

# 土壤链霉菌 *Streptomyces ardens* WS-65090 产生的 teleocidin 类化合物及其生物活性研究

张亚妮, 吴兆圆, 万中义, 张志刚, 石丽桥, 方伟, 柯少勇, 王开梅\*

湖北省生物农药工程研究中心, 武汉 430064

**摘要:** 研究土壤链霉菌 *Streptomyces ardens* WS-65090 的次级代谢产物及其生物活性。采用制备高效液相色谱, 从该菌株发酵液的乙酸乙酯提取物中共分离得到 5 个 teleocidin 类化合物, 通过 HR-MS、1D、2D-NMR、IR 等波谱分析、化学转化及与文献报道波谱数据比较等方法将其鉴定为 14-*O*-acetylteleocidin B-2 (1)、14-*O*-acetylteleocidin B-3 (2)、teleocidin B-2 (3)、teleocidin B-3 (4)、teleocidin A-2 (5), 其中化合物 1 为新化合物, 2 为新的天然产物。杀虫活性测试表明化合物 1~5 对草地贪夜蛾、棉铃虫、小菜蛾和蚜虫均具有毒杀活性, 其 LC<sub>50</sub> 值为 36.5 ~ 305.7 μg/mL。体外细胞毒活性实验结果表明化合物 1~5 对 A875、HepG2 和 Marc-145 细胞系具有较强的细胞毒活性, 其 IC<sub>50</sub> 值为 3.08 ~ 18.40 μM。

**关键词:** teleocidin 类化合物; 14-*O*-acetylteleocidin B-2; 14-*O*-acetylteleocidin B-3; 杀虫活性; 细胞毒活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)12-2059-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.12.010

## Teleocidin compounds from the soil-derived *Streptomyces ardens* WS-65090 and their bioactivities

ZHANG Ya-ni, WU Zhao-yuan, WAN Zhong-yi,

ZHANG Zhi-gang, SHI Li-qiao, FANG Wei, KE Shao-yong, WANG Kai-mei\*

Hubei Biopesticide Engineering Research Centre, Wuhan 430064, China

**Abstract:** To investigate the secondary metabolites produced by *Streptomyces ardens* WS-65090 from soil and their bioactivities. Five teleocidin compounds (1-5) were isolated from the ethyl acetate extract of fermentation culture of *S. ardens* strain WS-65090 by preparative HPLC. The compounds were elucidated as new teleocidin analogue 14-*O*-acetylteleocidin B-2 (1), and new naturally occurring teleocidin analogue 14-*O*-acetylteleocidin B-3 (2), and three known compounds teleocidin B-2, B-3 and A-2 (3-5) by extensive spectroscopic analysis, including HR-MS, 1D and 2D NMR, combined with chemical transformation methods and comparison with literature data, etc. Insecticidal activities and cytotoxicity of compounds 1-5 were investigated under laboratory conditions. All compounds showed insecticidal activities against *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella*, and *Aphis craccivora* with LC<sub>50</sub> values from 36.5 to 305.7 μg/mL, and exhibited cytotoxicity against A875, HepG2 and Marc-145 cell lines with IC<sub>50</sub> from 3.08 to 18.40 μM.

**Key words:** teleocidin compounds; 14-*O*-acetylteleocidin B-2; 14-*O*-acetylteleocidin B-3; insecticidal activity cytotoxicity

微生物为药物和农药的开发提供了大量的先导化合物资源。链霉菌属是放线菌的一个主要类群, 链霉菌次级代谢产物结构多样, 生物活性显著, 被认为是许多抗生素的来源和潜在的药物来源<sup>[1]</sup>。近

年来, 从链霉菌中发现了一些具有良好生物活性的代谢产物, 例如, 阿德加霉素 P (aldgamycin P) 是分离自土壤链霉菌 *Streptomyces* sp. KIB-K1 的新大环内脂类化合物, 对金黄色葡萄球菌具有显著的抑制作用, MIC 值为 7.81 μg/mL<sup>[2]</sup>。化合物 endostemonines A ~ J 是首次报道的从一株内生链霉菌属的菌株 BS-1 中分离鉴定出的新天然吡咯-2-羧酸酯衍生物, 对棉蚜具有很强的致死活性, 72 h LC<sub>50</sub> 值为

收稿日期: 2021-04-16 接受日期: 2021-07-05

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0201205); 湖北省农业科技创新中心 (2019-620-000-001-27); 湖北省自然科学基金面上项目 (2019CFB604)

\* 通信作者 Tel: 86-27-59101911; E-mail: kaimei.wang@nberc.com

3.55 ~ 32.00 mg/L<sup>[3]</sup>。

在我们从放线菌中寻找活性代谢产物的过程中,发现一株土壤链霉菌 *Streptomyces ardens* WS-65090 发酵提取物具有较好的杀虫活性,为了明确其活性代谢产物,对其进行了分离纯化,获得了一些 teleocidin 类化合物。Teleocidin 最早是在 1960 年作为有毒物质由地中海链霉菌菌丝体的甲醇提取物中分离出来<sup>[4-6]</sup>,其拥有独特的吡啶内酰胺骨架,有 A-1、A-2、B-1、B-2、B-3 和 B-4 6 种立体构型<sup>[7,8]</sup>,因独特的结构和多样的生物活性而备受关注<sup>[9-11]</sup>。目前,已从微生物中分离出多种 teleocidin 结构相关的化合物,如 lnygbyatoxins A ~ C<sup>[12,13]</sup>、olivoretins A ~ C<sup>[14,15]</sup>、14-O-(N-acetylglucosaminyl) teleocidin A<sup>[16]</sup> 和 2-oxo-teleocidin A1<sup>[17]</sup>。这些化合物表现出重要的生物活性,如皮肤刺激物、肿瘤促进剂和 PKC 激活剂以及细胞毒活性<sup>[12-17]</sup>。本研究报道的新 teleocidin B 类构型的类似物及其杀虫与细胞毒活性,丰富了此类化合物的结构类型及活性,也丰富了链霉菌活性代谢产物类型,为其在农用方面的研究提供了基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

MPC 500 旋光计 (Waltham, USA); 岛津 UV-2600 PC 紫外分光光度计 (Shimadzu, Japan); NICOLET IS50 FT-IR 红外光谱仪 (Thermo Fisher Scientific, USA); Bruker AVANCE 700 核磁共振仪 (TMS 为内标,德国 BrukerBioSpin 公司); Jasco J-810 圆二色光谱仪 (日本分光公司), Waters Xevo TQD UPLC-MS 超高效液质联用 (Waters Corporation, USA); Bruker maXis Q-TOF 高分辨质谱 (Bruker, Germany); Waters 高效液相制备色谱仪器 (Waters2525 泵,带 2767 自动收集系统,2996 二极管阵列检测器,色谱工作站 Masslynx V4.0, Waters, USA); 色谱柱: Sunfire C<sub>18</sub> OBD 制备柱 (19 mm × 250 mm / 10 mm × 250 mm, 5 μm, Waters, USA)。

### 1.2 菌株来源

菌株分离于湖北随县山坡土壤 (2015 年 4 月采样), 编号为 WS-65090, 在 ISP-2 培养基上菌落生长旺盛, 28 °C 下培养 14 天, 菌落直径 7 ~ 8 mm, 颜色为白色, 菌落背面呈淡黄色 (见图 1)。气生菌丝长而直, 表面光滑, 孢子稀少 (见图 2)。将 WS-65090 菌株的 16S rRNA 序列以 AB184864 的登录号筛选到 Gen-Bank, 与 ardens-NBRC 13430 菌株的相似性为

99.57%。通过形态鉴定和 16S rRNA 基因序列分析结果, 将菌株 WS-65090 鉴定为链霉菌属 *Streptomyces ardens* WS-65090 (艰难链霉菌)。菌种现保存于中国典型物保藏中心 (武汉, CCTCC), 登记号为 CCTCCM2020096。

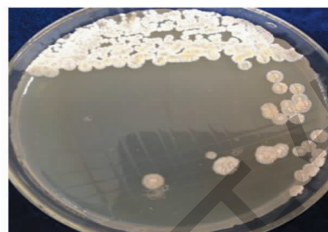


图 1 WS-65090 菌株的平板菌落形态

Fig. 1 Colony morphological characteristics of strain WS-65090

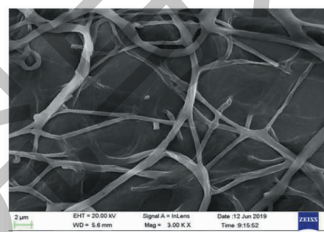


图 2 WS-65090 菌株电镜扫描图片 (Bar 2.0 μm)

Fig. 2 Scanning electron micrograph of strain WS-65090 (Bar 2.0 μm)

### 1.3 供试昆虫

草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 初孵幼虫、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 初孵幼虫、小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 二龄幼虫、豆蚜 (*Aphis craccivora*) 均由湖北省生物农药工程研究中心提供。

### 1.4 细胞株

人肝癌细胞株 HepG2、人恶性黑色素瘤细胞株 A875、非洲绿猴肾细胞株 Marc-145 均由湖北省生物农药工程研究中心实验室常规保存培养。

### 1.5 培养基

发酵培养基: ISP-2 液体培养基: 葡萄糖 4.0 g/L, 麦芽提取物 10.0 g/L, 酵母提取物 4.0 g/L, pH 值调至 7.2。

### 1.6 菌株发酵

将 *S. ardens* WS-65090 菌株的斜面菌种接种到含有 100 mL 种子培养基 ISP-2 的 500 mL 锥形瓶中。在 28 °C 下, 以 150 rpm 进行振荡培养。发酵 96 h 后, 在无菌条件下, 将 10% 的种子培养物转移到含有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 锥形瓶中, 在 28 °C 下, 摇床上以 150 rpm 发酵培养 120 h。

## 1.7 提取与分离

将链霉菌 WS-65090 菌株的 10L 发酵液冻干,用乙酸乙酯萃取冻干粉 2 次,合并乙酸乙酯萃取液,过滤并在真空下旋转蒸发得到粗提取物。将粗提物溶解于甲醇、离心,采用反相制备液相色谱进行分离纯化,色谱柱为 Waters Sunfire prep C<sub>18</sub> OBD 柱(19 mm × 250 mm, 5 μm);乙腈(B)和水(A)为流动相,以 24 mL/min 的流速梯度洗脱(0 ~ 2 min, 5% B; 2 ~ 27 min, 5% → 100% B; 27 ~ 32 min, 100% B; 32 ~ 37 min, 100% → 5% B; 37 ~ 40 min, 5% B),采用 PDA 全波长扫描,收集得到 13 个组分(Fr1 ~ Fr13)。其中,组分 Fr4 ~ 13 对草地贪夜蛾、棉铃虫、小菜蛾和蚜虫具有较强的毒杀活性,采用反相制备液相色谱分别对组分 Fr4 ~ 13 进行进一步分离纯化,色谱柱为 Waters Sunfire prep C<sub>18</sub> OBD 柱(19 mm × 250 mm, 5 μm);乙腈(B)和水(A)为流动相,以 24 mL/min 的流速梯度洗脱(0 ~ 2 min, 20% B; 2 ~ 22 min, 20% → 100% B; 22 ~ 26 min, 100% B; 26 ~ 30 min, 100% → 20% B; 30 ~ 33 min, 20% B)。采用 PDA 全波长扫描,由 Fr11 分离到了化合物 **1**(19.08 mg),由 Fr12 获得了化合物 **2**(10.96 mg),由 Fr7 获得了化合物 **3**(28.70 mg),由 Fr8 获得化合物 **4**(16.93 mg),由 Fr5 获得化合物 **5**(10.33 mg)。

## 1.8 杀虫活性测定

采用 24 孔微量盘人工饲料表面涂布法测定了化合物 **1** ~ **5** 对草地贪夜蛾、棉铃虫和小菜蛾幼虫的杀虫活性。首先将每种化合物溶解在甲醇中,并用含 0.1% 吐温-80 的水稀释至 0.25、0.125、0.63、0.031、0.016 mg/mL。将 40 μL 样品溶液转移到 24 孔微量盘人工饲料表面。然后,将 10 只幼虫放入孔中,在 25 °C 下培养。每一种浓度使用 30 只幼虫(每孔 10 只幼虫)。72 h 后,与 85% 阿维菌素阳性对照组和阴性空白对照组比较,目测死亡率,计算致死浓度 50% 值(LC<sub>50</sub>)。

化合物 **1** ~ **5** 对蚜虫的杀虫活性采用浸渍法<sup>[18]</sup>。每一种化合物用 0.1% 吐温-80 乙醇溶液制备成 5 种浓度梯度(0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 mg/mL)。在实验室条件下,将带蚜虫大豆幼苗浸入不同浓度的供试样品溶液 5 s,吸取多余的溶液,然后置于室温培养。每种处理重复 3 次,72 h 后,与阴性对照组和 85% 阿维菌素阳性对照组比较,观察死亡率。然后计算致死浓度 50% 值(LC<sub>50</sub>)。

## 1.9 体外细胞毒活性测定

化合物 **1** ~ **5** 对 HepG2、A875 和 Marc-145 3 种细胞系的体外细胞毒活性采用 MTT 法<sup>[19]</sup>。实验重复 3 次,用统计软件 SPSS16.0 进行数据分析并计算样品的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物结构鉴定

化合物 **1** 白色无定形固体;  $[\alpha]_D^{25}$  -15.3 (c 0.2, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3 446、2 957、2 932、2 870、1 740、1 662、1 455、1 371、1 231、1 044、917  $\text{cm}^{-1}$ ; 其中 3 446、1 740 和 1 662  $\text{cm}^{-1}$  波谱提示了氨基、酯羰基和酰胺羰基的存在。HR-ESI-MS:  $m/z$  494.339 6  $[M + H]^+$  (计算值为 C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 494.337 7), 确定分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 不饱和度为 11。化合物 **1** 的紫外光谱最大吸收值在 236 (3.15), 288 (2.92) nm, 提示和化合物 **3** 较为类似。<sup>1</sup>H NMR 谱显示该化合物在低场区存在 1 个质子信号 [ $\delta_H$  8.22 (1H, br s)], 2 个单独的芳香质子信号 [ $\delta_H$  6.56 (1H, br s) 和 6.81 (1H, s)], 1 个末端双键质子信号 [ $\delta_H$  6.12 (1H, dd,  $J = 17.5, 10.4$  Hz)、5.19 (1H, dd,  $J = 10.5, 1.3$  Hz) 和 5.10 (1H, dd,  $J = 17.4, 1.3$  Hz)], 此外在高场区还有 4 个次甲基质子信号 [ $\delta_H$  4.55 (1H, m)、4.33 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz)、2.65 (1H, m)、2.11 (1H, m)], 4 组亚甲基质子信号 [ $\delta_H$  4.19 (1H, dd,  $J = 11.6, 3.5$  Hz) 和 3.97 (1H, dd,  $J = 11.6, 8.5$  Hz)、3.21 (1H, d,  $J = 17.3$  Hz) 和 3.04 (1H, dd,  $J = 17.3, 4.2$  Hz)、1.88 (1H, m) 和 1.82 (1H, m)、1.88 (1H, m) 和 1.63 (1H, m)], 以及 8 个甲基质子信号 [ $\delta_H$  2.94 (3H, s)、2.09 (3H, s)、1.48 (3H, s)、1.32 (3H, s)、0.98 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz)、0.94 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz)、0.72 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz)、0.60 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz)]。结合<sup>1</sup>H NMR、HSQC 波谱 **1** 的<sup>13</sup>C NMR 谱检测到 30 个碳信号, 包括 2 个羰基信号 ( $\delta_C$  171.4、173.4), 8 个季碳信号 [其中 6 个芳香季碳 ( $\delta_C$  145.8、140.1、137.8、117.8、117.1、113.2), 2 个脂肪族季碳 ( $\delta_C$  40.4、39.8)], 7 个次甲基碳信号 [包括 1 个烯族次甲基 ( $\delta_C$  148.4), 2 个芳香族次甲基 ( $\delta_C$  120.9、107.2), 4 个脂肪族次甲基 ( $\delta_C$  71.3、53.5、38.4、28.7)], 5 个亚甲基碳信号 ( $\delta_C$  113.1、66.2、35.7、34.4、26.9), 8 个甲基信号 ( $\delta_C$  33.2、25.6、28.0、21.8、21.1、19.8、18.8、17.8)。结合上述分析及<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 谱数据结果(见表 1), 推测该化合物可能是含有吡

噪内酰胺核心结构类化合物(见图3),通过与同时分离自该菌的 teleocidin B-2 (**3**)的 $^1\text{H}$  NMR 和 $^{13}\text{C}$  NMR 谱数据对比,发现除了 H-9、H-14、C-9、C-14 和一个 AcO 基团 [ $\delta_{\text{H}}$  2.09 (s)、 $\delta_{\text{C}}$  171.4 (s) 和 21.1 (q)]的信号外,其余原子与化合物 **3** 的一维核磁谱数据非常相似。由此推测化合物 **3** 中 C-14 的羟基单元被 **1** 中的乙酰氧基取代,这一点被 2D-NMR 谱进一步证实。在 **1** 的 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱显示(见图4) H-8 到 H-9、H-9 到 H<sub>2</sub>-14 相关;由 H-14 [ $\delta_{\text{H}}$  4.19 dd

( $J = 11.6, 3.5$ ) 和 3.97 dd( $J = 11.6, 8.5$  Hz)] 与 C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  171.4 s), H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  2.09 s) 与 C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  66.2 t) 之间的 HMBC 相关性表明 C-14 处存在 AcO 基团。二维核磁共振数据 (HSQC、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC 和 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) 的详细数据分析证实了 **1** 的平面结构,并命名为 14-*O*-acetylteleocidin B-2<sub>o</sub>。化合物 **1** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 ([www.trew.ac.cn](http://www.trew.ac.cn))。

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 $^1\text{H}$  NMR (700 MHz) 和 $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz) 数据 (CDCl<sub>3</sub>)

Table 1  $^1\text{H}$  (700 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz) spectral data of compounds **1** and **2** (CDCl<sub>3</sub>)

编号 Position	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1	-	8.22 br s	-	8.49 br s
2	120.9 d	6.81 br s	120.4 d	6.76 br s
3	113.2 s		113.0 s	
3a	117.1 s		116.8 s	
4	145.8 s		145.9 s	
5	107.2 s	6.56 s	106.9 s	6.50 s
6	137.8 s		137.5 s	
7	117.8 s		118.5 s	
7a	140.1 s		138.7 s	
8	34.4 t	3.21 d(17.3) 3.04 dd(17.3, 4.2)	34.3 t	3.18 d(17.3) 3.02 dd(17.3, 4.2)
9	53.5 d	4.55 m	53.3 d	4.53 m
10	-	6.03 s	-	6.03 s
11	173.4 s		173.6 s	
12	71.3 d	4.33 d(10.2)	71.2 d	4.26 d(10.2)
14	66.2 t	4.19 dd(11.6, 3.5) 3.97 dd(11.6, 8.5)	66.3 t	4.21 dd(11.5, 3.5) 3.98 dd(11.5, 8.5)
15	28.7 d	2.65 m	28.8 d	2.62 m
16	19.8 q	0.72 d(6.7)	19.5 q	0.65 d(7.1)
17	21.8 q	0.94 d(6.3)	21.8 q	0.92 d(6.3)
18	33.2 s	2.94 s	33.4 s	2.91 s
19	39.8 t		39.8 t	
20	26.9 t	1.88 m 1.82 m	25.1 t	1.94 m 1.43 m
21	35.7 t	1.88 m 1.63 m	34.9 t	1.94 m 1.47 m
22	40.4 s		39.8 t	1.88 m
23	28.0 s	1.32 s	30.1 s	1.31 s
24	38.4 d	2.11 m	37.2 s	2.27 m
25	17.8 q	0.98 d(6.9)	17.2 q	1.02 d(6.7)
26	18.8 q	0.60 d(6.9)	18.6 d	0.59 d(6.8)
27	25.6 q	1.48 s	21.9 q	1.46 s
28	148.4 d	6.12 dd(17.5, 10.4) 5.19 dd(10.5, 1.3)	151.8 d	6.22 dd(17.7, 10.6) 5.38 dd(10.5, 1.3)
29	113.1 t	5.10 dd(17.4, 1.3)	113.1 t	5.25 dd(17.4, 1.3)
1'	171.4 s		171.4 s	
2'	21.1 q	2.09 s	21.1 q	2.11 s

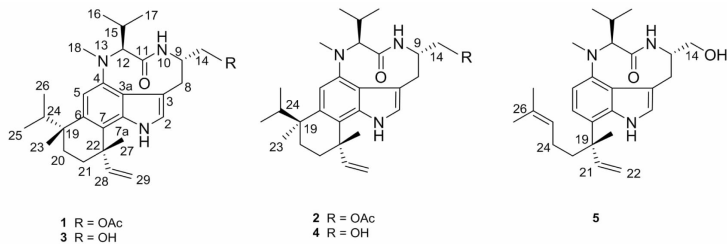


图3 化合物1~5的化学结构

Fig. 3 Structures of compounds 1-5

**化合物 2** 白色无定形固体;  $[\alpha]_D^{25} -57.3$  ( $c$  0.2, MeOH); HR-ESI-MS:  $m/z$  494.3373  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{30}H_{44}N_3O_3$ , 494.3377) 推测分子式为  $C_{30}H_{43}N_3O_3$ 。IR (KBr)  $\nu_{max}$  3447, 2958, 2932, 2870, 1740, 1663, 1453, 1373, 1230, 1043, 915  $cm^{-1}$ ; UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) 237 (3.15), 287 (2.92) nm, 化合物 2 的红外光谱和紫外吸收光谱与 1 较为相似, 提示化合物 2 和 1 具有相同的化学骨架。化合物 2 的  $^1H$  和  $^{13}C$  核磁数据表明除了存在 1 个 AcO 基团的信号外, 其余的原子信号与 teleocidin B-3 (4) 几乎相同。与化合物 4 相比, 2 存在 1 个额外的 AcO 单元信号, 其  $^{13}C$  NMR 谱中 C-9、C-14 的化学位移分别减少 2.5 ppm 和增加 1.1 ppm。根据这些数据推测 4 中 C-14 的羟基被 2 中的 AcO 取代, 这一点由以下 2D-NMR 数据证实。在 2 的 HMBC 谱(图 4)中, 从 H-14 [ $\delta_H$  4.21 dd ( $J = 11.5, 3.5$ ) 和 3.98 dd ( $J = 11.5, 8.7$  Hz)] 与 C-1' ( $\delta_C$  171.6 s) 的相关, 以及从 H-2' ( $\delta_H$  2.11 s) 与 C-14 ( $\delta_C$  66.7 t) 的相关表明在 C-14 处有一个 AcO 基团, 这导致 C-9 和 C-14 的化学位移发生变化。化合物 2 命名为 14-*O*-acetylteleocidin B-3。尽管早在 1991 年, 有机化学领域合成了 14-*O*-acetylteleocidin B-4 和 14-*O*-acetylteleocidin B-3 的混合物, 但是并未获得化合物 2 的单体以及报道其全部的 NMR 数据<sup>[20]</sup>。因此, 这是 2 在自然界中的首次发现, 也是其  $^1H$  和  $^{13}C$  核磁共振波谱数据的首次报道。

虽然化合物 1 和 2 具有相同的平面结构, 且 CD 谱表明两者在 220 ~ 340 nm 呈现相似的科顿效应 (见图 5), 但它们的一些核磁共振数据却有很大不同, 表明它们是立体异构体。化合物 1 和 2 在二维 NOESY 谱中并未表现出明显的相关, 根据 1 和 3, 2 和 4 的  $^1H$  和  $^{13}C$  NMR 中化学位移的相似性, 推测 1 的立体中心的相对构型与 3 相同, 2 与 4 相同。由于未能成功获得化合物 1 和 2 的晶体, 通过化学方

法碱水解实验进一步确定 1 和 2 的绝对构型。分别用相同质量的 0.1 N 氢氧化钠溶液水解化合物 1 和 2<sup>[21]</sup>, 应用 UPLC-MS 将它们的水解产物分别与共同分离的化合物 teleocidin B-2 (3)、B-3 (4) 进行比较分析, 通过比较其紫外吸收光谱、分子离子、色谱数据及 CD 谱(补充数据), 确认化合物 1 和 2 的水解产物分别为化合物 teleocidin B-2、B-3, 而 teleocidin B-2、B-3 的立体构型早在 20 世纪 80 年代通过 X-Ray 确定<sup>[8]</sup>。因此, 1 与 teleocidin B-2 (3) 具有相同的立体结构, 为 9*S*, 12*S*, 19*R*, 22*S*; 2 与 teleocidin B-3 (4) 具有相同的立体结构, 为 9*S*, 12*S*, 19*S*, 22*S*。

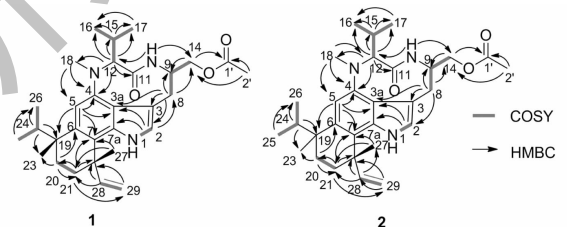
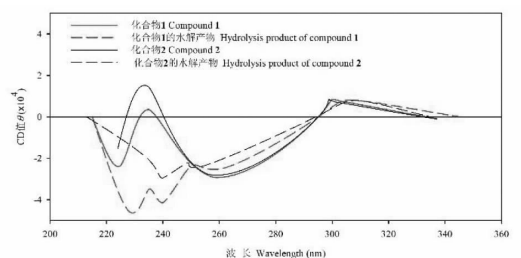
图4 化合物1和2的HMBC和 $^1H$ - $^1H$  COSY相关信号  
Fig. 4  $^1H$ - $^1H$  COSY and HMBC correlations of compounds 1 and 2

图5 化合物1~4的CD谱

Fig. 5 CD spectrum of compounds 1-4

**化合物 3** 白色无定形固体; ESI-MS:  $m/z$  452.73  $[M+H]^+$ , 450.77  $[M-H]^-$ ;  $^1H$  NMR (700 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 8.20 (1H, br s, H-1), 6.81 (1H, br s, H-2), 6.55 (1H, s, H-5), 6.12 (1H, dd,  $J = 17.5, 10.4$  Hz, H-28), 5.18 (1H, dd,  $J = 10.5, 1.4$  Hz, H-

29), 5.10 (1H, dd,  $J = 17.4, 1.3$  Hz, H-29), 4.35 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-12), 4.34 (1H, m, H-9), 3.74 (1H, dd,  $J = 11.4, 3.8$  Hz, H-8), 3.54 (1H, dd,  $J = 11.4, 8.5$  Hz, H-14), 3.16 (1H, d,  $J = 17.3$  Hz, H-8), 3.00 (1H, dd,  $J = 17.3, 3.9$  Hz, H-8), 2.93 (3H, s, H-18), 2.62 (1H, m, H-15), 2.11 (1H, m, H-24), 1.90 ~ 1.82 (2H, m, H-20), 1.88 ~ 1.62 (2H, m, H-21), 1.48 (3H, s, H-27), 1.32 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-25), 0.93 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-17), 0.70 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-16), 0.60 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-26);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 174.4 (C-11), 148.5 (C-28), 145.9 (C-4), 140.0 (C-7a), 137.8 (C-6), 120.8 (C-2), 117.6 (C-7), 117.2 (C-3a), 113.9 (C-3), 113.1 (C-29), 107.0 (C-5), 71.1 (C-12), 65.3 (C-14), 56.1 (C-9), 40.4 (C-19), 39.8 (C-22), 38.4 (C-24), 35.8 (C-21), 34.0 (C-8), 33.3 (C-18), 28.6 (C-15), 28.1 (C-23), 26.9 (C-20), 25.6 (C-27), 21.9 (C-17), 19.8 (C-16), 18.9 (C-26), 17.8 (C-25)。以上数据与文献<sup>[8,22]</sup>基本一致,故化合物**3**鉴定为 teleocidin B-2。

**化合物 4** 白色无定形固体; ESI-MS:  $m/z$  452.73  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 450.86  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.46 (1H, br s, H-1), 6.76 (1H, br s, H-2), 6.47 (1H, s, H-5), 6.22 (1H, dd,  $J = 17.7, 10.6$  Hz, H-28), 5.38 (1H, dd,  $J = 17.7, 1.2$  Hz, H-29), 5.25 (1H, dd,  $J = 10.6, 1.2$  Hz, H-29), 4.35 (1H, m, H-9), 4.29 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-12), 3.76 (1H, dd,  $J = 11.4, 3.7$  Hz, H-14), 3.57 (1H, dd,  $J = 11.4, 8.5$  Hz, H-14), 3.13 (1H, d,  $J = 17.1$  Hz, H-8), 2.98 (1H, dd,  $J = 17.4, 3.7$  Hz, H-8), 2.90 (3H, s, H-18), 2.60 (1H, m, H-15), 2.27 (1H, m, H-24), 1.94 ~ 1.42 (2H, m, H-20), 1.94 ~ 1.42 (2H, m, H-21), 1.47 (3H, s, H-27), 1.31 (3H, s, H-23), 1.02 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-25), 0.92 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-17), 0.65 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-16), 0.63 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 174.6 (C-11), 151.9 (C-28), 146.0 (C-4), 138.6 (C-7a), 137.5 (C-6), 120.3 (C-2), 118.3 (C-7), 116.8 (C-3a), 113.7 (C-3), 111.4 (C-29), 106.7 (C-5), 71.0 (C-12), 65.5 (C-14), 56.0 (C-9), 39.8 (C-19), 39.6 (C-22), 37.2 (C-24), 34.9 (C-21), 33.9 (C-8), 33.4 (C-18), 30.1 (C-23), 28.7 (C-15), 25.1 (C-20), 21.9 (C-17), 21.8 (C-27), 19.5 (C-

16), 18.6 (C-26), 17.2 (C-25)。以上数据与文献<sup>[8,22]</sup>基本一致,故化合物**4**鉴定为 teleocidin B-3。

**化合物 5** 白色无定形固体; ESI-MS:  $m/z$  438.73  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 436.68  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.53 (br s, 1H, H-1), 6.97 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 6.82 (br s, 1H, H-2), 6.48 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 6.20 (dd,  $J = 17.7, 10.6$  Hz, 1H, H-21), 5.30 (d,  $J = 19.0$  Hz, 1H, H-22), 5.26 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H, H-22), 5.09 ~ 5.06 (m, 1H, H-25), 4.34 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, H-12), 4.33 (br s, 1H, H-9), 3.74 (dd,  $J = 11.3, 4.1$  Hz, 1H, H-14), 3.55 (dd,  $J = 11.3, 8.5$  Hz, 1H, H-14), 3.15 (br d,  $J = 17.2$  Hz, 1H, H-8), 3.02 (dd,  $J = 17.3, 3.6$  Hz, 1H, H-8), 2.91 (s, 3H, H-18), 2.59 (m, 1H, H-15), 1.99 ~ 1.81 (m, 2H, H-23), 1.96 ~ 1.89 (m, 2H, H-24), 1.63 (s, 3H, H-28), 1.45 (s, 3H, H-20), 1.39 (s, 3H, H-27), 0.91 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, H-16), 0.60 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, H-17);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 174.3 (C-11), 149.2 (C-21), 146.7 (C-4), 137.7 (C-7a), 131.7 (C-26), 124.8 (C-25), 121.3 (C-2), 120.6 (C-6), 120.3 (C-3), 118.7 (C-7), 114.1 (C-3a), 112.4 (C-22), 106.2 (C-5), 71.3 (C-12), 65.4 (C-14), 55.8 (C-9), 43.6 (C-19), 38.2 (C-23), 34.3 (C-8), 33.2 (C-18), 28.8 (C-15), 25.9 (C-27), 25.0 (C-20), 23.4 (C-24), 21.8 (C-16), 19.6 (C-17), 17.6 (C-28)。以上数据与文献<sup>[7,23,24]</sup>基本一致,故化合物**5**鉴定为 teleocidin A-2。

## 2.2 化合物活性测试结果

### 2.2.1 杀虫活性测试结果

化合物**1**~**5**对草地贪夜蛾、棉铃虫和小菜蛾幼虫的活性测定,采用24孔盘人工饲料表面涂布法,对蚜虫的测定采用浸渍法。72 h 杀虫活性结果如表2所示,化合物**1**对草地贪夜蛾、棉铃虫、小菜蛾这3种供试昆虫的活性是这5个化合物中表现最强的,其 $\text{LC}_{50}$ 值分别为42.6、36.5、66.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;其次为化合物**2**, $\text{LC}_{50}$ 值分别为44.8、44.2、68.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;化合物**3**~**5**对这3种供试昆虫的 $\text{LC}_{50}$ 值为76.6~168.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这5个化合物对蚜虫表现出中等的杀虫活性,其 $\text{LC}_{50}$ 值为144.5~206.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而阳性对照阿维菌素对这4种供试昆虫的活性均高于化合物**1**~**5**,其 $\text{LC}_{50}$ 值分别为2.2、1.9、3.1、1.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 2 化合物 1~5 对 4 种供试昆虫的杀虫活性

Table 2 Insecticidal activities of compounds 1-5 against the four tested insects

化合物 Compound	半数致死浓度 LC <sub>50</sub> (μg/mL)			
	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	豆蚜 <i>Aphis craccivora</i>
1	42.6	36.5	66.4	144.5
2	44.8	44.2	68.1	192.5
3	87.4	168.6	163.4	229.2
4	76.6	126.4	150.4	305.7
5	106.5	113.0	151.7	206.8
阿维菌素 Avermectin*	2.2	1.9	3.1	1.7

注: \*85%阿维菌素作为阳性对照。

Note: 85% avermectin was used as positive control.

### 2.2.2 体外细胞毒活性

化合物 1~5 的细胞毒活性测试采用 MTT 法。结果表明,与阳性对照 5-氟尿嘧啶相比,这些化合物的细胞毒活性较强,对 A875、HepG2 和 Marc-145 细胞系的 IC<sub>50</sub> 值为 3.08 ± 1.04 ~ 18.40 ± 2.06 μM(表 3)。具体而言,1 对这 3 种细胞系表现出细

胞毒活性的 IC<sub>50</sub> 值分别为 15.53 ± 2.53、4.64 ± 0.95、13.52 ± 2.88 μM; 2 对这 3 种细胞系的 IC<sub>50</sub> 值为 11.72 ± 1.42、5.29 ± 1.95、13.86 ± 3.16 μM,与化合物 3~5 相比,显示出近似的细胞毒活性。

表 3 化合物 1~5 对 A875、HepG2 和 Marc-145 细胞系的体外细胞毒活性

Table 3 *In vitro* cytotoxicity of compounds 1-5 against the A875, HepG2 and Marc-145 cell lines

化合物 Compound	半抑制浓度 IC <sub>50</sub> (μM)		
	A875	HepG2	Marc-145
1	15.53 ± 2.53	4.64 ± 0.95	13.52 ± 2.88
2	11.72 ± 1.42	5.29 ± 1.95	13.86 ± 3.16
3	9.12 ± 1.22	3.08 ± 1.04	10.98 ± 0.42
4	17.09 ± 3.63	11.69 ± 2.63	18.40 ± 2.06
5	10.99 ± 1.78	10.19 ± 2.53	13.03 ± 3.08
5-氟尿嘧啶 5-Fluorouracil*	82.49 ± 8.00	75.34 ± 11.69	104.01 ± 18.60

注: \* 阳性对照。

Note: \* Positive control.

### 3 结论

从链霉菌 *Streptomyces arduus* WS-65090 发酵提取物中分离得到 5 个 teleocidin 类化合物,这些化合物均具有杀虫和细胞毒活性。其中 14-*O*-acetylteleocidin B-2(1)是一种新的化合物,14-*O*-acetylteleocidin B-3(2)是一种新的天然产物,首次对其核磁共振波谱数据进行了详细阐述。这也是近年来首次从土壤来源的链霉菌菌株中分离出的 teleocidin B 类型结构的化合物,其对草地贪夜蛾、棉铃虫、小菜蛾和蚜虫具有杀虫活性。另外,这两种新的 teleocidin 类似物在 C-14 处含有乙酰基,其杀虫活性强于已知的三种化合物。结合细胞毒活性的实验结果,说明了 teleocidin 类似物的 C-14 位的乙酰基基团对其生

物活性有重要影响。Teleocidin 类化合物生物活性多集中在医用活性方面,本研究报道的化合物丰富了 teleocidin 类化合物的种类,扩展了生物活性,为其在农用方面的研究提供了探讨。

### 参考文献

- 1 Berdy J. Bioactive microbial metabolites [J]. *J Antibiot*, 2005, 58:1-26.
- 2 Wang L, Yu ZY, Xu DD, et al. Macrolides from soil-derived *Streptomyces* sp. KIB-K1 and their antimicrobial activities [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1764-1771.
- 3 Zhao HM, Yang AP, Zhang N, et al. Insecticidal endoste-

- monines A-J produced by endophytic *Streptomyces* from *Stemona sessilifolia* [J]. *J Agr Food Chem*, 2020, 68: 1588-1595.
- 4 Takashima M, Sakai H. A new toxic substance, teleociclin, produced by *Streptomyces*. Part I. Production, isolation and chemical studies [J]. *Bull Agr Chem Soc Japan*, 1960, 24: 647-651.
- 5 Takashima M, Sakai H. A new toxic substance, teleocidin, produced by *Streptomyces*. Part II. Biological studies of teleocidin [J]. *Bull Agr Chem Soc Japan*, 1960, 24: 652-655.
- 6 Takashima M, Sakai H, Arima K. A new toxic substance, teleocidin, produced by *Streptomyces*. Part III. Production, isolation and chemical characterization of teleocidin B [J]. *Agr Biol Chem*, 1962, 26: 660-668.
- 7 Sakai SI, Hitotsuyanagi Y, Aimi N, et al. Absolute configuration of lyngbyatoxin A (teleocidin A-1) and teleocidin A-2 [J]. *Tetrahedron Lett*, 1986, 27: 5219-5220.
- 8 Hitotsuyanagi Y, Fjiki H, Sukanuma M. Isolation and structure of teleocidin B-1, B-2, B-3, B-4 [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32: 4233-4236.
- 9 Fujiki H, Sukanuma M, Matsukura N, et al. Teleocidin from *Streptomyces* is a potent promoter of mouse skin carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 1982, 3: 895-898.
- 10 Fujiki H, Sugimura T. New classes of tumor promoters: Teleocidin, aplysiatoin, and palytoxin [J]. *Adv Cancer Res*, 1987, 49: 223-264.
- 11 Stahn S, Thelen L, Albrecht IM, et al. Teleocidin A2 inhibits human proteinase-activated receptor 2 signaling in tumor cells [J]. *Pharma Res Per*, 2016, 4: e00230.
- 12 Cardellina JH, Marner FJ, Moore RE. Seaweed dermatitis; structure of lyngbyatoxin A [J]. *Science*, 1979, 204: 193-195.
- 13 Aimi N, Odaka H, Sakai SI, et al. Lyngbyatoxins B and C, two new irritants from *Lyngbya majuscula* [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53: 1593-1596.
- 14 Sakai SI, Aimi N, Yamaguchi K, et al. Elucidation of the structure of olivoretin A and D (teleocidin B) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32: 354-357.
- 15 Hitotsuyanagi Y, Yamaguchi K, Ogata K, et al. Elucidation of the structures of olivoretin B and C [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32: 3774-3778.
- 16 Nakae K, Hosokawa N, Sawa R, et al. A new teleocidin analog from *Streptomyces* sp. MM216-87F4 induces substance P release from rat dorsal root ganglion neurons [J]. *J Antibiot*, 2006, 59: 11-17.
- 17 Izumikawa M, Khan ST, Komaki H, et al. JBIR-31, a new teleocidin analog, produced by salt-requiring *Streptomyces* sp. NBRC 105896 isolated from a marine sponge [J]. *J Antibiot*, 2010, 63: 33-36.
- 18 Zhao Y, Li YQ, Ou XM, et al. Synthesis, insecticidal, and acaricidal activities of novel 2-aryl-pyrrole derivatives containing ester groups [J]. *J Agr Food Chem*, 2008, 56: 10176-10182.
- 19 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.
- 20 Okabe K, Muratake H, Natsume M. Synthesis of teleocidins A, B and their congeners. Part 3. Synthesis of dihydroteleocidin B-4 (dihydroteleocidin B), teleocidin B-3 and teleocidin B-4 [J]. *Tetrahedron*, 1991, 41: 8559-8572.
- 21 Irie K, Tomimatsu S, Nakagawa Y, et al. Isolation of (-)-14-O-malonylindolactam-V as a possible precursor of (-)-indolactam-V and (-)-14-O-acetylindolactam-V from *Streptomyces blastmyceticum* [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 1999, 63: 1669-1670.
- 22 Nakamura H, Yasui K, Kanda Y, et al. 11-Step total synthesis of teleocidins B-1-B-4 [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 1494-1497.
- 23 Muratake H, Okabe K, Natsume M. Synthesis of teleocidins A, B and their congeners. Part 2. Synthesis of lyngbyatoxin A (teleocidin A-1), teleocidin A-2, pendolmycin, and (R,E)- and (S,E)-7-(3,7,11)-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-yl)-(-)-indolactams [J]. *Tetrahedron*, 1991, 47: 8545-8558.
- 24 Fine Nathel NF, Shah TK, Bronner SM, et al. Total syntheses of indolactam alkaloids (-)-indolactam V, (-)-pendolmycin, (-)-lyngbyatoxin A, and (-)-teleocidin A-2 [J]. *Chem Sci*, 2014, 5: 2184-2190.