

· 研究报告 ·

## 来源于深海链霉菌 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-4112 的吡咯生物碱<sup>△\*</sup>

王衬<sup>1\*\*</sup>, 徐亚娟<sup>1\*\*</sup>, 黄小龙<sup>1,2</sup>, 郝杰杰<sup>1</sup>, 朱伟明<sup>1\*</sup>

(1. 中国海洋大学海洋药物教育部重点实验室, 医药学院, 山东 青岛, 266003; 2. 海南大学农学院, 海南 海口, 570228)

**摘要:**目的 分离鉴定深海来源放线菌 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-4112 的活性天然产物。方法 采用硅胶色谱、凝胶色谱及高效液相色谱(HPLC)等常规分离纯化手段对菌株的天然产物进行分离、纯化;运用核磁共振、CD、紫外、红外和旋光等方法鉴定所得化合物的结构;采用 MTT 法和 CCK-8 法评价化合物的细胞毒活性、对硝基苯基- $\alpha$ -吡喃葡萄糖苷(PNPG)法评价化合物的  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性。结果 从深海沉积物来源的链霉菌 OUCMDZ-4112 的发酵产物中分离鉴定了 2 个新的吡咯生物碱: S(+)-2-甲氧基-4-氧亚基-4-(2-吡咯基)丁酰胺(1)和 R(-)-2-甲氧基-4-氧亚基-4-(2-吡咯基)丁酰胺(2)、以及 2 个已知的灵菌红素(PGs): streptorubin B (3) 和 undecylprodigiosin (4)。化合物 3 和 4 对 K562 肿瘤细胞株具有强细胞毒活性, IC<sub>50</sub> 分别为 0.60  $\mu$ mol/L 和 0.01  $\mu$ mol/L(阿霉素的 IC<sub>50</sub> 为 0.43  $\mu$ mol/L);同时外消旋 1/2 和化合物 3、4 具有  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 2.61、0.082 和 0.92 mmol/L(阿卡波糖的 IC<sub>50</sub> 为 1.12 mmol/L)。结论 本文首次报道了 PGs 类化合物 3 和 4 的  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性;作为中间产物,新化合物 1 和 2 的分离鉴定,证明了文献中 PGs 的合成途径。

**关键词:**海洋放线菌; *Streptomyces* sp. OUCMDZ-4112; 天然产物; 灵菌红素; 细胞毒活性; 糖苷酶活性  
中图分类号: R931 文献标志码: A 文章编号: 1002-3461(2016)01-001-09

### Pyrrole alkaloids from the deep-sea sediment-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-4112

WANG Chen<sup>1</sup>, XU Ya-juan<sup>1</sup>, HUANG Xiao-long<sup>1,2</sup>, HAO Jie-jie<sup>1</sup>, ZHU Wei-ming<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;  
2. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract: Objective** To identify the bioactive natural products of the deep-sea sediment-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-4112. **Methods** The isolation and purification of compounds were performed by means of extraction, column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20 and HPLC. And their structures were elucidated by analysis of NMR, MS, UV and CD along with ECD calculation. The cytotoxicity was evaluated by MTT and CCK-8 methods. And the  $\alpha$ -glucosidase inhibition was assayed by p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) method. **Results** Two new pyrrole alkaloids, S(+)-2-methoxy-4-oxo-4-(1H-pyrrol-2-yl)butanamide (1) and R(-)-2-methoxy-4-oxo-4-(1H-pyrrol-2-yl)butana-

\*  $\Delta$ 基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2012AA092104, 2013AA092901); 国家自然科学基金项目(41376148, 21172204, U1406402)资助

作者简介: 王衬(1990-), 徐亚娟(1989-), 女, 硕士研究生。(\*\* 同等贡献)

\* 通讯作者: 朱伟明, 男, 教授, 博导。Tel: 0532-82031268 E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-05-06

mide (**2**), along with two known prodigiosins (PGs), streptorubin B (**3**) and undecylprodigiosin (**4**) were isolated and identified from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. OUCMDZ-4112. Compounds **3** and **4** showed potent cytotoxicities against K562 cell with the  $IC_{50}$  values of 0.60  $\mu\text{mol/L}$  and 0.01  $\mu\text{mol/L}$ , respectively (positive control, adriamycin,  $IC_{50}$  0.43  $\mu\text{mol/L}$ ). In addition, compound **4** and the racemic **1/2** exhibited pronounced  $\alpha$ -glucosidase inhibition with the  $IC_{50}$  values of 0.92 and 2.61 mmol/L, respectively (positive control, acarbose,  $IC_{50}$  1.12 mmol/L). **Conclusion** The  $\alpha$ -glucosidase inhibition of PGs **3** and **4** was reported here for the first time. And the isolation and identification of the new compounds **1** and **2** supported the biosynthesis of PGs in the literatures.

**Key words:** marine actinobacteria; *Streptomyces* sp. OUCMDZ-4112; natural products; prodigiosins; cytotoxicity;  $\alpha$ -glucosidase inhibition

海洋有着明显不同于陆地的环境特征,如高压、高盐、低温、寡营养等,正是这些特殊的环境因素导致海洋微生物能够产生结构新颖和具有生物活性的天然产物<sup>[1-2]</sup>。其中海洋放线菌是海洋微生物的重要组成部分,据不完全统计,在2010年1月到2013年2月期间报道来源于海洋放线菌的新化合物达263个,其中活性化合物的数量约为78%,以抑菌及抗肿瘤活性为主<sup>[3]</sup>。在放线菌目中,链霉菌属是最大的1个菌属,从该菌属中分离得到了大量结构新颖和活性多样的天然产物<sup>[4-5]</sup>。灵菌红素类(prodigiosins, PGs)是一类来源于沙雷菌属(*Settratia* sp.)细菌和链霉菌属(*Streptomyces* sp.)放线菌的结构独特、活性广泛的化合物。其结构中含有3个吡咯环,2个吡咯环直接通过C-C  $\sigma$ 键相连、第三个吡咯环则由1个次甲基连接之;生物活性包括抑菌、抗肿瘤、免疫抑制、抗癌等<sup>[6-7]</sup>。首个报道的PGs为灵菌红素(prodigiosin),于1902年被分离得到、1960年通过化学合

成确认其结构<sup>[6]</sup>。迄今为止已经发现并鉴定了17个天然PGs,包括 prodigiosin<sup>[8]</sup>、streptorubin B<sup>[9]</sup>、metacylprodigiosin<sup>[10]</sup>、undecylprodigiosin<sup>[11]</sup>和 HBPG<sup>[12]</sup>等。

在继续研究海洋链霉菌活性天然产物的过程中<sup>[13-16]</sup>,本课题组发现1株来自南海深海沉积物的链霉菌 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-4112,其发酵产物显示出灵菌红素的特征紫外吸收(520~540 nm)、在10  $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对MCF-7细胞株具有细胞毒活性(抑制率为63.0%)。本文采用化学追踪的分离方法,从菌株OUCMDZ-4112发酵产物中分离鉴定4个吡咯生物碱类化合物:S(+)-2-甲氧基-4-氧亚基-4-(2-吡咯基)丁酰胺(**1**)、R(-)-2-甲氧基-4-氧亚基-4-(2-吡咯基)丁酰胺(**2**)、streptorubin B(**3**)和 undecylprodigiosin(**4**),其中**1**和**2**为新化合物**3**和**4**,为PGs类化合物(见图1)。

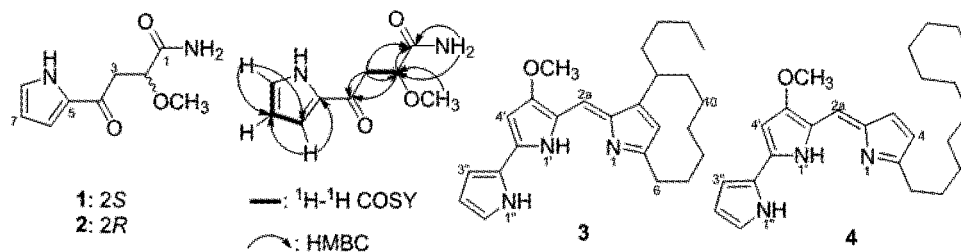


图1 化合物1~4的结构及1和2的关键 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY和HMBC信号

Fig. 1 Structures of compounds 1~4 and the key HMBC and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY correlations of 1 and 2

## 1 实验部分

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器

垂直层流洁净工作台 HCB-1300V (松下电器有限公司上海分公司健康医疗公司); 恒温培养箱: MIR-253 (SANYO 公司); 硅胶 H (200~400

目,青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20(Pharmacia 公司);制备型高效液相色谱采用 Waters 公司产品(Waters 600,Waters 996 二极管阵列检测器,Millennium32 工作站,YMC Pak ODS-A 柱:5  $\mu\text{m}$ ,4.6 mm  $\times$  250 mm);核磁共振仪(日本 Jeol JNM-ECP600 型);质谱仪(Mariner API-TOF 型);紫外光谱仪(Beck-man DUR640 型);旋光仪 POLAX-L 型(美国 ATAGO)公司;圆二色谱仪 J-810(日本 JASCO 公司);Chiral column(CHIRAL-PAK IA 柱:5  $\mu\text{m}$ ,4.6 mm  $\times$  250 mm);树脂(XAD-16,Dow Chemical Company)。

### 1.1.2 试剂

常规提取分离用甲醇(MeOH)、丙酮( $\text{Me}_2\text{CO}$ )、乙酸乙酯(AcOEt)、石油醚(PE)、二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )均为工业用化学纯产品,液相色谱甲醇、乙醇(EtOH)、异丙醇(*i*-PrOH)为色谱纯,液相色谱纯水为哇哈哈矿泉水,洗脱剂添加的酸为分析

纯的三氟乙酸(TFA)。

## 1.2 菌株的来源、分离培养和鉴定

### 1.2.1 菌株来源和鉴定

放线菌 OUCMDZ-4112,来自南海 2206m 深的沉积物样品。该菌株菌落在 SP2 培养基、28  $^\circ\text{C}$  的条件下生长较良好,后期能够产生较多的红色色素。但是菌株产生色素的情况很不稳定,与温度、培养基成分、菌株生长状况等都有很大的关系。由生工生物工程(上海)股份有限公司提取菌株 OUCMDZ-4112 的 DNA 并扩增 16S rRNA 基因序列,以及纯化和测序。测序后,利用 EzTaxon 在线比对服务(<http://www.ezbiocloud.net>)进行相关有效种的相似性搜索,确定菌株的属种,并下载相关放线菌的 16S rRNA 基因序列,用 Clustal X1.8 软件进行序列比对,随后用 Mega4.0 软件构建系统发育树(见图 2)。菌株以甘油管保藏于本课题组  $-80^\circ\text{C}$  的冰箱中。

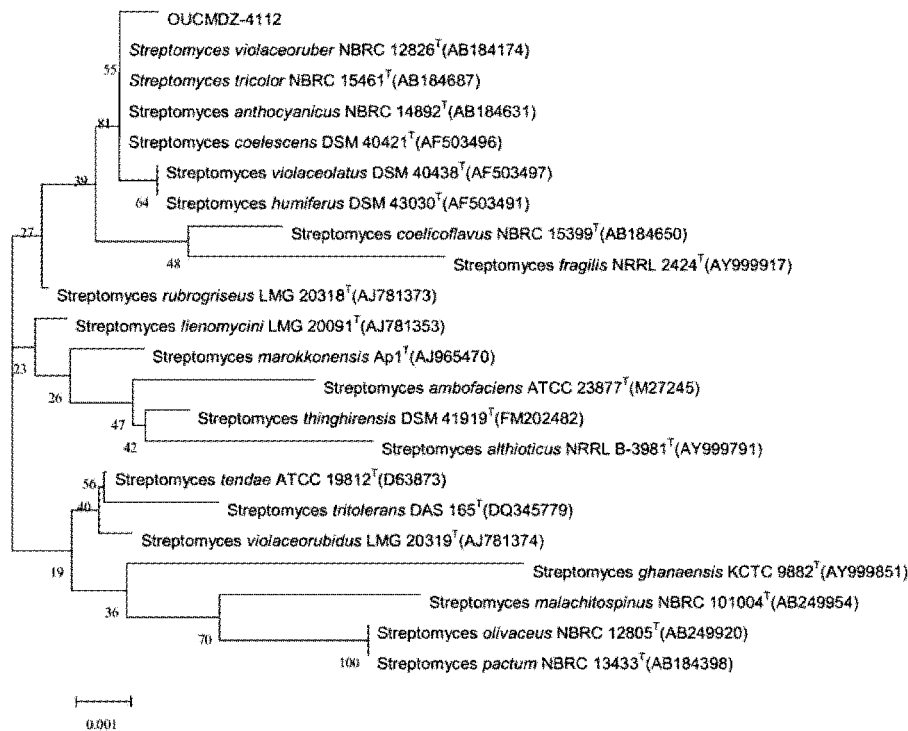


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的 OUCMDZ-4112 菌株的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree of OUCMDZ-4112 strain based on its 16S rRNA gene sequences

### 1.2.2 培养基

改良的 SP2 固体培养基:酵母浸粉 4 g、麦芽浸粉 10 g、葡萄糖 4 g、自来水 500 mL、陈海水 500 mL、琼脂 20 g,pH 7.3。

改良型 A1 液体培养基:可溶性淀粉 1 g,酵母

浸粉 0.4 g、蛋白胨 0.2 g、树脂 XAD-16 2 g、自来水 50 mL、陈海水 50 mL,pH 7.2。

### 1.2.3 发酵和提取

将菌株由斜面接种到平板上,在 28  $^\circ\text{C}$  恒温环境下培养 7 d,有大量红色色素出现。将产红色色

素多的菌丝体接种于 500 mL 三角锥瓶中(装有 150 mL 改良 A1 培养液),置于 28 °C、180 r/min 摇床上,培养 10 d,获得发酵液 50 L。发酵液经微孔滤膜,将菌丝体连同树脂与发酵液分离开来。在发酵液中加入少量树脂,吸附剩余次级代谢产物,过夜再次过滤。合并菌丝体和树脂,用丙酮溶液进行提取 3 次。将合并的丙酮溶液减压浓缩,共得到发酵粗提物 90 g。

### 1.3 天然产物的分离和纯化

溶解粗浸膏,采用减压硅胶柱色谱,以 PE-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 体系进行梯度洗脱(体积分数为:PE→1:1 PE:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→100:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH→50:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH→20:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH→10:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH→5:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH→1:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH→MeOH,每个梯度洗脱 1L),TLC 分析后合并为 6 个组分(Fr. 1~Fr. 6)。其中组分 Fr-2 (4.22 g)经过加压正相硅胶柱色谱,PE-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 体系梯度洗脱(洗

脱梯度同上),TLC 合并为 Fr-2-1~Fr-2-5。组分 Fr-2-4 (100 mg)经 HPLC 制备(体积分数为 85:15:0.15 的 MeOH-H<sub>2</sub>O-TFA 洗脱,流速为 4 mL/min)得到化合物 **3** (15 mg, t<sub>R</sub> 5.2 min)和 **4** (50 mg, t<sub>R</sub> 8.3 min)。组分 Fr-5 (3.67 g)经加压正相硅胶柱色谱,以 PE-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 体系梯度洗脱(洗脱梯度同上),TLC 合并得到组分 Fr-5-1~Fr-5-7。组分 Fr-5-4 (65 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离(体积分数为 1:1 的 CHCl<sub>3</sub>-MeOH 洗脱),得到亚组分 Fr-5-4-1~Fr-5-4-6。Fr-5-4-3 (23 mg)经 HPLC 纯化(体积分数为 70:30:0.15 的 MeOH-H<sub>2</sub>O-TFA 洗脱、流速为 4 mL/min),得到外消旋的 **1/2** (10 mg, t<sub>R</sub> 6.45 min);HPLC 手性分析(CHIRALPAK® IA 5μm,体积分数为 28:72 *i*-PrOH-EtOH 洗脱,流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>)显示其为峰面积 1:1 的 2 个峰(见图 3),进一步 HPLC 手性纯化后得到化合物 **1** (0.42 mg, t<sub>R</sub> 5.9 min)和 **2** (0.47 mg, t<sub>R</sub> 5.3 min)。

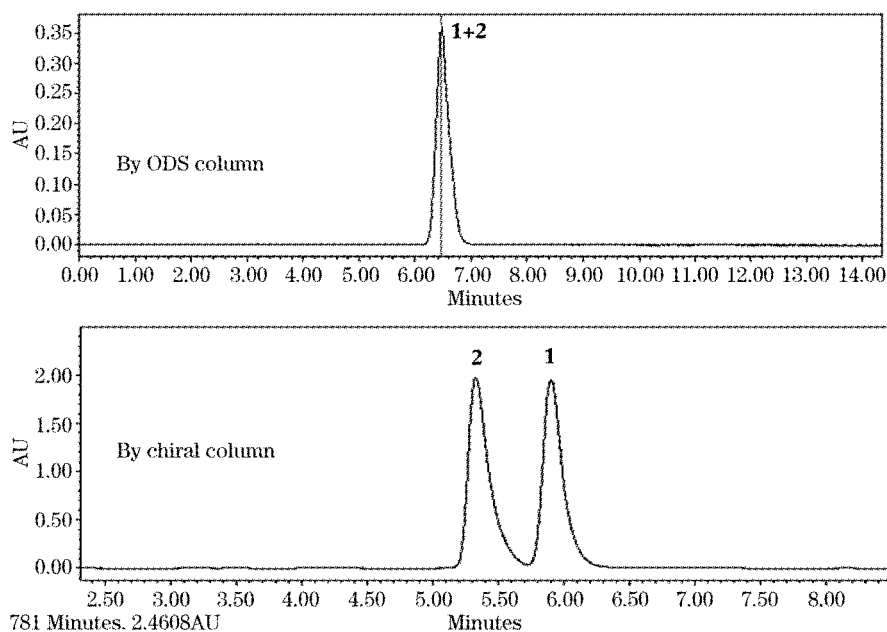


图 3 外消旋化合物 **1/2** 的手性拆分

Fig. 3 The resolution of the racemic **1/2** by chiral column(CHIRALPAK AY, 4.6×250 mm, 1 mL/min)

### 1.4 生物活性测试

#### 1.4.1 细胞毒活性测试

采用 MTT 法<sup>[17-18]</sup>和 CCK-8 法<sup>[19-20]</sup>分别测试化合物 **1~4** 对人肺癌细胞株 A549 和人乳腺癌细胞株 MCF-7 以及人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 的细胞毒活性。

#### 1.4.2 α-糖苷酶抑制活性的测定

采用的以对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)为底物的经典体外酶抑制剂筛选方法,对化合物 **1~4** 的 α-糖苷酶抑制活性进行筛选。PNPG 是麦芽糖的类似物,它经过 α-糖苷酶作用后能够生成显黄色的对硝基苯酚,可直接用于分光光度计的检测<sup>[21-24]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定结果

菌株 OUCMDZ-4112 的 16S rRNA 基因序列的长度为 1448bp (GenBank 登录号: KP981416), 将该菌株的 16S rRNA 基因序列在 EzTaxon 数据库中进行有效种的序列相似性检索, 发现菌株 OUCMDZ-4112 与链霉菌属的菌株高度相关, 与其相似性最高的链霉菌属的有效种为 *Streptomyces anthocyanicus* NBRC14892T、*Streptomyces violaceoruber* NBRC12826T、*Streptomyces tricolor* NBRC15461T 和 *Streptomyces coalescens* DSM40421T, 序列相似性都为 99.72%。在系统发育树中(见图 2), 菌株 OUCMDZ-4112 与最相似的 4 个有效种紧紧聚在一起, 并在同一分支上, 据此可以确定该菌株属于链霉菌属, 但是否为新种, 还有待进一步鉴定。

### 2.2 化合物结构鉴定

化合物 **1** 和 **2** 最初以外消旋体的形式得到, 为白色固体、香草醛-浓硫酸显黄棕色斑点。正离子高分辨质 HRESIMS 在  $m/z$  219.0746 处给出  $[M+Na]^+$  峰, 提示化合物的分子式是  $C_9H_{12}O_3N_2$  (对  $C_9H_{12}N_2O_3Na^+$  的计算值为 219.0740)。红外光谱显示分子中具有氨基 ( $3429\text{ cm}^{-1}$ )、羰基 ( $1651\text{ cm}^{-1}$ )、吡咯环 ( $1598, 1552\text{ cm}^{-1}$ ) 等官能团的特征吸收峰。结合 DEPT 和 HMQC 对化合物的  $^{13}C$  和  $^1H$  NMR 谱进行分析, 发现其存在 1 个共轭的酮羰基信号 ( $\delta_C 186.2$ )、1 个伯酰胺羰基信号 ( $\delta_C 173.5, \delta_H 7.46 \& 7.28$ )、1 个芳香季碳信号 ( $\delta_C 131.9$ )、3 个芳香次甲基信号 ( $\delta_{C/H} 125.8/7.09, 117.1/6.99, 109.9/6.18$ )、1 个连氧次甲基信号 ( $\delta_{C/H} 78.2/4.07$ )、1 个亚甲基信号 ( $\delta_{C/H} 40.9/3.12 \& 2.88$ )、1 个甲氧基信号 ( $\delta_{C/H} 57.8/3.23$ )、以及 1 个可交换氢信号 ( $\delta_H 11.81$ )。 $^1H-^1H$  COSY 谱中的从 H-6 ( $\delta_H 6.99$ ) 到 H-7 ( $\delta_H 6.18$ )、H-7 到 H-8 ( $\delta_H 7.09$ ) 以及可交换氢 ( $\delta_H 11.81$ ) 与 H-8 的强相关, 表明分子中含有 1 个 2-取代的吡咯环单元(A); HMBC 谱图中 H-8 与 C-6 ( $\delta_C 117.1$ ) 和 C-7 ( $\delta_C 109.9$ )、H-6 与 C-7 和 C-5 ( $\delta_C 131.9$ ) 的相关信号(见图 1)进一步证明了 2-吡咯环片段的在。另外, H-2 ( $\delta_H 4.07$ ) 与 H-3 ( $\delta_H 3.12 \& 2.88$ ) 的  $^1H-^1H$  COSY 相关表明分子中存在 1 个  $AB_2$  自旋偶合系统, 即  $-CH_2-CH-$  片段, 甲氧基质子

( $\delta_H 3.23$ ) 与 C-2 ( $\delta_C 78.2$ ) 的 HMBC 相关进一步将该片段连接为  $-CH_2-CH(OCH_3)-$ ; H-2 和 H-3 与羰基 ( $\delta_{C4} 186.2$  和  $\delta_{C1} 173.5$ ) 以及伯氨基质子 ( $\delta_H 7.46 \& 7.28$ ) 与 C-1 和 C-2 的 HMBC 相关(见图 1), 则表明分子中存在伯酰胺羰基、且伯酰胺羰基和酮羰基分别连在  $-CH-$  和  $-CH_2-$  上, 即存在结构单元 B:  $O=C-CH_2-CH(OCH_3)-CONH_2$ 。尽管 A、B 结构单元之间缺少必要的 HMBC 相关关系, 但酮羰基碳信号明显的高场位移 ( $\delta_C 186.2$ ) 表明其与不饱和基团相连, 为典型的  $\alpha, \beta$ -不饱和羰基, 故鉴定其构造为 2-甲氧基-4-氧亚基-4-(2-吡咯基)丁酰胺(见图 1)。

为了确定该化合物的绝对构型, 测定了其比旋光和 CD, 发现无旋光和 CD, 怀疑其为外消旋体。故对其进行手性分析和拆分, 然后再测旋光和 CD。结果表明其为一对对映体(见图 3)。**1** 为右旋体、**2** 为左旋体。观察化合物 **1** 和 **2** 的 CD 谱图(见图 4 左), 发现它们都表现了典型的激子手性 Cotton 效应, 这个现象是由化合物中的伯酰胺羰基和吡咯羰基 2 个发色团之间激子耦合引起的。利用 HyperChem Release 7.5 软件获得了其 S-构型的最稳定构象(见图 4 右), 该构象中 2 个发色团之间跃迁偶极方向为顺时针排列, 应于长波处产生正的 Cotton 效应<sup>[25]</sup>。测得化合物 **1** 的 CD 曲线在长波  $\lambda_{max}$  310 nm 处呈现正的 Cotton 效应 ( $\Delta\epsilon +0.14$ )、化合物 **2** 在长波  $\lambda_{max}$  312 nm 处呈现负的 CD Cotton 效应 ( $\Delta\epsilon -0.15$ ), 则化合物 **1** 和 **2** 的绝对构型分别为 S-和 R-, 即化合物 **1** 和 **2** 的结构分别鉴定为 S(+)-和 R(-)-2-甲氧基-4-氧亚基-4-(2-吡咯基)丁酰胺。其相关数据如下:

化合物 **1**:  $[\alpha]_D^{20} +11.0$  (c 0.05, MeOH); CD (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 310 (+0.14), 277 (-0.39), 250 (-0.28), 222.5 (+0.67) nm。化合物 **2**:  $[\alpha]_D^{20} -13.7$  (c 0.04, MeOH); CD (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 312 (-0.15), 278 (+0.59), 248.5 (+0.30), 222.5 (-0.69)。UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  ( $\log\epsilon$ ) 280 (2.1), 285 (2.1), 199 (0.5), 192 (0.6) nm。IR (KBr)  $\nu_{max}$  3429, 3169, 2974, 2915, 2831, 1651, 1598, 1552, 1438, 1404, 1338, 1311, 1233, 1124, 1040, 1012, 937, 777, 738, 606, 563  $\text{cm}^{-1}$ 。 $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  11.81 (1H, s, NH), 7.46 (1H,

s, NH<sub>2a</sub>), 7.28 (1H, s, NH<sub>2b</sub>), 7.09 (1H, s, H-8), 6.99 (1H, s, H-6), 6.18 (1H, s, H-7), 4.07 (1H, dd,  $J = 9.1, 3.3$  Hz, H-2), 3.23 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.12 (1H, dd,  $J = 15.8, 9.2$  Hz, H<sub>2</sub>-3a), 2.88 (1H, dd,  $J = 15.8, 3.3$  Hz, H<sub>2</sub>-3b); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> 186.2 (C, C-

4), 173.5 (C, C-1), 131.9 (C, C-5), 125.8 (CH, C-8), 117.1 (CH, C-6), 109.9 (CH, C-7), 78.2 (CH, C-2), 57.8 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>), 40.9 (CH<sub>2</sub>, C-3)。HRESIMS  $m/z$  219.0746 [M + Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 219.0740。

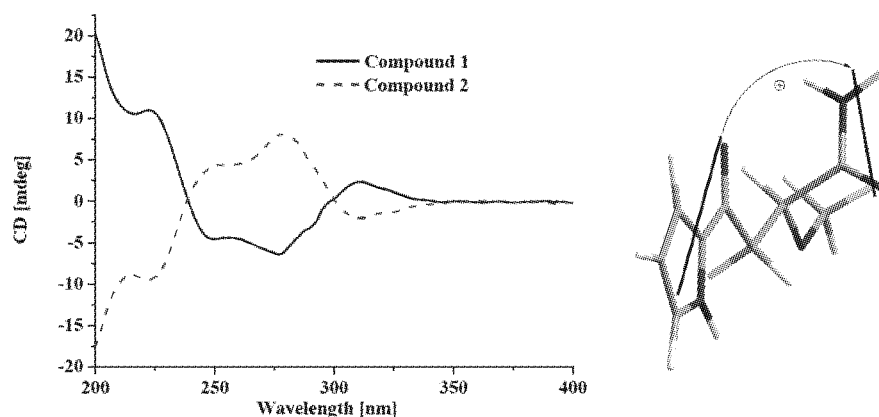


图4 化合物1和2的CD(左)和激子手性确定1的绝对构型(右)

Fig. 4 CD curve of compounds 1 and 2 (left) and the absolute configuration of 1 by CD exciton method (right)

化合物3:紫红色粉末,  $[\alpha]_D^{20} -81.1255$  ( $c$  0.20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。香草醛-浓硫酸显墨绿色斑点。正离子低分辨质谱ESI-MS在  $m/z$  392.0处给出[M + H]<sup>+</sup>峰,提示其分子量为391,结合<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C NMR谱推测该化合物3的分子式为C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O。紫外吸收光谱显示化合物3的在λ<sub>max</sub>517 nm处有强吸收,且其在酸性溶液中显紫红色、在碱性溶液中显橙黄色。根据化合物3的理化性质和紫外特征吸收,通过文献[7-12],推测化合物3是PGs。其<sup>13</sup>C NMR谱的低场区显示13个信号峰(δ<sub>C</sub> 165.9、154.3、151.0、147.9、127.6、125.5、122.2、120.8、117.5、117.2、112.7、111.9、93.4)及1个甲氧基信号(δ<sub>C</sub> 58.8);其<sup>1</sup>H NMR谱在低场区显示6个芳香氢信号(δ<sub>H</sub> 7.23、7.14、6.92、6.53、6.35、6.12)和2个可交换氢信号(δ<sub>H</sub> 12.62和11.99)、以及1个甲氧基信号(δ<sub>H</sub> 4.0);这些即为典型的PGs中连甲氧基的三吡咯环基本骨架的NMR信号。高场区的<sup>13</sup>C和<sup>1</sup>H NMR信号复杂,但δ<sub>H</sub> -1.57氢信号为与吡咯环桥连的脂肪环的特征信号;对其仔细解析并与文献比对,发现其波谱数据与streptorubin B相符<sup>[7]</sup>,故鉴定化合物3为streptorubin B。其NMR数据为:<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.62 (1H, s, H-1'), 11.99 (1H, brs, H-1''), 7.23 (1H, s, H-5''), 7.14

(1H, s, H-2a), 6.92 (1H, s, H-3'), 6.53 (1H, s, H-4), 6.35 (1H, s, H-4'), 6.12 (1H, s, H-4'), 4.03 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.18 (1H, m, H<sub>2</sub>-6a), 3.10 (1H, s, H-12), 2.53 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, H<sub>2</sub>-6b), 1.96~1.82 (2H, m, H<sub>2</sub>-7a/H<sub>2</sub>-9a), 1.88~1.56 (1H, m, H<sub>2</sub>-11a), 1.82~1.67 (2H, m, H<sub>2</sub>-8a/H<sub>2</sub>-13a), 1.67~1.47 (3H, m, H<sub>2</sub>-10a/H<sub>2</sub>-11b/H<sub>2</sub>-13b), 1.47~1.33 (3H, H<sub>2</sub>-7b/H<sub>2</sub>-14), 1.33~1.21 (2H, H<sub>2</sub>-15), 1.04~0.88 (1H, 10-H<sub>B</sub>), 0.92 (3H, t,  $J = 9.5$  Hz, H<sub>3</sub>-16), 0.84~0.73 (1H, m, H<sub>2</sub>-8b), 1.57 (1H, s, H<sub>2</sub>-9b); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.9 (C, C-3'), 154.3 (C, C-5), 151.0 (C, C-3), 147.9 (C, C-5'), 127.6 (CH, C-5'), 125.5 (C, C-2), 122.2 (C, C-2''), 120.8 (C, C-2'), 117.5 (CH, C-4), 117.2 (CH, C-3''), 112.7 (CH, C-2a), 111.9 (CH, C-4'), 93.4 (CH, C-4'), 58.8 (CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>), 38.9 (CH<sub>2</sub>, C-13), 37.5 (CH, C-12), 31.7 (CH<sub>2</sub>, C-7), 31.2 (CH<sub>2</sub>, C-11), 30.6 (CH<sub>2</sub>, C-14), 30.0 (CH<sub>2</sub>, C-6) 29.2 (CH<sub>2</sub>, C-8), 27.8 (CH<sub>2</sub>, C-9), 25.6 (CH<sub>2</sub>, C-10), 23.1 (CH<sub>2</sub>, C-15), 14.3 (CH<sub>3</sub>, C-16)。UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log $\epsilon$ ) 517 (2.1), 507 (2.2), 501 (2.1), 472 (2.1) nm。

化合物 **4**: 红色粉末, 香草醛-浓硫酸显墨绿色斑点。正离子低分辨质谱 ESI-MS 在  $m/z$  394.3 处给出  $[M + H]^+$  峰, 提示其分子量为 393, 结合  $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$  谱推测该化合物 **4** 的分子式为  $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}$ 。其理化性质和紫外吸收与化合物 **3** 相似, 提示化合物 **4** 也是 PGs, 但比化合物 **3** 多 2 个氢原子, 可能为化合物 **3** 的开环产物。仔细比较发现, 化合物 **4** 和 **3** 的 1D NMR 很相似, 不同之处在于少了 1 个芳香季碳和 1 个高场的次甲基信号, 却多了 1 个芳香次甲基和 1 个高场的亚甲基信号, 提示化合物 **3** 中的十员脂环开环成为化合物 **4** 中的脂肪链。文献调查表明, 化合物 **4** 的  $[\alpha]^{20\text{D}} - 546.4$  (c 0.48,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 和 NMR 数据与文献报道的 undecylprodigiosin 相符<sup>[11]</sup>, 故鉴定化合物 **4** 为 undecylprodigiosin。其 NMR 数据为:  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.79 (1H, brs, H-1'), 12.08 (1H, brs, H-1''), 7.23 (1H, s, H-5'), 7.00 (1H, s, H-2a), 6.97 (1H, s, H-3''), 6.85 (1H, s, H-4), 6.37 (1H, s, H-4''), 6.21 (1H, s, H-3), 6.10 (1H, s, H-4'), 4.01 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 2.79 (2H, m,  $\text{H}_2-6$ ), 1.72~1.19 (18H, m,  $\text{H}_2-7\sim\text{H}_2-15$ ), 0.87 (3H, t,  $J=7.1$  Hz,  $\text{H}_3-16$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.7 (C, C-3'), 152.8 (C, C-5), 149.7 (C, C-5'), 130.0 (CH, C-5''), 128.6 (C, C-2), 126.6 (C,

C-2''), 122.0 (C, C-2'), 121.9 (CH, C-3), 118.8 (CH, C-4), 116.6 (CH, C-3''), 112.7 (CH, C-2a), 112.3 (CH, C-4''), 93.7 (CH, C-4'), 58.9 (CH<sub>3</sub>,  $-\text{OCH}_3$ ), 32.1 (CH<sub>2</sub>, C-7), 29.8 (CH<sub>2</sub>, C-6), 29.7~28.4 ( $7\times\text{CH}_2$ , C-8~C-14), 22.8 (CH<sub>2</sub>, C-15), 14.3 (CH<sub>3</sub>, C-16)。UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log $\epsilon$ ) 491 (2.2), 488 (2.2), 475 (2.2), 473 (2.2) nm。

### 2.3 化合物 1 和 2 的生物合成途径推导

已阐明 undecylprodigiosin (**4**) 是 4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxaldehyde (MBC) 和 2-undecylpyrrole 的生物缩合产物, 其中 MBC 来自脯氨酸(proline)、丙二酰辅酶 A 和丝氨酸(serine)之间的缩合与氧化脱羧, 而 2-undecylpyrrole 则来自乙酰辅酶 A 及其与甘氨酸(glycine)之间的缩合与氧化脱羧, undecylprodigiosin (**4**) 开环得到 streptorubin B (**3**)<sup>[26-27]</sup>。在 MBC 生物合成中, 可能存在 1 个关键中间体 **1a**, 其 1-羰基与氨基发生亲核加成、脱水以及 3-羰基烯醇化生成 4-hydroxy-2,2'-bipyrrole-5-methanol (HBM), HBM 经甲基化和氧化得到 MBC。**1a** 可进一步氧化、脱羧生成另一个中间体 **1b**, **1b** 的 3-羰基还原甲基化即生成新化合物 **1** 和 **2** (见图 5)。故化合物 **1** 和 **2** 的分离鉴定, 进一步证实了 PGs 的生物合成途径。

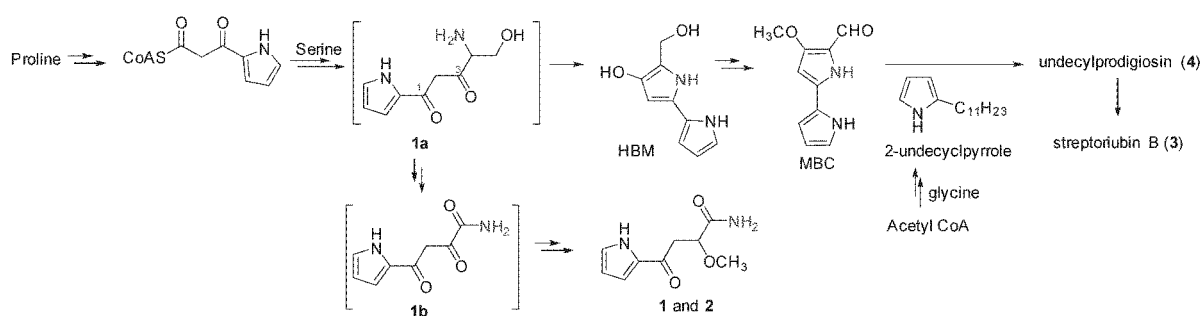


图 5 化合物 1~4 生物合成途径推导

Fig. 5 The Postulated biosynthetic pathway of compounds 1~4

## 2.4 生物活性结果

### 2.4.1 细胞毒活性

结果表明, 化合物 **3** 和 **4** 均对 K562 细胞有强的抑制活性,  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.60  $\mu\text{mol/L}$  和 0.01  $\mu\text{mol/L}$  (阿霉素 adriamycin 的  $\text{IC}_{50}$  0.43  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。化合物 **3** 和 **4** 同时对 A549 和 MCF-7 细胞

也表现了强细胞毒活性(见表 1), 与文献报道一致<sup>[28-29]</sup>; 但化合物 **1** 和 **2** 对 A549 和 MCF-7 没有细胞毒活性。这是本文首次评价了化合物 **3** 和 **4** 对人白血病细胞株 K562 的细胞毒活性。

### 2.4.2 $\alpha$ -糖苷酶抑制活性

结果表明, 外消旋的 **1/2** 具有较弱的  $\alpha$ -糖苷

酶抑制活性,  $IC_{50}$  为 2.61 mmol/L; 化合物 **4** 表现了与阿卡波糖(acarbose)相当的  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性, 其与阿卡波糖的  $IC_{50}$  分别为 0.92 mmol/L 和

1.12 mmol/L; 化合物 **3** 的  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性最强,  $IC_{50}$  为 0.082 mmol/L, 表明脂肪环的存在有利于增强 PGs 的  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性。

表 1 化合物 1~4 对 MCF-7、A549 和 K562 的细胞毒活性

Table 1 Cytotoxicity of compounds 1~4 against MCF-7, A549 and K562 cell lines

化合物 Compound	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率 inhibition/%		$IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
		MCF-7 <sup>a</sup>	A549 <sup>a</sup>	
1	10	24.0	5.0	NT
2	10	23.7	-2.5	NT
3	10	77.5	78.2	0.60
4	10	79.4	78.1	0.01
adriamycin	1	68.4	77.5	0.43

<sup>a</sup>MTT; <sup>b</sup>CCK-8; NT=not test.

### 3 结论

本文获得了 1 对互为对映体的新吡咯生物碱 (**1**、**2**) 以及 2 个具有强肿瘤细胞毒活性的 PGs: streptoriubin B (**3**) 和 undecylprodigiosin (**4**), 并首次报道了 PGs **3** 和 **4** 对人白血病细胞 K562 及其对  $\alpha$ -糖苷酶的抑制活性。本文还首次分离鉴定了 PGs 生物合成途径中的中间产物 **1** 和 **2**, 进一步验证了文献中对 PGs 的生物合成解析, 且外消旋的 **1/2** 具有较弱  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性 ( $IC_{50}$  为 2.61 mmol/L)。

### 参考文献

- [1] Blunt J W., Copp B R., Keyzers R A, et al. Marine natural products[J]. Nat Prod Rep, 2015, 32(2): 116-211.
- [2] Danielle S. Deep-sea natural products[J]. Nat Prod Rep, 2008, 25(6): 1131-1166.
- [3] 赵成英, 朱统汉, 朱伟明. 2010~2013 之海洋微生物新天然产物[J]. 有机化学, 2013, 33(6): 1195-1234.
- [4] Subramani R, Aalbersberg W. Culturable rare actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(21): 9291-9321.
- [5] Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, et al. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives [J]. Microbiol Res, 2013, 168(6): 311-332.
- [6] Furstner A. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids; a survey of the last 2500 years[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2003, 42(31): 3582-3603.
- [7] Papireddy K, Smilkstein M, Kelly J X, et al. Antimalarial activity of natural and synthetic prodiginines [J]. J Med Chem, 2011, 54(15): 5296-5306.
- [8] Bennett J W. Seeing red: the story of prodigiosin[J]. Adv Appl Microbiol, 2000, 47: 1-32.
- [9] Laatsch H, Kellner M, Weyland H. Butyl-meta-cycloheptyl-prodiginine - a revision of the structure of the former ortho-isomer[J]. J. Antibiot, 1991, 44(2): 187-191.
- [10] Wasserman H H, Keith D D, Rodgers G C. The structure of metacycloprodigiosin[J]. Tetrahedron, 1976, 32(15): 1855-1861.
- [11] Jolicoeur B, Lubell W D. Prodigiosin synthesis with electron rich 2, 2'-bipyrroles[J]. Can J Chem, 2008, 86(3): 213-218.
- [12] Feher D, Barlow R S, Lorenzo P S, et al. A 2-substituted prodiginine, 2-(p-hydroxybenzyl)prodigiosin, from Pseudoalteromonas rubra[J]. J Nat Prod, 2008, 71(11): 1970-1972.
- [13] Fu P, Zhuang Y, Wang Y, et al. New indolocarbazoles from a mutant strain of the marine-derived actinomycete Streptomyces fradiae 007M135 [J]. Org Lett, 2012, 14(24): 6194-6197.
- [14] Fu P, Yang C, Wang Y, et al. Streptocarbazoles A and B, two novel indolocarbazoles from the marine-derived actinomycete strain Streptomyces sp. FMA [J]. Org Lett, 2012, 14(9): 2422-2425.
- [15] Wang P, Xi L, Liu P, et al. Diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete Streptomyces sp. FXJ7.328 [J]. Mar Drugs, 2013, 11(4): 1035-1049.
- [16] Peng F, Kong F D, Wang Y F, et al. Antibiotic Metabolites from the Coral-Associated Actinomycete Streptomyces sp. OUCMDZ-1703 [J]. Chin J Chem, 2013, 31(1): 100-104.
- [17] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [18] Foongladda S, Roengsanthia D, Arjattanakool W, et al.



- Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2002, 6(12): 1118-1122.
- [19] Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay [J]. *Anal Commun*, 1999, 36(2): 47-50.
- [20] 熊建文, 张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J]. *激光生物学报*, 2007, 16(5): 559-562.
- [21] Gloria Y Y, Ted J K, David M E, et al. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(4): 1277-1294.
- [22] Van de Laar F A, Lucassen P L, Akkermans R P, et al. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005, (2): CD003639.
- [23] 吴酬飞, 李燕萍.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型的研究进展[J]. *际药学研究杂志*, 2008, 35(1): 9-12.
- [24] 刘立超, 吕点点, 李先磊. 高通量筛选在中药研究中的应用[J]. *畜牧与饲料科学*, 2009, 30(4): 19.
- [25] Berova N, Ellesta G A, Harada N. Characterization by circular dichroism spectroscopy[J]. Elsevier Ltd, 2010; 92-142.
- [26] Williamson N R, Simonsen H T, Ahmed R A A, et al. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*; identification of a novel 2-methyl-3-n-amylypyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Mol Microbiol*, 2005, 56(4): 971-989.
- [27] Williamson N R, Fineran P C, Leeper F J, et al. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines[J]. *Microbiol*, 2006, 4(12): 887-899.
- [28] Liu R, Cui C B, Duan L, et al. Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(12): 1341-1344.
- [29] Ho T F, Ma C J, Lu C H, et al. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 225(3): 318-328.