

药用植物内生放线菌的生物活性及菌株 D62 的代谢产物分析

刘 宁^{1,3} 张 辉² 郑 文¹ 黄 英^{1*} 王海彬^{2*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101)

(² 浙江海正药业技术中心 台州 318000) (³ 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 利用琼脂移块法及 WST-8 法分别对分离自西双版纳药用植物的 165 株内生放线菌进行了抗菌、抗肿瘤活性测定。结果显示,超过 42% 的菌株对病原菌表现出拮抗活性,且对病原真菌的总体拮抗活性明显强于土壤放线菌,78% 的菌株表现出抗肿瘤活性,且大部分菌株(54.5%)具有强抗肿瘤活性。选取其中对真菌及肿瘤细胞均有高抑制活性的菌株 D62,并对其次生代谢产物进行了进一步的研究,共分离得 6 个化合物,分别是 Antimycin A_{4a}(1), Antimycin A_{7a}(2), Antimycin A_{2a}(3), Antimycin A_{1a}(4), 10-hydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide(5)及 6-(2-(4-aminophenyl)-2-oxoethyl)-3,5-dimethyl-tetrahydropyran-2-one(6),其中化合物 6 为新化合物。以上结果表明药用植物内生放线菌作为一类新的微生物资源具有很好的开发潜力。

关键词: 内生放线菌; 抗菌活性; 抗肿瘤活性; 次生代谢产物; 新化合物

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)05-0823-05

植物内生菌是一些与宿主关系非常复杂和多样的微生物,包括真菌、放线菌和其它细菌^[1],他们与宿主共生或寄生,或者在几种关系中转换,但并不引发植物产生可见病症^[2]。自 1993 年 Stierle 等^[3]从短叶紫杉中发现产紫杉醇的内生真菌后,有关内生菌的研究引起了人们越来越多的兴趣。近年来的大量研究表明,内生菌广泛存在于绝大多数植物中,有着丰富的生物多样性和活性多样性,开发与应用潜力巨大^[4,5]。统计表明,从植物内生菌分离到的活性物质中,大约 51% 是未知的新化合物;而从土壤微生物中分离的新化合物只占其总数的 38%^[6]。放线菌是产生抗生素及多种生物活性物质的重要微生物资源,在植物中也广泛存在,并且内生放线菌很可能产生从土壤放线菌中难以发现的新型天然产物^[7-9]。我国有着丰富的植物多样性,尤其是民族药用植物,为开展植物内生放线菌的研究提供了有利资源。我们通过前期的研究工作,从云南西双版纳多种药用植物中分离出了百余株放线菌,其中链霉菌占 90% 以上(古强,中国科学院微生物研究所硕士学位论文,未发表)。该文报道了这些内生放线菌对病原菌的拮抗活性及抗肿瘤活性,并选取其中对真菌及肿瘤细胞均有高抑制活性的菌株 D62,对

其次生代谢产物进行了进一步的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: 内生放线菌菌的活化培养采用 ISP-2 (Glucose-Yeast extract-Malt extract agar) 及贝奈特琼脂(Bennett's agar)培养基,待测菌培养采用 LB 培养基(细菌)及 PDA 培养基(真菌)。菌株发酵均采用 ISP-2 培养基。

1.1.2 菌种和细胞系: 药用植物内生放线菌由本实验室分离保存,分 A、B、C、D、E 5 个系列,共计 165 株(硕士学位论文,未发表)。抗菌活性测试菌株: 耐药大肠杆菌(*Escherichia coli*)、耐药肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、耐药绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、耐药金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和耐药表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)等 5 株,由潍坊医学院提供;烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、尖孢镰孢霉(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和浅黄分支杆菌(*Mycobacterium gilvum*)等 6 株,由中国普通微生物保藏中心(CGMCC)提供。抗

基金项目: 浙江海正药业技术开发项目资助

* 通讯作者。Tel: 86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn; 86-576-8827806; E-mail: hbwang@hisunpharm.com

作者简介: 刘宁(1981-),男,山东淄博人,硕士研究生,主要从事放线菌资源研究。

其他作者: 雒文军²

收稿日期: 2007-07-02; 接受日期: 2007-07-05; 修回日期: 2007-07-18

肿瘤活性测试细胞系:人肺腺癌细胞系 A549 和鼠黑色素瘤细胞系 B16 购自中国医学科学院细胞中心。

1.1.3 材料、仪器及试剂:大孔吸附树脂层析采用 Diaion 的 HP-20 大孔吸附树脂;薄层层析采用青岛海洋化工厂生产的 TLC 薄层层析板(GF₂₅₄);硅胶柱层析采用青岛海洋化工厂生产的 100~200 目和 200~300 目硅胶 G;凝胶层析采用 Amersham 的 Sephadex LH-20;半制备型 HPLC 采用 Agilent 1100 Series 高压液相色谱仪,色谱柱为 ZORBAX RB C-18 (9.4mm×250mm);相关有机试剂均为 A. R. 级,北京化学试剂公司生产。

1.2 植物内生菌的抗菌、抗肿瘤活性测定

1.2.1 抗菌活性测定:将内生放线菌培养于固体活化培养基中 28℃ 培养 8~12d 后采用琼脂移块法^[9]测试其抗菌活性(打孔器直径 6mm)。

1.2.2 抗肿瘤活性测定:每株菌的 100mL 发酵液均离心分成菌丝体和上清液两部分。菌丝体部分用 100mL 丙酮浸泡过夜后浓缩收集丙酮浸出液;上清液通过树脂柱层析(Diaion HP-20 大孔吸附树脂)后收集乙醇洗脱部分;合并所有有机相后使用 WST-8 法^[11]测定其抗肿瘤活性。

1.3 菌株 D62 的代谢产物分析

1.3.1 菌株发酵:①种子培养:取菌株 D62 的新鲜 ISP-2 斜面菌种,接种于装有 300mL ISP-2 培养液的 1000mL 三角瓶中,28℃、摇床(250r/min)培养 4d。②发酵培养:1.2L 种子培养液接入装有 30L ISP-2 培养液的 50L 发酵罐中,于温度 28℃、通气量 10m³/h、搅拌转速 110~300r/min 条件下发酵 7d。

1.3.2 提取与分离:30L 发酵液离心后得菌体和上清液两部分,上清液用大孔吸附树脂吸附后用 95% 乙醇洗脱,菌体用适量丙酮提取。合并有机相并减压浓缩后用乙酸乙酯和正丁醇分别萃取 3 次;收集、蒸干有机相后得粗提物 11.37g。

将此粗提物上粗硅胶(100~200 目)柱,用石油醚:丙酮(95:5~60:40)梯度洗脱,并按照极性递增的顺序分成 I 和 II 两个流份。

将流份 I 过 LH-20 凝胶柱(CHCl₃ 洗脱)后分成两个部分,第一部分反复过凝胶柱后于半制备型 HPLC 上分离(MeOH:H₂O = 64:36;UV = 254nm;流速 1.6mL/min)得化合物 1~4(R_{T1} = 16.9min, 4.5mg; R_{T2} = 25.3min, 3.1mg; R_{T3} = 27.2min, 5.5mg; R_{T4} = 46.4min, 1.9mg)均为淡黄色结晶;第二部分于硅胶(200~300 目)层析柱(石油醚:乙酸乙酯 = 95:5~70:30)去除杂质后于半制备型 HPLC 上分离(MeOH:

H₂O = 85:15;UV = 220nm;流速 1.5mL/min)得油状化合物 5(R_{T5} = 11.2min, 28.4mg)。

将流份 II 依次通过硅胶(100~200 目)柱层析(石油醚:丙酮 = 95:5~85:15)及 LH-20 凝胶柱(CHCl₃ 洗脱)层析后于半制备型 HPLC 上分离(MeOH:H₂O = 80:20;UV = 220/254nm 双波长;流速 1.5mL/min)得粉末状化合物 6(R_{T6} = 12.2min, 3.6mg)。

分离过程中的物质检测,采用 UV₂₅₄ 紫外观察及茴香醛/硫酸(Anis 显色剂)显色法。

1.3.3 化合物结构解析及鉴定:UV 测定用 Beckman DU-800 紫外-可见分光光度计;IR 测定用 WQF-410 付立叶变换红外光谱仪(KBr 压片);NMR 测定用 Bruker DRX-400 型核磁共振仪,以 TMS 为内标;ESI-MS 和 HRFAB-MS 分别用 Q-TOF Micro LC-MS-MS 及 Bruker Daltonics APEX II FT-ICRMS 质谱仪测定。

2 结果

2.1 内生放线菌的抗菌活性

从表 1 可知,对不同测试菌有拮抗作用的内生放线菌在分离菌株中占有不同的比率,按抗枯草芽孢杆菌 > 抗白色念珠菌 > 抗浅黄分支杆菌 > 抗耐药金黄色葡萄球菌 > 抗尖镰孢霉菌、立枯丝核菌 > 抗耐药表皮葡萄球菌、耐药大肠杆菌 > 抗耐药肺炎克雷伯氏菌 > 抗烟曲霉 > 抗耐药绿脓杆菌的次序排序。165 株内生放线菌中,有 70 株菌(42.4%)表现出不同程度的抑菌活性;57 株菌(34.5%)对细菌有抑制作用,其中 55 株对革兰氏阳性菌有抑制作用,6 株对革兰氏阴性菌有抑制作用;36 株菌(21.8%)对真菌有抑制作用,其中 26 株对酵母菌有抑制作用,21 株对丝状真菌有抑制作用(图 1)。值得一提的是,有 42 株菌对耐药测试菌有抑制作用,其中 D30、E3 等部分菌株表现出了较高的拮抗活性及较宽的抑菌谱(表 2)。

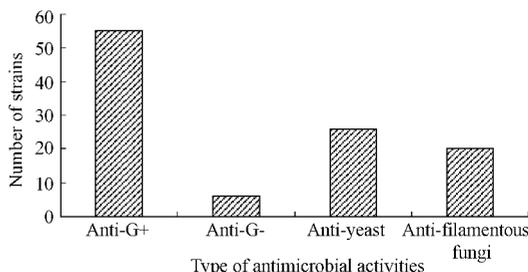


图 1 内生放线菌的抗菌活性统计

表 1 内生放线菌的抗菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of endophytic actinomycetes

Test microbe	Number of active strains (proportion)	Strain No.
<i>Bacillus subtilis</i>	32 (19.4%)	A5, A6f, B1, C2, C2-1, D3, D5, D8, D13, D14, D21, D22, D26, D27, D33, D38, E2, E3, E4, E6, E9, E10, E11, E15, E21, E22, E23, E26, E27, E34, E60, E37-1
<i>Mycobacterium gilvum</i>	20 (12.1%)	A6f, C9, D15, D30, DX7, E2, E3, E9, E12, E15, E18, E19, E21, E22, E41, E44, E45, E50, E58, E37-1
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (6.7%)	B5, B6, C3, C7, C8, D61, D65, E1, E19, E30, E50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5 (3.0%)	A3, B1, C2, E19, E50
<i>Escherichia coli</i>	5 (3.0%)	B2, C1, D30, E3, E8-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (2.4%)	D30, E3, E8-1, E50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (0.6%)	E3
<i>Candidia albicans</i>	26 (15.8%)	B2, B3, C2, D1, D3, D4, D14, D15, D17, D21, D22, D26, D30, D35, D62, D63, E3, E9, E10, E12, E19, E23, E25, E27, E60, E8-1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3 (1.8%)	C2-1, C11, E60
<i>Fusarium oxysporum</i>	10 (6.1%)	A6f, D1, D22, D30, D61, E3, E8, E9, E28, E8-1
<i>Rhizoctonia solani</i>	10 (6.1%)	B2, B3, B4, C2, C2-1, C3, C12, D15, D30, D33

表 2 部分活性菌株对测试菌的抑菌圈直径

Table 2 Diameters of inhibition zones of some active strains against test microbes

Strain No.	Test microbe/diameter (mm)											
	SA	SE	EC	KP	PA	MG	BS	CA	AF	FO	RS	
D30	-	-	10	8	-	10	-	17	-	10	10	
E3	18	-	12	14	10	>60	22	22	-	12	-	
E8-1	-	-	10	10	-	-	-	10	-	8	-	
E9	-	-	-	-	-	18	14	10	-	16	-	
E19	24	32	-	-	-	10	25	-	-	-	-	
E50	40	26	-	12	-	10	26	-	-	-	-	

SA, *Staphylococcus aureus*; SE, *Staphylococcus epidermidis*; EC, *E. coli*; KP, *Klebsiella pneumoniae*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; MG, *Mycobacterium gilvum*; BS, *Bacillus subtilis*; CA, *Candidia albicans*; AF, *Aspergillus fumigatus*; FO, *Fusarium oxysporum*; RS, *Rhizoctonia solani*; -, no inhibition zone.

2.2 内生放线菌的抗肿瘤活性

抗肿瘤活性结果见表 3。165 株内生放线菌中, 21 株菌因发酵失败未检测抗肿瘤活性。测定的 144 株内生放线菌中, 127 株 (88.2%) 对肿瘤细胞表现出抑制作用, 90 株 (62.5%) 表现出强抑制作用 (图 2)。

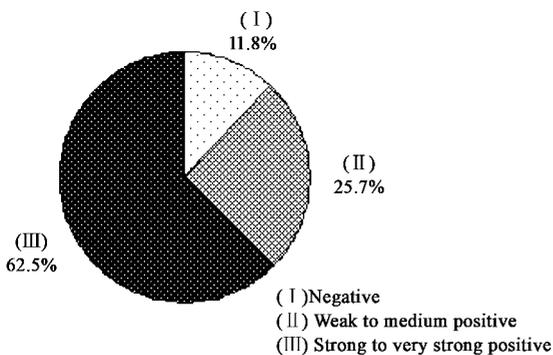


图 2 内生放线菌的抗肿瘤活性分布图

Fig. 2 Distribution of antitumor activity of endophytic actinomycetes

2.3 菌株 D62 的代谢产物分析

菌株 D62 是一株对白色念珠菌 (*Candida albicans*) 及肿瘤细胞系 A549 均有强烈抑制活性的内生放线菌。该菌发酵产物粗提物的 TLC 结果显示, 有若干层析点表现出了分离价值 (表 4), 因此在进一步的分离纯化过程中按照 1.3.2 节所述方法逐点追踪这些组分, 最终得到 6 个化合物。

目标化合物用 $CDCl_3$ 溶解, 经 NMR (1H 、 ^{13}C 、DEPT、2D-COSY、HMQC、HMBC 及 NOESY) 分析、电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 分析、紫外光谱 (UV) 及红外光谱 (IR) 分析后最终推定各化合物的分子结构见图 3。

由以上结构式, 对 6 个化合物进行了 CAS-online database 的在线检索。由结果可知, 化合物 1~4 均为大环双内酯类化合物-抗霉素 (Antimycin A) 家族的成员, 分别为 Antimycin A_{4a} (1)、Antimycin A_{7a} (2)、Antimycin A_{2a} (3) 及 Antimycin A_{1a} (4), 均为有多种生物活性的专利化合物^[12-14]; 化合物 5 为具有抗肿瘤活性的 Butanolides 类化合物, 最初分离自海洋放线菌^[15], 现在也有报道分离自植物内生菌^[16]; 化合物 6 为 δ -内酯类化合物, 经检索未发现任何已知化合物与其结构相同, 故为新化合物。其波谱分析数据如下:

化合物 6 白色至淡黄色无定型粉末, 易溶于氯仿、丙酮, 不溶于石油醚, 微溶于水; 分子式 $C_{15}H_{19}NO_3$; HRFAB-MS 显示 $[M+H]^+$ 262.1440 (calcd. 262.1438); UV: $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 为 202 (log ϵ 4.49) 及 298 (log ϵ 3.33); IR: 1714.7 cm^{-1} (C=O); 1665.5 cm^{-1} , 1638.6 cm^{-1} , 1599.5 cm^{-1} , 1379.0 cm^{-1} 及指纹区 827.9 cm^{-1} (单强峰) (对位取代苯); 3461.7 cm^{-1} 及 3352.9 cm^{-1} ('-NH₂' 基团); 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 2.72 (1H, m, H-3), 1.74 (2H, dd, J=7.7, 9.0, H-

4), 1.98(1H, m, H-5), 4.75(1H, ddd, 3.8, 7.5, 10.6, H-6), 2.96(1H, dd, 3.8, 16.7, H-7a), 3.36(1H, dd, 7.5, 16.7, H-7b), 7.81(1H, d, 8.7, H-10), 6.64(1H, d, 8.7, H-10), 6.64(1H, d, 8.7, H-10), 7.81(1H, d, 8.7, H-10), 1.21(3H, d, 6.8, H-15), 1.04(2H, d, 6.8, H-16), 4.17(s, 12-NH2); ¹³C-NMR

(CDCl₃, 100 MHz) δ: 175.9(s, C-2), 32.4(d, C-3), 35.1(t, C-4), 32(d, C-5), 79.3(d, C-6), 41.5(t, C-7), 194.5(s, C-8), 151.4(s, C-9), 130.8(d, C-10), 113.8(d, C-11), 127.5(s, C-12), 113.8(d, C-13), 130.8(d, C-14), 16.2(q, C-15), 17.9(q, C-16)。

表3 内生放线菌的抗肿瘤活性

Table 3 Antitumor activity of endophytic actinomycetes

Activity	Strain No.	Sum (proportion)
-	B4, C4, C9, D7, D9, D30, D34, D38, D41, D45, D49 ~ D52, D60, DX7, E8, E23, E24, E34, E48	17(10.3%)
+	C1, D39-1, D40, D42, D42-1 ~ D44, D48, D53, D54, D59, E1, E7, E15, E20, E27, E35, E39, E63, E71	20(12.1%)
++	A4, A6f, C2-1, D33, D21-1, D35, D65, E5, E11, E19, E24, E31, E44, E51, E52, E60, E62	17(10.3%)
+++	A1, A2, C2, C5, C8, D10, D19, D21, D27, E4, E9, E18, E21, E30, E33, E36, E46, E49, E55, E58	20(12.1%)
++++	A3, A5, A6, A7, A8, B1 ~ B3, B5 ~ B9, C3, C6, C7, C11, C12, D1 ~ D6, D8, D11, D13 ~ D18, D20, D22 ~ D26, D28, D29, D31, D32, D39, D47, D55 ~ D58, D61 ~ D64, E2, E3, E6, E8-1, E10, E12, E14, E16, E25, E28, E38, E40 ~ E42, E45, E47, E50, E56, E59	70(42.4%)
ND	D37, D66, E13, E15-1, E22, E26, E26-1 ~ E26-3, E29, E32, E32-1, E32-2, E37, E37-1, E43, E65, E67 ~ E70	21(12.7%)

- , Negative ; + , weak positive ; ++ , medium positive ; +++ , strong positive ; ++++ , very strong positive ; ND , not determined.

表4 菌株 D62 的化合物的层析行为

Table 4 TLC performance of compounds from strain D62

Dot No.	R _f (petroleum ether: acetone = 4:1)	UV ₂₅₄	ANIS agent	Compounds
1	0.6 ~ 0.7 (disperse dot)	fluorescent	yellow	1 ~ 4
2	0.8	none	violet → blue	5
3	0.85	weakly fluorescent	yellow	6

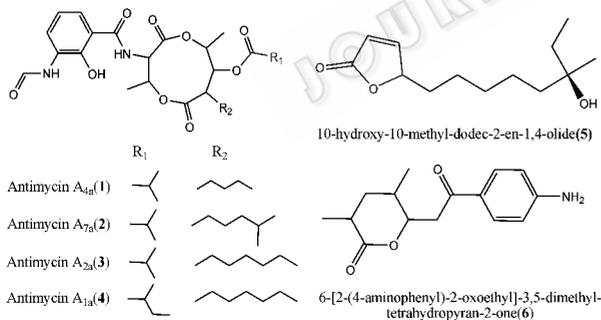


图3 化合物 1~6 的结构

Fig. 3 Structures of compounds 1 ~ 6

3 讨论

检测内生菌抗病原菌及肿瘤细胞的目的是筛选产生活性次生代谢产物的菌株,进一步寻找具有开发及应用价值的生物活性物质。从活性结果看(1)拮抗细菌的内生菌比拮抗真菌的多,拮抗 G⁺ 菌的内生菌明显比拮抗 G⁻ 菌的多。这与大多数土壤放线菌的总体活性结果一致。(2)内生放线菌对病原真菌,尤其是白色念珠菌的总体拮抗活性明显强于土壤放线菌^[9]。这可能与植物组织和土壤环境中微生物种群的差异性有关,植物组织中内生或病原真

菌类群占优势^[5],而土壤环境中则是细菌类群占优势。(3)广谱及抗耐药病原菌的内生放线菌资源丰富,提示这些内生放线菌具有较好的产生新抗菌产物的潜力。(4)内生放线菌的抗肿瘤活性无论是从活性菌株比例,还是从活性强度上来看都非常突出,提示这些放线菌具有巨大的产生抗肿瘤天然产物的能力。

菌株 D62 是一株内生链霉菌,与鲁地链霉菌(*Streptomyces rutgersensis*),白色链霉菌(*Streptomyces albus*)和脱叶链霉菌(*Streptomyces exfoliatus*)都有很高的 16S rRNA 序列相似性(古强硕士学位论文,未发表)。从菌株 D62 的发酵产物中获得的 6 个化合物中,5 个已知化合物均具有一定的生物活性,其中的 Antimycins 类是菌株生物活性的主要来源^[13-15],并具有较高的商业价值,值得进一步开发;已有的化学数据^[12]表明,大多数小分子天然内酯的发现多集中在五元环 δ-内酯类及六元环多羟基 δ-内酯,而从 D62 中发现的此二甲基 δ-内酯化合物不在上述之列,表明了植物内生菌产生的天然化合物结构上的新颖性。

综上,相对于已经研究得很多的土壤放线菌来说,药用植物内生放线菌作为一类新的微生物资源具有很好的开发潜力及潜在的商业价值,因此,利用我国丰富的药用植物多样性进行内生放线菌的研究和开发将为寻找微生物来源的新药开辟有效途径。

致谢 感谢潍坊医学院赵乃昕教授提供耐药细菌测试菌,感谢浙江海正药业技术中心王继栋博士协助

进行化合物的结构解析与鉴定工作。

参 考 文 献

- [1] Hallmann J, QuadtHallmann A, Mahaffee WF, et al. Bacterial Endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 1997, **43**, 895 – 914.
- [2] Bacon CW, White JF. Microbial Endophytes. New York : Marcel Dekker Inc. , 2000.
- [3] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, **260** : 214 – 216.
- [4] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod*, 2004, **67** : 257 – 268.
- [5] Strobel GA. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Curr Opin Microbiol*, 2006, **9** : 240 – 244.
- [6] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect*, 2003, **5** : 535 – 544.
- [7] Cao L, Qiu Z, You J, et al. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett Appl Microbiol*, 2004, **39** : 425 – 430.
- [8] Conn VM, Franco CMM. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** : 1787 – 1794.
- [9] Igarashi Y, Miura SS, Fujita T, et al. Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygroscopicus*. *J Antibiot*, 2006, **59** : 193 – 195.
- [10] 罗红丽, 黄 英, 王黎明, 等. 西藏地区土壤放线菌种群多样性及拮抗活性研究. *微生物学报*, 2005, **45** (5) : 724 – 727.
- [11] Tominaga H, Ishiyama M, Ohset O, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell visibility assay. *Anal Commun*, 1999, **36** : 47 – 50.
- [12] Kazuro SKH, Hiroko H, Atsuko M, et al. A new antibiotic, antimycin A9, produced by *Streptomyces* sp. K01-0031. *J Antibiot* (Tokyo), 2005, **58** : 74 – 78.
- [13] Nobuo H, Kazuo K, Hiroyuki N, et al. Antimycins A₁₀-A₁₆, seven new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* spp. SPA-10191 and SPA-8893. *J Antibiot* (Tokyo), 2005, **58** : 460 – 467.
- [14] Berdy J, Tomori L, Gado I, et al. Antimycin-a complex with high biological activity - from aerobic fermentation with certain streptovorticium hiroshimense strains. (Hungary) HU38394 – T. 1986.
- [15] Venugopal JRV, Michael S, Hartmut L, et al. New Butenolides from Two Marine *Streptomyces*. *J Nat Prod*, 2000, **63** : 1570 – 1572.
- [16] Zhao PJ, Li GH, Shen YM. New chemical constituents from the endophyte *Streptomyces* species LR4612 cultivated on *Maytenus hookeri*. *Chem Biodivers*, 2006, **3** : 337 – 342.

Bioactivity of endophytic actinomycetes from medicinal plants and secondary metabolites from strain D62

LIU Ning^{1,3}, ZHANG Hui², ZHENG Wen¹, HUANG Ying^{1*}, WANG Hai-bin^{2*}

(¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(² Center of Technology, Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China)

(³ Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract : It is believed that genetic recombination of the endophytes with the hosts that occurred in evolutionary time could result in some endophytes producing certain phytochemical originally characteristic of the host. Based on this widely accepted hypothesis, there have been increasing research efforts focused on screening for novel natural products from endophytes. In this study, antimicrobial and antitumor activities of 165 actinomycetes isolated from medicinal plants collected from Xishuangbanna were tested by agar diffusion method and WST-8 assay respectively. The results showed that over 42% of the isolates exhibited antagonism against pathogenic strains, and 54.5% displayed excellent inhibition against mouse melanoma cell line B16 or/and human alveolar epithelial cell line A549. These results are superior to those of soil actinomycetes, indicating tremendous potential of endophytic of actinomycetes for exploration. Six compounds that had both antimicrobial and antitumor activities were separated and purified from isolate *Streptomyces* sp. D62 by resin adsorption, silica-gel column and sephadex chromatography, etc. On the basis of spectral analyses, they were identified as antimycin A_{4a}(**1**), antimycin A_{7a}(**2**), antimycin A_{2a}(**3**), antimycin A_{1a}(**4**), 10-hydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1 A-olide(**5**) and 6-(2-(4-aminophenyl)-2-oxoethyl)-3,5-dimethyl-tetrahydropyran-2-one(**6**), with the last one defined as a novel compound. Based on all these results, it is convinced that endophytic actinomycetes are a promising resource for bioactive natural product discovery.

Keywords : endophytic actinomycetes ; antimicrobial activity ; antitumor activity ; secondary metabolites ; novel compound

Foundation items : Technical Development Projects of Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd.

* Corresponding authors. Tel : 86-10-64807311 ; E-mail : huangy@im.ac.cn ; 86-576-8827806 ; E-mail : hbwang@hisunpharm.com

Other author : LUO Wen-jun²

Received : 2 July 2007 / Accepted : 5 July 2007 / Revised : 18 July 2007