

海绵共附生链霉菌 *Streptomyces parvulus* 162432 次级代谢产物研究

陈瑞强¹, 罗祥超², 林厚文^{1,2*}, 焦伟华^{2*}

1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2. 癌基因与相关基因国家重点实验室海洋药物研究中心, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127

摘要: 目的 研究海绵共附生链霉菌 *Streptomyces parvulus* 162432 的化学成分。方法 采用十八烷基硅烷键合硅胶填料 (ODS) 中压柱色谱和半制备高效液相色谱等技术进行分离纯化, 得到的单体化合物采用 HR-ESI-MS、NMR 以及文献比对等方法进行鉴定, 新化合物的绝对构型通过计算 NMR 和圆二色谱 (ECD) 确定。结果 从菌株 *Streptomyces parvulus* 162432 中分离纯化得到 9 个环二肽类化合物, 包括 1 个新化合物链霉菌二肽 A (1) 和 8 个已知化合物: 环-(D-顺式-羟脯氨酸-L-苯丙氨酸) (2)、环-(D-脯氨酸-D-苯丙氨酸) (3)、环-(L-羟脯氨酸-L-亮氨酸) (4)、环-(L-羟脯氨酸-D-亮氨酸) (5)、环-(D-脯氨酸-L-亮氨酸) (6)、环-(L-脯氨酸-D-亮氨酸) (7)、环-(D-脯氨酸-L-异亮氨酸) (8)、环-(L-亮氨酸-D-缬氨酸) (9)。对分离得到的化合物 1~9 进行肿瘤细胞增殖细胞毒和抗菌活性评价, 活性结果显示, 化合物 1~9 在 10 $\mu\text{g/mL}$ 下对肿瘤细胞增殖均未显示出明显的细胞毒活性; 化合物 9 对苏云金芽孢杆菌显示抑菌活性, 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 25 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 化合物 1 为新化合物, 化合物 2 和 4~9 为首次从链霉菌 *Streptomyces parvulus* 中分离得到, 化合物 9 具有一定的抗菌活性。

关键词: 海绵; 链霉菌 *Streptomyces parvulus* 162432; 链霉菌二肽 A; 环-(L-亮氨酸-D-缬氨酸); 海洋天然产物; 抗菌活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4104-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.003

Secondary metabolites of a marine sponge associated *Streptomyces parvulus* 162432

CHEN Rui-qiang¹, LUO Xiang-chao², LIN Hou-wen^{1,2}, JIAO Wei-hua²

1. College of Food, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. Research Center for Marine Drugs, State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Abstract: Objective To reveal the secondary metabolites of a marine sponge associated *Streptomyces parvulus* 162432. **Methods** The organic extract and fractions were separated and purified by octadecylsilyl silica (ODS) medium-pressure column chromatography (MPLC) and semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). The obtained purified compounds were identified by high-resolution-electrospray-mass spectrometry (HR-ESI-MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and literature data comparison. The absolute configuration of new compound was determined by NMR and electrostatic circular dichroism (ECD) calculations. **Results** Nine compounds were isolated from *S. parvulus* 162432, including one new compound streptomyces dipeptide A (1) and eight known compounds: cyclo-(D-cis-Hyp-L-Phe) (2), cyclo-(D-Pro-D-Phe) (3), cyclo-(L-Hyp-L-Leu) (4), cyclo-(L-Hyp-D-Leu) (5), cyclo-(D-Pro-L-Leu) (6), cyclo-(L-Pro-D-Leu) (7), cyclo-(D-Pro-L-Ile) (8), cyclo-(L-Leu-D-Val) (9). The cytotoxicity on tumor cell proliferation and antibacterial activities of the isolated compounds 1—9 were evaluated. None of compounds 1—9 showed significant cytotoxic activity on tumor cell proliferation at the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$; compound 9 showed antibacterial activity against *Bacillus thuringiensis* with the minimal inhibitory concentration (MIC) value of 25 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, compound 2 and 4—9 are isolated from *S. parvulus* for the first

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2804100); 国家自然科学基金项目 (22137006); 国家自然科学基金项目 (82022068)

作者简介: 陈瑞强, 硕士研究生, 从事海洋天然产物研究。E-mail: 2823468021@qq.com

*通信作者: 林厚文, 教授, 博士生导师, 研究方向为海洋药物。E-mail: Franklin67@126.com Tel: (021)68383346

焦伟华, 研究员, 博士生导师, 研究方向为海洋药源分子的结构与功能。E-mail: weihuajiao@hotmail.com Tel: (021)68383339

time. Compound **9** showed antibacterial activity against *B. thuringiensis*.

Key words: marine sponge; *Streptomyces parvulus* 162432; streptomyces dipeptide A; cyclo-(*L*-Leu-*D*-Val); marine natural product; antibacterial activity

近年来, 新型致病菌以及耐药菌株的不断出现引起了药学家们的关注, 迫切需要发掘更多的天然活性产物来应对当今所面临的困局^[1-3]。海洋放线菌因其次级代谢产物具有丰富的化学多样性和良好的生物活性而受到人们的广泛关注^[4]。链霉菌为放线菌中物种最多、分布范围最广且形态特征最为典型的一类菌属, 产生了大量生物碱、大环内酯、萜、聚酮及肽等类化合物^[5-8], 部分化合物表现出抗菌、细胞毒等活性, 广泛应用于医疗健康、食品、农业等领域。本课题组前期从西沙群岛采集的海洋海绵 *Phyllospongia foliascens* 的样本中分离得到一株链霉菌, 经鉴定为 *Streptomyces parvulus* 系列, 命名为 *Streptomyces parvulus* 162432。本研究对该菌采用大米固体发酵, 对发酵产物的化学成分进行分离鉴定, 综合利用 ODS 中压色谱柱和半制备高效液相色谱等分离手段, 从醋酸乙酯层分离得到 9 个环

二肽类化合物, 分别为链霉菌二肽 A (streptomyces dipeptide A, **1**)、环-(*D*-顺式-羟脯氨酸-*L*-苯丙氨酸) [cyclo-(*D*-cis-Hyp-*L*-Phe), **2**]、环-(*D*-脯氨酸-*D*-苯丙氨酸) [cyclo-(*D*-Pro-*D*-Phe), **3**]、环-(*L*-羟脯氨酸-*L*-亮氨酸) [cyclo-(*L*-Hyp-*L*-Leu), **4**]、环-(*L*-羟脯氨酸-*D*-亮氨酸) [cyclo-(*L*-Hyp-*D*-Leu), **5**]、环-(*D*-脯氨酸-*L*-亮氨酸) [cyclo-(*D*-Pro-*L*-Leu), **6**]、环-(*L*-脯氨酸-*D*-亮氨酸) [cyclo-(*L*-Pro-*D*-Leu), **7**]、环-(*D*-脯氨酸-*L*-异亮氨酸) [cyclo-(*D*-Pro-*L*-Ile), **8**]、环-(*L*-亮氨酸-*D*-缬氨酸) [cyclo-(*L*-Leu-*D*-Val), **9**], 结构见图 1。已知化合物的结构由 NMR 数据及相关文献比对确定, 化合物 **2** 和 **4**~**9** 为首次从链霉菌 *Streptomyces parvulus* 中分离得到; 新化合物 (**1**) 的平面结构通过 NMR、HR-ESI-MS 数据确定, 立体构型通过 DP4+ 分析以及计算 ECD 确定。同时对分离得到的化合物评价了其细胞毒性和抗菌活性。

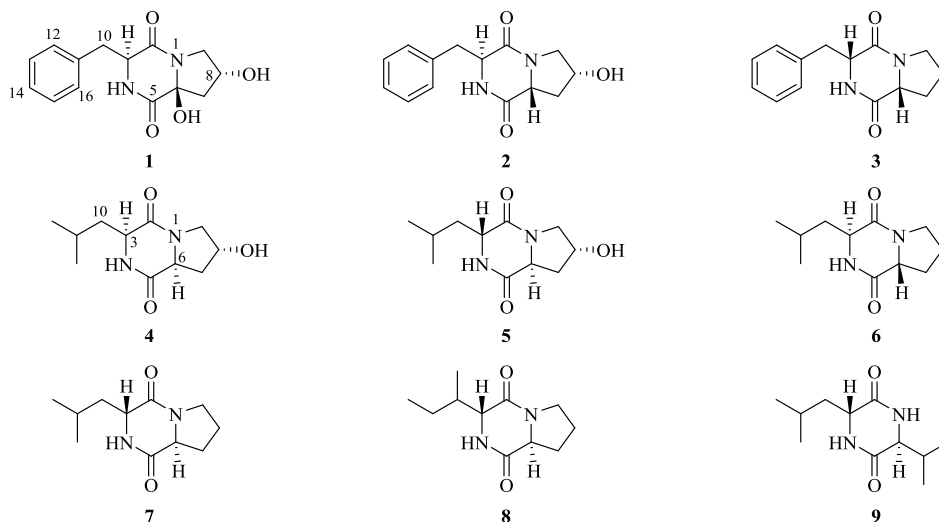


图 1 化合物 1~9 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—9

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Waters 1525/2996 型半制备高效液相色谱 (Waters 公司, 美国); Bruker AVANCE-600 MHz 核磁共振仪; Interchim puriflash 450 instruments 中压色谱仪 (Interchim 公司, 法国); JASCO P-2000 型旋光仪 (JASCO 公司, 日本); JASCO FT/IR-4100 型分光光度计 (JASCO 公司, 日本); 半制备色

柱为 YMC-Pack Pro C₁₈ RS (250 mm×10 m, 5 μm, YMC 公司, 日本); 柱色谱硅胶 (200~300、300~400 目, 山东青岛海洋化工有限公司); Waters Xevo G2-XS Q-ToF、Waters Q-ToF micro YA019 液质联用仪 (Waters 公司, 美国); 分析级甲醇和乙腈、二氯甲烷 (上海凌峰化学试剂有限公司); 色谱级甲醇和乙腈 (Merck 公司, 德国)。万古霉素 (Adamas, 批号 22961A)。

1.2 菌株来源

链霉菌 *Streptomyces parvulus* 162432 是 2013 年分离自西沙群岛采集的海绵 *Phyllospongia foliascens*, 由生工生物工程股份有限公司经分子生物学方法确定其种属^[9], 样本存放于上海交通大学附属仁济医院的癌基因与相关基因国家重点实验室海洋药物研究中心。

1.3 细胞

人神经胶质母细胞瘤 U343、人急性粒细胞 HL-60、人急性早幼粒细胞 NB4、人组织细胞淋巴瘤细胞 U937 均来自 ATCC 细胞库。

2 方法

2.1 发酵培养

2.1.1 菌株培养基 菌株活化 ISP-2 培养基: 葡萄糖 4 g、酵母提取物 4 g、麦芽提取物 10 g、海盐 17.5 g、去离子水 1 L、pH 为 7.0~7.2。大米发酵培养基: 海盐 17 g、大米 105 g、加水定容至 200 mL。

2.1.2 菌株发酵 将菌株链霉菌 *Streptomyces parvulus* 162432 从 -80 °C 冰箱保藏的甘油管中取出, 接种到 ISP-2 琼脂培养基上, 置于 30 °C 恒温培养箱中培养 4~7 d。挑取单菌落将其接种到 ISP-2 琼脂培养基中复壮, 培养 3 d 后, 将 1/2 的平板切成小块 (1 cm×1 cm) 接种于大米培养基内 (200 mL 培养基/2 L 锥形瓶), 静置常温 (25 °C) 培养 6 周。共发酵 60 瓶。

2.2 提取与分离

将大米发酵物用甲醇 (800 mL/瓶) 渗漉提取, 提取液减压浓缩蒸干获得 10.2 g 粗浸膏。将粗浸膏悬浮于 2 L 的水中, 用等体积的醋酸乙酯萃取 5 次, 获得醋酸乙酯萃取物 (1.3 g), 经 ODS 中压柱色谱, 乙腈-水 (5%→100%, 450 min) 梯度洗脱获得 10 个流分 (Fr. 1~10)。流分 Fr. 5 (308.4 mg) 经过半制备 HPLC (甲醇-水 13:87) 纯化, 得到化合物 **1** (2.3 mg, $t_R=40$ min)、**2** (6.4 mg, $t_R=23$ min) 和 **3** (4.8 mg, $t_R=35$ min); 流分 Fr. 6 (68.3 mg) 经过半制备 HPLC (甲醇-水 20:80) 纯化, 得到化合物 **4** (5.6 mg, $t_R=25$ min)、**5** (3.8 mg, $t_R=34$ min)、**6** (4.7 mg, $t_R=20$ min) 以及 **7** (2.4 mg, $t_R=40$ min); 流分 Fr. 7 (125.8 mg) 经过半制备 HPLC (甲醇-水 25:75) 纯化, 得到化合物 **8** (3.3 mg, $t_R=28$ min) 和 **9** (6.2 mg, $t_R=34$ min)。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状物, 易溶于甲醇。 $[\alpha]_D^{20}-48.2$ (c 0.1, CH₃OH)。HR-ESI-MS 给出 m/z 277.119 0

$[M+H]^+$ (C₁₄H₁₆N₂O₄, 理论值为 277.118 3), 有 8 个不饱和度。IR 光谱图显示有 1 662.8、3 260.0 cm⁻¹ 的吸收, 推测该化合物含有羰基及氨基或羟基。

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) 显示出 16 个质子信号: 5 个芳香质子重叠信号 H-12、H-15、H-16 (δ_H 7.26, 3H, d, $J=7.3$ Hz) 和 H-13、H-14 (δ_H 7.33, 2H, d, $J=7.3$ Hz); 4 个质子所在的碳是连接有氧或氮, 分别是 H-3 (δ_H 4.04, 1H, dd, $J=10.0, 4.7$ Hz)、H-8 (δ_H 4.63, 1H, m)、H-9a (δ_H 3.58, 1H, dd, $J=12.1, 4.4$ Hz) 和 H-9b (δ_H 3.78, 1H, dd, $J=12.1, 6.3$ Hz); 还有 2 个亚甲基质子信号 H-7a (δ_H 2.41, 1H, dd, $J=14.0, 6.3$ Hz), H-7b (δ_H 2.48, 1H, dd, $J=14.0, 6.1$ Hz) 和 H-10a (δ_H 3.26, 1H, dd, $J=13.3, 10.1$ Hz), H-10b (δ_H 3.20, 1H, dd, $J=13.4, 4.7$ Hz)。

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) 和 DEPT 谱显示该化合物含有 14 个碳: 4 个季碳, 包含 2 个羰基碳 C-2 (δ_C 170.0) 和 C-5 (δ_C 170.2), 1 个 sp² 杂化的季碳 C-11 (δ_C 138.6), 1 个 sp³ 杂化的季碳 C-6 (δ_C 88.6); 7 个次甲基信号, 其中 C-12/16 (δ_C 130.9)、C-13/15 (δ_C 130.0) 和 C-14 (δ_C 128.3) 为 sp² 杂化, C-3 (δ_C 60.8) 和 C-8 (δ_C 68.4) 为 sp³ 杂化; 3 个亚甲基 C-7 (δ_C 46.8)、C-9 (δ_C 54.0) 和 C-10 (δ_C 42.8)。该化合物的核磁谱图和环二肽类化合物的核磁谱图极其相似^[10]。¹H-¹H COSY 谱图的 H-12/H-13/H-14/H-15/H-16 相关结合在 HMBC 谱图中的 H₂-10 与 C-2、C-12、C-11、C-16 相关, 确定了单取代苯环的存在。进一步通过 H-3/H-10 的 COSY 相关以及 (H₂-10, H-3)/C-2 的 HMBC 相关推导出该化合物中含有苯丙氨酸残基; ¹H-¹H COSY 谱图的 H-7/H-8/H-9 相关结合在 HMBC 谱图中的 H₂-7 与 C-5 相关, H-8 与 C-6 相关, H₂-9 与 C-2 相关推导出该化合物含有脯氨酸残基^[10]。值得注意的是, 该化合物 C-6 (δ_C 88.6) 和 C-8 (δ_C 68.4) 化学位移明显增加, 推测其 H-6 和 H-8 被羟基取代, 随后通过 HR-ESI-MS 进一步确定了推测, 确定了化合物 **1** 的平面结构 (图 2)。对化合物 **1** 的数据归属 (表 1)。该化合物有 3 个手性中心, 无法通过 ROESY 谱图确定该化合物的相对构型, 因此通过计算 4 种相对构型的 NMR 数据, 分别是 3R*, 6R*, 8R*, 3R*, 6R*, 8S*, 3R*, 6S*, 8R*, 3R*, 6S*, 8S*, 基于 NMR 数据拟合 DP4+ 分析 (99.99%), 确定化合物的相对构型为 3R*, 6R*, 8S* (图 3)。随后用 ECD 计算 2 个对映异构体 (3R, 6R, 8S、3S, 6S, 8R), 计算值和实验值曲线模

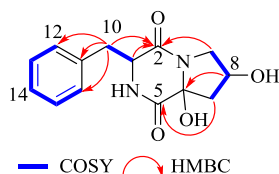


图 2 化合物 1 的 COSY 和 HMBC 相关

Fig. 2 Key COSY and HMBC correlations of compound 1

表 1 化合物 1 的一维和二维数据 NMR 谱图 (600/150 MHz, CD₃OD)

Table 1 1D and 2D NMR data for compound 1 (600/150 MHz, CD₃OD)

碳位	δ_C , type	δ_H	COSY	HMBC (H→C)	ROESY
2	170.2, C				
3	60.8, CH	4.04 (dd, $J = 4.7, 10.0$ Hz)	H-10	C-2, 10, 11	H-10
5	170.0, C				
6	88.6, C				
7	46.8, CH ₂	2.48 (dd, $J = 14.0, 6.1$ Hz) 2.41 (dd, $J = 14.0, 6.3$ Hz)	H-8	C-5, 6, 8, 9	
8	68.4, CH	4.63 (m)	H-7, 9	C-6, 9	H-7, 9
9	54.0, CH ₂	3.58 (dd, $J = 12.1, 6.3$ Hz) 3.78 (dd, $J = 12.1, 4.4$ Hz)	H-8	C-2, 6, 7, 8	
10	42.8, CH ₂	3.26 (dd, $J = 13.3, 10.1$ Hz) 3.20 (dd, $J = 13.4, 4.7$ Hz)	H-3	C-2, 3, 11, 12	
11	138.6, C				
12	130.9, CH	7.26 (d, $J = 7.3$ Hz)	H-13		H-3
13	130.0, CH	7.33 (t, $J = 7.3$ Hz)	H-12, 14		
14	128.3, CH	7.26 (d, $J = 7.3$ Hz)	H-13		H-3
15	130.0, CH	7.33 (t, $J = 7.3$ Hz)	H-14, 16		
16	130.9, CH	7.26 (d, $J = 7.3$ Hz)	H-15		H-3

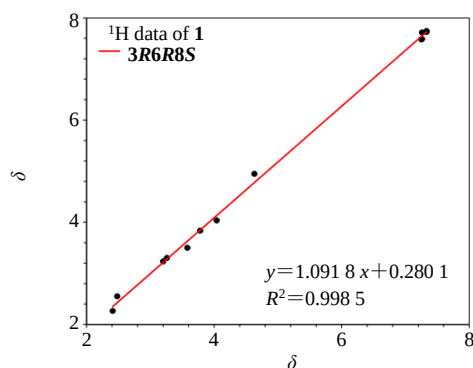
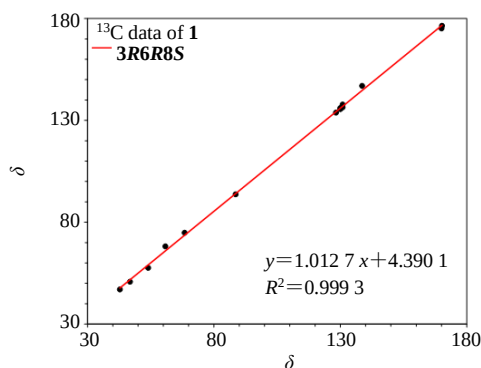


图 3 化合物 1 的实验和计算 NMR 数据的拟合线

Fig. 3 Fitting lines of experimental and calculated NMR data of compound 1

(1H, dd, $J = 13.7, 5.1$ Hz, H-10a), 3.01 (1H, dd, $J = 13.7, 4.8$ Hz, H-10b), 7.19 (2H, m, H-12, 16), 7.33~7.28 (3H, m, H-13~15); ¹³C-NMR (150 MHz,

拟 (图 4), 最后确定化合物的立体构型为 3*S*, 6*S*, 8*R*。

化合物 2: 无色油状物, $[\alpha]_D^{20} + 28$ (c 0.1, CH₃OH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 4.22 (2H, m, H-3, 8), 2.80 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H-6), 2.24 (1H, m, H-7a), 1.96 (1H, dd, $J = 13.7, 4.8$ Hz, H-10b), 7.19 (2H, m, H-12), 1.98 (1H, m, H-7b), 3.60 (1H, dd, $J = 12.4, 3.9$ Hz, H-9a), 3.34~3.24 (1H, m, H-9b), 3.19

CD₃OD) δ : 168.0 (C, C-2), 59.9 (CH, C-3), 171.3 (C, C-5), 57.5 (CH, C-6), 38.3 (CH₂, C-7), 68.8 (CH, C-8), 54.3 (CH₂, C-9), 41.2 (CH₂, C-10), 137.1 (C, C-11),

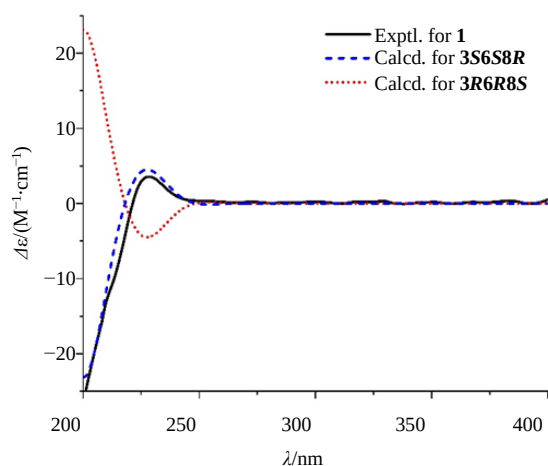


图 4 化合物 1 的实测 ECD 和计算 ECD

Fig. 4 Experimental and calculated ECD spectra for compound 1

131.5 (CH, C-12, 16), 130.0 (CH, C-13, 15), 128.8 (CH, H-14)。以上谱学数据与文献报道一致^[11], 故确定该化合物为环-(D-顺式-羟脯氨酸-L-苯丙氨酸)二肽。

化合物 3: 棕黄色油状物, $[\alpha]_D^{20} + 65$ (c 0.1, CH₃OH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 3.50 (1H, m, H-3), 4.16 (1H, m, H-6), 2.00 (1H, m, H-7a), 1.86 (1H, m, H-7b), 1.62 (2H, m, H-8), 3.27 (1H, m, H-9a), 2.58 (1H, m, H-9b), 3.15 (1H, dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, H-10a), 3.00 (1H, dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, H-10b), 7.15 (2H, m, H-12, 16), 7.26 (3H, m, H-13~15); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 171.6 (C, C-2), 59.4 (CH, C-3), 167.7 (C, C-5), 60.0 (CH, C-6), 30.1 (CH₂, C-7), 22.8 (CH₂, C-8), 46.4 (CH₂, C-9), 41.3 (CH₂, C-10), 137.0 (C, C-11), 129.9 (CH, C-12, 16), 131.5 (CH, C-13, 15), 128.8 (CH, C-14)。以上谱学数据与文献报道一致^[12], 故确定该化合物为环-(D-脯氨酸-D-苯丙氨酸)二肽。

化合物 4: 黄色结晶, $[\alpha]_D^{20} - 81$ (c 0.15, CH₃OH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 4.17 (1H, m, H-3), 4.46 (1H, t, $J = 4.2$ Hz, H-6), 2.09 (1H, m, H-7a), 2.27 (1H, dd, $J = 6.0, 13.2$ Hz, H-7b), 4.52 (1H, dd, $J = 6.6, 10.2$ Hz, H-8), 3.43 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-9a), 3.66 (1H, dd, $J = 4.8, 13.2$ Hz, H-9b), 1.51 (1H, m, H-10a), 1.91 (2H, m, H-10b, 11), 0.96 (6H, dd, $J = 3.0, 6.0$ Hz, H-12, 13); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 169.3 (C, C-2), 54.9 (CH, C-3), 173.3 (C, C-5), 59.0 (CH, C-6), 38.5 (CH₂, C-7), 69.4 (CH, C-8), 55.5 (CH₂, C-9),

39.7 (CH₂, C-10), 26.1 (CH, C-11), 22.5 (CH₃, C-12), 23.6 (CH₃, C-13)。以上谱学数据与文献报道一致^[13], 故确定该化合物为环-(L-羟脯氨酸-L-亮氨酸)二肽。

化合物 5: 无色结晶 (甲醇), $[\alpha]_D^{20} + 37$ (c 0.34, CH₃OH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 3.87 (1H, dd, $J = 5.4, 9.0$ Hz, H-3), 4.35 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-6), 2.23 (1H, m, H-7a), 2.49 (1H, m, H-7b), 4.42 (1H, m, H-8), 3.67 (1H, m, H-9a), 3.45 (1H, m, H-9b), 1.58 (2H, m, H-10), 1.78 (1H, m, H-11), 0.97 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12), 1.00 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 169.7 (C, C-2), 57.2 (CH, C-3), 171.5 (C, C-5), 57.8 (CH, C-6), 38.0 (CH₂, C-7), 69.1 (CH, C-8), 54.6 (CH₂, C-9), 43.7 (CH₂, C-10), 25.9 (CH, C-11), 22.3 (CH₃, C-12), 23.6 (CH₃, C-13)。以上谱学数据与文献报道一致^[13], 故确定该化合物为环-(L-羟脯氨酸-D-亮氨酸)二肽。

化合物 6: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20} + 42.7$ (c 0.1, CH₃OH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 3.85 (1H, dd, $J = 5.4, 9.6$ Hz, H-3), 4.26 (1H, m, H-6), 1.93 (2H, m, H-7), 2.02 (1H, m, H-8a), 2.34 (1H, m, H-8b), 3.50 (1H, m, H-9a), 3.58 (1H, m, H-9b), 1.78 (1H, m, H-10a), 1.68 (1H, m, H-10b), 1.57 (1H, m, H-11), 0.97 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12), 1.00 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 171.9 (C, C-2), 57.2 (CH, C-3), 169.2 (C, C-5), 59.6 (CH, C-6), 30.1 (CH₂, C-7), 23.4 (CH₂, C-8), 44.0 (CH₂, C-9), 46.9 (CH₂, C-10), 25.8 (CH, C-11), 22.1 (CH₃, C-12), 23.4 (CH₃, C-13)。以上谱学数据与文献报道一致^[14], 故确定该化合物为环-(D-脯氨酸-L-亮氨酸)二肽。

化合物 7: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20} - 94$ (c 0.1, CH₃OH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 4.26 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-3), 4.13 (1H, m, H-6), 2.30 (1H, m, H-7a), 2.03 (4H, m, H-7b, 8a, 10a, 11), 1.89 (1H, m, H-8b), 3.51 (2H, m, H-9), 1.52 (1H, m, H-10b), 0.96 (6H, dd, $J = 3.6, 6.0$ Hz, H-12, 13); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 173.1 (C, C-2), 54.9 (CH, C-3), 169.2 (C, C-5), 60.6 (CH, C-6), 29.4 (CH₂, C-7), 23.9 (CH₂, C-8), 46.7 (CH₂, C-9), 39.7 (CH₂, C-10), 26.4 (CH, C-11), 23.6 (CH₃, C-12), 22.5 (CH₃, C-13)。以上谱学数据与文献报道一致^[15], 故确定该化合物为环-(L-脯氨酸-D-亮氨酸)二肽。

化合物 8: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20} + 68$ (c 0.1, CH₃OH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 3.68 (1H, d, $J = 6.6$

Hz, H-3), 4.24 (1H, dd, $J = 10.2, 6.6$ Hz, H-6), 2.35 (1H, m, H-7a), 1.90 (3H, m, H-7b, 8), 3.49 (1H, m, H-9a), 3.62 (1H, m, H-9b), 2.02 (1H, m, H-10), 1.61 (1H, m, H-11a), 1.23 (1H, m, H-11b), 0.96 (3H, t, $J = 5.2$ Hz, H-12), 1.01 (3H, d, $J = 4.4$ Hz, H-13); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 168.2 (C, C-2), 60.0 (CH, C-3), 171.9 (C, C-5), 63.8 (CH, C-6), 30.6 (CH_2 , C-7), 23.2 (CH_2 , C-8), 47.0 (CH_2 , C-9), 41.3 (CH, C-10), 26.4 (CH_2 , C-11), 11.9 (CH_3 , C-12), 16.0 (CH_3 , C-13)。以上谱学数据与文献中报道的一致^[16], 故确定该化合物为环-(*D*-脯氨酸-*L*-异亮氨酸)二肽。

化合物 9: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20} + 4$ (c 0.1, CH_3OH); ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.98 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-3), 3.82 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-6), 2.32 (1H, m, H-7), 1.05 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-8), 0.95 (9H, d, $J = 6.6$ Hz, H-9, 12, 13), 1.73 (2H, m, H-10), 1.85 (1H, m, H-11); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 171.9 (C, C-2), 61.6 (CH, C-3), 170.5 (C, C-5), 54.5 (CH, C-6), 33.9 (CH, C-7), 19.1 (CH_3 , C-8), 17.3 (CH_3 , C-9), 43.4 (CH_2 , C-10), 25.5 (CH, C-11), 23.6 (CH_3 , C-12), 22.8 (CH_3 , C-13)。以上谱学数据与文献报道一致^[17], 故确定该化合物为环-(*L*-亮氨酸-*D*-缬氨酸)二肽。

3.2 细胞毒和抗菌活性筛选及结果

3.2.1 细胞毒活性 采用 CCK8 法^[18]检测全部化合物对 U343 细胞、HL-60 细胞、NB4 细胞、U937 细胞的肿瘤增殖抑制活性。首先, 在 96 孔板中配制 100 μL 的细胞悬液, 将细胞 U343 贴壁处理并将其培养板放入培养箱中预培养 24 h (37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2), 而悬浮细胞 (HL-60、NB4、U937) 不用预培养, 随后向培养板加入 10 μL 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的待测化合物, 将其放在培养箱培养 48 h 后, 再向每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 最后将培养板在培养箱内培养 1~4 h 后, 通过酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度 (A), 重复实验 3 次, 每组设定 3 个复孔。按照公式计算抑制率, 结果在 10 $\mu\text{mol/L}$ 下, 化合物均未显示明显的细胞毒活性。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_0 - A_{\text{空白}})$$

$A_{\text{给药}}$ 为具有细胞、CCK8 溶液和药物溶液的孔的 A ; $A_{\text{空白}}$ 为具有培养基和 CCK8 溶液而没有细胞的孔的 A ; A_0 为具有细胞、CCK8 溶液而没有药物溶液的孔的 A

3.2.2 抗菌活性 用 DMSO 将待测样品溶解, 并分别配制成 50、25、20、15 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度, 备用。苏云金芽孢杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

(MRSA) 和表皮金黄色葡萄球菌接种于 TSB 培养基, 在 37 $^\circ\text{C}$ 过夜。挑取单菌落接种于液体培养基 TSB, 在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下过夜培养。取 190 μL TSB 培养基、1 μL 菌液、10 μL 待测化合物于 96 孔板, 并以万古霉素 (Vancomycin) 作为阳性对照, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h (微量肉汤稀释法)^[19]。实验结果表明, 在浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 下, 化合物 9 对苏云金芽孢杆菌显示抗菌活性。

4 讨论

本研究从海绵 *Phyllospongia foliascens* 的共生链霉菌 *Streptomyces parvulus* 162432 的发酵产物分离得到 9 个二酮哌嗪类化合物, 其中化合物 1 为新化合物, 化合物 2 和 4~9 均是首次从该种中分离得到。所分得的化合物在 10 $\mu\text{g/mL}$ 下对上述肿瘤细胞增殖均未显示出明显的细胞毒活性; 化合物 9 对苏云金芽孢杆菌显示出抗菌活性, 最小抑菌浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 。该研究提示海绵共生链霉菌是活性天然产物发现的一个新来源, 具有重要的研究价值和广阔的开发前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Vu H N T, Nguyen D T, Nguyen H Q, et al. Antimicrobial and cytotoxic properties of bioactive metabolites produced by *Streptomyces cavourensis* YBQ59 isolated from *Cinnamomum cassia* prels in yen Bai Province of Vietnam [J]. *Curr Microbiol*, 2018, 75(10): 1247-1255.
- [2] Wu C S, Zacchetti B, Ram A F J, et al. Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus-Streptomyces* co-cultivation and biotransformation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10868.
- [3] Zhen X, Gong T, Liu F, et al. A new analogue of echinomycin and a new cyclic dipeptide from a marine-derived *Streptomyces* sp. LS298 [J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(11): 6947-6961.
- [4] Genilloud O. Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(10): 1203-1232.
- [5] Zhang S Y. Morindolestatin, naturally occurring dehydromorpholinocarbazole alkaloid from soil-derived bacterium of the genus *Streptomyces* [J]. *Org Lett*, 2020, 22(3): 1113-1116.
- [6] Sun J D, Zhao G X, O'Connor R D, et al. Vertirhodins A-F, C-linked pyrrolidine-iminosugar-containing pyranonaphthoquinones from *Streptomyces* sp. B15-008 [J]. *Org Lett*, 2021, 23(3): 682-686.
- [7] Marchbank D H, Ptycia-Lamky V C, Decken A, et al.

- Guanahanolide A, a meroterpenoid with a sesterterpene skeleton from coral-derived *Streptomyces* sp [J]. *Org Lett*, 2020, 22(16): 6399-6403.
- [8] An J S, Shin B, Kim T H, *et al.* Dumulmycin, an antitubercular bicyclic macrolide from a riverine sediment-derived *Streptomyces* sp [J]. *Org Lett*, 2021, 23(9): 3359-3363.
- [9] Jiao W H, Yuan, W L, Li Z Y, *et al.* Anti-MRSA actinomycins D₁-D₄ from the marine sponge-associated *Streptomyces* sp. LHW52447 [J]. *Tetrahedron*, 2018, 74(40): 5914-5919.
- [10] Wang N, Cui C B, Li C W. A new cyclic dipeptide penicimutide: The activated production of cyclic dipeptides by introduction of neomycin-resistance in the marine-derived fungus *Penicillium* [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(6): 762-770.
- [11] Xiang W X, Liu Q, Li X M, *et al.* Four pairs of proline-containing cyclic dipeptides from *Nocardiopsis* sp. HT88, an endophytic bacterium of *Mallotus nudiflorus* L [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(15): 2219-2224.
- [12] 吕海宁, 陈辉, 屈晶, 等. 内生真菌 *Trichoderma harzianum* 次生代谢产物研究 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(5): 427-430.
- [13] Cronan J M Jr, Davidson T R, Singleton F L, *et al.* Plant growth promoters isolated from a marine bacterium associated with *Palythoa* sp [J]. *Nat Prod Lett*, 1998, 11(4): 271-278.
- [14] 彭坤, 苏瑞强, 张改云, 等. 深海放线菌 *Micrococcus* sp. R21 的次生代谢产物研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2367-2371.
- [15] Yang B, Dong J D, Zhou X F, *et al.* Proline-containing dipeptides from a marine sponge of a *Callyspongia* species [J]. *Helv Chim Acta*, 2009, 92(6): 1112-1117.
- [16] Hwang J T, Jang H J, Kim J H, *et al.* *Lactococcus lactis* KR-050L inhibit IL-6/STAT3 activation [J]. *J Appl Microbiol*, 2017, 122(5): 1412-1422.
- [17] 龙聪, 刘小宇, 卢小玲, 等. 海洋亚硫酸杆菌 M44 的代谢产物研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(4): 51.
- [18] Hong L L, Yu H B, Wang J, *et al.* Unusual anti-allergic diterpenoids from the marine sponge *Hippospongia lachne* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43138.
- [19] Song T F, Chen M X, Ge Z W, *et al.* Bioactive penicypyrrodiether A, an adduct of GKK1032 analogue and phenol A derivative, from a marine-sourced fungus *Penicillium* sp. ZZ380 [J]. *J Org Chem*, 2018, 83: 13395-13401.

[责任编辑 王文倩]