

文章编号:1001-6880(2016)5-0690-07

# 海洋链霉菌 H41-59 畴醇类化学成分及其细胞毒活性研究

张杨梅<sup>1</sup>, 李先盛<sup>1</sup>, 李红玉<sup>1</sup>, 张英<sup>1</sup>, 林壁润<sup>2</sup>, 周光雄<sup>1\*</sup><sup>1</sup>暨南大学药学院中药及天然药物研究所 广东省普通高校中药和天然药物药效物质基础重点实验室, 广州 510632; <sup>2</sup>广东省农业科学院植物保护研究所 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510110

**摘要:**对来源于南海红树林底泥的海洋链霉菌 H41-59 发酵物中的次级代谢产物进行了分离纯化、结构鉴定及抗肿瘤细胞毒活性评价研究。经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 分子排阻层析和高效液相色谱等分离手段, 从中分离得到了 10 个甾醇类化合物。通过核磁、质谱等方法, 并结合与文献数据比对, 鉴定分离得到的化合物分别为:麦角甾-7,22-二烯-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -三醇(**1**)、麦角甾-7,22-二烯-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -三醇(**2**)、麦角甾-7,22-二烯-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -四醇(**3**)、麦角甾-7,22-二烯-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,25-四醇(**4**)、5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -环氧麦角甾-8(**9**)、22-二烯-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -二醇(**5**)、5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -环氧麦角甾-8(**14**)、22-二烯-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -二醇(**6**)、麦角甾-8(**9**)、22-二烯-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -四醇(**7**)、麦角甾-8(**14**)、22-二烯-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -四醇(**8**)、5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -环氧麦角甾-8(**14**)、22-二烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇(**9**)、麦角甾-5,7,22-三烯-3 $\beta$ -醇(**10**)。化合物**1~10**均为首次从海洋来源链霉菌中分离得到。采用 MTT 法对这 10 个化合物进行体外抗肿瘤细胞活性的筛选, 发现均具有一定的细胞毒活性。其中, 化合物**5, 7** 和 **8** 表现出较好的抑制活性, 其 IC<sub>50</sub> 值均小于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词:**链霉菌;甾醇;次级代谢产物;红树林;细胞毒活性

中图分类号:R931.77

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.009

## Cytotoxic Sterols from Marine Derived *Streptomyces* sp. H41-59

ZHANG Yang-mei<sup>1</sup>, LI Xian-sheng<sup>1</sup>, LI Hong-yu<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, LIN Bi-run<sup>2</sup>, ZHOU Guang-xiong<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine

and New Drugs Research, Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of New Technique for Plant Protection in Guangdong, Institute

of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510110, China

**Abstract:** To study the bioactive constituents of *Streptomyces* sp. strain H41-59 isolated from the sea bed mud at the mangrove district of South China Sea. By using silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography and preparative HPLC methods, ten ergosterols were isolated from its ethyl acetate extract. Based on the analysis of NMR and ESI-MS spectral data, the structures of these compounds were identified as ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol(**1**), ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -triol(**2**), ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -tetraol(**3**), ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,25-tetraol(**4**), 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-ergosta-8(**9**), 22-diene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol(**5**), 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-ergosta-8(**14**), 22-diene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol(**6**), ergosta-8(**9**), 22-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -tetraol(**7**), ergosta-8(**14**), 22-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -tetraol(**8**), 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-ergosta-8(**14**), 22-diene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol(**9**), ergosta-5,7,22-triene-3 $\beta$ -ol(**10**). Compound **1~10** were isolated from *Streptomyces* species for the first time. Cytotoxicities of these sterols against three cancer cell lines were evaluated *in vitro* by MTT method. All of them showed cytotoxic activity to some extent. Among them, compound **5, 7** and **8** displayed moderate cytotoxicity, with IC<sub>50</sub> values lower than 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Key words:** *Streptomyces*; sterols; metabolite; mangrove; cytotoxicity

链霉菌是一种革兰氏阳性丝状放线菌, 是一类重要的微生物资源, 可产生多种类型的具有重要价

值的次级代谢产物, 涉及的主要生物活性有抗癌、抗肿瘤、抗菌、抗炎等, 因此, 常被人们称为天然药物的合成工厂。海洋来源的链霉菌生活在高盐、低温等极端环境中, 具有独特的代谢途径, 可以产生结构新颖且活性良好的多种代谢产物<sup>[1]</sup>。目前, 海洋来源的链霉菌主要产生抗霉素、放线菌素、大环内酯、多

收稿日期:2016-01-14 接受日期:2016-04-06

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373320);广东省自然基金团队项目(2015A030312002);暨南大学教育部研究基金(21612114)

\* 通讯作者 Tel:86-20-85221469; E-mail:guangzh@sina.com

肽、多烯等类型化合物,关于链霉菌中产生的甾醇类化合物的报道相对较少。多羟基甾醇类化合物是一类重要的化合物,是细胞膜上的重要组成部分,常见于真菌、海绵、海鞘、海藻和珊瑚中。很多甾醇具有独特的生理作用,特别是具有较强的抗肿瘤活性。关于甾醇的分离鉴定、生物代谢、生理活性及其作用机制等方面,目前已有大量研究报道<sup>[2,3]</sup>。本文就链霉菌 H41-59 中的甾醇类化学成分进行了较系统

的研究,并对其抑制肿瘤细胞株的细胞毒活性进行了测定。我们从其乙酸乙酯萃取物中,分离鉴定了 10 个单体化合物(图 1),并对分得的化合物进行了体外抗肿瘤活性筛选,发现化合物 1~10 对三种肿瘤细胞株均具有不同程度的细胞毒活性。这些研究成果进一步丰富了海洋链霉菌的化学成分多样性,为后续关于链霉菌的活性次级代谢产物与药物先导物发现提供研究基础。

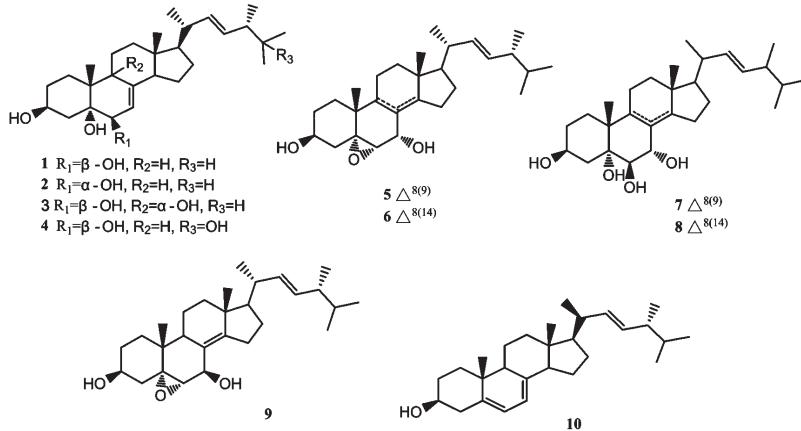


图 1 化合物 1~10 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-10

## 1 材料与仪器

### 1.1 链霉菌菌株

链霉菌 H41-59 由广东省农业科学院植物保护研究所保存和提供,该菌株分离自广东阳江闸坡近海红树林的底泥。

### 1.2 细胞株

人肺癌细胞 NCI-H460、人乳腺癌细胞 MCF-7 和人神经胶质瘤细胞 SF-268,均由暨南大学医学院提供。

### 1.3 培养基

菌株生长培养基(高氏一号培养基):可溶性淀粉 20 g, KNO<sub>3</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub> 1 g, NaCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.02 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, 海水晶 3 g, 琼脂 20 g, 水 1 L, pH 7.2~7.4。

发酵培养基:玉米淀粉 30 g, 酵母粉 30 g, 海水晶 2.5 g, CaCO<sub>3</sub> 1.5 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 0.6 g, FeSO<sub>4</sub> 0.02 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.9 g, 水 1 L, pH 7.2~7.4。

### 1.4 仪器与试剂

Biostate 30 L 生物发酵罐(德国贝朗公司); LKYC-2 型恒温摇床(杭州郎琨科技有限公司); CO<sub>2</sub>

培养箱(美国 Shel-Lab);台式离心机(德国 Sigma 公司);Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);Bruker AV-300 和 AV-600 型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司);Finnigan LCQ Advantage MAX 质谱仪(美国菲尼根质谱公司);液相分析色谱柱为 Ultimate XB-C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 × 250 mm)(美国 Welch 公司);液相半制备色谱柱为 Ultimate XB-C<sub>18</sub> (5 μm, 10 × 250 mm)(美国 Welch 公司)。硅胶(200~300 目)(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司);核磁用氘代试剂(Merck 公司);色谱级甲醇(山东禹王公司);液相用水(广东怡宝公司生产纯净水),其他试剂均为分析纯。RPMI-1640 培养基(Gibco);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma);DMSO(Sigma);胰酶(Amresco);胎牛血清(BI);青-链霉素(Hyclone)。

## 2 实验方法

### 2.1 发酵培养

#### 2.1.1 菌株活化

将于 4 ℃沙土管中保存的菌种 H41-59 接种到高氏一号固体培养基斜面上,在 30 ℃培养箱中培养

8 d。

### 2.1.2 种子液摇瓶培养

将活化后的菌株孢子转接到装有 200 mL 液体培养基的 1 L 三角瓶中,于 28 °C、165 rpm 摆床培养 2 d。

### 2.1.3 发酵罐放大培养

将约 1 L 的种子培养液转接入 Biostatic 30 L 的生物发酵罐进行放大培养,培养基为发酵培养基,30 L 罐装液量 20 L,发酵温度:28 °C,搅拌速度:300 rpm,通气量:15 L/min,培养 5 d。整个发酵过程中 pH 值先降低后缓慢增高。

## 2.2 提取与分离

收集菌株 H41-59 的发酵产物约 80 L,5000 rpm 离心 15 min,去掉上清液,收集菌丝体部分并用 95% 乙醇渗透提取。提取物浓缩至无乙醇后上大孔树脂 HP-2MGL 柱动态吸附,接着用水、50% 乙醇和 95% 乙醇洗脱,收集 95% 乙醇洗脱液浓缩至浸膏,用水制成悬浮液后用乙酸乙酯萃取 6 次,收集乙酸乙酯层并将其减压旋转蒸干,共得浸膏 50.3 g。

乙酸乙酯层浸膏经硅胶柱色谱层析,石油醚/乙酸乙酯(100:0-0:100)梯度洗脱,最后用甲醇冲洗柱,馏分经 TLC 薄层检测后进行合并,获得 Fr. 1 ~ 20 共 20 个组合馏分。Fr. 6 经半制备液相(MeOH/H<sub>2</sub>O 85:15)得到化合物 **6**(1.5 mg);Fr. 7 经半制备液相(MeOH/H<sub>2</sub>O 85:15)得到化合物 **9**(10 mg),Fr. 8 通过半制备液相 MeOH/H<sub>2</sub>O(50:50 ~ 100:0)得到化合物 **2**(3.1 mg) 和 **5**(3 mg);Fr. 12 经过硅胶柱色谱分离,CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(20:1 ~ 5:1)洗脱,经 TLC 合并得到 5 个子馏分 Fr. 12-1 ~ Fr. 12-5。Fr. 12-5 经半制备液相(MeOH/H<sub>2</sub>O 90:10)得到化合物 **4**(9.4 mg)、**7**(1.4 mg) 和 **8**(2.1 mg)。Fr. 12-4 经半制备液相(MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30)纯化得化合物 **3**(10.5 mg)。化合物 **1**(20.6 mg) 和化合物 **10**(30.1 mg) 则分别是从 Fr. 12 和 Fr. 4 中经结晶和重结晶纯化后得到。

## 2.3 化合物活性筛选

### 2.3.1 细胞培养

NCI-H460、MCF-7 和 SF-268 均培养于含有 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基中,放置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中。待细胞生长融合度至 80%,弃去培养液,用 PBS 洗涤两次,加入适量胰酶消化,室温静置 1 ~ 5 min,至细胞在显微镜下呈现成圆形,用移液枪吹打细胞,反复吹打使细

胞充分分离成为单细胞悬液。取适量的单细胞悬液用于传代培养,保证每次传代培养与实验用细胞皆处于生长对数期。

### 2.3.2 细胞毒活性检测

采用 MTT 法测定各化合物的细胞毒活性。将处于对数生长期的肿瘤细胞接种于 96 孔板,细胞密度为 8 × 10<sup>4</sup>/mL,过夜培养,细胞融合度至 70% ~ 80% 开始加药。各化合物和阳性药(顺铂)均溶于 DMSO 中,配制成浓度 10 mg/mL 的母液。设立空白组、样品组和顺铂组,给药的最大浓度为 100 μg/mL,随后采用倍半稀释的方法浓度依次降低浓度(50、25、12.5、6.3、3.1、1.6 μg/mL)。加药后孵育 48 h,然后加入 30 μL MTT 溶液(5 mg/mL)再孵育 4 h。孵育后,吸弃上清液,加入 100 μL DMSO 震荡混匀。使用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值,然后用数据处理软件 Origin 8 (OriginLab, Northampton, MA USA) 计算出各个化合物的 IC<sub>50</sub> 值。

## 3 实验结果

### 3.1 结构鉴定

**化合物 1** 无色针状结晶; mp. 231 ~ 233 °C; [α]<sub>D</sub><sup>23</sup>-1.3 (c 0.25, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS *m/z* 883 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是 δ: 5.23(1H, dd, *J* = 15.3, 7.0 Hz, H-23), 5.15(1H, dd, *J* = 15.3, 7.9 Hz, H-22), 5.08(1H, m, H-7), 3.76(1H, m, H-3), 3.60(1H, m, H-6), 0.54(3H, s, H-18), 0.87(3H, s, H-19), 0.99(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.90(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-28), 0.80(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-26), 0.81(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 31.2(C-1), 32.5(C-2), 66.0(C-3), 40.0(C-4), 74.5(C-5), 72.1(C-6), 119.5(C-7), 139.7(C-8), 42.3(C-9), 36.7(C-10), 21.3(C-11), 38.9(C-12), 43.0(C-13), 54.2(C-14), 22.6(C-15), 27.8(C-16), 55.3(C-17), 12.1(C-18), 17.7(C-19), 40.0(C-20), 21.0(C-21), 135.4(C-22), 131.4(C-23), 42.0(C-24), 32.5(C-25), 19.5(C-26), 19.8(C-27), 17.3(C-28)。其 <sup>1</sup>H NMR 在高场区出现 2 个角甲基信号(δ 0.54, 0.87)和 4 个双峰甲基信号(δ 0.99, 0.90, 0.80, 0.81),在低场区出现 2 个对称的 dd 峰信号(δ 5.23, 5.15),结合 <sup>13</sup>C NMR 及 ESI-MS 数据,可推测出该化合物为麦角甾类化合物。进一步与文献<sup>[4]</sup>对照,数据基本一致,因此,确

定该化合物为麦角甾-7,22-二烯- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -三醇(ergosta-7,22-diene- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol)。

**化合物 2** 无色针状结晶; mp. 236 ~ 238 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -0.8 (*c* 0.25, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS *m/z* 883 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.22(1H, dd, *J* = 15.3, 7.0 Hz, H-23), 5.19(1H, dd, *J* = 15.3, 7.9 Hz, H-22), 4.84(1H, m, H-7), 3.69(1H, m, H-3), 3.71(1H, m, H-6), 0.51(3H, s, H-18), 0.84(3H, s, H-19), 0.99(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.88(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-28), 0.79(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-26), 0.81(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 31.4(C-1), 30.9(C-2), 65.6(C-3), 39.2(C-4), 74.5(C-5), 69.1(C-6), 120.6(C-7), 139.7(C-8), 42.6(C-9), 38.1(C-10), 20.6(C-11), 38.9(C-12), 43.1(C-13), 54.2(C-14), 22.4(C-15), 27.9(C-16), 55.2(C-17), 12.0(C-18), 17.4(C-19), 39.8(C-20), 21.0(C-21), 135.4(C-22), 131.4(C-23), 41.9(C-24), 32.5(C-25), 19.5(C-26), 19.8(C-27), 17.3(C-28)。其<sup>1</sup>H NMR 数据和化合物**1**相似,<sup>13</sup>C NMR 中除了 C-4、C-6 和 C-10 和化合物**1**差别较大,其余数据基本一致。以上数据与文献<sup>[5]</sup>对照,鉴定化合物**2**为麦角甾-7,22-二烯- $3\beta,5\alpha,6\alpha$ -三醇(ergosta-7,22-diene- $3\beta,5\alpha,6\alpha$ -triol)。

**化合物 3** 无色针晶; mp. 236 ~ 238 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -30.3 (*c* 0.25, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS *m/z* 915 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.21(1H, dd, *J* = 15.3, 5.7 Hz, H-23), 5.18(1H, dd, *J* = 15.3, 5.7 Hz, H-22), 5.12(1H, br. d, *J* = 3.6 Hz, H-7), 3.77(1H, m, H-3), 3.50(1H, m, H-6), 0.55(3H, s, H-18), 0.95(3H, s, H-19), 0.98(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.89(3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.79(3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.81(3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 26.9(C-1), 31.0(C-2), 65.8(C-3), 40.2(C-4), 73.7(C-5), 71.6(C-6), 120.3(C-7), 141.1(C-8), 77.3(C-9), 40.0(C-10), 26.9(C-11), 35.0(C-12), 43.3(C-13), 50.1(C-14), 22.6(C-15), 27.8(C-16), 55.4(C-17), 11.7(C-18), 21.4(C-19), 39.8(C-20), 21.0(C-21), 135.5(C-22), 131.4(C-23), 42.1(C-24), 32.5(C-25), 19.5(C-26), 19.8(C-27), 17.4(C-28)。<sup>13</sup>C NMR 数据与文献<sup>[6]</sup>一致,结合<sup>1</sup>H NMR 和 ESI-MS 数据,可确定

化合物**3**为麦角甾-7,22-二烯- $3\beta,5\alpha,6\beta,9\alpha$ -四醇(ergosta-7,22-diene- $3\beta,5\alpha,6\beta,9\alpha$ -tetraol)。

**化合物 4** 无色针晶; mp. 223 ~ 225 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -24.0 (*c* 0.25, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS *m/z* 915 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.35(1H, dd, *J* = 15.6, 7.7 Hz, H-23), 5.17(1H, dd, *J* = 15.6, 8.4 Hz, H-22), 5.08(1H, m, H-7), 3.76(1H, m, H-3), 3.36(1H, m, H-6), 0.54(3H, s, H-18), 0.91(3H, s, H-19), 0.98(3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 0.89(3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-28), 0.97(3H, s, H-26), 1.02(3H, s, H-27); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 31.2(C-1), 32.5(C-2), 66.0(C-3), 40.2(C-4), 74.5(C-5), 72.1(C-6), 119.5(C-7), 139.7(C-8), 42.3(C-9), 36.7(C-10), 27.7(C-11), 39.0(C-12), 43.0(C-13), 54.2(C-14), 22.6(C-15), 27.7(C-16), 55.3(C-17), 12.1(C-18), 17.7(C-19), 40.1(C-20), 20.9(C-21), 135.7(C-22), 130.5(C-23), 47.2(C-24), 70.7(C-25), 26.0(C-26), 28.3(C-27), 15.0(C-28)。除了 C-24、C-25、C-26、C-27 和 C-28,其余<sup>13</sup>C NMR 数据与化合物**1**一致,结合<sup>1</sup>H NMR 和 ESI-MS 数据,经过文献<sup>[7]</sup>对照,可确定该化合物为麦角甾-7,22-二烯- $3\beta,5\alpha,6\beta,25$ -四醇(ergosta-7,22-diene- $3\beta,5\alpha,6\beta,25$ -tetraol)。

**化合物 5** 无色针状结晶; mp. 171 ~ 173 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -9.3 (*c* 0.25, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS *m/z* 879 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.15(1H, dd, *J* = 15.1, 7.6 Hz, H-23), 5.16(1H, dd, *J* = 15.1, 6.9 Hz, H-22), 4.20(1H, br. s, H-7), 3.93(1H, m, H-3), 3.30(1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-6), 0.56(3H, s, H-18), 1.12(3H, s, H-19), 1.00(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.89(3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-28), 0.80(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-26), 0.81(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 30.4(C-1), 31.0(C-2), 68.8(C-3), 39.3(C-4), 65.9(C-5), 62.8(C-6), 67.3(C-7), 127.1(C-8), 134.7(C-9), 38.2(C-10), 23.6(C-11), 35.9(C-12), 42.3(C-13), 49.8(C-14), 24.1(C-15), 29.2(C-16), 53.8(C-17), 11.5(C-18), 23.0(C-19), 40.6(C-20), 21.2(C-21), 135.8(C-22), 132.2(C-23), 43.0(C-24), 33.3(C-25), 19.9(C-26), 20.2(C-27), 17.9(C-28)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>对照一致,可确定该化合物**5**为 5 $\alpha,6\alpha$ -环氧麦角甾-8

(9), 22-二烯-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -二醇 ( $5\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxy-ergosta-8(9), 22-diene-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -diol)。

**化合物 6** 无色针晶; mp. 181 ~ 182 °C,  $[\alpha]_D^{23}$  -115 ( $c$  0.41, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$  879 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.19(1H, dd,  $J$  = 15.2, 7.2 Hz, H-23), 5.17(1H, dd,  $J$  = 15.2, 7.6 Hz, H-22), 4.40(1H, d,  $J$  = 3.5 Hz, H-7), 3.89(1H, m, H-3), 3.12(1H, d,  $J$  = 3.5 Hz, H-6), 0.84(3H, s, H-18), 0.84(3H, s, H-19), 0.99(3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-21), 0.89(3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-28), 0.79(3H, d,  $J$  = 5.1 Hz, H-26), 0.82(3H, d,  $J$  = 5.1 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 31.1(C-1), 32.2(C-2), 68.7(C-3), 39.6(C-4), 67.8(C-5), 61.3(C-6), 65.1(C-7), 125.2(C-8), 38.7(C-9), 35.8(C-10), 19.0(C-11), 36.6(C-12), 42.9(C-13), 152.5(C-14), 24.9(C-15), 27.2(C-16), 56.8(C-17), 17.6(C-18), 16.5(C-19), 39.3(C-20), 21.2(C-21), 135.3(C-22), 132.2(C-23), 42.8(C-24), 33.1(C-25), 19.7(C-26), 20.0(C-27), 18.1(C-28). 以上数据与文献<sup>[9]</sup>对照一致, 因此, 鉴定该化合物为  $5\alpha$ , 6 $\alpha$ -环氧麦角甾-8(14), 22-二烯-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -二醇 ( $5\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxy-ergosta-8(14), 22-diene-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -diol)。

**化合物 7** 无色针状结晶; mp. 202 ~ 205 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -61.1( $c$  0.25, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$  915 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.23(1H, dd,  $J$  = 15.4, 7.2 Hz, H-23), 5.21(1H, dd,  $J$  = 15.4, 7.9 Hz, H-22), 3.67(1H, d,  $J$  = 5.7 Hz, H-7), 3.82(1H, m, H-3), 3.44(1H, d,  $J$  = 5.7 Hz, H-6), 0.61(3H, s, H-18), 1.16(3H, s, H-19), 1.01(3H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-21), 0.90(3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-28), 0.80(3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-26), 0.81(3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR(125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 30.7(C-1), 31.0(C-2), 65.1(C-3), 40.5(C-4), 74.5(C-5), 77.9(C-6), 71.6(C-7), 127.2(C-8), 136.2(C-9), 40.2(C-10), 23.0(C-11), 35.9(C-12), 41.3(C-13), 49.4(C-14), 28.6(C-15), 22.7(C-16), 53.9(C-17), 11.2(C-18), 22.9(C-19), 40.0(C-20), 20.9(C-21), 135.5(C-22), 131.3(C-23), 42.1(C-24), 32.5(C-25), 19.5(C-26), 19.8(C-27), 17.4(C-28). 以上数据与文献<sup>[10]</sup>对照基本一致, 该化合物被鉴定为麦角甾-8(9), 22-二烯-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ -四醇 (ergosta-8(14), 22-diene-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ -tetraol)。

(9), 22-diene-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ -tetraol)。

**化合物 8** 无色针状结晶; mp. 171 ~ 173 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -65.0( $c$  0.25, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$  915 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.23(1H, dd,  $J$  = 15.3, 7.0 Hz, H-23), 5.22(1H, dd,  $J$  = 15.3, 7.9 Hz, H-22), 4.46(1H, s, H-7), 3.77(1H, m, H-3), 3.32(1H, m, H-6), 0.84(3H, s, H-18), 0.85(3H, s, H-19), 1.01(3H, d,  $J$  = 6.7 Hz, H-21), 0.89(3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-28), 0.80(3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-26), 0.81(3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR(125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 31.8(C-1), 31.0(C-2), 65.1(C-3), 40.9(C-4), 76.3(C-5), 76.0(C-6), 71.7(C-7), 127.0(C-8), 36.4(C-9), 39.8(C-10), 18.8(C-11), 36.6(C-12), 42.4(C-13), 147.6(C-14), 24.7(C-15), 27.2(C-16), 56.0(C-17), 18.0(C-18), 17.5(C-19), 38.5(C-20), 21.2(C-21), 135.3(C-22), 131.5(C-23), 42.1(C-24), 32.5(C-25), 19.5(C-26), 19.8(C-27), 17.4(C-28)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>对照基本一致, 故化合物 8 被鉴定为麦角甾-8(14), 22-二烯-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ -四醇 (ergosta-8(14), 22-diene-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ -tetraol)。

**化合物 9** 无色针状结晶; mp. 113 ~ 115 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -12.3( $c$  0.25, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$  879 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.20(H, dd,  $J$  = 15.3, 7.0 Hz, H-23), 5.15(1H, dd,  $J$  = 15.3, 7.0 Hz, H-22), 4.51(1H, br. s, H-7), 3.87(1H, m, H-3), 2.97(1H, d,  $J$  = 2.5 Hz, H-6), 0.87(3H, s, H-18), 0.99(3H, s, H-19), 0.99(3H, d,  $J$  = 6.7 Hz, H-21), 0.90(3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-28), 0.79(3H, d,  $J$  = 5.2 Hz, H-26), 0.81(3H, d,  $J$  = 5.2 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 31.4(C-1), 33.2(C-2), 68.9(C-3), 39.6(C-4), 65.1(C-5), 60.5(C-6), 63.9(C-7), 126.9(C-8), 39.8(C-9), 35.1(C-10), 19.5(C-11), 37.3(C-12), 43.8(C-13), 151.9(C-14), 26.1(C-15), 28.2(C-16), 55.6(C-17), 17.9(C-18), 17.1(C-19), 40.6(C-20), 21.3(C-21), 135.4(C-22), 132.5(C-23), 43.1(C-24), 33.3(C-25), 19.9(C-26), 20.2(C-27), 19.5(C-28)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道一致, 确定化合物 9 为  $5\alpha$ , 6 $\alpha$ -环氧麦角甾-8(14), 22-二烯-3 $\beta$ , 7 $\beta$ -二醇 ( $5\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxy-ergosta-8(14), 22-diene-3 $\beta$ , 7 $\beta$ -diol)。

**化合物 10** 无色针状结晶; mp. 169 ~ 171 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -27.1 (*c* 0.25,  $\text{CHCl}_3$ ); ESI-MS *m/z* 831 [2M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 谱中重要的鉴定特征性信号是  $\delta$ : 5.23 (1H, dd, *J* = 15.9, 6.6 Hz, H-23), 5.17 (1H, dd, *J* = 15.9, 6.6 Hz, H-22), 5.38 (1H, m, H-7), 5.57 (1H, dd, *J* = 6.6, 2.5 Hz, H-6), 3.61 (1H, m, H-3), 0.60 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.89 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.80 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-26), 0.82 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 38.6 (C-1), 32.0 (C-2), 70.7 (C-3), 41.0 (C-4), 140.0 (C-5), 116.5 (C-6), 119.8 (C-7), 141.6 (C-8), 46.3 (C-9), 37.2 (C-10), 21.3 (C-11), 39.3 (C-12), 43.0 (C-13), 54.6 (C-14), 23.2 (C-15), 28.5 (C-16), 55.8 (C-17), 12.3 (C-18), 16.5 (C-19), 42.9 (C-20), 21.3 (C-21), 135.8 (C-22), 132.2 (C-23), 40.4 (C-24), 33.3 (C-25), 19.9 (C-26), 20.2 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道一致,确定该化合物为麦角甾-5,7,22-三烯-3 $\beta$ -醇(ergosta-5,7,22-triene-3 $\beta$ -ol)。

### 3.2 生物活性

体外抗肿瘤细胞活性筛选结果显示,分离得到的十个甾醇化合物都具有一定的体外抗肿瘤活性。其中,化合物 5、7 和 8 对这三种肿瘤细胞株具有较好的抑制活性。化合物 5 对人肺癌细胞 NCI-H460、人乳腺癌细胞 MCF-7 和人神经胶质瘤细胞 SF-268 的  $IC_{50}$  值依次为 19.8、24.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 15.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 化合物 7 对以上 3 种肿瘤细胞的  $IC_{50}$  值依次为 23.7、17.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 27.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 化合物 8 对以上 3 种肿瘤细胞的  $IC_{50}$  值依次为 23.7、27.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 25.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 阳性药顺铂对以上 3 种肿瘤细胞的  $IC_{50}$  值依次为 25.1、4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 41.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 其他化合物的  $IC_{50}$  值均大于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 4 讨论与结论

目前,文献报道的麦角甾醇化合物的药理活性主要有免疫增强作用、肿瘤细胞毒活性和血管新生抑制作用等。高红等<sup>[14]</sup>的研究探讨了巴西菇麦角甾醇的抑瘤机理,在鸡胚绒毛尿囊膜实验中,麦角甾醇与相同剂量(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的阳性药地塞米松相比,显示出更强的血管新生抑制活性。环氧合酶 II (COX-2) 是一种在多种恶性肿瘤中高表达的酶,其代谢产物 PGE2 能够刺激细胞增殖和抑制凋亡,激

活 cAMP 途径诱导肿瘤血管生成,并通过抑制机体免疫系统和改变肿瘤周围微环境而利于肿瘤的浸润转移<sup>[15]</sup>。Zhang YJ 和 Mills GL 等<sup>[16,17]</sup>研究证实甾醇类化合物对环氧合酶 II (COX-2) 具有抑制作用,进而发挥抗肿瘤活性。本研究从海洋链霉菌 H41-59 中分离得到 10 个麦角甾醇类化合物,经细胞毒活性筛选实验证明,几乎所有化合物都具有一定的细胞毒活性,其中化合物 5、7 和 8 细胞毒活性更为突出,实验结果为海洋链霉菌来源的麦角甾醇类化合物的药物开发利用提供了一定的化学基础。

### 参考文献

- Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J Biotechnol*, 2012, 158: 168-175.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2015, 32: 116-211.
- Cui JG (崔建国), Wang Y (王屹), Lin CW (林翠梧), et al. Polyhydroxylated sterols with biological activities in marine organism. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12: 94-100.
- Piccialli V, Sica D. Four new trihydroxylated sterols from the sponge *Spongionella gracilis*. *J Nat Prod*, 1987, 50: 915-920.
- Wang Y, Wang SJ, Mo SY, et al. An abietane diterpene and a sterol from fungus *Phellinus igniarius*. *Chin Chem Lett*, 2006, 17: 481-484.
- Kawagishi H, Katsumi R, Sazaw T, et al. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*, 1988, 27: 2777-2779.
- Qi SH, Zhang S, Wang YF, et al. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of three new polyhydroxylated sterols from the South China Sea gorgonian *Subergorgia suberosa*. *Magn Res Chem*, 2007, 45: 1088-1091.
- Kobayashi M, Kanda F. Marine sterols. Part 18. Isolation and structure of four novel oxygenated sterols from a Gorgonian coral *Melithaea ochracea*. *Chem Inform*, 1991, 22: 1177-1179.
- Xiong HY, Fei DQ, Zhou JS, et al. Steroids and other constituents from the mushroom *Armillaria lueo-virens*. *Chem Nat Comp*, 2009, 45: 759-762.
- Li HJ, Lin YC, Vrijmoed LLP, et al. A new cytotoxic sterol produced by an endophytic fungus from *castaniopsis fissa* at the South China Sea coast. *Chin Chem lett*, 2004, 15: 419-422.
- Sun Y, Tian L, Huang J, et al. Cytotoxic sterols from marine-derived fungus *Pennicillium sp.* *Nat Prod Res*, 2006, 20: 381-384.

(下转第 760 页)