文章编号:1001-6880(2015)11-1900-05

青海干旱生境土壤链霉菌次级代谢产物的分离鉴定及活性研究

余志银[1,2],喻明明[2],罗剑英[2],苏　灿[2],薛泉宏[3],黄胜雄[2],孙　芸[1*],马亚团[2,3*]

[1]新疆医科大学中药系,乌鲁木齐 830011;[2]中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室,昆明 650201;[3]西北农林科技大学理学院,杨凌 712100

摘　要: 对青海干旱生境土壤链霉菌 *Streptomyces pactum* KIB-HL8 液体发酵,应用硅胶柱色谱和高效液相色谱等方法进行分离和纯化,得到 5 个化合物,并用 MS、NMR 等方法对其结构进行解析,分别鉴定为 *N*-乙酰酪胺(1)、*N*-乙酰色胺(2)、吡咯-2-甲酰胺(3)、Inthomycin C(4)和 Inthomycin B(5)。对其抗真菌、细菌活性进行筛选,发现化合物 4 对金黄色葡萄球菌有抑制活性,化合物 1 和 2 对番茄灰霉病菌有抑制活性,化合物 3 对番茄早疫病菌有较强的抑制活性。

关键词: 链霉菌;代谢产物;分离鉴定;抗细菌活性;抗真菌活性

中图分类号: R914.4;R284.2　　**文献标识码:** A　　DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.11.012

Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites from a Soil-derived *Streptomyces* from Arid Habitats of Qinghai

YU Zhi-yin[1,2], YU Ming-ming[2], LUO Jian-ying[2], SU Can[2], XUE Quan-hong[3], HUANG Sheng-xiong[2], SUN Yun[1*], MA Ya-tuan[2,3*]

[1]*College of TCM, Xinjiang Medical University, Xinjiang Urumqi 830011, China*; [2]*State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Yunnan Kunming 650201, China*; [3]*College of Science, Northwest A&F University, Shaanxi Yangling 712100, China*

Abstract: Five compounds, *N*-acetyramine (**1**), *N*-acetyltryptamine (**2**), pyrrole-2-carboxamide (**3**), inthomycin C (**4**) and inthomycin B (**5**), were isolated from the fermentation broth of *Streptomyces pactum* KIB-HL8, and their structures were elucidated by analysis of NMR and MS data. In addition, compound **4** moderately inhibited growth of *Staphylococcus aureus*. Compounds **1** and **2** showed significant antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Compound **3** displayed inhibitory activity against *Alternaria solani*.

Key words: *Streptomyces*; secondary metabolites; isolation and identification; antibacterial activity; antifungal activity

链霉菌是一类高 G+C 含量的革兰氏阳性放线菌,广泛分布于土壤、海洋、极端环境及一些生物体内[1]。链霉菌代谢途径复杂,能够产生许多结构新颖的次级代谢产物,在医疗、农业、食品、化工、环保等领域具有重要应用价值,是新天然活性物质的重要源泉。如最著名的生物农药阿维菌素(*Avermectins*,简称 *Avm*),由美国 Merek 公司于 1976 年在日本 Kitasato 研究所提供的 *Streptomyces avermitilis* 发酵物中发现。其作为一种高效广谱驱虫剂,不仅对线虫而且对蜱螨类(*Acarina*)、甲虫类(*Coleoptera*)、磷翅目(*Lepidoptera*)、直翅目(*Orthoptera*)、双翅目(*Diptera*)和膜翅目(*Hymenoptera*)害虫均有杀灭作用。其它从链霉菌中发现的生物农药还有井冈霉素、春雷霉素、农抗 120、中生菌素等[2]。然而这些生物农药的广泛使用导致严重的药物抗性问题,故寻找新的潜在的生物农药就显得至关重要。

番茄作为一种世界性蔬菜作物,其病害番茄灰霉病、番茄早疫病已成为影响番茄种植和品质的主要因素[3-5]。为了寻找新的抗植物病原菌天然活性物质,本课题组对多株链霉菌的发酵产物进行了活性筛选,得到一株具有较好抑菌活性的链霉菌 KIB-HL8。因此,我们扩大了该菌株的发酵规模,对发酵液中的次级代谢产物进行提取分离,得到了 5 个化合物,结构分别鉴定为:*N*-乙酰酪胺(1)、*N*-乙酰色胺(2)、吡咯-2-甲酰胺(3)、Inthomycin C(4)和 In-

收稿日期:2015-07-10　　接受日期:2015-09-09

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(QN2013039);杨凌示范区科技计划(2014NY-33);云南省首批博士后定向培养资助

* 通讯作者 Tel:86-013639930399;E-mail:sunyun330@163.com;yatuanma@nwsuaf.edu.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

thomycin B(**5**)(见图 1),并对其抗真菌和抗细菌活性进行筛选,旨在确定其中的抗菌活性成分。

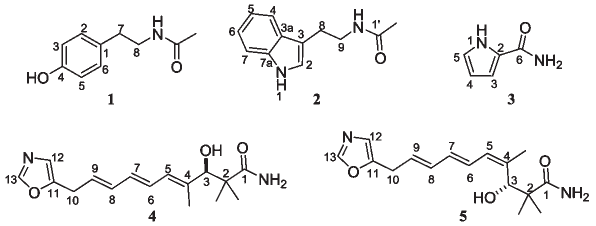

图 1　化合物 1 ~ 5 的化学结构

Fig. 1　Chemical structures of compounds **1-5**

1　材料与方法

1.1　仪器与材料

Bruker DRX-500、Avance Ⅲ-600 核磁共振仪(TMS 作为内标,δ 为 ppm),Waters Xevo TQ-S 型超高压液相三重四极杆联用质谱仪; ZQZY-HC 恒温摇床(上海知楚仪器),薄层色谱硅胶板和 200-300 目柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂),Sephadex LH-20(瑞典 AIRTECH 生物化学试剂公司生产),Hitachi Chromaster 5430 高效液相色谱仪(日立),YMC-Triat C_{18}型液相色谱柱(250 × 10 mm I. D.),中速滤纸(杭州新华纸业有限公司),YXQ-LS-18SI 高压蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。其他试剂为国产分析纯试剂(天津市大茂化学试剂厂,广东环凯微生物科技有限公司)。

1.2　发酵菌株

发酵菌株 *Streptomyces pactum* KIB-HL8 由西北农林科技大学资源环境学院微生物资源研究室薛泉宏教授课题组提供,菌株分离自青海干旱土壤样本(海西蒙古族藏族自治州德令哈市,东经 93°06′40.6″ ~ 96°22′14.9″,北纬 35°57′54.2″ ~ 37°15′09.8″)。通过对其 16S RNA 进行基因测序,发现其序列与 *Streptomyces pactum* AB184398,*Streptomyces olivaceus* AB249920 的序列相似度分别是 99.4% 和 99.3%,故将其初步鉴定为密旋链霉菌(*S. pactum*)。菌株 KIB-HL8 保藏于昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室。

1.3　培养基及培养条件

固体培养基: 为 MS 培养基,配方为大豆粉 20.0 g/L(煮沸过滤取滤液),甘露醇 20.0 g/L,技术琼脂粉 20.0 g/L,pH = 7.0。

种子培养基: 为 TSB 培养基,配方为胰蛋白胨 17.0 g/L,大豆蛋白胨 3.0 g/L,氯化钠 5.0 g/L,磷酸氢二钾 2.5 g/L,右旋葡萄糖 2.5 g/L,pH = 7.3 ± 0.2。

发酵培养基: 胰蛋白胨 2.0 g/L,葡萄糖 5.0 g/L,可溶性淀粉 12.0 g/L,玉米浆 7.0 g/L,酵母提取物 2.0 g/L,$CaCO_3$ 2.0 g/L,NaCl 4.0 g/L,K_2HPO_4 0.5 g/L,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L,$FeSO_4$ 1.0 mg/L,$MnCl_2$ 1.0 mg/L,$ZnSO_4$ 1.0 mg/L,pH = 7.5-7.8。

PDA: 200.0 g 去皮土豆切碎,加入 1.0 L 水,煮沸 30 min,用四层纱布过滤除,滤液定容到 1.0 L,加 20.0 g 琼脂粉,加热搅拌使其溶解,再加 20.0 g 葡萄糖。

LB: 胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母提取物 5.0 g/L,NaCl 10.0 g/L,技术琼脂粉 20.0 g/L, pH = 7.4。

将在 MS 平板上活化好的菌株接种到 20 只装有 50 mL 种子液的 250 mL 三角瓶中,置于 28 ℃,220 rpm 摇床上培养 2 d。

将种子液按 10% 接种量转接到 60 只盛有 250 mL 发酵培养基的 1 L 三角瓶中,置于 28 ℃,220 rpm 摇床上培养 7 d。

1.4　提取与分离

将发酵液于 6000 rpm 转速下离心 20 min。上清液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,用无水硫酸钠干燥,有机相减压浓缩后得 1.5 g 粗提物。经硅胶柱色谱分离,石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱(10∶0、10∶1、10∶2、0∶10),得到四个组分(Frs. A-D)。Frs. B 段过凝胶色谱 Sephadex LH-20,甲醇洗脱,TLC 分析,得到 3 个组分(Frs. B 1-3)。用 HPLC 分析后,Frs. B-2 段用高效液相色谱制备,用 28% ~ 100% 甲醇-水梯度洗脱,富集 20.2 min 的流份得化合物 **1**(57 mg),富集 37.1 min 的流份得化合物 **4**(1.4 mg),富集 41.3 min 的流份得化合物 **5**(1.0 mg); Frs. B-3 段用高效液相色谱制备,以 50% 的甲醇-水等度洗脱,富集 12.5 min 的流份得化合物 **2**(6.2 mg)。Frs. C

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

段经过 Sephadex LH-20(甲醇洗脱)后,TLC 分析,得到 3 个组分(Frs. C 1-3),用 HPLC 分析后,Frs. C-2 段用 HPLC 制备,以 15% 的甲醇-水等度洗脱,富集 16.5 min 的流份得化合物 3(14 mg)。

1.5 活性测试(滤纸片法)

将保存于石蜡油中的测试菌株番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella saubinetti*)、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporiodes*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、苹果腐烂病(*Valsa mali Miyabe et Yamada*)分别接种至 PDA 培养基上活化培养,28 ℃避光培养 4 d,待其菌落基本长满培养皿为止即可用。将保存于甘油中的测试菌株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)接种至 LB 培养基上活化培养,28 ℃避光培养 12 h,待其菌落基本长满培养皿为止即可用。

化合物 1、2、3、4、5 和卡那霉素均配制成浓度为 2.0 mg/mL 的丙酮溶液备用。

取无菌滤纸片(用打孔器将滤纸片加工成直径为 5 mm),滴上 10 μL 样品溶液,待溶剂挥干后移入已接菌的培养基平板上,培养皿中心到滤纸片中心的距离约为 30 mm 左右,金黄色葡萄球菌放在 37 ℃培养 12 h,其他菌株放在 28 ℃培养 24 h 后观察抑菌圈大小,用十字交叉法测量抑菌圈直径。以空白对照长至滤纸片为依据,测量菌落边缘到滤纸片的距离。测试时以无菌水和丙酮为阴性对照,以卡那霉素为阳性对照,每块平板中都需有阳性对照[6]。重复平行做 3 次,抑菌圈直径测量 3 次求平均值。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 无色粉末;分子式 $C_{10}H_{13}NO_2$;ESI-MS *m/z*: 180 $[M+H]^+$;^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 7.00 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2,6), 6.72 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3, H-5), 3.31 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-7), 2.66 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-8), 1.88 (3H, s, CH_3);^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ: 22.6 (CH_3), 35.7 (C-8), 42.6 (C-7), 116.3 (C-3, C-5), 130.8 (C-2, C-6), 131.3 (C-1), 156.9 (C-4), 173.25。以上数据与文献报道一致[7],故鉴定为 *N*-乙酰酪胺。

化合物 2 浅褐色油状物;分子式 $C_{12}H_{14}N_2O$;ESI-MS *m/z*: 225 $[M+Na]^+$, $[M+H]^+$ 203; ^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 7.55 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-4), 7.32 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-7), 7.08 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-6), 7.06 (1H, m, H-5), 7.00 (1H, m, H-2), 3.46 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-9), 2.93 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-8), 1.91 (3H, s, CH_3);^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 173.4 (C-1′), 138.3 (C-7a), 128.9 (C-3a), 123.5 (C-2), 122.4 (C-6), 119.7 (C-5), 119.4 (C-4), 113.4 (C-3), 112.4 (C-7), 41.7 (C-9), 26.4 (C-8), 22.7 (CH_3)。以上数据与文献报道一致[8],故鉴定为 *N*-乙酰色胺。

化合物 3 白色粉末;分子式 $C_5H_6N_2O$;ESI-MS *m/z*: 111 $[M+H]^+$;^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 6.91 (1H, dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, H-5), 6.80 (1H, dd, *J* = 3.5, 1.5 Hz, H-3), 6.15 (1H, dd, *J* = 3.5, 2.5 Hz, H-4);^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ: 165.9 C-6), 126.4 (C-2), 123.3 (C-5), 112.9 (C-3), 110.3 (C-4)。以上数据与文献报道一致[9],故鉴定为吡咯-2-甲酰胺。

化合物 4 黄色油状物;分子式 $C_{16}H_{22}N_2O_3$;ESI-MS *m/z*: 291 $[M+H]^+$;^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.79 (1H, s, H-13), 6.80 (1H, s, H-12), 6.39 (1H, dd, *J* = 11.4, 14.2 Hz, H-6), 6.23 ~ 6.18 (3H, m, H-8, H-7, NH), 6.02 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-5), 5.76 (1H, m, H-9), 5.44 (1H, brs, NH), 4.0 (1H, brs, H-3), 3.80 (1H, brs, OH), 3.49 (2H, d, *J* = 4.8 Hz, H-10), 1.79 (3H, s, 4-CH_3), 1.30 (3H, s, 2-CH_3), 1.11 (3H, s, 2-CH_3); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 180.6 (C-1), 150.8 (C-11), 150.4 (C-13), 137.9 (C-4), 133.4 (C-8), 132.4 (C-7), 128.8 (C-5), 128.0 (C-6), 127.4 (C-9), 122.5 (C-12), 83.8 (C-3), 44.9 (C-2), 28.9 (C-10), 25.7 (2-CH_3), 21.7 (2-CH_3), 13.3 (4-CH_3)。以上数据与文献报道一致[10],故鉴定为 Inthomycin C。

化合物 5 黄色油状物;分子式 $C_{16}H_{22}N_2O_3$;ESI-MS *m/z*: 291 $[M+H]^+$;^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 8.09 (1H, s, H-13), 6.85 (1H, s, H-12), 6.56 (1H, dd, *J* = 13.8, 11.4 Hz, H-6), 6.26 (1H, dd, *J* = 15.0, 10.8 Hz, H-8), 6.16 (1H, dd, *J* = 13.8, 10.8 Hz, H-7), 6.01 (1H, d, *J* = 11.4 Hz,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

H-5) ,5.76 (1H,dt, J = 15.0,7.2 Hz H-9) ,4.68 (1H,s,H-3) ,3.51 (2H,d,J = 7.2 Hz,H-10) ,1.79 (3H,s,4-CH_3) ,1.25 (3H,s,2-CH_3) ,1.05 (3H,s,2-CH_3) ; ^{13}C NMR (150 MHz,CD_3OD) δ : 183.4 (C-1) ,153.1 (C-13) ,152.8 (C-11) ,139.3 (C-4) ,134.8 (C-8) ,132.9 (C-7) ,130.9 (C-5) ,129.2 (C-6) ,128.2 (C-9) ,122.7 (C-12) ,75.9 (C-3) ,46.7 (C-2) ,29.4 (C-10) ,26.3 (2-CH_3) ,21.9 (2-CH_3) ,19.8 (4-CH_3) 。以上数据与文献报道一致[11] ,故鉴定为 Inthomycin B。

2.2 化合物抑菌活性结果

通过对 10 株病原菌株的测试,发现化合物 4 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 有抑制活性,对其他所测试病原菌没有活性; 化合物 1 和 2 对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*) 有抑制活性,对其他所测试病原菌没有活性; 化合物 3 对番茄早疫病菌(*Alternaria solani*) 有较强的抑制活性,对其他所测试病原菌没有活性; 化合物 5 对所测试病原菌均无活性(见表 1) 。

表 1 化合物 1 ~5 抑菌圈直径(mm)

Table 1 The diameter of inhibition zone of compounds **1-5** (mm)

测试菌 Tested bacteria	1	2	3	4	5	Kanamycin	Acetone	H_2O
番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*	7.20 ±0.14	5.00 ±0.05	0	0	0	0	0	0
小麦赤霉病菌 *Gibberella saubinetti*	0	0	0	0	0	0	0	0
苹果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporiodes*	0	0	0	0	0	0	0	0
棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum*	0	0	0	0	0	0	0	0
番茄早疫病菌 *Alternaria solani*	0	0	9.00 ±0.15	0	0	0	0	0
尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*	0	0	0	0	0	0	0	0
马铃薯干腐病菌 *Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0	0	0
苹果腐烂病 *Valsa mali Miyabe et Yamada*	0	0	0	0	0	0	0	0
大肠杆菌 *Escherichia coli*	0	0	0	0	0	0	0	
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	0	0	0	9.86 ±0.04	0	10.16 ±0.02	0	0

注: 表中数据均为 3 次重复平均值。

Note: Data given were from 3 duplicates.

3 讨论

本研究从链霉菌 *Streptomyces pactum* KIB-HL8 发酵液中分离得到 5 个化合物,其中化合物 1 由 Sobolevskaya 等人报道具有细胞毒活性,可以抑制海胆胚胎细胞的增值[12] 。化合物 2 由张文娟等人报道对革兰氏阳性菌有较强的抑制作用如蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) ,枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) ,对革兰氏阴性菌无明显活性[13] 。另外 Inthomycin 类化合物是一种恶唑三烯类抗生素,Uemura 等人在 1985 年首次报道了恶唑霉素 A 和新的恶唑霉素,这类抗生素具有广谱、有效的抗菌、抗病毒,抗肿瘤活性[10] 。1990 年 ōmura 等人从链霉菌中首次分到 Inthomycin A 和异构体 Inthomycin B、Inthomycin C。这类化合物是一种高度特异性纤维素生物合成抑制剂,并具有很强的抗菌活性和除草活性[10] 。中国是番茄出口大国,番茄种植面积约 145.5 万 hm^2,保护地栽培面积已达 21.7 万 hm^2,年产量约 837.6 万吨且以每年 6% ~8% 的速度增长,与此同时番茄上的各种病害也在逐年增加[14] 。本实验首次发现化合物 1 和 2 对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*) 有抑制活性,化合物 3 对番茄早疫病菌(*Alternaria solani*) 有较强的抑制活性,这为开发新型抑制番茄病害的生物农药提供理论和数据指导。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

1 Dai FP (代芳平), Li SW (李师翁). Progress on the secondary metabolites and applications of *Streptomyces*. *Biotech Bull* (生物技术通报), 2014, 3(4): 30-35.

2 Jiang L (蒋琳), Ma CZ (马承铸). Research advance biological pesticides. *Acat Agric Shanghai* (上海农业学报), 2000, 16: 73-77.

3 Xu YH (徐艳辉), Li Y (李烨), Xu XY (许向阳). Research progress of tomato *Fusarium wilt*. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), 2008, 39: 128-134.

4 Wang ST (王树桐), Hu TL (胡同乐), Wang XY (王晓燕), *et al*. Screening of plant extracts for the fungi toxicity against *Botrytis cinerea*. *J Agric Univ Hebei* (河北农业大学学报), 2003, 26: 61-64.

5 Wu RF (吴仁锋), Wang ZH (汪志红). Preliminary review on *Alternaria solani* of tomato. *Chin Plant Protect* (中国植保导刊), 2009, 3: 16-18.

6 Fang ZD (方中达). Research Methods on Plant Diseases. Beijing: China Agriculture Press (中国农业出版社), 1979.

7 Zhao PJ, Wang HX, Li GH, *et al*. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces sp*. Lz531. *Chem Biodivers*, 2007, 4: 899-904.

8 Maeda U, Hara N, Fujimoto Y, *et al*. *N*-fatty acyl tryptamines from annona reticulata. *Phytochem*, 1993, 34: 1633-1635.

9 Konig GM, Wfught AD. Two new naturally occurring pyrrole derivatives from the tropical marine sponge *Agelas oroides*. *Nat Prod Lett*, 1994, 5: 141-146.

10 Yoshino M, Eto K, Takahashi K, *et al*. Organocatalytic asymmetric syntheses of inthomycins A, B and C. *Org Biomol Chem*, 2012, 10: 8164-8174.

11 Henkel T, Zeeck A. Inthomycine, neue Oxazol-triene aus *Streptomyces sp*. *Liebigs Ann Chem*, 1991, 1991: 367-373.

12 Sobolevskaya MP, Denisenko VA, Moiseenko AS, *et al*. Bioactive metabolites of the marine actinobacterium *Streptomyces sp*. KMM 7210. *Russ Chem Bull*, 2007, 56: 838-840.

13 Zhang WJ, Wei SP, Zhang JW, *et al*. Antibacterial activity composition of the fermentation broth of *Streptomyces djakartensis* NW35. *Molecules*, 2013, 18: 2763-2768.

14 Ji JJ (纪军建), Zhang XF (张小风), Wang WQ (王文桥), *et al*. Research progress on control of tomato *Gray Mold*. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2012, 28: 109-113.

(上接第 1877 页)

10 Orlando G, Booth C, Wang Z, *et al*. Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies. *Biomater*, 2013, 34: 5915-5925.

11 Berthier C, Marti HP. Metzincins, including matrix metalloproteinases and meprin, in kidney transplantation. *Swiss Med Wkly*, 2006, 136: 789-794.

12 López-Hernández FJ, López-Novoa JM. Role of TGF-β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res*, 2012, 347: 141-154.

13 Wang YL (王亚利). Experimental study of Shenluotong on controlling and regulating mesangial cells, extracellular matrix and correlated cytokine. Shijiazhuang: Hebei Medical University (河北医科大学), MSc. 2005.

14 Dong Q (佟强), Cao JM (曹建民), Wu A (吴翱), *et al*. Hyperkinesia effects the extracellular matrix, metalloproteinase and the inhibitor factors in renal cells. *J Beijing Sport Univ* (北京体育大学学报), 2006, 29: 931-933.

15 Guo L (郭林). Change of renal tissue micro-structure in rats resulted from load training and mechanisms of molecule regulation. Beijing: Beijing Sport University (北京体育大学), PhD. 2005.

16 Yan H (阎衡). Transforming growth factor beta (TGF-β) and Autoimmune Disorders. *Int J Immunol Res*, 2002, 25: 25-27.

17 Chew B, Park J, Chyun J, *et al*. Astaxanthin stimulates immune response in humans in a double blind study. *Supplyside West Seminar*, 2003, 9.

18 Xie CX (谢潮鑫), Meng M (孟猛), Yin XF (殷先锋), *et al*. Effects of astaxanthin on renal fibrosis and cell apoptosis induced by partial unilateral ureteral obstruction in rats. *J South Med Univ*, 2013, 33: 305-308.

19 Wei QX (魏晴雪), Wan YG (万毅刚), Zhao Q (赵青), *et al*. Molecular mechanism of extracellular matrix degradation and intervention of traditional Chinese Medicine. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 38: 533-537.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net