

海洋放线菌 M313 菌株的鉴定及其抗肿瘤活性代谢产物的初步研究

林亲雄, 刘纯慧, 奚涛, 叶亮, 邢莹莹

(中国药科大学 海洋药物研究实验室, 江苏 南京 210009)

摘要:按经典的放线菌分类方法对海洋放线菌 M313 菌株进行鉴定,用 MTT 检测法对海洋放线菌 M313 代谢产物的细胞毒活性与培养基的关系、活性物质的理化性质进行了研究。结果表明,该菌株可初步鉴定为孢杆链霉菌的海洋变种 (*Streptomyces sporovirgulis* var. *marinus*);该菌株的发酵液对 7 种肿瘤细胞均具有很强的生长抑制活性, IC_{50} 为 800 ~ 2 000; M313 菌株在 GPDA、高氏一号培养基中均能产生细胞毒性很强的代谢产物;活性物质在 pH 2 ~ 10 稳定,但对热不稳定,60 以上加热处理丧失大部分活性;活性成分可能为分子质量大于 2000 u 的水溶性物质。

关键词: 海洋放线菌; 孢杆链霉菌; 细胞毒性; 理化性质

中图分类号: Q939.92 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)11-0053-05

海洋微生物具有生态和类群的多样性,并可产生丰富多样的生物活性物质,是海洋药物开发的一个重要来源。现已报道从海洋微生物中发现许多具有抗肿瘤活性的物质,从化合物的结构类型来看,主要有生物碱、环肽、聚醚类、大环类酯类、萜类、多羟基甾醇类化合物^[1]。多年来,诸多结构新颖、生物活性显著的天然活性产物持续从海洋来源放线菌代谢产物中被发现,这些活性化合物为新药研究提供了丰富的先导化合物,有些已进入研发阶段^[2]。海洋放线菌活性产物的研究仍然是海洋微生物产物研究中值得关注的一个热点。

本实验室建立了海洋微生物抗菌、抗肿瘤活性产物筛选模型,开展海洋微生物活性代谢产物的研究。M313 菌株是经大量筛选得到的一株具有较强细胞毒活性的海洋放线菌,初步显示出良好的体外抗肿瘤活性,本研究为进一步分离提取活性成分和研究其抗肿瘤作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与肿瘤细胞株

海洋放线菌 M313 菌株由本实验室分离筛选。胃癌 SGC-7091 细胞、乳腺癌 MDA-MB231 细胞、口腔

上皮癌 KB 细胞、宫颈癌 Hela 细胞、肝癌 SMMC-7721 细胞、小鼠黑色素瘤 B16 细胞、肺癌 A549 细胞均由本实验室保存细胞株。

1.2 菌种鉴定

菌种鉴定方法参照《放线菌的分类和鉴定》^[3],采用形态特征、培养特征,生理生化的指标对海洋放线菌 M313 进行菌种鉴定。菌种鉴定培养基均采用《链霉菌鉴定手册》^[4]中所推荐的培养基。

1.3 不同培养基对放线菌 M313 生长及发酵液活性的影响

分别用天然海水(NSW)、人工海水(ASW)^[5]、蒸馏水(DW)为基质配制 GPDA、GBP、高氏一号(简称 GS)培养基,接入 5%的新鲜种子液,28 ℃,200 r/min 振荡培养 60~72 h 至培养液变浑浊时中止,观察发酵液颜色,测定发酵液的 pH 值,5 000 r/min 离心 5 min 称量菌体湿质量,取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌

收稿日期: 2006-04-10; 修回日期: 2006-07-18

作者简介: 林亲雄(1970-),男,湖北武汉人,博士,主要从事微生物活性代谢产物研究, E-mail: lqx7021@sohu.com; 奚涛,通讯作者,男,教授,博士生导师,电话: 025-83271389, E-mail: xi-tao18@sina.com

作为测定样品,同时以天然海水、人工海水、蒸馏水为对照,各样品均设置6复孔,用MTT法^[6]测定各样品对KB细胞的增殖抑制率(R_1)。

GPDA培养基:马铃薯200g,葡萄糖10g,蛋白胨4g,水1000mL,pH7.2~7.4。

GBP发酵培养基:葡萄糖10g,牛肉膏3g,蛋白胨5g,水1000mL,pH7.2~7.4。

高氏一号培养基:参照《链霉菌鉴定手册》^[4]。

1.4 发酵液对不同肿瘤细胞株的毒活性测定

发酵液用人工海水配制的GPDA培养基制备,制备方法如1.3,发酵液离心后过滤除菌,用RPMI-1640细胞培养液分别稀释10,50,100,150,200倍,以GPDA空白培养基为对照,各样品均设置6复孔,用MTT法测定各样品对不同肿瘤细胞株的 R_1 ,计算 ID_{50} 值。

1.5 pH、温度对发酵液活性的影响

用于实验的发酵液同1.4,发酵液离心后用稀盐酸、氨水分别调pH值为2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,为了避免pH的变化对肿瘤细胞生长的影响,发酵液调pH后室温放置12h均调pH值至7.0,以发酵原液(pH7.0)为对照;将发酵液调节pH值为3.0,7.0,9.0,分别在40,50,60,70,80水浴中热处理1h,同样各处理发酵液均调pH值至7.0,以相应未加热处理的发酵液为对照组。

各样品均设置6复孔,用MTT法测定各样品对KB细胞的 R_1 。

1.6 有机溶剂和超滤提取活性物质

用于实验的发酵液同1.4,发酵液离心后,调pH值为3.0,7.0,9.0,在各pH值下分别用1:1的氯仿、乙酸乙酯、水饱和的正丁醇各萃取3次,有机相45℃减压蒸馏,除去有机溶剂,浓缩物用与原发酵液以等量的水溶解,有机相、水相样品均调节pH值为7.0,以发酵原液(pH7.0)为对照,各样品均设置6复孔,用MTT法测定各样品对KB细胞的 R_1 。

发酵液离心后,用分子截留范围大于2000u的超滤膜超滤,分别取滤过部分和截留部分,稀释至相同倍数,以发酵原液为对照,用MTT法测定各样品对KB细胞的 R_1 。

1.7 数据分析方法

对相关实验数据作统计分析,数据以平均值±SD值(标准差)表示,用EXCEL软件进行t检验,以 $P<0.05$ 表示差异显著,以 $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 菌种的鉴定

2.1.1 形态及培养特征

放线菌M313菌株在高氏一号琼脂上,生长丰茂,孢子丝直或波曲,有松散螺旋,孢子卵圆形、柱形或杆状,表面光滑,大小(长×宽)约(0.7~1.1) μm ×(0.6~0.7) μm 。孢子丝的显微照片见图1、孢子的电子扫描照片见图2。

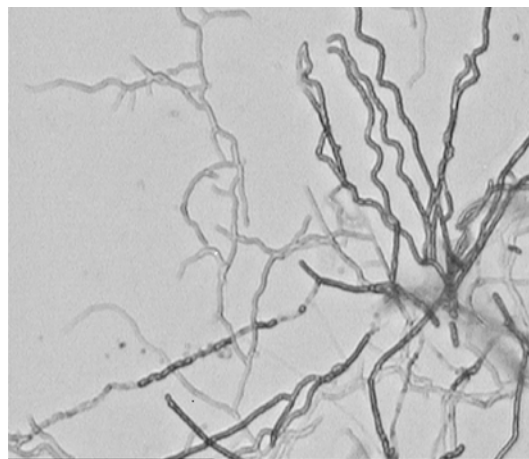


图1 放线菌M313的孢子丝形态(×640)

Fig.1 Morphological characteristics of spore hypha of actinomycete M313(×640)

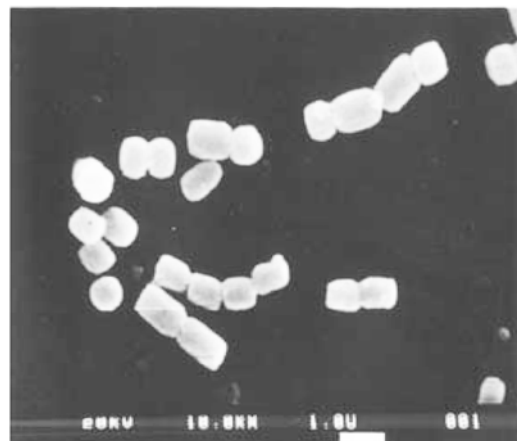


图2 放线菌M313的孢子形态(×10000)

Fig.2 Morphological characteristics of spores of actinomycete M313(×10000)

放线菌 M313 菌株在 8 种培养基上 28 培养 21 d 的生长结果见表 1, 菌丝及色素颜色参照《链霉菌鉴定手册》中的色谱。

表 1 放线菌 M313 的培养特征

Tab.1 Cultural characteristics of actinomycete M313

培养基	生长状况	气丝颜色	基丝颜色	可溶性色素
高氏一号	+	浅灰	金黄	无
淀粉琼脂	+	浅烟灰	黄褐	无
克氏	±	浅灰	黄褐	无
察氏	±	浅灰	金黄	无
葡萄糖-天冬素	+	浅灰	杏仁黄	无
葡萄糖-酵母	+	灰白	炒米黄	无
马铃薯块	+	烟灰	黄褐	无
甘油-天门冬素	±	灰白	杏仁黄	无

注：“+”表示生长茂盛，“±”表示生长稍贫乏

2.1.2 生理生化特征

放线菌 M313 能液化明胶, 分解淀粉, 在纤维素上生长弱, 牛奶凝固并胨化, 不产 H₂S; 能利用葡萄糖、阿拉伯糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、淀粉、甘露糖、果糖、木糖; 不利用鼠李糖、肌醇、乳糖、棉子糖。

2.1.3 菌种鉴定结论

参照阎迥初编写的《放线菌的分类和鉴定》, 根

据培养特征和生理生化特征定种的原则, 菌株 M313 与烟灰类群的孢杆链霉菌(*Streptomyces sporovirgulis*) 在形态与培养特征方面比较一致, 但不产生类黑色素, 能利用木糖和甘露醇, 与孢杆链霉菌不同, 鉴于菌株分离自海洋环境, 将放线菌 M313 初步鉴定为孢杆链霉菌的海洋变种(*Streptomyces sporovirgulis* var. *marinus*)。

2.2 不同培养基对放线菌 M313 生长及发酵液细胞毒活性的影响

不同培养基对放线菌 M313 的菌体生长及发酵液对 KB 的细胞毒活性影响见表 2 ($\bar{x} \pm S, n=6$)。菌体生长量与培养基配方、基质有关, 统计分析表明 GPDA 和 GBP 培养基中的生长量与在 GBP 培养基中的生长量差异显著。放线菌 M313 在 GPDA、GS 培养基中的发酵液活性很强, 与 GBP 培养基发酵液活性差异显著。基质对发酵液活性的影响与培养基配方有关, 对 GPDA、GS 培养基而言, 天然海水、人工海水、蒸馏水对发酵液活性差异不显著, 而蒸馏水配制的 GBP 培养基发酵液没有细胞毒活性。

2.3 发酵液对不同肿瘤细胞株的细胞毒活性

结果表明: 发酵液对胃癌 SGC-7091 细胞、乳腺癌 MDA-MB231 细胞、口腔上皮癌 KB 细胞、宫颈癌 Hela 细胞、肝癌 SMMC-7721 细胞、小鼠黑色素瘤 B16 细胞、肺癌 A549 细胞株的抑制率均在 80% 以上 (图 1), 抑制率为 50% 时的稀释倍数(即 ID₅₀)分别为

表 2 不同培养基对放线菌 M313 的生长及发酵液细胞毒性的影响

Tab.2 The effects of media on growth of starin M313 and cytotoxic activity of fermentation broths

培养基	发酵液颜色	发酵液 pH	菌体密度(g/100mL)	R _t
GPDA-NSW	浅黄色	7.0	8.60 ± 0.20*	0.869 ± 0.019
GPDA-ASW	浅黄色	7.0	10.00 ± 0.18	0.879 ± 0.015
GPDA-DW	黄色	6.5	8.40 ± 0.18*	0.849 ± 0.020
GS-NSW	浅黄色	6.5	7.10 ± 0.19	0.865 ± 0.020
GS-ASW	浅黄色	7.0	8.00 ± 0.20	0.855 ± 0.018
GS-DW	浅黄色	6.5	6.50 ± 0.17	0.815 ± 0.016
GBP-NSW	黄色	6.5	9.30 ± 0.18*	0.505 ± 0.021
GBP-ASW	黄色	6.5	9.50 ± 0.20	0.522 ± 0.018
GBP-DW	黄色	6.0	9.00 ± 0.19*	-0.756 ± 0.023

*p<0.05 : 与 GS-NSW 比较; p<0.05 : 与 GS-ASW 比较; *p<0.05 : 与 GS-DW 比较; *p<0.05 : 与 GBP-NSW 比较; *p<0.05 : 与 GBP-ASW 比较

800,900,900,1 000,1 500,1 500,2 000, 显示了较强的细胞毒性, 各发酵液与相应的培养基对照差异显著。在

显微镜下可观察到肿瘤细胞初期皱缩变形、后期大量凋亡。

2.4 pH、温度处理对发酵液活性的影响

pH 对发酵液活性的影响如图 3 ($\bar{x} \pm S, n=6$) 所示,各 pH 处理组的 R_1 与发酵原液对照组的 R_1 差异不显著,结果表明:室温下发酵液 pH 在 2~10 的范围内变化活性稳定。

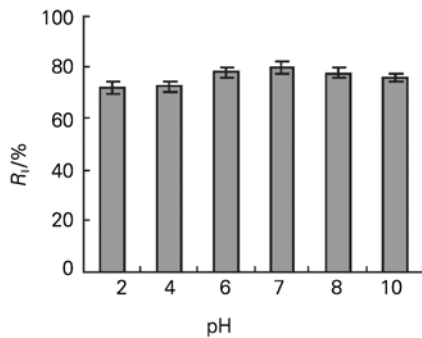


图 3 pH 对发酵液细胞毒活性的影响

Fig. 3 The effect of pH on cytotoxic activity of fermentation broth

温度对发酵液细胞毒活性的影响如图 4 ($\bar{x} \pm S, n=6$) 所示,除 pH 7.0 发酵液 40、50 热处理组和 pH 10.0 发酵液 40 热处理组的 R_1 与发酵液未处理组的 R_1 差异不显著外,其它各处理组的 R_1 与发酵液未处理组的 R_1 差异极显著 ($P < 0.01$)。结果表明:发酵液对热不稳定,随温度升高,活性下降,温度大于 60

热处理 1 h,活性丧失在 34%以上;而且酸性条件下受热,比中性、偏碱性条件下受热活性更不稳定。

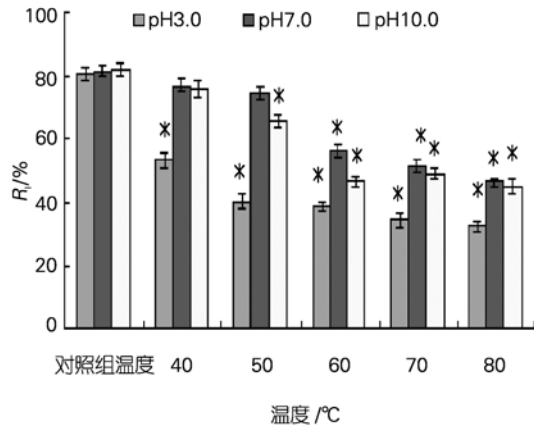


图 4 温度对发酵液细胞毒活性的影响

Fig. 4 The effect of temperature on cytotoxic activity of fermentation broth

2.5 活性物质的初步提取

发酵液萃取活性结果如表 3 ($\bar{x} \pm S, n=6$) 所示,不同 pH 的发酵液经有机溶剂萃取后,各萃取相的活性较发酵原液活性 (R_1 为 82.5%) 均有所下降;各萃取有机相的 R_1 均小于各萃余水相的 R_1 ,并与发酵原液对照组的 R_1 差异极显著;除 pH 3.0, 10.0 发酵液的正丁醇萃余水相外,其它萃余水相的 R_1 均在 70% 以上。

表 3 发酵液萃取物的细胞毒活性

Tab. 3 The cytotoxic activity of extracts from fermentation broth by organic solvents

发酵液 pH	R_1 (%)					
	氯仿萃取		乙酸乙酯萃取		正丁醇萃取	
	有机相	萃余水相	有机相	萃余水相	有机相	萃余水相
3.0	30.4 ± 2.1*	71.6 ± 2.4*	41.2 ± 2.1*	73.5 ± 2.1*	26.6 ± 2.8*	55.9 ± 1.9*
7.0	29.1 ± 1.8*	73.5 ± 2.0*	29.3 ± 2.8*	78.0 ± 2.1	12.7 ± 2.5*	70.4 ± 2.1*
10.0	36.4 ± 2.5*	72.0 ± 2.8*	44.0 ± 2.4*	79.4 ± 2.6	35.3 ± 1.8*	54.0 ± 2.4*

* $P < 0.01$: 与发酵液对比较

结果表明,活性成分难以被氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,主要存在于水相中,为水溶性较强的物质。

发酵液超滤后,滤出部分没有细胞毒活性,截留部分 R_1 为 80.6%,与发酵原液 (83.6%) 基本一致,显示活性物质可能为相对分子质量大于 2 000 的水溶

性物质。

3 讨论

据国外的研究^[7]表明:即使是专一性的海洋微生物,有的种类生长并不一定要求海水,活性产物在没

有海水的情况下产量甚至更大。海洋放线菌 M313 在天然海水、人工海水、蒸馏水配制的 GPDA 培养基中生长良好,产物的活性没有明显差异,也表明海水并不是所有海洋微生物生长和形成活性产物的必须条件,此现象在别的文献中也有报道^[8],同时笔者在研究过程中发现,海水对海洋微生物生长,特别是活性产物形成的影响,随菌株而异,不同的菌株差异很大,并且与培养基配方有关。因此,选用适宜的培养基是筛选海洋微生物活性产物一个值得注意的问题。

海洋放线菌 M313 的活性产物对鼠源和人源的多癌细胞具有较强的细胞毒性,能显著抑制癌细胞增殖,并可引起癌细胞凋亡,但其体内活性及作用机制的研究有待分离到单纯的化合物。该菌的活性产物水溶性较大,对热不太稳定,经 Sevag 去蛋白后无活性,给分离纯化工作带来了一定的困难,超滤表明活性物质相对分子质量可能大于 2 000,根据以上特性推测,活性物质可能为分子量较大的水溶性物质,在已发表文献中未见有类似海洋放线菌产物的报道,从发现具有生理活性的新天然产物来看,该菌的活性产

物有进一步研究的价值,目前正在进一步分离纯化。

参考文献:

- [1] 展翔天,张春光,司玫. 海洋微生物活性物质研究进展[J]. 中国海洋药物, 2002, 86(2):44-52.
- [2] 张清丽,顾谦群,崔承彬,等. 海洋来源的放线菌次级代谢产物及其生物活性[J]. 中国海洋药物杂志, 2004, 23(5):49-54.
- [3] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京:科学出版社,1992.
- [4] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1975. 658-665
- [5] 张士瑾,范晓,马军英. 海洋生物技术原理和应用[M]. 北京:海洋出版社,1998.13-14.
- [6] 徐叔云,卞如瀛,陈修. 药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2001. 1 784-1 786.
- [7] Jensen P R, Fenical W. Marine Microorganisms and Drug Discovery: Current Status and Future Potential [A]. Fusetani N. Drugs from the Sea[C]. Basel:Karger,2000.6-29.
- [8] 罗文新,陈晓佳,黄耀坚,等. 来自海洋的链霉菌抑菌活性与其培养条件的关系[J]. 微生物学通报, 1998, 25(6): 325-328.

Preliminary study of cytotoxic metabolite produced by marine actinomycete M313

LIN Qin-xiong, LIU Chun-hui, XI Tao, YE Liang, XING Ying-ying

(School of life science and technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Received: Apr., 10, 2006

Key words: marine actinomycete; *Streptomyces sporovirgulis*; cytotoxicity; physicochemical characteristics

Abstract: The marine actinomycete M313 was identified by the classical method of actinomycete taxonomy. The cytotoxicity of the metabolite produced by marine actinomycete M313 from different media was assayed by MTT method *in Vitro*, and physicochemical characteristics of the metabolite were evaluated. The results showed that the actinomycete M313 was primarily identified as *Streptomyces sporovirgulis* var. *marinus*. Its fermentation broth had strong cytotoxicity against seven varieties of tumor cells. Its ID₅₀ ranged from 800 to 2 000. The GPDA and GS media were suitable for production of strong cytotoxic metabolites. The active substances are stable under the pH 2~11, but are not heat-resistant above 60. The bioactive fractions were water-soluble and their molecular weight may be over 2 000 u.

(本文编辑:刘珊珊)