

学校编码: 10384

分类号\_密级\_

学号: 24520091153054

UDC\_

廈門大學

硕士学位论文

深海来源真菌 *Aspergillus versicolor* 次生代谢产物的研究

Studies on the Secondary Metabolites of a Deep Sea

Derived Fungus *Aspergillus versicolor*

郑敏

指导教师姓名: 吴 振 教授

邱鹰昆 副教授

专业名称: 药物化学

论文提交日期: 2012 年 12 月

论文答辩时间: 2012 年 12 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: \_

评阅人: \_

2012 年 12 月

深海来源真菌 *Aspergillus versicolor* 次生代谢产物的研究

郑敏

指导老师

吴振 教授

邱鹰昆 副教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 摘要

近几年来,随着人类对海洋生态系统的不断研究,海洋微生物——一种新型的抗肿瘤药物研究对象逐渐进入人们的视线。海洋微生物分布广,数量多,其次生代谢产物表现出十分广泛的生物学活性,包括抗肿瘤、抗病毒、抗菌、免疫抑制等。深海真菌由于处于高压、低温(部分区域为高温如热液口)、厌氧、极端 pH 梯度、高盐浓度、高金属浓度、无光照、寡营养、高卤素等特殊极端环境中,决定了其具有一些特异性的代谢途径和遗传背景,导致深海真菌的次生代谢产物具有化学结构奇特、新颖,生物活性多样等特点,这类次生代谢产物是寻找新型肿瘤药物的重要源泉。

本论文中,选取从东太平洋三千米左右的深海沉积物中分离鉴定得到的一株具有细胞毒活性的曲霉菌 *Aspergillus versicolor* 作为研究对象。通过对 *Aspergillus versicolor* 进行大规模培养发酵,应用大孔吸附树脂、ODS 柱层析、硅胶、制备 HPLC 等分离技术,对其次生代谢产物进行分离,得到 22 个化合物,并根据化合物的理化性质、核磁共振谱 ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) 及与文献报道对比鉴定了其化合物结构,分别为: 苯甲酸正丁酯 (1), 麦角甾醇 (2), 角甾-6,22-二烯-3,5,8-三醇 (3), 环-(异亮氨酸-缬氨酸) (4), 环-(脯氨酸-缬氨酸) (5), 对羟基苯乙醇 (6), 对羟基苯甲酸 (7), 3-羟基苯甲酸 (8), 7,7-二(3-吡啶基)对甲酚 (9), 3,3-二(1*H*-3-吡啶基)-2-吡啶酮 (10), 黑麦酮酸 F (11), 环-(脯氨酸-酪氨酸) (12), 环-(苯丙氨酸-脯氨酸) (13), 环-(丙氨酸-异亮氨酸) (14), 环-(丙氨酸-亮氨酸) (15), 氯霉素水解物 (16), 环-(色氨酸-酪氨酸) (17), 环-(苯丙氨酸-酪氨酸) (18), 腺嘌呤核苷 (19), 5-硝基吡啶-2-羧酸乙酯 (20), 7-苄氧基吡啶 (21), 1,1,2-三甲基-1*H*-苯并[e]吡啶 (22)。初步研究了温度对真菌 *Aspergillus versicolor* 次级代谢产物的影响。体外活性试验显示环二肽 5, 12, 13, 14, 15 不具有细胞毒活性。

本文研究结果表明:开展深海微生物的次生代谢产物研究,对开拓海洋新资源,寻找新型的抗肿瘤药物具有重要的意义。

**关键词:** 深海环境; 海洋真菌; 次生代谢产物; 抗肿瘤活性

## Abstract

In recent years, with the constant research on the marine ecosystem, Marine microorganisms — a new object of study about anticancer drug is gradually coming into sight. Marine microorganisms are widely distributed and have a great quantity, its natural products put up a great extensive bioactivities, such as anti-tumor, antiviral, antibiosis, immune suppression and so on. Because of the particular extreme conditions that include high pressure, low temperature, oxygen deficit, extreme pH value, high salinity, high metallicity, empty illumination, poor nutrition, high halogen the deep sea microorganisms live in, they have the unique metabolic pathway and heredity backgrounds and they can produce secondary-metabolites with novel structures, distinctive functions and slight side-effects. The secondary-metabolite is one of the most important sources in hunting for novel anti-tumor drugs. Thus marine fungus usually can generate bioactive metabolites and the research for these bioactive metabolites is of great significance in seeking for new drugs.

In this study, *Aspergillus versicolor* strain from the eastern Pacific about 3000 meters deep sediments was chosen for further research because of its cytotoxicity. After large scale culture, fermentation, extraction, concentration of *Aspergillus versicolor*, 22 compounds were separated by various chromatographic methods, such as macroporous resin, silica gel, ODS reversed-phase column, HPLC and so on.

In accordance with their physico-chemical properties and data of NMR(<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR), their structures can be judged as: butyl benzoate (1), (3b,22e)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol (2), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergosta-6,22-diene-3 $\beta$ ,5,8-triol (3), cyclo(Ile-Val) (4), cyclo(Pro-Val) (5), 4-hydroxyphenethyl alcohol (6), 4-hydroxybenzoic acid (7), 3-hydroxybenzoic acid (8), 7,7-bis(3-indolyl)-p-cresol (9), 3,3-Bis(1H-indol-3-yl)indolin-2-one (10), Secalonic Acid F (11), cyclo(Pro-Tyr) (12), cyclo(Phe-Pro) (13), cyclo(Ala-Ile) (14), cyclo(Ala-Leu) (15),

hydro-chloromycetin (16), cyclo(Trp-Tyr) (17), cyclo(Phe-Tyr) (18), adenosine (19), Ethyl 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate (20), 7-Benzoyloxyindole (21), 1,1,2-Trimethyl-1H-benz[e]indole (22). And we have the preliminary study of the impact of temperature on the secondary metabolites from *Aspergillus versicolor*. In vitro activity tests, compound 5, 12, 13, 14 and 15 don't have cytotoxic activity.

All in all, our study indicated that deep-sea marine microorganism metabolites were effective resources for compound precursors with structural novelty. Researching on the secondary metabolites from deep sea microorganism is greatly meaningful in exploiting marine new resources, seeking for novel anti-tumor drug.

**Key words:** marine fungus; secondary metabolite; anti-tumor activity; deep-sea

## 缩略语

Abbreviation	Full Name
TLC	Thin Layer Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CC	Column Chromatography
IR	Infra-Red
[ $\alpha$ ]	Optical Rotation
UV	Ultraviolet
MS	Mass Spectrometry
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
FT-MS	Fourier Transform Mass Spectroscopy
TOF-MS	Time of Light Mass Spectrometry
TMS	Trimethylsilyl
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
$^1\text{H}$ -NMR	$^1\text{H}$ Nuclear Magnetic Resonance
$^{13}\text{C}$ -NMR	$^{13}\text{C}$ Nuclear Magnetic Resonance
DEPT	Distortionless Enhancement By Polarization Transfer
HSQC	$^1\text{H}$ -Detected Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	$^1\text{H}$ -Detected Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
COSY	Correlation Spectroscopy
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
$\delta$	Chemical Shift
$J$	Coupling Constant
d	Doublet
dd	Doublet Of Doublet
dt	Doublet Of triplet
q	Quartet
s	Singlet
t	Triplet
m	Multiplet
DMSO	Dimethylsulfoxide
Ac	Acetyl
Ph	Phenyl
IC <sub>50</sub>	Concentration Giving 50% Of Maximal Inhibition



## 目 录

摘 要	I
ABSTRACT	II
缩略语	IV
第一章 前 言	1
1.1 海洋抗肿瘤天然产物研究概况	1
1.2 从海洋微生物寻找抗肿瘤药物的优势	5
1.3 海洋放线菌的抗肿瘤代谢产物的研究	6
1.4 海洋细菌的抗肿瘤代谢产物的研究	8
1.5 海洋真菌的抗肿瘤代谢产物的研究	10
1.6 论文研究的目的、内容和意义	16
参 考 文 献	18
第二章 次生代谢产物的研究	23
2.1 技术路线	23
2.2 材料、试剂与仪器	24
2.2.1 菌株	24
2.2.2 常用化学试剂	24
2.2.3 显色剂	24
2.2.4 色谱耗材	25
2.2.5 主要仪器	25
2.3 发酵与分离	26
2.3.1 发酵条件	26
2.3.2 发酵液的处理	26
2.3.3 分离流程	27
2.4 结果与分析	28
第三章 化合物结构解析	29

<b>3.1 化合物结构鉴定</b> .....	<b>31</b>
3.1.1 苯甲酸正丁酯 (1).....	31
3.1.2 麦角甾醇 (2).....	32
3.1.3 角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -三醇 (3).....	33
3.1.4 环-(异亮氨酸-缬氨酸) (4).....	34
3.1.5 环-(脯氨酸-缬氨酸) (5).....	34
3.1.6 对羟基苯乙醇 (6).....	35
3.1.7 对羟基苯甲酸 (7).....	35
3.1.8 3-羟基苯甲酸 (8).....	36
3.1.9 7,7-bis(3-indolyl)-p-cresol (9).....	36
3.1.10 3,3-Bis(1H-indol-3-yl)indolin-2-one (10).....	37
3.1.11 黑麦酮酸 F (11).....	38
3.1.12 环-(脯氨酸-酪氨酸) (12).....	39
3.1.13 环-(苯丙氨酸-脯氨酸) (13).....	40
3.1.14 环-(丙氨酸-异亮氨酸) (14).....	41
3.1.15 环-(丙氨酸-亮氨酸) (15).....	41
3.1.16 氯霉素水解物 (16).....	42
3.1.17 环-(色氨酸-酪氨酸) (17).....	42
3.1.18 环-(苯丙氨酸-酪氨酸) (18).....	43
3.1.19 腺嘌呤核苷 (19).....	44
3.1.20 5-硝基吡啶-2-羧酸乙酯 (20).....	44
3.1.21 7-苄氧基吡啶 (21).....	45
3.1.22 1,1,2-三甲基-1H-苯并[e]吡啶 (22).....	46
<b>3.2 小结与讨论</b> .....	<b>47</b>
<b>参 考 文 献</b> .....	<b>48</b>

## 第四章 温度对 *ASPERGILLUS VERSICOLOR* 次级代谢产物的影响.....50

<b>4.1 发酵与分离</b> .....	<b>50</b>
4.1.1 发酵条件.....	50

4.1.2 发酵液的处理.....	50
4.1.3 分离流程.....	51
<b>4.2 结果与分析 .....</b>	<b>52</b>
<b>第五章 次生代谢产物细胞毒活性研究.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 实验材料.....</b>	<b>53</b>
5.1.1 样品.....	53
5.1.2 肿瘤细胞株.....	53
5.1.3 常用微生物及肿瘤细胞培养基.....	53
<b>5.2 方法.....</b>	<b>54</b>
5.2.1 肿瘤细胞的培养.....	54
5.2.2 环二肽的细胞毒活性测定（SRB 法）.....	53
<b>5.3 结果与分析.....</b>	<b>53</b>
<b>第六章 结论与展望.....</b>	<b>57</b>
1. 结论.....	57
2. 展望.....	58
<b>附录.....</b>	<b>59</b>
<b>致谢.....</b>	<b>88</b>

Contents

<b>ABSTRACT IN CHINESE</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT IN ENGLISH</b> .....	<b>II</b>
<b>ABBREVIATION</b> .....	<b>III</b>
<b>CHAPTER 1 INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 SUMMARY OF ANTI-TUMOR MARINE NATURAL PRODUCT RESEARCH</b> .....	1
<b>1.2 ADVANTAGES IN MARINE MICROORGANISMS RESEARCH</b> .....	5
<b>1.3 SECONDARY ANTINEOPLASTIC METABOLITES FROM         MARINE-ACTINOMYCETE</b> .....	6
<b>1.4 SECONDARY ANTINEOPLASTIC METABOLITES FROM MARINE-BACTERIA</b> .....	8
<b>1.5 SECONDARY ANTINEOPLASTIC METABOLITES FROM MARINE-FUNGUS</b> .....	10
<b>1.6 AIMS, CONTENT AND SIGNIFICANCE OF RESEARCH PROJECT</b> .....	16
<b>REFERENCES</b> .....	18
<b>CHAPTER 2 SECONDARY METABOLIC PRODUCT         RESEARCH</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 RESEARCH TECHNICAL ROUTE</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 MATERIAL, REAGENTS AND APPARATUS</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 SAMPLES.....	24
2.2.2 CHEMICAL REAGENTS.....	24
2.2.3 CHROMOGENIC AGENT.....	24
2.2.4 CHROMATOGRAPHY CONSUMABLE GOODS.....	25
2.2.5 MAIN INSTRUMENT.....	25
<b>2.3 FERMENTATION AND ISOLATION</b> .....	<b>26</b>
2.3.1 FERMENTATION CONDITIONS.....	26
2.3.2 PROCESSING OF THE FERMENTATION BROTH .....	26

2.3.3 SEPARATION PROCESS .....	27
<b>2.4 Result and analysis.....</b>	<b>28</b>
<b>CHAPTER 3 STRUCTURE IDENTIFICATION OF CHEMICAL</b>	
<b>COMPOSITIONS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 STRUCTURE IDENTIFICATION OF NEW COMOUNDS.....</b>	<b>31</b>
3.1.1 butyl benzoate (1).....	31
3.1.2 (3b,22e)-ergosta-5,7,22-trien-3-ol (2).....	32
3.1.3 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergosta-6,22-diene-3 $\beta$ ,5,8-triol (3).....	33
3.1.4 cyclo(Ile-Val) (4).....	34
3.1.5 cyclo(Pro-Val) (5).....	34
3.1.6 4-hydroxyphenethyl alcohol (6).....	35
3.1.7 4-hydroxybenzoic acid (7).....	35
3.1.8 3-hydroxybenzoic acid (8).....	36
3.1.9 7,7-bis(3-indolyl)-p-cresol (9).....	36
3.1.10 3,3-Bis(1H-indol-3-yl)indolin-2-one (10).....	37
3.1.11 Secalonic Acid F (11).....	38
3.1.12 cyclo(Pro-Tyr) (12).....	39
3.1.13 cyclo(Phe-Pro) (13).....	40
3.1.14 cyclo(Ala-Ile) (14).....	41
3.1.15 cyclo(Ala-Leu) (15).....	41
3.1.16 hydro-chlor-omycetin (16).....	42
3.1.17 cyclo(Trp-Tyr) (17).....	42
3.1.18 cyclo(Phe-Tyr) (18).....	43
3.1.19 adenosine (19).....	44
3.1.20 Ethyl 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate (20).....	44
3.1.21 7-Benzyloxyindole (21).....	45
3.1.22 1,1,2-Trimethyl-1H-benz[e]indole (22).....	46
<b>3.2 BRIEF SUMMARY AND DISCUSSION.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>48</b>

<b>CHAPTER 4 THE IMPACT OF TEMPERATURE ON THE</b>	
<b>SECONDARY METABOLITES FROM</b>	
<b><i>ASPERGILLUS VERSICOLOR</i></b> .....	<b>50</b>
<b>4.1 FERMENTATION AND ISOLATION</b> .....	<b>50</b>
4.1.1 FERMENTATION CONDITIONS.....	50
4.1.2 PROCESSING OF THE FERMENTATION BROTH .....	50
4.1.3 SEPARATION PROCESS .....	51
<b>4.2 Result and analysis</b> .....	<b>52</b>
<b>CHAPTER 5 CYTOTOXIC ACTIVITY OF SECONDARY</b>	
<b>METABOLITES</b> .....	<b>53</b>
<b>5.1 MATERIALS</b> .....	<b>53</b>
5.1.1 Sample.....	53
5.2.1 Tumor cell line.....	53
5.2.1 Microorganism and tumor cell line culture medium.....	53
<b>5.2 METHOD</b> .....	<b>54</b>
5.2.1 Cultivate of tumor cells.....	54
5.2.2 Cytotoxic activity detemination of cyclic peptides (SRB) .....	53
<b>5.3 RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>55</b>
<b>CHAPTER 6 CONCLUSIONS AND PROSPECTS</b> .....	<b>57</b>
<b>1. CONCLUSION</b> .....	<b>57</b>
<b>2. PROSPECTS</b> .....	<b>58</b>
<b>APPENDIX</b> .....	<b>59</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>88</b>

## 第一章 前言

肿瘤是现代社会威胁人类健康的重要疾病，在1991年到2000年间，全球癌症发病及死亡人数均增长22%。2002年世界新发肿瘤人数1100万，当年死亡病例达到700万。世界卫生组织预测，到2020年，全世界癌症发病率将增加50%，癌症将成为人类的主要杀手，其死亡率仅次于心血管疾病。

自古以来，天然药物一直是人类防病治病的主要选择。天然产物是自然界的生物历经千百万年的进化过程通过自然选择保留下来的二次代谢产物，具有生物多样性、化学多样性和类药性<sup>[1]</sup>，临床上应用的许多药物都直接或间接来源于天然产物，如天然产物可作为药物半合成的前体物、药物化学合成的模板以及为药物设计提供新的思路。

Proudfoot<sup>[2]</sup>曾报道在2000年新上市的29个小分子药物里就有9个是天然产物来源的药物。这说明天然产物在新药及新药先导化合物的开发中起着越来越重要的作用。

从天然产物中寻找抗肿瘤药物一直是药学研究领域的热点。微生物作为天然产物的重要来源一直受到广泛的重视。但是，由于几十年长时间的开发，从陆栖微生物找到新活性物质的几率变小，筛选的难度增大。因此，开发生态环境及物种分布有别于陆地的海洋微生物资源、寻找新型微生物药物成为研究的必然趋势并形成了当前热点。

### 1.1 海洋抗肿瘤天然产物研究概况

海洋的面积占地球表面积的71%，是全球生物多样性的中心。据统计，已知的海洋生物大约有30万种，而且这些可能只占了所有海洋生物种类的一小部分<sup>[3-4]</sup>，海洋作为微生物生存的另一个巨大空间具有自己十分独特的环境特点，如高压、低营养、低温、无光照以及局部高温高盐度等所谓的生命极限环境。海洋真菌对海洋生活环境的适应，决定了海洋真菌独特的代谢途径和遗传背景，也就造成了海洋真菌往往能产生不同于陆地真菌的活性代谢产物，如头孢霉素

C是1945年从撒丁岛海泥中分离的顶头孢霉的发酵产物中最早发现的<sup>[5]</sup>。到目前为止,以海洋天然产物作为先导化合物,已有多种抗肿瘤候选药物进入了各期临床实验<sup>[6]</sup>。(表1-1)

表1-1 处于临床研究阶段的海洋来源肿瘤治疗药物

Name	Lead compound	Mechanism of action	Development status
aplidin	Aplidin	VEGF and VEGFR1 inhibitor G1/G2 phase cell cycle inhibitor	phase II
trabectedin	trabectedin	transcription-coupled nucleotide excision repair(TC-NER) and p53-independent apoptosis	phase II
KRN-7000	agelasphin	immunostimulation through ligand activated Val4 NKT	phase I / II
discodermolide	discodermolide	tubulin stabilization	phase I
E-7389	halichondrin B	tubulin assembly inhibition	phase I
HTI-286	hemiasterlin	tubulin assembly inhibition	phase I
dolastatin-10	dolastatin 10	tubulin assembly inhibition	phase II
soblidotin	dolastatin 10	tubulin assembly inhibition	phase II
synthadotin	dolastatin 15	tubulin assembly inhibition	phase II
kahalalide F	kahalalide F	alters lysosomal membrane function	phase II
squalamine	squalamine	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger isoform(NHE-5) inhibition	phase II
lactate		inhibition	
spisulosine	spisulosine	GTP-binding protein Rho inhibition	phase I

近年来,人们已从海绵、海藻、珊瑚、海鞘类海洋动植物中分离得到大量结构新颖的具有抗肿瘤、抗菌、抗炎症等生物活性的天然产物(图1-1)<sup>[7,8]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库