

链霉菌 *Streptomyces* sp. HS-NF-496 中两个 Anthrabenoxocinone 类化合物

杜敏娜, 姜南, 张灵坚, 张杭锋, 齐欢, 张辉*, 王继栋

浙江海正药业股份有限公司, 台州 318000

摘要: 对链霉菌 *Streptomyces* sp. HS-NF-496 的次级代谢产物进行了研究, 分离得到两个化合物, 经 1D 和 2D NMR、CD、MS 波谱分析及与文献数据比较, 鉴定它们分别为 (-)-(6*R*, 16*R*) 10-Cl-ABX (**1**) 和 (-)-(6*R*, 16*R*)-ABX (**2**)。对两个化合物的细胞毒活性和抗菌活性评价实验结果表明: 化合物 **1** 和 **2** 对人肺腺癌 A549 细胞, 人结肠癌 HCT-116 细胞和人神经瘤 SF-268 细胞表现出较弱的细胞毒活性; 化合物 **1** 和 **2** 对绿脓杆菌, 金黄色葡萄球菌, 枯草芽胞杆菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌表现出中等强度的抗菌活性。本文首次报道了化合物 **1** 的绝对构型。

关键词: 链霉菌; anthrabenoxocinones; 细胞毒性; 抗菌活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.10.009

Two Anthrabenoxocinone Metabolites from *Streptomyces* sp. HS-NF-496

DU Min-na, JIANG Nan, ZHANG Ling-jian, ZHANG Hang-feng, QI Huan, ZHANG Hui*, WANG Ji-dong

Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China

Abstract: Two anthrabenoxocinone metabolites, (-)-(6*R*, 16*R*) 10-Cl-ABX (**1**) and (-)-(6*R*, 16*R*)-ABX (**2**), were isolated from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. HS-NF-496. Their structures were determined on the basis of spectroscopic analysis, including 1D and 2D NMR techniques, CD as well as ESI-MS and comparison with data from the literatures. Bioassay results showed that **1** and **2** exhibited weak cytotoxic activity against three tumor cell lines A549, HCT-116 and SF-268 and moderate antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and Methicillin-resistant *S. aureus*. The absolute configuration of **1** was reported for the first time.

Key words: *Streptomyces* sp.; anthrabenoxocinones; cytotoxicity; antibacterial activity

Anthrabenoxocinones (ABXs) 是一类由多种链霉菌 (*Streptomyces*) 产生的六环芳香族化合物。至今, 许多天然 ABXs 类化合物及其生物活性被报道^[1-6]。从 *Streptomyces violaceusniger* A24566B 分离得到的化合物 BE-24566B 是第一个天然 ABX 类抗菌物质^[1,2], 而从放线菌 MA7150 中分离得到的化合物 L-755805 具有和 BE-24566B 相同的平面结构, 并且具有内皮素结合抑制作用^[3]。另外两个从 *Streptomyces* sp. MA6657 中分离得到的 ABXs 类化合物, (-)-ABX 及其类似物 (-)-BABX 被发现是肝 X 受体拮抗剂并且表现出比 BE-24566B 更强的抗革兰氏阳性菌 (Gram-positive bacteria) 活性^[4,5]。此外, 具有蛋白酶抑制作用的五个天然 ABXs 类化合物从放线菌 AA-98-E-N010GAS 中被发现^[6]。在从微生物

中寻找新的活性次生代谢产物的过程中, 我们对一株链霉菌 *Streptomyces* sp. HS-NF-496 发酵液的化学成分进行了研究, 得到了两个 ABXs 类化合物, (-)-(6*R*, 16*R*) 10-Cl-ABX 和 (-)-(6*R*, 16*R*)-ABX (**1-2**, 图 1)。本文详细介绍了两个化合物的分离纯化、结构鉴定和生物活性。

1 材料与方法

产生菌 *Streptomyces* sp. HS-NF-496 分离自中国西双版纳采集的土壤样品。该菌株的 16S rRNA 基因序列 (GenBank 号: ku848003) 和 *Streptomyces rishiriensis* strain NBRC13407 的基因序列 (GenBank 号: AB184383) 的相似性高达 99.45%, 因此我们将其鉴定为链霉菌属。

该菌的平板培养基为 YMS 培养基 (g/L): 麦芽提取物 (贝克顿-迪金森公司, 新泽西州, 美国) 10 g,

酵母提取物(Oxoid Ltd, 贝辛斯托克, 英国) 4 g、葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司, 上海, 中国) 4 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (国药化学试剂有限公司, 上海, 中国) 0.005 g 和琼脂(贝克顿-迪金森公司, 新泽西州, 美国) 20 g, pH 值为 7。种子培养基(g/L): 葡萄糖 4 g, 麦芽提取物 10 g, 酵母抽提物 4 g, pH 值为 7。发酵培养基(g/L): 甘露醇(山东天力药业有限公司, 山东, 中国) 20 g, 黄豆粉(宁波北仑江南油脂有限公司, 宁波, 中国) 20 g, pH 值为 6.8-7.0(灭菌前)。所有的培养基都经 121 °C 灭菌 20 min 后使用。在 250 mL 三角瓶中装入液体种子培养基 25 mL, 接种由斜面培养基上 28 °C 培养 5~7 d 的菌种, 于摇床上在 28 °C, 250 rpm 条件下培养 24 h。然后将上述种子培养基转入装有 250 mL 发酵培养基的 1 L 三角瓶中, 在 28 °C, 250 rpm 条件下的摇床上培养 8 d。

将收集自 36 个发酵三角瓶的 9 L 发酵液过滤得到滤饼和滤液。滤饼用 1 L 水洗涤后加入 1 L 甲醇提取, 重复提取一次。滤液和滤渣水洗液通过 HP-20 大孔吸附树脂后用工业乙醇(95%)洗脱并收集工业乙醇洗脱液。甲醇提取液和乙醇洗脱液合并后减压浓缩干后得粗提物。粗提物过硅胶柱(青岛海洋化工集团, 山东, 中国; 100~200 目), 以石油醚:丙酮(90:10~50:50, 体积比)梯度洗脱, 经过薄层层析(thin layer chromatography, TLC)检测后合并得到流分 A 和流分 B 两个部分。样品使用硅胶薄层板(HSGF₂₅₄, 烟台化工研究院, 烟台, 中国)在石油醚:丙酮(2:1)溶剂系统中展开, 然后在 254 nm 紫外灯下观察并用硫酸-乙醇(5:95, v/v)加热显色。流分 A 经过 Sephadex LH-20(GE 医疗集团, 贾尔斯, 英国)柱色谱, 氯仿/甲醇=1/1(体积比)洗脱, 经过 TLC 检测后得到流分 A-1。然后, 流分 A-1 进一步经过半制备反相高效液相(安捷伦 1100, Zorbax SB-C₁₈, 5 μm, 250 × 9.4 mm 内径; 1.5 mL/min; 220 nm; 安捷伦, 加州, 美国)色谱分离, 使用 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=80:10:10$ (v/v)洗脱得到化合物 2 (t_{R} 9.5 min, 9.3 mg)和化合物 1 (t_{R} 11.3 min, 6.5 mg)。

比旋度采用珀金埃尔默 341 旋光仪(珀金埃尔默股份有限公司, 苏州, 中国)测定。紫外光谱使用瓦里安 CARY 300 BIO 分光光度计(瓦里安股份有限公司, 北卡罗来纳州, 美国), 红外光谱采用 KBr 压片, 然后使用 Nicolet Magna FT-IR 750 光谱仪(Nicolet, 东京, 日本)测定。氢谱(¹H NMR)和碳谱(¹³C NMR)采用德国布鲁克 DRX-400 光谱仪测定

(¹H NMR: 400 兆赫兹; ¹³C NMR: 100 兆赫兹; 布鲁克公司, 莱茵施泰滕, 德国)。电喷雾电离质谱(ESI-MS)和高分辨率的电喷雾电离质谱(HR-ESI-MS)使用 Q-TOF Micro LC-MS-MS 质谱仪(沃特世公司, 米尔福德, 马萨诸塞州, 美国)。圆二色光谱(CD)使用甲醇作为溶剂在佳司科 J-810 光谱仪上测定(佳司科国际有限公司, 东京, 日本)。

2 结果与讨论

化合物 1 淡黄色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -173$ (c 0.1, EtOH), CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (λ_{max} nm) -4.0 (240), -1.1 (277), +0.4 (309), -0.2 (372) (图 2), UV (EtOH) λ_{max} nm (log ϵ): 203 (4.47), 224 (4.16), 269 (3.77), 394 (4.02)。红外光谱提示化合物 1 中含有羟基(3371 cm^{-1})和羰基(1611 cm^{-1})。HR-ESI-MS(positive)图谱给出 m/z 495.1191 [$\text{M} + \text{H}$]⁺(计算值为 495.1205)和同位素峰信号 m/z 497.1179, 而且比例为 3:1, 结合核磁数据(表 1), 确定该化合物分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{ClO}_7$, 其不饱和度为 16。¹³C NMR 给出 27 个碳信号, 结合 DEPT 谱, 其中包括: 4 个甲基碳信号(δ 18.6, 27.0, 27.8, 28.1); 1 个亚甲基碳信号(δ 40.1); 1 个脂肪族次甲基碳信号(δ 65.0); 4 个 sp^2 杂化次甲基碳信号(δ 100.9, 102.8, 110.1, 118.2); 14 个 sp^2 杂化季碳信号(δ 136.2, 157.2, 112.1, 161.8, 164.8, 156.8, 152.6, 142.9, 153.0, 149.1, 108.4, 110.1, 123.3, 113.9); 1 个缩酮碳信号(δ 97.9); 1 个 sp^3 杂化季碳信号(δ 39.8)和 1 个羰基碳信号(δ 201.1)。¹H NMR 图谱中清楚的给出了 4 个甲基氢信号 [δ 1.64 (3H, s), 1.91 (3H, s), 1.99 (3H, s), 2.44 (3H, s)]; 1 组亚甲基氢信号 [δ 3.15 (1H, d, $J = 18.1$ Hz), 3.34 (1H, d, $J = 18.1$ Hz)]; 2 个 sp^2 杂化次甲基双峰氢信号 [δ 6.17 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 6.28 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)]; 3 个 sp^2 杂化次甲基单峰氢信号 [δ 6.24 (1H, s), 6.61 (1H, s), 7.13 (1H, s)]和两个低场活泼氢信号 [δ 13.29 (1H, s), 13.38 (1H, s)]。比较化合物 1 和文献报道的化合物 3^[6]的¹H 和¹³C NMR 数据(表 1), 结果表明化合物 1 和化合物 3 具有相同的平面结构。化合物 1 的 HMBC 相关性(表 1)进一步确定了其平面结构(图 1)。ABX 类化合物存在 C6 和 C16 两个立体手性中心。该类化合物 1.264-C 通过 X-单晶衍射和 CD 光谱确定了其绝对构型为(6*S*, 16*S*)^[7]。根据公开发表的 CD 光

谱数据和旋光数据,化合物 BE-24566B 的绝对构型确定为(6*S*,16*S*),化合物(-)-ABX 和(-)-BABX 的绝对构型确定为(6*R*,16*R*)^[7]。化合物**1**和化合物(-)-ABX 和(-)-BABX 具有相似的 CD 光谱数据,因此其绝对构型可鉴定为(6*R*,16*R*)。最后,化合物**1**的结构式确定为(-)-(6*R*,16*R*) 10-Cl-ABX (图 1)。

化合物 2 淡黄色无定形粉末,ESI-MS: m/z 459 [M-H]⁻; CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (λ_{\max} nm) -9.7 (236), -3.1 (276), +1.0 (309), -0.8 (372) (图 2)。¹H NMR (CD₃COCD₃)谱信号有: δ 13.47 (1H, br s), 12.78 (1H, br s), 7.13 (1H, br s), 6.74 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.33 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.27 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.24 (1H, s), 6.16 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 3.32 (1H, d, $J = 18.3$ Hz), 3.13 (1H, d, $J = 18.3$ Hz), 2.45 (3H, s), 1.67 (3H, s), 1.64 (3H, s), 1.59 (3H, s); ¹³C NMR (CD₃COCD₃)谱信号有: δ 191.0 (s), 165.9 (s), 165.4 (s), 157.9 (s), 157.2 (s), 155.2 (s), 152.7 (s), 150.6 (s), 142.2 (s), 136.2 (s), 123.7 (s), 117.6 (d), 114.1 (s), 111.4 (s), 110.1 (d), 107.3 (s), 106.5 (d), 101.2 (d), 100.9 (d), 97.9 (s), 65.1 (d), 40.1 (t), 38.6 (s), 33.3 (q), 33.1 (q), 27.0 (q),

18.6 (q)。以上数据与文献^[3,4,7]数据基本一致,确定化合物**2**为(-)-(6*R*,16*R*)-ABX (图 1)。

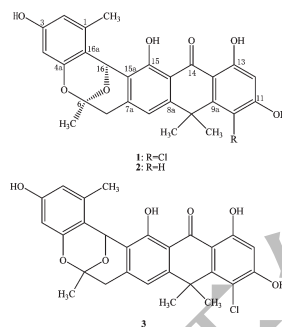


图 1 化合物**1**、**2**和**3**的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds **1**, **2** and **3**

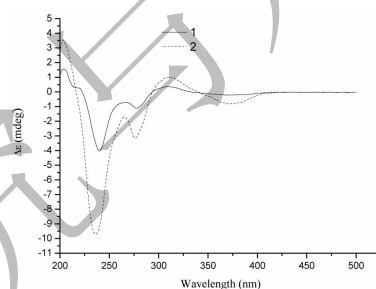


图 2 化合物**1**和**2**的 CD 光谱

Fig. 2 CD spectra of compounds **1** and **2**

表 1 化合物**1**和**3**的氢谱和碳谱

Table 1 ¹H (400 MHz) and ¹³C (100 MHz) NMR data of **1** and **3**

位置 Position	1 ^a			3 ^b	
	δ_H (J in Hz)	δ_C	HMBC	δ_H (J in Hz)	δ_C
1		136.2 (s)			137.5 (s)
2	6.28 d (2.5)	110.1 (d)	C3, C4, C4a, C16a, C19	6.25 d (2.5)	110.4 (d)
3		157.2 (s)			155.9 (s)
4	6.17 d (2.5)	100.9 (d)	C2, C3, C4a, C16a	6.21 d (2.5)	101.6 (s)
6		97.9 (s)			98.4 (s)
7	3.15 d (18.1)	40.1 (t)	C6, C7a, C8, C15a	3.15 d (18.0)	40.8 (t)
	3.34 d (18.1)		C6, C7a, C8, C15a, C18	3.23 d (18.0)	
8	7.13 s	118.2 (d)	C7, C9, C14, C14a, C15a	6.82 s	117.6 (d)
9		39.8 (s)			39.8 (s)
10		112.1 (s)			111.1 (s)
11		161.8 (s)			159.2 (s)
12	6.61 s	102.8 (d)	C10, C11, C13, C13a	6.63 s	103.4 (d)
13		164.8 (s)			165.0 (s)
14		191.3 (s)			191.5 (s)
15		156.8 (s)			157.9 (s)
16	6.24 s	65.0 (d)	C4a, C6, C7a, C15, C15a, C16a, C19	6.30 s	65.6 (d)

续表 1 Continued Tabl. 1

位置 Position	1 ^a			3 ^b	
	δ_H (J in Hz)	δ_C	HMBC	δ_H (J in Hz)	δ_C
4a		152.6 (s)			152.8 (s)
7a		142.9 (s)			142.9 (s)
8a ^c		153.0 (s)			152.8 (s)
9a ^c		149.1 (s)			149.1 (s)
13a		108.4 (s)			109.8 (s)
14a		110.1 (s)			110.6 (s)
15a		123.3 (s)			123.4 (s)
16a		113.9 (s)			115.5 (s)
18	1.64 s	27.0 (q)	C6, C7	1.72 s	27.7 (q)
19	2.44 s	18.6 (q)	C1, C2, C16a	2.45 s	19.5 (q)
20	1.99 s	27.8 (q)	C8a, C9, C9a, C21	1.92 s	28.9 (q)
21	1.91 s	28.1 (q)	C8a, C9, C9a, C20	1.85 s	29.1 (q)
13-OH	13.38 s		C12, C13, C13a	13.49 s	
15-OH	13.29 s		C15, C15a, C14a	13.20 s	

注:^a 氘代试剂为氘代丙酮;^b 氘代试剂为氘代氯仿;^c 可能互换。

Note:^aSolvent was deuterated acetone;^bsolvent was deuterated chloroform;^cmay exchange.

以人肺癌细胞 A549、人结肠癌细胞 HCT-116 和人神经瘤细胞 SF-268 为模型,阿霉素为阳性药,采用 CCK-8 法^[8,9]对化合物 **1** 和 **2** 的细胞毒活性进行了初步评价,结果显示化合物 **1** 和 **2** 对 A549、HCT-116 和 SF-268 三种肿瘤细胞表现出较弱的细胞毒活性,活性结果见表 2。

表 2 化合物 **1**、**2** 和阿霉素对选定的人肿瘤细胞系的细胞毒活性Table 2 Cytotoxic activity of **1**, **2** and doxorubicin against selected human tumor cell lines

人肿瘤细胞系 Human tumor cell lines	IC ₅₀ (μM)		
	1	2	Doxorubicin
A549	77.2	112.9	2.49
HCT-116	36.7	70.8	1.76
SF-268	55.4	85.4	0.12

依照美国临床实验室标准委员会 (CLSI),使用庆大霉素作为阳性药,采用常量肉汤稀释法测定化合物 **1** 和 **2** 的对绿浓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA),金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA),枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*, BS) 和耐甲氧西林金

黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的最低抑菌浓度 (MIC) 以评估其抗菌活性。结果表明化合物 **1** 和 **2** 对 PA、SA、BS 和 MRSA 表现出中等强度的抗菌活性,结果见表 3。

表 3 化合物 **1** 和 **2** 的抗菌活性Table 3 The antimicrobial activity of **1** and **2** against selected organisms

菌株 Strain	MIC (mg/mL)		
	1	2	庆大霉素 Gentamicin
PA	16	20	0.4
SA	0.8	1.2	0.1
BS	0.2	0.4	0.01
MRSA	0.5	0.8	0.5

3 结论

对链霉菌 *Streptomyces* sp. HS-NF-496 的次级代谢产物进行了研究,分离得到两个化合物,经 1D 和 2D NMR、CD、MS 波谱分析及与文献数据比较,鉴定它们分别为 (-)-(6*R*,16*R*) 10-Cl-ABX (**1**) 和 (-)-(6*R*,16*R*)-ABX (**2**)。对两个化合物的细胞毒活性和抗菌活性评价实验结果表明:化合物 **1** 和 **2** 对 A549 细胞,HCT-116 细胞和 SF-268 细胞表现出较弱的细胞毒活性;化合物 **1** 和 **2** 对 PA、SA、BS 和 MRSA 表现出中等强度的抗菌活性。本文首次报道了化合物 **1** 的绝对构型。

参考文献

- Kojiri K, Nakajima S, Fuse A, *et al.* Antibacterial substance BE-24566B and its manufacture with *Streptomyces*. EP 542234 A1, 1993-05-19.
- Kojiri K, Nakajima S, Fuse A, *et al.* BE-24566B, a new antibiotic produced by *Streptomyces violaceusniger*. *J Antibiot*, 1995, 48: 1506-1508.
- Lam YKT, Hensens O, Helms G, *et al.* L-755, 805, a new polyketide endothelin binding inhibitor from an actinomycete. *Tetrahedr Lett*, 1995, 36: 2013-2016.
- Herath KB, Jayasuriya H, Guan Z, *et al.* Anthrabenoxocinones from *Streptomyces* sp. as liver X receptor ligands and antibacterial agents. *J Nat Prod*, 2005, 68: 1437-1440.
- Kodali S, Galgoci A, Young K, *et al.* Determination of selectivity and efficacy of fatty acid synthesis inhibitors. *J Biol Chem*, 2005, 280: 1669-1677.
- Sanchez L, Jose M, Romero M, *et al.* Protein kinase inhibiting hexacyclic polyketides produced by *Streptomyces* strain AA-98-E-N010GAS. WO 2012010606 A1, 2012-01-26.
- Chen HY, Liu N, Huang Y, *et al.* Isolation of an anthrabenoxocinone 1.264-C from *Streptomyces* sp. FXJ1.264 and absolute configuration determination of the anthrabenoxocinones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2014, 25: 113-116.
- Wang JD, Zhang H, Yang XH, *et al.* HS071, a new furan-type cytotoxic metabolite from *Streptomyces* sp. HS-HY-071. *J Antibiot*, 2008, 61: 623-626.
- Wang JD, Zhang H, Ying LP, *et al.* Five new epothilone metabolites from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2. *J Antibiot*, 2009, 62: 483-487.
- Cockerill FR, Hindler JA, Wikler MA, *et al.* Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard M07-A9, Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- Cao WG (曹纬国), Tao YD (陶燕铎). The comparison of the five kinds of anthraquinone derivatives contents in *Rheum tanguticum* of the different growing periods. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2008, 25: 404-406.
- Yu S (俞森), Zhang H (张浩), Liu XF (刘显福). Comparison of contents of emodin and chrysophanol in *Rheum palmatum* L. in different growing periods and by distinctive cultivated method. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2005, 20: 221-223.
- Che GD (车国冬), Li YL (李玉林), Wang LY (王凌云). Seasonal change of anthroquinone content in cultivated *Rheum tanguticum*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2006, 26: 2378-2382.
- Li YL (李玉林), Che GD (车国冬), Suo YR (索有瑞). Comparative analysis of anthraquinones content between cultivated and wild *Rheum tanguticum*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 469-472.
- Song SP (宋平顺), Jin XJ (晋小军), Zhao JB (赵建邦). Influence on content of anthraquinones, phenolic acids by different processing methods in Rhubarb. *Mod Chin Med* (中国现代医药), 2012, 14: 46-49.
- Dai WY (代婉莹), Sun WH (孙维宏), Mao SJ (毛淑杰). Study on processing methods in *R. palmatum* L. *Chin J Exp Tradit Med Formu* (中国实验方剂学), 2010, 16: 90-93.
- Li Y (李芸), Miao XL (苗小楼), Wu PA (吴平安). Influences of different initial processing methods on *Rheum palmatum*. *China J Med Mater* (中药材), 2011, 34: 1196-1199.
- Tang WW (唐文文). Studies on drying methods and quality keep storage conditions of Radix Et Rhizoma Rhei. Gansu: Gansu Agriculture university (甘肃农业大学), MSc. 2012.
- Tang WW (唐文文), Li GQ (李国琴), Song PS (宋平顺). Study on drying methods of *Rhei Radix et Rhizoma*. *Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, 44: 424-429.

(上接第 1665 页)