

不同方法提取的板栗花黄酮对 HeLa 细胞生长的影响

陈亚蓝,王雪青*,李月娇,宋文军,王素英

天津市食品与生物技术重点实验室 天津商业大学生物技术与食品科学学院,天津 300134

摘要:采用 MTT 法,以正常生长的人肾上皮细胞 293T 为对照,探索半仿生法、乙醇回流法和水提法得到的板栗花黄酮对人宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响。结果表明:半仿生法、乙醇回流法和水提法制得的板栗花黄酮在实验浓度范围内能有效抑制 HeLa 细胞的生长,其对 HeLa 细胞的半数抑制率(IC_{50})分别为 7.30、9.94、22.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制作用效果呈剂量依赖性特点,而对 293T 细胞的 IC_{50} 分别为 54.71、54.17、153.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在低于 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,对 HeLa 细胞生长抑制作用显著($P < 0.05$),而对 293T 细胞生长抑制不明显($P > 0.05$)。实验结果表明板栗花黄酮具有很好的抑制 HeLa 细胞生长的活性,且半仿生-板栗花黄酮抑制作用是三种提取方法中效果最好的。

关键词:板栗花;黄酮;提取方法;细胞增殖

中图分类号:R915

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.8.019

Effect of Total Flavonoids from Chestnut Flower by Different Extraction Methods on the Proliferation of HeLa Cells

CHEN Ya-lan, WANG Xue-qing*, LI Yue-jiao, SONG Wen-jun, WANG Su-ying

Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China

Abstract: The inhibitory effects of chestnut flower flavonoids extracted by semi-bionic, ethanol reflux or water methods on the proliferation of cervical cancer HeLa cells were studied by MTT method with human renal epithelial 293T cell as control. The results showed that chestnut flower flavonoids extracted by above three methods exhibited the powerful cytotoxic activity on HeLa cells in the range of experimental concentration and the inhibitory effect was in dose-dependent manner. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of semi-bionic-, ethanol reflux- and water-flavonoids were 7.30, 9.94, 22.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for HeLa cells, and 54.71, 54.17, 153.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 293T cells, respectively. Especially, when the concentrations of chestnut flower flavonoids were lower than 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the inhibitions of chestnut flower flavonoids were significant on the proliferation of HeLa cells ($P < 0.05$), but not on 293T cells ($P > 0.05$). Therefore, flavonoids of chestnut flower had good inhibitory effect on the proliferation of HeLa cells, and among the flavonoids extracted by three methods, the semibionic-flavonoids showed the most powerful inhibitory effect on HeLa cells.

Key words: chestnut flower; flavonoids; extraction method; cell proliferation

板栗花是壳斗科栗属植物栗的雄性花序,由于板栗植物属于雌、雄花同株且比例相差悬殊,只需保留少量的雄花就满足授粉的需求,因此大量的板栗雄花需要人工疏除。板栗花(雄花)中花粉含量高,生物活性物质,如黄酮、氨基酸、微量元素、维生素、雌二醇、蛋白质等含量丰富,使得近年来随着板栗种植面积的不不断扩大,更多的板栗花产生并废弃,浪费

了自然资源^[1],其中,黄酮含量是报道花粉中含量最高的^[2-4]。因此,对板栗花黄酮的提取和活性的研究,对于板栗花的综合利用和开发具有重要意义。黄酮类物质是一种广泛存在于果蔬等植物中以 2-苯基色原酮为母核的一类次级代谢产物^[5]。黄酮类物质具有抗炎抑菌、抗氧化、降血糖、抗辐射、抗肿瘤以及增强免疫能力等广谱的药理活性和较低的毒性,能防治心脑血管和呼吸系统疾病^[6],因此该类物质的研究倍受广大学者的关注。目前,有研究报道,板栗花水提物能较好的抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的作用^[7]。李月娇^[8]的研究显示板栗花黄

收稿日期:2016-03-16 接受日期:2016-05-31

基金项目:天津市高等学校创新团队建设规划(TD12-5049);天津市高校科技发展基金(20120603);唐山迁西县板栗产业研究发展中心资助项目(G11034)

* 通讯作者 E-mail:wxqing@tjcu.edu.cn

酮的体外总还原能力,清除超氧阴离子和羟基自由基能力均强于 Vc,有显著的抗氧化作用。然而板栗花黄酮对肿瘤细胞的抑制作用尚未见报道。癌症是影响人类健康的严重疾病,发病率和死亡率呈逐年上升的趋势,现有的治疗方法多以手术切除结合化疗。临床用药主要是细胞毒性药物,如紫杉醇或多烯紫杉醇,在杀伤肿瘤细胞的同时,也会杀伤正常细胞,破坏机体的免疫力,显示出毒副作用以及容易产生耐药性等缺点^[9]。因此,从天然植物中筛选具有选择性抑制肿瘤作用的活性物质,受到越来越多的关注。

从植物中提取黄酮类化合物的方法有很多,较为普遍的提取方法有微波提取、超声提取、超临界流体萃取、酶解法、回流提取、水提法、半仿生提取法等^[8,10],不同来源或种类的黄酮,溶解性也存在差异,拥有很宽的溶解特性。因此,不同的提取工艺不仅影响黄酮的含量,而且影响种类,进而影响其生物活性^[11]。半仿生提取法是模仿口服药物在胃肠道的转运过程,其原理是通过模拟口服药物经胃肠道转运吸收的环境条件而设计的一种依次经过酸、碱处理的提取工艺,这样使体外提取的黄酮类化合物的种类与体内经胃肠道消化吸收后的黄酮类物质更为相近,能更好的阐述黄酮类物质对机体的生物活性及功能,而且节约成本,安全环保,近年来逐渐取得人们的重视。水提法,回流提取法等已广泛应用于包括板栗花黄酮在内的植物黄酮的提取,半仿生法也已成功应用于蜂胶黄酮、杜仲叶黄酮、葛根黄酮的提取,而尚未见半仿生法对板栗花黄酮的提取报道。

许多源于天然植物的黄酮类活性物质具有抑制肿瘤细胞生长的功能而成为辅助治疗癌症的功能保健品,而研究不同提取工艺得到的板栗花黄酮对不同细胞系生长的影响,对于板栗花黄酮保健功能的开发与应用至关重要。因此,本实验以板栗花雄花序为原材料,通过乙醇回流法、水提法和半仿生法提取的板栗花黄酮为实验对象,研究这三种不同方法提取的板栗花黄酮对癌细胞 Hela 细胞活力的影响并辅以正常细胞 293T 细胞作对照,以期从生物活性的角度出发,找到最佳的能有效发挥板栗花黄酮抑制肿瘤细胞生长的提取工艺,为板栗花的深入开发与利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

板栗花:河北省唐山迁西鲜板栗花,自然风干后粉碎;Hela 细胞,天津商业大学实验室提供;293T 细

胞,天津医科大学实验室提供。

MTT 试剂、0.25% 胰蛋白酶,北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清, Biological Industries; DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基,赛默飞世尔生物化学制品有限公司;二甲基亚砜, AMRESCO;96 孔板, NEST;槲皮素标准品,上海金穗生物科技有限公司;山柰酚标准品,上海源叶生物科技有限公司;无水乙醇,分析纯,博欧特化工贸易有限公司。

1.2 主要仪器与设备

3-18K 高速离心机,美国 SIGMA 公司;FHC-1200A 超净工作台,北京国仪合信商贸有限公司;240i 细胞培养箱,美国 Thermo 公司;SSI 四联泵高效液相色谱仪,美国 SSI 公司;UV1000 紫外检测仪,美国 Allteach 公司;SPECTRAMAX-M5 酶联免疫检测仪,美国 MD 公司;Lichrospher C₁₈ 色谱柱,德国默克公司;Ti-u 倒置荧光显微镜,日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 不同提取工艺提取板栗花黄酮

乙醇回流法板栗花黄酮:风干的板栗花粉末过筛(80 目),称取一定质量的板栗花粉末以 1:10(g:mL)的比例加入石油醚脱脂 2 h 后,再加入浓度为 80% (v/v)乙醇溶液回流 2 h 后抽滤,将滤液以 5000 rpm 离心 10 min,取上清用旋转蒸发器浓缩得到黄酮粗提液,冻干。槲皮素和山柰酚含量,采用 HPLC 外标法测定。板栗花黄酮粉末样品,用甲醇溶解配制成一定浓度的黄酮溶液,超声处理 20 min,用 0.45 μm 的有机滤膜过滤后进行含量测定。其色谱条件为:流速:1 mL/min;柱温:室温;检测波长 λ,槲皮素 = 350 nm,山柰酚 = 280 nm;进样量:10 μL;流动相为甲醇:超纯水 = 40:60 的条件进行实验。

水提法板栗花黄酮:称取一定质量的板栗花粉末以 1:10(g:mL)的比例加入石油醚脱脂 2 h 后,用 100 °C 水作为浸提剂提取板栗花黄酮,将滤液以 5000 rpm 离心 10 min,取上清用旋转蒸发器浓缩得到黄酮粗提液,其他测定方法同乙醇回流法。

半仿生提取法提取板栗花黄酮:称取一定质量的板栗花粉末以 1:10(g:mL)的比例加入石油醚脱脂 2 h 后,分别用 pH 为 2.2、7.6、8.0 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲溶液作为浸提剂提取板栗花黄酮,合并滤液以 5000 rpm 离心 10 min,取上清用旋转蒸发器浓缩得到黄酮粗提液。其他测定方法同乙醇回流法。

1.3.2 对数生长期细胞的制备

Hela 细胞和 293T 细胞均培养于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM/HIGH

GLUCOSE 培养基中,置 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中,每 2~3 d 传代一次,取对数生长期细胞成单细胞悬液进行实验。

1.3.3 黄酮对Hela细胞活力的影响

采用 MTT 法测定,将通过 1.3.1 方法制备的Hela细胞和293T细胞悬液按 5×10^4 个/200 μ L 接种于96孔板,同时以293T细胞作为正常细胞系对照培养。培养24h后,分调零组、空白组、实验组和本底对照组四种实验组,每组设5个复孔,实验组和本底对照组加入不同方法提取的不同浓度(分为0.0001、0.001、0.01、0.1和1.0 mg/mL)的板栗花黄酮溶液,调零组和空白组加等量的培养液。不同工艺提取的板栗花黄酮作用24h后加入终浓度为5 mg/mL的MTT溶液(本底对照组不加MTT以等量培养液替代),孵育4h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,PBS洗涤3次。每孔加入150 μ L DMSO,振荡10 min使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪上以波长490 nm测各孔吸光度(OD值),计算细胞生长抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀)。细胞生长抑制率公式如下:

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{OD_1 - OD_3}{OD_2}\right) \times 100$$

式中:OD₁表示实验组吸光度值;OD₂表示空白组吸收光度值;OD₃表示与实验组浓度相对应的本底对照组吸光度值。

1.3.4 数据处理与分析

数据采用均值及偏差($\bar{x} \pm s$)表示,显著性分析和IC₅₀的计算由SPSS 16.0完成。

2 结果与分析

2.1 不同工艺提取的板栗花总黄酮主要黄酮成分含量

所得冻干粉总黄酮含量采用文献报道的比色法测定,以芦丁为标准品,得到黄酮与吸光度值的标准曲线为 $y = 10.169x + 0.0158$,其中 $R^2 = 0.9971$ 。根据测定吸光度值得到乙醇回流,水提,半仿生工艺提取的总黄酮含量分别为33.10%、37.84%、35.55%,通过HPLC外标法测定板栗花黄酮的槲皮素和山奈酚的含量分别为2.28%和0.96%;2.01%和1.00%;2.22%和0.98%。

2.2 半仿生法提取的板栗花黄酮对Hela和293T细胞增殖的影响

半仿生法-板栗花黄酮对Hela细胞及293T细胞活力的影响见图1。由图1可知,在实验浓度范围内,随着作用浓度的增加,半仿生法-板栗花黄酮对Hela细胞和293T细胞产生的抑制作用也随着增

加,并且对Hela细胞的作用效果要显著高于对293T细胞的。在实验浓度范围内对Hela细胞的生长抑制有明显的剂量-效应性,与空白组相比差异显著($P < 0.05$)。在0.0001~0.01 mg/mL浓度范围内,板栗花黄酮对293T细胞生长抑制作用不明显,抑制率在11%以下。而高浓度的板栗花黄酮(>0.01 mg/mL),对Hela及293T细胞的抑制作用都十分显著($P < 0.05$),当浓度为0.1 mg/mL时,抑制率分别达到76.49%与78.57%,因此,板栗花黄酮在低浓度范围内,对Hela细胞的抑制显著,而对293T细胞作用不明显,显示出半仿生板栗花黄酮选择性抑制作用的特点。

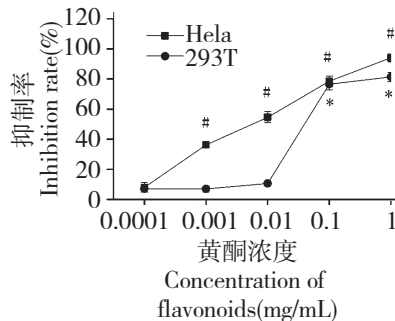


图1 半仿生法提取的板栗花黄酮对Hela细胞和293T细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of the chestnut flower flavonoids extracted by semi-bionic method on the proliferation of Hela and 293T cells

注:与空白组相比,黄酮显著抑制Hela细胞生长,[#] $P < 0.05$;与空白组相比,黄酮显著抑制293T细胞生长,^{*} $P < 0.05$,下同。

Note: compared with the blank group, flavones significantly inhibited the proliferation of Hela cells, [#] $P < 0.05$; compared with the blank group, flavones significantly inhibited the proliferation of 293T cells, ^{*} $P < 0.05$, Same as below.

2.3 乙醇回流法板栗花黄酮对Hela和293T的细胞活力影响

乙醇回流法提取的板栗花黄酮在1、0.1、0.01、0.001、0.0001 mg/mL五个浓度下对Hela细胞及293T细胞作用24h后生长抑制情况见图2。由图可知在实验浓度范围内,乙醇-板栗花黄酮对Hela细胞和293T细胞的生长起到不同程度的抑制作用,且随着板栗花黄酮浓度的增加,抑制细胞生长的作用也会增强,呈现明显的量效关系。但对293T细胞的生长的抑制作用明显低于对Hela细胞的,在0.001、0.01以及0.1 mg/mL乙醇-黄酮处理组中,二种细胞生长抑制率相差分别为18.92%、13.92%、22.18%,只有在黄酮浓度为1 mg/mL处理组时,板栗花黄酮对两种细胞生长的抑制作用无明显差异。

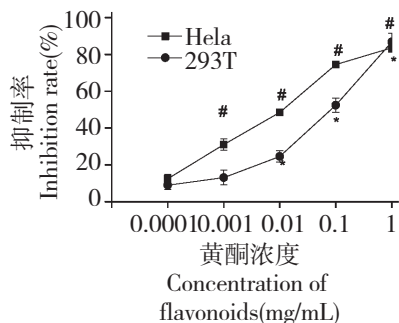


图2 乙醇回流法提取的板栗花黄酮对 HeLa 细胞和 293T 细胞生长的影响

Fig. 2 Effect of the chestnut flower flavonoids extracted by ethanol reflux method on the proliferation of HeLa and 293T cells

2.4 水提法提取的板栗花黄酮对 HeLa 和 293T 的细胞活力影响

水提法提取的板栗花黄酮对 HeLa 细胞及 293T 细胞作用 24h 后生长抑制情况见图 3。由图 3 可知在实验浓度范围内板栗花黄酮对 HeLa 细胞和 293T 细胞的抑制率随浓度的增加而增强,对 HeLa 细胞生

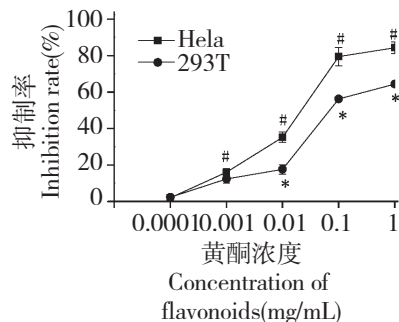


图3 水提法提取的板栗花黄酮对 HeLa 细胞和 293T 细胞生长的影响

Fig. 3 Effect of the chestnut flower flavonoids extracted by water extraction method on the proliferation of HeLa and 293T cells

长的抑制程度明显强于 293T 细胞的。在低浓度处理组(0.0001、0.001 mg/mL),黄酮对 HeLa 和 293T 细胞生长的抑制率分别为 16.13% 和 12.34% ($P > 0.05$),随着黄酮浓度的增加,0.01 mg/mL 处理组对 HeLa 细胞抑制作用 35.2% (与空白组相比, $P < 0.05$),而对 293T 细胞的生长抑制作用不显著 ($P > 0.05$),只有当黄酮的浓度大于 0.01 mg/mL 时才表现出明显的抑制作用。

3 讨论与结论

许多研究发现,广泛存在于植物中的黄酮类化

合物有良好的抗肿瘤效果。杨黄总黄酮对 HepG2 细胞 IC_{50} 为 93.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$,具有较好的体外抗癌作用^[12]。大蓟黄酮能诱导人子宫癌 HeLa 细胞的凋亡,其对 HeLa 细胞的 IC_{50} 为 85.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[13]。陈皮多甲氧基黄酮对 6 种肿瘤细胞:人肝癌细胞株 Bel-7402,人结肠癌细胞株 HCT-116,人胃癌细胞株 BGC-823,人膀胱癌细胞株 EJ,人食管癌细胞株 CaEs-17,小鼠肉瘤 5180 细胞有显著的抑制作用,并随着药物浓度的增加其抑制作用逐渐增强,其 IC_{50} 值在 10 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间^[14]。一般认为,当中药粗提物的 IC_{50} 小于 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,药物在体外对肿瘤有杀伤作用,可以进行下一步的抗肿瘤实验研究^[15]。而本研究结果显示,半仿生法、乙醇回流法和水提法提取的板栗花黄酮对 HeLa 细胞的 IC_{50} 分别为 7.3、9.94、22.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$,均小于 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而对正常 293T 细胞的 IC_{50} 分别为 54.71、54.17、153.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$,都大于 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,因此说明板栗花黄酮不仅具有较好的抗肿瘤作用,有研究和利用价值,而且对正常细胞系的毒副作用小。本实验通过对比明显看出较低浓度的板栗花黄酮对肿瘤细胞 HeLa 细胞有显著地作用效果而对 293T 细胞的生长抑制作用不明显,不影响其正常生长。

因为黄酮结构和种类的多样性,所以采用不同提取剂、提取方法得到的总黄酮,按照“相似相溶”的提取原理,其组分会随之改变^[16]。本研究采用的半仿生、乙醇回流和水提法提取的板栗花黄酮对 HeLa 细胞的 IC_{50} 存在差异,半仿生、乙醇回流明显小于水提法提取的板栗花黄酮的作用剂量,可能是半仿生法和乙醇回流法提取板栗花黄酮的有效活性物质优于水提法。比较不同方法提取的板栗花黄酮对 HeLa 细胞和 293T 细胞的增殖抑制情况(见图 1、2、3),当实验浓度为 7.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,半仿生-板栗花黄酮对 HeLa 细胞抑制率为 50%,而对 293T 细胞的抑制率不足 10.47%。当实验浓度为 54.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 293T 细胞的抑制率才能达到 50%。因此,两种细胞系达到同样的半对数抑制率,293T 细胞系的作用浓度是 HeLa 细胞的 7.5 倍,是三种方法中最具有选择性毒性的一种方法。

综上所述,半仿生法、乙醇回流法和水提法提取的板栗花黄酮均能显著抑制 HeLa 细胞生长,并且随着黄酮浓度增加其抑制率提高。特别是半仿生法提取的板栗花黄酮能在低浓度下对肿瘤细胞有明显的抑制增殖功效,而对非肿瘤细胞 293T 细胞毒性较小,这为板栗花综合利用与开发提供理论依据。然而板栗花黄酮选择性细胞毒活性的作用机制还有待

进一步研究。

致谢:本研究得到了唐山迁西县板栗产业研究发展中心的赵国强所长和付庆伟研究员的大力支持和帮助,作者在此表示衷心感谢。

参考文献

- 1 Wang S(王嗣), Du CL(杜成林), Tang WZ(唐文照), *et al.* Study on The chemical composition of Chinese chestnut flower. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35: 1103-1104.
- 2 Yu XL(俞秀玲). Active components in pollen. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2007, 28: 236-238.
- 3 Wang XY(王小艳), Wang HL(王洪伦), Sheng X(盛筱), *et al.* Determination of flavonoid aglycones in rape bee pollen by capillary electrophoresis. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 1043-1047.
- 4 Campos MG, Webby RF, Markham KR, *et al.* Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 742-745.
- 5 Wu LGRL(乌兰格日乐), Bai HQ(白海泉), Weng H(翁慧). Research progresses for anti-oxidation of flavones. *J Inner Mongolia Univ Nation; Nat Sci* (内蒙古民族大学学报: 自科版), 2008, 23: 277-280.
- 6 Cao WG(曹纬国), Li ZQ(刘志勤), Shao Y(邵云), *et al.* A progress in pharmacological research of flavonoids. *Acta Bot Boreal Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23: 2241-2247.
- 7 Wang HR(王浩然). Study on the comprehensive utilization of chestnut flower. Shijiazhuang: Hebei University of Science & Technology(河北科技大学), MSc. 2010.
- 8 Li YJ(李月娇). Studies on the extracting and purifying technology and bio-functions of the total flavonoids from chestnut flower. Tianjin: Tianjin University of Commerce(天津商业大

学), MSc. 2015.

- 9 Engida AM, Kasim NS, Tsigie YA, *et al.* Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Crops Prod*, 2013, 41: 392-396.
- 10 Chen LM(陈利梅). Ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Porphyra yezoensis*. *J Funct Food Sci* (食品科学), 2012, 33(4): 41-46.
- 11 Zhou Q(周清), Jiang H(姜浩), Gao YT(高云涛), *et al.* Study on extraction of general flavonoids from *Eclipta alba* with propyl alcohol and ammonium sulfate aqueous two-phase separation and ultrasonic integration. *J Kunming Meta College* (昆明冶金高等专科学校学报), 2010, 26(5): 80-83.
- 12 Cui YR(崔誉蓉), Li DF(李德芳), Ju B(鞠宝), *et al.* Antitumor effects of four licoflavones *in vitro*. *Food Sci Tech* (食品科技), 2010, 35(7): 88-92.
- 13 Sun JX(孙锦秀), Jiang HY(姜慧妍), Du P(杜盼), *et al.* Effect of total flavonoids from *Phellinus vaninii* on the apoptosis of human Hepatoma HepG2 cells. *Chin Pharm* (中国药房), 2015, 26: 1342-1345.
- 14 Liu SJ(刘素君), Guo H(郭红), Pan M(潘明), *et al.* Study of effects of inducing tumor cell apoptosis on Thistle flavonoids. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21: 294-295.
- 15 Li N(李娜). Dried tangerine or orange peel more methoxy flavone antitumor function and mechanism research. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学), MSc. 2007.
- 16 Chen YQ(陈玉琼), Li AQ(李安琪), Meng Y(孟燕). Study on purification of *Ampelopsis grossedentata* flavones with macroporous adsorption resin and structural identification of main composition in them. *J Funct Food Sci* (食品科学), 2009, 30(9): 51-55.

(上接第 1222 页)

- 11 Feng AQ(冯爱卿), Wang WJ(汪文娟), Zeng LX(增列先), *et al.* The preliminary report of a fungus pathogen causing the rice brown streak leaf spot. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), 2013, 12: 78-81.
- 12 Yin JW(尹建雯), Chen YW(陈有为), Xu W(徐闻), *et al.* The research of antifungal activity of *Aloe* endophytic fungi. *Mod Agric Sci Technol* (现代农业科技), 2005, 12: 18-19.
- 13 Zhang YL(张亚磊). The secondary metabolites and their antimicrobial activity from endophytic *Nigrospora sp.* LM003 of *Moringa oleifera Lam.* Zhejiang: Zhejiang University of Technology(浙江工业大学), MSc. 2012.

- 14 Shang Z(尚卓). Investigation of two marine-derived fungi for antimicrobial secondary metabolites. Beijing: Marine Research Institute, Chinese Academy of Sciences(中国科学院研究生院海洋研究所), MSc. 2011.
- 15 Yang KL(杨凯琳). Isolation and identification of sea anemone-derived fungi from the South China Sea and the activated secondary metabolites of a fungus. Shandong: Ocean University of China(中国海洋大学), MSc. 2012.
- 16 Guo JK(郭俊柯). Isolation and identification of taxol-producing endophytic fungi in *Taxus media*. Shanxi: North West Agriculture and Forestry University(西北农林科技大学), MSc. 2012.