

海洋放线菌 *Streptomyces* sp. 124092 中的 细胞毒活性成分

解修超^{1,2}, 梅文莉¹, 曾艳波¹, 林海鹏¹, 庄 令¹, 戴好富¹, 洪 葵¹

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101;

2. 陕西理工学院陕西省资源生物重点实验室, 汉中 723001)

摘要 对海洋放线菌 *Streptomyces* sp. 发酵液的提取物进行柱层析分离, 得到 5 个化合物. 经 MS, NMR, ¹H-¹H COSY, HSQC 和 HMBC 等数据鉴定, 其结构分别为 3-氨基-丙酸对甲苯酯(**1**)、6-Amino-3-(4-hydroxybenzyl)-1,4-diazonane-2,5-dione(**2**)、正丁基- α -D-吡喃甘露糖苷(**3**)、大豆苷元(**4**)和 1*H*-3-吡啶甲酸(**5**). 其中化合物 **1** 和 **2** 为新化合物, 细胞毒活性测试结果表明, 化合物 **1**~**4** 对人肝癌细胞(SMMC-7721)具有不同程度的生长抑制活性.

关键词 海洋放线菌; *Streptomyces* sp.; 细胞毒活性; 分离和纯化

中图分类号 O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)11-2183-04

从海洋微生物中发现有药用开发前景的活性天然产物已成为天然产物化学研究的热点之一^[1]. 红树林生态系统处于海洋与陆地之间的潮间带, 海洋微生物的多样性非常丰富, 近 10 年来的研究结果表明, 红树林环境的微生物富含新的具有生理活性的天然产物^[2]. 本研究组在对红树林土壤及红树植物共附生微生物的培养物进行抗肿瘤活性筛选的过程中, 发现分离自海南文昌清澜港红树植物银叶树(*Heritiera littoralis*)根际土壤的菌株 *Streptomyces* sp. (124092) 的发酵液对肝癌细胞(SMMC-7721)显示出生长抑制活性. 在活性筛选指导下, 从该发酵液的提取物中分离得到 5 个化合物, 经 MS, NMR, ¹H-¹H COSY, HSQC 和 HMBC 等波谱技术鉴定, 其结构分别为: 3-氨基-丙酸对甲苯酯(**1**), 6-Amino-3-(4-hydroxybenzyl)-1,4-diazonane-2,5-dione(**2**)、正丁基- α -D-吡喃甘露糖苷(**3**)、大豆苷元(**4**)和 1*H*-3-吡啶甲酸(**5**). 其中化合物 **1** 和 **2** 为两个含氮化合物, 均为新化合物. 对上述化合物进行细胞毒活性测试的结果表明, 化合物 **1**~**4** 对肝癌细胞(SMMC-7721)具有不同程度的生长抑制活性.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

北京泰克仪器有限公司 X-5 型显微熔点仪; Heidolph Laborota-20L 和 Heidolph Laborota-4000 旋转蒸发仪; Perkin Elmer-343 型自动旋光仪; VG Autospec-3000 型质谱仪; Bruker AV-400 核磁共振波谱仪, TMS 为内标. 薄层层析硅胶和柱层析硅胶均为青岛海洋化工厂产品; Sephadex LH-20 为 Merck 公司产品; DA-201 为上海亚东核级树脂有限公司产品; GJ-100BE 发酵罐(上海联环公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT)、MEM 和平衡盐溶液 PBS(北京欣经科公司); 丝裂霉素 C(Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.); 肝癌 SMMC-7721 细胞购自武汉大学培养物保藏中心; 其它试剂均为分析纯.

1.2 菌 株

放线菌 124092 分离自海南省文昌市清澜港红树林保护站红树植物银叶树的根际土壤, 由本研究

收稿日期: 2008-03-03.

基金项目: 国家“九七三”计划前期研究专项(批准号: 2007CB116306)和科研院所社会公益研究专项基金(批准号: 2004DIB3J702)资助.

联系人简介: 戴好富, 男, 研究员, 主要从事天然产物化学研究. E-mail: hfdai2001@yahoo.com.cn

洪 葵, 女, 教授, 主要从事微生物学研究. E-mail: k1022@163.net

组初步鉴定为链霉菌属(*Streptomyces* sp.), 现保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

1.3 培养基及培养条件

改良高氏培养基: 可溶性淀粉 20.0 g, KNO_3 1.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂粉 20.0 g, 用体积分数为 50% 的陈海水定容至 1000 mL, $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$, 在 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 压力下灭菌 25 min.

YE 液体种子培养基: 麦芽浸膏 10.0 g, 酵母膏 4.0 g, 葡萄糖 4.0 g, 用体积分数 75% 的陈海水定容至 1000 mL, $\text{pH} = 7.4$, 在 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 压力下灭菌 20 min.

黄豆粉发酵培养基: 可溶性淀粉 20.0 g, 黄豆粉 15.0 g, 酵母粉 5.0 g, 蛋白胨 2.0 g, 碳酸钙 4.0 g, 氯化钠 4.0 g, 用体积分数为 50% 的陈海水定容至 1000 mL, $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$, 在 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 压力下灭菌 25 min. 肝癌 SMMC-7721 细胞培养: 在含有质量分数 10% 小牛血清的 MEM 培养基中, 于体积分数为 5% 的 CO_2 , 湿度 90% 以上, 37°C 温箱中培养, 贴壁细胞用体积分数为 0.25% 的胰酶消化。

1.4 菌株的发酵

放线菌 124092 经改良高氏培养基斜面活化, 接种于 YE 种子培养基中, 于 28°C , 以 180 r/min 的速度振荡培养 2 d, 按 5% 接种量接种到 70 L 黄豆粉发酵培养基中, 用发酵罐培养 7 d.

1.5 化合物分离和纯化

将放线菌 124092 的发酵物经离心分离得菌丝体和发酵液, 发酵液经 DA-201 大孔树脂柱层析, 依次用水和甲醇洗脱, 减压浓缩甲醇洗脱液得到甲醇提取物(18.0 g). 甲醇提取物(18.0 g) 经减压硅胶柱层析, 以氯仿-甲醇梯度洗脱, 得到 Fr. 1 ~ Fr. 5 共 5 个组分. Fr. 1(1.1 g) 经硅胶 [$V(\text{氯仿}): V(\text{甲醇}) = 25:1$] 柱层析, 得到 6 个流份(Fr. 1-1 ~ Fr. 1-6), 其中 Fr. 1-1(38.0 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶 [体积分数为 95% 的乙醇] 柱层析, 得到化合物 **3**(3.8 mg). Fr. 1-2(246.0 mg) 依次经 Sephadex LH-20 凝胶 [体积分数为 95% 的乙醇] 柱层析和硅胶 [$V(\text{氯仿}): V(\text{丙酮}) = 25:1$] 柱层析, 得到化合物 **1**(6.2 mg) 和化合物 **2**(4.0 mg). Fr. 1-3(160.0 mg) 经 2 次硅胶柱层析, 洗脱剂分别为 [$V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯}) = 1:2$] 和 [$V(\text{氯仿}): V(\text{丙酮}) = 25:1$], 得到化合物 **5**(4.9 mg). Fr. 2(1.2 g) 经反复硅胶 [$V(\text{氯仿}): V(\text{丙酮}) = 25:1$] 柱层析和 Sephadex LH-20 凝胶 [体积分数为 95% 的乙醇] 得到化合物 **4**(3.2 mg).

1.6 结构鉴定

化合物 **1**(*p*-Tolyl 3-aminopropanoate) 为无色针晶(甲醇), m. p. $156 \sim 158^\circ\text{C}$; 茚三酮试剂显红色反应. IR(KBr), $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3296, 2944, 2363, 1650, 1550, 1515, 1450, 1372, 1239, 1029, 829; EI-MS 显示分子离子峰, m/z : 202 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; HREI-MS, m/z (计算值): 202.0840(202.0843). ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD), δ : 7.01(2H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, H3', 5'), 6.69(2H, $J = 8.4 \text{ Hz}$, H2', 6'), 3.31(2H, t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, H3), 2.67(2H, t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, H2), 1.89(3H, s, H7'). 化合物 **1** 的 ^{13}C NMR(DEPT) 谱数据见表 1.

Table 1 ^{13}C NMR and DEPT data of compounds **1** and **2**(100 MHz in CD_3OD)

Position	1		2		Position	1		2	
	δ_{C}	DEPT	δ_{C}	DEPT		δ_{C}	DEPT	δ_{C}	DEPT
1	173.2	C			9			45.9	CH_2
2	35.7	CH_2	167.0	C	1'	156.9	C	127.7	C
3	42.4	CH_2	57.9	CH	2'	116.2	CH	132.1	CH
4					3'	130.7	CH	116.2	CH
5			170.8	C	4'	131.2	C	157.7	C
6			60.1	CH	5'	130.7	CH	116.2	CH
7			29.4	CH_2	6'	116.2	CH	132.1	CH
8			22.7	CH_2	7'	22.5	CH_3	37.7	CH_2

化合物 **2**[6-Amino-3-(4-hydroxybenzyl)-1,4-diazonane-2,5-dione] 为无色针晶(甲醇), m. p. $100 \sim 102^\circ\text{C}$; 茚三酮试剂显红色反应. $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$: -48.0° (MeOH; c 0.7,). IR(KBr), $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3229, 2931, 1662, 1514, 1446, 1234, 818; EI-MS, m/z : 277 [M] $^+$; HREI-MS, m/z (计算值): 277.1425(277.1426). ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD), δ : 7.03(2H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, H2', 6'), 6.69(2H, $J = 8.4$

Hz, H3', 5'), 4.35(1H, t, $J=4.1, 4.5$ Hz, H3), 4.04(1H, dd, $J=6.2, 10.6$ Hz, H6), 3.54(1H, dt, $J=8.3, 11.9$ Hz, H9), 3.35(1H, dt, $J=6.9, 11.9$ Hz, H9), 3.08(1H, dd, $J=5.1, 14.2$ Hz, H7'), 3.01(1H, dd, $J=4.6, 14.2$ Hz, H7'), 1.79(2H, m, H8), 2.08, 1.20(each 1H, m, H7). 化合物 **2** 的 ^{13}C NMR (DEPT) 谱数据见表 1.

化合物 **3** 为正丁基- α -D-吡喃甘露糖苷, m. p. 148 ~ 149 °C, 其波谱数据与文献[3]中的甲基- α -D-吡喃甘露糖苷相应部分的数据基本一致.

化合物 **4** 为大豆苷元, m. p. 324 ~ 326 °C, 其波谱数据与文献[4]中的大豆苷元的数据基本一致.

化合物 **5** 为 1H-3-吡啶甲酸, m. p. 210 ~ 218 °C, 其波谱数据与文献[5]中的 1H-3-吡啶甲酸的数据基本一致.

1.7 肿瘤细胞毒活性测试

采用 MTT 法^[6]测定化合物的肿瘤细胞毒活性.

2 结果与讨论

2.1 结构解析

化合物 **1**: 茚三酮试剂显红色反应, 提示该化合物中含有氨基. EI-MS 显示分子离子峰为 m/z : 202 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, HREI-MS m/z (计算值): 202.0840(202.0843). 结合 ^{13}C NMR (DEPT) 即可推导出该化合物的分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$. ^1H NMR 谱(表 1)的低场区显示一组芳香氢 δ 7.01(2H, d, $J=8.4$ Hz) 和 δ 6.69(2H, d, $J=8.4$ Hz) 信号, 提示该组信号为 AA'BB' 自旋系统, 说明该化合物中存在一个 1,4-二取代的苯环. 同时在 δ 3.31(2H, t, $J=7.4$ Hz) 和 δ 2.67(2H, t, $J=7.4$ Hz) 处观察到一个 A_2B_2 自旋系统, 说明这 2 个亚甲基是相互连接的. 此外, 还观察到 1 个甲基氢的信号 δ 1.89(3H, s). ^{13}C NMR 及 DEPT 谱(表 1)中显示有 3 个季碳(δ 173.2, 156.9 和 131.2)、4 个次甲基[δ 130.7(2 个)和 δ 116.2(2 个)]、2 个亚甲基(δ 42.4 和 35.7) 和 1 个甲基(22.5)信号. 其中 δ 173.2 处的季碳为一个酯羰基的信号; 在 δ 156.9 处的季碳说明苯环中的一个碳被氧所取代. 由此可推导出该化合物中含有以下结构片段: 甲基、酯羰基、二取代的苯环以及相互连接的两个亚甲基, 结合该化合物的分子式和茚三酮试剂显红色反应的现象, 化合物 **1** 的结构推定为 3-氨基-丙酸对甲苯酯(*p*-Tolyl 3-aminopropanoate) (图 1).

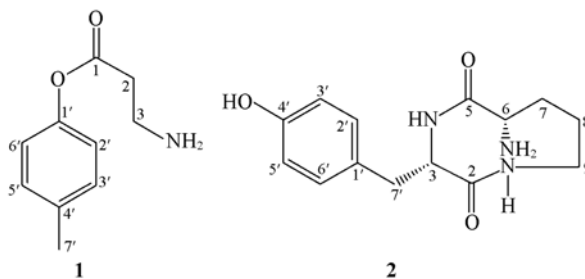


Fig. 1 Structures of compounds **1** and **2**

化合物 **2**: 茚三酮试剂显红色反应, 提示该化合物中含有氨基. EI-MS 显示分子离子峰为 m/z : 277 $[\text{M}]^+$, HREI-MS, m/z (计算值): 277.1425(277.1426). 结合 ^{13}C NMR (DEPT) 即可导出该化合物的分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$. ^{13}C NMR 及 DEPT 谱中共显示有 4 个季碳(δ 170.8, 167.0, 157.7 和 127.7)、6 个次甲基[δ 132.1(2 个), 116.2(2 个), 60.1 和 57.9] 以及 4 个亚甲基(δ 45.9, 37.7, 29.4 和 22.7) 信号. ^1H NMR 谱上的低场区显示一组芳香氢 δ 7.03(2H, d, $J=8.4$ Hz) 和 6.69(2H, d, $J=8.4$ Hz) 信号, 提示该组信号为 AA'BB' 自旋系统, 说明该化合物中存在一个 1,4-二取代的苯环. 通过二维核磁共振谱(^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC)可对化合物 **2** 的碳和氢的化学位移进行全归属(表 1). 在 ^1H - ^1H COSY 谱中, 可观察到如下质子之间的相关信号: δ 4.35 (H3)/3.01, 3.08 (H7'); δ 4.04(H6)/2.08, 1.20(H7)/1.79(H8)/3.54, 3.35

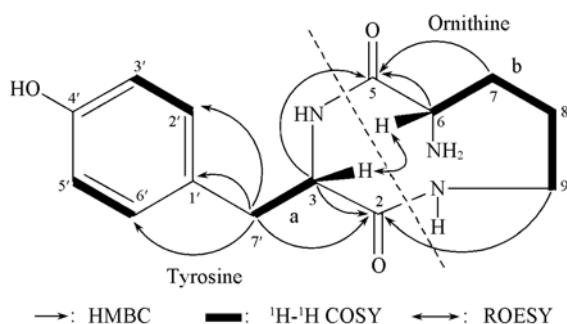


Fig. 2 Key HMBC, ^1H - ^1H COSY, and ROESY correlations of compound **2**

(H9), 以此可导出片段 a 和片段 b(图 2). 在 HMBC 谱上, δ 7.03(H2', H6') 与 δ 37.7(C7') 之间的相关信号及 δ 3.01, 3.08(H7') 与 132.1(C2', C6'), 127.7(C1') 之间的相关信号说明 C7' 与 C1' 相连; δ 3.01, 3.08(H7'), 4.35(H3) 与 酰氨羰基碳(δ 167.0, C2) 之间的相关信号说明 C3 与 酰氨羰基碳(C2) 相连. C3(δ 57.9) 和 C4'(δ 157.7) 的化学位移说明 C3 为氨基所取代, C4' 为羟基所取代, 至此, 片段 a 可扩展为一个酪氨酸残基(Tyrosine)^[7](图 2). 在 HMBC 谱上可观察到 δ 1.20(H7), 4.04(H6) 与另一个酰氨羰基碳 δ 170.8(C5) 之间的相关信号, 说明 C6 与 酰氨羰基碳(C5) 相连; C6(δ 60.1) 和 C9(δ 45.9) 的化学位移说明 C6 和 C9 需与氨基相连, 至此, 片段 b 可扩展为一个鸟氨酸残基(Ornithine)^[7](图 2). 最后, 在 HMBC 谱上, δ 4.35(H3) 与 酰氨羰基碳(δ 170.8, C5) 之间相关信号说明 C3 与 C5 之间通过酰氨键相连; δ 3.54(H9) 与 酰氨羰基碳(δ 167.0, C2) 之间相关信号说明 C9 与 C2 之间通过酰氨键相连. 因此, 化合物 2 的平面结构推定为: 6-Amino-3-(4-hydroxybenzyl)-1,4-diazonane-2,5-dione, 其相对立体构型通过 ROESY 试验得到确定, 在 ROESY 谱上, H3(δ 4.35) 与 H6(δ 4.04) 之间的相关点说明 H-3 和 H-6 在平面的同侧(图 2), 为特殊类型的环二肽化合物(图 1).

2.2 肿瘤细胞毒活性

表 2 结果表明, 化合物 1~4 对人肝癌细胞(SMMC-7721) 均有不同程度的生长抑制活性.

Table 2 Cytotoxic activity [$IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$] of compounds 1—4

Compound	1	2	3	4
SMMC-7721	22.0	60.0	13.6	6.0

参 考 文 献

- [1] Newman D. J., Cragg G. M. J. Nat. Prod. [J], 2004, 67(8): 1216—1238
- [2] LIN Yong-Cheng(林永成). Marine Microorganism and Their Secondary Metabolites(海洋微生物及其代谢产物)[M], Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 369
- [3] YU De-Quan(于德泉), YANG Jun-Shan(杨峻山). Handbook of Analytical Chemistry(分析化学手册)[M], Beijing: Chemical Industry Press, 2002, 7: 902
- [4] HUANG Wen-Zhe(黄文哲), DUAN Jin-Ao(段金傲), LI Zheng-Liang(李正亮). J. China Pharm. Univeristy(中国药科大学学报)[J], 2000, 31(1): 8—10
- [5] Bano S., Ahmad V. U., Perveen S., et al. Planta Medica[J], 1987, 53(2): 117—118
- [6] Mosmann T. J. Immunol Methods[J], 1983, 65: 55—63
- [7] Yun Y. S., Morita H., Takeya K., et al. J. Nat. Prod. [J], 1997, 60(3): 216—218

Cytotoxic Constituents from Marine Actinomycete *Streptomyces* sp. 124092

XIE Xiu-Chao^{1,2}, MEI Wen-Li¹, ZENG Yan-Bo¹, LIN Hai-Peng¹,
ZHUANG Ling¹, DAI Hao-Fu^{1*}, HONG Kui^{1*}

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of
Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;

2. Shanxi Key Laboratory of Resource Biology, Shanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

Abstract To study the cytotoxic constituents from marine actinomycete *Streptomyces* sp. (124092) of rhizosphere soil of mangrove plant *Heritiera littoralis*, five compounds were isolated by column chromatography from the fermentation broth of marine actinomycete *Streptomyces* sp. (124092). Their structures were elucidated as *p*-tolyl 3-aminopropanoate(**1**), 6-amino-3-(4-hydroxybenzyl)-1,4-diazonane-2,5-dione(**2**), *n*-butyl mannoside(**3**), daidzein(**4**), and indole- β -carboxylic acid(**5**), by MS, NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, and HMBC spectra. Among them, compounds **1** and **2** are new compounds. Cytotoxic bioassay results show that compounds **1—4** possess inhibitory effects on human hepatoma SMMC-7721 cell line *in vitro*.

Keywords Marine actinomycete; *Streptomyces* sp.; Cytotoxicity; Isolation and purification

(Ed.: H, J, Z)