

## 研究报告

喙尾琵琶甲肠道来源链霉菌(*Streptomyces* sp.) BPA71 次级代谢产物的分离鉴定及其生物活性评价

李铭晖, 王明明, 殷鹏凯, 肖怀, 杨大松\*, 杨银河\*

大理大学药学院 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000

李铭晖, 王明明, 殷鹏凯, 肖怀, 杨大松, 杨银河. 喙尾琵琶甲肠道来源链霉菌(*Streptomyces* sp.) BPA71 次级代谢产物的分离鉴定及其生物活性评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2076-2086.

LI Minghui, WANG Mingming, YIN Pengkai, XIAO Huai, YANG Dasong, YANG Yinhe. Isolation, identification, and bioactivity evaluation of secondary metabolites from *Blaps rynchopetera* gut-derived *Streptomyces* sp. BPA71[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2076-2086.

**摘要:** 【背景】昆虫是世界上种类最多、肠道菌群资源最丰富且多样的动物类群之一。昆虫肠道微生物具有产生活性次级代谢产物的能力, 是活性天然产物的重要来源。【目的】研究药用昆虫喙尾琵琶甲(*Blaps rynchopetera*)成虫肠道来源链霉菌(*Streptomyces* sp.) BPA71 的次级代谢产物及其生物活性。【方法】利用正相硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱等方法分离纯化该菌株的发酵粗提物, 采用牛津杯法进行抗菌活性追踪, 确定抗菌活性部位, 通过 ESI-MS、NMR 等波谱数据分析对化合物结构进行鉴定, 采用微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 采用 MTS 法测定抗肿瘤活性。【结果】从 *Streptomyces* sp. BPA71 的固体发酵提取物中共分离得到 4 个已知化合物, 通过对比核磁数据确定为糠酸甲酯(1)、吡咯甲酰胺 A (2)、吡咯甲酰胺 B (3)和吲哚-3-乙酸甲酯(4)。抗菌活性结果显示化合物 2 具有广谱抗菌活性。此外, 化合物 2 对宫颈癌细胞 HeLa、肺癌细胞 A549、肝癌细胞 SMMC-7721、乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和结肠癌细胞 SW480 这 5 株肿瘤细胞均有明显的抑制活性。【结论】喙尾琵琶甲肠道来源 *Streptomyces* sp. BPA71 可产生丰富的生物活性物质, 该研究结果为进一步挖掘喙尾琵琶甲肠道链霉菌的活性天然产物奠定了基础, 同时丰富了人们对喙尾琵琶甲肠道微生物的认识。

**关键词:** 喙尾琵琶甲; 肠道链霉菌; 次级代谢产物; 抗菌活性; 肿瘤抑制活性

资助项目: 云南省基础研究项目(202001AU070022); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(202305AC160035, 202105AC160062); 云南省重大科技专项计划(202002AA100007)

This work was supported by the Fundamental Research Project of Yunnan Province (202001AU070022), the Reserve Talents Project for Young and Middle-aged Academic and Technical Leaders of Yunnan Province (202305AC160035, 202105AC160062), and the Special Program of Science and Technology of Yunnan Province (202002AA100007).

\*Corresponding authors. E-mail: YANG Dasong, yangds@cpu.edu.cn; YANG Yinhe, yyh8612@126.com

Received: 2023-01-06; Accepted: 2023-03-10; Published online: 2023-04-10

## Isolation, identification, and bioactivity evaluation of secondary metabolites from *Blaps rynchopetera* gut-derived *Streptomyces* sp. BPA71

LI Minghui, WANG Mingming, YIN Pengkai, XIAO Huai, YANG Dasong\*, YANG Yinhe\*

Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical Research and Development, College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China

**Abstract:** [Background] Insects are the animal group with the most species and the most abundant gut microbiota resources in the world. The microorganisms in insect gut have the ability to produce active secondary metabolites, which is an important source of active natural products. [Objective] To identify the secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. BPA71 isolated from the gut of the medicinal insect *Blaps rynchopetera* and determine their biological activities. [Methods] The crude fermentation extract of the strain was separated and purified by column chromatography with silica gel and Sephadex LH-20. Oxford cup method was employed to determine the antimicrobial activity, and the antimicrobial active part was determined. The compound structure was identified by comparison of data from ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR, and  $^{13}\text{C}$  NMR. The minimum inhibitory concentration (MIC) and antitumor activity were determined by microbroth dilution method and MTS method, respectively. [Results] Four known compounds were purified from the crude fermentation extract of BPA71 and identified as methyl 2-furoate (1), pyrroloformamide A (2), pyrroloformamide B (3), and methyl 2-(1H-indol-3-yl) acetate (4). Compound 2 had broad-spectrum antimicrobial activity. In addition, it demonstrated significant inhibitory activities on five tumor cell lines, including cervical cancer cell line HeLa, lung cancer cell line A549, liver cancer cell line SMMC-7721, breast cancer cell line MDA-MB-231, and colon cancer cell line SW480. [Conclusion] *Streptomyces* sp. BPA71 from the gut of *B. rynchopetera* can produce rich bioactive substances. The findings of this study lay a foundation for further mining the active natural products of *Streptomyces* from the gut of *B. rynchopetera* and enriched our understanding of the gut microbiota of *B. rynchopetera*.

**Keywords:** *Blaps rynchopetera*; gut *Streptomyces*; secondary metabolites; antimicrobial activity; antitumor activity

微生物产生的次生代谢产物结构类型丰富多样, 在抗感染、抗肿瘤方面表现出独特的生物学活性, 是天然药物的重要来源之一<sup>[1]</sup>。近年来, 科研人员不断探索新环境下的微生物资源, 主要关注极端环境微生物、海洋微生物、稀有放线菌、黏细菌、植物内生菌等<sup>[2]</sup>。昆虫

在自然界中分布广泛, 其肠道是微生物分布的一类特殊生境, 存在着种类繁多、数量庞大的微生物<sup>[3]</sup>。为应对复杂的自然环境, 昆虫在长期的进化过程中形成了独特且高效的防御系统, 其体内的微生物会产生特殊的代谢产物以抵御外来病原菌的入侵, 从而保护宿主在复杂

的自然环境中生存下来,这表明昆虫相关微生物具有产生丰富抗菌活性物质的能力,可作为新型抗生素发现的重要来源<sup>[4-6]</sup>。

据文献统计,177个昆虫共生菌的次级代谢产物中47.5%的化合物具有显著的抗肿瘤、抗菌、抗氧化等生物活性,表明昆虫共生菌的次级代谢产物是先导性化合物的重要来源<sup>[4]</sup>。当前科学家们研究较多的是昆虫共生菌中的肠道微生物菌群。近年来,诸多学者对昆虫肠道这一特殊生境中的微生物次级代谢产物进行了研究,从昆虫肠道来源微生物次级代谢产物中分离获得的活性天然产物逐年增多。例如,从黑翅土白蚁<sup>[7]</sup>、纳塔尔大白蚁<sup>[8]</sup>、金龟子幼虫<sup>[9]</sup>、蝗虫<sup>[10]</sup>、美洲大蠊<sup>[11-12]</sup>、黑负葬甲<sup>[13]</sup>、家蚕<sup>[14]</sup>等多种昆虫肠道来源的微生物中已获得生物活性类型丰富的天然产物,为微生物药物的研发提供了候选分子。以上研究表明昆虫肠道微生物是挖掘新型活性次级代谢产物的重要来源,在医药领域具有潜在的药用价值和研究意义。喙尾琵琶甲(*Blaps rynchopetera*)属于鞘翅目(*Coleoptera*)拟步甲科(*Tenebrionidae*)琵琶甲属(*Blaps*),是一种携带特殊臭味的昆虫,在云南省分布广泛,生长在垂直海拔760–2 450 m阴凉潮湿的环境,靠近居民房屋、牲畜圈舍<sup>[15]</sup>,这样的生存环境大大增加了喙尾琵琶甲肠道菌群的种类丰富度。课题组前期已从喙尾琵琶甲肠道中分离获得176株放线菌,为进一步探索喙尾琵琶甲肠道来源微生物产生的抗菌活性天然产物,并为后续微生物菌株来源的先导化合物开发提供新的思路,本研究对一株具有广谱抑菌活性的链霉菌(*Streptomyces* sp.) BPA71<sup>[16]</sup>开展了次级代谢产物的研究,采用色谱技术从中分离获得化合物,结合波谱学方法对化合物进行结构解析。利用微量肉汤稀释法对主成分化合物进行抗菌活性测定,并采用MTS法对其

进行抗肿瘤活性测试。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

PDA、LB培养基、琼脂粉,广东环凯微生物科技有限公司;BHI培养基,北京陆桥技术股份有限公司;甲醇、乙酸乙酯、冰乙酸,天津市风船化学试剂科技有限公司;盐酸万古霉素(vancomycin hydrochloride)、青霉素G钠(penicillin G sodium)和制霉菌素(nystatin),上海麦克林生化科技有限公司;氯霉素(chloramphenicol),上海阿拉丁试剂有限公司。

洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;振荡培养箱,上海旻泉仪器有限公司;生化培养箱,上海龙跃仪器设备有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;旋转蒸发仪,BUCHI公司;紫外分析仪,温州铭仁仪器有限公司;多功能酶标仪,宝特公司。

### 1.2 菌株

*Streptomyces* sp. BPA71 (NCBI 登录号为OL780336)分离自云南省大理白族自治州大理市满江区农作物田地内的喙尾琵琶甲成虫肠道,菌株保藏于大理大学昆虫生物医药研发重点实验室。

将*Streptomyces* sp. BPA71在高氏1号培养基上进行大规模固体发酵,采用连续划线法在培养基表面接种培养,培养基总体积为20 L,将已接菌的培养皿置于28℃生化培养箱中培养14 d,相对湿度控制在75%。

试验采用9株病原菌作为指示菌进行抗菌活性检测,菌种信息如表1所示。

采用肺癌细胞A549、肝癌细胞SMMC-7721、宫颈癌细胞HeLa、乳腺癌细胞MDA-MB-231及结肠癌细胞SW480这5株肿瘤细胞进行代谢产

表 1 九株病原菌的菌种信息

Table 1 Strain information of 9 strains of pathogenic microorganisms

菌株名称 Strain name	标准菌株编号 Standard strain No.
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA	ATCC43300
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	BNCC103281
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC47077
白假丝酵母菌 <i>Candida albicans</i>	ATCC10231
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	BNCC186380
扩展青霉 <i>Penicillium expansum</i>	BNCC117714

表中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌购自广东省科学院微生物研究所; 鼠伤寒沙门氏菌购自北纳生物科技有限公司; 其余菌株保存于云南省昆虫生物医药研发重点实验室

In the table, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was purchased from the Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences; *Salmonella typhimurium* was purchased from BeNa Biotechnology Limited Company; The rest of the strains are stored in Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D.

物的抗肿瘤活性筛选, 所有细胞系均由中国科学院昆明植物研究所天然药物活性筛选中心提供。

### 1.3 代谢产物的提取与分离

*Streptomyces* sp. BPA71 于高氏 1 号培养基 28 °C 培养 14 d 后, 将培养基切成 1 cm 左右大小的方块, 使用乙酸乙酯: 甲醇: 冰醋酸体积比为 80:15:5 的配比液, 在常温下浸泡提取 3 次, 依次间隔 3、2 和 1 d。用滤纸过滤浸泡液, 减压浓缩获得发酵粗提物。将 *Streptomyces* sp. BPA71 的粗提物用超纯水混悬后, 先后用乙酸乙酯、正丁醇萃取, 将萃取液浓缩至浸膏状, 分为乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物。试验先对不同萃取物的抗菌活性进行追踪, 确定抗菌活性部位后, 利用正相硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱、薄层色谱层析等方法分离纯化该菌株的抗菌活性粗提物, 以进一步获得化合物。

### 1.4 活性测试

#### 1.4.1 抗菌活性

采用牛津杯法<sup>[17]</sup>检测不同萃取物的抗菌活性: 将耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和铜绿假单胞菌接种在 LB 液体培养基, 粪肠球菌接种在 BHI 液体培养基, 在振荡培养箱中 37 °C、180 r/min 培养 4 h。黑曲霉和扩展青霉先接种在 PDA 培养基 28 °C 活化 5 d, 分别将菌丝接入 PDB 培养基制备菌悬液; 白假丝酵母菌接种在 PDB 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 振荡培养 4 h。采用麦氏比浊法, 1.0 号麦氏浊度标准管约相当于  $3 \times 10^8$  CFU/mL, 2.0 号麦氏浊度标准管约相当于  $6 \times 10^8$  CFU/mL, 各病原菌的生长速率不一致, 但以不超过 2.0 号麦氏浊度标准管为宜, 将菌液再作 1:100 稀释, 可调整以上菌体浓度为  $(3-5) \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液, 吸取 100  $\mu$ L 菌悬液均匀涂布于对应的培养基上, 用无菌镊子将牛津杯(直径 8 mm)轻轻放置于平板上, 向其中加入 100  $\mu$ L 的不同萃取物(20 mg/mL)、盐酸万古霉素(100  $\mu$ g/mL)、氯霉素(150  $\mu$ g/mL)、青霉素 G 钠(200  $\mu$ g/mL)、制霉菌素(1 mg/mL)和阴性对照甲醇。将平板轻放于 4 °C 冰箱中 4 h, 待样品溶液渗透入培养基后, 细菌置于 37 °C 培

养 12 h 观察抑菌圈, 真菌置于 28 °C 培养 24 h 观察抑菌圈, 并记录抑菌圈的直径, 每组进行 3 次平行试验。

微量肉汤稀释法<sup>[18]</sup>测定化合物的抗菌活性: 将从 *Streptomyces* sp. BPA71 分离到的具有一定的化合物进行最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的检测。指示菌株包括 6 株病原细菌、3 株病原真菌, 9 株病原菌在适宜培养条件下活化后, 配制成浓度为  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液。

细菌的阳性对照为氯霉素、青霉素 G 钠和盐酸万古霉素, 真菌的阳性对照为制霉菌素。首先将化合物和阳性药用少量 DMSO 溶解, 并添加无菌水配制为 256  $\mu$ g/mL 的母液。样品组和阳性药组中化合物和阳性药的终浓度通过二倍稀释法倍比稀释为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 和 0.125  $\mu$ g/mL (反应体系中 DMSO 含量均小于 3‰), 加入等体积的菌液, 在无菌 96 孔板中进行反应, 最终反应体系为 100  $\mu$ L, 同时设定 DMSO 对照组和菌液空白对照组, 每组进行 3 次重复。将细菌在 37 °C 生化培养箱中培养, 真菌在 28 °C 生化培养箱进行培养, 分别在 12、24、48 和 72 h 观察菌株生长情况并使用多功能酶标仪读取各孔光吸收值, 检测波长为 600 nm。根据统计结果判断样品对各菌株的 MIC。

#### 1.4.2 细胞毒活性

采用 MTS 法检测化合物的抗肿瘤活性<sup>[19]</sup>。选择宫颈癌细胞 HeLa、肺癌细胞 A549、肝癌细胞 SMMC-7721、乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和结肠癌细胞 SW480 这 5 株肿瘤细胞进行抗肿瘤活性测试。首先用含 10% 胎牛血清的培养液配成细胞悬液, 以每孔 3 000–5 000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100  $\mu$ L, 细胞提前 12–24 h 接种培养。化合物 2 (DMSO 溶解) 以 40、8、1.6、

0.32 和 0.064  $\mu$ mol/L 浓度进行筛选, 每孔终体积 200  $\mu$ L (最终的反应体系中 DMSO 含量均小于 3‰), 每种处理均设 3 个复孔。37 °C 培养 48 h, 细胞贴壁后弃孔内培养液, 每孔加 MTS 溶液 20  $\mu$ L 和培养液 100  $\mu$ L; 设 3 个空白复孔 (MTS 溶液 20  $\mu$ L 和培养液 100  $\mu$ L 的混合液), 继续孵育 2–4 h, 使反应充分进行后测定光吸收值。使用多功能酶标仪读取各孔光吸收值, 检测波长为 492 nm, 记录结果, 数据处理后以浓度为横坐标、细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法计算化合物的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。顺铂广泛应用于多种肿瘤的治疗<sup>[20]</sup>, 紫杉醇作为治疗各种肿瘤的一线药物有着重要的作用<sup>[21]</sup>, 因此以顺铂和紫杉醇为阳性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 萃取物抗菌活性

采用牛津杯法测试不同萃取物的抗菌活性, 结果显示 *Streptomyces* sp. BPA71 的乙酸乙酯萃取物具有广谱的抗菌活性, 而正丁醇萃取物和水萃取物未表现出抑菌作用, 不同萃取物对病原菌的抑菌情况见表 2。除白假丝酵母菌外, 乙酸乙酯萃取物对其余 8 株病原菌均具有抑菌活性, 其中对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的抑菌活性显著 (抑菌圈直径 > 17 mm)。乙酸乙酯萃取物对部分病原菌 (6 株细菌) 的抑菌作用如图 1 所示。

### 2.2 化合物分离纯化

*Streptomyces* sp. BPA71 代谢产物的乙酸乙酯萃取物具有显著抑菌活性, 对其进一步分离纯化以追踪其活性成分。乙酸乙酯萃取物 (2.89 g) 经正相硅胶柱层析 (氯仿: 乙酸乙酯体积比为 100:1–6:4, 氯仿: 甲醇体积比为 10:1–0:10) 进行

表 2 不同萃取物对病原菌的抑菌圈直径

Table 2 Inhibition zone diameters of different extracts against pathogenic microorganisms (mm)

病原菌	乙酸乙酯萃取物	正丁醇萃取物	水萃取物
Pathogenic microorganisms	Ethyl acetate extract	N-butanol extract	Water extract
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA	19.3±0.6	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.7±0.6	—	—
<i>Escherichia coli</i>	17.7±0.6	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	13.0±0.0	—	—
<i>Salmonella typhimurium</i>	18.5±0.5	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.3±0.6	—	—
<i>Aspergillus niger</i>	16.6±1.5	—	—
<i>Penicillium expansum</i>	10.2±1.5	—	—
<i>Candida albicans</i>	—	—	—

表中数据为平均值±标准差; —: 无明显抑制作用(抑菌圈直径≤8 mm)

Data in the table are mean±SD; —: No obvious inhibition (inhibition zone diameter≤8 mm).

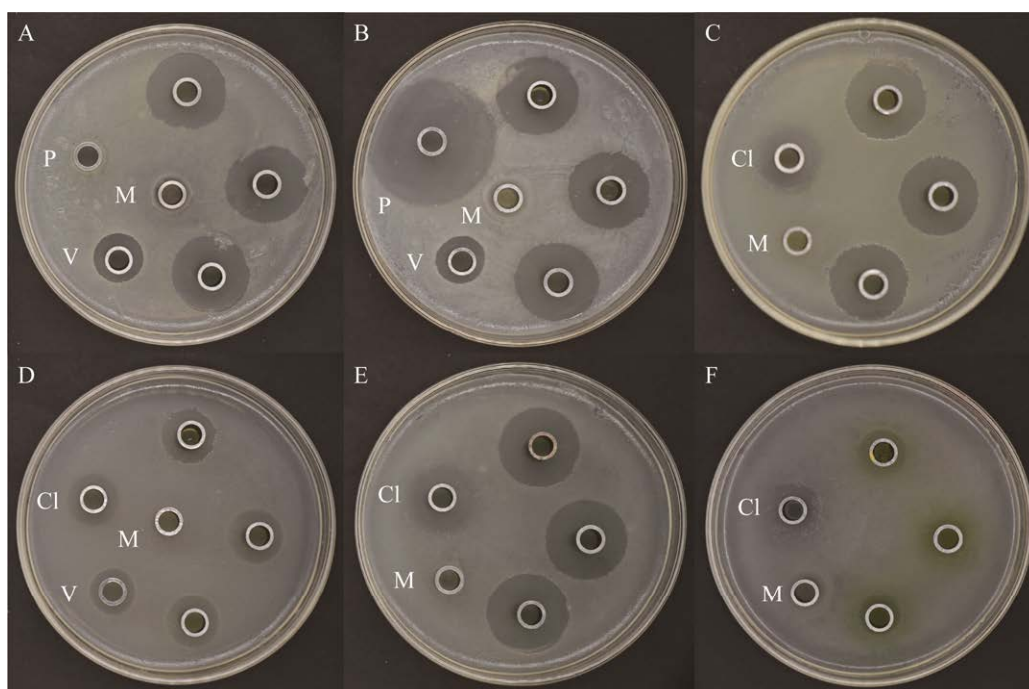


图 1 喙尾琵琶甲肠道 *Streptomyces* sp. BPA71 的乙酸乙酯萃取物对不同病原细菌的抑菌圈 A–F 中的致病细菌依次为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、粪肠球菌、鼠伤寒沙门氏菌和铜绿假单胞菌。样品均为乙酸乙酯萃取物。M: 甲醇(阴性对照); P: 青霉素 G 钠; V: 盐酸万古霉素; Cl: 氯霉素

Figure 1 Inhibition zones of the ethyl acetate extracts of *Streptomyces* sp. BPA71 isolated from *Blaps rynchopetera* adults against different pathogenic bacteria. A–F: The pathogenic bacteria are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, and all the samples are ethyl acetate extract. M: Methanol (negative control); P: Penicillin G sodium; V: Vancomycin hydrochloride; Cl: Chloramphenicol.

梯度洗脱, 根据薄层色谱特征合并样品获得馏分 A1-A14。A6 (67 mg) 经正相硅胶柱色谱层析(氯仿:乙酸乙酯体积比为 100:1-0:100)梯度洗脱得到 A6-1-A6-9, A6-3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱层析(氯仿:甲醇体积比为 1:1)纯化, 得到 A6-3-1-A6-3-4, 再将 A6-3-2 经薄层色谱层析法(氯仿:乙酸乙酯体积比为 1:2)得到化合物 **1** (10.0 mg)。A7 (203 mg) 经正相硅胶柱色谱层析(氯仿:乙酸乙酯体积比为 100:1-0:100, 氯仿:甲醇体积比为 10:1-0:10)梯度洗脱得到 A7-1-A7-8, A7-4 经凝胶柱色谱层析(氯仿:甲醇体积比为 1:1)纯化, 得到 A7-4-1-A7-4-6, A7-4-5 用氯仿:甲醇体积比为 1:1 混合液将其溶解, 静置过夜后, 有橘红色晶体析出, 其经正相硅胶柱色谱层析(氯仿:甲醇体积比为 100:1-0:100)纯化, 得到化合物 **2** (62.0 mg)。A7-4-1 通过凝胶柱层析(氯仿:甲醇体积比为 1:1)划分为 A7-4-1-1-A7-4-1-5。A7-4-1-4 (4.9 mg) 经薄层色谱层析法(氯仿:乙酸乙酯体积比为 1:1)得到化合物 **3** (1.2 mg)。A10 (221 mg) 经正相硅胶柱色谱层析(氯仿:甲醇体积比为 100:4-0:10)、凝胶柱层析(甲醇)及薄层色谱层析法(氯仿:乙酸乙酯体积比为 2:1)纯化得到化合物 **4** (2.2 mg)。以上 4 个化合物经过 GF-254 薄层色谱板点样、紫外分析仪检测、蘸取 5% 硫酸乙醇显色剂后烤板均

未观察到其他任何杂质。

### 2.3 化合物结构鉴定

喙尾琵琶甲肠道 *Streptomyces* sp. BPA71 经高氏 1 号培养基固体发酵后, 从其乙酸乙酯抗菌活性提取物中共分离得到 4 个已知化合物, 通过 ESI-MS、NMR 等波谱数据分析对化合物结构进行鉴定, 对比核磁数据确定为糠酸甲酯(**1**)、吡咯甲酰胺 A (**2**)、吡咯甲酰胺 B (**3**)、吡啶-3-乙酸甲酯(**4**)。它们的结构如图 2 所示。

化合物 **1**: 淡黄色清亮透明液体,  $C_6H_6O_3$ 。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4.16 (3H, s,  $OCH_3$ ), 6.56 (1H, dd,  $J=3.6, 1.8$  Hz, H-4), 7.32 (1H, d,  $J=3.6$  Hz, H-3), 7.65 (1H, d,  $J=1.7$  Hz, H-5);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 143.8 (C-2), 119.9 (C-3), 112.2 (C-4), 147.3 (C-5), 160.5 (C-6), 62.8 (C- $OCH_3$ )。以上数据与文献[22]及 Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) 数据库收录的碳谱、氢谱数据基本一致, 因此化合物 **1** 鉴定为 methyl 2-furoate。

化合物 **2**: 亮黄色针状晶体,  $C_7H_6N_2O_2S_2$ 。HRESI-MS  $m/z$  236.976 7  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_7H_6N_2O_2S_2Na$ , 236.976 8), 核磁谱图显示有两组相似信号, 经过和文献[23]中核磁共振氢谱、碳谱数据比较分析, 被鉴定为一对旋转异构体 pyrroloformamide A (rotamer a 和 rotamer b)。Rotamer a 具体的核磁共振波谱数据为  $^1H$  NMR

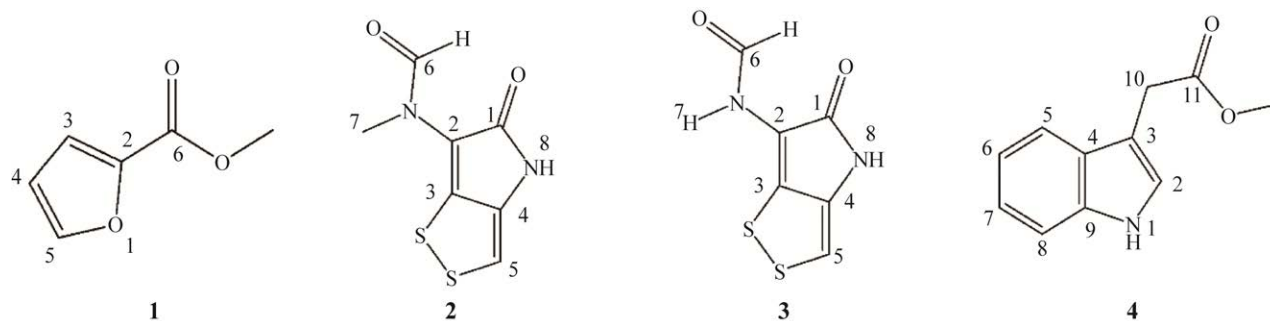


图 2 化合物 1-4 结构式

Figure 2 The chemical structures of compounds 1-4.

(400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.37 (3H, s, H-7), 7.25 (1H, s, H-5), 8.09 (1H, s, H-6), 10.82 (1H, s, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 168.6 (C-1), 115.4 (C-2), 133.3 (C-3), 142.2 (C-4), 112.7 (C-5), 162.5 (C-6), 33.9 (C-7)。Rotamer b 具体的核磁共振波谱数据为  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.15 (3H, s, H-7), 7.29 (1H, s, H-5), 8.36 (1H, s, H-6), 10.94 (1H, s, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 168.8 (C-1), 117.9 (C-2), 133.5 (C-3), 142.1 (C-4), 112.3 (C-5), 162.1 (C-6), 39.9 (C-7)。以上数据与文献[23]报道数据基本一致。

化合物 **3**: 黄色粉末,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 。  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.13 (1H, s, H-5), 8.00 (1H, s, H-6), 10.18 (1H, s, H-7), 10.80 (1H, s, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 167.8 (C-1), 113.8 (C-2), 133.6 (C-3), 134.7 (C-4), 111.6 (C-5), 159.6 (C-6)。以上数据与文献[23]报道的碳谱、氢谱数据基本一致, 因此化合物 **3** 鉴定为 pyrroloformamide B。

化合物 **4**: 黄色粉末,  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ 。  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 2.90 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3.35 (2H, s, H-10), 7.16 (2H, m, H-6, 7), 7.43 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-8), 7.95 (1H, s, H-2), 8.06 (1H, d,  $J=7.6$  Hz, H-5);  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ :

133.5 (C-2), 108.9 (C-3), 122.2 (C-4), 122.5 (C-5), 123.7 (C-6), 127.7 (C-7), 113.0 (C-8), 138.35 (C-9), 30.9 (C-10), 169.5 (C-11), 45.6 (C-OCH $_3$ )。以上数据与文献[24]数据相近, 因此化合物 **4** 鉴定为 methyl 2-(1H-indol-3-yl) acetate。

## 2.4 化合物生物活性测试

### 2.4.1 抑菌活性

对化合物 **2** 进行抗菌活性测试, 以氯霉素、青霉素 G 钠、盐酸万古霉素及制霉菌素为阳性对照。结果表明化合物 **2** 对 9 株病原菌具有广谱的抑菌活性(表 3)。

### 2.4.2 细胞毒活性

化合物 **2** 对人体不同肿瘤细胞系生长的抑制作用如表 4 所示。以顺铂和紫杉醇作为阳性对照, 化合物 **2** 对所测试的 5 种肿瘤细胞系均显示出较强的抑制作用,  $IC_{50}$  范围为  $(0.068\pm 0.001)-(0.413\pm 0.019)$   $\mu\text{mol/L}$ 。与阳性药相比, 化合物 **2** 对 5 株肿瘤细胞的  $IC_{50}$  值均低于顺铂, 对肝癌细胞 SMMC-7721 的  $IC_{50}$  值低于紫杉醇。

表 3 化合物对病原菌的最低抑菌浓度

Table 3 The minimal inhibitory concentration values of compounds against pathogenic microorganisms ( $\mu\text{g/mL}$ )

病原菌 Pathogenic microorganisms	氯霉素 Chloramphenicol	青霉素 G 钠 Penicillin G sodium	盐酸万古霉素 Vancomycin hydrochloride	制霉菌素 Nystatin	化合物 <b>2</b> Compound <b>2</b>
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA	/	/	1	/	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	0.25	/	/	28
<i>Escherichia coli</i>	10	/	/	/	48
<i>Enterococcus faecalis</i>	/	1	/	/	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	/	8	/	/	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96	/	/	/	64
<i>Aspergillus niger</i>	/	/	/	4	48
<i>Penicillium expansum</i>	/	/	/	2	64
<i>Canidia albicans</i>	/	/	/	2	64

/: 未使用该阳性药做测试

/: The positive drug is not used for testing.

表 4 化合物对人体肿瘤细胞系的半数抑制浓度

Table 4 The half maximal inhibitory concentration of compounds on human tumor cell lines ( $\mu\text{mol/L}$ )

肿瘤细胞 Tumor cell	化合物 2 Compound 2	顺铂 Cisplatin	紫杉醇 Paclitaxel
宫颈癌细胞 HeLa Cervical cancer cell HeLa	0.413 $\pm$ 0.019	8.830 $\pm$ 0.240	<0.008
肺癌细胞 A549 Lung cancer cell A549	0.121 $\pm$ 0.002	19.00 $\pm$ 0.24	<0.008
肝癌细胞 SMMC-7721 Liver cancer cell SMMC-7721	0.068 $\pm$ 0.001	12.35 $\pm$ 0.27	0.702 $\pm$ 0.041
乳腺癌细胞 MDA-MB-231 Breast cancer cell MDA-MB-231	0.171 $\pm$ 0.015	24.24 $\pm$ 0.47	<0.008
结肠癌细胞 SW480 Colon cancer cell SW480	0.139 $\pm$ 0.001	21.13 $\pm$ 0.57	<0.008

### 3 讨论与结论

天然产物骨架类型丰富, 生物活性广泛, 是研发新型药物的重要来源。微生物因分布广泛、种类繁多、生境条件多样、生长周期短、发酵技术较成熟、短时间内可大量富集代谢产物等优势获得众多学者的关注。本研究提出以药用昆虫喙尾琵琶甲成虫肠道来源链霉菌作为新的微生物来源, 选择具有显著抗菌活性的 *Streptomyces* sp. BPA71 进行固体发酵并制备代谢产物粗提物。

采用活性追踪法确定了活性部位为乙酸乙酯萃取物, 通过硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析等方法从乙酸乙酯活性部位分离获得 4 个化合物, 分别为糠酸甲酯(1)、吡咯甲酰胺 A (2)、吡咯甲酰胺 B (3)和吡啶-3-乙酸甲酯(4)。根据文献[23,25]报道, 吡咯甲酰胺 A、吡咯甲酰胺 B 为二硫吡咯酮类抗生素, 具有独特的吡咯酮二硫杂环戊二烯(4H-[1,2]二硫[4,3-b]吡咯-5-酮)骨架, 这 2 个化合物对多株致病菌具有显著的抗菌活性。在 Zhou 等<sup>[23]</sup>的研究中, 吡咯甲酰胺 A 对 A549 和 Caco-2 有较强的细胞毒性,  $IC_{50}$  分别为(1.34 $\pm$ 0.01)  $\mu\text{mol/L}$  和(0.57 $\pm$ 0.01)  $\mu\text{mol/L}$ 。与其他获得的成分相比, 化合物 2 的含量较多, 是

*Streptomyces* sp. BPA71 在高氏 1 号培养基固体发酵条件下产生的主要次级代谢产物。通过对化合物 2 的最低抑菌浓度(MIC)以及对 5 种肿瘤细胞的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )检测, 结果表明化合物 2 具有广谱的抗菌和抗肿瘤活性。研究从喙尾琵琶甲肠道链霉菌(*Streptomyces* sp.) BPA71 的次级代谢产物中共分离获得 4 个化合物, 代谢产物较少, 后续可通过优化培养条件, 以进一步挖掘种类丰富的代谢产物。本研究丰富了昆虫肠道来源链霉菌的次级代谢产物, 为开发利用昆虫来源微生物天然产物资源与寻找药物先导化合物提供了科学依据。

### REFERENCES

- [1] 王于方, 付炎, 吴一兵, 张曼丽, 李力更, 霍长虹, 史清文. 天然药物化学史话: 雷帕霉素[J]. 中草药, 2017, 48(4): 623-630.  
WANG YF, FU Y, WU YB, ZHANG ML, LI LG, HUO CH, SHI QW. Historical story on natural medicinal chemistry: rapamycin[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(4): 623-630 (in Chinese).
- [2] 万丹. 特境微生物天然产物抗肿瘤活性筛选及其作用机制研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2018.  
WAN D. Screening of antitumor activity of natural products from special microorganisms and its mechanism[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2018 (in Chinese).

- [3] SHAO YQ, CHEN BS, SUN C, ISHIDA K, HERTWECK C, BOLAND W. Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(1): 66-75.
- [4] 徐晓, 孙飞飞, 尹彩萍, 王滢, 张应烙. 昆虫共生菌的次级代谢产物研究进展[J]. *微生物学报*, 2018, 58(6): 1126-1140.
- XU X, SUN FF, YIN CP, WANG Y, ZHANG YL. Research progress in the secondary metabolites of insect symbionts[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1126-1140 (in Chinese).
- [5] van ARNAM EB, CURRIE CR, CLARDY J. Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(5): 1638-1651.
- [6] BEEMELMANNS C, GUO HJ, RISCHER M, POULSEN M. Natural products from microbes associated with insects[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2016, 12: 314-327.
- [7] BI SF, LI F, SONG YC, TAN RX, GE HM. New acrylamide and oxazolidin derivatives from a termite-associated *Streptomyces* sp.[J]. *Natural Product Communications*, 2011, 6(3): 353-355.
- [8] GUO HJ, BENNDORF R, LEICHNITZ D, KLASSEN JL, VOLLMERS J, GÖRLS H, STEINACKER M, WEIGEL C, DAHSE HM, KASTER AK, de BEER ZW, POULSEN M, BEEMELMANNS C. Isolation, biosynthesis and chemical modifications of rubterolones A–F: rare tropolone alkaloids from *Actinomadura* sp. 5-2[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2017, 23(39): 9338-9345.
- [9] 郭志凯, 刘寿柏, 马帅, 王蓉. 铜绿金龟子肠道链霉菌 *Streptomyces* sp. BCa1 菌体的抗菌成分研究[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(7): 1307-1311.
- GUO ZK, LIU SB, MA S, WANG R. Antibacterial metabolites from the mycelia of the cockchafer-derived *Streptomyces* sp. BCa1[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(7): 1307-1311 (in Chinese).
- [10] XIAO YS, ZHANG B, ZHANG M, GUO ZK, DENG XZ, SHI J, LI W, JIAO RH, TAN RX, GE HM. Rifamorpholines A–E, potential antibiotics from locust-associated actinobacteria *Amycolatopsis* sp. Hca4[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017, 15(18): 3909-3916.
- [11] 刘凌燕. 美洲大蠊肠道内生戈登氏放线菌 WA8-44 次级代谢产物抗真菌活性的初步研究[D]. 广州: 广东药科大学硕士学位论文, 2019.
- LIU LY. Preliminary study on the antifungal activity of the secondary metabolites of *Gordonia* WA8-44 from the intestinal tract of *Periplaneta americana*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong Pharmaceutical University, 2019 (in Chinese).
- [12] FANG X, SHEN J, WANG J, CHEN ZL, LIN PB, CHEN ZY, LIU LY, ZENG HX, JIN XB. Antifungal activity of 3-acetylbenzamide produced by actinomycete WA23-4-4 from the intestinal tract of *Periplaneta americana*[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(7): 516-523.
- [13] SHIN YH, BAE S, SIM J, HUR J, JO SI, SHIN J, SUH YG, OH KB, OH DC. Nicrophorusamides A and B, antibacterial chlorinated cyclic peptides from a gut bacterium of the carrion beetle *Nicrophorus concolor*[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(11): 2962-2968.
- [14] SHIN YH, BEOM JY, CHUNG B, SHIN Y, BYUN WS, MOON K, BAE M, LEE SK, OH KB, SHIN J, YOON YJ, OH DC. Bombyxamycins A and B, cytotoxic macrocyclic lactams from an intestinal bacterium of the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(6): 1804-1808.
- [15] 赵敏, 陈晓鸣, 孙龙, 冯颖, 叶寿德. 云南省喙尾琵琶甲分布及生态环境调查[J]. *林业科学研究*, 2007, 20(3): 356-362.
- ZHAO M, CHEN XM, SUN L, FENG Y, YE SD. Investigation on distribution and habitat of *Blaps rynchopetara* Fairmaire (Coleoptera: Tenebrionidae) in Yunnan[J]. *Forest Research*, 2007, 20(3): 356-362 (in Chinese).
- [16] 王明明, 殷鹏凯, 李铭晖, 杨自忠, 杨大松, 杨银河. 药用昆虫喙尾琵琶甲肠道抗菌活性放线菌的筛选及鉴定[J]. *昆虫学报*, 2022, 65(9): 1106-1114.
- WANG MM, YIN PK, LI MH, YANG ZZ, YANG DS, YANG YH. Screening and identification of actinomycetes with antimicrobial activity from the gut of the medicinal insect *Blaps rynchopetara* (Coleoptera: Tenebrionidae)[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022, 65(9): 1106-1114 (in Chinese).
- [17] 余之蕴, 黄宝莹, 刘海卿, 林耀文, 罗湘蓉, 黄玲玲. 牛津杯法测定食品添加剂对五种益生菌的抑菌活力[J]. *食品工业*, 2016, 37(1): 171-174.
- SHE ZY, HUANG BY, LIU HQ, LIN YW, LUO XR, HUANG LL. Antibacterial activity of foods additives against five strains of probiotics by Oxford plate assay system[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(1): 171-174 (in Chinese).
- [18] 魏秀丽, 李晴, 徐恩民, 张秀英, 杨志昆, 张志宾,

- 李有志. 蒲公英提取物联合多种抗生素对奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的体外协同抑菌实验[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(4): 70-76.
- WEI XL, LI Q, XU EM, ZHANG XY, YANG ZK, ZHANG ZB, LI YZ. *In vitro* synergistic antibacterial effect of dandelion extract combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(4): 70-76 (in Chinese).
- [19] 孙世猷, 姜晓晔, 王璇. 3'-甲氧基黄酮的合成及抗肿瘤活性研究[J]. 精细化工中间体, 2021, 51(6): 27-31.
- SUN SY, JIANG XY, WANG X. Synthesis and anti-tumor activity evaluation of 3'-methoxyl flavone[J]. Fine Chemical Intermediates, 2021, 51(6): 27-31 (in Chinese).
- [20] SANTABARBARA G, MAIONE P, ROSSI A, GRIDELLI C. Pharmacotherapeutic options for treating adverse effects of cisplatin chemotherapy[J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2016, 17(4): 561-570.
- [21] 李培, 邱飞, 吴龙火. 紫杉醇前药的研究概况[J]. 海峡药学, 2010, 22(3): 71-74.
- LI P, QIU F, WU LH. Progress in the development of paclitaxel prodrugs[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2010, 22(3): 71-74 (in Chinese).
- [22] 汪朝阳, 王瑞香, 梁陈生, 李彦东. 香料糠酸甲酯的新法合成与表征[J]. 精细化工, 2002, 19(4): 198-200.
- WANG ZY, WANG RX, LIANG CS, LI YD. New synthetic method of perfume methyl furoate and its characterization[J]. Fine Chemicals, 2002, 19(4): 198-200 (in Chinese).
- [23] ZHOU WQ, LIANG HY, QIN XJ, CAO DF, ZHU XC, JU JH, SHEN B, DUAN YW, HUANG Y. The isolation of pyrroloformamide congeners and characterization of their biosynthetic gene cluster[J]. Journal of Natural Products, 2020, 83(2): 202-209.
- [24] 解飞翔, 袁伟钰, 石佩星, 位石头, 李宝库. 竹子内生真菌 *Fusarium oxysporum* 次级代谢产物的研究[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(5): 174-175, 189.
- XIE FX, YUAN WY, SHI PX, WEI ST, LI BK. Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium oxysporum* from bamboo[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(5): 174-175, 189 (in Chinese).
- [25] WIETZ M, MANSSON M, GOTFREDSEN CH, LARSEN TO, GRAM L. Antibacterial compounds from marine *Vibrionaceae* isolated on a global expedition[J]. Marine Drugs, 2010, 8(12): 2946-2960.