



青风藤内生链霉菌 SZC001 生物合成潜力分析及抗肿瘤天然产物 η -rhodomycinone 的鉴定

秦雨晴[#], 田程[#], 杨浩, 蒲洪, 漆宇昕, 邹玮, 江丹丹, 黄雪霜^{*}, 孙润泽^{*}

湖南医药学院, 中药合成生物学研究湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418000

秦雨晴, 田程, 杨浩, 蒲洪, 漆宇昕, 邹玮, 江丹丹, 黄雪霜, 孙润泽. 青风藤内生链霉菌 SZC001 生物合成潜力分析及抗肿瘤天然产物 η -rhodomycinone 的鉴定[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4804-4816.

QIN Yuqing, TIAN Cheng, YANG Hao, PU Hong, QI Yuxin, ZOU Wei, JIANG Dandan, HUANG Xueshuang, SUN Runze. Biosynthetic potential and anti-tumor natural product η -rhodomycinone of the endophyte *Streptomyces* sp. SZC001 in *Sinomenium acutum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4804-4816.

摘要:【目的】探究青风藤内生链霉菌 SZC001 的次级代谢产物生物合成潜力, 挖掘未知的活性天然产物。【方法】表面消毒法分离 SZC001 并利用三代联合二代测序获得完整基因组, 结合 antiSMASH 分析评估其天然产物合成潜力; 使用 4 种培养基发酵初筛代谢谱, 通过硅胶柱层析、高效液相制备、高分辨质谱以及核磁共振仪等对化合物进行分离鉴定; 利用 CCK-8 法进行目标化合物的细胞毒性测定。【结果】鉴定研究菌株为链霉菌 SZC001, 基因组总长度 9 109 166 bp, G+C 含量 71.08%; antiSMASH 显示该菌株共含有 31 个潜在的生物合成基因簇, 有 17 个基因簇与已知基因簇的相似度小于 40%; 在 4 种培养基中可产生多个萜环类天然产物, 经分离鉴定得到含量最高的 2 个化合物 1 和 2。化合物 1 为已知化合物 ϵ -rhodomycinone; 化合物 2 为一个新化合物 η -rhodomycinone, 相对已知化合物 α_2 -rhodomycinone 其在 C-10 位羟基衍生化并且骨架 6 位羟基变为 11 位。化合物 1 与 2 对 2 种肿瘤细胞系均有较好的抑制活性, 半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为 1.55–4.59 μ mol/L。【结论】SZC001 是一株有挖掘活性天然产物潜力的菌株, 从中获得的萜醌类天然产物具有较好的抗肿瘤活性, 后续值得进一步开发和利用。本研究增加了 ϵ -rhodomycinone 衍生物的种类, 为青风藤内生菌资源的后续开发提供了基础。

资助项目: 湖南省自然科学基金(2023JJ50439); 湖南省教育厅科学研究项目(22C1186); 湖南省大学生创新创业训练计划(S2022122140016)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2023JJ50439), the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (22C1186), and the Hunan Provincial College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (S2022122140016).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. E-mail: HUANG Xueshuang, xueshuanghuang@126.com; SUN Runze, sunrunze@sjtu.edu.cn

Received: 2024-06-17; Accepted: 2024-09-25; Published online: 2024-09-27

关键词: 青风藤; 内生链霉菌; 天然产物; 蒽环类化合物; η -rhodomycinone

Biosynthetic potential and anti-tumor natural product η -rhodomycinone of the endophyte *Streptomyces* sp. SZC001 in *Sinomenium acutum*

QIN Yuqing[#], TIAN Cheng[#], YANG Hao, PU Hong, QI Yuxin, ZOU Wei, JIANG Dandan, HUANG Xueshuang^{*}, SUN Runze^{*}

Hunan Provincial Key Laboratory for Synthetic Biology of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, Hunan, China

Abstract: [Objective] To investigate the biosynthetic potential of the endophyte *Streptomyces* sp. SZC001 in *Sinomenium acutum* and explore the unknown active natural products. [Methods] SZC001 was isolated by surface sterilizing method and its full-length genome sequence was obtained by third-generation and second-generation sequencing. Then, the biosynthetic potential of SZC001 was evaluated by antiSMASH analysis. Fermentation was carried out with four media, and the compounds were separated and identified by silica gel column chromatography, high-performance liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The CCK-8 assay was employed to examine the cytotoxicity of the target compounds. [Results] The strain was identified as *Streptomyces* sp. SZC001, with a genome length of 9 109 166 bp and the G+C content of 71.08%. The antiSMASH analysis showed that the genome of the strain contained a total of 31 biosynthetic gene clusters (BGCs), among which 17 BGCs had less than 40% similarity with the known BGCs. The strain produced several anthracyclines in four media, and the two most abundant compounds **1** and **2** were isolated and identified. Compound **1** is the known compound ϵ -rhodomycinone and compound **2** is a new compound η -rhodomycinoe, which is derived from α_2 -rhodomycinone by derivatization of the hydroxyl group at the C-10 position and transfer of the hydroxyl group at the 6-position to the 11-position of the backbone. Both compounds **1** and **2** showed relatively strong inhibitory effects on two tumor cell lines, with IC₅₀ of 1.55–4.59 $\mu\text{mol/L}$. [Conclusion] SZC001 is a strain that holds the potential for the exploration of active natural products. The anthracyclines produced by the strain exhibit anti-tumor activities and warrant further development and utilization. This study enriches ϵ -rhodomycinone derivatives, furnishing a foundation for the subsequent exploitation of the endophytic resources of *S. acutum*.

Keywords: *Sinomenium acutum*; endophytic *Streptomyces*; natural product; anthracyclines; η -rhodomycinone

植物内生菌是指存在于植物内部且暂不致病的一类微生物, 包括内生真菌与内生细菌

等^[1-2]。植物内生菌是挖掘新的微生物菌种及新结构活性天然产物的重要来源^[3-4]。近年来, 从中药

植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)、直立百部(*Stemona sessilifolia*)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*)、矮小扁枝石松(*Diphasiastrum veitchii*)中均得到了验证^[5-8]。青风藤(*Sinomenium acutum*)为治疗风湿痹病的传统中药,其有效成分青藤碱(sinomenine, SIN)可治疗类风湿关节炎、慢性肾炎与痛风性关节炎等,具有重要的经济价值^[9-11]。然而,青风藤的微生物资源尚待深入发掘,当前关于其内生菌的研究文献较少。例如2015年肖健等^[12]对青风藤内生真菌 QT-NJ-10 研究得到了一个已知化合物 eremofortine C-1, 后续再无其他报道,其内生细菌研究基本处于空白。

紫红霉素(ϵ -rhodomycinone)于1985年从链霉菌(*Streptomyces*. sp) HPL Y-11472 中分离得到^[13]。它与一线抗肿瘤药物柔红霉素及阿霉素具有相似的骨架,但在糖基及羟基等基团的修饰存在差异(图1)^[14],这些差异导致它们的抗肿瘤活性及细胞毒性各异^[15]。 ϵ -rhodomycinone 对人肺癌细胞、人乳腺癌细胞、人肝癌细胞及人结肠癌细胞具有较好的抑制活性,相对于阿霉素及柔红霉素具有更低的心脏毒性^[16-17]。此外它还具有明显的抗疟疾活性,对疟原虫(*Plasmodium. falciparum*) K-1 的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为 8.88 $\mu\text{g/mL}$ ^[18]。 ϵ -rhodomycinone 是柔红霉素、

阿霉素、cytorhodin 等抗肿瘤化合物重要的生物合成前体^[19-23]。此外在阿霉素的发现菌株如波赛链霉菌(*Streptomyces peucetius* var. *caesius*)中 ϵ -rhodomycinone 产量最高,易于获得^[14,24]。因此早期有较多实验直接以 ϵ -rhodomycinone 为底物进行化学修饰或组合生物合成以期获得更有价值的衍生物^[22,25]。关于 ϵ -rhodomycinone 天然的非糖基化衍生物报道主要在2010年之前。在1991年,Johdo 等^[26-27]从链霉菌(*Streptomyces violaceus*) A262 中分离得到 ϵ -rhodomycinone (1)以及4个类似物 β -isorhodomycinone (3)、 γ -isorhodomycinone (4)、 α -citromycinone (5)、 α_2 -rhodomycinone (6) (图1)。

本文从中药植物青风藤分离得到一株可产 ϵ -rhodomycinone 及其类似物的内生链霉菌 SZC001,通过全基因组测序及 antiSMASH 分析发现其有较大挖掘潜力。本文通过结构鉴定以及活性测试,对其中的萜环类天然产物进行了初探。

1 材料与方 法

1.1 培养基

SZC001 的分离培养基为 ISP4 培养基和 G1 培养基^[28];种子培养基为胰蛋白胨大豆肉汤 TSB 培养基^[28];发酵培养基为 LNM 培养基^[29];

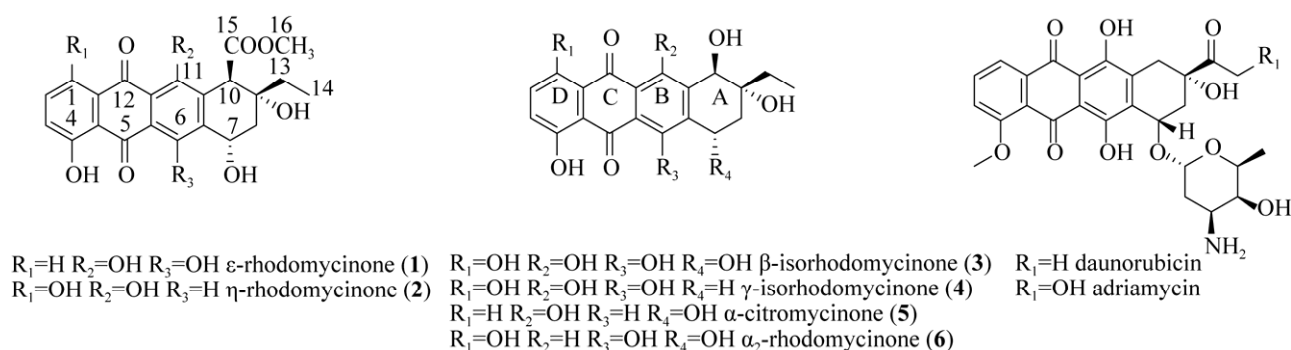


图1 ϵ -rhodomycinone 及其衍生物结构

Figure 1 Structures of ϵ -rhodomycinone and its derivatives.

其他测试培养基为 T₁ 培养基^[30]、ME 培养基^[31] 和 Fish 培养基^[28]。

1.2 主要试剂和仪器

分析纯石油醚、乙酸乙酯等有机试剂, 成都市科隆化学品有限公司; 色谱纯乙腈, 北京迈瑞达科技有限公司; 柔红霉素, 上海迈瑞尔生化科技有限公司; DA201 树脂, 天津浩聚树脂科技有限公司; 100–200 目硅胶, 青岛鼎康硅胶有限公司; Sephadex LH-20 凝胶, 青岛海洋化工有限公司; 分析型色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 沃特世科技(上海)有限公司; 半制备色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm), 月旭科技(上海)股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 试剂、引物合成和测序由北京擎科生物技术有限公司完成。

400 MHz 核磁共振波谱仪, 布鲁克(北京)科技有限公司; 高分辨质谱仪、紫外可见分光光度计、红外光谱仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 高效液相色谱仪、半制备液相色谱仪, 沃特世科技(上海)有限公司; 旋转蒸发器, 东京理化器械株式会社; 生化培养箱, 上海博迅实业有限公司; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; PCR 仪, 艾本德股份公司。

1.3 菌株分离

SZC001 菌株经表面消毒法分离于野生青风藤须根部(采样地位于湖南省怀化市中方县黄岩镇, 地理位置为 27°28'14.5"N, 110°3'3.88"E)。取青风藤置于培养箱 100 °C 干燥 30 min, 去除表面微生物。将其根茎叶拆分, 根部的处理: 取 5% 次氯酸钠溶液及 10% 硫代硫酸钠依次浸泡 10 min 和 5 min。最后用 10% 碳酸氢钠溶液浸泡 5 min, 再用无菌水洗净。将须根剪成小段碎末状, 均匀散布于 5 种放线菌培养基(25 mg/L 萘啶酮酸及 50 mg/L 制霉菌素), 置于培养箱 28 °C 培养 3–7 d; 用接种针将单个菌落接种于

对应平板进行反复划线直至纯化^[31]。SZC001 保藏于中药合成生物学研究湖南省重点实验室内生菌菌株保藏库。

1.4 菌株鉴定及全基因组测序

使用试剂盒提取菌株总 DNA, 并用引物 16S rRNA-F1 (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 16S rRNA-R1 (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR 扩增, 将对应片段进行 16S rRNA 基因测序^[31]。测序结果参考美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库进行种属鉴定。菌株 SZC001 的全基因组测序由北京百迈客生物科技有限公司完成, 包括样品质量检测、文库构建、文库质量检测、文库测序以及信息分析等流程。通过 Nanopore 三代测序平台进行全基因组测序并进行 contigs 拼接; 利用 Canu v1.5 软件对过滤后的 paired-end reads 进行组装; 通过 Racon v3.4.3 的三代 reads 进行结果矫正; 通过 Circlator v1.5.5 进行环化并调整起始位点, 最后利用 Pilon v1.22 软件及二代测序数据进行矫正纠错^[32-33]。使用 antiSMASH v7.0 进行次级代谢产物基因簇分析^[34]。采用 eggNOG、KEGG、Pfam、Swiss-Prot 数据库比对测序结果并进行基因功能注释。

1.5 发酵及分离鉴定

取 SZC001 冻存孢子接种到 TSB 培养基, 28 °C、220 r/min 培养 24–48 h。然后按发酵培养基体积分数 10% 的量转接到 LNM DA201 液体培养基中, 28 °C、220 r/min 培养 7 d, 共收集发酵液 31.5 L。树脂用乙酸乙酯提取, 将乙酸乙酯部分真空浓缩得到粗品 45.02 g。粗浸膏采用硅胶层析柱(100–200 目)进行粗分离, 石油醚-乙酸乙酯(1:0→0:1)梯度洗脱, 经 HPLC 分析合并得 8 个组分 Fr.1–Fr.8。通过硅胶柱色谱对组分 Fr.5 (1.51 g) 进行分离, 石油醚-乙酸乙酯

(1:0→0:1)洗脱, 分离得到了 Fr.5.2。Fr.5.2 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 甲醇-二氯甲烷 (1:1)洗脱, 得到 Fr.5.2.2。Fr.5.2.2 用半制备型 HPLC 制备(乙腈-1%甲酸水 40:60)得到化合物 1 ($t_R=12.7$ min, 10.1 mg)和化合物 2 ($t_R=11.4$ min, 12.7 mg)。

1.6 CCK-8 (cell counting kit-8)法测试细胞毒性

使用 CCK-8 (上海碧云天生物技术股份有限公司)法对 1 和 2 进行细胞毒性测试^[35]。测试细胞系为人胃腺癌细胞 SGC-7901 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 由上海交通大学张建明课题组提供。96 孔板每孔加入 100 μ L 测试细胞, 使细胞数约为 5 000 个。细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h, 使细胞贴壁。每孔分别加入 32、16、8、4、2、1、0.5、0.125 μ g/mL 的化合物, 置于细胞培养箱中孵育。MDA-MB-231 和 SGC-7901 分别孵育 72 h 和 96 h。酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 按公式(1)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\% \quad (1)$$

使用 GraphPad Prism 8 计算 IC_{50} 。二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)作为阴性对照, 空培养基作空白对照, 柔红霉素作为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 分离鉴定 SZC001 及全基因组测序分析

本研究利用表面消毒法从青风藤须根中分离得到内生菌 SZC001 (原始编号 C43-3-3)以及 5 种其他形态的内生菌(附图 1, 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0001715)。在 G1 培养基 30 $^{\circ}$ C 培养, 菌体正面从粉红色逐渐变为紫红色, 约第 3 天产生白色孢子, 第 7 天时可完全覆盖菌体表面; 菌体背面为粉红色且与培养基紧密结合(图 2)。抗生素测试显示它对

安普霉素(50 μ g/mL)、卡那霉素(50 μ g/mL)、硫链丝菌素(50 μ g/mL)、利福霉素(50 μ g/mL)、庆大霉素(50 μ g/mL)均敏感(附图 2, 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0001715)。以其基因组为模板, 通过 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及分子测序得到一条 1 496 bp 的基因序列 (NCBI 登录号为 PP702368)。NCBI 数据库 BLAST 分析表明, SZC001 与链霉菌 (*Streptomyces violarius*) strain MMS21-305、链霉菌 (*Streptomyces violarius*) strain ISP 5205、链霉菌 (*Streptomyces violarius*) strain NBRC 13104 相似度分别为 99.72%、99.59%、99.32%, 因此将其初步鉴定为链霉菌(*Streptomyces* sp.) SZC001。对该菌株进行全基因组测序结果显示, read 条数 120 644, 总碱基数 1 224 905 477, 平均序列读长 10 153 bp; 测序序列 N50 和 N90 的长度分别为 21 200 bp 和 3 731 bp; 重复序列为 155 777 bp, 占总长的 1.71%。进一步分析后可知其基因组总长度为 9 109 166 bp, G+C 含量为 71.08% (NCBI 登录号为 SRR29081433)。生物信息学分析显示基因组含有 8 044 个编码基因, 分别在 eggNOG、KEGG、Pfam、Swiss-Prot 数据库提取到 6 223、2 886、6 636、4 036 个基因的注释信息。

2.2 基因簇分析及生物合成潜力预测

基于 antiSMASH 7.0 对其代谢产物进行分析, 结果显示该菌株共含有 31 个潜在基因簇, 包括非核糖体多肽合成酶 (non-ribosomal peptide synthetase, NRPS) 类基因簇、聚酮合成酶 (polyketide synthases, PKS) 类基因簇、萜烯 (terpene) 类化合物合成基因簇、核糖体合成和翻译后修饰多肽 (ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPP) 类基因簇等类别 (表 1)。其中 9 个基因簇与 alkylresorcinol、 ϵ -poly-L-lysine、ectoine 等已知基因簇的相似度为 100%; 3 个基因簇与已知基

因簇相似度为 80%–95%；2 个基因簇与已知的基因簇相似度为 55%–60%；另外有 17 个生物合成基因簇与已知基因簇的相似度小于 40%。其中相似度在 30%–40% 的基因簇有 2 个，相似度在 10%–25% 的基因簇有 5 个，相似度在 10% 以下的基因簇有 10 个，且其中 4 个基因簇与数据库比对无相似度。表明菌株 SZC001 具有产

生结构新颖或功能独特化合物的潜力。

2.3 化合物分离鉴定及基因簇分析

SZC001 在 LNM、ME、Fish、T₁ 四种培养基(添加 DA201 树脂)中代谢谱较为丰富，主产物均为紫外吸收 230、255、290、490 nm 的类似物(图 3)。其中 SZC001 在 LNM 中发酵，该产物产量最高，被用作后期的发酵培养基。

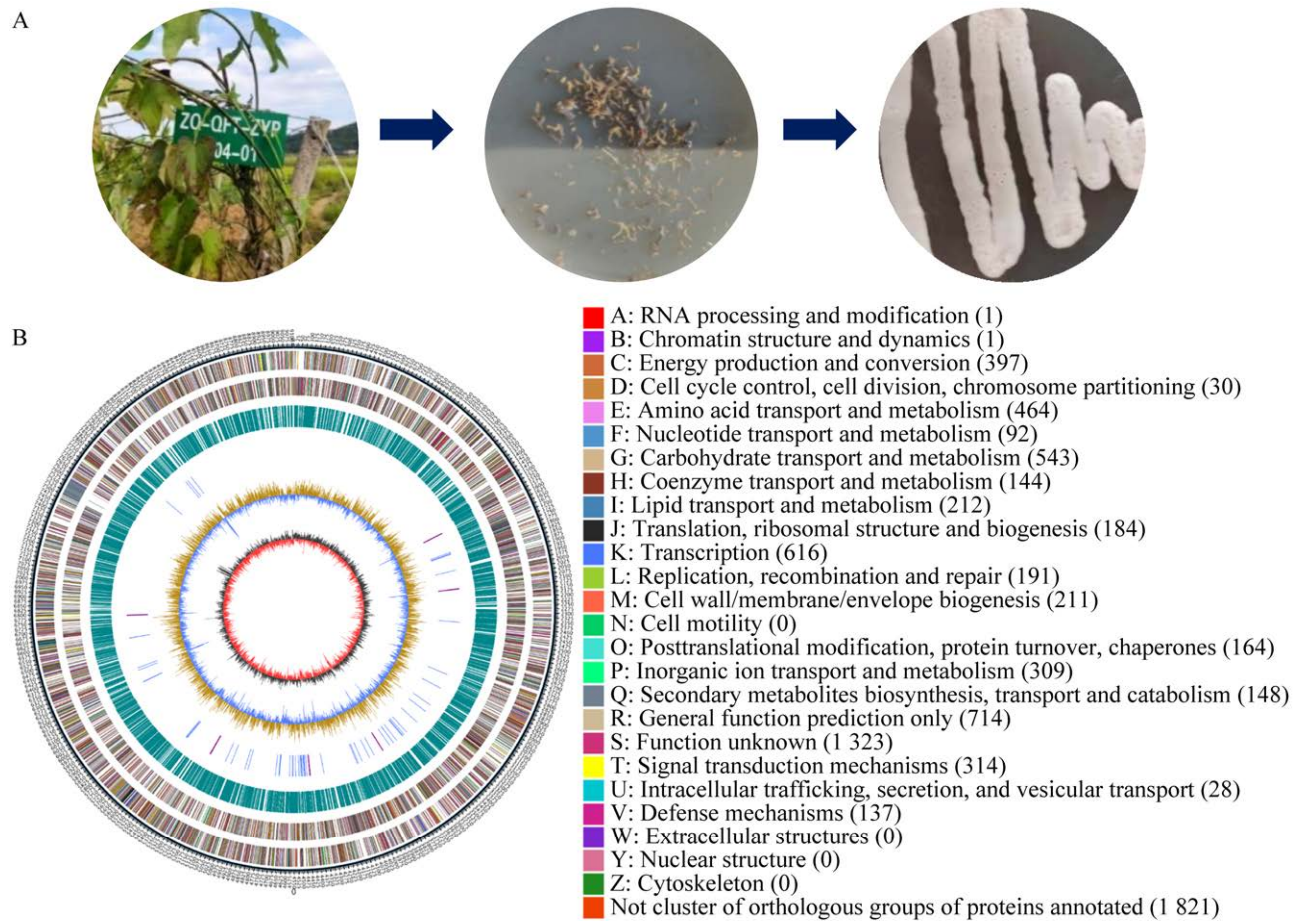


图 2 菌株 SZC001 的分离流程(A)及基因组圈图(B)

Figure 2 Isolation and identification of strain SZC001 and genomic circle map. A: Schematic diagram of strain isolation. B: Genomic circle map of strain. The outermost circle is the genome size marker, 5 kb per scale; The second and third circles are positive and negative stranded genes respectively, which are indicated by different colours according to different COG functional classifications; The fourth circle is the repetitive sequences; The fifth circle is the tRNAs and rRNAs, with the tRNAs in blue and the rRNAs in purple; The sixth circle is the G+C content, with the light yellow part being higher than the average, and the blue part being lower than the average; The innermost circle is the GC-skew, dark gray indicates that G is greater than C, and red indicates that C is greater than G; the GC-skew is a GC-skew with a darker gray color.

表 1 SZC001 次级代谢产物合成基因簇

Table 1 The secondary metabolite biosynthetic gene clusters encoded by the genome of SZC001

Cluster	Position of gene cluster (start)	Position of gene cluster (termination)	Type of gene cluster	Most similar known cluster	Similarity (%)
1	6 891	68 544	T3PKS, NRPS, T1PKS	Alkylresorcinol	100
2	229 260	250 820	Melanin, terpene	Melanin	57
3	643 925	689 547	NRPS-like, T1PKS	Olimycin A/B	20
4	1 188 455	1 208 783	Terpene	Clipibicyclene	6
5	1 362 768	1 402 798	T3PKS	Flaviolin/1,3,6,8-tetrahydro xynaphthalene	100
6	1 921 470	1 953 655	NAPAA	ϵ -poly-L-lysine	100
7	2 176 155	2 186 553	Ectoine	Ectoine	100
8	2 704 623	2 753 867	T1PKS, NRPS	Rifamorpholine A/B/C/D/E	3
9	2 968 910	2 989 421	Terpene	SCO-2138	14
10	3 256 213	3 291 146	NAPAA	Stenothricin	13
11	3 352 468	3 363 133	Melanin	Melanin	40
12	3 457 262	3 468 035	NI-siderophore	Desferrioxamin B/E	83
13	4 717 147	4 728 088	Butyrolactone	Coelimycin P1	8
14	5 185 780	5 258 286	T2PKS, Oligosaccharide, PKS-like	Cytorhodin	84
15	5 792 861	5 803 409	Butyrolactone	–	–
16	5 813 805	5 824 746	Butyrolactone	Neocarzinostatin	4
17	5 900 336	5 941 140	2dos	Notonesomycin A	6
18	6 189 388	6 209 988	Terpene	Albaflavenone	100
19	6 843 605	6 854 598	NI-siderophore	–	–
20	7 142 887	7 153 846	RiPP-like	–	–
21	7 217 971	7 238 601	Terpene	Geosmin	100
22	7 388 394	7 411 573	RRE-containing	–	–
23	7 481 332	7 619 277	NI-siderophore, NRPS, NRPS-like	Friulimycin A/B/C/D	33
24	8 025 082	8 052 261	Terpene	Hopene	92
25	8 199 733	8 258 068	NRP-metallophore, NRPS	Coelichelin	100
26	8 393 130	8 434 467	Ladderane	Colabomycin	15
27	8 465 947	8 507 131	T3PKS	Germicidin	100
28	8 572 827	8 586 380	NI-siderophore	Peucechelin	25
29	8 711 211	8 738 249	RiPP-like, lanthipeptide-class-iii	Informatipeptin	100
30	8 800 286	8 844 260	T1PKS	Chlorothricin/ Deschlorothricin	4
31	8 914 379	8 958 647	NRPS	Diisonitrile antibiotic SF2768	55

–: No similar gene cluster predicted.

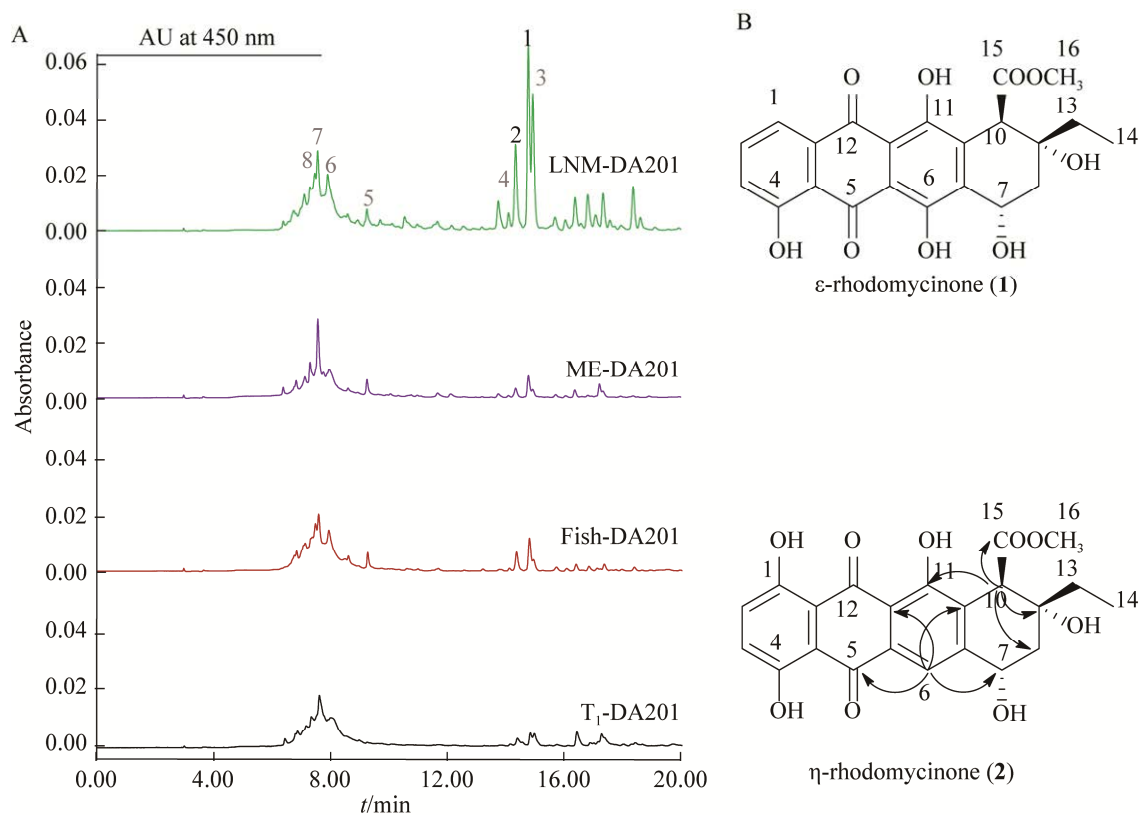


图3 SZC001的代谢谱图及化合物1和2结构(→代表关键的HMBC信号)

Figure 3 Metabolic profile of SZC001 and structures of compounds 1 and 2 (→ as key HMBC signal).

选取LNM进行31.5 L发酵,共得到了45.02 g 发酵浸膏。经过硅胶柱层析、凝胶柱、半制备高效液相色谱仪分离纯化共得到发酵含量较高的2个化合物1(10.1 mg)和2(12.7 mg)。化合物1为红色粉末状,易溶于二甲亚砜(DMSO)。对该化合物进行液相质谱(LC-MS)分析显示,负离子模式下[M-H]⁻峰为427.102 0,理论值为427.102 3,确定其分子式为C₂₂H₂₀O₉。在氘代DMSO中进行核磁测试。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)波谱数据 δ: 7.79 (d, *J*=9.4 Hz, 1H, H-1), 7.75 (d, *J*=7.0 Hz, 1H, H-2), 7.37 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, H-3), 5.55 (m, 1H, H-7), 4.15 (s, 1H, H-10), 3.65 (s, 3H, H-16), 2.06 (m, 2H, H-8), 1.70 (m, 1H, H-13_α), 1.45 (m, 1H, H-13_β), 1.05 (t, *J*=7.3 Hz, 3H, H-14); ¹³C-NMR

(175 MHz, DMSO-*d*₆)数据 δ: 189.77 (C-5), 185.87 (C-12), 171.20 (C-15), 162.16 (C-4), 157.80 (C-11), 156.87 (C-6), 139.90 (C-2), 137.51 (C-10a), 134.35 (C-6a), 133.53 (C-12a), 124.91 (C-3), 119.34 (C-1), 116.82 (C-4a), 111.52 (C-11a), 111.22 (C-5a), 71.51 (C-9), 61.39 (C-7), 52.71 (C-16), 51.82 (C-10), 35.22 (C-13), 32.71 (C-8), 7.29 (C-14)。核磁数据与已报道文献一致,因此化合物1确定为ε-rhodomycinone^[26-27]。

化合物2为橙色粉末状,易溶于二甲亚砜(DMSO)。UV-Vis (MeOH) λ_{max} [lg ε/(L/(mol·cm))]: 234 (4.53)、258 (4.28)、294 (3.85)、492 (4.04) nm。该化合物的红外光谱提示结构中存在羟基(3 417.85 cm⁻¹)、共轭羰基(1 719.71 cm⁻¹)和苯环(1 618.74, 1 500.34 cm⁻¹)。对其进行液相质

谱(LC-MS)分析显示,负离子模式下[M-H]⁻峰为427.1018,理论值为427.1023,确定其分子式为C₂₂H₂₀O₉。化合物**2**的¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)波谱数据 δ: 7.93 (s, 1H, H-6), 7.39 (m, 1H, H-2), 7.39 (m, 1H, H-3), 4.84 (t, *J*=4.5 Hz, 1H, H-7), 4.12 (s, 1H, H-10), 3.64 (s, 3H, H-16), 2.18 (m, 1H, H-8α), 1.98 (m, 1H, H-8β), 1.62 (m, 1H, H-13α), 1.48 (m, 1H, H-13β), 1.03 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, H-14); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆)数据 δ: 189.53 (C-12), 186.35 (C-5), 171.72 (C-15), 161.36 (C-11), 157.88 (C-4), 157.84 (C-1), 149.23

(C-6a), 131.64 (C-5a), 130.73 (C-2), 130.04 (C-10a), 129.81 (C-3), 119.69 (C-6), 114.42 (C-11a), 113.27 (C-4a), 113.11 (C-12a), 71.46 (C-9), 65.95 (C-7), 52.44 (C-16), 51.84 (C-10), 37.89 (C-8), 32.20 (C-13), 7.45 (C-14)。其与化合物**1** ¹³C-NMR 谱有较高的相似度(表2),但具有差异,推测化合物**2**为其类似物。经过归属发现化合物**2**与 α₂-rhodomycinone ¹³C-NMR 谱高度相似,但含有特有的 171.20 (C-15)及 52.71 (C-16)信号^[27]。该信号与化合物**1**的 COOCH₃的 C-15 及 C-16 信号相似。比对 ¹H-NMR 谱图也发现,化合物**2**相对于 α₂-rhodomycinone 有

表2 化合物**1**和**2**的氢谱(400 MHz)和碳谱(100 MHz)核磁数据

Table 2 ¹H (400 MHz) and ¹³C (100 MHz) NMR data of compounds **1** and **2**

Compound 1 (ε-rhodomycinone)			Compound 2 (η-rhodomycinone)		
Position	δ _C , type	δ _H , multiplicity (<i>J</i> in Hz)	δ _C , type	δ _H , multiplicity (<i>J</i> in Hz)	HMBC
1	119.34, CH	7.79, d (9.4)	157.84, C		
2	139.90, CH	7.75, d (7.0)	130.73, CH	7.39, m	4
3	124.91, CH	7.37, d (7.7)	129.81, CH	7.39, m	
4	162.16, C		157.88, C		
4a	116.82, C		113.27, C		
5	189.77, C		186.35, C		
5a	111.22, C		131.64, C		
6	156.87, C		119.69, CH	7.93, s	7,11a,10a,5
6a	134.35, C		149.23, C		
7	61.39, CH	5.55, m	65.95, CH	4.84, t (4.5)	
8	32.71, CH ₂	2.06, m	37.89, CH ₂	Hα 2.18, m Hβ 1.98, m	6a,7,9
9	71.51, C		71.46, C		
10	51.82, CH	4.15, s	51.84, CH	4.12, s	8,9,10a,6a,11,15
10a	137.51, C		130.04, C		
11	157.80, C		161.36, C		
11a	111.52, C		114.42, C		
12	185.87, C		189.53, C		
12a	133.53, C		113.11, C		
13	35.22, CH ₂	Hα 1.70, m Hβ 1.45, m	32.20 CH ₂	Hα 1.62, m Hβ 1.48, m	14,8,10,9
14	7.29, CH ₃	1.05, t (7.3)	7.45, CH ₃	1.03, t (7.2)	13,9
15	171.20, C		171.72, C		
16	52.71, CH ₃	3.65, s	52.44, CH ₃	3.64, s	15

一个明显的 3.64 (3H, s, COOCH₃)信号, 因此推测化合物 **2** 是 α_2 -rhodomycinone 的 C-10 位 OH 被替换为了 COOCH₃。据 HMBC 两组信号 4.12 (H-10)→161.36 (C-11)以及 7.93 (H-6)→65.95 (C-7), 可判定 B 环 OH 应该在 C-11 而非 C-6 位。通过 HMBC 及 HSQC 谱得到进一步确认(图 3)。由此确定化合物 **2** 为新的化合物结构, 命名为 η -rhodomycinone。结构解析及文献调研初步判断基因簇 14 可负责 rhodomycinone 及其类似物的生物合成, 它与已报道的 cytorhodin 的生物合成基因簇相似度为 84%^[23,36]。

2.4 细胞毒性测试

按 CCK-8 法对化合物 **1** 和 **2** 进行细胞毒性测试。化合物 **1** 对人胃腺癌细胞 SGC-7901 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 具有较好活性, IC₅₀ 值分别为 1.55 $\mu\text{mol/L}$ 和 3.23 $\mu\text{mol/L}$ 。化合物 **2** 对人胃腺癌细胞 SGC-7901 的活性略低于化合物 **1**, IC₅₀ 值为 4.59 $\mu\text{mol/L}$ 。其对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的抑制与化合物 **1** 类似, IC₅₀ 值为 2.11 $\mu\text{mol/L}$ 。阳性对照为柔红霉素, 它对以上 2 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 均小于 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 讨论与结论

基于“内共生”原理, 部分内生菌株可产生与宿主相同或相似的代谢产物, 代表案例有紫杉醇、鬼臼毒素、喜树碱等, 这引发了植物内生菌的研究热潮^[37-38]。有学者指出植物内生菌研究的真正意义不仅在于其生态的独特性, 更在于微生物在宿主体内和它们的协同作用及协同作用所产生的新物质和新功能^[2]。越来越多的证据也表明植物内生菌是一类开发不足的微生物资源, 从中可发掘具有新颖结构或作用靶点的抗生素^[5-8]。

本研究初步判定基因簇 14 负责编码化合

物 **1** 和 **2** 及其类似物的生物合成。尽管该基因簇与已知基因簇 cytorhodin 相似度较高(84%), 但 SZC001 基因组中还有其他相似度较低的次级代谢产物可被挖掘。如 friulimicin 是一种与 daptomycin 类似但作用靶点不同的脂肽, 它们是一类新型抗生素^[39]。Rifamorpholines A-E 是最近鉴定的利福霉素的一个新亚类, 具有特殊的 5/6/6/6 环发色团, 能有效抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌^[40]。Colabomycin E 可显著抑制 THP-1 细胞释放 IL-1 β , 是一种潜在的抗炎化合物^[41]。

萜环类天然产物通常可作为嵌入剂及拓扑异构酶抑制剂而发挥抗肿瘤作用^[42-43]。然而, 由于剂量依赖性心脏毒性等问题限制了其应用。萜环类药物结构差异会导致不同的心脏毒性, 如柔红霉素较阿霉素的心脏毒性更低, 因此有研究者关注它们衍生物改造及活性评估^[17]。从自然界中寻找天然存在的活性更强, 毒性更低的衍生物也是一种重要思路。本文对含量最高的产物 **1** 和 **2** 仅进行了初步的细胞毒性测试, 后期可对其他含量较低的类似物进行结构解析并对它们的抗肿瘤活性及细胞毒性进行综合评价。

综上所述, 本研究从青风藤的根系中分离得到一株内生菌 SZC001, 通过全基因组测序评估了其生物合成潜力并对其萜环类代谢产物进行了初探。化合物的分离鉴定丰富了 rhodomycinone 的天然产物库, 而 SZC001 则为青风藤内生放线菌的生物活性代谢产物后续发掘提供了基础。

致谢

感谢上海交通大学李雷副教授对文章的修改和建议, 感谢上海交通大学焦兴志博士对结

构解析的帮助,感谢上海交通大学王晓雯硕士对细胞毒性实验的帮助。

参考文献

- [1] HARRISON JG, GRIFFIN EA. The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here?[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(6): 2107-2123.
- [2] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(2): 349-363.
WANG ZW, JI YL, CHEN YG. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 349-363 (in Chinese).
- [3] SALAM N, KHIEU TN, LIU MJ, VU TT, CHU-KY S, QUACH NT, PHI QT, RAO MPN, FONTANA A, SARTER S, LI WJ. Endophytic actinobacteria associated with *Dracaena cochinchinensis* (Lour.): isolation, diversity, and their cytotoxic activities[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 1308563.
- [4] NISA H, KAMILI AN, NAWCHOO IA, SHAFI S, SHAMEEM N, BANDH SA. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 82: 50-59.
- [5] ZHAO HM, YANG AP, LIU J, BAO S, PENG R, HU Y, YUAN TJ, HOU SR, XIE T, ZHANG QC, CHEN XB, WANG XC, HU LH. Chartspirotone, a tetracyclic spiro-naphthoquinone derivative from a medicinal plant endophytic *Streptomyces*[J]. *Organic Letters*, 2020, 22(10): 3739-3743.
- [6] ZHAO HM, YANG AP, ZHANG N, LI SY, YUAN TJ, DING N, ZHANG SW, BAO S, WANG C, ZHANG YN, WANG XC, HU LH. Insecticidal endostemonines A–J produced by endophytic *Streptomyces* from *Stemona sessilifolia*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(6): 1588-1595.
- [7] SUN XX, WANG GY, XIAO H, JIANG JY, XIAO DL, XING BY, LI AN, ZHANG YT, SUN K, XU YQ, GUO LP, YANG DH, MA M. Strepimidazoles A–G from the plant endophytic *Streptomyces* sp. PKU-EA00015 with inhibitory activities against a plant pathogenic fungus[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(7): 2246-2254.
- [8] SHANG NN, ZHANG ZX, HUANG JP, WANG L, LUO JY, YANG J, PENG T, YAN YJ, MA YT, HUANG SX. Glycosylated piericidins from an endophytic *Streptomyces* with cytotoxicity and antimicrobial activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2018, 71(7): 672-676.
- [9] DING C, LI YZ, SUN Y, WU Y, WANG FR, LIU CW, ZHANG HW, JIANG Y, ZHANG DD, SONG XM. *Sinomenium acutum*: a comprehensive review of its botany, phytochemistry, pharmacology and clinical application[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2022, 50(5): 1219-1253.
- [10] 刘维, 刘晓亚, 刘滨. 正清风痛宁缓释片治疗类风湿关节炎 60 例疗效观察[J]. *中西医结合学报*, 2006, 4(2): 201-202.
LIU W, LIU XY, LIU B. Clinical observation on treatment of rheumatoid arthritis with Zhengqing Fengtongning Retard Tablets: a report of 60 cases[J]. *Journal of Integrative Medicine*, 2006, 4(2): 201-202 (in Chinese).
- [11] 李连, 何泽云, 李旭华, 汤毓, 毛婷彗, 印红爱. 正清风痛宁穴位透皮法治疗慢性肾炎的临床观察[J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35(11): 45-47, 55.
LI L, HE ZY, LI XH, TANG Y, MAO TY, YIN HA. Clinical observation of zhengqingfengtongning acupoint transdermal therapy in treating chronic nephritis[J]. *Journal of Hunan University of Chinese Medicine*, 2015, 35(11): 45-47, 55 (in Chinese).
- [12] 肖健, 程花蕾, 高鹏, 董静. 青风藤内生真菌 QT-NJ-10 化学成分研究[J]. *宝鸡文理学院学报(自然科学版)*, 2015, 35(4): 34-39.
XIAO J, CHENG HL, GAO P, DONG J. Study on chemical constituents of endophytic fungi QT-NJ-10 from *Caulis sinomenii*[J]. *Journal of Baoji University of Arts and Sciences (Natural Science Edition)*, 2015, 35(4): 34-39 (in Chinese).
- [13] REDDY GC, SAHAI R, FEHLHABER HW, GANGULI BN. Isolation and structure of a new epsilon-rhodomyacin compound produced by a *Streptomyces* species HPL Y-11472[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1985, 38(10): 1423-1425.
- [14] ARCAMONE F, CASSINELLI G, FANTINI G, GREIN A, OREZZI P, POL C, SPALLA C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1969, 11(6): 1101-1110.
- [15] MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity[J]. *Pharmacological Reviews*, 2004, 56(2): 185-229.

- [16] GUI C, YUAN J, MO XH, HUANG HB, ZHANG SW, GU YC, JU JH. Cytotoxic anthracycline metabolites from a recombinant *Streptomyces*[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(5): 1278-1289.
- [17] 韩宁宁. 紫红酶酮通过调控 p53/p21 通路诱导乳腺癌细胞衰老及抑制 EMT 的研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2023.
- HAN NN. Study on inducing aging of breast cancer cells and inhibiting EMT by regulating p53/p21 pathway[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2023 (in Chinese).
- [18] SUPONG K, SRIPREECHASAK P, PHONGSOPITANUN W, TANASUPAWAT S, DANWISSETKANJANA K, BUNBAMRUNG N, PITTAYAKHAJONWUT P. Antimicrobial substances from the rare actinomycete *Nonomuraea rhodomycinica* NR4-ASC07^T[J]. *Natural Product Research*, 2019, 33(16): 2285-2291.
- [19] GRIMM A, MADDURI K, ALI A, HUTCHINSON CR. Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase[J]. *Gene*, 1994, 151(1/2): 1-10.
- [20] FILIPPINI S, SOLINAS MM, BREME U, SCHLÜTER MB, GABELLINI D, BIAMONTI G, COLOMBO AL, GAROFANO L. *Streptomyces peucetius* daunorubicin biosynthesis gene, *dnrF*: sequence and heterologous expression[J]. *Microbiology*, 1995, 141(Pt 4): 1007-1016.
- [21] NIEMI J, WANG YL, AIRAS K, YLIHONKO K, HAKALA J. Characterization of aklavinone-11-hydroxylase from *Streptomyces purpurascens*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1430(1): 57-64.
- [22] 王晔. 蒽环类抗癌药阿霉素生物合成糖基化模块关键酶基因异源表达[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2021.
- WANG Y. Heterologous expression of key enzyme genes of anthracycline anticancer drug adriamycin biosynthesis glycosylation module[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2021 (in Chinese).
- [23] GUI C, MO XH, GU YC, JU JH. Elucidating the sugar tailoring steps in the cytorhodin biosynthetic pathway[J]. *Organic Letters*, 2017, 19(20): 5617-5620.
- [24] CHAUDHARY AK, POKHREL AR, HUE NT, YOO JC, SOHNG JK. Paired-termini antisense RNA mediated inhibition of DoxR in *Streptomyces peucetius* ATCC 27952[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2015, 20(3): 381-388.
- [25] HAN AR, PARK JW, LEE MK, BAN YH, YOO YJ, KIM EJ, KIM E, KIM BG, SOHNG JK, YOON YJ. Development of a *Streptomyces venezuelae*-based combinatorial biosynthetic system for the production of glycosylated derivatives of doxorubicin and its biosynthetic intermediates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14): 4912-4923.
- [26] JOHDO O, ISHIKURA T, YOSHIMOTO A, TAKEUCHI T. Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. I. Isolation of antibiotic-blocked mutants from *Streptomyces violaceus* A262[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1991, 44(10): 1110-1120.
- [27] JOHDO O, TONE H, OKAMOTO R, YOSHIMOTO A, NAGANAWA H, SAWA T, TAKEUCHI T. Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. V. New anthracycline alldimycin A: a minor component isolated from obelmycin beer[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1991, 44(10): 1160-1164.
- [28] LIU L, LI SN, SUN RZ, QIN XJ, JU JH, ZHANG CS, DUAN YW, HUANG Y. Activation and characterization of bohemamine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. CB02009[J]. *Organic Letters*, 2020, 22(12): 4614-4619.
- [29] HUANG Y, HUANG SX, JU JH, TANG GL, LIU T, SHEN B. Characterization of the genes unveiling key intermediates for β -alkylation in leinamycin biosynthesis[J]. *Organic Letters*, 2011, 13(3): 498-501.
- [30] PU H, JIANG T, PENG DA, XIA JJ, GAO J, WANG YJ, YAN XH, HUANG XS, DUAN YW, HUANG Y. Degradation of mirubactin to multiple siderophores with varying Fe(III) chelation properties[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2022, 20(25): 5066-5070.
- [31] QIN S, LI J, CHEN HH, ZHAO GZ, ZHU WY, JIANG CL, XU LH, LI WJ. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(19): 6176-6186.
- [32] JAIN M, OLSEN HE, PATEN B, AKESON M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community[J]. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 239.
- [33] MAGI A, SEMERARO R, MINGRINO A, GIUSTI B, D'AURIZIO R. Nanopore sequencing data analysis:

- state of the art, applications and challenges[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2018, 19(6): 1256-1272.
- [34] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJN, VAN WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W46-W50.
- [35] LI KL, LIANG Z, CHEN WH, LUO XW, FANG W, LIAO SR, LIN XP, YANG B, WANG JF, TANG L, LIU YH, ZHOU XF. Iakyracidins A–D, antiproliferative piericidin analogues bearing a carbonyl group or cyclic skeleton from *Streptomyces iakyrus* SCSIO NS104[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2019, 84(19): 12626-12631.
- [36] NIEMI J, YLIHONKO K, HAKALA J, PÄRSSINEN R, KOPIO A, MÄNTSÄLÄ P. Hybrid anthracycline antibiotics: production of new anthracyclines by cloned genes from *Streptomyces purpurascens* in *Streptomyces galilaeus*[J]. *Microbiology*, 1994, 140 (Pt 6): 1351-1358.
- [37] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [38] ALY AH, DEBBAB A, KJER J, PROKSCH P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products[J]. *Fungal Diversity*, 2010, 41(1): 1-16.
- [39] PAUL S, ISHIDA H, NGUYEN LT, LIU ZH, VOGEL HJ. Structural and dynamic characterization of a freestanding acyl carrier protein involved in the biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics[J]. *Protein Science*, 2017, 26(5): 946-959.
- [40] 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.
- [41] PETŘÍČKOVÁ K, POSPÍŠIL S, KUZMA M, TYLOVÁ T, JÁGR M, TOMEK P, CHROŇÁKOVÁ A, BRABCOVÁ E, ANDĚRA L, KRIŠTŮFEK V, PETŘÍČEK M. Biosynthesis of colabomycin E, a new manumycin-family metabolite, involves an unusual chain-length factor[J]. *Chembiochem*, 2014, 15(9): 1334-1345.
- [42] DAL BEN D, PALUMBO M, ZAGOTTO G, CAPRANICO G, MORO S. DNA topoisomerase II structures and anthracycline activity: insights into ternary complex formation[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, 13(27): 2766-2780.
- [43] CAPRANICO G, BINASCHI M, BORGNETTO ME, ZUNINO F, PALUMBO M. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1997, 18(9): 323-329.