

两株湛江红树林放线菌次级代谢产物及其细胞毒活性研究

梁晓燕^{1,2,3}, 黄永梅^{1,3}, 杨 洋², 郑嘉琳², 陈美芳³, 李俊杰³, 戚 怡^{1,3}, 李小叁^{2,3*}, 罗 辉^{1,3*}

(1. 广东医科大学海洋医药研究院, 湛江市环北部湾海岸特色微藻与微生物资源产品研发重点实验室, 广东湛江 524023; 2. 广东医科大学药学院, 广东省天然药物研究与开发重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江), 广东湛江 524023)

摘 要: 目的 研究两株来源于广东湛江红树林自然保护区的红树林放线菌 *Nesterenkonia* sp. N267 和 *Micromonospora echinofusca*^T DSM 43913 的化学成分。方法 综合运用开放硅胶柱层析、薄层色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)等色谱学方法, 对菌株的发酵粗提取物进行分离和纯化, 通过核磁共振波谱(NMR)、质谱(MS)等现代波谱法, 并结合相关文献数据对获得的单体化合物进行结构鉴定。结果 从两株放线菌菌株中分离鉴定出 10 个化合物, 其中化合物 1-6 为环二肽类: 环-(*L*-脯氨酸-*L*-亮氨酸)(1)、环-(*L*-脯氨酸-*L*-缬氨酸)(2)、环-(*L*-脯氨酸-*L*-苯丙氨酸)(3)、环-(*d*-脯氨酸-*d*-苯丙氨酸)(4)、环-(甘氨酸-*L*-苯丙氨酸)(5)、环-(*L*-脯氨酸-*L*-酪氨酸)(6)、phenylalanine(7)、pyridoxine(8)、3,3-di(1H-indol-3-yl) propane-1,2-diol(9)、pyrocatechol(10)。对分离得到的化合物 1~6 和 9 进行多种肿瘤细胞毒活性评价, 结果显示环二肽类化合物(1~6)在 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对肿瘤未表现出明显的细胞毒活性; 化合物 9 表现出中等细胞毒活性, 其 IC₅₀ 范围为 (42.32 $\pm$ 3.64) ~ (48.35 $\pm$ 5.28) $\mu\text{mol/L}$ 。结论 化合物 1~5 为首次从涅斯捷连科氏菌属中分离得到, 化合物 4 和 6~10 为首次从小单胞菌属中分离得到, 化合物 9 具有一定的抗肿瘤活性。

关键词: 湛江红树林; 放线菌; 环二肽类; 抗肿瘤活性

中图分类号: R 93

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 02-0146-07

Study on the secondary metabolites and their cytotoxicities from two strains Zhanjiang mangrove-derived actinomycetes

LIANG Xiao-yan^{1,2,3}, HUANG Yong-mei^{1,3}, YANG Yang², ZHENG Jia-lin², CHEN Mei-fang³, LI Jun-jie³, QI Yi^{1,3}, LI Xiao-san^{2,3*}, LUO Hui^{1,3*} (1. Marine Biomedical Research Institute, the Key Lab of Zhanjiang for R&D Marine Microbial Resources in the Beibu Gulf Rim, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To investigate the secondary metabolites of two strains of *Nesterenkonia* sp. N267 and *Micromonospora echinofusca*^T DSM 43913 from the Zhanjiang Mangrove Nature Reserve in Guangdong Province. Methods The fermented crude extracts were isolated and purified by silica gel column chromatography, thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. Their structures were identified by modern spectroscopic methods such as nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), mass spectrometry (MS) and compared with relevant literature data. Results Ten compounds were isolated from those two strains of actinomycetes. Especially, compounds 1-6 were cyclic dipeptides: cyclo-(*L*-Pro-*L*-Leu) (1), cyclo-(*L*-Pro-*L*-Val) (2), cyclo-(*L*-Pro-*L*-Phe) (3), cyclo-(*d*-Pro-*d*-Phe) (4), cyclo-(Gly-*L*-Phe) (5), cyclo-(*L*-Pro-*L*-Tyr) (6), phenylalanine (7), pyridoxine (8), 3,3-di(1H-indol-3-yl) propane-1, 2-diol

收稿日期: 2023-12-04

基金项目: 广东省科技计划项目(2019B090905011), 广东省普通高校青年创新人才项目(2020KQNCX023), 南海海洋大健康产业关键技术体系研发与示范项目(ZJW-2019-007), 湛江市科技计划项目(2021A05199)

共同第一作者简介: 梁晓燕(1998-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: lxy20210418@163.com

黄永梅(1988-), 女, 实验师, E-mail: huangym@gdmu.edu.cn

通信作者: 罗 辉(1963-), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: luohui@gdmu.edu.cn

李小叁(1988-), 男, 讲师, E-mail: lixiaosan2018@163.com

(9), pyrocatechol (10). The cytotoxic activities of compounds 1-6 and 9 were evaluated toward various human cancer cells, respectively. Compounds 1-6 exhibited no obvious cytotoxic activity at initial screening concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$, while compound 9 exhibited moderate cytotoxic activity with an IC_{50} values ranging from (42.32 ± 3.64) to (48.35 ± 5.28) $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** Compounds 1-5 were found from *Nesterenkonia* for the first time, while compounds 4 and 6-10 were found from *Micromonospora* for the first time. Compound 9 showed moderate anti-tumor activity.

Key words: Zhanjiang mangrove forest; actinomycetes; cyclic dipeptide; anti-tumor activity

红树林主要生长于热带、亚热带海岸潮间带的滩涂浅滩上部, 主要以真红树植物为主体的较为独特的木本生物群落, 最具特色的湿地生态系统, 有高湿度、高盐度、强酸和缺氧的特点^[1]。特殊的生境更适宜放线菌生存, 从而造就结构新颖的化合物。广东湛江红树林国家级自然保护区, 地处中国大陆最南端, 是中国红树林面积最大、分布最集中的自然保护区。涅斯捷连科菌属 (*Nesterenkonia*) 放线菌以及小单胞菌属 (*Micromonospora*) 放线菌均为稀有放线菌, 革兰阳性、好氧菌^[2-3]。化学成分研究表明, 小单胞菌属放线菌可产生丰富的氨基糖苷类、大环内酯类、生物碱类等次级代谢产物, 而涅斯捷连科氏菌属放线菌能产生包括大环内酯类、酚类、聚酮类等次级代谢产物^[4-5]。经前期文献调研, 目前关于湛江红树林放线菌化学成分的相关研究报道较少, 具有巨大的研究潜力。本课题组前期从广东湛江红树林国家自然保护区根际土壤样品中分离得到两株放线菌, 经鉴定分别为涅斯捷连科氏菌属 *Nesterenkonia* sp. N267 和小单胞菌属 *Micromonospora echinofusca*^T DSM 43913。为揭示这两株红树林放线菌次级代谢产物的化学成分, 阐明其物质基础, 本研究分别对其进行液体发酵, 对发酵产物进行系统化学成分研究。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Bruker DPX 400 MHz核磁共振仪(德国布鲁克公司); Triple Quad 4500 低分辨质谱仪(美国SCIEX公司); Technologies 1260 infinity 系列分析型和制备型高效液相色谱仪(德国Agilent公司); C18 色谱柱: 半制备型: 5 μm , 10 mm $\times$ 250 mm; 分析型: 5 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm(美国Epic C18); 色谱纯甲醇(天津市康科德科技有限公司); BIOSTAT® Cplus 生物反应器(德国); 旋转蒸发仪(EA-52 型, 上海亚荣生化仪器厂); 硅胶(200-300 目)、硅胶 GF254 薄层板(青岛海洋化工有限公司); 石油醚、乙酸乙酯、分析甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司); 培养皿、96 孔板(ACEA,

美国); 胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基(Gibco)、胎牛血清、谷氨酰胺(Biological Industries, 以色列); 二甲基亚砜(DMSO)(Solarbio); 秋水仙碱(纯度 99%, 阿拉丁试剂公司); 水为超纯水, PBS 缓冲液等为自配。

1.2 菌株来源与培养

红树林放线菌 N267 菌株以及 DSM 43913 菌株是从广东省湛江市雷州半岛徐闻海域红树林保护区根际土壤(5~0 cm)样品中分离得到, 根据放线菌的菌落形态及 16SrRNA 基因序列比对结果, 分别鉴定为: *Nesterenkonia* sp. N267 和 *Micromonospora echinofusca*^T DSM 43913, 两株放线菌菌株现保存于广东医科大学海洋医药研究院, 于 75% 甘油中 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

种子液培养基: 6.4 g 葡萄糖, 6.4 g 酵母粉, 16 g 麦芽粉, 1.6 L。

1.3 菌株的发酵与提取

将菌株接种在配制好的种子培养基上, 接种完成后置于摇床上培养 3~4 d, 28 $^{\circ}\text{C}$, 160 r/min。配制 18.4 L 液体培养基, 将液体培养基倒入发酵罐, 120 $^{\circ}\text{C}$, 高压灭菌 20 min, 待发酵罐冷却降温, 接种 1 600 mL 的种子液, 28 $^{\circ}\text{C}$, 160 r/min, 发酵 7 d。发酵 7 d 后收集 20 L 的菌株发酵液, 4 000 r/min, 15 min 离心, 收集菌株的上清液。每次发酵 20 L, N267 菌株发酵 5 次, 共收集 100 L 的 N267 菌株发酵液; DSM 43913 菌株发酵 10 次, 共收集 190 L 的 DSM 43913 菌株发酵液。采用 1.5 倍体积乙酸乙酯将 N267 菌株发酵液萃取 3 次, 浓缩后得到 10.0 g 的粗提取物。采用 1.5 倍体积乙酸乙酯、1.5 倍体积正丁醇分别将 DSM 43913 菌株发酵液萃取 3 次, 浓缩后分别得到乙酸乙酯层 9.6 g 和正丁醇层 22.7 g。

1.4 化合物的分离与纯化

N267 菌株的粗提取物(10.0 g)利用硅胶柱层析, 石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱(20 : 1 : 0 $\rightarrow$ 5 : 1 : 0 $\rightarrow$ 1 : 3 : 1 $\rightarrow$ 1 : 3 : 5, $v : v : v$), 得到 10 个馏分(Fr. 1~Fr. 10)。馏分 Fr. 7 (1.3 g)经 PRE - HPLC(30% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min)制备得到化合物 1 (11.4 mg)、化合物 2 (4.0 mg)、化合物 3 (5.8 mg)。馏分 Fr. 8 (800 mg)经

PRE-HPLC(30% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min) 制备得到化合物 4 (6.0 mg)、化合物 5 (5.7 mg)。

将 DSM 43913 菌株的乙酸乙酯层及正丁醇层合并 (32.3 g), 利用硅胶柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱 (30:1:0→20:1:0→10:1:0→1:1:1→1:1:10, $v:v:v$), 得到 4 个馏分 (Fr. 1~Fr. 4)。馏分 Fr. 4 (24.3 g) 用硅胶柱层析, 石油醚-乙酸乙酯-甲醇 (20:1:0→10:1:0→1:1:0→1:1:1, $v:v:v$) 梯度洗脱得到 8 个子馏分 (Fr. 4-1~Fr. 4-8)。Fr. 4-2 (9.0 g) 用硅胶柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯 (25:1→1:5, $v:v$) 梯度洗脱得到 6 个子馏分 (Fr. 4-2-1~Fr. 4-2-6)。馏分 Fr. 4-2-2 (388.9 mg) 经 PRE-HPLC (20% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min) 制备得到化合物 10 (9.5 mg)。馏分 Fr. 4-4 (735.9 mg) 经 PRE-HPLC (40% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min) 制备得到化合物 9 (11.1 mg)。馏分 Fr. 4-5 (1.0 g) 经 PRE-HPLC (20% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min) 制备得到化合物 1 (9.1 mg)、化合物 3 (22.1 mg)、化合物 4 (7.6 mg)。馏分 Fr. 4-6 (673.2 mg) 经 PRE-HPLC (20% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min) 制备得到化合物 6 (10.0 mg)。馏分 Fr. 4-7 (8.2 g) 用石油醚-乙酸乙酯-甲醇 (1:1:0→1:1:0.2→1:1:0.5→1:1:1, $v:v:v$) 梯度洗脱 7 个子馏分 (Fr. 4-7-1~Fr. 4-7-7), Fr. 4-7-4 (617.7 mg) 经 PRE-HPLC (10% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min) 制备得到化合物 8 (18.2 mg)。馏分 Fr. 4-8 (1.3 g) 经 PRE-HPLC (10% 甲醇-水, 流速 3.0 mL/min) 制备得到化合物 7 (8.5 mg)。

1.5 肿瘤细胞毒活性测试

评价化合物 1~6 和 9 对乳腺癌细胞 MCF-7、结肠癌细胞 HCT-116、宫颈癌细胞 HeLa 和肝癌细胞 HepG-2 的细胞毒活性。先在含有 10% FBS、1% L-谷氨酰胺、100 μ L 青霉素和 100 g/mL 链霉素的 1640 RPMI 培养基中培养 MCF-7 细胞、HCT-116 细胞、HeLa 细胞和 HepG-2 细胞, 将培养好的细胞按每 100 μ L / 孔 5×10^3 个的比例接种到 96 孔板中, 然后在恒温培养箱 (5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$) 中培养 48 h, 加入不同浓度的化合物 1~6 和 9, 并设置阳性对照组和溶剂空白对照组 (5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$, 48 h)。随后, 吸取原培养液, 在每个孔中加入 100 μ L MTT PBS (0.5 g/L)。然后将其置于恒温培养箱中 (37 $^\circ\text{C}$, 4 h), 随后吸出 MTT 溶液, 向 96 孔板中加入 DMSO 溶剂, 每孔 100 μ L, 放在摇床上使形成的晶体完全溶解。最后在 570 nm 波长处测量吸光度值。该实验重复 3 次。并用该公式计算肿瘤细胞的生长抑

制率, 细胞生长抑制率 = (实验组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (阳性对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值) $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 结构鉴定

通过利用开放硅胶柱层析和半制备高效液相色谱等色谱学分离手段, 以及利用核磁共振波谱等现代波谱技术, 从中共分离鉴定了 10 个化合物, 分别是: 环-(*l*-脯氨酸-*l*-亮氨酸) [cyclo-(*l*-pro-*l*-Leu)] (1)、环-(*l*-脯氨酸-*l*-缬氨酸) [cyclo-(*l*-Pro-*l*-Val)] (2)、环-(*l*-脯氨酸-*l*-苯丙氨酸) [cyclo-(*l*-Pro-*l*-Phe)] (3)、环-(*d*-脯氨酸-*d*-苯丙氨酸) [cyclo-(*d*-Pro-*d*-Phe)] (4)、环-(甘氨酸-*l*-苯丙氨酸) [cyclo-(Gly-*l*-Phe)] (5)、环-(*l*-脯氨酸-*l*-酪氨酸) [cyclo-(*l*-Pro-*l*-Tyr)] (6)、phenylalanine (7)、pyridoxine (8)、3,3-di (1H-indol-3-yl) propane-1,2-diol (9)、pyrocatechol (10), 并对获得的单体化合物进行了体外细胞毒活性测试。化合物 1~10 的化学结构见图 1。

化合物 1 无色晶体(甲醇)。ESI-MS: m/z 211.1 $[M+H]^+$; 提示该化合物分子量为 210。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} 4.26 (1H, t, $J = 6.4$ Hz, H-9), 4.13 (1H, s, H-6), 3.51 (2H, m, H-3), 2.31 (1H, m, H-5a), 2.03 (1H, m, H-4a), 2.02 (1H, m, H-11), 2.00 (1H, m, H-10a), 1.92 (1H, m, H-5b), 1.90 (1H, m, H-4b), 1.52 (1H, m, H-10b), 0.97 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-12), 0.96 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-13); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} 172.8 (C-1), 46.4 (C-3), 23.6 (C-4), 29.1 (C-5), 60.3 (C-6), 168.9 (C-7), 54.6 (C-9), 39.4 (C-10), 25.7 (C-11), 23.3 (C-12), 22.2 (C-13)。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[6], 鉴定化合物为环-(*l*-脯氨酸-*l*-亮氨酸)。

化合物 2 白色晶体(甲醇)。ESI-MS: m/z 197.2 $[M+H]^+$; 提示该化合物分子量为 196。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} 4.21 (1H, t, $J = 6.4$ Hz, H-9), 4.04 (1H, s, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 2.50 (1H, s, H-10), 2.33 (1H, s, H-5a), 2.04 (1H, m, H-5b), 1.95 (2H, m, H-4), 1.11 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-12), 0.95 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} 172.6 (C-1), 46.2 (C-3), 23.3 (C-4), 29.5 (C-5), 60.0 (C-6), 167.6 (C-7), 61.5 (C-9), 29.9 (C-10), 18.8 (C-11), 16.7 (C-12)。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[7], 鉴定化合物为环-(*l*-脯氨酸-*l*-缬氨酸)。

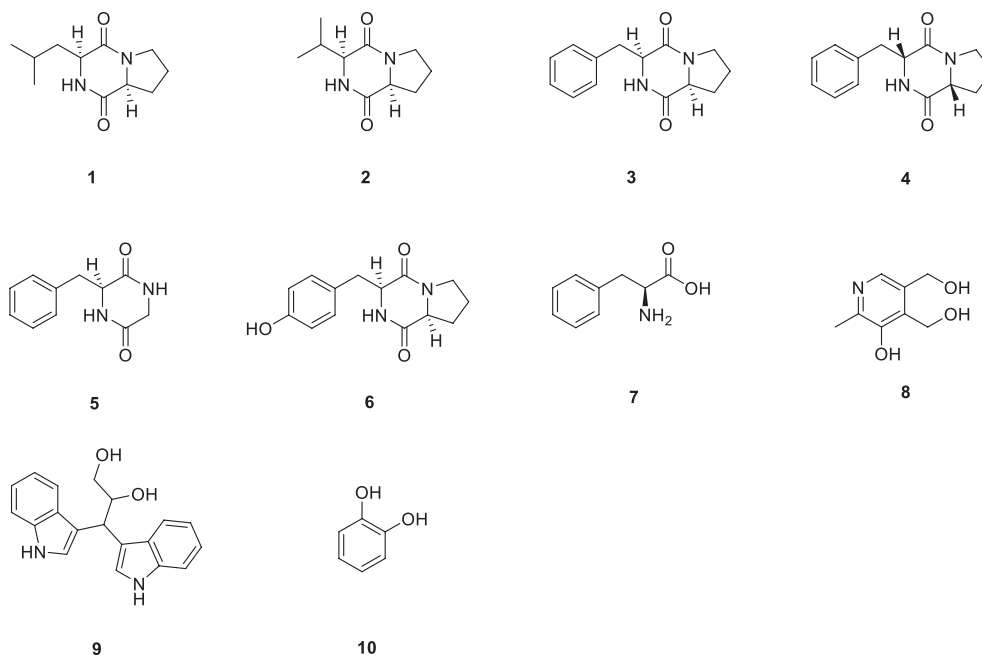


图1 化合物1~10的结构

化合物3 白色针状(甲醇)。ESI-MS: m/z 245.2 $[M+H]^+$; 提示该化合物分子量为 244。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H 7.27 (3H, m, H-3', 4', 5'), 7.22 (2H, m, H-2', 6'), 4.44 (1H, m, H-9), 4.06 (1H, m, H-6), 3.52 (1H, m, H-3a), 3.37 (1H, m, H-3b), 3.31 (1H, m, H-10b), 3.16 (1H, s, H-10a), 2.10 (1H, m, H-5a), 1.80 (2H, m, H-4), 1.23 (1H, m, H-5b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C 166.6 (C-1), 45.8 (C-3), 22.6 (C-4), 29.2 (C-5), 60.0 (C-6), 170.7 (C-7), 57.5 (C-9), 38.0 (C-10), 137.1 (C-1'), 129.3 (C-2'), 130.8 (C-3'), 127.9 (C-4'), 130.8 (C-5'), 129.3 (C-6')。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[8], 鉴定化合物为环-(*L*-脯氨酸-*L*-苯丙氨酸)。

化合物4 棕黄色固体(甲醇)。ESI-MS: m/z 245.1 $[M+H]^+$; 提示该化合物分子量为 244。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H 7.30 (3H, m, H-3', 4', 5'), 7.19 (2H, m, H-2', 6'), 4.61 (1H, m, H-6), 4.21 (1H, m, H-9), 3.52 (1H, m, H-3a), 3.18 (1H, m, H-3b), 3.01 (1H, m, H-10a), 2.60 (1H, m, H-5a), 2.03 (1H, m, H-10b), 1.91 (2H, m, H-4), 1.63 (1H, m, H-5b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C 171.3 (C-1), 46.1 (C-3), 22.5 (C-4), 29.8 (C-5), 59.7 (C-6), 167.4 (C-7), 59.7 (C-9), 41.0 (C-10), 136.7 (C-1'), 129.6 (C-2'), 131.3 (C-3'), 128.5 (C-4'), 131.3 (C-5'), 129.6 (C-6')。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[9], 鉴定化合物为环-(*D*-脯氨酸-*D*-苯丙氨酸)。

化合物5 棕黄色固体(甲醇)。ESI-MS: m/z 205.3 $[M+H]^+$; 提示该化合物分子量为 204。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H 7.30 (3H, m, H-3', 4', 5'), 7.23 (2H, m, H-2', 6'), 4.24 (1H, m, H-6), 3.45 (1H, d, H-3a), 3.23 (1H, d, H-7a), 3.01 (1H, d, H-7b), 2.65 (1H, d, H-3b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C 170.1 (C-1), 44.6 (C-3), 168.7 (C-4), 57.5 (C-6), 40.8 (C-7), 136.3 (C-1'), 129.6 (C-2'), 131.5 (C-3'), 128.5 (C-4'), 131.5 (C-5'), 129.6 (C-6')。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[10], 鉴定化合物为环-(甘氨酸-*L*-苯丙氨酸)。

化合物6 黄色针状结晶(甲醇)。ESI-MS: m/z 261.1 $[M+H]^+$; 提示该化合物分子量为 260。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H 7.04 (1H, m, H-2', 6'), 6.71 (1H, s, H-3', 5'), 4.57 (1H, m, H-10b), 4.37 (1H, m, H-9), 4.05 (1H, m, H-6), 3.49 (1H, m, H-3b), 3.36 (1H, m, H-3a), 3.06 (1H, m, H-10a), 2.10 (1H, m, H-5a), 1.81 (2H, m, H-4), 1.23 (1H, m, H-5b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C 167.0 (C-1), 45.9 (C-3), 22.7 (C-4), 29.4 (C-5), 60.1 (C-6), 170.8 (C-7), 57.9 (C-9), 37.7 (C-10), 127.6 (C-1'), 132.3 (C-2'), 116.2 (C-3'), 157.1 (C-4'), 116.2 (C-5'), 132.3 (C-6')。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[11], 鉴定化合物为环-(*L*-脯氨酸-*L*-酪氨酸)。

化合物7 白色粉末(甲醇)。ESI-MS: m/z 188.4 $[M+Na]^+$; 提示该化合物分子量为 165。 1H NMR (400

MHz, DMSO-d₆) δ_{H} 7.26 (4H, m, H-2', 3', 5', 6'), 7.21 (1H, dd, H-4'), 3.48 (H, m, H-3), 3.15 (1H, dd, $J=8.0$, 2.2 Hz, H-2b), 2.85 (1H, dd, $J=14.0$, 4.5 Hz, H-2a); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ_{C} 170.3 (C-1), 55.9 (C-2), 37.0 (C-3), 137.4 (C-1'), 129.7 (C-2', 6'), 128.8 (C-3', 5'), 127.0 (C-4'). 以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[12], 鉴定化合物为 phenylalanine。

化合物 8 无色晶体(甲醇)。ESI-MS: m/z 170.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 提示该化合物分子量为 169。 ^1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_{H} 7.81 (1H, s, H-6), 4.88 (2H, m, H-8), 4.60 (2H, m, H-9), 2.40 (3H, m, H-7); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_{C} 147.6 (C-2), 153.2 (C-3), 134.2 (C-4), 133.8 (C-5), 138.5 (C-6), 18.3 (C-7), 59.3 (C-8), 60.6 (C-9)。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[13], 鉴定化合物为 pyridoxine。

化合物 9 淡黄色油状(甲醇)。ESI-MS: m/z 329.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 提示该化合物分子量为 306。 ^1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_{H} 7.55 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-4''), 7.54 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-4'), 7.30 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7''), 7.29 (1H, s, H-2''), 7.28 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7'), 7.14 (1H, s, H-2'), 7.02 (1H, t, $J=7.1$ Hz, H-6''), 7.01 (1H, t, $J=7.1$ Hz, H-6'), 6.92 (1H, t, $J=7.3$ Hz, H-5''), 6.90 (1H, t, $J=7.3$ Hz, H-5'), 4.69 (1H, d, $J=6.4$ Hz, H-1), 4.50 (1H, dt, $J=6.7$, 3.8 Hz, H-1), 3.62 (1H, dd, $J=10.0$, 3.8 Hz, H-3a), 3.50 (1H, dd, $J=11.0$, 6.4 Hz, H-3b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_{C} 38.1 (C-1), 76.4 (C-2), 66.4 (C-3), 124.0 (C-2'), 116.0 (C-3'), 128.4 (C-3' a), 120.0 (C-4'), 119.3 (C-5'), 122.1 (C-6'), 112.0 (C-7'), 138.0 (C-7' a), 124.2 (C-2''), 117.9 (C-3''), 129.8 (C-3'' a), 120.2 (C-4''), 119.4 (C-5''), 122.2 (C-6''), 112.1 (C-7''), 138.1 (C-7'' a)。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[14], 鉴定化合物为 3,3-di (1H-indol-3-yl) propane-1,2-diol。

化合物 10 白色结晶(甲醇)。ESI-MS: m/z 243.2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$; 提示该化合物分子量为 110。 ^1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_{H} 6.75 (2H, m, H-4, 5), 6.66 (2H, m, H-3, 6); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_{C} 146.3 (C-1, 2), 120.9 (C-3, 6), 116.4 (C-4, 5)。以上波谱数据与文献报道的数据基本一致^[15], 鉴定化合物为 pyrocatechol。

2.2 体外肿瘤细胞毒活性测试

采用 MTT 法, 评价了化合物 1~6、9 对人癌细胞

MCF-7、HCT-116、HeLa 和 HepG2 的细胞毒活性。在 50 $\mu\text{mol/L}$ 初筛浓度下, 化合物 1~6 并未表现出明显的细胞毒活性; 而化合物 9 表现出中等细胞毒活性, 其 IC₅₀ 范围为 $(42.32 \pm 3.64) \sim (48.35 \pm 5.28) \mu\text{mol/L}$, 结果见表 1。

表 1 化合物 1~6 和 9 的细胞毒活性 ($\mu\text{mol/L}$)

化合物	IC ₅₀			
	MCF-7	HCT-116	HeLa	HepG2
1~6	> 50	> 50	> 50	> 50
9	48.35±5.28	47.88±2.74	46.98±6.29	42.32±3.64
秋水仙素 ^a	0.040±0.003	0.051±0.006	0.106±0.020	0.033±0.004

a 为阳性对照

3 讨论

放线菌是产生天然活性物质的重要微生物资源。目前已发现的微生物来源天然产物中约 50 % 来源于放线菌, 已发现的天然抗生素中约 70 % 来源于放线菌, 如红霉素、阿奇霉素等。红树林是世界上生物多样性及基因多样性最丰富的生态环境之一, 其特殊的生态系统, 蕴藏着丰富的放线菌资源, 造就了红树林放线菌丰富的多样性。放线菌 (*Actinomycetes*) 为一群革兰阳性、高 (G+C) mol% 含量 (>55%) 的细菌, 放线菌产生的次级代谢产物主要包括抗生素类药物、抗肿瘤类药物、免疫抑制剂、降血脂类药物、杀虫药物。红树林放线菌产生的次级代谢产物有着广泛的抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等活性。从红树林土壤中分离到的链霉菌属放线菌的次级代谢产物中分离出来的多肽类放线菌 D 是最早用于癌症治疗的抗生素, 包括后来人们陆续发现的丝裂霉素、盐孢菌素等活性成分均具有抗肿瘤活性。

广东湛江红树林国家级保护区为现存红树林面积最大的一个自然保护区, 地处广东省西南部的湛江市, 沿雷州半岛 1 556 千米海岸线分布, 位于中国大陆最南端, 保护总面积 20 278.8 公顷, 其中红树林面积 9 000 多公顷, 占全国的 33%, 广东省的 78%, 是中国红树林面积最大、分布最集中的自然保护区。但据文献调研, 目前鲜有湛江红树林来源的放线菌次级代谢产物的研究。因此, 本课题采用现代波谱法和色谱法对两株湛江红树林来源的放线菌 *Nesterenkonia* sp. N267 和 *Micromonospora echinofusca*^T DSM 的液体发酵产物进行系统化学成分研究, 为后续研究该地区的红树林放线菌次级代谢产物提供参考。从两株红树林放线菌菌株中分离鉴定了 10 个化合物(化合物 1~10), 其中化合物 1~6 为环二肽类, 提示该类成分可

能是湛江红树林放线菌的主要成分。环二肽类成分是通过两个氨基酸酰胺内环化而成,母体为 2,5 - 二酮哌嗪或 2,5-二氧哌嗪,是已知的最小的、结构最简单的环肽。其来源广泛,可分离自动物、植物、真菌、细菌中^[16],具有多种生物活性,比如抗 α -葡萄糖苷酶抑制活性^[17]、抑制大肠杆菌的活性^[18]、潜在的神经保护作用^[19]、抑菌活性^[20]、对二斑叶螨的杀螨能力^[21]和抗类风湿性关节炎的活性^[22]。此外,化合物 1~5 为首次从涅斯捷连科菌属中分离得到,化合物 4、6~10 为首次从小单胞菌属中分离得到。

本实验对化合物 1~6、9 进行了多种肿瘤细胞毒活性筛选测试,然而发现所分离得到的环二肽类成分并没有抗肿瘤的活性。上述研究结果表明两株不同属的红树林放线菌均可产生丰富的环二肽类成分,可为后续从中发酵该类成分提供鉴定的基础。综上,本研究结果可为后续对其来源的红树林放线菌次级代谢产物的研究提供参考。

参考文献:

- [1] 沙聪,王木兰,姜玥璐,等.红树林土壤 pH 和其他土壤理化性质之间的相互作用[J].科学通报,2018,63(26):2745-2756.
- [2] COLLINS M D, LAWSON P A, LABRENZ M, et al. *Nesterenkonia lacusekhoensis* sp. nov., isolated from hypersaline Ekho Lake, East Antarctica, and emended description of the genus *Nesterenkonia*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52(Pt4):1145-1150.
- [3] 杨星鹏,张志斌,朱笃.小单胞菌属次级代谢产物及其生物活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2019,31(5):908-915,921.
- [4] XIE C L, LIU Q, XIA J M, et al. Anti-allergic compounds from the deep-sea-derived actinomycete *Nesterenkonia flava* MCCC 1K00610[J]. Mar Drugs, 2017, 15(3):71.
- [5] XIE C L, CHEN R, YANG S, et al. *Nesteretral A*, a novel class of cage-like polyketide from marine-derived actinomycete *nesterenkonia halobia*[J]. Org Lett, 2019, 21(20):8174-8177.
- [6] YANG B, DONG J D, ZHOU X F, et al. Proline-containing dipeptides from a marine sponge of a *Callyspongia* species[J]. Helv Chim Acta, 2009, 92(6):1112-1117.
- [7] LEE W, KU S K, CHOI H K, et al. Inhibitory effects of three diketopiperazines from marine-derived bacteria on endothelial protein C receptor shedding in human endothelial cells and mice[J]. Fitoterapia, 2016, 110(3):181-188.
- [8] 曲承蕾,杨雪,张淑敏,等.海洋源放线菌 *Streptomyces* sp. 223 中二酮哌嗪类成分的研究[J].中国海洋药物,2015,34(3):23-28.
- [9] XIE C L, NIU S W, XIA J M, et al. *Saccharopolytide A*, a new cyclic tetrapeptide with rare 4-hydroxyproline moieties from the deep-sea derived actinomycete *Saccharopolyspora cebuensis* MCCC 1A09850[J]. Nat Prod Res, 2018, 32(14):1627-1631.
- [10] 李春远,陈敏,丁唯嘉,等.一株南海木榄内生真菌 (*Gloesporium* sp.) 代谢产物的研究[J].华南农业大学学报,2008,29(1):122-124.
- [11] RUSTAMOVA N, BOBAKULOV K, BEGMATOV N, et al. Secondary metabolites produced by endophytic *Pantoea ananatis* derived from roots of *Baccharoides anthelmintica* and their effect on melanin synthesis in murine B16 cells[J]. Nat Prod Res, 2021, 35(5):796-801.
- [12] 陈旭,郭孟煊,曹彦刚,等.零余子中环肽类化学成分及其生物活性研究[J].中国药学杂志,2022,57(12):1002-1007.
- [13] BALDESSARI A, MANGONE C P, GROS E G. Lipase-catalyzed acylation and deacylation reactions of pyridoxine, a member of vitamin-b6 group[J]. Helv Chim Acta, 1998, 81(12):2407-2413.
- [14] 王宏鹏,谢泽平,况焱,等.海洋链霉菌 B170167 发酵产物中含氮化合物及其细胞毒活性研究[J].天然产物研究与开发,2016,28(10):1557-1561.
- [15] 王玲玲,刘斌,石任兵.荷叶的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(3):416-419.
- [16] ZHU H, SUN S W, LI H, et al. Significantly improved production of Welan gum by *Sphingomonas* sp. WG through a novel quorum-sensing-interfering dipeptide cyclo(L-Pro-L-Phe)[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126(1):118-122.
- [17] 潘洁明,陈惠琴,王昊,等.鸚歌岭土壤来源 *Streptomyces* sp. YG-7 的次生代谢产物及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J].热带作物学报,2019,40(7):1428-1433.
- [18] NUMAN M, SHAH M, ASAF S, et al. Bioactive compounds from endophytic bacteria *Bacillus subtilis* strain EP1 with their antibacterial activities[J]. Metabolites, 2022, 12(12):1228.
- [19] LI D D, WANG Y, KIM E, et al. Neuroprotective effect of Cyclo-(L-Pro-L-Phe) isolated from the jellyfish-derived fungus *Aspergillus flavus*[J]. Mar Drugs, 2021, 19(8):417.
- [20] FDHILA F, VAZQUEZ V, SANCHEZ J L, R. R. DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*[J]. J Nat Prod, 2003, 69(7):1299-1301.
- [21] LI X Y, WANG Y H, YANG J, et al. Acaricidal activity of cyclodipeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* W1 against *tetranychus urticae*[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(39):10163-10168.
- [22] 沈章阳,关若晴,都孟然,等.诺丽果中化学成分及其抑制滑膜成纤维细胞增殖活性研究[J].中国中药杂志,2023,48(1):105-113.

(责任编辑:刘建滔)