

醉鱼草内生真菌 LL3026 杀螺作用实验研究

韩邦兴^{1,2}, 陈钧^{1*}, 郝蕾¹, 周晓坤¹, 韩方岸³, 李龙根³

【摘要】 目的 研究醉鱼草(*Buddleia lindleyana*)内生真菌 LL3026(*Colletotrichum* sp.)发酵液的杀螺作用、活性部位及其热稳定性和光照稳定性。方法 采用烧杯浸杀法,观察不同时间、不同浓度 LL3026 发酵液醇浸膏水溶液对湖北钉螺的杀灭作用,同时设 1 mg/L 氯硝柳胺水溶液和去氯离子水为对照。采用溶剂系统分离法分离 LL3026 发酵液的不同极性部位,并比较各极性部位的杀螺活性。该菌发酵液醇浸膏水溶液于不同温度(30~100 ℃)、不同时间(30~150 min)处理后,进行杀螺试验,检测其热稳定性。在 25 ℃、不同光照强度(分别照射 1~9 d)条件下,测定其光照稳定性。结果 施药后 24、48 和 72 h 的半数致死浓度(LC₅₀)分别为 50.11、3.43 和 1.55 mg/L。分离 LL3026 发酵液,获得石油醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇和水相等不同极性部位,其低极性部位的乙醚相杀螺效果最好,24、48 和 72 h 杀螺率均为 100%。在 80 ℃加热 120 min 后,发酵液活性物质热稳定性好,杀螺率为 100%。3 600 lx 强度光照 9 d 的发酵液的杀螺活性较强,其 48 h 杀螺率为 86.7%。结论 醉鱼草内生真菌 LL3026 具有较好的杀螺活性。

【关键词】 醉鱼草; 内生真菌; LL3026; 湖北钉螺; 杀螺剂

中图分类号: R978.81 文献标识码: A

Molluscicidal Effect of Endophyte LL3026 from *Buddleia lindleyana* against *Oncomelania hupensis*

HAN Bang-xing^{1,2}, CHEN Jun^{1*}, HAO Lei¹, ZHOU Xiao-kun¹, HAN Fang-an³, LI Long-gen³

(1 College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2 Engineering Technology Research Center of Plant Cell Engineering of Anhui Province, Lu'an 237012, China; 3 Zhenjiang Center for Disease Control and Prevention, Zhenjiang 2120001, China)

【Abstract】 **Objective** To research the molluscicidal effect, active components, thermal stability and light stability of endophyte LL3026 (*Colletotrichum* sp.) from *Buddleia lindleyana*. **Methods** The molluscicidal effect of LL3026 against *Oncomelania hupensis* was determined as referring to the WHO guidelines for laboratory molluscicidal test, and the control experiments were performed with 1 mg/L niclosamide or dechlorinated tap water. The active components from LL3026 were extracted by different polar solvents. The thermal stability and light stability of its extracellular moiety was examined at different temperature (30–100 ℃), different time (30–150 min) and different illumination time (1–9 d). **Results** Immersion test showed that the LC₅₀ values for the LL3026 broth were 50.11, 3.43, and 1.55 mg/L for 24, 48, and 72 h, respectively. The ether extract of LL3026 broth showed the best molluscicidal activity compared with other fractions. Treated with 25 mg/L ether extract for 24, 48, and 72 h, the mortality of *O. hupensis* was 100%. The molluscicidal activity of LL3026 broth had no change at 80 ℃ for 120 min, and the snail mortality was 100%. A 48-h exposure to LL3026 broth which placed in an artificial climate box with 3 600 lx illumination for 9 d resulted in 86.7% snail mortality. **Conclusion** The fractions extracted from endophyte LL3026 isolated from *B. lindleyana* shows molluscicidal effect to *O. hupensis*.

【Key words】 *Buddleia lindleyana*; Endophyte; LL3026; *Oncomelania hupensis*; Molluscicide

Supported by the Natural Resource Platform from Ministry of Science & Technology (No. 2005DKA21205-3) and the Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 2006AA10A207)

* Corresponding author, E-mail: liuguangyuan2002@sina.com

我国日本血吸虫病流行严重^[1], 钉螺是日本血吸虫惟一中间宿主^[2], 杀灭钉螺是预防和控制血吸虫病

的关键措施之一^[3]。氯硝柳胺是目前广泛使用的化学灭螺药,但因对环境和非靶生物具有不良反应^[4],导致杀螺药的筛选重点转向天然植物和微生物^[5-8]。因来源广泛且容易获得,微生物成为研究热点^[9]。目前,国内已有较多微生物杀螺剂研究^[10-12],但真菌杀螺剂少

作者单位: 1 江苏大学药学院, 镇江 212013; 2 植物细胞工程安徽省工程技术研究中心, 六安 237012; 3 镇江市疾病预防控制中心, 镇江 212001

* 通讯作者, E-mail: syxchenjun@126.com

见, 尤其植物内生真菌杀螺研究报道较少。近年来本研究室自金钱松分离出杀螺活性较好的内生真菌 JJ18^[13,14], 为扩大筛选范围, 又从杀螺植物醉鱼草 (*Buddleia lindleyana*)^[15] 中分离出 113 株内生真菌, 筛选到具有良好杀螺活性的菌株 LL3026。本实验对该菌株发酵液的杀螺作用、活性部位及其热稳定性和光照稳定性进行研究。

材料与方法

1 真菌和钉螺

醉鱼草内生真菌 LL3026 (*Colletotrichum* sp.) (GenBank 登录号为 GU004376.1) 由本研究室分离纯化, 保存于江苏大学生药学研究室。湖北钉螺指名亚种 (*Oncomelania hupensis hupensis*) 于 2009 年 4~5 月份采自江苏省镇江市江心镇朱家村江滩, 在实验室适应性饲养 1 d, 挑选活力较强的钉螺进行试验。

2 主要试剂和仪器

AR 级石油醚、乙醚、乙酸乙酯和正丁醇, 均为国药集团化学试剂有限公司产品。氯硝柳胺 (niclosamide, 纯度为 98%) 由江苏省血吸虫病防治研究所提供。优普超纯水机 (UPT-I-5T) 为成都超纯科技有限公司产品, 飞鸽离心机 (TDL-5-A) 为上海安亭科学仪器制造厂产品, 生化培养箱 (SPX-250B) 为上海跃进集团产品, 摇床 (QYC-211) 为上海福玛试验设备有限公司产品, 人工气候箱 (MGC-300H) 为上海一恒科技有限公司产品。

3 杀螺药物制备

将 LL3026 于超净台内接种到 200 ml 马铃薯葡萄糖液体培养基 (马铃薯 20%、葡萄糖 2% 和 1.5% 琼脂), 28 °C 120 r/min 发酵 7 d, 发酵液经纱布过滤除菌丝体得滤液。将滤液用 95% 乙醇浸提 3 次, 合并浸提液, 回收乙醇获得乙醇浸膏。乙醇浸膏水溶后采用系统分离法, 分别获得石油醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇和水相等不同极性部位, 各极性部位回收溶剂后获得各极性部位浸膏。

4 发酵液杀螺活性试验

采用烧杯浸杀法: 用倍比稀释法将 LL3026 发酵液乙醇浸膏配制浓度为 200、100、50、25、12.50 和 6.25 mg/L 的药液各 300 ml, 分别置烧杯中, 同时设等量清水作空白对照组。每杯投放 30 只钉螺, 盖上 U 型不锈钢网盖, 纱网在液面下 1 cm 左右以阻止钉螺爬出水面。分别于浸泡 24、48 和 72 h 后, 弃去药

液, 用去氯离子水冲洗钉螺 3 次, 复苏 72 h 后, 用水测法和压碎法计数钉螺死亡数。试验重复 3 次。计算半数致死浓度 (LC_{50}), 95% 可信区间及 90% 致死浓度 (LC_{90})。同时设 1 mg/L 氯硝柳胺水溶液和去氯离子水平行对照。

5 发酵液杀螺活性部位筛选

各极性部位浸膏用去氯离子水配制成 25 mg/L 的药液各 300 ml, 进行杀螺试验, 方法同上, 比较各极性部位的杀螺活性。

6 发酵液活性物质热稳定性试验

将发酵液乙醇浸膏配制成 50 mg/L 药液, 各取 300 ml 置烧杯中, 保鲜膜封口后分别置于 30、40、60、80 和 100 °C 水浴加热 30 min, 或于 80 °C 水浴加热 30、60、90、120 和 150 min, 其后进行杀螺试验, 方法同上。

7 发酵液光照稳定性试验

取发酵液乙醇浸膏 5 mg 溶于 100 ml 去氯离子水, 置烧杯中, 保鲜膜封口, 于 25 °C 人工气候箱中, 光照强度设置为 3 600 lx, 分别放置 1、3、6 和 9 d 后, 去氯离子水定容至 300 ml, 进行杀螺试验, 方法同上。

8 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行分析, 对数据进行均值化处理, 比较不同浓度, 不同温度、不同光照条件下 LL3026 发酵液及不同极性部位的钉螺死亡率。公式如下, 钉螺死亡率 = 死亡钉螺数 / 试验钉螺总数 × 100%。

结 果

1 发酵液杀螺试验

各试验组钉螺死亡率均随着药物浓度的升高和施药时间的延长而增加, 空白对照组无钉螺死亡。施药后 24、48 和 72 h 的 LC_{50} 分别为 50.11、3.43 和 1.55 mg/L。施药后 24 h 的 LC_{50} 95% 可信区间与 48 h 和 72 h 的无重叠。施药后 24、48 和 72 h 的 LC_{90} 分别为 157.28、6.97 和 3.37 mg/L。

2 杀螺活性部位筛选

不同极性部位乙醇浸膏水溶液对钉螺的毒杀效果显示, LL3026 发酵液乙醚相杀螺效果最好, 乙酸乙酯和石油醚相次之, 正丁醇相和萃余相杀螺活性较弱 (图 1)。

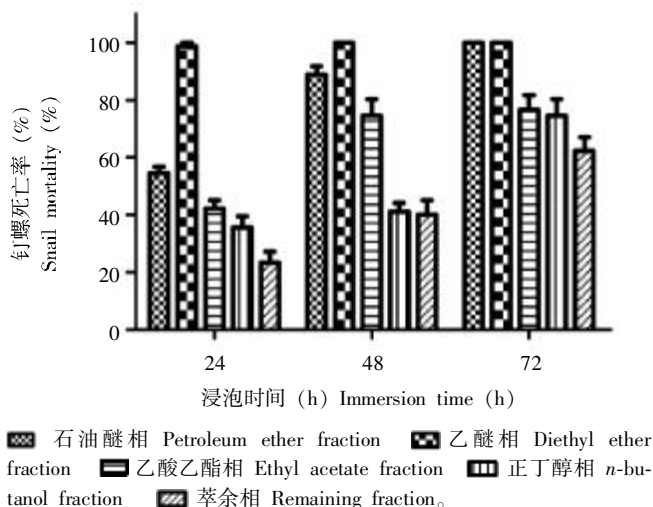


图 1 LL3026 发酵液杀螺活性部位
Fig.1 Effective fractions extracted from LL3026 broth against *O. hupensis*

3 发酵液杀螺活性物质热稳定性试验

LL3026 发酵液对热敏感性较低，经高温加热后仍有良好的杀螺效果。80℃加热 30 min 后，48 h 杀螺率为 93.3%；100℃加热 30 min 后，48 h 杀螺率为 90.0%，对 72 h 杀螺率无影响。观察加热时间对发酵液杀螺活性的影响发现，80℃加热时间长短对 LL3026 发酵液杀螺率基本无影响。

4 发酵液光照稳定性试验

LL3026 发酵液杀螺活性对高强度光照有一定敏感性。光照 1、3、6 和 9 d 发酵液，48 h 杀螺率分别为 83.3%、80.0%、86.7%和 86.7%。光照对 LL3026 发酵液的 72 h 杀螺活性基本无影响。

讨 论

内生真菌(endophytic fungus)是指其生活史上一定阶段生活在活体植物组织内，但对植物组织未引起明显病害症状的真菌。植物内生真菌分布广泛、种类繁多，次生代谢产物丰富，可产生抗生素类、杀昆虫物质类、植物生长调节剂类、抗肿瘤活性物质类和免疫抑制类物质等，在农业和医药业中极具开发利用价值^[16]。但内生真菌的杀螺研究尚处于初始阶段。

本实验室曾筛选到具有杀螺活性的金钱松内生真菌 JJ18，其 10%发酵液 72 h 杀螺率为 86.7%^[13]。醉鱼草内生真菌 LL3026 发酵液 2%浓度 48 h 杀螺率即达 83.3%，与之相比，LL3026 杀螺活性更强。通过杀螺活性物质的热稳定性和光照稳定性试验，发现 LL3026 发酵液在高温、强光照下稳定，具有较好的开发利用价值。活性部位筛选结果显示，LL3026 发

酵液杀螺活性部位为低极性化合物，较容易进行活性跟踪，分离筛选有效的活性物质，发现安全、有效的杀螺先导化合物。同时，可应用生物技术改良内生真菌，提高活性成分的含量和产量，对推动生物杀螺剂的筛选和可持续利用具有重要意义。LL3026 发酵液具有良好的杀螺效果，但尚需对非靶生物的安全性、生态环境的影响进行评价，同时还需要对灭螺活性成分，灭螺机制等进行深入研究。

致谢 感谢江苏省血吸虫病防治研究所梁幼生研究员、戴建荣研究员给予技术指导！

参 考 文 献

- [1] Chitsulo L, Engels D, Montresor A, et al. The global status of schistosomiasis and its control[J]. Acta Trop, 2000, 77(1): 41-51.
- [2] Zhou XN, Wang LY, Chen MG, et al. The public health significance and control of schistosomiasis in China—then and now [J]. Acta Trop, 2005, 96(2-3): 97-105.
- [3] dos Santos AF, de Azevedo DP, dos Santos Mata Rda C, et al. The lethality of *Euphorbia conspicuato* adults of *Biomphalaria glabrata*, cercariae of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*[J]. Bioresour Technol, 2007, 98(1): 135-139.
- [4] Andrews P, Thyssen J, Lorke D. The biology and toxicology of molluscicides, bayluscide[J]. Pharmacol Ther, 1982, 19(2): 245-295.
- [5] Yang XM, Chen SX, Xia L, et al. Molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* of *Ginkgo biloba*[J]. Fitoterapia, 2008, 79(4): 250-254.
- [6] Tan P, Zhang XJ, Yang JM, et al. Effect of *Alternanthera philoxeroides* on enzymic histochemistry of *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2009, 27(1): 11-16. (in Chinese) (谭苹, 张学俊, 杨建明, 等. 空心莲子草对钉螺酶组织化学的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(1): 11-16.)
- [7] Mao ZH, Yu PZ, Sun K, et al. Preparation of five ginkgolic acid monomers and their molluscicidal effects against *Oncomelania hupensis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(4): 274-278. (in Chinese) (毛佐华, 俞培忠, 孙锴, 等. 银杏酸 5 种同系物单体的制备及其杀灭钉螺的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(4): 274-278.)
- [8] Yang JM, Xiao RF, Zhou Y. Studies on killing snail of microorganism[J]. J Hubei Univ (Nat Sci Ed), 2003, 25(4): 337-339. (in Chinese) (杨建明, 肖瑞芬, 周艳. 微生物灭钉螺研究现状[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2003, 25(4): 337-339.)
- [9] Zhou XN, Zhang Y, Hong QB, et al. Science on *Oncomelania* Snail[M]. Beijing: Science Press, 2005: 97-114. (in Chinese) (周晓农, 张仪, 洪青标, 等. 实用钉螺学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 97-114.)
- [10] Tan P, Yang JM, Xiao RF, et al. Influence of *Streptomyces violaceoruber* on the enzyme-histochemistry in *Oncomelania hupensis* [J]. Acta Zool Sin, 2006, 52(1): 109-114. (in Chinese) (谭苹, 杨建明, 肖瑞芬, 等. 紫红链霉菌对钉螺酶组织化学的影响[J]. 动物学报, 2006, 52(1): 109-114.) (in Chinese)
- [11] Chen XL. Molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* of convex shape pseudomonad[J]. Microbiology, 1983, 10(5): 215-217. (in Chinese) (陈祥麟. 凸形假单胞菌对钉螺的杀灭作用[J]. 微生物学通报, 1983, 10(5): 215-217.)
- [12] Yao CS, Hu DY, Shi MZ, et al. Studies on snail-killing antibiotic 230[J]. Chin J Antibiotics, 1993, 18(4): 261. (in Chinese) (姚超素, 胡代炎, 石孟芝, 等. 杀钉螺抗生素 230[J]. 中国抗

生素杂志, 1993, 18(4): 261.)

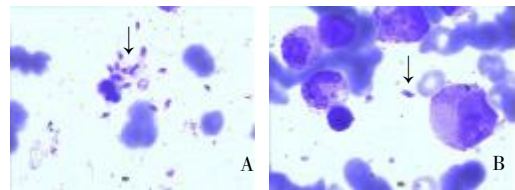
- [13] Guo SB, Chen J, Wang Y, *et al.* Experimental research on molluscicidal effect of endophyte JJ18 from *Pseudolarix amabilis*[J]. Chin J Chin Mater Med, 2008, 34(4): 389-392. (in Chinese) (郭尚彬, 陈钧, 王妍, 等. 金钱草内生真菌 JJ18 杀螺作用实验研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 34(4): 389-392.)
- [14] Guo SB, Chen J, He J, *et al.* Molluscicidal experiment of endophytes from *Pseudolarix kaempferi* Gord [J]. Chin J Schisto Control, 2007, 19(4): 285-287. (in Chinese) (郭尚彬, 陈钧, 何佳, 等. 金钱松内生真菌杀螺活性菌株筛选[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2007, 19(4): 285-287.)

- [15] Feng XG, Tan PP, Yi JM, *et al.* Preliminary screening tests of molluscicidal effects of extracts from 92 species of wild or cultivated plants and Chinese herbs against *Oncomelania hupensis*[J]. Chin J Schisto Control, 2002, 14(6): 412-417. (in Chinese) (冯新港, 谈佩萍, 易健民, 等. 92 种野生和栽培植物或中草药的提取物杀灭钉螺筛选试验[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(6): 412-417.)
- [16] Strobel GA. Harnessing endophytes for industrial microbiology[J]. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(3): 240-244. (收稿日期: 2009-06-18 编辑: 杨频)

(上接第 209 页)

产品, 生产批号为 080221), 从 0.1 mg/(kg·d) 开始静脉滴注, 逐渐加量至 1 mg/(kg·d), 33 d 内总剂量达 1 200 mg。用药 5 d 后, 患者精神和食欲明显好转, 体温恢复正常, 继续治疗 28 d 后患者贫血改善, 脾左肋缘下未触及。血常规: WBC $6.7 \times 10^9/L$, HGB 124 g/L, PLT $160 \times 10^9/L$, E 0.8%; 肝功: ALT 25 U/L, TBIL $11.5 \mu\text{mol/L}$, ALB 38 g/L, GLB 31 g/L。B 超: 脾脏大小正常。骨穿骨髓涂片未见利什曼原虫。临床治愈出院。随访半年无复发。

病例 2, 女, 7 岁, 甘肃陇南文县人。患儿于 2007 年 6 月出现乏力、发热, 体温 $38.0 \sim 40.0 \text{ }^\circ\text{C}$, 为不规则发热, 最高体温出现在下午或夜间, 有时在上午。陇南市第一人民医院诊断为“内脏利什曼病”, 给予注射用葡萄糖酸锑钠治疗, 0.6 g/d 静脉滴注, 疗程为 6 d, 症状消失后出院。2007 年 10 月和 2008 年 1 月出现乏力、寒战、高热, 先后就医于陇南市第一人民医院、四川华西医院均未取得显著疗效。2008 年 3 月再次以乏力和高热入院。体检: 体温 $39.2 \text{ }^\circ\text{C}$, 脉搏 108 次/min, 呼吸 22 次/min, 体重 20 kg。神志清, 精神差, 重度贫血貌。双肺无异常。心率快, 律齐。腹部膨隆, 肝剑下 1 cm, 肋下未触及, 脾左肋缘下 9 cm, 质 II°, 表面光滑, 无压痛及叩击痛, 移动性浊音阴性。血常规: WBC $1.5 \times 10^9/L$, HGB 54 g/L, PLT $80 \times 10^9/L$, E 0.1%; 肝功能: ALT 89 U/L, TBIL $28 \mu\text{mol/L}$, ALB 31 g/L, GLB 42 g/L; 肾功能正常。B 超: 脾厚 6.4 cm, 长径 16.4 cm。骨穿骨髓涂片见利什曼原虫(图 1B), 诊断为内脏利什曼病。予以注射用葡萄糖酸锑钠, 0.6 g/d 静脉滴注, 共 12 d, 患儿体温正常。体检脾脏无缩小, 左肋缘下 9 cm。血常规: WBC $1.8 \times 10^9/L$, HGB 55 g/L, PLT $90 \times 10^9/L$, E 0.1%。肝功能: ALT 72 U/L, TBIL $24.5 \mu\text{mol/L}$, ALB 30 g/L, GLB 43 g/L。再次做骨髓涂片检查, 仍见利什曼原虫。考虑该患儿锑剂耐药, 予以国产注射用两性霉素 B 治疗, 从剂量 0.1 mg/(kg·d) 开始静脉滴注, 逐渐加量至 1 mg/(kg·d), 24 d 总剂量达 420 mg。用药 4 d 后患儿精神食欲明显好转, 体温正常, 继续治疗 20 d 后贫血好转, 脾左肋缘下 3 cm。血常规: WBC $3.6 \times 10^9/L$, HGB 97 g/L, PLT $160 \times 10^9/L$, E 0.7%; 肝功能: ALT 25 U/L, TBIL $9.5 \mu\text{mol/L}$, ALB 36 g/L, GLB 35 g/L。B 超: 脾厚 6.1 cm, 长径 11.0 cm。1 个月后再复查, 脾左肋缘下未触及。血常规: WBC $6.3 \times 10^9/L$, HGB 131 g/L, PLT $158 \times 10^9/L$, E 2.5%。肝功能: ALT 20 U/L, TBIL $10.5 \mu\text{mol/L}$, ALB 39 g/L, GLB 30 g/L。B 超: 脾脏大小正常; 骨穿骨髓涂片未见利什曼原虫。随访 1 年无复发。



A: 患者 1; B: 患者 2; ↓ 示利什曼原虫。

图 1 2 例患者的骨髓涂片

讨论

甘肃省内脏利什曼病主要分布于武都区、文县、舟曲县和迭部县, 发病人数呈逐年上升的趋势^[1]。长期以来, 葡萄糖酸锑钠是治疗内脏利什曼病的首选用药, 具有疗效佳、疗程短和不良反应少等优点。但近年来, 该药在临床出现疗效下降、甚至无效的情况, 如锑剂治疗 3 疗程仍未愈者, 称为“抗锑剂”患者, 需用非锑剂治疗^[2]。本文的两例内脏利什曼病患者用葡萄糖酸锑钠治疗均无效, 改用脂质体两性霉素 B 治疗, 均治愈。脂质体两性霉素 B 是目前美国药品食品管理局唯一批准用于内脏利什曼病的药, 但价格昂贵, 为减轻患者经济负担, 选用国产注射用两性霉素 B 治疗。近年来, 有国内外研究者使用两性霉素 B 治疗内脏利什曼病, 均取得较好疗效^[3,4]。有关国产两性霉素 B 治疗内脏利什曼病的疗效, 有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Zheng CJ, Wang LY, Xu X, *et al.* Visceral leishmaniasis in China during 2004–2007[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2009, 27(4): 344-346. (in Chinese) (郑灿军, 王立英, 许翔, 等. 2004-2007 年我国内脏利什曼病流行情况[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(4): 344-346.)
- [2] Pen WW. Epidemiology[M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 234. (in Chinese) (彭文伟. 传染病学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 234.)
- [3] Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, *et al.* Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis[J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(7): 917-924.
- [4] Chen SB, Yang CM, Zhang CJ, *et al.* Domestic liposomal amphotericin B for the treatment of one case of visceral leishmaniasis resistant to meglumine antimoniate[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(3): inside back cover. (in Chinese) (陈生邦, 杨成明, 张丑吉, 等. 国产两性霉素 B 治愈抗锑性内脏利什曼病 1 例[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 封二.)

(收稿日期: 2009-12-06 编辑: 高石, 盛慧锋)