

粘质沙雷氏菌 S823 次生代谢产物及其抗肿瘤活性研究

朱琳妍¹, 庞翠萍², 朱向东³, 陈鲤群^{1*}

¹福州大学生物科学与工程学院, 福州 350116;

²江南大学生物工程学院, 无锡 214122; ³江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045

摘要:为从土壤中筛选得到能转化甾体化合物和产生具有抑制肿瘤生长的活性化合物菌株, 并分离鉴定出活性化合物。利用胆固醇作唯一碳源筛选, 通过形态观察、生理生化测试, 以及 16S rRNA 基因序列同源性分析来确定筛选菌株。以 Neuro-2a 细胞(小鼠神经瘤细胞)作为供试细胞, 通过活性跟踪, 用柱层析法分离活性成分, 经波谱方法鉴定产生的活性物质等方法。结果表明从土壤中筛选得到一株菌株具有抑制肿瘤生长的活性; 此菌株与粘质沙雷氏菌属(GenBank No. 序列号为 KR817904.1) 相似性为 99%, 命名为粘质沙雷氏菌 S823; 活性化合物为灵菌红素, 其对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B) 的抑制率是 $67.7 \pm 2.9\%$, 对含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SHP2) 抑制率为 $56.7 \pm 0.4\%$, 对 Neuro-2a 细胞有抑制作用, 其 IC_{50} 是 $0.05 \mu\text{M}$ 。灵菌红素是具有抗肿瘤活性的化合物。

关键词:生物转化; 抗肿瘤活性; 粘质沙雷氏菌; 7 β -羟基胆固醇; 灵菌红素

中图分类号: Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)2-0191-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.2.002

Secondary metabolites of *Serratia marcescens* S823 and antitumor activities

ZHU Lin-yan¹, PANG Cui-ping², ZHU Xiang-dong³, CHEN Li-qun^{1*}

¹College of Bioscience and Bioengineering, Fuzhou University, Fuzhou, 350116, China

²College of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China

³College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, 330045, China

Abstract: In order to screen strains which can produce secondary metabolites of inhibition of tumor growth, and isolate and identify active compounds, cholesterol was used as the sole source of carbon to screen strains from soil. The active components of the strain S823 were separated by chromatography and structure of them was identified by spectrum analysis. The strain was determined according to morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16 s rRNA gene sequence homology analysis. The test results showed that the strain extract could inhibit Neuro-2 a cell (mice glioma cells) growth. The compound was isolated by column chromatography and its structure was identified as prodigiosin base on analysis of MS and ¹H-NMR and ¹³C NMR. The strain S823 was analyzed by morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA sequence analysis. GenBank No. is KR817904.1. The similarity of it is 99% to *Serratia marcescens*. The inhibition rate of prodigiosin against cell cycle protein 25 B (CDC25B) was $67.7 \pm 2.9\%$, the inhibition rate was $56.7 \pm 0.4\%$ against the protein tyrosine phosphatase containing structure domain of SH2 (SHP2). It has the inhibition effect on the Neuro-2 a cells, the value of IC_{50} was $0.05 \mu\text{M}$.

Key words: biotransformation; antitumor activity; *Serratia marcescens*; 7 β -hydroxycholesterol; prodigiosin

甾体化合物通过微生物转化产生了新的产物, 表现出抗肿瘤、抗菌等活性。匍匐根霉产生的孕烯醇酮转化产物对酪氨酸酶和胆碱酯酶的抑制活性明显高于母化合物^[1]。1943年 Turfitt^[2,3]发现微生物

能够降解胆固醇并生成 C-19 的甾体激素。利用生物转化技术能够得到前体所不具有的新特性化合物^[4-6]。微生物的次生代谢产物也是抗肿瘤、抗菌等多种生物活性成分的来源。这些次生代谢产物具有重大的药用价值, 引起学者们强烈兴趣。一些学者从沙雷氏菌和链霉菌属细菌中分离到由 3 个吡咯环形成一个大的共轭体系构成分子骨架的抗菌活性成分^[7,8], 由 *Serratia marcescens* 产生的 Prodigiosin 能抗

收稿日期: 2018-06-06 接受日期: 2018-11-19

基金项目: 江西省教育厅科技计划 (GJJ170286); 国家自然科学基金 (21366012)

* 通信作者 Tel: 86-018106973597; E-mail: chenliqunair@hotmail.com

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌^[9], Undecylprodiginine 及其合成的衍生物 23-hydroxyundecylprodiginine 和 2-ketoundecylprodiginine 具有强烈抗疟原虫作用^[10], 以及从链霉菌属和沙雷氏属一些菌中分离出的 Prodigiosin 25-C 有免疫^[11]和抗肿瘤活性^[12]。

我们以胆固醇为唯一碳源筛选到一株菌株, 该菌株能将胆固醇转化为 7 β -羟基胆固醇(7 β -HC), 目前没有文献报道。在此基础上, 我们发现该菌提取物对 Neuro-2a 细胞(小鼠神经瘤细胞)有抑制作用, 通过活性追踪, 分离到活性成分灵菌红素, 发现灵菌红素对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B) 和含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SHP2) 这 2 个靶标蛋白具有强的抑制活性。SHP2 的表达可以抑制肿瘤细胞的生长, 此项研究在快速有效分离微生物中抗肿瘤活性成分方面是一种创新。大部分的 SHP2 细胞是通过靠近细胞膜促进酪氨酸的磷酸化而影响细胞生长, 这些重要结论有助于抗肿瘤药物筛选, SHP2 是潜在的靶分子。CDC25B 在分裂的 M 和 G1 期存在于细胞核中, 而到 S 期和 G2 期转移到细胞质中, CDC25B 具有原癌基因性质, 寻找到特异高效的抑制剂对癌症研究提供新的工具和手段。灵菌红素抑制 Neuro-2a 细胞(小鼠神经瘤细胞)的 IC₅₀ 值是 0.05 μ M, 此项研究为微生物资源利用, 以及抗肿瘤药物研发提供科学依据。

1 仪器和材料

1.1 菌种来源

土样: 采用同一地区多点取样, 于 2016 年 5 月取自云南省昆明市市郊玉米田间红壤土。

菌种: 以胆固醇为唯一碳源筛选得到。

1.2 培养基

富集培养基(g/L): 土豆 200、葡萄糖 20、酵母膏 3, pH7.0。

筛选培养基(g/L): 胆固醇 0.5 + 吐温 80、MgSO₄ 0.25、K₂HPO₄ 0.25、FeSO₄ · 7H₂O 0.001、NaCl 0.05、CaCl₂ 0.001、琼脂粉 15, pH7.0。

斜面培养基(g/L): 牛肉膏 3、蛋白胨 10、NaCl 5、琼脂粉 15, pH7.0。

种子液培养基(BPDAg/L): 牛肉膏 3、蛋白胨 10、NaCl 5, pH7.0。

转化培养基(g/L): 酵母膏 5、MgSO₄ 0.25、K₂HPO₄ 0.25、FeSO₄ · 7H₂O 0.001、NaCl 0.05、CaCl₂ 0.001, pH7.0。

初始发酵培养基(BPDAg/L): 牛肉膏 3、蛋白胨

10、NaCl 5, pH7.0。

1.3 供试细胞

Neuro-2a 细胞(小鼠神经瘤细胞), 来自江西农业大学生物科学与工程学院细胞生物学实验室所保存的细胞株。

1.4 试剂

胆固醇、氯仿、甲醇、石油醚、丙酮(国药集团); GF₂₄₅ 硅胶层析板(青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH20(Pharmacia 公司, 美国)。

胎牛血清(杭州四季青); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液、DMSO、MTT、PBS 磷酸缓冲液干粉、DMEM 高糖培养(北京索莱宝公司)。

1.5 仪器

PCR 反应扩增仪(BBI 公司, 加拿大); 高效液相色谱仪, Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5.0 μ m)(waters 公司, 美国); Agilent G6220A 质谱仪(Agilent, 美国); Avance 600 核磁共振仪(Bruker 公司, 瑞士), RT-6000 酶标仪(深圳雷杜)

2 实验方法

2.1 菌种初筛

取 1 g 土样放入装有 50 mL 已灭菌无菌水的三角瓶中, 置于摇床振荡半小时, 取土样水溶液 1 mL 于富集培养基中, 28 ~ 30 $^{\circ}$ C、180 rpm 的摇床中培养 24 h, 从富集培养基中取 200 μ L 加入到 50 mL 液体筛选培养基中, 180 rpm、30 $^{\circ}$ C 震荡培养 48 h, 共进行 3 次转移培养, 然后取 100 μ L 稀释度为 10⁻⁶ 的菌液涂布于以胆固醇为唯一碳源的固体筛选培养基上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养。菌落长出后根据形态挑取单菌落, 在筛选培养基上纯化两次后将菌株转移至斜面上培养, 编号并保藏。

2.2 复筛

将初筛得到的菌种接种于装有 50 mL 已灭菌发酵液的 250 mL 三角瓶中, 180 rpm, 28 ~ 30 $^{\circ}$ C、摇床培养 24 h 后投入 20 mL 0.5 g/L 的胆固醇吐温 80 乳化液, 相同条件下继续发酵培养 4 ~ 7 天。发酵液离心或过滤并用氯仿萃取, 萃取液浓缩到一定体积, 用硅胶板作薄层层析(TLC)进行检测分析, 根据检测结果, 筛选出具有转化胆固醇能力的菌株。

2.3 胆固醇转化产物的分离

转化发酵液离心后, 将上清液与菌体分开, 上清液浓缩至一定体积后用等体积氯仿反复萃取 3 次, 然后用真空旋转蒸发仪 50 $^{\circ}$ C 浓缩, 用少量硅胶拌样, 干燥后用 100 g 200 ~ 300 目硅胶装柱, 用甲醇:

氯仿 = 0 ~ 25% 洗脱, 每 30 mL 收集一流份, 根据 TLC 检测。对含转化产物用 Sephadex LH-20 进行凝胶色谱, 甲醇: 氯仿 = 1:1 洗脱, 再用 Rp-C₁₈ 反相色谱, 水: 甲醇 = 30:70% ~ 95:5% 洗脱, 产物经波谱鉴定。

2.4 抑制肿瘤细胞活性检测

采用 MTT 法以 Neuro-2a 细胞 (小鼠神经瘤细胞) 作为供试细胞, 通过对洗脱流份抗肿瘤活性检测, 对含活性成的样品进行色谱分离, 对分离到的活性化合物测定 IC₅₀ 值。

取在培养瓶中贴壁生长状态良好的细胞, 弃去废培养基, 每瓶加入 PBS 磷酸缓冲液, 洗涤一遍弃去, 除去衰老的细胞, 每瓶 (25 cm²) 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化, 观察到培养瓶贴壁面有呈块细胞离散开来, 弃去消化酶液, 加入一定量的 10% 胎牛血清培养基配成 3×10^4 的细胞混悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L 细胞悬液, (注意孔板周围一圈孔不加, 而用 PBS 填充), 待到细胞长到 80%, 弃去原来的培养基, 加入供试样品溶液, 浓度为 80 μ g/mL, 每孔 100 μ L, 同时用完全培养基作为空白对照, 阳性参照化合物为阿霉素, 溶剂对照 (DMSO 的浓度与最高浓度实验组中的 DMSO 的含量相当), 每个实验组设立 3 个平行, 放入培养箱中培养 24 h, 弃去培养基, 加入 100 μ L 10% MTT 的完全培养基, 作用 4 h, 移去上清液, 加入 150 μ L DMSO, 摇床震荡 30 min, 待甲管产物完全溶解后, 用酶标仪在 490 nm 条件下测定 OD 值。根据公式(1)计算各组浓度组的细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - (\text{OD 实验组} - \text{OD 空白对照组}) / (\text{OD 溶剂对照组} - \text{OD 空白对照组}) \times 100\%$$

IC₅₀ 值计算, 根据测试活性剂量依赖关系, 设 5 个浓度梯度, 1、10、20、30、40 μ g/mL, 通过样品活性对样品浓度进行非线性拟和得到, 计算所用软件为 Graphpad Prism 4, 拟合所使用的模型为 Sigmoidal dose-response (variable slope)。

2.5 抗肿瘤活性成分分离

经过 48 h 发酵培养, 发酵液合计 2 L, 经过离心去除上清液后, 菌体用丙酮超声波进行浸提 20 min, 反复浸提 3 次, 过滤, 用真空旋转蒸发仪在 50 $^{\circ}$ C 下浓缩得浸膏, 用氯仿溶解, 用适量硅胶拌样, 干燥后进行硅胶柱层析, 根据 TLC 检测, 合并有相同组分的流份, 以 Neuro-2a 细胞作为供试细胞, 对洗脱流份进行抗肿瘤活性检测。上清液用氯仿萃取、浓缩

后, 得到的固体物质质量很少, 未做进一步实验。

2.6 转化产物和抗菌活性成分的结构鉴定

分离纯化的产物采用质谱和核磁共振波谱进行测定, 溶剂为氘代氯仿, TMS 作为内标。

2.7 菌种鉴定

2.7.1 形态及生理生化测定

通过形态学观察菌株在斜面培养基及筛选培养基上的菌落形态, 电镜观察细胞形态, 对菌株进行相关生理生化实验, 参照东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》^[13] 进行鉴定。

2.7.2 16S rDNA 基因的克隆与测序

① 基因组的提取: 利用上海生工生物工程技术服务公司的 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒进行提取。

② 以 primerA (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3') primerB (5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3') 为上下游引物扩增菌株的 16S rDNA。PCR 反应体系 (25 μ L): 0.5 μ L Template (基因组 DNA 20 ~ 50 ng/ μ L), 0.5 μ L PrimerA (10 uM), 0.5 μ L PrimerB (10 uM), 1 μ L dNTP mix (2.5 Mm each), 2.5 μ L 10 \times Buffer (with Mg²⁺), 0.2 μ L 酶 (5 u/ μ L), 加水至 25 uL。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min, 循环 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 S, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 延伸 10 min。扩增的 16S rDNA 纯化后由上海生工有限公司直接测序。

③ 将序列上传到 GenBank 中进行比对, 调取沙雷氏菌属 (*Serratia*) 12 个标准菌株的 16S rDNA 序列, 进行系统发育学分析。16S rDNA 序列用 MEGA (6.0) 软件排序, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 用 Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 计算自引导值 (Bootstrap, 1000 次重复) 以评估系统发育树的置信度。

2.8 提取物抑制细胞周期分裂蛋白 25B 和含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SHP2) 活性测定

采用荧光底物 OMFP, 经 CDC25B 去磷酸化后得到的产物 OMF 在被 485 nm 激发光激发后可发射出波长为 530 nm 的可检测的荧光信号, 从而观察酶的活性变化, 以及化合物对其的抑制情况。阳性参照化合物为 Na₃VO₄。

3 结果与分析

3.1 筛选结果

复筛得到 16 株呈深红色、圆形光滑形态的菌株, 挑选一株, 经过发酵培养, 离心后上清液用氯仿

萃取,并用硅胶板薄层层析法(TLC)检测,展开剂为石油醚:丙酮 = 7:3(v/v),用10%的H₂SO₄乙醇溶液作为显色剂。样品用上述展开剂展开,喷雾、加热显色。发现这些菌株都能够转化胆固醇。其中一株菌,经上述实验,结果如图1。

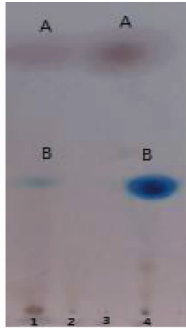


图1 菌株发酵转化产物 TLC 检测

Fig. 1 TLC of strain of transformation

注:1. 接菌种的转化培养液;2. 未接菌种的转化培养液;
3. 胆固醇标准品(A);4. 分离纯化的7β-羟胆固醇(B)。

Note: Lane 1 is the bioconversion medium with inoculated strain;

Lane 2 is the bioconversion medium without inoculated strain;

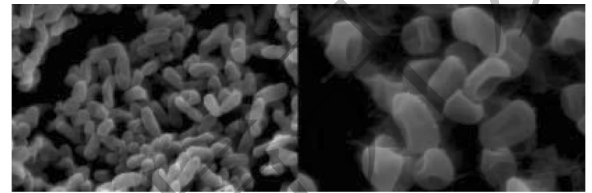
Lane 3 is cholesterol (A); Lane 4 is 7β-dihydroxycholesterol

(B) separated from the extract of the strain S823.

3.2 菌株鉴定

3.2.1 菌落形态特征

菌株 S823 为革兰氏阴性短杆菌,电镜显示大小约大小为(1~1.3) μm × (0.7~1.0) μm,如图2所示,无荚膜,无芽孢,周生鞭毛。30 °C 在平板上培养 36 h,菌落凸起,呈圆形光滑状,湿润,中心不透明,边缘整齐,深红色,易挑取,培养时间超过 72 h,菌落易成树枝状,边缘不规则。在液体培养基中混浊,形成菌膜,在筛选平板上呈粉红色不透明菌落。



A: 12000×

B: 30000×

图2 菌株 S823 的电镜图

Fig. 2 Scanning electron micrograph of isolate S823

3.2.2 生理生化实验

通过部分的生理生化试验(表1),结果显示菌株 S823 与粘质沙雷氏菌非常相似。

表1 菌株 S823 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical features of strain S823

项目 Item	标准反应 Standard reaction	结果 Result	项目 Item	标准反应 Standard reaction	结果 Result
脂酶试验 Lipase test	+	+	NH ₄ NO ₃ 利用 Use of NH ₄ NO ₃	+	-
氧化酶 Oxidase	-	-	荧光色素 Fluorochrome Test	-	-
接触酶 Catalase	+	+	麦芽糖发酵产 Maltose fermentation to produce acid	+	+
葡萄糖发酵产酸 Glucose fermentation to produce acid	+	+	蔗糖发酵产酸 Sucrose fermentation to produce acid	+	-
甘露醇发酵产酸 Mannitol fermentation to produce acid	+	+	甲基红试验 Methyl red test	+	+
乳糖发酵产酸 Lactose fermentation to produce acid	-	-	牛奶分解 Decomposition of milk	+	+
吲哚试验 Indol test	-	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+
淀粉分解 Amylolytic	-	-	V-P 测定 V-P test	D	+
产 H ₂ S Producing H ₂ S	-	-	葡萄糖酸盐氧化 Oxidation of gluconate	+	+
产氨试验 Producing NH ₃ test	-	-	柠檬酸盐利用 Use of citrate	+	+
乙醇氧化 Oxidation of ethanol	D	-	(NH ₄) ₂ SO ₄ 利用 Use of (NH ₄) ₂ SO ₄	+	+

续表 1 (Continued Tab. 1)

项目 Item	标准反应 Standard reaction	结果 Result	项目 Item	标准反应 Standard reaction	结果 Result
KNO ₃ 利用 Use of KNO ₃	-	-	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 利用 Use of (NH ₄) ₂ HPO ₄	-	+

注:“+”90%以上菌株阳性,“-”90%以上菌株阴性,“D”不同分类单位中的反应不同。

Note:“+”over 90% showing the positive bacteria strains;“-” over 90% showing the negative bacteria strains;D represent the different reaction in the different taxonomic unit.

3.2.3 16S rDNA 鉴定

16S rDNA 测序结果表明,16S rDNA 序列有 1434 个碱基(如下),在 Genebank 中进行比对分析,并绘制系统发育树,见图 3,确定该菌株为粘质沙雷氏菌属,并命名为 *Serratia marcescens* sp. S823,上传序列号为 KR817904.1。

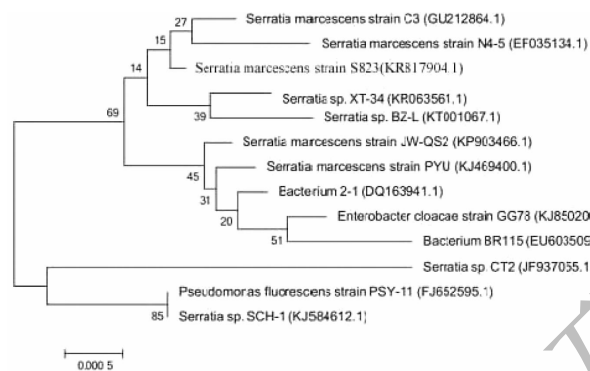


图 3 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S r RNA sequences of selected strains. Numbers in parentheses represent the sequences paccession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by boot strap. Bar,0.5% sequence divergence

3.3 转化产物分离

转化发酵液合计 1 L,离心后,上清液浓缩至一定体积后,用等体积氯仿反复萃取 3 次,合并萃取液,真空浓缩,经硅胶柱、凝胶柱、反相柱色谱进行分离,得到了化合物 1,称重 83 mg。

3.4 抗肿瘤活性物质的分离

经过 48 h 发酵培养,发酵液合计 2 L,离心后,菌体用丙酮超声波进行浸提、浓缩得浸膏,用氯仿溶解,用适量硅胶拌样,干燥后用 200 克 200~300 目硅胶装柱(5×80),氯仿:甲醇=100:0~70:30 洗脱,每瓶收集 50 mL,共 22 个流份,根据 TLC 检测,展开剂为石油醚:丙酮=7:3(v/v),10%的 H₂SO₄ 乙醇溶液作为显色剂。样品展开后,喷雾、加热显色。合并有相同组分的流份,得到 7 个部分 F₁-F₇,浓缩干燥后用 DMSO 溶解,用蒸馏水配成 80 μg/mL

溶液,DMSO 在最终体系中浓度控制在不影响检测活性的范围之内。经抑制肿瘤实验,F₃ 显示了对 Neuro-2a 细胞有抑制作用(图 4)。TLC 显示,F₃ 只有一个红点,这表明 F₃ 可能是一个纯的化合物,其纯度用 HPLC 进行检测。F₃ 真空干燥后,得到了化合物 2,称重 62 mg。准确称取化合物 2 样品 3.6 mg 用乙腈定容至 10 mL,配制成 0.36 mg/mL 的溶液,取 10 μL 溶液进样进行 HPLC 测定。分析条件如下:色谱柱:Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5.0 μm);温度:35℃;流速:0.45 mL/min;检测:RI2000 示差检测器;流动相 A:乙腈=10%,流动相 B:水=90%。出峰时间为 8.931 min,其峰面积比接近 99%,说明其纯度达到 99%(图 4)。F₁-F₂ 和 F₄-F₇ 对 Neuro-2a 细胞没有抑制作用,没有进一步分离。

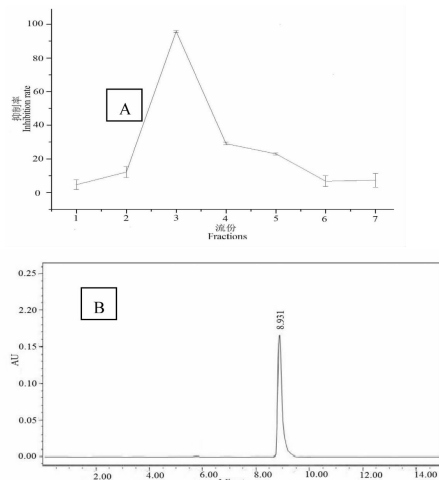


图 4 菌株 S823 提取物柱层析洗脱组份对 Neuro-2a 细胞的抑制率(A)和 F₃(化合物 2)HPLC 图(B)

Fig. 4 The inhibition rate of different parts of the extract of the strain S825 against Neuro-2a cell (A) and the HPLC spectrum of F₃(compound 2)(B)

2.5 化合物鉴定

化合物 1 无色固体;¹H NMR(CDCl₃, 600 MHz),δ:0.69(s,3H)、0.86(d,3H,J=2.4)、0.87(d,3H,J=3.0)、0.93(d,3H,J=6.6)、1.05(s,

3H), δ 5.28 (1H, s, H-6), δ 3.54 (m, 1H, 3- β OH), 3.84 (d, 1H, 7- β OH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150MHz) δ : 36.9 (t, C-1), 31.6 (s, C-2), 71.4 (d, C-3), 41.7 (t, C-4), 143.5 (s, C-5), 125.5 (d, C-6), 73.4 (d, C-7), 40.9 (d, C-8), 48.3 (d, C-9), 36.4 (d, C-10), 21.1 (t, C-11), 28.6 (t, C-12), 42.9 (s, C-13), 55.4 (d, C-14), 26.4 (t, C-15), 39.6 (t, C-16), 54.9 (d, C-17), 11.8 (q, C-18), 19.2 (q, C-19), 35.7 (d, C-20), 18.7 (q, C-21), 36.2 (t, C-22), 23.9 (t, C-23), 39.5 (t, C-24), 28.0 (d, C-25), 22.6 (q, C-26), 22.8 (q, C-27)。数据与文献中的报道基本一致^[14], 由此, 可判断该化合物为 7 β -羟基胆甾醇(7 β -hydroxycholesterol, 7 β -HC)。

化合物 2 红色固体; UV (MeOH) λ_{max} 535; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz), δ : 12.55 (s, NH), 12.70 (s, NH), 7.22 (s, 1H, H-2), 6.35 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-3), 6.91 (m, 1H, H-4), 6.08 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-8), 6.94 (m, 1H, H-12), 6.67 (s, 1H, H-14), 4.00 (s, 3H, O-Me), 2.38 (t, 2H, H-18), 2.54 (s, 3H, H-15), 1.2-1.4 (m, 6H, H-19-21), 0.89 (t, 3H, H-22); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz), δ : 126.9 (C-2), 111.7 (C-3), 117.0 (C-4), 122.2 (C-5), 147.7 (C-7), 92.8 (C-8), 165.5 (C-9), 120.7 (C-10),

58.7 (C-1), 116.0 (C-12), 125.1 (C-13), 128.5 (C-14), 128.5 (C-15), 147.0 (C-16), 12.4 (C-17), 25.3 (C-18), 29.8 (C-19), 30.6 (C-20), 22.5 (C-21), 14.1 (C-22); ESI-MS: m/z 324.3 [M + H]⁺ ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$)。数据与文献报道的灵菌红素 (prodigiosin) 一致^[15], 确定为灵菌红素, 结构为 (5[(3-methoxy-5-pyrrol-2-ylidene-pyrrol-2-ylidene)-methyl]-2-methyl-3-pentyl-1H pyrrole) (见图 5)。

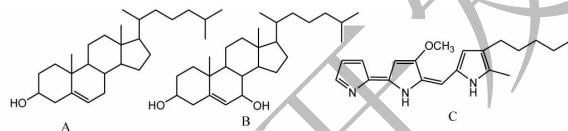


图 5 底物、转化产物和次生代谢活性产物结构式

Fig. 5 Structures of substrate and biotransformation product and activity compound

注: 化合物 A: 胆固醇, B: 7 β -羟基胆固醇, C: 灵菌红素。

Note: Compound A, Cholesterol; B, 7 β -hydroxycholesterol; C, prodigiosin.

3.6 灵菌红素抑制 CDC25B 和 SHP2 活性测定

实验以 Na_3VO_4 作为对照样品, 实验结果显示, 灵菌红素对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B) 和含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SHP2) 有抑制活性, 而 7 β -羟基胆甾醇对这 2 个靶标蛋白没有抑制活性 (表 2)。

表 2 活性化合物对 CDC25B 和 SHP2 的抑制

Table 2 Inhibition of compounds against CDC25B and SH2

ID	样品名称 Sample	浓度 Conc ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	类型 Type	CDC25B	SHP2
1	Prodigiosin	20	% Inhibition	67.7 \pm 2.9%	56.7 \pm 0.4%
2	7 β -HC	20	% Inhibition	24.2 \pm 1.90%	1.07 \pm 0.01%
	Na_3VO_4		IC ₅₀	0.68 \pm 0.04 μM	9.05 \pm 0.45 μM

3.7 抑制肿瘤细胞 IC₅₀ 值测定

以 Neuro-2a 细胞作为供试细胞, 根据测试活性剂量依赖关系, 测定了灵菌红素 5 个浓度梯度, 1、10、20、30、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 Neuro-2a 细胞的抑制率分别为 29.9%、41.9%、55.2%、68.5%、81.8%, 通过样品活性对样品浓度进行非线性拟和得到, 测得 IC₅₀ 为 0.05 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

4 结论

在本研究中, 我们通过微生物转化, 首次用筛选的粘质沙雷氏菌转化得到 7 β -羟基胆甾醇, 此化合物有重要的生物活性, 其对体外培养的增殖分化的

细胞及肿瘤细胞具有细胞毒性作用, 诱导细胞凋亡, 而对非增生的、缓慢分裂的神经元和星形胶质细胞, 没有毒性作用^[16]。并从该菌中分离得到灵菌红素, 此代谢产物对细胞周期分裂蛋白 25B (CDC25B) 和含 SH2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SHP2) 有强的抑制活性, 这是我们首次报道灵菌红素对这两种靶标有抑制作用。灵菌红素广泛的生物活性, 包括抗菌活性^[9]、抗疟疾活性^[10,17]、免疫抑制活性^[11,18], 以及抗肿瘤活性^[19,20] 激发国内外学者强烈兴趣。一些学者对不同环境产灵菌红素菌株筛选^[9]、灵菌红素的合成和结构进行了研究^[20]。这些研究成果可

为开发利用微生物,研制抗肿瘤药物提供科学依据。

参考文献

- 1 Nighat S. Microbial biotransformation of bioactive and clinically useful steroids and some salient features of steroids and biotransformation [J]. *Steroids*, 2018, 136:76-92.
- 2 Turfitt GE. The microbiological degradation of steroids: The sterol content of soils [J]. *Biochem J*, 1943, 37:115-117.
- 3 Turfitt GE. Microbiological agencies in the degradation of steroids; I. The cholesterol-decomposing organisms of soils [J]. *J Bacteriol*, 1944, 47:487.
- 4 de Padua RM, Meitinger N, de Souza FJ, et al. Biotransformation of 21-O-acetyl-deoxycorticosterone by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* (strain W. 1. 4) [J]. *Steroids*, 2012, 77:1373-1380.
- 5 Sultan S, Noor MZ, Anouar EH, et al. Structure and absolute configuration of 20 β -hydroxyprednisolone, a biotransformed product of prednisolone by the marine endophytic fungus *Penicillium lapidosum* [J]. *Molecules*, 2014, 19: 13775-13787.
- 6 Restaino OF, Marseglia M, De CC, et al. Biotechnological transformation of hydrocortisone to 16 α -hydroxy hydrocortisone by *Streptomyces roseochromogenes* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2014, 98:1291-1299.
- 7 Boonlarpradab C, Kauffman CA, PR Jensen PR, et al. Marineosins A and B, cytotoxic spiroaminals from a marine-derived actinomycete [J]. *Organic Letters*, 2008, 10: 5505-5508.
- 8 Hu DX, Withall DM, Challis GL, et al. Structure, chemical synthesis, and biosynthesis of prodiginine natural products [J]. *Chem Rev*, 2016, 116:7818-7853.
- 9 Marchal E, Uddin MI, Smithen DA, et al. Antimicrobial activity of non-natural prodigiosenes [J]. *RSC Adv*, 2013, 3: 22967-22971.
- 10 Kancharla P, Lu W, Salem SM, et al. Stereospecific synthesis of 23-hydroxyundecylprodiginines and analogues and conversion to antimalarial premarineosins via a rieske oxygenase catalyzed bicyclization [J]. *J Org Chem*, 2014, 79: 11674-11689.
- 11 Lee MH, Kataoka T, HonJo N, et al. *In vivo* rapid reduction of alloantigen-activated CD8 + mature cytotoxic T cells by inhibitors of acidification of intracellular organelles, prodigiosin 25-C [J]. *Immunology*, 2000, 99:243-248.
- 12 Smithen DA, Forrester AM, Corkery DP, et al. Investigations regarding the utility of prodigiosenes to treat leukemia [J]. *Org Biomol Chem*, 2013, 11:62-68.
- 13 Dong XZ, Cai MY. Handbook for identification of common bacterial systems (常见细菌系统鉴定手册) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- 14 Zhao XO. Synthesis of 7- ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol [D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2010.
- 15 Farzaneh A, Ju KS, Jozsef L, et al. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials [J]. *Biotechnol Prog*, 2008, 24:742-747.
- 16 Kupferberg A, Cremel G, Behr P, et al. Differential sensitivity of astrocyte primary cultures and derived spontaneous transformed cell lines to 7 β -hydroxy-cholesterol; effect on plasma membrane lipid composition and fluidity, and on cell surface protein expression [J]. *Molec Cell Biochem*, 1991, 101: 11-22.
- 17 Kancharla P, Kelly JX, Reynolds KA. Synthesis and structure-activity relationships of tambJamines and B-ring functionalized prodiginines as potent antimalarials [J]. *J Med Chem*, 2015, 58:7286-7309.
- 18 Azuma T, Watanabe N, Kobayashi Y. Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride a novel immunosuppressant [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 46:29-37.
- 19 Amangul H, Enera G, Pezilet B, et al. Inhibition effects of 2M3P prodigiosin crude extract on human esophageal carcinoma Eca-109 cells [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:766-770.
- 20 Marchal E, Rastogi S, Thompson A, et al. Influence of B-ring modifications on proton affinity, transmembrane anion transport and anti-cancer properties of synthetic prodigiosenes [J]. *Org Biomol Chem*, 2014, 12:7515-7522.