

[文章编号] 1007 - 7405( 2011) 06 - 0424 - 05

# 红树内生真菌 BYY - 1 中一个酚类化合物的 分离鉴定与抗肿瘤活性

杜希萍<sup>1 2</sup>, 赵保兵<sup>3 4 5</sup>, 郑忠辉<sup>3 4 5</sup>, 徐庆妍<sup>3 4 5</sup>, 苏文金<sup>1 2 3 4 5</sup>

( 1. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门市食品生物工程技術研究中心, 福建 厦门 361021;  
3. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 4. 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,  
福建 厦门 361005; 5. 福建省药物工程实验室, 福建 厦门 361005)

[摘要] 采用硅胶柱层析、薄层层析、Sephadex LH - 20 柱层析从红树内生真菌 BYY - 1 的次级代谢产物中分离到化合物 B1. 通过乙酰化、NMR、HR ESI - Q - TOF MS 等技术鉴定了化合物 B1 的结构, 确定其为首次从红树内生真菌中分离到的化合物. 运用 MTT 法和流式细胞术研究了化合物 B1 的抗肿瘤活性, 结果表明, 化合物 B1 可显著抑制 HeLa 细胞的增殖 (  $IC_{50} = 3.3 \mu\text{g/mL}$  ), 并且质量浓度为  $4 \mu\text{g/mL}$  时, 能诱导 HeLa 细胞发生明显的凋亡.

[关键词] 红树; 真菌; 分离鉴定; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R 93

[文献标志码] A

## Study on the Isolation Identification and Antitumor Activity of a Phenol Derivative from Mangrove Fungus BYY - 1

DU Xi-ping<sup>1 2</sup>, ZHAO Bao-bing<sup>3 4 5</sup>, ZHENG Zhong-hui<sup>3 4 5</sup>, XU Qing-yan<sup>3 4 5</sup>, SU Wen-jin<sup>1 2 3 4 5</sup>

( 1. School of Biotechnology Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Food Bio-engineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China; 3. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;  
4. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen 361005, China;  
5. Fujian Engineering Laboratory for Pharmaceuticals, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Compound B1 was obtained from the secondary metabolites of mangrove fungus BYY - 1 using silica gel column chromatography, thin layer chromatography and Sephadex LH - 20 column chromatography. The structure of compound B1 was elucidated by acetylation, NMR and HR ESI - Q - TOF MS analysis, and compound B1 was isolated from mangrove fungi for the first time. The antitumor activity of compound B1 was studied by the methods of MTT and flow cytometric DNA analysis. The results showed compound B1 could significantly inhibit the proliferation of HeLa cells with  $IC_{50} 3.3 \mu\text{g/mL}$ , and induce evident HeLa cells apoptosis when compound B1 was  $4 \mu\text{g/mL}$ .

**Key words:** mangrove; fungi; isolation identification; antitumor activity

[收稿日期] 2011 - 04 - 01 [修回日期] 2011 - 05 - 19

[基金项目] 中央高校基本业务费资助项目 ( 2010121092 ); 福建省科技计划重点项目 ( 2011N1008 ); 集美大学博士启动基金资助项目 ( ZQ2011004 )

[作者简介] 杜希萍 ( 1978 - ), 女, 讲师, 从事天然产物化学方面的研究. 通讯作者: 苏文金 ( 1956 - ), 男, 教授, 从事海洋药物与食品方向研究, E-mail: wjsu@jmu.edu.cn.

## 0 引言

红树林生长在热带亚热带海岸潮间带,它是受周期性潮水浸淹并以红树植物为主体的潮滩湿地木本生物群落<sup>[1]</sup>。红树林特殊的生理生态特征,使其生命力极强,并形成了特殊的生态环境。这种特殊环境导致其富含适应于海洋环境生存的特殊内生真菌,即红树内生真菌。研究表明,红树内生真菌可以产生许多具有强生理活性或结构新颖的化合物<sup>[2-9]</sup>,它们也成为了药物先导化合物发现的新源泉。BYY-1 菌株为分离自福建省云霄县漳江口红树植物白骨壤的矮棒曲霉 (*Aspergillus clavatonanicus*),该菌株发酵提取物不仅具有较好的抗菌活性,而且还具有较强的抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>。本文从 BYY-1 菌株次级代谢产物中首次分离到酚类化合物 B1,并经过乙酰化反应得到了化合物 B1A 的结构,并研究了化合物 B1 的体外抗肿瘤活性和作用机制,以期发现具有生物活性或结构独特的化合物,为微生物新药的研发奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

BYY-1 菌株是从福建省云霄县漳江口采集的红树植物白骨壤 (*Avicennia marina*) 中分离到的红树内生真菌。

#### 1.1.2 肿瘤细胞株

人宫颈癌 HeLa 细胞购于中国科学院上海细胞所。

#### 1.1.3 培养基

1) 半海水马铃薯葡萄糖培养基 (PD): 马铃薯 200 g (去皮,切成小块,加水煮沸 30 min,4~6 层纱布过滤,收集滤液),葡萄糖 20 g,用体积分数为 50% 的海水定容至 1 000 mL,121 °C 高压灭菌 20 min。

2) 细胞培养基: 一袋 10 g 干粉 DMEM 溶于 1 L 双蒸水中,加入 2 g NaHCO<sub>3</sub> 搅拌均匀,溶解后封口,置于 4 °C 过夜,以自然沉淀除去杂质,加体积分数为 10%~15% 已灭活 (56 °C 水浴 30 min) 的小牛血清及体积分数为 1% 的三抗,混匀后用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤除菌。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株的发酵及发酵产物的处理

BYY-1 菌株用半海水 PD 培养基静置发酵 60 L,室温培养 15 d。发酵液用 4 层纱布过滤,得到发酵液上清液和菌体。发酵液上清液用等体积乙酸乙酯萃取 4 次,有机相于 50 °C 减压浓缩得到浸膏;浸膏用石油醚和甲醇分相,分别得到石油醚相和甲醇相 BE (32.8 g)。

#### 1.2.2 发酵产物的分离纯化

BE (32.8 g) 分两次用凝胶柱 (150 g Sephadex LH-20) 层析,甲醇洗脱 (14 s/drop, 4 600 s/tube);合并后得到 7 个组分 (BE-1—BE-7)。组分 BE-5 (5.53 g 浸膏) 经反复硅胶柱和凝胶柱层析,得到化合物 B1 (430 mg)。

#### 1.2.3 化合物 B1 的乙酰化和分离纯化

化合物 B1 的乙酰化: 取纯化化合物 B1 放于室温干燥器中过夜,然后加入吡啶和乙酸酐的混合溶液 ( $V(\text{吡啶}):V(\text{乙酸酐})=1:1$ ),在干燥器中反应。24 h 后,用薄层层析检测反应产物和对照品 (纯化化合物 B1),判断是否反应完全。如果主要成分和对照品完全不同,则反应完全;反之,反应不完全,可能反应的时间不够,需要继续在干燥环境中反应。

化合物 B1 的分离纯化: B1 乙酰化后的样品 (94 mg) 用正相硅胶柱层析,石油醚饱和 2.1 g 硅胶装柱,石油醚-丙酮 ( $V(\text{石油醚}):V(\text{丙酮})=30:1$ ) 洗脱,6 mL/tube,13—17 号管合并得到 B1A (80 mg)。

#### 1.2.4 抗肿瘤活性测定

抗肿瘤活性测定方法参见文献 [11]。

## 1.2.5 细胞存活率及细胞周期分布测定

细胞存活率及细胞周期分布测定方法参见文献 [12].

## 2 结果与分析

## 2.1 化合物 B1 和 B1A 的实验数据

1) 化合物 B1 无色针状晶体, 溶于氯仿和甲醇. HR ESI-Q-TOF MS ( $m/z$ ): 163.018 4 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>, 281.1455 [ $2M + H$ ]<sup>+</sup>, 303.102 7 [ $2M + Na$ ]<sup>+</sup> 和 319.087 6 [ $2M + K$ ]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.14 (s) 7.0 (d) 6.93 (d) 6.5) 4.97 (s, 2H); <sup>13</sup>C-NMR 和 DEPT (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 126.9 (C-1) 114.6 (C-2) 147.9 (C-3) 149.3 (C-4) 114.8 (C-5) 116.1 (C-6) 61.5 (C-7).

2) 化合物 B1A ESI-MS ( $m/z$ ): 289.3 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>, 305.2 [ $M + K$ ]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.19 (s) 7.11 (d) 6.5) 7.09 (d) 5.05 (s, 2H) 2.31 (s, 3H) 2.27 (s, 3H) 2.08 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 129.3 s (C-1) 122.5 d (C-2) 146.2 s (C-3) 148.1 s (C-4), 123.0 d (C-5) 123.5 d (C-6) 60.9 t (C-7) 170.5 s 21.0 q 169.2 s 20.8 q 169.1 s 20.8 q.

## 2.2 化合物 B1 和 B1A 的结构解析

化合物 B1A 的 <sup>13</sup>C-NMR 显示, 碳信号 δ 146.2、123.5、123.0、148.1、122.5 和 129.3 组成苯环, δ 170.5、21.0, δ 169.2、20.8 及 δ 169.1、20.8 为 3 个乙酰基. <sup>1</sup>H-NMR 显示, 质子信号 δ 5.05 为单峰, 含有 2 个质子, 可能是与氧直接相连的亚甲基. 电喷雾质谱 (ESI-MS) 测得化合物 B1A 的准分子离子峰 ( $m/z$ ) 为 289.3 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>、305.2 [ $M + K$ ]<sup>+</sup>, 推测其相对分子质量为 266, 分子式为 C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>. 综合以上分析, 确定化合物 B1A 的结构如图 1. 对比化合物 B1 和 B1A 的核磁共振数据, 从而确定化合物 B1 的分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, 相对分子质量为 140, 这也恰好与化合物 B1 进行 HR ESI-Q-TOF MS 分析时出现的准分子离子峰 ( $m/z$ ) (163.018 4 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>, 281.145 5 [ $2M + H$ ]<sup>+</sup>, 303.102 7 [ $2M + Na$ ]<sup>+</sup>, 319.087 6 [ $2M + K$ ]<sup>+</sup>) 推出的相对分子质量一致, 所以化合物 B1 的结构如图 1 所示, 名称为 3, 4-dihydroxybenzyl alcohol. 经文献检索, 为首次从红树内生真菌中得到的化合物.

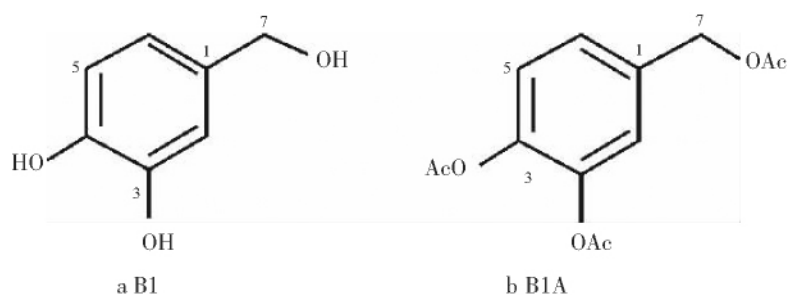


图 1 化合物 B1 和 B1A 的结构

Fig.1 The structure of compound B1 and B1A

## 2.3 化合物 B1 的抗肿瘤活性

以人宫颈癌 HeLa 细胞为指示瘤株, 采用 MTT 法测定化合物 B1 的抗肿瘤活性. 结果显示, 化合物 B1 具有较强的细胞毒作用, 对 HeLa 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 3.3 μg/mL.

用不同浓度的化合物 B1 分别处理 HeLa 细胞, 24 h 后观察细胞形态的变化, 其结果如图 2 所示. 从图 2 可以看出, 在经过化合物 B1 处理后, HeLa 细胞的形态发生了明显的变化: 正常的 HeLa 细胞呈不规则形, 贴壁生长 (见图 2a); 化合物 B1 质量浓度为 2 μg/mL 时, 大部分细胞贴壁生长, 少数细胞变圆, 形成膜泡, 悬浮于液体中 (见图 2b); 当化合物 B1 质量浓度为 4 μg/mL 时, 大部分细胞变圆, 形成膜泡, 悬浮于液体中, 只有极少数细胞存活 (见图 2c). 这些变化表明, 化合物 B1 可能引起 HeLa 细胞凋亡.

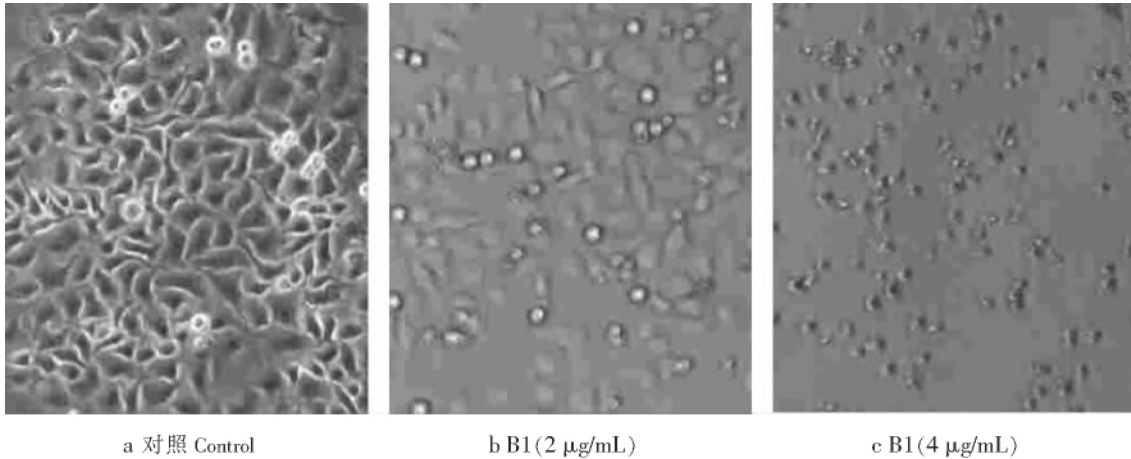


图 2 化合物 B1 对 HeLa 细胞形态的影响(x40)

Fig.2 The effect of B1 on HeLa cells' morphology(x40)

为了进一步研究化合物 B1 对 HeLa 细胞的作用, 采用六孔板, 以不同浓度的化合物 B1 分别处理 HeLa 细胞 24 h, 同时设置只加培养基的 HeLa 细胞为对照, 以 DNA 结合性类型染料 PI 对细胞 DNA 染色后, 用流式细胞仪分析细胞存活率 (见图 3) 及测定细胞周期分布 (见图 4 和表 1)。

从图 3 可以看出, 化合物 B1 对 HeLa 细胞有很强的抑制作用, 且呈浓度依赖性, 即随着药物浓度的增大, 化合物 B1 对 HeLa 细胞的抑制作用增强, HeLa 细胞的存活率明显下降; 当质量浓度达到 6 µg/mL 以上时, 24 h 后 HeLa 细胞的存活率接近 0。

从图 4 可以看出, 化合物 B1 作用 HeLa 细胞 24 h 后, 当质量浓度为 4 µg/mL 时, 在 DNA 直方图上出现一个位于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 峰左侧的细胞凋亡峰 (AP 峰) 或称亚二倍体 (sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) (见图 4c)。

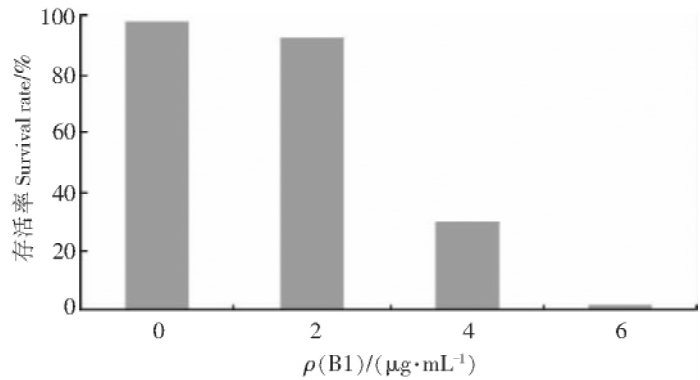
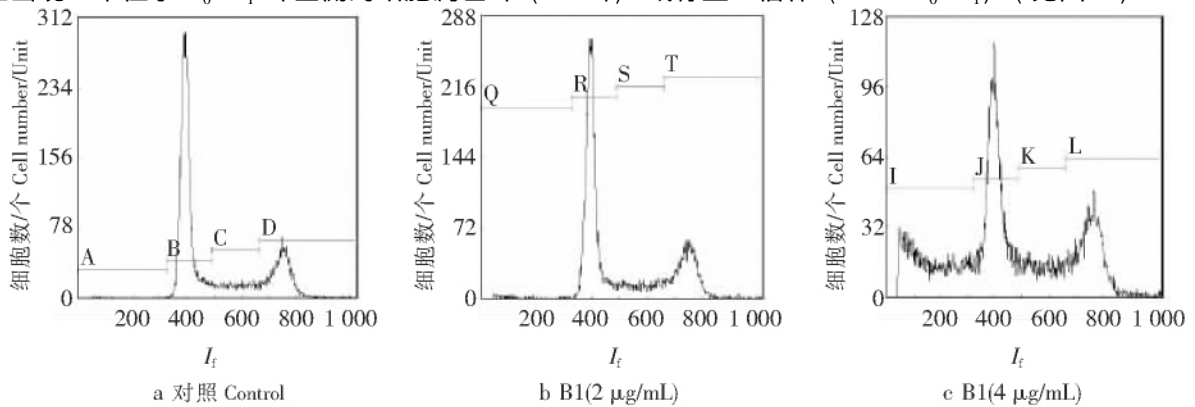


图 3 流式细胞仪分析化合物 B1 对 HeLa 细胞的存活率

Fig.3 The survival rate of HeLa cell treated with B1 by FCM analysis



说明:A、Q 和 I 为 sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期; B、R 和 J 为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期; C、S 和 K 为 S 期; D、T 和 L 为 G<sub>2</sub>/M 期。

Notes:A,Q and I stand for sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase; B,R and J stand for G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase; C,S and K stand for S phase; D,T and L stand for G<sub>2</sub>/M phase.

图 4 流式细胞仪分析化合物 B1 对 HeLa 细胞周期分布的影响

Fig.4 The effect of B1 on HeLa cell cycle distribution by FCM analysis

表 1 化合物 B1 对 HeLa 细胞周期分布的影响  
Tab.1 The effect of B1 on HeLa cell cycle distribution

$\rho(\text{B1}) / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	周期分布 Cycle distribution				%
	sub - G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
0	0.74	59.7	12.4	27.2	
2	2.28	54.0	13.8	29.9	
4	24.5	35.6	12.7	27.4	

从表 1 可以看出,用不同浓度的化合物 B1 分别处理 HeLa 细胞 24 h 后,HeLa 细胞的周期分布均发生了明显的变化.随着化合物 B1 浓度的增加,sub - G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的比例明显增加,而 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例降低.

以上实验结果表明,化合物 B1 作用 HeLa 细胞能引起细胞发生明显的凋亡,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例降低,使细胞不能进入增殖阶段,其具体的凋亡机制还有待进一步研究.

### [参考文献]

- [1] 刘峰,洪葵. 红树林微生物及其代谢产物多样性 [J]. 海南医学,2006,17(5): 171-173.
- [2] 徐庆妍. 两株红树植物内生真菌代谢物及抗菌、抗肿瘤活性研究 [D]. 厦门: 厦门大学生命科学学院,2004.
- [3] ZHAN Y Y, DU X P, CHEN H Z, et al. Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77 [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(9): 548-556.
- [4] 杨丽珊. 红树植物内生真菌生物活性及菌株 A-1-2-3 次级代谢产物的初步研究 [D]. 厦门: 厦门大学生命科学学院,2006.
- [5] XU F, ZHANG Y, WANG J J, et al. Benzofuran derivatives from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp (#2508) [J]. J Nat Prod, 2008, 71(7): 1251-1253.
- [6] SHAO C L, SHE Z G, GUO Z Y, et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for two anthraquinones and two xanthenes from the mangrove fungus (ZSUH-36) [J]. Magn Reson Chem, 2007, 45(5): 434-438.
- [7] SHAO C L, GUO Z Y, PENG H, et al. A new isoprenyl phenyl ether compound from mangrove fungus [J]. Chem Nat Comp, 2007, 43(4): 377-380.
- [8] HUANG Z J, YANG R Y, GUO Z Y, et al. A new naphtho- $\gamma$ -pyrone from mangrove endophytic fungus ZSU-H26 [J]. Chem Nat Comp, 2010, 46(1): 15-18.
- [9] NAWWAR M, HUSSEIN S, AYOUB N A, et al. Deuteromycols A and B, two benzofuranoids from a red sea marine-derived *Deuteromycete* sp [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(11): 1729-1733.
- [10] 李盛英. 红树植物内生真菌抗肿瘤、抗菌活性及其次级代谢产物的初步研究 [D]. 厦门: 厦门大学生命科学学院,2003.
- [11] SOLIS P N, WRIGHT C W, ANDERSON M M, et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemian salina* (Brine Shrimp) [J]. Planta Med, 1993, 59: 250-252.
- [12] LIU M, IAVARONE A, FREEDMAN L P. Transcriptional activation of the human p21 (WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor: correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 31723-31728.

(责任编辑 马建华)