

## · 基础研究 ·

# 新疆阿魏内生真菌链格孢属菌提取物体外抑制 肿瘤增殖活性筛选<sup>△</sup>

赵亚琴<sup>1,2</sup>, 徐惊惊<sup>3</sup>, 李晓瑾<sup>1,2\*</sup>, 樊丛照<sup>1,2</sup>, 朱军<sup>1,2</sup>, 王果平<sup>1,2</sup>

1. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002;

2. 国家中医药管理局 新疆中药民族药资源重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830002;

3. 新疆农业大学, 新疆 乌鲁木齐 830052

**[摘要]** 目的: 评价新疆阿魏内生真菌提取物体外抗肿瘤细胞增殖活性, 并筛选具有抗肿瘤细胞增殖活性的菌株, 为进一步研究其抗肿瘤作用提供依据。方法: 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法测定 117 株新疆阿魏内生真菌菌液提取物和菌丝体提取物对人宫颈癌 HeLa 细胞和胃癌 AGS 细胞增殖的影响。结果: 有 43 株链格孢属菌株的 49 份提取物在质量浓度为 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 对肿瘤细胞抑制率达 50% 以上; 其中 15 份对 HeLa 细胞、AGS 细胞的增殖均具有显著抑制作用, 且 1938/TL168 菌株提取物对 HeLa 细胞增殖的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 低至 (25.95 $\pm$ 3.39)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论: 阿魏内生真菌提取物可有效抑制肿瘤细胞增殖, 具备抗肿瘤药物研发潜质。

**[关键词]** 新疆阿魏; 内生真菌; 提取物; 肿瘤细胞; 增殖; 体外筛选

**[中图分类号]** R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)11-1911-05

**doi:** 10.13313/j.issn.1673-4890.20201115002

## Screening of *Alternaria* Endophytic Fungi from *Ferula sinkiangensis* Against Tumor Proliferation *In vitro*

ZHAO Ya-qin<sup>1,2</sup>, XU Liang-liang<sup>3</sup>, LI Xiao-jin<sup>1,2\*</sup>, FAN Cong-zhao<sup>1,2</sup>, ZHU Jun<sup>1,2</sup>, WANG Guo-ping<sup>1,2</sup>

1. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnical Materia, Urumqi 830002, China;

2. Xinjiang Key Laboratory of Chinese Materia Medica and Ethnic Materia Medica, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830002, China;

3. Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to evaluate the anti-tumor activity of the extracts of endophytic fungi from *Ferula sinkiangensis* K.M. Shen, and screen the anti-tumor strains, which is expected to lay a theoretical basis for further research on the anti-tumor activity of the fungi. **Methods:** The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was employed to examine the influence of the extracts of the culture and mycelia of 117 endophytic fungal strains from *F. sinkiangensis* on the proliferation of cervix cancer HeLa cells and gastric cancer AGS cells. **Results:** The inhibition rate of 49 extracts from 43 *Alternaria* strains on tumor cells reached over 50% at the concentration of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and 15 of the extracts showed significant suppression on the proliferation of both HeLa cells and AGS cells. Meanwhile, the half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of 1938/TL168 extract on HeLa cells was only (25.95 $\pm$ 3.39)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . **Conclusion:** The extract of *F. sinkiangensis* endophytic fungi can effectively inhibit the proliferation of tumor cells, which can be used for the development of anti-tumor drugs.

**[Keywords]** *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen; endophytic fungi; extract; tumor cell; proliferation; screening *in vitro*

阿魏应用历史悠久, 为汉族、维吾尔族、蒙古族、藏族等各民族传统医用药之一。现代药理学研究表明, 阿魏具有抗生育、免疫抑制、解热、镇痛、抗炎、抗肿瘤等广泛的药理活性, 近年来因发现其

<sup>△</sup> [基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2017D01B48)

\* [通信作者] 李晓瑾, 研究员, 研究方向: 中药资源学; Tel: (0991) 2665614, E-mail: xjlxj@126.com

具有植物雌激素活性成分和抗癌活性物质而备受关注<sup>[1]</sup>。新疆阿魏 *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen 是仅产于新疆的道地药材, 具有多年生早春短命植物特性, 日益增长的市场需求致使该物种濒临灭绝<sup>[2]</sup>, 因此寻找新疆阿魏替代资源具有重要意义。

植物内生真菌 (endophytic fungi) 是指部分或者全部时期生活在植物体内, 而不会引起宿主植物产生明显病害症状的一类真菌, 在与宿主植物共生的漫长过程中与宿主植物建立起了互利互惠的关系。其种类丰富, 次级代谢活跃, 不仅能产生一些结构独特、骨架新颖的活性化合物, 而且这类化合物生物活性较强<sup>[3]</sup>。多项研究表明, 植物内生菌代谢产物含有与宿主植物相同或相似的有效成分, 从内生真菌分离得到的活性物质中有 50% 以上是新化合物且抗癌活性显著, 为临床应用提供了新的药物来源<sup>[4]</sup>。

基于植物内生真菌能够产生与宿主相同或相似的活性成分, 本研究对前期已分离获得的 117 株新疆阿魏内生真菌提取物进行抗肿瘤活性体外筛选与评价, 以期寻找具有产生抗肿瘤活性物质潜力的菌株, 对挖掘和拓宽阿魏资源及新型抗癌活性物质的研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 菌株

117 株菌种源自伞形科植物新疆阿魏 *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen 的内生真菌, 保藏于新疆中药民族药研究所实验室菌种库, 由于菌株保密原因, 其名称尚未公开。

### 1.2 细胞

人宫颈癌 HeLa 细胞和胃癌 AGS 细胞均由中国医学科学院药用植物研究所天然药物研究中心化学室主任斯建勇教授惠赠, 由实验室传代保存。其中, HeLa 细胞使用 DMEM 培养基培养, AGS 细胞使用 Ham's F12 培养基培养。

### 1.3 试剂与仪器

马铃薯葡萄糖 (PDA) 培养基 (批号: P8931, 北京索莱宝科技有限公司); 高糖 DMEM 培养基 (批号: 12100-046, 美国 Invitrogen 公司); Ham's F12 培养基 (批号: SH30026.01B, 美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (批号: 70220-8611, 浙江天杭生物科技有限公司); 胰蛋白酶和青链霉素混合物 (批

号: 25200-056, 美国 Gibco 公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 批号: 0231, 美国 Amresco 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号: P1022, 北京索莱宝科技有限公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, 批号: 298-93-1, 美国 Sigma 公司); SA-1500-1 型 (SHJ 系列) 超净工作台 (上海上净净化设备有限公司); Sorvall legend Micro 17 型高速离心机、Fomia-86C991 型低温冰箱 (美国 Thermo 公司); CKX41SF 型倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司); JJ200 型电子分析天平 (上海精科仪器有限公司); MLS-3750 型全自动高压灭菌锅 (日本 Sanyo 公司); MQX200 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); QL-901 型 96 孔培养板 (美国 Corning 公司)。

## 2 方法

### 2.1 冻存菌株的复苏纯化与发酵粗提取

将本课题组前期分离鉴定的内生真菌菌株活化, 利用 PDA 培养基培养, 获得供试内生真菌提取物<sup>[5]</sup>。菌株接入培养基中, 于 25 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 摇床振荡培养 15 d; 滤过, 分别收集培养液与菌丝体; 培养液旋蒸后得到浸膏, 编号为 1~117; 菌丝体用甲醇回流提取, 旋蒸, 回收甲醇, 得到菌丝体醇浸膏 117 份, 编号为 118~224 (10 份菌丝体浸膏难以溶解未编入受试样品, 菌株编号为 2661/6852、2694/7253、2604/7251、2692/6826、2645/7250、2582/6614、2692/6836、2633/6835、501/3340、2584/6636)。

### 2.2 供试品制备

供试母液用 DMSO 配制, 分别称取供试品 (含菌丝体提取物、培养液提取物) 500 μg 于离心管中, 加 DMSO 500 μL, 超声助溶后置于 4 °C 冰箱备用。

### 2.3 MTT 法检测提取物抗肿瘤活性

**2.3.1 提取物对 HeLa、AGS 细胞增殖的影响** HeLa、AGS 细胞以 5×10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 至长满单层。加入终质量浓度为 100 μg·mL<sup>-1</sup> 受试样品 100 μL<sup>[6-7]</sup>, 每个样品设 3 个复孔, 设置调零孔 (只加培养基)、溶剂对照组 (加入终体积分数为 0.1% 的 DMSO)。培养 48 h 后, 加 MTT (5 mg·mL<sup>-1</sup>) 溶液 20 μL 避光孵育 4 h, 弃去, 每孔加 DMSO 150 μL 振荡溶解, 490 nm 波长条件下测吸光度 (A) 值, 计算每个样

品3个复孔A值的平均值,按公式(1)计算不同质量浓度提取物对HeLa、AGS细胞的增殖抑制率(IR)。

$$IR = (1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\% \quad (1)$$

**2.3.2 有效样品的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)测定** 以抑制率>50%为标准,筛选具有明显的肿瘤细胞增殖抑制活性的提取物,采用MTT法(受试样品质量浓度从200 μg·mL<sup>-1</sup>起,2倍比稀释供试提取物)测定有效样品的IC<sub>50</sub>。

**2.4 数据分析**

采用SPSS 25.0统计分析软件的t检验进行数据分析,计量数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示。

**3 结果**

**3.1 新疆阿魏内生真菌提取物对HeLa、AGS细胞增殖的影响**

结果表明,在质量浓度为100 μg·mL<sup>-1</sup>时,以抑制率大于50%为标准,得到有抑制肿瘤细胞增殖活性的样品49份(表1),占受试菌株的36.7%。其中菌液提取物12份、菌丝体提取物37份;有6株菌(编号分别为2618/6821、2596/6643、465/N190、2571/6657、487/3322、439/N158)的菌液提取物及菌丝体提取物对肿瘤细胞的增殖均具有显著抑制作用;15份样品对2种细胞均具有明显的抑制作用(图1)。

**3.2 有效样品的IC<sub>50</sub>测定结果**

结果显示,1938/TL168号菌株对HeLa细胞抑制作用最强,IC<sub>50</sub>为(25.95±3.39) μg·mL<sup>-1</sup>;2682/6626

表1 阿魏内生真菌提取物对2种肿瘤细胞增殖的影响

样品编号	菌株编号	抑制率是否达到50%		样品编号	菌株编号	抑制率是否达到50%	
		AGS	HeLa			AGS	HeLa
17	2682/6626	+	+	161	2666/6866	+	-
45	2618/6821	+	-	162	2590/6801	-	+
66	2596/6643	+	+	166	2604/6859	+	-
81	15/N15	+	-	167	1938/TL168	+	+
91	465/N190	-	+	168	2580/6618	-	+
95	413/N118	+	-	171	2683/6842	+	+
103	2571/6657	+	-	173	2695/6638	+	-
107	439/N158	+	-	175	2618/6821	-	+
111	435/N152	+	-	184	2632/6848	+	+
112	438/N157	+	-	187	2571/6657	+	+
116	487/3322	+	-	188	2592/6616	+	+
117	2590/6809	+	-	190	2695/6628	-	+
118	465/N190	+	-	191	2679/6634	+	+
120	487/3322	+	-	195	2616/6690	+	-
121	2684/6611	+	-	196	2607/6822	+	+
122	496/3320	+	-	198	2576/6625	-	+
123	439/N158	+	-	199	2593/6684	+	+
125	2625/6857	+	+	200	2695/6628	-	+
126	2626/6868	+	-	209	2668/6637	-	+
127	2650/6662	+	-	213	2574/6632	+	-
131	2690/7242	+	+	217	2636/6837	+	-
144	407/N93	+	+	218	2637/6872	-	+
146	2621/6847	+	-	222	2596/6643	+	+
158	2646/7240	+	-	223	2573/6630	+	+
159	2656/6680	+	-				

注: +表示抑制率达到50%; -表示抑制率不足50%。

号菌株提取物次之,IC<sub>50</sub>为(30.53±2.84) μg·mL<sup>-1</sup>。对AGS细胞抑制作用最强的是2690/7242号菌株,IC<sub>50</sub>为(32.17±2.47) μg·mL<sup>-1</sup>(表2)。

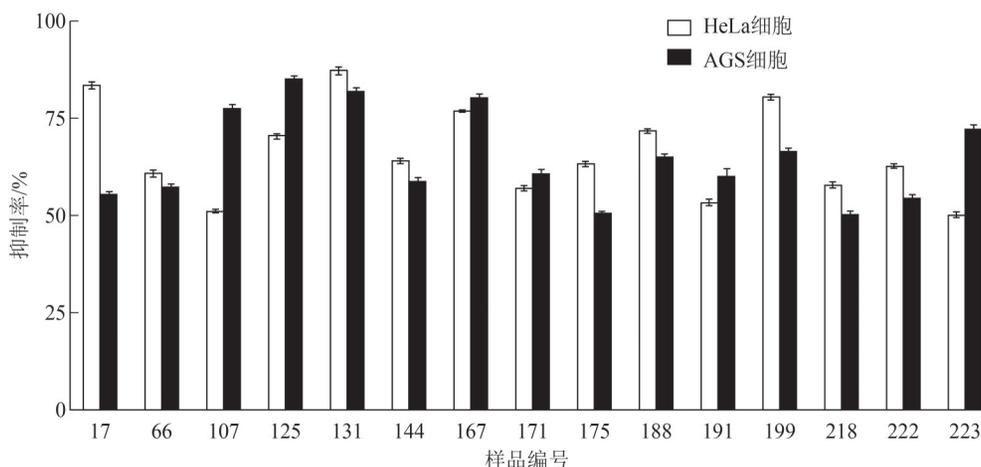


图1 15个新疆阿魏内生真菌提取物对AGS和HeLa细胞增殖的抑制率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

表2 新疆阿魏内生真菌提取物对AGS和HeLa细胞的IC<sub>50</sub>  
( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

样品编号	菌株编号	IC <sub>50</sub> μg·mL <sup>-1</sup>	
		HeLa	AGS
17	2682/6626	30.53±2.84	75.26±3.98
66	2596/6643	>100	97.15±2.73
107	439/N158	>100	72.45±4.12
125	2625/6857	79.55±4.07	45.18±3.39
131	2690/7242	48.13±1.32	32.17±2.47
144	407/N93	85.06±1.64	79.73±2.97
167	1938/TL168	25.95±3.39	51.31±1.45
171	2683/6842	>100	94.90±1.53
175	2618/6821	55.93±3.93	>100
188	2592/6616	78.17±2.58	99.87±3.7
190	2695/6628	71.74±0.92	>100
191	2679/6634	91.16±5.65	>100
196	2607/6822	59.32±4.89	>100
199	2593/6684	37.36±1.21	>100
218	2637/6872	94.87±3.21	>100
222	2596/6643	57.29±1.74	>100
223	2573/6630	>100	97.53±2.94

## 4 讨论

### 4.1 新疆阿魏内生真菌具备开发为抗肿瘤新药的潜质

植物内生真菌通过与植物交换基因,可以产生与宿主相同或相似的化合物,现已成为天然活性物质的重要资源库之一<sup>[8]</sup>。本团队前期对新疆阿魏不同部位提取物进行体外抗肿瘤活性研究,发现新疆阿魏树胶和种子的脂溶性部分对人胃癌、宫颈癌等细胞增殖具有显著的抑制作用<sup>[9-10]</sup>。本研究发现,新疆阿魏内生真菌可有效抑制胃癌、宫颈癌等癌细胞的体外增殖,亦证实了内生真菌可以产生与其宿主相关的活性物质。《国家新药(西药)临床前研究指导原则汇编》规定,体外抗肿瘤效果的评价以体外IC<sub>50</sub>表示,当植物提取物对肿瘤细胞增殖的IC<sub>50</sub>≤30 μg·mL<sup>-1</sup>,即被认为体外具有抗肿瘤活性<sup>[11]</sup>,新疆阿魏内生真菌编号为1938/TL168的菌株提取物对HeLa细胞增殖的IC<sub>50</sub>为(25.95±3.39) μg·mL<sup>-1</sup>,表明阿魏内生真菌提取物符合抗肿瘤药物体外筛选标准,可为新型抗肿瘤药物的研发提供新来源,具备开发为抗肿瘤新药的潜质。

### 4.2 新疆阿魏不同种属的内生真菌抗肿瘤活性存在较大差异

供筛的117株阿魏内生真菌中具有抑制肿瘤细胞增殖活性的菌株有43株,主要归属于链格孢属(*Alternaria* sp.)。链格孢属在植物中分布较为广泛,从该属的内生真菌中分得的生物碱(如长春碱、细胞松弛素等)、萜类(如紫杉醇)、黄酮类等化合物具有较强的抗肿瘤活性,是一类具有抗癌应用潜力的生物资源<sup>[12-14]</sup>。而本研究中相关内生真菌发挥抗肿瘤活性的物质基础具体是什么,是否与其宿主阿魏抗肿瘤活性成分一致等问题有待进一步研究;同时,研究发现阿魏内生真菌不同种属提取物之间的抗肿瘤活性存在较大差异,而同一菌株的提取物对不同肿瘤细胞的增殖抑制作用也存在差异,这些作用的差异可能与不同种属提取物中化学成分结构的多样性有关。

### 4.3 新疆阿魏内生真菌的培养条件和提取方式与其抗肿瘤活性相关

研究结果显示,虽然2682/6626号菌株的菌液提取物对HeLa细胞的IC<sub>50</sub>为(30.53±2.84) μg·mL<sup>-1</sup>,但在所有受试提取物筛选结果中,菌丝体提取物的肿瘤增殖抑制作用效果明显优于菌液提取物,说明内生真菌活性成分的积累、释放可能与菌株所处的温度、光照、终止培养时间等外在因素密切相关,其产生与作用机制尚需进一步研究。如何大批量培养能稳定产生抗肿瘤活性物质的提取物将是今后研究的一个重要方向。

## 参考文献

- [1] 杨秀伟. 阿魏属药用植物的物质基础[J]. 中国现代中药, 2018, 20(2): 123-144.
- [2] 孙丽, 石书兵, 朱军, 等. 阿魏的传统应用及现代研究概况[J]. 中国现代中药, 2013, 15(7): 620-626.
- [3] KUSARI S, HERTWECK C, SPITELLER M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites[J]. ChemBiol, 2012, 19(7): 792-798.
- [4] PANDI M, RAJAPRIYA P, MANOHARAN P T. Extraction and characterization of taxol: An anticancer drug from an endophytic and pathogenic fungi [J]. Lab Protoc Fungal Biol, 2013, doi:10.1007/978-1-4614-2356-0\_51.
- [5] 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 215.
- [6] ABE K, MATSUKI N. Measurement of cellular 3-(4, 5-

- dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT [J]. *Neurosci Res*, 2000, 38 (4) : 325-329.
- [7] 周静怡. 四种药用植物内生真菌的分离纯化及其次级代谢产物的生物活性研究[D]. 兰州:兰州理工大学, 2012.
- [8] BÖMKE C, TUDZYNSKI B. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(15/16):1876-1893.
- [9] WANG J C, GAO Y, WANG H J, et al. Apoptosis induction and cell cycle arrest induced by sinkiangenone B, a novel phenylpropanoid derivative from the resin of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen [J]. *RSC Adv*, 2018, 8 (8) : 4093-4103.
- [10] LI G Z, WANG J C, LI X J, et al. An unusual sesquiterpenecoumarin from the seeds of *Ferula sinkiangensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18 (9) : 891-896.
- [11] 中华人民共和国卫生部药政局. 国家新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药学、药理学、毒理学)[M]. 北京:中华人民共和国卫生部药政局,1993:137-139.
- [12] 张弘弛. 两种药用植物内生真菌次生代谢产物及其生物活性的研究[D]. 西安:陕西科技大学,2012.
- [13] 葛菁萍,平文祥,马玺,等. 紫杉醇产生菌HU1353的鉴定[J]. *微生物学杂志*,2004,24(3):19-21.
- [14] 谢红艳. 我国部分区域链格孢属(*Alternariae*)真菌的资源调查与形态和分子鉴定研究[D]. 贵阳:贵州大学,2006.

(收稿日期: 2020-11-15 编辑: 田苗)