

海洋放线菌 124092 细胞毒活性和化学成分研究*

解修超 梅文莉 庄 令 林海鹏 洪 葵 戴好富**

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘要: 采用 MTT 法对海洋放线菌 124092 正己烷提取物进行细胞毒活性筛选, 结果显示对小鼠 B16 黑色素瘤细胞有一定的生长抑制活性。用硅胶真空柱层析法将正己烷提取物粗分为 6 个组分 (Fr1 ~ Fr6), 细胞毒活性追踪显示 Fr6 组分为活性部分。为确定其中的活性成分, 运用 GC/MS 对 Fr6 组分的化学成分进行了分析, 结果显示其主要成分为: 棕榈酸 (Palmitic acid, 11.76%)、油酸 (Oleic acid, 12.16%)、亚油酸 (Linoleic acid, 14.77%) 和乳杆菌 (菌) 酸 (Lactobacillic acid, 61.31%)。据文献报道棕榈酸、油酸、亚油酸均对小鼠腹水瘤细胞具有细胞毒活性, 亚油酸还对人肺腺癌细胞具有抑制作用。

关键词: 海洋放线菌, 细胞毒活性, 气相色谱/质谱联用, 化学成分

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0119-04

Study on Cytotoxic Activity and Chemical Constituents of Marine Actinomycetes Strain 124092*

XIE Xiu-Chao MEI Wen-Li ZHUANG Ling LIN Hai-Peng HONG Kui DAI Hao-Fu**

(State Key Laboratory of Tropical Crops Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101)

Abstract: The hexane extract from marine actinomycetes 124092 showed potent inhibition on B16 cell line by MTT assay. The hexane extract was fractionated on silica gel column by vacuum liquid chromatography to afford 6 fractions (Fr1 ~ Fr6), and Fr6 showed cytotoxic activity. To determine the bioactive components of hexane extract, Fr6 was analyzed by GC/MS. The main components were identified as palmitic acid (11.76%), oleic acid (12.16%), linoleic acid (14.77%), and lactobacillic acid (61.31%). It has been reported that palmitic acid, oleic acid, and linoleic acid possess cytotoxic activity on rat ascites tumor cells and linoleic acid have suppressive effect on human lung adenocarcinoma cells.

Key words: Marine actinomycetes, Cytotoxic activity, GC/MS, Chemical constituents

癌症是严重威胁人类生命的常见病和多发病。随着陆地资源的相对枯竭, 从海洋生物中寻找新的抗肿瘤活性物质已成为当今抗肿瘤药物研究热点。海洋微生物因海洋环境的独特而具有特殊的生理性状和遗传背景, 进而形成不同于陆地土壤微生物的代谢系统。因此它们极有可能产生新颖的生物活性物质^[1]。与海洋动植物相比, 海洋微生物的开发不至于导致海洋物种与海洋生态环境失衡, 更具有自然资源的可持续利用性, 因此海洋微生物产生的生物活性物质目前正成为国内外研究的热点领域^[2-4]。本实验室研究证实, 海洋红树林环境放线菌具有丰富的多样性, 经分离结合活性测试筛选到一批强细胞毒活性菌株^[5]。在前期工作基础上, 我们选择其中活性最强的放线菌

* 国家高科技发展计划 (863) 海洋生物技术主题 (No. 2004AA628040)
科技部社会公益项目 (No. 2004DIB3J072)

** 通讯作者 Tel: 0898-66988061, E-mail: hfdai2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-09-14, 修回日期: 2006-05-08

菌株 124092 做了进一步的研究。本文对其菌体正己烷提取物的细胞毒活性及其化学成分进行报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:放线菌 124092, 分离自海南省清澜港红树林保护站银叶树 (*Heritiera littoralis*) 根际土壤, 为本实验室保存菌种。

1.1.2 培养基:改良高氏培养基^[6]: 可溶性淀粉 20g, KNO_3 1.0g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 琼脂粉 20g, 50% 陈海水定容至 1,000 mL, pH 7.2 ~ 7.4, 1×10^5 Pa 灭菌 25min。

YE 液体种子培养基: 麦芽浸膏 10g, 酵母膏 4.0g, 葡萄糖 4.0g, 75% 陈海水定容至 1,000 mL, pH 7.4, 1×10^5 Pa 灭菌 20min。

黄豆粉发酵培养基^[7]: 可溶性淀粉 20g, 黄豆粉 15g, 酵母粉 5g, 蛋白胨 2g, 碳酸钙 4g, 氯化钠 4g, 50% 陈海水定容至 1,000 mL, pH 7.2 ~ 7.4, 1×10^5 Pa 灭菌 25min。

1.1.3 细胞株及培养条件:小鼠 B16 黑色素瘤细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。用三蒸水溶解 9.6g 的 MEM 培养基, 加青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 用 NaHCO_3 调节 pH 7.2 ~ 7.4, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后用于细胞培养。细胞使用前加入 10% 的胎牛血清, 于 5% CO_2 、湿度 90% 以上、37℃ 温箱中培养, 贴壁细胞用 0.25% 胰酶消化。

1.1.4 试剂:95% 乙醇、正己烷、石油醚、乙酸乙酯均为工业级, 丙酮、乙醚为分析纯; 噻唑蓝 (MTT)、MEM 和平衡盐溶液 PBS (北京欣经科公司), 丝裂霉素 C (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd)。

1.1.5 仪器:100L 发酵罐 (上海联环公司), 毛细管气相色谱-质谱联用仪 (HP6890/5973MSD, 美国 Hewlett-Packard 公司), MK3 酶标仪 (上海雷勃分析有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的发酵及处理:放线菌 124092 经改良高氏培养基斜面活化, 接种于 YE 种子培养基中, 28℃, 180r/min 振荡培养培养 2d, 按 5% 接种量接种到 70L 黄豆粉发酵培养基, 发酵罐培养 7d。培养结束后, 将菌液于 10,000 r/min 离心 10min。收集得到的菌体经冷冻干燥后, 用丙酮超声波浸提 (260W, 20kHz), 共浸提 3 次, 每次 15min, 浸提物加入少量水后用正己烷萃取, 分液得到正己烷提取物。

1.2.2 正己烷提取物的处理:将正己烷提取物经硅胶真空柱层析, 以石油醚/乙酸乙酯 = 100/0, 100/2, 100/5, 100/10, 100/20, 0/100 为洗脱剂梯度洗脱, 粗分成 Fr1 ~ Fr6 共 6 个组分, 各取 1mg 做细胞毒活性筛选。

1.2.3 小鼠 B16 黑色素瘤细胞生长抑制实验 (MTT 法)^[8]:实验设空白对照组、阳性对照组 (丝裂霉素 C) 和不同浓度梯度的待测样品。收集对数生长期细胞, 血球计数板计数, 按每孔 4, 500 个癌细胞量接种于 96 孔平底细胞培养板中, 置于 5% CO_2 、湿度 90% 以上、37℃ 温箱中培养。24 h 后取出加入一定量的待测样品, 继续培养 3 d 后取出置于显微镜下观察每孔细胞形态, 记录细胞形态变化, 然后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 (溶于平衡盐溶液 PBS) 50 μL , 37℃ 反应 4 h 后, 将细胞培养液吸出, 每孔加入 100 μL DMSO 将 Formazane 充分溶解, 将细胞培养板置于 MK3 酶标仪上, 用 570 nm 波长测各孔的吸光度 (A), 按下列公式求生长抑制率。以样品浓度为横坐标, 抑制

率为纵坐标，作图并求出抑制率为 50% 时样品的浓度 (IC_{50})。

生长抑制率 (%) = $(1 - \frac{\text{用药组平均 A 值}}{\text{对照组平均 A 值}}) \times 100\%$

1.2.4 正己烷提取物 GC/MS 分析：取正己烷提取物 Fr6 组分 (0.5 g) 溶于乙醚中，经滤纸过滤后做 GC/MS 分析。

气相色谱条件：石英毛细管柱 HP-FFAP (30m × 0.25mm, 0.25 μ m)，程序升温：从 60℃ 开始，以 4℃/min 升到 150℃，再以 6℃ /min 升温到 250℃，保持 3min，载气为 He，柱流量 1.0mL/min，进样口温度 250℃，分流比 80:1。

质谱条件：接口温度：270℃；EI 源；电离电压 70eV，离子源温度 230℃，扫描范围 40 ~ 500aum，进样量 1.0 μ L。

利用 GC/MS 联用仪计算机的 NIST1998 谱库检索了挥发油各组分的质谱数据，对机检结果和有关保留时间和标准图谱核对，用面积归一化法确定相对含量。

2 结果

2.1 正己烷提取物粗分及各组分细胞毒活性分析

从 70L 发酵液中共收集 421.5g 菌体，经丙酮超声波浸提得到 44.0g 浸提物，收率约为 0.6%。浸提物加入少量水后用正己烷萃取，得到 26.6g 正己烷提取物。将正己烷提取物经硅胶真空柱层析，以石油醚/乙酸乙酯洗脱剂梯度洗脱，粗分成 Fr1 ~ Fr6 共 6 个组分，并分别做细胞毒活性筛选 (表 1)。

表 1 海洋放线菌 124092 正己烷提取物粗分物及其细胞毒活性筛选结果

	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5	Fr6
各组分的量 (g)	2.19	10.90	3.42	3.29	4.39	1.05
占正己烷提取物比例 (%)	8.24	40.98	12.87	12.38	16.51	3.95
细胞毒活性 (B16)	-	-	-	-	-	+

注：+ 为有细胞毒活性，- 为无细胞毒活性

以 MTT 法对正己烷提取物、正己烷提取物的 Fr1 ~ Fr6 组分分别进行小鼠 B16 黑色素瘤细胞生长抑制活性测试，结果表明，正己烷提取物及其 Fr6 组分均显示了一定的抑制活性，其 IC_{50} 分别为 17.5 μ g/mL (图 1) 和 2.8 μ g/mL (图 2)，其他组分没有明显活性。

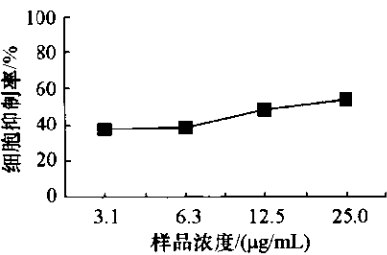


图 1 正己烷提取物细胞毒活性测定

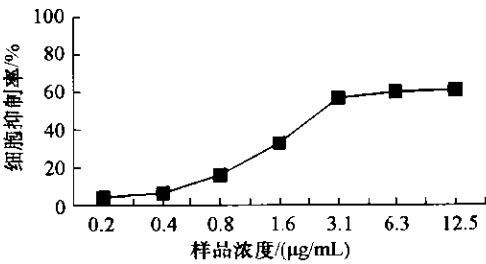


图 2 正己烷提取物 Fr6 组分细胞毒活性测定

2.2 Fr6 组分的 GC/MS 分析

采用 GC/MS 对上述具有明显活性的 Fr6 组分进行化学成分分析，鉴定了其中 4 个

化学成分 (表 2)。

表 2 海洋放线菌 124092 正己烷提取物 Fr6 组分的 GC/MS 分析结果

保留时间 (t/min)	化合物	分子式	相对百分含量 (%)
Retention Time	Compound	Molecular Formula	Content
36.99	棕榈酸 (Palmitic acid)	$C_{16}H_{32}O_2$	11.76
39.73	油酸 (Oleic acid)	$C_{18}H_{34}O_2$	12.16
40.39	亚油酸 (Linoleic acid)	$C_{18}H_{32}O_2$	14.77
41.29	乳杆 (菌) 酸 (Lactobacillic acid)	$C_{19}H_{36}O_2$	61.31

3 讨论

通过前期工作中对红树林环境细胞毒活性放线菌的分离筛选, 得到了一批具有较强细胞毒活性的放线菌。其中菌株 124092 发酵液对小鼠 B16 黑色素瘤细胞生长抑制活性达到 $ID_{50} = 5120$ (ID_{50} 为使 50% 的肿瘤细胞生长受到抑制的稀释倍数)。且初步研究表明, 其活性物质在发酵上清液和菌体中都存在。采用 MTT 法对菌体正己烷提取物进行小鼠 B16 黑色素瘤细胞生长抑制活性筛选, 结果其 $IC_{50} = 17.5 \mu\text{g/mL}$ 。运用硅胶柱真空柱层析法将正己烷提取物粗分为 6 个组分 (Fr1 ~ Fr6), 并分别进行了小鼠 B16 黑色素瘤细胞生长抑制活性测试。结果显示 Fr6 组分为活性部分, 其 $IC_{50} = 2.8 \mu\text{g/mL}$, 而其他组分没有明显活性。比较正己烷提取物和 Fr6 组分的活性结果, 可以发现, Fr6 组分的活性比正己烷提取物的活性提高了 6 倍多, 说明活性成分较好的集中在 Fr6 组分中, 而非活性成分分散在其他组分中。为了确定正己烷提取物中的活性成分, 运用 GC/MS 对 Fr6 组分的化学成分进行了分析, 结果表明脂肪酸类化合物为其主要成分, 分别为: 棕榈酸 (Palmitic acid, 11.76%)、油酸 (Oleic acid, 12.16%)、亚油酸 (Linoleic acid, 14.77%) 和乳杆 (菌) 酸 (Lactobacillic acid, 61.31%)。Siegel 曾报道^[9]棕榈酸、油酸、亚油酸对小鼠腹水瘤细胞均有体外细胞毒活性, 此外还有文献对亚油酸的人肺腺癌细胞抑制活性做了报道^[10]。上述脂肪酸是否就是海洋放线菌 124092 正己烷提取物中的活性成分, 尚须做进一步的研究证实。

致谢 本工作得到海南大学分析测试中心的大力支持, 深表谢意!

参考文献

- [1] Berman V S, Greenstein M, Maiese W M. *Adv Appl Microbiol*, 1997, **43**: 57 ~ 90.
- [2] Baz J P, Cañedo L M, Fernández Puentes J L. *J Antibiot*, 1997, **50** (9): 738 ~ 744.
- [3] Cañedo L M, Fernandez-Puentes J L, Baz J P. *J Antibiot*, 2000, **53** (5): 479 ~ 483.
- [4] Zheng Z H, Zeng W, Huang Y J, *et al*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **188** (1): 87 ~ 91.
- [5] 闫莉萍, 洪 葵, 胡申才, 等. *微生物学报*, 2005, **45** (2): 185 ~ 189.
- [6] 沈 萍, 范秀容, 李广武. *微生物学实验* (第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [7] Garcia G D, Romero M F, Perez B J, *et al*. Patent Number: US5681813.
- [8] 杨智源, 郑忠辉, 黄耀坚, 等. *中国海洋药物*, 1999, **18** (2): 52 ~ 55.
- [9] Siegel I, Liu T L, Yaghoubzadeh E, *et al*. *J Natl Cancer Inst*, 1987, **78** (2): 271 ~ 277.
- [10] 沙慧芳, 龚乐罗, 王恩忠. *上海医学*, 1994, **17** (11): 635 ~ 637.