

# 海洋放线菌 H2003 代谢产物中环二肽成分及其抗肿瘤活性的初步研究

李冬<sup>1</sup>, 朱伟明<sup>1</sup>, 顾谦群<sup>1</sup>, 崔承彬<sup>1,2</sup>, 朱天骄<sup>1</sup>, 刘红兵<sup>1</sup>, 方玉春<sup>1</sup>

(1. 教育部海洋药物重点实验室, 山东省海洋药物重点实验室, 中国海洋大学 海洋药物与食品研究所, 山东青岛 266003; 2. 军事医学科学院 毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** 海洋来源放线菌 H2003 发酵产物的粗提物对小鼠乳腺癌细胞 tsFT210 具有明显的细胞毒活性。为了发现其抗肿瘤活性成分, 采用活性跟踪的分离方法, 经多次硅胶柱色谱、凝胶柱色谱及高效液相色谱分离, 从菌株 H2003 发酵液中分离得到了 7 个环二肽化合物。经核磁共振光谱、质谱和旋光分析, 其结构分别鉴定为 cyclo (L-Leu-L-Pro) (1), cyclo (D-Val-L-Pro) (2), cyclo (Gly-L-Leu) (3), cyclo (L-Pro-L-Try) (4), cyclo (Gly-D-Phe) (5), cyclo (Gly-L-Pro) (6) 和 cyclo (L-Ala-L-Phe) (7)。其中化合物 1 通过 SRB 法测试表现出弱的抗肿瘤活性, 系首次报道。

**关键词:** 海洋放线菌; 次级代谢产物; 环二肽; 抗肿瘤活性

中图分类号: Q516 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)05-0045-04

环肽类化合物由于其具有抗肿瘤<sup>[1]</sup>、抗菌<sup>[2]</sup>、抗真菌<sup>[3]</sup>等生物活性而备受研究者关注。目前已发现的上百个环肽类化合物绝大部分来自于海洋生物, 其中海洋微生物所产生的一些特殊环肽显示出很好的抗肿瘤活性。因此, 从海洋微生物中寻找具有生物活性的环肽类化合物已成为一个新的研究热点。作者通过活性追踪方法对一株海洋放线菌 H2003 的环肽成分进行分离鉴定并应用 SRB 法对单体化合物进行了抗肿瘤活性评估。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器设备与实验材料

Mariner API-TOF 型质谱、日本 JEOL JNM-ECP 600 型核磁共振仪。分析型 PDA996 监测器的 Waters-600 型高效液相色谱仪, Shimpack ODS (H) KIT 柱。岛津制备型高效液相色谱 (LC-6AD 泵, SPD-M10AVP 检测器)。

Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司)和色谱用硅胶 H (青岛海洋化工厂)。胎牛血清 (FBS) (Hyclone 公司), RPMI-1640 细胞培养基 (GibcoBrid 公司)。碘

化丙啶 (PI) 和 Triton X-100 (Sigma 公司)。

放线菌菌株 H2003 从青岛胶州湾的海泥样品中分离。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌种培养

将菌种从固体斜面培养基取适量接种到内装 100 mL 液体培养基的三角瓶中, 在 28、120 r/min 的条件下摇床培养 48 h, 作为种子培养液。将该种子培养液按 5% 的接种量接种于 100 mL 液体培养基的三角瓶中, 共接种 8 L。在 28、120 r/min 的条件下摇床培养 6 d。

收稿日期: 2004-09-20; 修回日期: 2004-12-10

基金项目: 国家 863 计划项目 (2003AA624020); 山东省科技攻关项目 (012110107); 山东省重点基金项目 (Z2001C01); 国家教育部长江学者奖励计划项目; 青岛市自然科学基金项目 (04-2-JZ-81)

作者简介: 李冬 (1978-) 男, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微生物活性成分的研究, E-mail: lidongcn@126.com; 崔承彬, 通讯作者, E-mail: cuicb@sohu.com

### 1.2.2 提取分离

8 L 发酵液经乙酸乙酯萃取得到总浸膏(1.56 g), 活性表现为坏死性细胞毒活性。总浸膏经过硅胶柱色谱分离(石油醚:氯仿:甲醇, 梯度洗脱)得到6个组分, 其中组分2~5均表现出不同程度的抗肿瘤活性。组分2(102.4 mg)经反复硅胶柱色谱分离(氯仿:甲醇梯度洗脱)及HPLC分离制备得到化合物1(11.5 mg)和化合物2(6.8 mg), 组分3(75.6 mg)经 Sephadex LH-20(甲醇)及HPLC分离制备分离得到化合物3(4.1 mg)和化合物4(14.0 mg), 组分4(112.4 mg)经反复硅胶柱色谱分离(氯仿:甲醇梯度洗脱)得到化合物5(6.9 mg) 化合物6(5.4 mg)和化合物7(4.7 mg)。

### 1.2.3 结构表征

化合物1, 无定性粉末,  $[\alpha]_D^{26} -96.8$  (c 1.0, MeOH); Positive ESI-MS:  $m/z$  210.20  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR(CDCl<sub>3</sub>): 6.37 (br.s, NH), 4.12 (dd,  $J=7.8, 9.6$  Hz, H), 4.01 (dd,  $J=3.2, 9.6$  Hz, H), 3.54~3.95 (m, 2H), 2.34 (m, H), 2.12 (m, H), 2.01~2.05 (m, 2H), 1.92 (m, H), 1.87 (m, H), 1.53 (m, H), 1.01 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H), 0.96 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H)。以上数据与 cyclo (L-Leu-L-Pro) 的相关数据一致<sup>[4,5]</sup>。

化合物2, 无定性粉末,  $[\alpha]_D^{26} -85.4$  (c 1.0, MeOH); Positive ESI-MS:  $m/z$  197.32  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR(MeOH-d<sub>4</sub>): 4.19 (t, H), 4.02 (d,  $J=2.4$  Hz, H), 3.49~3.53 (m, 2H), 2.48 (m, H), 2.30 (m, H), 2.03 (m, H), 1.93 (m, 2H), 1.09 (m, 3H), 0.92 (m, 6H)。 $^{13}C$ -NMR(MeOH-d<sub>4</sub>): 172.6 (C), 167.6 (C), 61.5 (CH), 60.0 (CH), 46.2 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 23.2 (CH), 18.8 (CH<sub>3</sub>), 16.6 (CH<sub>3</sub>)。以上数据与 cyclo (D-Val-L-Pro) 的相关数据一致<sup>[6,7]</sup>。

化合物3, 无定性粉末,  $[\alpha]_D^{26} +7.4$  (c 1.0, MeOH); Positive ESI-MS:  $m/z$  170.56  $[M]^+$ ;  $^1H$ -NMR (MeOH-d<sub>4</sub>): 4.00 (d,  $J=18.0$  Hz, H), 3.88 (dd,  $J=5.4, 7.8$  Hz, H), 3.82 (d,  $J=18.0$  Hz, H), 1.78~1.84 (m, H), 1.65~1.68 (m, 2H), 0.96 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H), 0.95 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H)。 $^{13}C$ -NMR(MeOH-d<sub>4</sub>): 171.6 (C), 168.9 (C), 49.4 (CH), 48.7 (CH), 43.8 (CH<sub>2</sub>), 5.3 (CH), 23.4 (CH<sub>3</sub>)。以上数据与 cyclo (Gly-L-Leu) 的相关数据一致<sup>[7,8]</sup>。

化合物4, 无定性粉末,  $[\alpha]_D^{26} -36.2$  (c 1.0, MeOH); Negative ESI-MS:  $m/z$  259.53  $[M-H]^-$ ;  $^1H$ -NMR(MeOH-d<sub>4</sub>): 7.03 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 6.69 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 4.35 (m, H), 4.04 (m, H), 3.51 (m, H), 3.52 (m, H), 3.02~3.06

(m, 2H), 2.08 (m, H), 1.80 (m, H), 1.79 (m, 2H)。以上数据与 cyclo (L-Pro-L-Try) 相关数据一致<sup>[9]</sup>。

化合物5, 无定性粉末,  $[\alpha]_D^{26} +4.7$  (c 1.0, MeOH); Positive ESI-MS:  $m/z$  205.56  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (MeOH-d<sub>4</sub>): 7.29 (m, 3H), 7.27 (m, 2H), 4.21 (dd,  $J=4.2, 13.6$  Hz, H), 3.42 (d,  $J=18.0$  Hz, H), 3.21 (t,  $J=4.2$  Hz, H), 3.00 (dd,  $J=4.2, 13.6$  Hz, H), 2.64 (d,  $J=18.0$  Hz, H)。 $^{13}C$ -NMR (MeOH-d<sub>4</sub>): 170.0 (C), 168.7 (C), 136.4 (C), 131.5 (2CH), 129.6 (2CH), 128.5 (CH), 57.5 (CH), 44.7 (CH<sub>2</sub>), 40.9 (CH<sub>2</sub>)。以上数据与 cyclo (Gly-D-Phe) 的相关数据一致<sup>[8,9]</sup>。

化合物6: 无定性粉末,  $[\alpha]_D^{26} -14.8$  (c 1.0, MeOH); Positive ESI-MS:  $m/z$  173.24  $[M+H_2O+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (MeOH-d<sub>4</sub>): 4.22 (m, H), 4.08 (dd,  $J=1.8, 16.8$  Hz, H), 3.73 (d,  $J=16.8$  Hz, H), 3.50~3.54 (m, 2H), 2.31 (m, H), 1.94~1.98 (m, 3H)。 $^{13}C$ -NMR (MeOH-d<sub>4</sub>): 171.9 (C), 166.4 (C), 59.8 (CH), 46.9 (CH<sub>2</sub>), 46.3 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 23.3 (CH<sub>2</sub>)。以上数据与 cyclo (Gly-L-Pro) 的相关数据一致<sup>[7,8,11]</sup>。

化合物7: 无定性粉末,  $[\alpha]_D^{26} +35.4$  (c 1.0, MeOH); Positive ESI-MS:  $m/z$  218.13  $[M]^+$ ;  $^1H$ -NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.09 (br.s, NH), 8.00 (br.s, NH), 7.14~7.27 (m, 5H), 4.16 (t, H), 3.62 (m, H), 3.11~3.13 (dd,  $J=3.6, 13.8$  Hz, H), 2.84~2.87 (dd,  $J=3.6, 13.8$  Hz, H), 0.47 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H)。 $^{13}C$ -NMR (MeOH-d<sub>4</sub>): 167.7 (C), 165.8 (C), 136.0 (C), 130.4 (2CH), 128.0 (2CH), 126.7 (CH), 55.4 (CH), 49.7 (CH), 19.7 (CH<sub>3</sub>)。以上数据与 cyclo (L-Ala-L-Phe) 的相关数据一致<sup>[8,12]</sup>。

### 1.2.4 活性测试

活性跟踪采用温敏型小鼠乳腺癌细胞 tsFT210, 以细胞毒为抗肿瘤活性筛选指标。

化合物活性评价采用磺基罗丹明 B 染色法(SRB) 进行<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与讨论

本实验室近年来利用温敏型小鼠乳腺癌 tsFT210 细胞, 采用流式细胞术筛选手段, 开展了从海洋微生物中寻找天然抗肿瘤物质的研究工作。其中从海洋样品中分离出放线菌 H2003 菌株, 其发酵物的乙酸乙酯提取物显示明显的坏死性细胞毒活性(图1)。TLC 检测表明其发酵产物中存在大量的环肽类化合物<sup>[14]</sup>,

采用活性跟踪的方法和色谱分离技术，作者从其中 3 个活性组分中初步分离得到了 7 个环二肽类化合物，利用波谱学方法并结合旋光分析，其结构分别鉴定为：cyclo (L-Leu-L-Pro) (1)，cyclo (D-Val-L-Pro) (2)，

cyclo (Gly-L-Leu) (3)，cyclo (L-Pro-L-Try) (4)，cyclo (Gly-D-Phe) (5)，cyclo (Gly-L-Pro) (6) 和 cyclo (L-Ala-L-Phe) (7)。其中组分 5 的分离工作仍在进行当中。

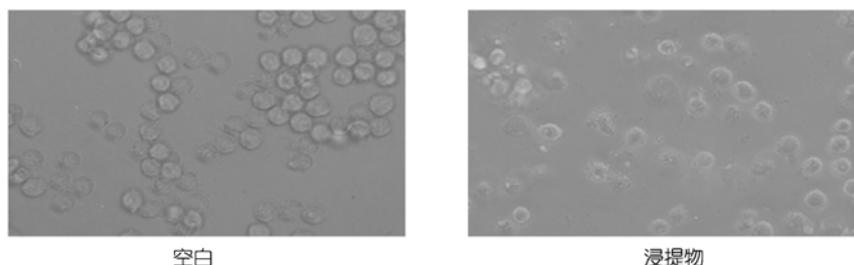


图 1 32°C 给药 3h 后浸提物对 tsFT210 细胞的形态学影响 (50 g/L)

Fig. 1 Effect of crud extracts on the morphology of tsFT210 cells at 50 g/L (32°C, 3h)

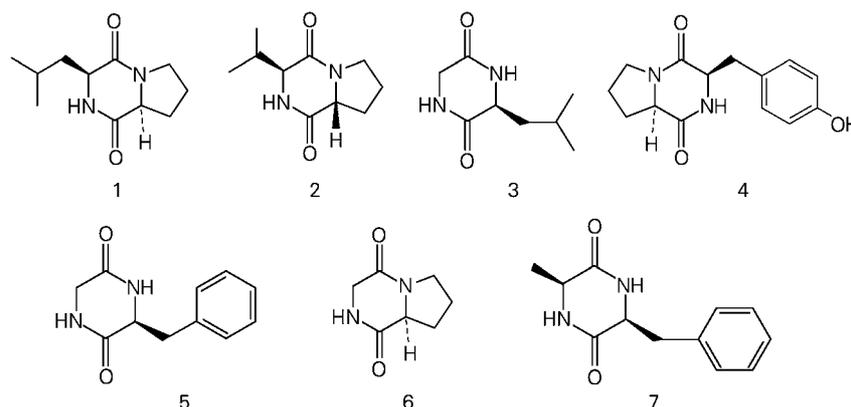


图 2 化合物 1~7 的结构

Fig. 2 The structure of compounds 1~7

利用 SRB 法，初步研究了环二肽类化合物 1~7 对 tsFT210 小鼠乳腺癌细胞的抗肿瘤活性。除化合物 1 外，化合物 2~7 在试验条件下未表现出抗肿瘤活性。化合物 1 在浓度为 0.952 mmol/L 时对 tsFT210 小鼠乳腺癌细胞的抑制率为 43.89%±1.837% (表 1)，表现出弱的抗肿瘤活性。作者对化合物 1 的抗肿瘤活性的研究虽属首次报道，但其活性较弱。由于该菌株发酵产物的总浸膏中含有大量环肽类化合物同时表现出强的坏死性细胞毒活性，目前分离得到的 7 个环二肽类化合物只有化合物 1 具有弱的活性，但对该菌株发酵物中微量强活性物质成分尚未分离得到。因此对该菌株活性成分的分离工作仍需继续进行。

表 1 化合物 1 对 tsFT210 细胞的增殖抑制作用

Tab. 1 Inhibitory effect of compound 1 on the proliferations of tsFT210 cells (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

化合物	浓度 (mmol/L)	A 值	抑制率 (%)
空白	-	0.817 ± 0.019	-
化合物 1	0.24	0.770 ± 0.052*	5.7 ± 6.4
化合物 1	0.48	0.743 ± 0.058**	25.7 ± 7.1
化合物 1	0.95	0.458 ± 0.015**	43.9 ± 1.8

注：\*P<0.05, \*\*P<0.01，与对照组相比

致谢：日本理化学研究所抗生物质研究室的长田裕之博士提供 tsFT210 细胞，谨此致谢。

参考文献:

- [1] Steven G T, Paul R J, Christopher A K, *et al*. Aspergillamides A and B: Modified cytotoxic tripeptides produced by a marine fungus of the genus *Aspergillus* [J]. **Tetrahedron**, 1998, 54: 13 459-13 466 .
- [2] Faouzi F, Victoriano V, Jose L S, *et al*. DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* Isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*[J]. **J Nat Prod**, 2003, 66(10): 1 299-1 302 .
- [3] Shigeki M, Nobuhiro F, Kanehisa H, *et al*. A novel antifungal bicyclic peptide from a marine sponge *Theonella* sp.[J]. **JACS**, 1989, 11: 2 582-2 588 .
- [4] Steven D B, Stephen G D. The biosynthetic origin of diketopiperazines derived from D-proline [J]. **J Chem Soc Perkin Trans**, 1998, 1: 2 313-2 316 .
- [5] Terry L P, Thomas P R, Rayanmond M T, *et al*. Chemical characterization of Diketopiperazines in Beer [J]. **J Agric Food chem**, 1997, 45: 3 183-3 197 .
- [6] 丁中涛, 保志娟. 金铁锁根中 3 个环二肽[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 337-340 .
- [7] 丁德全, 杨峻山. 分析化学手册(核磁共振分册)[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999. 126-140 .
- [8] 周俊山. 实用氨基酸手册[M]. 北京: 北京科学与技术出版社, 1990. 80-83 .
- [9] 熊江, 周俊, 谭宁华. 多蕊商陆的化学成分[J]. 云南植物研究, 2002, 24(3): 401-405 .
- [10] 陈光英, 刘晓红, 温露, 等. 南海红树林内生真菌 1893 代谢产物研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(1): 49-52 .
- [11] De Costa B R, He X S, Linders J T, *et al*. Synthesis and evaluation of conformationally restricted N-[2-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-N-methyl-2-(1-pyrrolidinyl) ethylamines at sigma receptors. 2. Piperazines, bicyclic amines, bridged bicyclic amines, and miscellaneous compounds[J]. **J Med Chem**, 1993, 36: 2 311-2 315 .
- [12] 李厚金, 林永成, 周世宁. 红树林内源真菌 2524 号的肽类成分[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(1): 110-112 .
- [13] 王青青, 余海. SRB 显色法用于抗癌药物敏感性试验的研究[J]. 科学通讯, 2000, 16(2): 104-107 .
- [14] 周俊, 谭宁华. 植物环肽的薄层化学识别新方法及其在植物化学研究中的应用[J]. 科学通报, 2000, 45(5): 1 047-1 051 .

## Structural identification and anti-tumor activity of Diketopiperazines from secondary metabolites of marine-derived actinomycete H2003

LI Dong<sup>1</sup>, ZHU Wei-ming<sup>1</sup>, GU Qian-qun<sup>1</sup>, CUI Cheng-bin<sup>1,2</sup>, ZHU Tian-jiao<sup>1</sup>, LIU Hong-bing<sup>1</sup>, FANG Yu-chun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Drugs of MEC & SP, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Received: Sep., 21, 2004

**Key words:** marine-derived actinomycete; secondary metabolite; diketopiperazine; anti-tumor activity

**Abstract:** The fermentation of the marine-derived actinomycete H2003 showed toxicity on tsFT210 cells. In order to isolate and identify the bioactive components, the secondary metabolite of the fermentation of H2003 was studied. Through bioassay-guided fractionation of necrosis on tsFT210 cells, seven diketopiperazines were isolated from the secondary metabolites of actinomycete H2003 by repeating chromatography over silica gel, sephadex LH-20 and HPLC. Their structures were identified by the spectroscopic methods and anti-tumor activities were assayed by SRB method. Compound(1) showed weak anti-tumor activity on tsFT210 cells.

(本文编辑: 张培新)