

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54(5): 532–542; 4 May 2014  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.008

## 粘细菌 STXZ54 的分离鉴定及其抗肿瘤活性

唐少军, 肖蓉, 文也, 秦浩, 刘慰, 丁学知, 夏立秋\*

湖南师范大学生命科学学院, 微生物分子生物学国家重点实验室培育基地, 湖南长沙 410081

**摘要** 【目的】从广东省土样中分离并鉴定获得粘细菌, 以丰富资源微生物库, 并对其抗肿瘤活性的初步研究, 为寻找新的抗肿瘤药物及其开发应用奠定基础。【方法】用灭活大肠杆菌诱导法, 从广东土样中分离得到粘细菌, 通过菌落形态观察、扫描电镜、生理生化特征、以及 16s rRNA 基因序列同源性分析, 鉴定并归类细菌。测定不同生长时期代谢产物的抗肿瘤活性, 分离纯化次级代谢产物得到抗肿瘤活性组分, 测定抗肿瘤活性组分抗肿瘤谱及其对应的半致死浓度。利用激光共聚焦显微镜观察抗肿瘤活性组分作用 B16 后的亚细胞结构变化。【结果】分离并鉴定了粘细菌 STXZ54 新菌株, 命名为 *Myxococcus macrosporus* STXZ54, 该粘细菌产生的抗肿瘤活性代谢产物能够较好地抑制 B16、Hela、HCT-116、4T1、Hep-3B 等多种肿瘤细胞, 初步分离其代谢产物得到活性组分 SGF5。经 MTT 实验算出 SGF5 对 B16、Hela、Hep-3B、4T1 细胞的  $IC_{50}$  均在  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  左右, 对 HCT-116 细胞的  $IC_{50}$  是  $70 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。利用激光共聚焦显微镜观察到活性组分 SGF5 作用 B16 后亚细胞结构出现了明显的变化, 结合细胞坏死与凋亡的检测初步判断 SGF5 能引起 B16 细胞的凋亡。【结论】从土样中分离得到粘细菌 STXZ54, 对分离到的活性组分进行了细胞毒性试验, 证实其具有较好的抗肿瘤活性, 有开发成抗肿瘤药物的潜在价值。

**关键词:** 粘细菌, 分离鉴定, 抗肿瘤

中图分类号: Q939 文章编号: 0001-6209(2014)05-0532-11

粘细菌是一类好氧的化能异养型原核生物, 属于革兰阴性单细胞杆状细菌, 广泛的分布在土壤表层、树皮、腐烂的木材、动物的粪便上等<sup>[1]</sup>; 粘细菌具有复杂的多细胞群体性行为, 具体表现在细胞生长对细胞密度的依赖、细胞群体性运动、子实体的发育、以及细胞群体方式捕食等<sup>[2-4]</sup>; 粘细菌还具有独特的生活史: 营养生长的粘细菌在营养条件不足的情况下, 细胞发生聚集运动, 在聚集和早期的堆积过

程中, 大部分细胞发生程序性自溶, 存活的细胞则有规律地堆积排列成大型子实体, 进入休眠状态; 而当营养状况转为良好时, 粘孢子又可以重新萌发, 呈营养生长, 重新开始新一轮发育。在粘细菌的整个生活史上, 粘细菌的捕食、运动以及子实体的发育多是协同进行的<sup>[5-6]</sup>, 这为粘细菌的分类提供一定的依据, 如根据粘细菌的生活习性可以将粘细菌分为 2 个类

基金项目: 国家“973 项目”(2012CB722301); 国家“863 计划”(2011AA10A203); 国家自然科学基金(31070006); 湖南省高校科技成果产业化培育项目基金(10CY013)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-731-88872905; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

作者简介: 唐少军(1987-), 男, 湖南邵阳市人, 硕士研究生, 主要从事微生物菌种资源开发及微生物抗肿瘤方面的研究。E-mail: 403673751@qq.com

收稿日期: 2013-09-12; 修回日期: 2013-12-16

群: 溶纤维菌群和溶细菌菌群。而根据粘细菌的形态特征又可以将粘细菌系统分类为 23 个属约 50 个种<sup>[7-9]</sup>。

粘细菌可以产生丰富的次级代谢产物, 是继放线菌、芽孢杆菌之后的第三大类次级代谢产物产生菌<sup>[10-11]</sup>, 尤其是粘细菌能产生多种抗肿瘤活性极高的化合物, 而且这些化合物的抑瘤谱较广<sup>[12]</sup>, 如埃博霉素 (Epothilone) 通过促进微管蛋白聚合且抑制它的解聚, 来抑制细胞的有丝分裂, 进而导致肿瘤细胞的凋亡, 埃博霉素能够很好的抑制乳腺癌、前列腺癌和结肠癌等多种人类肿瘤细胞的生长, 现有多种埃博霉素及其衍生物已投入临床试验<sup>[13-14]</sup>; Disorazoles 是从纤维素堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 中分离得到的, 能很好的抑制肺癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌等多种癌细胞, 其  $IC_{50}$  均在纳摩尔级别<sup>[15]</sup>。还有很多其他活性高且结构新颖的抗肿瘤代谢产物被陆续的发现<sup>[16-18]</sup>。

粘细菌是一类重要的资源微生物, 其次级代谢产物是抗癌新药物的重要来源, 对其抗肿瘤活性物质的筛选及其抗肿瘤机制的研究逐步成为了热点。但粘细菌的研究大部分都集中在纤维素堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 和黄色粘球菌 (*Mycococcus xanthus*), 而对于大孢粘球菌 (*Mycococcus macrosporus*) 在抗肿瘤方面的研究还未有报道。本研究采用大肠杆菌诱导法, 从土样中分离鉴定得到粘细菌 *Mycococcus macrosporus* STXZ54, 并研究了其抗肿瘤活性, 为寻找新的抗肿瘤药物及其开发应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 土样: 通过多点取样法从广东省广州市郊区林地采集得到。

1.1.2 供试细胞株: 小鼠黑色素瘤细胞 B16 (murine melanoma B16 cells)、人宫颈癌细胞 Hela (human cervical cancer Hela cell)、肝癌细胞 Hep-3B (hepatoma carcinoma Hep-3B cell)、小鼠乳腺癌细胞 4T1 (murine mammary carcinoma cells)、人结肠癌细胞 HCT-116 (human colon cancer cell), 均购买于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)。

1.1.3 培养基: ① Wax 固体培养基:  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

1 g, HEPES 0.5 g, 琼脂 15 g, 水 1000 mL, pH7.2; ② Rich 液体培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 1 g, 葡萄糖 1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  1 g, HEPES 10 g, 水 1000 mL, pH6.8; ③ MD1 液体培养基: Casein Peptone 6 g, 可溶性淀粉 2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.4 g, 水 1000 mL, pH7.2; ④ LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 水 1000 mL。

### 1.2 菌株分离

土样经风干研磨后加入 3 mL 的已配制好并过滤除菌的抗生素混合液 (庆大霉素 30 mg/mL; 卡那霉素 8 mg/mL; 氨基青霉素 30 mg/mL), 再加入放线菌酮的 DMSO 溶液 1 mL (15 mg/mL), 55°C 水浴 10 min, 放置过夜。土样中粘细菌子实体诱导方法<sup>[19]</sup>: 将灭菌后的糊状大肠杆菌滴加在含有放线菌酮的 Wax 琼脂培养基上 (放线菌酮的终浓度为 20  $\mu$ g/mL), 加少许土样大肠杆菌滴旁边, 30°C 培养 5 d 开始观察。待到大肠杆菌有明显被蚀刻的痕迹且出现子实体时, 用无菌针头挑取子实体转接到新鲜的 Wax 培养基上, 反复多次转接后 (每次转接都可以用抗生素混合液洗涤子实体 1 min), 将纯化后的粘细菌转接到 Rich 液体培养基中, 30°C, 150 r/min, 培养 7 d, 取菌液与甘油混匀 (甘油的终浓度在 25%), -80°C 冷冻保藏。

### 1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态观察: 将分离得到的菌株接种到 Wax 培养基上的灭活大肠杆菌旁边, 30°C 培养箱倒置培养 7 d, 观察菌落形态, 并在体视显微镜下观察子实体的形态。同时将菌株接种到 MD1 液体培养基中, 30°C, 150 r/min, 培养 7 d 后取菌体进行革兰染色, 同时用扫描电镜观察细胞形态。

1.3.2 生理生化特征观察: 参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[20]</sup> 和 Lyudmila (2000)<sup>[21]</sup> 等方法进行。

1.3.3 16S rRNA 基因扩增、测序与构建系统发育树: 用基因组提取试剂盒提取 STXZ54 菌株的基因组, 以基因组为模板, 基因通用引物进行 PCR 扩增 16S rRNA, 引物 16S BF: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3', 16S BR: 5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3', 引物由英俊生物公司合成。扩增总体积 30  $\mu$ L, 94°C 4 min, 94°C 45 s, 52°C 45 s, 72°C 1.5 min, 28 个循环, 72°C 10 min。用北京百泰克生物技术有限公司多功能 DNA 纯化回收试剂盒对 PCR 产物进行

回收后,与 pMD18-T 载体连接,热转至 Top10 感受态细胞,挑取阳性转化子后提取质粒送上海英骏生物技术有限公司完成测序。从 EzTaxon-e 数据库中获取与分离菌株亲源关系较近的模式菌株 16S rRNA 基因,结合在 GenBank 中经 BLAST 获取到的菌株 16S rRNA 基因,运用 MEGA4.1,采用邻接法 (NJ) 构建系统发育树 (Replications = 1000, Bootstrap 值取百分比)。

#### 1.4 STXZ54 菌株在不同生长时期代谢产物的抗肿瘤活性

**1.4.1 STXZ54 生长曲线的测定:** 由于粘细菌生长的特殊性,在液体培养基中贴壁且成团块生长。不宜通过测吸光值法来测粘细菌的生长量,所以本研究采用称重法:从平板上挑取少量菌体到装有 MD1 液体培养基的 EP 管中,振荡培养 4 d 后将其转接到 50 mL 摇瓶中,摇床培养 3 d 后按 5% 的体积比列分别转接到 30 个摇瓶中,每隔 8 h 取出一瓶出来,离心弃收集菌体,上清备用,菌体冷冻干燥机中去除表面水分,称重,记录重量。

**1.4.2 STXZ54 不同生长时期抗肿瘤活性的测定:** 取各时期的培养上清液各 1 mL,过滤后 13500 × g 离心 30 min,各取上清 10 μL 作为样品,在 96 孔板中接种 B16 细胞,每孔  $1 \times 10^3$  cells/95 μL,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,37°C 培养 12 h,分别加入 5 μL 各时期的样品,加入 MD1 液体培养基 5 μL 作为对照,每个样品和对照做 4 个重复。培养 24 h 后,观察细胞形态变化,用北京索莱宝科技有限公司 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测各样品对 B16 细胞的抑制率。

#### 1.5 抗肿瘤活性物质的初步研究

**1.5.1 STXZ54 抗肿瘤活性组分的分离:** 将菌种接种到 50 mL 的 Rich 液体培养基中培养 5 d 后,将培养基中的菌体用移液枪打散,按 10% 体积的比例接种到含 600 mL MD1 发酵液体培养基的 2 L 摇瓶中,30°C,150 r/min,发酵 7 d 后,加入 XAD-46 树脂,过夜吸附,取出树脂,用 10 倍树脂体积的水冲洗树脂,再用 10 倍树脂体积的甲醇与水 (甲醇:水 = 1:1) 解吸附树脂 12 h,将解吸附后上清冷冻干燥后得到粗提物。再将粗提物经过 sephadex LH-20 葡聚糖凝胶层析柱 (甲醇:水 = 1:10)、硅胶柱层析 (甲醇:水 = 10:1,5:1,1:1,1:5,1:10)、C18 反相柱层析 (甲醇:水 = 1:10,1:5,1:1,5:1,10:1) 后得到抗肿瘤活性组

分。将得到的抗肿瘤活性组分在安捷伦 1290 超高效液相色谱上检测纯度 (程序见表 1),上样量 5 μL,检测波长 240 nm。

表 1. 抗肿瘤活性组分 UHPLC (超高效液相色谱) 梯度洗脱程序

Table 1. UHPLC gradient elution procedure of the antitumor active component

t/min	c(H <sub>2</sub> O) /%	c(methanol) /%
0	98	2
3	50	50
6	2	98
7	98	2

**1.5.2 活性组分 SGF5 抗肿瘤谱的测定:** 将制备的活性组分稀释成不同浓度梯度,在 96 孔板上接种 B16、Hela、4T1、HCT-116、Hep-3B 细胞,每孔  $1 \times 10^3$  cells/95 μL,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,37°C 培养 12 h,加入不同浓度梯度的稀释样品,对照组加入 5 μL 的 MD1 液体培养基,调零组只加细胞培养基不加细胞和样品,通过 MTT 实验计算细胞抑制率:细胞抑制率 = (实验组 - 对照组) / (调零组 - 对照组),再用 SPSS 软件计算出 SGF5 对各肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub>。

**1.5.3 活性组分 SGF5 对 B16 细胞坏死与凋亡的检测:** 在 96 孔板中接种 B16 细胞,每孔  $1 \times 10^3$  cells/95 μL,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,37°C 培养 12 h,加入 10 μg/mL 的活性组分样品 SGF5,对照组加入水,37°C 培养 24 h。离心收集细胞到 1.5 mL 新的 EP 管中,用 800 μL 染色缓冲液重悬细胞,先后加入 Hoechst、PI 染色液各 5 μL,混匀后放在 4 度冰箱里孵育 30 min,再离心去上清,PBS 洗 1 次后,将细胞涂到盖玻片上,加 20 μL 抗荧光淬灭剂后,用激光共聚焦观察。

**1.5.4 激光共聚焦观察活性组分 SGF5 对 B16 亚细胞结构的影响:** 在 30 mm 细胞培养小皿里先加入 1 mL 新鲜培养基,将无水乙醇泡过的盖玻片吹干之后小心的加入小皿中,再将 B16 细胞小心的滴加在盖玻片的中间,每个培养皿中加入的细胞量大约为 1 万个细胞,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,37°C 培养 24 h,当有足够量的细胞在盖玻片上贴壁生长后,加入活性组分 SGF5 10 μg/mL、20 μg/mL,对照组加入无菌水,37°C 培养 24 h。对细胞进行染色 (整个过程避光操作):吸去培养基,再用 1 mL PBS 浸泡 2 次,每次 5 min;在盖玻片中间滴加 50 μL 0.1 μmol/L 的

Mitotrack 染色 20 min, 吸去染色液; 1 mL PBS 浸泡 2 次, 每次 5 min; 吸去 PBS, 1 mL 4% 甲醛固定 10 min; 吸去甲醛, 用 1 mL PBS 浸泡 2 次, 每次 10 min; 加入 50  $\mu$ L 的 0.5  $\mu$ g/mL 的 DAPI, 染色 20 min; 吸去 DAPI, 用 1 mL PBS 浸泡 2 次, 每次 5 min; 加入 1 mL 0.5% Triton-100, 透化处理 10 min, 吸去 Triton, 用 1 mL PBS 浸泡 3 次, 每次 5 min; 加入 1 mL 2% BSA, 封闭 30 min; 吸去 BSA, 用 1 mL PBS 浸泡 2 次, 每次 5 min; 在干净载玻片上滴加 20  $\mu$ L 0.5  $\mu$ g/mL 的 Tubulin, 将盖玻片倒扣在上面, 染色 1 h; 将盖玻片浸入到 PBS 使盖玻片自然脱落, 再将盖玻片放回小皿中, 用 1 mL PBS 浸泡 4 次, 每次 5 min; 在干净的载玻片中央滴加抗荧光淬灭剂, 将盖玻片倒扣在上面。然后用激光共聚焦观察染色好的细胞。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株鉴定

**2.1.1 形态特征:** 从土样中分离得到粘细菌, 革兰氏染色呈阴性, 从图 1 可以看出, 扫描电镜显示细胞大小约为 4  $\mu$ m  $\times$  0.6  $\mu$ m, 细胞呈细长杆状且能弯曲, 无鞭毛, 在 Wax 培养基中表现出运动性, 能蚀刻 Wax 上的灭活的大肠杆菌, 表明能以灭活的大肠杆菌作为营养物质。在固体培养基中, 菌落表现为暗红色, 形成子实体时菌落逐渐变黄色, 在体视显微镜下能观察到明显的子实体, 在液体培养基中表现为粉红色且培养基较澄清, 菌落成团且能贴壁生长。

**2.1.2 生理生化特征:** 生理生化实验结果如表 2 所示, 符合珊瑚球菌属的生理生化特征, 在甲基红试验和 V. P. 试验中均呈阴性, 刚果红和吲哚实验呈阳性, 具有氧化酶、过氧化氢酶活性, 能还原硝酸盐, 水解淀粉和明胶, 不水解纤维素, 在 4 $^{\circ}$ C 低温和 40 $^{\circ}$ C 时均不能生长, 不能利用葡萄糖、乳糖和蔗糖产酸产气。

**2.1.3 系统发育树的构建:** 分离得到菌株 STXZ54 的 16S rRNA 基因序列长度为 1501bp, 在 NCBI 上经过 BLAST 分析, 结果表明该菌株属于珊瑚球菌属 (*Coralloccoccus*), 与大孢粘球菌 (*Myxococcus macrosporus* Ccm7) 具有最高相似性, 序列相似性为 99%。利用 MEGA4.1 的 Kimura-2-Parameter 模型, 运用邻接 (NJ) 构建系统发育树如图 2 所示。与 *Myxococcus macrosporus* Cc m7 距离最近, 但 STXZ54 在系统进化树上与各亚种分开形成新的分支, 不和

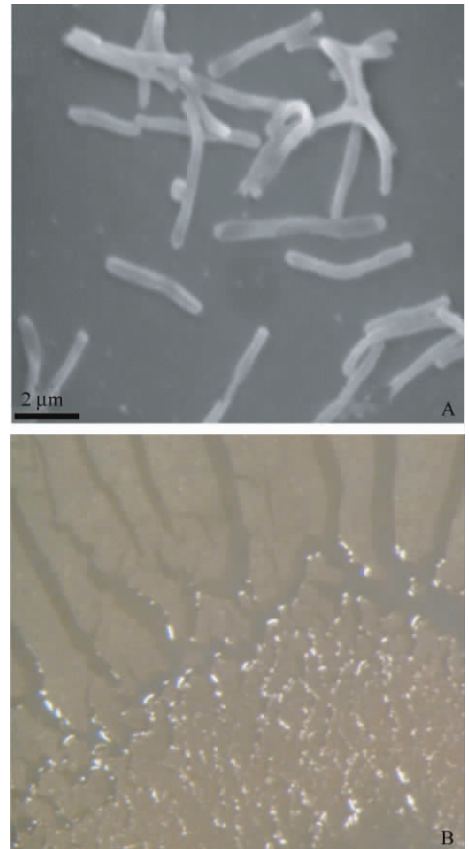


图 1. STXZ54 菌株的形态特征

Figure 1. The morphological characteristics of strain STXZ54. A: Cell morphology observed by scan electron microscope (SEM) ( $\times 8000$ ). B: Fruiting body of strain STXZ54 observed by stereo microscope ( $\times 300$ ).

表 2. STXZ54 菌株的生理生化特征

Table 2. physiological and biochemical characteristics of strain STXZ54

characteristic	S54	characteristic	S54
cell length ( $\mu$ m)	4.00 - 4.50	congo red test	+
width ( $\mu$ m)	0.60 - 0.75	methyl red test	-
growth at/with		voges-proskauer test	-
4 $^{\circ}$ C	-	nitrate reduction	+
40 $^{\circ}$ C	-	tween 80	+
hydrolysis of		acid produced from	
starch	+	glucose	-
gelatin	+	lactose	-
cellulose	+	sucrose	-
aesculin	+	production of	
activity of		indole	+
catalase	+	H <sub>2</sub> S	-
oxidase	+		

+: positive reaction; -: negative reaction.

*Myxococcus macrosporus* Cc m7 属于同一亚种, 结合菌株的形态、16SrDNA 序列分析以及生理生化结果,

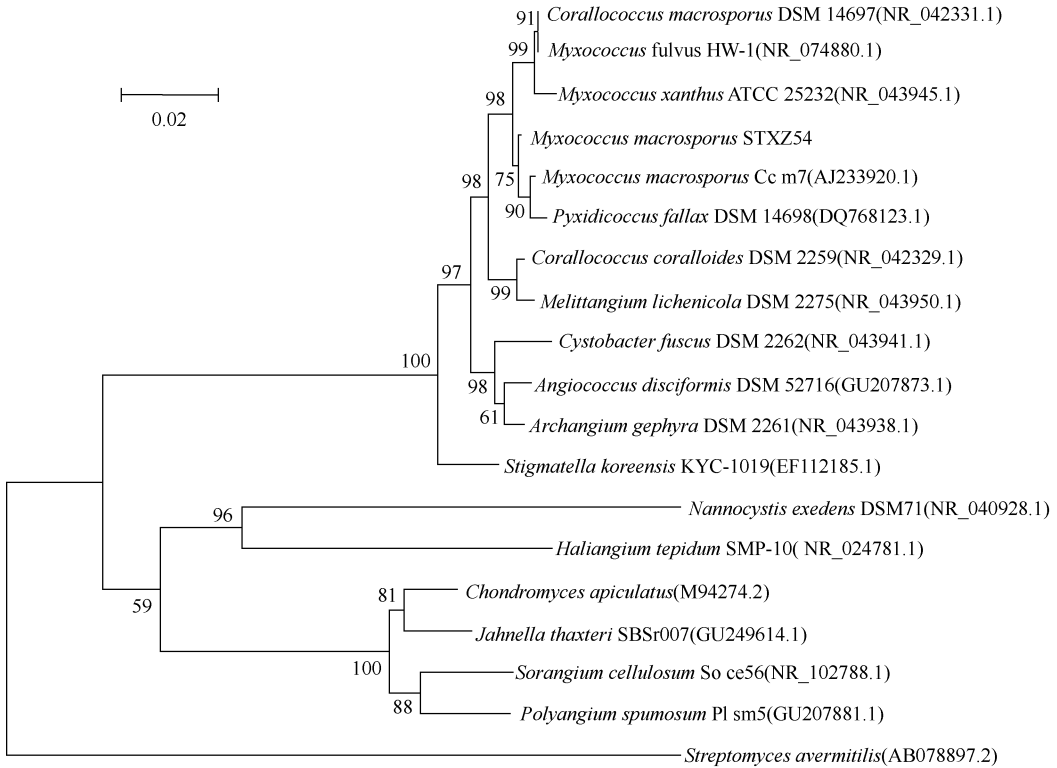


图 2. 根据 16s rRNA 基因序列构建系统发育进化树

Figure 2. The Phylogenetic tree based on 16s rRNA gene sequences. The numbers on branches indicate bootstrap values. The tree rooted was constructed by Kimura-2-Parameter model and N-J method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicate the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets followed each bacterial name are 16s rRNA sequence accession numbers in GenBank.

将 STXZ54 菌株命名为 *Myxococcus macrosporus*STXZ54, 该菌株 16S rRNA 基因序列在 GenBank 上获得的登录号为: KF482866。

## 2.2 STXZ54 菌株在不同生长时期代谢产物的抗肿瘤活性

利用称重法测定粘细菌的生长曲线, 用 MTT 实验来测定各生长时期的抗肿瘤活性, 了解 STXZ54 菌株在不同生长时期的代谢产物抗肿瘤活性的变化。该粘细菌在接种后便迅速调整进入对数生长期, 75 h 菌体重量达到最大, 进入平稳期, 但平稳期的时间不长, 一共不到 20 h, 在 90 h 的时候开始进入衰亡期, 菌体总重量逐渐减轻 (图 3-A)。有趣的是粘细菌在培养第 75 h 的上清液就出现了较明显的抗肿瘤活性, 在第 85 h 的时候效果达到了最佳 (图 3-B), 显微镜观察 B16 肿瘤细胞几乎全部死亡, MTT 实验数据显示死亡率达到到了 90.3%, 此后 B16 肿瘤细胞的死亡率没有明显的差别。

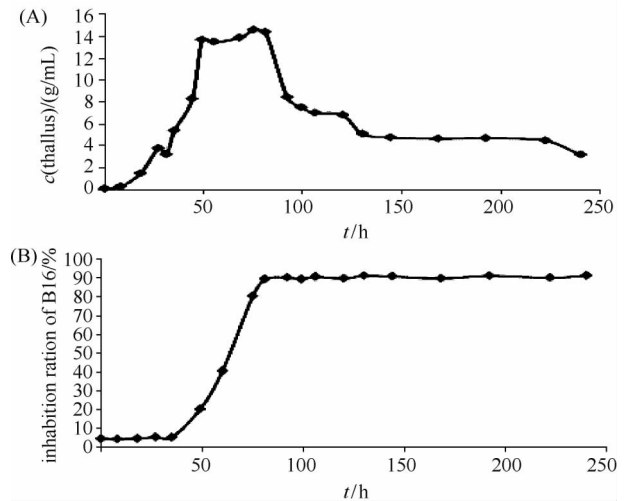


图 3. STXZ54 菌株在不同生长时期代谢产物的抗肿瘤活性

Figure 3. Growth curve and corresponding antitumor activity of strain STXZ54. A: Growth curve of strain STXZ54. B: Corresponding antitumor activity of metabolites from different growth periods of strain STXZ54.

## 2.3 抗肿瘤活性物质的初步研究

**2.3.1 STXZ54 菌株抗肿瘤活性组分的分离:** 首先对 STXZ54 次级代谢产物进行分离, 得到主要抗肿瘤活性物质。用 XAD-16 树脂粗提后得到 6.5 g 抗肿瘤活性粗提物, 将其用 3 mL 的无菌水复溶后分别用葡聚糖凝胶柱层析、硅胶柱层析、C18 反向柱层析后得到抗肿瘤活性组分 SGF5 共 40 mg。将活性组分用 200  $\mu$ L 的水复溶后, 用安捷伦 1290 高效液相色谱检测纯度(图 4), 得到了比较纯净的峰, 该目的峰的保留时间在 4.3 min。

**2.3.2 活性组分 SGF5 抗肿瘤谱的测定:** 将活性组分 SGF5 分别作用 B16、Hela、4T1、HCT-116、Hep-3B 肿瘤细胞, 作用 12 h 后, 结果如图 5 和对照组比较, 细胞状态出现了明显的变化, 对照组细胞紧贴壁培养皿, 对照组 B16 细胞呈梭状, Hela 细胞多边形, HCT-116 细胞呈菱形, 所有细胞都呈现很完整的伸展状态, 而实验组所有的细胞都成球形, 且贴壁不紧密并伴有凝结成团的现象。用 MTT 法测得 SGF5 对 B16、Hela、Hep-3B、4T1 细胞作用 24 h 的  $IC_{50}$  均在 10  $\mu$ g/mL 左右, 而对 HCT-116 细胞的  $IC_{50}$  是 70  $\mu$ g/mL, 对这 5 种肿瘤细胞均表现出较高抗肿瘤活性。

**2.3.3 活性组分 SGF5 对 B16 肿瘤细胞坏死与凋亡的快速检测:** 用 Hoechst 和碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 对 SGF5 处理的 B16 肿瘤细胞以及阴性对照细胞进行双染后用激光共聚焦显微镜观察, Hoechst 与 PI 的双标记染色中, Hoechst 可被活细胞摄取, 与 DNA 结合后经紫外激发下呈现蓝色荧光; PI 也是一种核酸染料, 它不能透过活细胞完整的细胞膜, 但在凋亡中晚期的细胞和死细胞, PI 能够透过其损伤的胞膜而使细胞核红染。因此, 根据红蓝两种荧光可分辨出 3 种细胞: 正常活细胞主要与

Hoechst 结合, 呈现微弱的蓝色荧光; 凋亡细胞的膜通透性改变, 主要摄取 Hoechst 染料, 而呈现强蓝色荧光和弱红色荧光; 坏死细胞由于细胞膜的完整性丧失, 有很强的 PI 嗜染性, 并可覆盖 Hoechst33258 染色, 而呈弱蓝色和强红色荧光。图 6 结果表明, 对照组中只看到 Hoechst 将细胞核染成微弱的蓝色, 并没有看到红色的荧光, 而在加了 10  $\mu$ g/mL 的活性组分 SGF5 的实验组中, 看到了较强的蓝色荧光和微弱的红色荧光。由此可以初步判断 SGF5 能引起 B16 肿瘤细胞凋亡。

**2.3.4 激光共聚焦显微镜观察活性组分 SGF5 作用 B16 肿瘤细胞后亚细胞结构的变化:** 加入样品作用 B16 细胞 24 h 后, 对细胞进行荧光染色, 染料 DAPI 与核酸结合, 呈蓝色荧光; 荧光抗体 Tubulin 标记微管蛋白, 呈绿色荧光; Mitotracker 标记线粒体, 呈红色荧光。经激光共聚焦观察小鼠黑色素瘤细胞 B16(图 7): 阴性对照组中, 肿瘤细胞荧光着色均匀, 细胞核形态较规则, 呈圆形或卵圆形, 整个细胞呈伸展状态, 微管均匀分布在细胞表面, 使细胞呈典型的梭型; 而加了 10  $\mu$ g/mL 的 SGF5 实验组中, 细胞核变得不规则, 染色质出现了凝聚, 甚至出现了泡状结构, 出现了典型的细胞凋亡的特征, 而且微管向细胞核靠拢且数目明显减少, 使细胞呈现球形, 被 Mitotracker 染成红色的线粒体的荧光强度明显减弱, 且形态变得不规则, 此荧光强度与线粒体膜电位是成正相关的, 推测可能线粒体膜电位降低, 这也是细胞凋亡的一项重要指标。加了 20  $\mu$ g/mL 的 SGF5 实验组, 细胞核皱缩裂解而变小, 微管蛋白大量降解, 且依附在微管上的线粒体数量也明显减少, 这是肿瘤细胞凋亡晚期的重要特征。

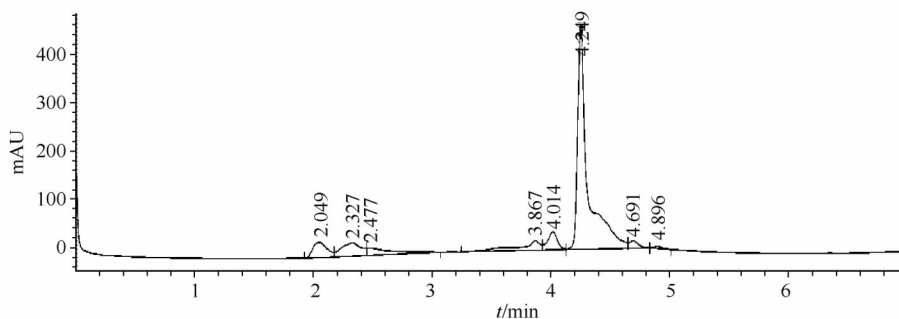


图 4. 超高效液相色谱检测活性组分的纯度

Figure 4. The purity of the active component was detected by high performance liquid chromatography.

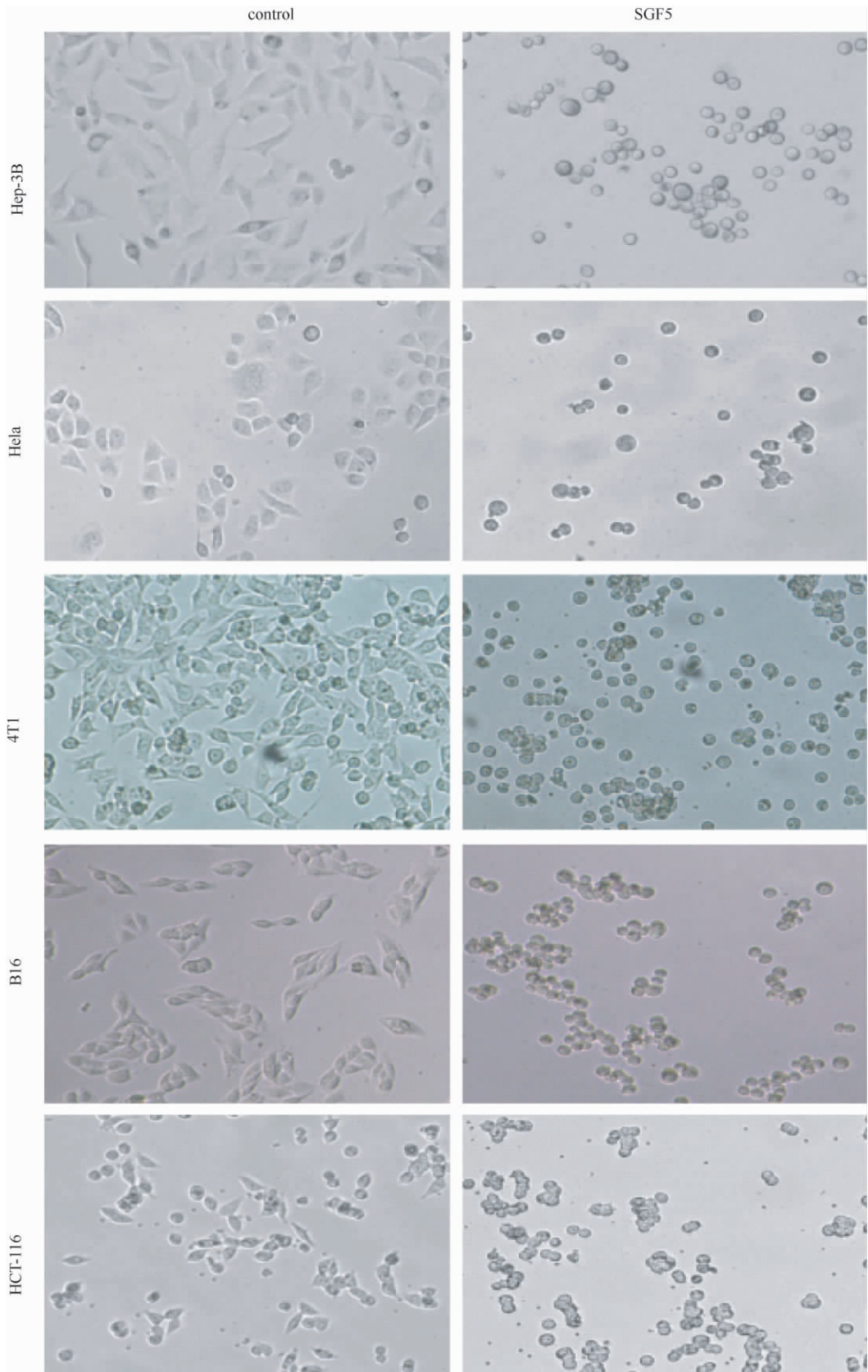


图 5. STXZ54 菌株的代谢活性产物抑制多种肿瘤细胞

Figure 5. The active metabolite of strain STXZ54 inhibited various tumor cells. all kinds of cells were cultivated in the 96 well plates without( control) and with SGF5.

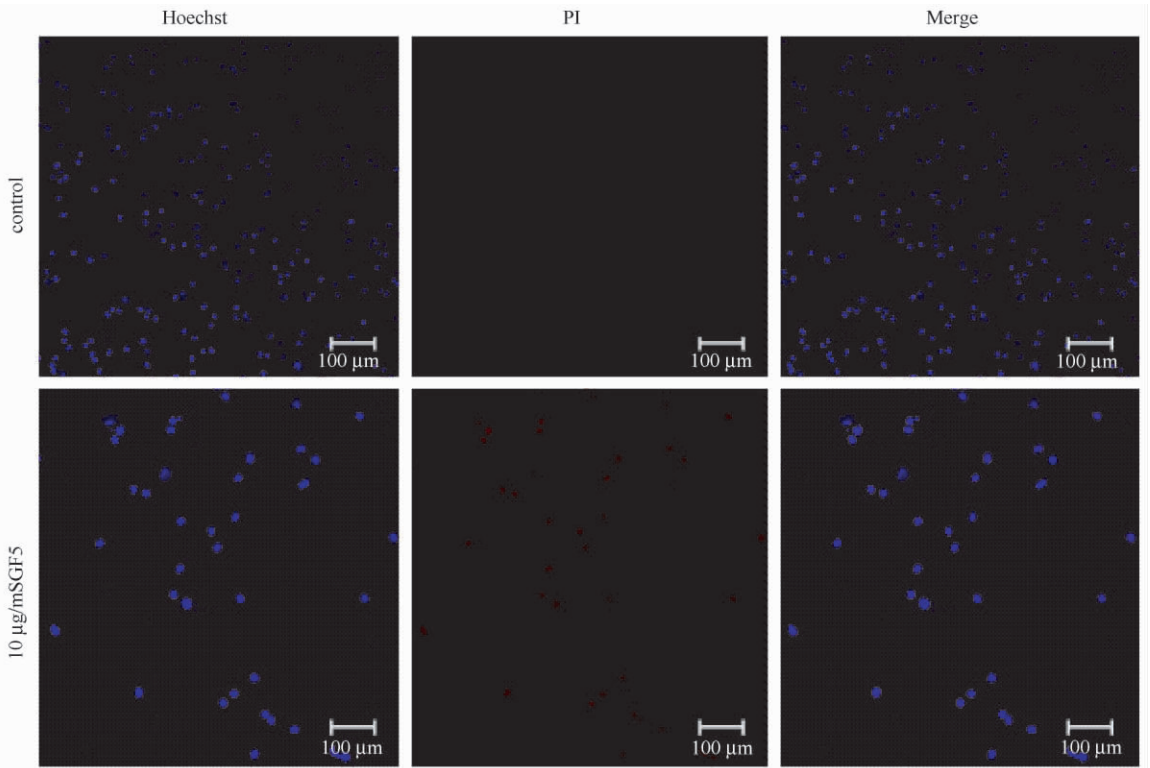


图 6. Hoechst/PI 双染检测 B16 细胞的凋亡

Figure 6. The morphological changes associated with apoptosis of B16 cells were observed by Hoechst /PI double-staining. Cells prepared in 6-well plates were treated without ( control) and SGF5 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h. High blue fluorescent indicates apoptotic cells , low blue indicates live cells. Representative images from two independent experiments were shown.

### 3 讨论

粘细菌因为难分离难纯化而一直影响着粘细菌的研究进展,近年来,蒋明德等<sup>[22]</sup>利用分子生态学技术来分析海底粘细菌的多样性;李越中等<sup>[23]</sup>通过非培养方法在不同生境,发现粘细菌巨大的多样性,但由于这些方法的适用范围较窄,粘细菌的分离纯化主要还是用传统的子实体诱导法。粘细菌在营养丰富的培养基上不能生长,在营养贫瘠的培养基上,能捕食大肠杆菌等细菌,这可能是由于粘细菌产生的代谢产物如裂解酶等裂解其他的微生物,再以裂解了的细菌作为营养物质<sup>[24]</sup>。粘细菌不仅能捕食革兰氏阴性菌也能捕食革兰氏阳性菌,而且其更易捕食革兰氏阴性菌<sup>[25]</sup>。因此,本研究利用了大肠杆菌子实体诱导法,从广东土样中分离到了粘细菌菌株 STXZ54,发现该菌株与 *Myxococcus macrosporus* Ccm7 具有最高相似性,与 *Myxococcus macrosporus* Ccm7 在进化树上属于同一聚类,但形成了新的分

支,推测不属于同一个亚种。*Myxococcus macrosporus* 属于粘球菌目,是珊瑚球菌属的一个种,*Myxococcus macrosporus* 常见于腐烂的树叶,也存在于动物粪便中,但从土壤中分离到还比较少见<sup>[26]</sup>。

本研究对粘细菌 STXZ54 菌株的抗肿瘤活性进行了研究,发现分离到的活性组分对 B16、Hela、Hep-3B、4T1 细胞的  $\text{IC}_{50}$  均在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右,而对 HCT-116 细胞的  $\text{IC}_{50}$  是 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  具有广谱的高效的抗肿瘤活性。近几年从粘细菌代谢物中筛到如此广谱高效的抗肿瘤活性物质并不多见,2012 年 Rolf 等从 *Aetherobacter* 中发现了新物质 *Aetheramides*<sup>[27]</sup>,能很好的抑制 HCT-116 细胞,但抗肿瘤谱相比 STXZ54 菌株较小。Tao. W 等人从纤维素堆囊菌 (*sorangium cellulosum* WXNJ-C) 分离得到一类大环类脂类化合物 phoxalone<sup>[28]</sup>,该物质对黑色素瘤细胞 B16、肝癌细胞 Bel7402、肺癌细胞 H446、人乳腺癌细胞 MCF 均有较好的抑制效果。但 STXZ54 与大部分粘细菌需较长的发酵时间不同(10 天) STXZ54 菌株只需发酵 3 天就能出现较高的抗肿瘤活性。Lang 等<sup>[29]</sup>对



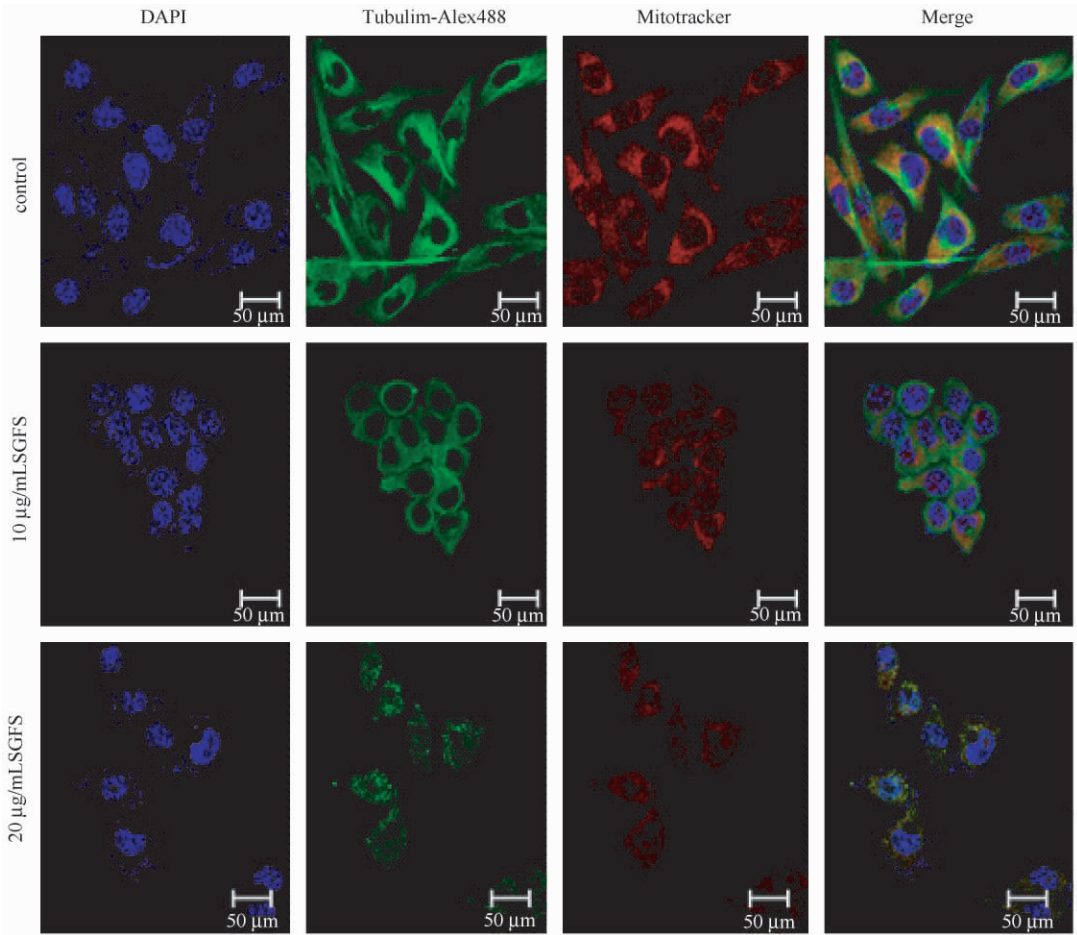


图 7. 药物作用 B16 细胞后细胞形态的变化

Figure 7. Morphological alterations in B16 cells treated with SGF5 were observed by CLSM (400 ×). The cells were grown on glass coverslips (22 × 22 mm) placed into 6-well plates without (control) and with 10 µg/mL or 20 µg/mL SGF5 for 24 h. DNA: blue; microtubules: green; plastosome: red; Merge: stack-up fluorescence image of DNA, microtubules and plastosome. Representative images from three independent experiments were shown.

*Myxococcus macrosporus* 在分类学地位上进行了研究, 但对于其抗肿瘤方面的研究还未见有报道。因此, STXZ54 菌株在药物开发方面具有重要的应用价值。

活性组分 SGF5 能够引起 B16 亚细胞结构出现明显变化, 且高浓度的药物能引起细胞结构出现坍塌, 这可能是细胞凋亡晚期的结果, 结合细胞凋亡与坏死的快速检测, 提供了我们初步判断细胞凋亡形象的直观依据, 也为接下来药物抗肿瘤机制的研究提供了思路。本文初步研究了 *Myxococcus macrosporus* STXZ54 的抗肿瘤活性, 对其活性物质的结构解析及其抗肿瘤机制的研究是今后的工作重点。

## 参考文献

[ 1 ] Brenner D, Krieg N, Staley J. The Proteobacteria ( Part

C ): the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria. Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2005: 1059-1144.

[ 2 ] Shimkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H. The myxobacteria // Dworkin M. *The Prokaryotes*. 3<sup>rd</sup> eds. Berlin: Springer, 2006: 31-115.

[ 3 ] Nan B, Zusman DR. Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 21.

[ 4 ] Volz C, Kegler C, Müller R. Enhancer binding proteins act as Hetero-oligomers and link secondary metabolite production to myxococcal development, motility and predation. *Chemistry & Biology*, 2012, 19( 11 ): 1447-1459.

[ 5 ] Zusman DR, Scott AE, Yang Z, Kirby JR. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus*

- xanthus*. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(11): 862-872.
- [6] Müller FD, Schink CW, Hoiczky E, Cserti E, Higgs PI. Spore formation in *Myxococcus xanthus* is tied to cytoskeleton functions and polysaccharide spore coat deposition. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(3): 486-505.
- [7] Spröer C, Reichenbach H, Stackebrandt E. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(3): 1255-1262.
- [8] Iizuka T, Jojima Y, Hayakawa A, Fujii T, Yamanaka S, Fudou R. *Pseudenhymyxa salsuginis* gen. nov., sp. nov., a myxobacterium isolated from an estuarine marsh. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt 4): 1360-1369.
- [9] Garcia RO, Reichenbach H, Ring MW, Müller R. *Phaselicystis flava* gen. nov., sp. nov., an arachidonic acid-containing soil myxobacterium, and the description of *Phaselicystidaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(6): 1524-1530.
- [10] Herrmann J, Elnakady YA, Wiedmann RM, Ullrich A, Rohde M, Kazmaier U, Vollmar AM, Müller R. Pretubulysin: from hypothetical biosynthetic intermediate to potential lead in tumor therapy. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37416.
- [11] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 403-427.
- [12] Steinmetz H, Mohr KI, Zander W, Jansen R, Gerth K, Müller R. Indiacens A and B: Prenyl Indoles from the Myxobacterium *Sandaracinus amyolyticus*. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(10): 1803-1805.
- [13] Hammer S, Sommer A, Fichtner I, Becker M, Rolff J, Merk J, Klar U, Hoffmann J. Comparative profiling of the novel epothilone, sagopilone, in xenografts derived from primary non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16(5): 1452-1465.
- [14] Whitehead RP, McCoy S, Rivkin SE, Gross HM, Conrad ME, Doolittle GC, Wolff RA, Goodwin JW, Dakhil SR, Abbruzzese JL. A Phase II trial of epothilone B analogue BMS-247550 (NSC # 710428) ixabepilone, in patients with advanced pancreas cancer: a Southwest Oncology Group study. *Investigational New Drugs*, 2006, 24(6): 515-520.
- [15] Schäckel R, Hinkelmann B, Sasse F, Kalesse M. The synthesis of novel disorazoles. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(9): 1619-1622.
- [16] Irschik H, Washausen P, Sasse F, Fohrer J, Huch V, Müller R, Prusov EV. Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of Maltepolides: Remarkable Macrolides from Myxobacteria. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(40): 5402-5405.
- [17] Wiebke Z, Klaus G, Kathrin IM, Wolfgang K, Rolf J, and Müller R. Roimatacene: An Antibiotic against Gram-Negative Bacteria Isolated from *Cystobacter ferrugineus* Cb G35 (Myxobacteria). *Chemistry European Journal*, 2011, 17(10): 7875-7881.
- [18] Lee C, An D, Lee H, Cho K. Correlation between *Sorangium cellulosum* subgroups and their potential for secondary metabolite production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(3): 297-303.
- [19] Chang N, Ou Y, Xu Q, Qian X, Zheng Z, Huan Y. Isolation, identification of Myxobacteria and activity assay. *Journal of Xiamen University*, 2012, 51(1): 112-116. (in chinese)  
常宁宁, 欧一新, 徐庆妍, 钱晓鸣, 郑忠辉, 黄耀坚. 粘细菌的分离鉴定及活性检测. 厦门大学学报(自然科学版) 2012, 51(1): 112-116.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 320-418.
- [21] Evtushenko LI, Taran VV, Akimov VN, Kroppenstedt RM, Tiedje JM, Stackebrandt E. *Nocardiopsis tropica* sp. nov., *Nocardiopsis trehalosi* sp. nov., nom. rev. and *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *albirubida* subsp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(1): 73-81.
- [22] Jiang M, Zhou X, Tian X, Wu Z, Li Y. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA and HSP60 gene sequences of the morphology-based taxa of myxobacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(6): 711-716. (in Chinese)  
蒋德明, 周秀文, 田晓翔, 吴志红, 李越中. 基于 16SrRNA 和 HSP60 基因序列分析粘细菌孢囊杆菌亚目形态分类的种属之间的亲缘关系. 微生物学报, 2008, 48(6): 711-716.
- [23] Li SG, Zhou XW, Li PF, Han K, Li W, Li ZF, Wu ZH, Li YZ. The existence and diversity of myxobacteria in lake mud—a previously unexplored myxobacteria habitat. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(6): 587-595.

- [24] Xiao Y , Wei X , Ebright R , Wall D. Antibiotic production by myxobacteria plays a role in predation. *Journal of Bacteriology* 2011 ,193( 18) : 4626–4633.
- [25] Ronald G , Klaus G , Marc S , Irineo J , Dogma J , Rolf M. Expanded phylogeny of myxobacteria and evidence for cultivation of the unculturable. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2010 57( 2) : 878–887.
- [26] Brenner D , Krieg N , Staley J. The Myxococcales In: the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria. *Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* , 2005: 1059–1144.
- [27] Plaza A , Garcia R , Bifulco G , Martinez JP , Hüttel S , Sasse F , Meyerhans A , Stadler M , Müller R. Aetheramides A and B , potent HIV-inhibitory depsipeptides from a *Myxobacterium* of the new genus “Aetherobacter”. *Organic Letters* ,2012 ,14( 11) : 2854–2857.
- [28] Guo WJ , Tao WY. Phoxalone , a novel macrolide from *Sorangium cellulosum*: structure identification and its anti-tumor bioactivity *in vitro*. *Biotechnology Letters* ,2008 ,30 ( 2) : 349–356.
- [29] Lang E , Stackebrandt E. Emended descriptions of the genera *Myxococcus* and *Corallococcus* , typification of the species *Myxococcus stipitatus* and *Myxococcus macrosporus* and a proposal that they be represented by neotype strains , Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,2009 ,59( 8) : 2122–2128.

## Isolation and identification of *Myxobacteria* strain STXZ54 with antitumor activities

Shaojun Tang , Rong Xiao , Ye Wen , Hao Qin , Wei Liu , Xuezhi Ding , Liqiu Xia\*

State Key Laboratory Breeding Base of Microbial Molecular Biology , College of Life Science , Hunan Normal University , Changsha 410081 , Hunan Province , China

**Abstract** [Objective] We isolated *Myxobacteria* strains from soil samples collected from Guangzhou , identified the strain and studied the antitumor activity. [Methods] We isolated *Myxobacteria* strains from soil samples through inactivated *E. coli* inducing method , identified the strain according to morphological observation , physiological and biochemical characteristics , and the homologous analysis of 16S rRNA sequences of nucleotides. The antitumor spectrum and the corresponding IC<sub>50</sub> of the active component separated from the culture was analyzed. Confocal laser scanning microscope was used to examine the growth inhibitory effect of the active component on B16 cells. [Results] We isolated a *Myxobacteria* strain and identified as *Myxococcus macrosporus* STXZ54. The active component termed SGF5 showed cytostatic activity against B16 , HeLa , 4T1 , Hep-3B with IC<sub>50</sub> values of 10 μg/mL , and HCT-116 cell with IC<sub>50</sub> values of 70 μg/mL. Subcellular structure of B16 cells were abnormal observed by confocal laser scanning microscope. Combining the apoptosis and necrosis assay result it is likely that SGF5 can induce apoptosis of B16 cells. [Conclusion] The active component separated from the culture of *Myxococcus macrosporus* STXZ54 has a significant antitumor activity tested by cytotoxicity assay , which was worth exploiting as potential antitumor drugs.

**Keywords:** myxobacteria , isolation , antitumor

( 本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development( 2012CB722301) , by the National Programs for High Technology Research and Development of China ( 2011AA10A203) , by the National Natural Science Foundation of China ( 31070006) and by the Science and Technology Achievements Breeding Program of Hunan Province University ( 10CY013)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-88872905; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

Received: 12 September 2013 / Revised: 16 December 2013