

文章编号:1001-6880(2016)12-1864-07

采用 OSMAC 法对 *Streptomyces roseofulvus* M63 次级代谢产物及其抗肿瘤成分的研究

关永强¹, 罗影², 石磊岭¹, 古丽娜·沙比尔¹, 陈刚¹, 郭雄飞¹, 罗都强^{3*}¹新疆维吾尔自治区中药民族药研究所; ²新疆农业科学院植物保护研究所, 乌鲁木齐 830002;³河北大学生命科学学院, 保定 071002

摘要:本文采用 OSMAC 方法通过 4 种发酵方式从玫瑰黄链霉菌 *Streptomyces roseofulvus* M63 中获得其次级代谢产物, 并研究它们的抗肿瘤活性。首先应用正相硅胶柱色谱、薄层色谱、羟丙基葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20、反向硅胶、制备色谱等多种方法进行分离纯化, 其次用 NMR 和 MS 等波谱技术解析化合物的结构, 最后采用 MTT 法筛选具有抗肿瘤活性的化合物。从玫瑰黄链霉菌 M63 中共分离鉴定出 14 个化合物, 分别为对甲基苯酚 (**1**)、4-羟基苯乙醇 (**2**)、2,3,4,5-四羟基苯甲基酯 (**3**)、3,4-二羟基苯甲酸 (**4**)、4-羟基苯甲酸 (**5**)、1H-吡咯-2-羧酸 (**6**)、(22E,24R)-麦角甾-7,22-二烯-3β-醇 (**7**)、4-羟基苯甲醛 (**8**)、3β-羟基-5α,8α-过氧化麦角甾-6,22-二烯 (**9**)、4-羟基苯乙酸 (**10**)、5-(2-甲基苯基)-4-戊烯酸 (**11**)、3β-羟基-麦角甾-5,7,22-三烯 (**12**)、(5-羟基-2-氧代-2H-吡喃-4-基)乙酸甲酯 (**13**)、(4S,5S,9aR)-5-(E)-4-羧基, 甲基-8-烯)-10,13-二甲基-6-萘甲酸 (**14**)。上述 14 个化合物均为首次从玫瑰黄链霉菌 M63 中分离得到, 其中化合物 **11**、**13** 对子宫颈癌细胞 (HeLa)、卵巢癌细胞 (SKOV3) 均有不同程度的抑制作用; 化合物 **11** 在 24 h 时的半抑制浓度值 (IC_{50}) 低于阳性对照物顺铂, 为 38.26、14.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$; 化合物 **13** 对 HeLa 细胞、Skov3 细胞在 24、48、72 h 时半抑制浓度值 (IC_{50}) 分别为 25.62、11.34、6.524 $\mu\text{mol}/\text{mL}$; 7.892、10.32、5.671 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

关键词:玫瑰黄链霉菌; OSMAC 方法; 次级代谢产物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.12.002

Isolation of Secondary Metabolites from *Streptomyces roseofulvus* M63 by OSMAC Methods and Their Anti-tumor Activity

GUAN Yong-qiang¹, LUO Ying², SHI Lei-ling¹, GULINAR Sabir¹, CHEN Gang¹, GUO Xiong-fei¹, LUO Du-qiang^{3*}¹Xinjiang Institute of Chinese Material Medical and Ethica; ²Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830001, China; ³College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China

Abstract: In this study, secondary metabolites of *Streptomyces roseofulvus* M63 were obtained under four fermentation ways using OSMAC methods, and their anti-tumor activity was examined. Compounds were firstly isolated and purified by column chromatography on Silica gel, Silica gel thin layer chromatography, Sephadex LH-20, reverse phase silica gel and preparative chromatography. The structures of purified compounds were identified by NMR and MS. Their anti-tumor activity was eventually evaluated using MTT method. The results showed that, fourteen compounds were purified and identified as p-cresol (**1**), 4-hydroxyphenyl ethanol (**2**), 2,3,4,5-tetra hydroxy, methyl ester (**3**), 3,4-dihydroxy benzoic acid (**4**), 4-hydroxy benzoic acid (**5**), 1H-Pyrrole-2-carboxylic acid (**6**), (22E,24R)-Ergosta-7,22-dien-3β-ol (**7**), 4-hydroxy benzaldehyde (**8**), 3β-hydroxy-5α,3β-hydroxy-5α,8α-ergosterol peroxide-6,22-diene (**9**), 4-hydroxy phenylacetic (**10**), 5-(2-Methylphenyl)-4-penten oic acid (**11**), 3β-hydroxy-ergosterol-5,7,22-triene (**12**), (5-hydroxy-2-oxo-2H-pyran-4-yl) acetate (**13**), (4S,5S,9aR)-5-(E)-4-carboxy methyl-8-en)-10,13-dimethyl-6-deca hydrronaphthalene-carboxylic acid (**14**). It was the first time to obtain these compounds from *Streptomyces roseofulvus* M63, cervical cancer (HeLa) cells and ovarian cancer (Skov3) were inhibited by compound **11**, **13** for different degrees. The IC_{50} values of com-

ponent **11** was 38.26 and 14.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ that less than positive control cisplatin only at 24h. The IC_{50} values of compound **13** on HeLa cells and Skov3 cells was 25.62, 11.34, 6.524 and 7.892, 10.32, 5.671, at 24 h, 48 h and 72 h, respectively.

收稿日期:2016-06-30 接受日期:2016-08-31

基金项目:国家自然科学基金(31171885, 31371957); 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年科学基金(2016D01B006)

* 通讯作者 Tel: 86-312-5929898; E-mail: duqiangluo@yeah.net

Key words: *Streptomyces roseofulvus*; OSMAC method; secondary metabolites; anti-tumor activity

真菌病害是作物损失的主要原因之一,目前应对植物病害的普遍方法是应用化学农药进行处理^[1],但是这种方法会造成环境污染及病原菌抗药性的增加,带来了诸多不利影响^[2]。有研究表明,来源于微生物机制的抗生素更容易被环境降解。放线菌是最早发现有生防效果的微生物,玫瑰黄链霉菌是一种放线菌,被证实对于多种植物病原菌有着较强的抑制作用^[3]。近来发现的一大批由链霉菌产生的农用抗真菌抗生素如万隆霉素、抑霉菌素、瑞拉菌素^[4]等对植物病原菌具有很好的抑制作用,因此采用生物防治方法寻找对环境无危害、抗菌谱广的天然产物是近期研究的重点项目。

据文献报道,通过一株菌多种次级代谢产物(One strain many compounds, OSMAC)的方法对于微生物中大量代谢途径的表达有促进作用,采用此策略对链霉菌进行发酵条件的改变会产生多种类型化合物^[5]。通过对包括培养基不同固液状态,不同发酵培养方式,添加不同的氮源得到不同的发酵产物,并对其进行提取,发现所得到的产物种类有很大的不同。最终从玫瑰黄链霉菌 *Streptomyces roseofulvus* M63 次级代谢产物中分离出 14 个化合物,均为首次从该菌中获得。

1 仪器与材料

薄层层析硅胶(GF254 型)、柱层析硅胶(10~40 μm, 200~300 目, 烟台江友硅胶开发有限公司);反相硅胶(The results showed that ODS-A, 日本 YMC 公司);Sephadex LH-20 凝胶(25~100 μm, 瑞典 GE Healthcare 公司);Waters 高效液相色谱仪(717 Plus, 600 Controller, 2424ELS/2489UV/Visible Detector), Bruker AVANCE III-600 核磁共振谱仪(德国 BRUKER 光谱仪器公司);ESI 和 HR-ESI-MS: APEI-II FT-MS 质谱仪(APEX-ulltra 7.0T, 德国 BRUKER 光谱仪器公司)。

菌株 *Streptomyces roseofulvus* M63 分离自河北保定的土壤中,后经过形态学研究以及基因组测序确定为玫瑰黄链霉菌,保存于实验室菌种库中。子宫颈癌细胞(HeLa),卵巢癌细胞(SKOV3)由河北大学药物化学与分子诊断教育部省部共建重点实验室提供。

活性测试药品:二甲基亚砜(DMSO, 美国 Amresco 公司)、四甲基偶氮唑(MTT, 美国 Amresco 公司)、

RPMI-1640 干粉培养基(美国 Gbico 公司)、胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司)、EDTA(乙二胺四乙酸, 天津市科密欧试剂制造有限公司)等。

2 培养与发酵

2.1 培养条件的选择

种子液培养基:cPDA 培养基:葡萄糖 20 g, 土豆 200 g, MgSO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 3 g, VB₁ 10 mg, 柠檬酸 0.1 g, 蒸馏水, 定容至 1000 mL, pH 自然。

发酵培养基:1、固体培养基:80 g 大米, 100 mL 蒸馏水, 于 121 °C 温度下灭菌 30 min。待拿出冷却至室温后培养基呈现固体状态, 最后调 pH 至自然 6.5~7.0。2、液体培养基:淀粉 7.0%, 豆粕粉 3.5%, 葡萄糖 1.0%, 酵母膏 0.2%, 蔗糖 2.0%, 果糖 0.2%, NaCl 0.5%, (NH₄)₂PO₄ 0.7%, CaCO₃ 0.02%, FeSO₄ 0.07%, ZnSO₄ 0.07%, 1000 mL 锥形瓶内加入 500 mL 蒸馏水溶解好后, 调 pH 至 6.5~7.0。3、改变氮源的培养基:将上述液体培养基中的无机氮源 0.02% (NH₄)₂PO₄ 换为有机氮源 0.02% 蛋白胨, 其他条件相同。

2.2 多种发酵方式共同进行

首先对保藏的菌种进行活化, 将活化的菌种 *Streptomyces roseofulvus* M63 接种到 cPDA 培养基上, 在 28 °C, 200 rpm 培养 4~6 d 制备种子液。

待种子液成熟之际, 以 10% 的接种量分别接种于大米固体培养基, 液体培养基, 改变氮源的液体培养基中。将大米固体培养基置于 28 °C 恒温培养箱中发酵 10~12 d, 液体培养基采用两种方式进行发酵, 一种为置于恒温摇床中, 28 °C, 200 rpm 培养 10~12 d; 另一种为放在恒温培养箱中 28 °C 发酵 10~12 d。最后将添加蛋白胨的液体培养基置于恒温摇床中, 28 °C, 200 rpm 培养 10~12 d。

3 提取与分离

对四种不同发酵方式获得的产物经过乙酸乙酯萃取, 减压浓缩获得得到 30 g 浸膏 1 号, 25 g 浸膏 2 号和 3 号, 20 g 浸膏 4 号。将浸膏进行硅胶柱色谱分离, 采用石油醚:乙酸乙酯(19:1, 9:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:3)的体积比进行梯度洗脱, 得到 1 号、2 号、3 号、4 号浸膏中各 7 个组分。对这四种浸膏中的 7 个组分进行次级分离, 1 号浸膏的组分通过硅

胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯,6:1,3:1)得到化合物**1**(25 mg)、**2**(18 mg);通过石油醚/乙酸乙酯9:1及3:1洗脱部分通过Sephadex LH-20凝胶(氯仿:甲醇=1:1)得到化合物**3**(12 mg)、**4**(21 mg)。2号浸膏的组分通过硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯,6:1;4:1)得到化合物**5**(30 mg)、**6**(17 mg);通过反向ODS柱(甲醇/水,4:1;6:1)得到化合物**7**(26 mg)、**8**(13 mg)。3号浸膏的组分通过石油醚/乙酸乙酯(9:1;6:1)梯度洗脱得到化合物**9**(15 mg)、**12**(26 mg),其他流分通过制备型薄层色谱(氯仿:甲醇=15:1)得到化合物**10**(14 mg),Sephadex LH-20凝胶(纯甲醇)得到化合物**11**(12 mg);4号浸膏组分通过HPLC(甲醇/水,7:3;4:1)方法得到**13**(17 mg)、**14**(11 mg)化合物。得到化合物类型分别为苯环衍生物、吡咯、甾醇、内酯、萜类等多种化合物,说明了OSMAC方法对于微生物产生多样化次级代谢产物的重要性。

4 结构鉴定

化合物1 对甲基苯酚(p-cresol), C_7H_8O ,无色针晶; 1H NMR(CD_3OD ,600 MHz) δ_H :7.97(2H,d, J =8.7 Hz,H-2,H-6),7.10(2H,d, J =8.2 Hz,H-3,H-5),2.17(1H,s,H-7); ^{13}C NMR(CD_3OD ,150 MHz) δ_C :155.4(s,C-4),129.8(d,C-2,C-6),127.2(s,C-1),114.6(d,C-3,C-5),29.3(q,C-7);以上数据结合文献^[6]可确定结构。

化合物2 4-羟基苯乙醇(4-hydroxyphenyl ethanol), $C_8H_{10}O_2$,无色晶体; 1H NMR(600 MHz, CD_3OD) δ_H :7.03(2H,d, J =14.1 Hz),6.71(2H,d, J =14.3 Hz),3.69(2H,t, J =14.5 Hz),2.72(2H,t, J =14.5 Hz); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ_C :129.7(s,C-1),129.5(d,C-2),114.8(d,C-3),155.3(s,C-4),114.7(d,C-5),129.5(d,C-6),63.2(t,C-7),38.0(t,C-8);以上数据结合文献^[7]可确定结构。

化合物3 2,3,4,5-四羟基苯甲基酯(2,3,4,5-tetra hydroxy, methyl ester), $C_8H_8O_6$,黄色油状物; 1H NMR(CD_3OD ,600 MHz) δ_H :7.35(1H,s,H-1),3.90(3H,s,H-8); ^{13}C NMR(CD_3OD ,150 MHz) δ_C :168.6(s,C-1),147.4(s,C-2),140.3(s,C-3),128.8(s,C-5),120.6(s,C-4),114.8(s,C-6),107.0(d,C-7),55.4(q,C-8);以上数据结合文献^[8]可确定结构。

化合物4 3,4-二羟基苯甲酸(34-dihydroxy

benzoic acid), $C_7H_6O_4$,白色针状结晶; 1H NMR(CD_3OD ,600 MHz) δ_H :7.45(2H,dd, J =11.0,1.8 Hz,H-1,5),6.82(1H,d, J =8.1 Hz,H-2); ^{13}C NMR(CD_3OD ,150 MHz) δ_C :168.9(s,C-7),150.1(s,C-4),144.7(s,C-3),122.5(d,C-1),121.7(s,C-6),116.3(d,C-5),114.4(d,C-2);以上数据结合文献^[9]可确定结构。

化合物5 4-羟基苯甲酸(4-hydroxy benzoic acid), $C_7H_6O_3$,无色晶体; 1H NMR(600 MHz, CD_3OD) δ_H :7.89(2H,d, J =8.4 Hz),6.83(2H,d, J =8.4 Hz); ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ_C :121.4(s,C-1),131.6(d,C-2),114.6(d,C-3),161.9(s,C-4),114.6(d,C-5),131.6(d,C-6),168.7(s,C-7);以上数据结合文献^[10]可确定结构。

化合物6 1H-吡咯-2-羧酸(1H-Pyrrole-2-carboxylic acid), $C_5H_5NO_2$,白色固体; 1H NMR(CD_3OD ,600 MHz) δ_H :6.96(1H,t, J =1.5 Hz,H-5),6.90(1H,dd, J =1.2,3.6 Hz,H-4),6.21(1H,t, J =3.0 Hz,H-3); ^{13}C NMR(CD_3OD ,150 MHz) δ_C :163.3(s,C-6),123.3(d,C-5),122.5(s,C-2),115.4(d,C-3),109.4(d,C-4);以上数据结合文献^[11]可确定结构。

化合物7 ($22E,24R$)-麦角甾-7,22-二烯-3 β -醇[($22E,24R$)-Ergosta-7,22-dien-3 β -ol], $C_{28}H_{46}O$,无色针晶; 1H NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ_H :0.53(3H,s,H-18),0.78(3H,s,H-19),0.82(3H,d, J =6.8 Hz,H-28)0.92(6H,d, J =6.0 Hz,H-26,H-27),0.99(3H,d, J =6.6 Hz,H-21),3.58(1H,m,H-3),5.14(1H,m,H-7),5.16(1H,m,H-22),5.21(1H,dd, J =15.3,7.1 Hz,H-23); ^{13}C NMR(150 MHz, $CDCl_3$) δ_C :37.0(t,C-1),31.5(t,C-2),70.5(d,C-3),38.0(t,C-4),40.3(d,C-5),29.7(t,C-6),117.4(d,C-7),139.8(s,C-8),49.5(d,C-9),34.2(s,C-10),21.4(t,C-11),39.5(t,C-12),43.3(s,C-13),55.1(d,C-14),22.8(t,C-15),28.1(t,C-16),56.1(d,C-17),12.0(q,C-18),13.0(q,C-19),40.4(d,C-20),21.1(q,C-21),135.7(d,C-22),131.9(d,C-23),42.8(d,C-24),33.1(d,C-25),19.9(q,C-26),19.7(q,C-27),17.6(q,C-28);以上数据结合文献^[12]确定结构。

化合物8 4-羟基苯甲醛(4-hydroxy benzaldehyde), $C_7H_6O_2$,白色针状结晶; 1H NMR(CD_3OD ,600 MHz) δ_H :9.79(1H,s,H-7),7.80(2H,d, J =8.4

Hz, H-2, 6), 6.93 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_{C} : 191.4 (s, C-7), 164.8 (s, C-4), 132.0 (d, C-2, 6), 128.9 (s, C-1), 115.5 (d, C-3, 5);以上数据结合文献^[13]确定结构。

化合物 9 3β -羟基- 5α , 8α -过氧化麦角甾-6,22-二烯 (3β -hydroxy- 5α , 8α -ergosterol peroxide-6, 22-diene), $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$, 无色针晶; EI-MS m/z 428 [M]⁺; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 6.52 (1H, m), 6.27 (1H, m), 5.22 (2H, m, H-22, H-23), 3.99 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-19), 0.94 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.90 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-28), 0.85 (6H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26, H-27), 0.83 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ_{C} : 135.2 (d, C-6), 135.0 (d, C-22), 132.7 (d, C-23), 131.6 (d, C-7), 82.3 (s, C-5), 79.1 (s, C-8), 65.8 (d, C-3), 55.3 (d, C-17), 51.8 (d, C-14), 50.3 (d, C-9), 44.3 (s, C-13), 42.7 (d, C-24), 39.5 (d, C-20), 38.6 (q, C-12), 36.7 (t, C-4), 37.2 (s, C-10), 34.2 (t, C-1), 33.2 (d, C-25), 30.2 (t, C-2), 28.6 (t, C-16), 22.5 (t, C-11), 21.3 (q, C-21), 20.5 (t, C-15), 19.8 (q, C-27), 19.2 (q, C-26), 18.6 (q, C-19), 17.4 (q, C-28), 12.7 (q, C-18);以上数据结合文献^[14]确定结构。

化合物 10 4-羟基苯乙酸(4-hydroxy phenylacetic), $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, 黄色油状; ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_{H} : 7.10 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, H-6), 6.74 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, H-5), 3.50 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_{C} : 176.5 (s, C-8), 157.4 (s, C-4), 131.3 (d, C-2, 6), 127.0 (s, C-6), 116.2 (d, C-3, 5), 41.3 (t, C-7);以上数据结合文献^[15]确定结构。

化合物 11 5-(2-甲基苯基)-4-戊烯酸[5-(2-Methylphenyl)-4-pentenoic acid], $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 白色固体; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7.81 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-3'), 7.63 (3H, m, H-4', 5', 6'), 6.64 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-5'), 6.15 (1H, m, H-4), 3.53 (4H, m, H-2, 3), 2.47 (s, 3H, H-2'); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 175.5 (s, C-1), 135.5 (d, C-3'), 134.5 (s, C-2'), 129.2 (s, C-1'), 128.7 (d, C-5), 128.2 (d, C-4), 126.5 (d, C-4'), 126.2 (d, C-5'), 125.7 (d, C-6'), 42.0 (t, C-3), 28.2 (t, C-2), 20.0 (q, C-7');结合文献数据^[16]确定结构。

化合物 12 3β -羟基-麦角甾-5,7,22-三烯(3β -hydroxy-ergosterol -5,7,22-triene), $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$, 无色针

晶; EI-MS m/z 396 [M]⁺; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ_{H} : 6.50 (1H, d, $J = 12$ Hz, H-6), 6.23 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 5.20 (1H, m, H-22), 5.15 (1H, m, H-23), 3.89 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.88 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28), 0.83 (6H, d, $J = 6.4$ Hz, H-26, H-27), 0.81 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ_{C} : 143.2 (s, C-8), 139.6 (s, C5), 133.3 (d, C22), 132.2 (d, C-23), 118.6 (d, C-6), 116.5 (d, C-7), 71.5 (d, C-3), 55.3 (d, C-17), 54.8 (d, C-14), 46.3 (d, C-9), 43.2 (d, C-24), 42.7 (s, C-13), 41.1 (t, C-12), 40.4 (d, C-20), 39.3 (t, C-1), 38.9 (s, C-10), 36.4 (t, C-4), 33.7 (d, C-25), 32.5 (t, C-2), 28.2 (t, C-16), 23.1 (t, C-15), 21.3 (t, C-11), 21.2 (q, C-21), 19.5 (q, C-27), 19.2 (q, C-26), 17.8 (q, C-28), 16.2 (q, C-19), 12.5 (q, C-18);通过以上数据结合文献^[17]确定结构。

化合物 13 (5-羟基-2-氧代-2H-吡喃-4-基)乙酸甲酯[(5-hydroxy-2-oxo-2H-pyran-4-yl) methyl acetate], $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$, 黄色固体; ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_{H} : 7.86 (1H, s, H-6), 6.51 (1H, s, H-3), 4.93 (2H, s, H-7), 2.16 (3H, s, H-10); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_{C} : 174.1 (s, C-2), 169.9 (s, C-9), 162.7 (s, C-5), 146.1 (s, C-4), 138.5 (d, C-6), 111.5 (d, C-3), 61.3 (t, C-7), 20.5 (q, C-10);以上数据结合文献^[18]确定结构。

化合物 14 (4S,5S,9AR-5-(E)-4-羧基,甲基-8-烯)-10, 13-二甲基-6-萘甲酸[(4S, 5S, 9aR)-5-(E)-4-carboxymethyl-8-en]-10, 13-dimethyl-6-decahydronaphthalene-carboxylicacid], $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ_{H} : 5.64 (1H, d, $J = 0.6$ Hz, H-14), 4.93 (1H, s, H-17a), 4.57 (1H, s, H-17b), 2.49 ~ 2.41 (1H, m, H-7b), 2.33 (1H, ddd, $J = 13.8$, 9.5, 4.2 Hz, H-12b), 2.16 (4H, d, $J = 3.9$ Hz, H-16, H-3b), 2.04 (2H, ddd, $J = 15.9$, 9.5, 6.1 Hz, H-6a, 12a), 2.00 ~ 1.84 (4H, m, H-1b, 2b, 7a, 6b), 1.81 ~ 1.71 (1H, m, H-11b), 1.67 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-9), 1.56 (2H, tdd, $J = 11.9$, 8.4, 3.8 Hz, H-11a, 2a), 1.39 (1H, dd, $J = 12.0$, 2.9 Hz, H-5), 1.23 (3H, s, H-18), 1.19 ~ 1.07 (2H, m, H-1a, 3a), 0.68 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_{C} : 183.8 (s, C-19), 172.8 (s, C-15), 164.5 (s, C-13), 152.0 (s, C-8), 119.3 (d, C-14), 109.4 (t, C-17), 60.0 (d, C-5),

59.2(d,C-9),47.7(s,C-4),44.1(s,C-10),43.3(t,C-12),43.0(t,C-1),42.4(t,C-7),41.9(t,C-3),32.1(q,C-18),30.1(t,C-6),25.4(t,C-11),23.7(t,C-2),21.5(q,C-16),15.9(q,C-20);以上数据结合文献^[19]确定结构。

5 活性筛选

5.1 准备工作

将之前在液氮中保存的细胞株取出,置于37℃水浴锅解冻复苏,待细胞解冻后吸出细胞悬液加入培养瓶中,同时注入RPMI1640完全培养液。将混合液在37℃,含有5%CO₂的培养箱中进行常规培养。传代培养三次,每2~3 d传代一次,使细胞恢复健康状态;

5.2 配制相关溶液

0.01 mol/L PBS缓冲液:分别称取NaCl 8.0 g,KCl 0.2 g,Na₂HPO₄·12H₂O 1.44 g,KH₂PO₄ 0.24 g,去离子水溶解后调pH约7.2,定容至1 L。

胰酶消化液:称取胰蛋白酶(1:250)0.5 g,EDTA 0.2 g,溶于100 mL PBS,用0.22 μm滤膜过滤后分装冻存。

药品稀释液:将待测化合物1~14用DMSO溶解,配成10 mg/mL母液、用生理盐水逐级稀释至1000、100、10、1、0.1 μg/mL。

MTT溶液:取20 mL PBS溶液溶解100 mg MTT,过滤分装,-20℃保存,整个过程避光。

5.3 细胞铺板

选取生长状态良好的细胞用胰蛋白酶进行消

化,然后于1000 rpm离心5 min。弃掉上层培养基,加含血清的培养基吹成单细胞悬液来计数,将细胞悬液浓度调整为5~8×10⁴ cells/mL,用移液枪以90 μL/孔加入96孔板中,置于5%CO₂、37℃的培养箱中备用。

5.4 加入药品

细胞接种培养24 h后,在96孔板的每孔中加入5.2中不同浓度的10 μL药物,每种药物分别有5个不同浓度100、10、1、0.1、0.01 μg/mL。以相同浓度的DMSO作为阴性对照,除去有机溶剂对细胞造成的影响。空白对照组无细胞,只加入100 μL DMSO溶液,来排除溶剂干扰;用顺铂做阳性对照,用生理盐水溶解后,使其最终浓度同样也分别达到100、10、1、0.1、0.01 μg/mL,评测药物活性。每种药物每个浓度设置3个平行,最后置于37℃,5%CO₂的培养箱中培养备用。

5.5 数据测定

分别于加药20、44、68 h后,于避光条件下在每孔加入10 μL MTT,孵育4 h。之后每孔加入150 μL DMSO,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪测定各孔在490 nm时的OD值,计算肿瘤细胞增值抑制率(IR)。抑制率IR(%)=[(OD对照组-OD药品处理组)/OD对照]×100%

用寇氏改良法处理数据,计算1~14号化合物IC₅₀值(half maximal inhibitory concentration,半数抑制浓度)^[20]。测试结果如下表1:

表1 化合物1~14对两种体外肿瘤细胞抑制活性筛选结果

Table 1 Inhibitory activities of compounds 1~14 against two cancer cells *in vitro*

化合物 Compound	HeLa细胞 IC ₅₀ (μmol/mL)			Skov3细胞 IC ₅₀ (μmol/mL)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	400.3	161.5	128.7	385.7	147.2	114.5
2	458.3	208.4	142.5	427.9	235.8	172.6
3	98.13	47.36	89.82	93.45	68.52	87.65
4	319.4	129.3	176.1	297.3	134.8	152.4
5	386.4	176.3	213.8	353.6	232.8	264.1
6	69.82	47.95	87.26	53.28	38.36	67.81
7	431.2	289.5	159.4	457.4	312.2	233.5
8	288.4	147.6	62.02	362.8	174.6	103.5
9	337.2	199.2	122.2	282.4	157.9	114.7
10	158.3	112.3	169.5	174.8	124.3	185.2

化合物 Compound	HeLa 细胞 IC ₅₀ (μmol/mL)			Skov3 细胞 IC ₅₀ (μmol/mL)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
11	38.26	43.21	57.32	14.25	27.84	45.23
12	314.7	205.9	147.3	374.2	165.7	132.2
13	25.62	11.34	6.524	7.892	10.32	5.671
14	185.9	143.2	178.7	179.6	196.3	151.6
顺铂 DPP	41.57	25.29	9.294	16.21	13.61	8.562

通过筛选发现化合物 **11**、**13** 对子宫颈癌细胞 (HeLa)、卵巢癌细胞 (Skov3) 均有抑制作用, 化合物 **13** 对 HeLa 细胞、Skov3 细胞在 24、48、72 h 时的半抑制浓度值 (IC₅₀) 均低于阳性对照物顺铂, 表明其有不错的抗肿瘤活性。化合物 **11** 在 24 h 时的半抑制浓度值 (IC₅₀) 低于阳性对照物顺铂, 显示其有较弱的抗肿瘤活性。

6 结论

本文采用 OSMAC 方法通过 4 种发酵方式从玫瑰黄链霉菌 *Streptomyces roseofulvus* M63 中获得 14 个单体化合物, 包括甾体类、苯环衍生物类、吡咯类、萜类、内酯类多种结构类型, 说明了该方法对于微生物产生多样化产物的重要性。并对这 14 个化合物进行了抗肿瘤活性的筛选, 测试发现化合物 **11**、**13** 对子宫颈癌细胞 (HeLa)、卵巢癌细胞 (Skov3) 均有抑制作用, 具有一定的抗肿瘤活性。未来可通过对微生物次级代谢产物中具有生物活性物质的提取和分离, 为新药的研发指明方向。

参考文献

- Zhang XZ, Kim KR, Cheon JU, et al. Changes in the sensitivity to metalaxyl, dimethomorph and ethaboxam of phytophthora infestans in Korea. *Plant Pathol J*, 2005, 21:33-38.
- Waard MA, Georgopoulos SG, Hollomon DW, et al. Chemical control of plant disease: Problems and prospects. *Annu Rev Phytopathol*, 1993, 31:403-421.
- Tanaka Y, Omura S. Agroactive compounds of microbial origin. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47:57-87.
- Bearder J. Discovering new secondary metabolites: A view from the agrochemical industry. *Pestic Sci*, 1985, 16: 422-427.
- Helge BB, Barbara B, Regina H. Big effects from small Changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chem Bio Chem*, 2002, 3:619-627.
- Takaya Y, Furukawa T, Miura S, et al. Antioxidant constituents in distillation residue of awamori Spirits. *J Agric Food Chem*, 2007, 55:75-79.
- Yang Y(杨云), Zhang HJ(张寒娟), Zhu ZH(朱振华), et al. Studies on the chemical constituents of *Epimedium brevicornum*. *J Chin Med Mater*(中药材), 2009, 32:1051-1053.
- Peter XI, Conrad HE. Rhodium (I)-katalysierte reaktionen der [2 + 4]-cycloaddukte aus 3,4-dimethoxyfuran und acetylendicarbonsaure-estern. *Helv Chim Acta*, 1978, 61: 1134-1138.
- Koneni VS, Suriya PS, Sweta M, et al. Galactolipids from bauhinia racemosa as a new class of antifilarial agents against human lymphatic filarial parasite, *Brugia malayi*. *Eur J Med Chem*, 2012, 50:230-235.
- Feng BM(冯宝民), Liu JY(刘菁琰), Wang HG(王惠国), et al. Isolation and identification on the chemical constituents of *Girardinia suborbiculata* C. J. Chen sub sp. *triloba*. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2011, 28: 364-367.
- Wang MZ, Xu H, Liu TW, et al. Design, synthesis and anti-fungal activities of novel pyrrole alkaloid analogs. *Eur J Med Chem*, 2011, 46:1463-1472.
- Keller AC, Maillard MP, Hostettmann K. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry*, 1996, 41:1041-1046.
- Hu L(胡琳), Ding ZH(丁智慧), Liu JK(刘吉开). Chemical constituents of *Boletopsis grisea*, *Acta Botan Yunnanica*(云南植物研究), 2002, 41:1041-1046.
- Mishra PD, Wahidulla S, Souza LD, et al. Lipid constituents of marine sponge *Suberites carnosus*. *Ind J Chem*, 1996, 35B: 806-809.
- Hiroshi K, Yoshitaka T, Kiyokazu T, et al. Synthesis of 13C-labeled possible intermediates in the biosynthesis of phenylethanoid derivatives, cornoside and rengyosides. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46:581-586.
- Mukku V, Maskey RP, Monecke P, et al. 5-(2-Methylphenyl)-4-pentenoic acid from a terrestrial Streptomyces. *Zeitschrift fur naturforschung B*, 2002, 57:335-337.