

纤维堆囊菌的代谢产物及其生物学活性分析*

李越中 胡 玮 吴斌辉 阎章才

(山东大学生命科学学院微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

陈 琦

(山东省农业科学实验中心 济南 250100)

摘 要:纤维堆囊菌不同菌株不但表现细胞和子实体形态的差异,而且代谢产物的组成和生物学活性也存在差异。纤维堆囊菌对革兰氏阴性细菌不表现任何抑制活性,部分菌株可抑制革兰氏阳性细菌;但所有菌株对真菌和肿瘤细胞有广泛和强烈的抑制作用。薄层层析显示,纤维堆囊菌的次级代谢产物组分较多,且大多数组分具有不同程度的抑制真菌和肿瘤细胞的活性。在筛选中发现四株菌的代谢产物能够促进微管蛋白聚合,其中 So33-1 活性组分的薄层层析 R_f 值与已知的 Epothilone A 相似,而 So81 的则较大的差异。研究结果表明纤维堆囊菌是很好的筛选抗真核生物活性的天然化合物资源。

关键词:粘细菌,纤维堆囊菌,代谢产物,多样性

中图分类号:Q935 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 06-0716-07

七十年代初发现的紫杉醇 paclitaxel (Taxol®) 是目前临床癌症化疗中最好的药物之一。紫杉醇通过促进形成超稳定的微管聚合物而抑制肿瘤细胞的增殖。由于紫杉醇的资源限制、水不溶性和肿瘤细胞的耐药性等问题^[1],促使人们筛选新型的促微管聚合类化合物。几十年的大量筛选仅发现五类促微管聚合活性化合物,即太平洋紫杉树产生的紫杉醇,分离自海洋低等动物珊瑚虫的 Eleutherobin,海绵的 Discodermolide, Laulimalide 和纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 产生的 Epothilones^[2]。其中 1993 年报道结构^[3]、1995 年证明促微管聚合活性^[4]的 Epothilones 以其工业化生产的可行性、良好的水溶性和较为简单的化学结构,尤其对耐紫杉醇肿瘤细胞的高活性引起了全球的广泛关注^[5,6]。

粘细菌,尤其纤维堆囊菌是一类发现新型生物活性次级代谢产物较多的细菌类群^[7]。其代谢产物的化学结构和生物活性作用机制的多样性可以与著名的链霉菌类群相比拟。但作为一类筛选天然药物的新资源,尚缺乏对该类菌代谢产物的全面认识。纤维堆囊菌属于粘细菌的溶纤维素类群。根据《Bergey's manual of systematic bacteriology》第九版^[8]和《The Prokaryotes》第二版^[9],溶纤维素粘细菌只有一个属和一个确定的种。纤维堆囊菌不同菌株合成次级代谢产物的能力可以有很强的菌株特异性。如 Gerth 等分析七百多株纤维堆囊菌,发现只有 1.6% 具有合成 Epothilones 的能力^[10]。我们在完成粘细菌资源菌库^[11]构建的基础上,对纤维堆囊菌次级代谢物产生和生物学活性进行了较全面分析。

* 国家自然科学基金(39570013, 39870003)、海洋 863 青年基金(819-Q-03)和山东省优秀中青年科学家奖励基金(97175508)资助

作者简介:李越中(1964-),男,微生物学博士,教授,主要从事原核生物分化发育和次级代谢的研究。

收稿日期:2000-10-08,修回日期:2001-02-24

1 材料和方法

1.1 实验菌株和发酵培养条件

除 So ce26 菌株为德国国家生物技术研究中心(GBF)Reichenbach 教授赠送外,其余菌株均由采自中国各地的土样中分离纯化^[11]。代谢物的发酵培养基为 M26(g/L):土豆淀粉 8.0;大豆蛋白胨 2.0;葡萄糖 2.0;酵母膏 2.0;MgSO₄·7H₂O 1.0; CaCl₂·2H₂O 1.0;微量元素液^[9] 1.0 mL。培养液中加入 1% 体积的中性吸附树脂,30 ℃, 150 r/min,培养 7 d。

1.2 代谢物的获得和组分的分离

不同菌株的发酵液 2 L 过滤取树脂,以 10 倍树脂体积的甲醇浸提。浸提物 45 ℃减压蒸馏除去溶剂。乙酸乙酯复溶,离心,并浓缩至 2 mL(粗提物)。同时,按上述步骤对未接菌培养液中的树脂提取作空白对照。GF254 硅胶板层析分离粗提物各组分,展开剂为二氯甲烷:甲醇 = 90:10。取主要分离组分带,甲醇浸提,浓缩至与粗提物相同体积。

1.3 样品对细菌和真菌的抑制活性

滤纸片法检测样品对各种指示菌的抑制活性。每张 5 mm 直径的新华滤纸片吸附 0.01 mL 的提取物,即相当于 10 mL 发酵液的提取物,室温下挥发除尽溶剂。指示真菌培养条件:葡萄糖土豆(PDA)培养基,30 ℃,40 h;细菌培养条件:牛肉膏蛋白胨(BPA)培养基,37 ℃,18 h。以每毫升发酵液产生的抑菌圈直径(mm)记录活性的大小。指示菌分别由山东省卫生防疫站菌种室、山东大学微生物系菌种室、山东省农科院植保所等提供。

1.4 样品对肿瘤细胞的抑制活性

样品完全风干,用 D-Hanks 缓冲液溶解样品,在 96 孔培养板上,MTT 法^[12]分析样品对宫颈癌 HeLa 细胞株系和肝癌 Bel 7402 细胞株系的抑制活性。测定 570 nm 波长下的光吸收值。各个样品均测定五个浓度,每毫升反应液加入相当于 20 mL、10 mL、5 mL、2.5 mL 和 1.25 mL 发酵液的量,8 组重复。IC₅₀ 值为细胞的生长一半被抑制时所需要的组分含量,用产生所需组分量的发酵液毫升数表示。如果 IC₅₀ 值在上述五个浓度的 ±10 之间,则 IC₅₀ 值用该浓度表示;如果超出 ±10,则表示为两个浓度之间。肿瘤细胞株系由中国科学院上海细胞研究所提供。

1.5 微管蛋白的制备和样品对微管蛋白聚合-解聚活性的影响

从新鲜宰杀的猪脑中,通过温度依赖性聚合-解聚循环制备微管蛋白^[13]。SDS-PAGE 电泳鉴定制备的微管蛋白。完全风干的样品用 PIPES 缓冲液溶解,按文献方法^[13],取 0.01 mL 样品(相当于 10 mL 的发酵液产物),加入到 1 mL 冰浴的微管蛋白反应液中后,立即放入带有 37 ℃循环水浴的分光光度计(UV-240,日本岛津)的样品槽中,测定反应液在 350 nm 波长下光吸收值随温度上升(Δ2 ℃/min)的时间变化曲线。标准样紫杉醇和 Epothilone A 的加样量为 10 μmol。紫杉醇由上海中国科学院有机化学研究所刘志煜先生惠赠,Epothilone A 由德国 GBF 研究所 Höfle 教授惠赠。

2 结果

2.1 纤维堆囊菌不同菌株的形态特征

纤维堆囊菌是粘细菌中唯一能降解纤维素的类群,主要存在于土壤、枯腐树皮和草食

动物的粪便中。不同纤维堆囊菌菌株的子实体、营养细胞和粘孢子有显著的差异。表 1 列举了 11 株纤维堆囊菌的主要形态特征,图 1 为纤维堆囊菌典型的子实体、营养细胞和粘孢子的形态。

表 1 11 株纤维堆囊菌菌株的形态特征
Table 1 Morphological characteristics of 11 *Sorangium cellulosum* strains

Strains	Fruiting bodies			Myxospores	Vegetative cells
	Diameters/ μm	Colors	Textures	/ μm	/ μm
So33-1	15 ~ 25	dark orange	soft	$2 \sim 3 \times 0.8 \sim 1$	$5 \sim 7 \times 0.7 \sim 1$
So35-22	15 ~ 20	orange	soft	$1.5 \sim 3 \times 0.7 \sim 1$	$4 \sim 6 \times 0.7 \sim 1$
So81	30 ~ 60	orange	soft	$2.5 \sim 4 \times 0.8 \sim 1.2$	$5 \sim 7 \times 0.8 \sim 1$
So ce26	30 ~ 50	rust-colour	rigid	$2 \sim 4 \times 0.8 \sim 1.2$	$5 \sim 6 \times 0.8 \sim 1$
So16	15 ~ 20	orange	soft	$1.5 \sim 2.5 \times 0.7 \sim 0.8$	$3 \sim 5 \times 0.6 \sim 0.9$
So21-1	10 ~ 20	yellow	soft	$2 \sim 3 \times 0.7 \sim 1$	$5 \sim 7 \times 0.8 \sim 1$
So41	30 ~ 50	black	rigid	$2 \sim 3 \times 0.8 \sim 1$	$4 \sim 6 \times 0.7 \sim 1$
So11-1	20 ~ 30	light-orange	soft	$2.5 \sim 4 \times 0.8 \sim 1$	$5 \sim 8 \times 0.8 \sim 1$
So09A	8 ~ 12	yellow	soft	$1.5 \sim 2.5 \times 0.7 \sim 1$	$3 \sim 4.5 \times 0.6 \sim 0.9$
So09n-r	20 ~ 40	light-orange	soft	$2 \sim 3 \times 0.8 \sim 1$	$5 \sim 7 \times 0.8 \sim 1$
So 10	40 ~ 60	brown	rigid	$2 \sim 3 \times 0.8 \sim 1.1$	$5 \sim 7 \times 0.8 \sim 1$

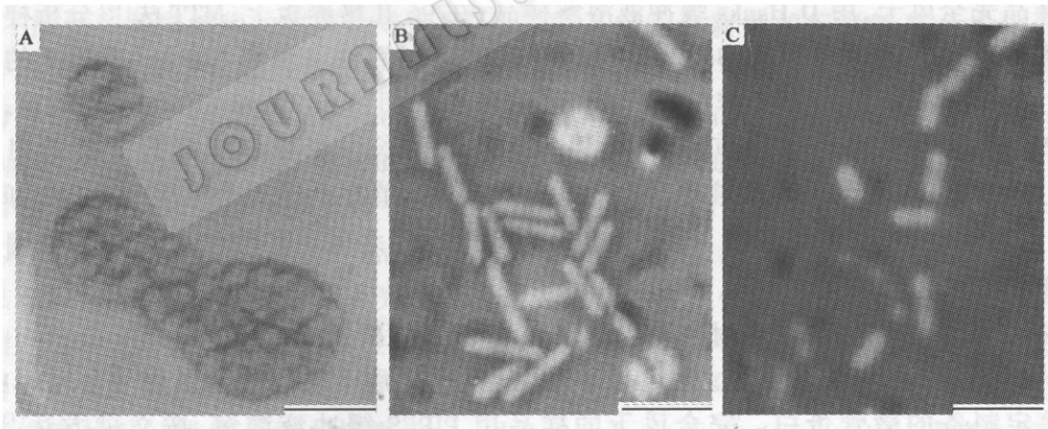


图 1 纤维堆囊菌的典型形态(模式菌株为 So33-1)

Fig.1 Typical morphological structures of *So. cellulosum*(Model strain was So33-1)

A. Fruiting bodies, bar = 100 μm ; B. Vegetative cells, bar = 10 μm ; C. Myxospores, bar = 10 μm .

A ~ C are photos of phase-contrasted microscope.

2.2 代谢粗提物的生物学活性

不同纤维堆囊菌菌株代谢产物的生物学活性分析结果显示(表 2),所有菌株的代谢产物对革兰氏阴性细菌均无任何抑制活性,少数菌株对革兰氏阳性细菌有抑制活性,如 So81,So ce26 等。更广泛的菌株活性分析也证明了纤维堆囊菌对革兰氏阴性细菌没有抑

制活性(测试菌株达 67 株,结果未列出)。但所有菌株均具有广泛而强烈的抑真菌活性。大部分菌株能够抑制肿瘤细胞生长(广泛的活性分析表明抑瘤阳性率达 89%)。其中, So33-1、So81、So11、So41 等抑制活性强烈。So 09A、So 09 等在最高测试浓度范围内未检得抗肿瘤细胞活性。

表 2 11 株纤维堆囊菌代谢产物的生物学活性
Table 2 Bioactivities of metabolites from 11 *Sorangium cellulosum* strains

Screen models	33-1	35-22	81	26	16	21-1	41	11-1	09A	09n-r	10
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> Type II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	7	12	6	6	7	-	6	-	-
<i>Bacillus megatherium</i>	-	-	10	6	-	-	-	-	6	-	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	17	24	-	28	-	25	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus nigricans</i>	35	34	44	40	20	34	40	25	-	-	20
<i>Mucor biemalis</i>	30	30	24	46	20	40	20	20	-	-	10
<i>Phytophthora infestans</i>	38	34	40	40	36	50	40	30	-	-	10
<i>Marssonina mali</i>	39	26	40	40	32	40	40	30	8	10	18
<i>Fusarium vasinfectum</i>	43	35	46	40	38	33	26	45	26	15	33
<i>Neurospora crassa</i>	25	18	40	25	30	12	30	30	-	-	16
<i>Aspergillus oryzae</i>	40	40	40	40	34	45	40	28	18	10	10
Hela cell line	< 1.25	5 ~ 10	< 1.25	2.5 ~ 5	> 20	1.25 ~ 2.5	1.25	1.25 ~ 2.5	-	-	10 ~ 20
Bel 7402 cell line	< 1.25	10	< 1.25	5	> 20	5	< 1.25	2.5 ~ 5	-	-	10 ~ 20

Anti-microorganism activities were represented using repressing diameter(mm/ml culture); anti-tumor cell activities were IC₅₀ (mL culture producing the activity). The maximal tested volume of culture samples was 20 mL.

2.3 代谢产物的微管聚合/解聚抑制活性

图 2 显示猪脑粗提物(Ext)经过二个循环制备的纯化微管蛋白(H₂P)的 SDS 电泳组分。H₂P 中包括 54 kD 和 57 kD 左右的 α 和 β -微管蛋白,以及其它的微管相关蛋白(MAPs)。分析粗提物对微管蛋白聚合-解聚活性的抑制结果表明,不具有抗肿瘤活性的菌株也不具有促微管聚合活性;而在有抗肿瘤细胞活性的菌株中仅有 4 株菌(So33-1、So81、So57-1, So81-1)的代谢产物可以明显地促进微管聚合过程,阳性率达 6%。未发现纤维堆囊菌的代谢产物有促微管解聚活性。

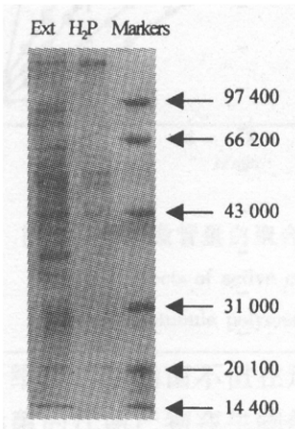


图 2 纯化微管蛋白的 SDS 电泳
Fig.2 SDS electrophoresis of purified tubulins

2.4 纤维堆囊菌代谢产物的分离及生物学活性

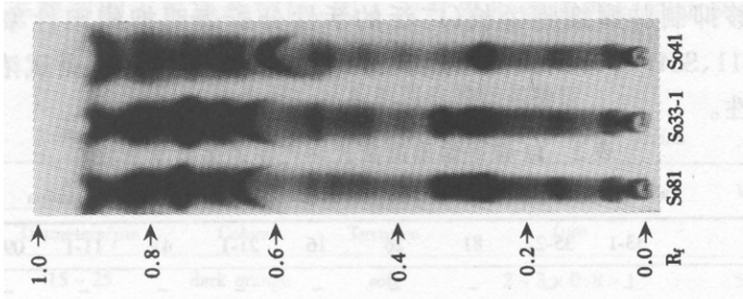


图 3 纤维堆囊菌代谢产物的薄层层析图谱

Fig.3 Thin layer chromatography components of metabolites produced by *So. cellulorum*

选择具有抗肿瘤细胞活性但不具有促微管聚合活性的 So41 菌株和具有促微管聚合活性的 So33-1 和 So81 菌株,以薄层层析(TLC)方法分离代谢粗提物(图 3)。三株菌均具有丰富的代谢产物,所含组分具有相似性,但有明显差异,各组分的含量也不同。从制备薄层层析分离组分中选取 10 个含量较大的组分,分析它们的生物活性(表 3)。对比表 2 的结果,菌株的抑菌活性通常是由几个组分共同作用的结果,如 So81 菌株对毛霉、根霉等的抑制活性,So41 和 So33-1 对曲霉的抑制活性等。不同菌株的 R_f 值相同或相近的组分抑菌活性差异也很大,如 R_f 值在 0.8~0.9 之间的组分。从三株菌的比较看,So81 菌代谢产物的抑菌活性明显与另外两株菌不同,其代谢物组分通常具有广谱的抑真菌活性,极性组分(R_f 值较小)具有更强的抑菌活性。而 So33-1 和 So41 菌株的高极性组分或抑菌谱窄,或无抑菌活性。

表 3 代谢产物的薄层层析主要分离组分及其抗真菌活性

Table 3 Main components of thin layer chromatography separation and their activities of anti-fungi

R_f values	<i>Sa. cerevisiae</i>	<i>Rh. nigricans</i>	<i>Mu. biemalis</i>	<i>Asp. oryzae</i>	<i>Ma. mali</i>	<i>Ne. crassa</i>
So81-0.88	-	-	-	-	-	10
0.83	-	14	12	12	-	10
0.75	-	-	-	-	-	-
0.71	-	-	-	-	16	22
0.66	-	-	-	-	12	20
0.33	-	15	22	-	-	10
0.26	-	22	15	30	25	25
0.15	-	17	26	24	31	28
0.06	-	20	24	35	32	40
0.03	-	19	16	20	22	20
So41-0.86	-	18	21	46	27	-
0.80	-	-	-	20	-	-
0.73	-	-	-	8	-	-
0.67	-	-	-	-	-	-
0.61	-	-	-	-	12	-

续表 3

0.51	-	-	-	10	-	-
0.26	-	-	-	-	-	-
0.15	-	-	-	-	-	-
0.06	-	20	-	-	-	-
0.03	-	24	-	-	-	-
So33-1-0.87	-	-	-	-	-	-
0.82	20	32	22	44	42	-
0.74	-	-	-	18	16	-
0.68	-	-	-	17	-	-
0.65	-	-	-	-	11	-
0.52	-	-	-	-	11	-
0.33	-	-	-	-	-	-
0.27	-	-	-	-	-	-
0.16	-	-	-	-	-	-
0.06	-	-	-	-	-	-

So33-1 菌株的主要代谢物组分通常具有抑制肿瘤细胞活性,与抑真菌活性有较好的对应性(表 4)。但粗提物全组分的抑制肿瘤细胞活性不是各组分效果的简单叠加。

表 4 So33-1 的薄层层析分离组分对 Bel7402 细胞株系的抑制活性

Table 4 Bioactivities of thin layer chromatography components of So33-1 against Bel 7402 cell lines

Bands/R _f	Ext	0.87	0.82	0.74	0.68	0.65	0.52	0.33	0.27	0.16	0.06
IC ₅₀ /ml*	0.24	-	0.38	0.39	0.40	0.57	1.10	0.42	2.08	-	0.57

* The biggest volume tested was equal to 5 mL culture

分析 So33-1 和 So81 的不同薄层层析组分对微管蛋白聚合-解聚活性的影响显示, So33-1 的代谢产物中具有促微管聚合活性组分的 R_f 值在 0.74 左右(第 3 个主要组分),与 Epothilone A 的 R_f 值(0.75)相同,而 So81 的促微管聚合活性组分 R_f 值在 0.83 左右(第 2 个组分),明显与已经报道的 Epothilones 不同,可能为一个新的组分(图 4)。

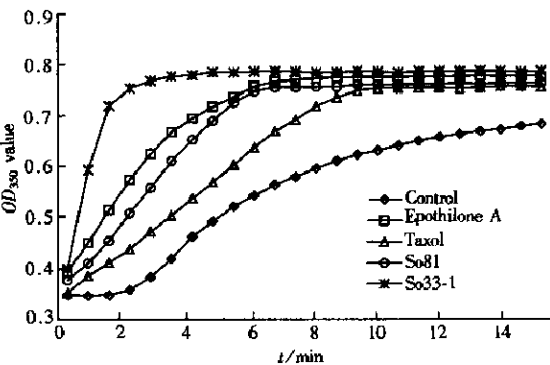


图 4 活性组分对微管蛋白聚合形成微管的作用

Fig.4 Effects of active components on microtubule polymerization

3 讨论

堆囊菌是细菌中独特的一个生理类群。由于缺乏更为可靠的数据,目前该属已经确定的分类仅包括一个种。从本文的结果看,降解纤维素的粘细菌不但在形态发生上有显著的差异,在次级代谢产物上也有不同。纤维堆囊菌的代谢产物在生物学活性上有明显的共同之处,如它们都不具有抗革兰氏阴性细菌活性,但对真核微生物却有强烈而广泛的抑制活性,并且大多数菌株具有抗肿瘤细胞活性。同一株纤维堆囊菌的代谢产物可以有多个组分具有抗肿瘤活性。但在抗肿瘤细胞活性组分中只有少数有抗微管活性。因此,纤维堆囊菌的代谢产物在抗肿瘤机制上可能具有显著的多样性,是一个很好的抗真核生

物类药物筛选的微生物类群。

参 考 文 献

- [1] Cowden C J, Paterson I. *Nature*, 1997, **387**:238.
- [2] 李赵中, 胡 玮, 周 璐. 药学学报, 2001, **36**(2):155 ~ 160.
- [3] Höffle G, Bedarf N, Gerth K, *et al.* Patent WO 93/10121, May, 1993.
- [4] Bollag D M, Mcquaney P A, Zhu J, *et al.* *Cancer Research*, 1995, **55**:2325 ~ 2333.
- [5] Robert F. *Science*, 1996, **274**:2009
- [6] Mann J. *Nature*, 1997, **385**:117
- [7] Reichenbach H, Höffle G. Production of bioactive secondary metabolites. In ; Dworkin M, Kaiser D ed. *Myxobacteria II*. Washington D C: Am Soc Microbiol, 1993. 347 ~ 397.
- [8] McMurdy H D. Order Myxococcales. In: Staley J T, *et al.* ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. 2139 ~ 2170.
- [9] Reichenbach H, Dworkin M. The Myxobacteria. In: Balous A, *et al.* ed. *The Prokaryote*. 2nd ed. New York: Spriger-Verlag, 1992. 3418 ~ 3487.
- [10] Gerth K, Bedarf N, Irschik H, *et al.* *J Antibiot*, 1996, **49**:560 ~ 563
- [11] 李越中, 李 健, 周 璐, 等. 微生物学报, 2000, **40**:652 ~ 656.
- [12] Monsmann T. *J Immunol Meth*, 1983, **65**:55 ~ 63.
- [13] Olmsted J B, Borisy G G. *Biochemistry*, 1975, **14**:2996 ~ 3005

DIVERSITY OF METABOLITES AND THEIR BIO-ACTIVITIES IN MYXOBACTERIUM SORANGIUM CELLULOSUM

Li Yuezhong Hu Wei Wu Binhui Yan Zhangcai

(State Key Laboratory of Microbial Technology, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Chen Qi

(Experiment Center, Shandong Academia of Agriculture Science, Jinan 250100, China)

Abstract: Different *Sorangium cellulosum* strains not only showed diversity in their cell and fruiting body morphologies, but also differences of bio-activities and components of the metabolites. All the Sorangial strains studied in this paper had no activity on Gram-negative bacteria, some were able to repress Gram-positive bacteria. However, all the strains were able to repress growth of fungi and tumor cells strongly and widely. Thin layer chromatography assay of metabolites showed multi-components in the metabolites, and most of them have abilities of repressing fungi and tumor cells in different degrees. Four strains were found to be able to produce compounds with activity of promoting polymerization of microtubule. Based on R_f value on TLC, the bio-active component produced by So33-1 strain was similar to Epothilone A, while that of So81 was much different. The results of this paper suggested that *Sorangium cellulosum* is a much beneficial resource for screening nature compounds with bio-activities against eukaryotes.

Key words: Myxobacterium, *Sorangium cellulosum*, Metabolites, Diversities