

• 化学成分 •

阿达青霉对熊果酸的微生物转化研究

王志平¹, 刘岱琳^{2*}, 延慧君³, 马卫俊²

1. 郑州人民医院 药学部, 河南 郑州 450003

2. 中国人民武装警察部队后勤学院 生药学与药剂学教研室, 天津 300162

3. 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院 药剂科, 天津 300162

摘要: 目的 利用阿达青霉对熊果酸进行微生物转化研究。方法 将熊果酸投入阿达青霉液体培养基中, 28 °C、140 r/min 条件下共培养 5 d 后超声处理, 正丁醇萃取获得富集的转化产物提取物; 利用多种柱色谱方法分离转化产物, 通过核磁共振波谱技术 (¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT、HMQC、HMBC、NOESY), 结合理化常数和化学反应等方法鉴定化合物的结构; 利用 MTT 法测定了转化产物和底物对 HepG2 细胞的细胞毒活性。结果 获得了一个熊果酸的微生物转化产物, 其结构鉴定为 3β, 21α-二羟基熊果酸-28-O-β-D-葡萄糖苷, 该转化产物具有一定的抑制 HepG2 肿瘤细胞的细胞毒活性, 其 IC₅₀ 为 19.72 μmol/L。结论 转化产物 3β, 21α-二羟基熊果酸-28-O-β-D-葡萄糖苷为 1 个新化合物, 其对 HepG2 肿瘤细胞的细胞毒活性强于底物。

关键词: 熊果酸; 微生物转化; 3β, 21α-二羟基熊果酸-28-O-β-D-葡萄糖苷; 阿达青霉; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)08-1043-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.001

Microbial transformation of ursolic acid by *Penicillium adametzi*WANG Zhi-ping¹, LIU Dai-lin², YAN Hui-jun³, MA Wei-jun²

1. Department of Pharmacy, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China

2. Department of Biology and Pharmaceutics, Logistics University of PAPF, Tianjin 300162, China

3. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Logistics University of PAPF, Tianjin 300162, China

Abstract: Objective To study the microbial transformation of ursolic acid by *Penicillium adametzi*. **Methods** The biotransformed extract was obtained by co-culture of substrate (ursolic acid) and the transferring fungi in a liquid medium at certain conditions, and then the inocula were dealt in an ultrasonic bath and extracted with *n*-BuOH. The transformed extract was isolated by chromatography on macroporous resin column, silica gel column, and preparative HPLC. The structures of the isolated compounds were identified by spectral analyses, physical constants, and chemical evidences. **Results** A microbial transformed product was isolated and identified as 3β, 21α-dihydroxyl-ursolic acid-28-O-β-D-glucopyranoside and it had the significant inhibitory effects against HepG2 cell with IC₅₀ value of 19.72 μmol. **Conclusion** The transformed product, 3β, 21α-dihydroxyl-ursolic acid-28-O-β-D-glucopyranoside, is a new compound with the stronger cytotoxic activity than that of substrate.

Key words: ursolic acid; microbial transformation; 3β, 21α-dihydroxyl-ursolic acid-28-O-β-D-glucopyranoside; *Penicillium adametzi*; cytotoxic activity

熊果酸 (ursolic acid, UA) 又名乌苏酸、乌索酸, 是天然植物中广泛分布的一种代表性的 α-香树脂醇型五环三萜类化合物^[1]。现代药理研究表明其具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、保肝、降血糖、抗 HIV^[2-5] 等多种生物学效应而备受关注。但熊果酸的脂溶性强, 体内药动学研究显示熊果酸生物利用度低^[6], 因

此近年来针对熊果酸进行结构改造的研究报道较多, 期望能够找到极性增加同时活性增强的转化产物。

微生物转化具有区域和立体选择性强、反应条件温和、操作简便、成本较低等多个优点, 且能使天然产物发生可以在发生羟基化、氧化、结构异构重排等反应^[7], 从而受到国内外学者的关注。本课题

收稿日期: 2014-01-10

作者简介: 王志平 (1980—), 男, 主管药师, 研究方向为临床药学。

*通信作者 刘岱琳, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为天然药物活性成分研究。Tel: (022)84876772 E-mail: dailinlch@163.com

题组一直利用微生物转化的方法对天然产物进行结构改造研究,已经利用 RP-HPLC 结合薄层色谱检测了 25 种真菌微生物对熊果酸的转化情况^[8],确定了 3 种菌种能够实现转化,在此基础上又扩展了真菌筛选范围,发现了阿达青霉 *Penicillium adametzi* 也能够对熊果酸发生微生物转化。而且本课题组已经利用阿达青霉转化熊果酸的同分异构体齐墩果酸,并获得了一系列转化产物,且发现抗肿瘤活性优于底物的产物^[9-10]。本实验在前期工作的基础上,利用阿达青霉进行熊果酸的微生物转化,获得了一个熊果酸的微生物转化产物,其结构鉴定为 3 β , 21 α -二羟基熊果酸-28-O- β -D-葡萄糖苷,该转化产物为 1 个新化合物。药理实验表明该化合物具有一定的抑制 HepG2 细胞的细胞毒活性,且活性强于底物。

1 仪器与材料

HZQ—QX 全温振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司), SW—CJ—2FD 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司), FA1204B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司), Yanaco MP—S3 熔点测定仪(日本 Yanaco 公司), P—1020 旋光测定仪(Jasco 公司), Bruker Maxis Q-TOF 质谱仪、Bruker AV—400 核磁共振波谱仪(布鲁克公司), 半制备高效液相色谱仪(泵, 岛津公司 LC—6A, 检测器: UV 204 nm, 色谱柱: RP₁₈, Shimadzu, 250 mm×20 mm, 5 μ m)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 葡萄糖(天津市化学试剂一厂), GF₂₅₄ 薄层板(10 cm×10 cm, 青岛海浪硅胶干燥剂厂), 无水乙醇(分析纯, 天津康科德科技有限公司), 纯净水(杭州娃哈哈饮料有限公司)。无支原体胎牛血清(FBS, Hyclone 产品); RPMI 1640 培养基(Gibco 产品); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, Sigma 产品); 青霉素(华北制药有限责任公司产品); 链霉素(Gibco 产品)。

阿达青霉 *Penicillium adametzi* 购自中国科学院微生物研究所。固体培养基: PDA 培养基(马铃薯葡萄糖琼脂培养基); 转化培养基: PDB 培养基(马铃薯葡萄糖液体培养基)。熊果酸对照品和熊果酸试药(对照品质量分数为 98%, 试药质量分数为 90%, 天津市科曼思特医药科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 生物转化方法

取活化后的阿达青霉斜面菌种 1 支, 用无菌水冲洗斜面上的孢子, 振摇, 得阿达青霉孢子悬浮液。取适量的孢子悬浮液接入新鲜无菌液体培养基中,

在 28 °C、140 r/min 条件下培养 2 d。取适量熊果酸用无水乙醇溶解, 配制成质量浓度为 9 mg/mL 的药液, 60 °C 加热超声 10 min 溶解, 经过 0.22 μ m 滤膜。在无菌条件下取适量药液加入到培养液中, 底物(熊果酸)浓度为 0.3 mg/mL, 在相同条件下继续培养 3 d。

2.2 转化产物的分离

按照“2.1”项的转化方法累积样品, 将累积的培养液抽滤后, 用等体积正丁醇萃取 2 次, 合并萃取液, 减压浓缩至干, 得到浸膏 12 g, 采用大孔树脂 HP20 (45 cm×3.7 cm) 进行分离, 以水, 30%、50%、70% 和 95% 乙醇梯度洗脱, 得到 5 个洗脱组分(组分 1~5)。组分 1 (540 mg) 经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇(99:1→80:20) 梯度洗脱, 获得 5 个洗脱组分(组分 11~15)。其中组分 14 (132 mg) 进行反相制备液相纯化, 甲醇-水(3:2) 洗脱获得 1 个转化产物 1 (36 mg)。

2.3 利用 MTT 法测定转化产物的细胞毒活性

分别将肝癌细胞 HepG2 和肝癌多药耐药细胞 HepG2r 培养于 RPMI 1640 培养液中, 加入 10% 胎牛血清, 1% 抗生素(10 000 U/mL 青霉素、10 000 μ g/mL 链霉素), 于 37 °C、5% CO₂ 条件的湿热培养箱中培养。每 2 天继代培养, 使细胞保持在对数生长期, 进行实验。

各个待测样品均分别用 DMSO 溶解, 用无血清的 RPMI 1640 培养液配制成 1 mg/mL 的储备液, 置于 -20 °C 保存。测试前再用无血清的 RPMI 1640 培养液稀释成终质量浓度为 25 μ g/mL 的待测溶液(DMSO 的终体积分数应小于 0.5%)。MTT 用 PBS 溶液配成 5 mg/mL 的母液, 于 4 °C 避光保存。

在 96 孔培养板的每一个孔中加入 90 μ L 生长良好的肿瘤细胞(约含有 1×10⁴ 个细胞/孔), 24 h 后加入供试样品, 每组平行设 4 个复孔, 同时设阳性对照、阴性对照和空白对照, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下共同培养 48 h。然后, 每孔加入 10 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL) 继续培养 4 h。离心弃去培养液, 染色的细胞用 DMSO (100 μ L/孔) 溶解, 待结晶完全溶解后, 用酶标仪于 570 nm 处测吸光度(A) 值, 并按如下公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{空白对照}}$$

3 实验结果

3.1 转化产物的结构鉴定

化合物 1: 白色粉末(甲醇), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +32.5^{\circ}$ (c

0.12, MeOH), Libermann-Burchard 反应阳性, 提示该化合物与底物类似, 为三萜类化合物。HR-TOF-ESI-MS m/z : 657.831 2 $[M+Na]^+$ (计算值 657.830 1), 确定分子式为 $C_{36}H_{58}O_9$ 。 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 0.95, 1.03, 1.20, 1.19, 1.24 (各 3H, s) 和 1.05 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.37 (3H, d, $J = 6.3$ Hz) 为 7 个熊果酸型的三萜甲基氢信号; 5.50 (1H, m, H-12) 为烯氢信号, 30 个为苷元上碳信号, 6 个为糖基碳信号。结合 DEPT 谱分析, 苷元上的 30 个碳信号中有 7 个甲基碳信号 (δ 28.7, 23.6, 17.8, 17.6, 16.5, 16.3, 15.7), 8 个亚甲基碳信号, 8 个次甲基碳信号, 7 个季碳信号和 1 个羧基碳信号 (δ 175.4)。将化合物 **1** 苷元部分的碳谱数据和底物熊果酸的数据进行比较, 发现其多出了 1 个 δ 70.2 的连氧碳信号。在 HSQC 谱观察到氢信号 (δ 3.76) 与碳信号 (δ 70.2) 存在相关峰, 说明 δ 3.76 是与碳信号 (δ 70.2) 直接相连的氢信号。在 HMBC 谱中, H-30 (δ 1.37) 与碳信号 C-20 (δ 47.6) 和 δ 70.2 存在相关, 氢信号 (δ 3.76) 也与碳信号 δ 47.6 (C-20), 47.6 (C-22) 存在相关, 确定碳信号 (δ 70.2) 是苷元 21 位上的碳信号。此外, 在 NOESY 谱中可以观察到 H-21 (δ 3.76) 与 H-29 和 H-20 存在远程相关。因此确定 21 位的羟基为 α 型。

取 5 mg 化合物 **1** 用 2 mol/L HCl 70 °C 加热水解 6 h, 然后再制备成三甲基硅烷化衍生物, 利用气相分析 (*L*-ChirasilVal 柱), 检测器: FID (氢火焰检测器); 载气: 氮气; 进样温度为 235 °C; 检测

器温度为 280 °C。柱温为程序升温, 初始柱温 150 °C, 维持 2 min, 以 5 °C/min 的速率升至 200 °C, 维持 5 min。分流比为 10 : 1; H_2 体积流量为 30 mL/min; 尾吹 25 mL/min; 进样量: 1.0 μ L。样品在 8 min 中出峰, 与葡萄糖对照品比较, 确定化合物中连接到糖为 *D*-吡喃葡萄糖。糖链部分氢谱数据给出糖的端基氢质子信号 δ 6.30 (1H, d, $J = 8.0$ Hz) 说明其为 β -*D*-葡萄糖。利用 1H - 1H COSY、TOCSY、NOESY 谱结合 HSQC 和 HMBC 谱对糖链的信号进行了归属。糖的端基质子碳信号为 δ 95.8 向高场位移, 且其端基氢信号在 HMBC 谱中与羧基碳信号 δ 176.9 存在相关, 说明该葡萄糖连接在苷元的 28 位, 形成了酯苷。综上所述, 化合物 **1** 的结构鉴定为 3 β , 21 α -二羟基熊果酸-28-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖酯苷。经过 Scifinder 数据库检索, 确定该化合物为 1 个新化合物, 结构见图 1; 具体的氢谱和碳谱数据归属见表 1。

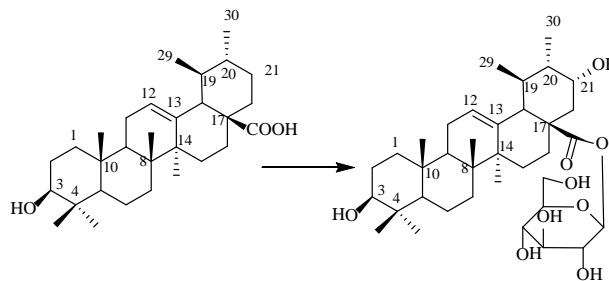


图 1 底物和转化产物的结构式

Fig. 1 Structure of substrate and transformatin product

表 1 转化产物 1 的碳谱和氢谱数据

Table 1 1H -NMR and ^{13}C -NMR data for transformatin product 1

碳位	δ_C	δ_H	碳位	δ_C	δ_H	碳位	δ_C	δ_H
1	39.1	1.61 (2H, m)	16	25.8	2.18 (1H, m), 2.09 (1H, m)	28-glc-1'	95.8	6.30 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)
2	28.1	1.85 (2H, m)	17	49.3		2'	74.0	4.18 (1H, m)
3	78.1	3.46 (1H, m)	18	53.1	2.69 (1H, m)	3'	79.2	4.03 (1H, m)
4	39.3		19	38.5	1.70 (1H, m)	4'	71.2	4.34 (1H, m)
5	55.8	0.86 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)	20	47.6	1.22 (1H, m)	5'	78.9	4.28 (1H, m)
6	18.7	1.53 (2H, m)	21	70.2	3.76 (1H, m)	6'	62.2	4.59 (1H, m), 4.39 (1H, m)
7	33.5	1.54 (1H, m), 1.41 (1H, m)	22	45.9	2.66 (1H, m), 2.11 (1H, m)			
8	40.2		23	16.5	1.03 (3H, s)			
9	48.1	1.65 (1H, m)	24	28.7	1.24 (3H, s)			
10	37.3		25	15.7	0.95 (3H, s)			
11	23.7	1.98 (2H, m)	26	23.6	1.20 (3H, s)			
12	126.5	5.50 (1H, m)	27	17.6	1.19 (3H, s)			
13	138.5		28	175.4				
14	42.5		29	17.6	1.05 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)			
15	32.8	1.21 (2H, m)	30	16.3	1.37 (3H, d, $J = 6.3$ Hz)			

3.2 细胞毒活性测试结果

活性测试结果显示化合物 **1** 对于 HepG2 具有一定的细胞毒活性, IC_{50} 为 $19.72 \mu\text{mol/L}$, 作用优于底物熊果酸。但是对 HepG2r 的细胞毒作用相对弱些, 结果见表 2。

表 2 熊果酸和化合物 **1** 抑制细胞增殖的 IC_{50} 值

Table 2 IC_{50} values of UA and compound **1** on cell proliferation

化合物	$IC_{50} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	
	HepG2	HepG2r
熊果酸 (底物)	>52.96	>52.96
化合物 1 (转化产物)	19.72	>39.43

4 讨论

本实验首次利用阿达青霉 *Penicillium adametzi* 对熊果酸进行微生物转化研究, 分离并鉴定了 1 个转化产物, $3\beta, 21\alpha$ -二羟基-熊果酸-28-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷, 该化合物为一个新的转化产物。本课题组在前期的微生物转化研究过程中建立了阿达青霉的生长曲线, 定量给予培养基、定量给予孢子, 28°C 、 140 r/min 条件下培养 2 d, 阿达青霉生长达到高峰期, 在该培养基条件下能够持续 3 d。故选择生长旺盛期加入转化底物熊果酸, 并且培养 3 d, 进行转化。利用 TLC 和 HPLC 进行检测, 共有 2~3 个转化产物存在, 并且以转化产物 $3\beta, 21\alpha$ -二羟基-熊果酸-28-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷为主, 其他转化产物有待后续进一步研究。本研究利用微生物转化的方法实现了对熊果酸 C-21 位羟基化和 C-28 位进行糖苷化。也验证了微生物转化可以在温和的条件下实现三萜类化合物的羟基化反应和糖苷化反应, 且具有立体选择性。

文献报道熊果酸具有抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖并且诱导凋亡的作用^[11], 本实验在分离鉴定转化产物结构的基础上, 又测定了产物和底物对肝癌细胞 HepG2 和肝癌多药耐药细胞 HepG2r 的细胞毒活性。结果显示本研究获得的新的转化产物具有很好的抑制肝癌细胞 HepG2 作用, 且活性强于底物熊

果酸。但是对于肝癌多药耐药细胞 HepG2r 作用相对弱些。说明利用微生物转化可以获得更多结构新颖的天然产物, 是获得更多更好的天然候选化合物的有效途径。

参考文献

- [1] 向敏, 王建梅, 凌婧, 等. 熊果酸抗肿瘤和抗心血管疾病作用的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(6): 7-10.
- [2] Muto Y, Ninomiya M, Fujiki H. Present status of research on cancer chemoprevention in Japan [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 1990, 20(3): 219-224.
- [3] 陈军, 柳军, 龚彦春, 等. 新型糖原磷酸化酶抑制剂熊果酸衍生物的合成及其生物活性 [J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 397-402.
- [4] Kwon T H, Lee B, Chung S H, et al. Synthesis and NO production inhibitory activities of ursolic acid and oleanolic acid derivatives [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2009, 30(1): 119-123.
- [5] 孟艳秋, 陈瑜, 王赳, 等. 熊果酸的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(1): 25-28.
- [6] Liao Q F, Yang W, Jia Y, et al. LC-MS Determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional Chinese medicinal preparation Lu-Ying extract [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2005, 125(6): 509-515.
- [7] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [8] 张泽生, 王炫, 段殷, 等. 熊果酸的微生物转化筛选及消耗率的测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(5): 387-390.
- [9] 李庆英, 延慧君, 朱铁梁, 等. 链格孢菌对熊果酸的微生物转化产物研究 [J]. 武警后勤学院学报, 2012, 21(12): 978-983.
- [10] Liu D L, Liu Y, Qiu F, et al. Biotransformation of oleanolic acid by *Alternaria longipes* and *Penicillium adametzi* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(2): 160-167.
- [11] 张静. 熊果酸诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的实验研究 [J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2010, 12(7): 4-6.