



غربال‌گری فرآورده‌های حاصل از استرپتو‌مایسنس‌ها با استفاده از تکنیک کشت سلولی به منظور شناسایی مواد آنتی‌تومور

دکتر سعید تاج‌بخش^{*}، سپهر صالحی^۲، دکتر نسرین معظمی^۳

^۱ استادیار باکتری شناسی، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۲ کارشناس ارشد باکتری شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون

^۳ استاد میکروب شناسی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران- تهران

چکیده

زمینه: یافتن مواد آنتی‌تومور جدید از اهمیت خاصی در جهت درمان و مبارزه با سرطان برخوردار است. استرپتو‌مایسنس‌ها از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های تولید کننده مواد آنتی‌تومور می‌باشند. هدف از این مطالعه، یافتن مواد آنتی‌تومور در استرپتو‌مایسنس‌های جدید شده از خاک توسط تکنیک کشت سلولی بود.

مواد و روش‌ها: منحني رشد استرپتو‌مایسنس تهیه شد و به منظور تولید فرآورده‌های میکروبی، نخست سوسپانسیون اسپور به محیط کشت اولیه تلقیح شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، باکتری‌ها به محیط کشت تولیدی انتقال یافتند. پس از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در محیط کشت تولیدی، در اواخر فاز ثابت رشد فرآیند تولید قطع شد و مایعات تخمیری استرپتو‌مایسنس‌ها جمع‌آوری شدند. برای غربال‌گری مواد آنتی‌تومور، روش «سنجهش افترافی مواد سایتوتوکسیک منتشر شده در آگار» بکار گرفته شد که طی آن مایعات تخمیری مذکور روی سلول‌های T مربوط به لنفوم موش مورد آزمایش قرار گرفتند. فرآورده‌هایی که قادر به کشتن سلول‌های سرطانی بودند، با نمایان شدن هاله‌ای آبی رنگ در کشت‌های حاوی سلول سرطانی مشخص شدند.

یافته‌ها: مجموعاً، ۱۲۵ فرآورده مربوط به ۱۲۵ سوش استرپتو‌مایسنس به دست آمد که دو فرآورده توانستند پاسخ مثبت (هاله آبی) تولید نمایند.

نتیجه‌گیری: دو فرآورده استرپتو‌مایسنس‌های جدا شده از خاک، فعالیت سایتوتوکسیک در کشت سلولی حاوی سلول‌های توموری از خود نشان دادند، این دو فرآورده می‌توانند ویژگی آنتی‌توموری داشته باشند که نیازمند پژوهش‌های آینده می‌باشند.

واژگان کلیدی: استرپتو‌مایسنس، آنتی‌تومور، سرطان، سایتوتوکسیک

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۱۳ - پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۱۴

* بوشهر، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، صندوق پستی ۳۶۳۱

Email: tajbakhshsaeed@yahoo.com

مقدمه

سلول‌ها پس از تقسیم، به صورت میسلیوم پدیدار می‌شوند. بنابراین بارزترین جنبه مورفولوژی استرپتوマイسس، تشکیل فیلامنت‌های رویشی و هوایی بسیار منشعب می‌باشد (۲). در کشت‌های مایعی که در آن‌ها توسط شیکر عمل هواده‌ی انجام می‌گیرد، استرپتوマイسس به شکل میکروکلنی‌ها یا تجمعات کروی رشد می‌کند. این باکتری چه در محیط جامد و چه در محیط مایع رنگدانه‌های قابل انتشاری را تولید می‌نماید (۲ و ۸).

یافتن ترکیبات آنتی‌توموری جدید یکی از مسائل اصلی در مطالعات مربوط به آنتی‌تومورها محسوب می‌گردد. برای دستیابی به این هدف، گام نخست این است که تعدادی سوش استرپتوマイسس از طبیعت جداسازی گردد و پس از تولید فرآورده‌های این ارگانیسم‌ها، تکنیک‌های غربال‌گری روی آن‌ها پیاده شده و آن فرآورده‌هایی که دارای فعالیت آنتی‌توموری هستند، شناسایی شوند. بدین ترتیب سوش‌های میکروبی مفیدی که طی روش‌های غربال‌گری مشخص و انتخاب شده‌اند، در اختیار محققین قرار می‌گیرد (۳ و ۹). برای این منظور، هم روش‌هایی در موجود زنده (*in vivo*) وجود دارد که در طی آن‌ها از موش‌های مبتلا به لوسومی لیمفوئید L1210 و یا لوسومی P388 استفاده می‌شود (۹-۱۱) و هم روش‌هایی در ویترو (in vitro) انجام می‌شود که یکی از آن‌ها تکنیک کشت سلولی می‌باشد (۱۲ و ۱۳). شایان ذکر است که از لاین‌های سلولی L1210 و P388 در ویترو نیز استفاده شده است (۹ و ۱۴). در این پژوهش جهت غربال‌گری فرآورده‌های حاصل از استرپتوマイسس‌ها، تکنیکی به نام «سنجه افتراکی

سرطان بیماری مهلکی است که بشر از دیرباز با آن درگیر بوده است. با وجود این‌که امروزه مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی کاهش پیدا کرده ولی کماکان سرطان مشکل عمدۀ‌ای در پزشکی به شمار می‌آید به طوری‌که در آمریکا پس از بیماری‌های قلبی-عروقی، دومین علت مرگ و میر می‌باشد (۱). سرطان آثار فراغی را بر جای می‌گذارد و علاوه بر عوارض جسمی، از نظر روانی نیز بیمار در شرایط نامطلوبی قرار می‌دهد. لذا هرگونه پژوهش در جهت درمان و مبارزه با این عارضه، از اهمیت خاصی برخوردار است.

یک گروه از مهم‌ترین داروها در زمینه شیمی درمانی تومورها، آنتی‌تومورهایی هستند که از میکرووارگانیسم‌ها و به ویژه استرپتوマイسس‌ها بدست می‌آیند و معمولاً به نام آنتی‌بیوتیک‌های ضد تومور خوانده می‌شوند (۲ و ۳). مثلاً اکتینومایسین-D توسط استرپتوマイسس پورولوس (Streptomyces purvulus) و اکتینومایسین-A و B توسط استرپتوマイسس آنتی‌بیوتیکوس (*S. antibioticus*) تولید می‌گردند (۳). میتومایسین-C از استرپتوマイسس پورپوراسنس (4) و کرومکسی مایسین از (*S. purpurascens*) استرپتوマイسس لیابانی (*S. liabani*) (۵) بدست moromycins A (B and B) که داروهای جدیدی می‌باشند و همچنین میترامایسین (mithramycin) نیز توسط استرپتوマイسس‌ها تولید می‌شوند (۶ و ۷).

استرپتوマイسس‌ها به عنوان میکرووارگانیسم‌های عمدۀ مولد آنتی‌بیوتیک‌های ضد تومور، باکتری‌هایی هستند هوازی، گرم مثبت، و بدلیل عدم جدا شدن

مایع بودند. تعداد ۱۵ ارلن در انکوباتور شیکردار با میزان چرخش ۲۲۰ rpm، اینکوبه شدند. یکی از ارلن‌ها به عنوان زمان صفر در نظر گرفته شد و بدون شیک دادن و انکوباسیون، سوسپانسیون میکروبی آن توسط کاغذ صافی واتمن صاف گردید و به وسیله فور خشک شد. در رابطه با ارلن‌های درون شیکر، هر ۸ ساعت یک ارلن از شیکر خارج شد و سوسپانسیون میکروبی آن به طرق فوق الذکر صاف و خشک گردید. بنابراین ۱۶ توده میکروبی خشک شده از ۱۶ ارلن بدست آمد که مربوط به زمان‌های صفر تا ۱۲۰ ساعت بود و توسط وزن کردن و کم نمودن وزن کاغذ، وزن خشک هر کدام از آن‌ها بدست آمد و منحنی رشد ترسیم گردید.

ب- تولید فراآورده

از هر سوش استرپتومایسین، یک کشت بر روی محیط ISP-4 شب دار تهیه شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شد. به طور متوسط، پس از ۴ روز اینکوباسیون، سطح ISP-4 را به طور کامل میکروب و به ویژه اسپور آن فراگرفت. در مرحله بعد کل میکرووارگانیسم و اسپورهای ISP-4 شسته شده و به ۵۰ میلی‌لیتر محیط سطح ISP-4 شسته شده و به ۵۰ میلی‌لیتر (preculture medium) موجود در کشت اولیه (preculture medium) موجود در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، تلقیح گردید. محیط کشت Brain Heart Infusion (BHI) مایع (Broth) بود. ارلن حاوی کشت اولیه در انکوباتور شیکردار در ۲۱۰rpm (۱۰) و در دمای ۳۰°C قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت (۱۰ و ۱۸)، ۲/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی کشت اولیه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولیدی (production medium) موجود در ارلن ۲۵۰

مواد سایتوکسیک منتشر شده در آگار» (Differential Agar Diffusion Bioassay for Substances Cytotoxic DADBCS) یا روش (۱۵) بکار برده شده است.

مواد و روش کار

قبل‌با به کارگیری روش‌های ویژه جداسازی، ۱۲۵ گونه مجهول استرپتومایسین از خاک جداسازی شده بود. جهت غربال‌گری فراآورده، این باکتری‌ها به منظور شناسایی مواد آنتی‌تومور، لازم بود که فراآورده‌های تخمیری (fermentation broth) آن‌ها تولید شود. با توجه به اینکه آنتی‌تومورها متابولیت ثانویه هستند (۱۶ و ۱۷) و در فاز ثابت رشد باکتری تولید می‌گردد، در مرحله اول لازم بود که منحنی رشد استرپتومایسین تهیه گردد.

الف- تهیه منحنی رشد

منحنی رشد برای یکی از استرپتومایسین‌های جدا شده به این صورت تهیه شد: محیط (International Streptomyces project -4) در چند لوله آزمایش بزرگ تهیه گردید و استرپتومایسین بر روی آن کشت داده شد. پس از ۴ روز، استرپتومایسین به خوبی روی این محیط اسپور تولید نمود. سپس اسپورهای موجود بر روی سطح محیط را به وسیله محیط مایع Spo (Sporulation Broth) شسته و سوسپانسیون اسپور تهیه شد و نهایتاً غلظت آن به میزان ۱۰۷ اسپور در میلی‌لیتر تنظیم گردید. در مرحله بعد به طور جداگانه ۲/۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون اسپور در ۱۶ عدد ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد که این ارلن‌ها حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط Spo

۱۲/۵ میلی متر به فرآوردهای استرپتومایسین آگشته گردید و بر روی سطح آگار قرار گرفت. میتومایسین-C با غلظت $200\text{ }\mu\text{g/ml}$, به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد که یک دیسک نیز به آن آگشته و در پلیت گذاشته شد. پس از مدت ۸ تا ۱۰ ساعت در انکوباتور 37°C اینکوبه شد. سانتی گراد حاوی ۵ درصد گاز CO_2 اینکوبه شد. در مدت زمان اینکوباسیون، فرآوردهای دیسک به درون آگار منتشر شده و در صورتی که فعال باشند، سلول‌های سرطانی ناحیه قرارگیری دیسک را می‌کشند. پس از ۸ تا ۱۰ ساعت به منظور بررسی فعالیت سایتو توکسیک، نخست دیسک‌ها از روی سطح آگار برداشته شدند. سپس سطح آگار کاملاً با محلول 0.05 M درصد DPIP 2,6-dichloro phenol رنگ حیاتی (DPIP, 2-indo-phenol) پوشانده شد. در اثر رنگ آبی از ۵ دقیقه، اضافی رنگ دور ریخته شد و پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد حاوی ۵ درصد گاز CO_2 قرار گرفت که پس از این مدت، نتیجه آزمایش بررسی شد.

یافته‌ها

الف- منحنی رشد

منحنی ۱، رشد مربوط به یک سوش استرپتومایسین را نشان می‌دهد. آنتی‌تومورها به عنوان متابولیت ثانویه در فاز ثابت رشد تولید می‌شوند. با توجه به منحنی رشد، زمان فاز ثابت رشد مشخص گردید؛ بنابراین در اواخر این زمان فرآیند تولید را قطع کرده و آنتی‌تومورها را پی‌جويی نمودیم.

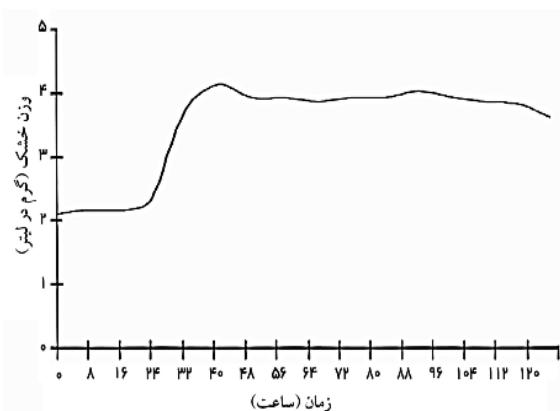
میلی لیتری انتقال یافت. محیط کشت تولیدی، محیط Spo_2 مایع بود. این محیط با همان شرایط در اینکوباتور شیکردار قرار گرفت با این تفاوت که مدت زمان انکوباسیون حدوداً ۵ روز در نظر گرفته شد. استرپتومایسین در این مدت وارد فاز ثابت رشد شده و متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌نماید. لذا حداکثر پس از ۵ روز پر و سه قطع rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی آن جمع‌آوری گردید.

ج- غربال‌گری فرآوردهای توسط تکنیک کشت سلولی کشت سلول‌های توموری مدام (continuous) به منظور غربال‌گری آنتی‌تومورها بکار می‌رود که در آن اثر آنتی‌توموری مواد را به طور مستقیم بر روی سلول‌های سرطانی بررسی می‌نمایند. سلول سرطانی مورد استفاده، EL-4 نام داشت که در واقع یک سلول T لنفوی موشی بود و از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران خریداری گردید. EL-4 به صورت مدام و سوسپانسیونی رشد می‌نماید. همان‌طور که قبل از این شاره شد، تکنیک مورد استفاده، «سنچش افتراقی مواد سایتو توکسیک منتشر شده در آگار» نام داشت (۱۵). در این روش به $3/6$ میلی لیتر سوسپانسیون سلولی EL-4 در محیط RPMI-1640 که شمارش آن $4 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ بود، $2/7$ میلی لیتر سرم جنین گاو، 1 میلی لیتر محلول گلوکز (0.075 g بر میلی لیتر) و $7/6$ میلی لیتر محلول آگار $2/8$ درصد اضافه شد. سوسپانسیون نهایی بدست آمده به سرعت در یک پلیت 9 سانتی‌متری ریخته شد که پس از جامد شدن آگار، سلول‌ها در سطح و عمق محیط گیر می‌افتدند. پس از جامد شدن آگار، دیسک‌های کاغذی با قطر

نتیجه آزمایش آماده گردید، بدین صورت که سلول‌های زنده رنگ را احیاء کرده و در نتیجه در ناحیه‌ای از پلیت که سلول زنده وجود داشت، رنگ آبی محیط از بین می‌رفت، ولی سلول‌های مرده توانایی احیاء رنگ را نداشتند و در نتیجه در محل قرارگیری دیسک و تأثیر فرآورده‌ها (در صورتی که فرآورده سلول را از بین برده باشد) رنگ احیاء نشده و به صورت هاله آبی رنگ نمایان می‌شد. از مجموع ۱۲۵ فرآورده مربوط به ۱۲۵ سوش استرپتومایسین، دو فرآورده توانستند پاسخ مثبت (هاله آبی) در این آزمایش ایجاد نمایند.

بحث

جهت تولید فرآورده‌های تخمیری، استرپتومایسین‌ها در محیط تولیدی به مدت ۵ روز اینکوبه شدند که استرپتومایسین در این مدت وارد فاز ثابت رشد شده و متابولیت‌های ثانویه مثل آنتی‌بیوتیک‌های ضد تومور را تولید نمودند. وی (Wei) و همکاران (۱۸)، استرپتومایسین آرانه ۲۰۴۶ (S. arane 2046) را به مدت ۱۲۰ تا ۱۴۴ ساعت در محیط تولیدی اینکوبه کردن و پس از این مدت، میزان مناسبی از آنتی‌تومور بدست آوردن. مائیس (Maiese) و همکاران (۱۹) زمان ۹۶ ساعت را در نظر گرفتند. آن‌ها نشان دادند که پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت، میزان آنتی‌بیوتیک به حداقل رسیده و سپس ثابت باقی می‌ماند. آنتی‌تومورها متابولیت‌های ثانویه هستند و در فاز ثابت رشد تولید می‌شوند. با توجه به محدوده زمانی فاز ثابت رشد (تقریباً از ساعت چهل و هشت‌تم به بعد) در منحنی رشد استرپتومایسین (منحنی ۱) و همچنین با توجه به زمان‌هایی که توسط پژوهشگران فوق الذکر بکار رفته، یک زمان اینکوباسیون ۵ روزه را برای تولید فرآورده‌ها



نمودار ۱: منحنی رشد یک سوش استرپتومایسین

ب- کشت استرپتومایسین در محیط مایع و تولید فرآورده در محیط ISP-4، استرپتومایسین‌ها به طور میانگین پس از ۴ روز به خوبی رشد کردند و مقدار زیادی اسپور تولید نمودند. در محیط کشت اولیه، استرپتومایسین‌ها پس از ۴۸ ساعت رشد خوبی نشان دادند و کلی آن‌ها به صورت تجمعاتی محیط کشت را پر کرد. در محیط تولیدی نیز باکتری‌ها به صورت تجمعات مشخصی رشد خود را نشان دادند. ضمناً گاهی در مراحل نهایی رشد پیگمان‌ها نیز مشاهده می‌شدند.

ج- غربال‌گری فرآورده‌ها توسط روش سنجش افتراقی مواد سایتو توکسیک منتشر شده در آکار (DADBCS) سلول EL-4 در محیط مغذی آکاردار در پلیت جایگزین شد. سپس دیسک‌های آگسته به فرآورده‌های مورد آزمایش بر روی آن قرار گرفت و پلیت به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. در مدت زمان اینکوباسیون، فرآورده‌ها در صورت فعل بودن، موجب مرگ سلول‌های ناحیه قرارگیری دیسک شدند. پس از ۱۰ ساعت، دیسک‌ها را از روی محیط بردند و محیط با رنگ DPIP پوشانده شد که رنگ آبی به محیط داد. پس از ۱/۵ تا ۲ ساعت اینکوباسیون،

فرآورده ریکامایسین (rebeccamycin) نامیده شد و فعالیت آن بر ضد تومورهای موشی ثابت گردید. ماتسون و همکاران (۲۰) در طی مطالعه‌ای دیگر، مایع تخمیری سوش C-49-OC9 را بر روی سلول C26 که مربوط به کلون موش می‌باشد، امتحان کردند که ماده مذکور اثر سلول کشی روی C26 داشت. فعالیت آنتی‌توموری این فرآورده در تومورهای موشی نیز نشان داده شده است. با توجه به مطالعات فوق الذکر، آشکار است که بین فعالیت آنتی‌توموری در کشت سلول (در ویترو) با فعالیت آنتی‌توموری در حیوان، رابطه بسیار نزدیکی وجود دارد به طوری که بسیاری از داروهایی که بر روی تومورهای آزمایشی حیوانات مؤثربودند، در این روش‌ها نیز پاسخ مثبت تولید کرده‌اند (۹ و ۱۴). با این وجود برای اینکه فعالیت آنتی‌توموری فرآورده‌های سایوتوكسیک مطالعه ما در حیوان اثبات گردد، جا دارد که این فرآورده‌ها روی موش‌های مبتلا به سرطان‌های استاندارد نیز آزمایش شوند. به این نکته نیز باید اشاره شود که هرچند در زمینه شناسایی مواد ضد سرطان غالباً سلول P388 بکار می‌رود، ولی همان‌گونه که در مطالعات پژوهشگران مختلف مشاهده می‌گردد، لاینهای سلولی گوناگونی در این رابطه مورد استفاده قرار می‌گیرد. ما به دو علت از سلول EL-4 استفاده نمودیم: یکی این که به صورت سوسپانسیون رشد می‌کند که این ویژگی، لازمه روش DADBCS می‌باشد و دیگر این که در مطالعات غربال‌گری، سلولهای سرطانی موشی کارایی وسیعی دارند و EL-4 نیز یک سلول موشی است.

از مجموع ۱۲۵ فرآورده مربوط به ۱۲۵ سوش استرپتومایسین، دو فرآورده توانستند پاسخ مثبت تولید

مناسب پنداشتیم که طی این مدت در فاز ثابت رشد، آنتی‌تومور تولید شده و به بیرون از باکتری ترشح می‌شود.

در این تحقیق، فرآورده‌های تولیدی از محیط مایع بیرون سلول باکتری جمع‌آوری گردید. مائیس و همکاران (۱۹)، ماتسون (Matson) و همکاران (۲۰) و بسیاری از محققین دیگر نیز فرآورده‌های تولیدی خود را از مایع تخمیری بیرون سلولی منتشر شده در بین میسلیوم‌ها بدست آورند (۱۷ و ۲۱). این گونه عملکرد بدین دلیل است که به طور کلی بیشتر متابولیت‌های ثانویه به خارج از سلول میکرووارگانیسم تولید کننده ترشح می‌شود و تعداد کمی از آن‌ها درون سلول باقی می‌ماند. این امر به ویژه در مورد آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد سایوتوكسیک صادق است؛ زیرا باقی ماندن این مواد درون باکتری ممکن است برای خود آن باکتری مضر باشد (۲۲). دلیل بارز دیگر که نشان دهنده خارج سلولی بودن چنین فرآورده‌هایی است، نقش آن‌هاست چرا که این‌گونه مواد باید در جهت رقابت بکار روند.

در غربال‌گری توسط روش DADBCS، دو فرآورده اثر سایوتوكسیک روی سلولهای سرطانی نشان دادند. به طور کلی سیستم غربال‌گری با استفاده از کشت سلولهای سرطانی، یک سیستم معتبر برای شناخت ضد سرطان‌ها به شمار می‌آید. اینویوئی (Inouye) و همکاران کشت سلول P388 را بکار برداشت و ممانعت از رشد این سلول‌ها را توسط آنتی‌تومور استرپتونيگرین مشخص کردند (۲۳). امروزه استرپتونيگرین به عنوان یک آنتی‌تومور قوی پذیرفته شده است. ممانعت از رشد سلول KB توسط مایع تخمیری سوش C-38-383، گزارشی بود که بوسیله (Bush) و همکاران منتشر کردند (۱۰) که بعداً این

توموری نشان دادند، می‌توانند ویژگی آنتی توموری داشته باشند.

نمایند. بنابراین در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود که با توجه به این که این دو فرآورده فعالیت سایتو توکسیک در کشت سلولی حاوی سلول‌های

References:

- Stricker TP, Kumar V. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al, editors. Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, 173-223.
- Mitchell TG. Actinomycetes. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, et al, editors. Zinsser microbiology. 20th ed .USA: Prentice Hall International Inc, 1992, 526-37.
- Tsukagoshi S, Takeuchi T, Hmezawa H. Antitumor substance. In: Rehm HJ, Reed G, editors. Biotechnology. Vol 4. Weinheim: Verlag Chemie, 1986, 509-30.
- Mandwal AK, Subramanian PM, Bhatia MC, et al. Production of mitomycin C and porfiromycin by Streptomyces species. *J Nat Prod* 1985; 48: 334.
- Iwami M, Kawai Y, Kiyoto S, et al. A new antitumor antibiotic, Chromoxymycin. I. Taxonomic studies on the producing strain: a new subspecies of the genus Streptomyces. *J Antibiot* 1986; 39: 6-11.
- Abdelfattah MS, Kharel MK, Hitron JA , et al. Moromycins A and B, isolation and structure elucidation of C-glycosylangucycline-type antibiotics from Streptomyces sp. KY002. *J Nat Prod* 2008; 71: 1569-73.
- Perez M, Baig I, Brana AF, et al. Generation of new derivatives of the antitumor antibiotic mithramycin by altering the glycosylation pattern through combinatorial biosynthesis. *Chembiochem* 2008; 9: 2295-304.
- Locci R. Streptomyces and related genera. In: Williams ST, editor. Bergey's manual of systematic bacteriology. 8th ed. Vol 4. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, 2451-508.
- Nakayama K. Prescreen of antitumor compounds. In: Rhem HJ, Reed G, editors. Biotechnology. Vol 1. Weinheim: Verlag Chemic, 1986, 395-9.
- Bush JA, Long BH, Catino JJ, et al. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *J Antibiot* 1987; 40: 668-78.
- Lam KS, Veitch JA, Forenza S, et al. Biosynthesis of elasmicin A, a novel antitumor antibiotic. *J Nat Prod* 1989; 52: 1015-21.
- Zandi K, Farsangi MH, Nabipour I, et al. Isolation a 60 KDa protein with in vitro anticancer activity against human cancer cell lines from the purple fluid of the Persian Gulf Sea hare, *Aplysia dactylomela*. *Afr J Biotechnol* 2007; 6:1280-83.
- Mizui Y, Sakai T, Iwata M, et al. Pladienolides, new Substances from Culture of *Streptomyces Platensis* Mer-11107.III. In vitro and in vivo antitumor activities. *J Antibiot* 2004; 57: 188-96.
- Elespuru RK, White RJ. Biochemical prophage induction assay: a rapid test for antitumor agents that interact with DNA. *Cancer Res* 1983; 43: 2819-30.
- Perlman D, Lummis WL, Geiersbach HJ. Differential agar-diffusion bioassay for cytotoxic substances. *J Pharm Sci* 1969; 58: 633-4.
- Dietera A, Hamm A, Fiedler HP, et al. pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic, and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain. *J Antibiot* 2003; 56: 639-46.
- Hu JF, Wunderlich D, Thiericke R, et al. Jenamidines A to C: unusual alkaloides from *Streptomyces* sp. with specific antiproliferative properties obtained by chemical screening. *J Antibiot* 2003; 56:747-54.
- Wei TT, Chan JA, Roller PP, et al. Detection of givocarcin antitumor complex by a biochemical induction assay (BIA). *J Antibiot* 1982; 35: 529-32.
- Maiese WM, Lechevalier MP, Lechevalier HA, et al. LL-E19020 alpha and beta. Animal growth promoting antibiotics: taxonomy, fermentation and biological activity, *J Antibiot* 1989; 42: 1489-93.
- Matson JA, Bush JA. Sandramycin, a

- novel antitumor antibiotic produced by a Nocardioides sp. Production, isolation, characterization and biological properties. *J Antibiot* 1989; 42: 1763-7.
21. Martin GD, Tan LT, Jensen PR, et al. Marmycin A and B , cytotoxic pentacyclic C-glycosides from a marine Sediment – derived actinomycete related to the genus Streptomyces. *J Nat Prod* 2007; 70:1406-9.
22. Vining LC. Secondary metabolism. In: Rehm HJ, Reed G, editors. *Biotechnology*. Vol 4. Weinheim: Verlag Chemic, 1986, 19-38.
23. Inouye Y, Okada H, Roy SK, et al. Biological properties of streptonigrin derivatives. I. Antimicrobial and cytoidal activities. *J Antibiot* 1985; 38: 1429-32.