

西藏芽孢杆菌 XZ7 中 Amicoumacin 类抗生素的分离鉴定与生物活性研究

刘少伟¹, 夏 曼², 高 强¹, 蒋忠科¹, 胡辛欣¹, 何琪杨¹, 游雪甫¹, 张玉彬², 孙承航^{1*}

¹中国医学科学院 & 北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050; ²中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009

摘要:采用 UPLC-DAD-MS 分析发现西藏当雄土壤来源芽孢杆菌 XZ7 发酵液中的 Amicoumacin 类化合物, 并利用反相柱层析和高效液相色谱对发现的 3 个 Amicoumacin 类化合物进行分离纯化; 根据紫外光谱、高分辨质谱和核磁共振波谱数据及文献比对, 鉴定 3 个化合物分别为: Bacilosarcin A (**1**)、Bacilosarcin B (**2**) 和 Bacilosarcin C (**3**)。抑菌实验结果表明化合物 **2** 对表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌具有较强的抑制活性 (MIC = 4 ~ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 细胞毒性测试结果表明化合物 **1** 和 **2** 对 HepG2 肿瘤细胞具有较高的抑制作用, 其中化合物 **2** 抑制作用最强, IC₅₀ 值为 2.8 μM 。同时, 化合物 **2** 对 MCF-7 和 HeLa 肿瘤细胞也有较强的细胞毒作用, IC₅₀ 值分别为 6.2 μM 和 4.0 μM 。

关键词: Amicoumacin; 芽孢杆菌; Bacilosarcin; 葡萄球菌; 细胞毒活性

中图分类号: Q939. 92

文献标识码: A

DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2016. 1. 002

Isolation, Identification and Bioactivity of Amicoumacin Group Antibiotics Produced by *Bacillus* Strain XZ7 Isolated from Tibet

LIU Shao-wei¹, XIA Man², GAO Qiang¹, JIANG Zhong-ke¹, HU Xin-xin¹,
HE Qi-yang¹, YOU Xue-fu¹, ZHANG Yu-bin², SUN Cheng-hang^{1*}

¹Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; ²College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Three Amicoumacin group compounds **1-3** were discovered by UPLC-DAD-MS analysis from the fermentation broth of strain XZ7, a *Bacillus* sp. isolated from soil of Damxung County in Tibet. The three compounds were isolated by reversed-phase column chromatography and further purified by high performance liquid chromatography. Their chemical structures were elucidated as Bacilosarcin A (**1**), Bacilosarcin B (**2**) and Bacilosarcin C (**3**) by combinational analysis of spectral data including UV, HR-ESI-MS, NMR and comparison with those of literature. Antimicrobial assay showed compound **2** had the strongest antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with MIC values of 4-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Both compound **1** and **2** exhibited cytotoxicity against HepG2 cell line, but compound **2** showed stronger cytotoxic activity with IC₅₀ value of 2.8 μM . Meanwhile, IC₅₀ values of compound **2** against MCF-7 and HeLa cell lines were 6.2 μM and 4.0 μM , respectively.

Key words: Amicoumacin; *Bacillus*; Bacilosarcin; *Staphylococcus*; cytotoxicity

Amicoumacin 类抗生素是一类具有 8-羟基-3,4-二氢异香豆素母核结构(如图 1 所示)的抗生素,自 1975 年第一个明确报道结构的化合物 Baciphelacin^[1]发现至今,天然来源的此类化合物至少已发现 36 个,产生菌绝大多数是芽孢杆菌。由于携带的羟基化酰氨基侧链不同,使该类化合物结构多样并具

有抗菌、抗肿瘤、抗疟、抗病毒、抗炎、溃疡保护、植物生长调节等丰富的生物活性^[2],其中在抗革兰氏阳性菌及其耐药菌,如耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)和抗肿瘤方面尤为显著。如 Kristenin^[3]、Baciphelacin^[4]、Amicoumacin A^[5,6]和 PJS^[7]等表现出优良的抗 MRSA 活性; Y-05460M-A^[8]和 PM-94128^[9]的体外抗肿瘤细胞活性 IC₅₀ 值在纳摩尔水平。

本实验室前期从西藏来源土样中发现一株能够产生多种 Amicoumacin 类抗生素的芽孢杆菌菌株

收稿日期: 2015-09-23 接受日期: 2015-11-25

基金项目: 国家自然科学基金(81402834 和 81172963); 北京市自然科学基金(7154223)

* 通讯作者 Tel: 86-10-63165278; E-mail: chenghangsun@hotmail.com

XZ7, 通过 UPLC-DAD-MS 对菌株 XZ7 次级代谢产物进行分析及化学分离, 获得 Amicoumacin 类化合物 AI-77-F 和 AI-77-H, 同时还发现与 Bacilosarcin A (MW = 491), Bacilosarcin B (MW = 493) 和 Bacilosarcin C (MW = 494) 分子量一致的 Amicoumacin 类组分^[10]。文献调研表明, Bacilosarcin A、B、C 均于 2008 年后由不同研究组从海洋来源的不同芽孢杆菌菌株中相继分离得到, 其中 Bacilosarcin A 具有较强的除草活性^[11] 以及抗疟原虫 (*P. falciparum*) 活性^[12], Bacilosarcin B 对金黄色葡萄球菌和 HeLa 细胞具有一定的抑制作用^[13]。鉴于目前未有研究组从一株芽孢杆菌中同时分离到 Bacilosarcin A、B、C, 且已有文献对三者抗菌、抗肿瘤活性的研究数据

不够全面, 故本课题组对其开展了定向化学分离, 纯品积累和结构解析工作, 确认三个化合物结构分别为 Bacilosarcin A (1)、Bacilosarcin B (2) 和 Bacilosarcin C (3), 结构见图 2, 同时, 对三个化合物的抗菌活性和细胞毒活性开展了较系统的研究分析, 并在活性结果的基础上, 对其构效关系进行了初步探讨。

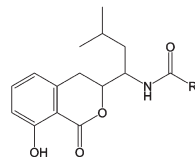


图 1 Amicoumacin 类抗生素的母核结构

Fig. 1 Common backbone of Amicoumacin group antibiotics

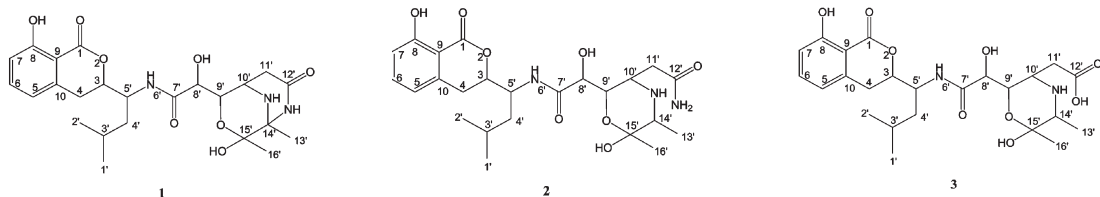


图 2 化合物 1~3 的平面结构

Fig. 2 Chemical structures of compounds 1-3

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞株

实验菌株 XZ7 分离自西藏当雄土壤, 经 16S rRNA 序列比对鉴定其为枯草芽孢杆菌亚种 (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*); 抑菌活性测试所用检定菌由中国医学科学院医药生物技术研究所保存; 细胞毒活性测试所用人非小细胞肺癌 A549 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人宫颈癌 HeLa 细胞购自美国模式生物保藏中心 (ATCC), 人乳腺癌 MCF-7 细胞来自美国国立癌症研究院。

1.1.2 培养基

菌株 XZ7 斜面培养基: 改良 ISP2 琼脂培养基: 葡萄糖 4.0 g, 酵母提取物 4.0 g, 麦芽浸粉 5.0 g, 维生素 B₁ 1.0 mg, 维生素 B₆ 1.0 mg, 核黄素 1.0 mg, 烟酸 1.0 mg, 苯丙氨酸 1.0 mg, 生物素 1.0 mg, 丙氨酸 0.3 mg, 微量盐 1.0 mL, 琼脂 18 g, 1.0L 无菌蒸馏水, pH 7.2。

菌株 XZ7 发酵培养基: 种子培养基和二级发酵培养基均同斜面培养基 (不含琼脂)。

检定菌培养基: Mueller Hinton (MH) 液体培养

基和 Mueller Hinton Agar (MHA) 固体培养基为英国 OXOID 公司产品。

1.1.3 分离填料和主要试剂

中压柱 LiChroprep RP-C₁₈ (50 g, 40 ~ 63 μm, 柱体积 1 × 50 cm) 为德国 Merck 公司产品; 高效液相制备色谱柱 Zorbax Bonus-RP (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) 为美国安捷伦公司产品; 液质联用分析柱 Shim-pack XR-ODS (3.0 × 75 mm, 2.2 μm) 为日本 Shimadzu 公司产品; 分析纯乙酸乙酯、甲醇等均为北京化工厂产品; 色谱级乙腈购于美国 Honeywell Burdick & Jackson 公司; 水为屈臣氏蒸馏水。

1.1.4 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪和 LC-MS 2020 型液相色谱质谱联用仪均为日本岛津公司产品; ThermoScientific Q Exactive 高分辨质谱仪为美国 Thermo 公司产品; Varian VNS-600 型核磁共振仪为瑞士瓦里安公司产品; 全温度恒温摇床 ZHWY-211C 为上海智诚分析仪器制造公司产品; OSB-2100 旋转蒸发器为日本 EYELA 公司产品; MIT-P 细菌多点接种仪为日本 SAKUMA 公司产品; MDF-U35V 型二氧化碳培养箱为日本三洋公司产品; CKX41 型倒置显微镜为日本奥林巴斯公司产品; Model680 型酶标仪为美

国伯乐公司产品。

1.2 方法

1.2.1 菌株 XZ7 的发酵

无菌操作下将生长良好的菌株 XZ7 从斜面接种于含 50 mL 改良 ISP2 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,作为种子,于 28 ℃、180 rpm 旋转振荡培养 24 h;按 5% 的接种量,将种子转接种于含 1000 mL 改良 ISP2 液体培养基的 5000 mL 三角瓶中,于 28 ℃、180 rpm 摇床上旋转振荡培养,72 h 后收获发酵液。

1.2.2 菌株 XZ7 产物中 Amicoumacin 类化合物的 UPLC-DAD-MS 分析

由于具有共同的 8-羟基-3,4-二氢异香豆素的母核结构,使 Amicoumacin 类化合物在 203 nm,247 nm,314 nm 处具有典型的紫外吸收特征,利用超高效液相色谱-质谱联用技术,对具有这一紫外特征的吸收峰进行质谱分析,可大致确定已知 Amicoumacin 类抗生素。UPLC-DAD-MS 分析条件如下:色谱柱为 Shim-pack XR-ODS;流动相:10% ~ 50% 乙腈-水溶液线性梯度洗脱 40 min,流速为 0.4 mL/min;离子化模式为电喷雾(ESI),SCAN 模式扫描,扫描范围 m/z 200 ~ 1000;正负离子同时监测;离子源电压 4.5 KV,检测器电压 1.25 KV,DL 温度 200 ℃,加热模块温度 350 ℃,雾化气流速 1.5 L/min,干燥气流速 15 L/min。

1.2.3 化合物的提取和分离

50 L 发酵液经 4500 rpm 离心 20 min 后,上清液用等体积乙酸乙酯萃取,有机相经无水 Na_2SO_4 脱水处理,旋转蒸发干燥后,获得棕黄色糖浆状粗品约 35 g。粗品用少量甲醇溶解后,上样于 LiChroprep RP-C₁₈ 中压柱,用 30% 甲醇-水溶液 150 mL 和 60% 甲醇-水溶液 200 mL 分级洗脱,流速控制在 1 mL/min 左右。收集 60% 甲醇-水洗脱液 40 管(5 mL/管),洗脱液经 UPLC-DAD-MS 分析后,合并含有 Amicoumacin 类化合物的流份,减压浓缩获得半纯品约 4.5 g。半纯品用少量甲醇溶解,经 0.22 μm 滤膜过滤后用高效液相色谱制备。流动相分别为:含 0.1% 三氟乙酸(TFA)的蒸馏水(A)和色谱纯乙腈(B);洗脱程序为:0 ~ 15.00 min,15% ~ 20% B;15.01 ~ 30.00 min,20% B;流速为 1 mL/min,检测波长为 210 nm、254 nm 和 314 nm。分别收集保留时间约为 8.8 min、14.7 min 和 18.6 min 左右的色谱峰,合并流份且冷冻干燥后获得纯品化合物 2(10.5 mg)、1(4.8 mg)和 3(5.3 mg)。化合物 1 ~ 3

的 HPLC 分离色谱图见图 3。

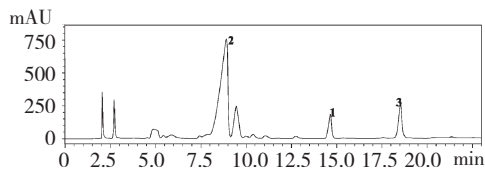


图3 化合物 1~3 的 HPLC 分离色谱图

Fig. 3 Preparative HPLC chromatogram for compound 1-3

1.2.4 化合物 1~3 的抗菌谱活性测定

参照 CLSI 推荐方法^[14],采用琼脂稀释法和多点接种仪进行 MIC 测定。化合物 1 ~ 3 经 DMSO 溶解后,用 MH 肉汤二倍稀释成各种所需浓度,分别加适量到平皿中;MH 琼脂培养基溶化后定量注入含待测化合物的平皿内混匀,使化合物的终浓度分别为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。检定菌用 MH 肉汤隔夜增菌,试验时制备成 0.5 麦氏浓度的菌悬液,1:10 稀释后以多点接种仪吸取菌液(约 1 ~ 2 μL)接种于琼脂平板表面,每点菌落数约为 10^4 CFU。接种好后置 37 ℃ 孵育 16 ~ 24 h 观察结果,以抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC 值。

1.2.5 化合物 1~3 的细胞毒活性测定

采用 MTT 法^[15]测定三个化合物的细胞毒活性。使用溶剂(50% DMSO + 50% 乙醇)把化合物 1 ~ 3 配制成 10 mM 的母液,-20 ℃ 保存,使用前用培养基将其分别稀释到合适的浓度。取对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板,A549、HepG2 和 HeLa 细胞的接种密度为 3000 个/孔,MCF-7 细胞 5000 个/孔。置 5% CO_2 培养箱中 37 ℃ 培养 24 h 后加入不同浓度化合物,每个化合物浓度设 3 个平行孔。实验组细胞加入不同浓度梯度化合物溶液,对照组细胞加入与化合物相同体积的培养液。药物作用 72 h 后,每孔加入新鲜配制的 MTT 溶液(1 mg/mL)50 μL ,混匀后继续孵育 2 h。小心吸除培养液,每孔加入 DMSO 150 μL ,震荡 5 min 混匀,酶标仪测定 570 nm 处的吸光度值(OD)。将各测试孔的 OD 值减去本底 OD 值(完全培养基加 MTT,无细胞),细胞存活率(%) = (加药细胞 OD 值-本底 OD 值)/(对照细胞 OD 值-本底 OD 值) \times 100 %。IC₅₀ 计算软件计算抑制细胞增殖 50% 的药物浓度即 IC₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 ~ 3 均为白色无定形粉末,不溶于水、

正己烷,微溶于乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷,易溶于甲醇、二甲基亚砜等溶剂。以甲醇为溶剂,三者均在 203 nm、247 nm 和 314 nm 处有最大紫外吸收。化合物 **1~3** 核磁数据如下:

化合物 1 HR-ESI-MS 显示 $[M + H]^+$ 测量值为 492.23402,理论值为 492.23404,分子量为 491,结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 确定其分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_8$,不饱和度为 10。 ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_{H} : 7.45 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6), 6.84 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 6.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 4.67 (1H, dt, $J = 12.0, 3.0$ Hz, H-3), 4.58 (1H, dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-9'), 4.32 (1H, m, H-5'), 4.16 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8'), 3.75 (1H, m, H-10'), 3.11 (1H, dd, $J = 16.2, 12.0$ Hz, H-4a), 2.93 (1H, dd, $J = 16.2, 3.0$ Hz, H-4b), 2.82 (1H, d, $J = 18.6$ Hz, H-11'a), 2.68 (1H, dd, $J = 18.6, 6.6$ Hz, H-11'b), 1.81 (1H, m, H-4'a), 1.70 (1H, m, H-3'), 1.48 (3H, s, H-13'), 1.44 (1H, m, H-4'b), 1.14 (3H, s, H-16'), 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-2'), 0.94 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_{C} : 173.9 (C-7'), 171.3 (C-1), 171.2 (C-12'), 163.2 (C-8), 141.4 (C-10), 137.6 (C-6), 119.7 (C-5), 116.8 (C-7), 109.4 (C-9), 98.7 (C-15'), 82.7 (C-3), 71.9 (C-14'), 71.1 (C-8'), 70.8 (C-9'), 50.6 (C-5'), 49.3 (C-10'), 40.6 (C-4'), 31.0 (C-4), 29.6 (C-11'), 25.9 (C-3'), 23.8 (C-2'), 22.1 (C-16'), 22.0 (C-1'), 21.3 (C-13')。以上数据与文献^[11,12]报道基本一致,故鉴定化合物 **1** 为 Bacilosarcin A。

化合物 2 HR-ESI-MS 显示 $[M + H]^+$ 测量值为 494.24928,理论值为 494.24969,分子量为 493,结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 确定其分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_8$,不饱和度为 9。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 10.80 (1H, s, 8-OH), 8.97 (1H, brs, 10'-NH), 7.94 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, 6'-NH), 7.73 (1H, s, 12'-NH_a), 7.35 (1H, s, 12'-NH_b), 7.46 (1H, dd, $J = 8.4, 7.8$ Hz, H-6), 6.71 (1H, s, 15'-OH), 6.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 6.81 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 5.75 (1H, brs, 8'-OH), 4.70 (1H, dt, $J = 13.2, 2.4$ Hz, H-3), 4.33 (1H, dd, $J = 7.8, 3.0$ Hz, H-9'), 4.19 (1H, m, H-5'), 3.93 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8'), 3.64 (1H, m, H-10'), 3.31 (1H, m, H-14'), 3.01 (1H, dd, $J = 16.8, 13.2$ Hz, H-4a), 2.82

(1H, dd, $J = 16.8, 2.4$ Hz, H-4b), 2.66 (1H, m, H-11'a), 2.64 (1H, m, H-11'b), 1.66 (1H, m, H-4'a), 1.60 (1H, m, H-3'), 1.33 (1H, m, H-4'b), 1.09 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13'), 1.05 (3H, s, H-16'), 0.88 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-2'), 0.84 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1'); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 172.5 (C-12'), 170.8 (C-7'), 169.2 (C-1), 160.8 (C-8), 140.6 (C-10), 136.3 (C-6), 118.7 (C-5), 115.2 (C-7), 108.3 (C-9), 94.6 (C-15'), 80.9 (C-3), 70.2 (C-8'), 67.4 (C-9'), 50.5 (C-14'), 49.7 (C-10'), 48.0 (C-5'), 39.0 (C-4'), 29.0 (C-4), 27.7 (C-11'), 24.2 (C-3'), 24.1 (C-16'), 23.3 (C-2'), 21.6 (C-1'), 13.6 (C-13')。以上数据与文献^[11,13]报道基本一致,故鉴定化合物 **2** 为 Bacilosarcin B。

化合物 3 HR-ESI-MS 显示 $[M + H]^+$ 测量值为 495.23357,理论值为 495.23371,分子量为 494,结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 确定其分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_9$,不饱和度为 9。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 10.80 (1H, s, 8-OH), 8.97 (1H, brs, 10'-NH), 8.72 (1H, brs, 12'-OH), 7.87 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, 6'-NH), 7.46 (1H, dd, $J = 8.4, 7.2$ Hz, H-6), 6.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 6.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 6.72 (1H, s, 15'-OH), 5.79 (1H, brs, 8'-OH), 4.69 (1H, dt, $J = 12.6, 3.0$ Hz, H-3), 4.46 (1H, dd, $J = 7.2, 2.4$ Hz, H-9'), 4.19 (1H, m, H-5'), 3.97 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-8'), 3.72 (1H, m, H-10'), 3.31 (1H, m, H-14'), 3.01 (1H, dd, $J = 16.8, 12.6$ Hz, H-4a), 2.87 (1H, dd, $J = 18.0, 4.8$ Hz, H-11'a), 2.82 (1H, dd, $J = 16.8, 3.0$ Hz, H-4b), 2.68 (1H, dd, $J = 18.0, 6.6$ Hz, H-11'b), 1.66 (1H, m, H-4'a), 1.62 (1H, m, H-3'), 1.33 (1H, m, H-4'b), 1.08 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13'), 1.07 (3H, s, H-16'), 0.88 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-2'), 0.85 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1'); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 172.4 (C-12'), 171.2 (C-7'), 169.6 (C-1), 161.3 (C-8), 141.0 (C-10), 136.7 (C-6), 119.1 (C-5), 115.7 (C-7), 108.7 (C-9), 95.2 (C-15'), 81.3 (C-3), 71.0 (C-8'), 67.9 (C-9'), 51.3 (C-14'), 49.7 (C-10'), 48.5 (C-5'), 39.5 (C-4'), 29.6 (C-4), 29.4 (C-11'), 24.7 (C-3'), 24.5 (C-16'), 23.8 (C-2'), 22.0 (C-1'), 13.9 (C-13')。以上数据与文献^[13]报道基本一致,故鉴定化

合物 **3** 为 Bacilosarcin C。

2.2 化合物 1~3 的抑菌活性测定结果

化合物 **1~3** 对常见致病细菌的活性结果如表 1 所示。化合物 **2** 对表皮葡萄球菌具有较强的抑制活性,对甲氧西林敏感表皮葡萄球菌(MSSE)MIC 值为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$;对甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌

(MSSA)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)及万古霉素中度耐药金黄色葡萄球菌(VISA)具有中度抑制活性,MIC 值为 8~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。化合物 **1** 只对甲氧西林敏感表皮葡萄球菌(MSSE)有活性,MIC 值为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$;化合物 **3** 对所有检定菌均活性较弱或无活性(MIC >16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

表 1 化合物 1~3 的抗菌谱

Table 1 Antibacterial spectrum of compounds 1-3

检定菌名称 Test organism	检定菌编号 Test organism No.	耐药性 Drug resistance	最小抑菌浓度 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
			1	2	3
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	MSSE	16	4	>16
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	13-1 *	MSSE	16	4	>16
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	MSSA	>16	16	>16
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	13-17 *	MSSA	>16	8	>16
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33591	MRSA	>16	16	>16
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	13-18 *	MRSA	>16	16	>16
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	Mu50	VISA	>16	16	>16
屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 700221	VRE	>16	>16	>16
屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	13-7 *	VSE	>16	>16	>16
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	VSE	>16	>16	>16
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	VRE	>16	>16	>16
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	ESBLs(-)	>16	>16	>16
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	14-11 *	ESBLs(+)	>16	>16	>16
肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	ESBLs(+)	>16	>16	>16
肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7 *	ESBLs(-)	>16	>16	>16
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853		>16	>16	>16
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606		>16	>16	>16
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 43560		>16	>16	>16
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048		>16	>16	>16
粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	ATCC 21074		>16	>16	>16
摩氏摩根菌 <i>Morganella morganii</i>	ATCC 25830		>16	>16	>16
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 29905		>16	>16	>16
弗劳地枸橼酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864		>16	>16	>16

注:MSSE:甲氧西林敏感表皮葡萄球菌;MRSE:耐甲氧西林表皮葡萄球菌;MSSA:甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌;MRSA:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;VISA:万古霉素中度耐药金黄色葡萄球菌;VSE:万古霉素敏感肠球菌;VRE:耐万古霉素肠球菌;ESBLs(+)/(-):产/不产超广谱 β -内酰胺酶菌株;*:临床分离菌株。

Note:MSSE:Methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermidis*;MRSE:Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*;MSSA:Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*;MRSA:Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*;VISA:Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*;VSE:Vancomycin-sensitive *Enterococci*;VRE:Vancomycin-resistant *Enterococci*;ESBLs(+)/(-):with/without Extended-Spectrum Beta-Lactamases;*:Isolated from the clinic.

2.3 化合物 1~3 的细胞毒活性测定结果

化合物 **1~3** 对人肝癌细胞 HepG2 的增值抑制作用具有差异性,IC₅₀ 值分别为 7.3 μM 、2.8 μM 和 54.3 μM ,其中化合物 **2** 对 HepG2 细胞的增值抑制

作用最强,且随着处理浓度的增加,细胞存活率明显下降,呈现明显的浓度依赖效应(图 4)。进一步考察化合物 **2** 对人非小细胞肺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 MCF-7、人宫颈癌细胞 HeLa 的抑制活性,结果

表明,化合物 **2** 对 MCF-7 和 HeLa 细胞的增殖抑制作用与 HepG2 细胞较为接近,IC₅₀ 值分别为 6.2 μM 和 4.0 μM,对 A549 细胞的增殖抑制作用较弱,IC₅₀ 为 63.5 μM(表 2)。

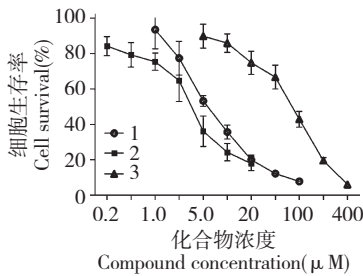


图 4 化合物 1~3 对 HepG2 细胞的增殖抑制作用

Fig. 41 Inhibitory effect of compounds 1-3 on HepG2 cell line

表 2 化合物 2 对四种肿瘤细胞株的 IC₅₀ 值

Table 2 IC₅₀ values of compound 2 on tumor cells growth (μM)

化合物 Compound	IC ₅₀ (μM)			
	HepG2	A549	MCF-7	HeLa
Bacilosarcin B (2)	2.8	63.5	6.2	4.0

3 讨论

Bacilosarcin A (**1**) 和 Bacilosarcin B (**2**) 最早于 2008 年由 Azumi 等^[11] 从远东沙鳎鱼 (*S. melanosticta*) 肠道中分离的枯草芽孢杆菌发酵液中发现并分离得到。2012 年 Boya 等^[12] 从太平洋巴拿马海岸采集的白色柔枝柳珊瑚 (octocoral *L. alba*) 来源的芽孢杆菌培养液中也分离得到 Bacilosarcin A (**1**)。同年, Li YX 等^[13] 从红海深处沉积物中获得的枯草芽孢杆菌中再次分离得到 Bacilosarcin B (**2**), 同时还发现了新同系物 Bacilosarcin C (**3**)。这三个化合物在结构上极其类似, 差别只在于: Bacilosarcin A (**1**) 的 C-12' 上的氨基与六元杂环上的 C-14' 相连, 形成一个独特的 3-氧杂-6,9-二氮杂双环 [3.3.1] 壬烷环系统, 具有环内酰胺键; 而 Bacilosarcin B (**2**) 和 Bacilosarcin C (**3**) 的 12' 位不与 C-14' 相连成环, Bacilosarcin B (**2**) 的 12' 位为酰氨, Bacilosarcin C (**3**) 的 12' 位为羧酸。已报道的活性研究表明 Bacilosarcin A (**1**) 与已上市的除莠霉素 A (herbimycin A) 相比, 除草活性更好^[11], 另外 Bacilosarcin A (**1**) 对耐氯喹恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 具有良好活性^[12], Bacilosarcin B (**2**) 对金黄色葡萄球菌和 HeLa 细胞具有抑

制作用^[13]。

本研究首次从同一株芽孢杆菌中分离得到化合物 **1~3**, 且应用多株临床致病菌和肿瘤细胞株, 对 3 个类似化合物开展了较全面的抗菌和抗肿瘤的活性评价。化合物 **2** 与 **3** 的结构差别只在于 C-12' 是酰胺基或羧基, 但化合物 **2** 无论在抑菌活性还是细胞毒活性方面, 都远远高于化合物 **3**, 推断 C-12' 位酰胺基团是 Amicoumacin 化合物重要的生物活性位点。化合物 **1** 由于在 C-12' 位也含有酰胺基团, 因此显示出一定的抑菌活性和细胞毒活性; 但与化合物 **2** 相比, 化合物 **1** 的活性相对较弱, 推测是由于 C-12' 位酰胺基团与其它基团相连发生环化, 使得其活性位点被部分掩盖, 从而影响了其生物活性。以上构效关系的分析结果与 2007 年 Hashimoto 等人^[6] 对 Amicoumacin A 和 Amicoumacin B 的构效关系研究结果一致, 从而进一步证明 C-12' 的酰胺化在 Amicoumacin 类化合物生物活性中发挥着关键作用。

参考文献

- Okazaki H, Kishi T, Beppu T, *et al.* Letter: A new antibiotic, baciphelacin. *J Antibiot*, 1975, 28: 717-719.
- Han XY (韩晓艳), Liu SW (刘少伟), Wang FF (王飞飞), *et al.* Research progress of Amicoumacin group antibiotic. *World Notes Anti* (国外医药抗生素分册), 2013, 34: 106-115.
- Weisenborn FL, Brown WE, Meyers E. Antibiotic kristenin. US4296101, 1981-10-20.
- Carrasco L. Baciphelacin: a new eukaryotic translation inhibitor. *Biochimie*, 1987, 69: 797-802.
- Itoh J, Shomura T, Omoto S, *et al.* Isolation, physicochemical properties and biological activities of amicoumacins produced by *Bacillus pumilus*. *Agric Biol Chem*, 1982, 46: 1255-1259.
- Hashimoto M, Taquchi T, Nishida S, *et al.* Isolation of 8'-phosphate ester derivatives of amicoumacins: structure-activity relationship of hydroxy amino acid moiety. *J Antibiot*, 2007, 60: 752-756.
- Liu SW, Jin J, Chen C, *et al.* PJS, a novel isocoumarin with hexahydropyrimidine ring from *Bacillus subtilis* PJS. *J Antibiot*, 2013, 66: 281-284.
- Sato T, Nagai K, Suzuki K, *et al.* A new isocoumarin antibiotic, Y-05460M-A. *J Antibiot*, 1992, 45: 1949-1952.
- Cañedo LM, Puentes JF, Baz JP. PM-94128, a new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. *J Antibiot*, 1997, 50: 175-176.

(下转第 64 页)