

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)产生的 二聚和三聚吲哚类生物碱

杨春丽^{1Δ} 韩茵^{2Δ} 王义¹ 张晓华^{2*} 朱伟明^{1*}

(1. 中国海洋大学医药学院 山东 青岛 266003)

(2. 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003)

摘要: 为了开发利用病原菌资源,研究了迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 的次生代谢产物,采用凝胶柱色谱、反相高效液相色谱等分离纯化手段,从该菌发酵产物的乙酸乙酯提取物中分离得到 5 个吲哚类生物碱 1–5。结合其理化性质和波谱学特征,化合物 1–5 的结构依次鉴定为: bis(1*H*-indol-3-yl)phenylmethane (1)、1,1-bis(1*H*-indol-3-yl)-2-phenylethane (2)、(2*S*)-3,3-bis(1*H*-indol-3-yl)propane-1,2-diol (3)、1*H*,1'*H*,1''*H*-3,2':3',3''-terindole (4) 和 (3,2':2',3''-terindolin)-3'-one (5), 其中化合物 1、2 和 4 为新天然产物。利用药敏纸片法、二倍稀释法和 SRB 法,对 5 个单体化合物的抗菌和细胞毒活性进行了初步评价。其中化合物 1 和 3 对产气杆菌有微弱的抑制作用,最小抑菌浓度(MIC)均为 0.125 g/L。

关键词: 迟缓爱德华氏菌, 二聚和三聚吲哚类生物碱, 抗细菌活性

Bis- and Tris- Indole Alkaloids from *Edwardsiella tarda*

YANG Chun-Li^{1Δ} HAN Yin^{2Δ} WANG Yi¹ ZHANG Xiao-Hua^{2*} ZHU Wei-Ming^{1*}

(1. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

(2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: In order to investigate the potential of pathogens for drug discovery, the secondary metabolites of *Edwardsiella tarda* were studied. As a result, five indole alkaloids were isolated by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, and HPLC preparation. By spectroscopic analysis, their structures were identified as bis(1*H*-indol-3-yl)phenylmethane (1), 1,1-bis(1*H*-indol-3-yl)-2-phenylethane (2), (2*S*)-3,3-bis(1*H*-indol-3-yl)propane-1,2-diol (3), 1*H*,1'*H*,1''*H*-3,2':3',3''-terindole (4), and (3,2':2',3''-terindolin)-3'-one (5), respectively. To the best our knowledge, compounds 1, 2 and 4 were isolated as the natural products for the first time. Both compounds 1 and 3 showed weak anti-bacterial activity against *Clostridium perfringens* with MIC values of 0.125 g/L.

Keywords: *Edwardsiella tarda*, Bis- and tris- indole alkaloids, Anti-bacterial activity

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2010CB833804)

* 通讯作者: Tel: 86-532-2031268; ✉: weimingzhu@ouc.edu.cn; xhzhang@ouc.edu.cn

Δ对本文同等贡献

收稿日期: 2010-03-12; 接受日期: 2010-05-07

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

迟缓爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 是一种革兰氏阴性肠道病原菌, 感染宿主广泛, 能使鱼类、两栖类、爬行类甚至哺乳类等多种动物感染致病^[1]。爱德华氏菌病(Edwardsiellosis)是水产养殖中最常见的传染病之一, 对大菱鲆和鳗鱼的感染已成为最严重的养殖鱼类病害之一, 并呈世界性分布^[2-3]。为了研究、开发病原菌资源, 作者对爱德华氏菌的次生代谢产物进行了研究, 从其乙酸乙酯萃取物(胞外产物)中分离得到 5 个二聚和三聚吲哚类生物碱(图 1)。结合其理化性质和 ¹H、¹³C NMR 等波谱学特征, 将化合物 1-5 的结构分别鉴定为: bis(1*H*-indol-3-yl)

phenylmethane (1)、1,1-bis(1*H*-indol-3-yl)-2-phenylethane (2)、(2*S*)-3,3-bis(1*H*-indol-3-yl)propane-1,2-diol (3)、1*H*,1'*H*,1''*H*-3,2':3',3''-terindole (4) 和 (3,2':2',3''-terindolin)-3'-one (5), 其中化合物 1、2 和 4 为新天然产物。利用 SRB 法、药敏纸片法和二倍稀释法, 分别评价了化合物 1-5 对 P388 和 Hela 细胞的细胞毒活性以及对 5 种致病菌(产气杆菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)的抗菌活性, 结果显示化合物 1 和 3 对产气杆菌有微弱的抑制作用, 最小抑菌浓度 (MIC) 均为 0.125 g/L。

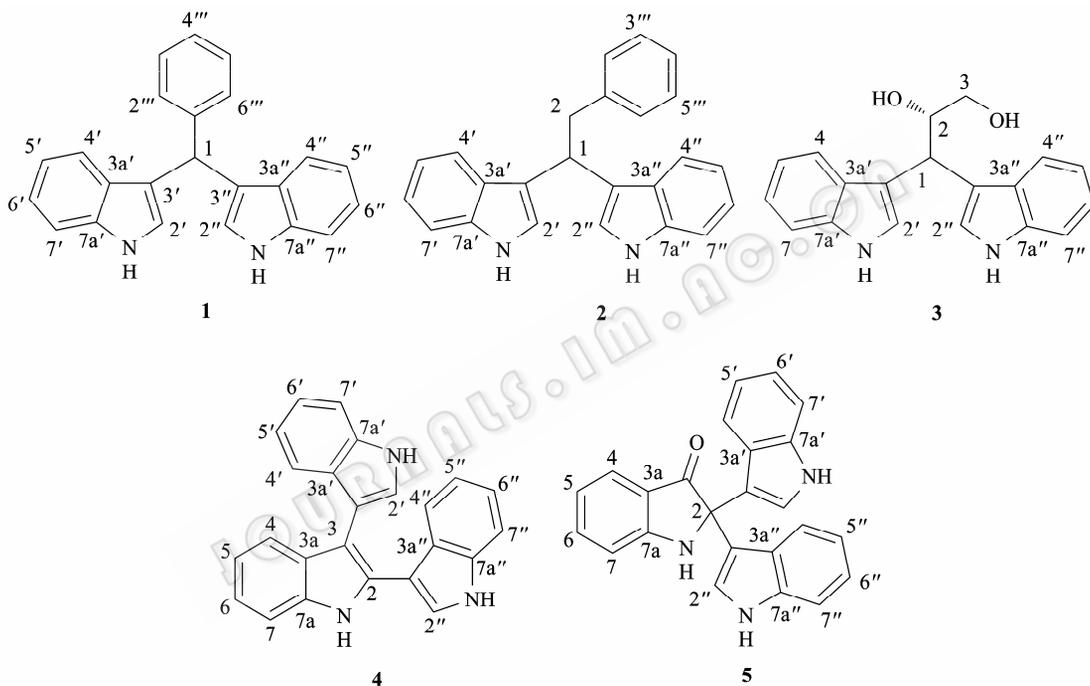


图 1 化合物 1-5 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-5

1 材料与方法

1.1 实验菌株与肿瘤细胞

迟缓爱德华氏菌 (*E. tarda*) LTB-4 菌株分离自青岛胶南渔场的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*), 并通过其 16S rDNA 序列加以鉴定。抑菌活性实验所用的 5 种致病菌依次为: 产气杆菌 (*Clostridium perfringens*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。小鼠白血病细胞 P388、人宫颈癌细胞 Hela

购于中国科学院细胞库。

1.2 试剂与仪器

质谱用 Autospec Ultima TOF 型质谱仪 (70 eV); 核磁共振谱用日本 JEOL JNM ECP600 型核磁共振仪 (TMS 为内标)。分析用高效液相色谱仪: Waters 公司产品, Waters 600 泵, Waters 996 二极管阵列检测器, Millennium³² 工作站, Capcell Park C₁₈ 柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 半制备用高效液相色谱仪: 日本岛津公司产品, LC-6AD 泵, SPD-M20 AVP 检测器, SCL-10AV 型系统控制器, Capcell Park C₁₈ 柱 (5 μm, 20 mm × 250 mm)。二氧化碳培养箱:

MCO175 (SANYO 公司); SPECTRAMAXplus 型酶标仪: 美国 Molecular Devices Corporation。胎牛血清(FBS)和 RPMI-1640 细胞培养基分别为 Hyclone 公司 (Cat. No. STF721)和 GIBCOBRL 公司产品。丽丝胺罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB): 美国 Sigma 公司产品。柱层析及薄层层析用硅胶 H (10 μm –40 μm , 青岛海洋化工集团公司)和 Sephadex™ LH-20 (Pharmacia 公司)。

1.3 菌种发酵

按培养微生物的常规方法, 取 *E. tarda* LTB-4 菌株适量, 接种到含 100 mL LB 培养基 (胰蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g, 氯化钠 10 g, 自来水 1000 mL, pH 7.4) 的 500 mL 三角烧瓶中, 在 28°C、165 r/min 摇床条件下培养 12 h, 获得种子培养液。用移液枪取该种子培养液适量, 按 5% 的接种量接种到内装 150 mL LB 培养基的 500 mL 三角烧瓶中, 置于 28°C、165 r/min 的摇床上发酵 24 h, 获得发酵培养液。

1.4 提取分离

将迟缓爱德华氏菌株 LTB-4 的发酵培养液过 0.22 μm 滤膜, 除去菌体, 得上清液 134 L, 用等量乙酸乙酯萃取 5 次, 减压浓缩至干, 得该菌株的乙酸乙酯粗提物 16.0 g。粗提物以氯仿-甲醇(1:1)为溶剂系统进行 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 将粗提物分成 10 个组分(fr.1–fr.10)。组分 fr.5 经加压正相硅胶柱层析, 以石油醚-丙酮为溶剂系统梯度洗脱, 得到 15 个组分(fr.5-1–fr.5-15)。fr.5-10 经半制备反相高效液相色谱, 甲醇-水(72:28, V/V)洗脱, 分别得到化合物 1 (3.2 mg, t_{R} 16.07 min)和化合物 2 (2.1 mg, t_{R} 18.76 min)。fr.5-14 和 fr.5-15 分别经半制备反相高效液相色谱, 甲醇-水(57:43, V/V)洗脱, 分别得到化合物 4 (3.9 mg, t_{R} 14.89 min) 和化合物 3 (6.3 mg, t_{R} 6.59 min)。fr.5-13 经 Sephadex LH-20 甲醇凝胶柱后, 通过半制备反相高效液相色谱甲醇-水(60:40, V/V)洗脱, 得到化合物 5 (9.0 mg, t_{R} 12.12 min)。

1.5 细胞毒活性测定

SRB 法^[4]: 取对数期生长的肿瘤细胞 (P388、Hela), 与不同浓度的药物共同孵育一定时间, 加入预冷的 80%三氯醋酸 50 μL TCA 固定, 放置一定时间后用去离子水冲洗, 甩干。然后每孔加入 150 μL 的 SRB, 染色后用 1%醋酸洗掉未结合的 SRB。再

加缓冲液 Tris 100 μL 。酶标仪 515 nm 处测定 OD 值, 计算抑制率, 评价药物对细胞增殖的抑制作用。

1.6 抗细菌活性测定

抗细菌活性的测定采用药敏纸片法和二倍稀释法^[5]。

(1) 药敏纸片法: 按照文献方法, 先将产气杆菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌接种到 LB 培养基上。用打孔器将干净的、吸水性强的优质滤纸制成直径为 6 mm 的无菌小圆纸片, 用移液枪吸取 10 μL 待测化合物的甲醇溶液(1.0、0.1、0.01 g/L)添加于滤纸片上, 待纸片晾干后, 将其贴于所制备好的含菌固体 LB 培养基中, 置于 28°C 培养箱中培养 24–48 h, 观察并测量抑菌圈的直径。重复 3 次, 同时以环丙沙星为阳性对照, 甲醇溶剂为阴性对照。

(2) 二倍稀释法: 配制化合物浓度为 1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625 g/L, 按药敏纸片法步骤测定化合物的最小抑制浓度 (MIC)。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 为红色固体, 正离子 ESI-MS 在 m/z 323.0 处给出伪分子离子峰 $[M+H]^+$, 提示分子量为 322。结合 ^1H NMR, ^{13}C NMR 谱推测该化合物的分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2$ 。化合物 1 的 ^1H NMR 低场区给出 2 个活泼氢信号 (δ_{H} 7.91, 2H, brs)和 15 个芳香氢信号 (δ_{H} 6.6–7.4)、高场区给出 1 个氢信号(δ_{H} 5.89, s, 1H)。 δ_{H} 7.91 (brs, 2H)、7.35 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz)、7.16 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz]、6.99 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz]、7.39 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz)、6.66 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz) 的 12 个氢信号提示分子中存在 2 个对称的 3-取代吡啶结构, 其余的 5 个芳香氢信号 [δ_{H} 7.34 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz), 7.27 (dt, 2H, $J = 7.7, 2.2$ Hz), 7.20 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz)] 提示分子中存在 1 个单取代的苯环。 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱给出 12 个 sp^2 杂化的芳香碳信号、1 个次甲基碳信号。这些数据表明化合物 1 的结构为 bis(1*H*-indol-3-yl) phenylmethane^[6]。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.89 (s, 1H, H-1), 6.66 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz, H-2'/2''), 6.99 [(dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-6'/6''), 7.16 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-5'/5''), 7.20 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-4''), 7.27 (dt, 2H, $J = 7.7, 2.2$ Hz,

H-3'''/5'''), 7.34 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-2'''/6'''), 7.35 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-4'/4''), 7.39 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-7'/7''), 7.91 (brs, 2H, NH-1'/1''). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 40.1 (CH, C-1), 110.9 \times 2 (CH, C-7'/7''), 119.2 \times 2 (CH, C-4'/4''), 119.7 \times 2 (qC, C-3'/3''), 119.9 \times 2 (CH, C-5'/5''), 121.9 \times 2 (CH, C-6'/6''), 123.5 \times 2 (CH, C-2'/2''), 126.1 (CH, C-4'''), 127.0 \times 2 (qC, C-3a'/3a''), 128.1 \times 2 (CH, C-3'''/5'''), 128.6 \times 2 (CH, C-2'''/6'''), 136.6 \times 2 (qC, C-7a'/7a''), 143.9 (qC, C-1'''). ESI-MS: m/z 323.0 [M+H]⁺.

化合物 2 为黄色固体, 正离子 ESI-MS 在 m/z 375.1 处给出伪分子离子峰[M+K]⁺, 提示分子量为 336。结合 ^1H 、 ^{13}C NMR 谱推测该化合物的分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2$, 比化合物 1 多一个 CH_2 单元。化合物 2 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱与化合物 1 非常相似, 表明它们是同系物, 也存在 2 个对称的 3-取代吲哚和 1 个单取代的苯环。但氢谱和碳谱在高场区多 2 个质子信号和 1 个亚甲基碳, 且与次甲基有偶合关系: δ_{H} 3.54 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz)、4.79 (brt, 1H, $J = 7.7, 6.6$ Hz), 提示存在 $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ 片段。结合文献[7], 确定化合物 2 为 1,1-bis(1*H*-indol-3-yl)-2-phenylethane。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3.54 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz, H-2), 4.79 (brt, 1H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-1), 6.96 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz, H-2'/2''), 7.01 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-2'''/6'''), 7.09 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-7'/7''), 7.10 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-4'''), 7.142 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-5'/5''], 7.149 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-6'/6''], 7.32 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-3'''/5'''), 7.56 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-4'/4''), 7.88 (brs, 2H, NH-1'/1'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 40.1 (CH, C-1), 48.9 (CH_2 , C-2), 111.1 \times 2 (CH, C-7'/7''), 119.1 \times 2 (CH, C-4'/4''), 119.5 \times 2 (qC, C-3'/3''), 119.8 \times 2 (CH, C-5'/5''), 121.8 \times 2 (CH, C-6'/6''), 122.0 \times 2 (CH, C-2'/2''), 125.7 (CH, C-4'''), 128.0 \times 2 (CH, C-2'''/6'''), 129.0 \times 2 (CH, C-3'''/5'''), 133.7 (qC, C-1'''), 136.6 \times 2 (qC, C-7a'/7a''), 141.3 \times 2 (qC, C-3a'/3a'')。ESI-MS: m/z 375.1 [M+K]⁺。

化合物 3 为白色粉末, 负离子 ESI-MS 在 m/z 305.1 处给出伪分子离子峰[M-H]⁻, 提示分子量为 306。结合 ^1H 、 ^{13}C NMR 谱推测该化合物的分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 。化合物 3 的 ^1H NMR 低场区给出 2 个活泼氢信号 [δ_{H} 10.74 (1H, brs)、10.72 (1H, brs)]、10 个芳香氢信号 (δ_{H} 6.8–7.6), 高场区还给出 6 个氢信号。与化合物 1 的 ^1H 、 ^{13}C NMR 相似, 化合物 3 低场区的 2 个活泼氢信号和芳香区的 10 个氢信号相应于 2 个 3-取代吲哚结构。高场区具有耦合关系的

6 个氢信号 [δ_{H} 3.25 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.46 (brt, 1H, $J = 6.4, 4.5$ Hz), 4.49 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz), 4.57 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz)] 提示 $-\text{CH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ 片段的存在。 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱给出 19 个碳信号, 包括 16 个 sp^2 杂化的芳香碳信号, 验证了两个吲哚环的存在。综合文献[8], 确定化合物 3 的平面结构为 3,3-bis(1*H*-indol-3-yl) propane-1,2-diol。通过与文献对比旋光值 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (+42.1° vs. +38.5°)^[9], 其绝对构型确定为 *S*-, 故化合物 3 的结构鉴定为 (2*S*)-3,3-bis(1*H*-indol-3-yl) propane-1,2-diol。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 3.25 (m, 1H, H-3a), 3.34 (m, 1H, H-3b), 4.26 (m, 1H, H-2), 4.46 (brt, 1H, $J = 6.4, 4.5$ Hz, HO-3), 4.49 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, H-1), 4.57 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, HO-2), 6.84 [dd (“t” like), 1H, $J = 8.2, 7.3$ Hz, H-6''], 6.87 [dd (“t” like), 1H, $J = 8.2, 7.3$ Hz, H-6'], 6.96 [dd (“t” like), 1H, $J = 8.2, 7.3$ Hz, H-5''], 6.98 [dd (“t” like), 1H, $J = 8.2, 7.3$ Hz, H-5'), 7.22 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H-2''), 7.28 (brd, 2H, $J = 8.2$ Hz, H-7'/7''), 7.31 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.51 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, H-4''), 7.52 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, H-4'), 10.72 (brs, 1H, NH-1''), 10.74 (brs, 1H, NH-1')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 36.4 (CH, C-1), 65.2 (CH_2 , C-3), 74.7 (CH, C-2), 111.5 (CH, C-7''), 111.7 (CH, C-7'), 115.7 (qC, C-3''), 117.8 (qC, C-3'), 118.2 (CH, C-4''), 118.4 (CH, C-4'), 119.4 (qC, C-5''), 119.7 (CH, C-5'), 120.8 (CH, C-6''), 121.0 (CH, C-6'), 123.4 (CH, C-2''), 123.9 (CH, C-2'), 127.4 (qC, C-3a''), 128.4 (qC, C-3a'), 136.4 (qC, C-7a''), 136.6 (qC, C-7a')。ESI-MS m/z 305.1 [M-H]⁻。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +42.1° (c 0.31, MeOH)。

化合物 4 为黄色油状物, 正离子 ESI-MS 在 m/z 386.1 处给出伪分子离子峰[M+K]⁺, 提示分子量为 347。结合 ^1H 、 ^{13}C NMR 谱推测该化合物的分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{N}_3$ 。化合物 4 的 ^1H NMR 低场区给出 3 个活泼氢信号 (δ_{H} 10.96, 2H, brs; 10.60, 1H, brs)、14 个芳香氢信号 (δ_{H} 6.7–7.4)。与化合物 1 氢谱相似, δ_{H} 10.96 (brs, 2H)、7.34 (brd, 2H, $J = 8.8$ Hz)、7.00 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz]、6.79 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz]、7.21 (brd, 2H, $J = 8.8$ Hz)、6.84 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz) 的 10 个氢信号提示分子中存在 2 个 3-取代吲哚结构。其余的 5 个氢信号—— δ_{H} 10.60 (brs, 1H), 7.21 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 6.92 [dd (“t” like), 1H, $J = 7.7, 6.6$ Hz], 7.22 [dd (“t” like), 1H, $J = 7.7, 6.6$ Hz], 6.98 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz) 提示分子中存在 1 个 2,3-双取代的吲哚。对照文献[10], 化合物 4 的结构确定为 1*H*,1'*H*,1''*H*-3,2':3':3''-terindole。 $^1\text{H-NMR}$

(600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 6.79 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-6'/6''], 6.84 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz, H-2'/2''), 6.92 [dd (“t” like), 1H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-5], 6.98 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-7), 7.00 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-5'/5''], 7.21 (brd, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-7'/7''), 7.21 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-4), 7.22 [dd (“t” like), 1H, $J = 7.7, 6.6$ Hz, H-6], 7.34 (brd, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-4'/4''), 10.60 (brs, 1H, NH-1), 10.96 (brs, 2H, NH-1'/1''). ESI-MS m/z 386.1 [M+K]⁺.

化合物 **5** 为红色油状物, 正离子 ESI-MS 在 m/z 364.2 处给出伪分子离子峰[M+H]⁺, 提示分子量为 363。结合 ¹H、¹³C NMR 谱推测该化合物的分子式为 C₂₄H₁₇N₃O。与化合物 **4** 相似, 化合物 **5** 的 ¹H NMR 低场区亦给出 3 个活泼氢信号 (δ_H 10.96, 2H, brs; 10.60, 1H, brs) 和 14 个芳香氢信号 (δ_H 6.7–7.4), 提示分子中存在 2 个 3-取代吲哚结构和 1 个 2,3-双取代的吲哚。但化合物 **5** 较化合物 **4** 的 ¹³C NMR、DEPT 谱多给出 1 个羰基碳信号 (δ_C 200.7)、少 1 个芳香季碳信号, 对照文献[11], 确定化合物 **5** 为 (3,2':2',3''-terindolin)-3'-one。¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 6.72 [dd (“t” like), 1H, $J = 7.8, 7.4$ Hz, H-6], 6.82 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.8, 7.4$ Hz, H-6'/6''], 6.94 (brd, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-4), 7.03 [dd (“t” like), 2H, $J = 7.8, 7.4$ Hz, H-5'/5''], 7.09 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz, H-2'/2''), 7.31 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-7'/7''), 7.35 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, H-4'/4''), 7.47 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-7), 7.50 [dd (“t” like), 1H, $J = 7.8, 7.4$ Hz, H-5], 8.13 (brs, 1H, NH-1), 10.97 (brs, 2H, NH-1'/1''). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 67.5 (qC, C-2), 111.5 \times 2 (CH, C-4'/4''), 111.7 (CH, C-4), 113.9 \times 2 (qC, C-3'/3''), 117.0 (CH, C-6), 117.7 (qC, C-3a), 118.3 \times 2 (CH, C-6'/6''), 120.5 \times 2 (CH, C-7'/7''), 120.9 \times 2 (CH, C-5'/5''), 123.9 \times 2 (CH, C-2'/2''), 124.4 (CH, C-7), 125.6 \times 2 (qC, C-3a'/3a''), 136.9 (CH, C-7a'/7a''), 137.3 (CH, C-5), 160.5 (qC, C-7a), 200.7 (qC, C-3)。ESI-MS m/z 364.2 [M+H]⁺。

2.2 细胞毒活性测定结果

经测试, 化合物 **1–5** 对小鼠白血病细胞 P388 和人宫颈癌细胞 Hela 均未显示细胞毒活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 大于 100 μ mol/L。

2.3 抑菌活性测定结果

化合物 **1–5** 对枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均无抑菌活性; 仅化合物 **1** 和 **3** 对产气杆菌有微弱的抑制作用, 最小抑菌浓度 (MIC) 均为 0.125 g/L。

3 讨论

通过实验结果可看出, 迟缓爱德华氏菌的次生代谢产物主要是二聚和三聚吲哚类化合物。二聚和三聚吲哚类化合物生物来源广泛, 陆地植物^[12]、海洋动物^[13]和海洋微生物^[14]均能代谢产生此类化合物, 其中海绵及其海绵共附生微生物为该化合物的主要来源, 但在迟缓爱德华氏菌中为首次发现。文献报道的化合物 **1**^[7]、**2**^[7]、**4**^[10]均为合成产物, 化合物 **3** 和 **5** 分别从禾本植物致病菌 *Balansia epichloe*^[15]、异养细菌 HEL-45^[16]以及海洋细菌 *Vibrio parahaemolyticus*^[17–18]的次生代谢产物中分离得到。故化合物 **1**、**2**、**4** 为新天然产物。

二聚和三聚吲哚类化合物具有细胞毒、抗微生物、抗病毒、拮抗 5-羟色胺等多种生物活性^[13,19]。文献报道化合物 **1** 可诱导白血病细胞 HL-60 的分化^[7]、化合物 **3** 在剂量为 5 μ g/个时对鸡胚胎的致死率为 40%^[15]、化合物 **5** 在 100 μ g/disk 时对金黄色葡萄球菌有抑制作用^[17]。据此, 本文采用药敏纸片法、二倍稀释法及 SRB 法对化合物 **1–5** 的抗菌和细胞毒活性进行了初步评价。结果显示这 5 个吲哚类生物碱抗细菌活性不佳, 只有化合物 **1** 和 **3** 对产气杆菌有微弱的抑制作用, 其最小抑菌浓度 (MIC) 均为 0.125 g/L, 表明苯基(而非苄基)和极性的羟基在抗菌活性中发挥了作用。同时, 化合物 **1–5** 对小鼠白血病细胞 P388 和人宫颈癌细胞 Hela 均未显示出细胞毒作用。但文献报道化合物 **1** 的氯取代物 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(*p*-chlorophenyl)methane 能够激活核孤儿受体 Nurr 1, 从而引发膀胱癌细胞的凋亡^[20]; 在浓度为 10 μ mol/L 时, 化合物 **1** 的氯取代物对膀胱癌细胞 KU7 的抑制作用是化合物 **1** 的 6 倍^[20]。故苯环对位的氯原子取代有助于增强细胞毒活性。

参考文献

- [1] 王波, 莫照兰. 迟缓爱德华氏菌及其致病机理. 海洋科学集刊, 2007(48): 133–139.
- [2] 陈翠珍. 爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病. 河北科技师范学院学报, 2004, 18(3): 70–76.
- [3] 李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲆腹水病原的研究. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 649–654.
- [4] 黄银久, 宋宝安, 金林红, 等. SRB 法和 MTT 法抗肿瘤

- 药物筛选结果相关性. 生物学杂志, 2009, 26(4): 13-16.
- [5] 刘胜贵, 许方美, 张兰兰, 等. 植物体外抑菌试验的方法研究. 怀化学院学报, 2006, 25(2): 65-67.
- [6] Nishiki M, Qi W, Ito K. Anion binding properties of indolylmethanes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2008, 61(1/2): 61-69.
- [7] Noguchi-Yachide T, Tetsuhashi M, Aoyama H, *et al.* Enhancement of chemically-induced HL-60 cell differentiation by 3,3-diindolylmethane derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2009, 57(5): 536-540.
- [8] 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. *Carbohydrate Research*, 2005, 340(14): 2251-2255.
- [9] Marzi M, Minetti P, Moretti GP, *et al.* Bis-heterocyclic (e.g., indolyl, pyrrolyl) compounds with antitumor and chemosensitizing activity. *PCT Int Appl WO 02/36561 A1*, 2002: 103.
- [10] Richter JM, Whitefield BW, Maimone TJ, *et al.* Scope and mechanism of direct indole and pyrrole couplings adjacent to carbonyl compounds: total synthesis of acremoxin A and oxazinin 3. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(42): 12857-12859.
- [11] Stull TL, Hyun L, Sharetzky C, *et al.* Production and oxidation of indole by *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(1): 5-8.
- [12] O'Connor SE, Maresh JJ. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports*, 2006, 23(4): 532-547.
- [13] Oh KB, Mar W, Kim S, *et al.* Bis(indole) alkaloids as sortase A inhibitors from the sponge *Spongosorites* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(22): 4927-4931.
- [14] Gupta L, Talwar A, Chauhan PMS. Bis and Tris indole alkaloids from marine organisms: new leads for drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, 14(16): 1789-1803.
- [15] Potter KJ, Bacon CW, Robbins JD, *et al.* Indole alkaloids from *Balansia epichloë*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1977, 25(1): 88-93.
- [16] Wagner-Döbler I, Rheims H, Felske A, *et al.* *Oceanibulbus indolifex* gen. nov., sp. nov., a North Sea alphaproteobacterium that produces bioactive metabolites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(4): 1177-1184.
- [17] Bell R and Carmeli S. Vibriindole A, a metabolite of the marine bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*, isolated from the toxic mucus of the boxfish *Ostracion cubicus*. *Journal of Natural Products*, 1994, 57(11): 1587-1590.
- [18] Veluri R, Oka I, Wagner-Döbler I, *et al.* New indole alkaloids from the North Sea bacterium *Vibrio parahaemolyticus* Bio249. *Journal of Natural Products*, 2003, 66(11): 1520-1523.
- [19] Oh KB, Mar W, Kim S, *et al.* Antimicrobial activity and cytotoxicity of Bis(indole) alkaloids from the sponge *Spongosorites* sp.. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(3): 570-573.
- [20] Inamoto T, Papineni S, Chintharlapalli S, *et al.* 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-chlorophenyl)methane activates the orphan nuclear receptor Nurr1 and inhibits bladder cancer growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2008, 7(12): 3825-3833.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(°C 和 % 除外), 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3°C-5°C 不可写成 3-5°C; 3%-6% 不可写成 3-6% 等。