

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01284

· 论 著 ·

仿刺参共附生放线菌 *Brevibacterium* sp. 中的环二肽成分的分离和鉴定

宫俊¹, 汤华¹, 耿婉丽¹, 刘宝姝¹, 孙鹏¹, 李玲¹, 李志勇^{2*}, 张文^{1*}

1. 第二军医大学药学院海洋药物研究中心, 上海 200433

2. 上海交通大学生命科学技术学院海洋生物技术实验室, 上海 200240

[摘要] **目的** 对仿刺参共附生放线菌 *Brevibacterium* sp. 的次生代谢产物进行研究。**方法** 运用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相色谱 (HPLC) 等现代色谱技术对放线菌的乙酸乙酯提取物进行分离纯化, 在核磁共振 (NMR)、质谱 (MS) 等现代波谱技术及与文献比对的基础上对其结构进行鉴定。**结果** 共分离得到 7 个环二肽类化合物, 分别鉴定为: 环-(L-脯氨酸-L-苯丙氨酸)(1)、环-(L-脯氨酸-L-甲硫氨酸)(2)、环-(L-脯氨酸-L-酪氨酸)(3)、环-(L-脯氨酸-L-缬氨酸)(4)、环-(L-脯氨酸-L-脯氨酸)(5)、环-(L-缬氨酸-甘氨酸)(6)、环-(L-脯氨酸-L-亮氨酸)(7)。**结论** 本研究是对仿刺参共附生微生物次生代谢产物研究的首次报道, 这 7 个化合物均为首次从放线菌 *Brevibacterium* sp. 中分离得到。

[关键词] 海参; 仿刺参; 放线菌; 环二肽**[中图分类号]** R 931.77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)12-1284-04

Cyclic dipeptides in actinomycete *Brevibacterium* sp. associated with sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka: isolation and identification

GONG Jun¹, TANG Hua¹, GENG Wan-li¹, LIU Bao-shu¹, SUN Peng¹, LI Ling¹, LI Zhi-yong^{2*}, ZHANG Wen^{1*}

1. Research Center for Marine Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Marine Biotechnology Laboratory, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective** To investigate the secondary metabolites of actinomycete *Brevibacterium* sp. associated with the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. **Methods** The ethyl acetate extract of the actinomycete was purified by repeated column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, and high-performance liquid chromatography (HPLC) to obtain pure compounds; and the compound structures were elucidated by spectroscopic analysis (nuclear magnetic resonance, NMR; mass spectrometry, MS) and the results were compared with the previously reported data. **Results** Seven compounds were isolated; cyclo-(L-Pro-L-Phe) (1), cyclo-(L-Pro-L-Met) (2), cyclo-(L-Pro-L-Tyr) (3), cyclo-(L-Pro-L-Val) (4), cyclo-(L-Pro-L-Pro) (5), cyclo-(L-Val-Gly) (6), and cyclo-(L-Pro-L-Leu) (7). **Conclusion** This is the first report on the secondary metabolites of microorganisms associated with the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka, and all the seven compounds have been reported from the actinomycete *Brevibacterium* sp. for the first time.

[Key words] sea cucumber; *Apostichopus japonicus* Selenka; actinomycete; *Brevibacterium* sp.; cyclic dipeptide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12):1284-1287]

海参属于无脊椎棘皮动物, 全世界约有 1 000 多种, 在我国有 140 多种^[1]。海参用药历史悠久, 清代《本草纲目拾遗》中将海参列为补益药物, 书中记载“海参性温补, 味甘咸, 补肾经, 益精髓, 消痰涎, 摄小便, 壮阳疗痿, 杀疮虫”。现代研究发现海参中的成

分具有溶血、抗真菌、抗肿瘤、抗氧化、阻断神经肌肉传导等显著的生物活性^[2], 引起了人们极大的研究兴趣。海参共附生微生物作为其生态体系的共同组成部分, 也越来越多地受到化学家及生态学家的重视。近年来已有对海参共附生微生物次生代谢产物

[收稿日期] 2012-10-23 **[接受日期]** 2012-11-28**[基金项目]** 国家自然科学基金(30873200, 41176125), 上海市浦江人才计划(PJ2008). Supported by National Natural Science Foundation of China (30873200, 41176125) and Shanghai Pujiang Talent Program (PJ2008).**[作者简介]** 宫俊, 硕士生. E-mail: gongjun_1986@126.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-34204036, E-mail: zyli@sytu.edu.cn; Tel: 021-81871257, E-mail: wenzhang1968@163.com

研究的报道,包括从日本海海参 *Eupentacta fraudatrix* 表皮真菌 *Acremonium striatisporum* 中分离得到的一系列具有中等细胞毒活性的二萜皂苷^[3-6],以及从黄海海参共生真菌 *Epicoccum* spp. 中分离得到的甾醇、丁二酸及苯吡喃类化合物^[7]。

在寻找海洋活性物质的过程中,本课题组已对我国 20 多种海参进行了系统的研究。我们在对仿刺参的活性成分进行研究的过程中,发现了多种具有显著生物活性的成分^[8-9]。为系统研究仿刺参与其共生微生物间的相互关系,我们又开始对仿刺

参共生微生物的次生代谢产物进行研究,在得到药源性活性物质的同时,考察其可能的生态作用。

本研究中的放线菌是从仿刺参体壁分离得到,根据 16S RNA 基因系统发育分析鉴定为 *Brevibacterium* sp.,运用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱以及高效液相色谱(HPLC)等分离纯化技术对该放线菌的次生代谢产物进行分离纯化,得到 7 种环二肽类化合物,并运用核磁共振(NMR)、质谱(MS)等现代波谱技术结合文献报道对这些化合物进行结构鉴定。化合物的结构式见图 1。

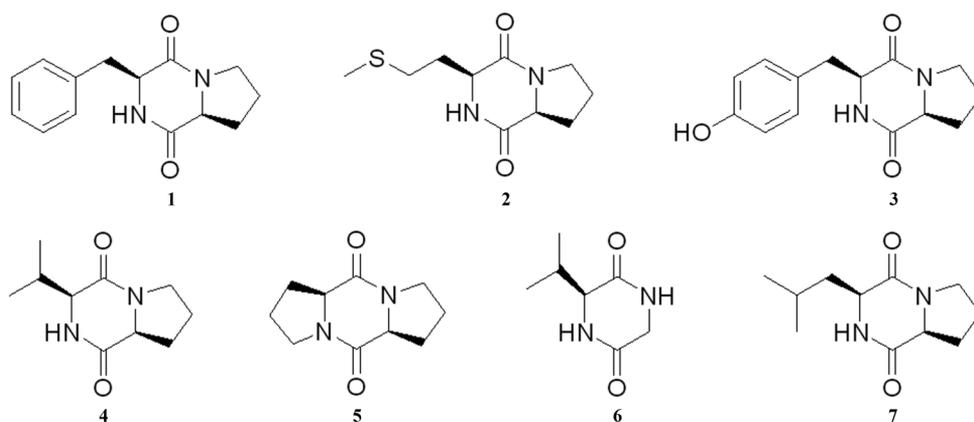


图 1 7 种环二肽类化合物的结构式
Fig 1 Structures of cyclic dipeptides 1-7

1 材料和方法

1.1 样品 实验所用菌株由上海交通大学李志勇教授课题组从仿刺参体壁分离得到,根据 16S RNA 基因系统发育分析鉴定为 *Brevibacterium* sp.,现保存在第二军医大学药学院海洋药物研究中心,编号为 HS-30。将菌株接种到 M1 培养基(10 g 可溶性淀粉,4 g 酵母,2 g 蛋白胨,1 L 人造海水)上,28℃、130 r/min 条件下,摇瓶内液体培养 1 周,共培养 30 L。

1.2 主要仪器与试剂 HZQ-F280 型全温震荡培养箱;LDZH-200KBS 型立式压力蒸汽灭菌器;Bruker Avance-500、Avance-400 核磁共振仪;MAT-212 质谱仪;SGW-1 自动旋光仪;XT5 显微熔点测定仪;Agilent 1100 高效液相色谱仪[RID 检测器,Zorbax 300-C₁₈柱(250 mm×9.4 mm, 5 μm)];TLC 薄层板和柱色谱硅胶均由烟台黄务硅胶开发实验厂提供;Sephadex LH-20 凝胶由 Amersham Pharmacia Biotech 生产;开放柱色谱所用溶剂为分析纯,HPLC 所用试剂为色谱纯,均由国药集团上海化学试剂公司生产。

1.3 代谢产物的提取与分离 30 L *Brevibacterium* sp. 发酵液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,减压浓缩得粗浸膏 2.2 g。该浸膏经硅胶柱层析梯度洗脱(二氯甲烷:丙酮=50:1~1:2)得到 23 个组分(Fr. 1~Fr. 23)。Fr. 12(213.1 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(CHCl₃:MeOH=2:1)及正相硅胶柱色谱(10~40 μm 硅胶、二氯甲烷:丙酮=5:1洗脱)分离纯化得到化合物 1(20.8 mg)和 2(3.6 mg);Fr. 15(103.5 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(CHCl₃:MeOH=2:1)及正相硅胶柱色谱(10~40 μm 硅胶、二氯甲烷:丙酮=8:1洗脱)分离纯化得到化合物 3(10.2 mg)和 4(1.5 mg);Fr. 17(412.9 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(CHCl₃:MeOH=2:1)及正相硅胶柱色谱(10~40 μm 硅胶、二氯甲烷:丙酮=2:1洗脱)分离纯化得到化合物 5(49.4 mg);Fr. 20(191.2 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(CHCl₃:MeOH=2:1)、正相硅胶柱色谱(10~40 μm 硅胶、二氯甲烷:丙酮=8:1洗脱)及 HPLC(流动相:26%甲醇-水;流速:1.5 ml/min;柱温:30℃)分离纯化得到化

合物 **6**(1.4 mg)和 **7**(2.6 mg)。

2 结果

2.1 化合物 **1** 的结构鉴定 白色针晶(甲醇), m. p. 189~193°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -92.6^\circ$ (*c* 0.36, CDCl_3); ESI-MS(*m/z*): 245.14 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 4.05(1H, t, *J* = 7.5 Hz, α -H Pro), 2.31(1H, m, β -H Pro), 1.96(1H, m, β -H Pro), 1.98(2H, m, γ -H Pro), 3.60(2H, m, δ -H Pro), 4.25(1H, dd, *J* = 10.4, 2.9 Hz, α -H Phe), 2.78(1H, dd, *J* = 18.5, 10.3 Hz, β -H Phe), 3.57(1H, m, β -H Phe), 7.20(2H, m, 2,6-H Phe), 7.34(2H, m, 3,5-H Phe), 7.33(1H, m, 4-H Phe), 5.92(1H, s, N-H Phe)。以上数据与文献[10-11]对照一致,故化合物 **1** 鉴定为环-(*L*-脯氨酸-*L*-苯丙氨酸)。

2.2 化合物 **2** 的结构鉴定 淡黄色粉末, m. p. 165~167°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -83.2^\circ$ (*c* 0.15, EtOH); ESI-MS(*m/z*): 251.14 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 227.14 ($[\text{M}-\text{H}]^-$); $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4): 4.23(1H, m, α -H Pro), 2.31(1H, m, β -H Pro), 1.97(1H, m, β -H Pro), 1.92(1H, m, γ -H Pro), 1.98(1H, m, γ -H Pro), 3.51(2H, m, δ -H Pro), 4.26(1H, m, α -H Met), 2.07(1H, m, β -H Met), 2.20(1H, m, β -H Met), 2.62(2H, m, γ -H Met), 2.00(3H, s, δ -H Met); $^{13}\text{CNMR}$ (100 MHz, Methanol- d_4): 60.3(α -C Pro), 29.3(β -C Pro), 23.5(γ -C Pro), 46.4(δ -C Pro), 172.6(CO Pro), 55.3(α -C Met), 30.2(β -C Met), 30.4(γ -C Met), 15.1(δ -C Met), 167.9(CO Met)。以上数据与文献[10,12]对照一致,故化合物 **2** 鉴定为环-(*L*-脯氨酸-*L*-甲硫氨酸)。

2.3 化合物 **3** 的结构鉴定 白色粉末, m. p. 88~90°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -118.9^\circ$ (*c* 0.26, EtOH); ESI-MS(*m/z*): 261.12 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5): 4.54(1H, t, *J* = 5.4 Hz, α -H Pro), 3.55(1H, m, β -H Pro), 3.33(1H, m, β -H Pro), 1.57(2H, m, γ -H Pro), 3.63(1H, m, δ -H Pro), 3.39(1H, m, δ -H Pro), 4.14(1H, dd, *J* = 8.9, 7.5 Hz, α -H Tyr), 3.33(1H, dd, *J* = 14.5, 6.5 Hz, β -H Tyr), 3.57(1H, dd, *J* = 14.5, 6.5 Hz, β -H Tyr), 7.10(2H, d, *J* = 8.4 Hz, 2,6-H Tyr), 7.41(2H, d, *J* = 8.4 Hz, 3,5-H Tyr), 8.52(1H, s, N-H Tyr)。以上数据与文献[10-11,13]对照一致,故化合物 **3**

鉴定为环-(*L*-脯氨酸-*L*-酪氨酸)。

2.4 化合物 **4** 的结构鉴定 白色粉末, m. p. 145~147°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -139.7^\circ$ (*c* 0.16, EtOH); ESI-MS(*m/z*): 197.12 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4): 4.20(1H, t, *J* = 7.7 Hz, α -H Pro), 2.32(1H, m, β -H Pro), 2.02(1H, m, β -H Pro), 1.94(2H, m, γ -H Pro), 3.52(2H, m, δ -H Pro), 4.02(1H, s, α -H Val), 2.48(1H, m, β -H Val), 1.00(3H, d, *J* = 6.5 Hz, γ -H Val), 0.92(3H, d, *J* = 7 Hz, γ -H Val)。以上数据与文献[10-11,14]对照一致,故化合物 **4** 鉴定为环-(*L*-脯氨酸-*L*-缬氨酸)。

2.5 化合物 **5** 的结构鉴定 白色晶体(甲醇), m. p. 183~187°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -130.5^\circ$ (*c* 0.15, EtOH); ESI-MS(*m/z*): 195.11 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4): 4.33(1H \times 2, t, *J* = 7.5 Hz, α -H Pro), 2.31(1H, m, β -H Pro), 1.98(1H \times 2, m, β -H Pro), 1.98(2H \times 2, m, γ -H Pro), 3.48(2H \times 2, m, δ -H Pro); $^{13}\text{CNMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4): 62.0(CH \times 2, α -C Pro), 29.0(CH $_2$ \times 2, β -C Pro), 24.5(CH $_2$ \times 2, γ -C Pro), 46.5(CH $_2$ \times 2, δ -C Pro), 168.9(CO \times 2)。以上数据与文献[15-16]对照一致,故化合物 **5** 鉴定为环-(*L*-脯氨酸-*L*-脯氨酸)。

2.6 化合物 **6** 的结构鉴定 白色固体, m. p. 150~152°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -59.3^\circ$ (*c* 0.16, EtOH); ESI-MS(*m/z*): 157.09 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); $^1\text{HNMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4): 3.73(1H, d, *J* = 3.5 Hz, α -H Val), 2.24(1H, m, β -H Val), 1.02(3H, d, *J* = 7 Hz, γ -H Val), 0.96(3H, d, *J* = 7 Hz, γ -H Val), 3.97(1H, d, *J* = 18 Hz, α -H Gly), 3.84(1H, d, *J* = 18 Hz, α -H Gly); $^{13}\text{CNMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4): 62.0(α -C Val), 34.7(β -C Val), 19.2(γ -C Val), 17.5(γ -C Val), 170.6(CO Val), 45.5(α -C Gly), 169.1(CO Gly)。以上数据与文献[16]对照一致,故化合物 **6** 鉴定为环-(*L*-缬氨酸-甘氨酸)。

2.7 化合物 **7** 的结构鉴定 白色针晶(甲醇), m. p. 213~215°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -134.0^\circ$ (*c* 0.12, CDCl_3); ESI-MS(*m/z*): 211.14 ($[\text{M} + \text{H}]^+$); $^1\text{HNMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 4.11(1H, t, *J* = 8.5 Hz, α -H Pro), 2.35(1H, m, β -H Pro), 2.02(1H, m, β -H Pro), 2.08(2H, m, γ -H Pro), 3.56(2H, m, δ -H Pro), 4.02(1H, dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, α -H Leu), 2.35(1H, m, β -H Leu), 2.02(1H, m, β -H Leu), 1.15(1H, m, γ -H Leu), 0.99(3H, d, *J* = 6.5 Hz, δ -H

Leu), 0.95(3H, d, $J=7$ Hz, δ -H Leu), 5.98(1H, s, N-H Leu)。以上数据与文献[10-11]对照一致, 故化合物 7 鉴定为环-(L-脯氨酸-L-亮氨酸)。

3 讨论

迄今为止, 国内外尚未有关于仿刺参共生微生物次生代谢产物化学成分的报道。我们从仿刺参体壁分离得到放线菌 *Brevibacterium* sp., 并对该菌的次生代谢产物进行研究, 得到 7 个环二肽类化合物, 经鉴定该 7 个化合物均为首次从放线菌 *Brevibacterium* sp. 中分离得到。

很多陆生动植物及微生物中均有环二肽类成分的报道, 海洋微生物更是环二肽类化合物的丰富资源。到目前为止, 从海洋细菌、海洋真菌、红树林内生真菌的代谢产物中已分离出大量的环二肽类化合物^[17]。环二肽类化合物具有不同程度的抗肿瘤、抑菌、免疫抑制等活性, 并且对心血管系统及神经元有保护作用^[17]。其中最为人所知的是免疫抑制剂胶霉毒素(gliotoxin), 该化合物是最早发现于缨粘帚霉 *Gliocladium fimbriatum* 中的环二肽^[18]。另外, 人们发现从渤海湾的淤泥放线菌 11014 中获得的 4 个环二肽具有不同程度的抗鳗弧菌作用^[19]。

本研究获得的环二肽类化合物与之前研究发现的海参中皂苷类主要生态活性物质^[9]在结构及生源上显然相去甚远, 该放线菌及环二肽类代谢产物在海参化学防御机制中的作用还有待进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 廖玉麟. 中国动物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 611.
- [2] 姜健, 杨宝灵, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究[J]. 生物技术通讯, 2004, 15: 537-540.
- [3] Afiyatullo S S, Kuznetsova T A, Isakov V V, Pivkin M V, Prokof'eva N G, Elyakov G B. New diterpenic altrosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber[J]. J Nat Prod, 2000, 63: 848-850.
- [4] Afiyatullo S S, Kalinovsky A I, Kuznetsova T A, Isakov V V, Pivkin M V, Dmitrenok P S, et al. New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber[J]. J Nat Prod, 2002, 65: 641-644.
- [5] Afiyatullo S S, Kalinovsky A I, Kuznetsova T A, Pivkin M V, Prokof'eva N G, Dmitrenok P S, et al. New glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber[J]. J Nat Prod, 2004, 67: 1047-1051.
- [6] Afiyatullo S S, Kalinovsky A I, Pivkin M V, Dmitrenok P S, Kuznetsova T A. New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber[J]. Nat Prod Res, 2006, 20: 902-908.
- [7] 夏雪奎, 刘新, 张永刚, 袁文鹏, 张锦松, 刘昌衡. 海参共生微生物 HS-1 *Epicoccum* spp. 次级代谢产物的研究[J]. 中药材, 2010, 33: 1577-1579.
- [8] La M P, Li C, Li L, Sun P, Tang H, Liu B S, et al. New bioactive sulfated alkenes from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Chem Biodivers, 2012, 9: 1166-1171.
- [9] Wang Z L, Zhang H W, Gong W, Tang H, Yi Y H, Zhang W, et al. Antifungal nortriterpene and triterpene glycosides from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Food Chem, 2012, 132: 295-300.
- [10] Gamini S J, Maureen P T, Alan C L, Julia E G, Bill J B. Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium *Pseudomonas*[J]. J Nat Prod, 1996, 59: 293-296.
- [11] 沈明曦, 陈刚, 田黎, 易国卿, 杨硕, 裴月湖. 海洋细菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)中环二肽类代谢产物的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28: 350-353.
- [12] 石姐姐, 徐俊, 沈月毛. 从假单胞菌 1896 中分离到的五个环二肽类化合物[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2011, 50: 637-640.
- [13] 熊江, 周俊, 戴好富, 谭宁华, 丁中涛. 多蕊商陆的化学成分[J]. 云南植物研究, 2001, 24: 401-405.
- [14] Wang S M, Tan N H, Yang Y B, He M. Cyclodipeptides from the roots of *Panax Notoginseng*[J]. Nat Prod Res Dev, 2004, 16: 383-386.
- [15] 丁中涛, 保志娟, 杨雪琼, 江明. 金铁锁根中的 3 个环二肽[J]. 中国中药杂志, 2003, 28: 337-339.
- [16] 刘友涛. 几种 2,5-二酮哌嗪类化合物的合成及其生物研究[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2011.
- [17] 杨子娟, 向兰, 邢杰, 郑毅男. 环二肽的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2009, 24: 73-81.
- [18] Gardiner D M, Waring P, Hewlett B J. The epipolythiodioxopiperazine(ETP) class of fungal toxins; distribution, mode of action, functions and biosynthesis[J]. Microbiology, 2005, 151: 1021-1032.
- [19] 李德海, 顾谦群, 朱伟明, 刘红兵, 方玉春, 朱天骄. 海洋放线菌 11014 中抗肿瘤活性成分的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30: 449-468.

[本文编辑] 尹茶