

· 研究报告 ·

棘刺锚参抗肿瘤因子的纯化及其抗肿瘤作用^{△*}

沈先荣*, 栾洁, 蒋定文, 陈伟, 刘李娜, 贾福星

(海军医学研究所, 上海 200433)

摘要:目的 纯化棘刺锚参抗肿瘤因子(*Protankyra bidentata* Antitumor Factor, PBATF), 并探讨其抗肿瘤活性。方法 棘刺锚参为原料, 采用盐溶液抽提, 硫酸胺分级沉淀, DEAE-Sephacryl S-300 分子筛层析, ZORBAX GF-250HPLC 层析, 得到 PBATF。采用 SDS-PAGE 电泳和 HPLC 鉴定其纯度。采用 MTT 方法测定 PBATF 对肿瘤细胞生长的影响, 克隆形成实验测定对肿瘤细胞集落形成的影响。采用荷瘤小鼠试验测定 PBATF 对体内肿瘤生长的影响。结果 从棘刺锚参纯化获得 PBATF, 达到较高纯度。PBATF 对 7901 人胃癌细胞、Hela 细胞、NCI 非小细胞肺癌细胞均具有显著的生长抑制效应, 而对 929 小鼠成纤维细胞和小牛主动脉血管内皮细胞只在高浓度时有抑制作用。PBATF 对 Hela 细胞的集落形成与生长具有明显的抑制作用, 试验浓度时对皮肤成纤维细胞的集落形成无明显影响。PBATF 对小鼠 Lewis 肺癌有明显的疗效, 结论 获得了高纯度的 PBATF, 能够显著抑制体内外肿瘤生长。5 mg · kg⁻¹ 剂量具有 56.89% 的抑瘤率, 1 mg · kg⁻¹ 剂量的抑瘤率为 52.00%, 0.5 mg · kg⁻¹ 剂量的抑瘤率为 33.61%。

关键词: 海参; 纯化; 抗肿瘤; 肿瘤细胞

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1002-3461(2013)01-001-06

棘皮动物全部生活在海洋中, 动物个体一般较大, 数量也较多, 是研究海洋药物良好的资源之一。尤其对海参, 国内外研究工作做的较多, 大都集中在海参纲中的盾手目、枝手目和芋参目, 而对于无足目的锚参, 则很少对其药用价值进行开发和利用。作者采用生化分离技术制备获得了锚参抗肿瘤因子, 并进行了纯化, 在细胞水平和动物水平观察了其抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Tris, SDS, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), Sigma 公司; 胰蛋白酶 1:250, Difco 进口分装; RPMI-1640 培养基, Scientific 公司; 小牛血清, 胎牛血清, 上海华美生物工程公司; DEAE-Sephacryl S-300, Amersham Pharmacia Biotech 公司; Zorbax Eclipse XDB-C8, ZORBAX GF-250 HPLC 柱, Agilent 公司。C57BL/6 小鼠, 上海医

药工业研究院, 合格证号: 沪动合证字第 107 号; 小鼠 Lewis 肺癌, 上海医药工业研究院; Hela 细胞, 929 成纤维细胞, 7901 细胞, NCI 细胞, 中科院细胞所细胞库; BaEC 细胞, 本实验室原代培养。棘刺锚参原料购自浙江温州地区, 由上海海洋大学鉴定。

1.2 方法

1.2.1 棘刺锚参抗肿瘤因子的制备与鉴定

取洗净的新鲜冷冻的海洋锚参, 用含 1 mol · L⁻¹ NaCl 的 10 mmol · L⁻¹ PB 缓冲溶液抽提 24 h, 8000 r/min 高速冷冻离心 (4℃), 上清液用 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀, 将饱和度 40%~60% 的沉淀组分进行 DEAE-Sephacryl S-300 分子筛层析, 用含 0~1 mol · L⁻¹ NaCl 的 10 mmol · L⁻¹ PB 缓冲液进行线性梯度洗脱, 收集 0.45 mol · L⁻¹~0.65 mol · L⁻¹ NaCl 梯度活性组分, 进行 Sephacryl S-300 分子筛层析, 用含 3 mmol · L⁻¹ EDTA 的 10 mmol · L⁻¹ PB 缓冲液洗脱, 收集活

* [△]基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471972) 资助

作者简介: 沈先荣 (1965-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为海洋生物药物。Tel: 021-51667111; e-mail: xianrong_sh@yahoo.com

收稿日期: 2012-11-18

性峰,浓缩后组分进行 HPLC 层析(ZORBAX GF-250, 9.4×250 mm, 4-Micron),收集活性峰,冻干后得到白色粉末即为 PBATF。用 12%的 SDS-PAGE 电泳和反相 HPLC 分析鉴定其纯度,用紫外可见分光光度计进行全波长扫描测定其最大吸收峰。

1.2.2 PBATF 对肿瘤细胞生长抑制的测定

采用 MTT 测定法^[1],选择人胃癌细胞 7901、人子宫颈癌细胞 HeLa 和人非小细胞肺癌细胞 NCI 为研究对象,小鼠皮肤成纤维细胞 929 和小牛主动脉血管内皮细胞(BaEC)为对照。所有细胞选择对数生长期细胞,将 $2 \times 10^3/200 \mu\text{L}$ 细胞加入 96 孔细胞培养板,在 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 12 h,按终浓度分别为 0、10、20、40、80、160 和 $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 PBATF,在相同条件下继续培养 48 h,倒去培养板内培养液,每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 以 RPMI-1640 培养基配置 MTT 溶液($0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),继续培养 4 h,倾去培养液,每孔加入 DM-SO $200 \mu\text{L}$,室温振荡 20 min,用酶标仪在波长 570 nm 处测定吸收值。实验重复 3 次,每次 3~8 个平行样品。对结果进行 t 检验,统计分析各处理组差异。

1.2.3 PBATF 对体外培养的肿瘤细胞集落形成的抑制效应

选择人子宫颈癌细胞 HeLa 为研究对象,小鼠皮肤成纤维细胞 929 为对照。选择对数生长期细胞,将 $100/3000 \mu\text{L}$ 细胞加入 6 孔细胞培养板,在 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 12 h,按终浓度分别为 0、80 和 $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 PBATF,在相同条件下继续培养 7 d,倒去培养液后加甲醇固定,瑞氏色素染色,计数克隆数,照相记录结果。

1.2.4 PBATF 抑制小鼠肿瘤生长的测定^[2]

C57BL/6 种小鼠 60 只,18~20 g,随机分为 5、1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PBATF 组、阳性对照组和阴性对照组。阴性对照组 20 只,其余每组 10 只。阴性对照组给以予试验组等体积的生理盐水;阳性对照环磷酰胺(CITX)的剂量为 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。腹腔注射给药,每天 1 次,连续 8 d。小鼠 Lewis 肺癌模型采用腋皮下接种肿瘤的方法,3 周左右处死动物,剖取肿瘤称重,按下列公式计算肿瘤抑制率:

肿瘤抑制率% = $[(\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重}] \times 100\%$ 。

本实验重复 3 次。

2 结果

2.1 棘刺锚参抗肿瘤因子的制备

新鲜冷冻的棘刺锚参,盐抽提后, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀,饱和度 40%~60%的组分进行 DEAE-Sephacryl CL-6B 层析, Sephacryl S-300 层析, HPLC 层析(ZORBAX GF-250, 9.4×250 mm, 4-Micron), HPLC 层析洗脱液为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 20°C ,在 41.8 min 时获得 1 个活性峰,峰面积占 95.84%,说明达到较高纯度,收集该活性峰,冻干后得到 PBATF。

2.2 PBATF 的 SDS-PAGE 电泳鉴定

结果如图 1 所示。PBATF 染色显示 1 条带,说明达到电泳纯,根据分子量标准蛋白计算 PBATF 的相对分子量约为 3.3 kD。

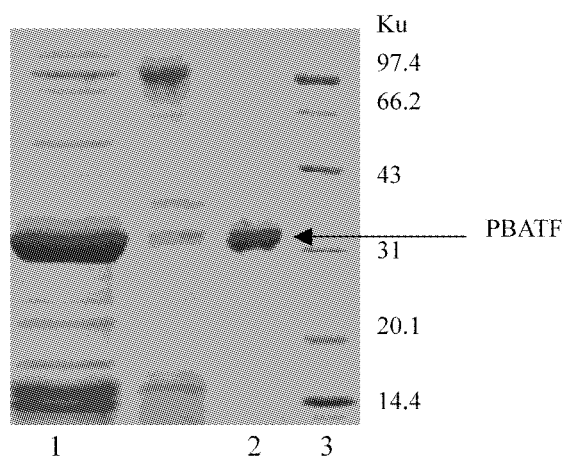


图 1 PBATF 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of PBATF

1 锚参提取液经过 DEAE-Sephacryl CL-6B 离子交换层析获得的活性组分,2 经过 HPLC GF-250 柱层析获得的活性组分 PBATF,3 分子量标准蛋白。

1 components of *Protankyra bidentata* extract purified with DEAE-Sephacryl CL-6B chromatography, 2 PBATF purified with GF-250 column HPLC, 3 Marker.

2.3 PBATF 的 HPLC 分析

PBATF 用水溶解 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,用反相 HPLC 鉴定其纯度。ZORBAX Eclipse CDB-C8 柱, $4.6 \times 150 \text{ mm}$, 5-Micron。洗脱液为含 0.02% NaN_3 , $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的水溶液, pH 7.2, 0~60%的乙腈梯度,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 20°C ,检测波长 280 nm。结果如图 2 所示,

PBATF 有一明显的吸收峰,说明达到较高纯度。

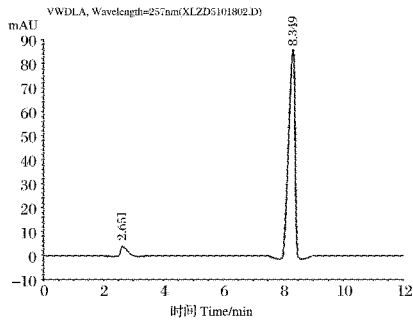


图 2 PBATF 的反相 HPLC 柱分析

Fig. 2 Reverse high performance liquid chromatography on ZORBAX Eclipse CDB-C8 column of PBATF.

2.4 PBATF 的吸收光谱分析

PBATF 用 H_2O 配置成 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,用紫外可见分光光度计进行全波长扫描,结果显示在 280 nm 处有最大吸收峰。

2.5 PBATF 对体外培养的肿瘤细胞生长的抑制效应

结果如表 1 所示, PBATF 对人胃癌细胞 7901、人宫颈癌细胞 HeLa 和人非小细胞肺癌细胞 NCI 均具有显著的生长抑制效应,而对正常细胞小鼠成纤维细胞 929 和小牛主动脉血管内皮细胞 BaEC 只在高浓度时有抑制作用,在低浓度时无明显影响。

表 1 PBATF 对肿瘤细胞生长的抑制效应 ($n=5, \chi \pm S$)

Table 1 The inhibitory effect of PBATF on the growth of tumor cells

浓度 Concentration $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	A570 nm				
	7901	HeLa	NCI	929	BaEC
320	$0.009 \pm 0.002^{**}$	$0.008 \pm 0.006^{**}$	$0.033 \pm 0.001^{**}$	$0.093 \pm 0.021^{**}$	$0.283 \pm 0.091^{**}$
160	$0.041 \pm 0.009^{**}$	$0.433 \pm 0.031^{**}$	$0.109 \pm 0.072^{**}$	$0.409 \pm 0.087^{**}$	$0.769 \pm 0.084^{**}$
80	$0.589 \pm 0.095^{**}$	$0.561 \pm 0.093^{**}$	$0.284 \pm 0.073^{**}$	$1.265 \pm 0.234^{*}$	1.295 ± 0.143
40	$0.873 \pm 0.089^{**}$	$0.989 \pm 0.132^{**}$	$0.590 \pm 0.041^{**}$	1.450 ± 0.211	1.500 ± 0.111
20	$1.098 \pm 0.120^{*}$	$1.316 \pm 0.089^{*}$	$0.892 \pm 0.077^{**}$	1.609 ± 0.307	1.623 ± 0.207
10	1.400 ± 0.237	1.334 ± 0.225	$1.059 \pm 0.129^{*}$	1.859 ± 0.215	1.559 ± 0.115
0	1.886 ± 0.136	1.675 ± 0.137	1.640 ± 0.128	1.989 ± 0.221	1.231 ± 0.088

注:与浓度为 0 的对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同。

Comparing with the control group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.6 PBATF 对体外培养的肿瘤细胞集落形成的抑制效应

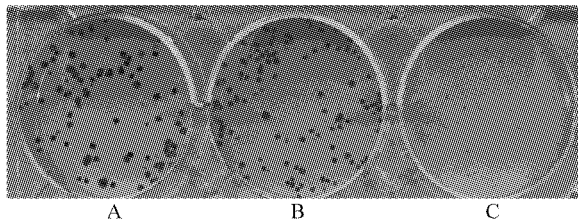


图 3 PBATF 对体外小鼠 929 细胞集落形成的抑制作用
注:PBATF 浓度 A $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; B $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;
C $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Fig. 3 The inhibitory effect of PBATF on the colony formation of mouse 929 cell line.
A the control, B $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PBATF,
C $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PBATF.

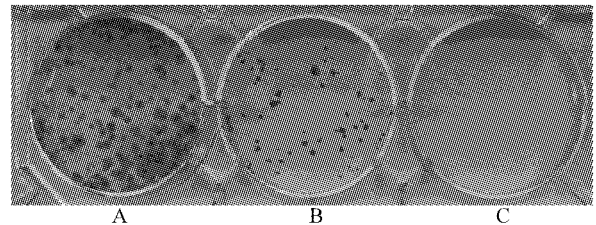


图 4 PBATF 对体外 HeLa 细胞集落形成的抑制效应
注:PBATF 浓度 A $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; B $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;
C $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Fig. 4 The inhibitory effects of PBATF on the colony formation of HeLa cell line.
A the control, B $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PBATF,
C $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PBATF.

如图 3,4 所示。PBATF 对 HeLa 细胞的集落形成与生长具有明显的抑制作用,高浓度 $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时无可见的集落形成,低浓度 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时集落形成数量与集落大小显著减少。而对小鼠 929 细胞,高浓度 $320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可见许多集落形成,但集落很小,低浓度 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时集落形成数量与集落大小与对照组比较无明显变

化。提示 PBATF 对肿瘤细胞的集落形成与生长均有非常显著的抑制作用,对皮肤成纤维细胞的集落形成无明显影响,但高浓度时抑制其集落的生长。

2.7 PBATF 对小鼠 Lewis 肺癌生长的抑制效应
PBATF 体内对小鼠 Lewis 肺癌腋下接种模型的疗效结果(3 次试验)见表 2~4。

表 2 PBATF 对小鼠 Lewis 肺癌疗效之一($\chi \pm S$)

Table 2 The inhibitory effect of PBATF on Lewis lung tumor implanted on mouse (the first experiment)

组别 Group/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数 始/末 Animals start/end	体质量/g 始/末 Body weight start/end	瘤重/g Tumor weight	抑制率/% Inhibitory rate
5 PBATF	10/10	20.2/24.8	$1.25 \pm 0.24^{* *}$	48.77
1 PBATF	10/10	20.1/25.1	$1.36 \pm 0.21^{*}$	44.26
0.5 PBATF	10/10	20.3/25.2	1.62 ± 0.22	33.61
30 CTX	10/10	20.4/20.1	$0.33 \pm 0.11^{* *}$	86.48
The control	20/20	20.5/25.2	2.44 ± 0.27	—

与对照组相比, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, 下表同。

Comparing with the control group * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

表 3 PBATF 对小鼠 Lewis 肺癌疗效之二($\chi \pm S$)

Table 3 The inhibitory effect of PBATF on Lewis lung tumor implanted on mouse (the second experiment)

组别 Group/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数 始/末 Animals start/end	体质量/g 始/末 Body weight start/end	瘤重/g Tumor weight	抑制率/% Inhibitory rate
5 PBATF	10/10	19.5/24.7	$1.39 \pm 0.23^{* *}$	48.13
1 PBATF	10/10	19.6/24.6	$1.45 \pm 0.31^{* *}$	45.89
0.5 PBATF	10/10	19.4/24.2	$1.91 \pm 0.33^{*}$	28.73
30 CTX	10/10	19.4/20.3	$0.38 \pm 0.22^{* *}$	85.82
The control	20/20	19.5/24.4	2.68 ± 0.47	—

表 4 PBATF 对小鼠 Lewis 肺癌疗效之三($\chi \pm S$)

Table 4 The inhibitory effect of PBATF on Lewis lung tumor implanted on mouse (the third experiment)

组别 Group/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数 始/末 Animals start/end	体质量/g 始/末 Body weight start/end	瘤重/g Tumor weight	抑制率/% Inhibitory rate
5 PBATF	10/10	19.5/25.1	$0.97 \pm 0.24^{* *}$	56.89
1 PBATF	10/10	19.4/25.2	$1.08 \pm 0.23^{* *}$	52.00
0.5 PBATF	10/10	19.7/24.8	$1.53 \pm 0.38^{*}$	32.00
30 CTX	10/10	19.6/22.8	$0.38 \pm 0.12^{* *}$	83.11
The control	20/20	19.7/25.2	2.25 ± 0.29	—

3 讨论

近半个世纪以来,国内外运用现代科技手段对海参进行了广泛而深入的研究。海参体壁是海参主要药(食)用部位,主要由上皮和真皮结缔组织间充填的胶原等纤维成分和蛋白聚糖,以及其它糖蛋白等细胞外基质组成。海参蛋白以胶原蛋白为主,可与传统中药的补胶如:阿胶、龟板胶、鳖甲胶、鹿角胶在成分与作用上相媲美。从海参上皮组织分离获得的由亮氨酸、脯氨酸、丝氨酸、精氨酸等氨基酸构成的 5 肽,相对分子质量为 568.1,具有显著的抗肿瘤和抗炎活性。海参多糖是体壁中另一类重要成分,约占海参总有机物的 6% 以上。早在 60 年代,国外有人发现用海参治疗皮肤癌,疗效可达 50%~60%。2003 年苏秀榕报道海参粗多糖具有明显的抗肿瘤活性,其抑瘤率为 73.56%^[3]。2005 年闫冰等从糙海参分离鉴定了 5 个三萜皂苷化合物,药理研究表明均具有显著肿瘤细胞毒性^[4]。

近 20 年来,国内外对海参多糖进行了多种药效试验^[5-8],证明(1)其抑制多种实验动物肿瘤生长,对 MA-737 乳腺癌和 T795 肺癌生长抑制率达 79%和 60%以上。同时还能抑制 MA-737 乳腺癌的人工转移和 Lewis 肺癌的自然转移;(2)海参多糖可提高机体免疫功能^[9];(3)海参多糖可抑制新生血管形成,包括移植性肿瘤诱发的新生血管生成。但是上述研究工作国内外学者都集中在海参纲中的盾手目、枝手目和芋参目,而对于无足目的锚参,则几乎没有涉及对其药用价值的研究。

棘刺锚参含丰富的蛋白质,味极鲜美,性咸寒,有滋阴降火、补虚清肺、降血压、消肿止痛、防癌等功效,有较高药用和食疗价值。我国多种本草记载棘刺锚参可用于疔疮毒肿,具有消肿止痛、

敛疮生肌等功效。现代医学研究表明棘刺锚参中含有丰富的多种蛋白水解酶,具有多种生物活性。棘刺锚参的抗肿瘤活性成分的相关研究,国内外未见报道。本文结果表明,PBATF 抗肿瘤效果非常明显,能够非常显著抑制肿瘤细胞的生长,显著抑制肿瘤细胞的集落形成,非常显著抑制体内肿瘤的生长。PBATF 提取得率较高(约千分之一),具有较高的开发价值,有望成为新型抗肿瘤药物。

参考文献

- [1] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immuno Met*, 1983, 65:55.
- [2] 王衡文,程立. 实验肿瘤学基础[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992:296.
- [3] 苏秀榕,姜永江,常亚青,等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究[J]. *营养学报*, 2003, 25(2):18.
- [4] 闫冰,李玲,易杨华,等. 糙海参中三萜皂苷活性成分的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26(6):626.
- [5] 马天舒,葛迎春. 海参活性物质的药理研究进展[J]. *特产研究*, 2003, (1):57.
- [6] Maier MS, Roccatagliata AJ, Kuriss A, et al. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*[J]. *J Nat Prod*, 2001, 64 (6):732.
- [7] 王振立,刘贵敏,郑瑞,等. 刺参酸性粘多糖抑制小鼠肿瘤细胞 DNA 合成及其代谢研究[J]. *中国医药工业杂志*, 1993, 24(9):405.
- [8] 吴萍茹,陈粤,方金瑞,等. 二色桌片参的化学成分的研究 IV 二色桌片参糖蛋白的分离性质及抗肿瘤活性的研究[J]. *中国海洋药物*, 2000, 19(5):4.
- [9] 黄益丽,郑忠辉,苏文金,等. 二色桌片参的化学成分研究 III 二色桌片参多糖-I 岩藻聚糖的免疫调节作用[J]. *海洋通报*, 2001, 20(1):88.

Purification and antitumor effect evaluation of *Protankyra bidentata* antitumor factor

SHEN Xian-rong* , LUAN Jie, JIANG Ding-wen, CHEN Wei, LIU Li-na, JIA Fu-xing
(Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To purify the *Protankyra bidentata* anti-tumor factor (PBATF) from *Protankyra bidentata*, and study its antitumor effects. **Methods** PBATF was extracted from *Protankyra bidentata* with 10 mmol L⁻¹ PB containing 1 mol L⁻¹ NaCl, and fractionally precipitated with 40% ~ 60% (NH₄)₂SO₄. Further purifications were achieved by DEAE-Sephacryl CL-6B ion exchange chromatography, Sephacryl S-300 gel filtration and reverse-phase high performance liquid chromatography. PBATF was evaluated as homogeneous by SDS-PAGE and HPLC analyses. MTT and Clone Formation Assay were used to detect the inhibitory effects of PBATF on the growth of tumor cells and the colony formation of cell, respectively. Tumor-bearing mice were used to determine the effect of PBATF on tumor growth in vivo. **Results** PBATF was purified from *Protankyra bidentata*, and appeared a single band on a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, and a single peak on Zorbax Eclipse XDB-C18 HPLC chromatography. PBATF inhibited the growth of 7901, HeLa, and NCI cells significantly, but had no significant effect on 929 cells and bovine artery endothelial cells. PBATF inhibited the colony formation of HeLa cells, and had no effect on 929 cells. The tumor growth of Lewis lung cancer implanted in C57BL/6 mice was inhibited significantly by PBATF, and the inhibitory rates were 56.89% in 5 mg kg⁻¹ group, 52.00% in 1 mg kg⁻¹ group, 33.61% in 0.5 mg kg⁻¹. **Conclusion** PBATF purified from *Protankyra bidentata* has significant inhibitory effect on tumor growth both *in vitro* and *in vivo*. **Key words:** sea cucumber; purification; antitumor activity; tumor cell

南海沉积环境来源真菌 *Eurotium* sp. SCSIO F452 的次生代谢产物研究^{△*}

王发左¹, 黄智¹, 史雪凤¹, 陈玉婵², 田新朋¹, 李洁¹, 章卫民², 张偲¹

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室 中国科学院海洋微生物研究中心
广东省海洋海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070)

摘要:目的 对 1 株南海沉积环境来源真菌的次生代谢产物进行分离、鉴定及活性研究。方法 采用溶剂萃取、硅胶柱层析、凝胶柱层析等方法对真菌 *Eurotium* sp. SCSIO F452 的发酵产物进行化学分离, 通过 NMR、MS 等波谱学技术并参阅文献进行化合物结构鉴定, 采用 SRB 法评价化合物的细胞毒活性。结果 从菌株 SCSIO F452 中分离鉴定 6 个单体化合物, 分别为: isodihydroauroglaucon(1)、flavoglaucon(2)、tetrahydroauroglaucon(3)、2-(1,1-dimethyl-2-propen-1-yl)-1H-indole-3-carboxaldehyde(4)、neoechinulin A(5) 和 methyl linoleate(6)。化合物 1-5 对 4 种肿瘤细胞系表现出不同强度的细胞毒活性。结论 苯甲醛衍生物 1-3 是真菌 SCSIO F452 的优势代谢产物, 细胞毒活性较强, 具有潜在的研究价值。

关键词: 海洋真菌; 散囊菌; 次生代谢产物; 细胞毒活性; 沉积物

中图分类号: R915, O629, P745

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2013)01-007-06

海洋微生物具有可利用现代微生物发酵技术进行生产、不会破坏生态平衡、无原材料后顾之忧、易实现产业化等优势, 被认为是最具开发前景的可持续性利用的药源^[1-2]。与其它海洋微生物相比, 海洋真菌来源的次生代谢产物不仅数量占到整个海洋微生物的一半左右, 还具有产量大、结构和活性多样性丰富、“创新指数”和“类药性”高等优势, 已经成为目前海洋微生物研究的新亮点^[3-6]。

海洋沉积环境是集化学物质和微生物于一体的特殊生态环境, 蕴藏着丰富的真菌代谢产物资源, 据 Rateb 等统计^[5], 2006—2010 年间, 海洋沉积环境来源真菌新次生代谢产物约占整个海洋真菌来源新次生代谢产物总数的 16%, 与红树林来源真菌所占的比例相同, 次于海藻、海绵来源真菌。海洋沉积环境来源真菌代谢产物不仅结构多样性丰富, 而且多表现出良好的抗肿瘤和抗菌活性, 具有潜在的应用价值^[7]。本研究从南海沉积物样品中分离得到 1 株散囊菌属真菌 *Eurotium*

sp. SCSIO F452, 前期筛选发现其乙酸乙酯提取物具有良好的卤虫致死活性, 进一步研究, 从其发酵产物中分离鉴定得到 6 个单体化合物, 包括苯甲醛衍生物 isodihydroauroglaucon(1)^[8]、flavoglaucon(2)^[9] 和 tetrahydroauroglaucon(3)^[9], 吡啶衍生物 2-(1,1-dimethyl-2-propen-1-yl)-1H-indole-3-carboxaldehyde(4)^[10] 和 neoechinulin A(5)^[11], 以及脂肪酸类化合物 methyl linoleate(6)。本研究还对化合物 1~5 的细胞毒活性进行了评价。

1 实验部分

1.1 试验试剂和仪器

核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司 AV-500 型); 质谱仪(瑞士 Bruker 公司 maxis 型); 旋光仪(美国 PerkinElmer 公司 Polarimeter 341 plus 型); 旋转蒸发仪(日本 EYELAN 公司 1100V-W 型); 柱层析用正相硅胶(青岛海洋化工厂); 高效薄层预制板(烟台市化学工业研究所, HSG-F254 型);

* **△基金项目:** 国家重点基础研究发展计划项目(2010CB833800); 国家高技术研究发展计划(2012AA092104); 国家自然科学基金青年基金(40906076, 40906075) 资助

作者简介: 王发左(1977-), 男, 副研究员, 研究方向为海洋特殊环境微生物资源、化学及功能。

* **通讯作者:** 张偲, 男, 研究员, 博士生导师 E-mail: zhsimd@scsio.ac.cn

收稿日期: 2012-08-17

Sephadex LH-20(Pharmacia 公司);有机试剂(氯仿、丙酮、甲醇、乙酸乙酯、石油醚等)均为分析纯

(天津市富宇精细化工有限公司和广州化学试剂厂)。

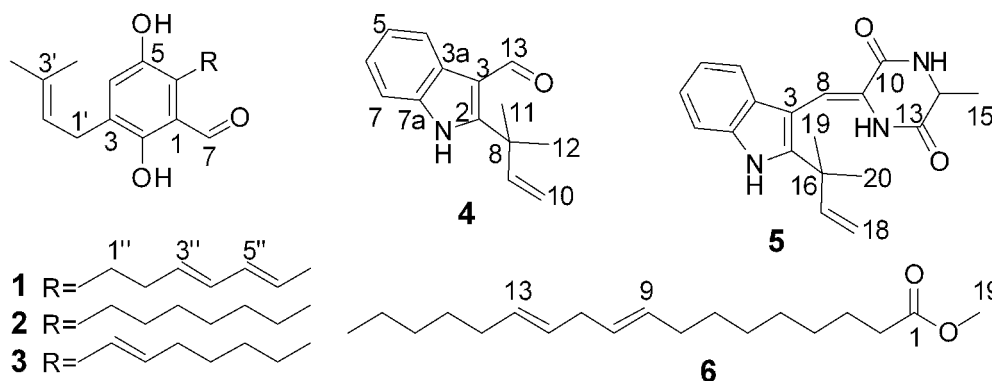


图1 化合物1~6的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1~6

1.2 菌株来源及培养基

1.2.1 菌株来源

真菌 SCSIO F452 分离自 2010 年 5 月采集到的南海北部沉积物样品(110°0.292'E, 17°29.804'N, 深度 158 m), 结合形态及分子鉴定确定为 *Eurotium* sp. (GenBank 登录号: JX481973)。菌株保藏于中国科学院海洋微生物研究中心, 保藏条件为 PDA 斜面、温度为 4 °C。

1.2.2 培养基

分离及保藏的培养基为 PDA 培养基: 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 陈海水 1000 mL。

发酵培养基: 麦芽糖 20 g, 味精 10 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, 葡萄糖 10 g, 酵母浸膏 3 g, 玉米粉 1 g, 甘露醇 20 g, CaCO_3 2 g, 海盐 30 g, 水 1000 mL, pH 6.5。

1.3 发酵与提取

保藏菌株复苏后, 从斜面转接到装有发酵培养基 150 mL 的三角瓶(500 mL)中, 28 °C、180 r/min 摇床培养 3 d 获得种子液。分别取种子液 5 mL 接种到装有 150 mL 发酵培养基的 20 个 500 mL 三角瓶中, 室温、静置培养 34 d 获得发酵液 30 L。发酵液经筛绢过滤, 分为发酵液和菌丝体。发酵液减压浓缩后, 用等量的乙酸乙酯萃取 3 次, 获得发酵液的乙酸乙酯萃取液。菌丝体加入 80% 丙酮水溶液浸提 3 次, 减压浓缩至不含丙酮, 再用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 获得菌丝体的乙酸乙酯萃取液。合并发酵液和菌丝体的乙酸乙酯萃取液并减压浓缩至干, 得到代谢产物粗浸膏 68.5 g。

1.4 代谢产物的分离纯化

以氯仿-甲醇溶解粗浸膏, 拌入大约 100 g 的 100 目硅胶, 减压抽干溶剂后装入事先装好的 300~400 目硅胶柱中, 进行减压柱层析, 以石油醚-氯仿, 氯仿-甲醇为溶剂进行梯度洗脱, 分为 18 个组分。组分 4、6 和 7 经过简单重结晶, 分别获得化合物 3(45.4 mg)、1(16.4 mg)和 2(16.0 mg)。组分 9 经硅胶柱层析(200~300, 石油醚: 氯仿=3: 7 洗脱)、凝胶柱层析(Sephadex LH-20, 氯仿: 甲醇=1: 1 洗脱), 获得化合物 4(0.9 mg)。组分 12 经硅胶柱层析(200~300, 氯仿: 甲醇=20: 1 洗脱), 获得化合物 5(7.2 mg)。组分 11 经硅胶柱层析(200~300, 石油醚: 氯仿=1: 3 洗脱)、凝胶柱层析(Sephadex LH-20, 氯仿: 甲醇=1: 1 洗脱), 获得化合物 6(17.5 mg)。

1.5 细胞毒活性测试

按照文献[12], 采用 SRB 法测试单体化合物对人中枢神经系统癌细胞 SF-268、人乳腺癌细胞 MCF-7、人肺癌细胞 NCI-H460 和人肝癌细胞 HepG-2 的细胞毒活性。

2 结果与讨论

2.1 结构鉴定

化合物 1: 淡黄色晶体, 阳离子 HR-ESI-MS 在 m/z 323.1657 出给出 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰(calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}^+$, 323.1623), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据, 推测该化合物分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3$, 计算不饱和度为 8。 ^1H NMR 谱在低场区给出 3 个

活泼氢信号[δ 11.93(1H, s, 2-OH), 10.27(1H, s, H-7), 5.08(1H, d, J 5.0 Hz, 5-OH)], 1 个芳香氢信号 6.92(1H, s, H-4) 和 5 个烯氢信号[δ 6.92(1H, s, H-4), 6.01(2H, m, H-4'', 5''), 5.57(2H, m, H-3'', 6''), 5.27(1H, tm, J 7.4 Hz, H-2'')]; 高场区给出 3 个甲基信号[δ 1.74(3H, s, H-4'), 1.72(3H, d, J 6.9 Hz, H-7''), 1.68(3H, s, H-5')], 3 个亚甲基氢信号[δ 3.28(2H, d, J 7.0 Hz, H-1a', 1b'), 2.98(2H, t, J 7.5 Hz, H-1''), 2.34(2H, td, J 7.7, 7.5 Hz, H-2'')]. 其 ^{13}C NMR 谱和 DEPT 谱给出 1 个醛基碳 δ 195.5(CH, C-7)、6 个芳香碳[δ 155.7(C, C-2), 145.3(C, C-5), 128.9(C, C-3), 127.6(C, C-6), 126.0(CH, C-4), 117.3(C, C-1)], 6 个烯碳[δ 133.8(C, C-3'), 131.9(CH, C-4''), 131.1(CH, C-5''), 129.4(CH, C-6''), 128.2(CH, C-3''), 121.1(CH, C-2'')], 3 个亚甲基[δ 34.2(CH₂, C-2''), 27.0(CH₂, C-1'), 24.0(CH₂, C-1'')] 和 3 个甲基[δ 25.7(CH₃, C-4'), 17.9(CH₃, C-7''), 17.7(CH₃, C-5')]. 以上数据提示化合物结构中包含五取代苯环骨架, 并与 1 个醛基、1 个异戊烯基和 1 个庚双烯基结构相连, ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关信号进一步证实了上述片段的连接(见图 2)以及整个化合物的结构。由此, 化合物 1 鉴定为图 1 所示结构, 其与文献报道已知化合物 isodihydroauroglaucin 数据一致^[8]。核磁共振谱数据: ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 11.93(1H, s, 2-OH), 10.27(1H, s, H-7), 6.92(1H, s, H-4), 6.01(2H, m, H-4'', 5''), 5.57(2H, m, H-3'', 6''), 5.27(1H, tm, J 7.4 Hz, H-2''), 5.08(1H, d, J 5.0 Hz, 5-OH), 3.28(2H, d, J 7.0 Hz, H-1a', 1b'), 2.98(2H, t, J 7.5 Hz, H-1''), 2.34(2H, td, J 7.7, 7.5 Hz, H-2''), 1.74(3H, s, H-4'), 1.72(3H, d, J 6.9 Hz, H-7''), 1.68(3H, s, H-5'); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 195.5(CH, C-7), 155.7(C, C-2), 145.3(C, C-5), 133.8(C, C-3'), 131.9(CH, C-4''), 131.1(CH, C-5''), 129.4(CH, C-6''), 128.9(C, C-3), 128.2(CH, C-3''), 127.6(C, C-6), 126.0(CH, C-4), 121.1(CH, C-2''), 117.3(C, C-1), 34.2(CH₂, C-2''), 27.0(CH₂, C-1'), 25.7

(CH₃, C-4'), 24.0(CH₂, C-1''), 17.9(CH₃, C-7''), 17.7(CH₃, C-5'); HR-ESI-MS m/z 323.1657 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₉H₂₄O₃Na⁺, 323.1623)。

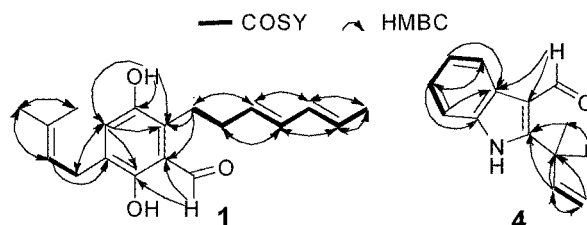


图 2 化合物 1 和 4 重要的 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关信号

Fig. 2 Selected ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compounds 1 and 4

化合物 2: 淡黄色晶体, 阳离子 HR-ESI-MS 在 m/z 305.2145 给出 [M+H]⁺ 峰 (calcd for C₁₉H₂₈O₃⁺, 305.2117), 结合 ^{13}C NMR 和 ^1H NMR 谱数据推测该化合物分子式为 C₁₉H₂₈O₃, 计算不饱和度为 6。与化合物 1 的 NMR 数据比较, 结果表明化合物 2 与 1 具有相似的骨架结构, 不同之处仅在于化合物 1 结构中的庚双烯支链被化合物 2 中饱和庚烷支链所取代。化合物 2 的 ^1H NMR 谱中在 δ 1.39(2H, m, H-3'') 和 1.30(6H, m, H-4'', 5'', 6'') 给出 8 个亚甲基氢信号, ^{13}C NMR 和 DEPT 谱在 δ 29.1(CH₂, C-3''), 29.6(CH₂, C-4''), 32.0(CH₂, C-5'') 和 22.6(CH₂, C-6'') 给出的 4 个亚甲基信号, 进一步证明了以上推测。由此, 确定化合物 2 为图 1 所示结构, 其核磁数据与文献^[9]报道的已知化合物 flavoglaucin 一致。核磁共振谱数据: ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 11.91(1H, s, 2-OH), 10.24(1H, s, H-7), 6.89(1H, s, H-4), 5.27(1H, tm, J 7.5 Hz, H-2''), 4.54(1H, br s, 5-OH), 3.28(2H, d, J 7.0 Hz, H-1a', 1b'), 2.88(2H, t, J 8.0 Hz, H-1''), 1.75(3H, s, H-4'), 1.69(3H, s, H-5'), 1.57(2H, m, H-2''), 1.39(2H, m, H-3''), 1.30(6H, m, H-4'', 5'', 6''), 0.87(3H, t, J 6.5 Hz, H-7''); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 195.6(CH, C-7), 155.8(C, C-2), 145.0(C, C-5), 133.8(C, C-3'), 29.6(CH₂, C-4''), 32.0(CH₂, C-5''), 22.6(CH₂, C-6''), 128.6(C, C-3), 29.1(CH₂, C-3''), 128.5

(C, C-6), 125.7(CH, C-4), 121.1(CH, C-2'), 117.3(C, C-1), 31.7(CH₂, C-2''), 27.0(CH₂, C-1'), 25.8(CH₃, C-4'), 23.9(CH₂, C-1''), 14.0(CH₃, C-7''), 17.7(CH₃, C-5'); HR-ESI-MS m/z 305.2145 [M+H]⁺ (calcd for C₁₉H₂₉O₃⁺, 305.2117)。

化合物 3: 黄色晶体, 阴离子 ESI-MS 在 m/z 301.33 [M-H]⁻、阳离子 ESI-MS 在 m/z 325.15 [M+Na]⁺ 给出准分子离子峰, 结合¹H NMR 谱数据, 推测分子式为 C₁₉H₂₆O₃, 计算不饱和度为 7。化合物 3 的分子量比化合物 2 少 2, 并且在¹H NMR 谱上, 化合物 3 中的 2 个烯氢信号[δ 6.66 (1H, d, J 16.0 Hz, H-1''), 5.88 (1H, dt, J 16.0, 6.9 Hz, H-2'')]取代了化合物 2 中的 4 个亚甲基氢信号[δ 2.88 (2H, t, J 8.0 Hz, H-1''), 1.57 (2H, m, H-2'')]。结合不饱和度, 提示化合物 3 与 2 间仅有的差异在于化合物 3 中 C-1'' 与 C-2'' 间存在反式双键结构。经查阅文献[9], 确定该化合物为 tetrahydroauroglaucin, 结构如图 1 所示。核磁波谱数据:¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆, TMS, δ ppm): 11.80 (1H, s, 2-OH), 10.15 (1H, s, H-7), 7.95 (1H, br s, 5-OH), 7.03 (1H, s, H-4), 6.66 (1H, d, J 16.0 Hz, H-1''), 5.88 (1H, dt, J 16.0, 6.9 Hz, H-2''), 5.29 (H, tm, J 7.5 Hz, H-2'), 3.27 (2H, d, J 7.5 Hz, H-1a', 1b'), 2.31 (2H, dt, J 7.7, 7.5 Hz, H-3''), 1.72 (3H, s, H-4'), 1.69 (3H, s, H-5'), 1.52 (2H, m, H-4''), 1.36 (4H, m, H-5'', 6''), 0.90 (3H, t, J 7.0 Hz, H-7''); ESI-MS m/z 325.15 [M+Na]⁺, m/z 301.33 [M-H]⁻。

化合物 4: 无色针状晶体, 阳离子 ESI-MS 在 m/z 214.07 给出准分子离子峰[M+H]⁺, 阴离子 ESI-MS 在 m/z 212.15 给出准分子离子峰[M-H]⁻, 结合¹H NMR 和¹³C NMR 谱, 推测分子式为 C₁₄H₁₅NO, 计算不饱和度为 8。¹H NMR 谱给出 2 个活泼氢[δ 10.75 (1H, br s, 1-NH), 10.42 (1H, s, H-13)], 4 个芳香氢[δ 8.27 (1H, d, J 8.0 Hz, H-4), 7.44 (1H, d, J 8.0 Hz, H-7), 7.18 (2H, m, H-5, 6)], 结合¹³C NMR 谱在 δ 187.5 (CH, C-13) 羰基碳信号, 提示分子中可能存在 1 个 2, 3-二取代吡啶结构和 1 个醛基结构; 而¹H NMR 谱

在 δ 6.36 (1H, dd, J 17.4, 10.6 Hz, H-9), 5.25 (1H, dd, J 17.4 Hz, H-10a), 5.18 (1H, dd, J 17.4, 10.6 Hz, H-10b) 和 1.69 (6H, s, H-11, 12) 给出一系列氢信号则表明结构中存在反异戊烯基结构。HSQC、¹H-¹H COSY 和 HMBC 相关信号(见图 2)进一步确证了化合物 4 的结构与已知化合物 2-(1,1-dimethyl-2-propen-1-yl)-1H-indole-3-carboxaldehyde 一致, 结构如图 1 所示^[10]。核磁波谱数据:¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆, TMS, δ ppm): 10.75 (1H, br s, 1-NH), 10.42 (1H, s, H-13), 8.27 (1H, d, J 8.0 Hz, H-4), 7.44 (1H, d, J 8.0 Hz, H-7), 7.18 (2H, m, H-5, 6), 6.36 (1H, dd, J 17.4, 10.6 Hz, H-9), 5.25 (1H, dd, J 17.4 Hz, H-10a), 5.18 (1H, dd, J 17.4, 10.6 Hz, H-10b), 1.69 (6H, s, H-11, 12); ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-*d*₆, TMS, δ ppm): 187.5 (CH, C-13), 156.8 (C, C-2), 148.2 (CH, C-9), 136.8 (C, C-7a), 129.2 (C, C-3), 124.7 (CH, C-6), 124.1 (CH, C-5), 123.4 (CH, C-4), 115.6 (C, C-3a), 114.0 (CH₂, C-10), 113.4 (CH, C-7), 41.7 (C, C-8), 30.5 (CH₃, C-11), 30.5 (CH₃, C-12); ESI-MS m/z 214.07 [M+H]⁺, m/z 212.15 [M-H]⁻。

化合物 5: 淡黄色无定形粉末, 阳离子 ESI-MS 在 m/z 346.13 [M+Na]⁺ 给出准分子离子峰, 阴离子 ESI-MS 在 m/z 322.28 [M-H]⁻ 给出准分子离子峰, 结合¹³C NMR 和¹H NMR 谱数据, 推测其分子式为 C₁₉H₂₁N₃O₂, 计算不饱和度为 11。与化合物 4 的 1D NMR 数据比较, 提示化合物 5 具有与 4 相同的、2 位与反异戊烯基相连的 2, 3-二取代吡啶结构。此外, 化合物 5 的¹H NMR 谱中还给出 2 个 NH 质子信号[δ 10.36 (1H, br s, NH-14), 9.49 (1H, br s, NH-11)], 2 个次甲基氢信号[δ 7.79 (1H, s, H-8), 4.61 (1H, qd, J 7.0, 1.8 Hz, H-12)] 和 1 个甲基氢信号[δ 1.73 (3H, d, J 7.0, H-15)], 结合¹³C NMR 中 2 个酰胺羰基碳信号[δ 167.4 (C, C-13), 161.1 (C, C-10)], 2 个次甲基碳信号[δ 121.6 (CH, C-8), 51.9 (CH, C-12)] 和 1 个甲基碳信号[δ 20.5 (CH₃, C-15)], 推测结构中存在 1 个二酮哌嗪结构, 并通过芳香次甲基 C-8 与吡啶结构的 3 位相连。进一步与文献数据比对, 鉴定化合物 5 为 neoechinulin A^[11] (见

图 1)。核磁波谱数据: $[\alpha]_D^{20}$ -0.032 (c 0.06, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, Pyridine- d_5 , TMS, δ ppm): 11.86(1H, br s, 1-NH), 10.36(1H, br s, NH-14), 9.49(1H, br s, NH-11), 7.80(1H, d, J 8.0 Hz, H-4), 7.79(1H, s, H-8), 7.36(1H, d, J 8.0 Hz, H-7), 7.22(1H, dd, J 8.0, 7.0 Hz, H-5), 7.17(1H, dd, J 8.0, 7.0 Hz, H-6), 4.61(1H, qd, J 7.0, 1.8 Hz, H-12), 6.19(1H, dd, J 17.4, 10.5 Hz, H-17), 5.15(1H, dd, J 17.4 Hz, H-18a), 5.09(1H, dd, J 10.5 Hz, H-18b), 1.73(3H, d, J 7.0, H-15), 1.57(6H, s, H-19, 20); ^{13}C NMR (125 MHz, Pyridine- d_5 , TMS, δ ppm): 167.4 (C, C-13), 161.1 (C, C-10), 145.4 (CH, C-17), 144.6 (C, C-2), 136.2 (C, C-7a), 127.4 (C, C-3a), 126.6 (C, C-9), 121.6 (CH, C-8), 120.2 (CH, C-5), 120.0 (CH, C-6), 111.9 (CH₂, C-18), 111.8 (CH, C-4), 105.0 (C, C-3), 110.9 (CH, C-7), 51.9 (CH, C-12), 39.6 (C, C-8), 27.8 (CH₃, C-19), 27.8 (CH₃, C-20), 20.5 (CH₃, C-15); ESI-MS m/z 346.13 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 322.28 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

化合物 **6**: 浅黄色油状, 阳离子 HR-ESI-MS 在 m/z 295.2621 给出 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰 (calcd for C₁₉H₃₅O₂⁺, 295.2637), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据推测化合物分子式为 C₁₉H₃₄O₂, 计算不饱和度为 3。 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱中在 δ 174.2 (C, C-1) 给出 1 个羰基信号, 在 δ 130.2 (CH, C-13)、130.0 (CH, C-9)、128.0 (CH, C-12) 和 127.9 (CH, C-10) 给出 4 个烯碳信号, 在 δ 51.9 (CH₃, C-19) 和 14.0 (CH₃, C-18) 给出 2 个甲基信号, 以

及在 δ 22.5~34.1 给出的一系列次甲基信号, 结合其 ^1H NMR 谱特征, 推测化合物 **6** 为包含 2 个不饱和双键结构的长链脂肪酸甲酯。进一步将化合物 **6** 的 1D NMR、质谱数据与有机化合物光谱数据库 (Spectral Database for Organic Compounds, SDBS) 中的数据 (SDBS No: 10529) 比较, 确定该化合物为 methyl linoleate, 结构如图 1 所示。核磁波谱数据: ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 5.34(4H, m, H-9, 10, 12, 13), 3.65(3H, s, H-19), 2.77(2H, t, J 6.5, H-11), 2.31(2H, t, J 7.5, H-2), 2.06(4H, m, H-8, 14), 1.61(2H, m, H-3), 1.37(6H, m, H-15, 16, 17), 1.33(4H, m, H-4, 5), 1.29(4H, m, H-6, 7), 0.89(3H, t, J 6.5 Hz, H-3); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 174.2 (C, C-1), 130.2 (CH, C-13), 130.0 (CH, C-9), 128.0 (CH, C-12), 127.9 (CH, C-10), 51.9 (CH₃, C-19), 34.1 (CH₂, C-11), 31.5 (CH₂, C-14), 29.6 (CH₂, C-8), 29.3 (CH₂, C-2), 29.1 (CH₂, C-7, 15, 16), 27.2 (CH₂, C-5, 6), 25.6 (CH₂, C-4), 24.9 (CH₂, C-3), 22.5 (CH₂, C-17), 14.0 (CH₃, C-18); HR-ESI-MS m/z 295.2621 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for C₁₉H₃₅O₂⁺, 295.2637)。

2.2 细胞毒活性

采用 SRB 法评价了化合物 **1-5** 对 SF-268、MCF-7、NCI-H460 和 HepG-2 这 4 种肿瘤细胞系的细胞毒活性, 以顺铂 (cisplatin) 为阳性对照。结果表明, 化合物 **1-3** 对 4 种肿瘤细胞系分别表现出良好的细胞毒活性, 而化合物 **4-5** 活性微弱 (见表 1)。

表 1 化合物 **1-5** 的细胞毒活性 ($x \pm s$, $n=3$)
Table 1 Cytotoxicities of compounds **1-5** ($x \pm s$, $n=3$)

化合物 Compound	细胞毒性 Cytotoxicity IC ₅₀ /μmol · L ⁻¹			
	SF-268	MCF-7	NCI-H460	HepG-2
1	66.25±0.98	64.53±0.54	98.13±0.27	72.66±1.24
2	80.47±2.83	79.06±1.51	93.75±7.32	77.5±0.27
3	61.41±0.81	57.03±0.27	76.88±1.69	74.84±0.98
4	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00
5	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00
Cisplatin	4.76±0.27	3.99±0.13	2.91±0.18	2.45±0.07

2.3 讨论

本文从南海沉积环境来源的 1 株散囊菌属真菌 *Eurotium* sp. SCSIO F452 的发酵产物中分离鉴定了 6 个化合物,其中包括 3 个苯甲醛衍生物(1-3)、2 个吲哚衍生物(4-5)以及 1 个脂肪酸类化合物(6)。苯甲醛类衍生物 1-3 是真菌 SCSIO F452 主要代谢产物,文献报道此类化合物最初来源于陆生真菌,具有良好的抗氧化活性和潜在的抗肿瘤活性[13],本研究进一步评价了化合物 1-3 对 SF-268、MCF-7、NCI-H460 和 HepG-2 4 种肿瘤细胞系的细胞毒活性,结果表明 3 个化合物都具有一定强度的细胞毒活性,具有潜在的研究价值。

参考文献

- [1] 谭仁祥. 海洋微生物: 新天然药物的重要源泉[J]. 中国天然药物, 2006, 4(1): 2-4.
- [2] 张偲, 张长生, 田新朋, 等. 中国海洋微生物多样性研究[J]. 中国科学院院刊, 2010, 25(6): 651.
- [3] Bugni T S, Ireland C M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms[J]. *Nat Prod Rep*, 2004, 21(1): 143.
- [4] Saleem M, Ali M S, Hussain S, et al. Marine natural products of fungal origin[J]. *Nat Prod Rep*, 2007, 24(5): 1142.
- [5] Rateb M E, Ebel R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats[J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(2): 290.
- [6] Blunt J W, Copp B R, Keyzers R A, et al. Marine natural products[J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(2): 144.
- [7] 黄智, 王发左, 张偲. 海洋沉积环境来源真菌次生代谢产物的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, in press.
- [8] Hamasaki T, Fukunaga M, Kimura Y, et al. Isolation and structures of two new metabolites from *Aspergillus ruber* [J]. *Agric Biol Chem*, 1980, 44(7): 1685.
- [9] Yoshihir K, Takahash C, Sekita S, et al. Tetrahydroauroglaucin from *Penicillium charlesii* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20(12): 2727.
- [10] Itokawa H, Akita Y, Yamazaki M. The indole derivatives isolated from the oil cakes of camellia seeds. On the relation to the components of the fungus infecting the oil cakes[J]. *Yakugaku Zasshi*, 1973, 93(9): 1251.
- [11] 王巍, 陈超, 杨君, 等. 植物内生真菌代谢物吲哚生物碱 Neoechinulin A [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(01): 48.
- [12] 孙利, 李冬利, 陈玉婵, 等. 海洋真菌帚状弯孢聚壳 FS26 代谢产物的分离鉴定与抗肿瘤活性研究[J]. 菌物学报, 2011, 32(2): 268.
- [13] Miyake Y, Ito C, Tokuda H, et al. Evaluation of flavoglaucin, its derivatives and pyranonigrins produced by molds used in fermented foods for inhibiting tumor promotion[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(5): 1120.

Analysis of Secondary metabolites produced by *Eurotium* sp. SCSIO F452 isolated from the South China Sea Sediment

WANG Fa-zuo¹, HUANG Zhi¹, SHI Xue-feng¹, CHEN Yu-chan², TIAN Xin-peng¹, LI Jie¹, ZHANG Wei-min² and ZHANG Si¹

(1. CAS Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, RNAM Center for Marine Microbiology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Objective To isolate and identify the secondary metabolites of *Eurotium* sp. SCSIO F452 isolated from the South China Sea sediment. **Methods** The fermentation products were purified by solvent extraction and column chromatography (silica gel and sephadex LH-20). The isolated compounds were identified by spectroscopic analysis (NMR and MS) as well as comparison with literatures. Their cytotoxicities were evaluated by SRB method. **Results** Six compounds were isolated from the acetic ether extracts of strain SCSIO F452, and their structures were determined as isodihydroauroglaucin(1), flavoglaucin(2), tetrahydroauroglaucin (3), 2-(1,1-dimethyl-2-propen-1-yl)-1H-indole-3-carboxaldehyde (4), neoechinulin A(5), and methyl linoleate(6). Compounds 1-5 showed varied cytotoxic activities against four cancer cell lines. **Conclusion** Benzaldehyde derivatives 1-3 were dominant metabolites of strain SCSIO F452 and exhibited moderate cytotoxicities. These compounds showed strong potentials for further research.

Key words: marine fungi; *Eurotium* sp.; secondary metabolites; cytotoxicity; sediment

中国南海多棘软珊瑚的化学成分 和生物活性研究^{△*}

贾睿¹, 冯林音², 严小红², 郭跃伟^{2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室, 上海 201203)

摘要:目的 研究中国南海多棘软珊瑚的化学成分。方法 综合利用各种层析方法分离和纯化化合物, 并利用光谱学和理化性质来鉴定化合物结构。结果 从中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为 (3*E*, 7*E*, 11*Z*)-dolabella-3, 7, 12-triene (1)、Cembrene A (2)、(1*R*, 2*E*, 4*R*, 7*E*, 11*E*)-cembra-2, 7, 11-triene-4-ol (3)、(1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3, 4-epoxycembra-7, 11, 15-triene (4)、epoxynephthenol acetate (5)、pregnan-1, 20-dien-3-one (6)、pregnan-1, 4, 20-trien-3-one (7)、pregnan-4, 20-dien-3-one (8)、cholest-4-en-3-one (9)、methyl 3-oxochola-4, 22-dien-24-oate (10)。结论 化合物 1 是一个新的天然产物, 化合物 1, 2, 9, 10 都是首次从该属软珊瑚中分离得到。

关键词: 多棘软珊瑚; 化学成分; 生物活性

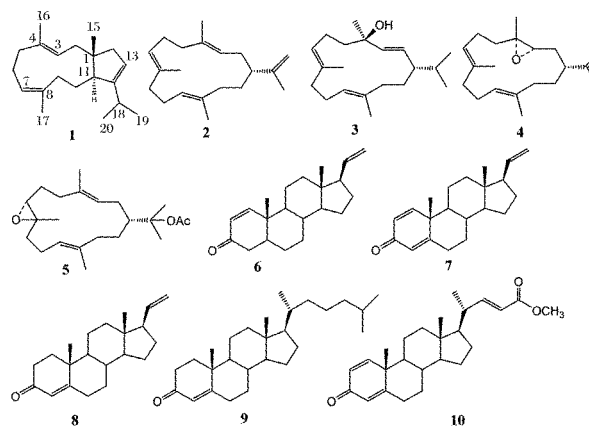
中图分类号: R931

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2013)01-013-04

多棘软珊瑚 *Spongodes* 属于腔肠动物门 (Cnidaria)、海鸡冠目 (Alcyonacea), 在热带和亚热带分布广泛。目前对该属海洋生物的化学成分研究的较少。为了寻找有重要生物活性和药用前景的海洋天然产物, 开发我国的海洋资源, 作者对采自我国南海的软珊瑚 *Spongodes* sp. 进行了系统的研究。从中共分离得到 10 个化合物, 包括 5 个二萜类化合物和 5 个甾体类化合物。理化性质和波谱数据与文献对照, 已知化合物的结构被确定为 (3*E*, 7*E*, 11*Z*)-dolabella-3, 7, 12-triene (1)^[1]、cembrene A (2)^[2]、(1*R*, 2*E*, 4*R*, 7*E*, 11*E*)-cembra-2, 7, 11-triene-4-ol (3)^[3]、(1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3, 4-epoxycembra-7, 11, 15-triene (4)^[3]、epoxynephthenol acetate (5)^[4-5]、pregnan-1, 20-dien-3-one (6)^[6]、pregnan-1, 4, 20-trien-3-one (7)^[6]、pregnan-4, 20-dien-3-one (8)^[6]、cholest-4-en-3-one (9)^[7]、methyl 3-oxochola-4, 22-dien-24-

oate (10)^[8]。其中, 化合物 1 是一个新的天然产物, 化合物 1, 2, 9, 10 都是首次从该属软珊瑚中分离得到。



1 实验部分

1.1 仪器与材料

Bruker DRX-400 核磁共振仪; (¹H NMR 位

* **△基金项目:** 国家海洋高技术研究发展计划 (2011AA09070102); 国家自然科学基金 (21072204, 21021063, 40976048, 31070310, 81072572); 中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室项目 (SIMM1203ZZ-03, SIMM1105KF-04); 国家科技重大专项 (2011ZX09307-002-03); 欧盟第七框架 IRSES 项目 (2010-2014); 上海市教委科研创新项目 (11YZ149); 上海市科委项目 (10391901900); 教育部留学回国人员科研启动基金资助

作者简介: 贾睿 (1975-), 女, 副教授, 研究方向为海洋生物学。

* **通讯作者:** 郭跃伟, 教授, Tel/Fax: 86-21-50805813, E-mail: ywguo@mail.shnc.ac.cn

收稿日期: 2012-08-30

移值以氘代溶剂中残存的 CHCl_3 (δ 7.26) 为内标, ^{13}C NMR 位移值以 CDCl_3 (δ 77.0) 为内标; Q-TOF Micro LC-MS-MS 质谱仪 (测定 ESI-MS); Finnigan-MAT-95 质谱仪 (测定 EI-MS); Agilent 1100 液相色谱仪; 层析用硅胶 (青岛海洋化工分厂); TLC 预制板 (烟台汇友硅胶开发有限公司); 石油醚 (杭州炼油厂, 分析纯); 丙酮 (上海溶剂厂, 分析纯)。

1.2 动物标本

实验样品于 2001 年 12 月采自我国海南三亚海域水下 20 m 处, 出水冷冻储藏。种属由中国科学院南海海洋研究所邹仁林研究员鉴定为多棘软珊瑚 (*Spongodes* sp.); 样品标本 (HN-100) 保存在中国科学院上海药物研究所海洋天然产物研究实验室。

1.3 提取与分离

将珊瑚 (*Spongodes* sp., 干质量 107g) 切碎后用丙酮超声提取 3 次, 将提取液减压浓缩除去有机溶剂, 浓缩物悬浮于 200 mL 水中, 用等体积的乙醚及正丁醇分别萃取 4 次, 有机相萃取液经减压浓缩分别得到乙醚粗浸膏 3.1 g 及正丁醇粗浸膏 2.0 g。乙醚粗浸膏经硅胶 (200~300 目) 柱层析, 以石油醚-丙酮梯度洗脱 (丙酮 0~100%), 然后经 SephadexLH-20 凝胶柱层析, 以石油醚/氯仿/甲醇 (2:1:1) 洗脱, 然后经硅胶 (400~600 目) 柱反复柱层析, 部分化合物最后经 C_{18} HPLC (甲醇/水, 乙腈/水) 纯化, 分别得到化合物 **1** (1.8 mg), **2** (1.6 mg), **3** (3.4 mg), **4** (2.6 mg), **5** (3.8 mg), **6** (3.1 mg), **7** (2.2 mg), **8** (2.7 mg), **9** (3.6 mg), **10** (10.5 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 无色油状物, 易溶于氯仿。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.20 (1H, br s, H-13), 5.17 (1H, br s, H-3), 4.86 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-7), 1.54 (3H, s, H-17), 1.48 (3H, s, H-16), 1.15 (3H, s, H-15), 1.08 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-19), 0.98 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-20); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 153.3 (C-12), 133.4 (C-4), 132.2 (C-8), 127.7 (C-3), 124.3 (C-7), 117.4 (C-13), 47.3 (C-14), 45.9 (C-11), 45.1 (C-1), 40.2 (C-2), 39.0 (C-5),

37.1 (C-9), 26.1 (C-18), 24.8 (C-6), 23.4 (C-10), 22.3 (C-15), 21.4 (C-20), 21.2 (C-19), 15.0 (C-16), 14.1 (C-17); EI-MS m/z 272 [M^+], 257, 229, 189, 161; ESI-MS m/z 272 [M^+]. 经与文献[1]对照, 化合物 **1** 被鉴定为 (3E,7E,11Z)-dolabella-3,7,12-triene。

化合物 **2** 无色油状物。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.19 (1H, t, $J=6.9$ Hz), 5.05 (1H, t, $J=6.7$ Hz), 4.98 (1H, t, $J=6.8$ Hz), 4.71 (1H, br s), 4.65 (1H, br s), 1.66 (3H, s), 1.59 (3H, s), 1.56 (3H, s), 1.55 (3H, s). 经与文献[2]对照, 化合物 **2** 被鉴定为 cembrene A。

化合物 **3** 无色油状物。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.54 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H-3), 5.26 (1H, dd, $J=15.4, 9.2$ Hz, H-2), 5.20 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-7), 5.01 (1H, m, H-11), 1.57 (3H, s, Me-8), 1.51 (3H, s, Me-12), 1.27 (3H, s, Me-4), 0.83 (3H, d, Me-15), 0.79 (3H, d, Me-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 138.7 (d, C-3), 132.8 (s, C-8), 127.7 (d, C-7), 126.9 (d, C-2), 124.7 (d, C-11), 73.8 (s, C-4), 46.1 (d, C-1), 43.9 (t, C-5), 38.9 (t, C-9), 36.8 (t, C-13), 32.9 (d, C-15), 29.2 (q, Me-4), 27.9 (t, C-14), 23.6 (t, C-6), 23.4 (t, C-10), 20.6 (q, Me-15), 19.3 (q, Me-15), 15.1 (q, Me-8), 14.7 (q, Me-12); EI-MS m/z 290 [M^+], 272, 257, 229, 189, 161. 经与文献[3]对照, 化合物 **3** 被鉴定为 (1R,2E,4R,7E,11E)-cembra-2,7,11-triene-4-ol。

化合物 **4** 无色油状物。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.09 (2H, m, H-7, 11), 4.86 (1H, brs, H-15), 4.63 (1H, brs, H-16), 2.83 (1H, dd, $J=2.6, 10.2$ Hz, H-3), 1.63 (3H, s, Me-17), 1.62 (3H, s, Me-19), 1.59 (3H, s, Me-20), 1.24 (3H, s, Me-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 148.6 (s, C-15), 135.2 (s, C-8), 133.3 (s, C-12), 124.3 (d, C-11), 123.9 (d, C-7), 63.3 (d, C-3), 60.8 (s, C-4), 40.3 (d, C-1), 39.5 (t, C-9), 38.2 (t, C-6), 34.6 (t, C-13), 33.6 (t, C-2), 29.7 (t, C-14), 24.3 (t, C-10), 23.6 (t, C-5), 18.4 (q, Me-17), 17.1 (q,

Me-20), 16.9(q, Me-18), 15.7(q, Me-19); EI-MS m/z 288 [M^+], 273, 255, 216, 147. 经与文献[3]对照, 化合物 **4** 被鉴定为 (1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3,4-epoxycembra-7,11,15-triene。

化合物 **5** 无色油状物。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.34 (1H, m, H-3), 5.11 (1H, m, H-11), 2.87 (1H, t, $J=5.3$ Hz, H-7), 1.97 (3H, s, H-OAc), 1.67 (3H, s, Me-18), 1.55 (3H, s, Me-20), 1.46 (3H, s, Me-16), 1.45 (3H, s, Me-17), 1.29 (3H, d, Me-19). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 134.7 (s, C-12), 131.8(s, C-4), 126.5(d, C-3), 125.0 (d, C-11), 85.5 (s, C-15), 62.2 (d, C-7), 59.9 (s, C-8), 45.8 (d, C-1), 38.6 (t, C-9), 36.4 (t, C-6), 36.2 (t, C-12), 28.7 (t, C-2), 28.4 (t, C-14), 25.2 (t, C-5), 23.3 (t, C-10), 23.3 (q, Me-16), 23.0(q, Me-17), 16.8 (q, Me-19), 15.6 (q, Me-18), 14.8 (q, Me-20); EI-MS m/z 348 [M^+], 333, 315, 272. 经与文献[4, 5]对照, 化合物 **5** 被鉴定为 epoxynephtenol acetate。

化合物 **6** 白色粉末。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.13 (1H, d, $J=10.4$ Hz, H-1), 5.83(1H, d, $J=10.4$ Hz, H-2), 5.74 (1H, m, H-20), 4.99 (1H, s, H-21), 4.96 (1H, m, H-21), 1.05 (3H, s, H-19), 0.61 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR(CDCl₃, 100 MHz) δ: 158.5 (C-1), 127.4 (C-2), 200.1 (C-3), 40.1 (C-4), 44.4 (C-5), 27.2(C-6), 31.4 (C-7), 35.8 (C-8), 50.3 (C-9), 39.1 (C-10), 20.8 (C-11), 37.4 (C-12), 43.7 (C-13), 55.6 (C-14), 24.7 (C-15), 27.6 (C-16), 55.3 (C-17), 13.0 (C-18), 13.0 (C-19), 139.5 (C-20), 114.7 (C-21); EI-MS (m/z): 298 [M^+], 283, 229, 163. 经与文献[6]对照, 化合物 **6** 被鉴定为 pregnan-1,20-dien-3-one。

化合物 **7** 白色粉末。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.08 (1H, d, $J=10.2$ Hz, H-1), 6.23(1H, dd, $J=10.2, 1.9$ Hz, H-2), 6.07 (1H, t, $J=1.9$ Hz, H-4), 5.74 (1H, m, H-20), 4.99 (1H, s, H-21), 4.96 (1H, m, H-21), 1.23 (3H, s, H-19), 0.66 (3H, s, H-18); EI-MS (m/z): 296 [M^+], 281, 227, 161. 经与文献[6]对照, 化合物 **7** 被鉴定为 pregnan-1,4,20-trien-3-one。

化合物 **8** 白色粉末。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.70 (1H, s, H-4), 5.70 (1H, m, H-20), 5.05 (1H, s, H-21), 4.88 (1H, m, H-21), 1.17 (3H, s, H-19), 0.60 (3H, s, H-18); EI-MS (m/z): 298 [M^+], 283, 229, 163. 经与文献[6]对照, 化合物 **8** 被鉴定为 pregnan-4,20-dien-3-one。

化合物 **9** 无色晶体。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.70 (1H, s, H-4), 1.14 (3H, s, 19-Me), 0.69 (3H, s, 18-Me); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 199.7 (C-3), 171.8 (C-5), 127.7 (C-4), 55.8 (C-14), 55.8 (C-17), 53.7 (C-9), 42.3 (C-13), 39.5 (C-24), 39.5 (C-12), 38.6 (C-10), 36.1 (C-22), 35.7 (C-1), 35.6 (C-20), 34.0 (C-2), 32.9 (C-6), 32.0 (C-7), 35.6 (C-8), 28.2 (C-16), 28.0 (C-25), 24.0 (C-15), 24.1 (C-23), 22.8 (C-26), 22.5 (C-27), 21.0 (C-11), 18.6 (C-21), 17.3 (C-19), 11.9 (C-18)。EIMS m/z : 384 [M^+], 369, 326, 285. 经与文献[7]对照, 化合物 **9** 被鉴定为 cholest-4-en-3-one。

化合物 **10** 无色油状物。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ 7.00 (1H, d, $J=10.1$ Hz, H-1), 6.19 (1H, dd, $J=10.1, 1.9$ Hz, H-2), 6.04 (1H, t, $J=1.6$ Hz, H-4), 6.83 (1H, dd, $J=15.5, 9.9$ Hz, H-22), 5.76 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-23), 3.71 (3H, s, H-OCH₃), 1.18 (3H, s, 19-Me), 0.96 (3H, d, $J=6.7$ Hz, 21-Me), 0.68 (3H, s, 18-Me); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz) δ: 155.9 (C-1), 127.4 (C-2), 186.3 (C-3), 123.8 (C-4), 169.0 (C-5), 32.9 (C-6), 33.6 (C-7), 35.5 (C-8), 52.3 (C-9), 43.3 (C-10), 22.6 (C-11), 38.5 (C-12), 42.6 (C-13), 55.1 (C-14), 24.1 (C-15), 27.5 (C-16), 55.8 (C-17), 12.3 (C-18), 18.7 (C-19), 39.9 (C-20), 20.0 (C-21), 155.3 (C-22), 118.7 (C-23), 167.2 (C-24), 51.4 (C-25)。经与文献[8]对照, 化合物 **10** 被鉴定为 methyl 3-oxochola-4,22-dien-24-oate。

3 化合物生物活性测试

环氧合酶 2 (COX-2) 抑制作用筛选试验: 以

花生四烯酸为底物,同时加入待测化合物,用放射免疫法检测 PEG2 生成量,以抑制百分率为指标,观察化合物对 COX-2 的抑制作用。试验结果:化合物 3 和 4 对 COX-2 有抑制活性,IC₅₀ 分别为 0.455 和 2.80 μmol/L。

4 结果与讨论

本次研究工作分离得到的 10 个化合物中,4 个都是首次从该属软珊瑚中分离得到。化合物 1 在 2006 年作为合成中间体被报道,尽管是一个纯碳氢化合物,但是 dolabella 型二萜双键位于 12, 13 位还是非常少见,是 1 个新的天然产物。化合物 2 作为纯碳氢骨架的低极性的西松烷型二萜在该属中是首次分离得到,从生源上也可能为化合物 3 和 4 的生源前体。生物活性筛选中发现化合物 3 和 4 对 COX-2 有较好的抑制活性。环氧合酶 (COX) 是前列腺素 (PGE) 通路的组成部分,是催化 PGE 进行生物合成的限速酶,在维持体内平衡稳定等方面发挥着重要作用。它有 2 个亚型: COX-1 和 2,其中,COX-1 主要结构性表达于大多数组织中,在维持胃肠道和肾髓质完整性方面起着关键作用,而 COX-2 在正常组织中几乎检测不到,但在炎症和肿瘤发生时其水平则会相应上调,其在多种人类肿瘤组织中均有过表达^[9]。化合物 3 和 4 作为能够抑制 COX-2 的天然产物,或许可

开发成为毒副作用较小的抗肿瘤或抗炎药物,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Scott A, Snyder Snyder S A, Corey E J. Concise Total Syntheses of Palominol, Dolabellatrienone, β-Araneosene, and Isoedunol via an Enantioselective Diels-Alder Macrobicyclization [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(3): 740.
- [2] Farkas I, Pfander H, Neue Synthese von (-)-(R)-Cembren A, Synthese von (+)-(R)-Cembrenen und (+)-(S)-Cembren [J]. *Helv Chim Acta*, 1990, 73(7): 1980.
- [3] Rao H B, Trimurtulu D. Diterpenes from the known alga *Dictyota divaricata* of the Indian Ocean [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(6): 1971.
- [4] Kunig G M, Wright A D. New dolabellanes from the marine alga *Dictyota pardalis* f. *pseudohanata* [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(27): 8011.
- [5] Bowden B F. Studies of Australian soft coral. XXIV Two cembranoid diterpenes from the soft coral *Sinularia facile* [J]. *Aust J Chem*, 1981, 34, 1551.
- [6] Schmitz F J, Vanderah D J. Marine natural products: naphthenol and epoxy-naphthenol acetate, cembrene derivatives from a soft coral [J]. *Chem Comm*, 1974, 407.
- [7] Arai Y, Nakagawa T, Hitosugi M, et al. Chemical constituents of aquatic fern *Azolla nilotica* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(3): 471.
- [8] Tomono Y, Hirota H, Imahara Y, et al. Four new steroids from two octocorals [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(11): 1538.
- [9] Cui Y Z, Zhang M R, Li F R. Research of the effects of traditional Chinese medicine on cyclooxygenase-2 [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2012, 27(7): 1878.

Analysis of the Chemical Constituents and Bioactivities of Soft Coral *Spongodes* sp.

JIA Rui¹, FENG Lin-yin², YAN Xiao-hong², GUO Yue-wei^{2*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

Abstract: **Objective** To analyze chemical components of *Spongodes* sp. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by various chromatographic techniques. Their structures were determined on the basis of physical properties and spectroscopic data. **Results** Ten compounds were isolated and identified as (3*E*, 7*E*, 11*Z*)-dolabella-3, 7, 12-triene (**1**)^[1], Cembrene A (**2**)^[2], (1*R*, 2*E*, 4*R*, 7*E*, 11*E*)-cembra-2, 7, 11-triene-4-ol (**3**)^[3], (1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3, 4-epoxycembra-7, 11, 15-triene (**4**)^[3], epoxy-naphthenol acetate (**5**)^[4,5], pregnan-1, 20-dien-3-one (**6**)^[6], pregnan-1, 4, 20-trien-3-one (**7**)^[6], pregnan-4, 20-dien-3-one (**8**)^[6], cholest-4-en-3-one (**9**)^[7], methyl 3-oxochola-4, 22-dien-24-oate (**10**)^[8]. **Conclusions** Compound **1** was found to be a new natural product. Moreover, this was the first time that compounds **1**, **2**, **9**, **10** were isolated from this genus of soft coral.

Key words: *Spongodes* sp.; chemical constituents; bioactivities

角鲨烯作为新型佐剂的免疫效果研究^{△*}

李丽杰^{1,3}, 杨奎真², 李明义³, 李延团^{1*}, 郝峰强³

(1. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛市第六人民医院, 山东 青岛 266033;
3. 山东信得科技股份有限公司, 山东 青岛 266061)

摘要:目的 研究以角鲨烯作为新型佐剂制备的新城疫、禽流感 H5N1 和 H9 灭活疫苗在 SPF 鸡体内的抗体效价水平以及对机体的细胞免疫作用。方法 本试验油相中按一定的比例添加角鲨烯, 按照常规方法制备灭活疫苗, 免疫 SPF 鸡后, 采用微量血凝抑制法和 MTT 法分别检测了 SPF 鸡免疫不同疫苗后机体的抗体效价水平和机体外周血 T 淋巴细胞的动态增殖变化。结果 免疫以角鲨烯作为新型佐剂制备的新城疫、禽流感 H5N1 和 H9 灭活疫苗后, HI 抗体在免疫后第 2 周检测为阳性, 第 3 周达到最大值, 持续到第 4 周抗体效价无明显下降($P>0.05$); 免疫组外周血 T 淋巴细胞增殖显著高于对照组。结论 表明以角鲨烯作为新型佐剂制备的新城疫、禽流感 H5N1 和 H9 灭活疫苗对 SPF 鸡的促抗体效价作用和细胞免疫作用均有显著增强。

关键词:角鲨烯; 新型佐剂; 抗体效价; 淋巴细胞增殖

中图分类号:R914

文献标志码:A

文章编号:1002-3461(2013)01-017-06

佐剂在广义上是指通过特异性或非特异性免疫增强作用提高血清中疫苗抗原特异性抗体水平的物质。由于灭活疫苗的免疫激活作用通常较弱, 不足以刺激机体产生足够的抗体, 因此通常在疫苗制剂中加入佐剂^[1]。与单独应用抗原相比, 抗原与佐剂联合应用所需的抗原量较少, 机体产生的抗体量较多, 并且还可以减轻免疫耐受。因此, 研发新型疫苗佐剂以提高疫苗免疫效果成为重要的研究方向^[2]。

角鲨烯主要来自深海鲨鱼肝油, 其含量范围从 15% ~ 69% 不等^[3,4]。其具有较强的生物活性, 在血液中输送活性氧的能力很强, 可增强机体生理功能, 提高免疫力, 还可帮助抵抗紫外线伤害, 是性能优良的血液输氧剂和生物抗氧化剂。许多研究结果表明, 角鲨烯对于肿瘤的治疗具有一定的生物活性^[5-10], 其作用机理是可以抑制肿瘤细胞的生长, 并增强机体的免疫力, 从而增强对肿瘤的抵抗力。除了较好的抗肿瘤作用以外, 对其它一些疾病, 如溃疡^[11]、痔疮^[12]、皮炎^[13]和皮肤烫伤等症状也有一定的疗效, 并可治疗或辅助治疗高血脂症^[14]。

角鲨烯在水包油型 MF59^[15]佐剂中, 广泛

应用于多种亚单位疫苗如流感、乙型肝炎、丙型肝炎及 HIV 疫苗的临床试验并被美国 FDA 批准成为除铝佐剂外第二个上市的人用佐剂。MF59 可增强体液免疫应答和细胞免疫应答, 同样量的抗原用 MF59 比用铝佐剂产生的抗体高 3~50 倍, 并且在动物模型和人类一到三期临床试验中证明没有明显的毒副作用, 安全可靠。

角鲨烯作为动物佐剂的应用是一个有待研究的方向。本文以 SPF 鸡作为试验对象, 测定角鲨烯作为新型佐剂制备的新城疫、H5N1 和 H9 灭活疫苗在 SPF 鸡体内的抗体效价水平以及对机体的细胞免疫作用, 进而为在动物佐剂方面的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 疫苗

新城疫病毒 (La Sota 株, EID50, 8.5), H5N1 病毒 (Re-6 株, EID50, 7.5) 和 H9 病毒 (11 株, EID50, 8.0) 均由中国兽医药品监察所提供。角鲨烯佐剂疫苗中加入 10% 角鲨烯, 并与白油佐剂疫苗制备含同等含量抗原。

* **△基金项目:**国家高技术研究发展项目(家禽病毒病基因工程疫苗的创制, 2011AA10A209)资助

作者简介:李丽杰(1982-), 女, 工程师, 博士研究生。E-mail: lilijielinxi@163.com

*** 通讯作者:**李延团, 教授, 博士生导师。E-mail: yantuanli@ouc.edu.cn

收稿日期:2012-09-04

1.1.2 试验动物

SPF 鸡(14 日龄)购自济南斯帕法斯家禽有限公司。

1.1.3 主要试剂

无支原体新生牛血清,杭州四季青生物工程有限公司产品,批号 090610;改良型 RPMI-1640 培养基,赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司产品,临用前加新生牛血清使终含量达 10% (体积分数),青霉素、链霉素含量分别达 100 IU/mL;伴刀豆素球蛋白(ConA),购自 Sigma 公司,用无血清 RPMI 1640 培养液配制成 0.025 mg/mL,过滤除菌,分装,-20℃ 保存;MTT 试剂盒,碧云天生物技术研究产品;人淋巴细胞分离液,北京索莱宝科技有限公司产品,批号 20110923。

1.1.4 主要仪器

680 型全自动酶联免疫检测仪, BIO-RAD。HF160W CO₂ 培养箱, Heal Force。CKX41 型倒置显微镜, OLYMPUS。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理

14 日龄 SPF 鸡 70 只,隔离器内饲养,自由采食和饮水。随机分为 7 组,每组 10 只,每羽皮下注射 0.3 mL 灭活疫苗。试验组分别注射角鲨烯佐剂新城疫灭活油苗(I)、白油佐剂新城疫灭活油苗(II)、角鲨烯佐剂 H5N1 灭活油苗(III)、白油佐剂 H5N1 灭活油苗(IV)、角鲨烯佐剂 H9 灭活油苗(V)、白油佐剂 H9 灭活油苗(VI)、无佐剂对照组注射等量的生理盐水(VII)。分别于免疫后 7、14、21、28 和 35 d,翼下静脉采血 0.5 mL,分离血清,用微量血凝抑制法(HI)测定抗体滴度;每组随机抽取 5 只鸡,翼下静脉采血 2 mL,柠檬酸钠抗

凝,测定 T 淋巴细胞增殖。

1.2.2 HI 抗体效价检测

各组 SPF 鸡分别于免疫后 7、14、21、28 和 35 d,翼下静脉采血 2 mL,分离血清,用微量血凝抑制法(HI)测定 HI 抗体滴度。

1.2.3 淋巴细胞增殖测定方法

用 MTT 法[16]测定淋巴细胞增殖。分离淋巴细胞,每组用含 10% 新生牛血清的改良型 RPMI-1640 培养基调整细胞含量为 5.0×10^6 /mL,加入到 96 孔细胞培养板中,每孔 50 μ L,再加 50 μ L ConA(终浓度为 10 μ g/mL),每个样品重复 3 孔,同时设立阴性对照,轻微振荡后置于 39℃、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h 后取出;每孔再加入 MTT 溶液 10 μ L,继续培养,直至长满结晶状深紫色 Formazan。每孔加入 100 μ L Formazan 溶解液,在细胞培养箱内再继续孵育。直至在普通光学显微镜下观察发现 formazan 全部溶解。在酶联免疫检测仪上检测 570 nm 处吸光值(A₅₇₀)。

1.3 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析,并用单因素方差分析(one-way ANOVA)法进行多组间显著性检验。

2 结果与分析

2.1 ND 抗体效价的动态变化

免疫后第 7 天,试验组和白油对照组的抗体效价显著高于空白对照组($P < 0.05$);第 14 天以后,试验组的抗体效价显著高于白油对照组和空白对照组($P < 0.05$) (见表 1)。表明角鲨烯佐剂能够显著提高新城疫疫苗的抗体效价。

表 1 各组鸡只免疫新城疫灭活疫苗后抗体 HI 效价结果 (log₂)
Table 1 Dynamic changes in the ND antibody titer in all groups (log₂)

组别 Group	免疫后天数 Days after the immunization				
	7	14	21	28	35
I	2.8±0.45 ^b	8.0±0.67 ^c	9.3±0.42 ^c	10.3±0.46 ^c	10.0±0.82 ^c
II	2.5±0.55 ^b	7.0±0.71 ^b	8.4±0.52 ^b	8.8±0.61 ^b	8.6±0.48 ^b
VII	2.0±0.00 ^a	2.3±0.45 ^a	2.3±0.42 ^a	3.0±0.00 ^a	2.6±0.52 ^a

注:同列数据没有相同小写字母者差异显著($P < 0.05$)。以下各表同

Note: The data on the same day (columns) marked without the same superscript lowercase letters (a-c) differ significantly ($P < 0.05$).

2.2 H5N1 抗体效价的动态变化

免疫后第 7 天,各组的抗体效价均为 0;第 14 天以后,试验组的抗体水平持续上升,在第 21d 达

到最大值,试验组抗体效价显著高于白油对照组和空白对照组($P < 0.05$) (见表 2)。表明角鲨烯佐剂能够显著提高 H5N1 疫苗的抗体效价。

表 2 各组鸡只免疫 H5N1 灭活疫苗后抗体 HI 效价结果 (log₂)
Table 2 Dynamic changes in the H5N1 antibody titer in all groups (log₂)

组别 Group	免疫后天数 Days after the immunization				
	7	14	21	28	35
Ⅲ	0.0	5.7±0.64 ^c	9.9±0.32 ^c	9.5±0.70 ^c	9.3±0.74 ^b
Ⅳ	0.03.8±0.75 ^b	8.3±0.59 ^b	8.7±0.67 ^b	8.6±0.49 ^b	
Ⅶ	0.0	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a

2.3 H9 抗体效价的动态变化

免疫第 7 天以后,试验组的抗体效价显著高于白油对照组和空白对照组($P < 0.05$) (见表 3)。

表明角鲨烯佐剂能够显著提高 H9 疫苗的抗体效价。

表 3 各组鸡只免疫 H9 灭活疫苗后抗体 HI 效价结果 (log₂)
Table 3 Dynamic changes in the H9 antibody titer in all groups (log₂)

组别 Group	免疫后天数 Days after the immunization				
	7	14	21	28	35
V	3.3±0.42 ^b	9.3±1.23 ^c	10.8±0.42 ^c	10.5±0.52 ^c	10.5±0.70 ^c
Ⅵ	2.5±0.52 ^a	8.0±0.94 ^b	8.4±0.67 ^b	9.6±0.52 ^b	9.4±0.63 ^b
Ⅶ	2.0±0.00 ^a	2.0±0.00 ^a	3.0±0.00 ^a	2.3±0.42 ^a	3.0±0.00 ^a

2.4 T 淋巴细胞增殖的动态变化

2.4.1 免疫 ND 试验组与对照组 T 淋巴细胞增殖的动态变化

免疫后,除第 21 天角鲨烯佐剂组和白油佐剂组的 A₅₇₀ 值差异不显著($P > 0.05$);第 7、14、28 和

35 天,角鲨烯佐剂组的 A₅₇₀ 值均显著高于白油佐剂对照组($P < 0.05$) (见表 4)。从试验组 A₅₇₀ 值峰值出现的时间看,角鲨烯佐剂组在免疫后第 14 天,白油佐剂组在第 21 天。结果表明,角鲨烯佐剂比白油佐剂促进淋巴细胞增殖迅速,效果好。

表 4 免疫 ND 试验组与对照组 T 淋巴细胞增殖的动态变化 (A₅₇₀ 值)
Table 4 Dynamic changes in T lymphocyte proliferation after the immunization of ND in all groups (A₅₇₀ value)

组别 Group	免疫后天数 Days after the immunization				
	7	14	21	28	35
I	0.251±0.041 ^c	0.591±0.046 ^c	0.493±0.014 ^b	0.458±0.028 ^c	0.393±0.011 ^c
Ⅱ	0.226±0.070 ^b	0.328±0.017 ^b	0.506±0.018 ^b	0.424±0.014 ^b	0.364±0.009 ^b
Ⅶ	0.153±0.012 ^a	0.138±0.013 ^a	0.164±0.010 ^a	0.134±0.012 ^a	0.143±0.025 ^a

2.4.2 免疫 H5N1 试验组与对照组 T 淋巴细胞增殖的动态变化

免疫后第 7 和 21 天,角鲨烯佐剂组和白油佐剂组的 A₅₇₀ 值差异不显著 ($P > 0.05$);第 14、28

和 35 天,角鲨烯佐剂组的 A₅₇₀ 值显著高于白油佐剂对照组($P < 0.05$) (见表 5)。从试验组 A₅₇₀ 值峰值出现的时间看,角鲨烯佐剂组在免疫后第 14 天,白油佐剂组在第 21 天。结果表明,角鲨烯

佐剂促进淋巴细胞增殖效果好。

表 5 免疫 H5N1 试验组与对照组 T 淋巴细胞增殖的动态变化 (A570 值)

Table 5 Dynamic changes in T lymphocyte proliferation after the immunization of H5N1 in all groups (A 570 value)

组别 Group	免疫后天数 Days after the immunization				
	7	14	21	28	35
III	0.248±0.053 ^b	0.601±0.013 ^c	0.501±0.054 ^b	0.456±0.026 ^c	0.390±0.012 ^c
IV	0.234±0.032 ^b	0.284±0.040 ^b	0.515±0.022 ^b	0.409±0.011 ^b	0.356±0.013 ^b
VII	0.153±0.012 ^a	0.138±0.013 ^a	0.164±0.010 ^a	0.134±0.012 ^a	0.143±0.025 ^a

2.4.3 免疫 H9 试验组与对照组 T 淋巴细胞增殖的动态变化

免疫后,除第 21 天角鲨烯佐剂组和白油佐剂组的 A₅₇₀ 值差异不显著 ($P>0.05$);第 7、14、28 和 35 天,角鲨烯佐剂组的 A₅₇₀ 值均显著高于白油佐

剂对照组 ($P<0.05$) (见表 6)。从试验组 A570 值峰值出现的时间看,角鲨烯佐剂组在免疫后第 14 天,白油佐剂组在第 21 天。结果表明,角鲨烯佐剂比白油佐剂促进淋巴细胞增殖迅速,效果好。

表 6 免疫 H9 试验组与对照组 T 淋巴细胞增殖的动态变化 (A570 值)

Table 6 Dynamic changes in T lymphocyte proliferation after the immunization of H9 in all groups (A 570 value)

组别 Group	免疫后天数 Days after the immunization				
	7	14	21	28	35
V	0.258±0.028 ^c	0.586±0.030 ^c	0.489±0.024 ^b	0.472±0.026 ^c	0.388±0.021 ^c
VI	0.231±0.020 ^b	0.343±0.020 ^b	0.496±0.050 ^b	0.413±0.012 ^b	0.352±0.018 ^b
VII	0.153±0.012 ^a	0.138±0.013 ^a	0.164±0.010 ^a	0.134±0.012 ^a	0.143±0.025 ^a

3 结语

疫苗用于传染性疾病的预防,被认为是医药界的一项巨大成功^[17]。尽管现在研究的有许多佐剂,包括弗氏不完全佐剂^[18-19], ISCOMS^[20-21], 脂质体^[22], 类脂 A^[23], 细胞因子^[24], ISA 51^[25-26], QS 21^[27] 和类脂 A 衍生物^[18] 等,但是几乎没有应用到疫苗市场的,铝佐剂仍然是疫苗应用最广泛的佐剂。

目前,用于预防黑素瘤的黑素瘤疫苗^[28] 和预防乙肝的 RC-529^[29] 的 2 种新型佐剂已经获得批准应用。还有其它一些佐剂已进入临床试验阶段,包括 ISA51^[25,26], QS21^[27], ISCOMS^[30], MPL^[31] 等。

角鲨烯作为新型佐剂,由于其良好的稳定性、粘度低,活性高、良好的耐受性,在美国多有研究。本试验结果表明,使用角鲨烯制备灭活油乳剂苗,能显著增强 SPF 鸡的特异性免疫应答反应,提高

疫苗的免疫效力,可以在保证免疫效果的情况下,明显加快油佐剂灭活疫苗的起效时间。这可能与角鲨烯粘度低,吸收快的特点有关。

淋巴细胞转化状态与用 MTT 法所测得的 A₅₇₀ 值呈正比。本试验结果表明,角鲨烯作为佐剂能够促进 T 淋巴细胞增殖,并能促进脾细胞或 ConA 诱导的淋巴细胞的转化。

本试验初步研究了角鲨烯作为新型佐剂制备的新城疫、H5N1 和 H9 11 灭活疫苗在 SPF 鸡体内的抗体效价水平以及对机体的细胞免疫作用,角鲨烯制备的佐剂疫苗可能不是通过储库形成起作用,乳剂本身可能具有佐剂活性。但是其临床效果还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王大勇,于庆海,周园,等. 现代免疫佐剂研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(2): 189-191.

- [2] 张君,郭智波,张云浦,等. 免疫增强剂提高抗体水平的比较试验 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2005, 6: 62-63.
- [3] Deprez P P, Volkman J K, Davenport S R. Squalene content and neutral lipid composition of livers from deep-sea sharks caught in Tasmanian waters [J]. *Aust J Mar Freshwater Res*, 1990, 41(3): 375-387.
- [4] Bakes M J, Nichols P D. Lipid, fatty acid and squalene composition of liver oil from six species of deep-sea sharks collected in southern Australian waters [J]. *Comp Biochem Physiol*, B; *Biochem Mol Biol*, 1995, 110B(1): 267-275.
- [5] Tomita Y. Immunological role of vitamin A and its related substances in prevention of cancer [J]. *Nutr Cancer*, 1983, 5(3-4): 187-194.
- [6] Ohkuma T, Otagiri K, Tanaka S, et al. Intensification of host's immunity by squalene in sarcoma 180 bearing ICR mice [J]. *J Pharmacobio-Dyn*, 1983, 6(2): 148-151.
- [7] Rsenthal M L. Inhibiting nitrosamine formation [P]. US Patent: 4 189 465, 1980-02-19.
- [8] 周金煦,李晓玉,汤宝娣,等. 角鲨烯的抗肿瘤和免疫调节作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1990, 4(2): 151-152.
- [9] Yamaguchi I T, Nakagawa M, Hidaka K, et al. Potentiation by squalene of antitumor effect of 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in a murine tumor system [J]. *Jpn J Cancer Res (GANN)*, 1985, 76(10): 1 021-1 026.
- [10] Nakagawa M, Yamaguchi T, Fukawa H, et al. Potentiation by squalene of the cytotoxicity of anticancer agents against cultured mammalian cells and murine tumor [J]. *Jpn J Cancer Res (GANN)*, 1985, 76(4): 315-520.
- [11] Nakanihl M. Preparation of a squalene-containing composition containing a stabilizing agent [P]. JP Patent: 63 005 036, 1988-01-11.
- [12] Harak, Eguchi Y. Composition for cleaning and wiping the anal region [P]. FR Patent: 2 547 197, 1984-12-14.
- [13] Aioi A, Horiguchi T, Shimizu T, et al. Vitamin E topical preparations for treatment of inflammatory skin disease [P]. JP Patent: 06 247 852, 1994-09-06.
- [14] Chan P, Tomlinson B, Lee C, et al. Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia [J]. *J Clin Pharmacol*, 1996, 36(5): 422-427.
- [15] Podda A, Guidice D. MF-59 adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2003, 2(2): 197-204.
- [16] Ashwood P, Wakefield A J. Immune activation of peripheral blood and mucosal CD₃⁺ lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2006, 173: 126-134.
- [17] World Health Report. World Health Organisation. 2000. <http://www.who.int/whr/en/reference>
- [18] Mckercher P D, Graves J H. A review for the current status of oil adjuvants in foot-and-mouth-disease vaccines [J]. *Dev Biol Stand*, 1976, 35: 107-112.
- [19] Claassen E, Leeuw D E W, Greeve D E P, et al. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula [J]. *Res Immunol*, 1992, 143(5): 478-483.
- [20] Morein B, Villacres-Eriksson M, Lovgren-Bentsson K. Iscom, a delivery system for parenteral and mucosal vaccination [J]. *Dev Biol Stand*, 1998, 92: 33-39.
- [21] Classen I, Osterhaus A. The Iscom structure as an immune enhancing moiety: experiences in viral systems [J]. *Res Immunol*, 1992, 143(5): 531-541.
- [22] Bueting A, Rooijen M, Van N, et al. Liposomes as antigen carriers and adjuvants in vivo [J]. *Res Immunol*, 1992, 143(5): 541-548.
- [23] Alving C R. Lipopolysaccharide: Lipid A and liposomes containing Lipid A as immunologic adjuvants [J]. *Immunobiology*, 1993, 187(3-5): 430-446.
- [24] Ahlers J D, Dunlof N, Alling D W, et al. Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 1997, 158(8): 3947-3958.
- [25] Driel Van W J, Rensing M E, Kenter G G, et al. Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(6): 946-952.
- [26] Slingluff J R C L, Yamshchikal G, Neese P, et al. Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100 (280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(10): 3012-3024.
- [27] Livingstone P O, Adluri S, Helling F, et al. Phase I trial of immunological adjuvant QS-21 with a GM2 ganglioside-KLH conjugate vaccine in patients with malignant melanoma [J]. *Vaccine*, 1994, 12: 1275-1280.
- [28] Sondak V K, Sosman J A. Results of clinical trials with an allogeneic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine [J]. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13: 409-415.
- [29] Evans J T, Cluff C W, Johnson D A, et al. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi. 529 [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2003, 2(2): 219-229.
- [30] Rimmelzwaan G F, Niewkoop N, Brnadenbur G A, et al. A randomized, double blind study in young healthy adults comparing cell mediated and humoral immune responses induced by influenza ISCOM vaccines and conventional vaccines [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 1180-1187.
- [31] Bienzle U, Gunther M, Neuhaus R, et al. Immunization with an adjuvant Hepatitis B vaccine after liver transplantation for Hepatitis B-related disease [J]. *Hepatology*, 2003, 38(4): 811-819.

Effects of Squalene adjuvant on immune response in chickens

LI Li-Jie^{1,3}, YANG Kui-Zhen², LI Ming-Yi³, LI Yan-Tuan^{1*}, HAO Feng-Qiang³

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

2. *Sixth People's Hospital of Qingdao City, Qingdao, Shandong 266033;*

3. *Shandong Sinder Technology Co., Ltd., Qingdao, Shandong, 266061*)

Abstract: Objective This study evaluates the effects of squalene adjuvant on the immune responses in SPF chicken model. **Methods** The adjuvanticity of squalene in newcastle disease (ND), avian influenza (AI) H5N1 and H9 was investigated by examining antibody titers and lymphocyte proliferation following immunization in chicken by micro-hemagglutination inhibition method and MTT method. **Results** Result shows that after given inactivated vaccine with squalene adjuvant, HI antibody was detected as positive after 2 weeks of immunization and reached maximum during the 3rd week, and there was no significant decline in the 4th week ($P>0.05$); peripheral blood T-lymphocyte proliferation in the immunized group was significantly higher than that in the control group. **Conclusion** In conclusion, ND, H5N1 and H9 inactivated vaccine prepared with squalene adjuvant can increase the antibody titer and cellular immune function in SPF chicken.

Key words: squalene; new adjuvant; antibody titer; lymphocyte proliferation

12 种海洋真菌发酵液粗多糖抗流感病毒 (H1N1) 活性研究^{△*}

刘亚男^{1,2}, 王伟^{1,2}, 李丹^{1,3}, 孙学超^{1,2}, 朱天骄^{1,3}, 于广利^{1,2*}

(1. 海洋药物教育部重点实验室; 2. 山东省糖科学与糖工程重点实验室;
3. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛, 266003)

摘要:目的 从红树林来源的黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*)及秀丽穗霉(*Spicaria elegans* KLA03)的 6 种培养基发酵液中获得 12 种粗多糖并评价其抗流感病毒(H1N1)活性。方法 运用高效液相色谱(HPLC), 红外光谱(IR)等对各粗多糖的单糖组成和基本结构特征进行分析比较; 采用犬肾(MDCK)细胞模型结合细胞病变效应(CPE)实验对其体外抗 H1N1 活性进行评价。结果 所有粗多糖均含有甘露糖、葡萄糖和半乳糖, 某些多糖还含有氨基葡萄糖、氨基半乳糖或少量木糖与阿拉伯糖; 在 250 μg/mL 的浓度下, 各多糖呈现了不同的抗 H1N1 病毒活性, 其中 AF-3 及 SEK-4 对 H1N1 抑制率分别达到为 69.6 % 和 67.5 %。结论 通过改变生长条件, 从海洋真菌发酵液中得到了 2 种具有较强抑制 H1N1 活性的胞外多糖。

关键词: 秀丽穗霉; 黄柄曲霉; 多糖; 抑制活性; H1N1

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1002-3461(2013)01-023-07

海洋真菌因其特殊的生活环境, 能够分泌产生结构新颖的代谢产物, 并成为寻找天然活性物质的宝贵资源之一^[1]。Rochfort^[2]等人从黄柄曲霉中得到具有抑制 HIV-1 整合酶活性的细胞毒素, Lin^[3]等人从秀丽穗霉中得到一系列结构新颖的细胞毒素。目前, 已从秀丽穗霉及黄柄曲霉不同培养基的次级代谢产物中得到各种细胞松弛类化合物^[4-5], 但对其发酵液中糖类物质的研究尚未见报导。

本文对红树林来源的秀丽穗霉及黄柄曲霉不同培养基发酵液提取, 获得 12 种水溶性多糖, 对其基本组成及体外抗流感病毒(H1N1)活性分析与评价, 为这 2 株真菌发酵液中多糖物质的深入研究提供了参考。

1 材料与仪器

1.1 材料和试剂

黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*), 秀丽穗霉(*Spicaria elegans* KLA03)采自青岛胶州海湾泥,

由中国海洋大学医药学院天然产物化学实验室分离鉴定。各种单糖标准品, 标准牛血清白蛋白(BSA), 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, 99 %)购于美国 Sigma 公司; Eclipse XDB-C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); 乙腈(色谱纯)购于 Merck 公司; 氯仿、甲醇等其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验仪器

pH 计(Model 818, 上海奥立龙公司); 离心机(TGL-16C/ TDL-150 型, 上海安亭科学仪器厂); 恒温真空干燥箱(DZF-150 型, 郑州长城科工贸有限公司); 高效液相色谱仪(LC-20AD, RID-10A, 日本岛津公司); 紫外可见分光光度计(UV-2102 PCS, 北京普析通用仪器有限责任公司); 红外光谱仪(Nicolet Nexus 470 型, Thermo Electron 公司)。

2 实验方法

2.1 菌株的发酵

* **△基金项目:** 国家自然科学基金项目(31070724); 国家海洋局公益专项(201005024); 长江学者和创新团队发展计划(IRT0944)资助
作者简介: 刘亚男(1988-), 硕士研究生, 研究方向为药物化学。

* **通讯作者:** 于广利, 男, 教授 E-mail: glyu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2012-05-02

黄柄曲霉菌株(下称 AF)及崎丽穗霉菌株(下称 SEK),6种培养基配方如下。

1号培养基:葡萄糖($20.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),酵母提取物($3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),麦芽糖($3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),蛋白胨($5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

2号培养基:淀粉($20.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),大豆($15.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),酵母提取物($5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),蛋白胨($2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),海盐($16.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

3号培养基:甘油($20.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),酵母提取物($10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),蛋白胨($10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),海盐($16.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

4号培养基:淀粉($10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),蛋白胨($1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),60%海盐($33.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

5号培养基:葡萄糖($20.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),酵母提取物($3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),麦芽提取物($3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),蛋白胨($5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),海盐($33.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

6号培养基:葡萄糖($20.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),土豆($200.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),琼胶($20.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

培养条件:pH=7.2,摇床转速130 r/min,28℃连续培养7 d

2.2 发酵液粗多糖的提取

各发酵液经布氏漏斗(G5)抽滤除去菌丝体及其他杂质,将得到的滤液过膜浓缩醇沉,沉淀依次用乙醇、丙酮洗涤3次后,再溶于适量蒸馏水中,置透析袋(3.5 kDa MWCO)透析除盐,冷冻干燥,备用。

2.3 基本理化性质测定

分别以 Man、Glc 为标准品采用硫酸-苯酚法^[6]测定总糖含量;以 BSA 为标准品采用 Folin-酚比色法^[7]测定粗蛋白含量;采用硫酸钡-明胶比浊法^[8]测定硫酸基含量。

2.4 单糖组成及红外光谱(IR)测定

称取1 mg 样品溶于1 mL 双蒸水中,加入1 mL $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟乙酸,105℃降解6 h,甲醇除三氟乙酸,采用PMP柱前衍生高效液相色谱法测定单糖组成^[9]。样品用 P_2O_5 干燥48 h,采用溴化钾压片法对样品进行红外光谱(IR)测定^[10]。

2.5 体外抗甲型流感病毒株 A/PR/8/34 (H1N1)活性实验

采用CPE抑制实验测定样品对甲型流感病毒H1N1的抑制率和半数抑制浓度(IC_{50}),待96孔板中的MDCK细胞长成单层后,接种病毒感染复数(MOI)为0.1的IAV病毒液,37℃孵育1 h后弃去上清,并加入不同浓度的含药培养液200 μL ,于37℃、5% CO_2 孵育48 h,阳性对照为利巴韦林,同时设正常细胞组和病毒对照组,其后采用4%多聚甲醛固定,并利用结晶紫染液染色30 min后,测各孔于570 nm波长下OD值,并按下列公式计算各样品对H1N1病毒的抑制率:抑制率%=(药物处理组OD值-病毒对照组OD值)/(正常细胞对照组OD值-病毒对照组OD值) $\times 100\%$,按Reed-Meuench法计算 IC_{50} 。

3 结果与讨论

3.1 发酵液粗多糖的提取

不同菌株在不同的培养基中生长状态各异^[11],黄柄曲霉及崎丽穗霉在6种不同的培养基中发酵生长状态如表1所示,其发酵液粗多糖性状及得率如表2所示,其中AF-3及AF-2中多糖得率分别为10.1%和9.7%(质量体积比),SEK-1及SEK-3多糖得率分别为8.0%和7.9%(质量体积比)。

表1 黄柄曲霉(AF系列)及崎丽穗霉(SEK系列)在6种不同培养基中的生长状态

Table 1 The growth status of *Aspergillus flavipes* and *Spicaria elegans* KLA03 in six different culture media

培养基编号 Media number	AF 系列		SEK 系列	
	发酵液颜色 Fermentation broth color	菌种状态 Strain state	发酵液颜色 Fermentation broth color	菌种状态 Strain state
1	棕黄色	谷粒状	棕黄色	谷粒状
2	深棕黄色	均匀的黏液	深棕黄色	絮状
3	黄色	谷粒状	灰黄色	絮状
4	淡黄色	谷粒状	棕红色	谷粒状
5	棕红色	谷粒状	深棕红色	絮状
6	棕黄色	黏稠的谷粒状	黄色	絮状

表 2 AF 及 SEK 系列发酵液中粗多糖性状及得率

Table 2 The characters and yields of polysaccharides from AF and SEK fermentation solution

培养基编号 Media number	AF 系列		SEK 系列	
	性状 Characteristic	得率(%质量体积比) Yield	性状 Characteristic	得率(%质量体积比) Yield
1	灰色粉末	5.2	棕色块状	8.0
2	棕色片状	9.7	棕色粉末	5.8
3	橙色粉末	10.1	橙色粉末	7.9
4	橙色粉末	0.4	棕色粉末	1.3
5	灰黑色粉末	4.7	棕黄色粉末	0.5
6	橙黄色粉末	0.6	棕灰色粉末	0.4

3.2 基本理化性质分析

采用化学方法检测 12 种粗多糖的化学成分,结果如表 3 所示,AF-4 及 SEK-4 总糖含量较高,分别为 79.0 %和 81.0 %,蛋白含量较低,分别为 8 %和 12 %,这可能是因为菌体在 4 号培养基中更易产生多糖,而在其他 10 种培养基中所得粗多糖的蛋白含量从 16.9 %~26.0 %不等,糖含量从

31.8 %~40.5 %不等。由于粗多糖是由 Glc, Man 和 Gal 等多种单糖组成的杂多糖,且结合或掺杂蛋白等其他杂质,从而引起总糖含量存在一定误差^[12],样品有待于进一步分离纯化。从表 3 还可以看出,除了 AF-4,AF-6,SEK-4 不含硫酸根外,其余样品含有少量硫酸根(3.2 %~7.9 %)。

表 3 AF 及 SEK 系列发酵液中粗多糖理化性质比较

Table 3 The physicochemical properties comparison of polysaccharides from AF and SEK fermentation solutions

	培养基编号 Media number	总糖/% Sugar content	粗蛋白/% Crude protein content	硫酸根/% Sulfate content
	AF 系列	1 ^a	31.8	17.9
2 ^a		33.2	21.2	6.4
3 ^a		36.8	18.0	7.9
4 ^b		79.0	8.0	nd
5 ^a		39.7	19.0	4.2
6 ^b		35.3	16.9	nd
SEK 系列	1a	40.5	21.3	3.9
	2a	37.5	19.6	6.2
	3a	35.1	26.0	7.5
	4b	81.0	12.0	nd
	5b	33.0	22.0	3.2
	6b	37.7	21.2	4.8

nd:未检测出;a:以 Man 为单糖标准品;b:以 Glc 为单糖标准品

nd;undetected; a: with mannose as a standard; b: with glucose as a standard

3.3 单糖组成分析

不同培养基发酵液得粗多糖的单糖各不相同^[13]。AF 及 SEK 系列粗多糖单糖组成分析谱图

见图 1,单糖摩尔比见表 4。从图表中可以看出,AF-4,AF-6 及 SEK-4 中 Glc 含量最高,分别高达 85.5 %,80.4 %和 87.0 %;AF-1,AF-3,SEK-5 及

SEK-6 的单糖种类主要为 Man 和 Glc,分别占总单糖比例的 72.5 %,80.7 %,81.9 %和 81.3 %。

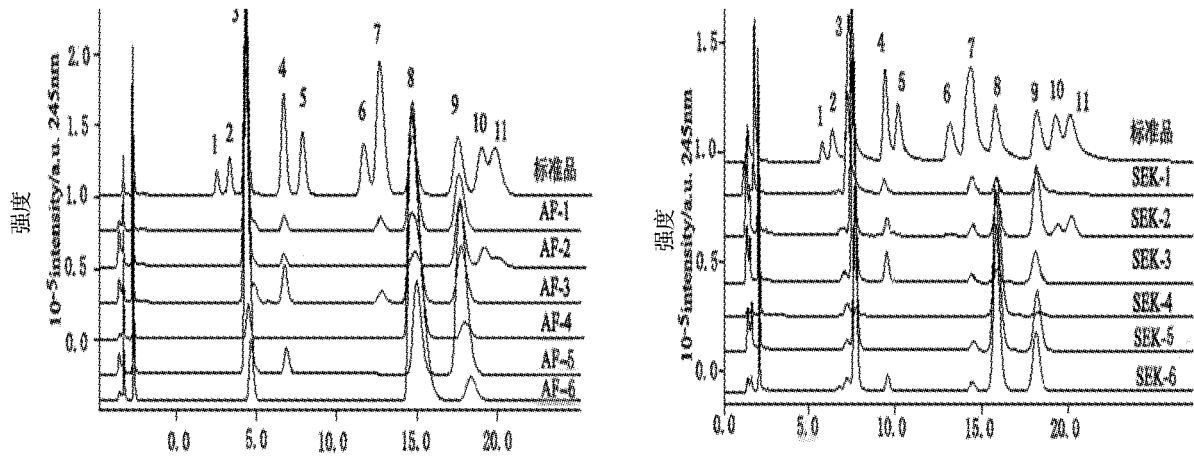


图 1 AF 及 SEK 系列发酵液粗多糖单糖组成分析

Fig. 1 The monosaccharide compositions analysis of polysaccharides from AF and SEK fermentation solutions (1. GluA 2. ManA 3. Man 4. GlcN 5. GlcA 6. GalA 7. GalN 8. Glc 9. Gal 10. Xyl 11. Ara)

表 4 AF 及 SEK 系列发酵液粗多糖单糖组成及其摩尔比

Table 4 The monosaccharide compositions and molar ratios of AF and SEK fermentation solution polysaccharides

培养基编号 Media number	单糖组成及其摩尔比/% The monosaccharide compositions and molar ratios/%							
	Man	GlcN	GalN	Glc	Gal	Xyl	Ara	
AF 系列	1	39.1	2.9	4.5	33.4	20.1	—	—
	2	66.5	2.0	—	2.9	22.2	3.9	2.5
	3	43.0	4.2	2.5	37.7	12.6	—	—
	4	8.2	—	—	85.5	6.3	—	—
	5	51.4	2.3	—	13.3	33.0	—	—
	6	12.4	—	—	80.4	7.2	—	—
SEK 系列	1	67.5	4.1	4.7	6.3	17.4	—	—
	2	52.9	2.4	4.9	12.3	18.1	2.5	6.9
	3	73.5	6.5	3.4	5.3	11.3	—	—
	4	7.4	—	—	87.0	5.6	—	—
	5	33.7	—	2.7	48.2	15.4	—	—
	6	36	2.1	2.4	45.3	14.2	—	—

注:—未检测出 — undetected

3.4 红外光谱(IR)分析

AF 及 SEK 系列液粗多糖的红外光谱如图 2 所示。从图 2 可知,3400 cm^{-1} 为糖类化合物多羟基中 O-H 伸缩振动;2930 和 1410 cm^{-1} 属于糖类物质 C-H 伸缩振动和变角振动;1640 cm^{-1} 处为糖蛋白酰胺键中 N-H 伸缩振动峰;1031 cm^{-1} 处的

信号为吡喃环 C-O-C 的伸缩振动峰;1236 cm^{-1} 区域的宽吸收峰为硫酸基的 S=O 伸缩振动,AF-4, AF-PDA 及 SEK-4 在 1236 cm^{-1} 区域没有吸收,说明样品中不含硫酸根,其余 9 种粗多糖在此区域有吸收说明有一定量硫酸根。该结果与表 3 的结果相一致。

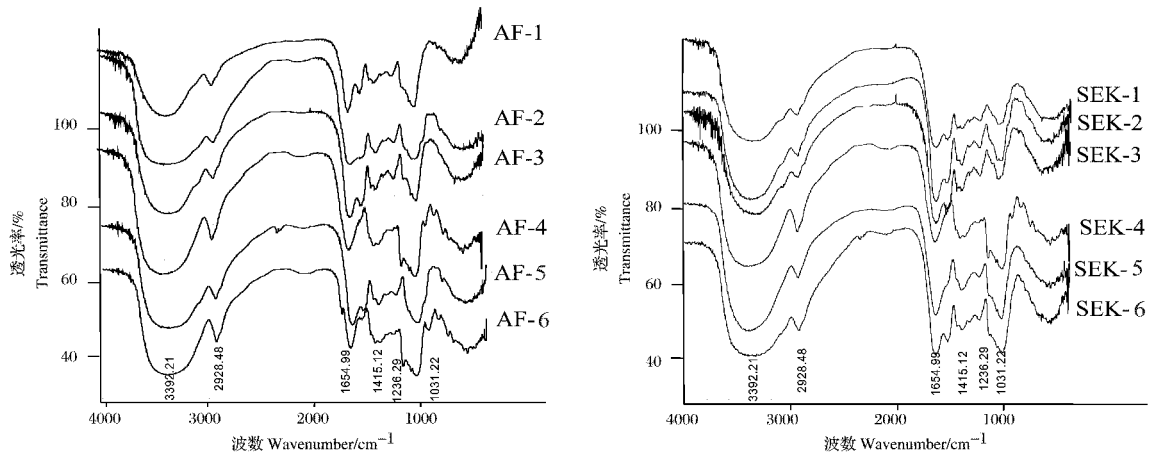


图2 AF及SEK系列发酵液中粗多糖红外光谱图

Fig. 2 The FTIR spectrum of series polysaccharides from AF and SEK fermentation solution

3.5 体外抗甲型流感病毒株 A/PR/8/34 (H1N1) 活性实验

AF及SEK系列粗多糖的体外抗H1N1活性与阳性对照药利巴韦林的实验对比如图3、表5所示。AF-3, SEK-4在250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下对甲型流感病毒株 A/PR/8/34(H1N1)的抑制率均大于67%。周金凤^[14]等人采用不同培养基对药用真菌灵芝进行液体发酵培养,研究其发酵液上清粗

提物对植物病原真菌抑菌活性,发现不同培养基的发酵液上清粗提物,对不同植物病原真菌的抑菌活性的确存在差异性,本文在对12种发酵液提取物体外抗H1N1活性中,也得到类似的结果,所得粗品体外抗病毒活性与其总糖含量、蛋白含量、单糖组成及其摩尔比有着密切的关系,表明其抗病毒活性受多种因素影响。

表5 AF与SEK发酵液多糖对甲型流感病毒H1N1抑制作用

Table 5 The inhibition effects of AF and SEK fermentation solution polysaccharides against H1N1 virus

	溶剂 Solvent	工作浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Working concentration	平均抑制率/% The average inhibition rate	\pm SD
AF-1	H ₂ O	250	31.1	\pm 2.2
AF-2	H ₂ O	250	1.4	\pm 0.4
AF-3	H ₂ O	250	69.6	\pm 4.1
AF-4	H ₂ O	250	26.4	\pm 0.9
AF-5	H ₂ O	250	36.1	\pm 1.4
AF-6	H ₂ O	250	37.4	\pm 1.2
SEK-1	H ₂ O	250	11.8	\pm 0.7
SEK-2	H ₂ O	250	36.5	\pm 5.1
SEK-3	H ₂ O	250	29.7	\pm 1.1
SEK-4	H ₂ O	250	67.5	\pm 2.7
SEK-5	H ₂ O	250	44.9	\pm 2.1
SEK-6	H ₂ O	250	46.6	\pm 1.7
利巴韦林	H ₂ O	250	88.0	\pm 1.4

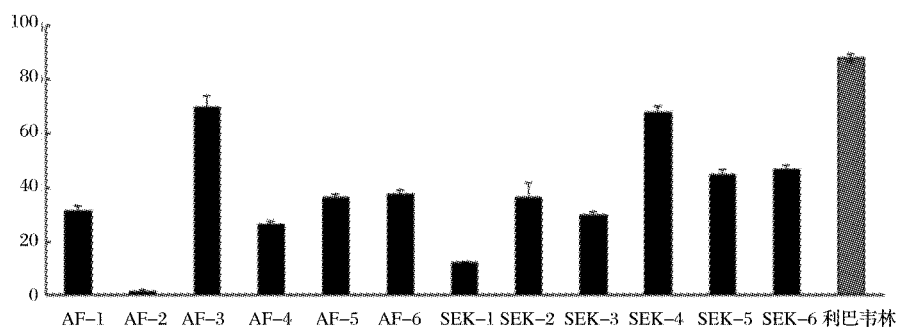


图3 AF与SEK发酵液多糖对甲型流感病毒H1N1抑制作用

Fig. 3 The inhibition effects of AF and SEK fermentation solution polysaccharides against H1N1 virus

4 结论

本文以红树林来源的黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*)及绮丽穗霉(*Spicaria elegans* KLA03)在6种不同培养基中的发酵液为原料,经浓缩醇沉和透析得到12种粗多糖,在对其得率、单糖组成和基本理化性质分析基础上,进一步评价且体外抗流感病毒(H1N1)活性,发现从AF-3及SEK-4获得的多糖抗H1N1流感病毒作用较强。从AF-3和SEK-4的组成分析可知,AF-3是由甘露糖、葡萄糖、半乳糖以及少量氨基葡萄糖和氨基半乳糖组成的,此外还含有7.9%的硫酸基和18%的蛋白,是一种结构复杂的硫酸化糖蛋白聚合物;而SEK-4除了主要含有葡萄糖外,还有少量甘露糖和半乳糖及12%蛋白。经进一步采用酶解去除蛋白后,2个样品的抗H1N1活性均有所下降,关于AF-3及SEK-4多糖的抗病毒活性机理,还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 熊枫,郑忠辉,黄耀坚,等. 从深海沉积物中筛选具有抗菌、抗肿瘤活性的海洋真菌[J]. 厦门大学学报(自然科学版). 2006, 45(003): 419.
- [2] Rochfort S, Ford J, Ovenden S, et al. A novel aspochalasin with HIV-1 integrase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes*[J]. *The Journal of antibiotics*. 2005, 58(4): 279.
- [3] Lin Z, Zhu T, Wei H, et al. Spicochalasin A and New Aspochalasins from the Marine-Derived Fungus *Spicaria elegans*[J]. *European Journal of Organic Chemistry*. 2009, 2009(18): 3045.
- [4] 王发左. 海洋真菌抗肿瘤活性次级代谢产物及其生物转化研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2008.
- [5] 林贞建. 真菌次级代谢产物的化学多样性开发及生物活性研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2009.
- [6] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical chemistry*. 1956, 28(3): 350.
- [7] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J biol chem*. 1951, 193(1): 265.
- [8] Terho T T, Hartiala K. Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans[J]. *Analytical Biochemistry*. 1971, 41(2): 471.
- [9] 付海宁,赵峡,于广利,等. 盐藻多糖单糖组成分析的四种色谱方法比较[J]. 中国海洋药物. 2008, 27(4): 30.
- [10] 王培培,于广利,赵峡,等. 海茸多糖的分离纯化与结构表征[J]. 中国海洋药物. 2010, 29(5): 1.
- [11] 肖辉川,李术惠,德玮. 微生物在不同培养基上生长情况的研究[J]. 实用医技杂志. 2006, 5(10): 1638.
- [12] 陈茵,郭守东,徐健,等. 海绵内生真菌胞外多糖理化性质及自由基清除活性研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版). 2010, 40(5): 1.
- [13] Khondkar P, Aidoo K E, Tester R F. Sugar profile of extracellular polysaccharides from different *Tremella* species[J]. *International journal of food microbiology*. 2002, 79(1-2): 121.
- [14] 周金凤,姚强,张露萍,等. 灵芝不同培养基发酵液粗提物抑菌活性研究[J]. 中国酿造. 2010, 3(3): 53-55.

Anti-influenza virus (H1N1) activities of twelve crude polysaccharides from fermentation solution of marine fungi

LIU Ya-nan^{1,2}, WANG Wei^{1,2}, LI Dan^{1,3}, SUN Xue-chao^{1,2}, ZHU Tian-jiao^{1,3}, YU Guang-li^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Glycoscience and Glycotechnology;

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

Abstract: objective To extract 12 kinds of crude polysaccharides from 6 kinds of fermentation solution of mangrove *Aspergillus flavipes* and *Spicaria elegans* KLA03 and to evaluate their anti-influenza virus (H1N1) activities. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) and infrared spectroscopy (IR) were used to compare and analyze the monosaccharide composition and structural characteristics of those 12 crude polysaccharides. In vitro anti-H1N1 virus activities were evaluated by cytopathic effect (CPE) assay using madin-darby canine kidney (MDCK) cell model. **Results** All crude polysaccharides contain mannose, glucose and galactose, and some of them also contain glucosamine, galactosamine or xylose and arabinose. Under 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration, all polysaccharides showed different anti-H1N1 virus activities, especially the inhibition rates of AF-3 and SEK-4 to H1N1 were found to be 69.6 % and 67.5 %, respectively. **Conclusion** Two kinds of exopolysaccharides that showed strong inhibitory activities to H1N1 were acquired from the fermentation solution by changing growth conditions of marine fungus.

Key words: *Aspergillus flavipes*; *Spicaria elegans* KLA03; polysaccharides; inhibition; H1N1

不同来源的壳寡糖产品的质量分析^{△*}

王世欣, 李春霞*, 赵峡, 高丽霞, 管华诗

(中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东省糖科学与糖工程重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:目的 对 7 种不同厂家壳寡糖产品(W-1~W-7)的相对分子质量、聚合度、脱乙酰度和蛋白质含量等指标进行分析检测, 比较产品的质量差异, 为壳寡糖质量标准的制定和产品的选择提供参考依据。方法 利用高效凝胶渗透液相色谱测定相对分子质量, 电喷雾质谱技术结合薄层色谱分析考察产品的聚合度分布, 核磁共振波谱技术测定脱乙酰度, 并对产品的蛋白含量、水分、灰分、酸碱度等进行分析检测。结果 W-1、W-6 及 W-7 的相对分子质量较小, 溶解度好, 寡糖聚合度分布较均匀, 为最佳的寡糖产品; W-2 的寡糖及低聚糖含量相当, 相对分子质量分布较宽; W-3 及 W-4 的相对分子质量较大, 溶解性较差, 寡糖含量低; W-5 的相对分子质量虽小, 但聚合度分布不均匀。结论 不同厂家的壳寡糖产品在相对分子质量、聚合度和杂质含量方面各有差异, 可能导致其活性及应用的差异, 本研究结果将为壳寡糖的质量分析提供参考, 同时为不同行业使用及选择壳寡糖提供借鉴。

关键词:壳寡糖; 产品; 质量分析

中图分类号: R927

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2013)01-030-07

壳寡糖(chitooligosaccharides, COS)是由壳聚糖通过物理、化学、生物等方法降解得到的聚合度在 20 以下的低分子量壳聚糖, 是由 2-氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖通过 β-1,4 糖苷键连接而成。壳寡糖作为带正电荷的碱性寡糖, 具有良好的水溶性和独特的生物活性, 如提高机体免疫力^[1]、抗肿瘤^[2]、抗菌^[3]、抗病毒^[4], 诱导植物产生广谱抗性、调节植物生长等, 因而在医药、食品、农业等领域具有广泛的应用前景。壳寡糖的功效及其应用是当今国内外研究和开发的重点, 并且壳寡糖的生物功能与其聚合度紧密相关, 如壳六糖具有抗肿瘤活性^[5]。然而目前壳寡糖的质量指标还是一个空白, 这极大的限制了壳寡糖的进一步应用。目前, 除了农业部 2004 年颁布的中华人民共和国水产行业标准《甲壳素和壳聚糖》(SC/T 3403-2004)外, 国内尚未出台任何针对氨基多糖产品尤其是壳寡糖产品的国家和行业标准^[6]。

目前市场上出现较多的壳寡糖产品, 但产品质量良莠不齐。本文采用高效液相色谱、电喷雾

质谱、核磁共振波谱等现代分析技术并结合化学分析方法对多个厂家的壳寡糖产品进行质量分析和比较, 以期壳寡糖产品需求的行业提供参考和借鉴, 为相关标准的建立提供参考。

1 仪器及试剂

1.1 主要仪器和耗材

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), DINEX Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国 DINEX 公司), G1362A 型示差折光率检测器(RID)(美国 Agilent 公司), JNM-ECP600 型核磁共振仪(日本 JEOL 公司), Nicolet Nexus 470 红外波谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司), Q-TOF-MS 质谱仪(美国 Micro mass 公司); TSK Bio-gel G3000 PW_{XL} 色谱柱(7.8 mm×300 mm), 日本 TOSOH 公司; Click maltose 色谱柱(090821-1), 中国科学院大连化学物理研究所, 硅胶板(G60 F254 20 cm×20 cm), 德国 Merck 公司。

* △基金项目: 海洋公益性行业科研专项基金(201005024); 长江学者和创新团队发展计划(IRT0944); 山东省科技发展计划(2011GSF11815); 青岛市公共领域科技支撑计划项目(11-2-3-73-jh)资助

作者简介: 王世欣(1986-), 女, 博士研究生, 研究方向为海洋药物。

* 通讯作者: 李春霞, 女, 副教授, E-mail: lchunxia@ouc.edu.cn; Tel: 0532-82032030

收稿日期: 2012-08-24

1.2 试剂

不同壳寡糖,分别命名为 W-1(本实验室酶解法自制),W-2、W-3、W-4、W-5、W-6 及 W-7(购买于不同厂家)。盐酸氨基葡萄糖(中国医药(集团)上海化学试剂公司,F20020830),壳四糖(烧津水产化学工业株式会社,9907140),系列右旋糖酐标准品(中国药品生物制品检定所,Mr 分别为 180 Da、2500 Da、4600 Da、7100 Da、10000 Da),日本 SHOWA DENKO 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 相对分子质量测定

称取右旋糖酐标准品及壳寡糖各 5 mg,加入 1 mL 0.2 mol/L HAc-0.1 mol/L NaAc 溶液配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,过 0.22 μm 水滤膜过滤,待测。色谱条件:TSK Bio-Gel G3000 PX_{wl} 柱,流动相为 0.2 mol/L HAc-0.1 mol/L NaAc 溶液,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,示差检测器检测,进样量 20 μL 。分别取标准品及壳寡糖溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图及保留时间。采用 Agilent GPC 软件,以保留时间(min)为横坐标,以相对分子质量对数(logMr)为纵坐标绘制标准曲线。

2.2 聚合度分析

2.2.1 薄层层析分析

展开剂为正丁醇:水:乙酸:氨水=5:10:5:2,显色剂为苯胺—二苯胺显色剂。吸取 0.5 μL 浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的壳寡糖溶液点样于高效硅胶板上。置于预饱和好的层析缸中,上行法展开,取出吹干后显色^[7]。

2.2.2 高效液相分析

色谱条件:“Click maltose”色谱柱,流动相为乙腈:甲酸铵(pH=3.0)溶液。梯度洗脱:45:55~25:75(0~15 min),25:75(15min~18 min),25:75~45:55(18min~25 min)。柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,电喷雾检测器检测,进样量 20 μL ^[8]。

2.2.3 质谱分析

采用正离子模式检测,以体积比为 1:1 的乙腈与 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4 \text{HCO}_3$ 溶解样品,Micro

mass Q-TOF Ultima Global 四极杆飞行时间串联质谱仪记录。

2.3 核磁共振法测定脱乙酰度

30 mg~40 mg 壳寡糖样品溶解在 1 mL D₂O 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 混匀 1 h,蒸干,反复 3 次,将羟基上的活泼氢取代为氘。样品溶于 0.5 mL D₂O(99.96%),在室温下以丙酮为内标进行¹H-NMR 分析^[9]。其中糖环上 C₂ 位乙酰胺基中乙酰基的氢信号在 1.8~1.9 处,糖环上 C₂-C₆ 位氢在 2.6~4.2 处,各样品根据公式(1)进行计算:

$$\text{Ddeac}(\%) = \{1 - [(1/3 I_{\text{CH}_3}) / (1/6 I_{\text{H}_2-\text{H}_6})]\} \times 100 \quad (1)$$

式中: I_{CH_3} ——糖环上 C₂ 位乙酰胺基中乙酰基的 3 个氢信号的积分值; $I_{\text{H}_2-\text{H}_6}$ ——糖环上 C₂-C₆ 位氢信号的积分值,即 H₂、H₃、H₄、H₅、H₆、H₆' 的积分值。

2.4 红外分析

KBr 压片,Nicolet Nexus 470 红外波谱仪记录红外波谱。

2.5 紫外定性分析蛋白含量

对于酶降解制备的壳寡糖产品,含有部分酶蛋白,可利用紫外扫描定性比较蛋白的含量。配置 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的产品溶液,在紫外下做全波长扫描,比较 280 nm 下的吸光度值。

2.6 水分、灰分、水溶性及酸碱度测定

水分测定:参照改良 GB/T14769—1993^[10];灰分测定:550 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧法,参照改良 GB/T 5505—2008^[11];水不溶物测定:参照改良的 NY/T 1115—2006^[12];pH 值测定:1% 水溶液的 pH,参照 GB/T1601—1993^[13]。

3 结果与讨论

壳寡糖的理化性质分析可以从外观、杂质、水分(%),灰分(%),1%水溶液 pH,5%水溶液黏度(cp)、相对分子质量(Mr)、脱乙酰度(%),溶解度(%),单糖含量(%),还原糖含量(%),总糖含量(%),菌落总数(CFU $\cdot\text{g}^{-1}$),大肠菌群(MPN $\cdot\text{g}^{-1}$),霉菌和酵母菌总数(CFU $\cdot\text{g}^{-1}$),致病菌、总砷(mg $\cdot\text{kg}^{-1}$),总铅(mg $\cdot\text{kg}^{-1}$)等多个方面进行,其中相对分子质量、寡糖聚合度及脱乙酰度是鉴别壳寡糖的重要指标。本文主要采用高效液相法、薄层色谱法、质谱法等对聚合度进行分

析,采用核磁共振法确定壳寡糖的脱乙酰度,并采用红外波谱佐证产品结构;并对其相对分子质量、灰分及水分等指标进行了测定。此外,酶法制备的壳寡糖产品中含有酶蛋白,本文采用紫外测定对产品中的蛋白含量进行了简单的定性比较。

3.1 聚合度结果分析

本文主要采用3种方法检测了壳寡糖产品的寡糖组成及其含量,其中TLC法简单直观,新兴的高效液相麦芽糖柱准确快速,而质谱法更加精确。

3.1.1 TLC检测

从TLC图上可直观看出产品中的寡糖组成及其分布(见图1)。其中W-1及W-6的寡糖含量最高,原点处基本没有低聚糖存在;W-2及W-7的寡糖及低聚糖的含量相当,但W-7的糖分布相对较均匀;而W-3及W-4的低聚糖含量较寡糖含量相对高;而W-5中寡糖斑点不明显且聚合度小于3,低聚糖含量较高。

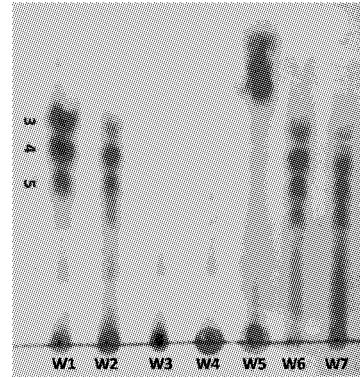


图1 7个壳寡糖产品的TLC分析

Fig. 1 TLC analysis of seven chitooligosaccharides

3.1.2 高效液相法测定聚合度

高效液相色谱法可准确分析产品中寡糖聚合度的分布。其中标准品单糖的出峰时间4.123 min,四糖7.587 min。以下列举具有代表性的W-1、W-4、W-5及W-7的液相分析图(见图2)。

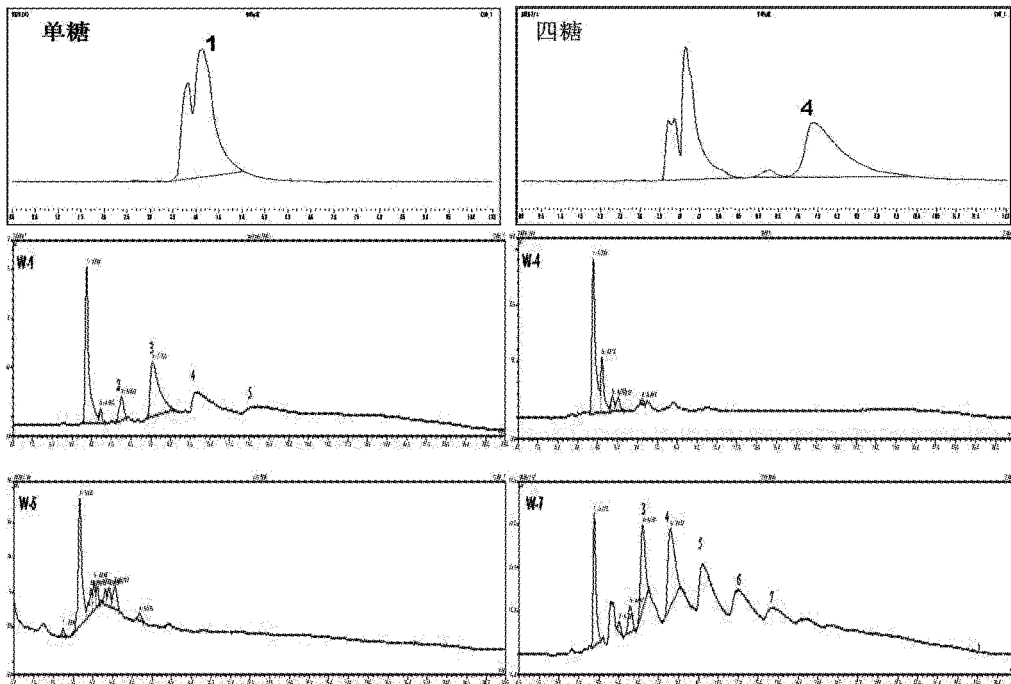


图2 氨基单糖、四糖及壳寡糖产品W-1、W-4、W-5和W-7的高效液相分析图

Fig. 2 HPLC analysis of glucosamine, chitotetraose, W-1, W-4, W-5 and W-7

W-1样品中三、四糖的含量较高,与TLC检测结果一致;TLC显示W-4、W-5中寡糖不明显,高效液相分析图显示二者的单糖含量较高,且之后均没有有效的分离出寡糖峰;W-7的寡糖含量

较高,而且杂质峰较少,寡糖的分离度高、分布均匀,与TLC检测结果一致。

3.1.3 质谱结果分析

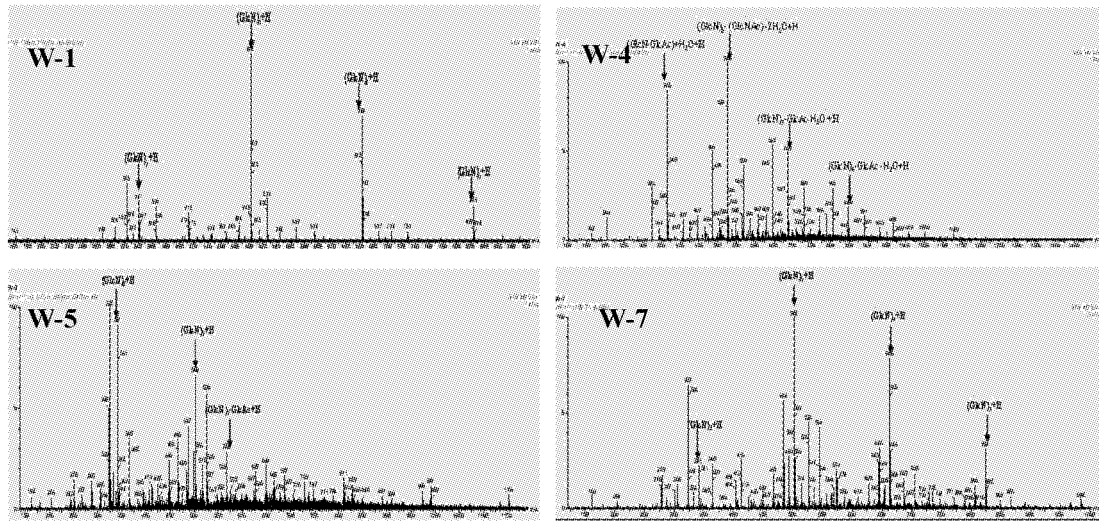


图3 不同壳寡糖产品的质谱分析图

Fig. 3 MS analysis of different chitooligosaccharides

通过上述质谱中信号峰的归属(见表1),结合TLC及高效液相色谱法可基本确定产品中寡糖的结构。测定的7个产品中,可大致分为三类:一类为脱乙酰度高的氨基糖峰,且杂峰相对较少,如

W-1及W-7;第二类主要为含有1个乙酰氨基的寡糖峰,如W-4,可能正是因为含有部分乙酰化的寡糖,其溶解性较其他产品差;第三类为氨基与乙酰氨基并存,且峰较杂,如W-5。

表1 壳寡糖产品的质谱分析中离子峰(m/z)及对应的结构

Table 1 M/z of chitooligosaccharides in MS analysis and their structures

m/z	结构 Structure	产品 Product
323	(GlcN) - H ₂ O + H	W-1, W-2, W-5, W-6, W-7
341	(GlcN) ₂ + H	W-1, W-5
365	(GlcN)- (GlcNAc) + H ₂ O + H	W-1, W-2, W-3, W-4
467	(GlcNAc) ₂ + H	W-5
484	(GlcN) ₃ -H ₂ O + H	W-6, W-7
502	(GlcN) ₃ + H	W-1, W-2, W-5, W-6, W-7
526	(GlcN) ₂ - (GlcNAc) -2H ₂ O + H	W-2, W-3, W-4, W-5, W-7
568	(GlcN) ₂ - (GlcNAc) + H	W-3, W-4, W-5
645	(GlcN) ₄ -H ₂ O + H	W-4
663	(GlcN) ₄ + H	W-1, W-2, W-6, W-7
687	(GlcN) ₃ - (GlcNAc) -H ₂ O + H	W-2, W-3, W-4, W-7
729	(GlcN) ₃ - (GlcNAc) ₂ -H ₂ O + H	W-3, W-4, W-5
771	(GlcN)- (GlcNAc) ₃ -H ₂ O + H	W-3
806	(GlcN) ₅ -H ₂ O + H	W-4
824	(GlcN) ₅ + H	W-1, W-2, W-6, W-7
848	(GlcN) ₄ - (GlcNAc) -H ₂ O + H	W-3, W-4

3.2 相对分子质量分析

所有产品的相对分子质量在5kDa以下(见表2),属于壳寡糖范围。从3.1聚合度的分析结果

看,W-3及W-4的寡糖含量低,因此高效液相法测定的相对分子质量相对较高;W-2的低聚糖及寡糖含量相当,导致分布范围较宽、相对分子质量偏

大;W-5 虽未能较好的检测出寡糖峰,但在单糖附近峰较杂且较强,导致其相对分子质量偏低;其它

产品的相对分子质量均较低,进一步表明其中寡糖含量较高。

表 2 壳寡糖产品相对分子质量、脱乙酰度、水分、灰分、水不溶物及 pH 测定结果

Table 2 The results of chitooligosaccharides in Mr, Degree of deacetylation, Moisture content, ash content, insoluble residue and pH

编号 Number	名称 Name	相对分子质量 Mr Da	脱乙酰度 Ddeac %	水分(以干重计) Moisture content %	灰分(以干重计) Ash content %	水不溶物(以干重计) Insoluble residue %	pH
1	W-1	1849	93.9	9.77	0.75	0.15	4.86
2	W-2	3423	89.8	8.62	0.54	0.32	6.96
3	W-3	3928	93.0	15.6	3.84	1.44	5.34
4	W-4	4357	88.1	9.51	2.87	3.86	5.42
5	W-5	1847	96.3	6.72	0.07	0.34	5.23
6	W-6	1340	95.2	9.56	1.00	0.11	5.03
7	W-7	2370	91.4	15.8	0.22	0	5.91

3.3 脱乙酰度分析

测定壳聚糖脱乙酰度的方法主要有滴定法,光谱法及破坏元素法等。滴定法、光谱法的紫外法和¹H NMR 法适用于可溶性壳聚糖。

目前,核磁共振氢谱法是一种准确、快速检测壳聚糖脱乙酰度的方法^[9]。根据公式(1),W-5 乙酰基的氢信号位于 1.8~1.9 处,定义其信号强度

为 1.00(积分值),C₂-C₆ 位氢信号位于 2.6~4.2 之间,总信号强度为 54.94(见图 4),代入

①式(1)中得 Ddeac% 为 96.3%。

②核磁共振氢谱测定结果(见表 2)表明各个产品的脱乙酰度均较高(>88%),2-位氨基主要是以盐酸盐的形式存在,佐证了产品的溶液 pH 呈现酸性的原因。

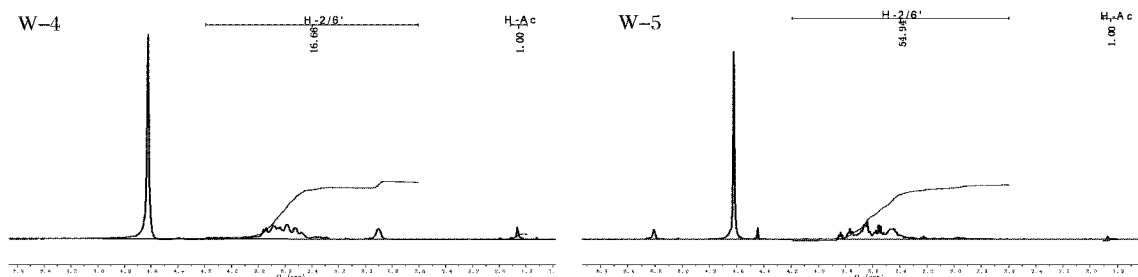


图 4 壳寡糖 W-4、W-5 的核磁共振氢谱图

Fig. 4 ¹H NMR spectra of W-4 and W-5

W-4 的脱乙酰度较低(88.1%),W-5 的脱乙酰度较高(96.3%),进一步利用红外光谱(见图 5)对酰胺基的存在进行定性分析。

糖的特征吸收峰,3300 cm⁻¹左右的宽峰是 O-H 与 N-H 的伸缩振动峰,2921cm⁻¹左右是甲基的伸缩振动峰,1650 cm⁻¹左右是酰胺 I 带(ν_{C=O}),1555 cm⁻¹左右是酰胺 II 带(δN-H),1310 cm⁻¹左右是酰胺 III 带(ν_{C-N}),1020~1160 cm⁻¹左右是

C-O 伸缩振动峰,898 cm⁻¹左右属于环伸缩振动峰。W-4 在 1634cm⁻¹显示有残余酰胺键吸收峰 I,且约在 1320cm⁻¹处出现强度较小的残余酰胺键吸收峰 III,在 1521cm⁻¹处的-NH₂的酰胺 II 谱带相对较弱;W-5 在 1587cm⁻¹处出现较大的-NH₂特征吸收峰,其乙酰基的吸收峰不明显。

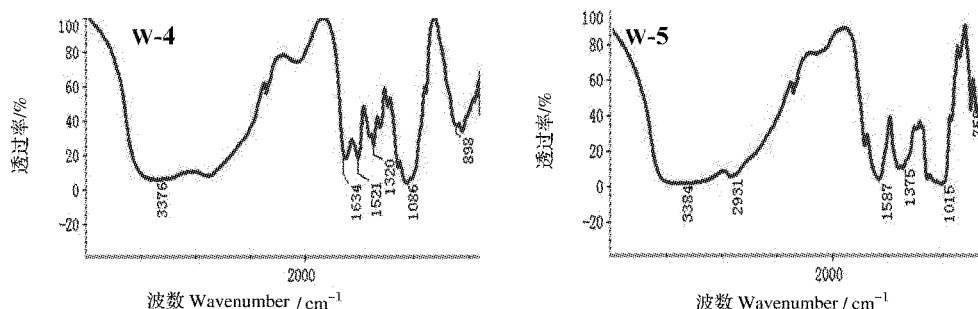


图 5 壳寡糖 W-4、W-5 的红外光谱图

Fig. 5 IR spectra of W-4 and W-5

3.4 外观形态、水不溶性及 pH、水分、灰分分析

壳寡糖产品一般为白色或淡黄色粉末。W-1 为乳白色粉末, W-2, W-4, W-6, W-7 为淡黄色, W-5 为黄色, W-3 为暗黄色。导致产品颜色深可能有以下原因, 一是降解时温度过高、时间过长; 二是喷雾干燥的温度过高; 三是可能在空气中放置时间长, 吸潮所致。

壳聚糖分子量较大, 晶体结构完整, 仅能溶于稀酸中, 而壳寡糖的分子量小, 且氨基含量的增加致使水合作用增加, 水溶性增强。从表中数据进一步佐证了分子量大、脱乙酰度较小的相对溶解性较差, 如 W-4; 分子量小、脱乙酰度大的溶解性较好, 如 W-1。

氨基糖的稳定性较差, 壳寡糖产品一般是以稳定的盐酸盐的形式存在, 自制的 W-1 即是以壳寡糖盐酸盐的形式存在。从表 2 中看出, 各个产品的 pH 均在 7.00 以下, 呈现酸性, 因此各个产品可能是以壳寡糖盐的形式存在。

一般认为壳寡糖的水分含量为 10% 以下, 灰分为 1.0% 以下时, 产品的性状较好。从表 2 中看出 W-1, W-2, W-5, W-6 的两项指标均良好; W-3、W-4 的灰分含量较高, 说明无机盐含量较高; 而随样品储藏时间的延长可能会吸收一定的水分, 水分含量随时间的延长逐渐上升, 因此水分的测定结果仅供参考。

3.5 酶蛋白分析

从图 6 中看出紫外光谱扫描从 320 nm~220 nm 处有吸收峰出现, 其中 210 nm 为肽键吸收峰, 254 nm 处为乙酰胺基吸收峰, 280 nm 处为蛋白中共轭双键吸收峰, 在一定含量范围内, 蛋白质溶液在 280 nm 处的吸光度与其浓度呈正比关系, 因此

当样品浓度一致时, 该处的吸光度值可定性分析蛋白质的含量。根据 280 nm 处吸光度的高低可大致判断该产品中蛋白质含量的高低, 图中 280 nm 处蛋白含量由低到高依次为 W-1, W-4, W-2, W-7, W-6, W-3, W-5(见图 6)。

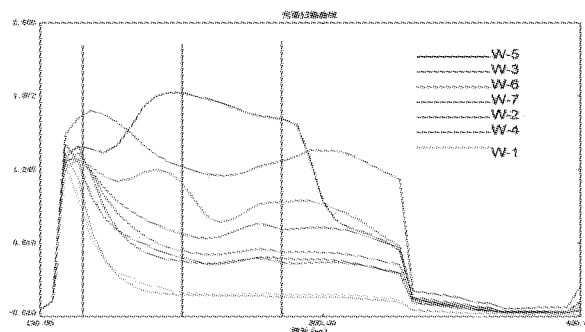


图 6 7 种壳寡糖产品紫外光谱图

Fig. 6 UV spectra of seven chitosan oligosaccharides

4 结论及展望

壳聚糖是存在于自然界的唯一的碱性多糖, 广泛存在于虾蟹壳、真菌动物及某些植物的细胞壁中, 年产量高达几亿吨, 如何开发利用这类丰富的海洋资源成为人们急需解决的一大问题。壳聚糖的降解产物壳寡糖溶解度高、活性显著, 具有广阔的开发前景和应用价值。如今在我国已有众多企业开始生产并出售壳寡糖产品, 但壳寡糖的质量标准都是由企业自行制定, 差别较大, 比较混乱, 因此通过壳寡糖的质量分析研究, 确定重要的质量指标, 从而为科学合理的制定壳寡糖产品的标准提供理论和数据支撑。

本研究主要通过薄层层析技术、高效液相色谱法、核磁共振波谱、质谱及红外光谱等方法鉴别

了产品的结构,并测定了产品的相对分子质量,水分,灰分等理化性质。其中W-1,W-6及W-7的相对分子质量小,溶解度较好,且寡糖聚合度分布较均匀,脱乙酰度也较好,主要成分为氨基糖类,灰分水分等性状均符合国标规定,为较佳的寡糖产品;W-2的相对分子质量分布范围较宽,寡糖含量及低聚糖含量相当,活性应用上可能更加广泛;W-3及W-4相对分子质量较大,溶解性能较差,可能会造成吸收的障碍;W-5的寡糖含量较低,且聚合度分布不均匀。

随着检测技术的不断进步,必将会有更多的检测方法应用到壳寡糖的质量分析上,更进一步的促进壳寡糖的发展。

参考文献

- [1] Nam K S, Kim M K, Shon Y H. Inhibition of proinflammatory cytokine-induced invasiveness of HT-29 cells by chitosan oligosaccharide[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(12): 2042-5.
- [2] Qin C Q, Du Y M, Xiao Ling, et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor[J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2002, 31: 111-7.
- [3] Tsai G J, Wu Z Y, Su W H. Antibacterial Activity of a Chitooligosaccharide Mixture Prepared by Cellulase Digestion of Shrimp Chitosan and Its Application to Milk Preservation[J]. *J Food Protection*. 2000, 63: 747-52.
- [4] Murat A, Fatih K, Mustafa Z K, et al. Anti-HIV-1 activity of low molecular weight sulfated chitooligosaccharides[J]. *Carbohydr. Res*, 2010, 345: 656-62.
- [5] Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, et al. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose [J]. *Carbohydr. Res*, 1986, 151: 403-8.
- [6] 白云鹏. 酶法生产壳寡糖及其质量控制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2001.
- [7] 房子, 刘万顺, 位晓娟, 等. 甲壳胺寡糖的液相色谱及薄层层析分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2005, 35(1): 113-5.
- [8] Fu Q, Liang T, Zhang X L, et al. Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column[J]. *Carbohydr. Res*, 2010, 345: 2690-7.
- [9] Asako H, Hisashi O, Akio N. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy [J]. *Polym. Bull.*, 1991, 26(1): 87-94.
- [10] 费荣昌. 试验分析与数据处理[M]. 无锡: 江南大学出版社, 2001.
- [11] 赵立清. 采用550℃灼烧法测定灰分的影响因素[J]. 面粉通讯, 2006, 1: 37.
- [12] 朱加虹, 郑连英, 陈建国. 壳寡糖生物农药质量标准与评价方法探讨[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(1): 24-8.
- [13] 肖峥, 孟斐, 蔡宇峰, 等. 农药pH值测定方法初探[J]. 农药, 2011, 50(9): 656-8.

The quality analysis of several different chitooligosaccharides

WANG Shi-xin, LI Chun-xia*, ZHAO Xia, GAO Li-xia, GUAN Hua-shi

(Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, Key Laboratory of Glycoscience and Glycotechnology, Shandong Province, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: **Objective** Compare the quality of different chitooligosaccharides (COS) by analyzing their molecular weight (Mr), degree of polymerization (DP), degree of deacetylation (Ddeac), and protein concentration, etc; provide data for the development of quality standards and different uses of chitooligosaccharides. **Method** Determined Mr by High performance gel permeation liquid chromatography; analyzed DP by electrospray ionization mass spectrometry and thin-layer chromatography; measured Ddeac by nuclear magnetic resonance spectroscopy; and protein concentration, water, ash and pH were also analyzed. **Result** W-1, W-6 and W-7 were good products with lower Mr, and uniformly distributed DP. W-2 contained both low molecular weight chitosan and COS, so the dispersion coefficient was large. The Mrs of W-3 and W-4 were high, which led to poor solubility. The Mr of W-5 was low, but its DP wasn't uniformly distributed. **Conclusion** COSs from different sources had different Mr, DP and impurities which would lead to different activities and applications. The research results are considered to provide references for the quality analysis and choices of COS industries.

Key words: chitooligosaccharides; product; quality analysis

浒苔共生真菌 HT-2 次生代谢产物的研究^{△*}

孙坤来, 王义, 付鹏, 刘培培, 朱伟明*

(中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:目的 探究浒苔共生真菌——蜡叶散囊菌(*Eurotium herbariorum*) HT-2 的次生代谢产物及其抗菌活性。方法 菌株规模发酵, 有机溶剂萃取, 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱及 HPLC 等方法对发酵产物进行分离、纯化, 运用紫外、红外、核磁共振等手段鉴定化合物的结构; 采用二倍稀释法评价化合物的抑菌活性。结果 从浒苔共生真菌 *E. herbariorum* HT-2 的发酵产物中分离鉴定了 10 个化合物: preechinulin (1)、cyclo-(L-Trp-D-Val) (2)、(+)-neoechinulin A (3)、neoechinulin B (4)、cryptochinulin C (5)、cyclo-(L-Trp-L-Ala) (6)、variecolorin H (7)、2-(E-1-庚烯基)-3,6-二羟基-5-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲醛 (8)、2-(E,E-3,5-庚二烯基)-3,6-二羟基-5-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲醛 (9) 和 2-(E,E-1,3-庚二烯基)-3,6-二羟基-5-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲醛 (10)。化合物 2、4 和 8 分别对产气杆菌 *Enterobacter aerogenes*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 具有弱的抗菌活性。结论 浒苔共生真菌 HT-2 菌株能代谢产生具有抑菌活性的化合物。

关键词: 浒苔; 共生真菌; 次生代谢产物; 抑菌活性

中图分类号: R978.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2013)01-037-09

浒苔 (*Enteromorpha prolifera*) 有极强的环境适应能力和繁殖能力。大量繁殖的浒苔能遮蔽阳光、消耗海水中的氧气、影响其它海洋生物的正常生长, 从而导致一系列的生态和环境问题^[1]。近年来研究者发现在共培养条件下鲜浒苔能显著抑制前沟藻、中肋骨条藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻 4 种赤潮微藻的生长, 浒苔干粉末的甲醇提取物亦能显著抑制 4 种赤潮微藻的生长^[2-3]。

植物共生真菌广泛存在于植物体的根、茎、叶、花、果和种子等器官组织的细胞或细胞间隙^[4-5]。植物的多样性、复杂性和特殊性使其共生真菌也具有同样的特性, 因而共生真菌所产生的次生代谢产物具有化学结构和生物活性多样性, 活性化合物的结构类型已远超出其宿主植物次生代谢产物的范围, 已成为寻找新的活性物质的重要新资源^[4]。而目前对于浒苔共生微生物次生代谢产物的研究国内外鲜有报道。

本文以采自青岛第一海水浴场的 *E. prolifera* 为研究对象, 分离纯化其中的共生真菌; 采用集成化学与生物学活性筛选方法, 选取浒苔真菌

Eurotium herbariorum HT-2 为目标菌株, 从其代谢产物中分离鉴定了 10 个化合物, 其结构如图 1 所示; 并初步评价了化合物的抑菌活性。其中化合物 2 和 5~7 为首次从 *Eurotium* 属真菌中得, 化合物 2、4 和 8 分别对产气杆菌 *Enterobacter aerogenes*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 具有弱的抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂

洁净工作台: Air Tech (苏州安泰空气技术有限公司); 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, Capcell Pak C18 柱: 5 μ m, 4.6mm \times 250mm); 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

* Δ 基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2009CQ014); 国家自然科学基金项目 (21172204) 资助

作者简介: 孙坤来 (1986-), 男, 博士研究生。研究方向为海洋微生物天然产物。

* 通讯作者: 朱伟明, 男, 教授, 博士。E-mail: weimingzhou@ouc.edu.cn

收稿日期: 2012-09-03

醚、二氯甲烷均为工业用化学纯产品,液相色谱甲
醇为色谱纯。

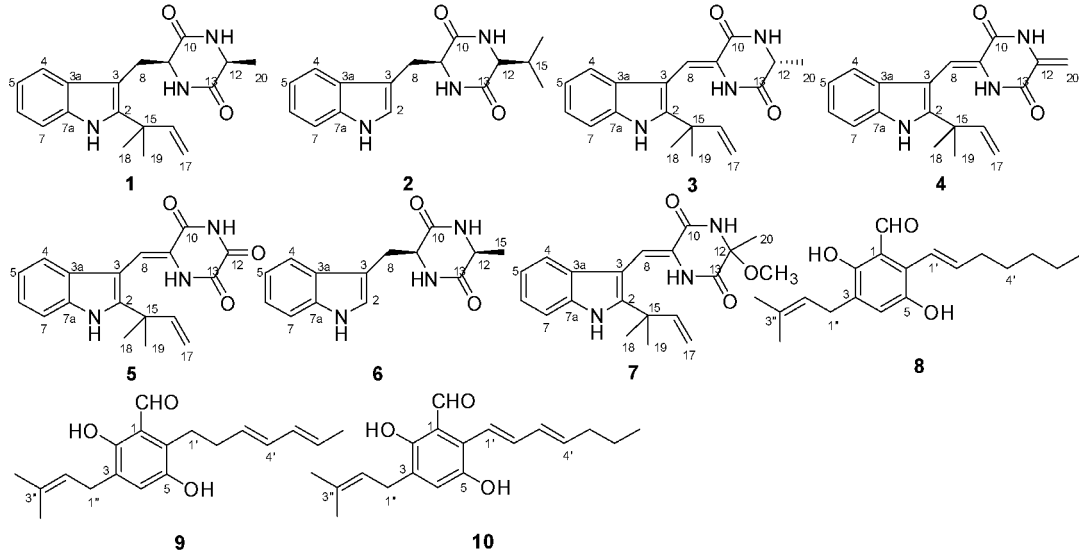


图1 化合物1~10的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1~10

1.2 菌株来源及其培养

浒苔真菌 HT-2 分离自 2008 年 6 月青岛第一海水浴场采集的新鲜浒苔样品。将新鲜样品用自来水、75%乙醇、灭菌水依次清洗样品表面各 3 次,然后组织破碎后涂布于 PDA 平板培养基上进行分离得 HT-2。对 HT-2 采用 18S rRNA 通用序列 NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')、NS6 (5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCTC-3') 扩增其 18S rRNA 序列。以所提的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,纯化测序后,菌株的 18S rRNA 序列的长度为 1338bp (见图 2, Gen-

Bank accession number JX839684)。将基因序列与 NCBI 对比同源性,发现测试结果与 *Eurotium herbariorum*、*Eurotium rubrum*、*Edyuillia athe-cia*、*Eurotium cristatum*、*Aspergillus prolifer-ans*、*Eurotium amstelodami* 的序列有 99% 的吻合度。该菌落在 20% 蔗糖查氏琼脂上生长较快,具皱纹,黄褐色,分生孢子结构灰绿色,菌落反面呈不同程度的褐色,子囊球形或近球形,分生孢子头辐射形,与 *Eurotium herbariorum* 的特征十分一致,因此 HT-2 鉴定为蜡叶散囊菌 (*Eurotium her-bariorum*)。

```

GTCTAGGTATAAAGCACTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGAT
AGTACCTTACTACATGGATACCTGTGGTAAATCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCTCGCATTCGGAAG
GGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAACGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGAATCATAATAACTAAGCGAAT
CGCATGGCTTGGCCGCGCATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGG
CCTACCATGGTGGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT
ACCACATCCAAAGGAAGGCAGCAGGCCGCGCAAATTCACCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAA
ATACTGATACGGGGCTCTTTTGGGTCTCGTAATTGGAAATGAGTACAATCTAAAATCCCTTAAACGAGGAACA
ATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAAATCCAGCTCCAATAAGCGTATATTAAGTTGTGTGC
AGTTAAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGTCTGGCTGGCCGGTCCGCCCTACCCGCGAGTACTGGTCCGGC
TGGACCTTTCCTTCTGGGGAACCTCATGGCCTTACTGGCTGTGGGGGAACAGGACTTTTACTGTGAA
AAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTTTGTCTGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGCG
GTTCTATTTTGTGGTTCCTAGGACCGCGTAAATGATTAATAGGGATAGTCCGGGGCGTCAATTCAGCT
GTCAGAGGTGAAAATTCITGGATTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCAT
TAATCAGGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGCTTAACCATAAACTATG
CCGACTAGGGATCGGGCGGTGTTCATATAATGACCCGCTCGGCACCTTACGAGAAAATCAAAGTTTGTGG
TTCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAAATTGACGGAAGGGCACCACAAGGGCTGGA
GCCITGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACAAAATAGGATTGACAGATTT
GAGAGCTTTTCTTGATCTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGTGATTTGCTGCTT
AATTTGCATAACGAAACGAGACCTTCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGCAATTTGCGGGCCGCTGGCTTCTTA
GGGGACTATCC

```

图2 菌株 HT-2 的 18S rRNA 序列数据

Fig. 2 The 18S rRNA sequence data of the fungal strain HT-2

发酵培养:从生长良好的斜面培养基中挑取适量菌体,接种于灭菌后的真菌培养基中,25℃静置培养发酵 30 d 共发酵 15 L,培养基配方为:麦芽糖 2 g、味精 1 g、KH₂PO₄ 0.05 g、葡萄糖 1 g、酵母浸膏 0.3 g、甘露醇 2 g、玉米浆 0.1 g、MgSO₄ 0.03 g、海水素 3.3 g、自来水 100 mL (pH 自然)。

1.3 次生代谢产物的分离纯化

将菌丝体滤除,剩余的发醇液用等体积的乙酸乙酯萃取 5 次,蒸干溶剂得发醇液浸膏(26.06 g)。菌丝体破碎后用 80%丙酮浸泡过夜后过滤,并重复用丙酮浸泡 3 次。将滤液中的丙酮蒸出,剩余水层用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,蒸干乙酸乙酯得菌丝体浸膏(22.72 g)。经 TLC、HPLC 分析后发现该两部分代谢产物类似,将其合并后共 48.78g 一起分离。

粗浸膏经硅胶柱减压柱层析分离,以石油醚-二氯甲烷-甲醇不同的比例作洗脱液进行洗脱,分部收集后点板合样得 Fr-1~Fr-6 共 6 个组份。对 Fr-1 进行正相硅胶柱加压柱层析后对所得组份进行 HPLC 制备分离,其中 Fr-1-1 经甲醇-水(体积分数 85:15)、流速为 4 mL/min (下同)的 HPLC 制备后得化合物 8 (31.6 mg, t_R 21.2 min)、9 (38.6 mg, t_R 24.3 min);Fr-1-22 经甲醇-水(体积分数 90:10)流速为 HPLC 制备后得化合物 10 (12.7 mg, t_R 9.4 min)。Fr-2 经反相柱层析后对其二级组份 Fr-2-10 以甲醇-水(体积分数 53:47)进行 HPLC 制备分别得化合物 5 (3.2 mg, t_R 18.1 min)、6 (17.6 mg, t_R 15.9 min)。Fr-3 经正相加压柱层析、反相柱层析、凝胶柱层析及 HPLC 分离(甲醇-水,体积分数 85:15)得化合物 1 (20 mg, t_R 9.5 min)、2 (7.5 mg, t_R 15.3 min)、3 (8 mg, t_R 8.6 min)、4 (10 mg, t_R 28.2 min)。Fr-4 经正相加压柱层析后分别以 60%和 50%的甲醇浓度经 HPLC 制备分离后得化合物 7 (24.2 mg, t_R 7.6 min)。

1.4 抑菌试验

对所分得的化合物分别评价对致病菌大肠杆菌 *E. coli*、铜绿假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、白色念珠菌 *Candida albicans*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、产气杆菌 *E. aerogenes* 的抑菌活性。将 5 种致病菌接入 LB 培养基中,28℃、280 r/min 恒温摇床中培养 12 h 备用。将预先培养备

用的致病菌均匀涂布到 PDA 平板培养基上,静置 15min,待致病菌完全渗透到培养基后进行实验。化合物以甲醇为溶剂,测试时设纯甲醇的阴性对照和针对细菌用的阳性药环丙沙星,白色念珠菌 *C. albican* 使用酮康唑为阳性对照药。采用滤纸片二倍稀释法(K-B 法)分别测化合物的 MIC^[6]。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1:白色粉末,易析出晶体;香草醛-浓硫酸显色呈紫色暗斑,生物碱试剂不显色。由 ESI-MS 给出的伪分子离子峰 m/z 326.1 [M+H]⁺,结合¹H-和¹³C-NMR 确定其分子式为 C₁₉H₂₃N₃O₂。其 1D NMR 在 δ_{H/C} 3.78/50.9 和 4.11/56.2 出现典型的环二肽 α-CH 特征吸收信号^[7],仔细观察其氢谱数据,显示出化合物 1 的芳香区有 1,2-二取代的苯环上 4 个芳氢[δ 7.42 (1H, d, 7.7)、7.32 (1H, d, 8.1)、7.02 (1H, dd, 7.6, 8.1)、6.93 (1H, dd, 7.5, 7.5)],丙氨酸[δ 3.78 (1H, qd, 2.8, 7.1)、1.22 (3H, d, 7.1)]以及 3 个可交换氢(NH)[δ 10.54(s)、8.16 (1H, d, 2.8)、7.50 (1H, d, 3.1)]的信号,表明化合物 1 存在由色氨酸和丙氨酸构成的环二肽骨架。结合碳谱中的 2 个羰基碳信号(δ 168.5, 167.9),证实了环二肽结构的存在。此外,氢谱中还显示了 1 个末端异戊烯基的吸收信号[δ 6.18 (1H, dd, 10.5, 17.3)、5.07 (1H, dd, 1.0, 17.2)、5.03(1H, dd, 1.0, 10.4)、1.49 (3H, s)、1.48 (3H, s)],表明化合物 1 是末端异戊烯基取代的环二肽,因此平面结构推断如图 1 所示。绝对构型的确定通过比旋光确定,实验值[α]_D²⁰ + 50.1° (c 0.11, MeOH) 与文献值[α]_D²⁴ + 46° (AcOH)基本一致^[8],因此判断该化合物为 2 个 L-型氨基酸形成的环二肽,核磁数据与文献^[9]报道基本一致,故化合物 1 鉴定为 preechinulin。其 NMR 数据如下:¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ 10.54 (1H, s, 1-NH), 7.32 (1H, d, J = 8.1, H-4), 7.02 (1H, dd, J = 7.6, 8.1, H-5), 6.93 (1H, dd, J = 7.5, 7.5, H-6), 7.42 (1H, d, J = 7.7, H-7), 3.38 (1H, dd, J = 7.5, 15.5, H-8), 3.07 (1H, dd, J = 8.9, 14.6, H-8), 3.96 (1H, ddd, J = 8.6, 4.3, 4.3, H-

9), 8.16 (1H, d, $J = 2.8$, 11-NH), 3.78 (1H, qd, $J = 2.8$, 7.1, H-12), 7.50 (1H, d, $J = 3.1$, 14-NH), 6.18 (1H, dd, $J = 10.5$, 17.3, H-16), 5.07 (1H, dd, $J = 1.0$, 17.2, H-17), 5.03 (1H, dd, $J = 1.0$, 10.4, H-17), 1.48 (3H, s, H-18), 1.49 (3H, s, H-19), 1.22 (3H, d, $J = 7.1$, H-20). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): δ 142.0 (s, C-2), 105.1 (s, C-3), 129.5 (s, C-3a), 118.5 (d, C-4), 119.0 (d, C-5), 121.1 (d, C-6), 111.4 (d, C-7), 134.9 (s, C-7a), 31.8 (t, C-8), 56.2 (d, C-9), 168.5 (s, C-10), 50.9 (d, C-12), 167.9 (s, C-13), 39.4 (s, C-15), 147.1 (d, C-16), 111.6 (t, C-17), 28.6 (q, C-18), 28.5 (q, C-19), 20.9 (q, C-20).

化合物 2: 淡黄色不定型粉末, TLC 生物碱试剂不显色; 阳离子 ESI-MS 在 m/z 286.1 处给出伪分子离子峰 $[M+H]^+$, 结合 ^1H 、 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱, 推测分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ 。UV (MeOH) [λ_{\max} (log ϵ): 272(3.3)、214(4.0)] 提示有吲哚环的吸收。氢谱和碳谱中显示环二肽的特征吸收 ($\delta_{\text{H/C}}$ 4.12/55.2, 3.26/59.7), 氢谱中 δ 7.60 (d, $J = 7.9$)、7.31 (d, $J = 8.1$)、7.00 (dd, $J = 7.1$, 7.9) 和 6.94 (dd, $J = 7.9$, 7.0) 表明分子中存在 1,2-二取代的苯环, 结合 δ 10.88 的活泼氢和 7.08 (d, $J = 2.3$) 的芳氢吸收峰, 可推测出该化合物含有 3-位取代的吲哚环。另外, 氢谱中还揭示了异丙基片段 ($\delta_{\text{H/C}}$ 2.02 (m)/32.10、0.81 (d, $J = 7.1$, 3H)/18.71、0.76 (d, $J = 6.8$, 3H)/17.2, 表明化合物 2 是由色氨酸和缬氨酸形成的环二肽。其核磁数据和 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 36.7^\circ$ (c 0.03, MeOH) 与文献值相符, 故化合物 2 的结构鉴定为 cyclo-(L-Trp-D-Val)^[10]。该化合物首次从 *Eurotium* 属中分得。其 NMR 数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ 10.88 (1H, s, 1-NH), 7.08 (1H, d, $J = 2.3$, H-2), 7.60 (1H, d, $J = 7.9$, H-4), 7.00 (1H, dd, $J = 7.1$, 7.9, H-5), 6.94 (1H, dd, $J = 7.9$, 7.0, H-6), 7.31 (1H, d, $J = 8.1$, H-7), 3.26 (1H, dd, $J = 4.6$, 4.3, H-8), 3.04 (1H, dd, $J = 4.6$, 4.2, H-8), 4.12 (1H, dd, $J = 4.1$, 4.3, H-9), 7.85 (1H, d, $J = 1.5$, 11-NH),

3.03 (1H, d, $J = 3.0$, H-12), 8.01 (1H, s, 14-NH), 2.02 (1H, m, H-15), 0.81 (3H, d, $J = 7.1$, H-16), 0.76 (3H, d, $J = 6.8$, H-17)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): δ 125.1 (d, C-2), 109.0 (s, C-3), 128.3 (s, C-3a), 119.5 (d, C-4), 121.4 (d, C-5), 118.9 (d, C-6), 111.7 (d, C-7), 136.4 (s, C-7a), 29.0 (t, C-8), 55.2 (d, C-9), 167.7 (s, C-10), 59.7 (d, C-12), 168.7 (s, C-13), 32.1 (d, C-15), 18.7 (q, C-16), 17.2 (q, C-17)。

化合物 3: 淡黄色不定型粉末, 由 ESI-MS 给出的伪分子离子峰 m/z 324.1 $[M+H]^+$, 结合 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 DEPT 推测化合物 3 的分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ 。该化合物的 UV (MeOH) [λ_{\max} (log ϵ): 337(3.6)、284(3.5)、220(4.0)] 提示分子中有吲哚类衍生物的吸收。氢谱中由芳氢构成的自旋系统 [δ 7.42 (1H, d, $J = 8.3$)、7.19 (1H, d, $J = 7.7$)、7.08 (1H, dd, $J = 7.7$, 8.3)、7.01 (1H, dd, $J = 8.3$, 7.7)] 提示吲哚环的苯环上无其它取代基; 氢谱还给出反异戊烯基的特征吸收峰 [δ 6.07 (1H, dd, $J = 10.5$, 17.3)、5.04 (1H, dd, $J = 1.1$, 10.4)、5.03 (1H, dd, $J = 1.1$, 17.3)、1.47 (6H, s)] 和丙氨酸的吸收峰 [δ 4.15 (1H, qd, $J = 7.1$, 1.6)、1.37 (3H, d, $J = 7.1$)]。这些数据与化合物 1 非常相似, 差别在于化合物 1 中的 CH_2CH 信号 ($\delta_{\text{H/C}}$ 3.07&3.96/31.8、4.11/56.2) 被 1 个三取代的乙烯键 $\text{CH}=\text{C}$ 信号 ($\delta_{\text{H/C}}$ 6.89/110.8、125.3) 所替代, 较低场的烯氢信号表明双键的构型为 Z。比旋光值 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 12.3^\circ$ (c 0.16, MeOH) 和波谱数据与文献报道的 (+)-neoechinulin A ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 56^\circ$ (c 0.1, MeOH)) 相符^[11-12], 化合物 3 的结构因此得以确定, 12-位构型为 R。其 NMR 数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ 11.05 (1H, s, 1-NH), 7.19 (1H, d, $J = 7.7$, H-4), 7.01 (1H, dd, $J = 8.3$, 7.7, H-5), 7.08 (1H, dd, $J = 7.7$, 8.3, H-6), 7.42 (1H, d, $J = 8.3$, H-7), 6.89 (1H, s, H-8), 8.31 (1H, s, 11-NH), 4.15 (1H, qd, $J = 7.1$, 1.6, H-12), 8.64 (1H, s, 14-NH), 6.07 (1H, dd, $J = 10.5$, 17.3, H-16), 5.04 (1H, dd, $J = 1.1$, 10.4, H-17), 5.03 (1H, dd, $J = 1.1$, 17.3, H-17),

1.47 (6H, s, H-18/19), 1.37 (3H, d, $J = 7.1$, H-20). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 144.6 (s, C-2), 103.9 (s, C-3), 126.5 (s, C-3a), 119.4 (d, C-4), 112.0 (d, C-5), 121.3 (d, C-6), 112.1 (d, C-7), 135.7 (s, C-7a), 110.8 (d, C-8), 125.3 (s, C-9), 160.4 (s, C-10), 51.1 (d, C-12), 167.0 (s, C-13), 39.7 (s, C-15), 145.7 (d, C-16), 111.7 (t, C-17), 28.1 (q, C-18), 28.1 (q, C-19), 20.2 (q, C-20)。

化合物 4:黄色粉末,香草醛-浓硫酸显棕色暗斑,生物碱不显色,由 ESI-MS 给出的伪分子离子峰 m/z 322.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 结合 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 和 DEPT 推测化合物 4 的分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ 。该化合物的 UV (MeOH) [λ_{max} (log ϵ): 221 (3.5)、273 (4.0)、371 (3.6)] 提示分子中有吲哚类衍生物的吸收。该化合物核磁数据与化合物 3 非常相似,不同在于化合物 4 中多了 2 个烯氢的吸收信号 [δ 5.24 (s, 1H)、4.93 (s, 1H)], 却少了 3 中的甲基 ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.37/20.2) 和次甲基 ($\delta_{\text{H/C}}$ 4.15/51.1) 的吸收信号,结合分子式推测化合物 3 中 12-和 20-位的 CH_3CH 可能被 $\text{C}=\text{C}$ 双键取代,较低场的烯氢信号 [δ 6.97 (s, 1H)] 表明双键的构型为 *Z*。故化合物 4 的结构鉴定为 neo-echinulin B, 其波谱数据与文献基本相符^[13]。其 NMR 数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 11.15 (1H, s, 1-NH), 7.44 (1H, d, $J = 8.0$, H-4), 7.10 (1H, dd, $J = 7.2, 7.9$, H-5), 7.03 (1H, dd, $J = 7.2, 7.8$, H-6), 7.22 (1H, d, $J = 7.9$, H-7), 6.97 (1H, s, H-8), 10.86 (1H, s, 11-NH), 8.94 (1H, s, 14-NH), 6.07 (1H, dd, $J = 10.5, 17.3$ H-16), 5.06 (H, dd, $J = 1.1, 10.4$, H-17), 5.04 (H, dd, $J = 1.1, 17.3$, H-17), 1.48 (6H, s, H-18/19), 5.24 (1H, s, H-20), 4.93 (1H, s, H-20). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 144.9 (s, C-2), 103.7 (s, C-3), 135.7 (s, C-3a), 120.2 (d, C-4), 119.4 (d, C-5), 124.9 (d, C-6), 112.3 (d, C-7), 145.0 (s, C-7a), 126.4 (d, C-8), 121.5 (s, C-9), 156.3 (s, C-10), 135.6 (s, C-12), 157.6 (s, C-13), 39.9 (s, C-15), 145.6 (d, C-16), 112.2 (t, C-17), 28.1 (q, C-18), 28.1 (q, C-19), 135.3 (q, C-20)。

化合物 5:橘黄色粉末;香草醛-浓硫酸显色显橘黄色斑点,生物碱显色剂不显色;由阳离子 ESI-MS m/z 324.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 结合 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 和 DEPT 推测化合物 5 的分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$; UV (MeOH) [λ_{max} (log ϵ): 284 (3.5)、220 (4.0)]。该化合物核磁数据与化合物 3 非常相似,不同在于化合物 5 中没有甲基 ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.37/20.2) 和次甲基 ($\delta_{\text{H/C}}$ 4.15/51.1) 的吸收信号,却多了 1 个连羰基季碳信号 ($\delta_{\text{H/C}}$ 161.1), 结合分子式推测化合物 5 为 $\text{C}=\text{O}$ 取代化合物 3 中 CH_3CH 的衍生物。故化合物 5 的结构鉴定为 neo-echinulin E, 其波谱数据与文献值相符^[13]。该化合物首次从 *Eurotium* 属真菌的发酵产物中分得。其 NMR 数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 11.98 (1H, s, 1-NH), 7.43 (1H, d, $J = 8.1$, H-4), 7.12 (1H, dd, $J = 7.9, 7.3$, H-5), 7.03 (1H, dd, $J = 7.9, 7.0$, H-6), 7.42 (1H, d, $J = 8.1$, H-7), 7.19 (1H, s, H-8), 11.26 (1H, s, 11-NH), 9.86 (1H, s, 14-NH), 6.07 (1H, dd, 10.5, 17.4, H-16), 5.09 (1H, dd, $J = 10.6, 1.1$, H-17), 5.06 (1H, dd, $J = 17.5, 1.1$, H-17), 1.48 (6H, s, H-18/19). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 152.9 (s, C-2), 104.3 (s, C-3), 135.7 (s, C-3a), 120.2 (d, C-4), 120.3 (d, C-5), 123.9 (d, C-6), 112.6 (d, C-7), 145.5 (s, C-7a), 126.7 d, (C-8), 121.6 (s, C-9), 155.8 (s, C-10), 161.1 (s, C-12), 157.9 (s, C-13), 39.6 (s, C-15), 146.2 (d, C-16), 112.2 (t, C-17), 28.2 (q, C-18), 28.2 (q, C-19)。

化合物 6:白色颗粒状粉末,难溶于甲醇、二氯甲烷;香草醛-浓硫酸显色显紫色暗斑,生物碱显色剂不显色;UV (MeOH) [λ_{max} (log ϵ): 283 (3.1)、276 (3.3)、214 (4.0)]。阳离子 ESI-MS 在 m/z 258.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 结合 ^1H 、 $^{13}\text{C NMR}$ 和 DEPT 谱,推测化合物 6 的分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ 。该化合物波谱数据与化合物 1 的十分相似,差别在于化合物 6 少了化合物 1 中的末端异戊烯基的吸收信号,但多了 1 个 sp^2 次甲基信号 ($\delta_{\text{H/C}}$ 7.04/111.7), 由此推测化合物 6 是由色氨酸和丙氨酸组成的二肽,核磁数据与比旋光 ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 16.1$ (c 0.15, EtOH)) 与文献值基本相符 ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 18$ (c

0.05, EtOH))^[14], 因此化合物 **6** 的结构鉴定为 cyclo-(L-Trp-L-Ala)。该化合物首次从 *Eurotium* 属真菌的发酵产物中分得。其 NMR 数据如下: ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.90 (1H, s, 1-NH), 7.04 (1H, d, *J* = 2.5, H-2), 7.56 (1H, d, *J* = 7.9, H-4), 6.94 (1H, dd, *J* = 7.9, 7.0, H-5), 7.02 (1H, dd, 7.0, 8.1, H-6), 7.30 (1H, d, *J* = 8.1, H-7), 3.24 (1H, dd, *J* = 14.5, 4.3, H-8), 3.01 (1H, dd, *J* = 14.5, 4.2, H-8), 4.11 (1H, dd, *J* = 4.1, 4.3, H-9), 7.91 (1H, d, *J* = 1.7, 11-NH), 3.59 (1H, q, *J* = 7.0, H-12), 8.03 (1H, d, *J* = 1.7, 14-NH), 0.41 (3H, d, *J* = 7.0, H-15). ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ 125.1 (d, C-2), 109.0 (s, C-3), 128.4 (s, C-3a), 119.5 (d, C-4), 121.4 (d, C-5), 118.9 (d, C-6), 111.7 (d, C-7), 136.4 (s, C-7a), 29.4 (t, C-8), 56.0 (d, C-9), 167.3 (s, C-10), 50.3 (d, C-12), 168.3 (s, C-13), 20.1 (q, C-15)。

化合物 **7**: 白色不定型粉末, 香草醛-浓硫酸显色显棕绿色暗斑, 生物碱显色剂不显色; 正离子 ESI-MS 给出的伪分子离子 *m/z* 354.2 [M + H]⁺, 结合 ¹H 和 ¹³C NMR 推测化合物 **7** 的分子式为 C₂₀H₂₃N₃O₃。该化合物的 UV (MeOH) [λ_{max} (logε): 203 (3.7)、226 (3.8)、279 (3.2)、350 (3.4)] 与化合物 **3** 的比较相似, 仔细比较化合物 **7** 与 **3** 的一维核磁数据, 发现化合物 **7** 与 **3** 的主要差别存在于二氧哌嗪结构, **3** 中的次甲基信号 (δ_{H/C} 4.15/51.1) 在化合物 **7** 中变为连氧季碳信号 (δ_C 84.5); 此外, 化合物 **7** 比 **3** 多一个甲氧基信号 (δ_{H/C} 3.23/50.6), CH₃-20 发生了低场位移 (δ_{H/C} 1.46/22.5), 提示化合物 **3** 中的次甲基 (CH-12) 的氢原子被甲氧基取代。较低场 δ_{H-8} 6.99 (s, 1H) 证明该处双键为 *Z*-型。因此, 化合物 **7** 的结构鉴定为 varicolorin H, 相关数据同文献数据吻合^[15]。该化合物首次从 *Eurotium* 属真菌的发酵产物中分得。其 NMR 数据如下: ¹H-NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.1 (1H, s, 1-NH), 7.17 (1H, d, *J* = 8.0, H-4), 7.0 (1H, dd, *J* = 7.0, 8.0, H-5), 7.08 (1H, dd, *J* = 7.0, 8.1, H-6), 7.42 (1H, d, *J* = 8.0, H-7), 6.99 (1H, s, H-8), 9.08 (1H, s, 11-NH), 9.21

(1H, s, 14-NH), 6.07 (1H, dd, *J* = 10.5, 17.3, H-16), 5.05 (1H, dd, *J* = 1.2, 10.5, H-17), 5.03 (1H, d, *J* = 1.0, 17.3, H-17), 1.47 (3H, s, H-18), 1.48 (3H, s, H-19), 1.46 (3H, s, H-20), 3.23 (3H, s, 12-OCH₃)。 ¹³C-NMR (150MHz, DMSO-*d*₆): δ 145.0 (s, C-2), 104.1 (s, C-3), 126.7 (s, C-3a), 119.5 (d, C-4), 120.0 (d, C-5), 121.3 (d, C-6), 112.2 (d, C-7), 135.7 (s, C-7a), 112.2 (d, C-8), 125.0 (s, C-9), 161.9 (s, C-10), 84.5 (s, C-12), 164.0 (s, C-13), 39.9 (s, C-15), 145.7 (d, C-16), 112.3 (t, C-17), 28.0 (q, C-18), 28.3 (q, C-19), 22.5 (q, C-20), 50.6 (q, 12-OCH₃)。

化合物 **8**: 黄绿色不定型粉末; FeCl₃ 显色呈反应阳性, 香草醛-浓硫酸显色显淡黄绿色暗斑, 表明为酚性化合物。**8** 的正离子 ESI-MS 给出的分子离子 *m/z* 303.1 [M + H]⁺, 结合其 ¹H 和 ¹³C 的 NMR 数据, 推测其分子式为 C₁₉H₂₆O₃, 不饱和度为 6。UV (MeOH) [λ_{max} (logε): 227 (4.58)、273 (4.00)] 表明分子中存在共轭体系。¹H、¹³C 及 DEPT-NMR 揭示分子中存在 -CHO、4 个 -CH、5 个 -CH₂、3 个 -CH₃、6 个季碳和 2 个可交换质子。氢谱中 1 个孤立的芳区质子信号 (δ 6.97 (s, 1H)) 表示苯环上其它 5 个 H 均被取代; 氢谱中还给出异戊烯基的吸收峰 [δ 3.20 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H)、5.23 (tq, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H)、1.69 (d, *J* = 0.9, 3H)、1.65 (d, *J* = 0.7, 3H)] 实验值。此外, 还给出 1 个构型为 *E*-的对称二取代的乙烯质子的信号: [δ 6.55 (dt, *J* = 15.8, 1.4, 1H)、5.78 (dt, *J* = 15.8, 6.8, 1H)], 这一推断在碳谱中得到了证实: δ 121.6 (d)、140.9 (d)。这些数据与文献报道的 2-(*E*-1-庚烯基)-3,6-二羟基-5-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲醛的核磁数据相一致^[16], 故结构得以鉴定。其 NMR 数据如下: ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.97 (1H, s, H-4), 6.55 (1H, dt, *J* = 15.8, 1.5, H-1'), 5.78 (1H, dt, *J* = 15.8, 6.8, H-2'), 2.22 (2H, ddt, *J* = 7.4, 6.6, 1.4, H-3'), 1.43 (2H, quint, *J* = 7.3, H-4'), 1.30 (2H, m, H-5'), 1.28 (2H, m, H-6'), 0.86 (3H, t, *J* = 7.0, H-7'), 3.20 (2H, d, *J* = 7.4, H-1''), 5.23 (1H, tq, *J* = 7.4, 1.4, H-2''), 1.69 (3H, d,

$J = 0.9$, H-4''), 1.65 (3H, d, $J = 0.7$, H-5''), 10.02 (1H, s, -CHO), 11.64 (1H, s, 2-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): δ 117.9 (s, C-1), 153.1 (s, C-2), 128.2 (s, C-3), 125.1 (d, C-4), 147.4 (s, C-5), 126.2 (s, C-6), 121.6 (d, C-1'), 141.0 (d, C-2'), 33.7 (t, C-3'), 28.9 (t, C-4'), 31.5 (t, C-5'), 22.5 (t, C-6'), 14.5 (q, C-7'), 27.4 (t, C-1''), 122.1 (d, C-2''), 133.2 (s, C-3''), 18.1 (q, C-4''), 26.1 (q, C-5''), 197.7 (d, -CHO).

化合物 9: 黄绿色粉末, FeCl_3 显色呈反应阳性, 亦为酚性化合物。UV (MeOH) [λ_{max} (log ϵ): 222 (4.58)、268 (4.00)、383 (3.82)]。其正离子 ESI-MS 给出的分子离子 m/z 301.2 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 结合 ^1H 和 ^{13}C 的 NMR 数据, 推测其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3$, 不饱和度为 7。仔细比对化合物 9 与化合物 8 的 ^1H 、 ^{13}C 及 DEPT-NMR 谱图发现二者十分相似, 异戊烯基很苯环的吸收峰没有明显变化。差别在于 7 个碳原子的侧链不同: 化合物 9 比化合物 8 多出 2 个烯氢信号而减少 2 个 $-\text{CH}_2$ 信号, 推测可能是化合物 8 中的 2 个 $-\text{CH}_2$ 被双键连接。结合 ^1H 谱中甲基质子信息: δ 1.68 (d, $J = 6.3$, 3H) 提示其与双键碳(季碳)相连; 3'-和 4'-位质子偶合常数 ($J = 14.2$)、5'-和 6'-位质子的偶合常数 ($J = 13.9$) 证明两双键构型均是 *E*-型。这些数据和文献报道的 2-(*E,E*-3,5-庚二烯基)-3,6-二羟基-5-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲醛的核磁数据基本一致^[16], 其结构因此得以确定。其 NMR 数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ 6.98 (1H, s, H-4), 2.93 (2H, t, $J = 7.5$, H-1'), 2.22 (2H, q, $J = 7.3$, H-2'), 5.57 (1H, dt, $J = 7.1, 14.2$, H-3'), 5.98 (1H, dd, $J = 7.3, 14.2$, H-4'), 5.96 (1H, dd, $J = 7.3, 13.9$, H-5'), 5.55 (1H, dt, $J = 7.0, 13.9$, H-6'), 1.68 (3H, d, $J = 6.3$, H-7'), 3.18 (2H, d, $J = 7.4$, H-1''), 5.23 (1H, dd, $J = 7.5, 7.4$, H-2''), 1.70 (3H, s, H-4''), 1.65 (3H, s, H-5''), 10.21 (1H, s, -CHO), 11.73 (1H, s, 2-OH), 9.08 (1H, s, 5-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): δ 122.2 (s, C-1), 153.7 (s, C-2), 131.5 (s, C-3), 118.1 (d, C-4), 147.5 (s, C-5), 131.2 (s, C-6), 26.1 (t, C-1'), 34.3 (t, C-

2'), 133.0 (d, C-3'), 127.6 (d, C-4'), 128.3 (d, C-5'), 127.6 (d, C-6'), 18.1 (q, C-7'), 27.2 (t, C-1''), 125.6 (d, C-2''), 132.1 (s, C-3''), 23.8 (q, C-4''), 18.4 (q, C-5''), 197.6 (d, -CHO).

化合物 10: 黄色粉末, 正离子 ESI-MS 给出与化合物 9 相同的分子离子峰 m/z 301.2 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 因此推测化合物 10 与化合物 9 为同分异构体。仔细比较化合物 10 与化合物 9 的 ^1H 、 ^{13}C 及 DEPT-NMR 谱, 发现其谱图十分相似, 不同之处仍在于 7 碳侧链部分的信号: 烯氢信号的裂分有所不同 [δ 6.78 (d, $J = 15.5$, 1H)、6.55 (dd, $J = 10.4, 15.5$, 1H)、6.28 (dd, $J = 10.0, 10.4$, 1H)、5.87 (dt, $J = 15.2, 7.0$, 1H)], 表明这 2 个双键共轭且与苯环也共轭, 1', 2'-位和 3', 4'-位的偶合常数分别为 15.5 Hz 和 15.2 Hz, 表明双键构型均为 *E*-型。这些波谱数据与文献报道的 2-(*E,E*-1,3-庚二烯基)-3,6-二羟基-5-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲醛一致^[17], 化合物 10 的结构因此得以鉴定。其 NMR 数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ 7.00 (1H, s, H-4), 6.78 (1H, d, $J = 15.7$, H-1'), 6.55 (1H, dd, $J = 10.4, 15.5$, H-2'), 6.28 (1H, dd, $J = 10.5, 15.1$, H-3'), 5.87 (1H, dt, $J = 15.2, 7.0$, H-4'), 2.10 (2H, dt, $J = 6.9, 7.3$, H-5'), 1.41 (2H, tq, $J = 7.4, 7.4$, H-6'), 0.89 (3H, t, $J = 7.4$, H-7'), 3.21 (2H, d, $J = 7.4$, H-1''), 5.24 (1H, tq, $J = 7.5, 1.4$, H-2''), 1.70 (3H, s, H-4''), 1.66 (3H, s, H-5''), 10.06 (1H, s, -CHO), 11.74 (1H, s, 2-OH), 9.40 (1H, s, 5-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): δ 117.5 (s, C-1), 153.4 (s, C-2), 128.6 (s, C-3), 125.2 (d, C-4), 147.9 (s, C-5), 125.2 (s, C-6), 122.0 (d, C-1'), 138.5 (d, C-2'), 131.8 (d, C-3'), 136.9 (d, C-4'), 34.9 (t, C-5'), 22.5 (t, C-6'), 14.2 (q, C-7'), 27.4 (t, C-1''), 122.0 (d, C-2''), 133.3 (s, C-3''), 18.2 (q, C-4''), 26.1 (q, C-5''), 197.4 (d, -CHO).

2.2 化合物抑菌活性

采用滤纸片二倍稀释法初步测试了化合物 2~10 对大肠杆菌 *E. coli*、铜绿假单胞杆菌 *P. aeruginosa*、白色念珠菌 *C. albican*、枯草芽孢杆

菌 *B. subtilis*、产气杆菌 *B. aerogenes* 的抑菌活性。结果显示(见表 1): 化合物 **2** 对产气杆菌、枯草芽孢杆菌有抑制活性, MIC 为 87 $\mu\text{mol/L}$; 化合

物 **4** 对产气杆菌、大肠杆菌有抑制活性, MIC 均为 78 $\mu\text{mol/L}$; 化合物 **8** 对产气杆菌、枯草杆菌的 MIC 也达 82 $\mu\text{mol/L}$, 表现出弱的活性。

表 1 化合物 2~10 的抑菌活性(“-”表示未测试)

Table 1 Antimicrobial activities of compounds 2~10 (“?” indicates not measured)

化合物 Compound	最小抑菌浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				
	产气杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	白色念珠菌 <i>Candida albican</i>
2	87	87	175	350	350
3	232	232	232	309	309
4	78	156	78	234	234
5	232	232	232	309	309
6	291	291	194	389	389
7	212	212	141	283	283
8	82	82	165	248	248
9	250	166	250	330	330
10	250	250	166	330	330
环丙沙星 Ciprofloxacin	0.47	0.94	0.24	0.47	—
lactate					
酮康唑 Ketoconazole	—	—	—	—	0.15

3 结论

本文首次对浒苔共生真菌的次生代谢产物进行了研究, 从浒苔共生真菌 *E. herbariorum* HT-2 的发酵产物中分离鉴定了 10 个单体化合物, 其中 7 个二酮哌嗪类 3 个苯甲醛衍生物。并初步测试了化合物对 5 种常见致病菌的抑制活性, 结果表明, 化合物 **2**、**4**、**8** 具有弱的抑制产气杆菌 *B. aerogenes*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 和大肠杆菌 *E. coli* 的活性。此外, 文献报道二酮哌嗪类和苯甲醛衍生物具有多样的生物活性。例如: 化合物 **2** 有轻微致芥末叶组织坏死作用^[18], 这可能与它能抑制微藻生长活性有关; 化合物 **3** 有一定的抗肿瘤活性, 对神经元细胞的氧化损伤也有保护作用^[12]等。

参考文献

[1] 李德萍, 杨育强, 董海鹰, 等. 2008 年青岛海域浒苔大爆发天气特征及成因分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(6): 1165.

[2] 孙颖颖, 李灿, 张静, 等. 浒苔对 4 种赤潮微藻生长的影响[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2010, 19(3): 75.

[3] 孙颖颖, 刘筱潇, 王长海. 浒苔提取物对 4 种赤潮微藻生长的抑制作用[J]. 环境科学, 2010, 31(6): 1662.

[4] Esser K. Endophytic fungi, occurrence and metabolites[M] // Anke T, Weber D Eds. The Mycota; A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Berlin: Springer Verlag, 2009: 154.

[5] Freeman S, Rodriguez R J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist[J]. Science, 1993, 260: 75.

[6] Jan H. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol [J/OL]. Microbe library, [2009-12-08]. <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>.

[7] 尹文清, 张青松, 林永成, 等. 海洋真菌 K26 号代谢产物的研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2004, 22(3): 54.

[8] Hamasaki T, Nagayama K, Hatsuda Y. Structure of a new metabolite from *Aspergillus chevalieri* [J]. Agric. Biol. Chem, 1976, 40: 203.

[9] Kouji K, Kensuke O, Satoshi F, et al. Synthesis and biological activities of neocheinulin A derivatives: new aspects

- of structure activity relationships for neoechinulin A[J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 2008, 56(12): 1738.
- [10] Stipanovic R D, Schroeder H W, Hein H J. Identification of D-valyl-L-tryptophan anhydride from *Aspergillus chevalieri*[J]. *Lloydia*. 1976, 39(2-3): 158.
- [11] Ryuta Y, Mikiharu D. Isolation of an antioxidative substance produced by *Aspergillus repens*[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(5): 932.
- [12] Toshiaki A, Kensuke O, Masaaki K, et al. Synthesis and neuroprotective action of optically pure neoechinulin A and its analogs[J]. *Pharmaceuticals*, 2010, 3(4): 1063.
- [13] Marchelli R, Dossena A, Pochini A, et al. The structures of five new didehydropeptides related to neoechinulin, isolated from *Aspergillus amstelodami*[J]. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 1977, 7: 713.
- [14] Hamasaki T, Nagayama K, Hatsuda Y. A new metabolite, L-alanyl-L-tryptophan anhydride from *Aspergillus chevalieri*[J]. *Agric Boil Chem*, 1976, 40 (12): 2487.
- [15] Wang W L, Lu Z Y, Zhu W M, et al. Isoechinulin- type alkaloids, varicolorin A-L, from Halotolerant *Aspergillus varicolor*[J]. *J Nat Prod*, 2007, 70: 1558.
- [16] 刘培培, 王文良, 朱伟明, 等. 耐盐真菌 *Aspergillus varicolor* B-17 产生的羟基苯甲醛衍生物及其细胞毒活性[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(4): 585.
- [17] Hamasaki T, Kimura Y, Hatsuda Y, et al. Structure of a new metabolite, Dihydroauroglaucin, Produced by *Aspergillus chevalieri*[J]. *Agric Biol Chem*, 1981, 45: 313.
- [18] Soledade M, Pedras C, Kevin C S, et al. Production of 2, 5-dioxopiperazine by a new isolate type of the blackleg fungus *Phoma lingam*[J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(6): 1575.

Studies on the secondary metabolites of *Eurotium herbariorum* HT-2 symbiotic with *Enteromorpha prolifera*

SUN Kun-lai, WANG Yi, FU Peng, LIU Pei-pei, ZHU Wei-ming*

(Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry Education of China, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of *Eurotium herbariorum* HT-2 symbiotic with *Enteromorpha prolifera*, and assay the antibacterial activities. **Methods** The isolations and purifications of compounds were performed by means of solvent extraction, column chromatography over silica gel and Sephadex LH-20, and semi-prepared HPLC. The structure identifications were made through spectroscopic analysis of UV, IR, ESI-MS, 1D and 2D NMR. The antibacterial activities were assayed using 2-fold dilution method. **Results** From the fermentation broth of *E. herbariorum* HT-2, ten compounds (1~10) were isolated and identified as preechinulin (1), cyclo-(L-Trp-D-Val) (2), (+)-neoechinulin A (3), neoechinulin B (4), cryptechinulin C (5), cyclo-(L-Trp-L-Ala) (6), varicolorin H (7), 2-(E-1-heptenyl)-3, 6-dihydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzaldehyde (8), 2-(3E, 5E-heptadienyl)-3, 6-dihydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzaldehyde (9) and 2-(1E, 3E-heptadienyl)-3, 6-dihydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl)benzaldehyde (10), respectively. Compounds 2, 4 and 8 showed weak antibacterial effects on *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Conclusion** Fungus HT-2 symbiotic with *E. prolifera* could produce compounds with antibacterial activities. **Key words:** *Enteromorpha prolifera*; symbiotic fungus; secondary metabolite; antibacterial activity

红树林放线菌多样性及新型糖苷类化合物 合成潜力发掘^{△*}

孙艺华, 冯鸽, 王超, 许姗姗, 李静*

(中国海洋大学海洋生命学院, 海洋微生物实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:目的 从红树林海泥中分离放线菌, 探讨其多样性; 并对分离菌株合成新型糖苷类化合物的代谢潜力进行评估和发掘。方法 利用 3 种培养基进行菌株分离, 对排重后菌株进行 16S rDNA 序列多样性分析; 对分离菌株进行糖基转移酶基因筛选, 对阳性菌株进一步进行合成潜力的评估及抗肿瘤活性的筛选。结果 分离纯化得到 148 株红树林放线菌, 分布于链霉菌属(*Streptomyces*)的 54 个种、原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*)。3 株菌株有合成新型糖苷类次级代谢产物的潜力并均表现出较好的抗肿瘤活性。结论 红树林土壤蕴含丰富的放线菌资源和合成活性次级代谢产物的潜力, 是新药开发和天然活性产物的重要来源。

关键词:红树林放线菌; 多样性; 糖基转移酶

中图分类号: R931

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2013)01-046-09

红树林是自然分布于热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落, 是海洋向陆地的过渡带, 有着丰富的微生物资源^[1-2], 其不同于陆地的性质: 水分高、盐分高、氧气缺乏, 其地下部分的微生物较之其他生态系统有很大的差异。因而生存于红树林环境的放线菌, 具有复杂独特的代谢途径, 其次级代谢产物在结构类型以及生物活性方面必然呈现出与陆生放线菌不同的特点和多样性, 这其中也蕴含着丰富的新型功能基因。因此红树林放线菌的资源多样性以及活性次级代谢产物一直是众多研究者的关注热点^[3-5]。

放线菌次级代谢产物的合成途径中包含着一些关键酶, 分别用于合成不同类型的化合物骨架和进行不同的后期修饰, 如环化、氧化、卤化、内脂化、甲基化、糖基化等, 最终形成有活性的化合物。因此, 以编码这些关键酶的基因作为筛选靶点, 探测菌株合成次级代谢产物的能力, 可以有效、快速地确定含有相关合成途径的菌株, 缩小活性筛选的菌株范围, 为我们在基因水平上评估放线菌产生活性物质的应用潜力, 提供可靠的技术支撑。

在糖苷类抗生素的生物合成途径中, 由糖基转移酶(GTase)催化的糖基化通常是后修饰的最后一步^[6], 通过糖的位置、类型和数量的改变对次级代谢产物的活性进行调节并加强其成药性^[7]。基于 PCR 的基因筛选技术可对放线菌中糖基转移酶和聚酮合成酶等进行基因探测和生物信息学分析, 从分子水平上获知微生物中是否具有合成糖苷类化合物的潜力, 初步预测产物结构, 指导代谢产物的分离及结构研究。

本研究的目的是从红树林根际土壤样品中选择性分离放线菌, 研究其资源多样性; 对分离到的红树林放线菌进行糖基转移酶基因 PCR 扩增和 PCR 产物序列分析。探讨红树林放线菌中糖基转移酶基因的多样性, 发现新型糖基转移酶基因, 评估其合成糖苷类化合物的潜力为红树林放线菌资源的研究、开发和利用提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

* [△]基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2010CM042); 山东省科学技术发展计划项目(2009GG10002080)资助

作者简介: 孙艺华(1987-), 女, 硕士研究生。研究方向为海洋放线菌及其基因资源研究。

* 通讯作者: 李静, 女, 讲师, 硕士生导师 E-mail: lijing313@ouc.edu.cn

收稿日期: 2012-10-11

土壤样品采集于广东珠海淇澳岛红树林保护区(22°25.631'N 113°37.729'E);广东深圳红树林(22°30.347'N 113°56.937'E);广东阳江海陵岛红树林(21°38.575'N 111°53.557'E)。样品采集后于-20℃保藏,运回实验室后进行分离。

1.1.2 培养基

菌株分离培养基:高氏一号培养基(Gause)^[8],改良淀粉酪素培养基^[9],腐植酸维生素琼脂^[10]。培养基中添加终浓度为 20 g/mL 的萘啶酮酸、25 g/mL 的制霉菌素和 50 g/mL 的重铬酸钾。发酵培养基:葡萄糖 2%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄ 0.05%、NaCl 0.05%、牛肉膏 0.3%、玉米浸粉 0.3%、酵母浸膏 1%、可溶性淀粉 1%、CaCO₃ 0.2%,pH=7.0。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

将采集的土壤样品自然风干,于无菌研钵中研成细粉状,置于 4℃备用。

1.2.2 菌株分离、纯化和保藏

取 10 g 风干样品溶于无菌陈海水中,剧烈振荡至混合均匀,然后置于 56℃水浴 6 min,上清液逐级稀释后涂布固体分离培养基平板上,28℃恒温培养 2~3 周,挑取不同的单菌落转接在相同培养基平板上进行二次纯化,纯化的菌种转接到含 20%甘油的保种液中于-80℃长期保存。斜面 28℃培养 24~36 h 后接种发酵培养基,装液量为 100 mL/500 mL 三角瓶。150 r/min,28℃培养 7 d。发酵产物破碎,乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯层真空浓缩至干,加甲醇配成 10 mg·mL⁻¹,供活性筛选用。

1.2.3 菌株的表观排重

根据培养特征、气丝、基丝、孢子丝的形态和颜色^[11],对分离菌株进行分群和表观排重。

1.2.4 菌株基因组 DNA 提取、16S rDNA 序列扩增及系统发育分析

放线菌基因组 DNA 提取参照 Cui 等人^[12]的方法,通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3') 扩增 16S rDNA 基因。PCR 扩增条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,56℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,共 30 个循环;72℃延伸 10 min。纯化的 PCR 扩增产物克

隆到 pMD19-T 载体(TaKaRa),送上海博尚生物工程公司测序。所测 16S rDNA 序列与 Genbank 数据库中已有序列比对。利用 MEGA5^[13] 软件构建 N-J 系统发育树。

1.2.5 糖苷类化合物相关合成基因的筛选和分析

用糖基转移酶特异引物 P1 和 P2 对菌株的糖基转移酶基因进行 PCR 扩增检测^[14];对糖基转移酶阳性菌株,利用引物 K1F 和 M6R、A3F 和 A7R 兼并引物进行 PKS-I 和 NRPS 基因扩增^[15]。PCR 扩增条件为:糖基转移酶基因:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,45℃退火 45 s,72℃延伸 1 min;PKS I:95℃5 min;95℃1 min,56℃1.5 min,72℃2 min;NRPS:95℃5 min;95℃45 s,57℃1 min,72℃1 min。PCR 产物由上海博尚生物技术有限公司进行测序。将测得的糖基转移酶基因序列、PKS-I 和 NRPS 基因在 GenBank 数据库中进行 Blastx 比对分析,用 MEGA 5.0 软件中 neighbour-joining(NJ)方法构建系统发育树。

1.2.6 抗肿瘤活性菌株的筛选

抗肿瘤活性菌株的筛选采用 SRB(sulforhodamine B,丽丝胺罗丹明 B)方法^[16],将对数期生长的小鼠白血病肿瘤细胞 P388,与终浓度为 100 μg/mL 的供试样品共同孵育一定时间,加入预冷的 50 μL 80%三氯醋酸固定,放置一定时间后用离子水冲洗。然后每孔加入 150 μL SRB 染色,后用 1%醋酸洗掉未结合的 SRB,再加 100 μL 缓冲液 Tris。酶标仪 515 nm 处测定 OD 值,计算抑制率。根据抑制靶细胞生长率的活性评价指标,抑制率 IR>50%的为有活性。

2 结果

2.1 菌株分离和表观排重

利用上述 3 种培养基从 9 个红树林样品中分离纯化得到 148 株红树林放线菌,根据基丝、气丝和可溶性色素可以将具典型放线菌形态的菌株归为 7 个类群:灰褐类群、烬灰类群、淡紫灰类群、粉红紫类群、白孢类群、黄色类群和粉红孢类群。

2.2 菌株的多样性分析

对表观排重得到的 80 株菌进行 16S rDNA 全序列测定,并与 Genbank 中已有序列进行比对,

结果显示:菌株分布在链霉菌属(*Streptomyce*)、原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*) 4个属中,其中 64 株分布于链霉菌属(*Streptomyce*)

的 54 个种、2 株分布于原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、1 株分布于糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、1 株分布于诺卡氏菌属(*Nocardia*) (见表 1)。

表 1 根据 16S rDNA 基因序列分析所得的放线菌菌属代表菌株的分类从属关系

Table 1 Phylogenetic affiliations of representative actinomycetes based on comparative analysis of 16S rDNA gene sequences

菌株编号 Strain No. of representatives	同源性最近的种 The closest species/Strain	最大同源性 Identities of 16S rDNA/%	收录号 Accession No.
OAct 2	<i>S. bikiniensis</i> strain DSM 40581	99	JX047059
OAct 4	<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331	99	JX047060
OAct 6	<i>S. viridobrunneus</i> strain LMG 20317	99	JX047061
OAct 7	<i>S. drozdowiczii</i> strain NRRL B-24297	99	JX047042
OAct 8	<i>S. diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> strain NRRL B-1773	99	JX144977
OAct 12	<i>S. coeruleoprunus</i> strain NBRC 15400	99	JX047024
OAct 14	<i>S. cavourensis</i> subsp. <i>cavourensis</i> strain NRRL 2740	99	JX144978
OAct 16	<i>S. variabilis</i> strain NRRL B-3984	99	JX047025
OAct 17	<i>S. enissocaesilis</i> strain NRRL B-16365	99	JX047026
OAct 18	<i>S. caviscabies</i> strain ATCC51928	97	JX047062
OAct 20	<i>S. albus</i> subsp. <i>albus</i> strain NRRL B-2365	98	JX047027
OAct 25	<i>S. tendae</i> strain ATCC 19812	99	JX047028
OAct 26	<i>S. albogriseolus</i> strain ABRINW EA1145	99	JX047029
OAct 27	<i>S. tendae</i> strain ATCC 19812	99	JX047063
OAct 28	<i>S. violaceoruber</i> strain ICSSB 1018	99	JX047030
OAct 31	<i>S. speibonae</i> strain HBUM173373	98	JX047031
OAct 33	<i>Promicromonospora citrea</i> strain DSM 43110	98	JX047069
OAct 34	<i>S. sampsonii</i> strain ATCC 25495	99	JX047032
OAct 41	<i>S. caviscabies</i> strain ATCC51928	99	JX144979
OAct 43	<i>S. canus</i> strain NRRL B-1989	99	JX047064
OAct 45	<i>S. enissocaesilis</i> strain NRRL B-16365	99	JX047033
OAct 46	<i>S. hawaiiensis</i> strain NBRC 12784	99	JX047034
OAct 50	<i>S. variabilis</i> strain NRRL B-3984	98	JX047065
OAct 55	<i>Promicromonospora sukumoe</i> strain HBUM83457	99	JX047070
OAct 57	<i>S. atrovirens</i> strain NRRL B-16357	99	JX047035
OAct 58	<i>S. flavofuscus</i> strain NRRL 8-8036	98	JX047036
OAct 59	<i>S. radiopugnans</i> strain HBUM174201	99	JX047037
OAct 62	<i>S. eurythermus</i> strain ATCC 14975	98	JX047038

续表 1

菌株编号 Strain No. of representatives	同源性最近的种 The closest species/Strain	最大同源性 Identities of 16S rDNA/%	收录号 Accession No.
OAct 63	<i>S. luteireticuli</i> strain NRRL B-12435	99	FJ842673
OAct 68	<i>S. pseudogriseolus</i> strain NRRL B-3288	99	JX047040
OAct 69	<i>S. levis</i> strain NRRL B-16370T	99	JX047041
OAct 73	<i>Saccharopolyspora hirsuta</i> strain ATCC 27875	98	JN968575
OAct 77	<i>S. sampsonii</i> strain ATCC 25495	99	JX047043
OAct 80	<i>S. bikiniensis</i> strain DSM 40581	98	JX047044
OAct 82	<i>S. olivoverticillatus</i> strain NRRL B-1994T	99	JX144981
OAct 84	<i>S. xiamenensis</i> strain MCCC 1A01550	99	JX047045
OAct 89	<i>S. brasiliensis</i> strain NRRL B-3327	99	JX047046
OAct 90	<i>S. hiroshimensis</i> strain CGMCC 4, 1948	98	JX047047
OAct 92	<i>S. racemochromogenes</i> strain NRRL B-5430	99	JX047048
OAct 93	<i>S. litmocidini</i> strain NRRL B-3635	99	JX047049
OAct 94	<i>S. fimbriatus</i> strain CFCC3133	98	JX047050
OAct 96	<i>S. albogriseolus</i> strain ABRIINW EA1145	99	JX047051
OAct 97	<i>S. sioyaensis</i> strain NRRL B-5408	99	JX047052
OAct 101	<i>S. xantholiticus</i> strain HBUM 174044	99	JX047066
OAct 106	<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331	99	JX047053
OAct 112	<i>S. chromofuscus</i> strain NBRC 12851	99	JX047054
OAct 113	<i>S. flavoviridis</i> strain NBRC 12772	99	JX047067
OAct 116	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	99	JX047068
OAct 121	<i>S. flavofuscus</i> strain NRRL B-8036	98	JX047055
OAct 124	<i>S. diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> strain NRRL B-1773	99	JN900494
OAct 125	<i>S. galilaeus</i> strain JCM 4757	99	JX047056

从表 1 可知,有 12 株菌与已知模式菌株的最大序列同源性为 98.1%,其中 10 株为链霉菌属,菌株 OAct33 的 16S rDNA 序列与原小单孢菌模式菌 *Promicromonospora citrea* DSM 43110 的最大序列同源性为 98%;OAct 73 与糖多孢菌 *Saccharopolyspora hirsuta* ATCC 27875 的最大序列同源性为 98%,这 12 株菌具体的分类学位置还需要结合其他生化指标和化学鉴定指标才能确定。菌株 OAct 18 与模式菌株 *S. caviscabies* ATCC51928T 的最大序列同源性为 97.3%,一般认为,16S rDNA 序列同源性小于 98%,可以认为属于不同的种,同源性小于 95%,可以认为属

于不同属^[17-18],可以基本确定为链霉菌属的 1 个新种,但其具体的分类学位置还需要结合 DNA-DNA 杂交、化学指标和形态特征等多相分类指标进行最终确定。

基于 16S rRNA 基因序列构建的 N-J 系统发育树如图 1。由图可见,分离到的红树林链霉菌可分为 3 簇,除潜在新种 OAct 18 外,各簇内菌株的进化距离均较短。菌株 OAct 62 与模式菌 *S. eurythermus* ATCC 14975 的最大同源性 98.3%,以 77 的自展值相对独立于簇 B 之外,菌株 OAct 50 与模式菌 *S. variabilis* NRRL B-3984 的最大同源性为 99.8%,以 80 的自展值在簇 A、B 之外

成为 1 个相对独立的进化分支;菌株 OAct 84 与 *S. xiamenensis* MCCC 1A01550 的最大同源性为 99.3%,以较高的自展值(97)成为 1 个独立于簇 A、B、C 的进化分支。

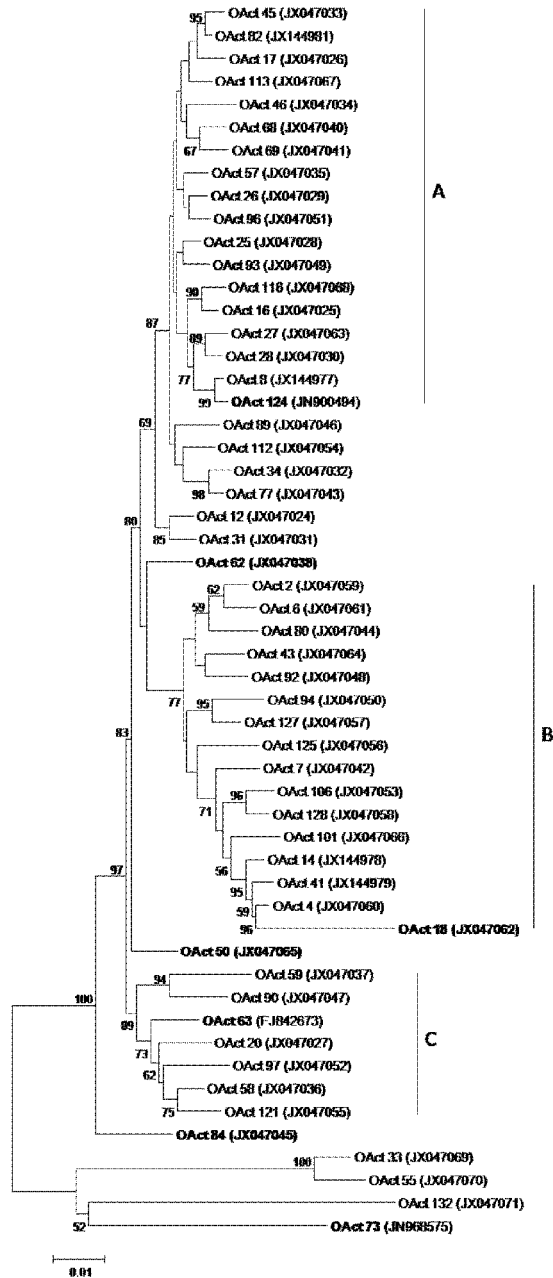


图 1 基于分离菌株 16S rDNA 基因序列构建的 N-J 系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining tree based on 16S rDNA sequences of the isolates. Numbers in parentheses represent the GenBank sequence accession numbers. Percentage bootstrap values based on 1000 resampled datasets are shown at the nodes. Only values above 50% are given.

2.3 糖苷类化合物相关合成基因的筛选及糖基转移酶基因的多样性分析

利用糖基转移酶基因兼并引物进行筛选,得到 3 株菌有糖基转移酶基因(见表 2),对糖基转移酶氨基酸序列的比对分析表明,这 3 个糖基转移酶氨基酸序列与已知菌株糖基转移酶序列的最大同源性均小于 70%,为新型糖基转移酶基因。为了进一步考察该 3 株菌合成糖苷类化合物的潜力,作者也扩增了 PKS-I 型聚酮合成酶基因和 NRPS 非核糖体多肽合成酶基因,结果显示这 3 株菌均含有 PKS-I 型聚酮合成酶基因和 NRPS 非核糖体多肽合成酶基因。结合基因筛选原理^[14,19-21]和上述筛选结果,可以推测这些菌株具有产生相关糖苷类次级代谢产物的代谢潜力。菌株及糖苷类化合物相关合成基因信息见表 2。

2.4 糖基转移酶氨基酸序列的系统发育分析

将获得的糖基转移酶基因序列转换为氨基酸序列,在 Genbank 数据库中进行比对分析,并利用 MEGA5.0 软件与数据库中合成已知糖基代谢产物的氨基酸序列构建了系统进化树(见图 2)。从图 2 中可以看出,本实验从红树林放线菌中获得的 3 个糖基转移酶序列分别位于 3 个相对独立的进化分支上。尽管菌株 OAct 63 糖基转移酶氨基酸序列与链霉菌 *Streptomyces scabies* 87-22 的冠面酸类(coronafacic acid-like)化合物合成途径中的糖基转移酶具有 70% 的最大同源性,但在系统发育树中,OAct 63 的糖基转移酶氨基酸序列并不与任何 1 个糖基转移酶序列聚成 1 支,而是以较高的自展值(99)单独形成 1 个独立的进化分支。菌株生物合成途径关键酶基因的筛选实验结果表明菌株 OAct 63 的 PKS-I 氨基酸序列与链霉菌 *Streptomyces caelestis* 的已知化合物合成途径中 PKS-I 具有 57% 的最大同源性,NRPS 氨基酸序列与链霉菌 *Streptomyces avermitilis* MA-4680 的已知化合物合成途径中 NRPS 具有 73% 的最大同源性。

菌株 OAct 73 糖基转移酶氨基酸序列与链霉菌 *Streptomyces globisporus* 的 enediyne 烯二炔类抗肿瘤化合物 C-1027 合成途径中糖基转移酶仅有 54% 的最大同源性,PKS-I 氨基酸序列与糖单孢菌属 *Saccharomonospora xinjiangensis* XJ-54 的已知化合物合成途径中 PKS-I 仅具有 60%

的最大同源性, NRPS 氨基酸序列与糖单孢菌属 *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 的已知化合物合成途径中 NRPS 具有 83% 的最大同源性。

表 2 含新型糖基转移酶基因菌株信息

Table 2 Information of the glycosyltransferase gene-positive strains

菌株编号 Strain	PKS-I GenBank No.	NRPS GenBank No.	GT gene GenBank No.	糖基转移酶最大 同源性菌株 First BLAST hit of glycosyltransferase	PKS-I 最大 同源性菌株 First BLAST hit of the PKS-I	NRPS 最大同源性 菌株 First BLAST hit of the NRPS
OAct 63	JF431432	JF431433	JF431431	<i>Streptomyces scabies</i> 87-22	<i>Streptomyces caelestis</i>	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680
OAct 73	JQ011363	JQ011365	JN968576	<i>Streptomyces globisporus</i>	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> XJ-54	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338
OAct 124	JQ011364	JQ011366	JN944846	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 11379	<i>Streptomyces globosus</i>	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> ATCC 53653

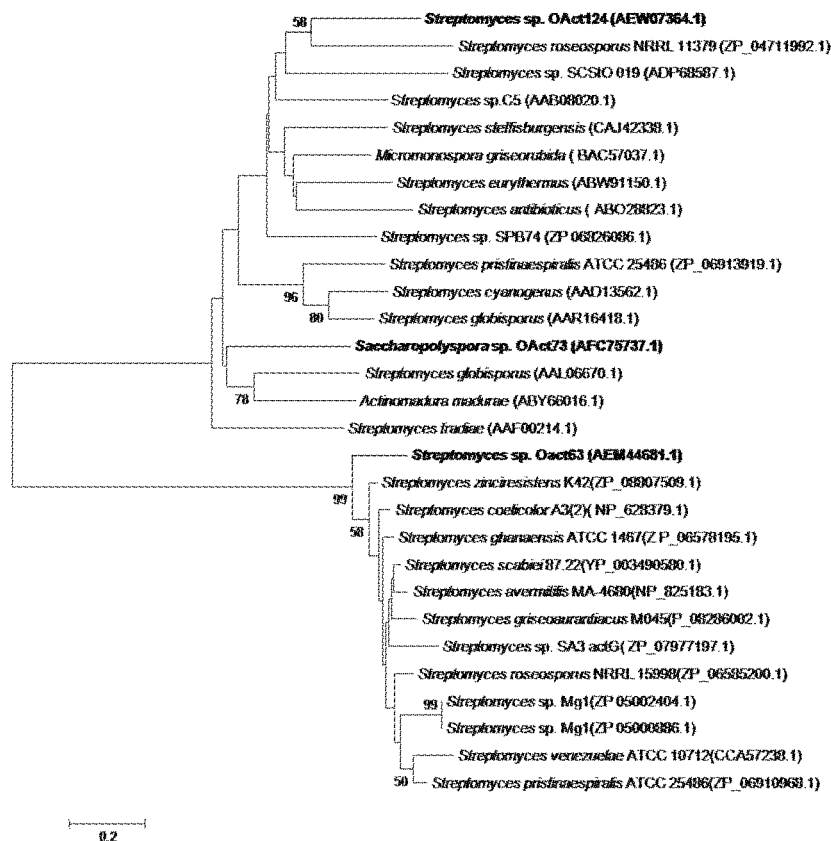


图 2 依据实验菌株(黑体)与已知糖基化合物产生菌的糖基转移酶基因氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree based on glycosyltransferase amino acid sequences of isolates (bold) and known glycosyl compounds-producing strains (normal)

(Numbers in parentheses represent the GenBank sequence accession numbers, Percentage bootstrap values based on 1000 resampled datasets are shown at the nodes. Only values above 50% are given.)

菌株 OAct 124 糖基转移酶氨基酸序列与已知糖基转移酶氨基酸序列的同源性最低,其与链霉菌 *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 的已知化合物 DP-D-desosamine: 3-L-mycarosyl erythronolide 红霉素酯 B 合成途径中的糖基转移酶仅有 53% 的最大同源性,PKS-I 氨基酸序列与链霉菌 *Streptomyces globosus* 的已知化合物合成途径中 PKS-I 的同源性也很低,为 57%;NRPS 氨基酸序列与链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 的已知化合物合成途径中 NRPS 具有 87% 的最大同源性。因此作者预测这 3 株菌均可能具有合成新型糖苷类活性化合物的潜力。

2.5 菌株的抗肿瘤活性

以 P388 肿瘤细胞株体外抗肿瘤活性为筛选模型,对 68 株红树林放线菌发酵产物的乙酸乙酯提取物进行活性筛选,萃取物的测定浓度为 100 g/mL。筛选结果表明红树林放线菌在该筛选模型下活性率较高,共得到 27 株抑制率 IR 大于 50% 的活性菌株,活性率为 39.7%;3 株糖基转移酶基因阳性的菌株均表现出较好的抗肿瘤活性,菌株 OAct 63 和 OAct 73 抑制率均大于 90%,分别为 95% 和 93%,菌株 OAct124 抑制率为 86%,进一步的化学筛选正在进行当中。

3 讨论

红树林环境是海岸潮间带干湿交替、兼具备海陆土壤特征的环境,蕴涵丰富的放线菌资源,目前从红树林土壤中已分离得到了包括链霉菌属、小单孢菌属、小四孢菌属、诺卡氏菌属和马杜拉菌属等大量放线菌,这些菌株显示出了一系列的抗菌、抗肿瘤活性,具有广阔的开发前景^[4-5]。本文对分离菌株的 16S rDNA 的多样性分析显示,本研究仅得到 3 株稀有放线菌分别是原小单孢菌属和糖多孢菌属,高达 94% 的菌株分布于链霉菌属的 54 个种当中,已有的文献报导均显示,链霉菌是红树林土壤中的优势菌属,如闫丽萍等^[22]从海南文昌、琼山红树林环境中分离到 30 株抗肿瘤活性的放线菌均为链霉菌属。肖静等人^[3]利用高氏一号培养基、察氏培养基、ISP2 培养基、HVA 培养基从福建漳州红树林保护区采集土壤样品中分离到 163 株放线菌,其中链霉菌属 145 株(89%)。骆耐香等^[5]对广西北海及防城港红树林土壤

放线菌的研究发现具有一定的多样性,其中链霉菌属占 80%。链霉菌一直被认为是产生各种抗生素的主要来源,遗传多样性分析表明,链霉菌属可产生的活性代谢产物的总数约有 10 万种,而目前发现的只是很小一部份^[23]。不但是发现放线菌新种的重要资源,也是新药开发和天然活性产物的重要来源。

对糖苷类化合物合成基因的筛选实验仅得到 3 株菌有新型糖基转移酶基因,这 3 株菌均含有 PKS-I 型聚酮合成酶基因和 NRPS 非核糖体多肽合成酶基因,预示这些菌株有产生相关糖苷类次级代谢产物的潜力。糖基转移酶是次级代谢产物合成途径中重要的后修饰酶,近年来,国际上对糖基转移酶在微生物代谢产物研究中的应用日渐关注,日本的 Miyamoto 等人从紫色链霉菌 *Streptomyces violaceus* 中克隆了紫红霉素生物合成途径中的糖基化转移酶基因 rhoG,该基因可以将紫红霉素酮糖基化^[24]。德国的 Bechthold 研究组从链霉菌和小单孢菌中克隆到了 22 个新的糖基转移酶基因^[25];目前国内对海洋放线菌中糖基转移酶基因的研究报道还很少,南海海洋研究张长生课题组对 Elaiophylin 的糖基转移酶展开了体外研究工作,完成了 Elaiophylin 糖基转移酶 ElaGT 和友菌素糖基转移酶 AmiG 的体外功能鉴定^[26],该课题组还验证了台勾霉素(tiacumicins)生物合成基因簇中 2 个糖基转移酶(TiaG1 和 TiaG2)的体内功能^[27]。但国内目前还未见利用基因筛选技术对放线菌进行糖基转移酶的基因筛选报道,基因筛选(Sequence Guided Genetic Screening)技术通过将特定功能基因作为筛选标记,探究细胞产生某类代谢物的可能性以及在基因水平上评估其产生活性物质的能力;另一方面,通过对基因筛选所获得的次生代谢产物合成相关基因(簇)进行生物信息学分析,可以初步预测产物结构,在一定程度上避免化合物的重复发现。本论文通过对糖基转移酶基因筛选,获得 3 株有合成新型糖苷类次级代谢产物的潜力的红树林放线菌,在 P388 肿瘤细胞株体外抗肿瘤活性实验中均表现出较好的抗肿瘤活性,验证了基因筛选的重要作用和指导性,为红树林放线菌资源的开发和持续利用提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] 王岳坤,洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. 微生物学报,2005,45(2):201.
- [2] Yan B, Hong K, Yu Z N. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones[J]. *J Microbiol*,2006,44(5):566.
- [3] 肖静,许静,徐俊,等. 红树林放线菌的分离及其抗菌和抗肿瘤细胞活性[J]. 应用与环境生物学报,2008,14(2):244.
- [4] 徐小雄,林海鹏,洪葵,等. 从红树植物根际土壤选择性分离小双孢菌[J]. 微生物学报,2009,36(9):1299.
- [5] 骆耐香,陈森洲,袁桂峰,等. 广西沿海地区红树林根系土壤中放线菌的分离与鉴定[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(2):310.
- [6] Losey HC, Peczuh MW, Chen Z, et al. Tandem action of glycosyltransferases in the maturation of vancomycin and teicoplanin aglycones: novel glycopeptides [J]. *Biochem*, 2001,40(15):4745.
- [7] Kren V, Martínková L. Glycosides in medicine: "the role of glycosidic residue in biological activity" [J]. *Curr Med Chem*,2001,8(11):1313.
- [8] 李卓隼,喻子牛,何绍江. 农业微生物实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996:143.
- [9] 唐蜀昆,姜怡,职晓阳,等. 嗜盐放线菌分离方法[J]. 微生物学通报,2007,43(2):390.
- [10] 刘志恒,姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京:科学出版社,2004:161.
- [11] 中国科学院微生物研究所. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1975:19.
- [12] Cui X L, Mao P H, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*,2001,51(2):357.
- [13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*,2011,28(10):2731.
- [14] Andriy L, Holger W, Annette C, et al. A strategy for cloning glycosyltransferase genes involved in natural product biosynthesis[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,2007,75(6):1367.
- [15] Ayuso-Sacido A and Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes; Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups [J]. *Microb Ecol*, 2005, 49(1):10.
- [16] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990,82(13):1107.
- [17] Devereux R, He S H, Doyle C L. Diversity and origin of desulfotribio species; phylogenetic definition of a family [J]. *J Bacteriol*, 1990,172(7):3609-3619.
- [18] Fry NK, Warwick S, Saunders NA. The use of 16S ribosomal RNA analysis to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae[J]. *J Gen Microbiol*, 1991,137(5):1215-1222.
- [19] Andreas H, Marcelo B, Agnieszka D, et al. Genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources[J]. *Chem Bio Chem*, 2007, 8:757-766.
- [20] Erin A, Susana P, William F, et al. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in Marine Actinobacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010,76(8):2487-2499.
- [21] Peng G, Ying H. Detection, distribution, and organohalogen compound discovery implications of the reduced flavin adenine dinucleotide-dependent halogenase gene in major filamentous Actinomycete taxonomic groups[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2009, 75(14):4813 - 4820.
- [22] 闫丽萍,洪葵,胡申才,等. 海南近海 30 株抗 B16 细胞活性放线菌的 16S rDNA 多样性分析[J]. 微生物学报,2005,45(2):185.
- [23] 阮继生. 放线菌分类基础[M]. 北京:科学出版社,1992:18.
- [24] Miyamoto Y, Osamu J, Yasunori N, et al. Cloning and characterization of a glycosyltransferase gene involved in the biosynthesis of anthracycline antibiotic-rhodomyacin from *Streptomyces violaceus* [J]. *Fems Microbiol Lett*, 2002,206(2):163.
- [25] Annette E, Holger W, Johannes H, et al. A bacterial glycosyltransferase gene toolbox; Generation and applications [J]. *Phytochem*, 2009,70(15-16):1812.
- [26] Gong L, Xiao Y, Liu Q, et al. Preliminary X-ray crystallographic analysis of the glycosyltransferase from a marine Streptomyces[J]. *Acta Cryst Sect F*, 2011, 67(1):136.
- [27] Xiao Y, Li S, Niu S, et al. Characterization of Tiacumicin B biosynthetic gene cluster affording diversified Tiacumicin analogs and revealing a tailoring dihalogenase[J]. *J Am Chem Soc*,2011,133(4):1092.

Phylogenetic diversity analysis and novel glycosides biosynthetic potential evaluation of Mangrove actinomycetes

SUN Yi-hua, FENG Ge, WANG Chao, XU Shan-shan, LI Jing*

(*College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China*)

Abstract: Objective To analyze the diversity of actinomycetes isolated from mangrove sediments and to evaluate the novel glycosides biosynthetic potential of these actinomycetes. **Method** Mangrove actinomycetes were isolated using 3 medium. 16S rDNA sequences of the representatives were amplified and sequenced to analyze phylogenetic diversity of the actinomycetes. A sequence-guided genetic screening strategy was used to evaluate the genetic biosynthetic potential. **Results** 148 strains were isolated and 80 representatives were classified into 4 genera. 3 strains showed novel glycosides biosynthetic potential and high antitumor activity. **Conclusion** There were abundant and diverse actinomycetes in the mangrove sediments. It is one of the most important sources in searching for new species and bioactive compounds.

Key words: mangrove actinomycetes; diversity; glycosyltransferase

II 型胶原蛋白的热稳定性、圆二色性和 红外光谱研究^{△*}

宋瑞瑞^{1,2}, 包斌³, 卜永士¹, 王永先¹, 陈丽娟¹, 吴文惠^{2,3*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工与贮藏工程技术研究中心, 上海 201306;
3. 上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306)

摘要:目的 以蓝鲨 II 型胶原蛋白为材料, 分析 II 型胶原蛋白的热稳定性、圆二色性和红外光谱特性。方法 采用限制性酶解法分离蓝鲨软骨 II 型胶原蛋白, 通过 SDS-PAGE、DSC、CD、IR 分析 II 型胶原蛋白的相对分子质量、热变性温度、二级结构特征和红外光谱特征。结果 蓝鲨 II 型胶原蛋白是由相对分子质量为 130 kDa 的 $\alpha 1$ 链构成; 蓝鲨 II 型胶原蛋白的热变性温度为 40.5 °C, $[Na^+]$ 和 $[H^+]$ 改变了胶原蛋白的热稳定性; 蓝鲨 II 型胶原蛋白在 3411、3008、1648、1549 cm^{-1} 有红外特征性吸收峰; 蓝鲨 II 型胶原蛋白以 β 折叠为主, 占主链的 36.9%, 接近于全 β 型三级结构, $[H^+]$ 将改变 II 型胶原蛋白的二级结构元件构成, 使其 β 折叠消失, 出现少量的 α 螺旋, II 型胶原蛋白肽链转变成无规卷曲。结论 蓝鲨 II 型胶原蛋白是典型的纤维状蛋白质, 具有作为生物功能物质的优良生物化学特性。

关键词: II 型胶原蛋白; 热变性温度; 二级结构; 红外光谱

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2013)01-055-08

II 型胶原蛋白以原骨胶原同型三聚体的超螺旋结构存在于哺乳动物软骨, 是由 3 条相同的 $\alpha 1$ (II) 链组成的, 在哺乳动物透明软骨中含量丰富, 约占软骨组织蛋白质总量的 80%^[1]。II 型胶原蛋白最初以前体的形式在软骨结缔组织的成纤维细胞合成, 随后被拼接成前胶原 II A 和前胶原 II B 2 种方式^[2], 不同分子形式的 II 型胶原蛋白是由于氨基端前肽的半胱氨酸富集区的选择性切割而形成的。前胶原 II A 在 N 末端有一段半胱氨酸富集区, 称为 II 型前胶原 A 氨基端前肽^[3], 主要见于前期软骨组织成纤维细胞和胚胎组织中, 而前胶原 II B 的 N 末端缺乏这种半胱氨酸富集区^[4], 主要存在于成年哺乳动物软骨成纤维细胞中。II 型胶原前体剪切掉氨基端前肽, 经羟基化修饰后, 通过二硫键连接成三螺旋结构分泌至细胞外成为软骨基质中的结构蛋白。

II 型胶原蛋白作为典型的结构蛋白, 含有大部分常见氨基酸, 其中甘氨酸和羟脯氨酸的含量很高^[5], 但不含有色氨酸, 组氨酸、苯丙氨酸和半

胱氨酸等氨基酸含量较少。基于氨基酸构成的胶原蛋白 3 条肽链形成的空间超螺旋结构, 和每一条肽链重复出现的 Gly-Xaa-Yaa 三肽单元密切相关。甘氨酸的空间位置能优化多肽链折叠构象, 而且甘氨酸是唯一适合肽链折叠内部位置的氨基酸, 产生 (Gly-Xaa-Yaa)_n 氨基酸序列的重复, 最为常见的三肽单元 Gly-Pro-Hyp 有助于三股螺旋的稳定^[6-7]。

鸡 II 型胶原蛋白的 α 链相对分子质量为 110 kDa, 提取的温度、胃蛋白酶添加量和提取时间等条件影响其二级结构, 其 β 折叠的数量占主链的 39.1%~46.5%, 无规卷曲相应为 60.9%~53.5%, 主链结构中不包含 α 螺旋, 圆二色谱分析中的谷 (Negative band) 和峰 (Positive band) 分别位于 198 nm 和 221 nm, 热变性温度为 43.8 °C^[8]。猪 II 型胶原蛋白的 α 链相对分子质量为 120 kDa, 电泳图谱有 1 条含量较高的 α 带, 含量为 93.2%, 还含有 1 条含量较低的 β 二聚体, 含量为 6.8%。吸收光谱分析显示, 猪 II 型胶原蛋白紫外最大吸

* Δ 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2011AA09070109); 上海市教委重点学科建设项目 (J50704) 资助

作者简介: 宋瑞瑞 (1986-), 女, 硕士研究生, 食品科学与工程专业。Tel: 18801770740; E-mail: songrui Rui2008@163.com

* 通讯作者: 吴文惠, 男, 教授, Tel: 021-61900388; E-mail: whwu@shou.edu.cn

收稿日期: 2012-05-08

收峰在 230 nm 处,甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸的含量分别为 419/1000、109/1000、164/1000^[9]。

基于 II 型胶原蛋白的结构和生物化学特性,其在组织工程和经口免疫耐受等方面的应用已经受到越来越多的关注^[10-11],研究 II 型胶原蛋白的生物化学特性是探索其作为生物功能物质的基础^[12],本文从分子结构特征、热变性温度和红外光谱特性等方面研究了蓝鲨 II 型胶原蛋白的生物化学特性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蓝鲨(*Prionace glauca*)软骨来自浙江省某水产品加工公司,−80℃冷冻保藏至使用;标准蛋白(肌球蛋白 200kDa,β-半乳糖苷酶 116kDa,磷酸酶 b 97.2kDa,牛血清蛋白 66.4kDa,卵清蛋白 44.2kDa)用于 SDS-PAGE,来自上海皓嘉科技发展有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 II 型胶原蛋白的分离

蓝鲨 II 型胶原蛋白的提取方法参照 Phanat 等^[13]方法,所有操作均在 4℃下进行。

1.3 SDS - PAGE

将提取纯化的蓝鲨 II 型胶原蛋白及标准蛋白(44~200kDa)加入加样缓冲液,采用 SDS - PAGE,3% 浓缩胶,7.5% 分离胶,室温下稳流 20 mA,电泳 2 h,固定液固定 1 h,考马斯亮蓝染色 0.5 h,脱色过夜,凝胶成像系统分析成像。

1.4 热稳定性测定方法

准确称取蓝鲨 II 型胶原蛋白样品 1 mg,分别用 5 μL 的去离子水、浓度梯度的 NaCl 和浓度梯度的乙酸充分浸润,置于铝坩锅中,压片机封口,以密封空铝盒作参比,起始温度 20℃,终止温度 60℃,2℃·min⁻¹升温程序中扫描。

1.5 圆二色性检测方法

用 0.05 mol·L⁻¹的乙酸配制浓度为 0.1 mg·mL⁻¹的蓝鲨 II 型胶原蛋白溶液待测;在 1 mL 的比色管中分别加入上述配制的 II 型胶原蛋白溶液 80 μL,然后依次加入浓度为 0.05 mol·L⁻¹的乙酸 0,40,80,160 μL,以去离子水定容到 800 μL,混合均匀后在 37℃条件下保温 30 min 于 0.1 cm 石英样品池扫描,波长范围为 190~250 nm,扫描速率 100 nm·min⁻¹,保温过程中每隔 10 min 扫描一次,以去离子水为对照进行圆二色谱扫描。

1.6 红外光谱检测方法

取适量冷冻干燥后的蓝鲨 II 型胶原蛋白和溴化钾,置于玛瑙研钵中,研磨成粉后,装样压片,采用红外光谱仪对样品在 650~4 000 cm⁻¹ 区间进行扫描。

2 结果与分析

2.1 II 型胶原蛋白的相对分子质量分析

以蓝鲨软骨为材料,参照 Phanat 等^[13]方法提取获得了蓝鲨 II 型胶原蛋白。

蓝鲨 II 型胶原蛋白样品及标准蛋白质的 SDS - PAGE 如图示。

由图 1 标准蛋白质的迁移率计算得蓝鲨 II 型胶原蛋白 α 条带的相对分子质量为 130 kDa。该实验结果和肖旭等^[14]从羊软骨中分离出的 II 型胶原蛋白相对分子质量为 130 kDa 是完全相同的,宁志刚等^[15]从猪软骨中分离出的 II 型胶原蛋白相对分子质量在 120 kDa 左右,陆雪琴等^[16]从鸡胸软骨粉中提取出的 II 型胶原蛋白相对分子质量在 130 kDa 以上,且有 2 个条带,相对分子质量分别为 130 kDa 和 200 kDa 左右。Phanat 等^[13]从斑竹鲨和黑鳍鲨软骨中分离的胶原蛋白相对分子质量在 116 kDa 以上,且有 2 个条带。

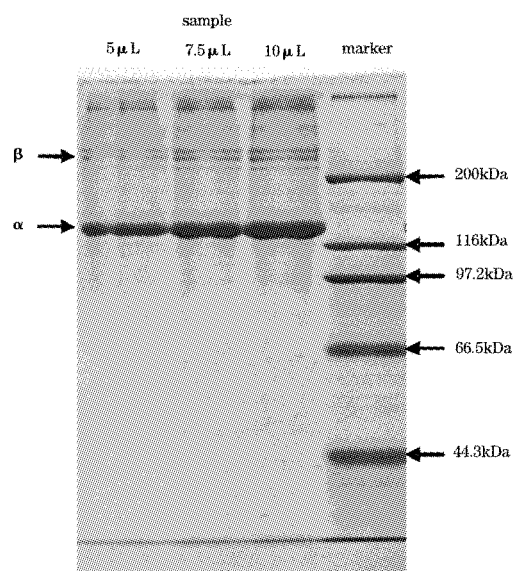


图 1 蓝鲨 II 型胶原蛋白 SDS - PAGE

Fig. 1 SDS - PAGE of *Prionace glauca* type II collagen

图 1 显示电泳图谱中出现 α 带为主的泳带和含量较少的 β 泳带,β 泳带在还原的条件下解聚(图未显示)成 α 泳带,由此结果分析得出,蓝鲨 II

型胶原蛋白是由 3 条相同的 α 链构成,此 β 链是 α 链的二聚体形式,并且确定从蓝鲨软骨中提取的胶原蛋白为 II 型胶原蛋白。

另外,图谱上无其他杂带说明提取的蓝鲨 II 型胶原蛋白达到电泳纯。

2.2 II 型胶原蛋白的热稳定性分析

用差示扫描量热仪检测了蓝鲨 II 型胶原蛋白的热变性温度,并且分析了盐浓度和氢离子浓度对其热变性温度的影响。

表 1 NaCl 和乙酸对蓝鲨 II 型胶原蛋白热变性温度的影响

序号 Number	蓝鲨 II 型胶原蛋白 <i>Prionace glauca</i> /mol · L ⁻¹ type II collagen(CII)	起始变性温度 Initial denaturation temperature	变性温度 Denaturation temperature	终止变性温度 Terminated denaturation temperature
1	去离子水	37.1	40.5	44.0
2	0.5 NaCl	36.7	37.5	44.9
3	1.0 NaCl	35.9	36.1	37.0
4	1.5 NaCl	45.1	49.1	53.3
5	0.1 乙酸	45.6	46.5	49.2
6	0.5 乙酸	47.5	48.0	48.5
7	1 乙酸	40.8	43.0	46.2

差示扫描量热仪的检测结果显示如表 1 所示。蓝鲨 II 型胶原蛋白的热变性温度为 40.5 °C,由表 1 可以看出,在相对低浓度的 NaCl 溶液中,蓝鲨 II 型胶原蛋白热变性温度能降低 3 °C,这可能是由于盐离子的加入影响了胶原蛋白分子之间带电氨基酸残基的相互排斥作用,降低了胶原蛋白的热稳定性^[17-18]。当进一步加大 NaCl 的浓度时,蓝鲨 II 型胶原蛋白的变性温度仍降低,这可能是由于 NaCl 与胶原蛋白分子骨架及侧链上的基团竞争水分子形成氢键,这使得胶原蛋白间的氢键易于被破坏。当继续增加盐离子的浓度时,胶原蛋白的变性温度会迅速增加,可能是因为这个浓度范围内胶原蛋白发生了盐析和聚集。蓝鲨 II 型胶原蛋白热稳定性与高稳定性的胶原纤维相类似^[19]。用乙酸代替上述的 NaCl,当乙酸浓度较低时,蓝鲨 II 型胶原蛋白热变性温度升高,随着酸浓度增高,蓝鲨 II 型胶原蛋白热变性温度继续升高,当酸浓度进一步加大时,蓝鲨 II 型胶原蛋白热变性温度又降低,但仍高于乙酸不存在时蓝鲨 II 型胶原蛋白的热变性温度。Kristiasson^[20]报道酸处理使鳕鱼肌原纤维蛋白凝胶强度略微升高,这与实验中乙酸的加入使蓝鲨 II 型胶原蛋白热变性温度升高相符。Mukund Mohan^[21]指出,在非中性 pH 条件下提取的蛋白质更易溶于其提取条件下的 pH,蓝鲨 II 型胶原蛋白在酸性的条件下提取,因此,在酸性条件下,其表面疏水性更强,增加了

其热稳定性。

2.3 II 型胶原蛋白的二级结构特性

采用圆二色光谱研究蓝鲨 II 型胶原蛋白的二级结构特征,结果如图 2 和图 3 所示。

如图 2,蓝鲨 II 型胶原蛋白在波长 216 nm 处出现正吸收谱带,这是左旋聚脯氨酸(P-II)构型肽链圆二色谱的典型特征,在波长 195 nm 左右处出现负吸收谱带,是蓝鲨 II 型胶原蛋白分子构象中无规则卷曲结构的典型特征^[16]。由图 2 可以看出,在一定的乙酸浓度范围内,随着乙酸加入量的增多,其负吸收谱带位置不断右移,且在此处的椭圆率逐渐减小,当加入量达到一定程度后,其负吸收谱带区域又向左移动,且此处的椭圆率又突然变大。这种现象可能是由于随着乙酸含量的增加,溶液的 pH 值不断减小,蓝鲨 II 型胶原蛋白的 β -折叠结构逐渐解聚。当保温时间长短不同时,图谱扫描的结果也不同,从图 3 可以看出,随着保温时间的增长,其椭圆率逐渐增大,保温时间越长,椭圆率值越小。还可以看出,保温时间长短对蓝鲨 II 型胶原蛋白负吸收谱带位置有着明显的影响,当保温时间为 10 min 时,其负吸收谱带区域发生蓝移,随着保温时间的增长,其负吸收谱带区域又向右移动。Kwak 等^[22]指出,当蛋白质完全变性时,其在 221 nm 处的正吸收峰完全消失,且其负吸收区域会发生红移现象。

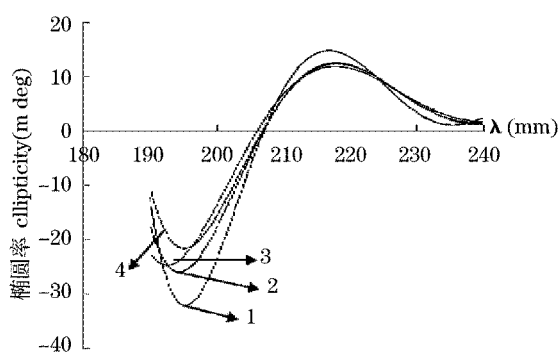


图2 乙酸对Ⅱ型胶原蛋白CD的影响

Fig. 2 The effect of acetic acid on CD of type II collagen

1: 5 mmol · L⁻¹; 2: 10 mmol · L⁻¹;
3: 15 mmol · L⁻¹; 4: 20 mmol · L⁻¹

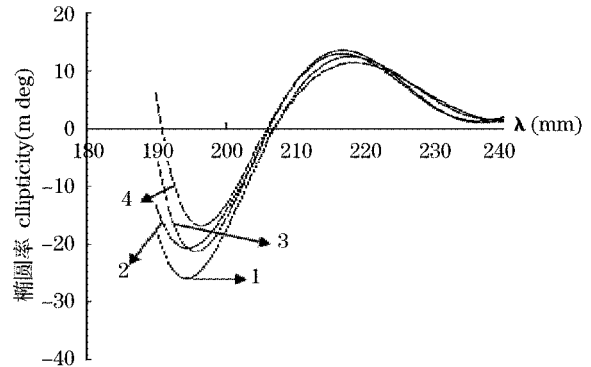


图3 温度处理对Ⅱ型胶原蛋白CD的影响

Fig. 3 The effect of temperature treatment on CD of type II collagen

1: 0 min; 2: 10 min; 3: 20 min; 4: 30 min

乙酸添加量和保温时间长短对蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白圆二色谱特性的影响结果列入表2。

表2 乙酸添加量和保温时间对蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白圆二色谱吸收峰及椭圆率的影响

Table 2 The effect of acetic acid and holding time on CD absorption peak and ellipticity of *Prionace glauca* type II collagen

序号 Number	乙酸浓度/mmol · L ⁻¹ Acetic acid concentration	吸收谱带波长/nm Wavelength of absorption band		椭圆率/m deg Ellipticity	
		正吸收谱带 Positive band	负吸收谱带 Negative band		
		1	5	217.0	192.0
2	10	216.0	195.5	12.009	-27.026
3	15	217.0	194.5	14.186	-32.008
4	20	218.5	195.0	11.918	-21.027
5	10, 37 °C 0 min	216.0	194.5	12.009	-25.026
6	10, 37 °C 10 min	218.0	194.0	11.692	-20.846
7	10, 37 °C 20 min	216.0	195.5	12.335	-21.014
8	10, 37 °C 30 min	216.5	196.0	11.701	-17.829

不同乙酸添加量和保温时间对蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白的二级结构的影响列入表3和表4。

表3 不同乙酸浓度对Ⅱ型胶原蛋白α-螺旋、β-折叠和无规卷曲比例的影响

Table 3 The effect of different acetic acid concentrations on the percentage of α-helix, β-sheet and random coil of *Prionace glauca* type II collagen

二级结构/% Secondary structure	乙酸浓度 Acetic acid concentration/mmol · L ⁻¹			
	0	10	15	20
无规卷曲 Random coil	63.1	83.2	100	97.2
β-折叠 β-sheet	36.9	16.8	—	—
α-螺旋 α-helix	—	—	—	2.8

由表3可以看出,乙酸的加入量对蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白的二级结构有着明显的影响,当乙酸的浓度为 5 mmol · L⁻¹时,无规卷曲所占的比例为

63.1%,β-折叠的比例为 36.9%。当乙酸的浓度为 10 mmol · L⁻¹时,无规卷曲所占的比例为 82.3%,而乙酸的浓度分别为 15 mmol · L⁻¹和

20 mmol · L⁻¹时,无规卷曲所占的比例分别是 100%和 97.2%。

表 4 温度处理对 II 型胶原蛋白 α 螺旋、 β 折叠和无规卷曲比例的影响

Table 4 The effect of temperature treatment on the percentage of α -helix, β -sheet and random coil of *Prionace glauca* type II collagen

二级结构/% Secondary structure	乙酸浓度 Acetic acid concentration/mmol · L ⁻¹			
	0 min	10 min	15 min	20 min
无规卷曲 Random coil	83.2	91.6	100	64.3
β 折叠 β -sheet	16.8	8.4	—	—
α 螺旋 α -helix	—	—	—	9.2
β 转角 β -turn	—	—	—	26.5

由表 4 还可以看出,一定的乙酸加入量和保温时间的长短对蓝鲨 II 型胶原蛋白的二级结构有着明显的影响。当乙酸浓度为 10 mmol · L⁻¹,保温时间为 10 min 时,蓝鲨 II 型胶原蛋白的二级结构中无规卷曲的比例为 91.6%,保温时间为 20 min 时,无规卷曲的比例为 100%,而当保温时间为 30 min 时,无规卷曲所占的比例为 64.3%,并且出现了 β 转角,比例为 26.5%。

2.4 II 型胶原蛋白的红外光谱特征

采用溴化钾压片法研究了 II 型胶原蛋白的红外光谱特征(见图 4)

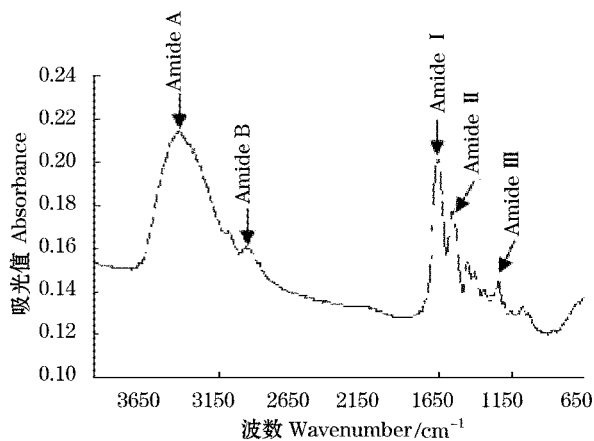


图 4 蓝鲨 II 型胶原蛋白的红外光谱

Fig. 4 IR spectra of *Prionace glauca* type II collagen

红外波谱扫描结果如图 4 所示,可看出蓝鲨 II 型胶原蛋白最主要的吸收带在酰胺带处,包括酰胺 I (1649~1658 cm⁻¹)、酰胺 II (1551~1557 cm⁻¹)、酰胺 III (1239~1245 cm⁻¹)、酰胺 A (3407~3425 cm⁻¹)和酰胺 B (2932~2961 cm⁻¹)。酰胺 I 的吸收峰主要与 C=O 键的伸缩振动有关,或由氢键和 COO⁻共同产生,并且,这是蛋白质二级结构典型的标志区域。Payne 等^[23]指出,酰胺 I 吸收峰向低波数区的移动与分子的有序性降低有

关。酰胺 II 的吸收峰在 1551~1557 cm⁻¹,是由于 N-H 键的振动和 C-N 键的伸缩振动产生的。II 型胶原蛋白酰胺 A 吸收峰(3407~3425 cm⁻¹)与 N-H 键的伸缩振动和氢键有关,根据 Muyonga 报道^[24],N-H 伸缩振动的吸收峰出现在 3400~3450 cm⁻¹如果它以氢键和其他官能团形成缔合体后,其峰将偏向低波数一侧。从图 4 可看出蓝鲨 II 型胶原蛋白酰胺 A 带出现在 3410.99 cm⁻¹,表明其 N-H 伸缩参与了分子中氢键的形成,1648.23 cm⁻¹为酰胺 I 带的 C=O 伸缩振动峰,1549.86 cm⁻¹为酰胺 II 带的 N-H 弯曲振动吸收峰。1200~1400 cm⁻¹为 N-H 的伸缩振动峰和 COO⁻的对称收缩振动峰,这是其他蛋白质所没有的红外光谱特征,可能是由于 II 型胶原蛋白的甘氨酸和特征氨基酸羟脯氨酸和脯氨酸含量高,且形成独特的 (Gly-Pro-Hyp) 序列结构引起的,1236.13 cm⁻¹为酰胺 III 带的 N-H 伸缩振动的变形峰^[25]。

3 结论与讨论

本文以蓝鲨软骨为原料,采用胃蛋白酶消化和氯化钠盐析等步骤得到相对分子质量为 130 kDa 电泳纯的蓝鲨 II 型胶原蛋白,研究了其热稳定性、圆二色谱和红外光谱等特性。

蓝鲨 II 型胶原蛋白的稳定性分析结果表明,其热变性温度为 40.5 °C。NaCl 和乙酸对其热变性温度有影响,在一定浓度范围内,II 型胶原蛋白的热变性温度随 NaCl 浓度的增加而降低,当 NaCl 浓度继续增高时,II 型胶原蛋白的变性温度又开始增高。低浓度的乙酸存在时,II 型胶原蛋白热变性温度降低,随着酸浓度增高,II 型胶原蛋白热变性温度又有升高,当酸浓度进一步加大时,II 型胶原蛋白热变性温度迅速降低。II 型胶原蛋白的热变性温度与肽链氨基酸残基所形成的氢

键、水和以及二级结构密切相关。

海洋生物蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白的热变性温度与陆地生物Ⅱ型胶原蛋白有明显不同。鸡、猪、羊等

陆地动物和一些海洋生物Ⅱ型胶原蛋白的热变性温度列入表5。

表5 海洋生物和陆地生物Ⅱ型胶原蛋白的热变性温度

Table 5 Thermal denaturation temperatures of type II collagen from marine and terrestrial organisms

生物	陆地生物 Terrestrial biota				海洋生物 Marine organism		
	鸡 ^[8]	羊 ^[14]	猪 ^[9]	蛇 ^[26]	蓝鲨	黑鳍鲨 ^[13]	斑竹鲨 ^[13]
变性温度/°C	43.8	40.0	—	—	40.5	34.6	36.0
Denaturation temperature							
相对分子质量/KDa	110	130	120	120	130	120	120
Molecular weight							
提取方法	胃蛋白酶	胃蛋白酶	胃蛋白酶	胃蛋白酶	胃蛋白酶	胃蛋白酶	胃蛋白酶
Extraction method	水解法	水解法	水解法	水解法	水解法	水解法	水解法

蛋白质的热变性温度被认为是生物长期适应环境的结果,生活于低温、缺氧、少光、高渗等海洋环境中的海洋生物有相对较低的热变性温度,与此相对生活于温暖陆地环境中的生物具有较高的热变性温度,推测Ⅱ型胶原蛋白这种不同的热变性温度与氨基酸构成、二级结构等生物化学特性密切相关,Ⅱ型胶原蛋白分子内如含有较多数量的能保持热焓的碱性氨基酸残基和/或酸性氨基酸残基,则其热变性温度高,稳定性强,更适于组织工程材料方面的应用。

蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白在216 nm处有最大的正椭圆率,在195 nm处有最小的负椭圆率,提取条

件对胶原蛋白的二级结构有明显影响,进而影响其生化特性。蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白的主要吸收峰在氨基化合物区域,包括酰胺Ⅰ(1648~1649 cm⁻¹),酰胺Ⅱ(1549~1550 cm⁻¹),酰胺Ⅲ(1236~1237 cm⁻¹),酰胺A(3410~3411 cm⁻¹)和酰胺B(2932~2933 cm⁻¹),这与文献报道的天然Ⅱ型胶原蛋白的吸收峰位基本一致,证明蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白的结构未遭到破坏。

到目前为止,仅有曹慧等对鸡胸软骨粉中分离的Ⅱ型胶原蛋白圆二色谱结构的研究报道,作者发现,蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白的圆二色谱特性与鸡型胶原蛋白的差异性明显,比较结果列入表6。

表6 蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白与鸡Ⅱ型胶原蛋白的圆二色谱特性

Table 6 The properties of type II collagen from *Prionace glauca* and chicken

生物	吸收谱带波长/nm		二级结构分量/%	
	Wavelength of absorption band		Percentage of secondary structure	
	正吸收谱带	负吸收谱带	β-折叠	无规卷曲
Organism	Positive band	Negative band	β-sheet	Random coil
鸡 ^[8]	221	198	46.5	53.5
Chicken				
蓝鲨	217	192	36.9	63.1
<i>Prionace glauca</i>				

蛋白质的CD信号反映了二级结构元件的总和,能估算未知结构蛋白质的螺旋、链和转角的比例。Ⅱ型胶原蛋白出现的正吸收峰与反式肽键的聚脯氨酸构型肽链有关,而其负吸收峰的出现与无规卷曲有直接的关系。蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白的负吸收谱带192 nm恰恰是α螺旋正吸收谱带的位置,所以蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白不包含α螺旋体现在其圆二色谱的检测结果上,鸡Ⅱ型胶原蛋白也在

192 nm附近的198 nm处有负吸收谱带,也没有α螺旋的存在,并且按照规则蛋白质三级结构分类标准^[27],鸡Ⅱ型胶原蛋白属于“全β型”三级结构,蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白也接近于“全β型”三级结构,这也是纤维蛋白的典型结构特点。与鸡Ⅱ型胶原蛋白的圆二色性相比,无论是聚脯氨酸构型肽链引起的正吸收峰还是无规卷曲产生的负吸收峰,蓝鲨Ⅱ型胶原蛋白吸收峰位置均发生蓝移现象,

这可能是由于陆地生物的 II 型胶原蛋白的三螺旋结构较海洋生物的 II 型胶原蛋白更为紧密。

蓝鲨 II 型胶原蛋白的红外光谱特性与陆生动物鸡以及海洋生物其它物种来源的鲨鱼 II 型胶原

蛋白有明显差别,鸡及其它来源的鲨鱼 II 型胶原蛋白红外光谱特征与蓝鲨 II 型胶原蛋白比较列入表 7。

表 7 海洋生物与鸡 II 型胶原蛋白红外光谱特性

Table 7 Infrared spectral characteristics of type II collagen from marine organisms and chicken

生物 Organism	吸收峰/cm ⁻¹ Wavelengthnumber				
	酰胺 A Amide A	酰胺 B Amide B	酰胺 I Amide I	酰胺 II Amide II	酰胺 III Amide III
蓝鲨 <i>Prionace glauca</i>	3417	2950	1656	1557	1242
斑竹鲨 ^[13] Bamboo shark	3299	2921	1633	1540	1235
黑鳍鲨 ^[13] Blacktip shark	3293	2921	1634	1540	1235
鸡 ^[8] Chicken	3309	—	1685	1552	1240

红外光谱测量蛋白质的功能基团和高极性键的振动,蛋白质的这些基团提供了由所有参与成分的振动特性组成的生化“指纹”,可以成功得到蛋白质二级结构的定量信息。推测,所有 II 型胶原蛋白都是由氢键来维系其空间结构,则可由所有来源的 II 型胶原蛋白在 3293~3306 cm⁻¹ 处的低频数看出。与其他鲨鱼来源的 II 型胶原蛋白相比,蓝鲨 II 型胶原蛋白的红外吸收峰均发生红移,但与陆生生物鸡来源的 II 型胶原蛋白相比,酰胺 I 发生了蓝移现象,酰胺 I 处的峰是蛋白质二级结构在红外光谱分析中典型的标志区域,由于这与分子的有序性相关,可以推测海洋生物来源的 II 型胶原蛋白分子有序性要稍低于陆地来源的生物 II 型胶原蛋白。

本文的研究结果表明蓝鲨 II 型胶原蛋白是 1 种含有(Gly-Xaa-Yaa)基序的重复结构,其中 Xaa 和 Yaa 通常为脯氨酸和赖氨酸残基。蓝鲨 II 型胶原蛋白氨基酸的这种重复序列体现着纤维状蛋白质的特征,这些序列促进了每种蛋白形成自己的拓扑结构。在胶原蛋白中,每 3 个氨基酸残基出现 1 个甘氨酸残基是非常重要的,因为甘氨酸的侧链使它能精确地适合 1 个 3 条多肽链紧密接触形成的区域,大的侧链会有效地破坏这个区域并扰动三螺旋结构^[28]。纤维状蛋白质的氨基酸组成不但与球状蛋白质差别很大,本身也是非常多样的,这种多样性反映了纤维状蛋白质的不同作用。

蓝鲨 II 型胶原蛋白的分子结构特征、红外光谱和二级结构特性体现出典型纤维蛋白的特性,具有作为生物功能物质的优良特性。

参考文献

- [1] Gelse K, Pschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(22): 1531.
- [2] 陈燕, 张会英. 骨关节炎中 II 型胶原相关分子标记物研究进展[J]. *检验医学*, 2010, 25(6): 488.
- [3] Leary JM, Hamilton JM, Deane CM, et al. Solution structure and dynamics of aprototypical chordin-like cysteine-rich repeat(von willebrand fact or type C module)from collagen IIA [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 53857.
- [4] McAlinden A, Havlioglu N, Liang L, et al. Alternative splicing of type II procollagen exon 2 is regulated by the combination of a weak 5' splice site and an adjacent intronic stem-loop cis element[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(38): 32700.
- [5] 李卫林, 曹健, 汤克勇, 等. 胶原蛋白结构和稳定性关系研究[J]. *中国皮革*, 2005, 34(23): 14.
- [6] Berg R A, Prockop DJ. The thermal translation of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen[J]. *Biochem Res Commun*, 1973, 52: 115.
- [7] Heidemann E, Roth W, Sythesis and investigation of collagen model peptide[N]. *Adv Polym Sci*, 1982, 43: 143.
- [8] Hui Cao, Shi-Ying Xu. Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage[J]. *Food Chemistry*, 2008, 108: 439.
- [9] 姜旭淦, 陈盛霞, 丁建霞, 等. 猪软骨 II 型胶原蛋白的提取纯化与鉴定[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2006, 16(5): 389.
- [10] Barnett M L, Kremer J M, St Clair E W, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen: Results

- of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 98.
- [11] Trentham D E, Dynesius-Trentham R A, Orav E J, et al. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis[J]. *Science*, 1993, 261: 1727.
- [12] 帅宗文,丁长海,徐建华,等.口服II型胶原治疗类风湿性关节炎的临床研究[J].中国医师杂志,2001,3(7):510.
- [13] Phanat K., Soottawat B, Wonnop V, Fereidoon S. Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) [J]. *Food Science and Technology*, 2010, 43: 792.
- [14] 肖旭,石文达,姚青,等.羊软骨II型胶原蛋白的提取纯化与鉴定[J].宁夏医科大学学报,2009,31(6):730.
- [15] 宁志刚,王富友,崔运利,等.可溶性猪软骨II型胶原蛋白的提取与鉴定[J].重庆医学,2011,40(10):954.
- [16] 陆雪芹,许时婴,曹慧.鸡胸软骨粉中II型胶原的提取及结构分析[J].食品科学,2009,30(4):76.
- [17] Reginak P, Rumiana K. Thermal stability of calf skin collagen type I in salt solutions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1297(2): 171.
- [18] 钟朝辉,李广美.草鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白粘度特性及变性温度研究[J].食品与发酵工业,2006,32(6):64.
- [19] 康俊霞,康永锋,包斌,等. Na^+ 、 Ca^{2+} 和 pH 值对鲨鱼皮胶原蛋白热变性温度的影响[J].食品科学,2011,32(13):66.
- [20] Kristianson G. Effect of low and high PH treatment on the functional properties of cod muscle protein[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2003, 51(17): 5103.
- [21] Mukund Mohan, Dhanya Ramachandran, T. V. Sankar, R. Anandan. Influence of pH on the solubility and conformational characteristics of muscle proteins from mullet (*Mugil cephalus*) [J]. *Process Biochemistry* 2007, 42: 1056.
- [22] Kwak J, Jefferson E A, Bhumralkar M, Goodman M. Triple helical stabilities of guest-host collagen mimetic structure[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 1999, 7: 153.
- [23] Payne K J, Veis A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies[J]. *Biopolymers*, 1988, 27(11): 1749.
- [24] Muyonga J H, Cole C G, & Duodu K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Latesniloticus*) [J]. *Food Chemistry*, 2004, 86: 325.
- [25] Sturrock, Obergag, Devore, et al. Method for preparation of type II collagen; US, 5840848[P]. 1998, 11.
- [26] 庞捷,李娟,吴湘慧,等.乌梢蛇II型胶原蛋白对大鼠佐剂型关节炎滑膜细胞因子的作用[J].中药材,2009,32(4):556.
- [27] Levitt M., Chothia C. Structural patterns in globular proteins. [J]. *Nature*, 1976, 261(5561): 552.
- [28] D. 惠特福德. 蛋白质结构与功能[M].北京:科学出版社,2008: 80.

Studies on thermostability, circular dichroism and Infrared spectral characteristics of type II collagen

SONG Rui-rui^{1,2}, BAO Bin³, BU Yong-shi¹, WANG Yong-xian¹, CHEN Li-juan¹, WU Wen-hui^{2,3*}

- (1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China; 3. Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Objective To study the thermostability, circular dichroism and infrared spectral characteristics of type II collagen purified from cartilage of *Prionace glauca*. **Methods** The digestion of pepsin was applied to extract type II collagen from *Prionace glauca* cartilage. SDS-PAGE, DSC, CD and IR were used to analyze type II collagen relative molecular mass, thermal denaturation temperature, secondary structure and infrared spectral characteristics respectively. **Results** The type II collagen from *Prionace glauca* was composed of $\alpha 1$ chains with relative molecular mass 130kDa. The thermal denaturation temperature of *Prionace glauca* type II collagen was 40.5 °C, and $[\text{Na}^+]$ and $[\text{H}^+]$ could alter its thermostability. IR analysis indicated that the characteristic absorption peaks of *Prionace glauca* type II collagen were at 3411, 3008, 1648 and 1549 cm^{-1} . β -sheet was the main secondary structure of *Prionace glauca* type II collagen, and its ratio was 36.9%, which was close to all- β -type tertiary structure. $[\text{H}^+]$ could change its secondary structure element ratio. With the additive amount of $[\text{H}^+]$, β -sheet disappeared and a small number of α -helix appeared, meanwhile, the main secondary structure became random coil. **Conclusion** The type II collagen purified from *Prionace glauca* was a typical fibrous protein with excellent biochemical characteristics as a potential functional biomaterial.

Key words: type II collagen; thermal denaturation temperature; secondary structure; infrared spectrum

· 综述 ·

Axinyssa 属海绵的次生代谢产物及 生物活性研究进展^{△*}

李玉芬^{1,2}, 梁林富², 刘海利², 梁敬钰^{1*}, 郭跃伟^{2*}

(1. 中国药科大学天然药物化学教研室, 江苏 南京 210009;

2. 中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室, 上海 201203)

摘要: *Axinyssa* 属海绵分布十分广泛, 含有丰富的结构新颖的次级代谢产物。这些物质具有多种生物活性, 如细胞毒、抗菌、抗病毒、防附着等。本文对 *Axinyssa* 属海绵的化学成分与生物活性研究进行综述, 以期对海洋天然产物的研究与开发提供参考。

关键词: *Axinyssa*; 次生代谢产物; 生物活性

中图分类号: R931

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2013)01-063-16

海绵 (marine sponge) 为多孔动物门 (porifera) 生物的统称, 是低等的、原始的多细胞动物。这类动物在进化中是一个分支, 因此又称“侧生动物” (Placozoa)^[1]。海绵种类繁多, 在幅员辽阔的海洋中, 分布着总数约 15 000 种的海绵, 其中已命名的约有 7 000 种; 另外, 在陆地淡水湖泊、河流以及沼泽中还有约 150 种淡水海绵。它们大致可分为 3 类: 钙质海绵纲 Calcispongiae、六星海绵纲 Hexasterophorida 以及寻常海绵纲 Demospongiae, 其中寻常海绵纲种类最多, 分布最广。

海绵生物种类的多样性、代谢途径的独特性、生存环境的复杂性以及共生体的不确定性, 决定了其次生代谢产物的丰富多样。在多年广泛探索中, 人们从种类繁多的海绵中发现了萜类、含氮化合物 (生物碱、氨基酸、核苷类、神经酰胺、环肽等)、聚醚类、大环内酯、过氧化物、多烯多炔以及甾体等一系列化合物^[2]。这些化合物多具有广谱或特异性的抗肿瘤、抗病毒、抗微生物、防附着以及抑制各种生物酶等生理活性, 其中不少化合物具有临床应用前景。因此对海绵的研究及其生理活

性物质的开发已成为海洋药物开发的热点^[3]。

Axinyssa 属海绵属于寻常海绵纲 Demospongiae、Halichondridae 目、Halichondriidae 科。该属海绵种类众多, 分布广泛, 含有丰富的结构新颖的次生代谢产物。这些次生代谢产物多为含有异脞、异硫脞或甲酰胺基团的倍半萜。除含氮倍半萜外, *Axinyssa* 属海绵还有少量的二萜、甾体和脂肪酸等化合物。这些化合物多具有显著的生物活性, 包括抗菌、抗肿瘤、抗疟和对盐水虾的毒性等。

Axinyssa 属海绵已成为国际天然海洋产物研究的热点, 每年从该属海绵中分得的新化合物越来越多, 而且许多化合物具有很好的生物活性。这些结构新颖的化合物潜在的药用价值越来越引起化学家和生理学家的关注。

Natural Product Reports 每年都会有海洋天然产物的年度综述, 国际上其他著名期刊上也均有 *Axinyssa* 属海绵的化合物和生理活性的报道。但是迄今为止, 还没有学者专门对该属海绵进行综述。本文综述的是 *Axinyssa* 属海绵化学成分

* △基金项目: 国家海洋“863”计划 (Nos. 2011AA09070102, 2013AA092902); 国家自然科学基金项目 (81273430, 21072204, 21021063, 40976048, 31070310, 81072572); 中国科学院国家新药研究重点实验室项目 (SIMM1203ZZ-03, SIMM1105KF-04); 国家科技重大专项 (2011ZX09307-002-03) 资助

作者简介: 李玉芬 (1987-), 女, 硕士研究生。E-mail: yueseweiwei@163.com

* 通讯作者: 梁敬钰, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: jyliang08@126.com;

郭跃伟, 男, 研究员, 博士生导师。E-mail: ywguo@mail.shnc.ac.cn.

收稿日期: 2012-09-24

和生理活性研究进展(1982年-2012年)。

从1982年到2012年的文献看, *Axinyssa* 属海绵化学成分主要分为五大类: 倍半萜、二萜、倍半萜二聚体、甾体及脂肪酸。本文就上述化合物在化学结构和生物活性两方面分别进行论述。

1 倍半萜类化合物

倍半萜类化合物是 *Axinyssa* 属海绵中含量最多、种类最丰富的一大类化合物。 *Axinyssa* 属海绵中倍半萜骨架种类众多, 常含有异腈、异硫腈或甲酰胺基团。这类倍半萜由 Faulkner 小组于1989年首次从 *Axinyssa* 属海绵中分离得到。生物合成研究表明: 异腈官能团来源于海水中的无机氢氰根离子, 在海绵体内特定酶的作用下形成次生代谢产物中的异腈官能团。而异腈官能团又可在酶的作用下转换为异硫腈或甲酰胺官能团^[4]。所以海绵中异腈、异硫腈、或甲酰胺3种官能团取代的倍半萜类化合物往往同时存在。生物学家认为这类化合物是海绵为了保护自身而产生的防御性物质。 *Axinyssa* 属海绵中骨架主要有5种类型, 分别为: Gorgonane、杜松烷型 cadinane、桉叶烷型 eudesmane、没药烷型 bisabolene、Isodaucane 等。这些含氮倍半萜多具有较强的细胞毒性, 因此这类海绵被海洋软体动物摄食后, 海绵体内的倍半萜将被软体动物富集到身体的特定部位成为它自身的化学防御物质, 分泌到周围的环境中, 以达到趋避捕食者而保护自身的作用。

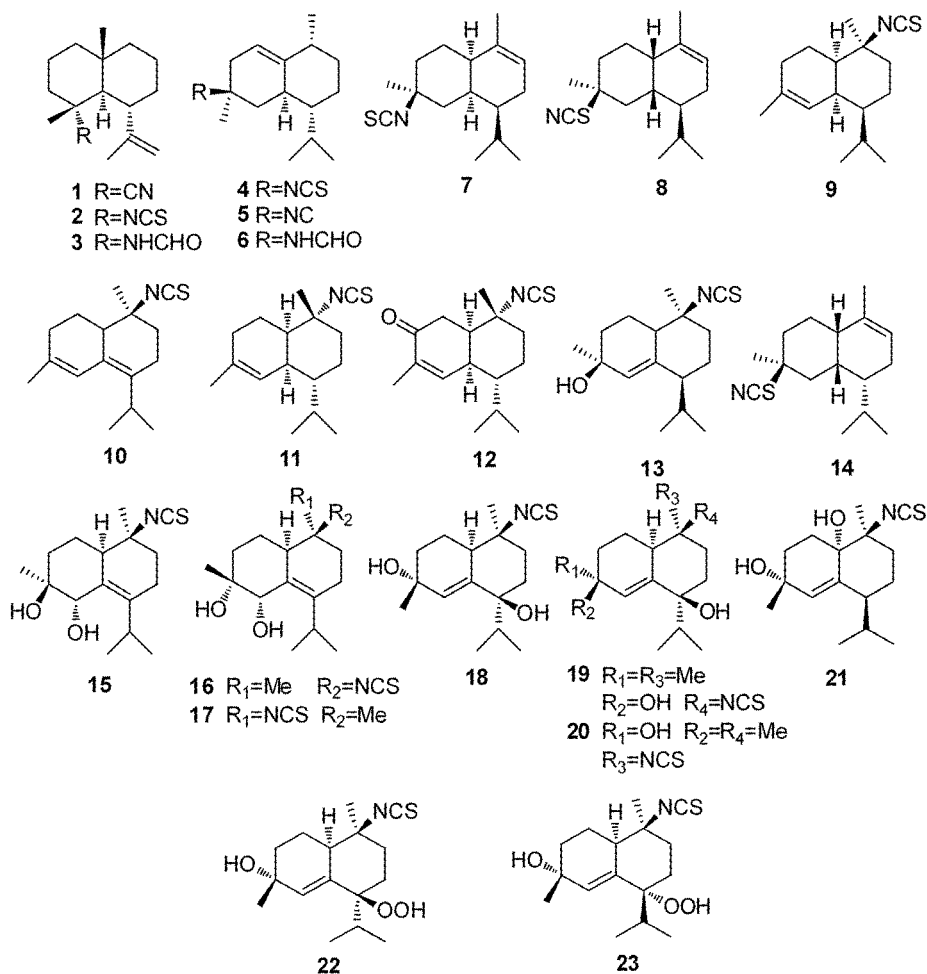
1.1 Gorgonane 型倍半萜

Jane 等人从密克罗尼西亚群岛的 *Axinyssa terpnis* 海绵的甲醇提取物中分得化合物 4 α -isocynogorgon-11-ene (1)^[5]。 Natalia V. Petrichcheva 等人从加勒比海 *Axinyssa terpnis* 海绵中分离鉴定 4 α -isothiocynogorgon-11-ene (2)、4 α -formamido-11-ene(3)^[6], 化合物(1)和(3)对小鼠白血病细胞株 P388 细胞系的 LC₅₀ 分别为 1.2、8.3 μ g/mL, 化合物(1)亦有一定的毒杀盐虾活性。

1.2 杜松烷型 cadinane 倍半萜

杜松烷型倍半萜是种类较多, 在海绵中分布较广的倍半萜。它的结构特点是2个六元环骈

合, 而且2个六元环多为顺式稠合。环上有异丙基和2个甲基取代, 结构的主要变化方式为双键的位移、异丙基的氧化等。 S. Compagnote 根据活性追踪的方法, 从采于冲绳岛 *A. aplysinoides* 海绵乙酸乙酯部位中分离鉴定得 (3S*, 5R*, 6R*, 9R*)-3-isocyano-1(10)-cadinene(4)、(3S*, 5R*, 6R*, 9R*)-3-isocyano-1(10)-cadinene(5)、(3S*, 5R*, 6R*, 9R*)-3-formamido-1(10)-cadinene(6)。其中化合物(6)有中等强度的抗金黄色葡萄球菌和抗枯草杆菌的活性^[7]。 K. A. Alvi 等在对泰国海绵 *A. fenestratus* 的化学研究中, 发现了 (1R*, 4S*, 6R*, 7S*)-4-isothiocyanato-9-amorphene (7)、amorphenethiocyanate (8)、10-isothiocyanato-4,6-arnorphadien(9)、(1S, 6R, 7R, 10R)-10-isothiocyanato-4-amorphene (10)、axinisothiocyanate K (11)、axinisothiocyanate L (12)、(4S*, 10S*)-10-isothiocyanato-5-amorphen-4-ol (13)、axinisothiocyanate B (16)、axinisothiocyanate C (17), 其中化合物(7)、(9)、(13)不但有很强的驱虫作用, 而且对巴西诺卡菌有中等强度的抑制活性^[8]。化合物(11)、(12)、(16)对人类乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、肺腺癌细胞株 A-549、结肠癌细胞株 HT-29 都显示细胞毒作用^[9]。其中化合物(11)对 A-549 与 HT-29 的 GI₅₀ 为 34.5、22.8 μ mol/L; 化合物(12)对 A-549 与 HT-29 的 GI₅₀ 分别为 31.4、21.4 μ mol/L; 化合物(16)对 A-549 与 HT-29 的 GI₅₀ 分别为 25.7、21.0 μ mol/L。(1S*, 4S*, 6S*, 7R*)-4-thiocyanato-9-cadinene(14)是从 *A. aplysinoides* 海绵中分离得到^[14]。倍半萜中羟基的引入增强了其抗菌和抗肿瘤的生理活性, María J. Ortega 等人从加利福尼亚湾的 *Axinyssa* sp. 海绵中分离鉴定得到 axinisothiocyanates A-I 化合物(15~23), 化合物(15)利用 Mosher 反应成功的确定了手性碳上仲 OH 的绝对构型。 Axinisothiocyanates A-H(15~22)对人类乳腺癌细胞 MDA-MB-231、肺腺癌细胞株 A-549、结肠癌细胞株 HT-29 均显示较好的细胞毒活性^[9]。



1.3 桉叶烷型 eudesmane 倍半萜

与杜松烷骨架相似,桉叶烷型倍半萜也是由 2 个相互联合的六元环、异丙基、2 个甲基构成,2 个六元环多为反式稠合。取代基的立体结构多样性决定了化合物结构的复杂性。Mari¹a J. Ortega 等人从加利福尼亚海湾所采集的海绵 *A. isabela* 中分离鉴定得 axinisothiocyanates M、N(**24**、**25**)、(1R,5R,6R,9S)-dec[4.4.0]ane-1,5 dimethyl-8-(1'-methylene)-5-isothiocyanate(**26**)^[10]、acanthene B(**27**)^[11],化合物(**24**~**27**)对人类乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、肺癌细胞株 A-549、结肠癌细胞株 HT-29 均有选择性抑制作用,此细胞毒实验用链霉素作为阳性对照物。Natalia V. Petrichtcheva 从加勒比海海绵 *A. ambrosia* 分得 (4R*,5R*,7S*,10R*)-eudesm-11-en-4-ylaminehydrochloride(**32**)、axinyssaminehydrochloride、(4R*,5R*,7S*,10R*)-4-aminoeudesm-11-ene(**33**)、(4R*,5R*,7S*,10R*)-4-isocya-

natoeudesm-11-ene (**34**)、(4R*,5R*,7S*,10R*)-formamidoeudesm-11-ene (**35**)、11-formamido-7 β -11-eudesm-5-ene(**37**),其中化合物(**32**)对小鼠白血病细胞株 P388、肺癌细胞株 A-549、结肠癌细胞株 HT-29 均有显著的细胞毒作用。此外该化合物对寄生在 *Madracis mirabilis* 珊瑚的珊瑚虫有强烈的毒杀作用^[6]。4-formamidoeudesman(**30**)、(4R*,5R*,7S*,10R*)-4-formamidoeudesman-11-ol(**31**)、(4R*,5R*,10R*)-4-formamidoeudesm-7-ene(**39**)是从中国南海海绵 *Axinyssa* sp. 分离得到的。其中化合物(**39**)对人类鼻咽癌细胞株 CNE-2、人类子宫癌细胞株 HeLa、人类正常的胚肝细胞株 L02 都有显著的抑制作用,IC₅₀ 分别为 13.8、7.5、38.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[12],化合物(**31**)对以上细胞无抑制作用。化合物(**31**)、(**39**)以 FPP 为原料并提出了其可能的生物合成途径(见图 1)。

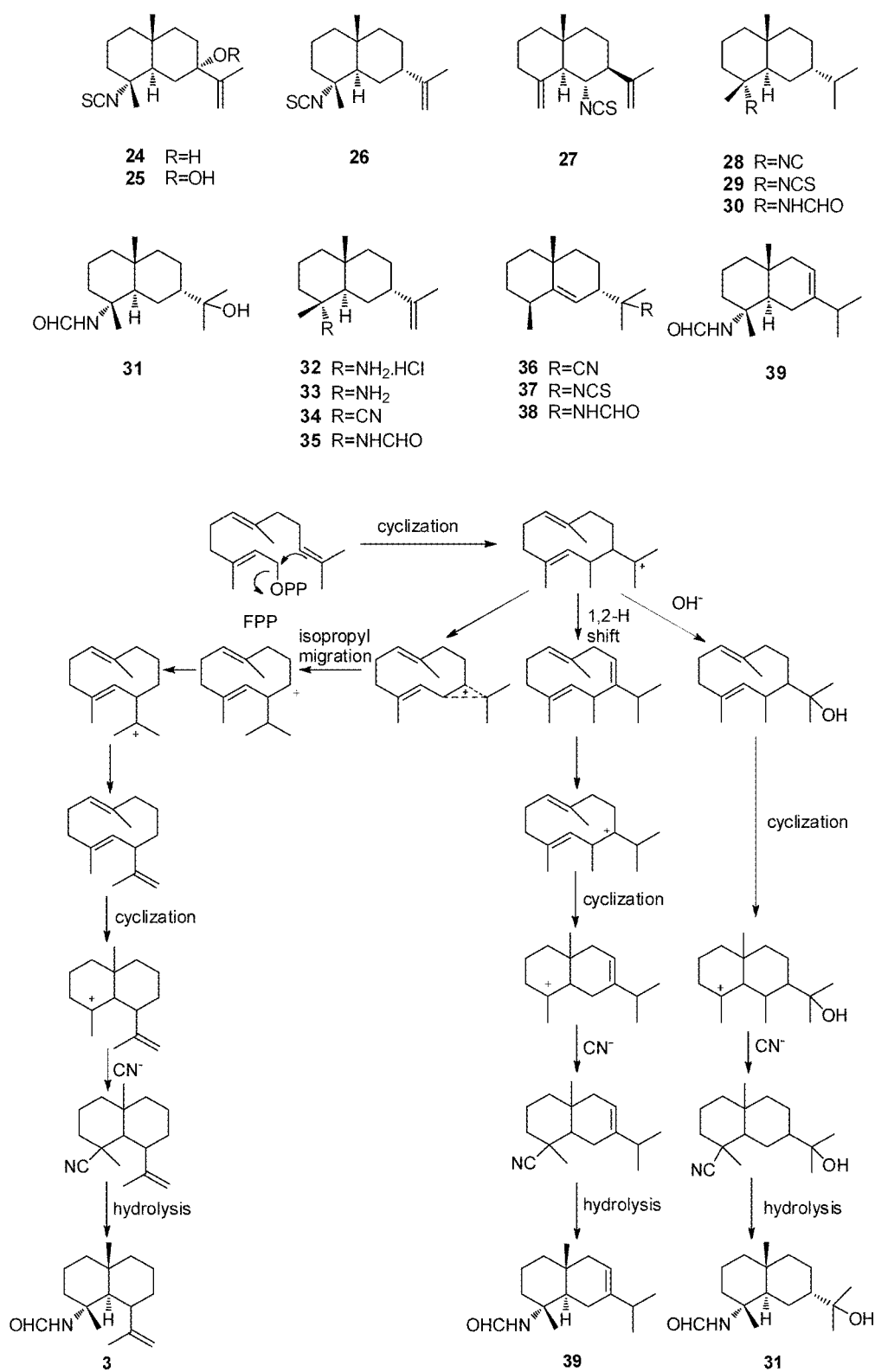


图1 化合物 3,31,39 可能生物合成途径

Fig. 1 Proposed biosynthetic pathway for 3,31,39

1.4 没药烷型 bisabolene 倍半萜

没药烷型倍半萜是陆地和海洋较为常见的一类化合物。由于海洋环境的独特性,这些化合物很少有卤素、乙酰化、环化等功能化基团。没药烷型倍半萜也是 *Axinyssa* 属海绵中存在较为普遍的一类倍半萜。郭跃伟小组从 2 种中国南海海绵 *Axinyssa* sp. 中分离得到 dehydrotheonelline (40)、theonelline (41)、3-isocyanotheonelline (53)^[17]、化合物(43~49)^[19]、7-isocyano-7,8-dihydro- α -bisabolene (50)、3-formamidotheonellin (51)、theonellin (52)、11-ethoxy-3-formamidotheonellin (54)、3-formamido-7,8-epoxyabisabolane (57)、3-isocyano-7,8-epoxy- α -bisabolane (58)^[23]、7-ethoxy-3-formamidobisabolane-8,10-diene (60)、lingshuine (63)、2-hydroxy-2-methyl-N-{trans-1-methyl-4-[(2E,4E)-6-methylhepta-2,4-dien-2-yl]cyclohexyl}propanamide (64)、N-{trans-1-methyl-4-[(2E,4E)-6-methylhepta-2,4-dien-2-yl]cyclohexyl}-formamide (65)^[20], 其中化合物(40)、(52)的混合物具有对金鱼 *C. auratus* 有拒食活性^[18]。化合物(54)和(61)均存

在乙酰基团,是首次发现的新天然产物,推测其合成途径可能为图 2 所示。化合物(63)作为混合物是新的在分离过程中产生的类天然产物,为了确认这一结论,小组利用 *Passerini* 反应成功的进行了此类型化合物的全合成,具体反应过程见图 3。化合物(63)在 K_2CO_3 的溶液中进行水解得到化合物(64)。Axinythiocyanate A (42)从加利福尼亚海湾所采集的海绵 *A. isabela* 中分离鉴定所得^[11]。李从军等人利用对盐水虾的毒性的生物活性追踪方法从雅浦岛(位于加罗林群岛西部) *Axinyssa* sp. 中分离鉴定得到化合物 3-formamidobisabolane-14(7),9-dien-8-ol(55)、3-formamido-8-methoxybisabolane-9-en-10-ol(57)、3-formamidobisabolane-14(7),9-dien-8-one(56)及化合物(50)^[22]。Makoto Iwashima 等人从日本冲绳岛海绵 *Axinyssa* sp. 中首次分离得到(E)-3-isocyanoabisabolane-7,10-diene(62),实验证明化合物(62)对盐水虾有很强的致死性,LC₅₀为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[23]。

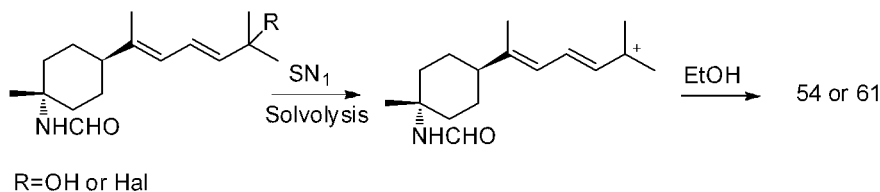


图 2 化合物 54 和 61 可能的生物合成路径

Fig. 2 Plausible biosynthetic pathway for 54 and 61

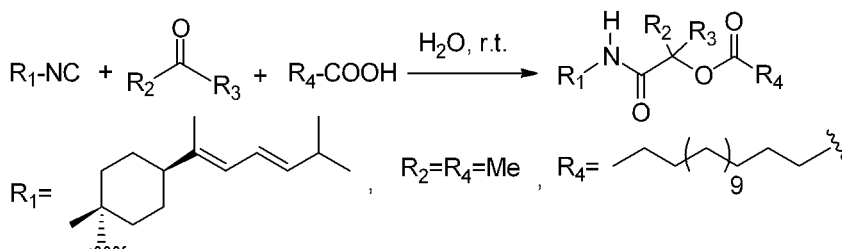
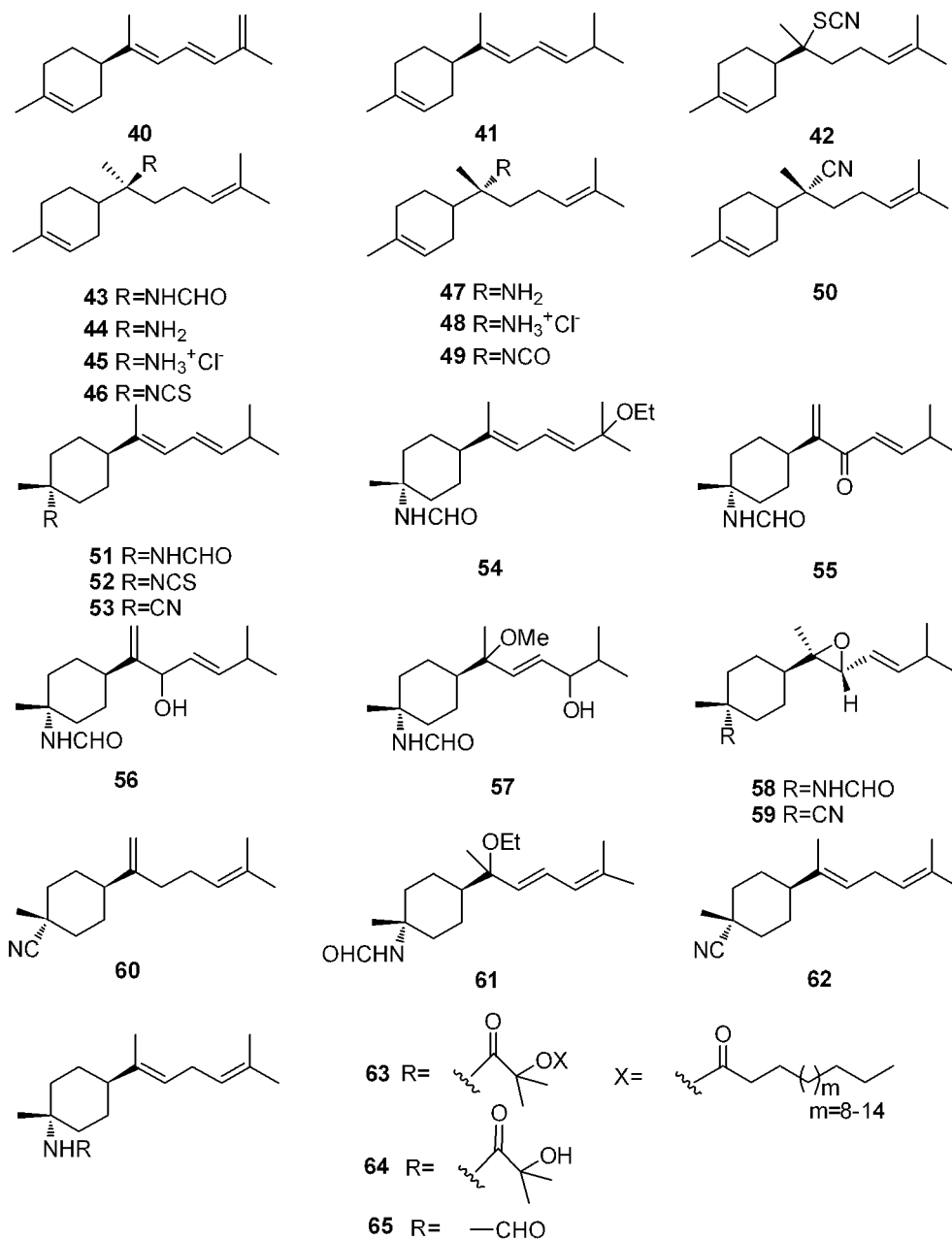


图 3 *Passerini* 反应(化合物 63 的合成路径)

Fig. 3 Biosynthetic pathway for 63



1.5 茴香烷型 farnesane 倍半萜

茴香烷型 farnesane 倍半萜是 *Axinyssa* sp. 海绵中存在数量不多的 1 种倍半萜, 它由三分子异戊二烯二磷酸酯连接构成法呢基二磷酸酯 (FPP), FPP 经重排可成橙花烯二磷酸酯 (NPP), 从 FPP 和 NPP 经一系列氧化修饰可得多个结构各异的茴香烷型倍半萜。含有二氯碳亚胺基团的次生代谢产物在海洋陆地生物中非常稀少, 这种基团仅出现在海洋天然产物中, 可作为海洋天然产物的特征性成分。Hiroshi Hirota 等人从采于

日本海域的 *Axinyssa* sp. 海绵分离鉴定得到 axinyssimides A-C (66~68)^[15], 它们具有抗附着活性, 化合物 (66) 的 EC₅₀ 为 1.2 μg/mL。由于海水中富含无机氢氰根离子, 在海绵体内特定酶的作用下形成次生代谢产物中的异脞官能团, 图 4 为海水中异脞和异硫脞基团转变成二氯碳亚胺基团的机理^[38]。此外郭跃伟课题组从中国南海海绵 *Axinyssa* sp. 分离得到 farnesylformamide (69) 和 isofarnesylformamide (70)^[12], 其可能的生源的途径很好的揭示了海绵中茴香烷型与其他几种骨架

倍半萜的联系。

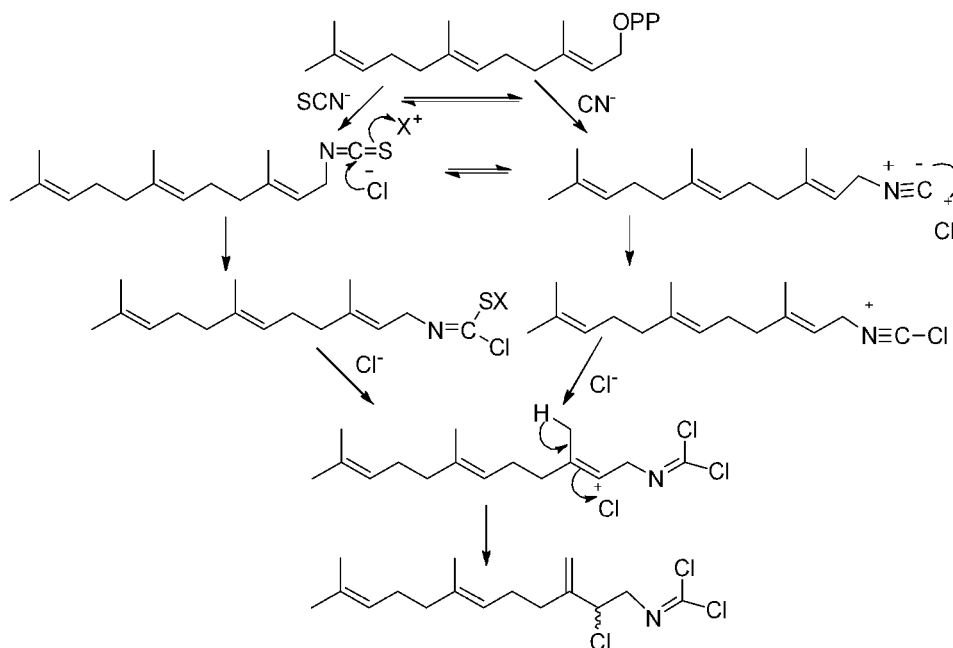
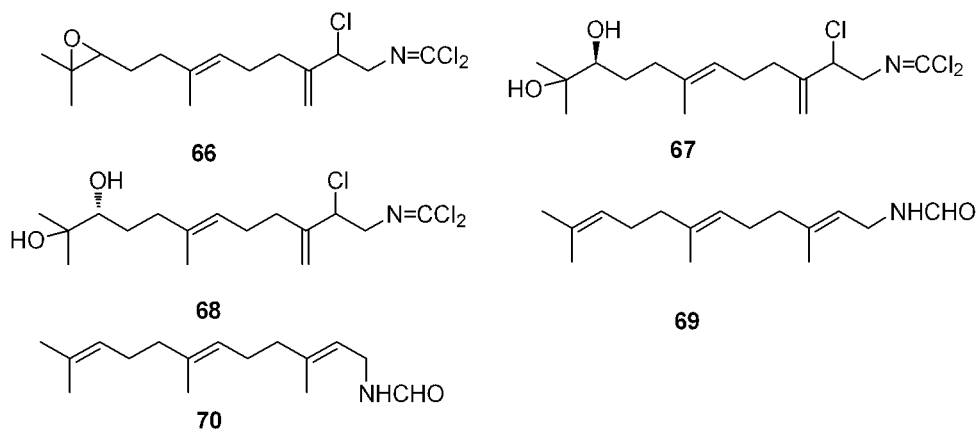


图 4 二氯碳亚胺基团的形成机理

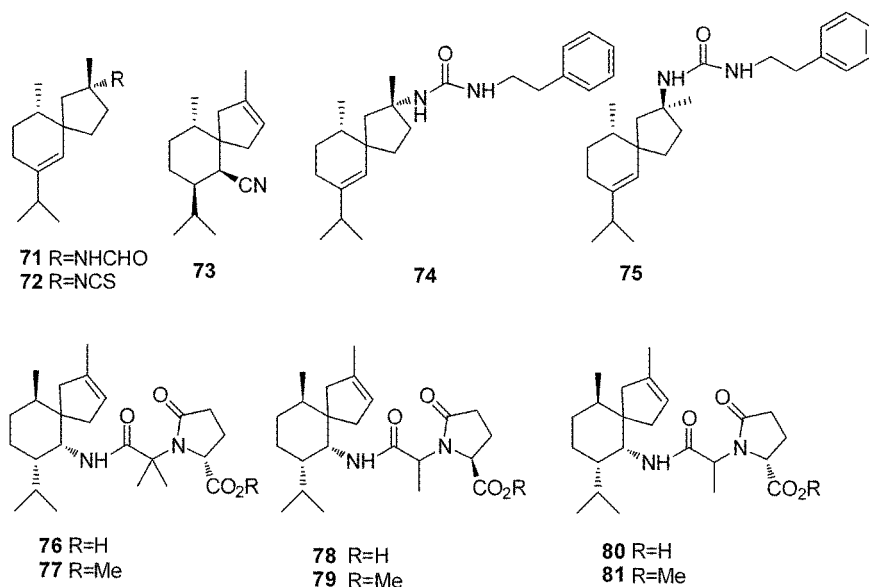
Fig. 4 Biosynthetic mechanisms for carbonimidic dichloride



1.6 Spiroaxane 型倍半萜

Spiroaxane 型倍半萜是由五元环和六元环形成螺环结构,这种结构新颖倍半萜是陆生动植物中较为少见,但在 *Axinyssa* sp. 海绵中有较为广泛的存在。Christopher J. Wegerski 从新几内亚岛采集的 *Axinyssa* sp. 海绵中分离鉴定的 2-formamido-6-axene(71)、(2R,5R,10S)-2-isothiocyanato-6-axene (72)、N-phenethyl-2-formamido-6-axenes(74 和 75)。化合物(74)、(75)是一对光学异构体。研究证明,化合物(71)对大肠杆菌、金黄

色葡萄球菌、坚强肠球菌有抑制活性^[25]。化合物 axisonitrile-3(73)来源于泰国海绵 *A. fenestratus*,此化合物对巴西诺卡菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等有一定的抑制作用^[8]。David E. Williams 等人从采于印度尼西亚 *Axinyssa aphysinoides* 海绵中分离得到(76~81), boneratamides A(76)、boneratamides C(80)有微弱的抗有丝分裂活性^[26]。这类化合物与 *Geodia exigua* 海绵中的化学物质相似,一定程度上说明了生源关系的相似性。



1.7 Aristolane、橄榄烷型 maaliene、萆澄茄烷型 cubebane 倍半萜

Aristolane、橄榄烷型 maaliene 倍半萜结构特点是异丙基的叔碳与六元环上碳环合成三元环。具有 Aristolane 结构的倍半萜 axinysones A-E(**82**~**86**)、axinyonitrile A(**87**)、(+)-aristolone(**88**)是从加利福尼亚海湾所采集的海绵 *A. isabela* 中分离鉴定所得。这些化合物对乳腺癌细胞 MDA-MB-231、肺癌细胞 A-549、结肠癌细胞 HT-29 均有一定的细胞毒性^[11]。化合物(**87**)利用化学合

成的方法验证了其绝对构型,具体合成过程见图 5。Maaliene 型倍半萜在 *Axinyssa* 属海绵存在较少,目前仅有一个。Epipolasin A(**89**)是从日本海 *Axinyssa* sp. 海绵中利用活性追踪方法分离所得^[13]。萆澄茄烷 cubebane 倍半萜也是 *Axinyssa* 属海绵中发现的为数不多的倍半萜, (1S*, 2R*, 5S*, 6S*, 7R*, 8S*)-13-isothiocyanatocubebane (**90**)、13-(methylamino) cubebane (**91**)源于帕劳岛海域 *A. aplysinoides* 海绵中分离所得^[14]。

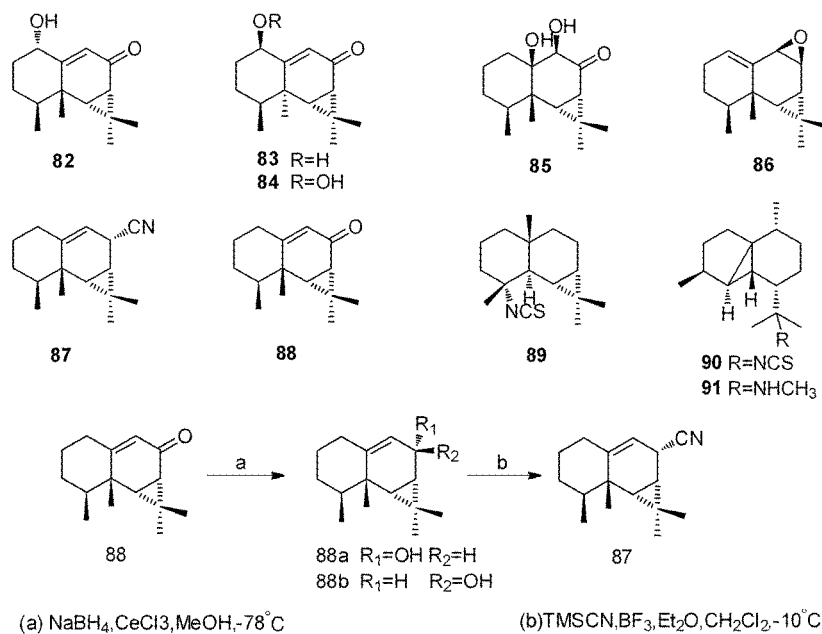


图 5 化合物 **87** 的合成过程

Fig. 5 Synthesis of **87**

1.8 愈疮木烷型 guaiane、aromadendrane、isodaucane 倍半萜

(1S*, 4R*, 7S*, 10R*)-1, 7-epidioxy-5-guaiene(**92**)是含过氧环具有独特的防附着生物活性的愈创木烷型倍半萜。此化合物是从日本八丈岛的 *Axinyssa* sp. 海绵中分离所得^[15]。从帕劳岛海域 *A. aplysinoides* 海绵中分离所得(1R*, 4S*, 5R*, 6S*, 7S*, 10R*)-1-isothiocyanatoaromadendrane(**94**)及化合物(**93**)^[14]。Kota Kod-

ama 等人从日本海 *Axinyssa* sp. 海绵中分得 isothiocyanate(**95**)与(+)-axisothiocyanate(**96**)是 aromadendrane 型的倍半萜^[13]。郭跃伟小组从中国南海海绵 *Axinyssa* sp. 分离鉴定得 4,5-epi-10-isothiocyanatoisodauc-6-ene(**97**)^[19], 小组对此化合物进行了生物合成路径的探索(见图 6), 并进行了 A-549、HL-60、P-388 等肿瘤细胞的细胞毒实验, 但均无活性。

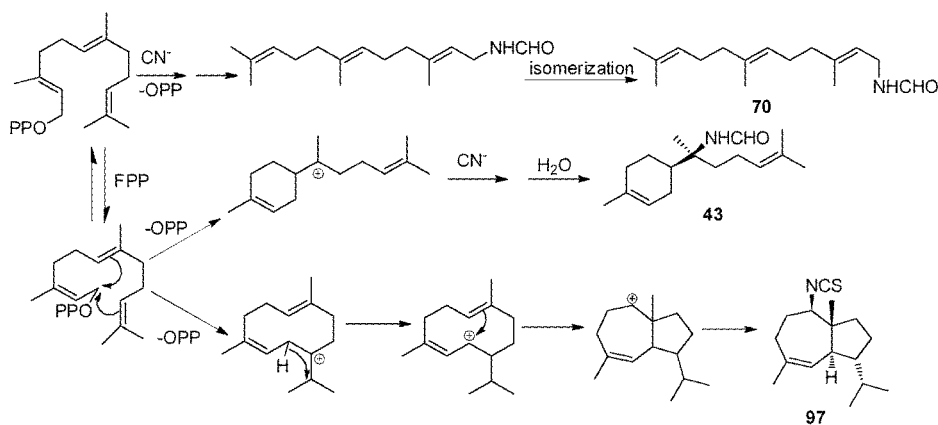
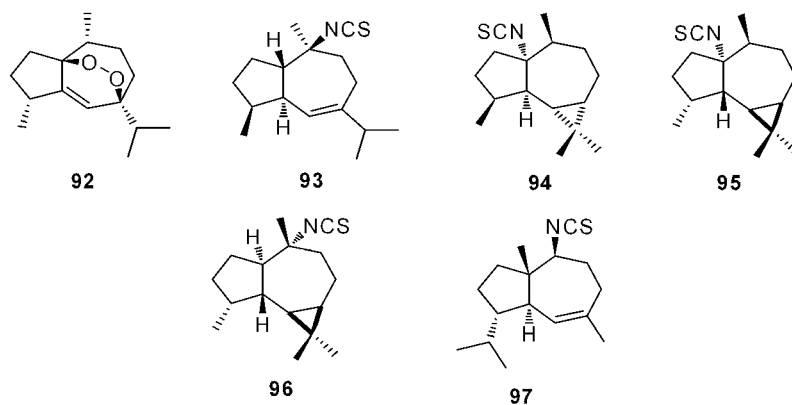


图 6 化合物 43、70、97 生物合成途径

Fig. 6 Biosynthetic pathway for 43, 70, 97



1.9 其他类型倍半萜

Axinyssa sp. 海绵除含有茴香烷型、没药烷型 bisabolene、桉叶烷型 eudesmane 等几种结构类型的倍半萜外, 还含有其他类型的倍半萜。这些倍半萜骨架复杂奇特, 多由 3 个五元环和六元环组成, 含氮基团的存在使这些化合物也具有广泛的生物活性。Jamie S. Simpson 从热带苍鹭岛采集的 *Axinyssa* sp. 海绵中分离鉴定得: 2-thiocyanatoneopupukeanane(**98**)、9-isocyanoallopupukeanane(**99**)、2-isocyanotrachyopsane(**100**)^[27]。利用

生物活性追踪的方法, Ashok D. Patil 等人从采于帕劳岛的 *Axinyssa* sp. 海绵中分离鉴定得 2-(formylamino) trachyopsane(**101**)及 *N*-Phenethyl-*N*-2-trachyopsanylurea(**102**), 海绵粗浸膏对酵母菌有抑制活性, 但分离纯化的化合物(**100**)和(**101**)对酵母菌均无明显的抑制作用^[28]。Javier Salvi 等人从帕劳岛采集 *Axinyssa aplysinoides* 海绵中分得(1R*, 2R*, 3R*, 5R*, 6S*, 7S*)-2-thiocyanatopupukeanane(**105**)、2-isocyanopupukeanane(**106**)、2-thiocyanatoneopupukeanane

(107)、4-thioanatonopupukaenane(108)、(1S*, 2S*, 3R*, 6R*, 7S*, 9R*)-2-thiocyanatoneopupukaenan(109)^[14]。Yasman 等人从雅加达北部千岛群岛 *Axinyssa aculeata* 海绵中分离得到 9-thiocyanatopupukeanane(112、114)、9-isothiocyanatopupukeanane(111)、9-isocyanopupukeananeepimers(110、113), 化合物(110~114)对盐水虾幼体有显著的毒杀活性, 对人类口腔表皮细胞瘤 KB 细胞系显示微弱的细胞毒活性。此外化合物(98)、(110)、(112)有抗疟活性。具体表现为:

对恶性疟原虫 D6、W2 有弱的抑制作用^[29]。Andrew H. Marcus 等从采于关岛的 *Axinyssa* sp. 海绵中分离得到 2-isocyanopupukeanane(115)及相应异硫脲、甲酰胺化合物(116)、(117)、5-isothiocyanatopupukeanane(118), 化合物(118)对河豚鱼有微弱的拒食活性^[30]。Veena Satitpatipan 等从泰国海域 *Axinyssa* sp. 海绵中分离得到(1Z, 4Z)-7 α H-11-aminogermacra-1(10), 4-diene(119), 实验证明该化合物对金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌、白色念珠菌有一定的抑制活性^[31]。

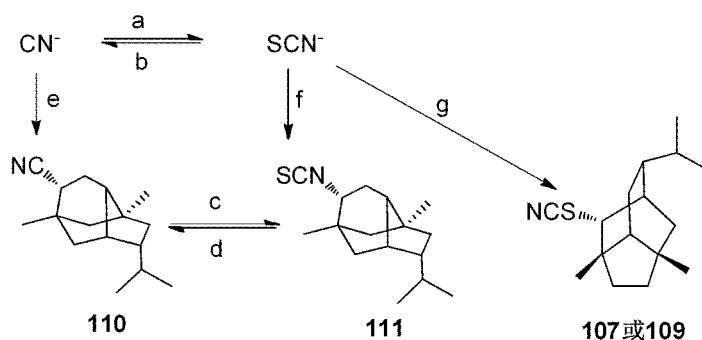
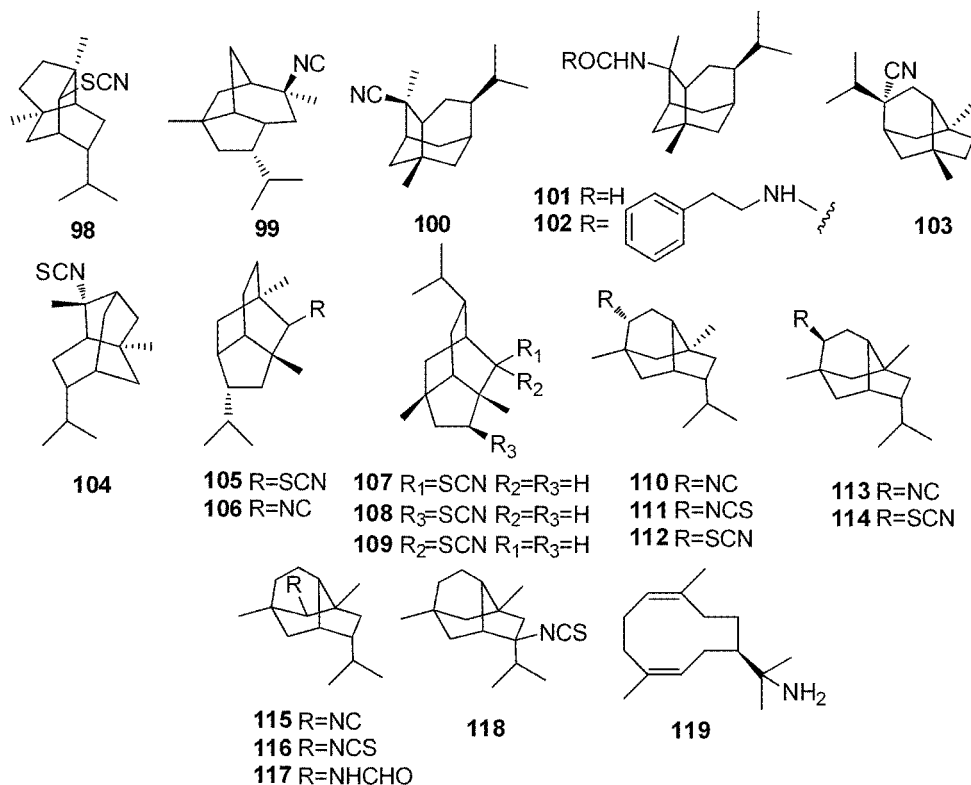


图7 化合物 110、111、107 或 109 生物合成途径
Fig. 7 Biosynthetic pathway for 110、111、107 or 109



2 倍半萜二聚体

倍半萜二聚体是自然界中存在较少的一类化合物,一般认为其二聚体是由两分子相同或结构不同的倍半萜缩合而成,因此单分子和二聚体常同时存在于同一生物中。*Axinyssa* sp. 海绵发现的二聚体是由两分子相同结构没药烷型或两分子大根香叶烷型倍半萜聚合而成。没药烷型倍半萜在海绵中很常见,但是其二聚体还是首次发现。郭跃伟小组从 2 种中国南海 *Axinyssa* sp. 海绵中分离得到 4 个没药烷型倍半萜二聚体化合物: cis-dimer A(120)、cis-dimer B(121)^[32]、trans-dimers D(122)和 C(123)^[17],该类型化合物的混合物对金鱼 *C. auratus* 有拒食活性^[18]。化合物(120)、(121)、(123)可能两分子没药烷型倍半萜由分子间的[4+2] Diels-Alder 环加成反应形成,由于反应的立体选择性,形成了内型和外形加成产物的

不同,可能的生物合成途径见图 8。这 2 种海绵的倍半萜骨架相同,可以推断他们在分类学有很近的亲缘关系,这为 2 种海绵的分类提供了一定依据。Veena Satitpatipa 从泰国海域 *Axinyssa* 属海绵中分离鉴定得到 *N,N*-11-bis[(1*Z*, 4*Z*)-7*α*H-11-germacra-1(10), 4-dienyl]urea (124)是大根香叶烷型倍半萜(119)的二聚体,实验证明,它对金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌、白色念珠菌均有抑制作用^[31]。*N,N'*-bis[(6*R*, 7*S*)-7-amino-7, 8-dihydro- α -bisabolen-7-yl]urea (125)是从马达加斯加岛 *Axinyssa aplysinoides* 海绵中分离得到的,7 位手型碳的 *S* 构型是海绵中没药烷型倍半萜的特征性构象和标志,其他海洋生物和陆生生物则全都是 7*R* 构象。这对海陆动植物化学分类有重要的意义^[33]。

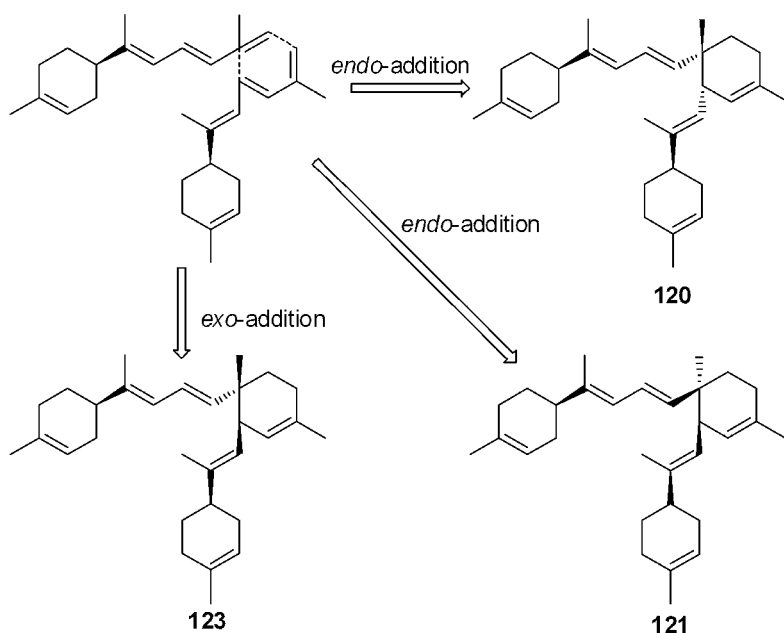
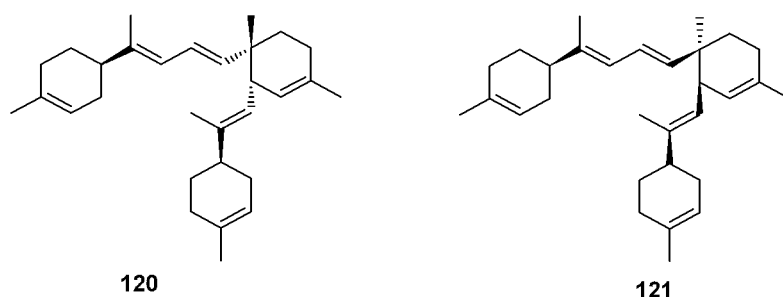
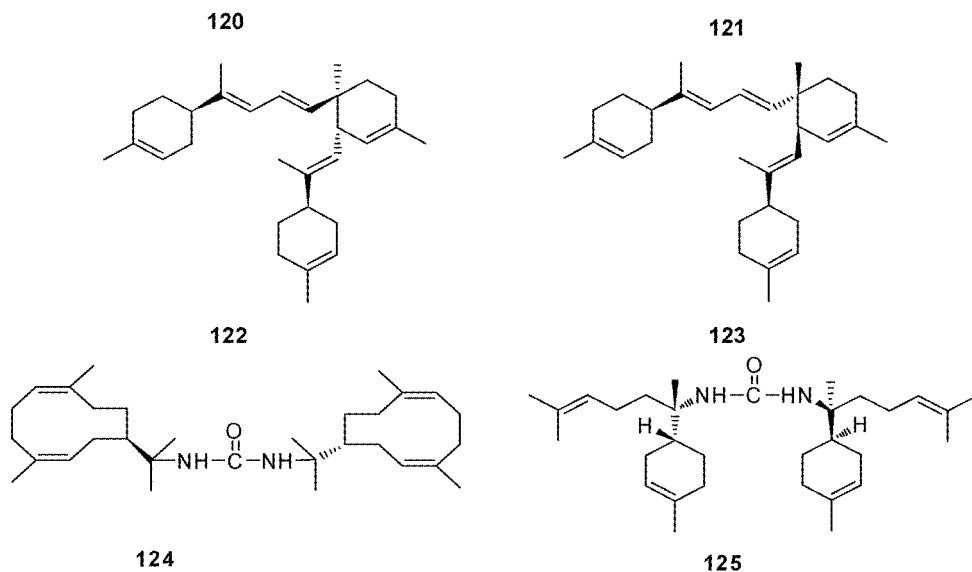


图 8 化合物 120、121、122 的生物合成途径

Fig. 8 Plausible biosynthetic pathway for 120~122

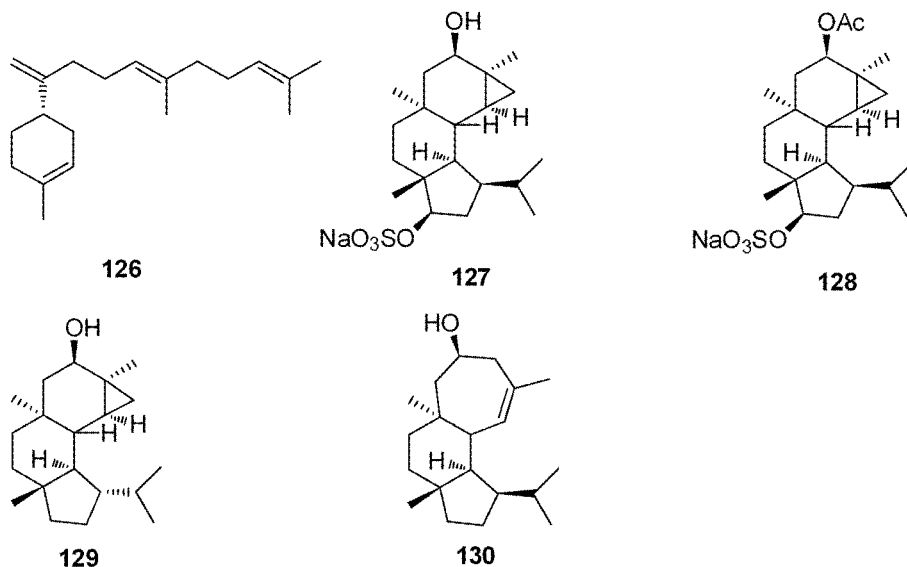




3 二萜化合物

Axinyssa 属海绵二萜结构常是三环或四环的化合物,多含有异脞、异硫脞或甲酰胺基团。与倍半萜相比,二萜化合物多含氧或卤素基团,因此具有高度的特异性生物活性,如抗感染、驱虫等作用。Kota Kodama 等人从日本海 *Axinyssa* sp. 海绵中分离得到(-)-axinyssene(**126**),通过化学合成方法鉴定出化合物的绝对构型为 1-methyl-4-[(4E)-5',9'-dimethyl-1'-methylene-4',8'-decadienyl]-(4S)-cyclohexene(**126**),该化合物对人白血病细胞系 HL-60 细胞株有一定的抑制活性,IC₅₀ 为 16.9 μg/mL^[13]。Hideo Kigoshi 小组从

日本冲绳岛 *Axinyssa tethyoides* 海绵中分离得到细疣烷二萜 5β-hydroxy-13-epi-11-neoverrucosanyl sulfate (**127**)、5β-acetoxy-13-epi-11-neoverrucosanyl sulfate (**128**),(**127**)、(**128**) 含有硫酸盐基团,利用 2D-NMR 和 X-ray 单晶衍射方法结合 Mosher 反应鉴定出了这 2 个化合物的绝对构型^[34]。以生物活性为指导,D. John Faulkner 小组从 *Axinyssa aplysinoides* 海绵中分离鉴定得(-)-neoverrucosan-5β-ol(**129**)、(+)-homoverrucosan-5β-ol(**130**),这 2 个化合物仅在苔类植物中分离得到,这对探讨该属海绵与苔类植物植物化学分类上亲缘关系有一定的意义^[7]。



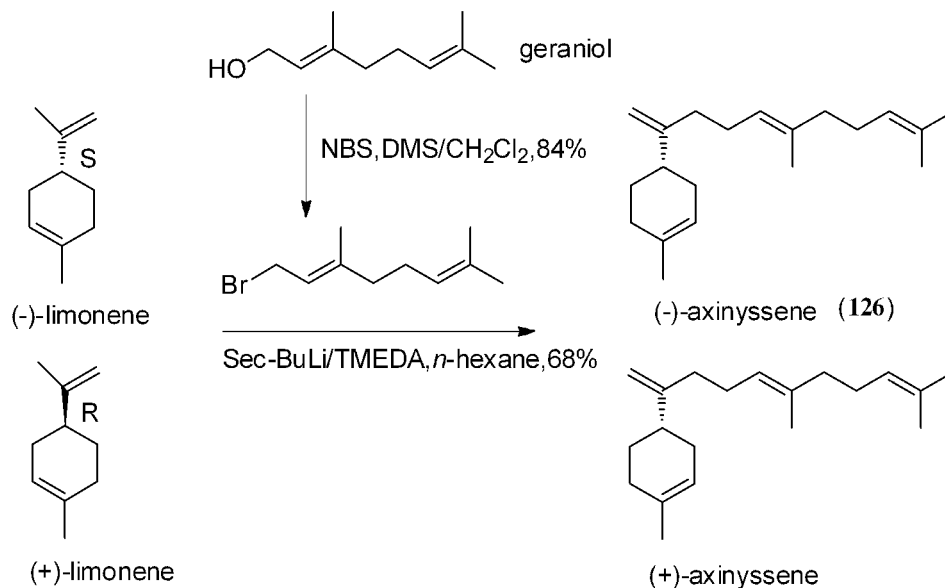


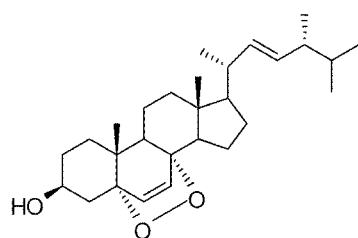
图9 化合物 126 的合成路径

Fig. 9 Synthesis of 126

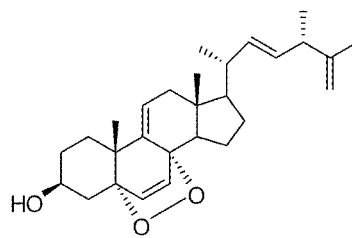
4 甾体化合物

甾体是一类分子中含环戊烷并多氢菲甾核的化合物,它海绵中一种重要的次生代谢产物。甾体既是生物膜的重要组成部分,也是生物物体某些激素的前体。1970年海洋生物学家从海洋生物中分离得到第一个甾醇后,海洋甾醇的发展十分迅速。*Axinyssa*属海绵的基本骨架为胆甾烷、麦角甾和孕甾烷等,其多样性表现为A环的芳香化,B环和侧链是产生甾体多样性的区域,B环的变化包括双键取代、羟基取代、开环、重排扩环等。C环也有类似的变化,侧链的变化包括双键取代、羟基取代、环合、聚合等。杨智等从日本冲绳海绵 *Axinyssa* sp. 中得到 ergosterolperoxide(131)、axinysasterol (133)、axinysasterolpbromobenzoate (134), (134)是该海绵乙酸乙酯可溶部分与对溴苯甲酰氯反应,后经 HPLC 方法制得^[35]。△9(11)-dehydroaxinysterol(132)是 Kazuo Iguchi 小组从日本冲绳海绵 *Axinyssa* sp. 海绵分离鉴定所

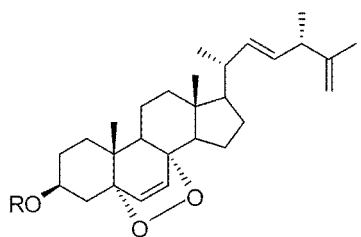
得, (133)化合物对多种肿瘤细胞均显示显著地抑制作用,例如对人类乳腺癌细胞 MCF-7、BSY-1 的 IC₅₀ 分别为 0.36、0.60 μg/mL;人类肺癌细胞 NCI-H23、NCI-H226 的 IC₅₀ 分别为 0.54、0.63 μg/mL;人类胃癌细胞 MKN1、MKN7 的 IC₅₀ 分别为 0.42、0.48 μg/mL;人类结肠癌 HCT-116、HT-29 的 IC₅₀ 分别为 0.48、0.50 μg/mL;人类乳腺癌细胞 OVCAR-3、OVCAR-8 的 IC₅₀ 分别为 0.19、0.22 μg/mL;前列腺癌细胞 DU-145、PC-3 的 IC₅₀ 分别为 0.54、0.57 μg/mL;人类皮肤癌黑色素瘤细胞 LOX-IMVI 的 IC₅₀ 为 0.60 μg · mL⁻¹^[24]。梁利岩等从中国南海海绵 *Axinyssa aplysinoides* 海绵中分离得到 △22(23)(E)-24,26,27-三甲基-25(30)-亚甲基胆甾醇(135)、24-异丁基-25(31)-亚甲基胆甾醇(136)^[39]。Yasman 等从 Pramuka 岛海绵 *Axinyssa aculeate* 分离得到 ergosta-4,22,25-trien-3-one(137)^[36]。



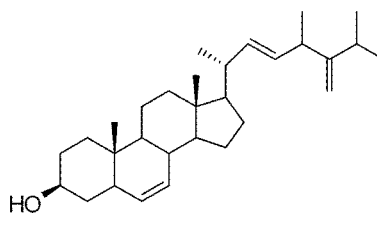
131



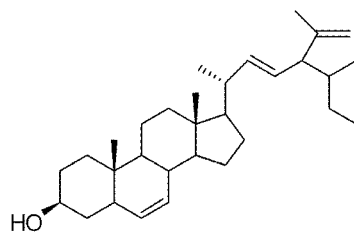
132



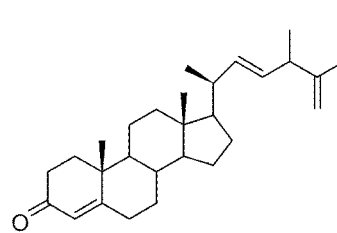
133 R=H

134 R= CO-C₆H₄-Br

135



136



137

5 其他类化合物

Axinyssa 属海绵除具有倍半萜、二萜、甾体等化合物外,还发现了数目众多的脂肪酸、核苷酸类等物质。迄今为止,*Axinyssa* 属海绵中已分离得到的多种含有环状直链或支链不饱和基团的脂肪酸。Oscar Osorno 等从加勒比 *Axinyssa* sp. 属海绵中发现了 n-tetradecanoic、6-methyltetradecanoic、13-methyltetradecanoic、12-methyltetradecanoic、n-pentadecanoic、14-methylpentadecanoic、9-hexadecenoic、n-hexadecanoic、15-methylhexadecanoic、14-methylhexadecanoic、3, 7, 11, 15-tetramethylhexadecanoic、11-methyloctadecanoic 等^[37] 多种脂肪酸。

6 结语与展望

Axinyssa 属海绵具有十分独特的生物代谢系统,这些次级代谢产物不仅种类丰富、结构新颖,

而且多含异脞、异硫脞、甲酰胺 3 种官能团。因此它也是生物活性物质的重要来源,如显著的抗菌、抗肿瘤、抗疟活性。近年来,对 *Axinyssa* 属海绵海绵的化学成分及药理活性的研究表明:*Axinyssa* 属海绵仍然是海洋天然产物领域最具有潜力的研究课题之一。

我国海域辽阔,海绵资源十分丰富、分布也相当广泛,但国内学者对海绵研究与国际水平还有很大的差距,因此加强这方面的科研投入对我国新药研究开发和海洋资源的充分利用具有重要的意义。

为了充分有效的利用海洋资源,一方面我们要发展极端环境生物采集技术,同时加快对海洋生物粗提物中可能的新药候选物的分离和结构鉴定工作。另一方面要加强海洋生物资源的可持续性意识。为此我们应该发展生物技术研究以寻找生产和大量够供应活性化合物的其他途径,如海洋药物基因工程,包括:将海洋药物基因转入陆地

微生物、植物或动物中表达;将来自陆地的药物基因转入海洋生物中表达;将海洋药物基因转入海水养殖生物中表达。

基于上述分析,在先进技术及科学思维指导下,我们相信 21 世纪海绵将成为新药的重要来源,也将成为药物研究开发的新热点。

参考文献

- [1] Fusetani N, Matsunaga S. Bioactive sponge peptides[J]. *Chem Rev*, 1993, 93: 1793.
- [2] 邓松之. 海绵的生理活性物质[J]. *中国海洋药物*, 1988, 7 (1/2): 44.
- [3] 薛松, 赵权宇, 张卫. 中国海绵天然产物的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2003, 15: 359.
- [4] Garson M J, Simpson J S. Marine isocyanides and related natural products structures-biosynthesis and ecology[J]. *Nat Prod Rep*, 2004, 21: 164.
- [5] Fu X, Barnes J B, Hossain M B, et al. Novel oxidation products of two sponge-derived sesquiterpenes, 4 α -formamido and 4 α -isocyanogorgon-11-ene[J]. *Nat Prod Lett*, 1998, 12: 75.
- [6] Petrictcheva N V, Duque C, Dueñas A, et al. New nitrogenous eudesmane-type compounds isolated from the Caribbean sponge *Axinyssa ambrosia* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65: 851.
- [7] Compagnone R S, Faulkner D J. Metabolites of the Palauan sponge *Axinyssa aplysinoides*[J]. *J Nat Prod*, 1995, 58: 145.
- [8] Alvi K A, Tenenbaum L, Crews P. Anthelmintic polyfunctional nitrogen-containing terpenoids from marine sponges [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54: 71.
- [9] Zubía E, Ortega M J, Hernández-Guerrero C J, et al. Isothiocyanate sesquiterpenes from a sponge of the genus *Axinyssa*[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 608.
- [10] König G M, Wright A D, Sticher O, et al. Two new sesquiterpene isothiocyanates from the marine sponge *Acanthella klethra*[J]. *J Nat Prod*, 1992, 55: 633.
- [11] Zubía E, Ortega M J, Carballo J L. Sesquiterpenes from the sponge *Axinyssa isabela* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 2004.
- [12] Lan W J, Wan H P, Li G X, et al. New sesquiterpene formamides from the marine sponge *Axinyssa* sp. [J]. *Helv Chim Acta*, 2008, 91: 426.
- [13] Kodama K, Higuchi R, Miyamoto T, et al. (-)-Axinyssene; a novel cytotoxic diterpene from a Japanese marine sponge *Axinyssa* sp. [J]. *Org Lett*, 2003, 5: 169.
- [14] He H Y, Salvi J, Catalos R F, et al. Sesquiterpene thiocyanates and isothiocyanates from *Axinyssa aplysinoides*[J]. *J Org Chem*, 1992, 57: 3191.
- [15] Hlrota H, Okino T, Yoshimura E, et al. Five new antifouling sesquiterpenes from two marine sponges of the genus *Axinyssa* and the nudibranch *Phyllidia pustulosa* [J]. *Tetrahedron*, 1998, 54: 13971.
- [16] Blunt J W, Copp B R, Hu W P, et al. Marine natural products[J]. *Nat Prod Rep*, 2009, 26: 170.
- [17] Mao S C, Manzo E, Guo Y W, et al. New diastereomeric bis-sesquiterpenes from Hainan marine sponges *Axinyssa variabilis* and *Lipastrotethya ana*[J]. *Tetrahedron*, 2007, 63: 11108.
- [18] Cimino G, De Rosa S, De Stefano S, et al. The chemical defense of four Mediterranean nudibranchs[J]. *Comp Biochem Physiol B: Comp Biochem*, 1982, 73: 471.
- [19] Li Z Y, Yu Z G, Guo Y W. New N-containing sesquiterpenes from Hainan marine sponge *Axinyssa* sp. [J]. *Helv Chim Acta*, 2008, 91: 1553.
- [20] Mao S C, Guo Y W, van Soest R, et al. New nitrogenous bisabolene-type sesquiterpenes from a Hainan sponge *Axinyssa aff. variabilis*[J]. *Helv Chim Acta*, 2007, 90: 588.
- [21] Xue D Q, Mollo E, Cimino G, et al. Lingshuine, an unexpected Passerini product from the Hainan sponge *Axinyssa variabilis*[J]. *Helv Chim Acta*, 2009, 92: 1428.
- [22] Li C J, Schmitz F J, Kelly M. New nitrogenous bisabolene-type sesquiterpenes from a Micronesian marine sponge, *Axinyssa* species[J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 1330.
- [23] Sun J Z, Chen K S, Liu H L, et al. New epoxy-substituted nitrogenous bisabolene-type sesquiterpenes from a Hainan sponge *Axinyssa* sp. [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 93: 517.
- [24] Iwashima M, Terada I, Iguchi K, et al. New biologically active marine sesquiterpenoid and steroid from the Okinawan sponge of the genus *Axinyssa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50: 1286.
- [25] Wegerski C J, Sonnenschein R N, Cabriaes F, et al. Stereochemical challenges in characterizing nitrogenous spiroaxane sesquiterpenes from the Indo-Pacific sponges *Amorphinopsis* and *Axinyssa*[J]. *Tetrahedron*, 2006, 62: 10393.
- [26] Williams D E, Patrick B O, Tahir A, et al. Boneratamides A-C, new sesquiterpenoids isolated from the marine sponge *Axinyssa aplysinoides*[J]. *J Nat Prod*, 2004, 67: 1752.
- [27] Simpson J S, Garson M J. Thiocyanate biosynthesis in the tropical marine sponge *Axinyssa* n. sp. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1998, 39: 5819.
- [28] Patil A D, Freyer A J, Reichwein R, et al. Two new nitrogenous sesquiterpenes from the sponge *Axinyssa aplysinoides*[J]. *J Nat Prod*, 1997, 60: 507.
- [29] Simpson J S, Garson M J, Hooper J N A, et al. Terpene

- metabolites from the tropical marine sponge *Axinyssa* sp. nov. [J]. *Aust J Chem*, 1997, 50: 1123.
- [30] Marcus A H, Molinski T F, Fahy E, et al. 5-Isothiocyanatopupukeanane from a sponge of the genus *Axinyssa*[J]. *J Org Chem*, 1989, 54: 5184.
- [31] Satitpatipan V, Suwanborirux K. New nitrogenous germacrane from a Thai marine sponge *Axinyssa* n. sp. [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67: 503.
- [32] Mao S C, Guo Y W, van Soest R, et al. Trans-dimer D, a novel dimeric sesquiterpene with a bis-bisabolene skeleton from a Hainan sponge *Axinyssa variabilis*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13: 770.
- [33] Bensemhoun J, Bombarda I, Aknin M, et al. 7-Amino-7, 8-dihydro- α -bisabolene derivatives from the marine sponge *Axinyssa aplysinoides*[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2008, 36: 326.
- [34] Shimogawa H, Teruya T, Suenaga K, et al. Isolation of two 13-*epi*-neoverrucosane-type diterpenoids from a marine sponge *Axinyssa tethyoides* [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 2005, 78: 1345.
- [35] 杨智, 井口和南, 山田泰司. 海绵 *Axinyssa* sp. 的化学成分研究[J]. 中国海洋药物, 1994, 13(4): 1.
- [36] Yasman, Edrada R A, Wray V, et al. New 9-thiocyanatopupukeanane sesquiterpenes from the nudibranch *Phyllidia varicosa* and its sponge-prey *Axinyssa aculeate*[J]. *J Nat Prod*. 2003, 66: 1512.
- [37] Rodríguez W, Osorno O, Ramos F A, et al. New fatty acids from Colombian Caribbean Sea sponges[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38: 774.
- [38] Simpson J S, Raniga P, Garson M J. Biosynthesis of dichloroamines in the tropical marine sponge *Stylotella aurantium*[J]. *Tetrahedron Lett*, 1997, 38: 7947.
- [39] 梁利岩, 邓松之. 中国南海海绵 *Axinyssa aplysinoides* 的化学成分研究[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(2): 1.

Review on the secondary metabolites from *Axinyssa* sponges and their bioactivities

LI Yu-fen^{1,2}, LIANG Lin-fu², LIU Hai-li², LIANG Jing-yu^{1*}, GUO Yue-wei^{2*}

(1. Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. State Key Laboratory of Drug Research,

Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: The genus *Axinyssa* is one of the most widespread sponges containing abundant secondary metabolites with novel structures and potent bioactivities. Many of the metabolites exhibit various of bioactivities, such as cytotoxic, antibacterial, antiviral and antifouling activities. This review describes the progress in chemical and bioactive research of this genus in recent years for further research.

Key words: *Axinyssa*; secondary metabolite; bioactivities