

# 具有抗氧化活性的北五味子内生真菌的筛选及鉴定

赵 玥\*, 秦 源, 李 娜, 李志鹏, 范志强, 于祥勇, 贾景明\*(沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R282.71 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4384-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.21

**摘要** 目的:对具有抗氧化活性的北五味子内生真菌进行筛选及鉴定。方法:利用组织分离法,从野生北五味子的根、茎、叶及果实中分离内生真菌,分别采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除法及羟自由基清除法筛选具有抗氧化活性的内生真菌;并对菌株的总DNA进行提取,利用通用引物ITS1和ITS4对菌株18S rDNA ITS序列进行扩增和测序,将测序结果进行同源性比对分析,确定活性菌株的分类地位。结果:从北五味子中共分离得到23株内生真菌。其中,从根部分离出的编号为GSR-12的菌株表现出较强的抗氧化活性,其DPPH自由基清除率和羟自由基清除率分别为87.96%和82.31%;经比对分析后鉴定GSR-12为粉红粘帚霉(*Clonostachys rosea*)。结论:分离自野生北五味子根部的1株粉红粘帚霉具有较强的抗氧化活性。

**关键词** 北五味子;内生真菌;抗氧化活性;鉴定;粉红粘帚霉

## Screening and Identification of Endophytic Fungi from *Schisandra chinensis* with Antioxidant Activity

ZHAO Yue, QIN Yuan, LI Na, LI Zhi-peng, FAN Zhi-qiang, YU Xiang-yong, JIA Jing-ming (School of TCM, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To screen and identify endophytic fungi from *Schisandra chinensis* with antioxidant activity. METHODS: The tissue isolation skill was used to isolate endophytic fungi from roots, leaves, stems and fruits of *S. chinensis*. And antioxidant activity of endophytic fungi were screened by DPPH radical scavenging assay and hydroxyl radical scavenging assay. The total DNA were extracted; the 18S rDNA ITS were amplified and sequenced with primer ITS1 and ITS4; the results of sequencing were analyzed comparatively based on homology to confirm the classification of active strains. RESULTS: 23 strains were isolated from *S. chinensis*. GSR-12, isolated from roots of *S. chinensis*, had strong antioxidant activities. The scavenging rate on DPPH and the hydroxyl radical were 87.96% and 82.31% respectively. GSR-12 strain was identified as *Clonostachys rosea* by analyzed comparatively. CONCLUSIONS: 1 strain of *C. rosea*, isolated from roots of *S. chinensis*, has strong antioxidant activity.

**KEYWORDS** *Schisandra chinensis*; Endophytic fungi; Antioxidant activity; Identification; *Clonostachys rosea*

用有关。

## 参考文献

- [1] 杨延坤,孙鑫,郑宏.糖萼的内皮保护作用与动脉粥样硬化[J].中国动脉硬化杂志,2013,21(4):381.
- [2] Jeon KI, Xu X, Aizawa T, et al. Vinpocetine inhibits NF-kappaB-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(21):9 795.
- [3] Saito K, Miyazawa M, Nukada Y, et al. Development of an in vitro skin sensitization test based on ROS production in THP-1 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(2):857.
- [4] Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke[J]. *Nat Med*, 2002, 8(12):1 363.
- [5] 黎创幸.丹酚酸B与三七总皂苷配伍对缺氧复氧内皮细胞黏附分子-1表达及对中性粒细胞与内皮细胞黏附率的影响研究[J].中国药房,2006,17(14):1 061.
- [6] Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(8):1 517.
- [7] Jia Z, Nallasamy P, Liu D, et al. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF- $\alpha$ -induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing IKB $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(3):293.
- [8] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(7):1 715.
- [9] 贾萍,荣晓凤,丁燕,等.芍药总苷调控巨噬细胞核因子- $\kappa$ B p65蛋白核转移作用的研究[J].中国药房,2007,18(36):2 811.
- [10] Huang CS, Lin AH, Yang TC, et al. Shikonin inhibits oxidized LDL-induced monocyte adhesion by suppressing NF $\kappa$ B activation via up-regulation of PI3K/Akt/Nrf2-dependent antioxidation in EA.hy926 endothelial cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 93(3):352.

\* 讲师,博士。研究方向:药用菌物资源。电话:024-23986501。E-mail:zhaoyue82@126.com

# 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:珍稀濒危药用植物及药用菌物资源。电话:024-23986501。E-mail:jjajingming@163.com

(收稿日期:2015-03-06 修回日期:2015-05-15)

(编辑:邹丽娟)

北五味子[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.]为木兰科多年生落叶藤本植物,药用部位为干燥成熟果实。其主产于东北三省,为辽宁地道药材,又称“辽五味”,具有保肝、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤及免疫促进等作用<sup>[1]</sup>。由于其显著的药用和保健价值,使其野生资源遭遇大肆采挖,日益稀少。目前,野生北五味子已被列为我国三级重点保护的药用植物物种,市场供给主要依赖人工栽培<sup>[2]</sup>。

植物内生真菌是指生活史的某一阶段或全部阶段存在于健康植物的各种组织或器官内部,而不会使宿主植物表现出明显病害症状的真菌<sup>[3]</sup>。在与宿主长期的共同进化中,内生真菌往往能产生与宿主相同的次生代谢产物,并表现出与宿主相似的药理活性。对药用植物内生真菌加以开发利用,可以在一定程度上缓解天然药物的来源紧张及濒临灭绝植物的保护问题。因此,越来越多的学者致力于药用植物内生真菌的药理活性及次生代谢产物研究<sup>[4]</sup>。

自由基是机体氧化反应中产生的一类有害化合物,具有较强的氧化性,可导致机体组织和细胞的损害,进而引起衰老效应及众多疾病<sup>[5]</sup>。目前,抗氧化剂的发现大多从植物中筛选,从植物内生真菌中筛选抗氧化剂的研究刚刚起步。从八角<sup>[6]</sup>、桂花树<sup>[7]</sup>、宁夏枸杞<sup>[8]</sup>、粉背雷公藤<sup>[9]</sup>、乌拉尔甘草<sup>[10]</sup>、蒺藜<sup>[11]</sup>等植物中均分离得到了具有较强抗氧化活性的内生真菌。以上信息均表明,植物内生真菌是天然抗氧化剂的潜在资源。

基于此,本研究以辽宁地区野生北五味子根、茎、叶及果实中的内生真菌为研究对象,筛选具有抗氧化活性的内生真菌,为寻找新的抗氧化活性物质提供理论基础,并为北五味子资源的可持续开发利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LDZM-80KZS-11型高压蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);ME204E型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SW-ZJ-2D型超净工作台(上海树立仪器仪表有限公司);ZQLY-300F型振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司);SPX-8085H-11型生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);TGL-18R型冷冻高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);ZF-1型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司);N-1100型旋转蒸发仪、ZA-1115A型冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司)。

### 1.2 药材、药品、试剂、培养基

野生北五味子根、茎、叶、果实等健康组织分别于2014年5—9月采集自辽宁省本溪市关门山,采集后4℃保存,24 h内进行处理。经沈阳药科大学中药资源学教研室贾景明教授鉴定为木兰科植物北五味子[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.]。

葡萄糖原料药(批号:20141107,分析纯)、30%过氧化氢溶液(批号:20150322,分析纯)均来源于天津博迪化工股份有限公司;抗坏血酸原料药(批号:200-006-2,纯度:>99%)、氨苄青霉素原料药(批号:69-52-3,纯度:>99%)均来源于上海生工生物工程有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(日本TCI公司,批号:217-591-8,纯度:>97%);水杨酸原料药(美国Sigma-Aldrich公司,批号:S5922,纯度:>99%);琼脂(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20140326);FeSO<sub>4</sub>、次氯酸钠、乙酸乙酯、甲醇均为分析纯。

真菌基因组DNA快速抽提试剂盒(美国Omega公司,批号:D3390-01);通用引物ITS1(Internal transcribed space-1, 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')均由上海生工生物工程有限公司合成。

分离培养基(自制),即马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯200 g,煮沸30 min后过滤取汁,加入葡萄糖原料药20 g、琼脂15 g、去离子水1 000 ml,高压灭菌备用。使用前添加氨苄青霉素原料药。液体发酵培养基(自制),即马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB):马铃薯200 g,煮沸30 min后过滤取汁,加入葡萄糖原料药20 g、去离子水1 000 ml,高压灭菌备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 内生真菌的分离纯化

2.1.1 内生真菌的分离纯化方法 采用组织分离法<sup>[12]</sup>。取新鲜健康的北五味子根、茎、叶和果实,用清水洗净后,表面消毒。75%乙醇浸泡30~60 s,无菌水漂洗3次,2%次氯酸钠浸泡3~4 min,无菌水漂洗5~6次,无菌滤纸拭干水分。将消毒后组织用无菌手术刀切去两端,切成0.5 cm的小段或者0.5 cm×0.5 cm的小块,置于PDA平板(内含100 μg/ml氨苄青霉素)上,采用漂洗液检验法<sup>[13]</sup>和组织印迹法<sup>[14]</sup>进行组织表面消毒效果的检验,28℃倒置培养3~7 d。

逐日观察,待切口处长出菌丝时,用接种针挑取菌丝接种至新鲜PDA平板上,待菌落出现后,根据菌落形态、颜色差异及生长速率等,分别挑取各平板上的菌落边缘的菌丝,接于新的平板上进行分离培养。培养物采用菌丝顶端纯化法多次转接至纯培养物。对菌株进行编号,转接至PDA试管斜面上,28℃培养4~7 d,长满后于4℃冰箱保存。

2.1.2 内生真菌的分离纯化结果 在表面消毒效果检验中,最后一次漂洗涂板培养平板及消毒后的组织贴片印迹培养平板中,均未发现有微生物生长,表明组织切片的表面消毒效果良好,证明所分离得到的微生物来源于植物内部的内生真菌而非植物组织表面附生菌或杂菌。

按“2.1.1”项方法对北五味子根、茎、叶及果实健康组织进行分离培养,共纯化获得23株内生真菌,其中从根部分离得到12株(占总分离菌株的52.2%,编号GSR-1~12),从茎部分离得到7株(占总分离菌株的30.4%,编号GSS-1~7),从叶部分离得到3株(占总分离菌株的13.1%,编号GSL-1~3),从果实分离得到1株(占总分离菌株的4.3%,编号GSF-1)。

### 2.2 内生真菌液体发酵培养及样液制备

用接种针从保存斜面中挑取少量菌丝,接种于PDA固体培养基上,置于28℃恒温箱中培养4~7 d,待菌落长至4~5 cm后,在超净工作台中用6 mm打孔器制备菌饼,接种至含100 ml PDB培养基的250 ml锥形瓶中,以未接菌的PDA平板制备的菌片为阴性对照。接种后,于25℃、130 r/min摇床培养7 d,以离心半径为12 cm、4 000 r/min离心20 min,收集上清液,上清液用等量乙酸乙酯萃取3次,浓缩至干,4℃保存。

分别取经以上步骤制成的干燥恒质量的各乙酸乙酯提取物5 mg,甲醇溶解并稀释至50 ml,即得100 μg/ml的各菌株样液,备用。

### 2.3 北五味子内生真菌抗氧化活性测定

2.3.1 内生真菌抗氧化活性测定方法 (1)DPPH自由基清除率的测定<sup>[15]</sup>。吸取0.1 ml各菌株样液,加入3.9 ml的1.0×10<sup>-4</sup>

mol/L的DPPH溶液(95%乙醇为溶剂)。从加入DPPH溶液开始计时,室温下避光放置90 min后,517 nm波长处测定吸光度(以95%乙醇调零),记为 $A_1$ 。另取0.1 ml甲醇代替样液同上操作,吸光度记为 $A_0$ 。试验重复3次取平均值。按下式计算清除率(%): $(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。以接种空白菌片的样液为阴性对照,以50  $\mu\text{g/ml}$  抗坏血酸溶液为阳性对照。(2)羟自由基清除率的测定<sup>[11]</sup>。用 $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ 产生羟自由基,以羟自由基氧化水杨酸所得产物的吸光度值表示羟自由基的多少,吸光度值越大,羟自由基就越多。在10 ml试管中依次加入6 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  1 ml、6 mmol/L水杨酸甲醇溶液1 ml后,将不同菌株的样液1 ml(制备方法同“2.2”项下)分别加入试管中,然后加入0.1%的 $\text{H}_2\text{O}_2$  1 ml,总体积5 ml,以双蒸水补足体积,摇匀后在37  $^\circ\text{C}$ 水中温育30 min,在510 nm波长处测定吸光度值,记为 $A_i$ ;以甲醇代替样液作为空白对照,吸光度值记为 $A_{\text{max}}$ ;以双蒸水代替 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液作为样品本底吸收,吸光度值记为 $A_0$ 。试验重复3次取平均值。按下式计算羟自由基的清除活性,清除率(%): $[A_{\text{max}} - (A_i - A_0)/A_{\text{max}}] \times 100\%$ 。以接种空白菌片的样液为阴性对照。

2.3.2 内生真菌抗氧化活性测定结果 按“2.3.1”项下方法测定各菌株发酵液粗提物对DPPH自由基和羟基自由基的清除率,考察其抗氧化活性,结果见表1。

表1 北五味子内生真菌发酵液粗提物的抗氧化活性( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 1 Antioxidant activity of crude extract of fermentation broth of endophytic fungi isolated from *S. chinensis* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 分离部位 | 菌株编号   | DPPH自由基清除率, %    | 羟基自由基清除率, %      |
|------|--------|------------------|------------------|
| 阴性对照 |        | 8.52 $\pm$ 1.35  | 2.33 $\pm$ 1.07  |
| 根    | GSR-1  | 20.77 $\pm$ 1.11 | 19.83 $\pm$ 2.49 |
| 根    | GSR-2  | 22.8 $\pm$ 1.03  | 29.79 $\pm$ 1.38 |
| 根    | GSR-3  | -                | 27.55 $\pm$ 2.21 |
| 根    | GSR-4  | -                | -                |
| 根    | GSR-5  | 45.69 $\pm$ 2.74 | -                |
| 根    | GSR-6  | -                | 30.08 $\pm$ 3.75 |
| 根    | GSR-7  | 41.37 $\pm$ 3.68 | 17.64 $\pm$ 2.81 |
| 根    | GSR-8  | 59.61 $\pm$ 1.49 | 70.92 $\pm$ 1.88 |
| 根    | GSR-9  | 86.05 $\pm$ 1.97 | 36.72 $\pm$ 2.30 |
| 根    | GSR-10 | -                | -                |
| 根    | GSR-11 | 39.24 $\pm$ 1.41 | 68.43 $\pm$ 1.51 |
| 根    | GSR-12 | 87.96 $\pm$ 1.76 | 82.31 $\pm$ 1.04 |
| 茎    | GSS-1  | 73.11 $\pm$ 2.28 | 85.08 $\pm$ 1.19 |
| 茎    | GSS-2  | -                | 17.63 $\pm$ 1.45 |
| 茎    | GSS-3  | 20.92 $\pm$ 4.06 | 28.95 $\pm$ 2.30 |
| 茎    | GSS-4  | 22.47 $\pm$ 1.67 | -                |
| 茎    | GSS-5  | 69.42 $\pm$ 1.96 | -                |
| 茎    | GSS-6  | 38.67 $\pm$ 1.32 | 14.85 $\pm$ 1.88 |
| 茎    | GSS-7  | -                | 36.18 $\pm$ 3.71 |
| 叶    | GSL-1  | 20.73 $\pm$ 1.19 | 46.33 $\pm$ 1.84 |
| 叶    | GSL-2  | 39.98 $\pm$ 4.02 | 27.14 $\pm$ 1.66 |
| 叶    | GSL-3  | 28.72 $\pm$ 2.63 | 17.36 $\pm$ 4.31 |
| 果    | GSF-1  | 40.11 $\pm$ 1.94 | 18.92 $\pm$ 1.77 |
| 阳性对照 | 抗坏血酸   | 48.95 $\pm$ 1.68 | 30.13 $\pm$ 3.02 |

注:“-”表示无自由基清除活性

Note:“-” means no radical scavenging activity

表1结果表明,各菌株对DPPH自由基和羟基自由基的清除能力略有差异。多数菌株发酵液粗提物对DPPH自由基和羟基自由基均有一定的清除能力。

全部菌株中,DPPH自由基清除率大于抗坏血酸(50  $\mu\text{g/ml}$ ,下同)的菌株有5株,约占分离菌株总数的21.74%;其中活性最强的为分离自根部的GSR-12和GSR-9,其DPPH自由基清除率分别为87.96%和86.05%。从根部分离得到的12株内生真菌中,其DPPH自由基清除率平均值为33.62%,有3株的DPPH自由基清除率大于抗坏血酸,占根部菌株总数的25.00%,其中2株的DPPH自由基清除率大于80%。从茎部分离得到的7株内生真菌中,其DPPH自由基清除率平均值为32.08%,有2株的DPPH自由基清除率大于抗坏血酸,占茎部菌株总数的28.57%,无DPPH自由基清除率大于80%的菌株。从叶部分离得到的3株内生真菌中,其DPPH自由基清除率平均值为29.81%,无DPPH自由基清除率大于抗坏血酸的菌株。从果实中分离得到的1株内生真菌DPPH自由基清除率小于抗坏血酸。

全部菌株中,羟基自由基清除率大于抗坏血酸的菌株有7株,约占分离菌株总数的30.43%;其中活性最强的为分离自茎部的GSS-1和分离自根部的GSR-12,其羟基自由基清除率分别为85.08%和82.31%。从根部分离得到的12株内生真菌中,其羟基自由基清除率平均值为31.94%,有4株的羟基自由基清除率大于抗坏血酸,占根部菌株总数的30.00%,其中1株的羟基自由基清除率大于80%。从茎部分离得到的7株内生真菌中,其羟基自由基清除率平均值为32.08%,有2株的羟基自由基清除率大于抗坏血酸,占茎部菌株总数的28.57%,其中1株的羟基自由基清除率大于80%。从叶部分离得到的3株内生真菌中,其羟基自由基清除率平均值为30.28%,其中1株的羟基自由基清除率大于抗坏血酸。从果实中分离得到的1株内生真菌羟基自由基清除率小于抗坏血酸。

以上结果显示,野生北五味子根、茎、叶及果实不同部位的内生真菌抗氧化活性略有差异。根部分离得到的内生真菌,其DPPH自由基清除活性平均值略高于其他部位的内生真菌;茎部分离得到的内生真菌,其羟基自由基清除活性平均值略高于其他部位的内生真菌;而叶和果实中分离得到的内生真菌,其DPPH自由基及羟基自由基清除活性均低于根及茎部的内生真菌。

综合DPPH自由基和羟基自由基清除试验结果可知,23株北五味子内生真菌中,菌株GSR-12和GSR-9具有较强的DPPH自由基清除活性,菌株GSS-1和GSR-12具有较强的羟基自由基清除活性,其中2株分离自北五味子根部,1株分离自茎部。其中,分离自根部的内生真菌GSR-12的DPPH自由基和羟基自由基清除能力均较强,故以下选择GSR-12进行分子生物学鉴定。

## 2.4 菌株GSR-12的分子生物学鉴定

2.4.1 菌株GSR-12的分子生物学鉴定方法 利用18S rDNA ITS序列测定及比对分析的方法,对“2.3.2”项下筛选获得的具有较强抗氧化活性的菌株GSR-12进行鉴定。用接种针从保存斜面中挑取少量菌丝点种于PDA平板上,置于28  $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养7 d后,刮取适量菌丝,使用真菌基因组DNA快速提取试剂盒,进行GSR-12的菌株总DNA提取。以提取的总

DNA为模板,采用18S rDNA ITS序列扩增通用引物ITS1、ITS4进行聚合酶链反应(PCR)扩增。反应在50 μl的体系中进行,其中包括:2×Master Mix(PCR扩增体系中的反应混合液)25 μl,模板DNA 2 μl,10 μmol/L引物ITS1和ITS4各2 μl,双蒸水19 μl。扩增反应程序为:94℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min;72℃后延伸7 min,35个循环。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,送北京金唯智生物科技公司进行序列测定。所得序列在NCBI/GenBank数据库中进行BLAST同源性分析。

2.4.2 菌株GSR-12的分子生物学鉴定结果 所得rDNA ITS序列如下:GATTTGGCGTGGACTTCACTCCAACCCATGTGAACATACTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGC-GCCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCTAGGAAAC-TCAACTCTTGTGTTTATTTTGAATCTTCTGAGTAGTTTTTA-CAAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTC-TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT-GTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC-GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT-CTGAGCGTCATTTCAACCCCTATGCCCTAGGGCGTGGT-GTTGGGGATCGGCCAAAGCCCGCGAGGGACGGCCGGCC-CCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCTCTGCG-AAGTAGTGATATTCCGCATCGGAGAGCGACGAGCCCTG-CCGTTAAACCCCAACTTTCCAAGGTTGACCTCAGATCA-GGTAGGAATACCCGCTGAAGTTAAGCATATCAAAGCCG-GGGAGAGAA。将测序结果在NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上进行BLAST比对分析,发现菌株GSR-12扩增片段的碱基序列与GenBank中*Clonostachys rosea*的rDNA ITS序列(序列号为KJ540089.1)同源性高达99%,由此证明所筛选的抗氧化菌株为粉红粘帚霉(*Clonostachys rosea*)<sup>[16]</sup>。

### 3 讨论

化学合成的抗氧化剂具有一定的毒性和致畸性,这使人们的注意力集中于寻找天然高效的抗氧化剂。近年来的研究表明,很多药用植物内生真菌具有较好的抗氧化、清除自由基的活性,从而成为了天然抗氧化物质的新来源<sup>[6]</sup>。

在天然抗氧化剂的研究开发中,抗氧化活性的评价是其至关重要的一环。目前常用的体外评价抗氧化活性的方法中,根据抗氧化剂对自由基的清除能力来反映其抗氧化活性,是较为常见的方法<sup>[17-18]</sup>。

体外检测抗氧化剂清除自由基方法中以清除DPPH自由基最为常见<sup>[19]</sup>。DPPH自由基是一种在氮氮连接键上含有不对称价电子的氮族自由基,其能稳定存在,在517 nm波长处有最大吸收值,易与具有氢键供体的化合物发生电子转移反应。DPPH自由基清除能力的测定方法最早由Blois MS<sup>[20]</sup>提出,后经大量试验,已成为评价抗氧化活性的一种常用方法。羟基自由基是活性氧中最活泼的自由基,也是毒性最大的自由基,几乎能与活细胞中任何分子发生反应,且反应速度极快。对羟基自由基清除能力的测定,是评价抗氧化能力的重要组成部分<sup>[21]</sup>。因此,笔者选择DPPH自由基清除活性和羟基自由基清除活性作为评价北五味子内生真菌的抗氧化能力的指标。

本试验从北五味子的根、茎、叶及果实中分离出23株内生真菌,考察了其发酵液乙酸乙酯提取物对DPPH自由基和羟基

自由基的清除性能。研究结果显示,分离自北五味子根部的菌株GSR-12发酵液的乙酸乙酯提取物具有较强的抗氧化活性,其发酵液粗提取物对DPPH自由基清除率为87.96%,对羟基自由基清除率为82.31%。可将其作为优良菌株进行进一步研究。分子鉴定结果显示,GSR-12为粉红粘帚霉(*Clonostachys rosea*)。

综合以上试验结果,笔者认为北五味子内生真菌是筛选天然抗氧化活性成分或先导化合物的潜在资源,这为开发抗氧化剂提供了新的来源。课题组后期将继续对这些菌株的抗氧化能力作进一步研究,以期开发出安全、低毒、高效的抗氧化剂。

### 参考文献

- [1] 韩志福.北五味子质量评价研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2013.
- [2] 李宝岩.五味子资源调查与品质评价[D].沈阳:辽宁中医药大学,2008.
- [3] Jin H, Yan ZQ, Yang XY, et al. Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern china[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 104(6): 949.
- [4] Pu X, Qu XX, Chen F, et al. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification and fermentation conditions optimization for camptothecin production[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(21): 9365.
- [5] 郭锡春, 高华, 刘坤, 等. 海参精囊两种提取物对环磷酰胺诱导的小鼠睾丸氧化损伤的保护作用[J]. *中国药房*, 2015, 26(4): 497.
- [6] 李海云, 阮贵华, 李子院. 八角内生真菌的分离及其抗氧化活性初步研究[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(24): 181.
- [7] 李海云, 阮贵华, 李子院, 等. 桂花树内生真菌的分离及其抗氧化抑菌活性[J]. *桂林理工大学学报*, 2014, 34(1): 138.
- [8] 刘建利. 宁夏枸杞内生真菌的分离及抗氧化活性的测定[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4): 857.
- [9] 朱欣婷, 刘云, 李常春. 粉背雷公藤内生真菌抗氧化活性的初步研究[J]. *中国民族民间医药*, 2012, 21(18): 46.
- [10] 于海宁, 姚振, 高源, 等. 抗氧化乌拉尔甘草内生菌株的筛选及鉴定[J]. *浙江工业大学学报*, 2014, 42(1): 63.
- [11] 刘雅莉, 黄一泓, 武文斌, 等. 蒺藜内生真菌抗氧化活性菌株的筛选[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(4): 435.
- [12] 方中达. *植病研究法*[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 132-133.
- [13] McInroy JA, Klopper JW. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn[J]. *Plant and Soil*, 1995, 173(2): 337.
- [14] Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, et al. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth[J]. *Biol Fertil Soils*, 1997, 25(1): 13.
- [15] Li HY, Hao ZB, Wang XL, et al. Antioxidant activities of

# 酮咯酸氨丁三醇眼用凝胶剂对兔金黄色葡萄球菌性角膜溃疡的保护作用

胡芳<sup>1\*</sup>, 徐婷君<sup>2</sup>(1.嘉兴市第二医院眼科, 浙江嘉兴 314000; 2.平湖市第一人民医院眼科, 浙江平湖 314200)

中图分类号 R965;R988.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4388-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.22

**摘要** 目的:研究酮咯酸氨丁三醇眼用凝胶剂对兔金黄色葡萄球菌性角膜溃疡的保护作用。方法:采用角膜实质层接种法复制家兔金黄色葡萄球菌性角膜溃疡模型,随机分为模型组、阳性对照(克拉霉素眼用凝胶)组和凝胶剂高、中、低剂量(酮咯酸氨丁三醇眼用凝胶剂120、80、40 mg/ml)组,每组20只,每日滴药1次,每次1滴。连续给药2周后观察各组家兔角膜病变情况,并对角膜评分和疗效进行比较;显微镜下观察家兔视网膜变化。结果:与模型组比较,阳性对照组和凝胶剂各剂量组家兔给药后角膜评分减小、总有效率增加,且凝胶剂高、中剂量组效果优于阳性对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。本实验对家兔视网膜无影响。结论:酮咯酸氨丁三醇眼用凝胶剂对家兔金黄色葡萄球菌性角膜溃疡具有保护作用。

**关键词** 酮咯酸氨丁三醇;眼用凝胶剂;金黄色葡萄球菌;角膜溃疡;家兔

## Protective Effects of Ketorolac Tromethamine Ophthalmic Gel against *Staphylococcus aureus* Corneal Ulcer in Rabbits

HU Fang<sup>1</sup>, XU Ting-jun<sup>2</sup>(1.Dept. of Ophthalmology, the Second Hospital of Jiaxing City, Zhejiang Jiaxing 314000, China; 2.Dept. of Ophthalmology, Pinghu First People's Hospital, Zhejiang Pinghu 314200, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study protective effects of Ketorolac tromethamine ophthalmic gel against *Staphylococcus aureus* corneal ulcer in rabbits. METHODS: *S. aureus* corneal ulcer in rabbits model was induced by corneal substance layer inoculation, and then divided into model group, positive control group (Clarithromycin ophthalmic gel), gel high-dose, medium-dose and low-dose groups (Ketorolac tromethamine ophthalmic gel 120, 80, 40 mg/ml), with 20 rabbits in each group. They were given relevant medicine, once a day for 2 weeks. The keratopathy of rabbits was observed; the clinical efficacy and keratopathy score were compared. The change of retina was observed under microscope. RESULTS: Compared with model group, the keratopathy score decreased while total effective rate increased in positive control group and gel groups after medication, and the effects of gel high-dose and low-dose groups were significantly lower than that of positive control group, with statistical significance ( $P<0.05$ ). The retina of rabbits had not affected by the experiment. CONCLUSIONS: Ketorolac tromethamine ophthalmic gel has protective effect against *S. aureus* corneal ulcer in rabbits.

**KEYWORDS** Ketorolac tromethamine; Ophthalmic gel; *Staphylococcus aureus*; Corneal ulcer; Rabbit

角膜溃疡是一种临床上常见的发病于眼球前层薄膜处的溃疡性病损,其发病原因较多且极其复杂,除严重的外伤或者

感染外,也可并发于结核或面瘫等<sup>[1]</sup>。临床上最为常见的类型主要为金黄色葡萄球菌性角膜溃疡,顾名思义,其发病原因因为

=====

- extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance[J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(2):970.
- [16] Abreu LM, Moreira GM, Ferreira D, et al. Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Fungal Biol*, 2014, 118(12):1 004.
- [17] 刘微微,任虹,曹学丽,等.天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展[J]. *食品科学*, 2010, 31(17):415.
- [18] 曾维才,石碧.天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J]. *化工进展*, 2013, 32(6):1 205.
- [19] 李铨军,崔胜云.抗坏血酸清除DPPH自由基的作用机理[J]. *食品科学*, 2011, 32(1):86.
- [20] Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical[J]. *Nature*, 1958, 181(4 617):1 199.
- [21] 王征帆.清除羟基自由基法评价水果抗氧化能力[J]. *光谱实验室*, 2013, 30(1):151.

\* 主治医师。研究方向:角膜病及斜弱视诊治。电话:0573-82055945。E-mail:monica\_111@163.com

(收稿日期:2015-06-23 修回日期:2015-09-06)  
(编辑:刘 萍)