

链霉菌放线菌 *Streptomyces antibioticus* H12-15 发酵物的化学成分研究

胡 辰¹, 陈 芳¹, 郑新恒¹, 林壁润², 周光雄^{1*}

¹暨南大学药学院中药及天然药物研究所 广东省普通高校中药和天然药物药效物质基础重点实验室, 广州 510632;

²广东省农业科学院植物保护研究所 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510110

摘要:对采集于近南海红树林底泥的抗生链霉菌 H12-15 发酵物中的次级代谢产物进行分离纯化, 经多种柱色谱技术得到 10 个化合物, 通过波谱学方法并结合文献数据比对, 鉴定所分离得到的化合物分别为: 放线菌素 X₂ (1)、放线菌素 D (2)、羊毛甾醇 (3)、4,4-二甲基酵母甾醇 (4)、麦角甾醇过氧化物 (5)、24-甲基-5 α -胆甾基-7,22-二烯-3 β ,6 α -二醇 (6)、麦角甾-3 β ,5 α ,9 α -三羟基-7,22-二烯-6-酮 (7)、麦角甾-3 β ,5 α ,9 α ,14 α -四羟基-7,22-二烯-6-酮 (8)、5 α ,6 α -环氧麦角甾-8,14,22-三烯-3 β ,7 α -二醇 (9)、 β -谷甾醇 (10), 化合物 3~10 均为首次从海洋来源链霉菌中分离得到。运用 MTT 法对这 10 个化合物进行体外抗肿瘤细胞活性的筛选, 其中, 化合物 1 和 2 具显著生长抑制活性, 其 IC₅₀ 值均小于 1.6 μ g/mL; 化合物 9 表现出一定的细胞毒活性。

关键词: 抗生链霉菌; 红树林; 次级代谢产物; 放线菌素; 甾醇

中图分类号: R931.77

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.007

Chemical Compounds from the Fermented Broth of *Actinomyces* Strain *Streptomyces antibioticus* H12-15

HU Chen¹, CHEN Fang¹, ZHENG Xin-heng¹, LIN Bi-run², ZHOU Guang-xiong^{1*}

¹Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese

Medicine and New Drugs Research, Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Key Laboratory of New Technique for Plant

Protection in Guangdong, Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510110, China

Abstract: By using various sorts of column chromatography, ten compounds were isolated from the bioactive fraction of *Streptomyces antibioticus* strain H12-15 which derived from the sea bed mud at the mangrove district of South China Sea. The structures of these compounds were identified as actinomycin X₂ (1), actinomycin D (2), lanosterol (3), 4,4-dimethylzymosterol (4), ergosterol peroxide (5), 24-methyl-5 α -cholesta-7,22-diene-3 β ,6 α -diol (6), 3 β ,5 α ,9 α -trihydroxy ergosta-7,22-diene-6-one (7), 3 β ,5 α ,9 α ,14 α -tetrahydroxyergosta-7,22-diene-6-one (8), 5 α ,6 α -epoxy-ergosta-8,14,22-triene-3 β ,7 α -diol (9), β -sitosterol (10) based on the spectroscopic analysis. Among them, compounds 3-10 were isolated from *Streptomyces* species for the first time. Cytotoxicities of these compounds against cancer cell lines were evaluated *in vitro* by MTT assay. Among them, compounds 1 and 2 showed significant growth inhibition of tumor cells, with IC₅₀ values lower than 1.6 μ g/mL, and compound 9 exhibited mild cytotoxic activity.

Key words: *Streptomyces antibioticus*; mangrove; metabolites; actinomycin; sterols

红树林^[1]是陆地向海洋过渡的特殊生态系统, 生态条件特殊, 但蕴藏着丰富并极具特色的微生物资源。这为红树林微生物类群的次级代谢物在结构类型以及生物活性方面呈现出多样性提供了可能。

近年来, 天然产物研究人员已从海洋放线菌中分离得到许多结构较为新颖、活性较为多样的化合物。因此, 红树林来源放线菌作为重要的药用微生物种群也是寻找和发现新药先导化合物的重要资源^[2]。

放线菌是一类高 G + C 含量的革兰氏阳性菌, 可产生多种结构新颖且活性良好的次级代谢产物, 主要生物活性包括抗菌、抗肿瘤、免疫抑制剂等等。经过前期大量研究发现, 放线菌所产生次级代谢产

收稿日期: 2016-09-12 接受日期: 2016-11-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81373320); 广东省自然科学基金团队项目 (2015 A030312002); 暨南大学教育部研究基金 (21612114)

* 通讯作者 Tel: 86-20-85221469; E-mail: guangxzh@sina.com

物的结构类型涉及生物碱、大环内酯类、多烯类、放线菌素、甾体等多种^[3]。目前,多羟基甾醇类化合物多发现于真菌、海藻、海绵之中,关于链霉菌产生的甾醇类化合物鲜有报道。本文就抗生链霉菌 H12-15 中的化学成分进行了较系统的分离纯化,得到了 10 个单体化合物(图 1),主要为具细胞毒活性的抗生素以及甾醇类化合物,其中化合物 **3** ~ **10** 均

为首次从链霉菌属放线菌发酵物中分离得到。经过对分得的化合物进行体外抗肿瘤活性筛选,发现化合物 **1** ~ **10** 对两种肿瘤细胞株均具有不同程度的细胞毒活性。本研究成果进一步丰富了海洋链霉菌的次级代谢产物多样性,为后续寻找与开发链霉菌相关的药物先导物提供了更多研究基础。

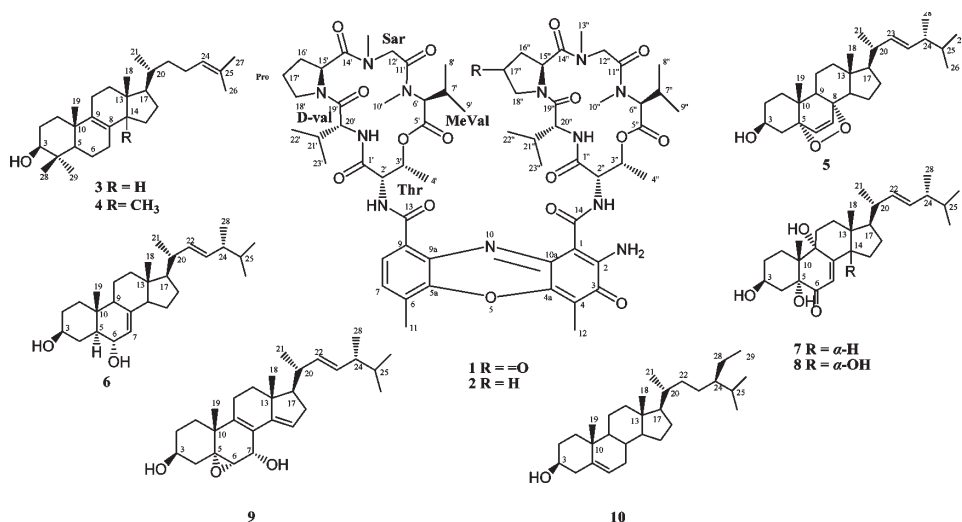


图 1 化合物 **1** ~ **10** 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds **1-10**

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Biostatc 30 L 生物发酵罐(德国贝朗公司); LKYC-2 型恒温摇床(杭州郎琨科技有限公司); CO₂ 培养箱(美国 Shel-Lab); 台式离心机(德国 Sigma 公司); Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司); Bruker AV-300 和 AV-600 型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司); Finnigan LCQ Advantage MAX 质谱仪(美国菲尼根质谱公司); Agilent 6120 LC/MS TOF 质谱仪(美国安捷伦科技公司); Synergy 酶标仪(美国博腾仪器有限公司); 液相分析色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ (5 μm, 4.6 × 250 mm)(美国 Welch 公司); 液相半制备色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ (5 μm, 10.0 × 250 mm)(美国 Welch 公司)。TLC 预制板和硅胶(200 ~ 300 目)(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20(Pharmacia 公司); 核磁用氘代试剂(Merck 公司); 色谱级甲醇(山东禹王公司); 色谱级乙腈(德国 Sigma 公司); 液相用水(广东怡宝公司生产纯净水), 其他试剂均为分析纯。RPMI-1640 培养基(美

国 Gibco 公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma); DMSO(德国 Sigma 公司); 胰酶(美国 Amresco); 胎牛血清(美国 Gibco 公司); 青-链霉素(美国 Hyclone 公司)。

1.2 培养基

斜面培养基(高氏一号培养基): 可溶性淀粉 2%, KNO₃ 0.2%, MgSO₄ 0.1%, NaCl 0.05%, FeSO₄ 0.002%, K₂HPO₄ 0.1%, 海水晶 0.3%, 琼脂 2%, 水 1 L, pH 7.2 ~ 7.4。种子培养基: 玉米淀粉 3%, 酵母粉 3%, 海水晶 0.25%, CaCO₃ 0.15%, KNO₃ 0.1%, MgSO₄ 0.06%, FeSO₄ 0.002%, K₂HPO₄ 0.09%, 水 1 L, pH 7.2 ~ 7.4。发酵培养基: 玉米淀粉 3%, 酵母粉 3%, 海水晶 0.25%, CaCO₃ 0.15%, KNO₃ 0.1%, MgSO₄ 0.06%, FeSO₄ 0.002%, K₂HPO₄ 0.09%, 水 1 L, pH 7.2 ~ 7.4。

1.3 菌株

链霉菌 H12-15 通过培养特征、形态特征、生理生化特性以及分子生物学, 鉴定该菌株为抗生链霉菌(*Streptomyces antibioticus*)。该菌种分离自广东省江门市台山近海红树林的底泥, 并保存于广东省农

业科学院植物保护研究所。

1.4 细胞株

人肺癌细胞 NCI-H460 和人乳腺癌细胞 MCF-7 均由暨南大学医学院提供。

2 实验方法

2.1 菌株发酵

菌种活化:将保存于 4 °C 沙土管中的菌种 H12-15 接种在高氏一号斜面培养基上,28 °C 培养箱中培养 6 d。发酵培养条件:5% 的接种量,1 L 三角瓶装液量 200 mL 于 28 °C、160 rpm 摇床培养 2 d。放大培养:约 1 L 的种子培养液转接入 Biostatic 30 L 的生物发酵罐,30 L 罐装液量 20 L,发酵温度为 30 °C,搅拌速度为 300 rpm,通气量为 15 L/min,培养 5 d。

2.2 提取与分离

菌株 H12-15 的发酵产物 80 L,经 4000 rpm 离心 20 min,分离得到菌液和菌丝体。菌丝体经 95% 乙醇渗漉提取,减压浓缩得到总浸膏。将该浸膏用水制成悬浮液后用乙酸乙酯萃取 8 次,合并萃取液并将其减压旋转蒸干,共得乙酸乙酯层浸膏 92.5 g。

该乙酸乙酯层经硅胶柱色谱层析,以石油醚/丙酮(100:0 ~ 0:100)为流动相梯度洗脱,运用 TLC 薄层色谱进行合并,获得 Fr 1 ~ 9 共 9 个组合馏分。Fr 8 经过凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离,CH₂Cl₂/MeOH(1:1)洗脱,经 TLC 合并得到 5 个子馏分 Fr 8-1 ~ Fr 8-5。Fr 8-2 约 2.8 g,取 120 mg 经半制备液相(乙腈/水 50:55)得到化合物 **1**(62 mg)和 **2**(42 mg)。Fr 2 用石油醚/乙酸乙酯系统(30:1)洗脱,TLC 薄层色谱合并后,得到的各个子馏分再经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离依次得到化合物 **3**(1.5 mg)和 **4**(1.0 mg)。化合物 **5**(30 mg)和 **10**(25 mg)由 Fr 3 先经过凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离,经 CH₂Cl₂/MeOH(1:1)洗脱后通过重结晶所得。Fr 6 经硅胶柱色谱层析,用石油醚/乙酸乙酯系统(15:1 ~ 1:1)洗脱,所得馏分经半制备液相(甲醇/水 85:15)纯化得到化合物 **6**(10 mg)、**7**(25 mg)、**8**(2.9 mg)和 **9**(2.6 mg)。

2.3 生物活性试验

2.3.1 细胞培养

NCI-H460 和 MCF-7 均培养于 RPMI 1640 培养基(10% FBS 和 1% 青-链霉素)中,放置于 37 °C,5% CO₂ 的细胞培养箱中。待细胞生长融合度至

80% 后弃去培养液,用 PBS 洗涤两次,加入适量胰酶消化,室温静置 1 min 至细胞在显微镜下呈圆形,用移液枪反复吹打使细胞充分分离成为单细胞悬液。取适量的单细胞悬液用于传代培养,保证每次传代培养与实验用细胞皆处于生长对数期。

2.3.2 细胞毒活性检测

采用 MTT 法测定各化合物的细胞毒活性。将细胞悬液接种于 96 孔板,细胞密度为 8×10^4 个/mL,培养 24 h,细胞融合度至 70% ~ 80% 开始加药。将各化合物和阳性药(顺铂)溶于 DMSO 中,其初始浓度为 10 mg/mL。设立空白组、样品组和顺铂组,最大给药浓度为 100 μg/mL,随后运用倍半稀释的方法依次降低浓度(50、25、12.5、6.3、3.1、1.6 μg/mL)。加药后孵育 2 d,弃去培养液后加入 30 μL MTT 溶液(5 mg/mL)再孵育 4 h。孵育后,吸弃上清液后加入 100 μL DMSO 震荡混匀。使用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值,然后用数据处理软件 Origin 8 (OriginLab, Northampton, MA USA)计算出各个化合物的 IC₅₀ 值。

3 实验结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1** 红色片晶; mp. 243 ~ 244 °C; ESI-MS: m/z 1291 [M + Na]⁺, 1267 [M + H]⁺ (C₆₂H₈₄N₁₂O₁₇); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 谱中重要的特征信号有: δ 7.55 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8), 7.34 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7), 6.58 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-15'), 5.90 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-15''), 5.20 (1H, qd, $J = 6.0, 2.1$ Hz, H-3'), 5.12 (1H, qd, $J = 6.0, 2.1$ Hz, H-3''), 4.68 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H_α-12'), 4.61 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H_α-12''), 4.48 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-2'), 4.45 (1H, dd, $J = 6.3, 2.1$ Hz, H-2''), 3.61 (2H, d, $J = 17.4$ Hz, H_β-12', 12''), 2.91 (3H, s, H-10'), 2.89 (3H, s, H-15'), 2.85 (3H, s, H-10'''), 2.84 (3H, s, H-15'''), 2.51 (3H, s, H-11), 2.12 (3H, s, H-12), 1.22 (3H, d, $J = 4.2$ Hz, H-4'), 1.10 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, H-22', 22''), 1.07 (3H, d, $J = 4.2$ Hz, H-4'''), 0.94 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, H-8'), 0.91 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, H-8''), 0.89 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, H-23', 23''), 0.71 (6H, d, $J = 3.0$ Hz, H-9', 9''); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 101.7 (C-1), 147.7 (C-2), 179.1 (C-3), 113.7 (C-4), 145.1 (C-4a), 140.6 (C-5a), 128.1 (C-6), 130.5 (C-7), 126.2

(C-8), 132.1 (C-9), 129.2 (C-9a), 146.0 (C-10a), 15.2 (C-11), 7.8 (C-12), 166.8 (C-13), 169.1 (C-14), 169.1 (C-1'), 167.7 (C-1''), 55.1 (C-2'), 54.9 (C-2''), 74.9 (C-3'), 74.7 (C-3''), 17.8 (C-4'), 17.2 (C-4''), 167.7 (C-5'), 166.4 (C-5''), 71.5 (C-6'), 71.2 (C-6''), 27.1 (C-7'), 27.1 (C-7''), 21.8 (C-8'), 21.7 (C-8''), 19.3 (C-9'), 19.2 (C-9''), 39.5 (C-10'), 39.3 (C-10''), 166.5 (C-11'), 166.1 (C-11''), 51.4 (C-12'), 51.4 (C-12''), 35.1 (C-13'), 34.9 (C-13''), 173.6 (C-14'), 173.1 (C-14''), 56.5 (C-15'), 54.4 (C-15''), 31.1 (C-16'), 42.1 (C-16''), 23.1 (C-17'), 208.9 (C-17''), 47.5 (C-18'), 51.4 (C-18''), 173.2 (C-19'), 172.9 (C-19''), 58.6 (C-20'), 57.2 (C-20''), 31.9 (C-21'), 31.8 (C-21''), 19.2 (C-22'), 19.1 (C-22''), 19.0 (C-23'), 18.9 (C-23'')。将化合物 **1** 与文献^[4]中理化参数及 NMR 数据进行比较,数据基本一致,确定该化合物为放线菌素 X₂ (actinomycin X₂)。

化合物 2 红色片晶; mp. 246 ~ 247 °C; ESI-MS: m/z 1277 [M + Na]⁺, 1255 [M + H]⁺ (C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 谱中重要的特征信号有: δ 7.60 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-8), 7.35 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-7), 6.00 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-15'), 5.91 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-15''), 5.21 (1H, qd, J = 6.6, 2.7 Hz, H-3'), 5.19 (1H, qd, J = 6.6, 2.7 Hz, H-3''), 4.80 (1H, d, J = 17.4 Hz, H_α-12'), 4.72 (1H, d, J = 17.4 Hz, H_α-12''), 4.63 (1H, d, J = 17.4 Hz, H-2'), 4.52 (1H, dd, J = 6.3, 2.1 Hz, H-2''), 3.66 (2H, d, J = 17.4 Hz, H_β-12', 12''), 2.92 (3H, s, H-10'), 2.89 (3H, s, H-15'), 2.87 (3H, s, H-10''), 2.87 (3H, s, H-15''), 2.69 (3H, s, H-11), 2.54 (3H, s, H-12), 1.25 (3H, d, J = 4.2 Hz, H-4'), 1.23 (3H, d, J = 4.2 Hz, H-4''), 1.11 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-22'), 1.10 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-22''), 0.95 (3H, d, J = 5.4 Hz, H-8'), 0.91 (3H, d, J = 5.4 Hz, H-8''), 0.89 (6H, d, J = 6.9 Hz, H-23', 23''), 0.74 (6H, d, J = 3.0 Hz, H-9', 9''); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 101.6 (C-1), 147.5 (C-2), 179.0 (C-3), 113.5 (C-4), 145.1 (C-4a), 140.4 (C-5a), 127.7 (C-6), 130.3 (C-7), 125.7 (C-8), 132.5 (C-9), 129.1 (C-9a), 145.8 (C-10a), 15.0 (C-11), 7.8 (C-12), 166.5 (C-13), 168.9 (C-14), 168.4 (C-1'), 167.6 (C-1''), 55.0 (C-2'), 54.8 (C-2''), 75.0

(C-3'), 74.9 (C-3''), 17.6 (C-4'), 17.3 (C-4''), 167.6 (C-5'), 166.5 (C-5''), 71.3 (C-6'), 71.2 (C-6''), 27.0 (C-7'), 27.0 (C-7''), 21.7 (C-8'), 21.5 (C-8''), 19.3 (C-9'), 19.1 (C-9''), 39.2 (C-10'), 39.1 (C-10''), 166.8 (C-11'), 166.3 (C-11''), 51.4 (C-12'), 51.4 (C-12''), 34.9 (C-13'), 35.0 (C-13''), 173.3 (C-14'), 173.4 (C-14''), 56.5 (C-15'), 58.7 (C-15''), 31.2 (C-16'), 31.5 (C-16''), 23.0 (C-17'), 22.8 (C-17''), 47.6 (C-18'), 47.4 (C-18''), 173.7 (C-19'), 173.4 (C-19''), 58.9 (C-20'), 58.7 (C-20''), 31.8 (C-21'), 31.5 (C-21''), 19.2 (C-22'), 19.1 (C-22''), 19.0 (C-23'), 19.0 (C-23'')。化合物 **2** 与化合物 **1** 两者的¹H NMR 较为相似,¹³C NMR 数据显示只有 C-16'、C-17' 和 C-18' 存在明显变化,结合文献^[5]报道,故鉴定该化合物为放线菌素 D (actinomycin D)。

化合物 3 无色针状结晶; mp. 137 ~ 139 °C; HR-ESI-MS: m/z 427.3934 [M + H]⁺ (calcd for C₃₀H₅₀O, 426.3934)。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) 谱中重要的特征信号有: δ 5.10 (1H, br. t, J = 7.0 Hz, H-24), 3.24 (1H, m, H-3), 1.68 (3H, s, H-27), 1.60 (3H, s, H-26), 1.00 (3H, s, H-29), 0.98 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-20), 0.87 (3H, s, H-28), 0.81 (3H, s, H-18), 0.69 (3H, s, H-30); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 35.8 (C-1), 28.0 (C-2), 79.2 (C-3), 39.0 (C-4), 50.6 (C-5), 18.4 (C-6), 26.7 (C-7), 134.6 (C-8), 134.6 (C-9), 37.2 (C-10), 21.2 (C-11), 31.0 (C-12), 44.7 (C-13), 50.0 (C-14), 31.0 (C-15), 28.4 (C-16), 50.6 (C-17), 15.9 (C-18), 19.3 (C-19), 36.4 (C-20), 18.8 (C-21), 36.5 (C-22), 25.1 (C-23), 125.4 (C-24), 131.1 (C-25), 25.9 (C-26), 17.8 (C-27), 28.1 (C-28), 15.6 (C-29), 24.4 (C-30)。以上数据与文献^[6]数据基本一致,确定化合物 **3** 为羊毛甾醇 (lanosterol)。

化合物 4 白色粉末; mp. 128 ~ 129 °C; HR-ESI-MS: m/z 413.3778 [M + H]⁺ (calcd for C₂₉H₄₈O, 412.3778)。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) 谱中重要的特征信号有: δ 5.09 (1H, br. t, J = 7.0 Hz, H-24), 3.24 (1H, m, H-3), 1.68 (3H, s, H-26), 1.60 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-28), 0.99 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), 0.81 (3H, s, H-29), 0.59 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 35.9 (C-1), 28.1 (C-2), 79.2 (C-3), 39.1 (C-4), 50.4 (C-

5), 18.6 (C-6), 28.6 (C-7), 128.1 (C-8), 136.0 (C-9), 37.1 (C-10), 22.2 (C-11), 37.2 (C-12), 42.3 (C-13), 52.1 (C-14), 23.9 (C-15), 29.0 (C-16), 55.0 (C-17), 11.5 (C-18), 20.0 (C-19), 36.2 (C-20), 18.8 (C-21), 36.2 (C-22), 25.0 (C-23), 125.4 (C-24), 131.1 (C-25), 25.9 (C-26), 17.8 (C-27), 28.1 (C-28), 15.5 (C-29)。该化合物¹H NMR 与化合物 **3** 相似,¹³C NMR 中除了 C-8、C-12、C-13、C-14、C-15、C-17、C-18 相差较大,其他数据基本一致。结合文献^[7,8],可鉴定化合物 **4** 为 4,4-二甲基酵母甾醇(4,4-dimethylzymosterol)。

化合物 5 无色针状结晶; mp. 174 ~ 177 °C; HR-ESI-MS: *m/z* 451.3158 [M + Na]⁺ (calcd. for C₂₈H₄₄O₃, 428.3158)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 谱中重要的特征信号有: δ: 6.50 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-7), 6.24 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 5.22 (1H, dd, *J* = 15.2, 7.1 Hz, H-22), 5.13 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.8 Hz, H-23), 3.96 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.90 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, *J* = 5.0 Hz, H-27), 0.81 (3H, d, *J* = 5.0 Hz, H-26), 0.80 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 37.1 (C-1), 30.2 (C-2), 66.6 (C-3), 34.8 (C-4), 82.3 (C-5), 135.3 (C-6), 130.9 (C-7), 79.6 (C-8), 51.2 (C-9), 37.0 (C-10), 20.8 (C-11), 39.5 (C-12), 44.7 (C-13), 51.8 (C-14), 23.5 (C-15), 28.9 (C-16), 56.3 (C-17), 13.0 (C-18), 18.3 (C-19), 39.9 (C-20), 21.0 (C-21), 135.5 (C-22), 132.4 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献^[9]报道数据基本一致,故鉴定该化合物为麦角甾醇过氧化物(ergosterol peroxide)。

化合物 6 无色针状结晶; mp. 206 ~ 208 °C; HR-ESI-MS: *m/z* 437.3389 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₈H₄₆O₂, 414.3389); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 谱中重要的特征信号有: δ: 5.23 (1H, m, H-23), 5.18 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-7), 5.13 (1H, m, H-22), 3.80 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-6), 3.58 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.90 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.85 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-26 or H-27), 0.81 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27 or H-26), 0.54 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 37.3 (C-1), 31.2 (C-2), 70.9 (C-3), 33.9 (C-4), 49.0 (C-5), 70.1 (C-6), 122.0 (C-7), 141.6 (C-8), 49.3 (C-

9), 35.3 (C-10), 21.5 (C-11), 37.1 (C-12), 43.6 (C-13), 55.0 (C-14), 22.9 (C-15), 28.2 (C-16), 56.1 (C-17), 12.3 (C-18), 14.1 (C-19), 40.6 (C-20), 21.2 (C-21), 135.6 (C-22), 132.2 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.7 (C-28)。经与文献^[10]对照,¹H NMR 和质谱数据基本一致,结合¹³C NMR 数据,可鉴定化合物 **6** 为 24-甲基-5 α -胆甾基-7,22-二烯-3 β ,6 α -二醇(24-methyl-5 α -cholesta-7,22-diene-3 β ,6 α -diol)。

化合物 7 无色片状结晶; mp. 218 ~ 219 °C; HR-EIS-MS: *m/z* 467.3147 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₈H₄₄O₄, 445.3147); ¹H NMR (300 MHz, C₅D₅N) 谱中重要的特征信号有: δ: 5.95 (1H, br. s, H-7), 5.28 (1H, dd, *J* = 15.1, 7.8 Hz, H-23), 5.22 (1H, dd, *J* = 15.1, 7.8 Hz, H-22), 4.65 (1H, m, H-3), 1.17 (3H, s, H-19), 1.07 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.99 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.90 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-27), 0.85 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.66 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (75 MHz, C₅D₅N) δ: 26.7 (C-1), 31.9 (C-2), 67.3 (C-3), 38.6 (C-4), 80.2 (C-5), 199.6 (C-6), 120.3 (C-7), 164.5 (C-8), 75.5 (C-9), 42.7 (C-10), 29.4 (C-11), 35.9 (C-12), 45.8 (C-13), 52.4 (C-14), 23.2 (C-15), 28.4 (C-16), 56.6 (C-17), 12.9 (C-18), 20.8 (C-19), 40.9 (C-20), 21.8 (C-21), 136.3 (C-22), 132.9 (C-23), 43.6 (C-24), 33.8 (C-25), 20.4 (C-26), 20.6 (C-27), 18.4 (C-28)。以上波谱数据与文献^[11]数据基本一致,确定该化合物为麦角甾-3 β ,5 α ,9 α -三羟基-7,22-二烯-6-酮(3 β ,5 α ,9 α -trihydroxyergosta-7,22-diene-6-one)。

化合物 8 无色针状结晶; mp. 226 ~ 228 °C; HR-EIS-MS: *m/z* 483.3066 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₈H₄₄O₅, 460.3066); ¹H NMR (600 MHz, C₅D₅N) 谱中重要的特征信号有: δ: 6.28 (1H, s, H-7), 5.35 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.3 Hz, H-23), 5.30 (1H, dd, *J* = 15.3, 8.1 Hz, H-22), 4.61 (1H, m, H-3), 1.13 (3H, s, H-19), 2.84 (2H, ddd, *J* = 14.0, 4.8, 1.9 Hz, H-4), 2.73 (2H, td, *J* = 13.9, 3.9 Hz, H-1), 1.16 (3H, s, H-19), 1.12 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.98 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-28), 0.89 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27), 0.88 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-26), 0.76 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (150 MHz, C₅D₅N) δ: 26.1 (C-1), 31.8 (C-2), 67.0 (C-3), 38.3 (C-4), 80.0 (C-5), 199.7 (C-6), 122.5 (C-7), 159.4 (C-8), 77.6 (C-9),

43.3 (C-10), 31.5 (C-11), 28.9 (C-12), 47.7 (C-13), 86.6 (C-14), 27.8 (C-15), 28.8 (C-16), 57.0 (C-17), 17.0 (C-18), 20.6 (C-19), 40.8 (C-20), 22.0 (C-21), 135.6 (C-22), 132.9 (C-23), 43.5 (C-24), 33.8 (C-25), 20.3 (C-26), 20.6 (C-27), 18.3 (C-28)。以上¹³C NMR 数据与化合物 **7** 除了 C-13、C-14、C-15, 其他信号基本一致, 结合文献^[12], 确定该化合物为麦角甾-3 β , 5 α , 9 α , 14 α -四羟基-7, 22-二烯-6-酮 (3 β , 5 α , 9 α , 14 α -tetrahydroxyergosta-7, 22-diene-6-one)。

化合物 9 无色针状结晶; mp. 171 ~ 173 °C; HR-EIS-MS: m/z 449. 3026 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₈H₄₂O₃, 449. 3026); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) 谱中重要的特征信号有: δ : 6.08 (1H, dd, $J = 3.3, 1.8$ Hz, H-15), 5.26 (1H, dd, $J = 15.4, 7.3$ Hz, H-23), 5.22 (1H, dd, $J = 15.4, 8.1$ Hz, H-22), 4.48 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-7), 3.99 (1H, m, H-3), 3.33 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-6), 1.16 (3H, s, H-19), 1.04 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.93 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28), 0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.75 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 31.1 (C-1), 30.6 (C-2), 68.6 (C-3), 39.3 (C-4), 65.2 (C-5), 62.6 (C-6), 67.6 (C-7), 122.3 (C-8), 139.6 (C-9), 38.9 (C-10), 23.6 (C-11), 35.1 (C-12), 45.5 (C-13), 146.7 (C-14), 123.5 (C-15), 37.2 (C-16), 56.2 (C-17), 15.4 (C-18), 23.5 (C-19), 38.9 (C-20), 21.3 (C-21), 135.5 (C-22), 132.4 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 21.2 (C-26), 20.1 (C-27), 17.8 (C-28)。结合文献^[9,13], 以上¹³C NMR 数据与文献报道基本一致, 可确定该化合物为 5 α , 6 α -环氧麦角甾-8, 14, 22-三烯-3 β , 7 α -二醇 (5 α , 6 α -epoxy-ergosta-8, 14, 22-triene-3 β , 7 α -diol)。

化合物 10 无色针状结晶; mp. 138 ~ 139 °C; HR-EIS-MS: m/z 415. 3934 [M + H]⁺ (calcd for C₂₉H₅₀O, 414. 3934); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 谱中重要的特征信号有: δ : 5.36 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-6), 3.52 (1H, t, H-3), 1.00 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.83 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27), 0.82 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-29), 0.67 (3H, s, H-19); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 37.4 (C-1), 26.2 (C-2), 71.9 (C-3), 42.4 (C-4), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 32.0 (C-7), 34.1 (C-8), 50.3 (C-9), 36.6 (C-10), 23.0 (C-11), 39.9 (C-12), 42.5 (C-13), 56.9

(C-14), 23.2 (C-15), 29.2 (C-16), 56.2 (C-17), 11.7 (C-18), 12.0 (C-19), 36.3 (C-20), 21.2 (C-21), 135.6 (C-22), 28.4 (C-23), 46.0 (C-24), 31.2 (C-25), 12.1 (C-26), 20.0 (C-27), 23.2 (C-28), 19.2 (C-29)。以上波谱数据与文献^[14]数据基本一致, 确定该化合物为 β -谷甾醇 (β -sitosterol)。

3.2 生物活性

体外抗肿瘤细胞活性筛选结果显示, 分离得到的十个化合物都具有一定的体外抗肿瘤活性。其中, 化合物 **1** 和 **2** 对人肺癌细胞 NCI-H460 和人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞株均表现出显著的细胞毒活性, IC₅₀ 值均为小于 1.6 μ g/mL; 化合物 **9** 对人肺癌细胞 NCI-H460 和人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞株的 IC₅₀ 值依次为 21.7 μ g/mL 和 39.4 μ g/mL; 阳性药顺铂对以上 2 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 值依次为 25.1 μ g/mL 和 4.0 μ g/mL; 其他化合物的 IC₅₀ 值均大于 50 μ g/mL。

4 讨论与结论

本研究从菌株 H12-15 的发酵物中鉴定了 10 个化合物, 主要为放线菌素类及甾醇类次级代谢产物。化合物 **1** 和 **2** 属于酚酞类抗生素, 此类化合物已经作为较成熟的抗肿瘤药物, 其中放线菌素 D 更是已经运用于临床治疗之中。此外, 该类化合物还具有一定的抗菌、抗病毒活性^[15] 等。化合物 **3** ~ **10** 均为首次从海洋来源的链霉菌分离得到的甾醇类化合物, 这类化合物在药理活性主要有免疫增强作用、肿瘤细胞毒活性等作用。海洋放线菌是一个巨大的资源宝库, 本实验结果为海洋链霉菌来源的化合物的药物开发利用提供了一定的化学基础, 为医药及天然产物开发提供了理论和物质基础。

参考文献

- Holguin G, Vazquez P, Bashan Y, et al. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology Fertility Soils*, 2001, 33: 265-278.
- Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J Biotechnol*, 2012, 158: 168-175.
- Zhang QL (张清丽), Gu QQ (顾谦群), Cui CB (崔承彬), et al. Secondary metabolites of marine-derived actinomycete microbes and their bioactivities. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 2004, 25: 49-54.