

剑叶龙血树内生链霉菌 S009 中抗菌活性成分的研究

宋薇¹, 许小蓉², 葛洁¹, 李慧玲¹, 文爱东¹, 王婧雯¹, 张晓梅^{2*}, 张娟利^{1*} (1.空军军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032; 2.云南中医药大学, 昆明 650500)

摘要: 目的 对剑叶龙血树内生链霉菌 S009 中抗菌活性成分进行研究。方法 采用 Sephadex LH-20、反相色谱、硅胶柱层析及 HPLC 对 S009 菌株的发酵产物进行分离纯化, 并通过 MS、NMR 等波谱技术鉴定其结构。结果 从 S009 菌株中分离并鉴定了 4 个大环四重内酯类化合物, 分别为 nonactin(1)、monactin(2)、dinactin(3)和 trinactin(4)。活性结果显示化合物 3 和 4 对多种 G⁺菌、G⁻菌和白色念珠菌均显示较强的抗菌活性。另外, 化合物 2~4 还具有很强的抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)活性, 其对所测试的多种 MRSA 菌株的最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)均小于或等于阳性药万古霉素(1~4 μg·mL⁻¹), 尤其以化合物 3 活性最为显著(MIC≤0.125 μg·mL⁻¹)。结论 本研究结果不仅可为研制新型抗 MRSA 药物提供先导化合物, 同时对有效利用和保护珍稀濒危植物剑叶龙血树资源具有重要意义。

关键词: 剑叶龙血树; 内生链霉菌; 结构鉴定; 大环四重内酯类成分; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)20-2573-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.20.001

引用本文: 宋薇, 许小蓉, 葛洁, 等. 剑叶龙血树内生链霉菌 S009 中抗菌活性成分的研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(20): 2573-2577.

Study of Antibacterial Components of Endophytic *Streptomyces* S009 from *Dracaena Cochinchinensis*

SONG Wei¹, XU Xiaorong², GE Jie¹, LI Huilin¹, WEN Aidong¹, WANG Jingwen¹, ZHANG Xiaomei^{2*}, ZHANG Juanli^{1*} (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the antibacterial components of endophytic *Streptomyces* S009 from *Dracaena cochinchinensis*. **METHODS** The fermentation extracts of S009 were isolated and purified by Sephadex LH-20, reversed phase column chromatography, silica gel column chromatography and semi-preparative HPLC. The chemical structures were identified by MS and NMR spectral analysis. **RESULTS** Four macrotetrolide components, including nonactin(1), monactin(2), dinactin(3) and trinactin(4), were isolated and identified from S009. The bioactivity results showed that compounds 3 and 4 possessed strong antibacterial activity against various G⁺ bacteria, G⁻ bacteria and *Candida albicans*. In addition, compounds 2-4 also had strong anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) activity, and the minimum inhibitory concentration(MIC) values of them against a variety of tested MRSA strains were less than or equal to that of positive drug, vancomycin(MIC: 1-4 μg·mL⁻¹). Especially, compound 3 had the most significant activity (MIC≤0.125 μg·mL⁻¹). **CONCLUSION** The results of this study can not only provide lead compounds for developing new anti-MRSA drugs, but also has important meaning for the effective utilization and protection of the rare and endangered *Dracaena cochinchinensis*.

KEYWORDS: *Dracaena cochinchinensis*; endophytic *Streptomyces*; structural elucidation; macrotetrolide components; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是目前医院感染的最常见的耐药菌之一, 具有耐药谱广、传播速度快、病死率高等特点, 给临床治疗带来了严峻挑战^[1]。糖肽类抗菌药物是目前对抗 MRSA

的主要治疗药物, 其中万古霉素被称为治疗 MRSA 感染的“最后一道防线”。但目前已出现耐万古霉素的金黄色葡萄球菌, 因此寻找新的有效的治疗 MRSA 感染的抗菌药物迫在眉睫^[2]。

植物内生菌作为一种新的微生物资源, 分布

基金项目: 国家自然科学基金项目(81602979, 21662048)

作者简介: 宋薇, 女, 护师

E-mail: 958511446@qq.com

*通信作者: 张晓梅, 女, 博士, 助理研究员

E-mail: meimeizhang.net@163.com

张娟利, 女, 博士, 助理研究员

E-mail: zhangjuanli0812@163.com

广泛,种类繁多,有些内生放线菌甚至可产生与宿主植物相同或相似的活性成分,是筛选新型抗菌药物的重要途径^[3-4]。剑叶龙血树是中国传统名贵中药龙血竭的基原植物之一,然而近年来随着龙血竭临床应用和需求不断扩大,致使其野生资源日趋枯竭,濒危灭绝。因此,研究剑叶龙血树内生菌具有重要的意义。课题组前期通过抗菌实验的筛选,发现一株剑叶龙血树内生链霉菌(*Streptomyces puniceus* S009)的粗提物对多种病原菌均具有较好的抑菌活性。因此,本研究拟对其次级代谢产物进行系统研究,旨在为开辟抗菌新药源及有效利用剑叶龙血树资源提供科学依据。

1 仪器、试剂与菌株

LC-10Avp 高效液相色谱仪(日本岛津);MALDI-TOF 电喷雾-四级杆-飞行时间串联质谱仪和 Advance III-400M 核磁共振仪(Bruker 公司);Sephadex LH-20 凝胶(美国 GE 公司);RP-18 反相硅胶(德国 Merck);柱层析用硅胶、高效硅胶薄层板 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂);N-1100-WD 旋转蒸发器(日本 EYELA);DLSB-S120 低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司);GM-0.33 II 隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司);ZF-C 型紫外分析仪(上海康禾光电仪器有限公司);BSA124S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);MJM-168 霉菌培养箱(宁波江南仪器厂);GNP-9050 恒温培养箱(精宏仪器厂)。

甲醇、二氯甲烷、石油醚和乙酸乙酯(分析纯,批号分别为 20211202, 20190115, 20190501 和 20201010, 天津市富宇精细化工有限公司);乙腈和甲醇(色谱纯,批号分别为 103183 和 110301, Fisher Scientific 公司)。

剑叶龙血树内生链霉菌由云南中医药大学基础医学院张晓梅课题组提供,通过 16S rRNA 测序分析比较,鉴定为 *Streptomyces puniceus* S009。13 株普通病原菌:G⁺菌包括大肠杆菌(*E. coli* ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC25923)、白色葡萄球菌(*S. albus* 1029)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* ATCC6633)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* 1037)、粪肠球菌(*E. faecalis* ATCC29212)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae* BNCC338425);G⁻菌包括鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium* χ 8956)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa* PA01)、肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*

ATCC13883)、鲍曼不动杆菌(*A. baumannii* ATCC19606)、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae* ATCC10211);真菌为白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC10231);9 株 MRSA 临床分离株分离自曲靖市第一人民医院感染科患者,编号为 1505, 1450, 1591, 1957, 2024, I-20, I-67, 28299, 28300;5 株氟康唑耐药白色念珠菌临床分离株(分离自昆明医科大学第一附属医院皮肤科患者),编号为 23#, 63#, 1725#, 1730#, 1732#。

燕麦培养基(ISP3 培养基):燕麦片(磨成粉状)20.0 g,加水煮沸约 20 min 后过滤得滤出液,加微量无机盐溶液 1 mL,20 g 琼脂,纯水定容至 1 000 mL,pH 调至 7.2~7.4;液体 LB 培养基:胰化蛋白胨 10 g;酵母提取物 5 g;NaCl 10 g;蒸馏水 1 000 mL;pH 调至 7.2~7.6。液体 SAB 培养基:液体沙氏培养基 50 g,蒸馏水 1 000 mL;pH 调至 5.6。

2 方法

2.1 菌株的培养发酵和提取

S009 菌株经燕麦琼脂培养基平板发酵 20 L,置于 28 °C 培养箱倒置培养 11 d。将固体培养基切块室温浸提 3 次,提取液为乙酸乙酯-甲醇-乙酸(80:15:5),合并 3 次浸提液,在 40 °C 下减压旋蒸至干,得发酵粗提物。发酵粗提物经乙酸乙酯-水(1:1)萃取分相,乙酸乙酯相又经石油醚-甲醇(1:1)萃取分相,得甲醇提取物(11.2 g)。

2.2 活性成分的分离纯化

甲醇提取物经正相硅胶柱层析,以二氯甲烷-甲醇系统(100:1~2:1)为洗脱液进行梯度洗脱,去除色素组分,纯甲醇冲柱子得非色素组分(8.04 g)。非色素组分经葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20[160 g,二氯甲烷-甲醇(1:2),每管 5 mL]柱层析分离,采用硅胶薄层层析跟踪检测,二氯甲烷-甲醇(15:1)作为展开剂,经改良碘化铋钾试剂显色,合并主斑点为橘红色的流份,得到组分 Fr.2(4.09 g)。Fr.2 经中压反相柱层析(RP-18, 40 g),依次用含甲醇 0%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%的甲醇-水溶液进行梯度洗脱,各梯度洗脱 400 mL,收集 90%甲醇-水洗脱流份得 Fr.2D(2.5 g),取 630 mg 该组分进一步经 HPLC(Inertsustain-C₁₈, 5 μ m, 10 mm \times 250 mm, UV 193 nm)分离,乙腈-水(95:5)洗脱,收集保留时间为 11.5, 12.7, 15.5, 19 min 的流份分别得到化合物 1(102 mg)、化合物 2(144 mg)、化合物

3(93 mg)和化合物 4(10 mg)。

2.3 结构鉴定

取适量纯品化合物 1~4, 分别溶解于 0.5 mL 氘代丙酮(化合物 2)和氘代氯仿(化合物 1, 3, 4)中, 装于核磁管中, 进行核磁共振扫描。记录 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、HMQC、HMBC 和 NOESY 等谱图信息。

2.4 抗菌活性测定

采用 2 倍稀释法^[5]测定最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。将 12 株普通病原细菌和 9 株 MRSA 病原菌分别接种于液体 LB 培养基中, 37 °C 恒温培养; 将普通白色念珠菌和 5 株氟康唑耐药白色念珠菌分别接种于液体 SAB 培养基, 28 °C 恒温培养; 12~24 h 后分别使用 LB 和 SAB 液体培养基将菌液浓度稀释成细菌 $0.5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、真菌 $1.0 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。取适量化合物 1~4 及阳性对照药(万古霉素、两性霉素 B、庆大霉素、氨苄青霉素和卡那霉素), 用 DMSO 溶解配制成 $25.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。取 198 μL 病原菌菌液加入 96 孔板第 1 孔, 再加入 2 μL 待测药物(或阳性药), 混匀, 使其终浓度为 $256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 2~12 孔加入 100 μL 菌液。取第 1 孔混合液 100 μL 放入第 2 孔, 混匀后从第 2 孔取 100 μL 加入第 3 孔, 以此类推, 直到第 12 孔取 100 μL 丢弃, 并以 100 μL 病原菌菌液作为空白对照, 每个实验组设 3 次重复。因此, 实验药物的浓度依次为 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 96 孔板置于恒温培养箱中培养 12~24 h, 期间需要进行观察和记录, 间隔为每次 12 h。若该孔呈浑浊状态, 说明对应浓度的药物无抗菌活性; 若呈澄清状态, 说明对应浓度的药物具有抗菌活性。培养液澄清者所对应的最低给药浓度即为该药物的 MIC 值。

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 1 为白色结晶, 易溶于二氯甲烷、DMSO 等有机溶剂。ESI-MS: m/z 775.403 0 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{O}_{12}$ 。 $^{13}\text{C-NMR}$ 显示化合物 1 有 10 个碳信号, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 HSQC 谱对其进行归属, 确定 δ_{C} 174.0 处的为酯羰基, δ_{C} 79.8, 76.1 和 68.8 处的为氧取代的次甲基, δ_{C} 45.0 处的为次甲基, δ_{C} 42.1, 31.2 和 27.9 处的为亚甲基, δ_{C} 20.3 和 12.6 处的为甲基。通过 COSY 相关信号连接可得到 $\text{C}_2\text{-Me} \rightarrow \text{C}_8\text{-Me}$ 的 9 碳片段, 进一步解析 HMBC 相

关信号, 发现 δ_{H} 4.02 处的质子与在 δ_{C} 76.1 存在相关性, 确定了化合物 1 结构中存在呋喃环; δ_{H} 1.08 的 HMBC 信号提示 δ_{C} 45.0 与酯羰基 δ_{C} 174.0 相连, 至此可得到 $\text{-C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 的结构单元。结合该化合物的质谱数据, 表明该化合物可能是 10 碳单元的四聚体结构。综合分析该化合物的质谱和核磁等数据, 以及通过与相关文献^[6]对比, 鉴定化合物 1 为 nonactin。

化合物 2 为无色油状物, 易溶于丙酮、氯仿、DMSO 等有机溶剂。ESI-MS: m/z 773.446 6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{O}_{12}$ 。从质谱数据来看, 化合物 2 比 1 多了 1 个 -CH_2 。化合物 3 的 NMR 谱与化合物 1 相似, 区别在于化合物 2 在 δ_{H} 1.20 处少了 1 个甲基, 而在 δ_{H} 0.88 处多了 1 个甲基, 在 δ_{H} 1.65 处多了 1 个亚甲基, 推测 C-8/8'/8''/8''' 位的某个取代从甲基变成了乙基, 这一推测与质谱结果一致。综合化合物 2 的二维核磁谱图, 以及通过与相关文献^[7]对比, 鉴定化合物 2 为 monactin。

化合物 3 为无色油状物, 易溶于二氯甲烷、DMSO 等有机溶剂。ESI-MS: m/z 787.459 0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{12}$ 。从质谱数据来看, 化合物 3 比 1 多了 2 个 -CH_2 。化合物 3 的 NMR 谱与化合物 1 相似, 区别在于化合物 3 在 δ_{H} 1.22 处少了 2 个甲基, 而在 δ_{H} 0.88 处多了 2 个甲基, 在 δ_{H} 1.60 处多了 2 个亚甲基, 推测 C-8/8'/8''/8''' 位有 2 处的取代, 从甲基变成了乙基, 这一推测与质谱结果一致。综合化合物 3 的二维核磁谱图, 以及通过与相关文献^[8]对比, 鉴定化合物 3 为 dinactin。

化合物 4 为无色油状物, 易溶于二氯甲烷、DMSO 等有机溶剂。ESI-MS: m/z 801.474 1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{O}_{12}$ 。从质谱数据来看, 化合物 4 比 3 多了 1 个 -CH_2 。化合物 3 的 NMR 谱与化合物 3 非常相似, 区别在于化合物 4 的 $^1\text{H-NMR}$ 在 δ_{H} 1.23 处少了 1 个甲基, 而在 δ_{H} 0.89 处多了 1 个甲基, 在 δ_{H} 1.61 处多了 1 个亚甲基, 推测 C-8/8''' 位的某个取代从甲基变成了乙基, 这一推测与质谱结果一致。综合化合物 4 的二维核磁谱图, 以及通过与相关文献^[6]对比, 鉴定化合物 4 为 trinactin。

化合物 1: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.99~4.91(m, 4H, H-8/8'/8''/8'''), 4.02(q, $J=7.1$ Hz, 4H, H-3/3'/3''/3'''), 3.96~3.80(m, 4H, H-6/6'/6''/6'''), 2.52(p, $J=7.1$ Hz, 4H, H-2/2'/2''/2'''), 2.01~1.93(m, 4H, H β -5/5'/5''/5'''), 1.92~1.87(m, 4H, H β -4/4'/4''/4'''),

1.80~1.63(m, 8H, H-7/7'/7''/7'''), 1.63~1.55(m, 4H, H_α-4/4'/4''/4'''), 1.51~1.44(m, 4H, H_α-5/5'/5''/5'''), 1.22(d, J=6.3 Hz, 12H, 8/8'/8''/8'''-Me), 1.08(d, J=7.0 Hz, 12H, 2/2'/2''/2'''-Me)。¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ174.0 (C-1/1'/1''/1'''), 79.8(C-3/3'/3''/3'''), 76.1(C-6/6'/6''/6'''), 68.8(C-8/8'/8''/8'''), 45.0(C-2/2'/2''/2'''), 42.1(C-7/7'/7''/7'''), 31.2(C-5/5'/5''/5'''), 27.9(C-4/4'/4''/4'''), 20.3(8/8'/8''/8'''-Me), 12.6(2/2'/2''/2'''-Me)。

化合物 2: ¹H-NMR(400 MHz, CD₃COCD₃) δ 4.98~4.87(m, 4H, H-8/8'/8''/8'''), 4.01~3.94(m, 4H, H-3/3'/3''/3'''), 3.90~3.80(m, 4H, H-6/6'/6''/6'''), 2.52~2.43(m, 4H, H-2/2'/2''/2'''), 2.03~1.97(m, 4H, H_β-5/5'/5''/5'''), 1.95~1.88(m, 4H, H_β-4/4'/4''/4'''), 1.81~1.68(m, 8H, H-7/7'/7''/7'''), 1.65~1.57(m, 6H, H_α-4/4'/4''/4''', 8-CH₂), 1.53~1.43(m, 4H, H_α-5/5'/5''/5'''), 1.21(d, J=6.3 Hz, 9H, 8/8'/8''/8'''-Me), 1.07(d, J=7.0 Hz, 3H, 2-Me), 1.05(d, J=7.0 Hz, 9H, 2'/2''/2'''-Me), 0.88(t, J=7.4 Hz, 3H, 8-Me)。¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ173.6(C-1), 173.4(C-1'/1''/1'''), 80.2(C-3), 80.1(C-3'/3''/3'''), 76.0(C-6), 75.9(C-6'/6''/6'''), 72.7(C-8), 68.5(C-8'/8''/8'''), 45.1(C-2), 45.0(C-2'/2''/2'''), 42.3(C-7/7'/7''/7'''), 40.0(C-7), 31.3(C-5), 31.2(C-5'/5''/5'''), 27.9(C-4), 27.7(C-4'/4''/4'''), 27.3(8-CH₂), 20.0(8'/8''/8'''-Me), 12.5(2-Me), 12.2(2'/2''/2'''-Me), 8.8(8-Me)。

化合物 3: ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 4.97~4.92(m, 2H, H-8'/8'''), δ4.91~4.86(m, 2H, H-8/8''), 4.04(q, J=7.2 Hz, 4H, H-3/3'/3''/3'''), 3.87~3.79(m, 4H, H-6/6'/6''/6'''), 2.55~2.47(m, 4H, H-2/2'/2''/2'''), 2.02~1.94(m, 4H, H_β-5/5'/5''/5'''), 1.93~1.86(m, 4H, H_β-4/4'/4''/4'''), 1.80~1.68(m, 8H, H-7/7'/7''/7'''), 1.64~1.54(m, 8H, H_α-4/4'/4''/4''', 8/8''-CH₂), 1.53~1.43(m, 4H, H_α-5/5'/5''/5'''), 1.21(d, J=6.3 Hz, 6H, 8'/8''-Me), 1.07(d, J=7.0 Hz, 6H, 2'/2''-Me), 1.05(d, J=7.0 Hz, 6H, 2'/2''-Me), 0.88(t, J=7.4 Hz, 6H, 8/8''-Me)。¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ 169.6 (C-1/1''), 169.4(C-1'/1''), 79.7(C-3/3''), 79.5(C-3'/3''), 76.3(C-6/6''), 76.1(C-6'/6''), 73.3(C-8/8''), 69.3(C-8'/8''), 46.6(C-2/2''), 46.4(C-2'/2''), 43.8(C-7/7''), 41.5(C-7'/7''), 33.5(C-5/5''), 33.4(C-5'/5''), 30.3(C-4/4''), 30.2(C-4'/4''), 29.6(8/8''-CH₂), 23.0(8'/8''-Me), 16.0(2'/2''-Me), 15.5(2'/2''-Me), 12.4(8/8''-Me)。

化合物 4: ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 5.00~4.82(m, 4H, H-8/8'/8''/8'''), 4.10~3.95(m, 4H, H-3/3'/3''/3'''), 3.89~3.77(m, 4H, H-6/6'/6''/6'''),

2.58~2.48(m, 8H, H-2/2'/2''/2'''), 2.03~1.95(m, 4H, H_β-5/5'/5''/5'''), 1.95~1.87(m, 4H, H_α-4/4'/4''/4'''), 1.81~1.70(m, 8H, H-7/7'/7''/7'''), 1.69~1.53(m, 10H, H_β-4/4'/4''/4''', 8/8'/8''-CH₂), 1.52~1.43(m, 4H, H_α-5/5'/5''/5'''), 1.23(d, J=6.2 Hz, 3H, 8''-Me), 1.10~1.06(m, 12H, 2/2'/2''/2'''-Me), 0.89(t, J=7.3 Hz, 9H, 8/8'/8''-Me)。¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ174.3 (C-1/1'/1''), 174.0(C-1''), 79.8(C-3), 79.7(C-3'), 79.6(C-3''), 79.4(C-3'''), 76.2(C-6/6'/6''), 76.1(C-6''), 73.1(C-8/8'/8''), 68.9(C-8''), 45.0(C-2), 44.9(C-2'/2''), 44.7(C-2''), 42.1(C-7''), 39.8(C-7/7'/7''), 31.4(C-5), 31.3(C-5'/5''), 31.2(C-5''), 28.0(C-4''), 27.9(C-4/4'/4''), 27.2(8/8'-CH₂), 27.1(8''-CH₂), 20.2(8''-Me), 12.9(2-Me), 12.7(2'/2''-Me), 12.5(2''-Me), 9.1(8/8'/8''-Me)。

综上, 通过 ESI-MS 和 NMR 等图谱解析和文献比对, 从菌株 S009 发酵产物中分离并鉴定了 4 个四重内酯类化合物, 分别为 nonactin(1), monactin(2), dinactin(3)和 trinactin(4), 其化学结构见图 1。

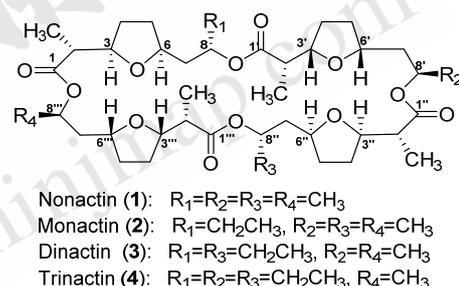


图 1 化合物 1~4 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compound 1~4

3.2 生物活性测试结果

从植物内生链霉菌 *Streptomyces* sp. S009 发酵液中分离纯化得到 4 个化合物, 普通病原菌活性测试结果见表 1, 耐药病原菌的活性测试结果见表 2。

4 讨论

本研究首次从剑叶龙血树内生链霉菌 *Streptomyces puniceus* S009 中分离得到 4 个大环四重内酯类化合物, 并采用 MS 和 NMR 等波谱技术鉴定了 4 个化合物的化学结构, 分别为 nonactin(1)、monactin(2)、dinactin(3)和 trinactin(4)。文献报道该类化合物具有抗细菌、抗真菌、抗肿瘤、杀虫和免疫抑制剂等活性^[8-10]。其可能的机制: 该类化合物是作为离子载体, 通过其 4 个呋喃环整合阳离子(如 Na⁺、K⁺、NH₄⁺等)而发挥作用^[11]。

表 1 化合物 1~4 抗普通病原菌的活性

Tab. 1 Activities of compound 1~4 on common pathogenic bacteria

菌株	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$							
	1	2	3	4	两性霉素 B	庆大霉素	氨苄青霉素	卡那霉素
大肠杆菌	>128	16	1	0.25	-	32	32	16
金黄色葡萄球菌	>128	32	2	0.25	-	-	16	8
白色葡萄球菌	>128	64	1	16	-	4	16	0.5
枯草芽孢杆菌	>128	>128	>128	>128	-	128	32	16
耻垢分支杆菌	>128	1	64	64	-	-	128	0.5
粪肠球菌	>128	64	4	0.5	-	32	128	>128
肺炎链球菌	>128	0.25	0.25	0.5	-	64	32	64
鼠伤寒沙门氏菌	>128	32	1	0.25	-	8	<0.125	4
铜绿假单胞菌	>128	>128	>128	>128	-	128	>128	-
肺炎克雷伯菌	>128	64	32	1	-	128	128	64
鲍曼不动杆菌	>128	64	64	0.25	-	64	>128	>128
流感嗜血菌	>128	>128	0.25	0.25	-	64	64	128
白色念珠菌	>128	>128	16	16	16	-	-	-

注：“-”表示未进行实验。

Note:“-” indicated that no experiment was performed.

表 2 化合物 1~4 抗耐药菌的活性

Tab. 2 Activities of compound 1~4 on drug resistant bacteria

菌株	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$						
	1	2	3	4	万古霉素	两性霉素 B	
1505	32	0.5	<0.125	0.5	4	-	
1450	32	1	<0.125	0.25	1	-	
1591	>128	1	0.125	0.5	4	-	
1957	>128	1	<0.125	1	4	-	
2024	>128	1	0.125	0.5	2	-	
I-20	128	1	0.125	1	4	-	
I-67	>128	1	0.125	0.5	4	-	
28299	64	2	0.25	1	4	-	
28300	16	1	<0.125	0.5	1	-	
23#	>128	>128	>128	>128	>128	8	
63#	>128	>128	>128	32	>128	4	
1725#	>128	>128	>128	>128	>128	8	
1730#	>128	>128	>128	>128	>128	4	
1732#	>128	>128	128	>128	>128	2	

注：“-”表示未进行实验。

Note:“-” indicated that no experiment was performed.

在此基础上,本研究对这 4 个化合物的抗菌活性进行了系统考察。结果显示化合物 3 和 4 具有广谱的抗菌活性,对 G^+ 、 G^- 和白色念珠菌均显示较强的抗菌活性,且活性比相应的阳性药庆大霉素、氨苄青霉素和卡那霉素更强,这些研究结果与以往研究结果一致^[6]。本研究首次发现随着 C-8/8'/8''/8''' 位乙基取代个数的增加,化合物 1~4 的抗菌活性逐渐增强,抗菌谱也逐渐扩大。对于耐氟康唑白色念珠菌,除了化合物 4 对编号 63# 的菌株具有中度抑制活性(MIC: $32\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)外,其余化合物均未表现出较好的活性。另外,MRSA 活性的测试结果显示,化合物 2~4 具有很强的抗 MRSA 活性,其对所测试的 MRSA 菌株的 MIC 均

小于或等于阳性药万古霉素($1\sim 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。尤其以化合物 3 活性最为显著,除了对 MRSA 28299 的 MIC 为 $0.25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,对其他测试的 MRSA 菌株的 MIC 均 $\leq 0.125\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。因此,化合物 2~4 具有开发为抗 MRSA 新药的潜力。

综上,本研究通过系统考察剑叶龙血树内生菌 S009 中的抗菌活性成分,发现了化合物大环四重内酯类成分的抗菌活性与其 C-8/8'/8''/8''' 位乙基取代个数密切相关;同时化合物 2~4 具有强于万古霉素的抗 MRSA 活性。这些结果不仅可为研制抗 MRSA 新药提供先导化合物,同时对有效利用和保护珍稀濒危的剑叶龙血树资源具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] China Antimicrobial Resistance Surveillance System. Surveillance on antimicrobial resistance of bacteria in different levels of hospitals: Surveillance report from China Antimicrobial Resistance Surveillance System in 2014-2019[J]. Chin J Infect Control(中国感染控制杂志), 2021, 20(2): 95-111.
- [2] 徐雪美. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染采用利奈唑胺与万古霉素治疗的有效性与安全性分析[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(24): 4360-4362.
- [3] JIN J, ZHAO Q, ZHANG X M, et al. Research progress on bioactive products from endophytes[J]. J Microbiol(微生物学杂志), 2018, 38(3): 103-113.
- [4] YUAN G J, LI P B, PAN W W. Quick identification of anti-MRSA secondary metabolites produced by two *Streptomyces* strains isolated from special surroundings[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(4): 337-341.
- [5] AN C L, KONG F D, MA Q Y, et al. Secondary metabolites from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCS-KFD66[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(13): 3001-3007.
- [6] ZHAN Y L, ZHENG S L. Efficient production of nonactin by *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*[J]. Can J Microbiol, 2016, 62(8): 711-714.
- [7] KAANICHE F, HAMED A, ELLEUCH L, et al. Purification and characterization of seven bioactive compounds from the newly isolated *Streptomyces cavourensis* TN638 strain via solid-state fermentation[J]. Microb Pathog, 2020(142): 104106.
- [8] HUSSAIN A, RATHER M A, DAR M S, et al. *Streptomyces puniceus* strain AS13., production, characterization and evaluation of bioactive metabolites: A new face of dinactin as an antitumor antibiotic[J]. Microbiol Res, 2018(207): 196-202.
- [9] HE H, XUE Y, XU N, et al. A novel pH-precursor-glucose synergic control strategy for dinactin biosynthesis by an Arctic actinomycete *Streptomyces* sp[J]. Process Biochem, 2016, 51(12): 1911-1918.
- [10] TEBBETS B, YU Z G, STEWART D, et al. Identification of antifungal natural products via *Saccharomyces cerevisiae* bioassay: Insights into macrotetrolide drug spectrum, potency and mode of action[J]. Med Mycol, 2013, 51(3): 280-289.
- [11] KUSCHE B R, SMITH A E, MCGUIRL M A, et al. Alternating pattern of stereochemistry in the nonactin macrocycle is required for antibacterial activity and efficient ion binding[J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(47): 17155-17165.

收稿日期: 2021-10-04

(本文责编: 蔡珊珊)