

南海海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 产生的一种抗肿瘤蓝色素*

温露¹, 袁保红², 李厚金¹, 林永成¹, 陈荣礼³, 周世宁²

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

3. 香港理工大学应用生物和化学技术系, 香港)

摘要: *Pseudomonas* sp. 是从大亚湾表面海水分离到的一株新的海洋细菌, 在改变培养条件之后, 能产生不同的次级代谢产物。从该菌培养液的脂溶性部分分离得到一种蓝色素 Blue-1, 它的结构通过 NMR, 2D-NMR, FABMS, 元素分析得到确定, 与从陆生菌 *Chromobacterium violaceum* (*Bacillus violaceus*) 中分离得到紫色杆菌素 (violacein) 的结构一致。抗肿瘤活性试验结果表明, Blue-1 对肿瘤细胞生长有很强的抑制作用, 对 MCG803 的 IC_{50} 为 4.6 $\mu\text{g/mL}$, 对 BEL-7402 的 IC_{50} 为 6.8 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 海洋细菌; *Pseudomonas* sp.; Blue-1; Violacein

中图分类号: O629 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 04-0063-04

自从 1929 年弗来明从真菌发现青霉素以来, 微生物活性代谢产物成了药物的丰富源泉。科学家大力研究细菌发酵代谢物的分子结构、化学性质和药理活性, 但目前分离到的所有细菌代谢物大部分是已知物质, 这些结果令人失望。另一方面, 传染性病菌对传统抗生素的抗药性正在增加, 寻找活性物质新源泉成了当务之急。因此科学界把注意力投向一个尚未开发的巨大天然资源宝库——海洋微生物。由于海洋环境的微生物在生态系统的功能, 海洋微生物已发展出独特的代谢方式, 也提供了在陆地微生物中未遇到过的代谢产物。近年来海洋微生物研究技术取得突破性的进展, 人们对从海洋微生物中找到新的特效药物寄予了极大的希望。海洋细菌作为海洋微生物的一个分支, 近年来一直吸引着科学工作者的目光, 取得重大的发展^[1]。

Violacein 是 Tobie 在 1935 年从陆生菌 *Chromobacterium violaceum* 中分离得到的化合物, 之后陆续有科学工作者研究了该化合物的杀菌活性, 杀利什曼原虫活性^[2], 抗大肠杆菌活性^[3], 抗胃溃疡活性^[4], 杀鞭毛虫活性^[5], 抗白血病和淋巴瘤细胞活性^[6]。

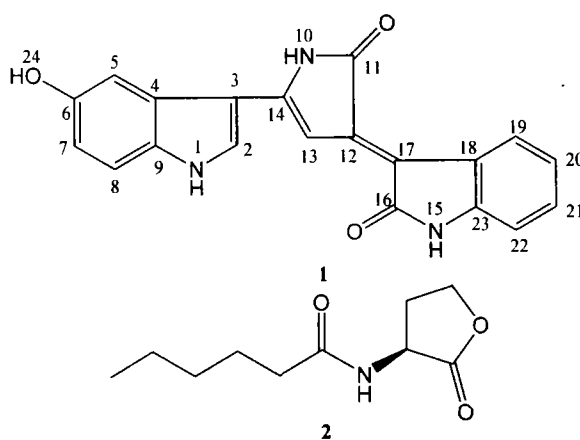
Pseudomonas sp. 是从大亚湾表面海水分离到的一株新的海洋细菌。本实验对该菌种的次级代谢产物进行了研究, 得到了一个蓝色素。生物活性试验

显示, Blue-1 对肿瘤细胞生长有很强的抑制作用。

1 结果与讨论

1.1 Blue-1 的结构分析

蓝色素 Blue-1 (1) 从 *Pseudomonas* sp. 的培养液脂溶性部分分离得到。据文献报导, 酰化的高丝氨酸内酯, 例如 HHL (2) 是产生 violacein 的实质因素, HHL 是自然界中存在的发送信息的化合物之一, 在细菌的次级代谢产物的产生过程中显示了非常特殊的活性, 在细菌自身之间起着传达信息的作用, 构成群体感应 (quorum sensing)。Violacein 就是在这个特殊条件下的产物, 产生 violacein HHL



* 收稿日期: 2004-11-15

基金项目: 国家 863 基金资助项目 (2003AA624010); 国家自然科学基金资助项目 (29672053); 广东省自然科学基金资助项目 (980317)

作者简介: 温露 (1978 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 林永成; E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn

的最佳浓度是 $3.7 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ^[7]。所以可以推测,在用 2216E 培养基培养细菌 *Pseudomonas* sp. 的时候,由于酵母膏中含有 2.3% 的丝氨酸,在 20 ℃ 条件下,会生成 HHL,并且 HHL 在代谢过程中维持一定的浓度,就会产生大量的 Blue-1。

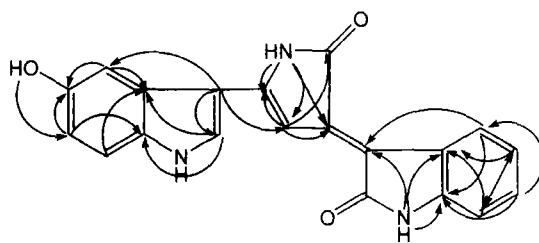


图 1 化合物 1 的 HMBC 相关

Fig.1 HMBC Correlations of compound 1

FAB-MS 谱显示 m/z 344 $[M + 1]^+$, 91 (100%), 165 (6%), 69 (46%), 结合元素分析与 NMR 谱分析得到 Blue-1 分子式 $C_{20}H_{13}N_3O_3$, 不饱和度为 16。碳谱结合 DEPT 谱可看出, 20 个碳中有 11 个 C, 9 个 CH, 没有 CH_2 , CH_3 。δ 171.6, 170.2 提示分子中有 2 个羰基 (连 NH) 存在。其他 18 个碳都是烯烃碳, 则分子中共有 11 个不饱和度, 故此分子有 5 个环。在氢谱中, 有 4 个活泼氢, δ 11.89(s, 1H), 10.67(s, 1H), 10.55(s, 1H), 9.26(s, 1H); 从化学位移, 峰形和偶合常数 [7.20(ddd, 1, 7.5, 7.5 Hz), 6.94(ddd, 1, 7.5, 7.5 Hz)] 可知化合物中有一个邻位二取代的苯环; 3 个芳香氢信号 [6.79(dd, 2, 8.5 Hz), 7.34(d, 9 Hz), 7.24(d, 2 Hz)] 提示还有 1 个三取代的苯环。 1H - 1H COSY 与 HMBC 谱 (图 1) 的相关信号, 清楚地揭示了整个分子的结构: 1H - 1H COSY 谱中, H-5 与 H-7 相关, H-7 与 H-8 相关可看出连接这 3 个 H 的 C 恰在三取代的苯环上, H-13 与 NH-10 相关, 证明 C-13 与 NH 在同一个吡咯环上, H-19 与 H-20 相关, H-20 与 H-21 相关, H-21 与 H-20, H-22 相关, H-22 与 H-21 相关, 显示出 C-19-C-22 在二取代的苯环上; 在 HMBC 谱中, H-8 与 C-4, H-7 与 C-9, H-5 与 C-7 相关再次证明 C-4-C-9 在同一个苯环上, OH-24 与 C-7 相关说明 OH 在苯环上, H-2 与 C-9 相关, H-5 与 C-3 相关说明苯环连接了一个吡咯环, 而 H-2 与 C-3 相关表明 C-2 与 C-3 在吡咯环上的相关关系, H-13 与 C-11, C-3 相关显示出 C-13 所在吡咯环与 C-3 所在吡咯环相连, H-19 与 C-21, H-20 与 C-18, C-22 相关, 建立了它们在邻位取代的苯环上的关系, H-19 与 C-17, NH-15 与 C-23 相关说明了吡咯环与苯环的相连关系与位置。将以上分析的各部分组合起来, 即得到 Blue-1 的结构。该结构与由陆生菌 *Chromobacterium violaceum* (*Bacillus violaceus*) 中分到的 Violacein 相同, 其波谱数据也是一致的。

1.2 Blue-1 的抗肿瘤活性

本文对 Blue-1 作了一系列抗肿瘤活性实验, 结果表明: Blue-1 对肿瘤细胞生长有很强的抑制作用, 对 MCG803 的 IC_{50} 为 $4.6 \mu\text{g/mL}$, 对 BEL-7402 的 IC_{50} 为 $6.8 \mu\text{g/mL}$ 。该物质对肿瘤细胞毒性作用,

可通过其引起的细胞形态学变化观察得到, BEL-7402 细胞在含该化合物的培养基中培养 24 h 后, $10 \mu\text{g/mL}$ 的量使大部分的 BEL-7402 细胞脱落变圆, 细胞体积也有所变小, 随着 Blue-1 作用时间的延长, 对肿瘤细胞形态的影响会更显著。另外, 肿瘤细胞经 $10 \mu\text{g/mL}$ Blue-1 处理 24 h 后, 引发了肿瘤细胞凋亡, 细胞核形态由圆形变为固缩或不规则, 边集呈肾形、分裂, 有的细胞核还已碎裂为诸多小块。MCG803 细胞用 $10 \mu\text{g/mL}$ Blue-1 处理 24 h 后, 出现了基因组 DNA 的降解。

2 实验部分

2.1 试剂与实验仪器

美国 Varian 公司 INOVA 500NB 超导核磁共振谱仪; VG ZAB-HS 质谱仪; 德国 Elementar 公司 Vario EL CHNS-O 元素分析仪; Agilent 1100 型高效液相色谱仪; Waters 515HPLC 泵; Waters 2487 双波长检测器; 浙江大学 N-2000 双通道色谱工作站; 北京泰克仪器有限公司的 X-4 数字显示显微熔点测定仪。

所用试剂均为广州化学试剂厂生产, 化学纯, 溶剂经重蒸后使用。柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 200 ~ 300 目硅胶, 硅胶 H, 薄层硅胶 GF254。

2.2 菌种和菌种培养

2.2.1 菌种 菌株由南海海洋研究所蔡创华提供, 是从大亚湾表面海水分离到的。种属鉴定为新的海洋细菌 *Pseudomonas* sp.^[8]。现保存于南海海洋研究所和中山大学化学与化工学院天然产物研究室。

2.2.2 菌种培养 以 2216E 培养基 (带鱼蛋白胨 0.5 g, 酵母膏 0.1 g, 磷酸铁 0.01 g, 陈海水 100 mL) 培养, 温度控制在 20 ℃, 180 r/min 摇床培养 42 h, 共培养 5 L, 最后菌体与培养液均变为蓝色。

2.3 提取与分离

收集发酵液, 冷冻干燥抽干水份后, 用甲醇浸泡, 提取浓缩物拌硅胶进行柱层析, 以石油醚/氯仿/甲醇梯度淋洗。收集各组分再进行反复柱层析。

表 1 Blue-1 的 NMR 数据
Tab.1 The NMR data of Blue-1

位号	DEPT	$\delta_c^{1)}$	$\delta_H^{2)}$	COSY	HMBC
1	NH		11.89		
2	CH	129.6	8.08(d,3Hz)	11.89	
3	C	105.7			7.24,7.55,8.08
4	C	131.6			6.79,7.24,8.08
5	CH	104.6	7.24(d,2Hz)	7.34	6.79
6	C	152.9			7.24,7.34
7	CH	113.3	7.34(d,9Hz)	6.79,10.55	7.24, 9.26
8	CH	113.0	6.79(dd,2,8.5Hz)		
9	C	125.6			7.34,8.08
10	NH		10.67		
11	C	171.6			7.55
12	C	147.6			7.55,10.67
13	CH	96.96	7.55(d,2 Hz)	10.67	10.67
14	C	136.96			7.55,10.67
15	NH		10.55		
16	C	170.2			
17	C	118.7			8.92,10.55
18	C	122.4			6.83,6.94,10.55
19	CH	126.3	8.92(d,8 Hz)	6.94	7.20
20	CH	120.8	6.94(ddd,1,7.5,7.5 Hz)	7.24,7.20,8.92	6.83
21	CH	129.3	7.20(dd,1,7.5,7.5 Hz)	6.94,6.83	8.92
22	CH	109.0	6.83(d,7.5 Hz)	7.20	6.94
23	C	141.8			7.20,8.92,10.55
24	OH		9.26		

1) Acetone-d₆ ,125 MHz;2) Acetone-d₆ , 500 MHz

重结晶纯化，用 HPLC 监测纯度，最后从培养液提取物中得到主要成分 Blue-1 (1) 约 3 mg。

Blue-1，蓝紫色粉末，易溶于丙酮，甲醇， θ_{mp} ：> 280 ℃，MS 343.34，C₂₀H₁₃N₃O₃，NMR 数据见表 1，元素分析 (w%)：C 69.96，H 3.82，N 12.24，O 13.98。

致谢：菌种 *Pseudomonas* sp. 是由南海海洋研究所蔡创华提供，在此表示感谢。

参考文献：

[1] 林永成.海洋微生物及其代谢产物[M].北京:化学工业出版社,2003.

[2] LEON L L, MIRANDA C C, DE SONZA A O, et al. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* [J]. J Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48:449 - 450.

[3] MARIANGELA B M, De Azevedo,JOEL A, et al. Biological activities of violacein, a new antitumoral indole Ddrivative, in an inclusion complex with β -cyclodextrin [J]. J Inclusion

Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2000, 37(1 - 4): 93 - 101.

[4] DURÁN N,JUSTO G E,MELO P S, et al. Evaluation of the antitumor activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with -cyclodextrin [J]. Canadian J Physiology and Pharmacology, 2003, 81(4): 387 - 396.

[5] CARSTEN M,PETER D,JENS B, et al. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1593 - 1599.

[6] MELO P S, MARIA S S, VIAL B C, et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2000, 36(8): 539 - 43.

[7] MARTINELLI D,GROSSMANN G,SÉQUIN U, et al. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* [J]. BMC Microbiology, 2004, 4:25.

[8] 陈月琴,周世宁,戴欣,等. 海洋产灵菌红素细菌的基因分析与鉴定[J]. 中山大学学报(自然科学版),1999, 38(1):115 - 117. (下转第 69 页)

D, E 的实验数据略。

参考文献:

- [1] 林永成. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] SITRIN R D, CHAN G, DINGERDISSEN J, et al. Isolation and structure determination of *Pachybasium cerebrosides* which potentiate the antifungal activity of aculeacin[J]. J Antibiot, 1988, 41(4): 469 - 480.
- [3] JENKINS K M, JENSEN P R, FENICAL W. Thraustochy-trosides A - C: new glycosphingolipids from a unique marine protist, *Thraustochyrium globosum* [J]. Tetrahedron, 1999, 40: 7637 - 7640.
- [4] BERTELLO L E, ANDREWS N W, de LEDERKREWS R M. Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 79 (2): 143 - 151.
- [5] 朱峰, 林永成, 周世宁, 等. 南海红树林内源真菌 2534 号代谢产物的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(1): 52 - 54.

Metabolites of Marine Fungus No.1924 from the South China Sea

ZHU Feng¹, LIU Xiao-hong¹, WEN Lu¹, LIN Yong-cheng¹, ZHOU Shi-ning², VRIJMOED L L P³

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract: Unidentified marine fungus No.1924 was isolated from a dropper of *Kandelia candel* from an estuarine mangrove in HongKong. Five Compounds (A, B, C, D, E) were isolated from the mycelium of this strain. Their structures were elucidated by comprehensive spectrometric methods as *N*-2'-hydroxypalmitoyl-1-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-9-methyl-4*E*,8*E*-sphingadiene (A), *N*-palmitoyldihydrosphingosine (B), ergosterol (C), 3 β -hydroxy-5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-diene (D), and cerevisterol (E), respectively. In the primary bioassay, compound A did not exhibit inhibitory activity to DNA topoisomerase (hTOP I) with IC₅₀ value of > 100 μ g/mL.

Key words: marine fungus; metabolites; sphingolipids; steroids

(上接第 65 页)

A Blue Pigment Isolated from Marine Bacteria *Pseudomonas* sp.

WEN Lu¹, YUAN Bao-hong², LI Hou-jin¹, LIN Yong-cheng¹, CHAN W L³, ZHOU Shi-ning²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. Hong Kong Polytechnic University Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong, China)

Abstract: *Pseudomonas* sp. is a new marine bacteria isolated from the South China Sea. By changing the culture media, it could produce different secondary metabolites. A blue compound Blue-1 has been first isolated from the ester extract of *Pseudomonas* sp. Its structure is the same of the known violacein as indicated by NMR, 2D-NMR, FABMS and element analysis. It has been found that Blue-1 is of strongly antitumour activities.

Key words: marine bacteria; *Pseudomonas* sp.; Blue-1; violacein