

文章编号:1673-1689(2010)01-0104-06

粘细菌 *Stigmatella* WXNJ-B 产生 抗肿瘤物质的研究

王大红, 陶文沂*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用 MTT 法研究了粘细菌 *Stigmatella* WXNJ-B 代谢产物对 Hep G2 肿瘤细胞的抑制作用, 考察了一些理化因素对代谢产物稳定性的影响并定性分析了代谢产物。结果表明, *Stigmatella* WXNJ-B 菌株产生的活性物质能抑制肿瘤细胞的生长, 抗肿瘤活性物质产生的最佳发酵时间为 7 d。大孔树脂 HPD100、XAD16 和 DA201 对活性物质的吸附效果较好, 该活性物质在 12 h 的自然光和紫外光照射下、在温度不高于 70 °C 和 pH 3~10 之间稳定性好, 代谢产物中含有内酯类、苷类和甾体类物质。

关键词: 粘细菌 WXNJ-B; 抗肿瘤活性; 稳定性; 定性分析

中图分类号: Q 819

文献标识码: A

Production of Antitumor Substances from *S. tigmatella* WXNJ-B

WANG Da-hong, TAO Wen-yi*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, the antitumor effect of the metabolites from *Stigmatella* WXNJ-B was analyzing by Hep G2 cell using MTT method. Furthermore, the stability of the metabolites under different physical and chemical environment was examined and the qualitative characteristics of the metabolites were analysis. The results showed that the antitumor bioactive metabolites efficient inhibited the growth of Hep G2 cell. The optimum fermentation time of antitumor substance was 7 days. HPD100, XAD16 and DA201 resin were efficient to adsorb the bioactive metabolites. The antitumor bioactivity on Hep G2 cell line did not obviously change when the temperature was lower 70 °C, pH was in the range from 3 to 10 and the metabolites were treated with daylight and ultraviolet light during 12 h. It was detected that lactones, glycosides and steroids components existed in the metabolites.

Key words: *Stigmatella* WXNJ-B, antitumor bioactive metabolites, stability, qualitative analysis

收稿日期: 2009-05-06

基金项目: 国家 863 计划项目 (2007AA021501)。

作者简介: 王大红 (1980 -), 男, 河南固始人, 发酵工程专业博士研究生。

*通讯作者: 陶文沂 (1946 -), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事发酵工程与生物制药方面的研究。Email: wytiao1946@163.com

粘细菌是最高等的原核生物类群,具有复杂的多细胞行为和形态发生,在细胞分化、发育和生物进化研究中占有重要地位,如 *Mycococcus* 是原核生物社会学行为研究的著名模式菌^[1]。近年来,粘细菌作为一类可产生丰富次级代谢物的微生物类群日趋受到重视^[2-3]。目前从粘细菌中已发现大约400多种生物活性物质,约占微生物来源总数的3.5%,仅在放线菌和芽孢杆菌之后,研究工作已涉及分子生物学、发育生物学、生物技术及生物活性物质等多个领域^[4]。粘细菌产生的生物活性物质具有种类多(包括芳香族、杂环类、醌类、大环类、聚醚类、多烯类等)、结构新、一株菌可以产生一种基本结构的许多衍生物、菌株的特异性等特点。其独特之处是粘细菌所产生的生物活性物质有许多是作用于真核细胞的,其抗肿瘤和抗真菌活性物质的比例较高^[5-6]。

在已经发现的活性物质中,Epothilone^[7]具有和 Taxol 相同的作用机制,被认为是下一代抗肿瘤药物;Soraphen^[8]是一种广谱抗真菌化合物,具有很大应用前景的生物农药。作者所在实验室分离、保存6株体外抗肿瘤活性很高的粘细菌,并且从其中一株 *Sorangium cellulosum* WXN XJ-C 中分离出一种新的大环内酯类抗肿瘤化合物——福鸽霉素(Phoxalone)^[9]。作者对另一株粘细菌 *Stigmatella* WXN XJ-B 菌株产生抗肿瘤物质的活性以及稳定性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 粘细菌 *Stigmatella* WXN XJ-B,作者所在研究室分离、鉴定和保存^[10]。

1.1.2 培养基(组分 g/L)

1) 种子培养基:土豆淀粉 10.0,葡萄糖 2.0,酵母粉 2.0,脱脂奶粉 4.0, CaCl₂ 1.0, MgSO₄ · 7H₂O 1.0, Fe(III)-Na-EDTA 0.008。

2) 发酵培养基:在种子培养基基础上加 20 g 大孔树脂,甘油 5 mL。

1.1.3 肿瘤细胞培养基 10%小牛血清,90% RPMI1640,2 mol/L L-谷氨酰胺,100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 的链霉素。

1.1.4 肿瘤细胞株 人肝癌细胞 Hep G2,江南大学医药学院分子药理研究室惠赠。

1.2 方法

1.2.1 粘细菌 *Stigmatella* WXN XJ-B 的发酵及其

代谢产物的粗提 从保存在 VY/4 斜面上的菌株中挑取菌株一环,转接到已灭菌的含有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角烧瓶中,30 °C、150 r/min 培养 3 d。取种子液 5 mL 加入至含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角烧瓶中,同样条件下培养 7 d。取出树脂,用水洗涤至澄清,再用 10%甲醇洗涤 3 次,过滤,沥干,放入干净的三角烧瓶中,加入与发酵液等体积的甲醇,解析 24 h,45 °C真空浓缩,浓缩液置于 4 °C下 24 h,取出后于 10 000 r/min 离心 10 min,留上清液去沉淀,作为稳定性和定性初步分析用样品。

1.2.2 抑制率的测定 抑制率的测定采用 MTT 法^[11]。样品于 45 °C烘干后用少量二甲亚砜(DMSO)溶解,然后加入到细胞培养基中,加入的 DMSO 含量不能超过 0.5%。用酶标仪在 570 nm 处测定其 OD 值,计算样品对细胞的抑制率 $\pm$ SD 和对肿瘤细胞的半数抑制浓度 IC₅₀ 值。

细胞的抑制率(%) = (正常细胞孔 OD 值 - 加药细胞孔 OD 值) / 正常细胞孔 OD 值 × 100%

1.2.3 发酵时间对抗肿瘤活性物质合成的影响

发酵时间分别设定为 3、4、5、6、7、8、9 d,发酵结束后取出树脂,用 20 mL 甲醇解析,24 h 后取 0.4 mL 于 45 °C烘干,测定其对 Hep G2 肿瘤细胞抑制率。每种培养条件设 3 个平行样,重复 3 次。

1.2.4 不同的树脂对活性物质提取的影响

HPD100、HPD300、HPD600、HPD450、D101、XAD16、DM301、AB8 和 DA201 共 9 种大孔吸附树脂先用 95%乙醇浸泡 24 h,使树脂充分溶胀,用去离子水洗尽乙醇。用 5% HCl 溶液浸泡 4 h,而后用去离子水洗至中性。再用 2%的 NaOH 浸泡 4 h,用去离子水洗至中性,晾干。每种树脂称取 1 g,加入装有 50 mL 培养基的 250 mL 摇瓶中,发酵培养 7 d 后,用相同体积的甲醇解析,取 0.4 mL 45 °C烘干后加 0.02 mL DMSO 溶解,测不同树脂对 Hep G2 的抑制率。每种树脂设 3 个平行样,重复 3 次。

1.2.5 活性物质稳定性的测定

1) 热稳定性试验:各取 0.2 mL 的甲醇浸提液于 5 mL 试管中,在温度为 50、60、70、80、90、100 °C 的水浴锅中保温 1 h。处理后,45 °C烘箱中至恒重,测其抗肿瘤细胞活性。4 °C条件下保存的甲醇浸提液为对照,测其对 Hep G2 的抑制率,重复 3 次^[12]。

2) 酸碱稳定性试验:取 11 份甲醇浸提液,每份 5 mL,用浓度为 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的

HCl 将样品分别调成 pH 值 1~11,然后在室温下放置。24 h 后将 pH 调至 7,从每个样品中取出 0.2 mL,45 °C 烘干,以未经酸碱处理的 4 °C 保存的浸提液为对照,测其对 Hep G2 的抑制率,重复 3 次^[13]。

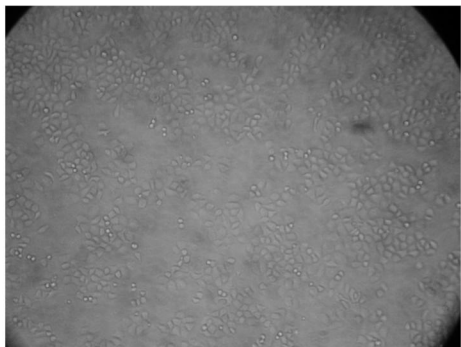
3) 光照和紫外线照射稳定性的测定:浸提液 2 mL 于小烧杯中,置于自然光和 15 W 紫外线下分别照射 2,4,6,8,10,12 h,照射距离为 40 cm,然后从每个样品中取 0.2 mL,45 °C 烘干,以 4 °C 条件下保存的、未经紫外线处理的浸提液为对照,测其对 Hep G2 的抑制率,重复 3 次。

1.2.6 抗肿瘤活性物质的初步分析 取甲醇解析物进行 FeCl₃ 试验、盐酸-镁粉试验和氯仿-浓硫酸试验等试验,具体方法参照文献[14]。

2 结 果

2.1 Stigmatella WXNXJ-B 代谢产物对 Hep G2 生长的影响

从图 1 可以看出,菌株的代谢产物对肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用。剂量为 14.0 μg/mL,在加药 48 h 后细胞的抑制率 40 % 左右;而剂量在 35.0 μg/mL 时,对细胞的抑制率在 95 % 左右,有很少的细胞存活。2 个加药组与加药前相比,后者的肿瘤细胞的数量要多于前者,因此活性物质可能促使肿瘤细胞凋亡。



(a) 加药前



(b) 对照组



(c) 13.7 μg/mL



(d) 33.6 μg/mL

图 1 Stigmatella WXNXJ-B 代谢产物对 Hep G2 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of metabolites from Stigmatella WXNXJ-B on Hep G2 cell growth

2.2 发酵时间对菌体生长和抗肿瘤物质含量的影响

30 °C、150 r/min 对粘细菌 WXNXJ-B 菌株进行培养,在培养 3、4、5、6、7、8、9 d 后分别取样测定树脂的甲醇解析物对 Hep G2 细胞生长的抑制率和菌体的生物量的影响,结果见图 2。菌体生物量在第 3 天达到最大,为 4.35 g/L,在第 2~4 天菌体代谢产物对 Hep G2 细胞抑制率增加较快,在第 7 天达到最高,为 79.04 %,因此发酵时间最好为 7 d。

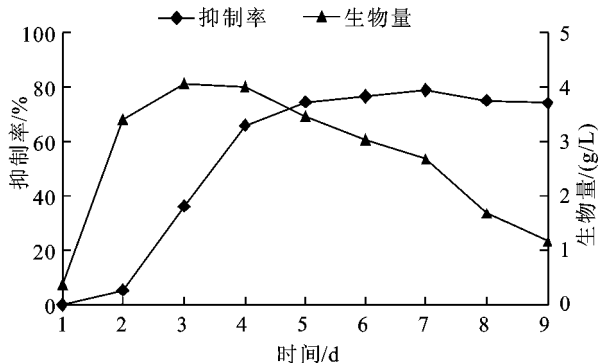
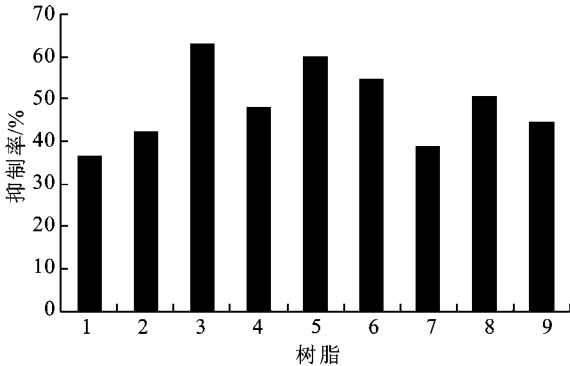


图 2 不同发酵时间对活性物质和菌体生物量的影响

Fig. 2 Effect of different fermentation time on bioactivity substance and biomass of Stigmatella WXNXJ-B

2.3 树脂的筛选

从图 3 中可以看出,在 9 种树脂中,HPD100、XAD16 和 DA201 这 3 种树脂的吸附效果较好,其对肿瘤细胞的抑制率分别为 63.1 %、59.4 %和 54.5 %。在粘细菌 WXN XI-B 菌株发酵生产抗肿瘤活性物质中优先选择这 3 种树脂。



1. HPD300; 2. D101; 3. HPD100; 4. HPD600; 5. XAD16; 6. DA201; 7. HPD450; 8. DM301; 9. AB8

图 3 不同树脂对活性物质吸附效果的影响

Fig.3 Effect of different resins on bioactivity substance adsorption

2.4 活性物质的稳定性

2.4.1 活性物质的热稳定性 图 4 表明,在水浴加热条件下,浸提液的抗 Hep G2 活性比较稳定,70 °C 以前的活性比较稳定,和 45 °C 时相比仍然能达到 100 %; 高于 70 °C 时,随着温度的升高,抗 Hep G2 的活性能力逐渐下降。由此可以说明,该活性物质具有较好热稳定性。

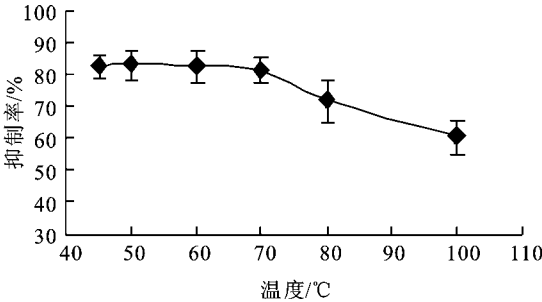


图 4 活性物质的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of antitumor bioactivity substance

2.4.2 活性物质的自然光稳定性 从图 5 中可以看出,活性物质在自然光下照射 2、4、6、8、10、12 h 后活性比率变化不大,说明该活性物质在自然光照射一定时间内稳定。

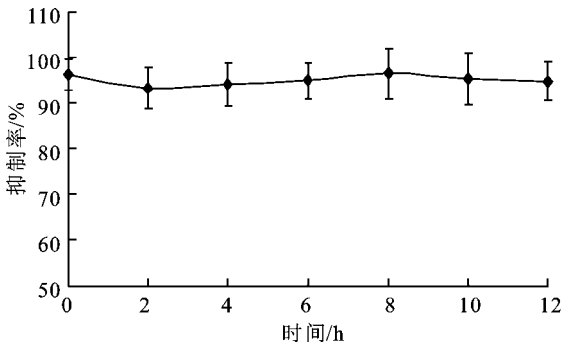


图 5 活性物质的自然光稳定性

Fig.5 The stability of antitumor bioactivity substance with daylight

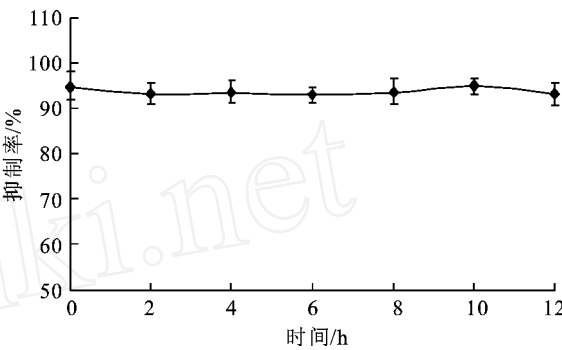


图 6 活性物质的紫外稳定性

Fig.6 The stability of antitumor bioactivity substance with ultraviolet light

2.4.4 活性物质的酸碱稳定性 图 7 表明(0 处为对照样品),活性物质在 pH 3~10 时比较稳定;pH 1~2 时,抑制率只有 50 %左右,只有对照的 60 %; pH 11 时,抑制率只有 55 %左右,和对照相比低 20 %。说明在酸碱性比较强的条件下,浸提液里的活性物质不稳定,可能会发生结构上的变化,从而导致对 Hep G2 细胞抗性的降低,在以后的处理样品和分离纯化过程中尽量不与酸碱性强的物质混合。

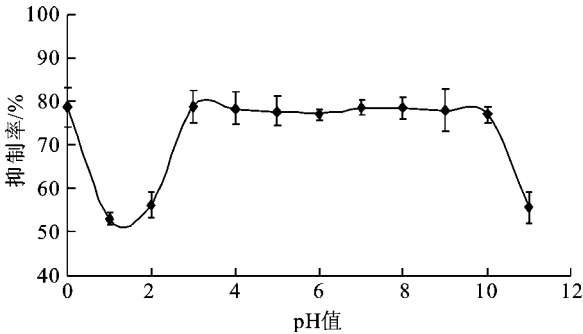


图 7 活性物质的酸碱稳定性

Fig.7 Acid and alkal stability of antitumor bioactivity substance

2.4.3 活性物质的紫外光稳定性 图 6 表明,活性物质在 15 W 紫外灯下照射 2、4、6、8、10、12 h 后活性比率变化不大,和对照一样,都保持在 95 %左右。说明在一定时间内,紫外照射对活性物质基本上没有影响。

2.5 树脂提取物的初步定性分析

如表 1 所示,FeCl₃ 试验、茚三酮试验、F KI 试验、溴酚兰试液、醋酐浓硫酸试验、碱液试验等试验均无明显变化,显示均无皂甙类、有机酸类、酚类、蒽醌、氨基酸、多肽、蛋白质、生物碱、鞣质等化合物。α-萘酚试验出现砖红色环反应,显示可能含有

糖、多糖或甙类物质;镁粉-HCl 试验呈红色,可能含有黄酮类物质;氯仿-浓硫酸试验氯仿层呈红色,可能含有甾体类物质;开闭环试验加 1 %NaOH 澄清,加 2 %HCl 混浊,可能含有香豆素、内酯类、黄酮类、糖甙类和甾体类物质。

表 1 Stigmatella WXNXJ-B 代谢产物的显色反应
Tab.1 Color reaction of the metabolite from Stigmatella WXNXJ-B

显色反应	显色变化	显色反应	显色变化
FeCl ₃ 试验	无	镁粉-HCl 试验	无
茚三酮试验	无	F KI 试验	无
α-萘酚试验	砖红色的环	氯仿-浓硫酸试验	氯仿层变红色
溴酚兰试液	无	碱液试验	无
醋酐浓硫酸试验	无	开闭环试验	1 %NaOH 澄清,2 %HCl 混浊

3 结 语

Stigmatella WXNXJ-B 所产生的代谢产物表现出很好的抗肿瘤细胞 Hep G2 的能力,加药后的细胞和加药前的细胞相比,在数量上后者多于前者,说明细胞对肿瘤细胞主要起杀伤作用。在试验过程中发现,对小鼠黑色素瘤 B16 和人乳腺癌 MDA-MB231 肿瘤细胞具有较高的生长抑制效果,而对正常小鼠的肾脏细胞基本不起作用,因此活性物质是通过促使肿瘤细胞凋亡而使细胞死亡的。对其代谢产物的初步分析,含有内酯类、苷类和甾体类物质,起作用的可能是其中的一种或者多种。

不同粘细菌其产生的活性物质类型不同,其发酵和提取条件也不尽相同。实验结果表明,*Stigmatella* WXNXJ-B 产生抗肿瘤活性物质的最佳培

养时间为 7 d,菌株在培养至 3 d 时其菌体生长量最大,然后菌体停止生长,活性物质开始积累,至 7 d 时达到最大量。在粗提中,HPD100、XAD16 和 DA201 这 3 种树脂的吸附效果较好。在本研究中,*Stigmatella* WXNXJ-B 所产生的活性物质在不高于 70 °C 的条件下保持较高的活性,对自然光和紫外光不敏感,在 pH 3~10 时较稳定。

这些研究为此菌株产抗肿瘤物质的后续研究和工业化生产提供了工艺依据,具有重要的实际意义。由于粘细菌产生的活性物质种类多且作用机制多样,使它成为目前研究的热点。但由于其自身特性的限制,分离纯化及难培养的特点成为制约研究开发粘细菌的一个瓶颈,随着对其代谢产物研究的逐步重视,粘细菌的研究在中国将有更大的发展。

参考文献(References):

[1] Dworkin M. Recent advances in the social and development biology of the Myxobacteria[J]. **Microbiol Revs**, 1996,60(1): 70 - 102.

[2] Reichenbach H, Dworkin M. The Myxobacteria[M]. New York: Spriger-Verlag, 1992 :3418 - 3487.

[3] Reichenbach H, Hofle G. Production of bioactive secondary metabolites[M]. Washington DC:American Society for Microbiology, 1993:347 - 397.

[4] Reichenbach H, Hofle G. Biologically active secondary metabolites from *Myxobacteria*[J]. **Biotech Adv**, 1993,11 :219 - 277.

[5] 李健,李越中,王溱圯. 粘细菌生物活性物质的研究进展[J]. 中国新药杂志,1998,7(2): 84 - 89.

LI Jiang, LI Yue-zhong, Wang Zhen-yi. Advances in studies of bioactive substances produced by *Myxaobacteria*[J]. **Chi-**

- nese Journal of New Drugs, 1998,7(2): 84 - 89. (in Chinese)
- [6] 王远亮,张彩琴.黏细菌产生多样性天然活性物质的研究进展[J]. 华西药理学杂志, 2006,21(1):69 - 71.
WANG Yuan-liang,ZHANG Cai-qin. Advances in studies of diversity of nature bioactive substances produced by myxobacteria[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006,21(1):69 - 71. (in Chinese)
- [7] Gerth K, Bedorf N, Hofle G, et al. Epothilons A and B:antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties[J]. J Antibiot,1996, 49: 560 - 563.
- [8] Gerth K, Bedorf N, Irschik H, et al. The soraphens:a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). I. Soraphen A1: fermentation, isolation, biological properties[J]. J Antibiot,1994, 47: 23 - 31.
- [9] GUO Wen-Jie,TAO Wen-Yi. Phoxalone,a novel macrolide from *Sorangium cellulosum*: structure identification and anti-tumor bioactivity evaluation in vitro[J]. Biotechnology Letters,2008,30(2): 349 - 356.
- [10] 郭文杰,陶文沂,许正宏,等. 产高活性抗癌物质的粘细菌的定向筛选[J]. 天然产物研究与开发,2007,19:1032 - 1036.
GUO Wen-jie,TAO Wen-yi,XU Zheng-hong,et al. Directed screening of myxobacteria producing high bioactive antitumor metabolites[J]. Nat Prod Res Dev,2007,19:1032 - 1036. (in Chinese)
- [11] 崔凤杰,郭文杰,许泓瑜,等. 灰树花菌丝体抗肿瘤糖肽 GFPS1b 结构的研究[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(5):66 - 76.
CUI Feng-jie, GUO Wen-jie, XU Hong-yu, et al. Structural analysis of anti-tumor acid heteropoly saccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006,25(5):66 - 76. (in Chinese)
- [12] 金青哲,齐策,王兴国,等. 辣椒红色素的分离及光稳定性研究[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(2):53 - 57.
JIN Qing-zhe,QI Ce,WANG Xing-guo,et al. Study on the separation and photostability of the paprika pigment[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2007,26(2):53 - 57. (in Chinese)
- [13] 张国强,师俊玲,杨自文. 1 株乳酸菌所产类细菌素 *Lactobacillin* SD-ZZ 的初步研究[J]. 食品与发酵工业,2008,34(5):51 - 54.
ZHANG Guo-qiang,Shi Jun-ling, Yang Zi-wen. Preliminary studies on bacteriocin-like substance synthesized by *Lactobacillus*[J]. Food and Fermentation Industry, 2008,34(5):51 - 54. (in Chinese)
- [14] 张贵君. 常用中药化学鉴定[M]. 北京:化学工业出版社,2005:264 - 272.

(责任编辑:李春丽)