

· 基础研究 ·

海洋放线菌 *Streptomyces variabilis* strain 6-1 次级代谢产物的研究 *赵韵宇¹ 孙 伟² 彭崇胜^{1△} 李志勇^{2△}

(1 上海交通大学药学院 上海 200240 2 上海交通大学生命科学院海洋生物技术实验室 上海 200240)

摘要 目的:对来自海洋软珊瑚的链霉菌 6-1 (*Streptomyces variabilis* strain 6-1) 进行次级代谢产物的分离和鉴定,寻找具有生物活性的化合物,为人类健康服务。**方法:**采用液体培养基对分离自海洋软珊瑚 *Scleronephthya* sp. 中的链霉菌 6-1 (*Streptomyces variabilis* strain 6-1) 进行发酵培养,用乙酸乙酯对发酵液进行萃取;采用半制备高效液相色谱(semi-preparative HPLC)分离方法对乙酸乙酯萃取物进行分离纯化,得到单体化合物;运用电喷雾质谱(ESI-MS)、核磁共振氢谱(¹H NMR)、核磁共振碳谱(¹³C NMR)和物理性质对所得单体化合物进行结构鉴定。**结果:**从海洋链霉菌 6-1 (strain 6-1) 发酵液的乙酸乙酯萃取物中分离得到 3 个单体化合物,分别鉴定为:7,4'-二羟基异黄酮(1)、5,7,4'-三羟基异黄酮(2)和丁烯酸内酯-I (3)。**结论:**丁烯酸内酯-I 是从链霉菌属首次分离得到,化合物 1 和 2 均是从 *Streptomyces variabilis* 中首次分离得到;变异链霉菌 6-1 (*Streptomyces variabilis* strain 6-1) 可以作为活性化合物 3 (丁烯酸内酯-I) 的重要来源。

关键词:海洋放线菌;变异链霉菌 6-1;次级代谢产物

中图分类号: Q939.132 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273 (2012) 26-5001-04

Study on the Secondary Metabolites from a Marine-derived Actinomycete *Streptomyces Variabilis* Strain 6-1 *ZHAO Yun-yu¹, SUN Wei², PENG Chong-sheng^{1△}, LI Zhi-yong^{2△}

(1 School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, P. R. China;

2 Marine Biotechnology Laboratory, State Key Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, P.R. China)

ABSTRACT Objective: To isolate and identify the secondary metabolites produced by *Streptomyces variabilis* strain 6-1 associated with marine soft coral *Scleronephthya* sp. and to search bioactive compounds, serving for people's health. **Methods:** The actinomycete *Streptomyces variabilis* strain 6-1 isolated from the soft coral *Scleronephthya* sp. was fermented in the liquid medium, the fermentation broth was extracted by acetic ether. The ethyl acetate extract of the fermentation broth was separated on semi-preparative HPLC to afford pure compounds. Structure of these compounds were identified by ESI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy methods and physical data. **Results:** The three compounds isolated from fermentation broth of the microorganism were elucidated as 7,4' - dihydroxy isoflavone (1), 5,7,4' - trihydroxy isoflavone (2), butyrolactone - I(3). **Conclusions:** Compound 3 was first isolated from fermentation broth of *Streptomyces*, compound 1 and 2 were first isolated from fermentation broth of *Streptomyces variabilis*; marine actinobacterium *Streptomyces variabilis* strain 6-1 is a good source of active compound 3 (butyrolactone - I).

Key words: Marine-derived actinomycete; *Streptomyces variabilis* strain 6-1; Secondary metabolite

Chinese Library Classification(CLC): Q939.132 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2012) 26-5001-04

前言

放线菌的次级代谢产物是药物的重要来源之一,其次级代谢产物具有免疫抑制、抗感染和抗肿瘤等活性。由于从陆生放线菌中发现新抗生素的几率变小,且获得的生物活性药物量有限,近几十年来,人们将目光投向海洋放线菌。海洋放线菌的生活条件与陆生放线菌的不同,其特点是高压、高盐、低温、寡营

养等,这种苛刻的环境造成它们的代谢途径独特、复杂,形成的次级代谢产物在结构类型及生物活性方面都呈现出与陆生放线菌不同的特点和多样性^[1]。近年来,已经从海洋放线菌中分离得到了许多结构新颖并具有多种生物活性的化合物。海洋放线菌的次级代谢产物的结构类型主要包括生物碱、肽类、萜类、大环内酯类和醌类化合物等,其具有的生物活性包括抗菌、抗肿瘤、抗血小板凝剂、免疫抑制、松弛平滑肌和细胞毒活性等^[2]。例

* 基金项目 国家自然科学基金(81102417);综合性新药研究开发技术大平台(2009ZX09302-007)

作者简介 赵韵宇(1986),男,硕士研究生,主要研究方向 海洋天然产物研究,

△通讯作者 彭崇胜,电话 021-34207064, E-mail: cspeng@sjtu.edu.cn

李志勇,电话 021-34204036, E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

(收稿日期 2012-02-21 接受日期 2012-03-17)

如:从来自斐济附近海底的沉积物中 *Streptomyces* sp. CNS-575 分离得到 3 个化合物 Fijimycins A-C, 它们具有体外抗耐甲氧西林葡萄球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 的活性^[3]; 从来自渤海海岸沉积物的 *Streptomyces roseoflavus* MB-97 中分离得到一个吡嗪咪唑类生物碱 staurosporine, 该化合物具有抗肿瘤、抑制蛋白激酶、抗血小板凝集和松弛平滑肌等多种生物活性^[4]; 化合物 SBR-22 是从印度孟加拉湾海洋沉积物分离的 *Streptomyces psammoticus* BT-408 代谢产物中得到的, 对多种革兰氏阳性菌、阴性菌和真菌具有抑制作用, 对 MRSA 有抑制作用^[5]。由此可见, 海洋放线菌正在成为海洋药物和活性天然产物的重要新来源。

本文对一株海洋链霉菌 *Streptomyces variabilis* strain 6-1 进行了发酵培养。用半制备高效液相色谱法对发酵提取物进行了分离, 得到 3 个化合物, 并通过 ESI-MS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 鉴定其分别为 7,4'-二羟基异黄酮 (1)、5,7,4'-三羟基异黄酮 (2)、丁烯酸内酯-I (3)。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器 核磁共振仪 AVANCE III 400 型 (¹H 400 MHz, ¹³C 100 MHz) 由 BRUKER 公司生产; 旋转蒸发仪 SB-1100 为 EYELA 公司产品; 旋光仪 341 型为 Perkin-Elmer 产品; 紫外分光光度计 EV 300 为 Thermo Electron CORP 公司产品; 高效液相色谱仪 1100 series、G1314A 型二极管阵列 (DAD) 检测器、HG-5 反相色谱柱 [5 μm, 4.6 mm × 15 cm]、半制备 HPLC 1100 series、G1314A VWD 检测器和 HG-5 反相柱 ODS [5 μm, 10 mm × 25 cm] 均为 Agilent 公司产品。

1.1.2 材料 菌株: *Streptomyces variabilis* strain 6-1 分离自中国东海福建诏安湾 23° 53' N, 117° 10' E 采集的潮间带珊瑚样品 *Scleronephthya* sp。

人工海水 NaCl 26.518 g, MgCl₂ 2.447 g, MgSO₄ 3.305 g, CaCl₂ 1.141 g, KCl 0.725 g, NaHCO₃ 0.202 g, NaBr 0.083 g, 蒸馏水 1000 mL。

Trace FeSO₄ · 7H₂O 1g, CuSO₄ · 5H₂O 0.1g, MnSO₄ · H₂O 0.1g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1g, 蒸馏水 1000 mL。

GYMM 培养基: 甘油 20 g, 麦芽提取物 4 g, 酵母提取物 4 g, 大豆蛋白胨 10 g, 谷氨酰胺 5 g, 精氨酸 1 g, 甘露醇 10 g, 人工海水 1000 mL, trace 2 mL。

1.2 培养

从平板上挑取 *Streptomyces variabilis* strain 6-1 圆滑的菌落, 接种到装有 20 mL GYMM 培养液的 100 mL 三角烧瓶中, 28℃、180rpm 条件下摇床培养 72 h, 获得 *Streptomyces variabilis* strain 6-1 菌株的种子培养液。将制备好的种子培养液按 10% 接种量接种于装有 500 mL GYMM 培养基的 1000 mL 三角烧瓶中, 28℃、180 rpm 的条件下摇床培养 7 d, 收获发酵液 500 mL。

1.3 提取分离

将发酵液用布氏漏斗抽滤, 得到滤液约 500 mL, 将滤液倒入分液漏斗中, 加入等体积的乙酸乙酯进行萃取, 静置分层, 将

乙酸乙酯层用旋转蒸发仪浓缩蒸干得到粗提物^[6]。乙酸乙酯反复萃取 3 轮, 最终得到浸膏 0.58 g。

用 8 mL 甲醇溶解浸膏, 微孔滤膜法过滤, 得到半制备样品。半制备样品用半制备 HPLC 进行分离。分离条件为: A 相为 0.1% 的 CH₃COOH 水溶液, B 相为乙腈, 洗脱梯度为 0%—65% 的 B 相 20 分钟, 65% 保持 2 分钟。最终得到化合物 1 (3.1 mg), 化合物 2 (3.6 mg), 化合物 3 (6.8 mg)。

1.4 结构鉴定

通过电喷雾质谱 (ESI-MS)、核磁共振 (¹H NMR) 和核磁共振碳谱 (¹³C NMR) 对化合物 1、化合物 2 和化合物 3 进行结构鉴定。化合物 3 还通过旋光进行了结构鉴定。

2 结果

化合物 1 为白色固体 (3.1 mg)。ESI-MS (+) *m/z* 255.0 [M + H]⁺, 分子量 254。 ¹H NMR (MeOH-d₄, 400 MHz) δ_{ppm} 6.85-6.88 (3H, m, H-8, 3', 5'), 6.96 (1H, dd, J = 8.8, 2.0, H-6) 7.38 (2H, d, J = 8.4Hz, H-2', 6'), 8.08 (2H, d, J = 8.4Hz, H-5), 8.13 (1H, s, H-2)。 ¹³C NMR (MeOH-d₄, 100 MHz) δ_{ppm} 102.1 (C-8), 114.9 (C-3', 5'), 115.0 (C-6), 116.3 (C-4a), 122.4 (C-3), 123.4 (C-1'), 129.6 (C-2', 6'), 151.9 (C-2), 157.0 (C-7, 4'), 157.3 (C-8a), 162.2 (C-5), 178.6 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[7], 确定化合物 1 为 7,4'-二羟基异黄酮, 化合物结构见图 1。

化合物 2 为白色固体 (3.6 mg)。ESI-MS (+) *m/z* 271.1 [M + H]⁺, ESI-MS (-) *m/z* 269 [M - H]⁻, 分子量 270。 ¹H NMR (MeOH-d₄, 400 MHz) δ_{ppm} 6.24 (1H, brs, H-6), 6.30 (1H, brs, H-8), 6.87 (2H, d, J = 8.4Hz, H-3', 5'), 7.39 (2H, d, J = 8.4Hz, H-2', 6'), 8.08 (1H, s, H-2)。 ¹³C NMR (MeOH-d₄, 100 MHz) δ_{ppm} 94.5 (C-8), 98.9 (C-6), 104.8 (C-4a), 115.9 (C-5', 3'), 121.6 (C-1'), 122.8 (C-3), 130.7 (C-2', 6'), 153.5 (C-2), 157.8 (C-8a), 158.2 (C-4'), 162.6 (C-5), 164.5 (C-7), 180.1 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[8], 确定化合物 2 为 5,7,4'-三羟基异黄酮, 化合物结构见图 1。

化合物 3 为固体, 略带黄色 (6.8 mg)。[α]_D²⁰ = +26.79 (c=0.095, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 221 (1.186), 306 (1.194) nm; ESI-MS (-) *m/z* : 423.1 [M-H]⁻, ESI-MS (+) *m/z* : 447.1 [M+Na]⁺ 分子式 C₂₄H₂₄O₇。 ¹H NMR (MeOH-d₄, 400 MHz) δ_{ppm} 7.59 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3', 5'), 6.56 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'), 6.51 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.42 (1H, s, H-2), 5.08 (1H, t, J = 7.0 Hz, H-2'') 3.78 (3H, s, 5-OCH₃), 3.46 (1H, d, J = 14.8 Hz, H-6a), 3.43 (1H, d, J = 14.8 Hz, H-6b), 3.07 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-1'''), 1.66 (3H, s, H-4'''), 1.57 (3H, s, H-5'''); ¹³C NMR (MeOH-d₄, 100 MHz) δ_{ppm} 171.98 (C, C-5), 168.97 (C, C-1), 155.37 (C, C-4'), 137.51 (C, C-2), 133.30 (CH, C-3'''), 132.72 (C, C-2') 130.61 (CH, C-2', C-6'), 130.07 (CH, C-6'), 128.75 (C, C-3), 126.99 (C, C-3') 125.44 (C, C-1'), 123.86 (C, C-2'') 122.88 (C, C-1''), 116.88 (C, C-3' C-5'), 115.12 (CH, C-5'), 85.55 (C, C-4), 54.12 (CH₃, 5-OCH₃), 39.95 (CH₂, C-6), 28.99 (CH₂, C-1'''), 26.23 (CH₃, C-4'''), 18.05 (CH₃, C-5''')。以上数据与文献报道一致^[9], 确定化合物 3 为丁烯酸内酯-I, 化合物

结构见图 1。

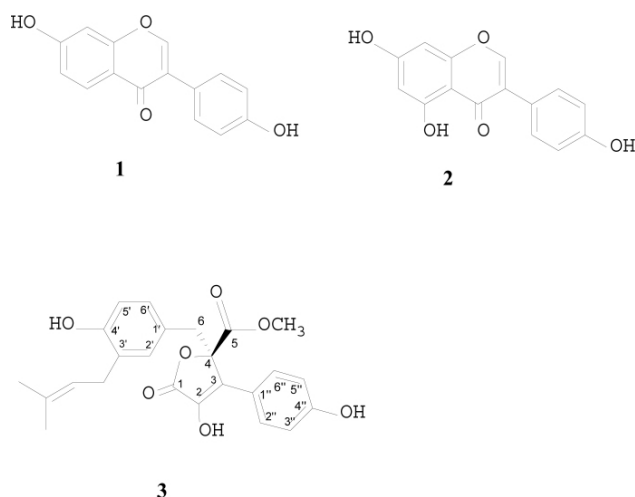


图 1 化合物 1-3 结构式

Fig.1 Chemical Structure of compound 1-3 isolated from *Streptomyces variabilis* strain 6-1

3 讨论

7,4'-二羟基异黄酮具有抗癌、预防骨质疏松、预防心脑血管疾病、提高免疫力和抗菌等多重功效,对多种慢性病的防治有重要意义^[10]。5,7,4'-三羟基异黄酮是一种酪氨酸激酶抑制剂,具有抑制免疫细胞活性,其结构与雌激素结构相似,因而具有类雌激素和抗雌激素活性的双重作用和抗骨质疏松的作用^[11]。另外,化合物 2 还有抗氧化和预防癌症等多种活性^[12]。化合物 1 和化合物 2 均属于异黄酮类成分,其应用前景非常广泛,是目前国内外研究的热点。化合物 3 (丁烯酸内酯 - I) 能抑制成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 的活性,因而能够阻滞减数分裂的恢复,广泛应用于小鼠、猪、牛和羊等的体外受精研究^[13]。丁烯酸内酯 - I 也是 5-脂氧合酶抑制剂,具有抗炎、抗肿瘤活性^[14]。

虽然有文献报道^[15]从链霉菌的发酵液中分离到化合物 1 和 2,但是这两个化合物都是首次从 *Streptomyces variabilis* 的次级代谢产物中发现。以往的文献^[16]报道中化合物 3 均是从真菌的发酵液中分离到,目前还没有从链霉菌中分离得到丁烯酸内酯 - I 的文献报道。本研究从 *Streptomyces variabilis* strain 6-1 的发酵液中分离得到化合物 1 和 2,为这两个生物活性物质提供了新的菌株来源。分离得到丁烯酸内酯 - I (化合物 3),丰富了丁烯酸内酯 - I 的生物菌株库。虽然目前对链霉菌的次级代谢产物研究报道很多,但是对于 *Streptomyces variabilis* 该种的链霉菌次级代谢产物研究很少,本研究丰富了 *Streptomyces variabilis* 的化合物结构库,从该菌株的发酵液中得到不同结构类型的具有生物活性的化合物,说明珊瑚中的此种放线菌能够产生不同活性的次级代谢产物,值得进一步开发利用。

4 结语

本研究对链霉菌 *S. variabilis* strain 6-1 进行了小规模发酵,获得 500 mL 发酵液,并从中分离鉴定出

3 个化学成分,这些化合物均是从该菌株中首次分离得到,其中,丁烯酸内酯 - I 是首次从链霉菌属菌株中发现。丁烯酸内酯类化合物具有抗菌、抗炎、抗肿瘤和促进体外受精等活性,但目前报道的该类化学结构比较少,构效关系尚不清楚。通过扩大发酵规模,或优化发酵条件,分离制备丁烯酸内酯 - I,并进行衍生物合成,或直接从中发现具有该母核结构的类似物,可望对该类化学成分进行比较系统的结构与活性关系研究,为该微生物及丁烯酸内酯类活性成分的科学利用奠定基础。

致谢:感谢国家自然科学基金项目 (81102417); 综合性新药研究开发技术大平台 (2009ZX09302-007) 对本研究的资助。

参考文献 (References)

- [1] 陈钢,朱卫.海洋微生物抗肿瘤活性物质研究进展 [J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2008, 27 (03): 321-326
Chen Gang, Zhu Wei. Review in studies on antitumor metabolites from marine microorganisms [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2008, 27 (03): 321-326
- [2] 李巧连,李可,谢明杰,等.海洋放线菌次级代谢产物及其活性研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2010, (05): 57-65
Li Qiao-lian, Li Ke, Xie Ming-jie, et al. Review in studies on secondary metabolites and activities from marine actinomycetes [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2010, (05): 57-65
- [3] Sun Peng, Maloney K N, Nam S J, et al. Fijimycins A-C, three antibacterial etanycin-class depsipeptides from a marine-derived *Streptomyces* sp. [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011, 19 (22): 6557-6562
- [4] Hu Jiang-chun, Ju Jian-hua, Wang Nan, et al. Staurosporine produced by marine-derived actinomycete *Streptomyces roseoflavus* MB-97 isolated from coastal sediment [J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136: S585-S586
- [5] Sujatha P, Bapi Raju K, Ramana T. Studies on a new marine *Streptomyces* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Microbiological Research, 2005, 160 (2): 119-126
- [6] 牛四文,李苏梅,田新朋,等.海洋放线菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 1934 中次生代谢产物的分离和鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (13): 1763-1768
Niu Si-wen, Li Su-mei, Tian Xin-peng, et al. Isolation and structural elucidation of secondary metabolites from marine *Streptomyces* sp. SCSIO 1934 [J]. China journal of Chinese material medica, 2011, 36 (13): 1763-1768
- [7] Hu Shen-cai, Hong Kui, Song Yong-chun, et al. Biotransformation of soybean isoflavones by a marine *Streptomyces* sp 060524 and cytotoxicity of the products [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25 (1): 115-121
- [8] St. Denis D. Jeffrey, Gordon IV S. James, Carroll M. Vincent, Priefer Ronny. Novel synthesis of the isoflavone genistein [J]. Synthesis, 2010, (10): 1590-1592
- [9] Cazar M. E., Schmeda-Hirschmann G., Astudillo L. Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* thom. Var terreus [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2005, 21 (6-7): 1067-1075
- [10] 高俊涛,赵春燕,宫丹.大豆异黄酮的研究进展 [J]. 第四军医大学吉林军医学院学报, 2005, 26 (1): 57-89, 63

- Gao Jun-tao, Zhao Chun-yan, Gong Dan. Research advancement on soybean isoflavones [J]. Journal of Jilin Military Medical College Fourth Military Medical University, 2005, 21 (6-7): 57-89,63
- [11] Barnes Stephen, Kim Helen, Darley-Usmar Victor, Patel Rakesh, et al. Beyond ERalpha and ER Estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story [J]. The Journal of Nutrition, 2000, 130 (3): 656-656
- [12] Seo Hye-Sook, DeNardo G. David, Jacquot Yves, et al. Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2006, 99 (2): 121-134
- [13] Leal CLV, Mamo S, Fair T, et al. Gene expression in oocytes after meiotic inhibition with the cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone I [J]. Reproduction Fertility and Development, 2010, 22 (1): 329-329
- [14] Wang Fu-sheng, Ke Ai-bing, Zhu Jing-tong, et al. Butyrolactones, inhibitors of 5 lipoxygenase from fungal metabolites [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Science, 2010, 19 (04): 251-255
- [15] 郑丹, 姜怡, 姜恺. 一株耐碱链霉菌次生代谢产物的研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2009, 19(5): 35-38
- Zheng Dan, Jiang Yi, Lou Kai. Secondary metabolites from the broth of an alkalophilic streptomyces [J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2009, 19(5): 35-38
- [16] Haritakun Rachada, Rachatawee Pranee, et al. Butyrolactones from the Fungus *Aspergillus terreus* BCC 4651 [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2010, 58 (11): 1545-1548

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN :978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。