

中国南海海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. rssa1 的化学成分研究王 蓉¹, 郭志凯^{2,3*}, 程 芬¹, 冯全英¹, 詹夏菲¹¹海南省海洋与渔业科学院 海南省热带海水养殖技术重点实验室, 海口 571126;²海南热带农业资源研究院 海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室;³中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南省热带微生物资源重点实验室, 海口 571101

摘要:对中国南海珊瑚样品来源的链霉菌 *Streptomyces* sp. rssa1 代谢产物进行研究。采用正相硅胶柱、ODS 反相硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱以及半制备高效液相色谱等分离方法, 从该菌株的大米固体培养基发酵产物中分离得到 10 个化合物, 通过 NMR、MS 等波谱数据, 将化合物结构分别鉴定为四霉素 A(1)、四霉素 B(2)、kanglemycin M(3)、tryptophandehydrobutyrine diketopiperazine(4)、3-吲哚乙酰胺(5)、*N*-乙酰基色氨酸(6)、苯乙酸(7)、*N*-乙酰基酪胺(8)、苯甲酰胺(9)、苯乙酰胺(10)。抗菌活性筛选显示, 化合物 4 对溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 的生长具有弱抑制活性。细胞毒活性测试结果显示, 化合物 3 对巨噬细胞 RAW 264.7 具有细胞毒活性。环化核苷酸磷酸二酯酶 PDE4 水解抑制活性筛选未发现化合物在测试浓度下具有抑制活性。

关键词:珊瑚; 链霉菌; 四烯大环内酯; 四霉素; 二酮哌嗪类化合物

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)6-0975-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.6.009

Study on the chemical components produced by the marine *Streptomyces* sp. rssa1 from the South China Sea

WANG Rong¹, GUO Zhi-kai^{2,3*}, CHENG Fen¹, FENG Quan-ying¹, ZHAN Xia-fei¹¹Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies, Hainan Academy of Ocean andFisheries Sciences, Haikou 571126, China; ²Hainan Key Laboratory of Conservation and

Utilization of Tropical Agricultural Bioresources, Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources;

³Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Institute of

Tropical Bioscience and Biotechnology, Haikou 571101, China

Abstract: Actinomycetes are an excellent treasure resource of structurally novel and bioactive natural products with potent medicinal values. The metabolites of the coral-associated *Streptomyces* sp. rssa1 from South China Sea were investigated. Totally, ten compounds were isolated from the solid fermentation extract using various chromatography methods including silica gel column, ODS reverse gel column, Sephadex LH-20 column and semipreparative HPLC. Their structures were identified as tetramycin A (1), tetramycin B (2), kanglemycin M (3), tryptophandehydrobutyrine diketopiperazine (4), 3-indole acetamide (5), *N*-acetyltryptophan (6), phenylacetic acid (7), *N*-acetyltyramine (8), benzamide (9), phenylacetamide (10) by NMR, MS data analysis and comparison with previously reported data. The antibacterial, cytotoxic and phosphodiesterase PDE4 inhibition activities of several compounds were screened. The results showed that compound 4 possessed weak inhibitory activity against the growth of *Vibrio alginolyticus*. Compound 3 displayed cytotoxic activity towards RAW 264.7 cells. No compound showed phosphodiesterase PDE4 inhibition activity at the concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$.

Key words: coral; *Streptomyces* sp.; tetraene macrolides; tetramycin; diketopiperazine

收稿日期: 2022-01-07 接受日期: 2022-03-25

基金项目: 海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC352); 海南省热带海水养殖技术重点实验室开放课题基金(TMTOF202101); 南峰专项(NFZX2021); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630052022016)

* 通信作者 E-mail: guozhikai@itbb.org.cn

海洋放线菌是一类具有重要价值的药用微生物资源,它们能够产生结构类型多样的生物活性物质,如大环内酯类、生物碱类、肽类、醌类等,特别是在抗菌化合物挖掘方面具有巨大潜力。Schinke 等^[1]曾统计 2010 年~2015 年间海洋细菌来源的抗菌化合物有 69% 来源于海洋放线菌。由于海洋环境的特殊性,海洋放线菌在生理生化特性和遗传背景特性上与陆生放线菌存在差异,使得从海洋放线菌中寻找活性分子潜力巨大。

本研究组近年来已从南海海洋生物共附生放线菌中发现了一些具有新颖结构的活性分子^[2-4],最近我们从中国海南西沙群岛采集的珊瑚样品中分离筛选得到的 1 株具有抗菌活性的海洋链霉菌菌株 *Streptomyces* sp. rssa1,但其抗菌药效物质不清楚。为了挖掘该菌株所产生的活性成分,本文首次利用大米固体培养基对它进行了固体发酵,对其发酵产物进行系统的化学成分研究,并对其活性进行了筛选。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Bruker DPX 400 MHz 和 Bruker DRX 600 MHz 超导核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司,TMS 为内标);Agilent 6210 TOF LC-MS 质谱仪(美国 Agilent 公司);Waters 1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配备分析型色谱柱(Waters XBridge C₁₈,150 mm × 2.1 mm,3.5 μm)和半制备型色谱柱(Waters XBridge C₁₈,250 mm × 10 mm,5 μm);旋转蒸发器(N1300,上海艾朗仪器有限公司);ZQZY-CS8V 恒温摇床(上海知楚公司);分析型薄层层析硅胶板(GF254)和正相层析柱硅胶(45~75 μm)(青岛海洋化工);Sephadex LH-20(瑞典 Pharmacia Biotech)和 ODS 反相硅胶(日本 Nacalai Tesque 公司);色谱甲醇(康科德);实验中使用的其他试剂均为分析纯。

1.2 菌株材料

本文所研究的菌株 rssa1 是我们从中国南海西沙群岛采集的珊瑚样品中分离纯化获得。通过 16S rRNA 基因序列测定,并经 BLAST 比对,与菌株 *Streptomyces* sp. HBUM206419 的 16S rRNA 序列(GenBank 号为 MT540570)的相似度为 99.93%,结合形态学特征,将该菌株鉴定为 *Streptomyces* sp.。菌株 *Streptomyces* sp. rssa1 的 16S rRNA 序列在 GenBank 中的注册号为 OL314653,并保藏于中国热带

农业科学院热带生物技术研究所。

1.3 培养基与菌株发酵

ISP2 固体培养基:酵母浸粉 4 g/L,麦芽浸粉 10 g/L,葡萄糖 4 g/L,琼脂 20 g/L,17.5 g/L 人工海盐,去离子水 1 L,pH 自然;麦芽提取物(ME)液体培养基:20 g/L 麦芽提取物,20 g/L 蔗糖,1 g/L 蛋白胨,17.5 g/L 人工海盐,去离子水 1 L,pH 值为 7.0;大米固体发酵培养基:大米 30 g,人工半海水(17.5 g/L)45 mL。

海洋链霉菌菌株 *Streptomyces* sp. rssa1 经 ISP2 培养基活化,28 °C 培养 5 天,之后将活化后的菌株接种至装有 200 mL ME 液体培养基的三角瓶(1 000 mL)中,于恒温摇床上振荡培养 72 h(160 r/min,28 °C)。取 10 mL 的 ME 液体种子液接种到装有 30 g 大米的组培瓶中进行发酵,静置培养 45 天(28 °C)。以上培养基均于高压蒸汽灭菌锅中 121 °C 灭菌 30 min。

1.4 提取与分离纯化

大米固体培养基培养发酵菌株 *Streptomyces* sp. rssa1 45 天后,加入乙酸乙酯浸提 3 次,合并提取液,于 45 °C 下减压浓缩得到提取物 6 g。对获得的提取物进行减压正相硅胶柱层析分离,采用二氯甲烷-甲醇等度洗脱(100:0、100:1、100:2、100:4、100:8、100:16、100:32、0:100),在 TLC 检测下合并得到 8 个组分(Fr. a~Fr. h)。组分 Fr. c 经减压 ODS 反相柱层析后,将 70% 甲醇水部位经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离纯化得到化合物 **3**(4 mg)。组分 Fr. d 经 ODS 反相硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 凝胶柱层析后,利用半制备 HPLC(0~40 min,0%~70% 甲醇,40~42 min,70%~100% 甲醇,42~52 min,100% 甲醇,52~53 min,100%~0% 甲醇,53~58 min,0% 甲醇;波长 254 nm,流速为 3.0 mL/min)纯化得到化合物 **4**(8 mg, $t_R = 23.5$ min)、**5**(3 mg, $t_R = 19.6$ min)、**6**(5 mg, $t_R = 21.6$ min)、**7**(5 mg, $t_R = 24.1$ min)、**8**(4 mg, $t_R = 16.1$ min)、**9**(3 mg, $t_R = 17.4$ min)和 **10**(6 mg, $t_R = 18.5$ min)。组分 Fr. e 经 ODS 反相硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 凝胶柱层析后,利用半制备 HPLC(0~20.0 min,65% 甲醇,20.1~40.0 min,70% 甲醇)纯化得到化合物 **1**(9 mg, $t_R = 34.6$ min)和 **2**(6 mg, $t_R = 20.3$ min)。

1.5 活性筛选

体外抗菌活性测试采用先前报道的滤纸片法测定抑菌圈直径大小^[5],供试病原细菌为溶藻弧菌

(*V. alginolyticus*)。化合物和卡那霉素分别用 DMSO 配成 5 mg/mL 的样品溶液备用。测试抗菌活性时,以 DMSO 为阴性对照,以卡那霉素为样品对照,选用加人工海盐的 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,人工海盐 25 g/L,琼脂粉 20 g/L,去离子水 1 L, pH 7.4)进行细菌培养和测试。用交叉交叉法测定抑菌圈直径,做 3 次平行重复。采用已报道的方法检测了化合物对 RAW 264.7 细胞产生的毒性^[6]和环化核苷酸磷酸二酯酶 PDE4 水解抑制活性^[7]。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 淡黄色粉末,溶于甲醇; $[\alpha]_D^{25}$ -46.0 (*c* 0.1, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 696.3584 [M + H]⁺; 分子式为 C₃₅H₅₃NO₁₃; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.77 (1H, overlap, H-3), 6.41 (1H, m, H-18), 6.35 (1H, m, H-19), 6.28 (2H, overlap, H-17, H-22), 6.15 (1H, m, H-20), 6.08 (2H, overlap, H-16, H-21), 5.80 (1H, d, J = 14.6 Hz, H-2), 5.48 (1H, dd, J = 14.8, 9.6 Hz, H-23), 4.99 (1H, m, H-25), 4.57 (1H, s, H-1'), 4.43 (2H, overlap, H-7, H-11), 4.41 (1H, m, H-15), 4.28 (1H, m, H-13), 4.03 (1H, m, H-2'), 3.85 (1H, m, H-5), 3.40 (1H, m, H-5'), 3.35 (1H, m, H-4'), 3.14 (1H, m, H-3'), 2.38 (1H, m, H-24), 2.01 (1H, m, H-12), 1.28 (3H, d, J = 5.2 Hz, H-6'), 1.13 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-26), 0.91 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-28); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 167.0 (C-1), 125.4 (C-2), 147.5 (C-3), 49.2 (C-4), 74.6 (C-5), 42.9 (C-6), 70.5 (C-7), 48.6 (C-8), 99.0 (C-9), 39.5 (C-10), 67.4 (C-11), 61.8 (C-12), 68.1 (C-13), 45.3 (C-14), 79.7 (C-15), 137.9 (C-16), 133.3 (C-17), 134.6 (C-18, C-19), 130.6 (C-20), 136.5 (C-21), 132.8 (C-22), 132.3 (C-23), 49.4 (C-24), 72.7 (C-25), 14.1 (C-26), 25.2 (C-27), 12.8 (C-28), 180.8 (C-29), 99.2 (C-1'), 69.4 (C-2'), 57.2 (C-3'), 71.1 (C-4'), 73.7 (C-5'), 17.9 (C-6')。以上数据与文献^[8,9]报道一致,故将该化合物鉴定为四霉素 A。

化合物 2 淡黄色粉末,溶于甲醇; $[\alpha]_D^{25}$ -22.0 (*c* 0.1, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 712.3541 [M + H]⁺; 分子式为 C₃₅H₅₃NO₁₄; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.71 (1H, dd, J = 15.4, 2.8 Hz, H-3), 6.32 (1H, m, H-18), 6.27 (1H, m, H-19), 6.17 (2H,

m, H-17, H-22), 5.98 (4H, overlap, H-2, H-16, H-20, H-21), 5.40 (1H, dd, J = 15.1, 9.6 Hz, H-23), 4.91 (1H, m, H-25), 4.48 (1H, s, H-1'), 4.35 (1H, m, H-7), 4.31 (1H, m, H-11), 4.30 (1H, m, H-15), 4.19 (1H, td, J = 10.3, 3.8 Hz, H-13), 3.98 (1H, overlap, H-4), 3.96 (1H, overlap, H-2'), 3.74 (1H, m, H-5), 3.29 (1H, m, H-4'), 3.24 (1H, m, H-5'), 3.13 (1H, m, H-3'), 2.28 (1H, m, H-24), 1.92 (1H, overlap, H-12), 1.25 (2H, m, H-27), 1.19 (3H, d, J = 5.7 Hz, H-6'), 1.04 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), 0.82 (3H, t, J = 7.3 Hz, H-28); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 167.3 (C-1), 123.0 (C-2), 150.2 (C-3), 74.7 (C-4), 75.0 (C-5), 41.8 (C-6), 70.0 (C-7), 48.5 (C-8), 99.1 (C-9), 39.5 (C-10), 67.4 (C-11), 61.8 (C-12), 68.0 (C-13), 45.2 (C-14), 79.6 (C-15), 137.7 (C-16), 133.3 (C-17), 134.6 (C-18), 134.3 (C-19), 130.5 (C-20), 136.4 (C-21), 132.9 (C-22), 132.4 (C-23), 49.6 (C-24), 73.8 (C-25), 14.1 (C-26), 25.2 (C-27), 12.8 (C-28), 180.8 (C-29), 99.0 (C-1'), 69.1 (C-2'), 57.2 (C-3'), 70.5 (C-4'), 74.6 (C-5'), 17.8 (C-6')。以上数据与文献^[8,9]报道一致,故将该化合物鉴定为四霉素 B。

化合物 3 棕色固体,溶于甲醇; HR-ESI-MS: m/z 321.0760 [M + H]⁺; 分子式为 C₁₉H₁₂O₅; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.00 (1H, s, OH-1), 10.70 (1H, s, OH-9), 8.28 (1H, br s, H-15), 8.17 (1H, br s, H-14), 7.80 (1H, br s, H-4), 7.61 (1H, br s, H-3), 7.50 (1H, br s, H-12), 7.36 (1H, br s, H-2), 7.11 (1H, br s, H-10), 5.45 (1H, t, J = 5.6 Hz, 19-OH), 4.66 (2H, br s, H-19); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 160.9 (C-1), 123.6 (C-2), 137.6 (C-3), 119.4 (C-4), 146.6 (C-5), 186.5 (C-6), 133.6 (C-7), 119.7 (C-8), 155.6 (C-9), 113.7 (C-10), 135.6 (C-11), 116.8 (C-12), 136.5 (C-13), 121.7 (C-14), 135.5 (C-15), 138.6 (C-16), 187.8 (C-17), 115.5 (C-18), 62.8 (C-19)。以上数据与文献^[10]报道一致,故将该化合物鉴定为 kanglemycin M。

化合物 4 黄色固体,溶于氯仿; HR-ESI-MS: m/z 284.1391 [M + H]⁺; 分子式为 C₁₆H₁₇N₃O₂; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.25 (1H, br s, NH-1), 7.61 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-5), 7.29 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-8), 7.15 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-7), 7.06 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-6), 7.01 (1H, br s, NH-15), 6.82 (1H,

$d, J = 1.7$ Hz, H-2), 5.44 (1H, q, $J = 7.4$ Hz, H-18), 4.26 (1H, dd, $J = 3.8, 3.6$ Hz, H-11), 3.56 (1H, dd, $J = 14.8, 2.8$ Hz, H-10a), 3.26 (1H, dd, $J = 14.8, 4.8$ Hz, H-10b), 3.09 (3H, s, H-17), 0.88 (3H, d, $J = 7.4$ Hz, H-19); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 124.8 (C-2), 107.9 (C-3), 127.5 (C-4), 118.7 (C-5), 119.8 (C-6), 122.3 (C-7), 110.9 (C-8), 136.2 (C-9), 27.7 (C-10), 63.3 (C-11), 166.5 (C-13), 126.2 (C-14), 160.3 (C-16), 32.9 (C-17), 112.2 (C-18), 9.7 (C-19)。以上数据与文献^[11]报道一致,故将该化合物鉴定为二酮哌嗪类化合物 tryptophandehydrobutyrine diketopiperazine。

化合物 5 白色晶体,溶于甲醇;HR-ESI-MS: m/z 175.086 9 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.85 (1H, br s, NH-1), 7.55 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.34 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-8), 7.28 (1H, br s, NH), 7.19 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-2), 7.07 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-7), 7.00 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6), 6.82 (1H, br s, NH), 3.47 (2H, s, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 124.2 (C-2), 109.5 (C-3), 127.7 (C-4), 121.4 (C-5), 111.7 (C-6), 118.7 (C-7), 119.1 (C-8), 136.6 (C-9), 33.0 (C-10), 173.4 (C-11)。以上数据与文献^[12]报道一致,故将该化合物鉴定为 3-吡啶乙酰胺。

化合物 6 白色晶体,溶于甲醇; $[\alpha]_D^{25} + 42.0$ (c 0.10, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 247.108 2 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.83 (1H, br s, NH-1), 8.10 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, NH-13), 7.53 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.33 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-8), 7.13 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 7.06 (1H, td, $J = 7.7, 1.4$ Hz, H-7), 6.99 (1H, td, $J = 7.7, 0.7$ Hz, H-6), 4.44 (1H, ddd, $J = 9.5, 8.4, 5.6$ Hz, H-11), 3.16 (1H, dd, $J = 14.7, 5.6$ Hz, H-10a), 2.99 (1H, dd, $J = 14.7, 9.1$ Hz, H-10b), 1.80 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 123.9 (C-2), 110.6 (C-3), 127.7 (C-4), 118.6 (C-5), 118.8 (C-6), 121.5 (C-7), 111.8 (C-8), 136.5 (C-9), 27.6 (C-10), 53.6 (C-11), 174.1 (C-12), 169.6 (C-14), 22.9 (C-15)。以上数据与文献^[13]报道一致,故将该化合物鉴定为 *N*-乙酰基色氨酸。

化合物 7 无色片状晶体,溶于甲醇;HR-ESI-MS: m/z 137.059 7 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.30 (1H, br s, COOH), 7.31 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H-3, H-5), 7.26 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H-2, H-6), 7.24 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-4), 3.56 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 135.6 (C-1), 129.8 (C-2, C-6), 128.7 (C-3, C-5), 127.0 (C-4), 41.3 (C-7), 173.2 (C-8)。以上数据与文献^[14]报道一致,故将该化合物鉴定为苯乙酸。

化合物 8 黄色油状物,溶于甲醇;HR-ESI-MS: m/z 180.101 7 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.03 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2, H-6), 6.74 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3, H-5), 3.34 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8), 2.69 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7), 1.92 (3H, s, H-10); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 155.5 (C-1), 114.9 (C-2, C-6), 129.4 (C-3, C-5), 129.9 (C-4), 34.3 (C-7), 41.1 (C-8), 171.9 (C-9), 21.3 (C-10)。以上数据与文献^[15]报道一致,故将该化合物鉴定为 *N*-乙酰基酪胺。

化合物 9 无色片状晶体,溶于甲醇;HR-ESI-MS: m/z 122.060 1 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式为 $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.97 (1H, br s, NH), 7.87 (2H, dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, H-2, H-6), 7.52 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-4), 7.45 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-3, H-5), 7.35 (1H, br s, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 134.7 (C-1), 127.9 (C-2, C-6), 128.7 (C-3, C-5), 131.7 (C-4), 168.4 (C-7)。以上数据与文献^[16]报道一致,故将该化合物鉴定为苯甲酰胺。

化合物 10 白色晶体,溶于甲醇;HR-ESI-MS: m/z 136.075 6 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式为 $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.46 (1H, br s, NH_2), 7.30 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-3, H-5), 7.26 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2, H-6), 7.22 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4), 6.87 (1H, br s, NH_2), 3.37 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 137.0 (C-1), 129.5 (C-2, C-6), 128.6 (C-3, C-5), 126.7 (C-4), 42.6 (C-7), 172.7 (C-8)。以上数据与文献^[17,18]报道一致,故将该化合物鉴定为苯乙酰胺。

化合物 1~10 结构见图 1。

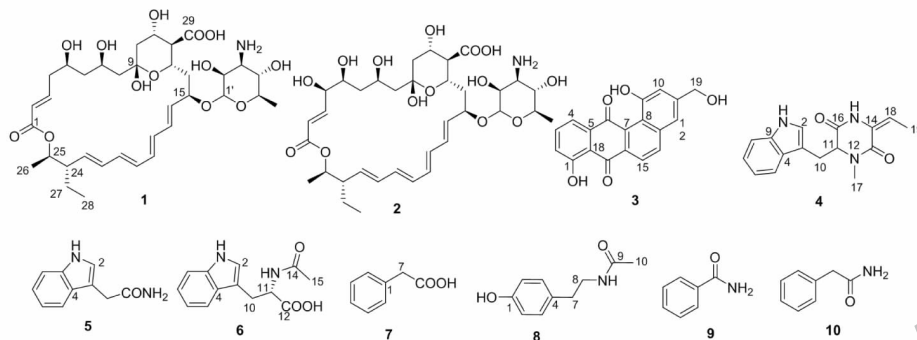


图1 化合物 1~10 的化学结构

Fig.1 The chemical structures of compounds 1-10

2.2 活性测试结果

抗菌活性实验显示,化合物 4 对溶藻弧菌具有微弱的抑制活性,其抑菌圈直径为 8.33 ± 0.67 mm,显著弱于阳性对照卡那霉素的抑制效果(抑菌圈直径为 26.67 ± 0.33 mm)。针对巨噬细胞 RAW 264.7 的毒性筛选结果显示,化合物 3 在 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度下,RAW 264.7 细胞的存活率为 $(18.97 \pm 0.31)\%$,表明它对 RAW 264.7 具有细胞毒性。化合物 3 对环化核苷酸磷酸二酯酶 PDE4 的水解抑制活性筛选结果显示,它在 $5 \mu\text{mol/L}$ 的测试浓度下无抑制活性,而阳性对照 rolipram 的水解抑制率为 52.02% 。

3 讨论与结论

放线菌是一类具有重要价值的药源微生物,目前发现的天然抗生素中近三分之二源于放线菌中,尤其是链霉菌。本文从珊瑚来源的链霉菌 *Streptomyces* sp. rssa1 的代谢产物中分离鉴定出 10 个化合物,其中化合物 1 和 2 分别为四烯大环内酯类化合物四霉素 A 和四霉素 B^[8,9],化合物 3 为苯并萘醌类化合物 kanglemycin M^[10],活性筛选发现它对巨噬细胞 RAW 264.7 具有细胞毒活性,进一步丰富了我国海洋放线菌活性天然产物库。化合物 4 为一种二酮哌嗪类化合物 tryptophandehydrobutyrine diketopiperazine。Li 等^[11]曾报道该化合物具有杀线虫活性,它对线虫(*Panagrellus redivivus*)48 h 的致死率为 40% ,本文首次从海洋链霉菌中发现具有杀线虫活性的化合物 4,预示着该菌可能在作物根结线虫病害防治中具有价值,并且发现它对溶藻弧菌具有弱抑制活性,为防治水产弧菌病害的药物研发提供线索。化合物 5~10 均为常见的吲哚类或含苯类简单化合物,其中 Jin 等^[13]从植物猪毛菜中首次发现

的化合物 7 具有较强的 α 淀粉酶抑制活性,在浓度 0.556 mg/mL 时的抑制率为 44% 。

多烯大环内酯类物质是一类高效广谱抗真菌抗生素,如纳他霉素能够抑制霉菌和酵母菌,并因具有良好的理化稳定性而被作为天然食品防腐剂和抗菌添加剂^[8,9]。本文分离发现的化合物 1 和 2 分别被鉴定为四烯大环内酯类抗生素四霉素 A 和 B,其结构上均有一个 25 个碳原子组成内酯环骨架,环上有 4 个共轭双键和多个羟基,并在 15 号位羟基通过糖苷键连接 1 个氨基糖。目前发现的四霉素产生菌均为链霉菌放线菌,最早是由 Dornberger 等^[19,20]从链霉菌 *Streptomyces noursei* 中发现,并且它们对苜蓿根腐病菌、稻瘟病菌等农业病原真菌具有较强抑制作用。然而,由于四霉素 A 和 B 的化学结构在阳光下不稳定,它们对紫外线较为敏感,因而限制了它们在农业生产上的直接应用^[9]。Zhang 等^[9]发现四霉素 A 和 B 在较低浓度下对黄曲霉菌具有较好的杀菌效果,最低杀菌浓度分别为 3.13 和 $12.56 \mu\text{g/mL}$ 。由于多烯大环内酯类化合物对哺乳动物毒性低且无副作用^[21],具有成为粮食和饲料防霉剂的潜力。本文首次从南海珊瑚来源的链霉菌菌株 rssa1 中发现了具有强效抗真菌活性的四烯大环内酯类化合物四霉素 A 和四霉素 B,由于许多研究表明它们在医药和农业病害防治领域具有良好的应用前景,因此该菌可能作为开发高效、低毒药物和绿色生防菌剂的一种重要菌种资源,该发现也为从我国热带海洋生物中寻找具有药用和农用价值的放线菌资源提供重要线索。

参考文献

- Schinke C, Martins T, Queiroz SCN, et al. Antibacterial compounds from marine bacteria, 2010-2015 [J]. J Nat Prod,

- 2017, 80:1215-1228.
- 2 Guo ZK, Ma SY, Khan S, et al. Zhaoshumycins A and B, two unprecedented antimycin-type depsipeptides produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. ITBB-ZKa6 [J]. *Mar Drugs*, 2021, 19:624.
 - 3 Guo ZK, Wang R, Chen SQ, et al. Anthocidins A-D, new 5-hydroxyanthranilic acid related metabolites from the sea urchin-associated actinobacterium, *Streptomyces* sp. HDa1 [J]. *Molecules*, 2018, 23:1032.
 - 4 Guo ZK, Wang R, Chen FX, et al. Bioactive aromatic metabolites from the sea urchin-derived actinomycete *Streptomyces spectabilis* strain HDa1 [J]. *Phytochem Lett*, 2018, 25:132-135.
 - 5 Guo ZK, Gai CJ, Cai CH, et al. Antibacterial metabolites from the soil-derived actinobacteria *Streptomyces* sp. [J]. *J Shenzhen Univ; Sci Eng(深圳大学学报:理工版)*, 2018, 35:166-171.
 - 6 Yan J, Pang Y, Chen J, et al. Synthesis, biological evaluation and mechanism study of a class of cyclic combretastatin A-4 analogues as novel antitumour agents [J]. *RSC Adv*, 2015, 5:98527-98537.
 - 7 Pan T, Xie S, Zhou Y, et al. Dual functional cholinesterase and PDE4D inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis and evaluation of tacrine-pyrazolo[3,4-b]pyridine hybrids [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29:2150-2152.
 - 8 Zhang YK, Zhou Y, Xue L, et al. Identification and medium optimization of tetramycins and tetrins from *Streptomyces* sp. CB02959 [J]. *Microbiol China(微生物学通报)*, 2021, 48:2341-2354.
 - 9 Zhang N, Sun CP, Song Z, et al. Isolation, purification and characterization of antifungal substances from *Streptomyces hygrosopicus* BS-112 [J]. *Acta Microbiol Sin(微生物学报)*, 2011, 51:224-232.
 - 10 Vanga DG, Kaliappan KP. A unified strategy for the syntheses of angucyclinone antibiotics: total syntheses of tetrangulol, kanglemycin M, X-14881-E, and anhydrolandomycinone [J]. *Eur J Org Chem*, 2012(11):2250-2259.
 - 11 Li P, Ma L, Xi JQ, et al. Study on the biocontrol efficiencies of strain BJLSH9 towards nematode and *Phytophthora nicotianae* and the identification of the nematocidal metabolite [J]. *J Yunnan Univ; Nat Sci(云南大学学报:自科版)*, 2012, 34:590-595.
 - 12 Ji YB, Zheng T, Yin JD. Chemical constituents from Chinese marine sponge *Cinachyrella* sp. [J]. *Chin J Mar Drugs(中国海洋药物)*, 2018, 37:7-12.
 - 13 Jin YS, Du JL, Yang Y, et al. Chemical and biologically active constituents of *Salsola collina* [J]. *Chem Nat Compd*, 2011, 47:257-260.
 - 14 Yan ZW, Liu JP, Lu D, et al. Chemical constituents from the bile of *Anser anser* and their anti-MMP activity [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2008, 20:960-963.
 - 15 Zhou TT, Xie CL, Zhang GY, et al. Study on the secondary metabolites from a deep-sea-derived actinomycete *Streptomyces* sp. WP6 [J]. *J Guangdong Pharma Univ(广东药学院学报)*, 2016, 32:282-285.
 - 16 de Kowalewski DG, Kowalewski VJ, Botek E, et al. Experimental and theoretical study of the ethoxy group conformational effect on ^{13}C chemical shifts in ortho-substituted phenetols [J]. *Magn Reson Chem*, 1997, 35:351-356.
 - 17 Song FH, Fan X, Xu XL, et al. Studies on chemical constituents of the brown alga *Dictyopteris divaricate* [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2006, 31:125-128.
 - 18 Cheng J, Li MG, Ding ZG, et al. Secondary metabolites of tin tailings *Streptomyces* sp. AE21985 [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2017, 29:190-197.
 - 19 Dornberger K, Thruma H, Radics L. The structure of tetramycin, a new polyene macrolide antibiotic [J]. *Tetrahedron*, 1979, 35:1851-1856.
 - 20 Radics L, Incze M, Dornberger K, et al. Tetramycin B, a new polyene macrolide antibiotic: the structure of tetramycins A and B as studied by high-field NMR spectroscopy [J]. *Tetrahedron*, 1982, 38:183-189.
 - 21 Hamilton-Miller JM. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics [J]. *Bacteriol Rev*, 1973, 37:166-196.