

• 化学成分 •

红树林底泥放线菌 (N2010-37) 抗肿瘤化学成分研究 (I)

周中流¹, 尹文清², 金蓓¹, 傅春燕², 冯华芬², 曾立²

1. 湛江师范学院化学科学与技术学院 制药工程系, 广东 湛江 524048

2. 广西师范大学 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室, 广西 桂林 541004

摘要: 目的 寻找发现红树林底泥放线菌 (N2010-37) 中抗肿瘤活性成分。方法 放线菌 (N2010-37) 发酵菌丝体经 95% 乙醇提取, 溶剂分级萃取, 应用多种柱色谱分离和谱学分析方法对醋酸乙酯萃取部位化学成分进行分离鉴定。结果 从醋酸乙酯部位分离得到 1 个新的单环内酯和 2 个蒽酮类化合物, 依次鉴定为 (3*S*, 4*R*, 7*R*, 8*R*, 9*S*)-3, 8-二羟基-4, 7, 9-三甲基-2, 6-环壬二酯 (**1**)、1-甲氧基-2-羟基-3-甲基蒽醌 (**2**)、1, 6, 8-三羟基-3-甲基蒽醌 (**3**)。结论 化合物 **1** 为新化合物, 体外抗肿瘤实验表明, 化合物 **1** 和 **3** 对人类慢性髓性白血病细胞系 K562 细胞株具有一定的细胞毒活性。

关键词: 红树林; 放线菌; 单环内酯; 抗肿瘤活性; (3*S*, 4*R*, 7*R*, 8*R*, 9*S*)-3, 8-二羟基-4, 7, 9-三甲基-2, 6-环壬二酯; 1-甲氧基-2-羟基-3-甲基蒽醌; 1, 6, 8-三羟基-3-甲基蒽醌

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)11-2173-04

Chemical constituents of antineoplastic actinomycete strain (N2010-37) of bottom mud in mangrove (I)

ZHOU Zhong-liu¹, YIN Wen-qing², JIN Bei¹, FU Chun-yan², FENG Hua-fen², ZENG Li²

1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemistry Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China

2. Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Ministry of Education, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in the cultured filaments of an antitumor actinomycete strain (N2010-37). **Methods** Compounds were isolated and purified by chromatographic techniques and recrystallization, and the structures were identified by spectral methods together with physicochemical analysis. The antitumor effects of these compounds were tested *in vitro* by MTT method. **Results** Three compounds were identified including two anthrones and one novel macrolide. They were (3*S*, 4*R*, 7*R*, 8*R*, 9*S*)-3, 8-dihydroxy-4, 7, 9-trimethyl-2, 6-cyclononanediiolacetone (**1**), 2-hydroxy-1-methoxy-3-methylanthraquinone (**2**), and 1, 6, 8-thihydroxy-3-methylanthraquinone (**3**). **Conclusion** Compound **1** is a new compound, and compounds **1** and **3** show the favorable cytotoxic activity against human chronic granulocytic leukemia cell line K562 strain by MTT method *in vitro*.

Key words: mangrove; actinomycete; macrolide; antitumor activity; (3*S*, 4*R*, 7*R*, 8*R*, 9*S*)-3, 8-dihydroxy-4, 7, 9-trimethyl-2, 6-cyclononanediiolacetone; 2-hydroxy-1-methoxy-3-methylanthraquinone; 1, 6, 8-thihydroxy-3-methylanthraquinone

海洋微生物由于生活在高盐、高压的特殊环境中, 具有独特的代谢方式。因此, 海洋微生物次生代谢产物一直是结构新颖和活性天然产物的重要来源, 特别是抗肿瘤药物发现的重要源泉之一^[1]。本实验采用 MTT 法进行抗肿瘤活性测试, 对我国湛江

红树林采集的底泥样品中分离纯化的微生物菌株进行筛选, 得到的一株放线菌 (N2010-37) 具有很好的细胞毒活性。为了阐明其抗肿瘤活性成分, 对其发酵物进行系统研究。目前, 共分离鉴定了 3 个化合物, 分别为 (3*S*, 4*R*, 7*R*, 8*R*, 9*S*)-3, 8-二羟基-4, 7,

收稿日期: 2011-07-05

基金项目: 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目资助 (LYM09100); 湛江师范学院自然科学研究项目博士专项 (ZL1009)

作者简介: 周中流 (1981—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为药物化学和天然药物化学。

Tel: (0759)3182455 E-mail: zhoul10zhong99@sohu.com

网络出版时间: 2011-10-14

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20111014.1422.001.html>

9-三甲基-2, 6-环壬二酯 [(3*S*, 4*R*, 7*R*, 8*R*, 9*S*)-3, 8-dihydroxy-4, 7, 9-trimethyl-2, 6-cyclononanediol-lactone, **1**]、1-甲氧基-2-羟基-3-甲基蒽醌 (2-hydroxy-1-methoxy-3-methylantraquinone, **2**)、1, 6, 8-三羟基-3-甲基蒽醌 (1, 6, 8-thihydroxy-3-methylantraquinone, **3**)，化合物**1**为新化合物，已以快报形式发表^[2]。体外抗肿瘤试验表明，化合物**1**和**3**具有一定的细胞毒活性。

1 仪器、试剂与药材

DRX-400 型核磁共振仪，TMS 为内标；Kofler 显微测熔仪；柱色谱硅胶 (200~300、300~400 目) 青岛海洋化工厂产品。薄层色谱用 10%浓硫酸乙醇试剂加热显色；医用乙醇为汇海科仪科技有限公司产品；其他化学试剂均为分析纯。

放线菌 (N2010-37) 从湛江红树林底泥中分离得到，样本保存于广西师范大学药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室。提取分离纯化培养的放线菌，采用插片法，28 °C 培养，用光学显微镜观察形态，笔者根据放线菌基内菌丝、气生菌丝和孢子丝的形态特征极性分类鉴定。

适量菌体取自 28 °C 培养 4 d 的高氏 1 号培养基，接种于种子培养基 (可溶性淀粉 1%、葡萄糖 2%、K₂HPO₄ 0.05%、豆粉 0.5%、蛋白胨 2%、酵母提取物 0.4%、牛肉膏 0.1%、CaCO₃ 0.2%、陈海水配制，pH 值调至 7.0)，于 28 °C、200 r/min 的条件下摇床培养 3 d 得到种子培养液。将该种子培养液按 10%的接种量接种于 150 瓶每瓶含 100 mL 液体培养基 (成分同上) 的 500 mL 三角瓶中，28 °C、200 r/min 摇床培养 6 d。

2 提取与分离

菌丝体用 95%乙醇浸泡 3 次，每次 12 h，合并浸提液，减压浓缩，得到浸膏 121 g。将此浸膏混悬于热水中，依次用石油醚、醋酸乙酯和水饱和正丁醇萃取，合并醋酸乙酯萃取液，减压蒸干，得到浸膏 28 g。浸膏拌硅胶过柱 (200~300 目)，以石油醚-醋酸乙酯、氯仿-甲醇梯度洗脱，收集各流份，减压浓缩、合并，得到 5 个流份 Fr. 1~5。每个流份经抗肿瘤活性测试，确定 Fr. 2 和 Fr. 5 为活性流份。经反复正反相硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱和重结晶等分离手段，从 Fr. 2 得到化合物**1** (14 mg)、**2** (11 mg)、**3** (17 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**：为白色针晶，mp 113~116 °C。[α]_D²⁵ +

79.4° (c 0.5, CHCl₃)。ESI-MS 显示准分子离子峰 *m/z* 231 [M-H]⁺，化合物**1** 的相对分子质量为 232。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 233.212 6 [M+H]⁺ (理论值 233.212 9)，推断其分子式为 C₁₀H₁₆O₆，不饱和度为 3。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 谱化学位移 δ_H 4~5.2 显示 4 组与杂原子氧相连的次甲基信号：δ_H 4.78 (1H, d, *J* = 5.2 Hz), 5.09 (1H, m, *J* = 5.2, 7.0 Hz), 4.45 (1H, t, *J* = 10.3 Hz) 和 4.98 (1H, m, *J* = 7.0, 10.3 Hz)。在高场区 δ_H 1~1.5 显示 3 个双峰甲基质子信号 δ_H 1.39 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.31 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.43 (3H, d, *J* = 7.1 Hz)，说明它们分别与次甲基相连。

化合物**1** 的 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 谱以及 DPET 谱显示 10 个碳信号。高场区 δ_C 10~20 有 3 个甲基碳信号，分别是 δ_C 13.8、13.3、15.5。在化学位移 δ_C 70~80 有 4 个连氧次甲基信号 δ_C 71.7、73.8、71.3、77.3。低场区 δ_C 170~180 有两个酯基碳信号 δ_C 172.5、176.6。化合物**1** 的不饱和度为 3，除去两个酯基，故推测化合物**1** 中还含有 1 个内酯环。

在 ¹H-¹H COSY 谱中，δ_H 4.78 (1H, d, *J* = 5.2 Hz) 与 5.09 (1H, m, *J* = 5.2, 7.0 Hz) 呈相关关系，δ_H 5.09 (1H, m, *J* = 5.2, 7.0 Hz) 与 1.43 (3H, d, *J* = 7.1 Hz) 和 4.78 (1H, d, *J* = 5.2 Hz) 呈相关关系，推断化合物**1** 含有片段 A (图 1)。δ_H 1.31 (3H, d, *J* = 7.0 Hz) 与 3.07 (1H, m, *J* = 7.1, 10.0 Hz) 呈相关关系，δ_H 3.07 (1H, m, *J* = 7.1, 10.0 Hz) 与 1.31 (3H, d, *J* = 7.0 Hz) 和 4.45 (1H, t, *J* = 10.3 Hz) 呈相关关系，δ_H 4.45 (1H, t, *J* = 10.3 Hz) 与 3.07 (1H, m, *J* = 7.1, 10.0 Hz) 和 4.98 (1H, m, *J* = 7.0, 10.3 Hz) 呈相关关系，δ_H 4.98 (1H, m, *J* = 7.0, 10.3 Hz) 与 4.45 (1H, t, *J* = 10.3 Hz) 和 1.39 (3H, d, *J* = 7.0 Hz) 呈相关关系，推测化合物**1** 中还含有结构片段 B。

在 HMBC 谱图中，发现 δ_H 4.78 (1H, d, *J* = 5.2 Hz)

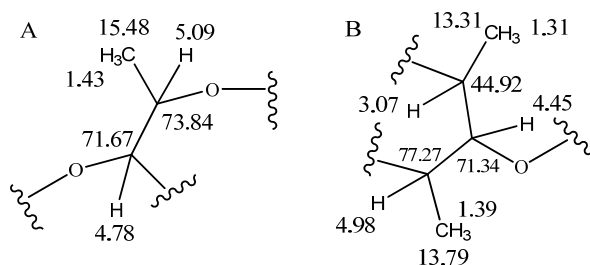


图 1 化合物**1** 的结构片段 A 和 B

Fig. 1 Structure segments A and B of compound 1

与 δ_C 73.8、15.5、172.5 呈远程相关, δ_H 5.09 (1H, m, $J=5.2, 7.0$ Hz) 与 δ_C 71.7、15.5、172.1、176.6 呈远程相关, 说明 δ_C 71.7 与酯基碳 172.5 直接相连, 而 δ_C 73.8 与另一个酯基碳 176.6 相隔一个原子相连。同时, 还发现 δ_H 4.98 (1H, m, $J=7.0, 10.3$ Hz) 与 δ_C 172.5、13.8、71.3、44.9 呈远程相关, δ_H 3.07 (1H, m, $J=7.1, 10.0$ Hz) 与 δ_C 176.6、13.3、71.3、77.3 呈远程相关, δ_H 4.45 (1H, t, $J=10.3$ Hz) 与 δ_C 44.9、176.6、13.3、77.3、13.8 呈远程相关, 表明 δ_C 44.9 与酯基碳 δ_C 176.6 直接相连, δ_C 77.3 与酯基碳 δ_C 172.5 间隔一个原子相连。这样, 经片段 A 与片段 B 的连接, 化合物 1 的母核为取代的 9 元内酯单环。根据化合物 1 的化学式, 可以知道 R_1 和 R_2 均为氢原子, 表明该化合物中含有两个羟基。至此, 确定了化合物 1 的平面结构。化合物 1 的 HMBC 谱图中关键碳氢相关信号见图 2。

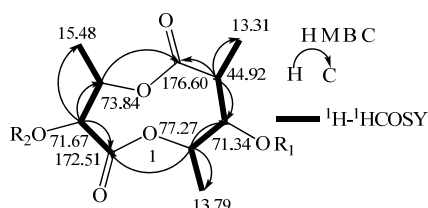


图 2 化合物 1 主要的 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关信号
Fig. 2 Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compound 1

在 ROESY 谱中, 可以看到 δ_H 4.45 (1H, t, $J=10.3$ Hz)、1.39 (3H, d, $J=7.0$ Hz)、1.31 (3H, d, $J=7.0$ Hz)、5.09 (1H, m, $J=5.2, 7.0$ Hz) 和 4.78 (1H, d, $J=5.2$ Hz) 空间相关, 说明它们空间接近。同时, 还能看到 δ_H 3.07 (1H, m, $J=7.1, 10.0$ Hz) 和 4.98 (1H, m, $J=7.0, 10.3$ Hz) 呈相关关系, 提示两个甲基 δ_C 13.7 与 δ_C 13.3 空间取向一致, 甲基 δ_C 15.4 与它们空间取向相反。

综合以上信息, 检索 SciFinder 数据库, 发现化合物 1 与文献报道^[3]的 antimycin A₇ 具有相同的母核, 都含有一个九元内酯环。比较这两个化合物的结构, 除了 C-3、C-7 和 C-8 位上取代基不同外, 其余结构片段的波谱数据基本一致。同时, 在相同条件下测试化合物 1 和 antimycin A₇ 的比旋光度, 化合物 1 $[\alpha]_D^{25} +79.4^\circ$ (c 0.5, CHCl_3), antimycin A₇ $[\alpha]_D^{25} +72^\circ$ (c 0.5, CHCl_3), 两个化合物的比旋光度基本一致。因此, 确定化合物 1 的结构为 (3*S*, 4*R*, 7*R*, 8*R*, 9*S*)-3, 8-二羟基-4, 7, 9-三甲基-2, 6-环壬二酯, 见

图 3。其氢谱和碳谱信号全归属结果见表 1。

化合物 2: 黄色晶体, mp 221~224 $^\circ\text{C}$, ESI-MS m/z : 268 $[\text{M}]^+$, 结合其碳谱推测出分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$, 不饱和度为 11。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.24 (1H, m, H-5), 8.18 (1H, m, H-8), 7.89 (1H, m, H-6), 7.80 (1H, m, H-7), 7.78 (1H, s, H-4), 3.86 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 6.44 (1H, 2-OH), 2.31 (3H, s, CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3COCD_3) δ : 147.8 (C-1), 156.5 (C-2), 133.7 (C-3), 127.1 (C-4), 127.4 (C-5), 134.6 (C-6), 134.1 (C-7), 127.3 (C-8), 184.4 (C-9), 183.2 (C-10), 136.0 (C-8a), 132.9 (C-5a), 124.5 (C-4a), 121.0 (C-9b), 62.0 ($-\text{OCH}_3$), 17.1 ($-\text{CH}_3$)。以上波谱数据及理化性质与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 2 为 1-甲氧基-2-羟基-3-甲基萜醌。

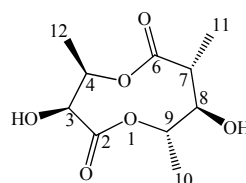


图 3 化合物 1 的化学结构
Fig. 3 Chemical structure of compound 1

表 1 化合物 1 和 antimycin A₇ 的 NMR 数据
(在 CDCl_3 , 400/100 MHz)

Table 1 NMR data of compound 1 and antimycin A₇
(in CDCl_3 , 400/100 MHz)

碳位	化合物 1		antimycin A ₇
	δ_H	δ_C	δ_C
1	—	—	—
2	—	172.5	170.1
3	4.78 (1H, d, 5.2)	71.7	53.8
4	5.09 (1H, m, 5.2, 7.0)	73.8	70.9
5	—	—	—
6	—	176.6	172.9
7	3.07 (1H, m, 7.1, 10.0)	44.9	50.4
8	4.45 (1H, t, 10.3)	71.3	75.4
9	4.98 (1H, m, 7.0, 10.3)	77.3	74.9
10	1.39 (3H, d, 7.0)	13.8	15.0
11	1.31 (3H, d, 7.0)	13.3	—
12	1.43 (3H, d, 7.1)	15.5	17.8

化合物 3: 黄色晶体, ESI-MS m/z : 270 $[\text{M}]^+$, 结合其碳谱和 DEPT 谱推测分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, 不饱和度为 11。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3COCD_3) δ :

12.80 (1H, s, 1-OH), 12.23 (1H, s, 8-OH), 9.82 (1H, br s, 6-OH), 7.56 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-4), 7.24 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5), 7.13 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 6.66 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-7), 2.36 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3COCD_3) δ : 191.3 (C-9), 182.8 (C-10), 166.5 (C-1), 166.2 (C-8), 162.7 (C-6), 148.6 (C-3), 136.1 (C-5b), 134.3 (C-4a), 124.7 (C-2), 121.2 (C-4), 114.4 (C-1a), 110.6 (C-8b), 109.5 (C-7), 108.7 (C-5), 22.1 (-CH₃)。波谱数据及理化性质与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 **3** 为 1, 6, 8-三羟基-3-甲基蒽醌。

4 抗肿瘤活性筛选

采用人类慢性髓性白血病 K562 细胞系, 细胞培养液采用 10% FBS 的 RPMI1640 培养基, 内含有 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中传代培养。

采用 MTT 法^[6]测定了化合物 **1**、**2**、**3** 对 K562 细胞的增殖抑制效果, IC_{50} 值分别为 1.36、19.73、6.14 $\mu\text{mol/L}$, (阳性对照药顺铂的 IC_{50} 值 < 0.1 $\mu\text{mol/L}$)。结果表明, 3 个化合物对 K562 细胞显示中等程度的细胞毒活性, 化合物 **1** 活性较强。同时, 本研究揭示了放线菌株 (N2010-37) 的主要抗肿瘤

活性成分是内酯类和蒽醌类化合物, 它们对 K562 细胞显示不同程度的增殖抑制作用。

参考文献

- [1] Tan N, Shao C L, Tao L M, *et al.* Identification and bioassay of three anthraquinone secondary metabolites of mangrove endophytic fungus #2240 from South China Sea [J]. *Chin J Appl Chem*, 2009, 26(3): 277.
- [2] Zhou Z L, Jin B, Yin W Q, *et al.* Components in antineoplastic actinomycete strain (N2010-37) of bottom mud in mangrove [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 165-167.
- [3] Barrow C, Oleynek J, Marinelli V. Antimycins, inhibitor of ATP-citrate lyase, from a *Streptomyces* sp. [J]. *J Antibiot*, 1997, 50(9): 729-733.
- [4] Li C Y, She Z G, Lin Y C, *et al.* Studies on metabolites from the mixed fermentation products of two mangrove endophytic fungi K38 and E33 [J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyat*, 2010, 49(6): 137-144.
- [5] 王爱芹, 李军林, 李家实. 藏边大黄的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 343-347.
- [6] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. *J Immunol Method*, 1983, 65(1): 55-63.

《中草药》杂志最新佳绩

《中国科技期刊引证报告》2010 年 11 月 26 日发布:《中草药》杂志 2009 年总被引频次 5 631, 名列我国科技期刊第 16 名, 中医中药类期刊第 1 名; 影响因子 0.627, 基金论文比 0.620, 他引率 0.890, 权威因子 2 202.980; 连续 6 年 (2005—2010 年) 荣获“百种中国杰出学术期刊”称号。

《中草药》杂志 2009 年 12 月荣获“新中国 60 年有影响力的期刊”, 执行主编陈常青研究员荣获“新中国 60 年有影响力的期刊人”。

《中草药》杂志荣获第二届中国出版政府奖 (中国出版政府奖是中国出版界的最高奖, 此次评选是在全国约 5 000 种科技期刊中评选出前 10 名为中国出版政府奖, 11~30 名为中国出版政府奖提名奖), 2011 年 3 月 18 日于北京举行盛大的颁奖典礼。