

人参内生假单胞菌 G13476 分离筛选及其抗肿瘤效果研究

鞠鑫, 钱玮, 胡翠英, 马雪香, 王桃云, 郭伟强* (苏州科技大学化学生物与材料工程学院, 江苏苏州 215009)

摘要 [目的] 从人参中寻找具有抗肿瘤活性的内生菌, 并研究其抗肿瘤效果和机制。[方法] 使用假单胞菌基础培养基进行分离, 通过 16s rDNA 分子鉴定, 采用 MTT 比色法、western blot 等在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 胞系中检测抗肿瘤活性。[结果] 所分离菌株 G13476 经 BLAST 比对, 确定其为假单胞菌; MTT 数据和 western blot 结果显示, 菌株 G13476 通过下调 Bcl-2、上调 Bax 实现对三阴性乳腺癌的抑制。[结论] 该研究结果为人参内生假单胞菌 G13476 在抗肿瘤药物的开发和应用提供技术支撑和理论基础。

关键词 人参; 内生菌; 假单胞菌; 分离筛选; 抗肿瘤; 三阴性乳腺癌

中图分类号 R284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)23-0193-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.23.056

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation and Anti-tumor Effect of Endophytic Pseudomonad G13476 in Ginseng

JU Xin, QIAN Wei, HU Cui-ying et al (School of Chemistry, Biology and Material Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou, Jiangsu 215009)

Abstract [Objective] The research aimed to find endophytic bacteria with anti-tumor activity from ginseng and study its anti-tumor effect and mechanism. [Method] Pseudomonas basal culture medium was used for isolation, molecular identification was analyzed by 16s rDNA, the anti-tumor effect and mechanism were measured by MTT assay and western blot in MDA-MB-231 cells. [Result] The isolated strain G13476 was aligned by BLAST to determine that it was pseudomonas; MTT data and western blot results showed that strain G13476 inhibited triple-negative breast cancer by down-regulating Bcl-2 and up-regulating Bax. [Conclusion] The results of this study provide technical support and theoretical basis for the development and application of anti-tumor drugs by pseudostellaria genus G13476.

Key words Ginseng; Endophytic bacteria; Pseudomonad; Isolation and screening; Anti-tumor; Triple-negative breast cancer

癌症严重危害人民群众身体健康, 如肺癌、肝癌、乳腺癌等。乳腺癌是十大恶性肿瘤之一, 尤以三阴性乳腺癌危害更重^[1]。目前, 三阴性乳腺癌因缺少合适的治疗靶点, 致使治疗效果差、死亡率高^[2]。因此, 找寻新的抗癌药物一直是研究热点和重点。

人参, 属五加科植物, 在我国有数千年的药用历史, 是传统名贵药材。人参具有调气血、安精神、止惊悸等功效。近年来, 现代药理扩大人参的应用范围和价值, 研究发现人参具有抗肿瘤、抗炎症、抑菌等作用^[3-4]。人参皂苷 Rg1 通过抑制 AMPK/mTOR/PI3K 通路减少血管紧张素 II 诱导足细胞的自噬现象^[5]; 人参皂苷 Rg3 下调胰岛素一号增长因子的分泌, 实现对骨髓瘤细胞的增殖抑制^[6]; 人参皂苷 Re 在人永生表皮细胞 HaCaT 中, 能够调控丝蛋白和半胱天冬酶-14 (caspase-14) 促进皮肤的保护功能^[7]; 人参皂苷 Rh2 在结肠癌荷鼠抑制瘤模型中能够减轻肿瘤相关抑郁症状^[8]。

内生菌(endophyte)是一类可在植物体内生存的微生物, 且对宿主植物友好, 不造成任何伤害。内生菌因其次生代谢产物中可能含有与宿主植物相同或相似的活性成分, 而成为研究的热点和重点^[9]。因此, 笔者研究从人参内生菌中分离的一株假单胞菌在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中的抗肿瘤活性和潜在作用机制, 以期以为该菌为基础开发新型抗肿瘤药物提供理论依据和试验支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料 新鲜人参购自安徽亳州中药市场; MDA-MB-231 细胞株为苏州科技生物实验中心保存; RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 细菌总 DNA 提取试剂盒、Taq 酶购自天根生化科技(北京)有限公司; 引物合成、基因测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。蛋白胨、牛肉粉、氯化钠、乙酸乙酯等试剂购自国药集团。

假单胞菌基础培养基: 明胶胨 16.0 g、蛋白胨 10.0 g、硫酸钾 10.0 g、氯化镁 1.4 g、溴化十六烷基三甲胺 0.2 g、琼脂粉 15 g, 双蒸水定容至 1 L, pH 调节至 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 人参表面消毒及培养。 新鲜人参根茎经由自来水冲洗后, 用 50% 乙醇处理 15 s, 75% 乙醇处理 30 s。随后, 将人参于 1% NaClO 溶液中浸泡 3 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 收集冲洗废液。将人参根茎剪成 5 mm 的小段置于固体假单胞菌基础培养基中, 于隔水式干燥培养箱中, 28 °C 培养 14 d 左右。随后, 进行单菌落分选。

1.2.2 人参内生细菌总 DNA 提取和 16s rDNA 扩增。 将所分离的单菌落进行摇瓶培养, 28 °C, 100 r/min 培养 3 d 后, 10 000 r/min 离心 1 min 后, 在菌体沉淀中加入 200 μL 缓冲液 GA 和 20 μL 蛋白酶 K, 振荡; 加入 220 μL 缓冲液 GB, 振荡 15 s 后 70 °C 水浴 10 min; 加入 220 μL 无水乙醇, 振荡 15 s, 转至吸附柱中, 随后按说明书进行操作。使用紫外微量分光光度计检测所提 DNA 的浓度和质量。

以所提 DNA 为模板, 使用通用引物 27F(5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGGYTACCTTGT-TACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。20 μL PCR 扩增体系如下: 2.0 μL 10×Taq Buffer(with Mg²⁺), 1.5 μL 10 mmol/L dNTPs,

基金项目 国家自然科学基金项目(81502958); 江苏省自然科学基金项目(BK20150286); 苏州市农业应用基础研究项目(SYN201506)。

作者简介 鞠鑫(1982—), 男, 山东烟台人, 讲师, 博士, 从事微生物、发酵工程等相关研究。*通信作者, 讲师, 博士, 从事天然产物、抗肿瘤药理等相关研究。

收稿日期 2018-11-15

0.5 μL 10 mmol/L 27F, 0.5 μL 10 mmol/L 1492R, 0.2 μL Taq 酶, 1.5 μL 模板 DNA, 加无菌水补至 20 μL 。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增所得 PCR 产物, 经琼脂糖凝胶电泳检测并回收。所回收的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.2.3 次生代谢产物提取。收集上述假单胞菌培养液 5 L, 乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯萃取物, 经旋转蒸发和冷冻干燥, 得到粗提物, 称重后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 MDA-MB-231 细胞培养及 MTT 活力检测。MDA-MB-231 细胞贴壁培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 中培养。取处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 接种于 96 孔板中, 使每孔细胞数量为 3×10^3 个/100 μL 。加入不同浓度粗提物(DMSO 溶解), 终浓度为 0、0.5、2、8、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每浓度设置 3 个平行孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下分别培养 24、48 h 后, 弃上清, 加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后, 加入 100 μL DMSO, 使用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度。

1.2.5 Western blot 检测 Bcl-2、Bax 等相关蛋白含量变化。取处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 接种于 6 孔板中, 根据 MTT 比色结果, 选择 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的粗提物进行刺激。刺激 24 h 后, 提取总蛋白, 经 BCA 定量后, 取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 后转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入一抗(Bcl-2、Bax 和 GAPDH) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, ECL 显影。

2 结果与分析

2.1 人参内生假单胞菌 G13476 的分离与鉴定 人参表面经无菌处理后, 经涂布分析显示灭菌彻底。使用假单胞菌基础培养基进行培养, 分离单菌落 G13476。提取该菌的基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得一条大小约 1 500 bp 的特异性 DNA 片段, 与细菌的 16s rDNA 长度一致(图 1)。此片段经回收和测序, 测序结果进行 Blast 分析, 表明菌株 G13476 属假单胞菌属(图 2)。

2.2 菌株 G13476 抑制 MDA-MB-231 细胞生长 将菌株 G13476 进行发酵培养, 收集发酵液, 经乙酸乙酯萃取, 旋转蒸发和冷冻干燥浓缩, 获得干粉, DMSO 溶解, 调整浓度至 10 mg/mL。

由图 3 可见, 菌株 G13476 粗提取对 MDA-MB-231 细胞有明显的抑制作用, 随着浓度的增加, 抑制率增加, 且随着作用时间的延长, 抑制率也随之增加。在作用 24 h, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 粗提取的抑制率约为 35%, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 粗提取的抑制率约为 51%。试验结果显示, 菌株 G13476 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 具有较好的抑制增殖作用。

2.3 菌株 G13476 调控 Bcl-2 和 Bax 蛋白含量 由图 4 可知, 菌株 G13476 粗提物可有效抑制 Bcl-2 蛋白含量, 同时提升 Bax 的蛋白含量, 且 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的调控效果明显优于 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果表明, 菌株 G13476 可通过调控 Bcl-2 和 Bax 显示抗肿瘤作用。

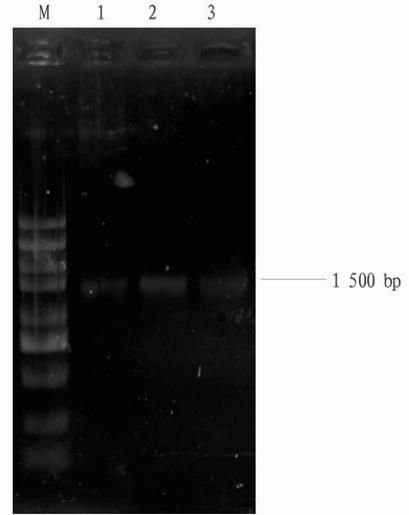


图 1 1% 琼脂糖凝胶电泳检测人参内生假单胞菌 G13476 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification of ginseng endophytic *Pseudomonas* G13476 by 1% agarose gel electrophoresis

```
GGAGAAAGCGGCAGCTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTGCTTCTTGAGAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAACGGGA
CGCTAATACCGCATAACGCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTTCGGGCTTGCCTATCAGAT
GAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGCCGACGATCCGTAACCTG
GTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCCAGC
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCGTATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAAGT
CTTCGGATTGTAAGCATTAAAGTTGGGAGGAAGGGTTGATGATTAATACTCTGCAATTTTGGAC
GTTACCGACAGAAATAAGCACCCTAATCTCTGTGCGAGCAGCCGGTAATACAGAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCCGCGTAGGTGTTAGTTAAGTTGGATGTGAAAT
CCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGATTCAAACCTGACTGACTAGAGATGTTGAGAGGTTGGTG
GAATTTCTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCACTGGCGGAAGCCGAC
ACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTG
GTAGTCCACCGCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTAGCTCTTAGTGGCCGAGCTA
ACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAATCGAAGCAACGGAAGAACCCTTACCAGGCC
TTGACATCCAATGAACITTTCTAGAGATAGATTGGTCCCTCGGGAACATGAGACAGGTGCTGC
ATGGTGTCTGACGCTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGT
CCTTAGTTACCAACGACGTTATGGTGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAA
GGTGGGATGACGTCAAGTCAATGCGCCCTACGGCCTGGGCTACACAGTCTACAATGTT
CGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAACCCGATGCTAGTCCGGA
TCGACGCTCGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGGAATCAGAATGTCGCG
GTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGATGGGTTGCACCAGA
AGTAGCTAGTCAACCTTCGGGAGGACGTACCACGGTATTGCTTGGC
```

图 2 人参内生假单胞菌 G13476 测序结果

Fig. 2 Sequencing results of *Pseudomonas sinensis* G13476

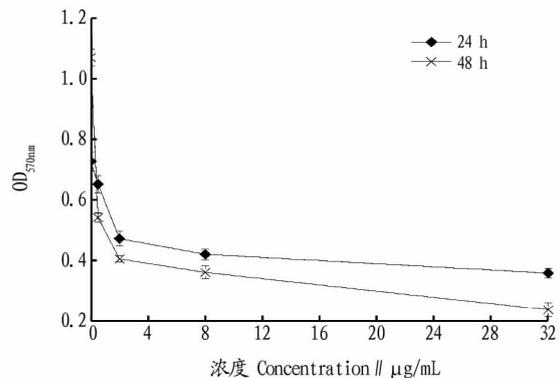


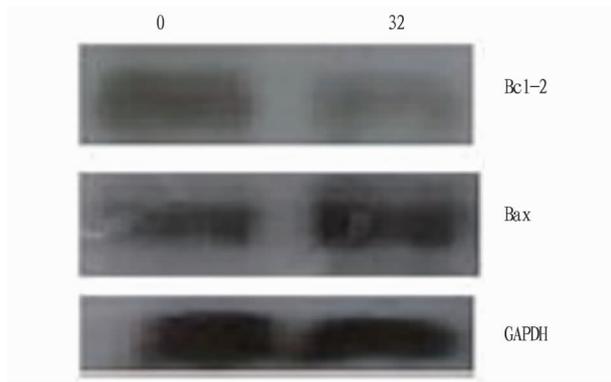
图 3 MTT 检测 G13476 提取物抑制细胞增殖

Fig. 3 MTT detection of G13476 extract inhibits cell proliferation

3 结论与讨论

该研究以人参为对象, 从中分离假单胞菌株 G13476, 并在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中检测其抗肿瘤效果。结果

表明,假单胞菌株 G13476 具有较好的抗肿瘤活性,终浓度 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G13476 粗提物的抑制率为 51%。



注:“0”表示未加 G13476 提取物的正常细胞对照;“32”表示加入 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G13476 提取物刺激的 MDA-MB-231 细胞

Note:“0” indicates normal cell control without G13476 extract;“32” indicates addition of 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G13476 extract-stimulated MDA-MB-231 cells

图 4 Western Blot 检测 G13476 粗提物对 Bcl-2 和 Bax 含量影响

Fig. 4 Effect of G13476 crude extract on the content of Bcl-2 and Bax by Western Blot

人参被称为“百草之王”,药用价值广泛,现代药理研究显示,人参具有抗肿瘤、抗炎症、增加免疫力等作用。但因价格、虫害等因素阻碍了人参的应用及推广。近年来,随着对内生菌研究的深入,人参内生菌中含有与人参功效相似的次生代谢产物,使其人参内生菌成为热点研究领域之一。田磊等^[10]从人参内生菌中筛选到 1 株具有较为 ACC 脱氢酶活性的荧光假单胞杆菌;王卓等^[11]发现 2 种人参内生真菌——GS-4 和 GS-22,其乙酸乙酯粗提物对子宫颈癌 Hela 细胞具有抑制作用,其半抑制浓度达 60~140 $\mu\text{g}/\text{mL}$,这 2 种真菌分别属于半裸镰刀菌和半球菌。虽然有关人参内生菌的抗肿瘤活性和分离筛选研究较多,但有关内生假单胞菌的筛选和抗肿瘤活性研究较少。

乳腺癌是排位第一的女性常见恶性肿瘤,其发病率近年来出现升高且年轻化趋势。三阴性乳腺癌是乳腺癌中较为特殊的一种类型,其雌激素受体、孕激素受体、HER-2 受体均为阴性,因缺乏合适的治疗靶点,导致其死亡率高于其他类型。因此,找寻乳腺癌(特别是三阴性乳腺癌)的新型治疗药物或手段成为研究热点和重点^[12-13]。相关文献报道显示,蒲公英提取物对三阴性乳腺癌细胞具有良好的抑制效果^[14];中药西黄丸可有效抑制三阴性乳腺癌细胞株 Hs578T 的增殖^[15]。该研究以三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为受测细胞,采用 MTT 比色法分析所分离的假单胞菌株 G13476 的抗肿瘤活性,结果表明,菌株 G13476 具有较好的抗三阴性乳腺癌活性。

B 淋巴细胞瘤-2 蛋白家族(B-cell lymphoma-2, Bcl-2),是较早开展研究的肿瘤相关蛋白。其中 Bcl-2 是一种原癌基因,位于 t(14:18)染色体异位断裂处,其具有抗氧化、抑

制凋亡等方面作用;Bax 是一种促凋亡蛋白,其通过自身形成同源二聚体,进而破坏线粒体膜结构,进而激活 caspase 的级联反应,诱导细胞死亡。因此,Bcl-2 长久以来被认为是抗肿瘤药物研究的热点和重点^[16-17]。傅思莹等^[18]研究发现桃红四物汤可有效降低浸润性乳腺癌中 Bcl-2 蛋白表达,提高 Bax 蛋白含量。该研究结果显示,人参内生假单胞杆菌 G13476 可通过下调 Bcl-2 蛋白含量、上调 Bax 蛋白含量,实现对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制。

综上所述,该研究从人参中分离获得一株具有抗肿瘤活性的菌株 G13476,经鉴定为假单胞杆菌属,并在三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中,发现其次生代谢产物可通过调控 Bcl-2、Bax 蛋白,实现抑制作用。该结果为人参内生菌在抗肿瘤药物的开发和应用提供技术支撑和理论基础。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA: A cancer journal for clinicians, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] 张继博, 史业辉, 贾勇圣, 等. 三阴性乳腺癌治疗进展[J]. 肿瘤, 2017, 37(7): 788-794.
- [3] 徐家翠. 人参化学成分的药理活性及其含量积累的研究性进展[J]. 药物与人, 2015, 28(1): 43.
- [4] 占颖, 刘春生, 刘洋洋, 等. 人参和三七活性成分与药理作用对比研究进展[J]. 中国中医药科技, 2014, 21(6): 711-712.
- [5] MAO N, TAN R Z, WANG S Q, et al. Ginsenoside Rg1 inhibits angiotensin II-induced podocyte autophagy via AMPK/mTOR/PI3K pathway[J]. Cell biology international, 2016, 40(8): 917-925.
- [6] LI Y, YANG T, LI J, et al. Inhibition of multiple myeloma cell proliferation by ginsenoside Rg3 via reduction in the secretion of IGF-1[J]. Molecular medicine reports, 2016, 14(3): 2222-2230.
- [7] OH Y, LIM H W, KIM K, et al. Ginsenoside Re improves skin barrier function in HaCaT keratinocytes under normal growth conditions[J]. Bioscience biotechnology and biochemistry, 2016, 80(11): 2165-2167.
- [8] WANG J, CHEN Y M, DAI C X, et al. Ginsenoside Rh2 alleviates tumor associated depression in a mouse model of colorectal carcinoma[J]. American journal of translational research, 2016, 8(5): 2189-2195.
- [9] WATERMAN C, CALCUL L, BEAU J, et al. Miniaturized cultivation of microbiota for antimalarial drug discovery[J]. Medicinal research reviews, 2016, 36(1): 144-168.
- [10] 田磊, 姜云, 陈长卿, 等. 一株人参内生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氢酶活性细菌的筛选、鉴定及其对宿主生长的影响[J]. 微生物学报, 2014, 54(7): 760-769.
- [11] 王卓, 于慧美, 刘鼎, 等. 人参内生真菌的分离及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(9): 748-751.
- [12] 潘晓曦, 关一鸣, 张舒娜, 等. 人参内生菌研究现状与展望[J]. 人参研究, 2014, 26(3): 52-55.
- [13] DIANA A, FRANZESE E, CENTONZE S, et al. Triple-negative breast cancers; Systematic review of the literature on molecular and clinical features with a focus on treatment with innovative drugs[J]. Current oncology reports, 2018, 20(10): 76.
- [14] LI X H, HE X R, ZHOU Y Y, et al. Taraxacum mongolicum, extract induced endoplasmic reticulum stress associated-apoptosis in triple-negative breast cancer cells[J]. Journal of ethnopharmacology, 2017, 206: 55-64.
- [15] ZHENG W X, HAN S Y, JIANG S T, et al. Multiple effects of Xihuang pill aqueous extract on the Hs578T triple-negative breast cancer cell line[J]. Biomed Rep, 2016, 5(5): 559-566.
- [16] HUANG Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design[J]. Oncogene, 2000, 19: 6627-6631.
- [17] MIRZAYANS R, ANDRAIS B, KUMAR P, et al. The growing complexity of cancer cell response to DNA-damaging agents: Caspase 3 mediates cell death or survival? [J]. International journal of molecular sciences, 2016, 17(5): 708.
- [18] 傅思莹, 何玉萍, 王南卜, 等. 桃红四物汤对浸润性乳腺癌 Bcl-2、Bax 及 Ki-67 蛋白表达的影响[J]. 中医药学报, 2018, 46(4): 89-92.