

药用植物内生菌的生物多样性及活性成分

黄宝康, 秦路平* (第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 植物内生菌是一个多样性十分丰富的微生物类群, 寄生于健康植物组织内而不产生外在感染症状, 并与宿主植物协同进化。内生真菌产生的代谢产物有很多是应用前景广阔的新型生物活性物质, 开发利用价值非常高。本文就药用植物内生真菌的种类, 与高等植物的相互作用, 内生菌产生的天然产物及其生物活性等方面进行归纳与讨论。

关键词 药用植物; 内生菌; 生物多样性; 活性成分

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2006)04-0193-04

微生物包括内生菌与植物有着密切的相互关系, 如根瘤菌与豆科植物, 菌根真菌与木本植物存在共生关系。内生菌(endophyte)是指在其生活史的某一段时期生活在健康植物组织内部, 不引起植物组织明显侵染及症状改变的一类菌, 包括真菌、细菌、卵菌和放线菌^[1,2]。1898年 Guerin 等人从一种黑麦草(*Lolium temulentum*)中首先分离得到内生真菌以来^[3], 截止目前所研究的植物类群数量并不算多, 约有数百种。实际上内生菌在植物体内是普遍存在的, 可以说几乎每种植物都有内生菌或共生菌的存在。

植物与内生真菌呈互利共生的关系: 一方面, 植物为内生真菌提供光合产物和矿物质; 另一方面, 内生真菌次生代谢的代谢物, 具有刺激植物的生长发育和提高宿主植物对生物胁迫或非生物胁迫的抵抗能力的作用^[2]。内生菌不仅能够参与植物次生代谢及成分的转化合成, 而且还能够独立产生丰富的次生代谢产物, 是天然产物的重要来源。这些代谢产物有很多是应用前景广阔的新型生物活性物质, 在目前陆地动植物药用资源日渐减少, 生物多样性受到破坏的形势下, 加强对微生物多样性的研究, 并加以开发利用, 具有良好的前景和开发利用价值。本文概述内生真菌的种类, 与高等植物作用产生的天然产物及其生物活性等方面取得的研究进展。

1 内生菌在药用植物中的分布及其生物多样性

大多数内生真菌都属于子囊菌亚门, 包括核菌纲(*Pyrenomyetes*)、盘菌纲(*Discomycetes*)和腔菌纲(*Loculoascomycetes*)的许多种属以及它们的一些衍生菌。

内生真菌在植物中一般分布于叶鞘、种子、花、茎、叶片和根等的细胞间, 其中叶鞘和种子中菌丝含量最多, 而在叶片和根中含量比较少。内生真菌的宿主植物涉及藻类、针叶树、灌木和草本植物等多个类群, 但禾本科植物尤为常见, 现已在 80 多个属的几百种禾本科植物中发现有与之共生的内生真菌。内生菌的分布还受到地理位置、气候条件等诸多环境因子的影响。生物多样性越丰富的地区, 内生菌种类也越丰富。内生菌具有丰富的生物多样性。

内生真菌在植物界分布广泛, 普遍存在于各种陆生和水生植物中, 具有分布广、种类多的特点, 而且不同植物体内分离到的内生真菌数量不同, 少则十几种, 多则近百种。能在非豆科植物根部形成根瘤并具有固氮能力的弗兰克氏菌属(*Frankia*)是最早被发现的内生放线菌。目前已从八个科的木本双子叶植物中发现弗兰克氏菌形成的根瘤, 这些放线菌根植物的代表种广泛分布于除南极洲外的各大洲, 但主要分布于温带地区, 在山地、沼泽、沙丘、盐沼、干旱灌丛地带以及冲积区均有放线菌根植物的分布。不少菌株能产生抗细菌、抗真菌的活性物质。

近年来, 从许多重要的经济林木, 如针叶类的各种冷杉(*Abies spp.*)、云杉(*Picea asperata*)、红杉(*Sequoia sempervirens* Endl.)、紫杉(*Taxus cuspidata*)、松(*Pinus Sylvestris*)、柏(*Cupressus sempervirens*)等植物的树皮、枝叶内分离和鉴定出多种内生真菌, 在多种草本植物、栽培植物、果树、苔藓和蕨类植物中也发现了多种内生真菌类群^[1]。可以推断, 植物体内普遍存在内生菌, 而且因为其对特殊环境的要求, 药用植物体内的内生菌的种类会更多。

2 内生菌与药用植物的相互作用

内生菌生活在植物体内, 在与宿主植物长期共生进化过程中, 内生菌与宿主植物及其各种天敌(如

作者简介: 黄宝康(1969-), 男, 博士, 副教授。Tel: (021)25074577。

通讯作者: 秦路平, Tel: (021)25070394。

草食性脊椎和无脊椎动物,病原微生物等)之间形成了密切而又错综复杂的生态关系,而维持这种关系的物质基础是内生菌产生的或由其诱导宿主植物合成的次生代谢产物。内生菌能正常生活在植物体内,又不引起植物的破坏和植物组织的病害,在某些情形下还可以提高植物胁迫下的存活率以及更高的宿主特异性。植物与内生真菌存在着互惠共生的关系。一方面植物为内生真菌提供光合产物和矿物质,另一方面内生真菌的代谢物能刺激植物生长发育,提高寄主植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力。植物内生菌几乎存在于所有目前已研究过的植物中^[4],分布广,种类多。研究表明,感染内生菌的植物宿主往往具有生长快速、抗逆境、抗病害、抗动物危害等优势,比未感染植株更具生存竞争力^[5]。内生菌在植物体内自身或胁迫植物体形成的代谢产物具有一定的生物活性。

许多植物内生菌可产生吲哚乙酸、吲哚乙腈和细胞激动素等生长激素,能够促进植物生长,从而表现出感染内生菌的植株一般比未感染内生菌的植株生长速度快的现象。张集慧等^[6]从天麻、石斛等兰科药用植物中分离到的5种内生真菌中,检测到赤霉素、吲哚乙酸、脱落酸、玉米素、玉米素核苷等植物激素。从假单胞菌属、肠杆菌属、葡萄球菌属及固氮菌属内生细菌的一些菌株分离到乙烯、生长素、细胞激动素等生长调节物质。研究表明,内生菌产生的此类物质,能够增强宿主对环境胁迫如干旱、低温、环境污染等的抗逆性,维持宿主在非生物胁迫环境下的正常生长。

另外植物内生菌还会产生一些毒性物质。内生菌感染的牧草可能引起牲畜中毒就是因为这个原因。牧草内生真菌产生的麦角碱、麦角胺、色胺和吡啶碱等数十种生物碱是引起牲畜神经系统紊乱、血清肾上腺素浓度改变,造成高酥油草夏季综合症和黑麦草蹒跚症的主要原因。还有 Ju 等^[7]从一种早熟禾(*Poa ampla*)的内生菌中分离到数个黄酮类化合物,对蚊子幼虫具有毒性作用。血竭的产生也和真菌感染密切相关,真菌感染进入植物体内,尤其是镰刀菌(*Fusarium sp.*)的侵染可以有效促进龙血树脂的形成,现在的研究结果认为血竭是植物受到真菌刺激产生的胁迫反应产物。

3 内生菌产生的活性成分

内生菌其自身合成的抗生素、激素、酶抑制剂、诱导物等多种活性物质通过诱导物胁迫宿主植物合成的萜类、生物碱、皂苷、黄酮、酚类和多炔类等次生代谢产物^[1],这些次生代谢产物是具有生物活性

的,这也是现代学者研究的热点之一。内生菌常用的筛选方法是通过对内生菌培养液提取物进行一些色谱及免疫检测来分析该内生菌是否有产生目的化合物的能力^[3]。这是目前研究的主要方法。现在研究人员已经利用这种方法从植物内生菌中分离纯化鉴定出了很多种生物活性物质。另外还有就预先选择筛选模型来选择活性菌株,对其进行发酵培养,再分离纯化活性物质和对其进行鉴定。

3.1 抗肿瘤活性成分 1971年美国学者 Wani 从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 的树皮中提取出了具有独特的抑制微管解聚和稳定微管作用的紫杉醇(taxol),开辟了一个抗肿瘤药物研制的新时代^[8]。1993年 Stierle 等从短叶红豆杉的韧皮部分离得到一株能产生紫杉醇的内生真菌—安德氏紫杉霉(*Taxomyces andreanae*),发现其发酵产物中也能分离出紫杉醇^[9],紫杉醇对卵巢癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤疗效突出,由于产品供不应求,价格昂贵,加上红豆杉植物资源有限,一度使天然的红豆杉林造成了毁灭性的破坏。内生真菌产生紫杉醇的研究成果为解决紫杉醇药源问题提供了新思路。随后不断有新的研究报道,如从云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)、西藏红豆杉(*Taxus wallichiana*)、中国红豆杉(*T. chinensis*)、南方红豆杉(*T. marirei*)等红豆杉植物树皮中先后分离出80多个产紫杉醇或其类似物的内生真菌菌株。我国也从东北红豆杉(*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.)根、茎、叶中分离获得78种内生真菌,经形态学和 ITS 分析,确认分别属于子囊菌亚门的3个属和半子囊菌亚门的23个属,表明东北红豆杉内生真菌具有丰富的物种多样性,其中有4个菌种能产紫杉醇^[10]。

长春花含有的长春新碱被广泛应用于治疗何杰金氏病、恶性淋巴瘤,由于含量极低,使从天然植物提取应用受到限制。郭波等^[11]从长春花中分离到21株真菌,其中有4株可产长春新碱类似物,它们分别属于镰刀菌属(*Fusarium*)、链格孢属(*Alternaria*)和无孢菌群等,为利用内生菌培养提取长春新碱类开辟了道路。

存在于足叶草(*Podophyllum peltatum*)等植物中的有一类天然木质素—鬼臼毒素,具有显著的抗肿瘤活性,能抑制微管蛋白的聚合作用和 DNA 拓扑异构酶活性。从桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)植株中分离得到28株真菌,其中发现有两株也能产鬼臼毒素类似物,它们分属于青霉属(*Penicillium*)和链格孢属(*Alternaria*)。近几年有报道从四川八角莲(*Dysosma veitchii*)、南方山荷叶(*Diphylleia sinensis*)等产鬼臼毒素的植物中都分离到产鬼臼毒

素的内生真菌^[13]。

王军等从南海红树(*Rhizophora chinensis* L.)的嫩叶中分离获得一种内生真菌 No. 2533,其代谢产物中的异香豆素 avicruin A 是一种新化合物^[12]。异香豆素是一类广泛存在于自然界的天然产物,其中某些化合物具有通便、退热等药理作用和明显的抗癌活性。

从美登木(*Maytenu shookeri*)茎、叶中可以分离筛选到内生真菌-球毛壳菌(*Chaetomium globosum*),能产生球毛壳甲素,也具有一定的抗癌活性^[13]。

从欧洲紫杉(*Taxus baccata*)中分离到枝顶霉属(*Acremonium* sp.)的内生真菌,从中提取到一种白灰制菌素 A,对人体某些癌细胞具有很强的抑制作用,并具有杀真菌活性^[14]。

3.2 抗生素成分 植物的主要组织器官中普遍都有内生菌,能够产生抗菌活性物质,一方面可以保护宿主植物免受其它的细菌、真菌、病毒等的侵害^[15],能产生抗菌活性物质的内生菌包括内生真菌、内生细菌、内生放线菌等,产生的成分主要有蛋白、肽、酸及萜类等。禾本科植物内生菌可产生麦角碱、有机胺、吡咯里西啶以及吲哚二萜衍生物等生物碱,这些生物碱表现出抗病原菌、抗线虫、昆虫等多种生物学活性。

Strobel 等从雷公藤(*Tripterigeum wilfordii*)的茎中分离到一株内生真菌(*Cryptosporiopsis quercina*),由它产生一种肽类抗生素 cryptocandin,不仅能抑制灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)等一些植物病原真菌,而且还能抑制白假丝酵母(*Candida albicans*)等人类病原真菌^[15]。

从黄花蒿(*Artemisia annua*)中分离得到了 39 株内生菌,其中 21 株能产生抗霉菌的物质^[16];李桂玲等^[17]从三尖杉、南方红豆杉和香榧中分离到约 90 株拟青霉属、镰孢菌属等内生真菌,都能产生一种或多种植物病原真菌的抑制剂;在西班牙中部石膏性和盐性土壤中生长的芦竹(*Arundo douax*)、针茅(*stipatenacissima*)、迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)、二行芥(*Diplotaxis erucoides*)、麻黄(*Ephedra nebrodensis*)、戟叶滨藜(*Atriplex halimus*)、南方芦苇(*Phragmites australis*)等植物中存在 37 种具有酵母和细菌杀灭能力的内生菌;何红等从辣椒中分离得到了对香蕉枯萎菌和黄瓜枯萎菌有拮抗作用的内生菌^[18];从黄花蒿(*Artemisia annua*)和蒙古蒿(*Artemisia mongolica*)分离到 10 余种内生真菌,其中一株内生真菌刺盘孢霉(*Colletorichum* sp.)能产生炭疽菌酸等 3 种新的抗菌活性物质,对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球

菌和八叠球菌有很好的抑制作用;从一些兰科植物分离到的内生真菌可产生杀菌活性的物质,分别对奥里斯葡萄球菌、长球菌、大肠杆菌、隐球酵母和假丝酵母具有广谱或专一抗性等等。

大量研究报道证明抗生素内生菌的普遍存在,体现了内生菌与宿主植物的互利共生关系,即通过抗生素来保护宿主植物免受病原菌侵害。同时,产抗菌素内生菌可以通过微生物方法来增加产量从而缓解抗生素类药物的短缺问题,也为解决因滥用抗生素而引发的致病菌耐药性问题提供了良好的方法。

3.3 抗糖尿病物质 从非洲热带植物分离得到的内生菌(*Pseudomassaria* sp.)^[19]产生的次生代谢产物中分离出一种类似胰岛素的小分子化合物(L-783,281),可使人的胰岛素受体酪氨酸 β 亚基磷酸化,并使胰岛素受体的作用底物磷酸化,激活 Akt,起到类似胰岛素中介作用的效果,可以进一步开发成为降血糖的天然药物。

3.4 其他成分 霍娟等应用 TBA 反应法对从杜仲(*Eucommia ulmoides* Olive.)叶片中分离到的内生真菌刺孢壳(*Chaetomela* sp)培养液提取物进行的抗氧化活性的测定表明该菌能够产生抗氧化活性成分,通过 TLC 和 HPLC 对抗氧化活性成分的分析表明其活性成分为黄酮类化合物^[20]。

从 *Terminalia morobensis* 的一株内生菌中得到两种异构体 pestacin 和 isopestacin,二者既表现出抗菌活性,又显示出抗氧化活性。Isopestacin 与类黄酮类抗氧化剂结构相似,可以清除溶液中的过氧化物和自由基。Pestacin 的抗氧化活性被证实比维生素 E 高出许多。有些内生真菌在植物体内生长、繁殖、代谢的过程中会产生各种有毒代谢物,而使该植物带毒,从而引起草食动物和昆虫中毒。如 *Neotyphodium*, *Balansia*, *Epichloe*, *Myriogenospora* 和 *Fusarium* 属中的许多种,这些毒性代谢产物有串珠镰孢菌素,白僵菌素,镰刀菌酸,念珠菌素,麦角碱和黑麦草碱等^[21,22]。如玉米内生真菌 *Fusarium moniliforme*, 能产 5 种真菌毒素,其中串珠镰孢菌毒素是在玉米种子萌发时产生的,该毒素会引起马脑软化症和猪水肿病。人畜食用感染了 *F. moniliforme* 内生真菌的玉米还可导致食道癌^[23]。

4 内生真菌的研究前景

内生真菌的研究已成为药理学、生态学、微生物学、植物病理学、动物学、遗传学、植物保护学等领域科学家感兴趣的研究领域。我国在兰科植物内生菌方面的研究是比较成功的例子。中国协和医科大学

药用植物研究所自上世纪 90 年代中期开始从墨兰等兰科植物分离鉴定了数百株内生真菌,发表了不少新种,同时对真菌与植物共生关系的物质基础都作了较深入的研究。

植物内生菌的研究目前仍处于起步阶段。尽管人们在植物内生菌的种类、生态分布、代谢产物等方面做了很多工作,但仍然不是很深入,而且迄今为止研究过的植物也不过数百种,还有大量的研究工作需要进一步开展。结合学科发展的趋势,可以认为,在植物内生菌的多样性、内生菌次生代谢产物以及活性成分的开发和利用等领域,将会有越来越多的研究成果,并将产生重要意义。

参考文献:

- [1] 马旭圃,吴萍茹. 植物内生真菌——一类生物活性物质的新资源微生物[J]. 海峡药学,2004,16(4):11.
- [2] 官 册,钟国华,孙之潭,等. 植物内生真菌的研究进展[J]. 仲恺农业技术学院学报,2005,18(1):61.
- [3] 黎万全,胡之璧. 内生菌与天然药物[J]. 中国天然药物,2005,3(4):193.
- [4] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌的研究新进展[J]. 植物学报,2001,43(9):881.
- [5] 孙力军,陆兆新. 植物内生菌抗菌活性物质研究进展[J]. 食品与发酵工业,2005,31(2):78.
- [6] 张集慧,王春兰,郭顺星,等. 兰科药用植物的 5 种内生真菌产生的植物激素[J]. 中草药,1999,21(6):460.
- [7] Ju Y, Sacalis JN, still CC. Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa annua*) [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 3785.
- [8] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. the isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. J Am Chem Soc, 1971,93: 2325.
- [9] Stierle A, Stibel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. Science,1993,260:214.
- [10] 李长田,李 玉,方浙明,等. 东北红豆杉内生真菌的多样性 [J]. 吉林农业大学学报,2004,26(6):612.
- [11] 郭 波,李海燕,张玲琪. 一种产长春碱真菌的分离[J]. 云南大学学报(自然科学版),1998,20(3):214.
- [12] 王 军,林永成,吴雄宇,等. 从南海红树内生真菌 No. 2533 分离出新的异香豆素[J]. 中山大学学报(自然科学版),2001,40(1):127.
- [13] 张玲琪,王海昆,邵 华,等. 美登木内生真菌产抗癌物质球毛壳甲素的分离及鉴定[J]. 中国药理学杂志,2002,37(3):172.
- [14] Strobel G A, Torczynski R, Bollon A. *Acremonium* sp. -a leucino-statin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*) [J]. Plant sci,1997,128:97.
- [15] Strobel GA, Miller RV, Miller C, et al. Cryptocandrin, a potent antitumor from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina* [J]. Microbiology,1999,145:1919.
- [16] Liu CH, Zou WX, Lu H, et al. Antibacterial activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi [J]. Journal of Biotechnology,2001,88:277.
- [17] 李桂玲,王建峰,黄耀坚,等. 几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究[J]. 微生物学通报,2001,8(6):64.
- [18] 何 红,蔡学清,洪永聪. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 中国生物防治,2002,18(4):171.
- [19] Zhang B, Salituro G, Szalkowski D, et al. Isolation of small molecule insulin with antidiabetic activity in mice [J]. Science, 1999,284:974.
- [20] 霍 娟,陈双林. 杜仲内生真菌抗氧化活性[J]. 南昌大学学报(理科版),2004,28(3):270.
- [21] Leslie JF, Marasas WF, Shephard GS, et al. Mating toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and F mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) [J]. Appl Environ Microbiol,1996,62:1182.
- [22] Shephard GS, Sewram V, Nieuwoudt TW, et al. Production of the mycotoxins fusaproliferin and beauvericin by South African isolates in the *FusaHuTn* section *Liseola* [J]. J Agric Food Chem, 1999,47:5111.
- [23] Panaccione DG, Johnson RD, Wang J, et al. Elimination of ergovaline from a grass. *Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98:12820.

收稿日期:2006-01-13

环孢素在自身免疫性疾病中的临床应用进展

黄玉凤,王 慧,张国庆(第二军医大学附属东方肝胆外科医院药剂科,上海 200438)

摘要 目的:综述环孢素在自身免疫性疾病中的应用进展。方法:回顾国内外相关文献,总结环孢素在自身免疫性疾病中的应用效果。结果:环孢素作为一种强效的免疫抑制剂,其在自身免疫性疾病的治疗中也得到广泛的应用,并取得较好的临床效果。结论:环孢素可应用于自身免疫性疾病的治疗,应用过程应注意药物的应用剂量,掌握好合适的减药及停药时机,以减少药物副作用。

关键词 环孢素;自身免疫性疾病

作者简介:黄玉凤(1969-),女,主管药师,执业药师。