

南海深海链霉菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 5604 次级代谢产物 lyngbyatoxin A 的研究

唐桂岭^{1,2}, 黄洪波¹, 王 博¹, 田新朋¹, 鞠建华^{1*}, 宋永相^{1*}

¹中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 中国科学院海洋微生物中心 广东省海洋药物重点实验室
中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:以卤虫致死活性和 HPLC-DAD 图谱为指导, 充分利用正相、反相色谱技术, 对采自南海北部 3536 m 深的海底沉积放线菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 5604 的活性次级代谢产物进行了研究, 从中分离到一个吡啶内酰胺类化合物, 经 HR-ESI-MS、¹H NMR、¹³C NMR 波谱分析, 确定其为 lyngbyatoxin A。

关键词:海洋放线菌; 链霉菌属; 鞘丝藻毒素 A; 卤虫致死活性

中图分类号: R284.77

文献标识码: A

Lyngbyatoxin A from Deep South China Sea-Derived *Streptomyces* sp. SCSIO 5604

TANG Gui-ling^{1,2}, HUANG Hong-bo¹, WANG Bo¹, TIAN Xin-peng¹, JU Jian-hua^{1*}, SONG Yong-xiang^{1*}

¹ Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Research Center for Marine Microbes, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301, China; ² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The strain SCSIO 5604 was identified to be *Streptomyces* sp. by 16S rRNA gene sequence, which was isolated from a sediment sample collected in South China Sea at E 120° 0.250' and N 20° 22.971' at 3536 m depth. Guided by brine shrimp lethality and HPLC-DAD, chemical analysis of the crude extract of the fermentation culture, led to the isolation of an indolelactam compound, namely lyngbyatoxin A. The structure of lyngbyatoxin A was identified based on the HR-ESI-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR spectra and comparing with literature data.

Key words: marine actinomycete; *Streptomyces* sp.; lyngbyatoxin A; brine shrimp lethality

放线菌因其能够合成活性独特、结构新颖的次级代谢产物, 长期以来被作为重要的药源微生物应用于抗生素、抗肿瘤等药物研发当中; 过去的半个多世纪, 约 70% 的抗生素来源于放线菌^[1]。然而, 随着陆生放线菌出新率的不断下降, 新的疾病及耐药病原菌的不断增长, 迫使研究者将目光转向海洋来源的放线菌以加速新的活性化合物的发现^[2]。近年来, 研究者先后从海洋放线菌中分离到具有良好的抗菌、抗肿瘤、抗炎等生物活性的新结构天然产物, 包括聚酮类、生物碱类、甾体类、萜类、葱醌类等化合物。Ritesh R 等人从海洋放线菌 *Streptomyces* sp. (CMB-M0244) 中分离到具有抗疟疾和抗菌活性

的聚酮类化合物 mollemycin A^[3]; Ryosuke S 等人从一株海洋来源放线菌链霉菌中分离到一个新的 20 元多烯巨内酰胺 8-deoxyheronamide C, 该化合物是一种特殊的生物膜粘合剂^[4]; 李苏梅等人从深海放线菌 *Pseudonocardia* sp. SCSIO 01299 中分离出了具有细胞毒活性和抗菌活性的新化合物 pseudonocardians A-C^[5]; 张文军等人从一株南海沉积物来源的小单孢 *Micromonospora rosaria* SCSIO N160 中分离得到具有抗菌活性的大环内酯类抗生素^[6]。

本课题组致力于深海放线菌次级代谢产物的研究, 已先后从中分离出多种具有良好活性的化合物。从 *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652 中分离鉴定了具有很强的抗菌和细胞毒活性的联噻唑环肽类化合物 marthiapeptide A^[7] 和具有抗疟原虫活性的 β -吡啶生物碱和吡啶内酰胺类生物碱^[8]; 从 *Streptomyces* sp. SCSIO 1666 中发现了替达霉素^[9]; 从 *Streptomyces* sp. SCSIO 03219、*Streptomyces grise-*

收稿日期: 2014-04-17 接受日期: 2014-07-09

基金项目: 中国科学院知识创新工程青年人才领域前沿项目(SQ 201119); 国家自然科学基金青年基金项目(41206135, 41106138); 海洋经济创新发展区域示范专项(GD2012-D01-001)

* 通讯作者 Tel: 86-20-89023028; E-mail: jju@scsio.ac.cn; songxiang0517@126.com

orubens SCSIO ZY0206 和 *Streptomyces albiflavinig* SCSIO ZJ28 中分别发现了一个新的孕烯化合物^[10]、4 个具有抗菌活性的多酚蒽酮^[11]和大环内酯类 elaiophyline^[12]。近期,作者在对海洋放线菌活性次级代谢产物的筛选中,发现采自南海沉积物的深海链霉菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 5604 的次级代谢产物具有较强卤虫致死活性,通过对活性组分的发酵、分离和鉴定,确定为鞘丝藻毒素 lyngbyatoxin A(1)(图 1)。本论文报道了南海深海链霉菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 5604 的 16S rRNA 基因序列的分子生物学鉴定及其次级代谢产物鞘丝藻毒素 lyngbyatoxin A 的发酵、分离和鉴定。

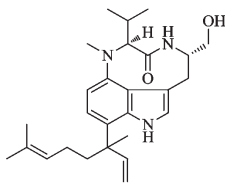


图 1 化合物 1 的结构

Fig. 1 Chemical structure of compound 1

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

中压制备层析系统 CHEETAHTM MP 200(伯纳艾杰尔); Bruker AVANCE DRX 500 核磁共振仪(500/125 MHz); Bruker amaZon SL 离子阱质谱仪; 安捷伦高效液相色谱仪(配 PDA 检测器); YMC-Pack ODS-A 半制备色谱柱(250 × 10 mm, 5 μm); 硅胶薄层层析板(HSGF₂₅₄)和柱层析用硅胶(100 ~ 200 目)均为烟台江友硅胶开发有限公司产品; YMC GEL ODS-A(75 μm); 色谱纯乙腈(安徽时联公司); 氘代氯仿(CIL); 其它化学试剂皆为国产分析纯。16S rDNA 基因序列 PCR 扩增及基因片段加 A 所用酶分别为 TransStart FastPfu DNA Polymerase 和 EasyTaq DNA Polymerase, 购自北京全式金生物技术有限公司。PCR 扩增仪器为 AG 22331 hamburg(Eppendorf)。

南海深海链霉菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 5604 采集于中国南海(E 120°0.250, N 20°22.971)3536 m 海底沉积物样品,菌种保存于中国科学院南海海洋所。平板培养基使用 M-ISP4 培养基;可溶性淀粉 1%, 细菌学蛋白胨 0.1%, 酵母提取物 0.05%, K₂HPO₄ · 3H₂O 1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%,

(NH₄)₂SO₄0.2%, CaCO₃0.2%, 海盐 3%, 微量元素溶液 100 μL/L, 琼脂 1.5% ~ 2.0%, pH 7.2 ~ 7.4; 种子培养基, 发酵培养基均用 M-AM2ab: 豆粉 0.5%, 酵母粉 0.5%, 细菌学蛋白胨 0.2%, 葡萄糖 2%, 可溶性淀粉 0.5%, KH₂PO₄0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, 海盐 3%, 碳酸钙 0.2%, pH 7.2 ~ 7.4。

1.2 方法

1.2.1 南海深海链霉菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 5604 的分子生物学鉴定

1.2.1.1 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增及扩增片段加 A

用细菌 16S rDNA 的通用引物, A primer(5'-CA-GAGTTTGATCCTGGCT-3')和 B primer(5'-AGGAG-GTGATCCAGCCGCA-3'), 对其基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): DNA 模板 1.0 μL, 5 × Buffer 5.0 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 2.0 μL, A primer(20 μmol/L) 1.0 μL, B primer(20 μmol/L) 1.0 μL, TransStart FastPfu DNA Polymerase 酶(5 U/μL) 0.2 μL, DMSO 2.0 μL, ddH₂O 12.8 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 50 s, 60 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保温。

PCR 扩增片段加 A: 反应体系(25 μL): 10 × Buffer 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, EasyTaq DNA Polymerase 0.2 μL, 16S rDNA 10 μL, ddH₂O 10.3 μL。72 °C 反应 15 min。

1.2.1.2 扩增产物的序列测定

用凝胶回收试剂盒 Gel Extraction kit 和 PCR 产物回收试剂盒 Cycle Purekit(OMEGA)纯化 PCR 产物和加 A 产物,再连接到 pCR2.1 载体(Invitrogen)上,16S rDNA 序列由上海美吉生物医药科技有限公司测定。将获得的 16S rDNA 序列进行 BLAST 分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.2.1.3 系统发育树的构建

通过 CLUSTALX 软件对 *Streptomyces* sp. SCSIO 5604 及链霉菌属最相似菌株的 16S rDNA 基因序列进行对比,使用软件 MEGA5.1 构建系统进化树。

1.2.2 菌株的发酵培养

种子培养基和发酵培养基均采用 M-AM2ab 培养基。种子液用 250 mL 锥形瓶,每瓶加入 50 mL 培养基,从平板上接入适量菌种,于 28 °C、200 rpm 的摇床上培养 36 h 后分别转接于 2 L 锥形瓶,每瓶 200 mL 培养基,于 28 °C、200 rpm 条件下培养 7 d。

1.2.3 卤虫致死活性检测

用卤虫致死性生物测定法^[13]检测化合物 1 的生物活性。取卤虫卵 300 mg 置于 500 mL 烧杯中,加入处理过的海水 400 mL,用充气泵缓缓充气,25 °C 水浴中孵化 48 h,除去卵壳及未孵化的卵,获得卤虫幼体活体备用。

将 DMSO 样品溶液配制成终浓度分别为 1000、100、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,各浓度组设 3 个平行样,与此同时设置 DMSO 空白组。取 10 只幼虫分别加入到各浓度组中,室温下继续培养 24 h 后,记录存活海虾幼虫数量并计算半数致死浓度 LC_{50} 。

1.2.4 发酵产物的提取与分离

发酵产物(6 L)于 4000 rpm 离心 10 min,分离得到上清液和菌丝体部分,上清液经丁酮萃取后减压浓缩得到浸膏 A;菌丝体用丙酮浸提,浸取液减压浓缩得到浸膏 B,通过 HPLC 分析,浸膏 A 和 B 成分相似,合并得到总浸膏 17 g。采用正相柱层析,氯仿-甲醇梯度(100:0、98:2、96:4、94:6、92:8、90:10、8:2、5:5)洗脱共得到 8 个组份 Fr. 1 ~ Fr. 8。组分 Fr. 2、Fr. 3 卤虫致死活性明显,将其合并,进一步经过中压反相柱层析,水-甲醇梯度(100:0 ~ 0:100)洗脱得到亚组分 Fr. A-1 ~ Fr. A-11,活性追踪显示,活性组分集中分布在 Fr. A-8 ~ Fr. A-10 中,尤其是 Fr. A-9,结合 TLC、HPLC-DAD 分析结果,合并这三个组分,并以半制备 HPLC(乙腈-水 80 ~ 100% 线性洗脱 12 min,100% 乙腈洗脱 15 min,流速 2.5 mL/min)进行分离,在 R_t 22.4 min 得到化合物 1(43 mg)。

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定

菌株 SCSIO 5604 在 M-ISP4 固体培养基上于 28 °C 培养 6d 后,形成浅褐色基质菌丝和白色气生菌丝,其菌落形态见图 2。16S rRNA 基因序列分析表明 SCSIO 5604 为链霉菌属成员,其系统发育树见图 3。

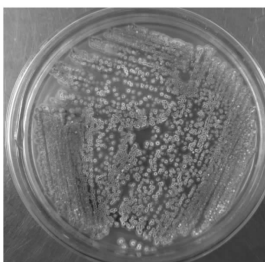


图 2 菌株 SCSIO 5604 在 M-ISP4 培养基上的形态图

Fig. 2 Phenotype of strain SCSIO 5604 on M-ISP4 medium plate

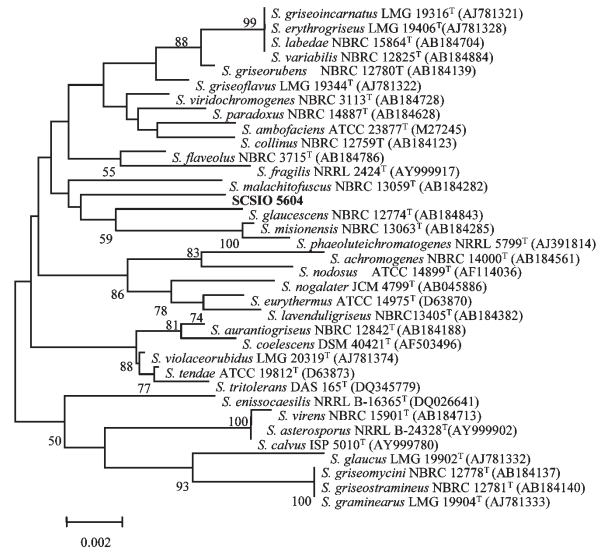


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的 SCSIO 5604 与其他链霉菌菌种 NJ 分子系统进化树

Fig. 3 Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationship between strain SCSIO 5604 and closely related members of genus *Streptomyces*

2.2 卤虫致死活性测定与结果

按照 1.2.3 中的实验方法对化合物 1 进行卤虫致死活性测定。根据报道,粗提取物 $\text{LC}_{50} < 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$,纯化合物 $\text{LC}_{50} < 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 具有强的生物活性。实验结果表明化合物 1 的卤虫致死活性很强,计算 LC_{50} 为 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 结构鉴定

化合物 1 为白色粉末,HR-ESI-MS(+)给出准分子离子峰 m/z : 438.3124 $[\text{M} + \text{H}]^+$,计算分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_2$,有 10 个不饱和度。¹H NMR 显示,在 δ_{H} 8.53、7.74、6.83 处分别有一单峰,在 δ_{H} 6.47 (H,d, $J = 8.0 \text{ Hz}$,H-5)、6.96 (H,d, $J = 8.0 \text{ Hz}$,H-6)处有两个相邻的芳环质子峰,在 δ_{H} 6.21、5.30、5.26、5.07 处有四个烯键氢,在高场区 δ_{H} 2.90 (3H,s)有一个氮甲基,四个甲基 δ_{H} 1.65 (3H,s)、1.45 (3H,s)、0.91 (3H,d, $J = 6.0$)、0.61 (3H,d, $J = 6.0$),其中后两个甲基组合成一个异丙基基团。结合¹³C NMR 在 δ_{C} 149.0 ~ 106.1 间 12 个双键碳信号,去除四个烯键碳,剩余 8 个双键碳信号,暗示结构中吡啶单元的存在。经与文献对比^[14],确定化合物 1 的结构为鞘丝藻毒素 A(lyngbyatoxin A)。

化合物 1 的波谱数据如下:¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ_{H} : 8.53 (1H,s), 7.74 (1H,s), 6.96

(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.83 (1H, s, H-2), 6.47 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.21 (1H, dd, $J = 17.5, 10.5$ Hz, H-21), 5.30 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-22a), 5.26 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-22b), 5.07 (H, t, $J = 7.0$ Hz, H-17), 4.36 (1H, overlapped, H-12), 4.34 (1H, overlapped), 3.73 (1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, H-24a), 3.59 (1H, dd, $J = 12.0, 8.0$ Hz, H-24b), 3.14 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-8a), 3.06 (1H, dd, $J = 17.0$ Hz, 2.5 Hz, H-8b), 2.90 (3H, s, H-28), 2.57 (1H, m, H-25), 2.00 (1H, td, $J = 12.5, 4.5$ Hz, H-15a), 1.90 (1H, m, H-16a), 1.81 (1H, td, $J = 12.5, 4.5$ Hz, H-15b), 1.63 (3H, s, H-20), 1.54 (1H, m, H-16b), 1.45 (3H, s, H-19), 1.39 (3H, s, H-23), 0.91 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-26), 0.60 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 Hz) δ_{C} : 174.7 (C-11), 149.0 (C-21), 146.5 (C-4), 137.6 (C-7a), 131.4 (C-18), 124.6 (C-17), 121.1 (C-2), 121.1 (C-3), 120.3 (C-6), 118.6 (C-7), 114.1 (C-3a), 112.1 (C-22), 106.1 (C-5), 71.1 (C-12), 65.1 (C-24), 55.8 (C-9), 43.4 (C-14), 38.1 (C-15), 34.0 (C-8), 33.0 (C-28), 28.6 (C-25), 25.6 (C-23), 24.8 (C-19), 23.2 (C-16), 21.6 (C-27), 19.4 (C-26), 17.3 (C-20); HR-ESI-MS m/z : 438.3124 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

2.4 讨论

鞘丝藻毒素 lyngbyatoxin A 是一种吡啶内酰胺类生物碱, 该化合物 1979 年从蓝藻 *Lyngbya majuscula* 的提取物中发现并在《Science》杂志上报道, 其对钓鱼贝 *Poecilia vittata* 具有很强的毒性^[14]。相继的生物活性研究还发现, 鞘丝藻毒素 A 是一种潜在的肿瘤启动子, 它通过与蛋白激酶 C (PKC) 的结合以调节其活性, 在哺乳动物细胞中 PKC 是调节丝氨酸/苏氨酸激酶信号转导通路, 能够获得特异性调节 PKC 同工酶活性的小分子是治疗癌症的重要目标^[15,16], 因此, 鞘丝藻毒素 A 是治疗癌症方面的一种重要先导化合物。

除了蓝藻来源的 lyngbyatoxin 类化合物, 日本学者相继从不同来源的链霉菌 *Streptomyces* sp. 中分离到该类化合物^[17-19]。在前期具有类似骨架化合物的研究中, 我们报道了来自深海放线菌 *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652 的 methylpendolmycin, pendolmycin 及其生物合成机制^[20]。本文首次从南海深海放线菌中分离到 lyngbyatoxin A, 不但为

该化合物提供了新的菌株资源, 而且还为研究 lyngbyatoxin A 与 methylpendolmycin 及 pendolmycin 在生源途径上的差异性提供了基础。同时, 利用基因重组技术, 对 lyngbyatoxin A 进行组合生物合成研究, 为具有抗肿瘤活性的新型海洋药物的研发提供了可能。

参考文献

- Berdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot*, 2005, 58:1-26.
- Fenical W, Jensen PR. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria nature chemical biology. *Nat Chem Biol*, 2006, 2:666-673.
- Ritesh R, Zeinab GK, Andrew MP, et al. Mollemycin A: An antimalarial and antibacterial glycohexadepsipeptide-polyketide from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. (CMB-M0244). *Org Lett*, 2014, 16:1716-1719.
- Ryosuke S, Shinichi N, Nobuaki M, et al. Structure and biological activity of 8-deoxyheronamide C from a marine-derived *Streptomyces* sp.: Heronamides target saturated hydrocarbon chains in lipid membranes. *J Am Chem Soc*, 2014, 136:5209-5212.
- Li SM, Tian XP, Niu SW, et al. Pseudonocardians A-C, new diazaanthraquinone derivatives from a Deep-Sea actinomycete *Pseudonocardia* sp. SCSIO 01299. *Mar Drugs*, 2011, 9:1428-1439.
- Zhang WJ (张文军), Li SM (李苏梅), Zhang HB (张海波), et al. Isolation and structural elucidation of macrolide antibiotics from marine-derived *Micromonospora rarosaria* SCSIO N160. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:466-469.
- Zhou X, Huang HB, Chen YC, et al. Marthiapeptide A, an anti-infective and cytotoxic polythiazole cyclopeptide from a 60-L scale fermentation of the deep sea-derived *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652. *J Nat Prod*, 2012, 75:2251-2255.
- Huang HB, Yao YL, He ZX, et al. Antimalarial β -carboline and indolactam alkaloids from *Marinactinospora thermotolerans*, a deep sea isolate. *J Nat Prod*, 2011, 74:2122-2127.
- Duan CR (段传人), Yao YL (姚月良), Wang ZW (汪中文), et al. Fermentation optimization, isolation and identification of tirandamycins A and B from marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO1666. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 2010, 29:12-20.