

一株红树林真菌抗单纯疱疹病毒 II 型的研究 *

裴 华 林英姿[△] 饶朗毓 王永霞 牛莉娜 王华民 杨 文

(海南医学院热带医学与检验医学院 海南 海口 571101)

摘要 目的: 对分离自海南红树林真菌菌株 PH0016 的胞外多糖 (exopolysaccharide, EPS) 抗单纯疱疹病毒 II 型 (Herpes simplex virus type 2, HSV-2) 活性进行研究。**方法:** 收集纯化菌株 PH0016 产生的 EPS, 体外采用细胞病变观察 EPS 的细胞毒性和抗 HSV-2 作用。为观察 EPS 对 HSV-2 体内感染的治疗效果, 小鼠颅内注射 0.02ml 滴度为 100LD₅₀/0.1ml⁻¹ 的 HSV-2, 24 小时后以不同浓度 EPS 灌胃, 持续 7 天, 14 天后计算小鼠存活率和存活时间。菌株分类采用形态学观察和 ITS 序列分析。**结果:** EPS 可抑制 HSV-2 病毒活性, 病毒感染的细胞病变的半抑制浓度 (Inhibited concentration, IC₅₀) 为 313 μg/mL, SI 为 11.43。EPS 25mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃后, 小鼠存活率为 40.0%, 存活时间为 9.82±1.87 天, 相比模型组实验动物存活时间和存活率均有提高。菌株初步鉴定为淡紫色拟青霉。**结论:** 从海南红树林分离一株淡紫色拟青霉, 其产生的 EPS 具有抗 HSV-2 活性, 值得进一步研究。

关键词 真菌 红树林 胞外多糖 淡紫色拟青霉 抗病毒作用 单纯疱疹病毒 II 型

中图分类号 R285.5, R965.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 17-3209-04

A Study on Anti Herpes Simplex Virus Type 2 Activities of one Fungi Strain Isolated from Mangrove*

PEI Hua, LIN Ying-zi[△], RAO Lang-yu, WANG Yong-xia, NIU Li-na, WANG Hua-min, YANG Wen

(School of Tropical Medicine and Laboratory Medicine, Hainan Medical College, Haikou 571101, China)

ABSTRACT Objective: The antiviral activities of exopolysaccharide (EPS) from one kind of fungi strain PH0016 isolated from mangrove in Hainan province against HSV-2 was explored. **Methods:** The EPS of strain PH0016 was collected and purified. The toxicity and antiviral actions of EPS in vitro was evaluated by observing cytotoxicity effect and cytopathic effect (CPE). To study the therapeutic effect of EPS on HSV-2 infection in vivo, every mouse was injected intracerebrally 0.02ml HSV-2 solution with the titer of 100LD₅₀ 0.1ml⁻¹. After 24hours, the mice were treated by EPS with different doses respectively for 7 days. Survival rate and survival time of mice were observed after 14 days. The taxonomic status of strain was identified by means of morphological observations and analysis of the ITS sequence. **Results:** The EPS inhibited HSV-2 at the IC₅₀ values of 313 μg/ml, and SI values of 11.43 in vitro. After using EPS 25mg·kg⁻¹·d⁻¹, the survival rate of the mice infected with HSV-2 was 40.0%. The average survival time was 9.82±1.87 days. The mortality of the infected mice was reduced and the survival days prolonged. The strain was identified as Paecilomyces lilacinus. **Conclusion:** EPS from fungi strain PH0016 isolated from mangrove in Hainan province had remarkable anti HSV-2 activity, this EPS could be utilized for the further research.

Key words: Fungi; Mangrove; Exopolysaccharide; Paecilomyces lilacinus; Antiviral effect; Herpes simplex virus type 2

Chinese Library Classification (CLC): R285.5, R965.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 17-3209-04

分布于海岸潮间带的红树林独特土壤生境中蕴藏着丰富的微生物资源, 目前已分离鉴定的红树林真菌超过 200 种, 成为海洋真菌的第二大类群。红树林生态环境具有沼泽化、盐渍化、强酸性、有机质含量高的特点, 在此生存的真菌可能存在特殊的代谢途径并产生具有独特生物学功能的代谢产物^[1,2]。本研究从海南岛红树林筛选分离并鉴定一株真菌菌株, 并对其产生 EPS 的抗 HSV-2 病毒活性进行了初步评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Hep-2 细胞株、HSV-2 病毒均购自中国典型培养物保藏中心, 本室传代保存。待试菌株采集于海南演丰红树林国家自然保护区表土, 本研究组分离纯化。DMEM 培养基购自 GIBCO 公司, 发酵培养基采用大豆粉玉米粉培养基 (大豆粉 10.0g, 玉米粉 10.0g, 可溶性淀粉 5.0g, KH₂PO₄ 0.5g, 50% 陈海水定容至 1 L, 调 pH 7.2)。陈海水马丁培养基 (50% 陈海水配置、1% 氯霉素)、PDA 培养基、沙氏培养基和查氏培养基均购自北京陆桥技术有限责任公司。新生牛血清购自杭州四季青工程材料有限公司。MTT 购自 Sigma 公司, 其余试剂均为国产分析纯。昆明种小鼠购买自广州市医学实验动物中心。

* 基金项目 国家自然科学基金项目 (30760001) 海南省自然科学基金资助项目 (琼科 [2009] 309033);

海南省自然科学基金资助项目 (琼科 [2009] 309032)

作者简介 裴华 (1979), 男, 讲师, 硕士, 研究方向 抗感染免疫, 电话: 0898-66893746; E-mail: 52665720@sina.com

△ 通讯作者 林英姿, E-mail: phzmh61@sohu.com

(收稿日期 2011-11-28 接受日期 2011-12-30)

1.2 EPS 的获取

挑取单菌落接种于发酵培养基中,发酵 5d(250rpm,28℃),发酵液离心后(3000rpm,4℃,20min)取上清。发酵上清 4℃ 6520g 离心 20 分钟后,上清液以 3 倍体积冰乙醇 4℃ 沉淀。24 小时后 4℃ 条件下 4520g 离心 15 分钟后,沉淀溶于去离子水中。链蛋白酶+Sevag 法联合脱蛋白^[34]后,-50℃ 条件下冻干 48 小时后备用。

1.3 体外抗病毒实验

1.3.1 EPS 对的 Hep-2 细胞毒性测定 向 96 孔培养板各孔加入 100 μl 处于对数生长期的 Hep-2 细胞悬液,使每孔中含有 104 个细胞。置细胞培养板于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,待 80% 细胞融合后向孔内加入倍比稀释的 EPS 溶液,设细胞对照,72 h 后用光学显微镜观察细胞病变(CPE),Reed-Muench 法算出药样对细胞的 50%细胞中毒浓度(CC₅₀),以无毒浓度用于进行抗病毒实验。

1.3.2 EPS 抗 HSV-2 病毒活性测定 待接种于 96 孔培养板的 Hep-2 细胞 80% 融合后弃去原培养液,加入 100 μl100TCID₅₀ 病毒悬液,置培养板于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,2h 后弃去病毒液,向孔内加入倍比稀释的对细胞无毒性 EPS 溶液。设正常对照、病毒感染对照及阿昔洛韦阳性对照,37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,每天观察由病毒引起的 CPE。当病毒对照组出现 75~100% CPE,而正常细胞对照组正常时,记录各孔的 CPE^[56]。

1.4 体内抗病毒实验

1.4.1 HSV-2 感染昆明种小鼠 LD₅₀ 测定 选用 14-16g 健康昆明种小鼠,随机分为 6 组。各组小鼠接受 10 倍比稀释的病毒悬液 0.02ml 颅内注射,观察记录 14d 各组动物的存活数量,计算造成小鼠半数致死的病毒浓度(median lethal dose, LD₅₀)。

1.4.2 EPS 对小鼠模型死亡率的影响 将小鼠随机分成 EPS 大剂量、中剂量、小剂量组、阿昔洛韦阳性对照组、模型组、生理盐水对照组。将 0.02ml100LD₅₀ 的 HSV-2 病毒溶液颅内注射感染小鼠,生理盐水对照组颅内注射 0.02ml 生理盐水。24h 后开始灌胃给药治疗。小鼠用量高、中、低分别为 50 g·kg⁻¹d⁻¹、25 g·kg⁻¹d⁻¹ 和 12.5 g·kg⁻¹d⁻¹。阳性对照药阿昔洛韦(acyclovir,ACV) 0.1 g·kg⁻¹d⁻¹ 给药;空白对照组及模型组分别灌胃生理盐水,每只 0.5ml,连续给药 7 日。观察记录给药后 14d 内各组小鼠的存

活时间和存活数量^[7,8,9]。

1.5 抗病毒结果计算

体外实验用 Reed-Muench 法计算药物对 50%细胞中毒浓度(Cytotoxic concentration, CC₅₀)和细胞病变的半抑制浓度(Inhibited concentration, IC₅₀)并计算选择指数(Selectivity Index, SI)。

$CC_{50}=10^{(\text{高于 } 50\% \text{ 的稀释度对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数}) \times \text{原始药物浓度}}$
 $IC_{50}=10^{(\text{高于 } 50\% \text{ CPE 率} - \text{低于 } 50\% \text{ CPE 率}) \times \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数}} \times \text{药物的原始浓度}$
 $SI = CC_{50}/IC_{50}$
 体内实验用 SPSS 中 Bliss 法统计软件计算出 LD₅₀,用多组 T 检验计算存活天数。

1.6 菌种鉴定

1.6.1 形态学观察 菌落形态观察菌株点植在 PDA、查氏和沙氏培养基 3 种固体培养基上,28℃ 培养。从培养的第 3d 开始每天观察菌落的形状、大小、生长速度、颜色等特征。将菌株接种于 PDA 琼脂平板,插片,28℃ 培养 6d,取出用光学显微镜观察菌丝大小、形状、表面特征及是否有横隔,孢子大小、形状、类型、颜色等,确定种属地位^[10,11]。

1.6.2 ITS 序列获取及分析 采用改进的 CTAB 法^[12]提取真菌染色体 DNA。采用真菌通用引物 ITS-1 和 ITS-4。94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1min,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,共 30 个循环,72℃ 温育 10min。同时设不含 DNA 模板的阴性对照。PCR 产物送华大基因公司进行序列测定。菌株 ITS 序列测序结果与 Genbank 中核酸序列进行比对,并利用 Clustal W 软件序列进行分析,然后采用邻近一连接法(Neighbour Joining method)聚类,生成系统聚类树,并用 Bootstrap 软件对系统发育树进行检验。

2 结果

2.1 体外抗 HSV-2 实验

2.1.1 EPS 对 Hep-2 细胞 CC₅₀ 的结果 从初始 EPS 浓度为 0.8g/ml 开始,将 EPS 用 DMEM 维持液倍比稀释 7 个浓度,由表 1 数据可计算出 EPS 致 50%细胞中毒的稀释倍数为 224 倍,由此得到 CC₅₀ 为 3571 μg/ml。

表 1 EPS 对细胞半数毒性浓度(CC₅₀)计算表

Table 1 The antiviral activity of EPS from strain PH0016 against HSV-2

Dilution rate	Positive cases	Negative cases	Total positive cases	Total negative cases	Total positive rate
1:80(10 ^{-1.9})	12	0	24	0	100
1:160(10 ^{-2.2})	12	0	12	0	100
1:320(10 ^{-2.5})	0	12	0	12	0
1:640(10 ^{-2.8})	0	12	0	24	0

2.1.2 EPS 对 HSV-2 感染细胞的保护作用 将 EPS 用 DMEM 培养液制成 CC₅₀ 浓度以下若干浓度进行抗 HSV-2 实验,由表 2 数据可计算出 EPS 对 HSV-2 感染的 Hep-2 细胞 50%保护率稀释倍数为 2560,由此得出 IC₅₀ 为 313 μg/ml,SI 为 11.43。

2.2 体内抗 HSV-2 实验

表 3 显示,模型组小鼠在观察期间全部死亡,而中等剂量组存活率达 40.0%,生存时间上中剂量组平均为 9.82±1.87d,与模型组比较 P<0.01。表明 EPS 对 HSV-2 型颅内感染引起的小鼠死亡有较好的防御作用。

表 2 EPS 对细胞病变的半抑制浓度(IC₅₀)计算表
Table 2 The CC₅₀ of EPS from strain PH0016

Dilution rate	Positive cases	Negative cases	Total positive cases	Total negative cases	Total positive rate
1:320(10 ⁻²⁵)	1	11	1	41	2.4
1:640(10 ⁻²⁸)	2	10	3	30	9.1
1:1280(10 ⁻³¹)	4	8	7	20	25.9
1:2560(10 ⁻³⁴)	5	7	12	12	50.0
1:5120(10 ⁻³⁷)	8	4	20	5	80.0
1:10240(10 ⁻⁴⁰)	11	1	31	1	96.9
1:20480(10 ⁻⁴³)	12	0	43	0	100.0

表 3 EPS 对 HSV-2 感染小鼠的治疗作用
Table 3 The therapeutic effect of EPS on HSV-2 infected mice

Group	Dose(g/kg)	The number of animals	Live number	Survival rate(%)	Survival time(d)
Control	0	20	20	100	14
Model	0	20	0	0	7.52± 0.63
ACV	0.1	20	9	45.0	10.30± 1.67
Large dose	50	20	5	25	8.07± 0.85
Mediandose	25	20	8	40.0	9.82± 1.87*
Small dose	12.5	20	2	10.0	7.63± 0.46

Note: *Compared with control P<0.01.

2.3 菌株鉴定

2.3.1 菌株 PH0016 的形态学特征 接种于查氏培养基上培养 3d 见菌落生长,7d 直径可达 15mm~18mm。菌落扁平、质地疏松、粉絮状、淡紫色。表面紫色为产孢层,产孢旺盛,肉眼可见紫色孢子密集。菌落边缘质地疏松,呈白色,菌落背面呈白色。PDA 培养基形态同查氏培养基。沙氏培养基上菌落生长速度缓慢,灰白色,中央隆起,质地较疏松,不形成紫色色素。光镜下营养菌丝壁光滑,无色透明。分生孢子梗光滑无色,单个小梗直立于营养菌丝上,瓶梗基部膨大,孢梗上有 2~4 个瓶梗状的轮生分枝。顶部锥形变细,形成较薄独特的颈,分生孢子成向两侧

分开的链状,偶有纠缠,分生孢子呈卵形或近球形,成熟后表面粗糙,透明无色,成团时呈紫色(图 1)。

2.3.2 ITS 序列分析结果 测序获得菌株 PH0016ITS 序列长度为 588bp。将该序列与 Genbank 相关序列进行 BLAST 相似性分析,选取与其同源性较高菌株,用 Neighbour Joining method 构建系统发育树(图 2)。结果显示,PH0016 与一株未明确命名的真菌菌株(FJ612890,Fungal sp. ARIZ L99)聚为一支,两者相似率达到 100%,其 Bootstrap 支持率为 100% 其分类地位为子囊菌纲(Ascomycetes);肉座菌目(Hypocreales);麦角菌科(Clavicipitaceae)拟青霉属(Paecilomyces)。

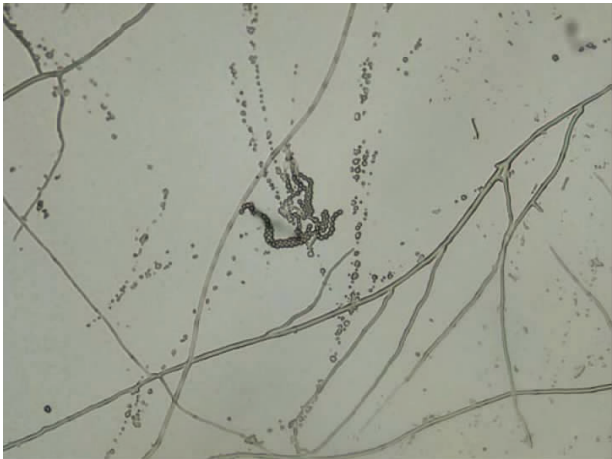


图 1 菌株 PH0016 显微形态 (40× 10)
Fig.1 The micro-morphology of the strain PH0016 (40× 10)

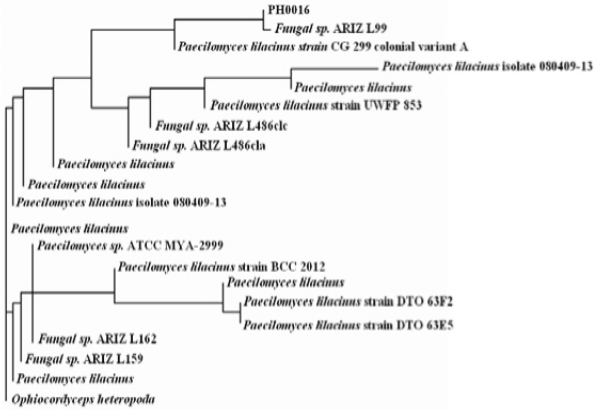


图 2 基于 ITS 序列的菌株 PH0016 与相关菌株系统发育树
Fig.2 Dendrogram of rDNA ITS sequence of PH0016

3 讨论

近年来,针对红树林真菌代谢产物的生物学活性研究大量展开^[13,14]。多种真菌及其代谢产物的抗菌、抗肿瘤等生物学效应被大量报道。本研究自海南演丰红树林自然保护区土壤样本分离一株淡紫色拟青霉,其产生的 EPS 经初步体外抗病毒感染试验,发现具有抗 HSV-2 活性。目前暂未见相关文献报道。后续将对此 EPS 抗病毒活性及结构特点进行深入研究探索。

海南省是中国红树植物种类最多、分布和保存面积最大的区域,具有红树物种多样、古老、濒危、热带和集中分布、保存完整的特点。此地区的生物多样性极其丰富。然而当前多项针对红树林土壤及植物部分微生物的资源调查和生物活性评价研究表明 红树林土壤中大部分微生物尚未被分离培养的^[8]。因此对本地区红树林地区真菌资源进行更详尽的调查和生物活性评价,将可能为新药物的研究开发提供重要资源。

参考文献(References)

- [1] Cheng Zhong-shan, Pan Jia-hui, Tang Wen-cheng, et al. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi [J]. Forestry Research, 2009, 20(1):63-72
- [2] Bharathkumar S, Paul D, Nair S. Microbial diversity of culturable heterotrophs in the rhizosphere of salt marsh grass, *Porteresia coarctata* (Tateoka) in a mangrove ecosystem [J]. Basic Microbiol, 2008, 48(1): 10-15
- [3] 缪承杜, 庄令, 林海鹏, 等. 海南文昌清澜港红树林真菌抗 B16 肿瘤细胞活性菌株的筛选[J]. 生物工程学报, 2008, 24(6): 975-979
Miao Cheng-du, Zhuang Ling, Lin Hai-peng, et al. Screening of cytotoxic activity against B16 tumor cell of mangrove fungi isolate from qinglan harbor in hainan [J]. Chin J Biotech, 2008, 24(6): 975-979
- [4] Säwén E, Huttunen E, Zhang X, et al. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* ST1 solely by NMR spectroscopy [J]. Biomol NMR, 2010, 47(2):125-134
- [5] 张颖, 岑颖洲, 黄日明, 等. 南海七种海藻多糖的抗病毒活性初步研究[J]. 病毒学报, 2006, 22(4):282-285
Zhang Ying, CEN Ying-zhou, Huang Ri-ming, et al. A preliminary study on antiviral activities of polysaccharides from seven kinds of algae collected from the south china sea in vitro[J]. Chinese Journal of Virology, 2006, 22(4):282-285
- [6] 曾凡力, 周敏, 许敏, 等. 贵州老鹰茶提取物体外抗单纯疱疹病毒 1 型活性的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2):282-284
Zeng Fan-li, Zhou Min, Xu Min, et al. Study on the in vitro anti-HSV-1 activity of aqueous extract from *Litsea coreana*[J]. Lishizhi Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(2):282-284
- [7] 杨海霞, 陈廷, 宋焱, 等. 无花果叶乙醇提取物体内抗单纯疱疹病毒的实验研究[J]. 实用预防医学, 2009, 16(4):1228-1229
Yang Hai-xia, Chen Ting, Song Ye, et al. Antiviral Effect of Alcohol Extract of Fig Leaf on Herpes Simplex Virus [J]. Practical preventive medicine, 2009, 16(4):1228-1229
- [8] 鞠怀强, 王沙燕, 裴赢, 等. 直杆梭果实提取物体外抗单纯疱疹病毒和乙型肝炎病毒的实验研究[J]. 中药材, 2011, 34(2):242-245
Ju Huai-qiang, Wang Sha-yan, Pei Ying, et al. In vitro study on the anti-HSV-1 and HBV activities of extracts from the fruit of *Eucalyptus maidenii* [J]. Journal of Chinese Medical Materials, 2011, 34(2):242-245
- [9] Jordão AK, Ferreira VF, Souza TM, et al. Synthesis and anti-HSV-1 activity of new 1,2,3-triazole derivatives[J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(6):1860-1865
- [10] 牛莉娜, 王英, 饶朗毓, 等. 一株具有免疫增强活性的海南红树林真菌 WC1016 的分类鉴定[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(8):1009-1014
Niu Li-na, Wang Ying, Rao Lang-yu, et al. Classification and identification of mangrove fungi strain WC1016 possessing immunity activity[J]. Journal of Hainan Medical University, 2011, 17(8):1009-1014
- [11] 饶朗毓, 陈政良, 裴华, 等. 一株具免疫增强活性红树林真菌的筛选及鉴定[J]. 中国热带医学, 2011, 11(6): 683-685
Rao Lang-yu, Chen Zheng-liang, Pei Hua, et al. Screening and identification of a mangrove fungus possessing immunoenhancement activity[J]. China tropical medicine, 2011, 11(6): 683-685
- [12] 孙立夫, 张艳华, 裴克全. 一种高效提取真菌总 DNA 的方法[J]. 菌物学报, 2009, 28(2):299-302
Sun Li-fu, Zhang Yan-hua, Pei Ke-quan, et al. A rapid extraction of genomic DNA from fungi[J]. Mycosystema, 2009, 28(2):299-302
- [13] Li CY, Ding WJ, Shao CL, et al. A new diimide derivative from the co-culture broth of two mangrove fungi (strain no. E33 and K38) [J]. Asian Nat Prod Res, 2010, 12(9):809-813
- [14] Zhang JY, Tao LY, Liang YJ, et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi [J]. Mar Drugs, 2010, 8(4):1469-1481
- [15] 杨晓洪, 顾觉奋. 红树林土壤微生物与其代谢产物研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2011, 32(3):97-134
Yang Xiao-hong, Gu Jue-fen. The development of studies on mangrove soil microorganisms and their metabolites[J]. World Notes on Antibiotics, 2011, 32(3):97-134