

# 土壤来源链霉菌 *Streptomyces* sp. CICC 203679 的次生代谢产物研究

张冰源<sup>1,2</sup>, 汤艳<sup>1,2</sup>, 郭哲<sup>2</sup>, 柏菁璘<sup>2</sup>, 余利岩<sup>2</sup>, 戴胜军<sup>1\*</sup>, 张德武<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>烟台大学药学院, 烟台 264005; <sup>2</sup>中国医学科学院 & 北京协和医学院 医药生物技术研究所, 北京 100050

**摘要:** 对一株土壤来源的链霉菌 *Streptomyces* sp. CICC 203679 进行次生代谢产物研究。采用正反相硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱及半制备高效液相色谱等技术, 从菌株 CICC 203679 的发酵物中分离纯化了 9 个化合物, 通过波谱学方法分析鉴定其结构, 包括 1 个新脂肪酸类化合物: (3*S*)-3-羟基-8-甲基-5-氧壬酸 (**1**) 和 8 个已知化合物: *N*-[2-(4-对羟基苯酚)乙基]乙酰胺 (**2**)、3,3-二-(3'-吡啶)丙烷-1,2-二醇 (**3**)、环(*L*-亮-*L*-脯)二肽 (**4**)、环(*L*-苯丙-*L*-酪)二肽 (**5**)、环(*L*-酪-*L*-脯)二肽 (**6**)、环(*L*-苯丙-*L*-脯)二肽 (**7**)、环(*L*-异亮-*L*-脯)二肽 (**8**)、2,3-dihydroxypropyl(9*E*, 11*E*)-13-oxooctadeca-9,11-dienoate (**9**)。化合物 **3** 为首次从土壤来源的链霉菌中分离得到。对分离得到的化合物 **1**~**8** 进行了体外抗菌活性和细胞毒性评价, 药理活性评价结果显示, 化合物 **1**~**8** 均未显示出明显的抗菌和抗肿瘤活性。

**关键词:** 链霉菌; 次生代谢产物; 脂肪酸; 生物碱; 环二肽

中图分类号: R914.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)6-0960-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.6.007

## Secondary metabolites from a soil-derived *Streptomyces* sp. CICC 203679

ZHANG Bing-yuan<sup>1,2</sup>, TANG Yan<sup>1,2</sup>, GUO Zhe<sup>2</sup>,  
BAI Jing-lin<sup>2</sup>, YU Li-yan<sup>2</sup>, DAI Sheng-jun<sup>1\*</sup>, ZHANG De-wu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; <sup>2</sup>Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

**Abstract:** The secondary metabolites of a soil-derived *Streptomyces* sp. CICC 203679 were investigated. The fermentation extract of strain CICC 203679 were isolated by silica gel column, Sephadex LH-20 gel column, and high performance liquid chromatography, which led to the isolation of nine compounds, including a new fatty acid, (3*S*)-3-hydroxy-8-methyl-5-oxononanoic acid (**1**) and eight known compounds, *N*-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acetamide (**2**), 3,3-bis(3'-indolyl)propane-1,2-diol (**3**), cyclo-(*L*-Leu-*L*-Pro) (**4**), cyclo-(*L*-Phe-*L*-Try) (**5**), cyclo-(*L*-Try-*L*-Pro) (**6**), cyclo-(*L*-Phe-*L*-Pro) (**7**), cyclo-(*L*-Ile-*L*-Pro) (**8**), 2,3-dihydroxypropyl(9*E*, 11*E*)-13-oxooctadeca-9,11-dienoate (**9**). Their structures were elucidated by spectroscopic methods and comparison with reported literatures. Compound **3** was obtained from the soil-derived *Streptomyces* for the first time. The isolated compounds **1**-**8** were evaluated for their antibacterial and cytotoxic activities. The biological activity results showed that all compounds had no antibacterial and cytotoxic activities.

**Key words:** *Streptomyces*; secondary metabolites; fatty acid; alkaloid; cyclic dipeptide

放线菌是发现新抗生素的重要资源, 它可以产生结构类型多样的活性天然产物<sup>[1]</sup>。链霉菌属 *Streptomyces* 为放线菌的优势属, 是放线菌中已报道有效发表种最多的属, 其广泛分布于土壤、淡水、海

洋以及一些生物体内。链霉菌以能够产生结构类型丰富多样的活性次级代谢产物而著称, 是临床常用抗生素的重要来源, 目前临床上应用的抗生素约三分之二是由该属微生物产生<sup>[2]</sup>。近年来, 从链霉菌属中源源不断的报道了大量的结构骨架新颖和生物活性显著的次生代谢产物<sup>[3-6]</sup>, 表明从该属中发掘新的先导化合物仍具有巨大潜力。本课题组在前期生物活性筛选中发现了一株来源于土壤的链霉菌 *Streptomyces* sp. CICC 203679, 其发酵液粗提物具有

收稿日期: 2021-11-08 接受日期: 2022-03-25

基金项目: 国家自然科学基金(82073744); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-055); 国家微生物资源平台项目(NMRC-2021-3)

\* 通信作者 E-mail: sjdai8616@sina.com, zhangdewuever@163.com

良好的抗菌活性,本文采用多种现代色谱和波谱技术对该菌株的次生代谢产物进行了初步的分离纯化

和结构鉴定,得到了9个化合物(见图1),并对化合物1~8进行了体外抗菌活性和细胞毒性评价。

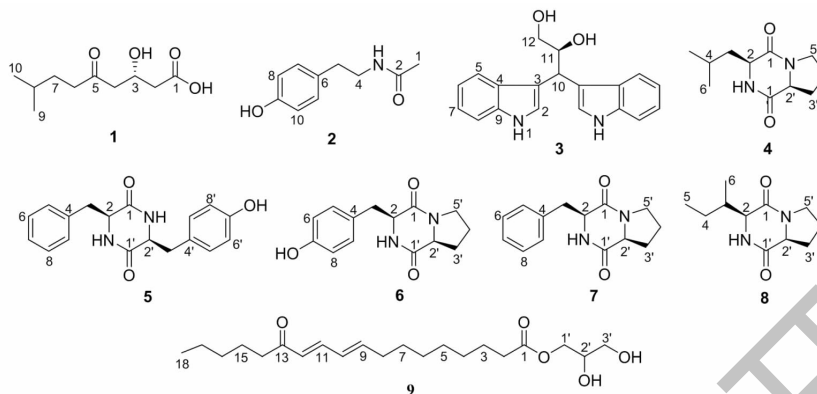


图1 化合物1~9的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-9

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Bruker ARX-600 MHz 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司); Thermo LTQ 质谱仪(美国 Thermo 公司); Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Waters 2535 制备液相色谱仪(美国 Waters 公司); Combiflash Rf200 快速纯化制备液相色谱(美国 Teledyne Isco 公司); 步琦 R210 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司); ZSD-1160 生化培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司); ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 分析型色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 半制备型色谱柱(250 mm × 10 mm, 5 μm); 甲醇、二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯、正己烷、正丁醇、无水乙醇、色谱乙腈、色谱甲醇(北京通广精细化工公司); 反相 C<sub>18</sub> 硅胶(日本 YMC 公司); 200~300 目柱层析硅胶(青岛海洋化工厂)。

### 1.2 菌株来源

菌株 *Streptomyces* sp. CCCC 203679 分离自浙江省杭州西溪湿地的土壤,通过对其 16S rRNA 基因测序发现其序列与菌株 *Streptomyces rochei* NRRLB 2410 (T)、*Streptomyces enissocaeilis* NRRLB-16365 (T)、*Streptomyces plicatus* NBRC 13071 (T) 的序列相似度均为 99.86%,该菌株现保藏于中国药典微生物菌种保藏管理中心。

### 1.3 发酵培养

PYG 培养基:蛋白胨 3 g、酵母膏 5 g、甘油 10 g、琼脂 14 g、甜菜碱 1.25 g、丙酮酸钠 1.25 g,加水定

容至 1 L。

种子及发酵培养基:葡萄糖 10 g、可溶性淀粉 30 g、棉籽粉 20 g、酵母膏 3 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g、Mg-SO<sub>4</sub> 1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g、NaCl 1g、CaCO<sub>3</sub> 1 g,加水定容至 1 L。

将菌株 CCCC 203679 从其保藏的甘油管中接种于 PYG 斜面培养基,置于 28 °C 恒温箱培养 7~10 天。选择生长状态良好的斜面继续在相同斜面培养基中复壮,待其生长状态良好时接种于种子培养基(100 mL 培养基/500 mL 三角瓶)中,28 °C 振荡培养 48 h 得到种子液。然后以 10% 浓度(V/V)接入 5 L 三角瓶(含 2 L 发酵培养基)中,于 28 °C 培养 5 天收获。共发酵 120 L。

### 1.4 提取分离

收集 120 L 发酵液,离心后分别收集菌体和发酵液上清。菌体用甲醇超声提取三次,浓缩后得菌体甲醇提取部分,然后均匀分散于水中,用乙酸乙酯萃取四次,得菌丝乙酸乙酯部分;发酵液上清用大孔吸附树脂 HP-20 吸附后,首先用去离子水冲洗,再用甲醇进行洗脱,减压浓缩后得到发酵液上清部分,然后用乙酸乙酯萃取四次,得菌液乙酸乙酯部分。将菌丝和菌液的乙酸乙酯部分合并,浓缩后得浸膏 33.7 g。

将所得浸膏(33.7 g)用 60~100 目硅胶拌样,进一步进行正相硅胶柱(200~300 目)层析,二氯甲烷-甲醇(100:0→50:50)梯度洗脱得 15 个流分(Fr. 1~Fr. 15)。流分 Fr. 4(10.8 g)经反相中压制备柱层析,乙腈-水(10%→100%)梯度洗脱,得 34 个流

分(Fr. 4. 1 ~ Fr. 4. 34);流分 Fr. 4. 8(112. 9 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-水, 10: 90)纯化, 得到化合物 4(9. 2 mg);流分 Fr. 4. 10(204. 6 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-水, 10: 90)纯化, 得到化合物 8(13. 4 mg);流分 Fr. 4. 12(169. 2 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-水, 15: 85)纯化, 得到化合物 7(6. 7 mg);流分 Fr. 4. 15-16(248 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-水, 15: 85)纯化, 得到化合物 1(43. 8 mg);流分 Fr. 4. 29(88. 6 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-水, 50: 50)纯化, 得到化合物 9(5. 5 mg)。流分 Fr. 5(2. 2 g)经反相中压制备柱层析, 乙腈-水(10% → 100%)梯度洗脱, 得 23 个流分(Fr. 5. 1 ~ Fr. 5. 23);流分 Fr. 5. 5(56. 2 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-水, 5: 95)纯化, 得到化合物 2(18. 9 mg);流分 Fr. 5. 6(179 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-水, 5: 95)纯化, 得到化合物 6(80. 1 mg);流分 Fr. 5. 16(17. 7 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-水, 30: 70)纯化, 得到化合物 3(2. 9 mg)。流分 Fr. 10(0. 97 g)经反相中压制备柱层析, 乙腈-水(10% → 100%)梯度洗脱, 得化合物 5(7. 1 mg)。

### 1. 5 抗菌活性测试<sup>[7]</sup>

采用微稀释法对所得到的化合物分别进行抗金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)和大肠埃希菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)体外活性测定:将测试菌从冻存管中划线接种于营养琼脂平板活化, 37 °C 培养, 挑取其中 3 ~ 5 个单菌落至营养肉汤培养基, 37 °C 培养 6 ~ 8 h, 将菌悬液调整至 0. 5 McF 浓度(约为  $1 \times 10^8$  CFU/mL), 再使用 MHB 液体培养基进行 20 倍稀释, 制成浓度约为  $5 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液。在 96 孔板中, 第 1 列不接种菌悬液仅加入 MHB 培养基作为空白对照。待测化合物使用 MHB 液体培养基根据二倍稀释法稀释至相应浓度后加入 96 孔板。第 12 列加入 MHB 培养基和菌悬液作为菌株阳性对照。样品终浓度分别为: 64、32、16、8、4、2、1、0. 5  $\mu$ g/mL, 96 孔板置于 37 °C 静置培养 16 ~ 18 h 后, 未见菌株生长(肉眼未见浑浊)的孔板内所含化合物最小的浓度即为最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

### 1. 6 细胞毒活性测试<sup>[8]</sup>

采用 MTT 法对所得到的化合物进行细胞毒活性测试。人胰腺癌细胞系(MIA PaCa-2)细胞株体外培养于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清), 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养;取等量细胞培

养于 96 孔板中, 24 h 加药, 将培养板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件的 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 培养 48 h 后, 每孔加入 100  $\mu$ L 1:4 倍稀释的 MTT 溶液, 37 °C 继续孵育 3. 5 ~ 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO 充分溶解甲臞, 轻度震荡后, 用酶标仪测定各孔 490 nm 条件下的吸光度, 计算 IC<sub>50</sub> 值。

## 2 结果与分析

### 2. 1 结构鉴定

化合物 1 淡黄色油状;可溶于甲醇、二氯甲烷、氯仿等溶剂;  $[\alpha]_D^{25} + 5$  (c 0. 12, CH<sub>3</sub>OH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 216(1. 81), 273(0. 61) nm; ESI-MS:  $m/z$  203 [M + H]<sup>+</sup>; HR-ESI-MS:  $m/z$  225. 109 4 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>4</sub>, 225. 110 3); IR (KBr)  $\nu_{max}$  3 385, 1 957, 1 707, 1 408, 1 386, 1 287, 1 171, 1 049, 744 cm<sup>-1</sup>。

根据 HR-ESI-MS 结果推测该化合物的分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>。其<sup>13</sup>C NMR 和 DEPT 谱显示, 该化合物有 10 个碳信号, 包括 1 个酮羰基  $\delta_c$  209. 4(C-5), 1 个酯羰基  $\delta_c$  172. 6(C-1), 2 个次甲基  $\delta_c$  64. 0(C-3) 和 27. 0(C-8), 4 个亚甲基  $\delta_c$  49. 5(C-4)、42. 3(C-2)、40. 8(C-6) 和 31. 8(C-7), 2 个甲基  $\delta_c$  22. 3(C-9, C-10)。通过<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、DEPT 和 HSQC 等波谱数据对所有的 H 和 C 进行了归属。在 HMBC 谱中(见图 2), H-3 和 C-1、C-2、C-4、C-5 相关, H-6 和 C-5、C-7、C-8 相关, H-7 和 C-5、C-6、C-8、C-9、C-10 相关;在<sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY 谱中显示了 H-2/H-3/H-4, H-6/H-7/H-8/H-9 等相关信号。综合以上谱图信息, 确定化合物 1 为 3-羟基-8-甲基-5-氧壬酸, 为新化合物, 其结构如图 1 所示。化合物结构中仅含有一个叔醇(C-3), 可以通过 Rh<sub>2</sub>(OCOCF<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-络合的 CD 谱来确定其绝对构型<sup>[9]</sup>, 在 Rh<sub>2</sub>(OCOCF<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-络合的 CD 谱中, 350 nm 处显示正的 Cotton 效应, 确定其 C-3 的绝对构型为 S。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)。

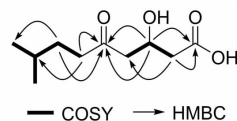


图 2 化合物 1 的 COSY 和 HMBC 相关

Fig. 2 Key COSY and HMBC correlations of compound 1

化合物 2 白色粉末;可溶于甲醇、二氯甲烷、氯仿等溶剂;ESI-MS:  $m/z$  180 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR

表 1 化合物 1 的<sup>1</sup>H NMR(600 MHz)和<sup>13</sup>C NMR(150 MHz)数据(DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Table 1 <sup>1</sup>H NMR (600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (150 MHz) data of compound 1 (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

No.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)
1	172.6	
2	42.3	2.34(1H, dd, J = 15.0, 5.4 Hz) 2.27(1H, dd, J = 15.0, 7.8 Hz)
3	64.0	4.25(1H, m)
4	49.5	2.51(2H, overlap)
5	209.4	
6	40.8	2.42(2H, td, J = 7.2, 2.4 Hz)
7	31.8	1.34(2H, dd, J = 14.4, 7.2 Hz)
8	27.0	1.48(1H, m)
9	22.3	0.84(3H, d, J = 6.6 Hz)
10	22.3	0.84(3H, d, J = 6.6 Hz)

(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.16 (1H, s, 9-OH), 7.85 (1H, t, J = 6.0 Hz, NH), 6.98 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-7, H-11), 6.67 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-8, H-10), 3.17 (2H, m, H-4), 2.56 (2H, t, J = 7.8 Hz, H-5), 1.77 (3H, s, H-1); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 22.6 (C-1), 168.9 (C-2), 40.5 (C-4), 34.4 (C-5), 129.5 (C-6), 129.4 (C-7), 115.1 (C-8), 155.6 (C-9), 115.1 (C-10), 129.4 (C-11)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>中报道一致,故确定该化合物为 *N*-[2-(4-对羟基苯酚)乙基]乙酰胺。

**化合物 3** 白色粉末;可溶于甲醇、二氯甲烷、氯仿等溶剂; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 57.4 (c 0.08, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS: *m/z* 329 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 10.73 (1H, d, J = 2.4 Hz, NH), 10.71 (1H, d, J = 2.4 Hz, NH), 7.52 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5), 7.51 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-5'), 7.31 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 7.27 (2H, dd, J = 7.8 Hz, H-8), 7.22 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'), 6.98 (1H, m, H-7), 6.96 (1H, m, H-7'), 6.87 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-6), 6.84 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-6'), 4.57 (1H, d, J = 5.4 Hz, H-10), 4.47 (1H, d, J = 5.4 Hz, 11-OH), 4.45 (1H, br s, 12-OH), 4.27 (1H, m, H-11), 3.33 (1H, overlap, H-12a), 3.26 (1H, m, H-12b); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 123.3 (C-2), 117.3 (C-3), 127.9 (C-4), 119.1 (C-5), 117.9 (C-6), 120.5 (C-7), 111.2 (C-8), 136.1 (C-9), 35.9 (C-10), 74.2 (C-11), 64.7 (C-

12), 122.9 (C-2'), 115.2 (C-3'), 126.9 (C-4'), 118.9 (C-5'), 117.7 (C-6'), 120.3 (C-7'), 111.0 (C-8'), 135.9 (C-9')。以上数据与文献<sup>[11,12]</sup>中报道一致,其旋光数值与文献<sup>[12]</sup>报道的基本一致,确定该化合物的绝对构型为 *S*,故确定该化合物为 (1*S*)-3,3-二-(3'-吡啶)丙烷-1,2-二醇。

**化合物 4** 白色粉末;可溶于甲醇、二氯甲烷、氯仿等溶剂;茛三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茛三酮显色阳性,提示为环肽类化合物; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -220.4 (c 0.08, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS: *m/z* 211 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.00 (1H, s, NH), 4.19 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-2'), 4.00 (1H, t, J = 6.0 Hz, H-2), 3.40 (2H, m, H-5'), 2.41 (1H, m, H-3'a), 1.91 (1H, m, H-3'b), 1.85 (1H, m, H-4), 1.79 (2H, m, H-4'), 1.76 (1H, m, H-3a), 1.35 (1H, m, H-3b), 0.87 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-5), 0.86 (3H, t, J = 6.4 Hz, H-6); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 166.5 (C-1), 52.6 (C-2), 37.8 (C-3), 24.0 (C-4), 22.8 (C-5), 21.9 (C-6), 170.3 (C-1'), 58.4 (C-2'), 27.4 (C-3'), 22.5 (C-4'), 44.8 (C-5')。以上数据与文献<sup>[13]</sup>中报道一致,故确定该化合物为环(*L*-亮-*L*-脯)二肽。

**化合物 5** 白色粉末;茛三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茛三酮显色阳性,提示为环肽类化合物; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -37.5 (c 0.11, DMSO); ESI-MS: *m/z* 333 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.21 (1H, s, OH), 7.85 (2H, br s, NH), 7.28 (2H, dd, J = 7.8, 7.2 Hz, H-6, H-8), 7.20 (2H, dd, J = 7.8, 7.2 Hz, H-7), 7.03 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-5, H-9), 6.83 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-5', H-9'), 6.67 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-6', H-8'), 3.94 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-2), 3.89 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-2'), 2.58 (1H, dd, J = 14.4, 4.8 Hz, H-3a), 2.51 (1H, d, J = 14.4, 4.8 Hz, H-3'a), 2.19 (1H, dd, J = 14.4, 6.0 Hz, H-3b), 2.17 (1H, dd, J = 14.4, 6.0 Hz, H-3'b); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 166.3 (C-1), 55.4 (C-2), 38.5 (C-3), 136.6 (C-4), 129.8 (C-5), 128.2 (C-6), 126.4 (C-7), 128.2 (C-8), 129.8 (C-9), 166.2 (C-1'), 55.7 (C-2'), 38.5 (C-3'), 126.4 (C-4'), 130.8 (C-5'), 115.0 (C-6'), 156.1 (C-7'), 115.0 (C-8'), 130.8 (C-9')。以上数据与文献<sup>[14]</sup>中报道一致,故确定该化合物为环-(*L*-苯丙-*L*-酪)二肽。

**化合物 6** 白色粉末;可溶于甲醇、二氯甲烷、氯仿等溶剂;茛三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茛

三酮显色阳性,提示为环肽类化合物; $[\alpha]_D^{25}$ -152.3 ( $c$  0.38, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS:  $m/z$  261 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.14 (1H, s, OH), 7.83 (1H, s, NH), 7.02 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5, H-9), 6.60 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-6, H-8), 4.21 (1H, t,  $J$  = 4.8 Hz, H-2), 4.02 (1H, dd,  $J$  = 10.8, 6.0 Hz, H-2'), 3.37 (1H, m, H-5'a), 3.23 (1H, m, H-5'b), 2.89 (2H, dd,  $J$  = 5.4, 4.8 Hz, H-3), 1.97 (1H, m, H-3'a), 1.69 (2H, m, H-4'), 1.37 (1H, m, H-3'b); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 165.1 (C-1), 56.0 (C-2), 34.6 (C-3), 155.8 (C-4), 130.8 (C-5), 114.7 (C-6), 127.0 (C-7), 114.7 (C-8), 130.8 (C-9), 168.8 (C-1'), 58.3 (C-2'), 27.8 (C-3'), 21.8 (C-4'), 44.5 (C-5')。以上数据与文献<sup>[15]</sup>中报道一致,故确定该化合物为环(L-酪-L-脯)二肽。

**化合物 7** 白色粉末;可溶于甲醇、二氯甲烷、氯仿等溶剂;茚三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茚三酮显色阳性,提示为环肽类化合物; $[\alpha]_D^{25}$ -211.6 ( $c$  0.19, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS:  $m/z$  245 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.99 (1H, s, NH), 7.27 (2H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-6, H-8), 7.25 (2H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-5, H-9), 7.19 (1H, m, H-7), 4.35 (1H, t,  $J$  = 5.4 Hz, H-2), 4.07 (1H, dd,  $J$  = 10.8, 6.0 Hz, H-2'), 3.39 (1H, m, H-5'a), 3.27 (1H, m, H-5'b), 3.07 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 4.8 Hz, H-3a), 3.02 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 4.8 Hz, H-3b), 2.01 (1H, m, H-3'a), 1.72 (2H, m, H-4'), 1.41 (1H, m, H-3'b); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 165.0 (C-1), 55.7 (C-2), 35.3 (C-3), 137.3 (C-4), 129.8 (C-5), 127.9 (C-6), 126.3 (C-7), 127.9 (C-8), 129.8 (C-9), 169.0 (C-1'), 58.4 (C-2'), 27.7 (C-3'), 21.9 (C-4'), 44.6 (C-5')。以上数据与文献<sup>[16]</sup>中报道一致,故确定该化合物为环(L-苯丙-L-脯)二肽。

**化合物 8** 白色粉末;可溶于甲醇、二氯甲烷、氯仿等溶剂;茚三酮显色阴性,薄层原位酸水解后茚三酮显色阳性,提示为环肽类化合物; $[\alpha]_D^{25}$ -148.3 ( $c$  0.06, CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS:  $m/z$  211 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.96 (1H, s, NH), 4.11 (1H, t,  $J$  = 7.8 Hz, H-2'), 3.95 (1H, br s, H-2), 3.40 (1H, m, H-5'a), 3.33 (1H, m, H-5'b), 2.13 (1H, m, H-3'a), 2.02 (1H, m, H-3), 1.85 (1H, m, H-3'b), 1.82 (2H, m, H-4'), 1.34 (1H, m, H-4a), 1.26 (1H, m, H-4b), 0.98 (3H, d,  $J$  = 7.2 Hz, H-6), 0.83 (3H,

t,  $J$  = 7.2 Hz, H-5); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 165.2 (C-1), 58.2 (C-2), 34.8 (C-3), 23.8 (C-4), 12.3 (C-5), 14.9 (C-6), 170.1 (C-1'), 59.2 (C-2'), 27.9 (C-3'), 22.0 (C-4'), 44.6 (C-5')。以上数据与文献<sup>[17]</sup>中报道一致,故确定该化合物为环(L-异亮-L-脯)二肽。

**化合物 9** 无色油状;可溶于二氯甲烷、氯仿等溶剂; ESI-MS:  $m/z$  369 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.18 (1H, dd,  $J$  = 15.6, 9.6 Hz, H-11), 6.27 (1H, dd,  $J$  = 21.6, 9.6 Hz, H-10), 6.24 (1H, m, H-9), 6.10 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-12), 4.03 (1H, dd,  $J$  = 11.4, 4.2 Hz, H-1'a), 3.89 (1H, dd,  $J$  = 11.4, 6.6 Hz, H-1'b), 3.62 (1H, m, H-2'), 3.34 (1H, overlap, H-3'), 2.54 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-14), 2.28 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-2), 2.17 (2H, m, H-8), 1.52 ~ 1.22 (16H, m, H-3 ~ H-7, H-15 ~ H-17), 0.85 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-18); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 172.9 (C-1), 33.4 (C-2), 24.4 (C-3), 28.5 (C-4), 28.4 (C-5), 28.3 (C-6), 28.1 (C-7), 32.4 (C-8), 145.3 (C-9), 129.0 (C-10), 142.7 (C-11), 128.1 (C-12), 200.2 (C-13), 40.0 (C-14), 23.5 (C-15), 30.9 (C-16), 21.9 (C-17), 13.8 (C-18), 65.5 (C-1'), 69.3 (C-2'), 62.6 (C-3')。以上数据与文献<sup>[18]</sup>中报道一致,故确定该化合物为 2,3-dihydroxypropyl (9*E*, 11*E*)-13-oxooctadeca-9, 11-dienoate。

## 2.2 活性结果

化合物 9 为长链不饱和脂肪酸类化合物,据已有文献报道,脂肪酸类化合物在结构以及抗菌、抗肿瘤活性上无较大研究价值,故未对其进行活性测定。本文仅对分离得到的化合物 1 ~ 8 进行了抗金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) 和大肠埃希菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922) 的体外活性测试 (见表 2)。结果表明,所有化合物对这两株测试菌株均无明显的抑制活性 (MIC > 64  $\mu$ g/mL)。采用 MTT 法评价了本实验分离得到的化合物 1 ~ 8 对人胰腺癌细胞 (MIA PaCa-2) 增殖的影响,在 50  $\mu$ mol/L 测试浓度下,所有化合物均未表现出明显的活性 (抑制率低于 50%)。

## 3 讨论与结论

从土壤来源的链霉菌 *Streptomyces* sp. CICC 203679 的发酵物中分离得到了 9 个化合物,其结构类型包括脂肪酸、生物碱和环二肽等。化合物 1 为新的脂肪酸类化合物,化合物 3 为首次从土壤来源

表2 化合物1~8的抗菌和细胞毒活性评价

Table 2 Antibacterial and cytotoxic activities of compounds 1-8

样品 Sample	最小抑菌浓度 MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		抑制率 Inhibition rate (%)
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureu</i> ATCC 29213	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	人胰腺癌细胞 MIA PaCa-2
1	>64	>64	24.2
2	>64	>64	16.3
3	>64	>64	-0.9
4	>64	>64	13.4
5	>64	>64	-17.6
6	>64	>64	22.8
7	>64	>64	27.2
8	>64	>64	10.2
左氧氟沙星 Levofloxacin*	0.125	$\leq 0.03$	-
吉西他滨 Gemcitabine*	-	-	99.3

注: \* 阳性对照;“-”代表未测试。

Note: \* Positive control;“-” means no test.

的链霉菌中分离得到。药理活性评价结果显示,化合物1~8未显示明显的抗菌和抗肿瘤活性。化合物2属于生物碱类化合物,该化合物广泛存在于放线菌、细菌、真菌等微生物中,如:*Streptomyces*<sup>[19]</sup>、*Bacillus*<sup>[20]</sup>、*Aspergillus*<sup>[21]</sup>、*Alternaria*<sup>[22]</sup>。化合物3属于吡啶生物碱类化合物,于1965年首次被报道,该化合物在*Bacillus*、*Balansia*、*Edwardsiella*等属中也有报道<sup>[12,23,24]</sup>。据文献报道,化合物3具有防污染的作用,对纹藤壶的幼虫具有一定的抑制作用,其ED<sub>50</sub>为18.6  $\mu\text{mol}/\text{L}$ <sup>[25]</sup>。环二肽是自然界中最小的环肽,其广泛存在于植物、动物以及微生物的代谢产物中,具有抗菌、抗肿瘤、神经保护、抗血栓等方面活性<sup>[26]</sup>。本研究并未分离得到具有明显生物活性的次生代谢产物,可能是由于在当前的培养条件下,活性代谢产物的生物合成基因簇并没有被激活,或是因为活性代谢产物的产量太低而没有分离得到。后续我们将尝试优化培养条件来增加次生代谢产物的结构多样性,并进一步结合抗菌活性评价,获得结构新颖、活性显著的次生代谢产物。

## 参考文献

- 1 Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics [J]. Nat Prod Rep, 2017, 34: 1203-1232.
- 2 Procópio RED, Silva IR, Martins MK, et al. Antibiotics produced by *Streptomyces* [J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16: 466-471.
- 3 Sun J, Zhao G, O' Connor RD, et al. Vertirhodins A-F, C-linked pyrrolidine-iminosugar-containing pyranonaphthoqui-

- 4 nones from *Streptomyces* sp. B15-008 [J]. Org Lett, 2021, 23: 682-686.
- 5 Marchbank DH, Ptycia-Lamky VC, Decken A, et al. Guanah-anolide A, a meroterpenoid with a sesterterpene skeleton from coral-derived *Streptomyces* sp. [J]. Org Lett, 2020, 22: 6399-6403.
- 6 Zhang SY, Zhan ZJ, Zhang H, et al. Morindolestatin, naturally occurring dehydromorpholinocarbazole alkaloid from soil-derived bacterium of the genus *Streptomyces* [J]. Org Lett, 2020, 22: 1113-1116.
- 7 An JS, Shin B, Kim TH, et al. Dumulmycin, an antitubercular bicyclic macrolide from a riverine sediment-derived *Streptomyces* sp. [J]. Org Lett, 2021, 23: 3359-3363.
- 8 Gu G, Cai G, Wang Y, et al. Daldispones A and B, two new cyclopentenones from *Daldinia* sp. CCCC 400770 [J]. J Antibiot, 2021, 74: 215-218.
- 9 Zhang D, Tao X, Gu G, et al. Microbial transformation of neo-clerodane diterpenoid, scutebarbatine F, by *Streptomyces* sp. CCCC 205437 [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 662321.
- 10 Zhang D, Tao X, Chen R, et al. Pericoannosin A, a polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase hybrid metabolite with new carbon skeleton from the endophytic fungus *Periconia* sp. [J]. Org Lett, 2015, 17: 4304-4307.
- 11 Liao QY, Wang ZY, Li WJ, et al. Secondary metabolites of alkalitolerant *Streptomyces sindenensis* OUCMDZ-1368 [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2015, 40: 19-27.
- 12 Sato S, Sato T. A mild and environmentally friendly scandium (III) trifluoromethanesulfonate-catalyzed synthesis of bis (3'-indolyl) alkanes and bis (3'-indolyl)-1-deoxyalditols [J]. Carbohydr Res, 2005, 340: 2251-2255.

- 12 Yang CL, Han Y, Wang Y, et al. Bis- and tris-indole alkaloids from *Edwardsiella tarda* [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2010, 37: 1325-1330.
- 13 Fu YD, Li ZL, Pu SB, et al. Chemical constituents from *Scolopendra multidens* (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2013, 44: 1726-1729.
- 14 Cheng ZH, Wu T, Yu BY. Chemical constituents in the tubers of *Ophiopogon japonicus* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2005, 17: 1-3.
- 15 Chen S, Zhang D, Chen M, et al. A rare diketopiperazine glycoside from marine-sourced *Streptomyces* sp. ZZ446 [J]. Nat Prod Res, 2020, 34: 1046-1050.
- 16 Wang L, Hu SZ, Liu CX, et al. Cyclic dipeptides metabolites from the symbiotic fungus *Paraconiothyrium brasiliense* [J]. Chin Res Appl (化学研究与应用), 2014, 26: 1478-1482.
- 17 Li Y, Tang JS, Gao H, et al. Study of anti-MRSA bioactive constituents from a marine actinomycetes *Micromonospora* sp. (No. 69) [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物杂志), 2010, 29: 16-21.
- 18 Kawagishi H, Miyazawa T, Kume H, et al. Aldehyde dehydrogenase inhibitors from the mushroom *Clitocybe clavipes* [J]. J Nat Prod, 2002, 65: 1712-1714.
- 19 Zhao PJ, Li GH, Shen YM. New chemical constituents from the endophyte *Streptomyces* species LR4612 cultivated on *Maytenus hookeri* [J]. Chem Biodivers, 2006, 3: 337-342.
- 20 Xie CL, Xia JM, Su RQ, et al. Bacilsubteramide A, a new indole alkaloid, from the deep-sea-derived *Bacillus subterraneus* 11593 [J]. Nat Prod Res, 2018, 32: 2553-2557.
- 21 Zhao WY, Zhu TJ, Fan GT, et al. Three new dioxopiperazine metabolites from a marine-derived fungus, *Aspergillus fumigatus* Fres. [J]. Nat Prod Res, 2010, 24: 953-957.
- 22 Fang ZF, Yu SS, Zhou WQ, et al. A new isocoumarin from metabolites of the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees; Fr.) Wiltshire [J]. Chin Chem Lett, 2012, 23: 317-320.
- 23 Shen S, Li W. The inhibitory effects of metabolites from *Bacillus pumilus* on potato virus Y and the induction of early response genes in *Nicotiana tabacum* [J]. AMB Expr, 2020, 10: 152.
- 24 Porter JK, Bacon CW, Robbins JD, et al. Indole alkaloids from *Balansia epichloe* (Weese) [J]. J Agr Food Chem, 1977, 25: 88-93.
- 25 Wang KL, Xu Y, Lu L, et al. Low-toxicity diindol-3-ylmethanes as potent antifouling compounds [J]. Mar Biotechnol, 2015, 17: 624-632.
- 26 Yang ZJ, et al. Research advances in cyclic dipeptides [J]. Mod Pharm Clin (现代药物与临床), 2009, 24: 73-81.

(上接第 933 页)

- 22 Hu R, Wang MQ, Ni SH, et al. Salidroside ameliorates endothelial inflammation and oxidative stress by regulating the AMPK/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway in AGEs-induced HUVECs [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 867: 172797.
- 23 Dong J, Chen Y, Yang F, et al. Naringin exerts therapeutic effects on mice colitis; a study based on transcriptomics combined with functional experiments [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 729414.
- 24 Xu L, Wang S, Li B, et al. A protective role of ciglitazone in ox-LDL-induced rat microvascular endothelial cells via modulating PPAR $\gamma$ -dependent AMPK/eNOS pathway [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(1): 92-102.
- 25 Xu X, Wang Y, Wei Z, et al. Madecassic acid, the contributor to the anti-colitis effect of madecassoside, enhances the shift of Th17 toward Treg cells via the PPAR $\gamma$ /AMPK/ACC1 pathway [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2723.