

文章编号:1001-6880(2014)7-1021-05

海洋交替假单胞菌 QD1-2 抗肿瘤活性辅酶 Q 衍生物的分离与结构鉴定

陈晓兰, 丁立建, 何山*

宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211

摘要: 海洋交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas rubra* QD1-2)是从青岛海域分离筛选出的一株具有抗肿瘤活性的菌株。为了明确海洋交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas rubra* QD1-2)的抗肿瘤活性成分和结构, 利用大孔树脂柱层析、半制备HPLC等分离方法, 首次从菌株QD1-2发酵液中分离到了一个单体化合物。通过高分辨率质谱、一维和二维核磁共振波谱等现代波谱技术进行结构鉴定, 经测定, 分子量为320, 分子式为 $C_{18}H_{24}O_5$, 为辅酶Q₂衍生物。最后利用MTT法进行抗肿瘤活性测试, 显示了较强的抗肿瘤活性。这一结果揭示了海洋交替假单胞菌产生新颖抗肿瘤化合物巨大的潜力, 该属为寻找新型抗肿瘤天然化合物提供了新的来源。

关键词: 交替假单胞菌; 结构鉴定; 辅酶Q₂; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.2

文献标识码:A

Isolation and Structure Elucidation of An Antitumor Ubiquinone Derivative from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas rubra* QD1-2

CHEN Xiao-lan, DING Li-jian, HE Shan*

Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: A marine bacterium, *Pseudoalteromonas rubra* QD1-2, was isolated from the Qingdao sea in China. The crude culture of QD1-2 was highly active against human tumor cells. In order to confirm chemical structure of the antitumor compound, the crude metabolites of QD1-2 were isolated and purified by using column chromatography with Diaion HP20 macroporous resin and then purified it by preparative HPLC. The chemical structure of the active compound finally obtained was achieved with spectroscopy methods, including high resolution mass spectrometry and 1D and 2D nuclear magnetic resonance. According to the analysis results, we identified the active compound as a ubiquinone derivative with the molecular weight of 320, the molecular formula $C_{18}H_{24}O_5$. Finally antitumor activity was tested by the MTT method, showing very strong. The results revealed the huge potential of discovering novel antitumor compounds from *Pseudoalteromonas*, providing new sources for antitumor natural compounds.

Key words: *Pseudoalteromonas*; structure elucidation; coenzyme Q₂; antitumor activity

海洋交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)是Gauthier等^[1]人建立的一个海洋独有的细菌属, 可以分为有颜色的属和没有颜色的属。近十年来, 该属在海洋天然产物和海洋生态研究中发挥了重要的作用^[2,3], 在海洋天然产物方面, 虽然没有颜色的属产生活性物质较少, 但带有颜色的交替假单胞菌属

能产生一系列抗菌^[4]、抗污^[5]、抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7]等活性物质, 结构包括多糖、蛋白酶、生物碱、环肽和一些含溴的化合物等^[6,8-11]。在海洋生态方面, 比如发现海藻和海洋动物起主要防御作用是海洋交替假单胞菌产生的化学物质, 它能影响其他生物的生存、环境的变化, 目前从中发现了很多与海洋生态系统其他相关的化合物^[9,12,13]。

辅酶Q类化合物(Coenzyme Q_n, 简称CoQ_n), 又称泛醌(ubiquinone), 它是一种脂溶性醌类化合物, 根据异戊二烯侧链长度的不同分为不同的辅酶Q, 在医药和保健品等领域得到广泛应用^[14]。尤其是辅酶Q₁₀, 作为生物细胞呼吸链中的重要递氢体, 可

收稿日期:2013-05-20 接受日期:2013-09-05

基金项目: 浙江省海洋生物技术产业科技创新团队项目(2012R10029-02); 宁波市海洋藻类资源高效开发利用创新团队项目(2011B81007); 宁波大学引进人才启动基金项目(RCL2011718); 宁波大学学科项目(XKL11D2103, XKC11002); 宁波大学创新性开放实验建设项目(Cxxkf-201226)

* 通讯作者 E-mail: heshan@nbu.edu.cn

作为癌症、心脑血管疾病、急慢性肝炎和帕金森症等疾病治疗药物^[15]。目前还作为抗氧化剂,延缓皮肤衰老,应用于化妆品中。除辅酶Q₁₀外的,还有其他辅酶Q类化合物,其生化和药理作用也正在不断地被发现出来。因此,发现具有高活性高产量的辅酶Q类化合物具有重要的意义。

本实验室从青岛海域分离筛选到了一株红颜色抗肿瘤活性菌株 QD1-2,经鉴定为交替假单胞菌属 *rubra* 种,其代谢产物对胃腺癌细胞 BGC-823、宫颈癌细胞 Hela 以及肝癌细胞 HepG2 有明显抑制作用。因此,为了明确其代谢产物的主要活性成分,对其进行了分离纯化、结构鉴定和活性测试。

1 材料和仪器

1.1 菌株和培养基

菌株:海洋交替假单胞菌 (*Pseudoalteromonas rubra* QD1-2)、BGC-823 胃腺癌细胞、Hela 宫颈癌细胞以 HepG2 肝癌细胞保藏于应用海洋生物技术教育部重点实验室。

发酵培养基:Zobell 2216E 培养基(蛋白胨 5 g,酵母粉 1 g,柠檬酸铁 0.01 g 天然海水 1000 mL, pH7.2)。

1.2 仪器和试剂

Q-TOF Premier 四级杆与分析时间串联质谱仪(美国 Waters 公司);Brucker Avance 500 型核磁共振波谱仪(美国 Brucker 公司);W2695 分析型液相色谱(美国 Waters);W600 半制备高效液相色谱(美国 Waters);W2998 PDA 检测器(美国 Waters);Diaion HP-20 大孔树脂(日本三菱);XBridge 制备柱(19 mm × 250 mm, 10 μm);Waters C₁₈ 分析柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);旋转蒸发仪 RE-3000A(上海朗比仪器公司);TG21KR 高速冷冻离心机(东旺仪器);MTT(四甲基偶氮唑盐);甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 菌株发酵液粗提物

将保藏海洋细菌 (*Pseudoalteromonas rubra* QD1-2)画线接种到 Zobell 2216E 固体斜面培养基上,于 30 ℃ 培养箱中培养 1 天活化;将斜面培养获得的菌落接种到装有 400 mL Zobell 2216E 的 1 L 的三角瓶中,共发酵 40 L,于 30 ℃,转速 150 rpm 的条件下摇床发酵 7 d,获得发酵产物;将发酵产物用离

心机离心去除菌体,获得发酵液;首先利用大孔树脂吸附发酵液,然后用 80% 乙醇洗脱活性成分,最后用旋转蒸发仪将乙醇去除,获得粗浸膏。

2.2 半制备型 HPLC 分离纯化

粗浸膏用甲醇溶解,0.22 μm 孔径过滤,每次进样量 2 mL,以甲醇:水 = 65: 35 (V/V) 为流动相,流速为 8 mL/min, PDA 检测波长为 277 nm, 收集对应的活性成分,最后蒸干得到活性化合物。

2.3 样品纯度验证

取一定量纯样品溶解于 90% 的甲醇水溶液中,利用 Waters2695 分析型 HPLC,以甲醇和水为流动相进行梯度洗脱。色谱条件为:C₁₈ 反相柱, PDA 检测器,检测波长为 277 nm,自动进样器进样 10 μL,以 0.8 mL/min 的流速,甲醇比例从 10% 梯度洗脱到 90%,洗脱 60 min。

2.4 纯化合物抗肿瘤活性测试

采用 MTT 法,取对数生长期的 BGC-823 胃腺癌细胞、Hela 宫颈癌细胞以及 HepG2 肝癌细胞,将细胞用胰酶消化后,调节密度为 2~3 × 10⁴ 个/孔,添加于 96 孔板中,每孔 195 μL,置于 37 ℃、0.5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,然后加入不同浓度样品溶液到 96 孔板中,在同一块 96 孔板中样品的每个浓度均设置三孔,以甲醇作为阴性对照,37 ℃、0.5% CO₂ 培养箱中培养 48 h;取出 96 孔板,每孔加入 20 μL MTT(四甲基偶氮唑盐)(5 mg/mL),继续培养 4 h;弃培养液,每孔加入 150 mL DMSO(二甲基亚砜),37 ℃ 振荡 6 min,492 nm 处测定各孔的光吸收,取三孔平均 OD 值按 IR(%) = (OD 阴性对照 - OD 样品)/OD 阴性对照 × 100% 式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率(IR%),最后计算半抑制浓度(IC₅₀)。

2.5 化学结构鉴定

2.5.1 高分辨率质谱测试

质谱条件:采用 ESI 离子源,正离子模式,毛细管电离电压 3 kV,锥孔电压 20 V,离子源温度 120 ℃,脱溶剂温度 200 ℃,脱溶剂氮气流速 400 L · h⁻¹,锥孔反吹氮气 0,扫描分子量范围 *m/z* 100-700。

2.5.2 核磁共振波谱测试

以氘代甲醇为溶剂,TMS 为内标,测定¹H 谱、¹³C 谱、DEPT135、COSY 谱、HMBC 谱、HMQC 谱等。

3 结果和分析

3.1 活性成分的分离纯化

摇瓶发酵 40 L 发酵液,经过大孔树脂分离发

现,活性成分主要是 80% 乙醇洗脱液,合并活性组分,浓缩后经过分析型液相色谱检测,发现其中保留时间 47 min 为最强吸收峰。初步估计该化合物为活性峰,利用制备型液相色谱分离该活性物质。最

后对分离到的纯样品进行纯度验证,洗脱曲线为单一峰,说明分离到单一化合物,纯度达 99% 以上,符合后续化学结构测定要求。

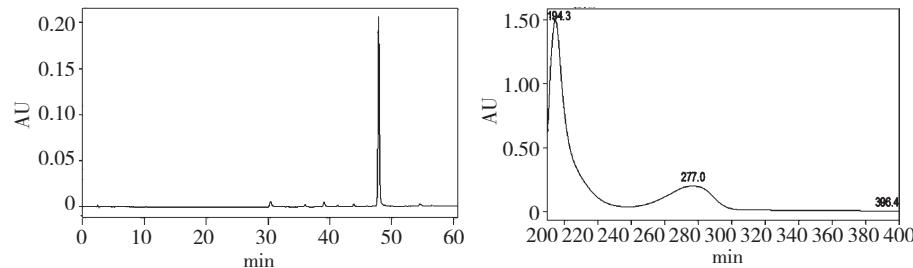


图 1 菌株 QD1-2 活性物质的 HPLC 色谱图和对应光谱图

Fig. 1 typical HPLC chromatogram and UV spectrum of bioactive compound from strain QD1-2

3.2 化学结构解析

3.2.1 高分辨质谱

通过分析活性成分质谱图,发现正离子模式下检测到 $[M + Na]^+$ 峰 m/z 343.1532,通过自带 Mass-

lynx 软件元素分析发现分子式为 $C_{18}H_{24}O_5$,误差 3.2 ppm,由此计算该化合物不饱和度为 5,可以断定分子结构为多不饱和键或环结构。

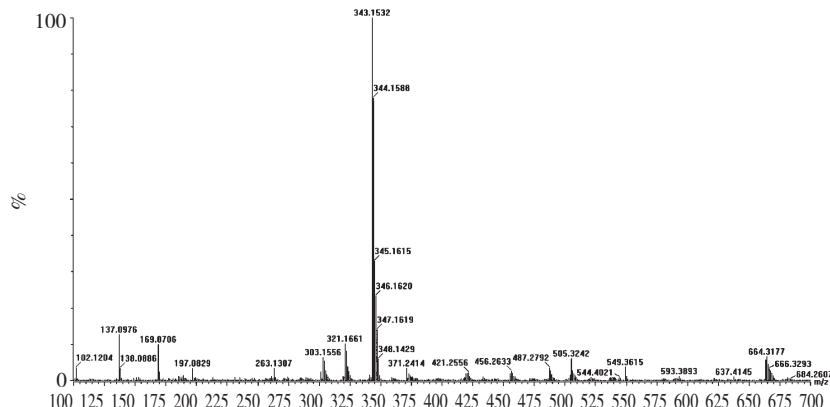


图 2 菌株 QD1-2 活性成分的高分辨正离子质谱图

Fig. 2 High resolution mass spectrum (positive ion) of the active compound from strain QD1-2

3.2.2 核磁共振数据归属

结合质谱数据,根据 1H 谱、 ^{13}C 谱信息和 HMBC

表 1 菌株 QD1-2 活性成分 1H NMR, ^{13}C NMR 和 COSY 和 HMBC 谱归属

Table 1 Assignments of 1H , ^{13}C NMR data, COSY, and HMBC spectra of the active compound from strain QD1-2

Position	δ_H (J in Hz)	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	3.19	26.0, CH ₂	H-2	C-2, C-3, C-2', C-3', C-4'
2	4.96	121.3, CH	H-1	
3		138, C		
4	1.97	39.9, CH ₂	H-5	C-2, C-5, C-6, C-9
5	1.64	22.8, CH ₂	H-4	C-3, C-4, C-6, C-7
6	2.39	43.5, CH ₂		C-4, C-5, C-7

7		211.8, C	
8	2.09	29.9, CH ₃	C-4, C-7
9	1.72	16.1, CH ₃	C-2, C-3, C-4
1'		186.2, C	
2'		142.7, C	
3'		140.3, C	
4'		185.4, C	
5'		145.9, C	
6'		146.1, C	
7'	1.99, s	12.0, CH ₃	C-1', C-2', C-3'
8'	3.96, s		C-5'
9'	3.97, s		C-6'

3.2.3 活性成分化学结构的确定

综合分析上述质谱和核磁共振数据,可以推断菌株 QD1-2 所产生的主要抗肿瘤活性组分为辅酶 Q2 衍生物,化学结构式如图 2 所示。该结构与文献报道的 Pseudoalteromon A 结构相同^[16]。

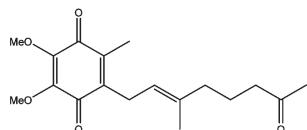


图 3 菌株 QD1-2 活性成分的化学结构式

Fig. 3 Chemical structure of the active compound from strain QD1-2

3.3 活性单体化合物抗肿瘤活性测试

在 MTT 法测试中,辅酶 Q₂ 衍生物具有明显的抗肿瘤作用,可作为肿瘤药物候选化合物进行研究。化合物分别对人胃腺癌细胞 BGC-823、人宫颈癌细胞 Hela 以及人肝癌细胞 HepG2 的细胞毒数据结果见表 2。

表 2 化合物对不同癌细胞的细胞毒数据

Table 2 Cytotoxic data of compound for different cancer cells

活性化合物	癌细胞株		
	BGC-823	Hela	HepG2
IC ₅₀ (μg/mL)	3.17	3.73	3

4 讨论

本研究从海洋交替假单胞菌里分离出的化合物属于为辅酶 Q₂ 衍生物,从结构上可以看出是辅酶 Q₂ 支链异戊二烯链中 7 号位甲基碳脱羧变成了酮

基结构,是一类较新颖的结构骨架^[16]。根据文献报道该化合物对人类急性白血病淋巴细胞具有很强的抑制,IC₅₀ 为 3.764 μg/mL,并且发现该化合物在 10 μg/mL 浓度下对人类中性粒细胞释放弹性蛋白酶有抗炎作用,抑制率达 45.1%^[16]。其中抗肿瘤活性测试结果与我们所做的结果相似,说明该化合物可以在多种肿瘤细胞有很强的抑制作用,为以后开发抗肿瘤药物奠定了理论基础。辅酶 Q 类化合物具有提高免疫力和激活细胞代谢的功能,添加到保健品和功能食品中,以此用来提高机体免疫力,改善亚健康人群的生活质量,作为一种新型的天然药物,具有巨大的市场应用潜力。

对产辅酶 Q₂ 衍生物的海洋交替假单胞菌,今后将从以下几方面进行研究:第一,通过改变培养条件和其他诱导手段,分离出新颖的同系物,以期得到更多有活性的辅酶 Q 化合物,供药物活性筛选。本实验通过诱导培养已经发现类似结构的出现,目前正在分离纯化中。第二方面,通过优化培养基,提高辅酶 Q₂ 衍生物的产量,以实现工业化生产做准备,另外,利用先进的分离手段进行快速高效分离,比如高速逆流色谱等。第三,目前有关这个化合物的研究主要在抗肿瘤活性和抗炎活性中,其他活性还未曾研究,因此开展其他生理活性研究,可以像辅酶 Q₁₀一样可以广泛的医用在医药、保健品和化妆品等领域,具有良好的应用前景。

参考文献

- Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division

- of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (e-mended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45:755-761.
- 2 Bowman JP. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *pseudoalteromonas*. *Mar Drugs*, 2007, 5:220-241.
- 3 Kalinovskaya NI, Ivanova EP, Alexeeva YV, et al. Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species. *Curr Microbiol*, 2004, 48: 441-446.
- 4 Feher D, Barlow R, Mcatee J, et al. Highly brominated antimicrobial metabolites from a marine *Pseudoalteromonas* sp. *J Nat Prod*, 2010, 73:1963-1966.
- 5 Egan S, James S, Holmstrom C, et al. Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environ Microbiol*, 2002, 4:433-442.
- 6 Isnansetyo A, Kamei Y. MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30 (T), against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47:480-488.
- 7 Pinkerton DM, Banwell MG, Garson MJ, et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of synthetically derived tambjamines C and E - J, BE-18591, and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Chem Biodivers*, 2010, 7:1311-1324.
- 8 Muldoon J, Perepelov AV, Shashkov AS, et al. Structure of an acidic polysaccharide from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NCIMB 2033 (T). *Carbohydr Res*, 2003, 338:459-462.
- 9 Rungprom W, Siwu ERO, Lambert LK, et al. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Digenea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*. *Tetrahedron*, 2008, 64:3147-3152.
- 10 Kanoh K, Kamino K, Leleo G, et al. Pseudoalterobactin A and B, new siderophores excreted by marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KP20-4. *J Antibiot (Tokyo)*, 2003, 56:871-875.
- 11 Mitova M, Tutino ML, Infusini G, et al. Exocellular peptides from Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas Haloplanktis*. *Mar Biotechnol (NY)*, 2005, 7:523-531.
- 12 Sakata T, Castillo CSD, Yoshikawa T, et al. Chemical Structures of Quinolinol Compounds Produced by Marine *Pseudoalteromonas* sp. A1-J11. *Mem Fac Fish Kagoshima Univ*, 2008, 57:29-35.
- 13 Bowman JP. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *pseudoalteromonas*. *Mar Drugs*, 2007, 5:220-241.
- 14 Wu ZF(吴祖芳), Wen PF(翁佩芳), Chen J(陈坚). Advances of Coenzyme Q₁₀ Function Studies. *J Ningbo Univ, Nat Sci En Ed*(宁波大学学报,理工版), 2001(2):85-88.
- 15 Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q₁₀. *J Am Coll Nutr*, 2001, 20:591-598.
- 16 Chen Y, Lu M, Chang Y, et al. Pseudoalteromone A: a novel bioactive ubiquinone from a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. CGH2XX (Pseudoalteromonadaceae). *Tetrahedron Letters*, 2012, 53:1675-1677.