

链霉菌 SC120 细胞毒活性代谢产物的研究*

王继栋 魏孝义** 朱西儒 谢海辉 陈贻竹

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

摘要: 在研究链霉菌 *Streptomyces* sp. SC120 抗荔枝霜疫霉菌活性代谢产物的过程中, 分离得到一对人鼻咽癌细胞具有细胞毒作用的抗生素。通过 UV、IR、HR-MS、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT、 ^1H - ^1H COSY、HMQC、HMBC 等波谱分析, 鉴定其结构与 Pimprinine 相同。首次报道 Pimprinine 对人鼻咽癌细胞具有细胞毒作用。

关键词: 抗生素, 链霉菌, Pimprinine, 细胞毒作用

中图分类号: R978.1*9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0019-04

A CYTOTOXIC METABOLITE OF *STREPTOMYCES* SP. SC120*

WANG Ji-Dong WEI Xiao-Yi** ZHU Xi-Ru XIE Hai-Hui CHEN Yi-Zhu

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract: During the course of the investigation of the antifungal metabolites against *Peronophythora litchii* from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. SC120, an antibiotics that exhibited the cytotoxicity to CNE₂ was isolated. By spectral (UV, IR, HRMS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY, HMQC and HMBC) analyses, its structure was identified as pimprinine. The cytotoxicity of pimprinine to CNE₂ was reported for the first time.

Key words: Antibiotics, *Streptomyces*, Pimprinine, Cytotoxicity

我们在研究 *Streptomyces* sp. SC120 菌株抗荔枝霜疫霉菌拮抗菌活性代谢产物的过程中, 从该菌株发酵培养液中分离得到一个对人鼻咽癌细胞具有细胞毒作用的化合物

* 国家自然科学基金资助项目, (No.39870538)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39870538)

* 联系人 E-mail: weixiaoy@scib.ac.cn

收稿日期: 2001-12-07, 修回日期: 2002-02-25

(1), 经过光谱 (UV、IR、HR-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、2D-NMR) 分析, 鉴定其结构与 Pimprinine 相同。国内未见有关 Pimprinine 的报道, 本文报道产生化合物 (1) 的菌种及化合物 (1) 的提取、分离、活性和结构鉴定。

1 材料与方法

1.1 产生菌

产生菌是我们在寻找荔枝霜疫霉菌拮抗菌的过程中从广东深圳一荔校园土壤样品中分离得到, 其形态特征、培养特征、化学分类及生理生化特性显示属于链霉菌属 (*Streptomyces*), 与淡紫灰直丝链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*) 很相似, 编号为: *Streptomyces* sp. SC120。

1.2 拮抗菌的发酵

种子培养: 在 100 mL 的三角瓶中装入 40 mL PD (马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, pH7.2) 培养液, 接种由斜面培养基上培养好的拮抗菌菌种, 于摇床上在 28℃, 120 r/min 条件下培养 6 d。

发酵培养: 于 250 L 发酵罐中, 装入 PD 培养液 135 L, 消毒后接入 15 L 种子发酵液进行发酵, 温度 30℃ ~ 32℃, 通气量 8 ~ 9 m³/h, 转速 170 ~ 250 r/min, 时间为 6 d。

1.3 提取、分离

大孔吸附树脂层析用 Diaion HP-20 大孔吸附树脂; 硅胶柱层析用青岛海洋化工厂生产的 100-200 目和 200-300 目硅胶 G。

1.4 抗肿瘤试验

以噻唑蓝还原法 (MTT 法) 测试对人鼻咽癌细胞 (CNE₂) 的作用: 在无菌条件下, 取上述各人癌细胞, 调成 1×10^5 /mL 的细胞悬液, 分装于 96 孔细胞培养板, 每孔 0.2 mL, 设无药对照组, DMSO 溶剂对照组, 已知抗癌药 DDP 组和 5 ~ 6 个不同浓度的受试物组, 每组设 4 个平行孔, 分别加入药物作用 48 h 后, 于酶联仪上测各孔的 OD 值, 按 $[(1 - \text{实验组平均 OD 值} / \text{DMSO 组平均 OD 值}) \times 100\%]$ 公式计算生长抑制率 (IR)%, 重复 2 ~ 3 批实验, 取各批的平均抑瘤率, 再用药理计算系统 < 46 > 求出半数抑制浓度 (IC₅₀), 进行比较。如果单体化合物的 IC₅₀ < 20 μg/mL, 可被认为有细胞毒作用, 可进一步实验。

1.5 理化性质与结构鉴定

熔点测定用 MD-S2 显微熔点测定仪; UV 测定用日本岛津 1601 紫外-可见光光谱仪; IR 测定用 WQF-410 付立叶变换红外光谱仪, KBr 压片; NMR 测定用 Bruker DRX-400 型核磁共振仪, 以 TMS 为内标, DMSO-d₆ 为溶剂; HR-MS 用 VG Auto Spec-3000 质谱仪测定。

2 结果与分析

2.1 化合物 (1) 的提取、分离

150 L 发酵液, 抽滤后得到滤液和菌体两部分, 滤液通过大孔吸附树脂柱, 依次用水和 95% 乙醇洗脱, 收集 95% 乙醇洗脱液; 菌体用 95% 乙醇提取, 过滤。将树脂柱乙醇洗脱液和菌体乙醇提取液合并, 减压蒸至约 1,000 mL, 用 CHCl₃ 萃取 3 次, 把 CHCl₃ 相蒸去溶剂后, 得 CHCl₃ 提取物 34.15 g。

CHCl_3 提取物 (34.15g), 上硅胶 (100-200 目) 柱, 用 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (100:0-90:10) 梯度洗脱, 以 200 mL/份收集, 共收集 47 个流份, 合并流份 2-42, 蒸干得 20.80 g 棕色糖浆状物; 将该糖浆状物再次上硅胶 (200-300 目) 柱, $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (100:0-90:10) 梯度洗脱, 每份收集 150 mL, 共收集 35 个流份, 合并薄层层析中为一个点的流份 5-13, 蒸干后得淡棕色粉末 1.8 g, 用丙酮重结晶, 得一纯化合物 (1)。

2.2 化合物 (1) 对人鼻咽癌细胞的活性

化合物 1 对人鼻咽癌细胞 (CNE₂) 的生长有显著抑制作用 (见表 1), IC_{50} 为 9.67 (7.55 ~ 12.38) $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 理化性质与结构鉴定结果

化合物 (1) 为无色针状结晶, 熔点: 213.5 $^{\circ}\text{C}$ (未校正), $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (lg ϵ): 224 (4.35), 266.5 (4.16), 281 (sh, 4.09),

300 (sh, 4.01); IR (KBr) $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450, 3135, 2933, 1639, 1583, 1452, 1122。HR-MS 给出 $[\text{M}]^+ = 198.0801$, 显示分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ (计算值 198.0793)。

在 $^1\text{H-NMR}$ 中, $\delta 2.45$ (3H, s) 显示分子中有一与不饱和碳相连的甲基, $\delta 7.10$ (1H, br t, $J = 7.2$ Hz), $\delta 7.17$ (1H, br t, $J = 7.2$ Hz), $\delta 7.44$ (1H, br d, $J = 7.6$ Hz), $\delta 7.82$ (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 说明有一邻位二取代苯环; $\delta 11.51$ (1H, br s) 说明有一 NH 基。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱显示有 12 个碳原子信号峰, DEPT 谱显示其中有 1 个甲基碳、6 个次甲基碳和 5 个季碳, 其化学位移值说明次甲基碳和季碳均为芳碳和烯碳。

通过综合分析 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY、HMOC 和 HMBC (图 1), 可将化合物 (1) 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据归属如下:

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): $\delta 2.45$ (3H, s, 2-CH_3), $\delta 7.10$ (1H, br t, $J = 7.6$ Hz, H-5'), $\delta 7.17$ (1H, br t, $J = 7.6$ Hz, H-6'), $\delta 7.27$ (1H, s, H-4), $\delta 7.44$ (1H, br d, $J = 7.6$ Hz, H-7'), $\delta 7.71$ (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-2'), $\delta 7.82$ (1H, br d, $J = 7.6$ Hz, H-4'), $\delta 11.51$ (1H, s, NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): $\delta 13.6$ (2-CH_3), 104 (C-3'), 112.2 (C-7'), 119.3 (C-4), 119.5 (C-4'), 120.0 (C-5'), 122.1 (C-6'), 122.9 (C-2'), 123.5 (C-3'a), 136.4 (C-7'a), 147.4 (C-5), 158.3 (C-2)。

结果显示化合物 (1) 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与 Pimprinine 的文献^[1-3] 值完全一致, 证明化合物 (1) 即为 Pimprinine (图 1)。

2.4 讨论

Pimprinine 最初是由链霉菌 *Streptomyces pimprina* 的培养液中分离得到的, 早在 1963 年就发现 Pimprinine 具有抗癫痫作用^[1,4], 此后直到 1984 年才发现 Pimprinine 对血小板凝集具有有效的抑制作用^[5], 2001 年又发现它对小鼠表现出明显的抗痉挛及抑制震颤素引起的震颤和疼痛丧失的作

表 1 化合物 (1) 对人鼻咽癌细胞 (CNE₂) 生长的影响

生长抑制率 (%)							IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78		
72.1	50.6	48.9	20.6	14.4	9.4		
$\pm 15.3 \pm 17.5 \pm 7.2 \pm 7.2 \pm 9.4 \pm 6.1$							9.67 (7.55 ~ 12.38)

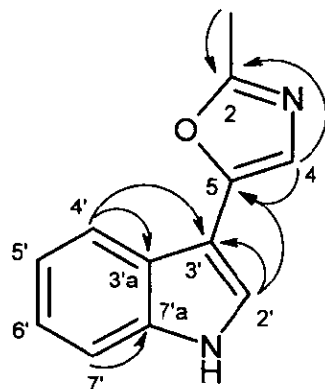


图 1 化合物 (1) 的结构及在 HMBC 中的主要 H→C 远程偶合

用^[6], 本文又发现其有明显的抑制人鼻咽癌细胞生长的作用, 新的活性在相隔相当长时间后才被发现。由此可见, 对 Pimprinine 的药理活性还应进行进一步试验研究, 以期发现其新的用途。同时还可对其进行结构上的修饰改造, 寻找活性更高的物质。

致谢 广东省微生物研究所张菊梅老师帮助进行菌种鉴定; 中国科学院昆明植物研究所沈月毛研究员帮助进行 HR-MS、HMQC 和 HMBC 测定; 中国科学院广州化学研究所陈瑞强老师帮助进行 NMR 测试; 中山医科大学谢冰芬教授帮助测试抗肿瘤活性; 特此致谢!

参 考 文 献

- [1] Joshi B S, Taylor W I. *Tetrahedron*, 1963, **19**: 1437 ~ 1439.
- [2] Koyama Y, Yokoe K, Dolby L J. *Agric Biol Chem*, 1981, **45** (5): 1285 ~ 1287.
- [3] Doyle K J, Moody C J. *Synthesis*, 1994, 1021 ~ 1022.
- [4] Narasimhan M J Jr, Ganla V G. *Hindustan Antibiot Bull*, 1967, **9** (3): 138 ~ 142.
- [5] Umehara K, Yoshida K, Okamoto M, *et al.* *J Antibiot (Tokyo)*, 1984, **37** (10): 1153 ~ 1160.
- [6] Naik S R, Harindran J, Varde A B. *J Biotechnol*, 2001, **88** (1): 1 ~ 10.