

蝉拟青霉代谢产物抑制单胺氧化酶和抗肿瘤活性研究

陈安徽¹, 樊美珍^{2,*}, 邵颖¹, 陈宏伟¹

(1. 徐州工程学院食品(生物)工程学院, 江苏 徐州 221008; 2. 安徽省微生物防治重点实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: 以单胺氧化酶(MAO)为靶标对蝉拟青霉 RCEF0947 菌株发酵液和菌丝体甲醇乙酸乙酯提取物体外抑制单胺氧化酶活性进行研究, 结果发现, RCEF0947 发酵液提取物对 MAO-A 具有较强的抑制活性, 其对单胺氧化酶 MAO-A 的半数抑制浓度(IC₅₀)为 272.97 μg/ml。而对于 MAO-B 的抑制活性而言, 当样品反应浓度为 400 μg/ml 时, 发酵液和菌丝体提取物对 MAO-B 的 IC₅₀ 分别为 538.37 μg/ml 和 509.36 μg/ml, 经统计分析二者之间无显著性差异(p > 0.05)。以中国仓鼠卵巢(CHO)细胞株作为模型, 用 Resazurin 法检测生长抑制率, 对 RCEF0947 菌株发酵液和菌丝体提取物进行体外抗肿瘤活性实验, 结果发现, 两种提取物均具有较强的体外抗肿瘤活性, 两种提取物对 CHO 细胞株的 IC₅₀ 分别为 122.35 μg/ml 和 171.93 μg/ml。

关键词: 蝉拟青霉; 提取物; 单胺氧化酶; 抗肿瘤

Monoamine Oxidase-inhibiting and Anti-tumor Activities of Metabolites of *Paecilomyces cicadae*

CHEN An-hui¹, FAN Mei-zhen^{2,*}, SHAO Ying¹, CHEN Hong-wei¹

(1. Department of Food (Biology) Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China;

2. Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, Hefei 230036, China)

Abstract: With monoamine oxidase (MAO) as the target, the inhibitory activities of the methanol-ethyl acetate (1:1, V/V) extracts from the broth and mycelia of *Paecilomyces cicadae* RCEF0947 were investigated. It was found that the broth extract had good inhibitory activity against MAO-A, and the IC₅₀ was 272.97 μg/ml; while for MAO-B, when the reaction concentration of sample was 400 mg/ml, both the extracts from broth and mycelia of RCEF0947 showed strong inhibitory activity with the IC₅₀ of 538.37 μg/ml and 509.36 μg/ml (no significant difference between them, p > 0.05), respectively. Meanwhile, a Resazurin cytotoxicity assay model of Chinese hamster ovary cells (CHO) was employed to study the anti-tumor activity of extracts from the strain RCEF0947. The results revealed that both the extracts from broth and mycelia of RCEF0947 had strong anti-tumor activity with IC₅₀ of 122.35 μg/ml and 171.93 μg/ml, respectively.

Key words: *Paecilomyces cicadae*; extract; monoamine oxidase (MAO); anti-tumor

中图分类号: S646

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0216-03

蝉拟青霉(*Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson)又名雌蝉花, 属半知菌类或有丝分裂孢子真菌, 是一种具有保健功能的大型药食两用真菌, 亦是我国传统的名贵中药。据《中药大辞典》中记载蝉拟青霉含有糖原、甘露醇、生物碱及麦角甾醇等多种活性物质^[1]。事实上, 早在宋代《证类本草》上就记载有蝉花具有主治小儿天吊、夜啼心悸, 祛风止痉, 治疗麻疹、目赤、多泪的功效。正因为蝉花含有多种活性成分, 并具有一定的药理作用, 故对蝉花的研究已为各国的学者所关

注。如刘广玉等^[2]和金丽琴等^[3]研究发现蝉花有较好的镇静催眠作用和增强大鼠免疫能力、改善脂类物质代谢和保护脏器组织的作用。李春如等^[4]比较分析了几种虫草无性型及其相关真菌的 SOD 酶比活力及粗酶含量, 结果发现蝉拟青霉(PC-1)具有相对较高的 SOD 酶比活力。葛飞等^[5]对蝉拟青霉发酵菌丝体与天然蝉花中化学成分进行了比较分析, 研究结果表明, 蝉拟青霉菌丝体与天然蝉花相比, 发酵菌丝体中虫草多糖、甘露醇、麦角甾醇、腺苷、氨基酸总量、必需氨基酸总量和不饱和脂肪酸的

收稿日期: 2008-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570189)

作者简介: 陈安徽(1979-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品、微生物与生物制药。E-mail: chenah201@163.com

* 通讯作者: 樊美珍(1944-), 女, 教授, 研究方向为应用微生物学。E-mail: mzf@ahau.edu.cn

含量明显高于后者,其他化学成分和天然蝉花中相应成分基本一致。Odier 等^[6]亦报道了一种蝉拟青霉培养物中具有抗菌和免疫抑制作用的多球壳菌素 Myriocin。

虽然对蝉拟青霉的相关研究已有较多的报道,但尚未见对蝉拟青霉代谢产物抑制单胺氧化酶和抗肿瘤活性研究的详细报道。现代研究表明,单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)是机体内参与胺类物质代谢的主要酶类之一,具有十分重要的生理功能,当其活性过强时不仅能直接造成胺类神经递质不足,同时过多氧化脱胺产生的自由基会进一步损伤神经组织,导致相关病症的出现,如目前发病率逐年升高的抑郁症和帕金森综合症等就与单胺氧化酶活性过强有关^[7-8]。近年来,肿瘤的发病率明显增高,由于传染病的减少,肿瘤和心血管病已上升为第一、第二位的疾病。现代研究发现某些临床上使用的单胺氧化酶抑制剂具有诱发小鼠肺部与血管肿瘤的现象,虽然在人类中尚未确定,但也对人类健康构成潜在威胁。另外,发现某些癌症的发生亦常伴随着体内 MAO 的变化^[9],因此,对单胺氧化酶抑制剂和肿瘤抑制剂的研究已成为寻找有关治疗药物的热点。本研究将分别对蝉拟青霉发酵液和菌丝体甲醇乙酸乙酯提取物进行抑制单胺氧化酶和抗肿瘤活性的详细研究,期望找到一种兼有抑制肿瘤细胞生长和抑制单胺氧化酶活性的新药品,旨在为进一步的开发利用虫草资源和相关保健食品、药品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及其来源

蝉拟青霉菌株(*Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson) RCEF0947 安徽省微生物防治重点实验室;中国仓鼠卵巢 CHO 细胞株 中国科技大学细胞免疫实验室。

1.2 培养基

固体培养基(g/L): 葡萄糖 40、蛋白胨 10、酵母浸出粉 10、琼脂 20、蒸馏水 1000ml。

液体发酵培养基(g/L): 葡萄糖 40、蛋白胨 10、酵母浸出粉 10、蒸馏水 1000ml。

细胞培养基: DMEM/F₁₂ 培养基(含 10% 小牛血清以及 100 μg/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素)。

1.3 试剂与仪器

小牛血清、胰蛋白酶 GIB 公司;单胺氧化酶 A 和 B、DMSO、台盼蓝、Resazurin、kynuramine dihydrobromide Sigma 公司;无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯等均为国产分析纯。

TUMEN TL-15 高速离心机 江苏图们离心机厂; FREEZONE12 冻干机 美国 Labconco 公司;梅特勒 AE200 型电子天平 上海分析仪器厂; Spectra M2 酶标仪 美国 Molecular Devices 公司。

1.4 方法

1.4.1 菌株的培养及样品的准备

用液体培养基,以 5% 的接种量接入一级液体种子,置于 160r/min、25℃ 摇床上培养 7d 后抽滤,菌丝体冻干备用,滤液低温减压浓缩至原体积的 1/4,然后加入 95% 乙醇沉淀,使其终浓度为 75%,4℃ 冰箱放置过夜后离心,弃沉淀,将上清液在 40℃ 条件下浓缩得浸膏,冻干后备用。分别准确称取 0.1g 菌丝体和发酵液冻干品,加入 10ml 的甲醇乙酸乙酯混合液(按 1:1 体积比混合)置于超声波振荡器中在 100Hz 条件下振荡浸提 30min,然后 5000r/min 离心 5min 取上清液,氮气流干后称重,分别得到 10mg 和 8mg 提取物,将得到的两种提取物分别采用 12.5% DMSO 溶液配成不同浓度样品溶液备用。

1.4.2 样品对单胺氧化酶抑制活性的测试

参考 Weissbach 等^[10]和 Schmidt 等^[11]方法并改进,用 pH 7.6、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液配制浓度为 0.05mg/ml 的单胺氧化酶 A 型(MAO-A)和 0.15mg/ml 单胺氧化酶 B 型(MAO-B)样品液。

样品对 MAO-A 型抑制活性的测试:取 495 μl 的 MAO-A 缓冲液加入待测溶于 DMSO 溶液的样品 5 μl 于 37℃ 保温 5min,取此混合物 140 μl 放置 96 孔板,同时加入 10 μl 溶于缓冲液中的底物 Kynuramine dihydrobromide 并使其最终的浓度为 500 μmol/L,自动混匀后在 37℃ 条件下,测试波长为 360nm 进行动力学模式测试。每间隔 5min 进行测定一次。

$$\text{相对抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\Delta A_m}{\Delta A_c}\right) \times 100$$

式中: ΔA_m 为反应后样品的吸光度在一定反应时间内的增值; ΔA_c 为空白对照吸光度在一定反应时间内的增值。

样品对 MAO-B 型抑制活性的测试:方法同 MAO-A 型,但 MAO-B 的浓度为 0.15mg/ml,步骤和操作过程不变。

1.4.3 肿瘤细胞生长抑制实验方法^[12]

细胞的亚培养: CHO 细胞经 0.25% 胰酶消化后加新鲜培养液,于温度为 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养,每 2~3d 更换一次培养液,待细胞生长到对数分裂期,用于进一步实验。

96 孔板种子细胞的培养:待细胞进入对数分裂期,将细胞从培养瓶中转移到 96 孔板中培养,以每孔 4.0×10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中,每孔体积 100 μl,同时留出 3 个空白孔(不加细胞),于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24h。

加样品与细胞共培养:待细胞在 96 孔板中稳定 24h 且贴壁后,用移液器吸出旧的培养液,然后每孔加 90 μl 新鲜培养液和 10 μl 溶于 12.5% DMSO 的样品,同时设 100% 对照组、0% 对照组,100% 和 0% 对照孔中分别加入 90 μl 新鲜培养液和 10 μl 12.5% DMSO(其中 100% 对照组是 3 个无细胞的空白孔),每组设 3 个重复,于 37℃、

5%CO₂ 培养箱中培养 72h。

酶标仪检测: 细胞加样品共培养 72h 后, 每孔加 20 μl 0.05%Resazurin, 于培养箱中保温 2h, 用酶标仪检测荧光强度(FLU), 激发波长 530nm, 发射波长 590nm。

$$\text{细胞生长抑制率(\%)} = (1 - \frac{\text{FLU}_{\text{样品}} - \text{FLU}_{100\%}}{\text{FLU}_{0\%} - \text{FLU}_{100\%}}) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 MAO 活性的抑制实验

按照 1.4.2 的方法加入供试样品, 进行抑制单胺氧化酶活性测试, 每个浓度样品设 3 个重复, 结果见表 1。

表 1 不同浓度样品对单胺氧化酶的相对抑制率
Table 1 Inhibition rates of different concentrations two extracts against MAO

样品	反应浓度(μg/ml)	MAO-A抑制率(%)	MAO-B抑制率(%)
发酵液提取物	100	16.38 ± 2.13	14.08 ± 1.43
	200	29.65 ± 3.01	24.44 ± 2.07
	400	69.74 ± 1.45	42.59 ± 2.19
菌丝体提取物	100	12.18 ± 1.75	14.26 ± 1.87
	200	21.44 ± 2.33	23.71 ± 2.09
	400	39.23 ± 2.64	44.51 ± 1.52

表 1 的结果表明, RCEF0947 菌株发酵液和菌丝体提取物均具有一定的体外抑制单胺氧化酶活性, 当样品反应浓度为 400 μg/ml 时, 发酵液和菌丝体提取物对 MAO-A 的抑制率分别为 69.74% 和 39.23%, 经统计分析二者之间差异极显著($p < 0.01$); 发酵液和菌丝体提取物对 MAO-B 的抑制率分别为 42.59% 和 44.51%, 经统计分析二者之间无显著性差异($p > 0.05$)。另外发现两种提取物样品对单胺氧化酶抑制活性呈明显的量效关系, 随着样品浓度的增加, 其抑制活性增强。在供试的样品浓度范围内, 供试样品浓度与其对单胺氧化酶的相对抑制率显著相关, 相关系数都在 0.95 以上。经计算, 发酵液甲醇乙酸乙酯提取物对 MAO-A 的半数抑制浓度(IC₅₀) 为 272.97 μg/ml, 发酵液和菌丝体提取物对 MAO-B 的 IC₅₀ 分别为 538.37 μg/ml 和 509.36 μg/ml。

2.2 肿瘤细胞抑制活性实验

按照 1.4.3 中的方法加入供试样品, 每个浓度样品设 3 个重复, 进行样品的细胞生长抑制活性实验, 各样品对肿瘤细胞抑制率的具体实验结果见表 2。

表 2 不同样品对 CHO 细胞的生长抑制率
Table 2 Inhibitions rates of different concentrations of two extracts against CHO cell growth

样品测试反应浓度(μg/ml)	肿瘤细胞生长抑制率(%)	
	发酵液提取物	菌丝体提取物
50	21.92 ± 1.16	18.73 ± 0.92
100	38.79 ± 1.62	35.01 ± 1.25
200	69.33 ± 2.37	54.19 ± 2.48

由表 2 可以看出, RCEF0947 菌株发酵液和菌丝体提取物抑制肿瘤细胞活性差异较显著, 当样品反应浓度为 200 μg/ml 时发酵液和菌丝体提取物对 CHO 肿瘤细胞的抑制率分别达到 69.33% 和 54.19%, 经统计分析二者之间差异达显著水平($p < 0.01$)。经进一步计算发现, 发酵液和菌丝体提取物对 CHO 细胞株的 IC₅₀ 分别为 122.35 μg/ml 和 171.93 μg/ml。

3 讨论

本研究结果表明, 蝉拟青霉 RCEF0947 发酵液和菌丝体提取物均具有一定的体外抑制单胺氧化酶活性, 其中发酵液提取物对 MAO-A 的抑制活性相对较强, 而对于 MAO-B 的抑制活性而言, 当样品反应浓度为 400 μg/ml 时, 发酵液和菌丝体提取物对 MAO-B 的抑制率分别为 42.59% 和 44.51%, 经统计分析二者之间无显著性差异($p > 0.05$)。从抑制类型上可知, RCEF0947 菌株代谢产物中单胺氧化酶抑制剂具有一定的特异性和选择性, 如果能将它们分离纯化成单体, 将有可能得到高效的 A 型和 B 型单胺氧化酶抑制剂, 开发出分别对抑郁症和帕金森综合症有疗效的药物^[7-8]。肿瘤细胞抑制活性实验结果表明, RCEF0947 菌株发酵液提取物对 CHO 肿瘤细胞的抑制活性最强, 其对 CHO 肿瘤细胞 IC₅₀ 为 122.35 μg/ml, 这说明该菌株代谢产物中抑制肿瘤活性成分主要为一类胞外成分。由于目前被称为都市流行感冒的抑郁症的发病率逐年升高, 而作为一种多发病的肿瘤发病人数也越来越多。本研究表明蝉拟青霉 RCEF0947 菌株代谢产物具有较强的单胺氧化酶抑制活性和肿瘤细胞抑制活性, 可将该菌株开发成相关产品, 产品兼有抑制肿瘤细胞生长和抑制单胺氧化酶活性的功效, 如在治疗肿瘤患者时, 可避免病人出现焦虑抑郁等神经性疾病的发生, 故值得对该菌株作进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 王琪, 刘作易. 药用真菌蝉花的研究进展[J]. 中草药, 2004, 34(4): 469-471.
- [2] 刘广玉, 胡菽英. 天然蝉花和人工培养品镇静镇痛作用的比较[J]. 现代应用药学, 1991, 8(2): 5-8.
- [3] 金丽琴, 吕建新, 袁谦, 等. 蝉拟青霉对大鼠免疫功能 and 血液生化指标的影响[J]. 温州医学院学报, 2001, 31(6): 344-346.
- [4] 李春如, 吴茜茜, 严景华, 等. 几种虫草无性型及其相关真菌 SOD 比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(1): 90-93.
- [5] 葛飞, 夏成润, 李春如, 等. 蝉拟青霉菌丝体与天然蝉花中化学成分的比较分析[J]. 菌物学报, 2007, 26(1): 68-75.
- [6] ODIER F, VEY A, BUREAU J P. *In vitro* effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E[J]. Biol Cell, 1994, 314(20): 267-271.
- [7] 吴伟利, 徐艳华. 帕金森病治疗进展[J]. 国外医学: 老年医学分册, 2002, 23(9): 236-238.
- [8] 顾牛范, 李华芳. 抑郁症药物治疗新进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 11(4): 252-255.
- [9] 韩福才, 杨卫华, 郭沁香, 等. 肺癌患者超氧化物歧化酶和单胺氧化酶测定[J]. 中国肺癌杂志, 2001, 4(3): 76-77.
- [10] WEISSBACH H, SMITH T, DALY J, et al. A rapid spectrophotometric assay of monoamine oxidase based on the rate of disappearance of kynuramine[J]. Journal of Biochemistry, 1960, 235(4): 1160-1163.
- [11] SCHMIDT K, LI Z, SCHUBERT B, et al. Screening of entomopathogenic deuteromycetes for activities on targets involved in degenerative diseases of the central nervous system[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 89: 251-260.
- [12] Promega 公司. CellTiter-Blue™ 细胞活性检测系统[J]. 普洛麦格中文通讯, 2003.