

放线菌菌株 H4-5 发酵菌丝体的化学成分研究

刘婷¹, 夏召¹, 许天启¹, 胡辰², 林壁润³, 孙大元³, 周光雄^{1*}¹暨南大学药学院中药及天然药物研究所 广东省普通高校中药和天然药物药效物质基础重点实验室, 广州 510632;²赣南卫生健康职业学院, 赣州 341000; ³广东省农业科学院植物保护研究所 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640

摘要:对采集于近海红树林底泥的放线菌 H4-5 发酵菌丝体的次级代谢产物进行研究。综合运用多种色谱技术对放线菌 H4-5 发酵菌丝体的 95% 乙醇提取物进行分离纯化, 通过波谱学方法并结合文献数据比对共鉴定了 13 个化合物的结构, 分别为环-(L-脯氨酸-L-天冬酰胺) (1)、尿嘧啶 (2)、尿苷 (3)、2'-脱氧尿苷 (4)、胸腺嘧啶核苷 (5)、β-腺苷 (6)、2'-脱氧腺苷 (7)、豆甾-7, 22-二烯-3β, 5α, 6α-三醇 (8)、麦角甾醇 (9)、N-(2-苯乙基) 乙酰胺 (10)、methyl 8-(3-octyloxiran-2-yl) octanoate (11)、tetrahydro-5-oxo-2-furancarboxylic acid ethyl ester (12)、环-(L-亮氨酸-L-缬氨酸) (13)。通过 MTT 法检测了这些化合物对三株人癌细胞的毒性并且通过 LPS 诱导的巨噬细胞 NO 释放实验检测了它们的抗炎活性, 结果显示这 13 种化合物对供试的癌细胞没有明显的生长抑制作用, 但化合物 2 显示出一定的抗炎活性。

关键词:链霉菌属; 放线菌; 发酵菌丝; 化学成分

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022) Suppl-0026-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.S.004

Chemical constituents from the fermented mycelia of actinomycete strain H4-5

LIU Ting¹, XIA Zhao¹, XU Tian-qi¹, HU Chen², LIN Bi-run³, SUN Da-yuan³, ZHOU Guang-xiong^{1*}¹Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New Drugs Research, Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Gannan Healthcare Vocational College, Ganzhou 341000, China;³Key Laboratory of New Technique for Plant Protection in Guangdong, Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

Abstract: The secondary metabolites of actinomycete H4-5 fermented mycelium collected from the sediments of offshore mangroves were studied. A variety of chromatographic techniques were used to separate and purify compounds from the 95% ethanol extract of actinomycete H4-5 fermentation mycelium. By spectroscopic methods combined with literature data comparison, 13 compounds were isolated and identified as cyclo-(L-Pro-L-Asn) (1), uracil (2), uridine (3), 2'-deoxyuridine (4), thymidine (5), β-adenosine (6), 2'-deoxyadenosine (7), stigmasta-7, 22-diene-3β, 5α, 6α-triol (8), ergosterol (9), N-(2-Phenethyl) acetamide (10), methyl 8-(3-octyloxiran-2-yl) octanoate (11), tetrahydro-5-oxo-2-furancarboxylic acid ethyl ester (12), cyclo-(L-Leu-L-Val) (13). The cytotoxicity of these compounds to three human cancer cell lines was tested by MTT method, and their anti-inflammatory activity was tested by LPS-induced macrophage NO release test. The results showed that these 13 compounds had no obvious effect on the tested cancer cell lines, but compound 2 shows certain anti-inflammatory activity.

Key words: Streptomyces; actinomycete; fermented mycelia; chemical constituents

微生物来源的天然产物在预防和治疗人类疾病过程中一直扮演着重要的角色, 海洋微生物是微生

物中一个重要组成部分, 主要指的是在海水、海泥或海洋动植物上生活的微生物, 近几年, 海洋微生物引起了科研工作者的密切关注。海洋独特的环境使得其能够产生丰富的结构新颖的活性天然产物^[1,2]。海洋放线菌是一类具有高 G + C 含量的革兰氏阳性菌, 是海洋微生物中一个大的类群, 它广泛分布于海

收稿日期: 2021-06-17 接受日期: 2021-11-18

基金项目: 广东省自然科学基金(2020A151010389); 广州市科技计划项目(201704030120); 广东省农业科学院科技创新战略专项(R2017YJ-YB2002, R2018QD-064)

* 通信作者 E-mail: guangzh@sina.com

洋的各种环境中,如海底沉积物、海洋近岸、海洋浅滩等。红树林^[3]是生长在热带、亚热带海岸潮间带的湿地木本植物群落,是陆地与海洋之间特殊的生态系统,被认为是放线菌理想的栖息场所,蕴藏着物种多样而且非常具有特色的微生物资源。在我国,红树林主要集中在海南、广西和广东的沿海地带,这些地区的红树林资源约占我国总红树林面积的95%,这为红树林天然产物研究者们提供了丰富的自然资源^[4]。最近这些年,天然产物研究人员已经从海洋放线菌中分离得到了许多结构新颖、活性多样的化合物^[5]。并且有研究发现这些新化合物在抗真菌^[6]、抗疟^[7]、抗肿瘤^[8]和杀虫^[9]等方面具有很好的生物活性。因此,放线菌作为迄今最大和最重要的药用微生物种群,为新药活性先导化合物的发现提供了重要来源。故本研究对放线菌菌株 H4-5 发酵菌丝体进行了系统的化学成分研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LKYC-2 型恒温摇床(杭州郎琨科技有限公司);Biostatc 30 L 生物发酵罐(德国贝朗公司);CO₂ 培养箱(美国 Shel-Lab);台式离心机(德国 Sigma 公司);Eyela 旋转蒸发仪(N-1100V-WB);LC-100 型半制备液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司);BP211D 电子天平(Sartorius 公司);Bruker AV-300、AV-400、AV-600 型核磁共振仪(德国布鲁克公司);Agilent 6120 LC/MS TOF 质谱仪(美国安捷伦科技公司);Ultimate XB-C₁₈ 液相分析色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm, 美国 Welch 公司);Ultimate XB-C₁₈ 半制备液相色谱柱(10 × 250 mm, 5 μm, 美国 Welch 公司);Sephadex LH-20(Pharmacia 公司);TLC 预制板(青岛海洋化工厂);ODS(Silicycle 公司);色谱级甲醇(山东禹王公司);核磁用氘代试剂(Merck 公司);液相用水(广东怡宝公司),其他试剂均为分析纯。

1.2 培养基

斜面培养基(高氏一号培养基):可溶性淀粉 2%, KNO₃ 0.2%, MgSO₄ 0.1%, NaCl 0.05%, FeSO₄ 0.002%, K₂HPO₄ 0.1%, 海水晶 0.3%, 琼脂 2%, 水 1 L, pH 7.2 ~ 7.4。

种子培养基:酵母粉 3%, 玉米淀粉 3%, 海水晶 0.25%, CaCO₃ 0.15%, KNO₃ 0.1%, MgSO₄ 0.06%, FeSO₄ 0.002%, K₂HPO₄ 0.09%, 水 1 L, pH 7.2 ~ 7.4。

发酵培养基:酵母粉 3%, 玉米淀粉 3%, 海水晶

0.25%, CaCO₃ 0.15%, KNO₃ 0.1%, MgSO₄ 0.06%, FeSO₄ 0.02%, K₂HPO₄ 0.09%, 水 1 L, pH 7.2 ~ 7.4。

1.3 菌株和细胞株

放线菌菌株 H4-5 分离自广东省江门市台山近海红树林底泥,并保存于广东省农业科学院植物保护研究所。

人肺癌细胞株 H1299、人结肠癌细胞株 Lovo、人恶性黑色素瘤细胞株 A375(均来源于暨南大学药学院)。

1.4 菌株的活化和培养

先将低温保存下的菌种 H4-5 接种到高氏一号固体培养基上,然后在 30 °C 条件下恒温培养一周,便可将菌株活化。

将已活化的菌株接种到装有 200 mL 液体培养基的 1 L 三角瓶中,在 28 °C、165 r/min 摇床培养 3 天得种子液。

将约 1 L 的种子培养液转移至装有 20 L 发酵培养基的发酵罐中进行扩大培养,在 28 °C、300 r/min、通气量 15 L/min 的条件下培养 4 天。

1.5 细胞培养

人肺癌细胞株 H1299、人结肠癌细胞株 Lovo、人恶性黑色素瘤细胞株 A375 均使用 RPMI1640 培养基(含 10% FBS,青霉素 200 IU/mL,链霉素 200 IU/mL)于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中培养。

1.6 细胞毒性实验

运用 MTT 法对所分离的 13 个化合物进行细胞毒活性测试。供试细胞包括人肺癌细胞株 H1299、人结肠癌细胞株 Lovo 以及人恶性黑色素瘤细胞株 A375,阳性药为顺铂。给药浓度依次为 100、50、25、12.5、6.3、3.1、1.6 μg/mL。加药之后孵育 2 天,随后加入质量浓度为 5 μg/mL 的 MTT 溶液 30 μL 再继续孵育 2 天,吸弃上清液,加入 100 μL DMSO 震荡摇匀,最后测出各个化合物的 IC₅₀ 值。

1.7 抗炎活性实验

RAW 264.7 细胞用 DMEM 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培育箱中培养 24 h,吸出培养液,加入含有不同浓度的待测化合物的培养液,阳性对照药用的是槲皮素,同时往培养液中加入 100 ng/mL 的脂多糖。培养 24 h 后,用 Griess 试剂显色法检测一氧化氮的生成量,计算化合物的 IC₅₀ 值。

2 实验结果

2.1 提取与分离

菌株发酵液 60 L, 5 000 r/min 离心 10 min 后去

掉上清液,菌丝体用95%乙醇渗漉提取,减压浓缩至无醇味,得到430 g粗提取物浸膏,接着用水将粗提取物溶解,先用石油醚反复萃取水溶液,直至萃取液无色,得到石油醚萃取液和水部位,接着将石油醚萃取液合并并且减压浓缩后,得到石油醚部位(35 g)。以同样的方法再先后用二氯甲烷以及乙酸乙酯萃取,得到二氯甲烷部位(8.5 g)以及乙酸乙酯部位(1.2 g)。二氯甲烷部位经正相硅胶柱以二氯甲烷-乙酸乙酯为洗脱剂,经不同溶剂比例(100:0、100:1、80:1、50:1、30:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:10、1:100、0:1)洗脱,结合TLC薄层层析,合并得到Fr.1~8共8个粗馏分。馏分Fr.2先后经正相硅胶柱色谱(二氯甲烷-乙酸乙酯,梯度洗脱,溶剂比例同前述正相硅胶柱)、Sephadex LH-20凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇)及半制备高效液相色谱分离得化合物1(3.0 mg)。馏分Fr.3先后经正相硅胶柱色谱(二氯甲烷-乙酸乙酯,梯度洗脱,溶剂比例同前述正相硅胶柱)、Sephadex LH-20凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇)及半制备高效液相色谱分离得化合物2(6.2 mg)、4(8.1 mg)、5(5.8 mg)。

乙酸乙酯部位经正相硅胶柱以二氯甲烷-乙酸乙酯为洗脱剂,经不同溶剂比例(50:1、30:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1)洗脱,结合TLC薄层层析,合并得到Fr.1~4共4个粗馏分。馏分Fr.2先后经正相硅胶柱色谱(二氯甲烷-乙酸乙酯,梯度洗脱,溶剂比例同前述正相硅胶柱)、Sephadex LH-20凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇)及半制备高效液相色谱分离得化合物3(3.4 mg)、8(7.3 mg)。馏分Fr.4经过正相硅胶柱色谱(二氯甲烷-乙酸乙酯,梯度洗脱,溶剂比例同前述正相硅胶柱)、Sephadex LH-20凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇)及半制备高效液相色谱分离得化合物6(3.2 mg)、7(4.4 mg)、9(7.2 mg)。

另一批相同条件下培养得到的菌株发酵液同样经离心提取减压浓缩至无醇味,得到65 g粗提取物浸膏,同样先用水将粗提物溶解,接着先后用石油醚、二氯甲烷以及乙酸乙酯反复萃取,直到萃取液没有颜色,再分别将石油醚萃取液、二氯甲烷萃取液以及乙酸乙酯萃取液合并减压浓缩后,得到石油醚部位(5.02 g)、二氯甲烷部位(4.3 g)、乙酸乙酯部位(1.3 g)。二氯甲烷部位经正相硅胶柱以石油醚-乙酸乙酯为洗脱剂,经不同溶剂比例(100:0、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5、1:10、0:1)洗脱,结合TLC薄层层析,合并得到Fr.1-8共8个馏

分。馏分Fr.4先后经Sephadex LH-20凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇1:1)及半制备高效液相色谱分离得纯化合物3(8.0 mg)、13(6.0 mg)。馏分Fr.5经过Sephadex LH-20凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇1:1)及半制备高效液相色谱分离得化合物12(3.0 mg)。乙酸乙酯部位经正相硅胶柱以二氯甲烷-甲醇为洗脱剂,经不同溶剂比例(100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1)洗脱,结合TLC薄层层析,合并得到Fr.1~5共5个馏分。馏分Fr.2先后经Sephadex LH-20凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇)及半制备高效液相色谱分离得化合物10(1.0 mg)。馏分Fr.3经过Sephadex LH-20凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇1:1)及半制备高效液相色谱分离得化合物11(5.0 mg)。

2.2 化合物结构鉴定

化合物1 白色粉末(甲醇);HR-ESI-MS: m/z 234.085 1 [$M + Na$] $^+$ (calcd for $C_9H_{13}N_3O_3Na$, 234.085 2),确定其分子式为 $C_9H_{13}N_3O_3$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 4.36 (1H, t, $J = 6.3$ Hz, H-3), 4.21 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-6), 3.41 (2H, m, H-9), 2.72 (1H, dd, $J = 16.1, 6.0$ Hz, H_b -10), 2.31 (1H, dd, $J = 16.1, 6.5$ Hz, H_a -10), 2.13 (1H, m, H_b -7), 1.88 (1H, m, H_a -7), 1.80 (2H, m, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.7 (C-2), 51.5 (C-3), 169.8 (C-5), 58.6 (C-6), 27.6 (C-7), 22.4 (C-8), 44.9 (C-9), 34.6 (C-10), 171.5 (C-11)。以上数据与文献^[10]的报道一致,因此鉴定该化合物为环-(*L*-脯氨酸-*L*-天冬酰胺)。

化合物2 淡黄色粉末(甲醇);HR-ESI-MS: m/z 113.035 0 [$M + H$] $^+$ (calcd for $C_4H_5N_2O_2$, 113.035 0),确定其分子式为 $C_4H_5N_2O_2$ 。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.39 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-6), 5.45 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-5); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 151.5 (C-2), 164.3 (C-4), 100.2 (C-5), 142.2 (C-6)。以上数据与文献^[11]的报道一致,因此鉴定该化合物为尿嘧啶。

化合物3 淡黄色粉末(甲醇);HR-ESI-MS: m/z 245.029 9 [$M + H$] $^+$ (calcd for $C_9H_{13}N_2O_6$, 245.029 9),确定其分子式为 $C_9H_{13}N_2O_6$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.88 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 5.77 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-1'), 5.64 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 4.02 (1H, t, $J = 5.3$ Hz, H-2'), 3.96

(1H, t, $J = 4.5$ Hz, H-3'), 3.83 (1H, m, H-4'), 3.59 (2H, m, H-5'); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 150.7 (C-2), 163.1 (C-4), 101.8 (C-5), 140.7 (C-6), 87.7 (C-1'), 69.9 (C-2'), 73.6 (C-3'), 84.8 (C-4'), 60.9 (C-5')。以上数据与文献^[12]的报道一致, 因此鉴定该化合物为尿昔。

化合物 4 淡黄色粉末(甲醇); HR-ESI-MS: m/z 229.090 1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5$, 229.082 1), 确定其分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.83 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 6.15 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 5.61 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 4.23 (1H, dt, $J = 6.3, 3.3$ Hz, H-3'), 3.77 (1H, m, H-4'), 3.55 (2H, t, $J = 4.2$ Hz, H-5'), 2.08 (2H, m, H-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.5 (C-2), 150.7 (C-4), 101.8 (C-5), 140.4 (C-6), 84.1 (C-1'), 40.2 (C-2'), 70.4 (C-3'), 87.4 (C-4'), 61.3 (C-5')。以上数据与文献^[13]的报道一致, 因此鉴定该化合物为 2'-deoxyuridine。

化合物 5 淡黄色粉末(甲醇); HR-ESI-MS: m/z 243.105 5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_5$, 243.097 7), 确定其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.70 (1H, s, H-6), 1.77 (3H, s, H-7), 6.17 (1H, t, $J = 6.9$ Hz, H-1'), 2.07 (2H, m, H-2'), 4.24 (1H, m, H-3'), 3.76 (1H, m, H-4'), 3.57 (2H, m, H-5'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.7 (C-2), 150.5 (C-4), 109.3 (C-5), 136.1 (C-6), 12.2 (C-7), 83.7 (C-1'), 39.4 (C-2'), 70.4 (C-3'), 87.2 (C-4'), 61.3 (C-5')。以上数据与文献^[12]的报道一致, 因此鉴定该化合物为 thymidine。

化合物 6 白色油状(甲醇); HR-ESI-MS: m/z 268.103 1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_4$, 268.104 3), 确定其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.35 (1H, s, H-8), 8.14 (1H, s, H-2), 5.88 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-1'), 4.61 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, H-2'), 4.14 (1H, dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, H-3'), 3.96 (1H, q, $J = 3.4$ Hz, H-4'), 3.62 (2H, m, H-5'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 152.4 (C-2), 149.1 (C-4), 119.4 (C-5), 156.2 (C-6), 139.9 (C-8), 87.9 (C-1'), 73.4 (C-2'), 70.6 (C-3'), 85.9 (C-4'), 61.7 (C-5')。以上数据与文献^[12]的报道一致, 因此鉴定该化合物为 β -adenosine(腺昔)。

化合物 7 淡黄色粉末(甲醇); HR-ESI-MS: m/z

274.273 8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3\text{Na}$, 274.091 4), 确定其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$ 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.33 (1H, s, H-8), 8.12 (1H, s, H-2), 6.34 (1H, dd, $J = 7.9, 6.1$ Hz, H-1'), 4.41 (1H, dt, $J = 5.7, 2.9$ Hz, H-3'), 3.88 (1H, m, H-4'), 3.57 (2H, m, H-5'), 2.72 (1H, ddd, $J = 13.4, 7.9, 5.7$ Hz, H_b-2'), 2.25 (1H, ddd, $J = 13.4, 6.1, 2.9$ Hz, H_a-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 152.8 (C-2), 148.9 (C-4), 119.3 (C-5), 156.1 (C-6), 139.5 (C-8), 83.9 (C-1'), 40.0 (C-2'), 71.0 (C-3'), 88.0 (C-4'), 61.9 (C-5')。以上数据与文献^[14]的报道一致, 因此鉴定该化合物为 2'-deoxyadenosine(脱氧腺昔)。

化合物 8 白色粉末(甲醇); HR-ESI-MS: m/z 453.341 4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3\text{Na}$, 453.333 3), 确定其分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$ 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.24 (1H, dd, $J = 15.3, 7.0$ Hz, H-22), 5.17 (1H, dd, $J = 15.3, 7.8$ Hz, H-23), 5.09 (1H, dt, $J = 4.8, 2.2$ Hz, H-7), 3.77 (1H, m, H-3), 3.59 (1H, s, H-6), 0.99 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.91 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.81 (3H, d, $J = 5.3$ Hz, H-28), 0.79 (3H, d, $J = 5.3$ Hz, H-26), 0.54 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 21.3 (C-1), 40.2 (C-2), 66.0 (C-3), 31.2 (C-4), 74.5 (C-5), 72.1 (C-6), 119.5 (C-7), 139.6 (C-8), 42.3 (C-9), 36.6 (C-10), 32.5 (C-11), 39.0 (C-12), 43.0 (C-13), 54.2 (C-14), 22.6 (C-15), 27.7 (C-16), 55.3 (C-17), 12.1 (C-18), 17.7 (C-19), 40.0 (C-20), 21.0 (C-21), 135.4 (C-22), 131.4 (C-23), 42.0 (C-24), 32.5 (C-25), 19.8 (C-26), 19.5 (C-27), 17.3 (C-28)。以上数据与文献^[15]的报道一致, 因此鉴定该化合物为 stigmasta-7, 22-diene- β 3,5 α ,6 α -triol(豆甾-7,22-二烯- β 3,5 α ,6 α -三醇)。

化合物 9 白色粉末(甲醇); HR-ESI-MS: m/z 397.381 1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{O}$, 397.345 9), 确定其分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.55 (1H, dd, $J = 5.7, 2.5$ Hz, H-6), 5.36 (1H, dt, $J = 5.7, 2.8$ Hz, H-7), 5.20 (1H, dd, $J = 15.3, 7.0$ Hz, H-22), 5.17 (1H, dd, $J = 15.3, 7.8$ Hz, H-23), 3.60 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.92 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d, $J = 7.0$

Hz, H-28), 0.82 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26), 0.78 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 0.60 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 38.6 (C-1), 32.2 (C-2), 70.7 (C-3), 41.0 (C-4), 140.0 (C-5), 119.8 (C-6), 116.5 (C-7), 141.6 (C-8), 46.5 (C-9), 37.2 (C-10), 21.3 (C-11), 39.3 (C-12), 43.0 (C-13), 54.8 (C-14), 23.2 (C-15), 28.5 (C-16), 56.0 (C-17), 12.3 (C-18), 16.5 (C-19), 40.6 (C-20), 21.3 (C-21), 135.8 (C-22), 132.2 (C-23), 43.0 (C-24), 33.3 (C-25), 19.9 (C-26), 20.2 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献^[16]的报道一致,因此鉴定该化合物为麦角甾醇。

化合物 10 白色粉末 (甲醇); HR-ESI-MS: m/z 164.1072 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}$, 164.1072), 确定其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.19 ~ 7.30 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.39 (2H, m, H-8), 2.79 (2H, m, H-7), 1.91 (3H, s, H-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 21.1 (C-2'), 35.1 (C-8), 40.7 (C-7), 125.9 (C-4), 128.1 (C-2, 6), 128.4 (C-3, 5), 139.1 (C-1), 171.8 (C-1')。以上数据与文献^[17]的报道一致,因此鉴定该化合物为 N-(2-苯乙基)乙酰胺。

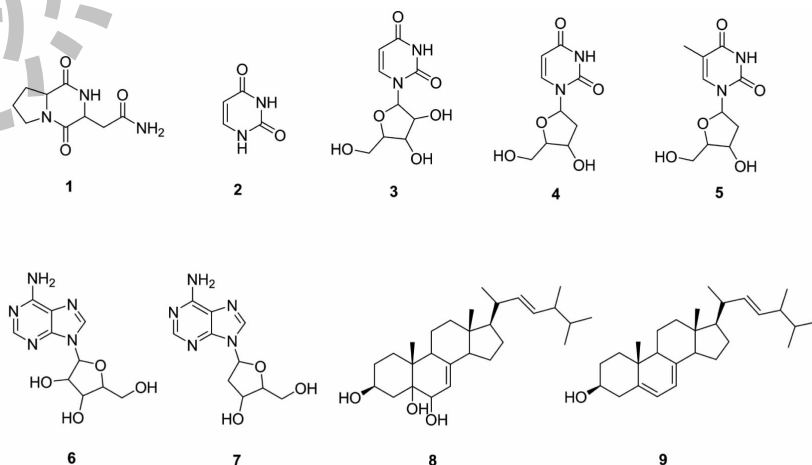
化合物 11 白色粉末 (甲醇); HR-ESI-MS: m/z 313.2718 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{O}_3$, 313.2733), 确定其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_3$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.66 (3H, s, OMe), 2.89 (2H, m, H-2), 2.30 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-9, H-10), 1.27 ~ 1.62 (7H, m, H-3 ~ 8, H-11 ~ 17), 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 14.2 (C-18), 34.2 (C-2), 51.6 (OMe), 57.3, 57.4 (C-9, 10),

32.0 ~ 22.8 (C-3 ~ 8, 11 ~ 17)。以上数据与文献^[18]的报道一致,因此鉴定该化合物为 methyl 8-(3-octyloxiran-2-yl) octanoate。

化合物 12 白色粉末 (甲醇); HR-ESI-MS: m/z 159.0847 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_4$, 159.0654), 确定其分子式为 $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_4$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.29 (1H, dd, $J = 9.0, 4.5$ Hz, H-5), 4.23 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, H-7), 2.59 ~ 2.41, 2.22 ~ 2.10 (2H, m, H-3), 2.39 ~ 2.29 (2H, m, H-4), 1.30 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-8); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 181.1 (C-2), 30.3 (C-3), 25.9 (C-4), 51.7 (C-5), 174.0 (C-6), 62.5 (C-7), 14.4 (C-8)。以上数据与文献^[19]的报道一致,因此鉴定该化合物为 Tetrahydro-5-oxo-2-furancaboxylic acid ethyl ester。

化合物 13 白色粉末 (甲醇); HR-ESI-MS: m/z 213.1580 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$, 213.1598), 确定其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 3.96 (1H, ddd, $J = 9.1, 4.5, 1.0$ Hz, H-3), 3.79 (1H, dd, $J = 4.4, 1.1$ Hz, H-6), 2.24 (1H, td, $J = 6.9, 4.4$ Hz, H-7), 1.93 ~ 1.82 (1H, m, H-11), 1.81 ~ 1.72, 1.67 ~ 1.57 (2H, m, H-10), 1.06 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-8), 1.01 ~ 0.95 (9H, m, H-9, H-12, H-13); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 171.3 (C-2), 54.4 (C-3), 169.7 (C-5), 61.5 (C-6), 33.7 (C-7), 19.3 (C-8), 17.8 (C-9), 46.0 (C-10), 25.3 (C-11), 21.8 (C-12), 23.6 (C-13)。以上数据与文献^[20]的报道一致,因此鉴定该化合物为环-(L-亮氨酸-L-缬氨酸)。

化合物 1 ~ 13 的结构见图 1。



续图 1 (Continued Tab.1)

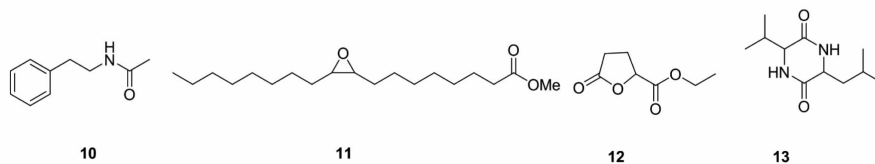


图 1 化合物 1~13 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-13

2.3 活性研究

采用 MTT 法以顺铂为阳性对照评价了化合物 1~13 对人肺癌细胞株 H1299、人结肠癌细胞株 Lo-vo、人恶性黑色素瘤细胞株 A375 的生长抑制作用,结果显示 13 个化合物均表现出可以忽略的细胞毒性。又通过抑制一氧化氮(NO)生成实验评价了化合物 1~13 的抗炎活性,结果显示化合物 2 表现出一定的抗炎活性,IC₅₀为 89.68 ± 1.75 μM,槲皮素作为阳性对照 IC₅₀为 17.08 ± 0.35 μM。

3 讨论与结论

本研究从放线菌菌株 H4-5 发酵菌丝体的 95% 乙醇提取物中分离鉴定了 13 个化合物,虽然结构上相对简单,有的也较为常见,但显示了结构类型的多样性,包括环肽类(2 个)、尿嘧啶(1 个)、核苷类(5 个)、甾体类(2 个)、酰胺类(1 个)、酯类(2 个)。而其中尿嘧啶及核苷类和麦角甾醇等均为生命内源性物质。通过对这些化合物的活性研究发现这 13 种化合物对供试的癌细胞株没有明显的生长抑制作用,但化合物 2 显示出一定的抗炎活性。另外,有文献报道化合物 1 对慢性髓系白血病细胞系 K562 表现出一定的细胞毒性^[10]。而 2'-脱氧腺苷也叫 2'-脱氧腺嘌呤核糖核苷(2'-deoxyadenosine),是脱氧核糖核酸 DNA 的结构构件,它几乎参与了所有生物细胞遗传信息的传递,调控着生物体内细胞的生长、增殖、分化和抑制。此外,它自身具有很好的生理活性,如抑制由糖诱导的胰岛素释放、降低特异性磷酸二酯酶抑制剂或腺苷环化酶激活剂促进胰岛素分泌的作用。总的来说,海洋放线菌是一个巨大的资源宝库,本实验结果丰富了放线菌次级代谢产物的结构多样性,为海洋链霉菌来源的化合物的药物开发利用提供了一定的化学基础,为医药及天然产物开发提供了理论和物质基础。

参考文献

1 Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present,

and future [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43: 155-176.

2 Holguin G, Vazquez P, Bashan Y, et al. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview [J]. *Biol Fertil Soils*, 2001, 33: 265-278.

3 Jothimanivannan C, Kumar RS, Subramanian N. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of aerial parts of *Justicia gendarussa* Burm [J]. *Int J Pharmacol*, 2010, 6: 278-283.

4 Hong K. Actinomycetes from mangrove and their secondary metabolites [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53: 1131-1141.

5 Wang HY, Liu J, Zhang SJ. Research progress of marine actinomycete diversity and its metabolites [J]. *Chin J Mar Drugs (中国海洋药物)*, 2010, 29: 67-74.

6 Han Y, Yang BJ, Zhang FL, et al. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China Sea sponge *Craniella Australiensis* [J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11: 132-140.

7 Wright AD, Lang UN. Diterpene formamides from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi* and their antimalarial activity *in vitro* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72: 492-495.

8 Hong K, Gao AH, Xie QY, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China [J]. *Mar Drugs*, 2009, 7: 24-44.

9 Gunatilaka AA. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 509-526.

10 Liu C, Yang XQ, Ding ZT, et al. Cyclodipeptides from the secondary metabolites of two novel actinomycetes [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9: 78-80.

11 Liu RH, Luo H, Li YL, et al. N-Containing compounds from the traditional Chinese medicine Chansu [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45: 599-600.

12 Ma H, Li FL, Wang F, et al. Nucleosides chemical constituents from *Oldenlandia ciffusa* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2009, 45: 599-600.

13 Shi XF, Tang XL, Li GQ, et al. Studies on chemical constitu-

- ents of gorgonian *Muriceides collaris* from the South China Sea[J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物),2009,28:18-21.
- 14 Wu YZ, Li R, Qiu BL, et al. Chemical constituents from *Fusarium redolens*, the endophytic fungus from *Edgeworthia chrysantha*[J]. Acta Pharm Sin(药学报),2017,52:598-602.
- 15 Yang XF, Wu Y, Qu ZR, et al. Chemical constituents of the secondary metabolites of endophytic fungi DL02 from *Saposhnikovia divaricata* and their biological activities [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2018,40:1325-1328.
- 16 Yuan C, Li G, Wu CS, et al. Study on the metabolites of endolichenic fungus *Myxotrichum* sp. [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2014,26:513-516.
- 17 Kang M, Wang ZY, Guo DL, et al. Chemical constituents of *n*-butanol extract of *Myrothecium verrucaria* [J]. J Chin Med Mater(中药材),2016,39:548-551.
- 18 Wu FL, Ross BP, Mcgeary RP. New methodology for the conversion of epoxides to alkenes [J]. Eur J Org Chem, 2010(10):1989-1998.
- 19 Qiu YK, Zhao YY, Dou DQ, et al. Two new α -pyrones and other components from the cladodes of *Opuntia dillenii*[J]. Arch Pharm Res,2007,30:665-669.
- 20 He LQ, Yang XY, Feng T, et al. Chemical constituents of the fermentation broth of *Antrodia zonata*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:753-757.

(上接第 65 页)

- 2 Dong Q, Yimamu H, Parhat R, et al. Fatty acids from *Fritillaria pallidiflora* and their biological activity [J]. Chem Nat Compd,2018;54:959-960.
- 3 Paierhati R, Abulimiti Y, Muhebuli A, et al. Study on fatty acid composition and activity of bovine bone marrow oil[J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2018,39(21):59-66.
- 4 Nuerxiati R, Abuduwaili A, Mutailifu P, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don(Sal-ep)[J]. Int J Biol Macromol,2019;141:431-443.
- 5 Liu WY, Long M, Li R, et al. Progress in the application of fatty acid detection in food industry[J]. Food Mach(食品与机械),2019,35(11):217-222.
- 6 Belury MA, Cole RM, Snoke DB, et al. Linoleic acid, glyceric control and type 2 diabetes [J]. Prostag Leukotr Ess, 2018;132:30-33.
- 7 Guo KL. Diagnosis and treatment of lamb *Escherichia coli* disease[J]. Farmers Consultant(农家参谋),2020(12):171.
- 8 Zhang LM, Huang XT. Research progress of *Candida albicans* lipase[J]. Biol Chem Eng(生物化工),2020,6(2):121-124.