

# 太子参内生真菌 NSZJ-1 抗氧化活性的初步研究

王俊丽,王 龙,欧阳湖,焦松林,任建国\*

贵州医科大学公共卫生学院 环境污染与疾病监控教育部重点实验室,贵阳 550025

**摘要:**从太子参块根中分离内生真菌,以研究其发酵液不同极性溶剂提取物清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和羟自由基( $\cdot$ OH)能力,同时测定各提取物总多酚含量。结果表明,在所分离纯化得到的 10 株内生真菌中,只有 1 株为非致病内生真菌 NSZJ-1。菌株 NSZJ-1 经形态观察和分子鉴定为柱孢属(*Cylindrocarpon* sp.);NSZJ-1 发酵液 5 种极性溶剂-石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和乙醇提取物清除 DPPH 和 OH 自由基的  $IC_{50}$  值分别为:270.537、27.189、2.061、0.672、6.181 mg/mL 和 946.221、39.957、9.466、1.053 和 11.270 mg/mL;5 种极性溶剂-石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和乙醇提取物总多酚含量分别为 0、0.002 9、0.005 5、0.018 6、0.011 1 mg/mL。本研究表明内生菌 NSZJ-1 可作为抗氧化成分来源进行开发研究。

**关键词:**太子参;内生真菌;抗氧化活性;多酚

中图分类号:R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)11-1920-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.11.016

## Study on the antioxidant activity of the metabolites of endophytic fungus NSZJ-1 from *Pseudostellaria heterophylla*

WANG Jun-li, WANG Long, OUYANG Hu, JIAO Song-lin, REN Jian-guo\*

School of Public Health, Guizhou Medical University, Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guiyang 550025, China

**Abstract:** The endophytic fungus was isolated from *Pseudostellaria heterophylla* roots to study the scavenging capacities of different polar extracts of its fermentations on diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) radical and hydroxyl radical ( $\cdot$ OH), and the contents of total polyphenols for different polar extracts were also determined. The results showed that only one strain named NSZJ-1 was the non-pathogenic endophyte among ten endophytic fungi achieved. Strain NSZJ-1 was confirmed as *Cylindrocarpon* sp. based on the morphological observation and molecular identification. The  $IC_{50}$  values of five different polar solvent extracts, viz. petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol and ethanol of strain NSZJ-1 fermentation broth for scavenging DPPH and  $\cdot$ OH radicals were 270.537, 27.189, 2.061, 0.672, 6.181 mg/mL and 946.221, 39.957, 9.466, 1.053 and 11.270 mg/mL, respectively. The contents of total polyphenols in five different polar solvent extracts, viz. petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, and ethanol were 0, 0.002 9, 0.005 5, 0.018 6, 0.011 1 mg/mL, respectively. This study indicated that the endophytic NSZJ-1 could be used as a resource of antioxidant ingredients for development and research.

**Key words:** *Pseudostellaria heterophylla*; endophytic fungus; antioxidant activity; polyphenol

太子参为中药材的一种,有保护心肌功能、促进免疫、抗应激、治疗糖尿病、止咳等功效。目前在福建、贵州、江苏、安徽等地均有种植生产,但由于连作

障碍、化肥和农药等过度施用现象的存在,使得药材品质下降,进而影响到其药用安全问题。鉴于植物内生菌会产生与宿主相同或相似的生理活性成分<sup>[1]</sup>,且其发酵不受季节环境条件的影响,因而有望代替中药材的种植生产来获得药用活性成分。已有众多关于药用植物内生真菌产生活性成分的研究报道,如从银杏(*Ginkgo biloba*)叶中分离得到可产生抑菌(*Rhizoctonia solani* 和 *Sclerotinia sclerotiorum*)

收稿日期:2020-04-07 接受日期:2020-09-17

基金项目:国家自然科学基金(31760604);贵州省 2018 年大学生创新创业训练计划(2018520329);贵州省区域内一流学科建设项目-公共卫生与预防医学(黔教科研发 2017 [85]号)

\* 通信作者 Tel:86-851-88416193; E-mail:jianguoren2002@126.com

物质 sporothriolide 的内生真菌 *Nodulisporium* sp. A21<sup>[2]</sup>;从青藤 (*Sinomenium acutum*) 叶中分离得到具有细胞 (Hela, HCT116 和 A549 细胞系) 毒性活性成分 sinopestalotiollides A-D 的内生真菌 *Pestalotiopsis palmarum*<sup>[3]</sup>;从药用植物 *Polygala elongata* 中分离得到具有抗氧化活性 (ABTS 和 DPPH 自由基) 的内生真菌 *Colletotrichum* sp.<sup>[4]</sup>, 另外从药用植物 *Azadirachta indica* 中分离得到的 5 株内生真菌次生代谢物有机提取物活性表明, 其具有抑菌、抗氧化和抗糖尿病功能, 因而可用于特定药物的生产上<sup>[5]</sup>。Tanapichatsakul 等<sup>[6]</sup> 从越南肉桂 (*Cinnamomum loureiroi*) 叶中分离得到能产生丁香油酚的内生真菌 *Neopestalotiopsis* sp. 和 *Diaporthe* sp., 其代谢产物表现出明显的抑菌活性和抗氧化活性。关于太子参内生真菌的研究仅有有限报道<sup>[7]</sup>, 为此, 本研究计划从贵州省道地药材太子参中去分离内生真菌, 以研究其代谢产物抗氧化活性, 为天然活性化合物的获得奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

材料:新鲜太子参 (*Pseudostellaria heterophylla*) 块根 (来自贵州省施秉县牛大场镇太子参种植基地); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) (Sigma 公司); 福林酚试剂 (上海荔达生物科技有限公司); 没食子酸 (中国药品生物制品鉴定所); 抗坏血酸 (中国药品生物制品鉴定所); 其它化学试剂均为分析纯。

仪器: Multiskan GO 酶标仪 (赛默飞世尔科技); FA1004N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); GL-21B 离心机 (上海安亭科学仪器厂); R-100 旋转蒸发仪 (瑞士步琦公司); CLG-32L 全自动高压灭菌器 (日本 ALP); SW-CJ-1B 超净工作台 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); ZGP-9050P 隔水式恒温培养箱 (上海喆图科学仪器有限公司); DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 用于分离、活化真菌, 马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB) 用于菌株发酵。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 内生真菌的分离与纯化

把采集来的新鲜无病斑太子参块根样品用自来水清洗干净、风干, 然后依次用 75% 的酒精表面消

毒 1 min、5% 的次氯酸钠溶液消毒 5 min, 再用无菌水清洗 5 次, 取 100  $\mu$ L 的第 5 次清洗液放入马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 平板中, 进行涂布培养 (30  $^{\circ}$ C), 以确证表面彻底消毒。

在超净工作台上把经表面消毒的太子参块根切成约 1 cm 见方的组织块, 放入 PDA 平板中, 每个平板等间距放置 3 个组织块, 于 30  $^{\circ}$ C 下恒温培养以分离内生真菌。通过不定期观察, 将从块根上已经分离出的菌丝体移接于其它 PDA 平板上, 恒温培养 (30  $^{\circ}$ C) 且观察真菌是否纯化。纯化菌株移接 PDA 试管培养、低温保存和备用。

#### 1.2.2 内生真菌的致病性测定

将分离得到的内生真菌进行致病性测定: 首先对新鲜无病斑太子参块根进行表面消毒 (采用实验“1.2.1”中的消毒方法), 然后用解剖刀横切块根约为相等两份, 分别置于用无菌水浸润的灭菌滤纸 (位于培养皿内) 上, 在其中的一份块根组织切口处接种内生真菌, 另一份不接种作为对照, 用封口膜密封培养皿, 28  $^{\circ}$ C 下恒温培养, 观察块根切口致病情况。若组织切口有变褐、软化, 且菌丝体大量生长, 初步判断为该内生真菌为病原真菌。该菌株再经柯赫氏法则验证后, 即为病原真菌, 否则为内生真菌。

#### 1.2.3 内生真菌的鉴定

致病性内生真菌的初步鉴定依照 PDA 平板培养特征、产孢结构及孢子的显微观察进行; 而非致病性内生真菌的鉴定步骤如下: 从 PDA 平板上挑取少量菌丝体移入已灭菌的盛 50 mL 马铃薯葡萄糖培养液 (PDB) 三角瓶中, 28  $^{\circ}$ C、120 rpm 水浴振荡摇床培养 7 天, 用灭菌玻璃棒挑取菌丝团进行 DNA 提取。具体提取过程参考真菌 DNA 提取试剂盒说明书 (Qiagen 69104 DNeasy Plant Mini Kit (50), 德国 QIAGEN 公司)。采用引物 ITS1 和 ITS4 扩增内生真菌菌株的 rDNA ITS 区, 进行 PCR 反应。反应条件: 93  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 0.5 min, 55  $^{\circ}$ C 复性 1.0 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 0.5 min, 共 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应产物送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。测序所得的序列, 利用 BLAST 与 GenBank 中的已知序列进行比对, 寻找相似度最高的菌株, 结合形态学特征, 确定内生真菌的分类地位。

#### 1.2.4 内生真菌抗氧化活性试验

将内生真菌在 PDA 平板上活化, 用打孔器在菌落边缘打取 6 mm 菌碟接种于 150 mL 马铃薯葡萄

糖液体培养基 (PDB) 中培养, 29 °C、180 rpm 培养 5 天, 以不接种内生真菌的培养液作为空白对照, 重复 3 次。依照 Pan 等<sup>[8]</sup>方法进行石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和乙醇提取物制备和 6 个不同浓度

各提取物供试液制备 (见表 1)。DPPH 自由基清除能力测定参考余兰彬等方法<sup>[9]</sup>; 羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 清除能力测定参考任薇等方法<sup>[10]</sup>; 以 1 mmol/L 抗坏血酸为阳性对照。

表 1 不同极性供试液浓度设置

Table 1 Concentration setting of the different polar solutions assayed (mg/mL)

有机相 Organic phase	浓度序号 Sequential number of concentration					
	1	2	3	4	5	6
石油醚 Petroleum ether	3.031	6.603	12.125	24.250	48.500	97.000
二氯甲烷 Dichloromethane	1.313	2.625	5.250	10.500	21.000	42.000
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.406	0.813	1.625	3.250	6.500	13.000
正丁醇 n-Butanol	0.094	0.188	0.375	0.750	1.500	3.000
乙醇 Ethanol	1.313	2.625	5.2500	10.500	21.000	42.000

### 1.2.5 内生真菌抗氧化成分分析

多酚含量测定采用福林酚法<sup>[11]</sup>。标准曲线绘制: 用蒸馏水配制浓度为 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mg/mL 没食子酸溶液, 分别取上述溶液 1 mL 于 25 mL 试管中, 再加 1.0 mL 福林酚试剂、23.0 mL 5% 碳酸钠溶液, 混匀后于 25 °C 水浴 60 min, 在 745 nm 下测定吸光度, 绘制标准曲线为  $y = 47.786x + 0.1043$  ( $R^2 = 0.9727$ )。

样品含量测定: 取 5  $\mu\text{L}$  样品溶液于 EP 管, 加 5  $\mu\text{L}$  福林酚试剂、240  $\mu\text{L}$  5% 碳酸钠溶液, 混匀, 恒温水浴后在 745 nm 测定吸光度。每个样品重复三次。总酚含量以每毫升培养液含有相当没食子酸的毫克

数表示, 即 mg/mL。

### 1.3 数据分析

以上试验数据均重复测定 3 次, 其结果以平均数的形式表示。采用 SPSS17.0 (IBM 公司) 统计分析软件。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。Excel 进行数据整理。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生真菌的获得

经纯化分离获得 10 株内生真菌, PDA 平板培养特征见图 1。由 PDA 平板培养特征结合菌丝体生长情况, 将内生真菌分为 3 类: 第 1 类包括菌株 GS-1、GS-3、GS-5、MD-2、MD-3、MD-5 和 MD-6, 菌丝体呈现棉絮状, 有紫色色素产生。菌丝体生长速度快, 28

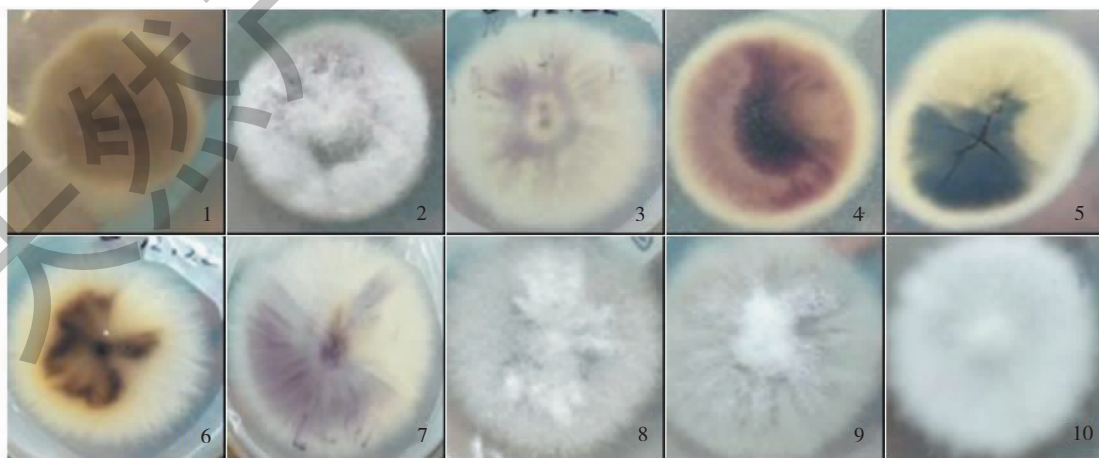


图 1 内生真菌在 PDA 平板上的培养特征

Fig. 1 The cultural characteristics of endophytic fungi on PDA plate

注: 1~10: NSZJ-1、GS-1、GS-3、GS-5、GS-7、GS-8、MD-2、MD-3、MD-5、MD-6。

℃恒温培养5天,菌落直径达9 cm;第2类为GS-7和GS-8,菌丝体致密、平铺呈垫状,有黄黑色色素产生。菌丝体生长速度慢,28℃恒温培养7天,菌落直径约5 cm;第3类为菌株NSZJ-1,白色菌丝体致密、平铺于培养基表面,背面有棕褐色色素产生。菌丝体生长速度慢,28℃恒温培养7天,菌落直径约3~4 cm之间(图1-1)。由此可见,太子参块根含有丰富的内生真菌资源。

## 2.2 内生真菌的致病性

室内新鲜太子参块根接种致病情况表明,菌株

NSZJ-1为非致病内生真菌(块根组织不呈现软化变褐现象),而菌株GS-1、GS-3、GS-5、GS-7、GS-8、MD-2、MD-3、MD-5和MD-6均为致病内生真菌(块根组织呈现软化变褐现象),其感染致病太子参块根状况见图2。受致病内生真菌感染的块根出现腐烂坏死状,且菌丝体在块根上生长旺盛(图2-4),而非致病内生真菌接种后的块根则无上述变化(图2-2)。由此可见,外观呈现无感病状态的太子参块根其内部潜伏存在有病原真菌的侵染。



图2 内生真菌对太子参块根致病情况测试

Fig. 2 Assays on pathogenicity of endophytic fungi on root tuber of *Pseudostellaria heterophylla*

注:1和3为对照;2和4为接种内生真菌。Note:1 and 3 are controls;2 and 4 are inoculated with endophytic fungi.

## 2.3 内生真菌的鉴定

由试验结果“2.1”得到的第1类内生真菌产孢结构为单瓶梗,有大型镰刀状分生孢子和小型分生孢子,且有紫色素产生,初步确定为镰刀菌类(*Fusarium* sp.);第2类内生真菌产孢结构轮枝分支,有球形分生孢子,且有黑色素产生,初步鉴定为轮枝孢菌类(*Verticillium* sp.);第3类内生真菌NSZJ-1产孢结构为单瓶梗或轮枝分支,有大型柱状分生孢子(多为3分隔,平直)和厚垣孢子形成(图3)。ITS

序列分析表明其与 *Cylindrocarpon* sp. (AB369260.1)、*Dactylonectria pauciseptata* (LC427841.1)、*Cylindrocarpon pauciseptata* (JF735305.1)和 *Ilyonectria radicola* (HM214452.1)有100%同源性(系统进化树自展值为99%,见图4),结合菌株NSZJ-1在PDA上的培养特征以及大型分生孢子的隔膜数、小型分生孢子和厚垣孢子的有无以及参考文献<sup>[12]</sup>,将内生菌NSZJ-1鉴定为柱孢属(*Cylindrocarpon* sp.)。

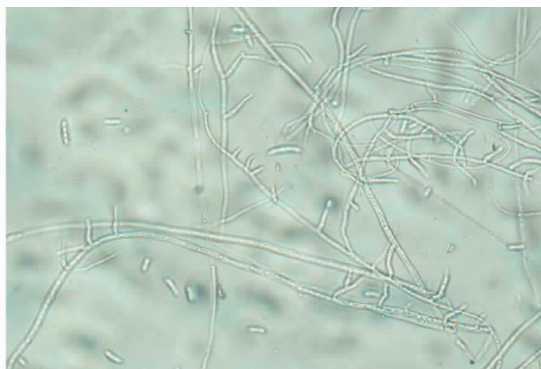


图3 内生菌NSZJ-1菌丝体及孢子形态显微结构(×10)

Fig. 3 Microscopic structures of mycelia and spores of endophytic fungus NSZJ-1 (×10)

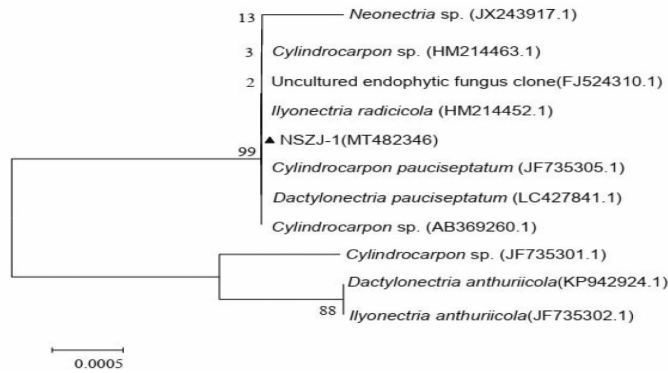


图4 基于 rDNA ITS 序列系统进化树的构建(邻接法)

Fig. 4 The construction of phylogenetic tree based on rDNA ITS sequence (neighbour joining method)

## 2.4 内生真菌 NSZJ-1 的抗氧化活性

内生真菌振荡培养、去除菌体后,不同极性粗提取物 DPPH 自由基清除能力和羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除能力测定结果见图5和6。从图5和6中可看出,在各相粗提取物测试浓度范围内,随着浓度的增加,DP-PH 自由基和羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除率增加。石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和乙醇提取物清除 DPPH 自由基、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 270.537、27.189、2.061、0.672、6.181 mg/mL 和 946.221、39.957、9.466、1.053 和 11.270 mg/mL,由此可见,内生真菌抗氧化物质主要集中在乙酸乙酯、正丁醇和乙醇提取物中,且正丁醇提取物抗氧化性最强,其次为乙酸乙酯提取物。1 mmol/L 抗坏血酸的 DPPH 自由基和羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除率分别为 96% 和 95.1%。

## 2.5 内生真菌 NSZJ-1 抗氧化成分多酚测定

石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和乙醇提

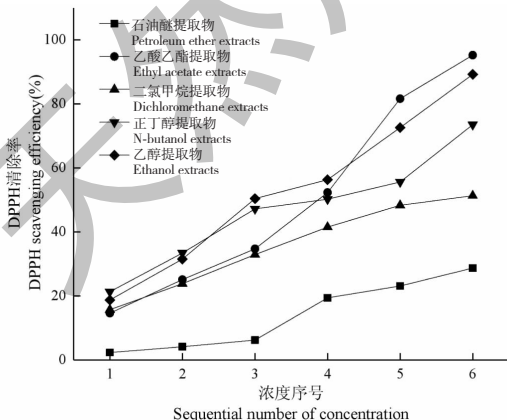


图5 不同极性有机提取物对 DPPH 清除能力

Fig. 5 The scavenging capacities of different polar extracts on DPPH radical

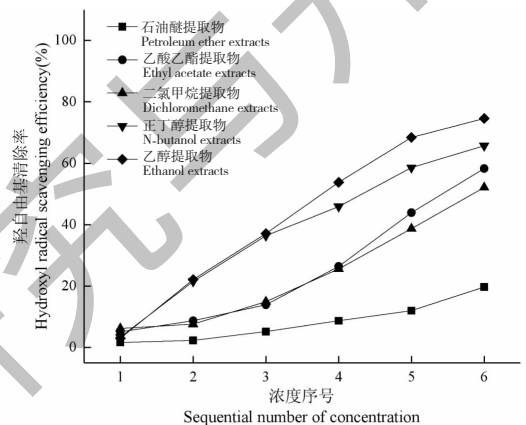


图6 不同极性有机提取物对羟自由基清除能力

Fig. 6 The scavenging capacities of different polar extracts on hydroxyl radical

取物总多酚含量用没食子酸当量(mg/mL)来表示,分别为0.0001、0.0029、0.0055、0.0186、0.0111 mg/mL。内生真菌 NSZJ-1 多酚主要集中在正丁醇提取物中,其次为乙醇提取物中,再者为乙酸乙酯提取物,而在二氯甲烷提取物中多酚的含量约为前三者的15%~50%,石油醚提取物中多酚含量几乎为0;二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和乙醇提取物中多酚含量与 DPPH 自由基和羟自由基清除率的关系分别见图7和8。

在一定范围内,多酚对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率随其浓度的增加而增强。二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和乙醇提取物中多酚清除 DPPH 自由基和羟自由基的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 1.966、0.949、4.138、1.677  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 3.353、4.415、6.241、2.710  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



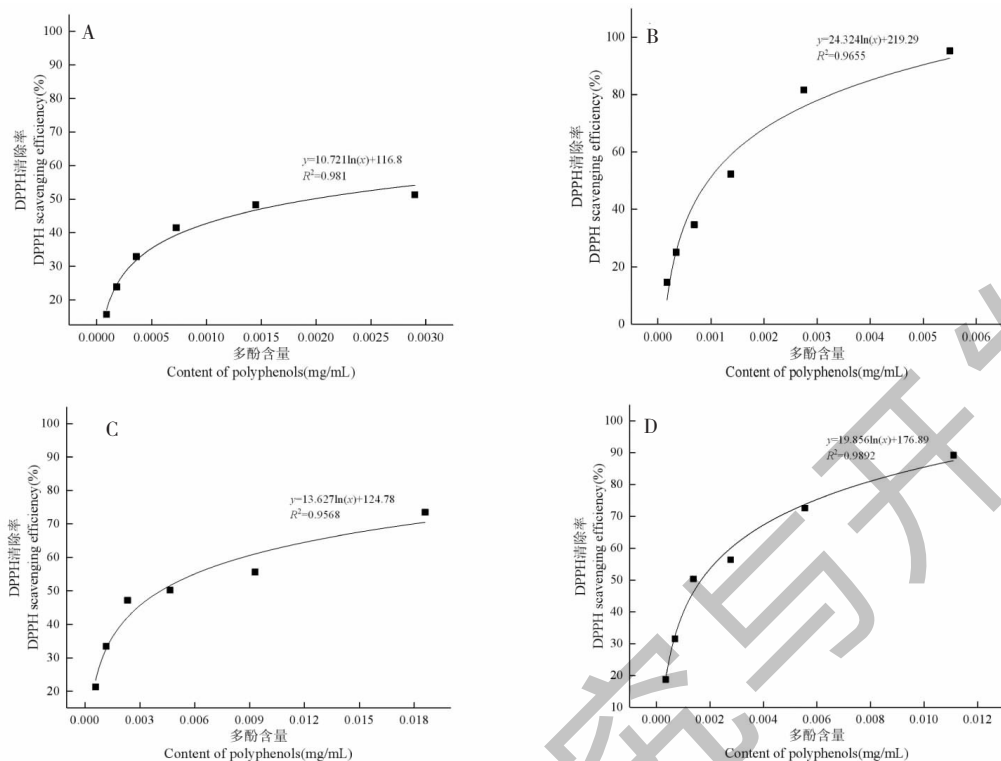


图7 不同有机提取物中多酚含量与DPPH自由基清除率的关系

Fig. 7 Relationship between the contents of polyphenols in different organic phase extracts and DPPH radical scavenging efficiency

注:A:二氯甲烷;B:乙酸乙酯;C:正丁醇;D:乙醇。Note:A: Dichloromethane;B: Ethyl acetate;C: n-Butanol;D: Ethanol.

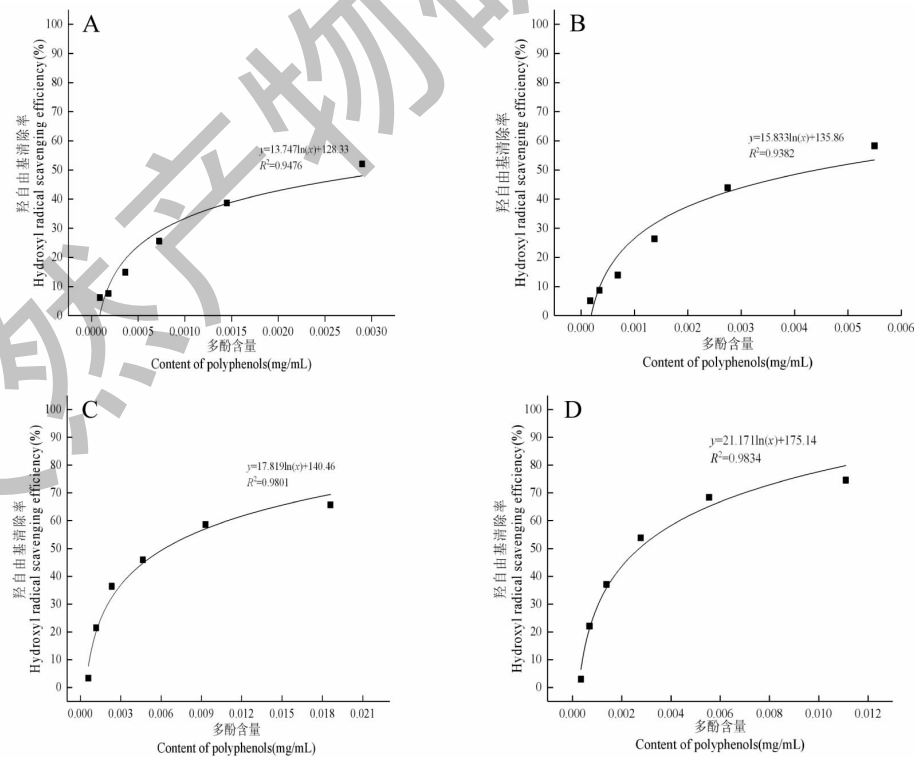


图8 不同有机提取物中多酚含量与羟自由基清除率的关系

Fig. 8 Relationship between the contents of polyphenols in different organic phase extracts and hydroxyl radical scavenging efficiency

### 3 讨论

目前已从药用植物中获得具有抗细菌、真菌、病毒、氧化、肿瘤、糖尿病和利什曼病等作用的众多内生真菌,因而有望被用于临床药物开发研究中。本研究从贵州道地药材基地采取太子参分离获得的内生真菌 NSZJ-1 为柱孢属 (*Cylindrocarpon* sp.) 明显不同于福建产地太子参分离得到的内生真菌 (DP-PH 自由基清除的  $IC_{50}$  值相差很大)<sup>[7]</sup>, 进而说明宿主植物栖息地点对内生真菌的寄主专一性有影响<sup>[13]</sup>。

对于药用植物内生真菌代谢物抗氧化研究方面,前人已有诸多报道。Septiana 等<sup>[14]</sup>从 *Curcuma longa* 叶中分离得到的内生真菌 Bo. Ci. Cl. D1 和 Bo. Ci. Cl. D2, 其乙酸乙酯提取物对 DPPH 自由基清除的  $IC_{50}$  值分别为 24.04 和 96.08 mg/mL, 多酚含量分别为 113.47 和 81.83 mg/g, 该结果表明提取物多酚含量与其清除 DPPH 自由基能力正相关, 同时也间接暗示了这类物质是主要的抗氧化剂。关于药用植物内生真菌抗氧化研究, 以往大多研究集中在乙酸乙酯提取物方面<sup>[15,16]</sup>, 且发现内生真菌的抗氧化能力与其代谢物全酚含量正相关<sup>[15]</sup>。Sorout 和 Arunachalam<sup>[17]</sup>从药用植物 *Azadirachta indica* 中分离得到 5 株内生真菌, 不同内生真菌含有的植物化学成分种类各不相同, 其中 F5 菌株代谢物植物化学成分种类最多, 对其进行 PDB 发酵培养、有机溶剂提取得到的石油醚、二氯甲烷和乙酸乙酯提取物进行全酚测定及抗氧化 (DPPH 自由基清除) 试验, 结果表明: 多酚含量为乙酸乙酯提取物 > 二氯甲烷提取物 > 石油醚提取物; 抗氧化活性为乙酸乙酯提取物 > 二氯甲烷提取物 > 石油醚提取物。本研究采用与文献<sup>[17]</sup>相同的培养基质进行内生真菌发酵培养, 获得了与其相似的抗氧化活性结果, 具体表现在各提取物的  $IC_{50}$  值上。Xue 等<sup>[18]</sup>对内生真菌代谢物的抗氧化性 (DPPH 自由基和羟自由基) 研究表明, 3 个内生真菌发酵液乙酸乙酯提取物有较强的 DPPH 自由基清除能力, 但对羟自由基的清除能力却很弱, 本研究结果表明内生真菌 NSZJ-1 的正丁醇提取物有明显的 DPPH 自由基、羟自由基清除能力, 但进一步试验表明乙酸乙酯提取物中多酚具有较强的 DPPH 自由基清除能力, 乙醇提取物中的多酚具有较强的羟自由基清除能力, 造成有机溶剂粗提物与多酚类物质对自由基清除结果不一致的原因可能是内生真菌还可能产生多酚类之外的其它类抗氧化物质。

目前除了本研究从太子参块根中分离得到柱孢属 (*Cylindrocarpon* sp.) 内生真菌外, 也有文献报道从药用植物 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*<sup>[19]</sup>、*Sapium ellipticum*<sup>[20]</sup> 和 *Saussurea involucrate*<sup>[21]</sup> 等中分离得到此属内生真菌, 且相关文献报道此属内生真菌能够产生一些新结构化合物<sup>[20]</sup>, 为此今后有必要对太子参内生真菌 NSZJ-1 代谢物进行单体分离、纯化、结构鉴定及其生物活性开展研究, 为天然药物开发利用奠定基础。

### 参考文献

- García A, Rhoden SA, Rubin Filho CJ, et al. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L and their localization by scanning electron microscopy [J]. *Biol Res*, 2012, 45: 139-148.
- Cao LL, Zhang YY, Liu YJ, et al. Anti-phytopathogenic activity of sporothriolide, a metabolite from endophyte *Nodulisporium* sp. A21 in *Ginkgo biloba* [J]. *Pestic Biochem Phys*, 2016, 129: 7-13.
- Xiao J, Hu JY, Sun HD, et al. Sinopestalotiellides A-D, cytotoxic diphenyl ether derivatives from plant endophytic fungus *Pestalotiopsis palmarum* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28: 515-518.
- Pawle G, Singh SK. Antioxidant potential of endophytic fungus *Colletotrichum* species isolated from *Polygala elongate* [J]. *Int J Pharm Bio Sci*, 2014, 5: 313-319.
- Sorout N, Arunachalam S. Diversity and biological activities of endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica* [J]. *Res J Pharm Technol*, 2017, 10: 4198-4202.
- Tanapichatsakul C, Khruengsai S, Monggoot S, et al. Production of eugenol from fungal endophytes *Neopestalotiopsis* sp. and *Diaporthe* sp. isolated from *Cinnamomum loureiroi* leaves [J]. *Peer J*, 2019, 7: e6427.
- Cai QY, Lin S, Xiao GQ, et al. Study on bioactivity of endophytic fungi from *Pseudostellaria heterophylla* (Miqi) Pax ex Pax et Hoffm [J]. *J Fujian Univ TCM* (福建中医药大学学报), 2011, 21: 41-43.
- Pan F, Chen AM, Zhu XQ, et al. Antioxidant activity of secondary metabolites derived from the fungal endophytic *Fusarium* sp. A14 isolated from *Fritillaria unibracteata* Hsiao et KC Hsia [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 376-381.
- Yu LB, Xu GL, Tan ZW, et al. Studies on antioxidant activities of five anti-aging Chinese medicines by DPPH method [J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med* (江西中医药), 2016, 47: 74-76.

- 10 Ren W, Bao XW, Zhang ZF, et al. Study on free radical scavenging and anti-lipid peroxidation of seabuckthorn polysaccharide[J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2019, 8:272-277.
- 11 Liu C, Zhou JC. Research on antioxidation of plant polyphenols[J]. *Cereals Oils*(粮食与油脂), 2011, 2:43-46.
- 12 Schroers H-J, Žerjav M, Munda A, et al. *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia[J]. *Mycol Res*, 2008, 112:82-92.
- 13 Petrini O, Sieber TN, Toti L, et al. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi[J]. *Nat Toxins*, 1992, 1:185-196.
- 14 Septiana E, Rahmawati SI, Izzati FN, et al. Antioxidant activity, total phenolic, and flavonoid contents of the extract of endophytic fungi derived from turmeric(*Curcuma longa*) leaves[J]. *J Pharm Sci Commun*, 2019, 16:78-85.
- 15 Khiralla A, Mohamed I, Thomas J, et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8:701-704.
- 16 Duan X, Xu F, Qin D, et al. Diversity and bioactivities of fungal endophytes from *Distylium chinense*, a rare waterlogging tolerant plant endemic to the Three Gorges Reservoir[J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19:278.
- 17 Sorout N, Arunachalam S. Diversity and biological activities of endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica*[J]. *Res J Pharm Technol*, 2017, 10:4198-4202.
- 18 Xue HY, Yang L, Wang YG, et al. Isolation, characterization, and antioxidant potentials of endophytic fungi of *Ephedra intermedia*[J]. *Oxid Commun*, 2016, 39:2972-2980.
- 19 Liu T, Greenslade A, Yang SC. Levels of rhizome endophytic fungi fluctuate in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* as plants age[J]. *Plant Divers*, 2017, 39:60-64.
- 20 Kamdem RST, Pascal W, Rehberg N, et al. Metabolites from the endophytic fungus *Cylindrocarpon* sp. isolated from tropical plant *Sapium ellipticum*[J]. *Fitoterapia*, 2018, 128:175-179.
- 21 Lv Y, Zhang F, Chen J, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the alpine plant *Saussurea involucrate*[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33:1300-1306.
- (上接第 1912 页)
- 14 de Mendonca IC, Porto IC, do Nascimento TG, et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells[J]. *BMC Complem Altern M*, 2015, 15:357.
- 15 Xuan HZ, Zhang JH, Wang YH, et al. Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organotin compound in MCF-7 cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26:570-574.
- 16 Thallinger CM, Kiesewetter B, Raderer M, et al. Preand post-operative treatment modalities for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32:4609-4627.
- 17 Bird-Lieberman EL, Fitzgerald R. Early diagnosis of oesophageal cancer[J]. *Brit J Cancer*, 2009, 101:1-6.
- 18 Xuan HZ, Wang Y, Li AF, et al. Bioactive components of Chinese propolis water extract on antitumor activity and quality control[J]. *Evid-based Compl Alt*, 2016, 2016:9641965.
- 19 Li AF, Xuan HZ, Sun AL, et al. Preparative separation of polyphenols from water-soluble fraction of Chinese propolis using macroporous absorptive resin coupled with preparative high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1012-1013:42-49.
- 20 Wang Y, Fu C, Zhang L, et al. Antitumor activities comparison of Chinese propolis and Brazilian green propolis[J]. *Chin Apidol*(中国蜂业), 2014, 65:43-48.
- 21 Xuan HZ, Fu CL, Sang Q, et al. The anticancer properties of caffeic acid phenethyl ester and its molecular mechanisms[J]. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2013, 34:97-104.