

产酸模素苷及白藜芦醇苷的毛脉酸模内生真菌筛选

丁常宏¹, 郭美¹, 王谦博², 王振月^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 广东药学院附属第一医院药学部, 广州 510080)

[摘要] 目的:在前期的研究工作中已从不同产地分离得到毛脉酸模内生真菌 278 株,以这些内生真菌为研究对象,寻找能够通过自身发酵产生酸模素苷、白藜芦醇苷的内生真菌。方法:通过 HPLC 检测内生真菌的次生代谢产物,以酸模素苷、白藜芦醇苷为参照,筛选能够产生酸模素苷、白藜芦醇苷的内生真菌,并测定其含量。结果:发现其中的 11 株内生真菌的次生代谢产物中含有酸模素苷,5 株次生代谢产物中含有白藜芦醇苷,其中内生真菌 tq-s1 的次生代谢产物中酸模素苷的质量分数最高($530 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),且白藜芦醇苷的质量分数也最高($224 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。结论:内生真菌的种类和其次生代谢产物的形成受到地理位置的影响,对于酸模素苷和白藜芦醇苷的高产菌株 tq-s1,可以进行开发利用的研究。

[关键词] 毛脉酸模; 内生真菌; 酸模素苷; 白藜芦醇苷

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0045-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230045

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0918.024.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:18

Screening for Endophytic Fungi of *Rumex gmelini* Producing Nepodin-8-*O*- β -D-Glucopyranoside and Polydatin

DING Chang-hong¹, GUO Mei¹, WANG Qian-bo², WANG Zhen-yue^{1*}

(1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Department of Pharmacy, the First Hospital Affiliated to Guangdong
Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:** In the previous study, 278 strains of endophytic fungi were separated from *Rumex gmelini* in different origins. These endophytic fungi were taken as the research object to screen out endophytic fungi that could produce nepodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside and polydatin through fermentation. **Method:** HPLC was used to detect secondary metabolites of endophytic fungi, nepodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside and polydatin were used as reference to screen out endophytic fungi that could produce nepodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside and polydatin, and determine their content. **Result:** Eleven strains of endophytic fungi whose secondary metabolites containing nepodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside were found, meanwhile 5 strains could produce polydatin. Among them, fungi tq-s1 had the highest mass fraction of nepodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside ($530 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and polydatin ($224 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in its secondary metabolites. **Conclusion:** Endogenous fungal species and formation of their secondary metabolites were affected by geographical location. Further studies shall be conducted on the development and utilization of high-yield strain tq-s1 of both nepodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside and polydatin.

[Key words] *Rumex gmelini*; endophytic fungi; nepodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside; polydatin

[收稿日期] 20151222(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30970300);黑龙江省自然科学基金面上项目(C2016053);黑龙江中医药大学科研基金项目(015128)

[第一作者] 丁常宏,博士,副教授,从事中药资源学研究,Tel:0451-87266873,E-mail:goodluckdd81@126.com

[通讯作者] *王振月,教授,从事中药资源学研究,Tel:0451-87266873,E-mail:wangzhen_yue@163.com

内生真菌(endophytic fungi)是指存在于健康正常植物的各种组织和器官之内的真菌,被其感染的植物不会显示出明显的病症,可以经对植物组织内直接扩增微生物 DNA 的方式来证明其在内部的真实存在^[1-4]。药用植物内生真菌的研究还表明,内生真菌具有促进宿主植物合成次生代谢产物的能力。如唐坤等^[5]将 1 株拟青霉属内生真菌接种到丹参幼苗中,对比发现该真菌能够促进丹参幼苗的生长,且对植物中有效成分丹酚酸的积累有显著的促进作用。林燕青等^[6]从木麻黄中分离出内生真菌-18,该真菌与苗木共生时,能够显著提高木麻黄的平均抽稍量。还有一些内生真菌通过发酵作用能够合成与宿主相同或是相似的次生代谢成分。张鹏等^[7]从云南红豆杉的内生真菌中筛选出 1 株拟盘多毛孢属真菌,该菌可以经发酵作用产生紫杉醇,产量能够达到 $140 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。闵长莉等^[8]从植物博落回的内生真菌中筛选出层出镰刀菌,通过薄层色谱和高效液相色谱研究发现在其发酵液中含有与宿主相同的一种次生代谢成分血根碱。吴晓民等^[9]从高山红景天的内生真菌中筛选出 1 株能够通过发酵产生其宿主主要药效成分红景天苷的菌株。曾宪军等^[10]从麻花秦艽中分离出 1 株能够产生龙胆苦苷的腐皮镰刀菌。药用植物内生真菌的这些特点,为利用其通过发酵工业生产药用活性化合物开辟了新的途径,为提高药用植物活性成分的生产提供了新思路和新方法,利于中药资源的可持续利用^[11-13]。

毛脉酸模为蓼科多年生草本植物,具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、镇咳、平喘、降压、抗氧化的作用^[1-2]。毛脉酸模中含有白藜芦醇、白藜芦醇苷、酸模素、酸模素苷、蒽醌类、多糖等化学成分。其中酸模素苷和白藜芦醇苷具有很高的药用价值,但毛脉酸模的植物资源有限,且在逐渐减少,所以寻找能够替代毛脉酸模植物的微生物资源是一条可行且环境友好的解决方案。课题组在前期的研究工作中已从不同产地分离得到毛脉酸模内生真菌 278 株^[2],本研究以这些内生真菌为研究对象,通过 HPLC 对其次生代谢产物进行研究,首次以酸模素苷、白藜芦醇苷为参照,寻找能够通过自身发酵产生以上 2 种次生代谢产物的内生真菌,并测定其含量,并成功筛选出两种次生代谢产物的高产菌种。此研究填补了内生真菌通过发酵同时产生酸模素苷和白藜芦醇苷方面的空白,为菌株进一步在工业方面地开发利用提供依据,为植物资源保护和可持续利用做出贡献。

1 材料

课题组前期从黑龙江省乌伊岭(wy),图强(tq),红星(hx),塔河(th),加格达奇(jq),绥棱(sl),桃山(ts),上甘岭(sc),新林(xl)及黑龙江中医药大学药用植物园(yy)10个产地的毛脉酸模 *Rumex gmelini* 的根及根茎(经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定)中分离出共 278 株内生真菌,现保存于黑龙江中医药大学中药资源与开发实验室。白藜芦醇苷对照品购于成都曼思特生物科技有限公司(批号 MUST-12121606),酸模素苷对照品是本课题组前期从毛脉酸模植物中提取分离得到,经波谱分析鉴定结构,归一化法计算,含量在 98% 以上。

高效液相色谱仪(600 型泵,2487 型二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司),BSD-100 型振荡培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司),二级 B2 型生物安全柜(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

甲醇(色谱纯,美国 Dikma 公司,批号 81120),磷酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20140527),水为娃哈哈饮用纯净水。葡萄糖(分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号 13-201-00311),琼脂(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号 01-024)。

2 方法

2.1 菌株的活化 采用点植法,将保存的毛脉酸模内生真菌接种到新鲜 PDA 平板培养基上,28 ℃,3~5 d 进行活化培养。观察菌落形态,待长势较好时进行下一步的接种。

2.2 发酵培养 将活化后的菌株接种于 500 mL 锥形瓶中(每瓶含有液体培养基 300 mL),28 ℃,160 r·min⁻¹ 下发酵培养 7 d(个别菌种发酵 10~15 d)。将菌体及发酵液在 60 ℃ 下水浴蒸干得到内生真菌发酵产物。记录各内生真菌发酵产物的质量。另取马铃薯葡萄糖液体培养基 300 mL,60 ℃ 下水浴蒸干,作为空白培养基。

2.3 毛脉酸模内生真菌次生代谢产物的提取 取蒸干后的毛脉酸模内生真菌发酵产物,称取 4 g 置于圆底烧瓶中,加入甲醇 20 mL,称质量。加热回流 2 次,每次 2 h,补足损失后滤过,合并滤液。得到毛脉酸模内生真菌的提取液,该提取液经微孔滤膜(0.45 μm)滤过作为供试品溶液备用。同时将空白培养基做同样处理。

2.4 对照品溶液的制备 分别精密称取白藜芦醇

苷、酸模素苷对照品 2.25, 1.70 mg, 甲醇溶解, 定容至 25 mL 量瓶内, 配制成质量浓度依次为 0.09, 0.068 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.5 HPLC 测定条件 Gemini C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm (酸模素苷) 和 303 nm (白藜芦醇苷), 进样量 10 μL。流动相为甲醇-0.1% 磷酸水, 梯度洗脱: 0 min, 30% 甲醇; 0 ~ 50 min, 30% ~ 100% 甲醇; 50 ~ 60 min, 100% 甲醇。

3 结果与分析

通过对 278 株提取自不同产地的毛脉酸模中的内生真菌进行筛选, 发现其中的 11 株内生真菌的次生代谢产物中含有酸模素苷 (jq-s9, tq-s1, tq-s2, xl-s5, xl-s10, jq-l3, jq-l14, tq-l11, xl-s3, xl-s11, ts-l1) (表 1, 图 1), 5 株次生代谢产物中含有白藜芦醇苷 (jq-s9, tq-s1, tq-s2, xl-s5, xl-s10) (表 1, 图 2)。

表 1 产生酸模素苷和白藜芦醇苷的内生真菌

Table 1 Endophytic fungi producing nepodin-8-O-β-D-glucopyranoside and polydatin

菌株	种属	成分	质量分数/μg·g ⁻¹
jq-s9	环梗孢属 <i>Annellophora</i>	酸模素苷	280
		白藜芦醇苷	166
tq-s1	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	530
		白藜芦醇苷	224
tq-s2	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	441
		白藜芦醇苷	204
xl-s5	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	474
		白藜芦醇苷	182
xl-s10	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	427
		白藜芦醇苷	163
jq-l3	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	76
jq-l14	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	154
tq-l11	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	143
xl-s3	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	382
xl-s11	链格孢属 <i>Alternaria</i>	酸模素苷	526
ts-l1	青霉属 <i>Penicillium</i>	酸模素苷	246

按 1 瓶 (300 mL) 发酵液计算, 菌 tq-s1, tq-s2, jq-s9, xl-s3, xl-s5, xl-s10, xl-s11 所含酸模素苷成分均在 1 000 μg 以上, 其中内生真菌 tq-s1 的次生代谢产物中酸模素苷的含量最高 (530 μg·g⁻¹), 含量最低的是 jq-l3 (76 μg·g⁻¹)。白藜芦醇苷的含量在内生真菌 jq-s9, tq-s1, tq-s2, xl-s5, xl-s10 的次生代谢产物中相差不多, 其中内生真菌 tq-s1 的次生代谢产物中白藜芦醇苷的含量最高 (224 μg·g⁻¹), 含量最低的是 xl-s10 (163 μg·g⁻¹)。由此可见内生真菌 tq-s1 是

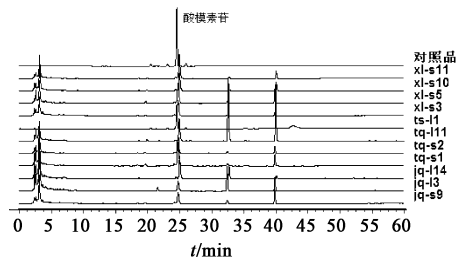


图 1 内生真菌提取液及酸模素苷的 HPLC (254 nm)

Fig. 1 HPLC of extracts of endophytic fungi and nepodin-8-O-β-D-glucopyranoside (254 nm)

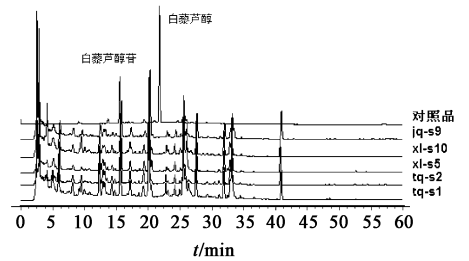


图 2 内生真菌提取液及白藜芦醇苷的 HPLC (303 nm)

Fig. 2 HPLC of extracts of endophytic fungi and polydatin (303 nm)

可以同时产生酸模素苷和白藜芦醇苷的菌种, 且为高产菌种。

4 讨论

酸模素苷的化学式为酸模素-8-O-β-D-葡萄糖苷, 基本作用与酸模素相似, 具有抗氧化和抗真菌的作用^[14-15], 是毛脉酸模的药用有效成分。本研究中筛选出的 11 株毛脉酸模的内生真菌在与宿主共生的过程中经宿主影响, 其次生代谢产物中也含有此种成分, 这可能是植物和真菌在物质水平和基因水平长期交流的结果。由于酸模素具有抗真菌的活性, 所以与毛脉酸模共生的真菌显然对这种化学物质能够产生抵抗能力。白藜芦醇苷可以对癌细胞的生长和迁移起到抑制作用, 抗肿瘤活性良好。张玉松等^[16]通过细胞水平的实验发现白藜芦醇能够显著抑制乳腺癌细胞的生长, 同时能够阻碍癌细胞的迁移并降低其侵袭能力。孙海榕等^[17]研究发现白藜芦醇苷对肝癌细胞的增殖和迁移也有一定的抑制作用。另有研究发现白藜芦醇苷能够减少脑梗死大鼠的缺血性损伤, 起到改善血脑屏障渗透性的作用^[18], 白藜芦醇苷能够提高巨噬细胞的抗炎能力^[19], 且能够有效的抑制糖尿病的发生和发展^[20], 等等。综上所述, 酸模素苷和白藜芦醇苷都具有较高的药用价值, 如果能够通过内生真菌发酵的方法高效经济地获得大量的酸模素苷和白藜芦醇苷, 将会为药物的生产提供更便捷的途径, 为中药资

源的可持续发展做出贡献。

本研究中使用的这些真菌是从图强(tq),塔河(th),新林(xl),加格达奇(jq),绥棱(sl),乌伊岭(wy),红星(hx)等 10 个产地的毛脉酸模中分离出来的,通过 HPLC 法筛选发现有 11 株可以产生酸模素苷,这 11 株真菌是从加格达奇、图强、桃山、新林 4 个地方的野生毛脉酸模中分离出来的,5 株内生真菌通过发酵能够产生白藜芦醇苷,分别是加格达奇、图强、新林 3 地区的毛脉酸模中分离得到。由此可以推断内生真菌的种类和其次生代谢产物的形成受到地理位置的影响,呈现出明显的地域性。同时 jq-s9, tq-s1, tq-s2, xl-s5, xl-s10 这 5 种内生真菌既能产生酸模素苷又可以产生白藜芦醇苷,2 种次生代谢产物的形成在这些内生真菌的代谢过程中可能存在一定的联系,而且通过对比发现这 5 种内生真菌产酸模素苷的平均能力显著高于只能单独产生酸模素苷的另外 6 种真菌(jq-l3, jq-l14, tq-l11, xl-s3, xl-s11, ts-l1)。其中内生真菌 tq-s1 发酵后的提取物中酸模素苷和白藜芦醇苷的含量都是最高,在今后的研究中将通过优化该菌种培养条件,对 tq-s1 进行诱变育种等方式提高其产生酸模素苷和白藜芦醇苷的稳定性和生产效率,为工业化大规模生产奠定基础。

[参考文献]

[1] 吉林省中医中药研究所. 长白山植物药志[M]. 长春:吉林人民出版社,1982:299.
[2] 张广庆,赵海鹏,王振月,等. 酸模属植物的化学成分与药理活性研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2008,10(5): 86-93.
[3] Hallmann J, Quadt H A, Mahaffee W. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. Can J Microbiol, 1997,43(10): 895-914.
[4] 周启武,于龙凤,路浩,等. 小花棘豆和变异黄芪内生真菌显微分布及定量检测[J]. 微生物学报,2014,54(5): 572-581.
[5] 唐坤,李标,郭顺星. 一株促进丹参生长和提高丹酚酸含量的活性内生真菌[J]. 菌物学报,2014,33(3): 594-600.
[6] 林燕青,吴承祯,谢安强,等. 木麻黄(Casuarina equisetifolia)内生真菌的分离与促生菌株的筛选[J]. 北华大学学报:自然科学版,2015,16(4):522-528.
[7] 张鹏,刘博,周蓬蓬,等. 一株产紫杉醇内生真菌 YN6 的分离及鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2011,27(10):961-967.
[8] 闵长莉,汪学军,赵梦凡,等. 博落回内生真菌的分

离及产血根碱菌株的筛选[J]. 中国中药杂志,2014,39(22):4288-4291.
[9] 吴晓民,任谓明,杨信东,等. 高山红景天内生真菌的分离及产红景天苷菌株的筛选[J]. 时珍国医国药,2014,25(11):2769-2772.
[10] 曾宪军,杨欣,丁仁芳,等. 一株产龙胆苦苷的麻花秦艽内生真菌的分离鉴定[J]. 时珍国医国药,2015,26(8):2024-2027.
[11] 吴秀丽,张怡轩,赵文倩,等. 真菌 EST-I 及 EST-II 对人参皂苷 Rg₁ 定向转化为人参皂苷 F₁ 的研究[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(1): 73-76.
[12] Liu L, Dong Y S, Qi S S, et al. Biotransformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright to diosgenin by *Trichoderma harzianum* [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2010,85(4):933-940.
[13] Ding C H, Du X W, Xu Y, et al. Screening for differentially expressed genes in endophytic fungus strain 39 during co-culture with herbal extract of its host *Dioscorea nipponica* Makino [J]. Curr Microbiol,2014,69(4):517-524.
[14] Choi G J, Lee S W, Jang K S, et al. Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews [J]. Crop Protection,2004,23(12):1215-1221.
[15] Gautam R, Karkhile K V, Bhutani K K, et al. Anti-inflammatory, cyclooxygenase (COX)-2, COX-1 inhibitory, and free radical scavenging effects of *Rumex nepalensis*[J]. Planta Med,2010,76(14):1564-1569.
[16] 张玉松,庄志祥,焦旸,等. 白藜芦醇苷对乳腺癌细胞转移潜能影响观察[J]. 中华肿瘤防治杂志,2014,21(22):1788-1793.
[17] 孙海榕,王璐瑜,王忠鑫. 白藜芦醇苷通过抑制 microRNA-21 表达抑制肝癌细胞增殖和迁移[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2015,31(11):1220-1226.
[18] 季辉,张祥建,杜媛媛,等. 白藜芦醇苷在缺血性脑血管病中的保护机制[C]. 福建:中华医学会第十七次全国神经病学学术会议,2014.
[19] Lou T, Jiang W, Xu D, et al. Inhibitory effects of polydatin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells[J]. Inflammation,2015,38(3):1-8.
[20] Huang K, Chen C, Hao J, et al. Polydatin promotes Nrf2-ARE anti-oxidative pathway through activating Sirt1 to resist AGEs-induced upregulation of fibronectin and transforming growth factor- β_1 in rat glomerular mesangial cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 399(19):178-189.

[责任编辑 邹晓翠]