

镰刀菌 *Fusarium* sp. JN 158 色素的鉴定 及其抗肿瘤活性

郑里翔^{1,2}, 蔡宇杰¹, 徐敏娟², 李昌伟¹,
王巧凤², 王月², 孟宪明², 廖祥儒^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江西中医药大学 基础医学院, 江西 南昌 330004)

摘要: 通过对镰刀菌发酵所产色素的分离及结构的分析, 筛选其抗肿瘤的活性成分。采用形态与分子生物学方法对镰刀菌株鉴定, 利用 HPLC 的对该菌株发酵所产的色素进行分离, 分离的产物用紫外、红外、核磁进行结构鉴定, 使用 MTT 的方法筛选抗肿瘤的活性成分。结果表明: 该镰刀菌所产色素共 6 个不同的峰, 相对分子质量均在 380 左右, 其中 VI 号峰结构新颖, 为花青苷类色素, 分子式为 C₁₇H₁₈O₁₀, 能抑制 A539、MCF-7、MKN-45、HepG2、SW620 五种不同肿瘤细胞的增殖, 并呈现浓度的依赖性, 其中 MCF-7 乳腺癌细胞抑制最明显 ($P < 0.01$), 故 VI 号峰色素可能是一种很有前景的防治乳腺癌的化合物。

关键词: 镰刀菌; 色素; 结构; 抗肿瘤

中图分类号: R 915 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)02—0463—07

Pigment Production by Fermentation of *Fusarium* (*Fusarium* sp. JN158) and It's Anti-Cancer Activity

ZHENG Lixiang^{1,2}, CAI Yujian¹, XU Minjuan², LI Changwei¹,
WANG Qiaofeng², WANG Yue², MENG Xianming², LIAO Xiangru^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Basic Medicine, Jiangxi University, Nanchang 330004, China)

Abstract: Through the separation and structural analysis of the pigment produced by *Fusarium* fermentation, the research aims to screen the anti-tumor active components. *Fusarium* was identified by using morphological and molecular biology methods. The pigment was isolated by HPLC, the production structure was identified by UV, IR, NMR, and the screening of anti-tumor activity was by MTT. The results showed that the pigment from *Fusarium* produced a total of six different peaks, the molecular weight is about 380, the VI peak, which is the anthocyanins, can inhibit the A539,

收稿日期: 2014-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(8116031); 国家级大学生创新创业项目(2013)。

作者简介: 郑里翔(1965—), 男, 江西南昌人, 医学硕士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事分子肿瘤方面的研究。E-mail: zlx000168@126.com

* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 江西赣州人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程方面的研究。

E-mail: 13771104596@163.com

MCF-7, MKN-45, HepG2, SW620 five different tumor cell proliferation in a concentration-dependent manner, among them MCF-7 breast cancer cells were inhibited most ($P < 0.01$), so the VI compound with a new structure from *Fusarium* sp JN 158, may be a good treatment for breast cancer.

Keywords: *Fusarium*, pigment, structure, anti-tumor

色素广泛应用于食品工业、医药等行业,色素一般分为天然色素和合成色素。天然色素主要来源于植物、动物和微生物等,一般具有营养保健功能;合成色素虽然有很多优点,但有毒性和致癌性,因此,合成色素正逐渐被天然色素取代。微生物色素是天然色素的重要发展方向,可以不受季节、材料等限制,可连续不断的发酵生产,能满足日益增加的社会需求,而且大部分微生物色素具有一定的生物学活性^[1-4]。

镰刀菌作为一类在自然界中广泛存在和分布的真菌微生物,对其研究主要集中在致病机理上。近年来,随着人们对于天然色素需求的增加,对镰刀菌所产的色素也引起人们的关注,开发利用也逐渐增加^[5-6]。而镰刀霉菌产色素抗肿瘤的报道很少。作者将传统的形态学方法与现代分子生物学技术相结合,对该镰刀菌进行了鉴定;同时对镰刀菌所产的色素进行分离和结构的鉴定,并对部分成分进行抗肿瘤的活性研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 仪器 超净工作台 (SW-CJ-1f): 苏州净化厂; 回转式恒温摇床 (HZC-250): 广州医疗器材厂; 恒温恒湿培养箱 (LHS-250 HC): 苏州医疗器材厂; 分光光度计 (UV-3000): 日本日立公司; 立式压力蒸汽灭菌锅 (YXD-LS-60): 江苏仪器厂; 液质联用仪 (Waters Platform ZMD4000): 美国 waters 公司; 核磁共振仪 (AVANCE III 400 MHz): 傅立叶红外光谱仪 (NICOLET NEXUS 470): 美国; 冷冻干燥机 (EZ585Q): 江苏吴中; 扫描电子显微镜 (Quanta-200): 日本三菱。

1.1.2 试剂 葡萄糖、果糖、乳糖、D-半乳糖、甘油、蔗糖、麦芽糖、尿素、硫酸铵、丙酮、氯仿、无水乙醇、盐酸、异丙醇、二甲基亚砜 (DMSO)、柠檬酸、苯甲酸钠、三氟乙酸 (TFA), 以上均为分析纯, 购自上海国

药集团; 四甲基偶氮唑盐 (MTT): 购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 镰刀霉菌培养基

1) PDA 斜面培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, pH 自然;

2) 种子培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, pH 自然;

3) 液态发酵培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 牛肉膏 3, pH 自然。

1.2.2 菌株的形态学特征 将供试菌株接种在培养基平板上, 30 °C 培养, 对病原菌在培养基上的菌落形态、生长情况、颜色以及孢子形状、大小、产孢结构等进行观察, 将菌株的菌丝、孢子用电子显微镜及光学显微镜 (石炭酸-棉蓝染色) 观察, 并拍照记录, 并依据镰刀菌的分类系统^[7-9], 对镰刀菌菌株进行鉴定。

1.2.3 菌株的分子生物学鉴定 采用 CTAB 法^[10]提取镰刀菌基因组 RNA, 使用真菌 26 rRNA 基因间隔区通用引物 (ITS1/ITS4)^[11], 对镰刀菌分离物的基因组 rRNA 进行 PCR 扩增, 序列全长为 606 bp, 测序, 获得的 ITS 序列在 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行同源性比较。

1.2.4 镰刀霉菌的培养及色素提取 从斜面培养基上挑取一小块菌落, 转接到有种子培养基的三角瓶 (250 mL 三角瓶中装液量 50 mL), 30 °C 下旋转式摇床以 200 r/min 的转速培养 36 h, 以 5% 的接种体积分数接种到 50 L 的发酵罐中发酵 72 h。

发酵液经 10 000 g 离心 10 min, 收集紫色菌体, 加入 4 倍体积的 95% 酸性乙醇溶液 (乙醇-盐酸=9:1) 浸提过夜, 得到色素提取液, 用 1 mol/L NaOH 调 PH 至 7.8 左右, 离心得到紫色沉淀, 即得色素粗品。

1.2.5 色素的 HPLC 分离 分离条件: 色谱柱 Pheceda C18 (5 μm, 4.6 mm×250 mm), 柱温 25 °C;

DAD 检测器检测波长 254 nm; 流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L, 流动相 A 为含体积分数 0.1% TFA (氟乙酸) 的乙腈, 流动相 B 为含体积分数 0.1% TFA 的蒸馏水, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度程序

Table Gradient program of mobile phase

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	2.0	98.0
3.00	6.0	94.0
3.10	45.0	55.0
28.00	70.0	30.0
32.00	80.0	20.0

1.2.6 镰刀霉菌发酵产紫色素结构的分析

1) 紫外光谱分析: 取紫色素纯品 2 mg 溶于乙腈-三氟乙酸 (10:1) 中, 通过 Waters Platform ZMD4000 进行液质分析, 液相扫描选择的波长为 200~750 nm, 然后利用 Masslynx V4.1 软件分析出该色素紫外图谱。

2) 红外光谱分析 (IR): 取紫色素纯品 2 mg, 与 200 mg 干燥的 KBr 研磨混匀, 用傅立叶变换红外光谱仪在 4 000~400 cm^{-1} 区间扫描, 扫描次数: 32 次, 分辨率: 4 cm^{-1} 。

3) 核磁共振 (NMR) 分析: 用氘代三氟乙酸将待测样品溶于 5 mm 标准的 NMR 管中, 加入少量 TMS 作为基准参照物进行测定。

1.2.7 MTT 比色法测定色素对不同肿瘤细胞增殖的影响 用含 10% 胎牛血清的完全培养基, 培养肺癌细胞 A539、乳腺癌 MCF-7、人胃癌细胞 MKN-45、肝癌 HepG2 细胞株、大肠癌细胞株 SW620 等 5 种不同的细胞株 (上述细胞均购于上海细胞所), MTT 方法参照文献[12], 将制好的含细胞的完全培养液加入 96 孔培养板中, 色素终浓度分别为 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入含等体积盐酸乙醇的新鲜完全培养液 200 μL ; 阳性药物乌苯美司终浓度为 (IC_{50}) 10 mmol/L, 对照组含 1% 的醋酸培养液^[13]。每组均为 15 个复孔, 选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 (A)。

1.3 统计学方法

应用 SPSS11.5 统计软件进行数据处理, 数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。两组间比较将采用 LSD、Hochberg's GT_2 、Games-Howell 统计学方法进行统计处理。取 $\alpha=0.05$ 做为显著性检验标准, 以 $P<0.05$

为差异有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 平板生长特性

将镰刀菌株接种于 PDA 固态培养基的平皿中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 观察菌体生长状态。培养 3~4 d 后, 菌落中央的菌丝体顶部呈白色丛毛突起, 菌落边缘整齐, 菌丝体呈白色绒毛状, 菌落背面呈紫色; 7~8 d 后, 气生菌丝发达, 密集丛立, 少匍匐, 菌落致密, 质地呈棉絮状平展, 菌落上有一层白色孢子, 菌落和培养基紧密连接, 难以挑取, 无渗出液, 无特殊气味。

2.2 显微形态特征

镜下观察发现透明分隔状菌丝, 有顶生、间生的厚壁孢子和较多肾形小分生孢子, 呈头状着生于不分支的分生孢子梗上, 大分生孢子多见, 呈镰刀状, 两头尖, 2~4 个分隔, 无足细胞或顶端突起。根据菌体形态特征的研究, 查阅《真菌鉴定手册》^[14] 和《中国真菌志》^[15], 初步鉴定菌株为镰刀霉菌 JN158。

2.3 镰刀菌株 JN158 的 rRNA 基因间隔序列测定

通过 PCR 扩增得到的 26S rRNA 基因间隔序列的 D1/D2 区, 序列全长为 606 bp, 见图 1。经 GenBank, 其登录号为 HQ265299。根据 BLAST 结果, 取相似度较高的序列列表, 见表 2。通过表 2 的分析发现, 与 *Fusarium* sp 的 26S rRNA 基因其相似度为 100%, 因此结合菌株的形态特征, 确定菌株 JN158 属于镰刀霉菌属, 命名为 *Fusarium* sp JN158。

2.4 利用 HPLC 对 *Fusarium* sp. JN158 产色素的分离纯化

本实验 HPLC 选用 C_{18} 柱, 对色素分离效果较好, 由图 2 可看出有 6 个峰, 与 LC/MS 分析的出峰数基本上一致 (数据未显示), 分别标记成 I~VI (图 2a), VI 峰的峰相对最高 (图 2b), 与周围杂峰距离也较远, 该组分较易分离纯化, 所以只对这一组分进行了制备。

2.5 *Fusarium* sp. JN158 紫色素结构的鉴定

2.5.1 紫色素的紫外光谱分析 早期对有色的有机化合物研究发现, 颜色的发生与分子中存在不饱和基团或体系有关如 >C=C< 、 >C=O 、 —N=N— 、苯环等, 把这些基团或体系称为生色团。紫外光谱仪提供分子中的共轭体系和某些基团的结构信息。通过 LC/MS 的分析, 得到该色素的紫外吸收光谱见图 3。

1 GGTCCTGTT TCAAGACGGG TCGTTGATGG CCATTACGCC AGCATCCTTG CAGATGCGCG
61 AACCTCAGTC CCCCCAGGG TATTACAAA CGGGCTATAA CACTCCCCGA AGAGAGCCAC
121 ATTCCGAAG TCTTTATCCC CCGGGGAAAA CTGATGCTGG CCTGGACTGG AAAAGTGCAC
181 TGGGGAGAAC CCCAGATGAT TAACCAAGCC CAAGTCTGGT CATAAACGCT TCCCTTTCAA
241 CAATTCACG TACTTTTAA CTCTCTTTT AAAGTGCTTT TCATCTTTCG ATCACTCTAC
301 TTGTGCGCTA TCGGTCTCTG GCCGGTATTT AGCTTTAGAA GACATATACC TCCCATTTAG
361 AGCAGCATTC CCAAACACT CGACTCGTCG AAGGAACTTT ACAGAGATTT GGCATCCAAC
421 CAGACGGGGC TCTACCCCTC TATGGCGTCC CGTTCAGGG AACTCGGAAG GCACCGCATC
481 AAAAGTATCC TCTACAAATT ACAACTCGGG CCGGAGAGCC AGATTTCAAA TTTGAGCTGT
541 TGCCGCTTCA CTCGCCGTTA CTAGGGCAAT CCCTGTTGGT TTCTTTTCT CCGCTTATTG
601 ATATGC

图 1 镰刀菌 *Fusarium* JN158 26S rRNA 基因间隔区序列

Fig. 1 Gene sequence of *Fusarium* sp JN158 26S rRNA Spacer

表 2 用于同源比对的镰刀菌 (*Fusarium*)真菌的 RNA 序列

Table 2 RNA sequences from *Fusarium* used for alignment with the new sequence

编号	索引号	分类	描述	覆盖范围/%	同一性/%
1	HQ265299.1	<i>Fusarium</i> sp.	26S ribosomal RNA gene	100	100
2	HF679024.1	<i>Fusarium fujikuroi</i>	IMI 58289 draft genome	100	99
3	KC119203.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	18S ribosomal RNA gene	100	99
4	KC119197.1	<i>Fusarium</i> sp.	18S ribosomal RNA gene	100	99
5	HQ876767.1	<i>Fusarium subglutinans</i>	28S ribosomal RNA gene	100	99
6	HQ332522.1	<i>Fusarium proliferatum</i>	18S ribosomal RNA gene	100	99
7	EU193176.1	<i>Fusarium</i> sp. QJC-1403	28S ribosomal RNA gene	100	99
8	AF291060	<i>Fusarium prolife-ratum</i> NRRL 31071	28S ribosomal RNA gene	100	99
9	AB363766.1	<i>Gibberella moniliformis</i>	large subunit rRNA	100	99
10	FJ613115	<i>Fusarium</i> sp. G7	28S ribosomal RNA gene	100	99

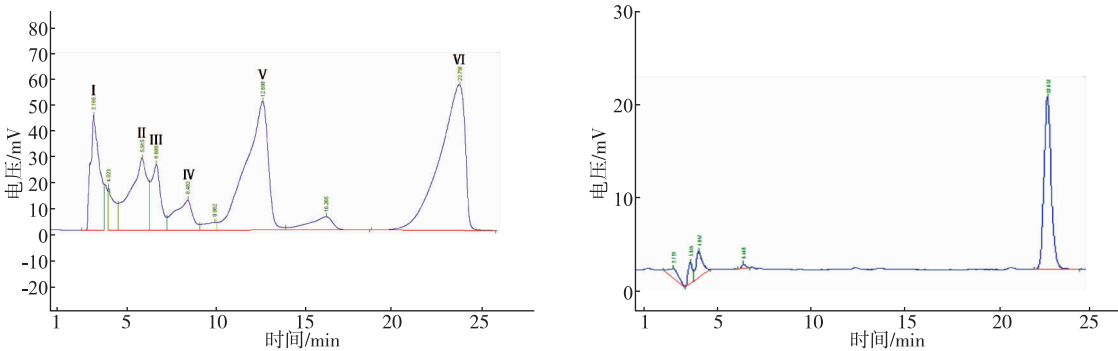


图 2 HPLC 分离色素

Fig. 2 HPLC separate pigment

可以看出,该化合物在紫外区有两条吸收带,分别为 253 nm 和 274 nm,可初步判断该色素是一种带苯环的化合物。

2.5.2 紫色素的质谱分析 一级质谱主要是用于

分析目标分子的相对分子质量,该紫色素的一级质谱图见图 4,可以看出该色素的相对分子质量为 382.0。

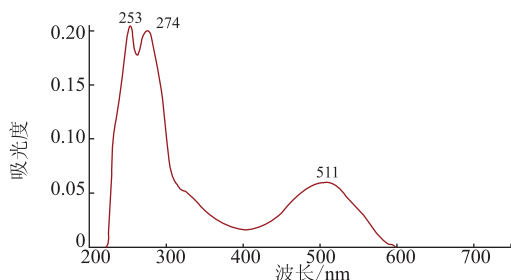


图3 紫色素的光谱扫描图

Fig. 3 Spectrum of purple pigment

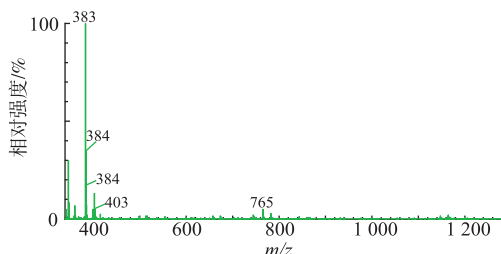


图4 *Fusarium* JN158 紫色素的正离子质谱图

Fig. 4 MS spectra of purple pigment from *Fusarium* JN158

2.5.3 紫色素的红外光谱分析 红外光谱是记录有机分子吸收红外光后产生化学键振动而形成的光谱吸收,测定范围一般为 $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$,常用来确定各种羧基、烷烃、芳环及炔烃等基团的特征吸收峰。基团频率区在 $4\ 000\sim 1\ 300\text{ cm}^{-1}$ 之间,在

$1\ 800\text{ cm}^{-1}(1\ 300\text{ cm}^{-1})\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 区域内,除单键的伸缩振动外,还有因变形振动产生的谱带。 O—H 基的伸缩振动出现在 $3\ 650\sim 3\ 200\text{ cm}^{-1}$ 范围内; $-\text{CH}_2$ 基的吸收峰出现在 $2\ 930\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\ 850\text{ cm}^{-1}$ 附近; C=O 伸缩振动出现在 $1\ 900\sim 1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 范围内;苯的衍生物的泛频谱带,出现在 $2\ 000\sim 1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 范围,是 C—H 面外和 C=C 面内变形振动的泛频吸收;频率范围在 $1\ 500\sim 1\ 300\text{ cm}^{-1}$ 为 C—H 弯曲振动区;酚的相应谱带在较高频率 $1\ 200\sim 1\ 280\text{ cm}^{-1}$;醇的 C—O 出现在 $1\ 000\sim 1\ 200\text{ cm}^{-1}$ 。结合图 5,该紫色素的红外光谱分析结果汇总见表 3。

2.5.4 紫色素的核磁共振(NMR)分析

1) ^1H 核磁共振图谱分析:从图谱的位移值及峰形来看,化学位移 11.500 为烯醇的 H ;化学位移 5.384 与芳环中的羟基中的 H 一致;化学位移 3.908 为醇羟基中的 H ;化学位移 4.550 为甲氧基相连的 CH_2 中的 H ;化学位移 4.053 与羟基相连的 CH_2 的 H 一致;化学位移 4.486 为 C=C—OCH_3 中的 H ;化学位移 3.527 为 C—C—OCH_3 中的 H 。

2) ^{13}C 核磁共振图谱分析:从图谱的位移值及峰形来看,化学位移 178.67、176.12 与羧基中的 C 一致;化学位移 53.12、53.71、55.68 为甲氧基中的 C ,表明该色素含有 3 个甲氧基,其中 2 个是对位

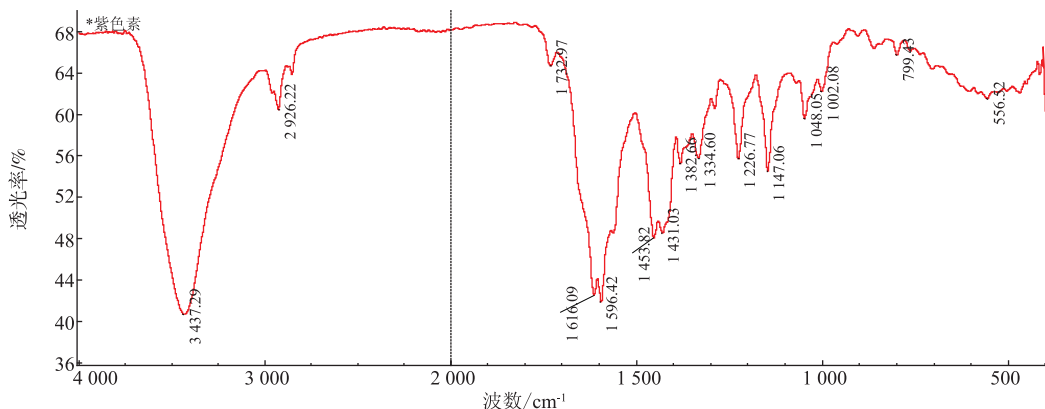


图5 *Fusarium* JN158 紫色素的红外光谱图

Fig. 5 IR spectrum of purple pigment from *Fusarium* JN158

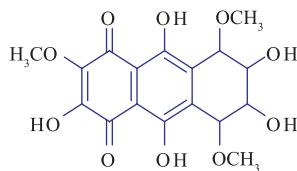
表3 *Fusarium* sp. JN158 紫色素的红外光谱分析结果

Table 3 IR spectrum results of purple pigment from *Fusarium* sp. JN158

红外吸收/ cm^{-1}	官能团	结构特征
3 437, 1 226	酚羟基	O—H 伸缩振动
2 926, 1 453, 1 431	CH_3^-	C—H 反对称弯曲振动
1 732, 1 616, 1 596	芳环	C=C 伸缩振动
1 147, 1 048, 1 002	苯环	Ar—H 面内变形振动

的,与氢谱结果一致;化学位移 157.42 为苯环中与羟基相连的 C;化学位移为 C=C 中接羟基的碳;化学位移 56.27 与 C—OH 中的 C 一致。

结合紫色素的性质及质谱与红外的光谱分析,通过 COSY (Correlated Spectroscopy)、HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)、ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) 及 MLEV [M. Levitt (broadband composite decoupling sequence)] 对 ^1H 、 ^{13}C 核磁共振谱峰进行准确的归属,确定了该色素的相对分子质量为 382.0,分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$,结构为:



2.6 镰刀霉菌产 VI 号化合物对不同瘤株细胞增殖的影响

MTT 比色实验法检测 *Fusarium* sp. JN158 产 VI 号化合物对 MCF-7、A549、NKM-45、SW 620 结肠癌细胞、HePG2 肝癌细胞 5 种肿瘤细胞增殖的影响,使用 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 3 个不同浓度的 VI 号化合物和乌苯美司 (IC_{50} 10 mmol/L) 作用于肿瘤细胞

24 h,乌苯美司 (Ubenimex) 是从网状橄榄链霉菌培养液中发现的一种具有抗菌作用和免疫增强作用的小分子二肽化合物,相对分子质量与 VI 相似,已有体外研究表明,乌苯美司可诱导人非小细胞肺癌细胞、人白血病细胞等凋亡。

通过酶联免疫检测仪而测出的 490 nm 波长下的各组吸光度 (A) 值,见表 4。

可以看出,VI 号化合物对 MCF-7、MKN-45、A549、SW 620、HePG2 均有不同的抑制作用,并呈现浓度的依赖性,其中 MCF-7 有明显的抑制作用。在相同浓度的情况下,色素对所有肿瘤细胞的抑制均要优于阳性药物—乌苯美司,对正常人脐带静脉内皮细胞 (HUVEC) 没有影响 (数据没有在表中列出),提示 VI 号化合物可能是一种有应用开发前景的抗肿瘤化合物。

3 结 语

本研究使用的霉菌是根据霉菌的形态特征和培养性状的观察结果,参照 Booth 的镰刀菌分类系统及其生物学特点,根据 26SRNA 间隔测序的结果,判断为 *Fusarium* sp. B158 镰刀菌。

镰刀菌 *Fusarium* sp. B158 发酵所使用的培养基只需要葡萄糖和土豆,培养基所用的成本低廉。

表 4 VI 号化合物对不同肿瘤细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of different cancer cell proliferation from NO.6 compound

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞种类	A 值		A 值	
		对照组	给药组	对照组	乌苯美司
5	MCF-7	1.02 $\pm$ 0.10	0.89 $\pm$ 0.11*	1.57 $\pm$ 0.21	1.54 $\pm$ 0.11
	MKN-45	2.67 $\pm$ 0.29	2.51 $\pm$ 0.15	2.49 $\pm$ 0.31	2.39 $\pm$ 0.18
	A549	2.11 $\pm$ 0.40	1.90 $\pm$ 0.37	2.36 $\pm$ 0.37	2.23 $\pm$ 0.35
	SW 620	1.40 $\pm$ 0.02	1.36 $\pm$ 0.07	1.67 $\pm$ 0.23	1.59 $\pm$ 0.21
	HePG2	2.03 $\pm$ 0.39	1.96 $\pm$ 0.31	2.12 $\pm$ 0.29	1.94 $\pm$ 0.27
10	MCF-7	0.96 $\pm$ 0.11	0.58 $\pm$ 0.09*#	1.49 $\pm$ 0.23	1.01 $\pm$ 0.17*
	MKN-45	2.57 $\pm$ 0.14	2.21 $\pm$ 0.26	2.34 $\pm$ 0.25	2.27 $\pm$ 0.31
	A549	2.09 $\pm$ 0.09	1.90 $\pm$ 0.39	2.14 $\pm$ 0.13	1.92 $\pm$ 0.27
	SW 620	1.20 $\pm$ 0.34	1.13 $\pm$ 0.03	1.54 $\pm$ 0.26	1.23 $\pm$ 0.19
	HePG2	1.98 $\pm$ 0.07	1.78 $\pm$ 0.08	1.91 $\pm$ 0.15	1.78 $\pm$ 0.12
15	MCF-7	0.94 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.08***#	0.93 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.04*
	MKN-45	1.42 $\pm$ 0.09	1.34 $\pm$ 0.08#	2.12 $\pm$ 0.29	1.94 $\pm$ 0.28
	A549	1.94 $\pm$ 0.21	1.88 $\pm$ 0.34	1.82 $\pm$ 0.29	1.79 $\pm$ 0.18
	SW 620	1.10 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.10	1.41 $\pm$ 0.08	0.94 $\pm$ 0.12*
	HePG2	1.90 $\pm$ 0.21	1.62 $\pm$ 0.33	1.91 $\pm$ 0.17	1.64 $\pm$ 0.13*

与对照组比较 * P <0.05,** P <0.01;与乌苯美司 # P <0.05

发酵的产物在酸性乙醇中(pH 1.5 左右)呈现红色,在碱性条件下(pH 7~8)变成紫黑色,并有结晶沉淀。该色素不溶于水,可溶于酸性乙醇。

通过色素的液相分离和制备实验,选择最佳流动相和最佳洗脱程序,分离得到 6 个峰,其中 VI 号峰远离其余的峰,通过液相制备系统制得纯度约 98%。

质谱实验可知 VI 号峰的相对分子质量为 382,结合有机元素实验数据,推测可能的分子式是 $C_{17}H_{18}O_{10}$,是花青苷类色素。通过科技查新可知:没

有这种相对分子质量的分子式报道,故 VI 号峰的色素可能是一种新的化合物。

为证实该色素的功效特点,选择常见的 5 种瘤株,测定 VI 号化合物对肿瘤细胞的影响。结果发现,这个化合物对上述 5 种肿瘤细胞瘤株均具有抑制作用,而对 MCF-7 乳腺癌细胞抑制最为明显($P < 0.05$),而对正常细胞没有毒性作用(结果未在文章中显示),提示这可能是一种潜在的有开发前景的防治乳腺癌的化合物。

参考文献:

- [1] 周波,吴吉林,朱明军,等. 微生物黄色素的研究进展[J]. 微生物学通报,2010,37(9):1362-1368.
ZHOU Bo, WU Jilin, ZHU Mingjun, et al. Research progress of microbial yellow pigment [J]. **Microbiology China**, 2010, 37(9): 1362-1368. (in Chinese)
- [2] 赵春安,李海燕,柳陈坚. 微生物色素的生物合成及其遗传工程研究进展[J]. 现代化工,2009,29(12):35-37.
ZHAO Chun'an, LI Haiyan, LIU Chenjian. Microbial pigment biosynthesis and genetic engineering progression [J]. **Modern Chemical Industry**, 2009, 29(12): 35-37. (in Chinese)
- [3] 孙肇喝,杨秀萍. 放线菌素研究进展[J]. 首都师范大学学报:自然科学版,2011,32(2):54-57.
SUN Zhaohe, YANG Xiuping. Research progress of actinomycin [J]. **Journal of Capital Normal University: Natural Science Edition**, 2011, 32(2): 54-57. (in Chinese)
- [4] 李洪波,杜巍,赵凯,等. 灵茵红素研究进展[J]. 生物技术通讯,2012,22(1):139-141.
LI Hongbo, DU Wei, ZHAO Kai, et al. Research progress of Ling Yin red pigment [J]. **Letters in Biotechnology**, 2012, 22(1): 139-141. (in Chinese)
- [5] 李昌伟,蔡宇杰,廖祥儒,等. 镰刀霉菌(*Fusarium* JN158) 紫色素的提取及理化性质[J]. 食品科学,2012,33(3):131-133.
LI Changwei, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Extraction and physico-chemical properties of purpurin pigment from liquid-cultured mycelia *Fusarium* sp B158[J]. **Food Science**, 2012, 33(3): 131-133. (in Chinese)
- [6] 王永威,沈健增,蔡宇杰,等. 镰刀霉菌(*Fusarium* sp)JN158 色素提取和分离技术的研究[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(1): 167-171.
WANG Yongwei, SHEN Jianzeng, CAI Yujie, et al. Research of extraction and separation on pigment of *Fusarium* sp JN158 and [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(1): 167-171. (in Chinese)
- [7] Booth C. The genus *Fusarium* commonwealth mycological institute[M]. England: Kew Surrey, 1971.
- [8] Brayford D. The identification of *Fusarium* species[M]. Egham: international Mycological Intitute Press, 1993.
- [9] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual[M]. Iowa: Blackwell Professional Publishing, 2006.
- [10] Kuniyasu K, Kishi K. Seed transmission of *Fusarium* wilt of bottle gourd, *Lagenaria siceraria* Standl, used as rootstock of watermelon. II. The seed infection course from the infected stem of bottle gourd to the fruit and seed [J]. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, 1977, 43(2): 192-198.
- [11] O Donnell K, Cigelnik E, Casper H H. Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*[J]. **Fungal Genetics and Biology**, 1998, 23(1): 57-67.
- [12] 郑里翔,刘红宁,舒洋,等. 不同体质血清对 A549 肺癌细胞周期蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(2):324-326.
ZHENG Lixiang, LIU Hongning, SHU Yang, et al. The effect of different constitution serum on Cyclins/Cdk expression of A549 lung cancer[J]. **China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy**, 2012, 27(2): 324-326. (in Chinese)
- [13] 郑艳波,弓建华,李毅,等. 乌苯美司抑制肿瘤细胞侵袭与诱导凋亡的研究[J]. 药学报,2012,47(12):1593-1598.
ZHENG Yanbo, GONG Jianhua, LI Yi, et al. Research of Ubenimex inhibiting tumor cell invasion and induced apoptosis[J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2012, 47(12): 1593-1598. (in Chinese)
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [15] 孔华忠. 中国真菌志[M]. 北京:科学出版社,2007.