

六种粘细菌 095B06 次生代谢产物的分离、鉴定及初步生物学活性研究

施晓琼¹, 许强芝¹, 刘小宇¹, 韩文菊¹, 刘新利², 焦炳华^{1*}, 李越中^{2*}

(1. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 2. 山东大学生命科学学院微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

[摘要] **目的:** 研究粘细菌的活性次生代谢产物的分离、鉴定及生物学活性。**方法:** 利用稻瘟霉模型筛选活性菌株, 对活性菌株 *Myxococcus xanthus* 095B06 发酵液的甲醇提取物采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、高效液相色谱等手段进行分离纯化化学成分, 通过¹HNMR、¹³CNMR 和 ESI-MS 对化合物进行结构鉴定, 利用纸片扩散法和四甲基偶氮唑盐比色法对单体化合物进行生物活性评价。**结果和结论:** 从粘细菌 095B06 发酵液中分离鉴定了 4 个大环内酯类化合物、1 个甾醇类化合物及 1 个生物碱类化合物, 它们分别为 Avermectin A1a(1)、Avermectin A2a(2)、Avermectin B1a(3)、Avermectin B2a(4)、麦角甾-7, 22-双烯-3, 5, 6-三醇(赛勒维甾醇)(5)和 4-喹啉羧酸(6)。化合物 1~5 为首次从粘细菌中分离得到, 且化合物 2 和 4 对肿瘤细胞 SMMC-7721 具有较强的抑制作用, 其 IC₅₀ 均为 5 μg/ml。

[关键词] 粘细菌目; 代谢产物; 生物学活性**[中图分类号]** R 93 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0266-06**Isolation, identification, and biological characterization of 6 secondary metabolites extracted from *Myxococcus xanthus* 095B06**SHI Xiao-qiong¹, XU Qiang-zhi¹, LIU Xiao-yu¹, HAN Wen-ju¹, LIU Xin-li², JIAO Bing-hua^{1*}, LI Yue-zhong^{2*}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. State Key Laboratory of Microbial Technology, Life Science College, Shandong University, Jinan 250100)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the isolation, identification, and biological characteristics of the secondary metabolites of myxobacteria. **Methods:** A growth inhibition model of *Pyricularia oryzae* was used to screen the active microbes. The compounds extracted with methanol from the fermentation broth of *Myxococcus xanthus* 095B06 were separated by silica chromatography, gel filtration chromatography, and high-performance liquid chromatography. The chemical structures of the compounds were identified by ¹HNMR, ¹³CNMR, ESI-MS, and EI-MS techniques. The bioactive activities of the separated compounds were evaluated by Kirby-Bauer Disc Diffusion method and MTT method. **Results:** Six compounds, namely, Avermectin A1a, Avermectin A2a, Avermectin B1a, Avermectin B2a, ergosta-7, 22-dien-3, 5, 6-triol, and 4-quinolinecarboxylic acid, were obtained. **Conclusion:** Compound 1, 2, 3, 4, and 5 have been isolated from myxobacteria for the first time and compound 2 and 4 can strongly inhibit the growth of SMMC-7721 cell line, with both IC₅₀ values being 5 g/ml.

[KEY WORDS] Myxococcales; metabolites; biological activities

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 266-271]

微生物是产生天然活性化合物的天然宝库。为了提高对微生物资源的利用, 人们把目光投向了以往较少研究的微生物类群。近年来, 粘细菌作为一类可产生丰富次级代谢产物的微生物类群日趋受到重视, 成为一类筛选天然药物的新资源。稻瘟霉模型^[1]作为一种快速、灵敏的筛选抗真菌/肿瘤活性的模型, 已被广泛应用。

本研究利用这一模型对 20 株粘细菌单菌液进行活性筛选, 其中粘细菌 095B06 发酵液对稻瘟霉分生孢子有很强的抑制和诱导变形作用, 其最小诱导变形浓度为 1 : 256 倍。对该菌株进行大规模发酵后, 从其发酵液中先期得到 15 个化合物。利用

¹HNMR、¹³CNMR、ESI-MS 等方法鉴定了其中 6 个化合物的结构, 并对它们进行了抗真菌、细菌和细胞毒活性评价。

1 材料和方法

1.1 仪器和材料 Agilent 1100 高效液相仪,

[基金项目] 上海市优秀学科带头人计划(05XD1423). Supported by Shanghai Outstanding Field Leaders Program(05XD1423)**[作者简介]** 施晓琼, 硕士生. E-mail: shhxiaoqiong@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: jiaobh@mail.uninet.com.cn; lilab@sdu.edu.cn

Bruke-300 及 Bruke-600 核磁共振仪, Micro-Mass Q-TOF 质谱仪, HP5989A 质谱仪。稻瘟霉由日本东京大学分子生物学研究所提供。Sephadex LH20 凝胶为 Pharmacia 公司; 柱层析硅胶(200~300 目), 薄层层析硅胶(40 μm), HSGF₂₅₄ 高效薄层层析板均为烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂生产。

1.2 实验菌株和发酵培养条件 实验菌株由来自中国北京田地土壤中分离纯化。实验菌株 095B06 由山东大学微生物国家重点实验室鉴定为粘细菌粘球菌属(*Myxococcus xanthus* 095B06), 其发酵培养基为 VY/2 (g/L): 鲜酵母 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0, VitB_{12} 0.5 mg, pH 7.2。培养液中加入 1% 体积的中性吸附树脂, 30 $^\circ\text{C}$, 150 r/min, 培养 6 d。

1.3 指示菌和培养条件 指示菌为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisia*)、稻瘟霉(*Pyricularia oryzae*)、黄瓜黑星病菌(*Cladosporium cucumerinum*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)。指示真菌培养条件: 葡萄糖土豆(PDA)培养基, 30 $^\circ\text{C}$, 40 h; 酵母培养基, 37 $^\circ\text{C}$, 18 h; 细菌培养条件: 牛肉膏蛋白胨(BPA)培养基, 37 $^\circ\text{C}$, 18 h。指示菌均由本实验室保存。

1.4 活性成分的提取分离 菌株 095B06 的发酵液过滤取树脂, 以 10 倍树脂体积的水、甲醇依次浸提。浸提物 45 $^\circ\text{C}$ 减压蒸馏除去溶剂, 分别得到水粗提物和甲醇粗提物。甲醇粗提物进行硅胶柱层析, CHCl_3 -MeOH(100:1, 50:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, V/V) 梯度洗脱, 每 250 ml 洗脱液为一收集单位, TLC 检测洗脱进程, 共分得 15 个组分。利用稻瘟霉模型对 15 个组分进行活性筛选, 选择活性较好的 F、H、J 组分进行分离纯化。F 组分(2 g) 通过 ODS 硅胶柱层析, H_2O - CH_3OH (1:1, 1:3, 1:4, 1:9, V/V) 梯度洗脱, 合并 H_2O : CH_3OH (1:9, V/V) 洗脱液, 并利用 HPLC [Agilent C18 (4.6 mm \times 250 mm), 88% MeOH, 1.0 ml/min, 218 nm 检测] 纯化得到化合物 1。H 组分进行硅胶柱层析, CHCl_3 : MeOH(50:1, 30:1, 20:1, V/V) 梯度洗脱, 每 100 ml 洗脱液为一收集单位, TLC 检测洗脱进程, 将 4~10 馏分合并再经 Sephadex LH20 凝胶柱层析, CHCl_3 : MeOH(2:1, V/V) 为流动相, 得到化合物 2; 16~20 馏分合并后进行 Sephadex LH20 凝胶柱层析, CHCl_3 : MeOH(2:1, V/V)

为流动相, 最后经 HPLC [Agilent C18(4.6 mm \times 250 mm), 85% MeOH, 1.0 ml/min, 218 nm 检测] 纯化后得到化合物 3。J 组分通过硅胶柱层析(CHCl_3 -MeOH 梯度洗脱), 合并 32~40 馏分后通过 Sephadex LH20 凝胶柱层析 [CHCl_3 : MeOH(2:1, V/V) 为流动相] 得到化合物 4; 馏分 41~50 合并后再次进行硅胶柱层析(CHCl_3 -MeOH 梯度洗脱) 得到化合物 5; 馏分 50~70 合并后经 HPLC [Waters Altantis C18(4.6 mm \times 250 mm), 18% MeOH, 1.0 ml/min, 218 nm] 检测纯化得到化合物 6。

1.5 样品对真菌和细菌的抑制活性 滤纸片法检测样品对各种指示菌的抑制活性。每张 5 mm 直径的新华滤纸片吸附 20 μg 的化合物, 室温下挥发除尽溶剂, 以抑菌圈直径(mm) 表示活性的大小。

1.6 样品对肿瘤细胞的抑制活性 用 10% DMSO 溶解样品, 样品浓度为 1 mg/ml。在 96 孔培养板上, MTT 法^[2] 分析样品对宫颈癌 HeLa 细胞株系和肝癌 SMMC-7721 细胞株系的抑制活性。各个样品均测定 8 个梯度, IC_{50} 值为细胞的生长一半被抑制时所需要的样品含量, 肿瘤细胞株系均由本实验室保存。

2 结果

2.1 化合物 1 的鉴定 分子式为 $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{O}_{14}$, 白色粉末, 易溶于氯仿。ESI(m/z): 887(M+H), 909.3(M+Na), 925.3(M+K), 确定相对分子质量为 886。¹H NMR(600 MHz, CDCl_3 , δ): 3.331(1H, q, $J=2.4$ Hz, H-2), 5.395(1H, m, H-3), 1.815(3H, s, H-4a), 3.974(1H, m, H-5), 3.505(3H, s, H-5a), 4.032(1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6), 4.662(2H, m, H-8a), 5.883(1H, m, H-9), 5.727(1H, m, H-10), 5.741(1H, m, H-11), 2.523(1H, d, H-12), 1.169(3H, d, $J=7.2$ Hz, H-12a), 3.936(1H, br s, H-13), 1.497(3H, s, H-14a), 5.010(1H, m, H-15), 2.288(2H, m, H-16), 3.858(1H, m, H-17), 0.878(1H, m, H-18), 1.785(1H, m, H-18), 5.390(1H, m, H-19), 1.461(1H, m, H-20), 2.014(1H, m, H-20), 5.760(1H, m, H-22), 5.547(1H, dd, $J=9.6, 2.4$ Hz, H-23), 2.288(1H, m, H-24), 0.923 或 0.904(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-24a), 3.496(1H, m, H-25), 0.904 或 0.923(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-26a), 0.941(3H, t, $J=7.2$ Hz, H-28), 4.774(1H, d, $J=3.0$

Hz, H-1'), 1.570 (1H, m, H-2'), 2.221 (1H, m, H-2'), 3.620 (1H, m, H-3'), 3.433 (3H, m, H-3' a), 3.240 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4'), 3.835 (1H, dq, $J=9.0, 6.0$ Hz, H-5'), 1.256 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-6'), 5.390 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-1''), 1.520 (1H, m, H-2''), 2.329 (1H, m, H-2''), 3.421 (1H, m, H-3''), 3.163 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4''), 3.772 (1H, dq, $J=9.0, 6.0$ Hz, H-5''), 1.275 (1H, q, $J=9.0$ Hz, H-6''); ¹³CNMR (600 MHz, CD₃Cl, δ): 173.99 (C-1), 45.77 (C-2), 118.44 (C-3), 136.18 (C-4), 19.87 (C-4), 77.01 (C-5), 57.79 (C-5), 77.64 (C-6), 80.62 (C-7), 139.90 (C-8), 68.18 (C-8), 119.69 (C-9), 124.91 (C-10), 137.71 (C-11), 39.81 (C-12), 20.24 (C-12), 82.06 (C-13), 135.21 (C-14), 15.12 (C-14), 118.44 (C-15), 34.56 (C-16), 68.43 (C-17), 36.68 (C-17), 68.28 (C-19), 40.55 (C-20), 95.83 (C-21), 136.18 (C-22), 127.91 (C-23), 30.63 (C-24), 16.40 (C-24), 75.01 (C-25), 35.29 (C-26), 12.96 (C-26), 27.56 (C-27), 12.03 (C-28), 95.01 (C-1'), 34.29 (C-2'), 79.42 (C-3'), 54.49 (C-3'), 80.62 (C-4'), 67.32 (C-5'), 17.68 (C-6'), 98.58 (C-1''), 34.29 (C-2''), 78.26 (C-3''), 54.39 (C-3''), 76.22 (C-4''), 68.43 (C-5''), 18.41 (C-6''). 以上数据与文献^[3]基本一致, 确定化合物 **1** 为 Avermectin A1a。

2.2 化合物 2 的鉴定 分子式为 C₄₉H₇₆O₁₅, 白色粉末, 易溶于氯仿。ESI (m/z): 905.4 (M+H), 927.4 (M+Na), 943.4 (M+K), 确定相对分子质量为 904。¹HNMR (600 MHz, CDCl₃, δ): 3.331 (1H, q, $J=2.4$ Hz, H-2), 5.392 (1H, m, H-3), 1.821 (3H, s, H-4a), 3.969 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-5), 3.509 (3H, s, H-5a), 4.037 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6), 4.665 (2H, m, H-8a), 5.827 (1H, m, H-9), 5.728 (1H, m, H-10), 5.739 (1H, m, H-11), 2.529 (1H, d, H-12), 1.170 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-12a), 3.950 (1H, br s, H-13), 1.438 (3H, s, H-14a), 4.980 (1H, m, H-15), 2.317 (2H, m, H-16), 3.768 (1H, m, H-17), 0.855 (1H, m, H-18), 1.780 (1H, m, H-18), 5.310 (1H, m, H-19), 1.438 (1H, t, $J=12$ Hz, H-20), 2.007 (1H, dd, $J=12.6, 3.6$ Hz, H-20), 1.662 (1H, dd, $J=13.2, 3.0$ Hz, H-22), 1.980 (1H, dd, $J=13.2, 3.6$ Hz, H-22), 3.775 (1H, m, H-23), 1.588 (1H, m, H-24), 0.908 (3H, d, $J=6.6$

Hz, H-24a), 3.533 (1H, m, H-25), 1.545 (1H, m, H-26), 0.877 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-26a), 1.482 (2H, m, H-27), 0.967 (3H, t, $J=7.8$ Hz, H-28), 4.765 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-1'), 1.564 (1H, m, H-2'), 2.218 (1H, m, H-2'), 3.572 (1H, m, H-3'), 3.431 (3H, s, H-3' a), 3.244 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4'), 3.832 (1H, dq, $J=9.0, 6.0$ Hz, H-5'), 1.258 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6'), 5.392 (1H, m, H-1''), 1.527 (1H, m, H-2''), 2.340 (1H, m, H-2''), 3.480 (1H, m, H-3''), 3.423 (3H, s, H-3'' a), 3.165 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4''), 3.768 (1H, dq, $J=9.0, 6.0$ Hz, H-5''), 1.278 (1H, q, $J=6.0$ Hz, H-6''); ¹³CNMR (600 MHz, CD₃Cl, δ): 173.79 (C-1), 45.62 (C-2), 118.23 (C-3), 136.13 (C-4), 19.89 (C-4), 76.91 (C-5), 57.78 (C-5a), 77.43 (C-6), 80.55 (C-7), 139.93 (C-8), 68.19 (C-8a), 119.60 (C-9), 124.882 (C-10), 137.61 (C-11), 39.68 (C-12), 20.24 (C-12a), 81.71 (C-13), 135.67 (C-14), 15.12 (C-14a), 117.51 (C-15), 34.47 (C-16), 68.10 (C-17), 36.40 (C-18), 67.64 (C-19), 40.72 (C-20), 99.63 (C-21), 41.16 (C-22), 68.86 (C-23), 35.70 (C-24), 13.75 (C-24a), 70.78 (C-25), 35.11 (C-26), 12.41 (C-26a), 27.25 (C-27), 11.78 (C-28), 94.82 (C-1'), 34.17 (C-2'), 79.31 (C-3'), 56.45 (C-3'), 80.39 (C-4'), 67.24 (C-5'), 18.37 (C-6'), 98.49 (C-1''), 34.17 (C-2''), 78.16 (C-3''), 56.37 (C-3'' a), 76.07 (C-4''), 68.29 (C-5''), 17.65 (C-6''). 根据文献^[3]比对, 与 Avermectin A2a 数据基本一致, 确定化合物 **2** 为 Avermectin A2a。

2.3 化合物 3 的鉴定 分子式为 C₄₈H₇₂O₁₄, 白色粉末, 易溶于氯仿。ESI (m/z): 873.4 (M+H), 895.4 (M+Na), 911.4 (M+K), 确定相对分子质量为 872。与化合物 **1** 对照, 化合物 **3** 的氢谱中 H-5 明显向低场位移, 碳谱中 C-5 位向高场位移, 且氢谱和碳谱中都缺少一甲氧基信号, 其他数据和化合物 **1** 基本一致。¹HNMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 3.283 (1H, q, $J=2.1$ Hz, H-2), 5.409 (1H, m, H-3), 1.859 (3H, s, H-4a), 4.280 (1H, m, H-5), 3.957 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6), 4.673 (2H, m, H-8a), 5.832 (1H, m, H-9), 5.724 (1H, m, H-10), 5.724 (1H, m, H-11), 2.523 (1H, d, H-12), 1.152 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-12a), 3.924 (1H, br s, H-13), 1.477 (3H, s, H-14a), 4.943 (1H, m, H-15), 2.283 (2H,

m, H-16), 3.859 (1H, m, H-17), 0.844 (1H, m, H-18), 1.785 (1H, m, H-18), 5.388 (1H, m, H-19), 1.436 (1H, t, $J=12$ Hz, H-20), 2.010 (1H, dd, $J=12.6, 3.6$ Hz, H-20), 5.539 (1H, dd, $J=9.9, 2.7$ Hz, H-22), 5.773 (1H, m, H-23), 2.283 (1H, m, H-24), 0.900 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-24a), 3.468 (1H, m, H-25), 1.620 (1H, m, H-26), 0.915 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-26a), 1.610 (2H, m, H-27), 0.922 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-28), 4.758 (1H, d, $J=3.0$, H-1'), 1.579 (1H, m, H-2'), 2.212 (1H, m, H-2'), 3.620 (1H, m, H-3'), 3.428 (3H, s, H-3'a), 3.231 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4'), 3.822 (1H, dq, $J=9.3, 6.3$ Hz, H-5'), 1.242 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-6'), 5.388 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-1''), 1.516 (1H, m, H-2''), 2.352 (1H, m, H-2''), 3.468 (1H, m, H-3''), 3.411 (3H, s, H-3''a), 3.153 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4''), 3.757 (1H, dq, $J=9.3, 6.3$ Hz, H-5''), 1.264 (1H, q, $J=6.6$ Hz, H-6''); 13 CNMR (600 MHz, CD_3Cl , δ): 173.74 (C-1), 45.79 (C-2), 118.06 (C-3), 138.09 (C-4), 19.89 (C-4a), 67.75 (C-5), 79.21 (C-6), 80.56 (C-7), 139.72 (C-8), 68.40 (C-8a), 120.44 (C-9), 124.77 (C-10), 138.09 (C-11), 39.84 (C-12), 20.16 (C-12a), 81.97 (C-13), 135.16 (C-14), 15.09 (C-14a), 118.44 (C-15), 34.53 (C-16), 68.40 (C-17), 36.70 (C-18), 68.47 (C-19), 40.54 (C-20), 95.80 (C-21), 127.85 (C-22), 136.19 (C-23), 30.61 (C-24), 16.38 (C-24a), 75.01 (C-25), 35.26 (C-26), 12.94 (C-26a), 27.54 (C-27), 12.01 (C-28), 94.98 (C-1'), 34.27 (C-2'), 79.39 (C-3'), 56.49 (C-3'), 80.43 (C-4'), 67.31 (C-5'), 18.39 (C-6'), 98.55 (C-1''), 34.27 (C-2''), 78.25 (C-3''), 56.37 (C-3''a), 76.18 (C-4''), 68.17 (C-5''), 17.67 (C-6'')。经与文献^[4]数据比较, 确定化合物 **3** 为 Avermectin B1a。

2.4 化合物 **4** 的鉴定 分子式为 $C_{48}H_{74}O_{15}$, 白色粉末, 易溶于氯仿。ESI (m/z): 891.4 (M+H), 913.4 (M+Na), 929.4 (M+K), 确定相对分子质量为 890。与化合物 **2** 对照, 化合物 **4** 的氢谱中 H-5 明显向低场位移, 碳谱中 C-5 位向高场位移, 且氢谱和碳谱中都缺少一甲氧基信号, 其他数据和化合物 **1** 基本一致。 1 HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ): 3.293 (1H, q, $J=2.4$ Hz, H-2), 5.426 (1H, m, H-3), 1.879 (3H, s, H-4a), 4.288 (1H, m, H-5), 3.960

(1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6), 4.681 (2H, m, H-8a), 5.855 (1H, m, H-9), 5.756 (1H, m, H-10), 5.756 (1H, m, H-11), 2.529 (1H, m, H-12), 1.175 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-12a), 3.950 (1H, br s, H-13), 1.512 (3H, s, H-14a), 4.988 (1H, m, H-15), 2.321 (2H, m, H-16), 3.763 (1H, m, H-17), 0.854 (1H, m, H-18), 1.783 (1H, m, H-18), 5.322 (1H, m, H-19), 1.423 (1H, m, H-20), 2.010 (1H, m, H-20), 1.670 (1H, dd, $J=13.8$ Hz, 3.0, H-22), 1.980 (1H, dd, $J=13.8, 3.0$ Hz, H-22), 3.781 (1H, m, H-23), 1.612 (1H, m, H-24), 0.912 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-24a), 3.566 (1H, m, H-25), 1.558 (1H, m, H-26), 0.880 (3H, d, $J=6.3$ Hz, H-26a), 1.479 (1H, m, H-27), 0.969 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-28), 4.767 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-1'), 1.579 (1H, m, H-2'), 1.564 (1H, m, H-2') 2.222 (1H, m, H-2'), 3.629 (1H, m, H-3'), 3.442 (3H, s, H-3'a), 3.244 (1H, t, $J=9.3$ Hz, H-4'), 3.831 (1H, dq, $J=9.3, 6.3$ Hz, H-5'), 1.241 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-6'), 5.396 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-1''), 1.530 (1H, m, H-2''), 2.340 (1H, m, H-2''), 3.481 (1H, m, H-3''), 3.431 (3H, s, H-3''a), 3.163 (1H, t, $J=9.3$ Hz, H-4''), 3.763 (1H, dq, $J=9.3, 6.3$ Hz, H-5''), 1.282 (1H, q, $J=6.6$ Hz, H-6''); 13 CNMR (300 MHz, CD_3Cl , δ): 173.534 (C-1), 45.796 (C-2), 118.076 (C-3), 138.041 (C-4), 19.88 (C-4a), 67.690 (C-5), 79.387 (C-6), 80.440 (C-7), 139.852 (C-8), 68.352 (C-8a), 120.448 (C-9), 124.883 (C-10), 138.050 (C-11), 39.803 (C-12), 20.221 (C-12a), 81.795 (C-13), 135.773 (C-14), 15.166 (C-14a), 117.761 (C-15), 34.221 (C-16), 68.410 (C-17), 36.455 (C-18), 67.690 (C-19), 40.808 (C-20), 99.435 (C-21), 41.199 (C-22), 69.880 (C-23), 35.758 (C-24), 13.809 (C-24a), 70.919 (C-25), 35.150 (C-26), 11.899 (C-26a), 27.333 (C-27), 11.394 (C-28), 94.908 (C-1'), 34.399 (C-2'), 79.307 (C-3'), 56.375 (C-3'), 80.512 (C-4'), 67.291 (C-5'), 18.418 (C-6'), 98.617 (C-1''), 34.221 (C-2''), 78.320 (C-3''), 56.408 (C-3''a), 76.109 (C-4''), 68.210 (C-5''), 17.407 (C-6'')。和文献^[3]对照, 确定化合物 **4** 为 Avermectin B2a。

2.5 化合物 **5** 的鉴定 分子式为 $C_{28}H_{46}O_3$, 白色粉末, 易溶于甲醇。EI/MS m/z (%): 412 (12.84),

398(1.45), 397(7.41), 395(1.81), 394(9.40), 383(12.66), 380(7.32), 379(24.50), 269(17.54), 251(20.89)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 2.091(1H, m, H-1), 2.058(1H, m, H-1), 1.832(2H, m, H-2), 4.050(1H, m, H-3), 1.676(2H, m, H-4), 3.563(1H, m, H-6), 5.318(1H, m, H-7), 1.986(1H, m, H-9), 1.551(2H, m, H-11), 1.588(2H, m, H-12), 1.936(1H, m, H-14), 1.570(1H, m, H-15), 1.481(1H, m, H-15), 1.756(1H, m, H-16), 1.321(1H, m, H-16), 1.308(1H, m, H-17), 0.611(3H, s, H-18), 1.061(3H, s, H-19), 2.041(1H, m, H-20), 1.014(3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-21), 5.195(1H, m, H-22), 5.211(1H, m, H-23), 1.868(1H, m, H-24), 1.513(1H, m, H-25), 0.825(1H, d, *J* = 5.1 Hz, H-26), 0.843(3H, d, *J* = 5.1 Hz, H-27), 0.919(3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-28); ¹³C NMR (300 MHz, CD₃Cl, δ): 31.187 (C-1), 32.542 (C-2), 67.035 (C-3), 40.672(C-4), 75.707(C-5), 73.888(C-6), 119.268(C-7), 142.136(C-8), 42.921(C-9), 36.773(C-10), 21.734 (C-11), 39.063 (C-12), 43.422 (C-13), 54.498 (C-14), 22.682 (C-15), 27.732 (C-16),

55.750 (C-17), 11.970 (C-18), 18.041 (C-19), 40.220 (C-20), 20.815 (C-21), 135.280 (C-22), 131.837 (C-23), 42.602 (C-24), 32.847 (C-25), 19.325(C-26), 19.640(C-27), 17.290(C-28)。以上数据与文献^[5]基本一致,确定化合物 **5** 为赛勒维甾醇(cerevisterol)。

2.6 化合物 **6** 的鉴定 分子式为 C₁₀H₇O₂N, 白色粉末, 易溶于甲醇。EI/MS *m/z* (%): 172(4.97), 156(2.31), 128(5.58), 85(60.31), 71(82.97), 57(100)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 8.788(1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-2), 7.459(1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-3), 8.006(1H, dt, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H-5), 7.692(1H, td, *J* = 8.7, 8.4, 1.8 Hz, H-6), 7.552(1H, td, *J* = 8.7, 8.4, 1.8 Hz, H-7), 8.206(1H, dt, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H-8); ¹³C NMR (300 MHz, CD₃Cl, δ): 149.271 (C-2), 118.621 (C-3), 141.670 (C-4), 128.750 (C-5), 130.171 (C-6), 127.698 (C-7), 125.211 (C-8), 147.670 (C-9), 124.255 (C-10), 169.997(4-COOH)。经与文献^[6]数据对比,确定化合物 **6** 为 4-喹啉羧酸(4-quinolinecarboxylic acid)。

化合物 **1~6** 的结构见图 1。

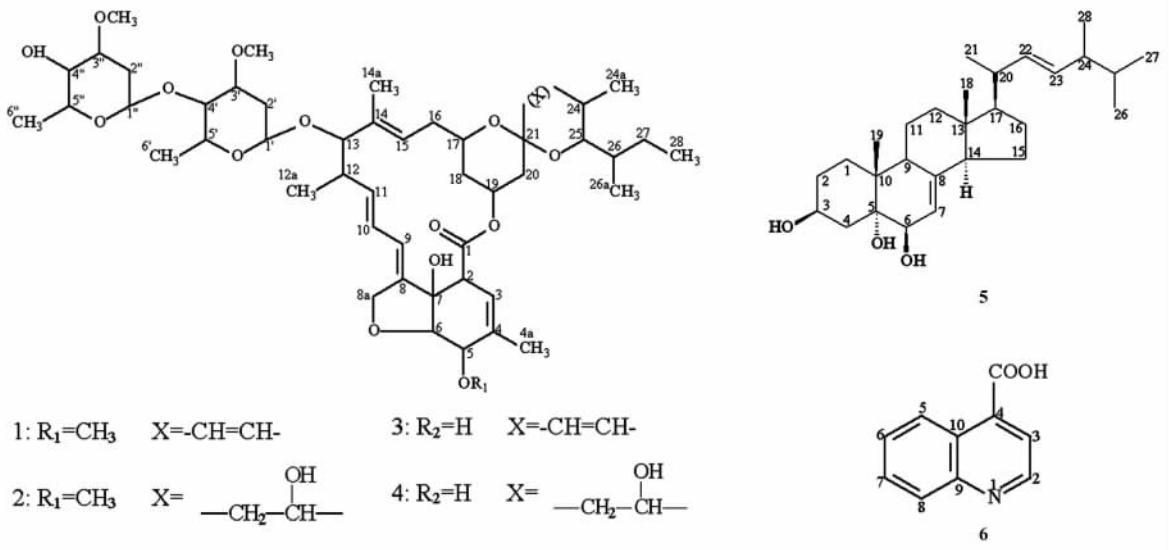


图 1 化合物 **1~6** 的结构
 Fig 1 Structures of compound 1-6

2.7 活性筛选结果 粘细菌的次生代谢产物化合物 **1~6** 对酿酒酵母、黄瓜黑星病菌、枯草杆菌、大肠杆菌均无抑制活性, 化合物 **1~5** 对稻瘟霉有轻微的抑制

活性, 这 5 种化合物都能抑制肿瘤细胞 SMMC-7721、Hela 的生长, 且化合物 **2** 和 **4** 能明显抑制肿瘤细胞 SMMC-7721 的生长(图 2), 其 IC₅₀ 均为 5 μg/ml。

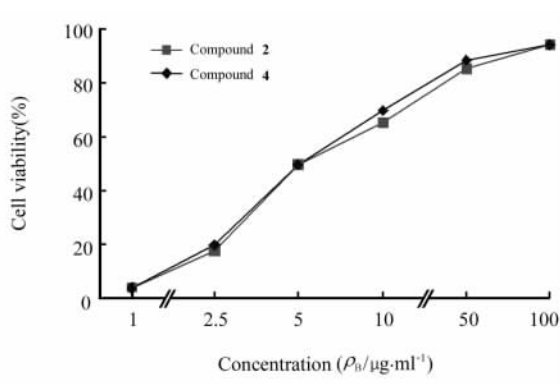


图2 化合物2和4对SMMC-7721肝癌细胞株的生长抑制作用

Fig 2 Inhibitory effect of compound 2 and 4 on growth of SMMC-7721 cell line

3 讨论

本实验首次对从粘球菌 *Myxococcus xanthus* 095B06 的次生代谢产物进行研究。研究结果显示: Avermectins 为菌株 *Myxococcus xanthus* 095B06 的主要次生代谢产物,且 Avermectins 及赛勒维甾醇均首次从粘细菌中发现,化合物 6(4-喹啉羧酸)曾在粘细菌 *Archangium gephyra* 的代谢产物中报道^[6]。生物学活性结果表明化合物 1~5 具有细胞毒活性,化合物 1~4 为一类衍生物,化合物 1、2

结构中 C-5 位有甲氧基取代,化合物 3、4 结构中 C-5 位有羟基取代,化合物 1、3 结构中在 22 和 23 位有一双键,化合物 2、4 结构中 22 和 23 位无双键,且 C-23 位有羟基取代。结合活性推测 22 和 23 位无双键且 C-23 位有羟基取代可使活性增强,而 C-5 位羟基被甲基化对活性无明显影响,由于本文筛选得到的该类化合物数量较少,该类化合物的构效关系有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 宋志刚,许强芝,鲁心安,等. 利用真菌分生孢子筛选抗真菌活性的海洋微生物[J]. 第二军医大学学报,2005,26:1300-1301.
- [2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. J Immunol Methods, 1983, 65:55-63.
- [3] Albers-schönberg G, Arison B H, Chabala J C, et al. Avermectins structure determination[J]. J Am Chem Soc, 1981, 103:4216-4221.
- [4] Hanessian S, Dubé D, Hodges P J. Studies on the deconjugation-epimerization strategy en route to avermectin B_{1a}: problems and solutions[J]. J Am Chem Soc, 1987, 109:7063-7067.
- [5] Gao J M, Hu L, Liu J K. A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*[J]. Steroids, 2001, 66:771-775.
- [6] Bhlendorf B, Forche E, Bedorf N, et al. Antibiotics from gliding bacteria, LXIII indole and quinoline derivatives as metabolites of tryptophan in myxobacteria[J]. Liebigs Ann, 1996 (1):49-53.

[收稿日期] 2006-11-13

[修回日期] 2007-02-09

[本文编辑] 尹 茶

· 书 讯 ·

《临床技术操作规范——普通外科分册》已出版

2006年12月由人民军医出版社出版,16开,精装,235页,28.4万字。本书系国家卫生部委托中华医学会组织全国著名专家集体编写的权威性技术操作规范。全书共18章,分别对肠内外营养、甲状腺、乳房、胃肠、肝、胆、胰、脾、血管及腹腔镜等外科手术操作进行系统规范。每项操作均对适应证、禁忌证、操作方法及程序、注意事项等做了具体规定。本书内容科学实用、可操作性强,对于规范普通外科技术操作,提高医疗质量有着重要指导作用。适于普通外科医师和医疗行政管理人员使用。定价:75.00元。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市100036信箱188分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168。E-mail: wanglan@pmmpp.com.cn