

海洋来源链霉菌 IMB18-531 与枝孢菌 IMB19-099 共培养代谢产物研究

李莎莎^{1#}, 李琴^{1,2#}, 李翊铭¹, 商悦¹, 何红伟¹, 陈淑珍¹, 舒积成^{2*}, 甘茂罗^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 国家新药微生物筛选实验室, 北京 100050;
2. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: 利用中压反相色谱、凝胶柱色谱和 HPLC 等多种色谱分离方法对两株海洋来源微生物——链霉菌 IMB18-531 与枝孢菌 IMB19-099 的共培养发酵物进行分离纯化, 共分离得到 9 个化合物。根据波谱学数据分析并结合化学方法, 分别鉴定为: 铝草氨酸 E (1)、去铁胺 E (2)、铁草氨酸 E (3)、terragine E (4)、卡巴西霉素 (5)、环(L-脯氨酸-L-酪氨酸) (6)、邻氨基苯甲酸 (7)、(Z)-14-甲基十五烷-9-烯酸 (8) 和 (Z)-十六烷-8-烯酸 (9)。其中, 化合物 1 为新化合物。活性筛选结果表明, 化合物 2 显示出抗肝纤维化活性, 能够抑制肝纤维化相关基因 *COL1A1*、*MMP2* 和 *TIMP2* 的表达。化合物 5、8 和 9 对甲氧西林耐药金葡菌、表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌显出抗菌活性, MIC 为 16~64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。化合物 5 对人胰腺癌细胞 MIA Paca-2 和结肠癌细胞 HT-29 显示出显著的细胞毒活性, IC_{50} 分别为 2.9 和 6.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 海洋微生物; 共培养; 铁载体; 抗肝纤维化; 去铁胺 E

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-0967-08

Identification of the metabolites from co-cultures of marine *Streptomyces* sp. IMB18-531 and *Cladosporium* sp. IMB19-099

LI Sha-sha^{1#}, LI Qin^{1,2#}, LI Yi-ming¹, SHANG Yue¹, HE Hong-wei¹, CHEN Shu-zhen¹,
SHU Ji-cheng^{2*}, GAN Mao-luo^{1*}

(1. Laboratory for Screening New Microbial Drugs, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicines, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: A new siderophore chelate (1) and 8 known compounds were identified from the liquid co-cultures of the marine-derived *Streptomyces* sp. IMB18-531 and *Cladosporium* sp. IMB19-099 by a combination of chromatography methods, including C18 reversed-phase medium pressure chromatography, gel column chromatography and HPLC. Their structures were determined by spectroscopic analysis and chemical methods as aluminioxamine E (1), desferrioxamine E (2), ferrioxamine E (3), terragine E (4), capsimicin (5), cyclo(L-prolinyl-L-tyrosine) (6), anthranilic acid (7), (Z)-14-methylpentadec-9-enoic acid (8), and (Z)-hexadec-8-enoic acid (9). Compound 2 showed inhibitory activities against the expression of liver fibrosis related genes *COL1A1*, *MMP2*, and *TIMP2*. Compounds 5, 8, and 9 displayed antibacterial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and

收稿日期: 2022-10-28; 修回日期: 2022-12-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82273830, 81872781); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (CIFMS, 2021-I2M-1-055).

#同等贡献.

*通讯作者 Tel: 86-10-63165277, E-mail: shujc210@jxutcm.edu.cn; ganml@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1130

Bacillus subtilis, with MICs of 16-64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Compound **5** showed cytotoxicities against human pancreatic cancer MIA Paca-2 and human colon cancer HT-29 cell lines with IC_{50} of 2.9 and 6.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

Key words: marine microorganism; co-culture; siderophore; anti-hepatic fibrosis; desferrioxamine E

海洋微生物蕴含结构多样的次级代谢产物,是药物先导物发现具有潜力的资源^[1-3]。一种微生物基因组中通常含有20种以上的次级代谢生物合成基因簇^[4,5]。在常规实验培养条件下,多数次级代谢基因处于沉默状态。挖掘微生物的沉默基因潜能有望发现更多结构新颖的活性产物^[6,7]。近年来,包括共培养、核糖体工程、单种多化合物 (one strain many compounds, OSMAC)、化学诱导、转录因子调控及CRISPR-Cas9启动子置换等技术被应用于微生物基因组挖掘研究^[6]。其中,共培养是将两种或多种微生物在同一容器中进行混合培养,通过模拟自然界微生物种群间相互竞争的环境,从而激活微生物基因组中化学防御机制相关的沉默基因表达^[8,9]。研究表明,利用共培养策略诱导产生的新颖次级代谢产物,大多具有抗菌、抗病毒和细胞毒等广泛的生物活性^[10-12]。

在对海洋微生物开展活性产物研究的过程中^[13-16],本课题组利用平板对分离的海洋微生物进行共培养筛选,发现海洋来源的链霉菌 *Streptomyces* sp. IMB18-531 与枝孢属真菌 *Cladosporium* sp. IMB19-099, 在平板上显示出显著的相互抑制作用,二者的液体共培养发酵产物较单一菌株培养发酵产物对铜绿假单胞菌、白色念珠菌等多种致病菌的抗菌活性显著增强。LC-MS 数据分析表明,共培养发酵产物中产生了多个未知组分,一些组分的含量显著升高。通过进一步放大发酵和分离纯化,从共培养产物中分离鉴定了9个化合物(图1),发现一个新的铁载体螯合物,对分离的化合物进行了抗肝纤维化、抗菌和肿瘤细胞毒活性筛选。本文主要报道两株海洋微生物共培养产物及其活性筛选结果。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 **1** 为浅黄色粉末,UV 光谱在 218 nm 显示出最大吸收峰。HR-ESI-MS 谱在 m/z 625.315 6 给出准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 结合 NMR 数据确定其分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_9\text{Al}$ ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_9\text{Al}$ 计算值 625.314 2)。化合物 **1** 的 ^1H NMR 谱中显示出两组连氮亚甲基质子 (δ_{H} 4.02, m; 3.53, m; 3.53, m; 2.90, m) 以及在 δ_{H} 1.24~3.00 处的 5 组脂肪亚甲基质子信号。 ^{13}C NMR 谱显示出 9 个碳信号,包括 2 个羰基碳 (δ_{C} 174.3、164.3), 7 个

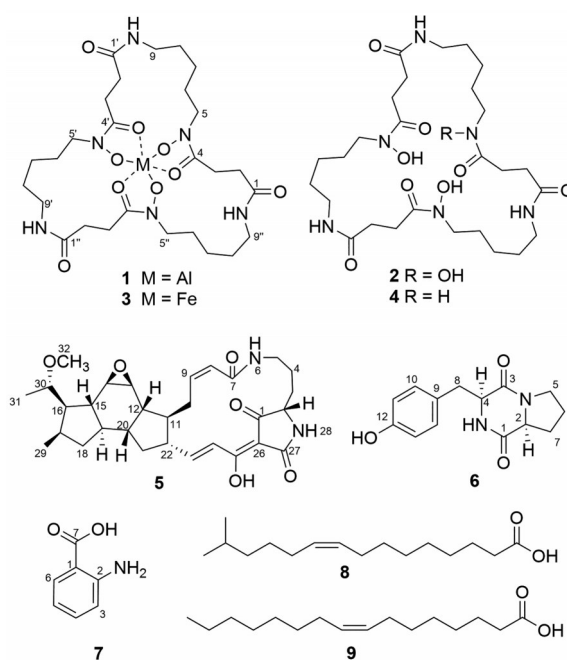


Figure 1 The structures of compounds 1-9

脂肪亚甲基碳(其中2个为连氮亚甲基 δ_{C} 51.4、38.3)。由 NMR 数据推测结构中含有 $5\times\text{CH}_2$ 、 $2\times\text{NCH}_2$ 和 $2\times\text{CO}$ 结构片段,以上单元化学式组成为 $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$, 约相当于分子式元素组成的 1/3, 这提示化合物 **1** 中含有 3 个重复的结构单元。此外,仍有 3 个氧原子、3 个氢原子和 1 个铝原子未归属。化合物 **1** 的 NMR 数据与同时分离到的去铁胺 E (desferrioxamine E, 别名 nocardamine, **2**)^[17] 的数据非常相似(表 1), 其主要差异是化合物 **1** 中的一个羰基碳 (δ_{C} 164.3) 向高场位移了 8.3 ppm。根据以上数据推测化合物 **1** 为去铁胺 E (**2**) 的衍生物。

分析化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 谱, 提示其结构中含有两组自旋偶合体系(图 2)。在 HMBC 谱中, 观察到 H-2a、H-2b 和 H-3a、H-3b 分别与羰基碳 C-1 (δ_{C} 174.3) 和 C-4 (δ_{C} 164.3) 的相关信号, 提示结构中存在琥珀酰(琥珀酸)结构单元。H₂-7 与 C-5、C-6、C-8 和 C-9 的相关峰表明结构中存在戊二氨基 $[\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{N}$, cadaverine] 单元; C-5 (δ_{C} 51.4) 相较于 C-9 (δ_{C} 38.3) 更低场的化学位移, 提示 cadaverine 单元中的 N-5 上取代有一个氧原子。H-5a 和 H-5b 与 C-4 的 HMBC 相关信号提示以上两个结构单元组成了一个琥珀酰戊二氨基单元。此外, H-9a 和 H-9b (H-9'a 和 H-9'b 或 H-9''a 和 H-9''b) 与 C-1'

Table 1 NMR spectroscopic data for compounds **1** and **2**. δ were measured in CD_3OD for **1** and $\text{DMSO}-d_6$ for **2** at 600 MHz for ^1H and 150 MHz for ^{13}C . Proton coupling constants (J) in Hz are given in the parenthesis

No.	1		2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1,1',1''		174.3, C		172.6, C
2,2',2''	3.00, m; 2.47, m	25.0, CH_2	2.27, t (6.6)	30.6, CH_2
3,3',3''	2.78, m; 2.49, m	30.8, CH_2	2.57, t (6.6)	28.0, CH_2
4,4',4''		164.3, C		172.6, C
5,5',5''	4.02, m; 3.53, m	51.4, CH_2	3.44, t (6.6)	47.4, CH_2
6,6',6''	1.86, m; 1.40, m	26.5, CH_2	1.46, m	26.2, CH_2
7,7',7''	1.21, m	22.4, CH_2	1.16, m	23.6, CH_2
8,8',8''	1.55, m	28.1, CH_2	1.34, m	28.9, CH_2
9,9',9''	3.53, m; 2.90, m	38.3, CH_2	2.98, q (6.0)	38.9, CH_2
OH			9.87, brs	
NH			7.76, brt (6.0)	

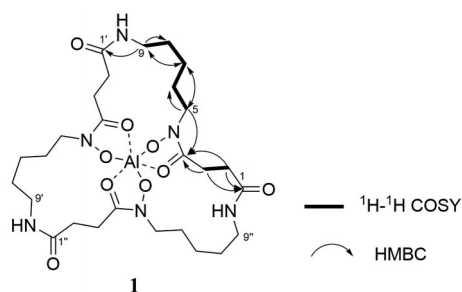


Figure 2 The ^1H - ^1H COSY and key HMBC correlations of compound **1**

(C-1''或C-1)的相关信号,表明结构中的3个琥珀酰戊二氨单元通过头尾相接的顺序组成了一个三十三元环,证实化合物**1**的母核结构为去铁胺E(**2**)的三价酸根。由于分子组成中含有一个铝原子,提示化合物**1**为化合物**2**的三价铝离子螯合物。

为进一步确定化合物**1**的结构,参照铁载体类化合物脱去金属离子的方法^[18],将化合物**1**用8-羟基喹啉处理除去螯合的金属离子,经HPLC纯化后得到

去铁胺E(**2**)。此外,将化合物**2**与 AlCl_3 水溶液搅拌20 min,经HPLC纯化可得到化合物**1**。以上结果进一步表明,化合物**1**的结构为去铁胺E的铝离子螯合物,命名为铝草氨酸E(aluminioxamine E)。

2 生物活性评价

对化合物**1**~**9**进行了抗肝纤维化、抗菌和肿瘤细胞毒活性筛选。结果显示,不同浓度的化合物**2**(10、20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均能够抑制肝纤维化相关基因COL1A1启动子的活性,其中40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时效果最好,抑制率为44.7%(图3a)。进一步在细胞水平上评价化合物**2**对肝纤维化相关基因mRNA表达水平的影响。结果显示,化合物**2**在浓度为10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够浓度依赖性地降低肝纤维化相关基因COL1A1、MMP2和TIMP2的表达,在浓度为40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够将TIMP2基因的表达量降至与对照组相当(图3b)。这些研究结果提示去铁胺E(**2**)可能具有抑制肝纤维化作用。

抗菌活性结果显示,化合物**5**、**8**、**9**对金黄色葡萄球菌、甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)、表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及白色念珠菌具有一定的抑制活性,最低抑菌浓度(MIC)为16~64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (表2)。其他化合物未显示出抗菌活性(MIC > 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

化合物**5**对人胰腺癌MIA Paca-2和结肠癌HT-29细胞显示出较强的细胞毒活性,IC₅₀分别为2.9和6.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (阳性对照多柔比星IC₅₀分别为0.5和0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。其余化合物未显示出明显的细胞毒性(IC₅₀ > 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

小结

从海洋来源的链霉菌IMB18-531与枝孢菌IMB19-099液体共培养发酵产物中分离得到9个化合物,其中4个为铁载体类化合物,包括1个新的铁载体

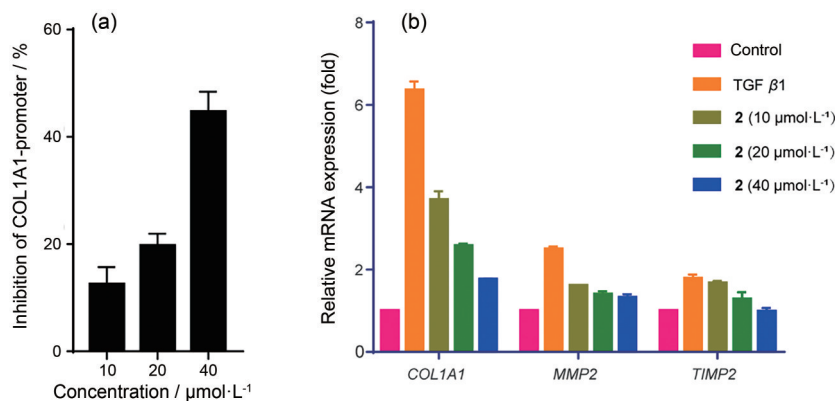


Figure 3 (a) Inhibition of COL1A1 promoter activity in LX-2 cells of compound **2**. Data were analyzed by Bright-Glo luciferase assay system; (b) The inhibitory effects of compound **2** on the mRNA expression level of liver fibrosis-related genes at different concentrations

Table 2 Antimicrobial activities of compounds **5**, **8**, and **9** (MIC, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Microorganism	Strain No.	5	8	9	Rifampicin
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	ATCC 33591	32	64	64	<0.097 6
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	16	32	32	<0.097 6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 1228	32	32	64	<0.097 6
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	16	32	64	<0.097 6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	>128	>128	>128	8
<i>Morganella morganii</i>	ATCC 25830	>128	>128	>128	10
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	>128	>128	>128	8
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	64	32	64	<0.097 6

螯合物铝草氨菌素 E (**1**)。去铁胺 E (**2**) 及其衍生物是一类重要的铁载体, 主要由链霉菌、诺卡氏菌、小单孢菌等多种放线菌产生^[19], 主要功能是为菌株生长从环境摄取和转运所需的铁元素^[20]。卡巴西霉素 (**5**) 也是链霉菌产物, 具有抗细菌、真菌和抗肿瘤细胞活性^[21,22]。LC-MS 分析结果显示, 化合物 **1**~**5** 在共培养产物中的含量, 较链霉菌 IMB18-531 纯培养产物中提高了 3~10 倍。这一结果表明, 通过共培养有效促进了链霉菌中与化学防御和铁摄取相关的次级代谢基因的表达, 增加了微生物产物的化学多样性。此外, 本研究分离得到的产物主要来源于链霉菌, 未能获得真菌来源的特征次级代谢产物, 可能与共培养中真菌的生长受到抑制有关。去铁胺 E (**2**) 的抗肝纤维化活性为首次报道, 值得进一步深入研究。

实验部分

¹H、¹³C NMR 谱用 Bruker 600 MHz 核磁共振仪测定 (德国 Bruker 公司); HR-ESI-MS 谱用 Waters UPLC XevoG2-XS Tof 液相色谱-高分辨质谱联用仪测定 (美国 Waters 公司); LC-MS 分析用 LC-MSD 1946D 液相色谱-质谱联用仪 (美国安捷伦公司); HPLC 制备色谱用岛津 LC-20AP 液相色谱仪 (日本岛津公司); 中压色谱用 BuchiPure C-850 中高压色谱仪 (瑞士 Buchi 公司); 凝胶柱色谱填料 Sephadex LH-20 (美国 GE Biosciences 公司) 和 Toyopearl Gel HW-40F (日本 Tosoh 公司); 大孔吸附树脂 Amberlite XAD7HP (美国 Rohm & Haas 公司); 人工海盐 (天津中盐海洋生物公司)。

菌株 IMB18-531 分离自广西北海涠洲岛 (109° 6'38"E, 21° 1'35"N) 未鉴定种属海绵, 其 16S rRNA 序列与厦门链霉菌 *Streptomyces xiamenensis* 318 (Genbank No. CP009922) 相似度为 100%, 根据菌株表型及 16S rRNA 序列分析, 将该菌株确定为链霉菌属菌株。菌株 IMB 19-099 分离自巴布亚新几内亚中部 (152° 25'51.57"E, 5° 51'97.33"N) 海域的钩虾 (*Gammarus* sp., 上海彩虹鱼海洋科技股份有限公司提供), 其 ITS 区域 DNA 序列与枝孢属真菌 *Cladosporium endophyticum*

MFLUCC 17-0599 (Genbank No. NR_158360) 相似度为 98.35%, 根据菌株表型及 ITS 序列分析, 将该菌株确定为枝孢属菌株。菌株保存于中国医学科学院医药生物技术研究所国家新药 (微生物) 筛选实验室。

1 发酵

菌株 IMB18-531 接种于 M1 培养基 (淀粉 10 g、酵母提取物 4 g、蛋白胨 2 g、琼脂 18 g、人工海盐 30 g、去离子水 1 L) 琼脂平板上, 28 °C 恒温培养 8 天, 用无菌竹签划取 2 cm² 左右的含菌琼脂块, 接种于含 100 mL TCG 培养基 (葡萄糖 4 g、酪蛋白 5 g、胰蛋白胨 3 g、人工海盐 30 g、去离子水 1 L) 的 500 mL 三角瓶中, 28 °C、200 r·min⁻¹ 培养 3 天得到放线菌种子液。菌株 IMB19-099 接种于 PDA 培养基板上, 28 °C 下培养 6 天。用无菌竹签取 2 cm² 大小的含菌琼脂块接种于含 100 mL PDB 培养基 (马铃薯浸出粉 3 g、葡萄糖 20 g、人工海盐 30 g、去离子水 1 L) 的 500 mL 三角瓶中, 28 °C、200 r·min⁻¹ 震荡培养 3 天得到真菌种子液。将放线菌与真菌种子液按体积比 4:1 混匀, 取 10 mL 接种于含 100 mL TCG 培养基的 500 mL 三角瓶中, 共 320 瓶, 28 °C、200 r·min⁻¹ 震荡共培养发酵 8 天。

2 提取与分离

收集发酵液共 32 L, 离心得到菌丝体和上清液。菌丝体用丙酮 (3 L×3) 超声提取。上清液加入 Amberlite XAD7HP 大孔树脂 (200 mL·L⁻¹), 120 r·min⁻¹ 振荡 6 h, 依次用水、50% 甲醇、甲醇和丙酮分别洗脱 12 L。将大孔树脂有机溶剂洗脱的各个流分、菌丝体丙酮提取液分别减压除去溶剂, 合并得到提取物浸膏 35 g。将提取物浸膏用 C18 中压柱色谱 (C18 反相硅胶 1 kg, 49 mm × 920 mm) 分离, 依次用 10%、30%、50%、70%、90%、100% 甲醇和 100% 丙酮进行洗脱, 得到 7 个流分 (F₁~F₇)。

流分 F₁ (23 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶色谱, 30% 甲醇洗脱得到 10 个组分 (F₁₋₁~F₁₋₁₀)。F₁₋₈ (481 mg) 经 HPLC 色谱 (Capcell PAK C18 AQ, 5 μm , 10 mm × 250 mm, 6% 甲醇含 0.1% 甲酸, 3 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 **6** (79 mg) 和 **7** (3.2 mg)。

流分 F₂ (2.6 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶色谱, 50% 甲醇洗脱, 得到 11 个组分 (F₂₋₁~F₂₋₁₁)。F₂₋₄ (880 mg) 经 C18 反相硅胶中压柱色谱 (20 g) 进一步分离, 5%~35% 甲醇梯度洗脱, 得到 11 个组分 (F₂₋₄₋₁~F₂₋₄₋₁₁)。其中 F₂₋₄₋₅ 经 HPLC 色谱 (Capcell PAK C18 MG II 5 μm, 10 mm × 250 mm, 14% 乙腈, 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 **3** (60 mg) 和 **1** (6 mg)。

流分 F₃ (2.1 g) 经 C18 反相硅胶中压柱色谱 (40 g), 10%~70% 甲醇梯度洗脱, 得到 18 个组分 (F₃₋₁~F₃₋₁₈)。F₃₋₇ (220 mg) 经 HPLC 色谱 (Capcell PAK C18 MG II 5 μm, 10 mm × 250 mm, 20% 乙腈含 0.1% 甲酸, 3 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 **2** (73 mg); F₃₋₆ (112 mg) 经 HPLC 色谱 (Capcell PAK C18 MG II 5 μm, 10 mm × 250 mm, 15% 乙腈含 0.1% 甲酸, 3 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 **4** (11 mg)。

流分 F₄ (1.86 g) 经 Toyopearl Gel HW-40F 凝胶柱色谱, 75% 甲醇洗脱, 得到 16 个组分 (F₄₋₁~F₄₋₁₆)。F₄₋₆ (501 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 75% 甲醇洗脱得到 5 个亚组分 (F₄₋₆₋₁~F₄₋₆₋₅)。F₄₋₆₋₃ (227 mg) 经 HPLC 色谱 (Capcell PAK C18 MG II 5 μm, 10 mm × 250 mm, 45% 甲醇, 3 mL·min⁻¹) 多次纯化得到化合物 **8** (10 mg) 和 **9** (7 mg)。F₄₋₇ (14 mg)、F₄₋₈ (10 mg)、F₄₋₉ (13 mg) 经 HPLC 色谱 (Capcell PAK C18 MG II 5 μm, 10 mm × 250 mm, 47% 乙腈, 3 mL·min⁻¹) 多次纯化得到化合物 **5** (3 mg)。

化合物 **1**: 浅黄色粉末; UV (MeOH, HPLC-DAD) λ_{max} 218 nm; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) 数据见表 1; HR-ESI-MS: *m/z* 625.315 6 [M+H]⁺ (C₂₇H₄₆AlN₆O₉, 理论值为 625.314 2)。

化合物 **2**: 白色粉末; UV (MeOH, HPLC-DAD) λ_{max} 200 nm; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) 数据见表 1; HR-ESI-MS: *m/z* 601.355 5 [M+H]⁺ (C₂₇H₄₉N₆O₉, 理论值为 601.356 1)。以上数据与文献^[17]报道的去铁胺 E (desferrioxamine E, 又名 nocardamine^[23,24]) 数据一致, 因此将化合物 **2** 的结构确定为去铁胺 E。

化合物 **3**: 深红色粉末; UV (MeOH, HPLC-DAD) λ_{max} 240、445 nm; HR-ESI-MS: *m/z* 654.265 7 [M+H]⁺ (C₂₇H₄₆FeN₆O₉, 理论值为 654.267 6)。化合物 **3** 经 NMR 波谱测试, 没有显示出 ¹H 和 ¹³C 信号, 提示结构中含有 Fe³⁺ 离子^[25]。将化合物 **3** 经 8-羟基喹啉处理, 除去螯合的 Fe³⁺ 离子, 经 HPLC 纯化后得到化合物 **2**。以上理化性质及质谱数据与文献^[24,26]报道的铁草氨酸 E (ferrioxamine E) 数据一致, 因此化合物 **3** 的结构确定为铁草氨酸 E。

化合物 **4**: 白色粉末状; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 2.28 (8H, t, *J* = 6.6 Hz, H-2/3/2'/2''), 3.00 (8H, t, *J* = 6.6 Hz, H-5/9/9'/9''), 1.35 (8H, m, H-6/8/8'/8''), 1.20 (6H, m, H-7/7'/7''), 2.58 (4H, t, *J* = 7.2 Hz, H-3'/3''), 3.46 (4H, t, *J* = 6.6 Hz, H-5'/5''), 1.48 (4H, m, H-6'/6''), 7.73 (4H, brt, NH), 9.61 (1H, brs, OH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ 171.5 (C-1), 31.1 (C-2/3), 172.0 (C-4), 38.3 (C-5/9/9'/9''), 28.7 (C-6/8/8'/8''), 23.5 (C-7), 171.3 (C-1'/1''), 30.0 (C-2'/2''), 27.5 (C-3'/3''), 171.3 (C-4'/4''), 46.9 (C-5'/5''), 25.8 (C-6'/6''), 23.2 (C-7'/7''); HR-ESI-MS: *m/z* 585.361 7 [M+H]⁺ (C₂₇H₄₉N₆O₈, 理论值为 585.361 2)。以上数据与文献^[23]报道的 terragine E 数据一致, 因此化合物 **4** 的结构确定为 terragine E。

化合物 **5**: 米黄色粉末; UV (MeOH, HPLC-DAD) λ_{max} 325 nm; [α]_D²⁵ +80 (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 3.83 (brs, H-2), 1.98 (m, H-3a), 1.73 (m, H-3b), 1.38 (m, H-4a), 1.14 (m, H-4b), 3.63 (m, H-5a), 2.45 (m, H-5b), 7.87 (t, *J* = 5.4 Hz, 6-NH), 5.80 (d, *J* = 11.4 Hz, H-8), 6.04 (ddd, *J* = 11.4, 11.4, 3.6 Hz, H-9), 3.69 (m, H-10a), 2.34 (m, H-10b), 1.67 (m, H-11), 2.33 (m, H-12), 2.90 (d, *J* = 3.6 Hz, H-13), 3.25 (m, H-14), 0.90 (td, *J* = 12.0, 1.8 Hz, H-15), 1.87 (m, H-16), 2.25 (m, H-17), 1.87 (m, H-18a), 0.59 (m, H-18b), 1.10 (m, H-19), 1.67 (m, H-20), 2.00 (m, H-21a), 1.10 (m, H-21b), 2.24 (m, H-22), 6.63 (dd, *J* = 15.6, 10.2 Hz, H-23), 7.00 (d, *J* = 15.6 Hz, H-24), 8.68 (brs, 28-NH), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, H-29), 3.33 (m, H-30), 1.20 (d, *J* = 6.0 Hz, H-31), 3.20 (s, H-32); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ 195.8 (C-1), 61.1 (C-2), 26.8 (C-3), 20.5 (C-4), 38.2 (C-5), 165.5 (C-7), 124.4 (C-8), 139.0 (C-9), 25.2 (C-10), 45.4 (C-11), 40.5 (C-12), 53.0 (C-13), 57.4 (C-14), 46.9 (C-15), 49.4 (C-16), 33.3 (C-17), 38.8 (C-18), 46.9 (C-19), 40.1 (C-20), 36.3 (C-21), 48.9 (C-22), 149.8 (C-23), 122.2 (C-24), 171.3 (C-25), 100.8 (C-26), 175.1 (C-27), 17.8 (C-29), 76.8 (C-30), 17.2 (C-31), 54.7 (C-32); HR-ESI-MS: *m/z* 525.298 0 [M+H]⁺ (C₃₀H₄₀N₂O₆, 理论值为 525.296 5)。以上数据与文献^[21,22]报道的卡巴西霉素 (capsimycin) 核磁数据一致, 因此化合物 **5** 的结构确定为卡巴西霉素。

化合物 **6**: 白色粉末, 易溶于甲醇、DMSO; UV (MeOH, HPLC-DAD) λ_{max} 215 nm; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ 4.36 (td, *J* = 5.4, 1.8 Hz, H-3), 4.03 (ddd, *J* = 11.4, 6.6, 1.8 Hz, H-6), 2.10 (m, H-7a), 1.79 (m, H-7b), 1.80 (m, H-8a), 1.24 (m, H-8b), 3.54 (m, H-9a), 3.35 (m, H-9b), 3.08 (dd, *J* = 14.4, 5.4 Hz, H-10a), 3.03 (dd, *J* =

14.4, 4.8 Hz, H-10b), 7.04 (d, $J = 8.4$ Hz, H-12/16), 6.71 (d, $J = 8.4$ Hz, H-13/15); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ 170.8 (C-2), 60.0 (C-3), 166.9 (C-5), 57.9 (C-6), 29.4 (C-7), 22.7 (C-8), 45.9 (C-9), 37.7 (C-10), 127.6 (C-11), 132.1 (C-12/16), 116.2 (C-13/15), 157.6 (C-14); HR-ESI-MS: m/z 261.124 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$ 理论值为 261.123 9)。以上数据与文献^[27]报道的环(L-脯氨酰-L-酪氨酸)数据一致。利用高级Marfey法^[28]进一步确定化合物6中的氨基酸绝对构型均为L构型。因此,化合物6的结构确定为环(L-脯氨酰-L-酪氨酸)。

化合物7: 淡黄色粉末, 易溶于甲醇、DMSO; UV (MeOH, HPLC-DAD) λ_{max} 223、274 nm; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 6.71 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-3), 7.20 (td, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-4), 6.49 (td, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-5), 7.68 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 109.8 (C-1), 151.5 (C-2), 114.6 (C-3), 133.7 (C-4), 116.4 (C-5), 131.2 (C-6), 169.7 (C-7); HR-ESI-MS: m/z 138.056 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$ 理论值为 138.055 5)。以上数据与文献^[29]报道的邻氨基苯甲酸数据一致, 因此化合物7的结构确定为邻氨基苯甲酸。

化合物8: 无色油状液体, 易溶于甲醇、DMSO; UV (MeOH, HPLC-DAD) λ_{max} 190 nm; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 2.16 (t, $J = 7.2$ Hz, H-2), 1.49 (m, H-3), 1.14~1.30 (12H, m, H-4~6/11~13), 1.97 (4H, q, $J = 7.2$ Hz, H-7/10), 5.33 (dt, $J = 10.2, 7.2$ Hz, H-8), 5.31 (dt, $J = 10.2, 7.2$ Hz, H-9), 1.50 (m, H-14), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz, H-15/16); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 174.7 (C-1), 33.8 (C-2), 24.6 (C-3), 27.4 (C-4), 28.6 (C-5), 28.6 (C-6), 26.6 (C-7), 129.7 (C-8), 129.7 (C-9), 27.0 (C-10), 28.7 (C-11), 26.9 (C-12), 38.1 (C-13), 29.1 (C-14), 22.6 (C-15/16); HR-ESI-MS: m/z 255.230 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2$ 理论值为 255.232 4)。以上数据与文献^[30]报道的(Z)-14-甲基十五烷-9-烯酸数据一致。因此, 将化合物8的结构确定为(Z)-14-甲基十五烷-9-烯酸。

化合物9: 无色油状液体, 易溶于甲醇、DMSO; UV (MeOH, HPLC-DAD) λ_{max} 190 nm; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 2.16 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2), 1.47 (2H, m, H-3), 1.23~1.29 (16H, m, H-4~6/11~15), 1.97 (4H, q, $J = 7.2$ Hz, H-7/10), 5.32 (dt, $J = 10.2, 7.2$ Hz, H-8), 5.31 (dt, $J = 10.2, 7.2$ Hz, H-9), 0.84 (t, $J = 6.6$ Hz, H-16); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 174.6 (C-1), 33.8 (C-2), 24.6 (C-3), 29.2 (C-4), 28.7 (C-5), 29.2 (C-6), 26.7 (C-7), 129.8 (C-8), 129.7 (C-9), 26.7 (C-10), 28.6 (C-11), 28.6 (C-12), 28.4 (C-13), 31.2 (C-14), 22.2

(C-15), 14.0 (C-16); HR-ESI-MS: m/z 255.230 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2$ 理论值为 255.232 4)。以上数据与文献^[31]报道的(Z)-十六烷-8-烯酸。因此, 化合物9的结构确定为(Z)-十六烷-8-烯酸。

3 化合物1、3与化合物2互变考察

取化合物1 (5 mg) 和3 (11 mg), 分别溶解于3 mL 去离子水中, 加入4 mL $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 8-羟基喹啉, 室温搅拌30 min, 然后加入6 mL CH_2Cl_2 萃取3次。收集水层, 减压浓缩得到反应产物, 经HPLC半制备色谱纯化 (Capcell PAK ADME 5 μm , 10 mm \times 250 mm, 21% 乙腈 + 0.1% 甲酸, $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 分别得到3和7 mg的化合物2, 其HR-ESI-MS和NMR数据与天然产物2一致。

取化合物2 (10 mg), 溶解于2 mL 甲醇中, 加入1 mL $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 溶液, 室温搅拌20 min, 将反应产物经HPLC半制备色谱纯化 (Capcell PAK C18 MG-II 5 μm , 10 mm \times 250 mm, 12% 乙腈含0.1% 甲酸, $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 得到1 (6 mg), 其HR-ESI-MS和NMR数据与天然产物1一致。

4 抗肝纤维化活性测定

4.1 抗肝纤维化活性筛选 应用基于COL1A1启动子的高通量抗肝纤维化筛选模型对分离化合物进行抗肝纤维化活性筛选^[32]。采取瞬时转染的方式对LX-2细胞进行转染, 待细胞汇合度至90%~95%时, 以每孔 1.5×10^4 个细胞铺至96孔板中, 细胞贴壁后加入待测化合物, 然后检测单荧光素酶活性。利用酶标仪测定每孔全波长荧光值。计算不同化合物对COL1A1基因启动子抑制率。抑制率 = (对照组荧光值 - 处理组荧光值) / 对照组荧光值 $\times 100\%$ 。

4.2 化合物对目的基因mRNA表达水平影响检测 按照文献^[33]所述方法, 对样品处理过的细胞, 进行总RNA提取、逆转录PCR、实时定量PCR, 荧光信号值在每个循环的末尾收集, 分析对照组和实验组目的基因的相对表达量, 通过目标基因表达量的多少判断化合物对细胞中相关基因的表达是否有影响。

5 抗菌活性测定

应用微量稀释法^[13]评价化合物对金葡萄菌、表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、摩氏摩根菌、大肠杆菌和白色念珠菌等病原菌的抗菌活性。将菌株接种于MH培养基, 37°C 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养12 h后, 将菌液按10% 体积比转接至MH培养基, 待菌液吸光度 A_{600} 为1.0时, 将菌液用MH培养基稀释3 000倍, 得到菌落数每毫升约 5×10^5 CFU的菌液。取198 μL 稀释好的菌液加入96孔板第一行, 其余各行加入菌液100 μL 。取2 μL 待测样品DMSO溶液 ($12.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 加入第一行孔中混匀, 然后从上一行依次取100 μL 加

到下一行的孔中进行二倍稀释。每样品重复3个复孔。将96孔板置于37 °C培养12 h后, 观察活性结果, 记录最小抑菌浓度(MIC)。

6 细胞毒活性测定

利用CCK-8试剂盒测定化合物对人胰腺癌细胞MIA Paca-2和结肠癌细胞HT-29的活性^[15]。将化合物配置成浓度为20 mmol·L⁻¹的DMSO溶液备用, 随后用PBS将样品稀释到相应的测试浓度。在每个96孔培养板的孔中加入大约4×10³个MIA Paca-2细胞或者5×10³个HT-29细胞, 过夜培养24 h后加入样品, 继续培养48 h后每孔加入10 μL CCK-8试剂, 反应2 h, 用酶标仪检测每孔在450 nm处的吸光度。实验重复3次, 根据对照孔和实验孔的数据计算细胞存活率。

作者贡献: 李莎莎负责共培养发酵、分离提取、结构鉴定和抗菌活性测定, 撰写论文初稿; 李琴负责菌株分离和共培养筛选; 李翎铭负责抗肝纤维化活性筛选; 何红伟负责抗肝纤维化活性的实验设计, 数据分析, 稿件修改; 陈淑珍、商悦分别负责肿瘤细胞毒活性的实验设计与测定; 舒积成为本文的共同通讯作者, 负责数据分析、稿件修改; 甘茂罗为本文通讯作者, 负责实验设计, 结构鉴定, 文章修改及定稿。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines [J]. *J Biotechnol*, 2012, 158: 168-175.
- [2] Barzkar N, Jahromi ST, Poorsaheli HB, et al. Metabolites from marine microorganisms, micro, and macroalgae: immense scope for pharmacology [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17: 464.
- [3] Ouyang Z, Sun X, Sun H, et al. Research progress on anti-tumor and tumor immunity of marine natural products [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2642-2653.
- [4] Ochi K, Tanaka Y, Tojo S. Activating the expression of bacterial cryptic genes by rpoB mutations in RNA polymerase or by rare earth elements [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41: 403-414.
- [5] Netzker T, Fischer J, Weber J, et al. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 299.
- [6] Nguyen CT, Dhakal D, Pham VTT, et al. Recent advances in strategies for activation and discovery/characterization of cryptic biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* [J]. *Microorganisms*, 2020, 8: 616.
- [7] Pinedo RC, Aleu J, Durán PR. Cryptic metabolites from marine-derived microorganisms using OSMAC and epigenetic approaches [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20: 84.
- [8] Yu G, Sun Y, Han H, et al. Coculture, an efficient biotechnology for mining the biosynthesis potential of macrofungi via interspecies interactions [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 663924.
- [9] Knowles SL, Raja HA, Roberts CD, et al. Fungal-fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity [J]. *Nat Prod Rep*, 2022, 39: 1557-1573.
- [10] Zhuang L, Zhang H. Utilizing cross-species co-cultures for discovery of novel natural products [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2021, 69: 252-262.
- [11] Arora D, Gupta P, Jaglan S, et al. Expanding the chemical diversity through microorganisms co-culture: current status and outlook [J]. *Biotechnol Adv*, 2020, 40: 107521.
- [12] Chen J, Zhang P, Ye X, et al. The structural diversity of marine microbial secondary metabolites based on co-culture strategy: 2009-2019 [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18: 449.
- [13] Li J, Chen M, Hao X, et al. Structural revision and absolute configuration of burnettramic acid A [J]. *Org Lett*, 2020, 22: 98-101.
- [14] Li J, Hu Y, Hao X, et al. Raistrickindole A, an anti-HCV oxazinoindole alkaloid from *Penicillium raistrickii* IMB17-034 [J]. *J Nat Prod*, 2019, 82: 1391-1395.
- [15] Hao X, Li S, Ni J, et al. Acremopeptaibols A-F, 16-residue peptaibols from the sponge-derived *Acremonium* sp. IMB18-086 cultivated with heat-killed *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84: 2990-3000.
- [16] Liu B, Tan Y, Gan M, et al. Identification of tetracenomycin X from a marine-derived *Saccharothrix* sp. guided by genes sequence analysis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 230-236.
- [17] Kalaitzis JA, Ingrey SD, Chau R, et al. Genome-guided discovery of natural products and biosynthetic pathways from Australia's untapped microbial megadiversity [J]. *Aust J Chem*, 2016, 69: 129-135.
- [18] Zhang Y, Ren J, Wang W, et al. Siderophore and indolic acid production by *Paenibacillus tritici* BJ-18 and their plant growth-promoting and antimicrobe abilities [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9403.
- [19] Müller G, Raymond KN. Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in *Streptomyces pilosus* [J]. *J Bacteriol*, 1984, 160: 304-312.
- [20] Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores [J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 637-657.
- [21] Aizawa S, Akutsu H, Satomi T, et al. Capsimycin, a new antibiotic. I. Production, isolation and properties [J]. *J Antibiot*, 1979, 32: 193-196.
- [22] Yu HL, Jiang SH, Bu XL, et al. Structural diversity of anti-pancreatic cancer capsimycins identified in mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis* 318 and post-modification via a novel cytochrome P450 monooxygenase [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40689.
- [23] Wang GY, Graziani E, Waters B, et al. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host [J]. *Org Lett*,

- 2000, 2: 2401-2404.
- [24] Yuan GJ, Lin HP, Wang C, et al. Isolation and identification of the metabolites produced by marine *Streptomyces* sp.211726 [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物杂志), 2010, 29: 7-10.
- [25] Bao J, Wang J, Zhang XY, et al. New furanone derivatives and alkaloids from the co-culture of marine-derived fungi *Aspergillus sclerotiorum* and *Penicillium citrinum* [J]. Chem Biodivers, 2017, 14: e1600327.
- [26] Berner I, Konetschny RS, Jung G, et al. Characterization of ferrioxamine E as the principal siderophore of *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*) [J]. Biol Met, 1988, 1: 51.
- [27] Rudi A, Kashman Y, Benayahu Y, et al. Amino acid derivatives from the marine sponge *Jaspis digonoxea* [J]. J Nat Prod, 1994, 57: 829-832.
- [28] Fujii K, Ikai Y, Mayumi T, et al. A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: elucidation of limitations of Marfey's method and of its separation mechanism [J]. Anal Chem, 1997, 69: 3346-3352.
- [29] Portada T, Margetic D, Strukil V. Mechanochemical catalytic transfer hydrogenation of aromatic nitro derivatives [J]. Molecules, 2018, 23: 3163.
- [30] Carballeira NM, Sanabria D, Oyola D. An improved synthesis for the (Z)-14-methyl-9-pentadecenoic acid and its topoisomerase I inhibitory activity [J]. ARKIVOC, 2007, 2007: 49-57.
- [31] Gunstone FD, Pollard MR, Scrimgeour CM, et al. Fatty acids. Part 50. ¹³C nuclear magnetic resonance studies of olefinic fatty acids and esters [J]. Chem Phys Lipids, 1977, 18: 115-129.
- [32] Zhao S, Wang J, Wang Y. Establishment and application of a high-throughput drug screening model based on COL1A1 promoter for anti-liver fibrosis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 169-173.
- [33] Zhang N, Zhao SS, Zhang YX, et al. A novel biphenyl compound IMB-S7 ameliorates hepatic fibrosis in BDL rats by suppressing Sp1-mediated integrin αv expression [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41: 661-669.