP 和巯基乙醇, 使用前加入 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KAc)。

2.3.2 ITS 系列扩增 PCR 反应条件: $10 \times$ Ex Buffer $5 \text{ } \mu\text{L}$ $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 4 min, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP $4 \text{ } \mu\text{L}$, $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ITS4 $1 \text{ } \mu\text{L}$ $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ITS5 $1 \text{ } \mu\text{L}$ $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, DNA template $1 \text{ } \mu\text{L}$ $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min, ExTaq $0.15 \text{ } \mu\text{L}$, ddH₂O 加至 $50 \text{ } \mu\text{L}$, 共 30 循环。真菌 ITS 扩增通用引物: ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')。

2.3.3 PCR 扩增产物纯化回收和测序 PCR 结束后, 进行浓度 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 同时以 $5 \text{ } \mu\text{L}$ 的 DNA maker 作为标准参照, 130 V , 15 min 。然后用 Biotake 的 DNA 纯化回收试剂盒, 按说明书要求对扩增产物进行纯化回收。检测后目的 DNA 片段的样品, 送华大基因测序。

3 结果

3.1 反应体系优化

3.1.1 最适底物浓度 实验结果显示, PNP 生成量随 PNPG 浓度增大逐渐增加, 当 PNPG 浓度大于 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, PNP 生成量趋于稳定, 因此选择浓度 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为该反应体系加入 PNPG 的浓度。

3.1.2 最佳酶浓度 实验结果显示, PNP 生成量随酶溶液浓度增大逐渐增加, 当酶液浓度大于 $0.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, PNP 生成量趋于稳定, 故选择 $0.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为该反应体系加入酶液的浓度。

3.1.3 最佳反应时间 实验结果显示, PNP 生成量随反应时间的延长逐渐增加, 当大于 15 min 时, PNP 生成量趋于稳定, 因而选择 15 min 作为该反应体系的最佳反应时间。

3.2 内生真菌提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 在底物 PNPG 浓度为 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶浓度为 $0.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 反应时间为 15 min 的条件下, 对从昆

明山海棠植株中分离所得到的 98 株内生真菌进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性初筛, 部分菌株初筛结果见表 1。初筛结果显示, 98 株受试菌株中, $\text{IC}_{50} < 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的有 15 株, ThF-63 活性最强, 其 $\text{IC}_{50} < 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对活性菌株 ThF-63 进行复筛。见表 2。ThF-63 正丁醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用呈现明显的量效关系, 抑制效果 ($\text{IC}_{50} 1.034 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 高于阿卡波糖 ($\text{IC}_{50} 1.396 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

3.3 菌株分子生物学鉴定结果 经通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 进行扩增, 对扩增产物纯化回收和测序, 并进行 ITS 比对, ThF-63 与链孢属真菌 (*Alternaria*) 相似度达 98%, 因此鉴定该菌株为链孢属真菌 (*Alternaria*)。

表 1 昆明山海棠内生真菌正丁醇提取物对 α -糖苷酶的抑制作用 ($n=3$)

Table 1 Inhibitory activity of endophytes of *Tripterygium hypoglaucum* on α -glucosidase ($n=3$)

样品	$\text{IC}_{50}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	样品	$\text{IC}_{50}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
ThF-66	10.092	ThF-93	10.324
ThF-43	29.803	ThF-97	17.143
ThF-37	17.110	ThF-98	3.963
ThF-16	17.932	ThF-83	15.910
ThF-44	13.850	ThF-47	7.282
ThF-67	12.479	ThF-95	4.510
ThF-53	18.120	ThF-63	0.903
ThF-92	9.997	阿卡波糖	1.442

4 结论

昆明海棠 (*Tripterygium hypoglaucum*) 为卫矛科雷公藤属植物, 又名六方藤、紫金藤、火把花等, 主要分布于我国西南地区。始载于《滇南本草》, 具有祛风通络、活血化瘀的功效, 为拉祜族、哈尼族、彝族等常用药^[16]。研究显示, 昆明海棠主要含有生物碱、萜类、色素类等多种成分, 具有抗炎、抗肿瘤及免疫抑制等多种药理活性^[6-9], 但对其内生真菌 α -葡萄糖苷酶抑制研究较少^[17]。

α -糖苷酶抑制剂如阿卡波糖是一类作用机制新颖、治疗确切、毒副作用低的降血糖药物, 主要用于 2 型糖尿病治疗。它通过竞争性地阻断存在于小肠黏膜微绒毛膜表面的淀粉酶、麦芽糖酶和蔗糖酶等酶活性, 结果使摄入的多糖、寡糖、双糖消化成葡萄糖等单糖的过程受抑制, 从而减少碳水化合物的消化和吸收, 有效地降低餐后血糖。

表 2 ThF-63 正丁醇提取物对 α -糖苷酶的抑制作用 ($n=3$)

Table 2 Inhibitory activity of endophytes of ThF-63 on α -glucosidase ($n=3$)

样品	质量浓度 /g·L ⁻¹	抑制率/%	IC ₅₀ /g·L ⁻¹
ThF-63 正 提取物丁醇	0.156 25	8.57 ± 0.03	1.034
	0.312 5	20.84 ± 0.03	
	0.625	34.10 ± 0.06	
	1.25	57.86 ± 0.04	
	2.5	73.77 ± 0.05	
	5	82.65 ± 0.01	
阿卡波糖	0.156 25	16.76 ± 0.004	1.396
	0.312 5	23.37 ± 0.04	
	0.625	31.82 ± 0.05	
	1.25	45.59 ± 0.001	
	2.5	62.91 ± 0.004	
	5	72.60 ± 0.001	
10	83.41 ± 0.004		

本研究首先对 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型适宜条件进行优化,研究表明,底物 PNPG 浓度为 2.5 mmol·L⁻¹,酶浓度为 0.8 U·mL⁻¹,反应时间为 15 min 为该模型筛选的适宜条件。在此基础上,本研究对从昆明山海棠植株中分离所得到的 98 株内生真菌进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选,结果显示,15 株菌正丁醇提取物表现出明显的 α -糖苷酶抑制活性 (IC₅₀ < 30 g·L⁻¹),以 ThF-63 最显著 (IC₅₀ 1.034 g·L⁻¹),抑制作用呈现明显的量效关系。ITS 鉴定内生真菌 ThF-63 为链孢属真菌 (*Alternaria*)。微生物具有培养简单、成本低,来源广泛,种类繁多,代谢旺盛等特点,该研究进一步拓展了民族药昆明山海棠应用价值,为其二次开发提供了理论依据和参考,对开发云南地产植物药材,促进中药资源的保护、生态环境的平衡、社会的可持续发展具有重要意义。目前有关菌株 ThF-63 α -葡萄糖苷酶抑制活性物质基础尚未明确,有必要进一步在生物活性的指导下开展代谢产物分离与鉴定的研究,从而发现高活性 α -葡萄糖苷酶抑制剂的先导化合物。

[参考文献]

[1] 刘霞,冯长根. 酶抑制剂在抗糖尿病药物中的应用

研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 38(2):89-91.

[2] 周晓玲. 桑树内生菌 *Micrococcus luteus*-Y2 发酵产 DNJ 的研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2011.

[3] Stratmann A, Mahmud T, Lee S, et al. The Acb C protein from *Actinoplanes specise* is a C7-cyclitol synthase related to 3-dehydroquinate synthases and is involved in the biosynthesis of the α -glucosidase inhibitor acarbose [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(16):10889-10896.

[4] 倪孟祥,马丽娜. 海洋微生物来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选及性质研究[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(4):60-67.

[5] 李宪瑾,范晓,韩丽君,等. 海藻提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的初步筛选[J]. 中国海洋药物, 2002, 21(2):8-11.

[6] 刘珍珍,赵荣华,邹忠梅. 昆明山海棠根皮化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18):2503-2506.

[7] 袁桂峰,陈森洲,梁爽,等. 昆明山海棠对 CIA HIF-1 α 的影响[J]. 华夏医学, 2012, 25(1):6-11.

[8] 黄鸣清,蒋东旭,罗明俐,等. 昆明山海棠抗肿瘤活性部位筛选研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20):2633-2636.

[9] 骆耐香,陈森洲,李莎莎,等. 昆明山海棠对胶原诱导型关节炎大鼠的作用及可能机制[J]. 现代免疫学, 2012, 32(4):287-292.

[10] 刘超,王俊霞,顾雪竹,等. 小槐花提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 20(19):91-93.

[11] 张丽,李晓梅,李彩芳,等. 加拿大蓬 α -葡萄糖苷酶抑制作用研究[J]. 河南大学学报:医学版, 2008, 27(4):39-41.

[12] 康文艺,王金梅,张丽. 河南产连翘叶抑制 α -糖苷酶活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(9):1156-1159.

[13] 康文艺,张丽,宋艳丽. 滇丁香中抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4):406-409.

[14] Kang W Y, Song S L, Zhang L. α -Glucosidase inhibitory and antioxidant properties and antidiabetic activity of *Hypericum ascyron* L [J]. *Med Chem Res*, 2011, 20:809.

[15] 吴发红,黄东益,黄小龙,等. 几种真菌 DNA 提取方法的比较[J]. 中国农学通报, 2009, 25(8):62-64.

[16] 宋立人,洪恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典[M]. 上册. 北京:人民卫生出版社, 2001:1271-1273.

[17] 边军昌,冯永辉,杨静,等. 中药内生菌的研究进展[J]. 光明中医, 2010, 25(1):164-165.

[责任编辑 周冰冰]