

研究报告

海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. B9173 合成的 2-吲哚酮生物碱

刘艳艳 沈新迁 王晓政 林双君*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要: 【背景】海洋来源的天然产物近年来已成为小分子药物的重要来源。对海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. B9173 的基因组分析显示, 该菌包含多种天然产物的生物合成基因簇, 具有产生多种新化合物的潜力。【目的】挖掘 B9173 菌株中未知的次级代谢产物, 以期发现结构新颖或生物活性独特的化合物。【方法】利用 HPLC/LC-MS 结合的方法, 排除了该菌株产生的已知化合物, 确定 3 个未知化合物作为挖掘对象, 然后利用正、反相硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱和高效液相色谱等技术对次级代谢产物进行分离纯化, 最后得到化合物单体。利用质谱及核磁共振光谱技术对化合物结构进行解析和鉴定。【结果】确定 3 个化合物分别是色胺酮、甲基异靛蓝和 N,N-二甲基异靛蓝, 三者都属于 2-吲哚酮生物碱。其中色胺酮具有非常广的生物活性, 包括抗菌、抗肿瘤、抗炎症等, 是药物开发的良好前体, 这是首次在细菌中被分离得到。甲基异靛蓝是我国临床治疗慢性粒细胞白血病的药物, 这是首次在微生物发酵液中被分离得到。目前这 3 个化合物均主要依赖化学合成。本研究结合 B9173 菌株的代谢背景, 推测了 3 个化合物的生物合成途径。【结论】基于紫外吸收光谱和质谱特征, 从 B9173 菌株的发酵液中分离鉴定了 3 个 2-吲哚酮生物碱, 丰富了微生物活性天然产物的种类, 对 3 个化合物生物合成途径的推测也为进一步研究色胺酮和甲基异靛蓝的生物合成机制奠定基础, 后续可利用合成生物技术重构这类化合物的生物合成途径, 提供更便捷、低成本的生物合成方法。

关键词: 链霉菌 B9173, 2-吲哚酮生物碱, 甲基异靛蓝, 色胺酮, N,N-二甲基异靛蓝

2-Oxindole alkaloids produced by marine-derived *Streptomyces* sp. B9173

LIU Yan-Yan SHEN Xin-Qian WANG Xiao-Zheng LIN Shuang-Jun*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Background] Marine-derived natural products have become an important source of small molecule drugs in recent years. Genomic analysis showed that *Streptomyces* sp. B9173 contains a variety of biosynthetic gene clusters of natural products, with the potential to generate multiple new

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31425001)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34208057; E-mail: linsj@sjtu.edu.cn

Received: March 26, 2018; Accepted: May 23, 2018; Published online (www.cnki.net): June 21, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(31425001)

*通信作者: Tel: 86-21-34208057; E-mail: linsj@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-26; 接受日期: 2018-05-23; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-21

compounds. **[Objective]** The objective of this paper is to find new compounds with novel structures or unique biological activities from the strain B9173. **[Methods]** With the method combined with HPLC and LC-MS, we excluded the known compounds produced by B9173 and identified three unknown compounds as isolation targets. The secondary metabolites were isolated and purified using normal or reverse phase column chromatography, gel column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). The structures of the compounds were elucidated by using mass spectroscopy (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). **[Results]** Three compounds were purified and identified as tryptanthrin, meisoindigo, and N,N-dimethylisoindigo. All three compounds belong to the 2-oxindole alkaloids. Tryptanthrin has diverse biological activity, including antibacterial activity, anti-inflammatory activity, anti-tumor activity. Tryptanthrin is a potential drug lead and it is the first time to be isolated from bacteria. Meisoindigo is a drug used for clinical treatment of chronic myelogenous leukemia in China. It was isolated for the first time in a microbial fermentation broth. Based on the metabolic background of B9173, we speculated the biosynthetic pathways of three compounds. **[Conclusion]** Three 2-oxindole alkaloids were purified and structurally elucidated based on their UV-vis spectra and MS data. This study enriches the types of microbially active natural products. The proposed biosynthetic pathways will lay the foundation for further research on the biosynthetic mechanisms of tryptanthrin and meisoindigo. Subsequently biosynthetic pathways for this class of compounds can be reconstructed using synthetic biology techniques, which will provide more convenient and low-cost biosynthesis method for tryptanthrin and meisoindigo.

Keywords: *Streptomyces* sp. B9173, 2-Oxindole alkaloid, Meisoindigo, Tryptanthrin, N,N-Dimethylisoindigo

天然产物是药物开发的重要资源^[1-2]。到目前为止,人们已从自然界中鉴定了二十多万个天然产物^[3]。目前天然药物开发面临的最大问题是重复分离鉴定已知的化合物,所以在粗提物分离前期对其成分进行分析鉴别,排除已知化合物,有目标的挖掘新化合物可以极大节约资源和时间,提高发现新化合物的几率,这种方法叫做“排重(Dereplication)”^[4]。目前,排重的方法主要有基因组挖掘技术及色谱数据比对技术等。基因组挖掘技术是利用生物信息学的方法分析基因组序列,鉴定基因簇,预测化合物的种类以促进新化合物的发现^[5]。例如 Scherlach 和 Hertweck 等通过预测 *Aspergillus nidulans* 基因组序列中未知基因编码的产物,发现了 Aspoquinolones A-D 新型次级代谢产物,其具有很高的抗白血病作用^[6]。色谱数据比对技术是将化合物的色谱数据建成数据库,以此来筛选未知的化合物,包括紫外吸收图谱(UV)、高分辨质谱(HRMS)、二级质谱(MS/MS)、保留时间(Retention time)、核磁共振光谱(NMR)等^[7-9]。例如通过比对质谱数据筛选多肽类化合物^[10]

和利用 LC-DAD-TOFMS 可以快速地对微生物天然产物进行排重^[11]。

本文研究菌株海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. B9173 是从南美智利的太平洋沿岸沉积物中分离得到的。从该菌的发酵液里已经分离鉴定了抗白血病的生物碱类 Maremycin A-F^[12-13]及抗肿瘤物质色霉素 A₃^[14],说明该菌代谢产物丰富且活性多样。我们利用 HPLC-DAD 和 LC-MS 结合的方法,排除已知化合物,筛选并成功分离鉴定了 3 个化合物:色胺酮(1)、甲基异靛蓝(2)、N,N-二甲基异靛蓝(3) (图 1)。其中色胺酮具有非常广泛的生物活性,是首次在细菌中被分离得到。甲基异靛蓝是临床治疗慢性粒细胞白血病的小分子药物,是首次在微生物中被分离得到。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

Streptomyces sp. B9173 是德国 HKI 研究所馈赠的海洋链霉菌菌株。

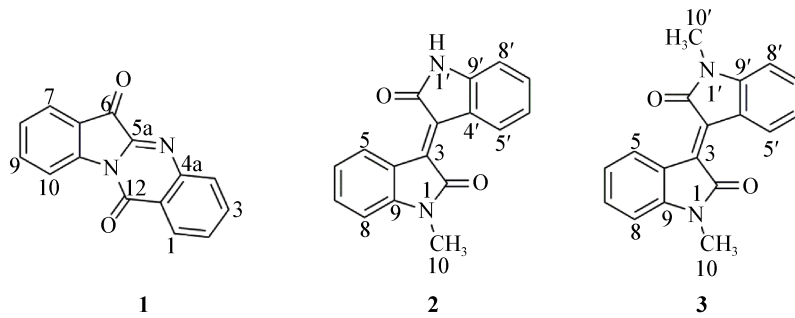


图 1 3 个化合物的化学结构

Figure 1 The chemical structure of three compounds

注：1：色胺酮；2：甲基异靛蓝；3：N,N-二甲基异靛蓝。

Note: 1: Tryptanthrin; 2: Meisoindigo; 3: N,N-dimethylisoidigo.

1.1.2 培养基

种子培养基(g/L)：Oxide TSB 30.0。产孢培养基(g/L)：甘露醇 20.0，黄豆饼粉 20.0，琼脂 20.0。发酵培养基(g/L)：甘露醇 20.0，黄豆饼粉 20.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

甲醇、乙酸乙酯、石油醚、氯仿、DMSO 等有机试剂，上海国药集团；色谱纯乙腈(Acetonitrile, ACN)，Sigma-Aldrich 公司；氘代氯仿(CD_3Cl-d_4)，Cambridge Isotope Laboratory 公司；正相柱层析硅胶，青岛海洋化工有限公司； C_{18} 反相柱层析硅胶，YMC 公司；凝胶色谱填料，GE 医疗集团。摇床，New Brunswick Scientific 公司；旋转蒸发仪，BUCHI 公司；冷却循环泵，上海东玺制冷仪器设备有限公司；真空泵，VACUUBRAND 公司；冷冻干燥机，LABCONCO 公司；自动样品收集器，上海青浦沪西仪器厂；高效液相色谱仪(Agilent 1260 infinity HPLC)，Agilent 公司；超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪，Waters 公司；600 MHz 核磁共振波谱仪，Bruker 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养与发酵

将菌种划线接种于产孢固体平板培养基，30 °C 恒温培养 5 d 至长出一层浓密的灰色孢子。滴加 1 mL 20% 的甘油-无菌水溶液至平板上，使用棉签轻轻地洗下孢子，用移液器将液体转移到菌种

管中，-20 °C 保存。取 10 μ L 孢子接种于含有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中，30 °C、220 r/min 振荡培养 20 h，至菌液呈浓密粘稠状；取种子液，按 8% 接种量接种于装有 500 mL 发酵培养基的 2 L 三角瓶中，30 °C、220 r/min 振荡培养 7 d。重复以上发酵步骤，共收集发酵液 150 L。

1.2.2 次级代谢产物的提取

将发酵液 6 000 r/min 离心 10 min。取上清液进行分批萃取，每批用 1.5 倍发酵液体积的乙酸乙酯进行常温振荡萃取，振荡 3 min，静置分层，分离水相和乙酸乙酯相。将水相再重复使用 1.5 倍的乙酸乙酯萃取 2 次。将萃取后的乙酸乙酯相 30 °C 减压蒸馏浓缩，蒸除乙酸乙酯并回收再利用，共获得 30.5 g 黑色油状发酵粗提物。

1.2.3 次级代谢产物的检测方法

取少量样品使用 HPLC 分析，DAD 检测器全波长扫描，并选取 210、254 和 400 nm 作为检测波长。HPLC 以 H_2O -ACN 作为流动相。分析柱为 XDB- C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm，5 μ m，Agilent)，流速为 0.4 mL/min。洗脱条件为梯度洗脱，乙腈的起始浓度为 10%，0-12 min 乙腈浓度由 10% 逐渐增加到 60%；12-35 min，乙腈浓度由 60% 逐渐增加到 95%；35-36 min，乙腈浓度由 95% 逐渐增加到 100%；36-40 min，乙腈浓度持续为 100%；40-41 min，乙腈浓度由 100% 逐渐降低到 10%；41-46 min，乙

腈浓度持续为 10%，本研究中的 HPLC 检测方法均保持一致。

1.2.4 次级代谢产物的分离纯化

首先使用正相硅胶柱进行初步分离。取约 450 g 200–300 目的硅胶悬浮于石油醚中，然后装于直径约 10 cm 的柱中，沉降完全后待用。粗提物用甲醇溶解然后用约 90 g 100–200 目硅胶进行拌样，采用干法上样。然后用洗脱体系(石油醚:石油醚:乙酸乙酯=5:1 石油醚:乙酸乙酯=1:1 乙酸乙酯:乙酸乙酯:甲醇=1:1 甲醇)逐级洗脱，洗脱体积都为 5 个柱体积，流速约 10 mL/min。用 250 mL 三角瓶收集洗脱液，每瓶收集样品约 200 mL。每瓶取样品 20 μ L，使用 HPLC 检测，根据各组分的成分，将含有相近化合物的样品合并为 FR1–FR10 共 10 个组分，通过减压蒸馏去除有机溶剂，得到棕黑色固体残渣。

使用长 35 cm，直径 2.5 cm 的 C_{18} 反相硅胶柱对各组分进行细分，采用干法上样，用甲醇和水的混合液作为流动相进行梯度洗脱，甲醇的浓度依次为 35% 50% 75% 100%，每个体系洗脱 5 个柱体积。用试管结合自动收集器收集洗脱液，每管收集 10 mL。HPLC 检测后，选取含有不同代谢物的样品使用 LC-MS 分析。以上 10 个组分都按照上述步骤进行分离和检测。在组分 FR5 中确定 3 个目标化合物，将含有目标化合物的组分合并为 FR5-4。

然后使用柱长 200 cm，直径 2.5 cm 的 Sephadex LH-20 进行纯化，甲醇作为洗脱剂，洗脱体积为 3 个柱体积。收集洗脱液，每管收集 5 mL。HPLC 检测后，将含有目标化合物的组分合并为 FR5-4-3。

对 FR5-4-3 使用上述相同的反相硅胶层析柱，洗脱液甲醇的浓度依次为 60%、70%、80%、90%、100%，每个梯度洗脱 5 个柱体积。收集洗脱液，每管收集 5 mL。HPLC 检测后，合并含有相近化合物的组分，得到组分 FR5-4-3-1、FR5-4-3-2、FR5-4-3-3、FR5-4-3-4。

对组分 FR5-4-3-2 使用长 35 cm，直径 1.5 cm 的 C_{18} 反相硅胶柱进一步分离，洗脱液甲醇的浓度梯度缩小为 60%、65%、70%、75%、80%、100%，每个梯度洗脱 3 个柱体积。收集洗脱液，每管收集 3 mL，HPLC 检测后，将洗脱液进一步分为 2 个组分。第二个组分中主要为化合物 1，重复组分 FR5-4-3-2 的分离步骤，最终得到纯的目标化合物 1。

对组分 FR5-4-3-3 同样使用长 35 cm，直径 1.5 cm 的 C_{18} 反相硅胶层析柱进行分离，洗脱液甲醇的浓度依次为 75%、80%、85%、90%、100%，每个梯度洗脱 3 个柱体积，收集洗脱液，每管收集 3 mL。HPLC 检测后合并为 2 个组分。对组分 2 重复上述分离步骤，最终得到纯的目标化合物 2。

对组分 FR5-4-3-4 使用上述相同的层析柱进行再次分离，洗脱液甲醇的浓度依次为 85%、90%、95%、100%，每个梯度洗脱 3 个柱体积。收集洗脱液，每管收集 3 mL。HPLC 检测后，排除含有杂质的组分，得到纯的目标化合物 3。

取少量纯化后的样品，溶解于甲醇中，使用 HRMS 检测，获得样品的高分辨质谱；将剩余样品全部溶解于 0.5 mL 氘代氯仿中，以四甲基硅烷(TMS)作为内标，进行核磁共振光谱(NMR)分析。检测结束后，样品回收，减压蒸馏去除溶剂，将干燥的样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 结果与分析

2.1 目标化合物的筛选

当使用 HPLC-DAD 对 FR5 的组分进行分析时，在石油醚-乙酸乙酯(5:1)洗脱部分发现 3 个 HPLC 峰(图 2A)，呈现出特殊的紫外吸收光谱(图 2B)。当使用反相层析柱对该组分进行细分时，纯甲醇洗脱部分(定为 FR5-4)富集了这 3 个代谢物(图 2A)，该紫外吸收光谱暗示这 3 个代谢物可能含有共轭结构。结合对这 3 个代谢物的 LC-MS 分析(图 2C)推测，这 3 个化合物虽然分子量较小，但是结构上应该具有一定的新颖性，于是将这 3 个化合物作为目标化合物进行后续分离。

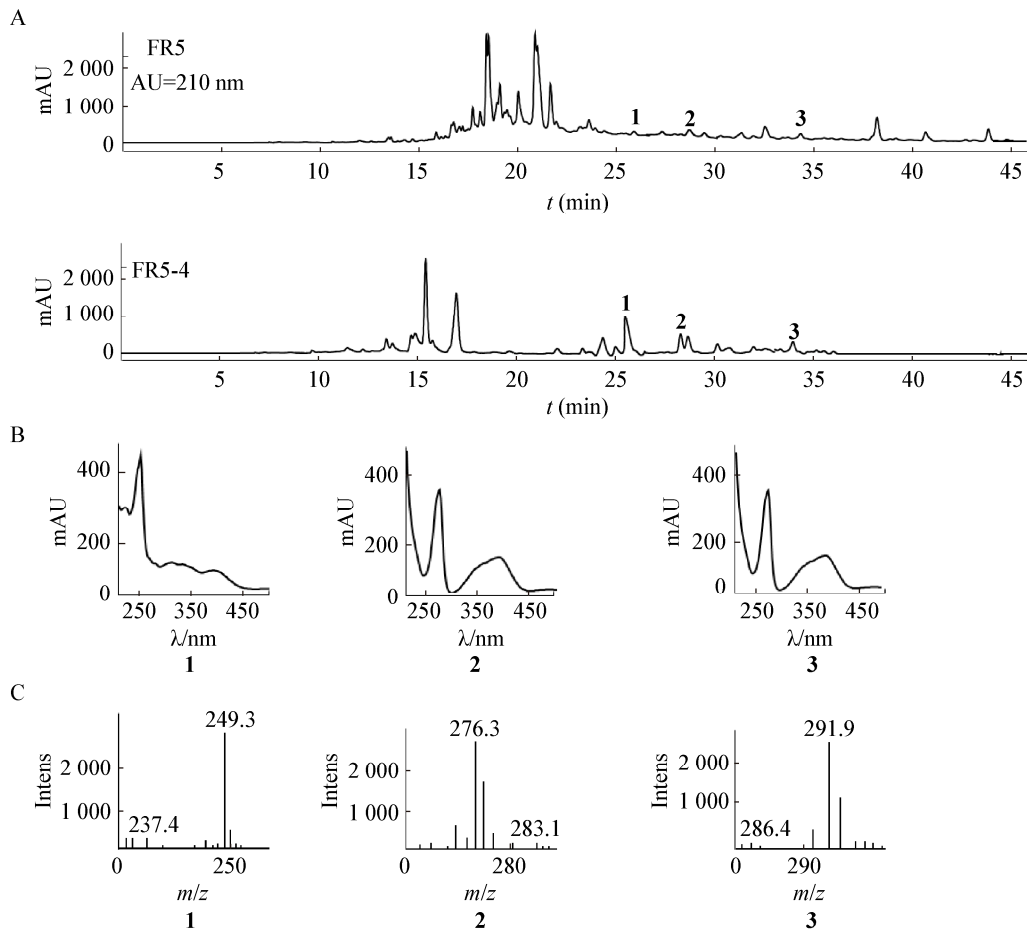


图 2 目标化合物的检测、富集和色谱数据

Figure 2 Detection, enrichment, and the chromatographic data of three candidate compounds

注：A：目标化合物在 HPLC 上的保留时间；B：目标化合物的紫外吸收图谱；C：目标化合物的质谱。

Note: A: The retention time of three candidate compounds on HPLC; B: The UV-vis spectra of three candidate compounds; C: The MS data of three candidate compounds.

2.2 目标化合物的分离纯化

利用凝胶过滤色谱和反相层析色谱对 FR5-4 进行多轮反复的分离纯化，最终从组分 FR5-4-3-2 分离得到化合物 1 (5 mg)，从组分 FR5-4-3-3 中

分离得到化合物 2 (5 mg)，从组分 FR5-4-3-4 中分离得到纯的目标化合物 3 (4 mg)，得到的 3 个纯化合物使用 HPLC 共进样分析的结果如图 3 所示。

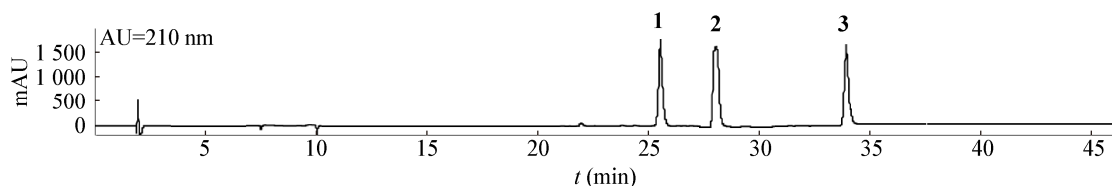


图 3 化合物 1、2、3 的 HPLC 谱图

Figure 3 The HPLC chromatogram of 1, 2, and 3

2.3 目标化合物的结构鉴定

2.3.1 化合物 1 的结构鉴定

1 是黄色粉末, 可溶于甲醇、氯仿。紫外吸收如图 2 所示, 其中 λ_{\max} : 210 nm、252 nm。在正离子模式下, 高分辨质谱分析(图 4A)给出其准分子离子峰为 249.065 9 $[M+H]^+$, 而其理论分子量为 248.058 6, 因此确定它的分子式为 $C_{15}H_8N_2O_2$ 。化合物 1 的 1H NMR (600 MHz, CD_3Cl)和 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3Cl)如图 5 所示。 1H NMR 显示该化合物有 8 个芳香氢质子信号 δ_H 8.64 (d, $J=7.86$ Hz, H-10)、 δ_H 8.44 (d, $J=7.68$ Hz, H-1)、 δ_H 8.03 (d, $J=7.92$ Hz, H-4)、 δ_H 7.92 (d, $J=7.32$ Hz, H-7)、 δ_H 7.86 (dd, $J=7.56, 7.32$ Hz, H-3)、 δ_H 7.80 (dd, $J=7.62, 7.56$ Hz, H-9)、 δ_H 7.68 (dd, $J=7.32, 7.26$ Hz, H-2)、 δ_H 7.43 (dd, $J=7.26, 6.89$ Hz, H-8), 而信号 δ_H 1.58 为水的信号, 此外通过二维核磁共振谱图可以确定信号 δ_H 1.25 是体系带来的杂质, 基于这些信息可以推测该结构中存在 2 个邻位取代苯环单元(图 1)。 ^{13}C NMR 和 DEPT 显示该化合物有 2 个羰基信号 δ_C 182.6 (C-6)、 δ_C 158.1 (C-12); 5 个不饱和季碳信号 δ_C 146.6 (C-4a)、 δ_C 146.3 (C-10a)、 δ_C 144.3 (C-5a)、 δ_C 123.7 (C-12a)、 δ_C 122.2 (C-6a); 8 个不饱和次甲基碳信号 δ_C 138.3 (C-9)、 δ_C 135.2 (C-3)、 δ_C 130.7 (C-4)、 δ_C 130.3 (C-2)、 δ_C 127.6 (C-1)、

δ_C 127.2 (C-8)、 δ_C 125.4 (C-7)、 δ_C 118.0 (C-10) (图 5B)。结合 1H - 1H COSY、HSQC、HMBC 等 2D NMR 光谱, 确定化合物 1 为色胺酮(Tryptanthrin), 化学结构如图 1 所示, 核磁数据与文献[15]报道一致。

2.3.2 化合物 2 的结构鉴定

2 是紫红色粉末, 可溶于甲醇、易溶于氯仿。紫外吸收如图 2 所示, 其中 λ_{\max} : 210 nm、274 nm、390 nm。在正离子模式下, 质谱分析(图 4B)给出其准分子离子峰为 277.098 0 $[M+H]^+$, 而其理论分子量为 276.089 9, 因此确定它的分子式为 $C_{17}H_{12}N_2O_2$ 。 1H NMR (图 6A)显示该化合物有 7 组芳香氢质子信号 δ_H 9.19 (d, $J=8.04$ Hz, H-5')、 δ_H 9.11 (d, $J=7.98$ Hz, H-5)、 δ_H 7.38 (t, $J=7.68$ Hz, H-7)、 δ_H 7.32 (t, $J=7.56$ Hz, H-7')、 δ_H 7.07 (d, $J=7.68$ Hz, H-6')、 δ_H 7.04 (d, $J=7.68$ Hz, H-6)、 δ_H 6.81 (m, H-8')、 δ_H 6.81 (m, H-8), 推测该结构中存在 2 个邻位取代苯环单元, 结合质谱该化合物为类二聚体; 信号 δ_H 3.28 (s)应该是氮甲基。 ^{13}C NMR (图 6B)和 DEPT 显示该化合物有 2 个羰基信号 δ_C 169.3 (C-2')、 δ_C 167.9 (C-2); 6 个不饱和季碳信号 δ_C 145.3 (C-9)、 δ_C 142.4 (C-9')、 δ_C 133.7 (C-3)、 δ_C 133.3 (C-3')、 δ_C 122.5 (C-4')、 δ_C 121.5 (C-4); 8 个不饱和次甲基碳信号 δ_C 132.5 (C-7)、 δ_C 132.5 (C-7')、 δ_C 130.2 (C-5')、 δ_C 129.8 (C-5)、 δ_C 122.5

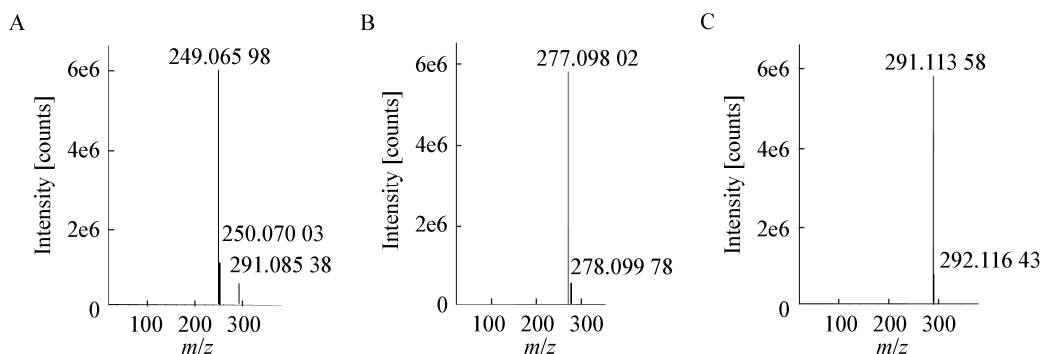


图 4 3 个化合物的高分辨质谱图

Figure 4 The HRMS spectra of three compounds

注: A: 色胺酮的高分辨质谱图; B: 甲基异靛蓝的高分辨质谱图; C: N,N-二甲基异靛蓝的高分辨质谱图。

Note: A: The HRMS spectrum of Tryptanthrin; B: The HRMS spectrum of Meisoindigo; C: The HRMS spectrum of N,N-dimethylisoindigo.

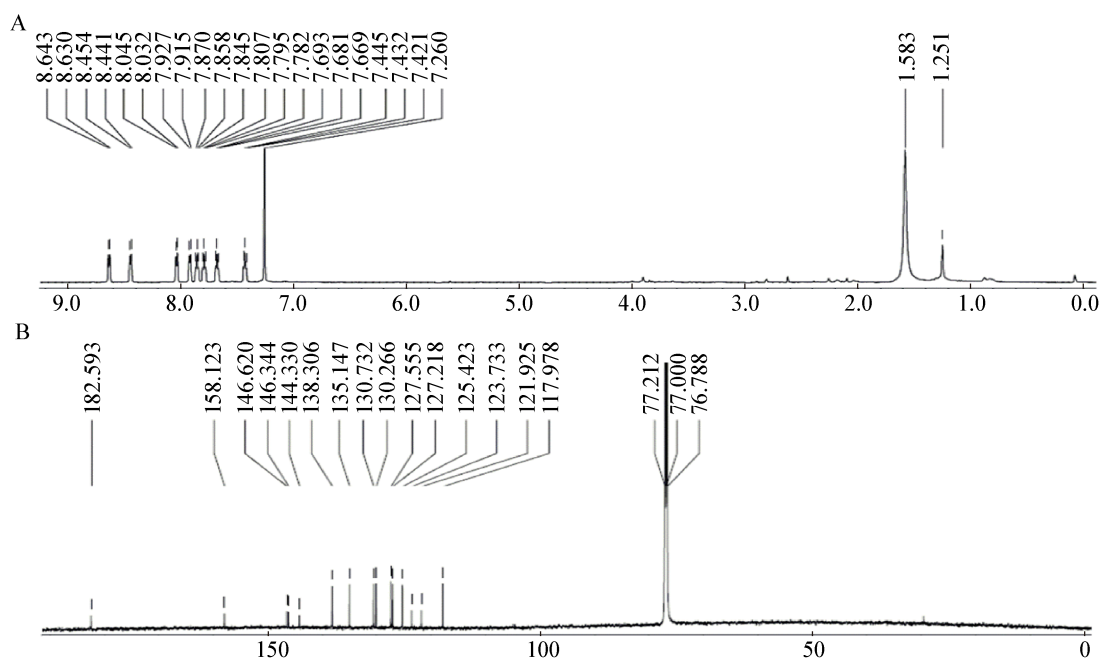


图 5 化合物 1 的一维核磁共振谱图

Figure 5 The 1D NMR spectra of compound 1

注：A：氢谱(600 MHz)；B：碳谱(150 MHz)。

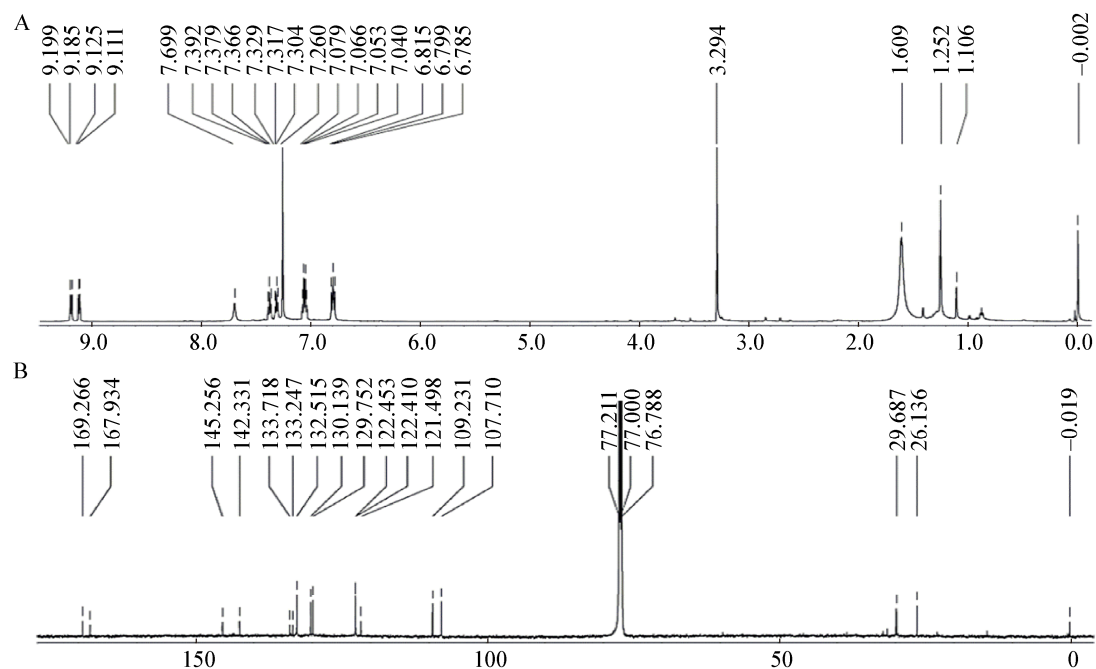
Note: A: ^1H NMR (600 MHz); B: ^{13}C NMR (150 MHz).

图 6 化合物 2 的一维核磁共振谱图

Figure 6 The 1D NMR spectra of compound 2

注：A：氢谱(600 MHz)；B：碳谱(150 MHz)。

Note: A: ^1H NMR (600 MHz); B: ^{13}C NMR (150 MHz).

(C-6')、 δ_c 122.4 (C-6)、 δ_c 109.2 (C-8')、 δ_c 107.7 (C-8)；一个与氮相连的甲基碳信号 δ_c 26.1 (C-10)。结合 ^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC 等 2D NMR 光谱，明确了重叠的信号峰并且排除了杂质信号(δ_H 1.25 与 δ_c 29.7)，最终确定化合物 2 为甲基异靛蓝 (Meisoindigo)，化学结构如图 1 所示，核磁数据与文献报道一致^[16]。

2.3.3 化合物 3 的结构鉴定

3 是紫红色粉末，微溶于甲醇，易溶于氯仿。紫外吸收如图 2 所示，与化合物 2 完全相同。在正离子模式下，质谱分析(图 4C)给出其准分子离子峰为 291.113 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，而其理论分子量为 290.105 5，因此确定它的分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (图 7A)显示该化合物有 4 组芳香氢质子信号 δ_H 9.21 (d, $J=7.98$ Hz, H-5/5')、 δ_H 7.38 (t, $J=7.68$ Hz,

H-7/7')、 δ_H 7.07 (t, $J=7.74$ Hz, H-6/6')、 δ_H 6.79 (d, $J=7.74$ Hz, H-6/6')，推测该结构中存在邻位取代苯环单元； ^1H NMR 还显示的一个氮甲基信号 δ_H 3.26 (s)，并结合该化合物的分子量，推测该化合物为二聚体； ^{13}C NMR (图 7B)和 DEPT 显示该化合物有一组羰基信号 δ_c 168.0 (C-2/2')；三组不饱和和季碳信号 δ_c 145.2 (C-9/9')、 δ_c 133.4 (C-3/3')、 δ_c 121.6 (C-4/4')；四组不饱和次甲基碳信号 δ_c 132.4 (C-7/7')、 δ_c 129.8 (C-5/5')、 δ_c 122.4 (C-6/6')、 δ_c 107.7 (C-8/8')；一组与氮相连的甲基碳信号 δ_c 26.1 (C-10/10') (图 7B)。信号 δ_H 3.49 (s)和 δ_c 50.9 为甲醇的核磁信号。结合 ^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC 等 2D NMR 光谱，确定化合物 3 为 N,N-二甲基异靛蓝(N,N-dimethylisoindigo)，化学结构如图 1 所示，核磁数据与文献^[17]报道一致。

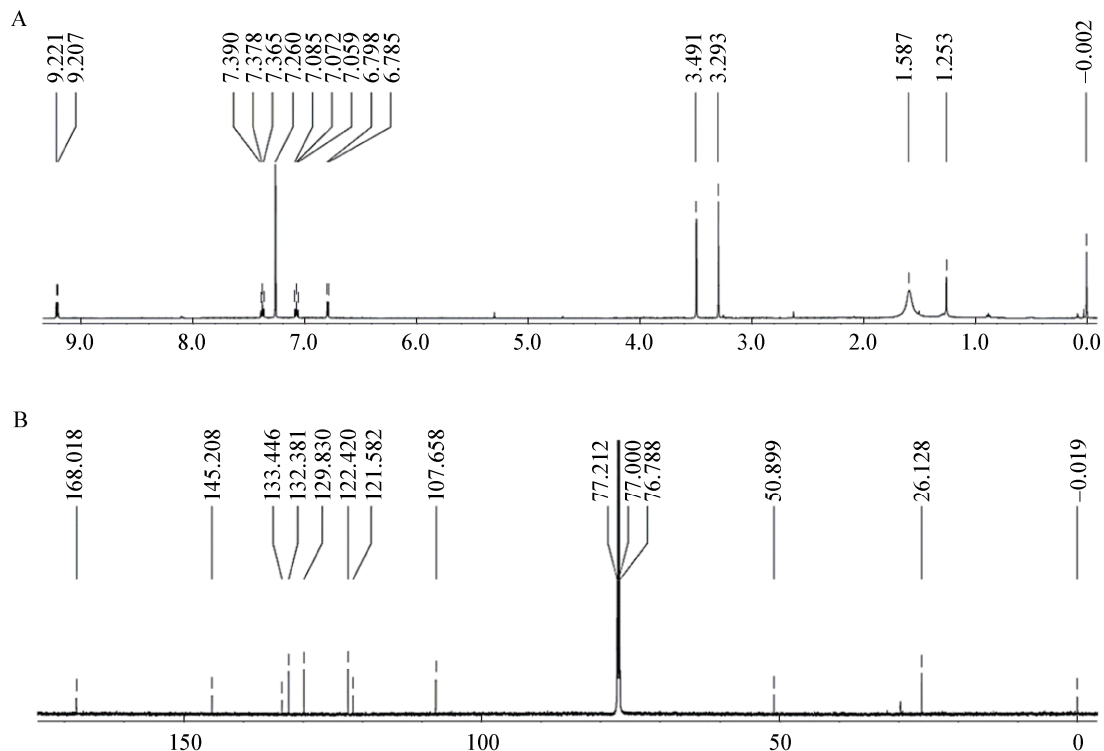


图 7 化合物 3 的一维核磁共振谱图

Figure 7 The 1D NMR spectra of compound 3

注：A：氢谱(600 MHz)；B：碳谱(150 MHz)。

Note: A: ^1H NMR (600 MHz); B: ^{13}C NMR (150 MHz).

3 讨论与结论

化合物 1 色胺酮具有非常广泛的生物活性,主要包括抗菌、抗炎症、抗肿瘤、抗疟疾、抗原生虫、抗氧化等^[18-20]。最显著的活性是对结核分枝杆菌的抑制作用,体外实验证明,它可以抑制多种类型的结核分枝杆菌,尤其是对多重抗药性的结核分枝杆菌, MIC 值是 0.5–1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 活性远远高于肺结核的临床药物异烟肼(MIC 4–16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 但体内实验尚未报道^[21]。同时色胺酮在体内对多种肿瘤细胞具有抗性。目前色胺酮的来源主要有 3 种:一是从植物中提取;二是 Hosoe 等在担子菌属裂褶菌的发酵液里提取到^[22];三是人工化学合成,主要方法是以吲哚醌和靛红酸酐为底物,以 N-甲基吡啶为催化剂,在吡啶溶剂中回流 1 h,产率达到 75%–95%,但底物合成复杂,成本高,污染大^[18]。本研究是首次在链霉菌发酵液里发现色胺酮,为其生物合成途径的研究奠定了基础。

化合物 2 甲基异靛蓝是靛玉红的衍生物,凭借活性高,副作用小,替代了靛玉红,临床上用来治疗慢性粒细胞白血病(CML)^[23],且有望成为治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)和急性骨髓性白血病(AML)的药物^[24]。目前甲基异靛蓝采用人工化学方法合成,这是首次从微生物的发酵液中分离得到。化合物 3 是化合物 2 的 N-CH₃ 衍生物,水溶性较化合物 2 明显降低,且完全没有生物活性。

这 3 个化合物均含有 2-吲哚酮结构单元。我们前期研究 Maremycins 生物合成机制过程中,阐明了血红素依赖的色氨酸双加氧酶在还原条件下特异性地催化 3-取代吲哚经环氧中间体生成 2-吲哚酮化合物^[25]。因此,我们推测这 3 个化合物可能同样利用了 MarE 催化吲哚形成的环氧中间体,以不同的形式分别形成了化合物 1 和化合物 2、3,如图 8 所示。如果 MarE 催化吲哚直接形成 2-吲哚酮,那么 2 个 2-吲哚酮在氧化酶催化下发生偶联脱氢反应,形成化合物 2 的前体(图 8 的途径 A)。这个氧化酶可能类似于催化 3-氧吲哚发生氧化二聚生成靛玉红的氧化酶^[26],将有利于我们通过对产生菌基因组的分析挖掘到该氧化酶。该前体经氮甲基转移酶的催化下发生了 2 次加载甲基的过程^[27],第一次加载甲基形成了化合物 2,第二次加载甲基形成了化合物 3。

如果环氧中间体在邻氨基苯甲酸存在下,邻氨基苯甲酸氮上的孤对电子进攻这个中间体就形成了 B 途径中的化合物 B₁,然后 B₁ 发生脱氢和环化反应,形成内酰胺化合物 B₂,B₂ 最后自发或酶催化发生脱氢反应形成芳香化合物 1 (图 8 的途径 B)。依据推测途径,我们可以寻找相关基因和酶,继而利用代谢工程改造菌株,使之高产甲基异靛蓝和色胺酮,这将极大降低两个化合物的生产成本并保护环境,有很好的应用价值和社会效益。

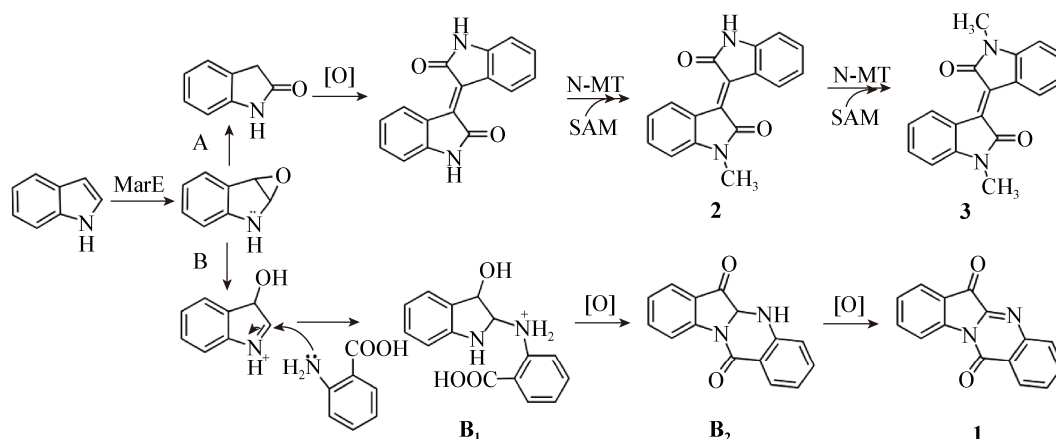


图 8 3 个化合物生物合成途径的推测

Figure 8 The proposed biosynthetic pathway for three compounds

REFERENCES

- [1] Beutler JA. Natural products as a foundation for drug discovery[J]. *Current Protocols in Pharmacology*, 2009, 46: 9.11.1-9.11.21
- [2] Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46(10): 4769-4807
- [3] Blunt JW, Munro MHG. Is there an ideal database for natural products research?[A]//*Natural Products: Discourse, Diversity, and Design*[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2014: 413-433
- [4] Mohamed A, Nguyen CH, Mamitsuka H. Current status and prospects of computational resources for natural product dereplication: a review[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2016, 17(2): 309-321
- [5] Challis GL. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways[J]. *Microbiology*, 2008, 154(6): 1555-1569
- [6] Scherlach K, Hertweck C. Discovery of aspoquinolones A–D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2006, 4(18): 3517-3520
- [7] Pérez-Victoria I, Martín J, Reyes F. Combined LC/UV/MS and NMR strategies for the dereplication of marine natural products[J]. *Planta Medica*, 2016, 82(9/10): 857-871
- [8] Zani CL, Carroll AR. Database for rapid dereplication of known natural products using data from MS and fast NMR experiments[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(6): 1758-1766
- [9] Chervin J, Stierhof M, Tong MH, et al. Targeted dereplication of microbial natural products by high-resolution MS and predicted LC retention time[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(5): 1370-1377
- [10] Mohimani H, Gurevich A, Mikheenko A, et al. Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(1): 30-37
- [11] Nielsen KF, Månsson M, Rank C, et al. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(11): 2338-2348
- [12] Balk-Bindseil W, Helmke E, Weyland H, et al. Maremycin A and B, new diketopiperazines from a marine *Streptomyces* sp.[A]//*Liebigs Annalen*[M]. Wiley-VCH, 1995: 1291-1294
- [13] Tang YQ, Sattler I, Thiericke R, et al. Maremycins C and D, new diketopiperazines, and Maremycins E and F, novel polycyclic spiro-indole metabolites isolated from *Streptomyces* sp.[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2001, 2001(2): 261-267
- [14] Xu XF, Fang Q, Liang ZT, et al. Chromomycin A3 and its analogues from the marine *Streptomyces* sp. B9173[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(5): 1013-1020 (in Chinese)
徐向飞, 方启, 梁祖韬, 等. 海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. B9173 的色素素 A3 及其类似物[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(5): 1013-1020
- [15] Liu Y, Ouyang F, Yu HY, et al. Chemical constituents in the leaves of *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek[J]. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 19(4): 273-275,283 (in Chinese)
刘远, 欧阳富, 于海洋, 等. 马蓝叶化学成分研究[J]. *中国药物化学杂志*, 2009, 19(4): 273-275,283
- [16] Xi KW, Yeo WK, Zhang B, et al. Synthesis and evaluation of functionalized isoindigos as antiproliferative agents[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(21): 7562-7571
- [17] Bergman J, Romero I. Synthesis of α -oxo-sulfines in the indole series[J]. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2010, 47(5): 1215-1220
- [18] Gholamzadeh P, Ziarani GM, Badiei A, et al. Efficient green synthesis of isoindigo derivatives using sulfonic-acid-functionalized nanoporous silica (SBA-Pr-SO₃H) catalyst and study of their antimicrobial properties[J]. *Research on Chemical Intermediates*, 2013, 39(9): 3925-3936
- [19] Jung EH, Ji YJ, Ko HL, et al. Tryptanthrin prevents oxidative stress-mediated apoptosis through AMP-activated protein kinase-dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2017, 40(9): 1071-1086
- [20] Moon SY, Lee JH, Choi HY, et al. Tryptanthrin protects hepatocytes against oxidative stress via activation of the extracellular signal-regulated kinase/NF-E2-related factor 2 pathway[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 37(10): 1633-1640
- [21] Hudson A, Imamura T, Gutteridge W, et al. The current anti-TB drug research and development pipelines[R]. World Health Organization, 2003
- [22] Hosoe T, Nozawa K, Kawahara N, et al. Isolation of a new potent cytotoxic pigment along with indigotin from the pathogenic basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune*[J]. *Mycopathologia*, 1999, 146(1): 9-12
- [23] Xiao ZJ, Hao YS, Liu BC, et al. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China[J]. *Leukemia & Lymphoma*, 2002, 43(9): 1763-1768
- [24] Huang M, Lin HS, Lee YS, et al. Evaluation of meisoindigo, an indirubin derivative: *in vitro* antileukemic activity and *in vivo* pharmacokinetics[J]. *International Journal of Oncology*, 2014, 45(4): 1724-1734
- [25] Zhang YY, Zou Y, Brock NL, et al. Characterization of 2-Oxindole forming heme enzyme MarE, expanding the functional diversity of the Tryptophan dioxygenase superfamily[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(34): 11887-11894
- [26] Berry A, Dodge TC, Depsin M, et al. Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, 28(3): 127-133
- [27] Lan YX, Zou Y, Huang TT, et al. Indole methylation protects diketopiperazine configuration in the maremycin biosynthetic pathway[J]. *Science China Chemistry*, 2016, 59(9): 1224-1228