

## 小单孢菌 FIM060152 中抗肿瘤活性成分的提取分离纯化

陈丽, 林如, 王海龙, 方志镨, 江红, 连云阳\*

福建省微生物研究所 福建省新药(微生物)筛选重点实验室, 福州 350007

**摘要:** 本文是探讨分离和提取纯化小单孢菌 FIM060152 发酵液中的抗肿瘤抗生素的方法。实验采用 HZ816 大孔吸附树脂柱层析、萃取、硅胶柱层析、半制备色谱等方法对菌株 FIM060152 的发酵液中次级代谢产物进行提取分离纯化, 获得化合物 FIM060152-C1。理化性质和 UV、MS 以及 NMR 波谱分析结果表明化合物 FIM060152-C1 为 Calicheamicin $\gamma_1^I$ 。化合物 FIM060152-C1 的抗肿瘤活性通过 DNA 断裂法进行检测, 其断裂质粒 pBR 的最低浓度约为 0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词:** 小单孢菌 FIM060152; calicheamicin $\gamma_1^I$ ; 分离纯化; DNA 断裂活性

中图分类号: O629.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.006

## Purification and Identification of Anti-tumor Antibiotic from *Micromonospora* FIM060152

CHEN Li, LIN Ru, WANG Hai-long, FANG Zhi-kai, JIANG Hong, LIAN Yun-yang\*

Fujian Institute of Microbiology, Fujian Provincial Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fuzhou 350007, China

**Abstract:** The purpose of the present study was to isolate, purify and identify antitumor compounds from the fermentation broth of *Micromonospora* FIM060152. The secondary metabolite was isolated and purified by macroporous resin column chromatography, silica gel chromatography and preparative chromatography; the structure was identified by physicochemical properties, LC-MS and NMR spectral data. The antitumor activity was detected by DNA damage. As a result, compound FIM060152-C1 was isolated from the strain and identified as Calicheamicin $\gamma_1^I$ . DNA damage exhibited that FIM060152-C1 had strong antitumor activity on plasmid pBR322, with MIC value of 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Key words:** *Micromonospora* FIM060152; calicheamicin $\gamma_1^I$ ; purification; DNA damage

烯二炔类抗生素由于其强烈的生物活性, 可以发展为新型高效抗肿瘤药物, 在肿瘤治疗方面, 可作为单克隆抗体导向药物的弹头使导向药物小型化、高效化。Calicheamicin 是从一株稀有放线菌小单孢菌 *Micromonospora echinospora* spp *calichensis* 的发酵液中分离得到的烯二炔类抗生素<sup>[1-5]</sup>。它包括一系列成员, 其中 Calicheamicin $\gamma_1^I$  是其重要的成员, 它对体外培养的多种细胞具有强烈的杀伤活性<sup>[6]</sup>, 对细胞的杀伤作用主要是引起细胞 DNA 断裂并诱导凋亡<sup>[7,8]</sup>, 据报道在不同的浓度, 抑制细胞生长的抗癌药物会引起细胞坏死、膜损坏或细胞凋亡<sup>[9]</sup>。Calicheamicin $\gamma_1^I$  诱导凋亡有浓度依赖性, 低浓度的

样品溶液引起细胞的凋亡, 高浓度的溶液直接损伤 DNA 链的双螺旋结构。Calicheamicin $\gamma_1^I$  与单抗连接后, 偶联物对移植于裸鼠的人乳腺癌、骨髓瘤和卵巢癌等有显著的疗效。随着抗体工程技术、偶联技术、细胞毒药物合成技术的不断发展, 目前已有数十种抗体药物偶联物处于各个临床阶段, 另外处于临床前研发阶段的抗体药物偶联物类药物更是不胜枚举<sup>[10-12]</sup>。由于烯二炔类抗生素合成工艺复杂, 从微

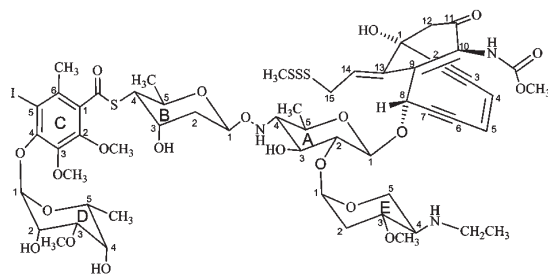


图1 Calicheamicin $\gamma_1^I$  (FIM060152-C1) 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of calicheamicin $\gamma_1^I$  (FIM060152-C1)

收稿日期: 2016-10-10 接受日期: 2016-12-23

基金项目: 福建省自然科学基金(2014J01275); 公益类科研院所专项(2014R1009-4); 福州市生物制药行业技术创新中心(2016-PT-36); 福建省化药技术重大研发平台(2014Y200); 闽海洋高新项目(2016-25)

\* 通讯作者 E-mail: yulian@tom.com

生物代谢产物中筛选烯二炔类抗生素对寻找高效、低毒、高选择性的抗肿瘤药物具有现实的理论意义和实用价值<sup>[13,14]</sup>,本课题组通过研究初步建立了采用大孔吸附树脂提取纯化抗肿瘤抗生素 Calicheamicin<sub>γ</sub><sup>I</sup> 的新工艺,该工艺的建立在化合物后续的活性研究提供了依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 实验仪器

分析型 HPLC: Shimadzu LC-20A-DAD 液相色谱仪;半制备型 HPLC: Shimadzu LC-6AD 液相色谱仪;质谱仪: Agilent 1100 Series LC/MSD Trap; Bruker AV-400 超导核磁共振波谱仪(内标物 TMS,  $\delta$  为 ppm,  $J$  为 Hz); Fire reader 凝胶成像系统。

### 1.2 实验材料

高效硅胶薄层板 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工厂); 200~300 目层析用硅胶(青岛海洋化工厂); 分析色谱柱: YMC ODS C<sub>18</sub> 柱(5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm); 半制备色谱柱: Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱(5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  10 mm); 试剂均为分析纯或色谱纯。

### 1.3 实验菌株、药品

小单孢菌 FIM060152 菌株来自福建省微生物研究所微生物新药筛选中心菌种资源库; Calicheamicin<sub>γ</sub><sup>I</sup> 对照品来自中国医学科学院北京协和医学院。

### 1.4 培养基

斜面培养基采用 ISP2(%) : 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, 葡萄糖 4.0, 琼脂 15.0, 蒸馏水 1.0L, pH7.3。

种子培养基(%) : 可溶性淀粉 1.5, 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 0.5, 酵母粉 0.5, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, NaCl 0.05, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05, CaCO<sub>3</sub> 0.1, pH7.5。

发酵培养基(%) : 糊精 1, 蔗糖 0.4, 甘油 0.1, 蛋白胨 0.1, 黄豆粉 0.3, 酵母粉 0.4, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

0.05, NaCl 0.05, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.05, KI 0.01, pH7.5。

## 2 实验方法

### 2.1 培养条件

将斜面接入种子培养基, 温度 35  $^{\circ}$ C、摇瓶转速 240 rpm 培养 42 h; 将种子培养液以 10% 的接种量接入二级种子培养基中, 培养条件为温度 35  $^{\circ}$ C、摇瓶转速 240 rpm, 培养 22 h; 将二级种子培养液以 1% 的接种量接入发酵培养基中, 发酵条件为温度 30  $^{\circ}$ C、摇瓶转速 240 rpm, 培养 120 h。

### 2.2 FIM060152-C1 组分的提取分离纯化

将小单孢菌 FIM060152 的发酵液(200 L) 4500 rpm 离心 15 min, 取上清液, 过 HZ816 大孔吸附树脂后, 先用 30% 乙醇水冲洗, 再用 72%~79% 乙醇水洗脱, 分段收集 72%~79% 乙醇水洗脱部分, 根据 HPLC 分析检测, 检测条件为: 乙腈: 0.03% 甲酸铵溶液 = 520: 480, 洗脱 30 min, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 将 FIM060152-C1 样品较为集中的部分经减压浓缩去乙醇后, 用等体积二氯甲烷萃取 3 次, 合并二氯甲烷萃取液, 经减压浓缩得粗提物(8.4 g)。将粗提物用二氯甲烷溶解, 可溶解部分进行正相硅胶柱层析(硅胶 G200~300 目), 二氯甲烷/甲醇梯度洗脱(100:0~90:10), 分段收集洗脱液, 根据 HPLC 分析检测, 发现 FIM060152-C1 主要集中于二氯甲烷/甲醇 95:5 部分(图 2a)。对该部分 14.7 min 的色谱峰进行半制备液相制备, 色谱条件为: 乙腈/0.035% 甲酸铵溶液 = 600: 400, 流速 3.5 mL/min, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 收集 FIM060152-C1 色谱峰, 浓缩至干, 得到纯品 12 mg。

### 2.3 结构鉴定

对 FIM060152-C1 样品进行 HPLC 分析, 得到其 HPLC 纯度为 85.3% (图 2b); 对其进行 HPLC-MS 液质联用分析; 检测其紫外吸收光谱; 以 CDCl<sub>3</sub> 为溶

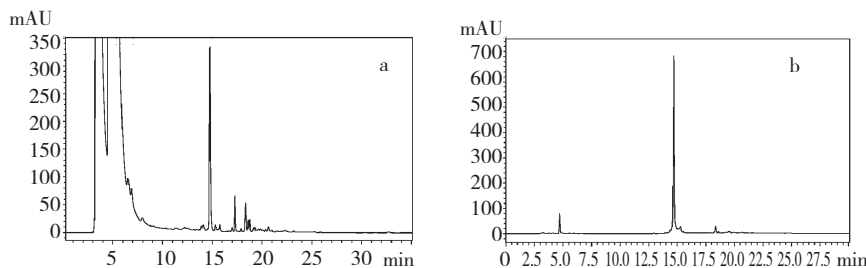


图 2 二氯甲烷/甲醇 95:5 洗脱峰(a)及纯化样品 FIM060152-C1(b)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of elution peaks of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5 (a) and purified compound FIM060152-C1 (b)

剂,对其进行核磁图谱( $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR)分析,鉴定化合物结构。

## 2.4 DNA 断裂活性测定<sup>[15]</sup>

将 Calicheamicin $\gamma_1^I$  对照品用 DMSO 溶解,配制浓度为 0.2 mg/mL 的溶液, FIM060152-C1 样品用 DMSO 溶解,配制浓度为 1 mg/mL 的溶液,逐级稀释至浓度分别 0.1 mg/mL、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,分别取 1  $\mu\text{L}$  对照品和 FIM060152-C1 稀释后的样品溶液与 3.0  $\mu\text{L}$  50mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 缓冲液、5.0  $\mu\text{L}$  pBR322 DNA 溶液(100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 和 1  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇混合,置室温下暗反应 1 h,再将样品加入电泳样品孔,在含 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中电泳 45 min,紫外下检测 pBR322 DNA 的结构变化。

## 3 实验结果

### 3.1 化合物 FIM060152-C1 的结构鉴定

化合物 FIM060152-C1 淡黄色粉末; UV<sub>max</sub> (MeOH) nm: 在 230 ~ 250 nm 处和 260 ~ 300 nm 处有两个弱的特征吸收峰; ESI-MS:  $m/z$  1369.0 [M + H]<sup>+</sup>, 结合氢谱和碳谱确定分子式为 C<sub>55</sub>H<sub>74</sub>N<sub>3</sub>O<sub>21</sub>S<sub>4</sub>I, 该结构分为六个部分: 包括 A、B、C、D、E 环和烯二炔环结构。 $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 4.67 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, H-1A), 3.64 (1H, bt,  $J$  = 9.2 Hz, H-2A), 4.03 (1H, bt,  $J$  = 10.0 Hz, H-3A), 2.48 (1H, m, H-4A), 3.77 (1H, m, H-5A), 1.37 (3H, d,  $J$  = 6.0 Hz, H-5A-CH<sub>3</sub>), 5.04 (1H, dd,  $J$  = 10, 2.0 Hz, H-1B), 1.77 (1H, bdd,  $J$  = 14.5, 10.0 Hz, H-2B), 2.03 (1H, md,  $J$  = 14.5 Hz, H-2B), 4.32 (1H, bd,  $J$  = 2.5 Hz, H-3B), 3.76 (1H, dd,  $J$  = 11, 2.5 Hz, H-4B), 4.05 (1H, m, H-5B), 1.41 (3H, d,  $J$  = 6.0 Hz, H-5B-CH<sub>3</sub>), 3.89 (3H, s, H-2C-OCH<sub>3</sub>), 3.83 (3H, s, H-3C-OCH<sub>3</sub>), 2.35 (3H, s, H-6C-CH<sub>3</sub>), 5.72 (1H, bs, H-1D), 4.48 (1H, bs, H-2D), 3.82 (1H, m, H-3D), 3.65 (1H, dq,  $J$  = 9.5 Hz, 6.2, H-4D), 4.20 (1H, m, H-5D), 3.57 (3H, s, H-3D-OCH<sub>3</sub>), 1.30 (3H, d,  $J$  = 6.0 Hz, H-5D-CH<sub>3</sub>), 5.69 (1H, bs, H-1E), 1.50 (1H, dt,  $J$  = 14.0, 4.0 Hz, eq, H-2E), 2.06 (1H, m, H-2E), 3.66 (1H, m, H-3E), 2.29 (1H, m, H-4E), 3.78, 3.80 (1H, m, H-5E), 3.42 (3H, s, H-3E-OCH<sub>3</sub>), 3.51, 3.56 (2H, 2m, H-4E-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.11 (1H, d,  $J$  = 5 Hz, H-4E-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.89 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, H-4), 5.82 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, H-5), 6.22

(1H, s, H-8), 2.82 (1H, d,  $J$  = 17.0 Hz, H-12), 3.18 (1H, d,  $J$  = 17.0 Hz, H-12), 6.41 (1H, dd,  $J$  = 14.5, 7.5 Hz, H-14), 3.84 (1H, m, H-15), 4.08 (1H, m, H-15), 3.70 (3H, s, H-10-NHCOOCH<sub>3</sub>), 2.50 (3H, s, H-15-SSSCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 102.7 (d, C-1A), 75.9 (d, C-2A), 71.1 (d, C-3A), 67.0 (d, C-4A), 71.8 (d, C-5A), 17.6 (q, C-5A-CH<sub>3</sub>), 99.7 (d, C-1B), 37.0 (t, C-2B), 68.5 (d, C-3B), 51.8 (d, C-4B), 70.5 (d, C-5B), 18.9 (q, C-5B-CH<sub>3</sub>), 128.8 (s, C-1C), 143.0 (s, C-2C), 130.9 (s, C-3C), 150.6 (s, C-4C), 93.6 (s, C-5C), 130.2 (s, C-6C), 192.8 (s, C-1C-C = O), 61.7 (q, C-2C-OCH<sub>3</sub>), 61.0 (q, C-3C-OCH<sub>3</sub>), 25.4 (q, C-6C-CH<sub>3</sub>), 97.3 (d, C-1D), 69.2 (d, C-2D), 80.9 (d, C-3D), 68.4 (d, C-4D), 69.8 (d, C-5D), 57.3 (q, C-3D-OCH<sub>3</sub>), 17.6 (q, C-5D-CH<sub>3</sub>), 99.6 (d, C-1E), 34.1 (t, C-2E), 75.9 (d, C-3E), 60.4 (d, C-4E), 68.2 (t, C-5E), 56.4 (q, C-3E-OCH<sub>3</sub>), 42.3 (t, C-4E-NHCH<sub>2</sub>-), 14.8 (q, C-4E-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 72.1 (s, C-1), 100.9 (s, C-2), 88.2 (s, C-3), 123.4 (d, C-4), 124.5 (d, C-5), 82.8 (s, C-6), 102.7 (s, C-7), 72.1 (s, C-8), 129.8 (s, C-9), 130.5 (s, C-10), 192.1 (s, C-11), 67.8 (t, C-12), 133.4 (s, C-13), 129.5 (d, C-14), 39.1 (t, C-15), 151.6 (s, C-NH-COO-), 52.8 (q, C-NH-COOCH<sub>3</sub>), 22.8 (q, C-15-CH<sub>3</sub>)。该波谱数据与文献<sup>[16]</sup>一致, 确定该化合物为 Calicheamicin $\gamma_1^I$ , 其化学结构如图 1 所示。

### 3.2 DNA 断裂活性

将对照品和不同浓度的样品溶液经上述方法处理后在紫外下检测 pBR322 DNA 的结构变化, 发现对照品和样品 FIM060152-C1 对细胞的 DNA 断裂活性均为阳性, 样品最低抑制浓度范围最在 0.5 ~ 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 重新配制浓度分别为 0.2 mg/mL、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 FIM060152-C1 样品溶液和对照品进行上述实验, 发现 DNA 断裂活性的最低样品浓度在 0.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右。结果如图 3 所示。

## 4 讨论与结论

本研究尝试建立采用大孔吸附树脂提取纯化抗肿瘤抗生素 Calicheamicin $\gamma_1^I$  的新工艺, 实验分别对 HZ816 和 HP20 大孔吸附树脂对 FIM060152 的发酵液的吸附能力进行了考察, 发现 HZ816 树脂的吸附容量较大, 且分离效果较好。该方法的建立既可有效除去 Calicheamicin $\gamma_1^I$  组分以外的杂质, 使样品富

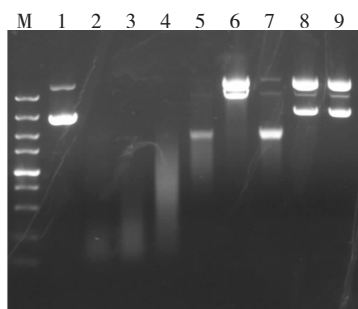


图3 FIM060152-C1 的 DNA 切割图

Fig. 3 DNA damage of FIM060152-C1

注: M: DNA marker DL5000; 1: pBR322; 2: 0.2 mg/mL 的 Calicheamicin $\gamma_1^I$  对照品溶液; 3-9: 浓度分别为 0.2 mg/mL、0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.4  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2  $\mu\text{g/mL}$  的 FIM060152-C1 样品溶液

M: DNA ladder DL5000; 1: pBR322; 2: 0.2mg/mL 的 Calicheamicin $\gamma_1^I$  reference substance; 3-9: Solution concentration of 0.2 mg/mL、0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.4  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2  $\mu\text{g/mL}$  of FIM060152-C1

集,又减小了直接萃取使用大量溶媒的危险性。因制备的样品量和纯度有限,实验发现样品在此纯度下对细胞 DNA 断裂活性的最低样品浓度在 0.20  $\mu\text{g/mL}$  左右,更为具体详细的活性研究还需要纯化更大量的样品。

Calicheamicin $\gamma_1^I$  除有极强的抗肿瘤活性外,还具有自身的毒性,导致菌株的效价很低,试验中为提高效价:将菌种在不同的波长下、不同时间进行紫外处理,并利用不同抗生素、不同浓度进行诱变处理。并在摇瓶发酵试验中考察了不同的碳源、氮源、氨基酸及其配比。通过对这些工艺条件的优化,目前小单孢菌 FIM060152 中 Calicheamicin $\gamma_1^I$  的产量有明显提高,为继续研究该组分的相关活性以及其他几个类似组分,后续仍需对该菌株的发酵条件和工艺进行深入的研究和优化,以提高 Calicheamicin $\gamma_1^I$  和相关的 Calicheamicin 小组分的生物合成水平。

#### 参考文献

- Jiang HF(江海飞),Chen JH(陈建华),Gu JF(顾觉奋). Recent progresses on enediyne antibiotics and their targeted drugs. *World Notes Antibiotics* (国外医药抗生素分册), 2011, 32:150-155.
- Elespuru RK,White RJ. Biochemical prophage induction assay:a rapid test for antitumor agents that interact with DNA. *Cancer Res*,1983, 43:2819-2830.
- Zhang QJ(张庆娟). Recent Progresses of enediyne antitumor antibiotic calicheamicins. *Chin J Clin Ration Drug Use* (临床合理用药),2013,6(10):77-178.

- Zhang WJ(张文军),Li DD(李电东),Shao RG(邵荣光). The mechanisms of action of enediyne antitumor antibiotic calicheamicins. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志),2008, 17:815-820.
- Shao RG(邵荣光),Zhen YS(甄永苏). Research and development of enediyne antitumor drugs. *China Prescription Drug* (中国处方药),2006,57:6-9.
- Nicolaou KC,Pitsinos EN,Theodorakis EA,et al. Synthetic calicheamicin mimics with novel initiation mechanisms;DNA cleavage,cytotoxicity,and apoptosis. *Chem Biol*,1994,1:57-66.
- Amico D,Barbui AM,Erba E,et al. Differential response of human acute myeloid leukemia cells to gemtuzumab ozogamicin *in vitro*; role of Chk1 and Chk2 phosphorylation and caspase 3. *Blood*,2003,101:4589-4597.
- Pagano L,Fianchi L,Caira M,et al. The role of Gemtuzumab Ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia patients. *Oncogene*,2007,26:3679-3690.
- Prokop A,Wrasidlo W,Lode H,et al. Induction of apoptosis by enediyne antibiotic calicheamicin theta II proceeds through a caspase-mediated mitochondrial amplification loop in an entirely Bax-dependent manner. *Oncogene*,2003,22:9107-9120.
- Li L(李良),Shao RG(邵荣光). Recent progresses of antibody-drug conjugate. *Chin Med Biotechnol*(中国医药生物技术),2014,9:300-302.
- Sievers EL,Larson RA,Stadtmauer EA,et al. Appelbaum for the mylotarg study group. *J Clin Oncol*,2001,19:3244-3254.
- Chen H(陈华),Zheng LH(郑玲辉),Meng Q(孟强),et al. Purification and identification of a high active anti-tumor antibiotic calicheamicin. *Chin J Antibiotics* (中国医药生物技术),2011,36:758-761.
- Chen YH,Yin M,Horsman GP,et al. Improvement of the enediyne antitumor antibiotic C-1027 Production by manipulating its biosynthetic pathway regulation in *Streptomyces globisporus*. *J Nat Prod*,2011,74:420-424.
- Forsman JJ,Leino R. L-Pentoses in biological and medicinal applications. *Chem Rev*,2011,111:3334-3357.
- Zhang WJ(张文军). Fermentation,isolation,purification and study of antitumor activity of a new calicheamicins strain from *Micromonospora* C3509. Beijing:Institute of Medicinal Biotechnology,Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College(北京协和医学院;中国医学科学院),PhD.2009.
- Lee MD,Manning JK,Williams DR,et al. Calicheamicins,a novel family of antitumor antibiotics. 3. Isolation,purification and characterization of Calicheamicins  $\beta_1^{\text{Br}}$ , $\gamma_1^{\text{Br}}$ , $\alpha_2^{\text{I}}$ , $\alpha_3^{\text{I}}$ , $\beta_1^{\text{I}}$ , $\gamma_1^{\text{I}}$  and  $\delta_1^{\text{I}}$ . *J Antibiot(Tokyo)*,1989,42:1070-1087.