

海洋链霉菌 LS298 次级代谢产物研究

甄心, 巩婷, 朱平

(中国医学科学院&北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 国家卫生和计划生育委员会天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050)

摘要: 目的: 对海洋链霉菌 LS298 的微量次级代谢产物进行研究。方法: 采用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 等方法对 LS298 发酵产物进行分离纯化; 通过核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)、电喷雾电离质谱 (electrospray ionization mass spectrometer, ESI-MS) 等波谱分析手段对分离得到的化合物进行结构鉴定。结果: 分离得到 6 个化合物, 包括 3 个星孢霉素类化合物, 4'-N-甲基星孢霉素 (1)、7-羟基星孢霉素 (2) 和 7-去氢星孢霉素 (3); 3 个其他类化合物, 光黄素 (4)、N-乙酰基- β -酮-色胺 (5) 和尼克酰胺 (6)。结论: LS298 菌株的次级代谢产物表现出结构类型的多样性, 这也是本菌株的特点。

关键词: 药物化学; 链霉菌; 次级代谢产物; 星孢霉素; 结构鉴定

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2017)05-0534-06

Study on secondary metabolites produced by marine *Streptomyces* sp. LS298

ZHEN Xin, GONG Ting, ZHU Ping

(Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products of the National Health and Family Planning Commission, State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective: To study the trace secondary metabolites produced by the marine *Streptomyces* sp. LS298. Methods: The isolation and purification of the metabolites from the fermentation broth were conducted by Sephadex LH-20 gel column chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic separation process; the nuclear magnetic resonance (NMR), electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS) and other spectroscopic methods were applied in the structural identification of the purified compounds. Results: Six compounds were purified and identified, three of which were analogues of staurosporine: 4'-N-methyl-staurosporine (1), 7-hydroxyl-staurosporine (2), 7-dehydro-staurosporine (3); and the other three compounds were lumichrome (4), N-acetyl- β -oxotryptamine (5), and niacinamide (6). Conclusion: The secondary metabolites of LS298 were rich in the structural types, and structural diversities were the characteristics of the strain.

Key words: medicinal chemistry; *Streptomyces*; secondary metabolites; staurosporine; structural identification

0 引言

海洋微生物生活在高盐度、高压、低温、低光照、寡营养、弱碱性的海洋环境中, 其生理生化和代谢途径与陆生微生物有很大区别, 从而产生了具有丰富化学多样性 (结构类型包括生物碱、聚酮、甾

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (81402846); 高等学校博士学科点专项科研基金 (新教师基金) (20131106120022)

作者简介: 甄心 (1987—), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 微生物天然产物

通信联系人: 朱平, 研究员, 主要研究方向: 微生物工程与天然药物合成生物学. E-mail: zhuping@imm.ac.cn

体、萜类、大环内酯、肽类、脂肪酸、酰胺等)和独特活性(包括抗病毒、抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种活性)的次级代谢产物^[1]。因此,海洋微生物已成为创新药物研究的重要宝库,在生物医药研究领域具有广阔的开发前景。

基于上述原因,本实验室对海洋链霉菌(*Streptomyces* sp. LS298, GenBank 编号: FJ937945)开展了系统的次级代谢产物分离及药理活性筛选的研究。前期工作揭示,LS298 包含三类抗生物物质:棘霉素(echinomycin)、替达霉素(tirandamycin)、星孢霉素(staurosporine)以及环肽及其酯类等^[2-3]。为进一步挖掘 LS298 微量次级代谢产物,继续对其活性成分进行分离及结构鉴定,目前从中获得 3 个星孢霉素类化合物(如图 1 所示),4'-*N*-甲基星孢霉素(1)、7-羟基星孢霉素(2)和 7-去氢星孢霉素(3); 3 个其他类化合物,光黄素(4)、*N*-乙酰基- β -酮-色胺(5)和尼克酰胺(6)。

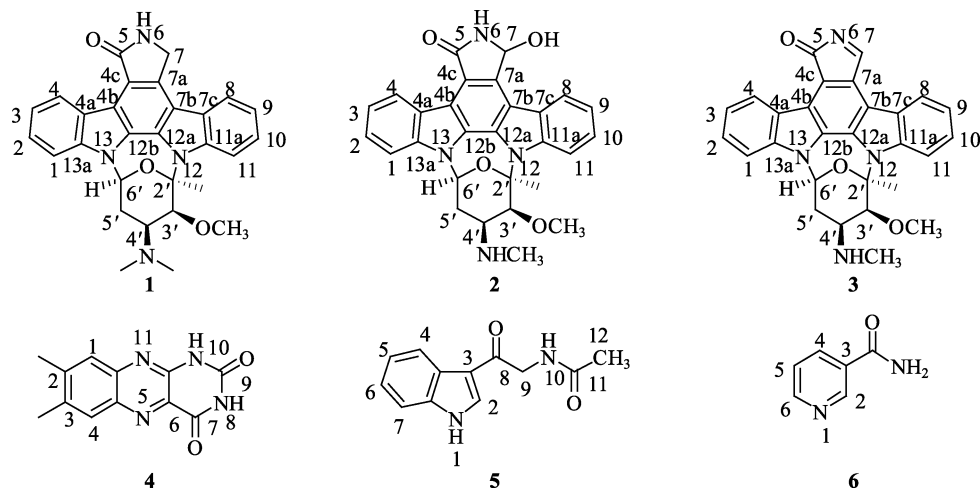


图 1 化合物 1~6 的结构

Fig. 1 Structures of compound 1-6

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

链霉菌菌株 LS298 分离自丰肉结海绵(*Gelliodes carnosa*)组织并保藏于本实验室。

1.1.2 主要试剂与仪器

Mercury-300、Mercury-400、VNS-600 型核磁共振谱仪(Varian 公司,美国),Avance-500 型核磁共振谱仪(Bruker 公司,瑞士),均以四甲基硅烷(TMS)作为内标;1100 LC/MSD Trap SL 型液相色谱-质谱联用仪(Agilent 公司,美国);1200 分析型高效液相色谱仪(Agilent 公司,美国);LC-6AD 型半制备液相色谱仪(岛津公司,日本);HZQ-Q 恒温振荡摇床(哈尔滨东联科学仪器有限公司)。

液相色谱柱 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μ m, Agilent 公司,美国)和 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (9.4 mm×250 mm, 5 μ m, Agilent 公司,美国);Sephadex LH-20 (GE Healthcare 公司,美国);薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC)用层析板(烟台化工研究所);柱色谱用硅胶(60~100 目,200~300 目,青岛海洋化工厂)。

色谱纯甲醇购自北京宏达欣宇科技有限公司;酵母提取物和胰蛋白胨购自英国 Oxoid 公司;葡萄糖和琼脂购自北京拜尔迪生物科技有限公司;海水采自河北省秦皇岛海域;常用分析纯试剂购自北京化学

试剂厂。

1.1.3 培养基

高氏 I 号 (Gause I) 培养基: 可溶性淀粉 20 g/L、KNO₃ 1 g/L、NaCl 0.5 g/L、K₂HPO₄ 0.5 g/L、MgSO₄ 0.01 g/L, pH=7.2, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min, 冷却后备用。固体加入 1.5% 琼脂。

海水 A1 液体培养基: 可溶性淀粉 10 g/L、胰蛋白胨 2 g/L、酵母提取物 4 g/L、天然海水, pH=7.2, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min, 冷却后备用。

1.2 菌株 LS298 次级代谢产物的分离与结构鉴定

1.2.1 菌种活化

在菌株 LS298 的菌种保藏斜面上取适量菌体, 转接至 Gause I 固体培养基的平板上, 于 28℃ 的恒温培养箱内培养 4~5 d。

1.2.2 种子液制备

在活化好的 Gause I 固体培养基上挑取适量菌体, 接种至装有 100 mL 海水 A1 液体培养基 (培养基内装有 10 粒左右的玻璃珠) 的 250 mL 三角瓶中, 于 28℃、180 r/min 的恒温摇床上振荡培养 4~5 d。

1.2.3 放大培养

将 LS298 种子液按 1:10 (体积比) 的比例转接至装有 200 mL 海水 A1 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 28℃、180 r/min 的恒温摇床上振荡培养 9 d, 或者按相同比例接种于装有海水 A1 液体培养基的发酵罐中, 于 28℃ 培养 9 d。

1.2.4 发酵产物的提取与分离

培养 9 d 后, 收集发酵产物 40 L, 发酵液经 5 L 乙酸乙酯萃取, 共 3 次, 有机相浓缩蒸干得到粗提取物约 5 g。粗提取物采用反相柱色谱分离, 洗脱体系分别为 15%、35%、55%、75%、85%、100% 甲醇-水溶液, 得到 6 个组分 (标为 Fr. 1~Fr. 6)。各组分采用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备 HPLC 以及制备 TLC 等多种手段进行进一步分离纯化, 由 Fr. 3 分离得到化合物 4 (4.7 mg) 和化合物 6 (4.3 mg), 由 Fr. 4 分离得到化合物 1 (4.3 mg)、化合物 2 (3.5 mg)、化合物 3 (3.8 mg) 和化合物 5 (4.5 mg)。

2 结构解析

化合物 1 淡黄色针晶 (甲醇)。ESI-MS m/z : 481 [M+H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.53 (1H, d, J =8.4 Hz, H-1), 7.42 (1H, dd, J_1 =8.4 Hz, J_2 =7.2 Hz, H-2), 7.21 (1H, dd, J_1 =7.6 Hz, J_2 =7.2 Hz, H-3), 9.23 (1H, d, J =7.6 Hz, H-4), 8.49 (1H, s, H-6), 4.83 (2H, s, H-7), 7.89 (1H, d, J =7.2 Hz, H-8), 7.21 (1H, dd, J_1 =7.2 Hz, J_2 =6.8 Hz, H-9), 7.42 (1H, dd, J_1 =8.8 Hz, J_2 =6.8 Hz, H-10), 7.96 (1H, d, J =8.8 Hz, H-11), 2.31 (3H, s, 2'-CH₃), 4.04 (1H, d, J =3.2 Hz, H-3'), 3.38 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.24 (1H, m, H-4'), 1.44 (6H, s, 4'-N(CH₃)₂), 2.50 (2H, m, H-5'), 6.68 (1H, dd, J_1 =9.2 Hz, J_2 =2.8 Hz, H-6'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 108.2 (C-1), 125.1 (C-2), 119.3 (C-3), 125.9 (C-4), 122.3 (C-4a), 113.5 (C-4b), 118.7 (C-4c), 172.5 (C-5), 45.7 (C-7), 132.1 (C-7a), 114.2 (C-7b), 124.3 (C-7c), 120.9 (C-8), 119.8 (C-9), 124.2 (C-10), 115.1 (C-11), 139.4 (C-11a), 130.4 (C-12a), 126.5 (C-12b), 136.1 (C-13a), 91.0 (C-2'), 82.4 (C-3'), 50.0 (C-4'), 29.7 (C-5'), 80.3 (C-6'), 29.9

(2'-CH₃), 57.4 (3'-OCH₃), 33.5, 35.1 (4'-N(CH₃)₂). 以上数据与文献[4]报道相一致, 故鉴定化合物 **1** 为 4'-N-甲基星孢霉素。

化合物 **2** 淡黄色针晶 (甲醇)。ESI-MS m/z : 483[M+H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.53 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-1), 7.46 (1H, dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=7.2$ Hz, H-2), 7.27 (1H, dd, $J_1=7.6$ Hz, $J_2=7.2$ Hz, H-3), 9.28 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-4), 8.53 (1H, s, H-6), 6.39 (1H, s, H-7), 7.94 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-8), 7.27 (1H, dd, $J_1=7.2$ Hz, $J_2=6.8$ Hz, H-9), 7.41 (1H, dd, $J_1=8.8$ Hz, $J_2=6.8$ Hz, H-10), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-11), 2.29 (3H, s, 2'-CH₃), 4.05 (1H, d, $J=3.2$ Hz, H-3'), 3.37 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.27 (1H, m, H-4'), 1.44 (3H, s, 4'-NCH₃), 2.50 (2H, m, H-5'), 6.72 (1H, dd, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=1.3$ Hz, H-6'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 108.6 (C-1), 125.1 (C-2), 119.3 (C-3), 125.9 (C-4), 122.7 (C-4a), 113.8 (C-4b), 118.8 (C-4c), 172.6 (C-5), 78.4 (C-7), 132.3 (C-7a), 114.4 (C-7b), 124.3 (C-7c), 120.9 (C-8), 119.8 (C-9), 124.1 (C-10), 115.5 (C-11), 139.3 (C-11a), 130.4 (C-12a), 126.8 (C-12b), 136.5 (C-13a), 91.3 (C-2'), 82.9 (C-3'), 50.2 (C-4'), 29.5 (C-5'), 80.6 (C-6'), 29.7 (2'-CH₃), 57.4 (3'-OCH₃), 33.5 (4'-NCH₃). 以上数据与文献[5]报道相一致, 故鉴定化合物 **2** 为 7-羟基星孢霉素。

化合物 **3** 淡黄色针晶 (甲醇)。ESI-MS m/z : 465[M+H]⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.56 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-1), 7.49 (1H, dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=7.2$ Hz, H-2), 7.28 (1H, dd, $J_1=7.6$ Hz, $J_2=7.2$ Hz, H-3), 9.25 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-4), 5.72 (1H, s, H-7), 7.95 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-8), 7.26 (1H, dd, $J_1=7.6$ Hz, $J_2=7.2$ Hz, H-9), 7.40 (1H, dd, $J_1=8.8$ Hz, $J_2=7.6$ Hz, H-10), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-11), 2.29 (3H, s, 2'-CH₃), 4.06 (1H, d, $J=3.2$ Hz, H-3'), 3.32 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.25 (1H, m, H-4'), 1.44 (3H, s, 4'-NCH₃), 2.50 (2H, m, H-5'), 6.72 (1H, dd, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=1.3$ Hz, H-6'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 108.6 (C-1), 125.2 (C-2), 119.1 (C-3), 125.7 (C-4), 122.4 (C-4a), 113.4 (C-4b), 18.7 (C-4c), 172.4 (C-5), 128.3 (C-7), 132.4 (C-7a), 114.5 (C-7b), 124.0 (C-7c), 120.9 (C-8), 119.9 (C-9), 124.6 (C-10), 115.5 (C-11), 139.7 (C-11a), 130.7 (C-12a), 126.8 (C-12b), 136.5 (C-13a), 91.3 (C-2'), 82.9 (C-3'), 50.2 (C-4'), 29.5 (C-5'), 80.5 (C-6'), 29.8 (2'-CH₃), 57.4 (3'-OCH₃), 35.1 (4'-NCH₃). 以上数据与文献[6]报道相一致, 故鉴定化合物 **3** 为 7-去氢星孢霉素。

化合物 **4** 黄色粉末 (甲醇)。ESI-MS m/z : 243[M+H]⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.90 (1H, s, H-1), 7.70 (1H, s, H-4), 2.45 (3H, s, 2-CH₃), 2.49 (3H, s, 3-CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 128.8 (C-1), 139.0 (C-1a), 138.4 (C-2), 141.8 (C-3), 125.9 (C-4), 144.8 (C-4a), 130.3 (C-6), 160.8 (C-7), 150.2 (C-9), 146.6 (C-10a). 以上数据与文献[7]报道相一致, 故鉴定化合物 **4** 为光黄素。

化合物 **5** 白色粉末 (三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 217[M+H]⁺. 分子式 C₁₂H₁₂N₂O₂. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.46 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 8.22 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-2, H-4), 7.24 (2H, t, $J=8.0$ Hz, H-5, H-6), 4.61 (2H, s, H-9), 2.09 (3H, s, 12-CH₃). ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 134.3 (C-2), 115.8 (C-3), 122.7 (C-4), 126.9 (C-4a), 123.3 (C-5), 124.4 (C-6), 112.9 (C-7), 138.3 (C-7a), 191.9 (C-8), 47.1 (C-9), 173.7 (C-11), 22.5 (C-12). 以上数据与文献[8]报道相一致, 故鉴定化合物 **5** 为 N-乙酰基- β -酮-色胺。

化合物 **6** 白色粉末 (三氯甲烷)。ESI-MS m/z : 123[M+H]⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.49 (1H, dd, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=4.5$ Hz, H-5), 7.57 (1H, NH), 8.14 (1H, NH), 8.20 (1H, d, $J=7.5$ Hz,

H-4), 8.69 (1H, d, $J=4.5$ Hz, H-6), 9.20 (1H, s, H-2). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 151.8 (C-2), 135.3 (C-3), 123.6 (C-4), 129.3 (C-5), 146.8 (C-6), 166.5 (C=O). 以上数据与文献[9]报道相一致, 故鉴定化合物 **6** 为尼克酰胺。

因为化合物 **1~3** 的样品量有限, 无法称量并测定其旋光值, 所以本文只鉴定了其相对构型, 并未对其绝对构型进行确定。

3 讨论与结论

由海洋链霉菌 LS298 发酵产物中分离得到 6 个化合物, 包括 3 个星孢霉素类化合物 (化合物 **1~3**) 和 3 个其他类化合物 (化合物 **4~6**)。星孢霉素于 1977 年最初分离自陆生链霉菌 (*Streptomyces* sp. AM-2282)^[10], 并于次年采用 X 射线衍射技术测定了其绝对构型^[11], 此后不断在其他链霉菌 (*S.* sp. N-126、*S. longisporoflavus*、*S.* sp. RK-286、*S. fradiae* 007M135、*S.* sp. FMA 等)^[7, 9, 12~14]的次级代谢产物中分离得到其类似物, 也有从海鞘 (*Eudistoma toaleansis*) 及其附生的扁形虫 (*Pseudoceros* sp.) 中分离得到其类似物的报道^[8]。星孢霉素及其类似物为蛋白激酶 C (PKC) 的抑制剂, 对多种人癌细胞系具有显著的细胞毒性 (包括 HL-60、K562、A-549、BEL-740、Hela 等), 半抑制浓度为 0.001~34.5 $\mu\text{mol/L}$, 并能将 Hela 细胞阻滞在 G_2/M 期^[13~14]。经文献调研, 其他 3 个化合物 (化合物 **4~6**) 为首次由链霉菌分离得到。通过对海洋链霉菌 LS298 次级代谢产物研究表明, 该菌株具有生成多样结构类型产物的潜力, 这也是该菌株的一个特点。

致谢

感谢本所药物分析室进行波谱数据测试。

[参考文献] (References)

- [1] BLUNT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 2012, 29: 144-222.
- [2] 崔美子, 巩婷, 朱平. 丰肉结海绵相关链霉菌 LS298 活性代谢产物研究[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7 (6): 418-425. CUI M Z, GONG T, ZHU P. Bioactive metabolites produced by *Streptomyces* sp. LS298 isolated from the marine sponge *Gelliodes carnosa*[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2012, 7(6): 418-425. (in Chinese)
- [3] ZHEN X, GONG T, LIU F, et al. A new analogue of echinomycin and a new cyclic dipeptide from a marine-derived *Streptomyces* sp. LS298[J]. Marine Drugs, 2015, 13(11): 6947-6961.
- [4] SCHUPP P, PROKSCH P, WRAY V. Further new staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toaleansis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp.[J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(3): 295-298.
- [5] TAKAHASHI I, SAITOH Y, YOSHIDA M, et al. UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C[J]. The Journal of Antibiotics, 1989, 42(4): 571-576.
- [6] CAI Y, FREDENHAGEN A, HUG P, et al. A nitro analogue of staurosporine and other minor metabolites produced by a *Streptomyces longisporoflavus* strain[J]. The Journal of Antibiotics, 1995, 42: 143-148.
- [7] TSUKAMOTO S, KATO H, HIROTA H, et al. Lumichrome. A larval metamorphosis-inducing substance in the ascidian *Halocynthia roretzi*[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 264(3): 785-789.
- [8] IAKOVOU K, VARVARESOU A, KOUROUNAKIS A P, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel β -substituted indol-3-yl ethylamido melatonergic analogues[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002, 54(1): 147-156.
- [9] 谢文佩, 林琳, 龙彬, 等. 北部湾网状软柳珊瑚化学成分研究[J]. 广西科学, 2013, 20 (2): 165-167.

- XIE W P, LIN L, LONG B, et al. Chemical constituents from the Beibu gulf gorgonian *Suberogorgia reticulat*[J]. Guangxi Sciences, 2013, 20(2): 165-167. (in Chinese)
- [10] OMURA S, IWAI Y, HIRANO A, et al. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization[J]. The Journal of Antibiotics, 1977, 30(4): 275-282.
- [11] TAKAHASHI H, OSADA H, URAMOTO M, et al. A new inhibitor of protein kinase C, RK-286C (4'-demethylamino-4-hydroxystaurosporine). II. Isolation, physic-chemical properties and structure[J]. The Journal of Antibiotics, 1990, 43(2): 168-173.
- [12] FURUSAKI A, HASHIBA N, MATSUMOTO T, et al. X-ray crystal structure of staurosporine: a new alkaloid from a *Streptomyces* strain[J]. Journal of the Chemical Society, Chemical Communication, 1978, 65: 800-801.
- [13] FU P, ZHUANG Y B, WANG Y, et al. New indolocarbazoles from a mutant strain of the marine-derived actinomycete *Streptomyces fradiae* 007M135[J]. Organic Letters, 2012, 14(24): 6194-6197.
- [14] FU P, YANG C L, WANG Y, et al. Streptocarbazoles A and B, two novel indolocarbazoles from the marine-derived actinomycete strain *Streptomyces* sp. FMA[J]. Organic Letters, 2012, 14(9): 2422-2425.