

链霉菌 BAF-0711 产生的抗肿瘤活性成分的分离纯化和结构鉴定

张欣¹, 杨煌建², 周剑², 陈宏³, 方东升², 黄楷², 郑卫^{1,2*}¹福建医科大学药学院, 福州 350004; ²福建省微生物研究所, 福州 350007;³福建省中医药研究院药物研究所, 福州 350003

摘要: 探讨分离、纯化和鉴定链霉菌 BAF-0711 发酵液中的抗肿瘤活性成分的方法。采用大孔吸附柱层析、硅胶柱层析等方法对该菌株的次级代谢产物进行分离纯化; 根据理化性质和波谱学方法进行化学结构的鉴定; 利用 MTT 法来检测化合物的抗肿瘤活性。从该菌株发酵液中分离到化合物 BAF-0711-A。经波谱方法鉴定与文献中报道的 bafilomycin A1 同质。以拉帕替尼为对照, BAF-0711-A 对乳腺癌细胞 MB-45-3d 有较强的增殖抑制活性, 其 IC₅₀ 值为 0.217 μmol/L。

关键词: bafilomycin A1; 大环内脂; 分离纯化; 结构鉴定; 抗肿瘤活性

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.5.010

Isolation, Purification and Structural Identification of Component with Antitumor Activity Produced by *Streptomyces* strain BAF-0711

ZHANG Xin¹, YANG Huang-jian², ZHOU Jian², CHEN Hong³,FANG Dong-sheng², HUANG Kai², ZHENG Wei^{1,2*}

¹School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; ²Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007, China; ³Institute of Materia Medica, Fujian Academy of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

Abstract: The purpose of the present study was to isolate, purify and identify components with antitumor activity produced by *Streptomyces* sp. BAF-0711. The secondary metabolite was isolated and purified by macroporous resin column chromatography, silica gel chromatography, etc.; the chemical structure was identified by physicochemical properties and spectroscopic methods; The antitumor activity was detected by MTT assay. As a result, compound BAF-0711-A was isolated from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. BAF-0711 and was identified as bafilomycin A1 by spectroscopic methods. MTT assay showed that BAF-0711-A had strong growth inhibitory activity compared with lapatinib on MDA-MB-453 cell, with IC₅₀ value of 0.217 μmol/mL.

Key words: bafilomycin A1; macrolide antibiotic; isolation and purification; structural identification; antitumor activity

通过筛选自噬抑制剂寻找抗肿瘤药物是目前抗肿瘤研究的热点^[1,2]。冯晓兰等的研究发现, 自噬抑制剂可用作辅助药物增强肿瘤细胞的凋亡^[3]。Gerber HP 等的报道^[4]指出, 自噬抑制剂 bafilomycin A1 可作为抗体药物偶联药 (antibody-drug conjugate, ADC) 用于治疗肿瘤。最新研究^[5]表明, bafilomycin A1 在低浓度下 (1 nM) 通过抑制细胞自噬和促进细胞凋亡两种途径抑制并且杀死急性 B 淋巴细胞白血病细胞。报道提示, bafilomycin A1 有可能成为具有自噬抑制作用的抗肿瘤药物。

本实验对 BAF-0711 发酵液中的有效成分分离

纯化得到化合物 BAF-0711-A, 经波谱方法鉴定, BAF-0711-A 与大环内脂类抗生素 bafilomycin A1 同质, 对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 具有较强的增殖抑制作用。

1 材料与仪器

1.1 实验仪器

NRBP-212K 型双层摇床; Beckman J-20xp 离心机; 旋转蒸发器 (日本 EYELA 公司); 高效液相色谱仪 (Agilent 1260 LC-DAD, 美国安捷伦公司); 梯度半制备系统 (P3000A, 北京创新通恒); Bruker AV-400 超导核磁共振波谱仪 (内标物 TMS, δ 为 ppm, J 为 Hz); Bruker Avance III-400MHz 超导核磁共振仪 (内标物 TMS, δ 为 ppm, J 为 Hz); 质谱仪 (Agilent

1100 Series LC/MSD Trap); 红外光谱仪 (FI-IR Spectrometer) (美国 Thermo Fisher 科技公司); Shimadzu UV2401PC 紫外可见分光光度仪。

1.2 实验材料

高效硅胶薄层板 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); 200~300 目层析用硅胶 (青岛海洋化工厂); 合作 818 大孔吸附树脂; Synchronis C₁₈ 分析型色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 填料粒径 5 μm); Synchronis C₁₈ 制备型色谱柱 (10 mm × 250 mm, 填料粒径 5 μm); 试剂均为分析纯或色谱纯。

1.3 实验菌株、细胞和药品

菌株 BAF-0711 分离自福建武夷山土壤, 由本课题组保存; 细胞 MDA-MB-453 购自上海生命科学研究院; 拉帕替尼购买于美国 Thermo Fisher 公司。

1.4 培养基

种子培养基 (g/mL): 麦芽浸粉 2.0%; 蛋白胨 2.0%; CaCO₃ 1.0% (培养基灭菌前 pH 为 7.2)。

发酵培养基 (g/mL): 马铃薯糊精 2.5%; 麦芽浸粉 1.0%; 蛋白胨 2.5%; 牛肉膏 0.8%; CaCO₃ 0.1% (培养基灭菌前 pH 为 7.2)。

2 实验方法

2.1 培养条件

菌株斜面培养成熟后, 接种于种子培养基, 置于 28 °C、220 rpm 摇床, 培养 48 h; 种子再转接入发酵培养基, 接种量为 5%, 后置于 28 °C、220 rpm 摇床, 培养 96 h。

2.2 发酵产物的提取纯化

发酵液 (20 L) 离心 (8000 rpm) 15 min, 弃渣, 清液上样于 818 大孔吸附树脂柱, 吸附后分别用 5 BV 的水、50% 乙醇/水溶液和 90% 乙醇/水洗脱, 收集 90% 乙醇/水洗脱液, 蒸干得粗提物 2.38 g。

粗提物 1 g 上样于 20 g 正相硅胶柱层析 (硅胶 G 200~300 目), 用石油醚: 乙酸乙酯 = 10: 1、5: 1、2: 1 的流动相梯度洗脱, 分段收集洗脱液。HPLC 分析检测目标组分 (检测条件: 甲醇: 水 = 85: 15, 洗脱 30 min, 流速 1 mL/min, 检测波长 248 nm, 柱温 30 °C)。合并相同组分, 用梯度半制备系统制备 (70% 乙腈/水洗脱, 流速 5 mL/min, 检测波长 284 nm), 获得单组分, 氮气吹干溶剂, 减压真空干燥得 BAF-0711-A 纯品 13.5 mg。

2.3 结构鉴定

对化合物 BAF-0711-A 用紫外分光光度仪分析

得到紫外吸收波长; 测定其红外光谱得到其主要官能团的特征吸收峰; 对其进行质谱分析, 得到分子量; 以 CDCl₃ 为溶剂, 对其进行核磁图谱 (¹H NMR、¹³C NMR) 分析, 鉴定化合物结构。

2.4 抗肿瘤活性测定

MDA-MB-453 细胞培养在含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 IU/mL) 和链霉素 (100 μg/mL) 的 L-15 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。取对数生长期的细胞制成单细胞悬液以 15000 个细胞/孔种入 96 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h 后, 加入用培养基稀释至终浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μmol/L 的 BAF-0711-A, 另设不加药培养基作为空白对照, 相同浓度梯度的拉帕替尼作为阳性对照。每个浓度设 3 个平行组, 37 °C 培养 48 h 后, 加入 MTT 液 (5 mg/mL) 20 μL, 继续孵育 4 h。4 h 后用真空泵吸弃上清液, 每孔加入 150 μL 二甲亚砜, 用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔的吸光值, 计算细胞增殖抑制率 (细胞生长抑制率 = (空白组吸光值 - 实验组吸光值) / 空白组吸光值 × 100%)。做剂量反应曲线, 计算药物的半数抑制浓度 IC₅₀。

3 实验结果

3.1 BAF-0711-A 的结构鉴定

BAF-0711-A: 白色至淡黄色不定形粉末; UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 248 (2.50), 280 (1.21) nm; IR (KBr) ν_{max} = 3427, 2958, 2930, 2872, 1680, 1100 cm⁻¹; ESI-MS *m/z*: 645.7 [M + Na]⁺; 623.8 [M + H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6.70 (1H, s, H-3), 5.82 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, H-5), 2.55 (1H, m, *J* = 9.1, 7.2, 1.2 Hz, H-6), 3.30 (1H, s, H-7), 1.91 (1H, d, *J* = 11.9, H-8), 2.14-1.94 (2H, m, H-9), 5.82 (1H, d, *J* = 10.5, 1.2 Hz, H-11), 6.53 (1H, q, *J* = 15.0, 9.8 Hz, H-12), 5.51 (1H, dd, *J* = 15.9, 9.5 Hz, H-13), 3.90 (1H, t, *J* = 9.9, 8.7 Hz, H-14), 4.97 (1H, q, *J* = 8.9, 1.2 Hz, H-15), 2.14 (1H, s, H-16), 4.15 (1H, d, *J* = 11.9 Hz, H-17), 1.78 (1H, m, *J* = 7.2 Hz, H-18), 2.31-1.76 (2H, m, H-20), 3.71 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, H-21), 1.35 (1H, m, *J* = 10.2, 9.9, 6.2 Hz, H-22), 3.51 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-23), 1.87 (1H, d, *J* = 6.7 Hz, H-24), 0.90 (1H, d, *J* = 6.7 Hz, H-25), 1.98 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-26), 1.09 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-27), 0.93 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-28), 1.93 (1H, d, H-29), 0.83 (1H, d, *J* = 6.7

Hz, H-30), 1.04 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-31), 0.96 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-32), 0.78 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-33), 3.65 (1H, d, C₂-OCH₃), 3.25 (1H, d, C₁₄-OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 167.3 (s, C-1), 141.2 (s, C-2), 141.2 (d, C-3), 143.1 (s, C-4), 125.1 (s, C-5), 36.8 (d, C-6), 81.3 (d, C-7), 39.9 (d, C-8), 41.2 (t, C-9), 132.8 (s, C-10), 142.8 (d, C-11), 133.0 (d, C-12), 127.0 (d, C-13), 82.4 (d, C-14), 76.8 (d, C-15), 37.1 (d, C-16), 70.6 (d, C-17), 42.0 (d, C-18), 98.8 (s, C-19), 43.5 (q, C-20), 70.8 (s, C-21), 41.0 (d, C-22), 75.9 (d, C-23), 27.9 (d, C-24), 12.2 (q, C-25), 14.0 (q, C-26), 17.3 (q, C-27), 14.4 (q, C-28), 20.1 (q, C-29), 9.8 (q, C-30), 7.1 (q, C-31), 21.7 (q, C-32), 21.2 (q, C-33), 59.8 (q, C₂-OCH₃), 55.6 (q, C₁₄-OCH₃)。以上波谱数据与文献^[6]一致,确定 BAF-0711-A 与 bafilomycin A1 同质,分子量 622.83,化学式 C₃₅H₅₈O₉,其化学结构如图 1 所示。

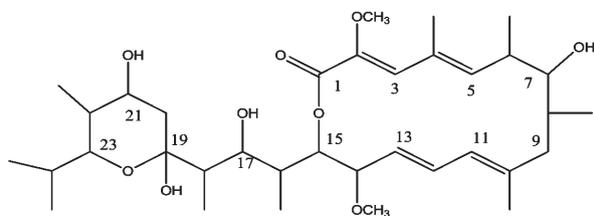


图 1 BAF-0711-A 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of compound BAF-0711-A

3.2 BAF-0711-A 的抗肿瘤活性检测

BAF-0711-A 和拉帕替尼不同浓度的对数值对细胞 MDA-MB-453 增殖抑制率作图,得到剂量反应曲线,根据线性回归方程求出 BAF-0711-A 和拉帕替尼作用于细胞 MDA-MB-453 48h 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.217 和 0.434 $\mu\text{mol/L}$ 。其剂量反应曲线如图 2 所示。

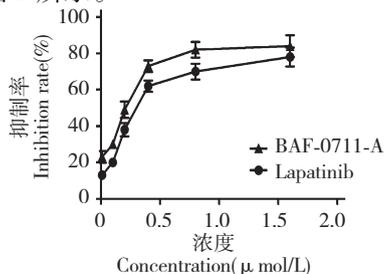


图 2 BAF-0711-A 和拉帕替尼的剂量反应曲线

Fig. 2 Dose-response curve of BAF-0711-A and lapatinib

4 讨论与结论

1983 年 Gerhard W 等通过一株灰色链霉菌发酵最先分离得到 bafilomycin A1^[6]。近年来,国内仅有魏刚等报道^[7]从海洋放线菌 Y12-26 中分离得到 bafilomycin A1,且效价极低。国外关于 bafilomycin A1 产生菌的报道^[8,9]也很少。寻找更多更高产的 bafilomycin A1 产生菌对于进一步研究具有重要意义。

自噬过程影响肿瘤细胞的产生、生长和分化^[10]。通过抑制自噬过程控制肿瘤细胞的增殖已成为抗肿瘤药物研究的新思路^[11]。Bafilomycin A1 作为自噬抑制剂的作用早在上世纪 80 年代已被阐明,而 bafilomycin A1 作为潜在抗肿瘤药物的研究才刚起步^[12-14]。找到特定的抗肿瘤靶点将是后续研究的重点。

本研究首次从链霉菌 BAF-0711 产生的次级代谢产物中同时分离到 Bafilomycin A1,并对其抗肿瘤活性开展了实验,实验结果显示化合物 BAF-0711-A 对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 具有较强的增殖抑制活性,其 IC₅₀ 值为 0.217 $\mu\text{mol/L}$,呈明显的剂量效应关系。但其稳定性差,后续将继续探寻影响其稳定性的因素。另外还需要对该菌株的发酵条件进行深入研究、优化发酵工艺,以提高目标物含量,为其进一步的研究奠定基础。

致谢:本研究细胞活性部分数据由福建医科大学陈丽红提供,在此表示感谢。

参考文献

- 1 Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett*, 2010, 584: 1427-1435.
- 2 Levine B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature*, 2007, 446: 745-747.
- 3 Feng XL (冯晓兰), Wang P (王攀), Wang YB (王筱冰). Sonodynamic therapy enhanced tumor cell apoptosis by inhibiting autophagy. *Chin J Biomed Eng* (中国生物医学工程学报), 2015, 34: 62-69.
- 4 Gerber HP, Koehn FE, Abraham RT. The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product-based cancer therapeutics. *Nat Prod Rep*, 2013, 30: 625-639.
- 5 Yuan N (袁娜), Song L (宋林), Zhang SP (张素萍), et al. Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2015, 100: 345-356.