

含亚精胺植物药在平阳霉素发酵上的应用

卢雪欢^{1,2}, 邓旭², 孟宪伟², 郭瑞玲², 李继安^{2*}, 林惠敏^{2*}

1. 浙江工业大学 长三角绿色制药协同创新中心, 浙江 杭州 310014

2. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200040

摘要: **目的** 从含亚精胺植物中筛选出一种对平阳霉素发酵起促进作用的植物药。**方法** 以生物发酵中碳氮源筛选手段为基础, 通过 HPLC 在黑枸杞、宁夏枸杞、宁夏枸杞嫩芽、红花和薏米等中药材中筛选出对平阳霉素生物合成促进效果最佳的植物药, 并筛选出最佳的添加时间、添加量以及添加频率。**结果** 筛选得到宁夏枸杞嫩芽对平阳霉素发酵效果最佳, 且初始添加时间为 24 h, 添加间隔为 24 h, 添加频率为 3 次时效果最佳。每次添加量为 7 g/L 时其摇瓶发酵水平为 21.3 μg/mL, 每次添加量为 18 g/L 时 25 L 罐发酵水平为 37.5 μg/mL, 较原始发酵效价分别提高了 23.8% 和 118.0%, 较添加亚精胺产率提高 45.3%。**结论** 含亚精胺植物药大部分对平阳霉素发酵生产具有促进作用, 筛选宁夏枸杞嫩芽作为平阳霉素发酵原材料从成本、产率以及环保角度均符合生产要求。

关键词: 植物药; 亚精胺; 宁夏枸杞嫩芽; 平阳霉素; 产率; 生物合成

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)24-5950-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.006

Application of plant medicine containing spermine in pingyangmycin fermentation

LU Xue-huan^{1,2}, DENG Xu², MENG Xian-wei², GUO Rui-ling², LI Ji-an², LIN Hui-min²

1. Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

Abstract: **Objective** Screening a plant medicine containing spermidine to promote the fermentation of pingyangmycin (PYM). **Methods** Based on the screening method of carbon and nitrogen sources in biological fermentation, the plant medicine with the best promotion effect on PYM was screened out by HPLC method in *Lycium ruthenicum*, *Lycium barbarum*, *Lycium barbarum* bud, *Carthamus tinctorius*, and *Coicis Semen*. And the best adding time, amount and frequency were also screened out. **Results** The results showed that *Lycium barbarum* bud had the best effect on PYM fermentation, and the initial adding time was 24 h, the adding interval was 24 h, and the adding frequency was three times. The shaking bottle fermentation level was 21.3 μg/mL when the addition amount was 7 g/L/per batch, and the 25 L tank fermentation level was 37.5 μg/mL when the addition amount was 18 g/L/per batch, which increased by 23.8% and 118.0%, respectively. Compared with the addition of spermidine, the yield was increased by 45.3%. **Conclusion** Most plant drugs containing spermidine can promote the fermentation of pingyangmycin, and the selection of *Lycium barbarum* bud as raw materials for pingyangmycin fermentation meets the production requirements in terms of cost, yield and environmental protection.

Key words: botanical; spermidine; bud of *Lycium barbarum*; PYM; productive rate; cost

平阳霉素(博来霉素 A5, PYM), 是由我国学者自主研制并投入临床应用的抗肿瘤药物, 是博来霉素类抗肿瘤药物^[1]。如图 1、2 所示, 日本报道的博

来霉素(bleomycin)是含有 13 种组分的复合物; 平阳霉素则为单一博来霉素 A5 组分制品, 主要差异在于末端胺结构^[2-4], 而平阳霉素的末端胺结构侧链取代

收稿日期: 2019-03-26

作者简介: 卢雪欢(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物与生化药物。Tel: 13186972589 E-mail: 358573373@qq.com

*通信作者 李继安(1965—), 男, 医学博士, 研究员, 博士生导师, 从事微生物药物开发研究。Tel: (021)20572145 E-mail: lijianhenan@126.com
林惠敏(1982—), 女, 硕士生导师, 副研究员, 博士, 研究方向为微生物与生化药物。Tel: 18721613988 E-mail: hmlin1127@163.com

结构为精胺^[5-6]，且研究表明，末端胺结构的疏水性对其 DNA 结合性能和抗肿瘤活性有重要影响^[7-9]。

平阳霉素由于其末端为精胺结构，在实验过程

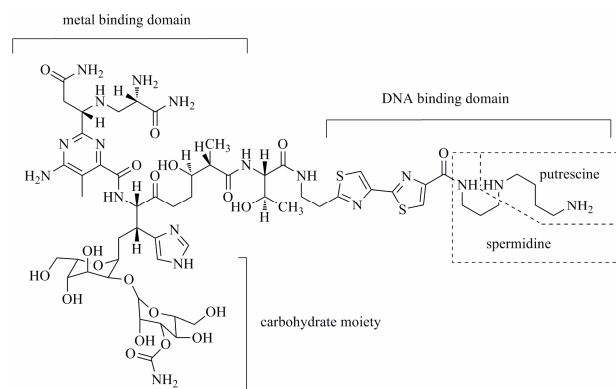


图 1 博来霉素复合物化学结构

Fig. 1 Chemical constitution of BLMs

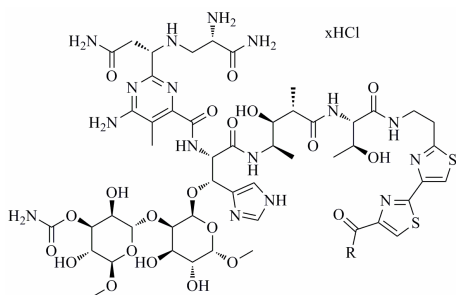


图 2 平阳霉素化学结构

Fig. 2 Chemical constitution of PYM

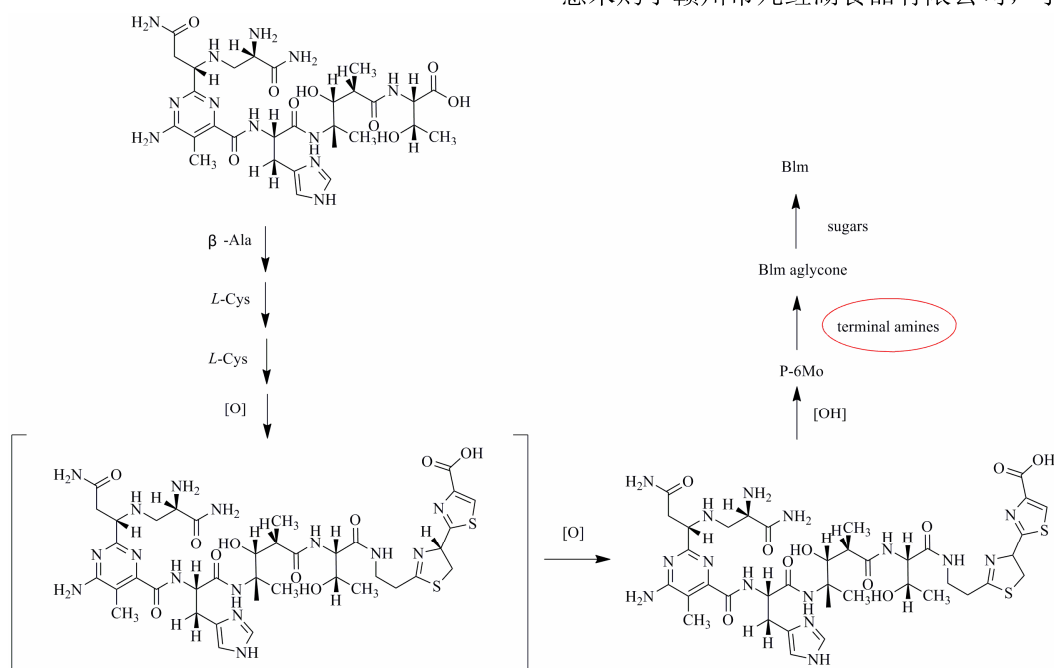


图 3 平阳霉素生物合成途径

Fig. 3 Biosynthesis of PYM

中添加前体亚精胺能促进平阳霉素的定向合成^[10]。

如图 3 所示，亚精胺作为终端胺的一种，使博来霉素往平阳霉素方向进行定向合成^[11]。平阳霉素发酵生产过程中所需要添加的前体物质具有价格昂贵、生产效益不高、成本与效益不成比例等缺点。张宁等^[12]首次对生物胺在宁夏枸杞不同部位的分布情况进行了研究，结果表明宁夏枸杞不同部位中主要含有腐胺、组胺、亚精胺与精胺；亚精胺在宁夏枸杞嫩叶、老叶与花中有较高含量，以嫩叶中最多；赵硕等^[13]研究发现多种植物如黑枸杞、红花、奎东茄、长筒曼陀罗、榭树叶、茶树花叶、甘青青兰及华西龙头草等均含有亚精胺，而工业中常以红花为原材料进行亚精胺物质的提取；吕海洋^[14]在研究中发现，与另 2 种枸杞（黄枸杞、宁夏枸杞）相比，精胺类化合物是黑枸杞中的特色成分。本实验选择其他含有前体的植物以及植物药进行替代实验，进行定向合成的发酵优化实验。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 菌株 轮枝链霉菌平阳变种 *Streptomyces verticillus*，由本实验室保藏。

1.1.2 药材与试剂 宁夏枸杞、黑枸杞、枸杞芽茶购买于银川杞里香商贸有限公司，玉米浆购买于西王有限公司，红花购于苏州伊唯生物科技有限公司，薏米购于赣州市九鲤湖食品有限公司，宁夏枸杞嫩

叶为本实验室种植。

宁夏枸杞、黑枸杞、枸杞芽茶、红花由中国医药工业研究总院中药部吴彤研究员分别鉴别为茄科枸杞属小灌木枸杞 *Lycium barbarum* L. 的成熟子实，茄科枸杞属多棘刺灌木黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 的干燥子实，茄科枸杞属小灌木枸杞 *Lycium barbarum* L. 的叶子、菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 (g/L) 可溶性淀粉 20.0、KNO₃ 10.0、K₂HPO₄ 5.0、MgSO₄•7H₂O 5.0、NaCl 5.0、FeSO₄•7H₂O 0.1、玉米浆 5.0、琼脂 20.0，pH 7.4~7.6。

1.2.2 种子发酵培养基 (g/L) 玉米浆 30.0、黄豆饼粉 20.0、榴花酵母粉 2.0、葡萄糖 10.0、麦芽糊精 10.0、KH₂PO₄ 1.0、ZnSO₄•7H₂O 0.5、CuSO₄•5H₂O 0.1，pH 6.5。

1.2.3 基础发酵培养基 (g/L) 玉米浆 7.5、冷榨黄豆饼粉 35.0、榴花酵母 2.0、葡萄糖 5.0、淀粉 (α-淀粉酶液化) 60、NaNO₃ 2.0、KH₂PO₄ 1.0、ZnSO₄•7H₂O 0.5、CuSO₄•5H₂O 0.1，pH 6.5。

1.2.4 发酵罐补料 (g/L) 玉米浆 70.0、冷榨豆粉 49.0、榴花酵母粉 21.0、KH₂PO₄ 1.0、ZnSO₄•7H₂O 0.5、CuSO₄•5H₂O 0.1、NaNO₃ 2.0，pH 自然，每次补料量 1.6%，补料时间间隔为 12 h。

1.3 仪器

Agilent 1200 HPLC (美国 Agilent 公司); BMR-B 系列机械搅拌发酵罐(上海敖中生物工程设备有限公司)。

2 方法

2.1 菌株培养条件^[16]

2.1.1 斜面培养 将冷冻干燥管或甘油管中的孢子接种到斜面培养基上(茄型瓶，60 mL/300 mL)，放在 28.5~29 °C 恒温培养箱培养 6~7 d，当菌落凸起、表面呈丝绒状、孢子呈白色且丰富时终止培养。

2.1.2 种子培养 用接种铲移取一定量的生长成熟的斜面到装有 80 mL/500 mL 种子培养基的三角摇瓶中，用 8 层纱布包扎好后放在摇床上，220 r/min、28.5~29 °C 条件下培养 24 h。

2.1.3 摇瓶发酵培养 5%接种量将生长好的种子液移种到装有 35 mL/250 mL 发酵培养基的三角摇瓶中培养，220 r/min、28.5~29 °C 条件下培养 168 h。

2.1.4 25 L 种子发酵罐发酵条件 装液量为 16 L，

将培养好的种子摇瓶培养基 80 mL 接种至灭好菌的种子培养基当中，温度为 28.5 °C，通气比为 1.0，转速为 0~14 h 为 250 r/min，14~18 h 为 300 r/min，18~24 h 为 350 r/min，24 h 之后为 375 r/min；发酵周期为 24~28 h。

2.1.5 25 L 发酵罐发酵条件 装液量为 16 L，接种量为 40%，温度为 28.5 °C，通气比为 1.0 L/L/min，转速 0~4 h 为 250 r/min，4~6 h 为 300 r/min，6~8 h 为 350 r/min，8 h 之后为 375 r/min，发酵周期为 168~192 h。

2.2 含亚精胺植物药筛选策略

2.2.1 无菌亚精胺溶液的配制 准确称量 5.00 g 质量分数为 75%的亚精胺药品，溶解于 50 mL 无菌水中，搅拌使其充分溶解，再经无菌超滤膜滤过，获得 7.5%的亚精胺无菌溶液。

2.2.2 添加亚精胺对平阳霉素促进作用的验证 将配制好的亚精胺溶液于发酵 0 h 分别以 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mL 为剂量添加到 35 mL/250 mL 的发酵摇瓶，在发酵 168 h 检测平阳霉素效价，验证亚精胺溶液对平阳霉素摇瓶发酵的影响以及筛选最佳前体添加方案。

2.2.3 含亚精胺植物药添加对平阳霉素的影响 本实验选取宁夏枸杞、黑枸杞、宁夏枸杞嫩芽、藏红花、薏米粉、枸杞芽茶、玉米浆等物质在发酵 0 h 以 7 g/L 剂量分别添加至 35 mL/250 mL 的发酵摇瓶中，筛选所得具有促进作用药物同时进行添加量(0、3、5、7、9、11、13、15 g/L)和添加频率实验(添加间隔为 12、24 h 以及添加天数分别为 1~5 d 的联合实验)，寻找提高平阳霉素发酵产率的物质。

2.2.4 含亚精胺植物药在罐发酵上对平阳霉素的影响 将上述实验中筛选出的对平阳霉素摇瓶发酵有效的物质加入 25 L 发酵罐中，通过等比例放大[时间间隔 24 h，添加量为 3 g/(L·次)，添加 3 次]以及添加量单项实验[9、18、27 g/(L·次)]，将筛选所得验证这些物质在发酵罐中对平阳霉素产率的影响。

2.3 分析检测方法

2.3.1 显微镜镜检^[16] 操作步骤：涂片→固定→染色→水洗→干燥→镜检。

2.3.2 pH 值的测定^[16] 直接取菌液，用精密数显示酸度计测量发酵液的 pH 值。

2.3.3 还原糖及总糖测定^[16] 取发酵液离心后取上清 1 mL，采用斐林滴定法测定发酵液中的还原糖

及总糖含量。

2.3.4 氨氮测定 [16] 取发酵液离心后取上清 0.5 mL, 利用甲醛滴定法测定发酵液中氨基氮和氨氮量的总和。

2.3.5 HPLC 测定 菌丝体草酸酸化至 pH 为 1.5~2.0, 静置 30 min, NaOH 固体回调至中性。取 1 mL 菌液于 1.5 mL EP 管中, 14 000 r/min 离心 5min, 取褐色上清 0.3 mL 加于 0.9 mL 甲醇当中, 混匀使蛋白杂质变性, 14 000 r/min 转速离心 5min, 取上清进行液相检测。HPLC 条件请参考《中国药典》2015 年版 [17]。

3 结果与分析

3.1 亚精胺对平阳霉素促进作用的验证

选择在发酵 0 h 时对发酵摇瓶添加剂量分别为 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mL 的无菌亚精胺溶液, 正常发酵后在放瓶时间取样, 检测平阳霉素效价。结果见图 4。

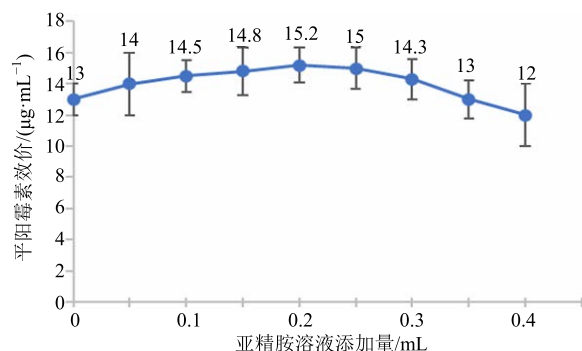


图 4 0 h 添加不同量亚精胺对平阳霉素效价的影响

Fig. 4 Effect of different amounts of spermidine on yield of PYM at 0 h

由图 4 可知, 在发酵时间为 0 h 时添加不同量的亚精胺溶液, 在添加 0.20 mL 时效价最高, 为 15.2 μg/mL, 提高了 16.9%, 验证添加适量亚精胺物质对平阳霉素发酵具有促进作用。

3.2 含前体物质的植物药添加对平阳霉素产率的影响

本实验采用宁夏枸杞、黑枸杞、宁夏枸杞嫩叶、宁夏枸杞嫩叶芽茶、红花、薏米这些含有前体物质的氮源, 在摇瓶中进行初步添加 7 g/L, 以确定其对平阳霉素产率影响。结果如图 5 所示, 宁夏枸杞、宁夏枸杞嫩叶对平阳霉素产率有明显影响, 其中宁夏枸杞嫩叶对平阳霉素产率影响最强, 因此选用宁夏枸杞嫩叶做不同起始添加时间对摇瓶中平阳霉素产率影响的实验。

选择起始添加量为 7 g/L, 添加次数为 1, 分别

在摇瓶发酵初始 0、6、12、18、24、30、36 h 时添加宁夏枸杞嫩叶, 正常发酵后在放瓶时间取样, 检测平阳霉素效价。结果见图 6。筛选得到最佳初始添加时间为发酵初始 24 h。

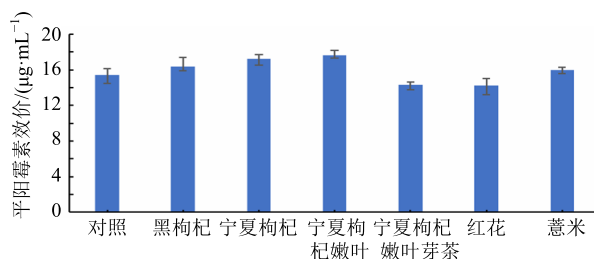


图 5 分别添加多种含亚精胺植物药后平阳霉素效价

Fig. 5 Effect of addition of various substances on yield of PYM

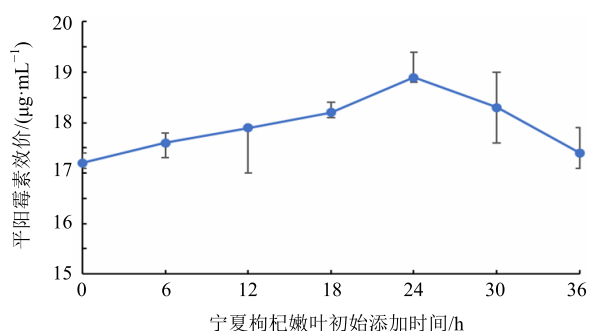


图 6 宁夏枸杞嫩叶初始添加时间对平阳霉素效价的影响

Fig. 6 Effect of initial addition time of *Lycium barbarum* bud on yield of PYM

上述实验均以单次添加宁夏枸杞嫩叶为基础, 在实际生产中, 适当量的宁夏枸杞嫩芽是平阳霉素持续合成的动力, 因此借鉴罐发酵的流加工艺, 针对摇瓶发酵, 本实验采取“少量多次”的实验方案, 进一步研究单次的不同添加量 (0、3、5、7、9、11、13、15 g/L) 的宁夏枸杞嫩芽添时间间隔和添加频率对平阳霉素效价的影响。具体实验方案见表 1, 结果见图 7。选择单次添加量为 9 g/L, 添加时间间隔为 24 h, 添加频率为 3 次时平阳霉素获得最高效价, 为 21.3 μg/mL, 较对照组效价提高了 38.3%, 因此选择宁夏枸杞嫩芽添加量为 9 g/L, 作为一种新的原材料和添加剂量运用到 25 L 罐发酵当中, 进行平阳霉素发酵实验。同上述探究实验所得摇瓶发酵中亚精胺最佳添加方案为时间间隔为 24 h, 添加量为 2.5 mL/(L·d), 添加 3 次。

本实验所采用的宁夏枸杞、黑枸杞、宁夏枸杞嫩叶、薏仁、红花均对平阳霉素的发酵具有一定的

表 1 不同量的宁夏枸杞嫩叶添加频率和添加时间间隔

Table 1 Effect of addition time and time intervals of different amounts of *Lycium barbarum* bud

组别	添加时间间隔/h	添加频率/次
1	24	1
2	24	2
3	24	3
4	24	4
5	24	5
6	12	2
7	12	4
8	12	6
9	12	8
10	12	10

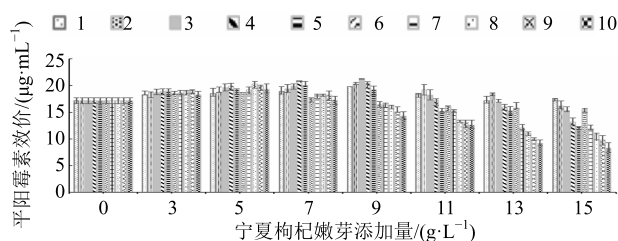


图 7 不同添加量的宁夏枸杞嫩芽中平阳霉素的效价

Fig. 7 Effect of *Lycium barbarum* bud with different dosages on yield of PYM

促进作用, 宁夏枸杞嫩叶芽茶对平阳霉素的发酵无促进作用, 而宁夏枸杞嫩叶的促进作用最强, 这与亚精胺的不稳定性质有关^[18], 且宁夏枸杞嫩芽中的亚精胺的生物选择性更强; 宁夏枸杞嫩芽最佳添加时间为发酵起始 24 h, 平阳霉素的效价随宁夏枸杞嫩芽添加量的增加呈先增后减趋势, 说明亚精胺对菌丝的初级代谢不利, 且平阳霉素合成途径存在反馈抑制, 此外宁夏枸杞嫩芽作为氮源或碳源成分加入, 碳氮源含量过剩也是 PYM 菌丝生长的限制因素。

3.3 宁夏枸杞嫩芽添加量在 25 L 发酵罐中的影响

本实验分别以不添加任何物质、添加亚精胺溶液 (时间间隔 24 h, 添加量为每次 2.5 mL/L, 添加 3 次)、添加宁夏枸杞嫩叶 (时间间隔 24 h, 添加量为每次 3 g/L, 添加 3 次) 进行 25 L 罐发酵实验, 发酵效价见图 8。

如图 8 所示, 宁夏枸杞嫩叶的添加在 25 L 平阳霉素罐发酵中, 在发酵 120 h 时其发酵最高效价可达 28.9 $\mu\text{g/mL}$, 较对照效价提高了 68.0%; 从发酵周期角度看, 其发酵周期可缩短至 120 h。添加亚精胺的罐发酵 120~132 h 时其发酵效价最高, 可达

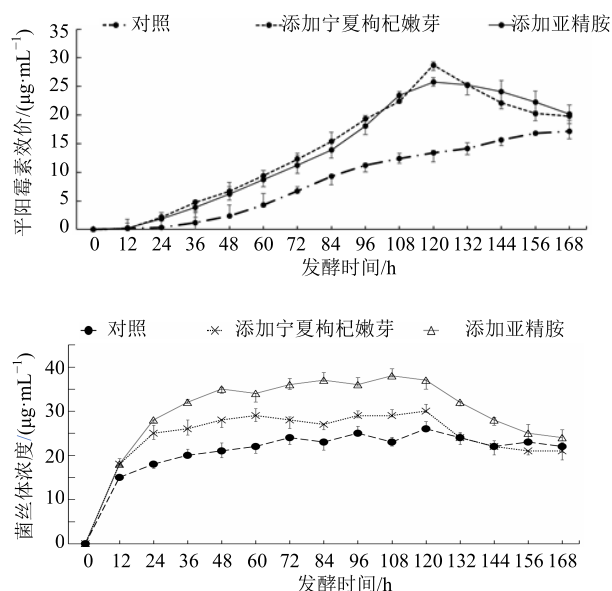


图 8 添加不同物质时平阳霉素效价

Fig. 8 Effect of adding different substances on yield of PYM

25.8 $\mu\text{g/mL}$, 效价提高 50.0%。对比两者的效价、发酵时间和生产成本, 均以宁夏枸杞嫩叶的添加占优势。宁夏枸杞嫩叶的添加对平阳霉素效价的提高效果明显, 分析原因可能是因其亚精胺含量较高, 对平阳霉素的促进作用较强。

以宁夏枸杞嫩叶为添加物质, 探究 25 L 罐中宁夏枸杞嫩叶不同添加量对平阳霉素效价的影响。如图 9 所示, 从 24 h 开始添加, 宁夏枸杞嫩叶分别以总添加量 27 g/L (添加量为每次 9 g/L, 时间间隔为 24 h, 添加 3 d)、54 g/L (添加量为每次 18 g/L, 时间间隔为 24 h, 添加 3 d)、81 g/L (添加量为每次 27 g/L, 时间间隔为 24 h, 添加 3 d) 在 25 L 罐中进行试验, 发现添加量为每次 18 g/L 时, 平阳霉素在 120 h 时效价最高, 可达 37.5 g/L, 较不添加宁夏枸

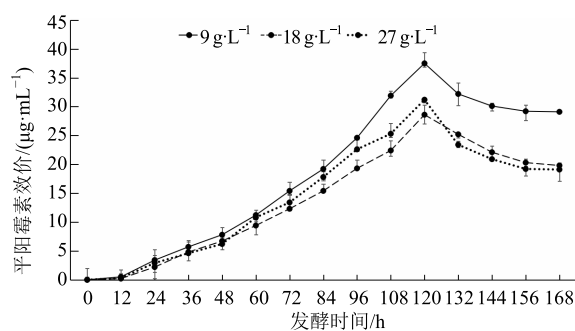


图 9 添加不同量的宁夏枸杞嫩叶时平阳霉素效价

Fig. 9 Effect of adding different amount of *Lycium barbarum* bud on yield of PYM

杞嫩叶效价提高 118.0%，较添加亚精胺效价提高 45.3%，符合生产需求。

宁夏枸杞嫩芽的添加在提高发酵效价的前提下，对菌丝体的生长也有促进作用。对照组在发酵 48 h 的时候菌浓为 21%，而添加组的菌浓为 35%。镜检观察发酵 48 h 的菌丝体，如图 10 所示，对照组菌丝体染色较深，菌丝粗壮，分支较多，菌丝内空泡较少；添加组的菌丝染色较深，菌丝较对照组细弱，分支较多，菌丝内空泡密集，说明添加组菌丝提前进入产抗期，这也与后期实验中发酵周期缩短相符合。产生该现象的主要原因不仅与宁夏枸杞嫩芽中的亚精胺成分有关，可能还与其他成分如枸杞多糖、甜菜碱以及其他微量元素的存在有关^[19]，此时宁夏枸杞嫩芽以碳源或氮源角色参与生物合成的其他途径。

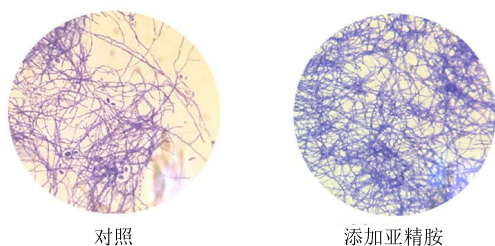


图 10 发酵起始 48 h 对照组和添加组的菌丝体镜检
Fig. 10 Mycelial microscopy images of control group and experimental group at beginning of fermentation for 48 h

3.4 宁夏枸杞嫩芽对平阳霉素杂质的影响

分别将对照组和实验组放罐后的发酵液预处理后进行 HPLC 检测，如图 11 所示，平阳霉素后期分离纯化工艺中的关键因素为其酸化物质和氧化物质的除杂^[20-21]。宁夏枸杞嫩芽的添加，能够有效降低其酸化物质的产量，为后期分离纯化提供便利条件。因此宁夏枸杞嫩芽中存在某种物质，该物质能够有效抑制平阳霉素在发酵生产过程中平阳霉素的酸化和氧化。

4 讨论

本研究将植物药和生物发酵相结合，引入含有亚精胺的植物药物，主要目的是在保证平阳霉素效价的同时能够有效降低发酵成本，而宁夏枸杞嫩芽作为一种四季均可采用的植物，其种植成本低，来源广泛，成本低廉，符合工艺要求。此外，平阳霉素作为一种国内广泛适用于皮肤癌、淋巴瘤的“救命药”，由于效价低下而面临停产危机，本研究中能将平阳霉素效价提高 118.0%，符合市场需求。相比

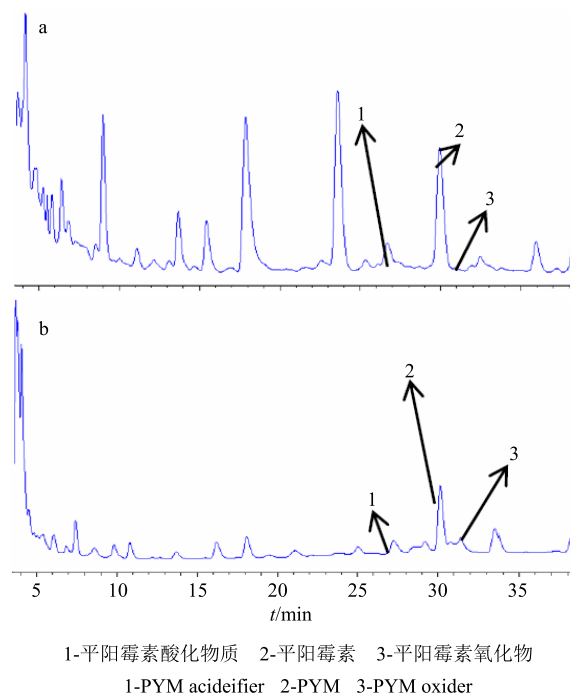


图 11 实验组 (a) 和对照组 (b) 发酵液 HPLC 检测
Fig. 11 HPLC detection of fermentation broth in experimental group (a) and control group (b)

较于亚精胺的直接添加，不仅能从成本角度优化发酵流程，也符合我国“绿色环保”的生产要求。

参考文献

- [1] Zheng F F, Chen H D, Chen Y F, *et al.* Comparative analysis of ADR on China's national essential medicines list (2015 edition) and WHO model list of essential medicines (19th edition) [J]. *Biol Med Res Inter*, 2018, 2018: 1-4.
- [2] Berry D E, Chang L H, Hecht S M. DNA damage and growth inhibition in cultured human cells by bleomycin congeners [J]. *Biochemistry*, 1985, 24(13): 3207-3214.
- [3] 赵克健. 抗癌新药平阳霉素简介 [J]. *新医学*, 1982(1): 52-53.
- [4] 争光霉素总结鉴定会在津举行 [J]. *中国药学杂志*, 1979(2): 59.
- [5] Aouida M, Pagé N, Leduc A, *et al.* A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(3): 1102-1109.
- [6] He Y L, Lan Y, Liu Y, *et al.* Pingyangmycin and bleomycin share the same cytotoxicity pathway [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 862.
- [7] Xu Z D, Wang M, Xiao S L, *et al.* Synthesis, biological evaluation and DNA binding properties of novel bleomycin analogues [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(15): 2595-2599.

- [8] Xu Z D, Wang M, Xiao S L, *et al.* Novel peptide derivatives of bleomycin A5: Synthesis, antitumor activity and interaction with DNA [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(18): 3996-3999.
- [9] Brosseau N, Andreev E, Ramotar D. Complementation of the yeast model system reveals that *caenorhabditis elegans* OCT-1 is a functional transporter of anthracyclines [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133182.
- [10] 虞 惺, 许永寿, 李妙儿. 平阳霉素发酵中若干问题的探讨 [J]. 中国抗生素杂志, 1979(3): 9-16.
- [11] Shen B, Du L, Sanchez C, *et al.* Bleomycin biosynthesis in *Streptomyces verticillus* ATCC15003: A model of hybrid peptide and polyketide biosynthesis [J]. *Bioorg Chem*, 1999, 27(2): 155-171.
- [12] 张 宁. 中药中生物胺类成分及氨基酸的衍生化分析 [D]. 西安: 西北大学, 2014.
- [13] 赵 硕, 幸岑璨, 王 艳, 等. 植物中亚精胺类物质的化学结构及生理活性研究进展 [J]. 核农学报, 2018, 32(1): 123-130.
- [14] 吕海洋. 枸杞多酚的结构鉴定及抗氧化活性评价 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [15] 虞 惺. 博莱霉素生物合成研究进展 [J]. 国外医药: 抗生素分册, 1981(4): 32-42.
- [16] 汪玉真. 去甲金霉素菌种选育及发酵工艺研究 [D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2017.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [18] 赵 硕, 幸岑璨, 王 艳, 等. 植物中亚精胺类物质的化学结构及生理活性研究进展 [J]. 核农学报, 2018, 32(1): 123-130.
- [19] 王娅丽, 刘思洋, 邵千顺, 等. 宁杞 9 号枸杞叶芽营养成分分析 [J]. 经济林研究, 2015(4): 106-110.
- [20] Cai Y, Sun R, Wang R, *et al.* The activation of Akt/mTOR pathway by bleomycin in epithelial-to-mesenchymal transition of human submandibular gland cells: A treatment mechanism of bleomycin for mucocoeles of the salivary glands [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 109-115.
- [21] Fiedler H P, Wachter J. High-performance liquid chromatographic determination of bleomycins [J]. *J Chromatogr*, 1991, 536(1/2): 343-347.