军事医学科学院研究生学位论文独创性声明

秉承军事医学科学院严谨的学风和科研作风,本人声明所呈交的 学位论文是本人在导师指导下独立进行的研究工作和取得的研究成 果,除了文中特别加以标注和致谢之处外,论文中不包含其他人已经 发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得**军事医学科学院**或其它教 育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究 所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签字日期: _200b 年 5 月 29 日 论文作者签字: 高桥

军事医学科学院研究生学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解**军事医学科学院**有关保留、使用学位论 文的规定。特授权**军事医学科学院**可以将学位论文的全部或部分内容 编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保 存、汇编以供查阅和借阅。同意将本学位论文的复印件和磁盘送交国 家有关部门和机构。

(保密学位论文在解密后适用本授权书)

论文作者签字: 点板 签字日期: 2006 年 5 月 29 日 指导教师签字: 孔双拉 签字日期: 2006 年 5 月 29 日

中文摘要

I 放线菌 1146 活性代谢产物的跟踪分离及结构鉴定

微生物是许多活性天然产物的重要来源。微生物代谢产物化学结构多样性和复杂性对发现新药有重要价值。寻找具有特殊生物活性的微生物代谢物是一项有意义的工作。

本实验选用我国边远地区土壤放线菌 1146 菌,筛选具有选择性抑制 K562 细胞生长的微生物代谢物。通过九种培养基发酵对比筛选培养基,菌种大规模发酵、乙酸乙酯提取、正反相硅胶柱层析和高效液相色谱等方法,进行代谢产物活性跟踪分离。对分离得到的化合物结合理化性质、质谱数据和核磁共振数据进行结构鉴定,推断化合物的结构。

通过九种培养基发酵对比,挑选出第四号培养,菌种大规模发酵,提取物采用活性跟踪分离手段,分离出一种主要活性成分,经结构鉴定为放线菌素 D。另外还对其它成分进行了分离、鉴定,分别得到大豆素、染料木素和苯乙酰胺。 关键词:土壤放线菌;有效成分;分离;结构鉴定

II 荨麻药材质量研究

荨麻(Urtica L.)为荨麻科、荨麻属植物,具有抗炎、镇痛及抑制前列腺增生等药理活性,研究发现其很多药理作用可归于水溶性多糖成分。关于荨麻的质量控制尚无明确定性、定量指标,为了更好地开展对荨麻的开发和利用,我们对荨麻药材的质量标准进行了研究。

本实验对不同产地荨麻(内蒙、贵州、湖南)的多糖含量进行比较,对贵州荨麻根药材按药典对其进行各项目检测(水分、水溶性浸出物、总灰分和酸不溶性灰分、重金属含量),并对贵州荨麻多糖抗炎活性进行研究,

不同产地荨麻根多糖含量对比结果表明贵州荨麻根多糖含量最高为 60.45%; 贵州荨麻根药材各项目检测其中水分含量为 7.1%, 水溶性浸出物含量为 8.6%, 总灰

分含量为 11.7%,酸不溶性灰分含量为 1.7%,重金属含量不超过 0.03%;荨麻多糖抗炎活性研究结果显示荨麻多糖对角叉菜胶引起的急性炎症过程具有明显的抑制作用,并呈剂量效应关系。

关键词: 荨麻; 多糖; 抗炎; 角叉菜胶

ABSTRACT

I Isolation and Structure Identification of Active Compounds from Soil Actionmycetes 1146

Microorganisms are an important resource for biological compounds. The structural diversity and complexity of microbial secondary metabolites play an important role in exploitation for drugs development. The discovery of active metabolites is a meaningful work.

In this paper we isolated active compounds from soil actinomycete No. 1146 collected in Yunnan Porvince for suppression on K562 cell growth. Firstly we compared nine different culture media and selected No.4 medium for fermentation in large volume and the fermentation broth was extracted with ethyl acetate and separated by silca gel column chromatography and RP HPLC. Structures of these compounds were further identified by physicochemical characteristics, MS and NMR.

The main active compound isolated was identified to be actinomycin D. Other compounds were identified to be genistin, daidzein and phenylacetamide respectively.

Key Words: soil actinomycetes; active compound; K562 cell line; chromatography; structure identification

II Quality Study on Medical Material of *Urtica cannabina L*.

Urtica L. has been widely used as folk medicine for a long history. Recent studies show that Urtica L. extracts have anti-inflammatory, analgestic effects and inhibition of benigh prostatic hyperplasia(BPH). The main active components have been reported to be polysaccharides.

In this paper we quantitively compared polysaccharide content in different species

军事医学科学院硕士学位论文

collected from Hunan, Neimeng and Guizhou and determined some quality items

according to Chinese Pharmacopoeia. Anti-inflammatory effect of polysaccharide

extracted from roots of Urtica cannabina. L. was also tested.

The results showed polysaccharide content of Urtica cannabina L. collected from

Guizhou was 60.45%, higher than other *Urtica L*. collected from Neimeng and Hunan.

The moisture content of *Urtica cannabina L.* roots was 7.1%, ash content of roots was

11.7% and ash content undissolved in acid was 1.7%, water extracts was 8.6%, heavy

mental content was below 0.03%. Polysaccharide of Urtica cannabina L. also had a

significant dose-dependence inhibition on rat inflammation caused by carrageenin.

Key Words: *Urtica cannabina L.*; polysaccharides; Pharmacopeia; anti-inflammatory

目 录

- ₩中文摘要
- ₩英文摘要
- 計□第 I 篇 放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定:引言
- ▮ № □1. 微生物生物多样性
- □ 1-□2. 微生物代谢产物复杂性
- □□3.海洋微生物及代谢产物
- □ 1-14. 微生物菌种分离与培养
- □□5. 微生物代谢产物分离与鉴定
- □ 1-16. 本课题的研究目的及研究方法
- ► 第 I 篇放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定:第一章放线菌株 1146 代谢产物的活性筛选
- □□1. 材料与方法
- Ⅱ № □1.1 仪器与试剂
- 計山1.2 供试土壤放线菌
- □ 1.3 供筛选样品的制备
- □ 1.4细胞培养及 MTT 法(四甲基偶氮唑盐比色法)
- → 第 I 篇放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定:第二章放线菌 1146 培养基的筛选和大规模发酵
- # 計□1. 材料与方法
- □□1.1 仪器与试剂
- ≒ № 1.2 放线菌 1146 培养基的筛选
- □ □ 1.2.1 放线菌 1146 的发酵
- ↓ □1.2.2 放线菌 1146 发酵液的提取
- □ ┣□1.3 放线菌 1146 大规模发酵及菌液提取
- ≒ 늘 1.3.1 放线菌 1146 大规模发酵

- □ 1.1 放线菌 1146 培养基的筛选
- □□2.2 放线菌 1146 大规模发酵及菌液提取
- ► 第 I 篇放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定: 第三章活性代谢产物跟踪分离
- # 計□1. 材料与方法
- : : □1.1 仪器与材料
- ▮ № □1.2 活性成分跟踪分离
- Ⅱ 計山2. 结果与讨论
- □ □2.1 放线菌 1146 代谢产物的提取分离流程
- □ □2.2 分离出的代谢产物

- №第 I 篇放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定: 第四章化合物结构鉴定
- : : □1. 仪器
- Ⅱ № □2. 化合物结构鉴定
- □ 1 □ 2.1 活性化合物的结构鉴定
- □ 1: □2.2 其它化合物的结构鉴定
- 1 □3. 讨论
- □□3.1 放线菌素 D 的结构特点
- □3.2 放线菌素 D 作用机制
- □3.3 放线菌素 D 的临床用途
- 上□第 I 篇 放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定:本篇结论
- ├──第Ⅱ篇 荨麻药材质量研究: 引言
- □ 1. 荨麻属植物的研究概况
- □ 1.1 抑制前列腺增生
- ▮ №□1.2 抗炎、抗过敏、镇痛作用
- □1.3 强免疫功能、抗病毒
- □ 1.4 降血糖、降血压
- □□2. 本课题的研究目的及研究方法
- 上□第II 篇荨麻药材质量研究: 第一章不同产地荨麻多糖含量测定
- 』 ├□1. 材料与方法
- □ 1.1 三种不同产地不同种荨麻总糖的提取流程
- □1.2 总糖含量测定
- □1.3 3,5 二硝基水杨酸比色法分析单糖含量(DNS)
- : □2. 结果与讨论
- **├**□第Ⅱ篇荨麻药材质量研究: 第二章贵州荨麻根药材各项指标的测定
- 』 ├□1. 材料与方法
- ▮ №□1.1 荨麻根水分的测定
- ▮ ├□1.2 荨麻根水溶性浸出物的测定
- □ 1:□1.3 荨麻根总灰分及酸不溶性灰分的测定
- □ 1.4 荨麻根重金属的测定
- □□2. 结果与讨论
- 上□第Ⅱ篇荨麻药材质量研究: 第三章麻叶荨麻多糖对角叉菜胶诱发大鼠足爪肿胀的抑制作用
- ▮ №□1. 材料与方法
- : :-□2. 疗效评定
- : □3. 数据处理
- □□4. 实验结果
- 』 □ 5. 讨论
- **:□**第Ⅱ篇 荨麻药材质量研究: 本篇结论
- **!**□参考文献
- ₩□附录1 化合物光谱图
- ₩□附录二 研究生期间发表的文章
- **└─**致谢

第 I 篇 放线菌 1146 活性代谢产物跟踪分离和结构鉴定

引言

微生物是活性天然产物的重要来源,微生物代谢物具有极大的化学结构多样性和复杂性。目前药品市场大约有 30%的药物来源于天然产物,微生物代谢物是目前临床使用的抗生素的主要来源。随着青霉素的发现和使用,人们从微生物特别是放线菌和真菌中发现了大量的抗生素。利用许多抗生素的化学构架作为先导化合物,通过结构改造已经开发出许多有用的抗生素。从微生物代谢产物中开发新的生物活性药物成为制药领域的新课题,并已取得了丰富的成果。尽管由于组合化学的发展,人们对天然化合物的关注减少,但随着菌种分离、代谢产物的检测和结构鉴定新技术的发展,开发微生物代谢产物必然成为寻找新抗生素和生物活性化合物的重要途径^[1]。

1、微生物生物多样性

放线菌(Actinomycetes)是临床使用的抗生素最主要的来源,大约 70%的微生物天然产物来源于放线菌,特别是从土壤分离出的链霉菌属(Streptomyces)。链霉菌属包括 500 种以上的物种,从中发现了许多结构新颖的代谢产物^[2]。随着人们对放线菌认识及应用的快速发展,已知放线菌已达 170 个属。然而,作为原核生物的重要成员,其已知物种与其估计自然界存在的数量相比仍然是微不足道的。随着放线菌生物多样性研究的进展,放线菌仍然具有产生新的生物活性物质的极大潜力^[3]。

真菌为生物活性物质另一主要来源,能合成许多生物活性多样的代谢产物,一些已在临床使用,如 β-内酰胺抗生素、洛伐他汀等。许多真菌在自然环境中与高等植物或海洋生物共生^[2]。生产活性代谢产物的微生物种类还包括多粘菌和绿藻菌,主要合成抗肿瘤化合物,最近一项研究显示多粘菌可产生抑制革兰氏阴性菌的代谢产物^[1]。此外,小单孢菌和稀有放线菌也是新生物活性物资的重要来源^[3]。

2、微生物代谢产物多样性

微生物代谢活性物质包括抗生素和非抗生素生物活性物质。每年发现近百个新微生物活性物质,其中新的非抗生素生物活性物质逐年增多,并在数量上超过抗生素,已有 40 多种酶抑制剂成为临床药物。从发现新药的微生物来源看,放线菌仍是主要产生菌,人们不断发现新的放线菌并从中分离出新的代谢产物^[3]。Raoudha报道从新放线菌种 Streptommyces sp.TN97 分离出四个具有抑菌活性的化合物,分别为二酮哌嗪衍生物、异香素类和 N-乙酰酪胺。P. Sujatha 报道一种新放线菌 streptomycete BT-408 可产生具有抑制耐药金黄葡萄球菌的多肽抗生素 SBR-22^[4]。

此外,小单孢菌、稀有放线菌和多粘菌是寻找新微生物生物活性物质的重要菌源。小单孢菌产生许多结构类型不同的生物活性化合物,除能产生链霉菌产生的抗生素化学结构类型,也能产生独特化学结构的生物活性物质。近年来从小单孢菌中发现了结构新颖的稀二炔类抗肿瘤抗生素 calicheamicin Y1,由棘孢小单孢菌M. echinospora sp. calichensis 所产生。游动放线菌(Actinoplane sp.)ATCC 3076产生的抗细菌抗生素雷莫拉宁是一种糖酯缩肽化合物,它对需氧菌和厌氧菌均有抗菌作用。Epothilons 是粘细菌纤维束菌(Sorangium celluosum)产生的新型细胞毒化合物。它是一种新的 16 元环多酮大环内酯,含有一个噻唑基和环上的一个环氧结构^[3]。

3、海洋微生物及代谢产物

海洋环境占地球总面积 70%以上,是许多生物活性化合物的重要来源。海洋微生物生长在生物竞争性环境中,其温度、pH 值、压力较特殊,并含有丰富的氯离子和溴离子。因此,与陆生菌相比较海洋微生物代谢产物具有更特别的生物活性。由于海水的稀释作用海洋微生物代谢产物具有很强的生物活性,同时也表现出一定的毒性,临床上主要作为抗肿瘤药物。与其它药物联合使用时,许多海洋药物、在低剂量时发挥更好的治疗效果。尽管从海洋微生物中筛选获得新药的几率高,但是关键要解决海洋微生物的分离方法和培养方法^[5]。

海洋微生物有五类基本代谢物: 胺及酰胺类、吲哚生物碱类、乙酰配基类、环肽类、聚丙酸酯类, 其中以含氮化合物和乙酸酯类化合物占首位。海洋放线菌是海洋微生物活性物质的重要来源, Fenical 发现并分离出全新的海洋放线菌属

Salinospora,该菌属只存在于海洋环境中。从 Salinospora 菌种培养液中分离出一种活性较强的蛋白酶抑制剂 Salinosporamide A。Salinosporamide A 具有内酰胺内酯双环结构,对肿瘤细胞的生长具有较强的抑制作用,可用于直肠癌、非小细胞肺癌和乳腺癌的治疗。海洋真菌成为继海洋放线菌之后的又一研究热点。Gerwick 研究组从加勒比海真菌 Lyngbra majuscula 中分得酰胺类化合物 Curacin A,并对同系物进行了构效关系研究^[6]。

4、微生物菌种分离与培养

在自然环境中存在的大多数微生物在标准培养条件下无法培养,因此许多微生物资源还未被开发,这些资源中包含许多新菌种可产生新颖化合物。运用分子生物学技术如 DNA 克隆库可检测采用标准培养条件不能获得的样品,并可排除已知样品。Daniel R.报道从土壤和其它生态环境中分离出微生物 DNA 片段,用克隆在E. coli 或 Streptomyces sp 中 DNA 片段建立转基因库,用于微生物活性代谢成分的筛选。采用此方法可研究标准条件下不能培养的微生物代谢产物,为寻找新活性代谢成分开辟了新途径^[7]。

在工业化生产青霉素时期,人们就知道同一菌株在不同生长条件下能产生许多不同的化合物。因此采用多样化的生长条件来提高菌种代谢产率成为工业大规模筛选中经常使用的策略^[8]。适合一种代谢产物生物合成的培养条件不一定适合微生物的生长。不同的生物合成过程所需的培养条件不同,选择微生物培养条件必须考虑代谢产物的数量和质量等因素。在实验中随着培养条件的增加会导致可筛选的菌种数量减少^[1]。Witholt 报道在微孔板上培养细菌的方法,该方法能在不同培养条件下一次处理大量菌株^[9]。J. R. Tormo 建立了高效液相自动化分析方法,比较一组放线菌在不同培养基中产生代谢物的能力,以提高微生物代谢库的质量。从土壤和海洋采集样品分离出 250 种放线菌,每种菌分别在十种不同的培养基中小量培养,用高效液相-蒸发散射检测器分析每种提取物,挑选出产生的代谢物成分多样、组成重叠小的三种培养基进行大规模发酵,用来建立代谢物库。试验结果表明该方法通过减少多余的发酵条件和增加菌种代谢物化学成分多样性可提高供药物筛选代谢物的质量^[8]。

5、微生物代谢产物分离与鉴定

从微生物代谢产物中发现新型结构的活性化合物是天然药物化学研究的首要问题。随着分离技术、结构在线检测技术(如液相色谱-质谱联用技术、液相色谱-质谱/质谱联用技术、液相色谱-核磁共振联用技术)和活性筛选技术的高效、快速、微量化,使得研究重点已从单纯地发现新化合物转向具有生物活性的新型结构的研究^[10]。

常用的微生物代谢产物的分离方法是传统的化学分离法,主要是根据有效成分在不同溶剂中的溶解性不同得到粗制的目标组分,运用层析法进一步进行精制和纯化。层析法包括多种方法,而且随着技术的进步和发展,不断有新的层析方法涌现。为了加速高通量药物筛选过程,许多高通量技术用于天然产物的分离、检测和结构鉴定,如高通量平行制备液相色谱用于天然产物库的构建。Tang 报道利用 CombiFlashTM si1000s 系统将平行色谱技术与凝胶渗透、硅胶色谱技术相结合,应用于链霉菌 GT061089 代谢产物的分离。从 200 升菌种发酵液中分离得到16 种化合物,其中两种化合物结构已知。平行色谱技术的应用允许多个样品同时分离,极大地缩短分离时间。该技术将在天然产物的高通量分离方面发挥重要作用[III]。

如何排除已知化合物的干扰,从微生物代谢粗提物中高效快速找出新型结构化合物是研究工作者面临的新课题。检测微生物代谢物最基本的方法是液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)和液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)。通常HPLC-MS 是判断已知化合物的最灵敏的方法,多通道质谱的应用使检测可在高通量水平进行^[12]。Cremin 报道采用 8 通道全自动平行 LC-MS-ELSD 系统对天然产物库进行分析,确定某一组分中的化合物的分子量、数量和质量^[13]。电喷雾电离源(SI)与不同质量分析器(飞行时间质谱计,离子阱)组合可测定混合物中样品的分子量和分子式,由碰撞诱导解离(CID-MS/MS)产生的碎片离子信息可以获得化合物的结构信息。质谱与高效液相、薄层色谱联用,提供分析物的分子量、分子式和化学结构等信息。Gräfe 报道利用电喷雾电离质谱技术寻找新的微生物代谢物和排除已知化合物。采集分离 150 种放线菌,琼脂平板培养,提取物采用薄层

色谱展开,紫外下观察,将斑点刮下、洗脱,经 SI-CID-MS/MS 检测,鉴定出 20 种已知化合物和一种新化合物^[14]。

液相色谱-核磁共振(HPLC-NMR)尽管灵敏性不如 HPLC-MS,但在快速鉴定已知化合物和判断未知化合物的结构类型方面具有很强的优势。特别当 HPLC-MS 提供的信息不完全或某一样品组分不确定时,HPLC- NMR 可提供有用的信息^[12]。

此外,应用基因组分析方法分析微生物的功能基因可预测微生物生物合成的过程,可从许多已知微生物中发现新化合物。McAlpine 等通过基因组扫描(genome scanning),确定包括双环菌素基因簇在内共有 12 个天然产物基因簇,挑选出一个包括 35 个开放读写框的基因簇进行全面分析,推断出该基因簇对应代谢物 ECO-02301 结构可能为直链聚烯多肽,通过查询化合物库确定该代谢产物为一种新化合物。最后通过菌种发酵,从菌丝体和菌液中分离得到化合物 ECO-02301,经质谱、核磁共振检测,碳、氢位移与应用基因组分析方法推断得到的化合物的数据基本一致。实验结果表明应用基因组分析方法可从许多产生已知化合物的微生物中发现新化合物。此外该技术与质谱、核磁共振谱相结合可快速鉴定许多复杂化合物结构^[15]。

6、本课题的研究目的及研究方法:

慢性髓细胞性白血病(Chronic myeloid leukemia, CML)是血液系统最常见的恶性疾病之一,在国内年发病率约为 0.36/10 万,占白血病的第三位。CML 的分子生物学特征是存在 bcr/abl 融合基因,该基因通过转录翻译产生分子量为 210KDa 的融合蛋白 $P_{210}^{bcr/abl}$,该融合蛋白具有异常增高的酪氨酸激酶活性,使造血干细胞发生异常转化而导致 CML 发生。K562 细胞系(慢性髓系白血病细胞)来源于急变期 CML 病人, $P_{210}^{bcr/abl}$ 呈阳性,是研究 CML 经典的细胞模型。随着 CML 细胞对目前临床使用药物耐药性的产生,寻找新作用机制的有效药物变得日益重要。

我国地域辽阔,具有庞大和复杂的微生物资源,我国的西藏、江西、甘肃、四川等地区的生物物种具有独特的地方性和未被破坏性。本课题选用我国边远地区土壤放线菌种,以格列卫耐药 K562 细胞作为靶细胞,对土壤中分离得到的放线菌 1146 代谢物进行活性跟踪分离,筛选具有选择性抑制格列卫耐药 K562 细胞生

长的微生物代谢活性成分。本实验研究内容包括:

- 活性放线菌 1146 的筛选
- 放线菌 1146 培养基筛选
- 大规模发酵,菌液经乙酸乙酯提取,采用色谱技术对粗提物进行生物活性跟踪 分离
- 采用核磁共振、质谱等技术对活性化合物进行结构鉴定
- 对其它代谢物进行分离和结构鉴定

第一章放线菌株 1146 代谢产物的活性筛选

1、材料与方法

- 1.1 仪器与试剂
- 1.1.1 仪器:
- FD-1 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);
- GH 型隔水培养箱 (天津市泰斯特仪器有限公司);

Elx800 型酶标仪 (BIO-TEK):

ph211 酸度离子测定仪(北京哈纳科仪科技有限公司);

高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);

HZ 系列恒温振荡器培养箱 (中国太仓市实验设备厂);

CJT 型洁净工作台(北京昌平长城空气净化设备工程公司)

1.1.2 培养基:

可溶性淀粉 1%(北京化学试剂公司),葡萄糖 2%(北京化学试剂公司),牛肉浸膏 0.1%(北京奥博星生物技术公司),酵母提取物 0.4%(Merck 公司),NaCl 0.2%(北京化学试剂公司), K_2HPO_4 0.025%(北京化学试剂公司),CaCO₃ 0.2%(北京化学试剂公司):PH=7.2

1.1.3 试剂:

无水乙醇;二甲基亚砜(DMSO,为 Sigma 公司产品);长春新碱(上海华联制药公司);噻唑蓝(MTT,华美公司)

1.2 供试土壤放线菌

从云南等地区收集土壤,按文献方法进行分离克隆单株放线菌,菌株编号后冻存 于本实验室。

1.3 供筛选样品的制备

从斜面琼脂培养基中取少量菌落。放入 5ml 装有培养基的试管中,室温下于培养箱培养 3~4d 后,向试管中加入 5ml 无水乙醇。放置过夜,离心收集上清夜,冻存于-20℃。各取一定体积的上述乙醇溶液,预置 96 孔板后,置于减压干燥器中减压

真空抽去乙醇后,冷冻干燥后除去水液供筛选(图 1-1)。

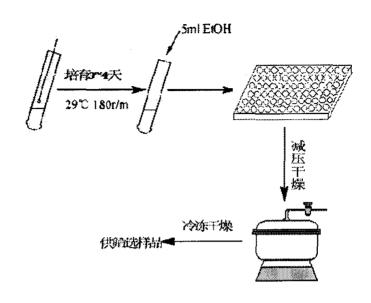


图 1-1 筛选样品的制备流程

1.4 细胞培养及 MTT 法 (四甲基偶氮唑盐比色法):

不同浓度提取物加入格列卫耐药 K562 细胞和 Vero 细胞系中用含 10%小牛血清 PRMI-1640 培养液,37℃,5%CO₂培养箱中培育 72 小时后,加入 20 μ lMTT 溶液,继续孵育 4 小时,吸去细胞悬液,加入 120 μ lDMSO 溶解沉淀物,酶联免疫检测 仪在 490nm 波长处测定其光吸收值。每一样品浓度为三孔,阳性对照为长春新碱(n=3)。

2、结果与讨论:

我国云南地区的生物物种具有独特的地方性和未被破坏性,所以我们选取该地区土壤放线菌进行筛选。放线菌样品经过采集、分离、培养,使用 MTT 方法进行测定代谢产物抑制格列卫耐药 K562 细胞活性。MTT 法是一种检测细胞存活和生长的方法。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的四唑盐还原为难溶性的蓝紫色结晶物,并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的四唑盐紫色结晶物,用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值,

可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,四唑盐结晶物形成的量与细胞数 成正比,用此方法可测定细胞的存活率。

2.1 筛选结果表明放线菌 1146 提取物对格列卫耐药 K562 细胞具有较好抑制作用,对正常细胞的抑制作用较小。所以选择该放线菌种为本实验研究对象,放线菌 1146 提取物对格列卫耐药 K562 细胞抑制活性见图 2-1,对格列卫耐药 K562 细胞半数抑制剂量(IC₅₀)为 20.36 µ g/ml。

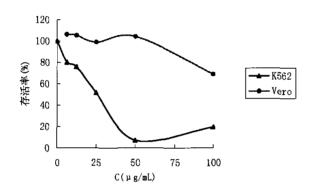


图 2-1 放线菌 1146 提取物对格列卫耐药 K562 细胞抑制活性

2.2 取菌液于载玻片上,加热后固定美蓝染色,显微镜下观察。放线菌 1146 形态 见图 2-2,该图所示为放线菌 1146 的菌丝体。

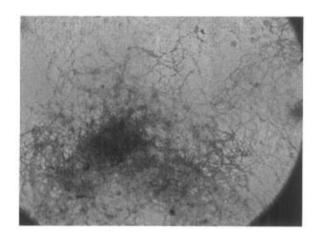


图 2-2 放线菌 1146 形态 (美蓝染色)

第二章放线菌 1146 培养基的筛选和大规模发酵

微生物产生次级代谢产物的化学成分和产率受培养基成分和生长条件的影响。 在相同培养条件下,同一菌种采用不同碳源、氮源的培养基将产生不同的代谢产 物。通过调节微生物生长条件来提高微生物代谢产物的质量和数量是人们在实验 和生产中经常使用的策略。

本文根据文献报道选出九种培养基,在相同条件下(温度、转速、接种量)分别对放线菌 1146 进行摇瓶培养。依据菌种干种、粗提物产率等各项指标进行对比,从中挑选出最佳培养基进行大规模发酵。

1、材料与方法:

- 1.1 仪器与试剂
- 1.1.1 仪器:

HZ系列恒温振荡器培养箱

中国太仓市实验设备厂

CJT 型洁净工作台

北京昌平长城空气净化设备工程公司

pH211 酸度离子测定仪

北京哈纳科仪器科技有限公司

高速台式离心机

上海安亭科学仪器厂

旋转蒸发器 RE-52A

上海亚荣生化仪器厂

1.1.2 试剂:

可溶性淀粉(北京化学试剂公司),蛋白胨(北京奥博星生物技术公司),牛肉膏(北京奥博星生物技术公司),葡萄糖(北京化学试剂公司),NaCl(北京化学试剂公司),牛肉膏(北京奥博星生物技术公司),酵母粉(Merck. Co),碳酸钙(北京化学试剂公司);大豆粉,FeSO4.7H2O(国药集团化学试剂有限公司),K2HPO4(北京化学试剂公司),KCl(北京化学试剂公司),甲硫氨酸(国药集团化学试剂 有限公司),KH2PO4(北京化学试剂公司),玉米浆,KNO3(北京化学试剂公司),MgSO4(北京化学试剂公司),水解干酪素(北京奥博星生物技术公司),糊精(北京化学试剂公司),鱼粉(北京奥博星生物技术公司),糊精(北京化学试剂公司),鱼粉(北京奥博星生物技术公司),CaCO3(北京化学试剂公司),KBr(北京化学试剂公司)

1.2 放线菌 1146 培养基的筛选

1.2.1 放线菌 1146 的发酵

将-70°C 保存的放线菌 1146 菌种复苏,无菌条件下接种于 200ml/500ml 三角瓶中,转速 120 转/分钟、温度为 28°C 条件下摇床培养 3 天。配制以下九种培养基各 600ml (见表 1-1),分装成三瓶,每瓶 200ml,高温消毒。

表 1-1 九种不同培养基成分

<u></u>	2、1-1 プロサイト内の47 <u>本がの</u>
1	蛋白胨1%, 牛肉膏0.3%, 葡萄糖2%, NaCl 0.5%, , PH=7.5
2	淀粉 2.4%, 葡萄糖 0.1%, 蛋白胨 0.3%, 牛肉膏 0.3%, 酵母粉 0.5%,
	CaCO ₃ 0.4%, PH=7.0
3	可溶性淀粉 4.0%, 黄豆粉 2.0%, FeSO ₄ •7H ₂ O 0.05%, K ₂ HPO ₄ 0.05%,
3	KCl 0.03%, PH=6.5
4	葡萄糖 2%, 黄豆粉 2%, 甲硫氨酸 0.1%, KH ₂ PO ₄ 0.1%, CaCO ₃ 1%,
4	PH=6.5
	葡萄糖 7%,黄豆粉 1.2%,玉米浆 1.2%,NaCl 0.3%,CaCO ₃ 0.1% ,
5	K ₂ HPO ₄ 0.03%, Fe ₂ (SO ₄) ₃ 0.01%, PH=7.5
	葡萄糖 0.4%, KNO30.1%, 无水 K2HPO40.05%, MgSO4 •7H2O 0.05%,
6	NaCl 0.05%, FeSO ₄ •7H ₂ O 0.001%,可溶性淀粉 0.4%
7	葡萄糖 1%, 酪蛋白胨 0.2%, 牛肉膏 0.1%, 玉米浆 0.3%, PH=7.0
	葡萄糖 1%, 糊精 2.5%, 鱼粉蛋白胨 3.5%, CaCO30.2%, KBr0.5%,
8	PH=7.0
9	可溶性淀粉 1% ,葡萄糖 2%, 牛肉膏 0.1%, 酵母提取物 0.4%,
	NaCl 0.2%, K ₂ HPO ₄ 0.025%, CaCO ₃ 0.2%, PH=7.2
	• • • • • • • • • • • • • • • • • • •

将菌液转接于 27 个三角瓶,每瓶培养基接种约 10ml 菌液。转速为 120 转/分钟,温度为 28⁰C 条件下摇床培养,分别在发酵第 1、2、3、4、5 天取样,分析并记录细菌生长曲线。

1.2.2 放线菌 1146 发酵液的提取

取九种培养基发酵液共 250ml, 按比例为 1: 1 加入丙酮静置沉淀一天, 抽滤得菌清液, 菌液浓缩将丙酮蒸出再用 1: 1 体积的乙酸乙酯提取 3 次, 提取液用无水硫

酸钠干燥,浓缩蒸干,得乙酸乙酯提取物。

- 1.3 放线菌 1146 大规模发酵及菌液提取
- 1.3.1 放线菌 1146 大规模发酵

菌种来源: 放线菌 1146 菌

培养基:葡萄糖 2%,黄豆粉 2%,甲硫氨酸 0.1%,KH2PO40.1%,CaCO31%;摇瓶(250m1/瓶)发酵,累计至 50L

温度: 29°C, 转速: 130 转/分钟, 发酵时间: 5 天

1.3.2 发酵液的提取

放线菌 1146 发酵液共 50L 按比例为 1: 1 加入丙酮静置沉淀一天,抽滤得菌清液,菌液浓缩将丙酮蒸出再用 1: 1 体积的乙酸乙酯提取 3 次,提取液用无水硫酸钠干燥,浓缩蒸干,得乙酸乙酯提取物 (共计 5 克)。

2、结果与讨论:

- 2.1 放线菌 1146 培养基的筛选
- 2.1.1 干重法测定菌种的动态生长情况(见图 2-1)。由该图可看出细菌生长干重变化和生长时间的快慢。其中使用 4 号培养基菌体干重值最大,第三天到达细菌生长平台期,细菌生长较快。

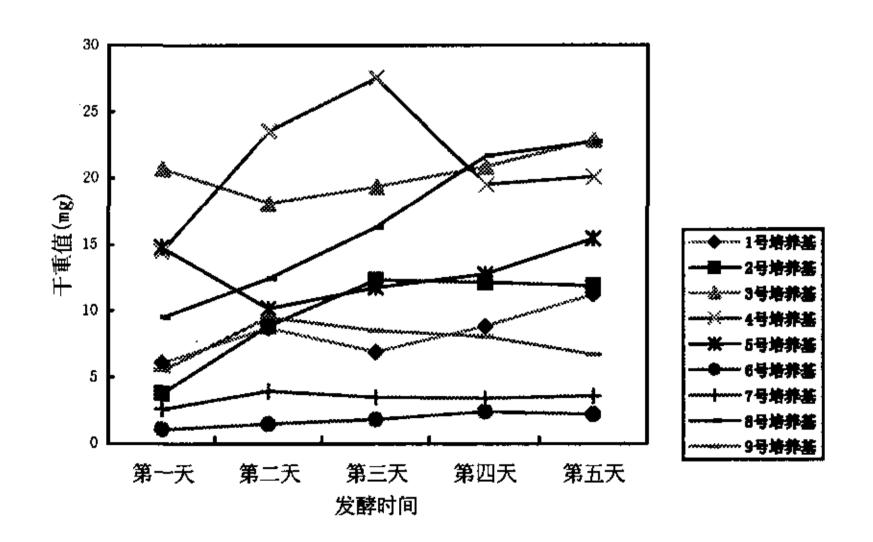


图 2-1 为各培养基的菌种的干重变化趋势图。

2.1.2 九种不同培养基提取物的产量比较见表 2-1

4X 4 1 70/11/11/19/	口小本水小川
培养基	提取物数量(毫克/250ml)
一号培养基	73.3
二号培养基	55.6
三号培养基	43.1
四号培养基	70.9
五号培养基	32.1
六号培养基	42.0
七号培养基	30.7
八号培养基	29.4
九号培养基	20.4

表 2-1 九种不同培养基提取物的产量对比

采用九种不同的培养基在相同温度和转速对放线菌 1146 进行培养,分别进行菌种干重、提取物产率等指标的对比。由于采用四号培养基细菌生长最好,提取物产率最高,所以选出第四号培养基作为大规模发酵培养。

2.2 放线菌 1146 大规模发酵及菌液提取

放线菌 1146 采用摇瓶培养发酵总共 50L,每天取样记录细菌干重值(图 2-2)。发酵液经过滤、乙酸乙酯提取后,浓缩蒸干,得到约 5 克提取物。用 MTT 法测定提取物,制格列卫耐药 K562 细胞生长活性(如图 2-3),由该图可见放线菌 1146 粗提物具有较好的抑制活性。

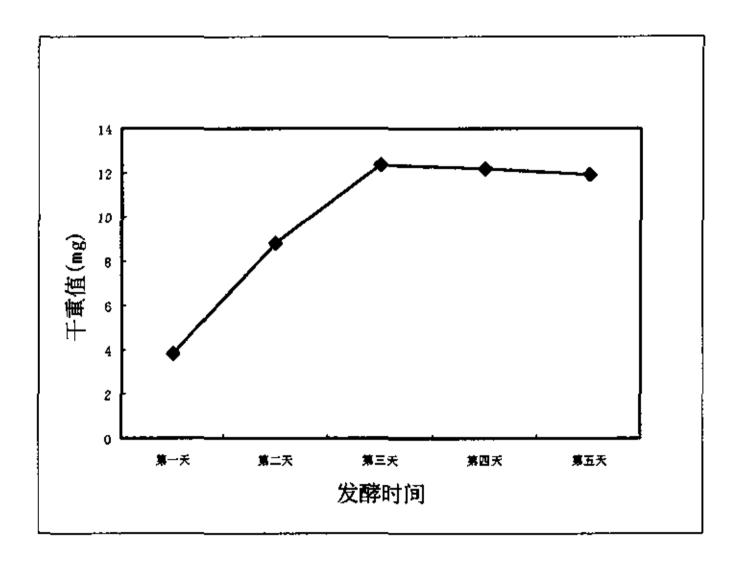


图 2-2 放线菌 1146 生长曲线图

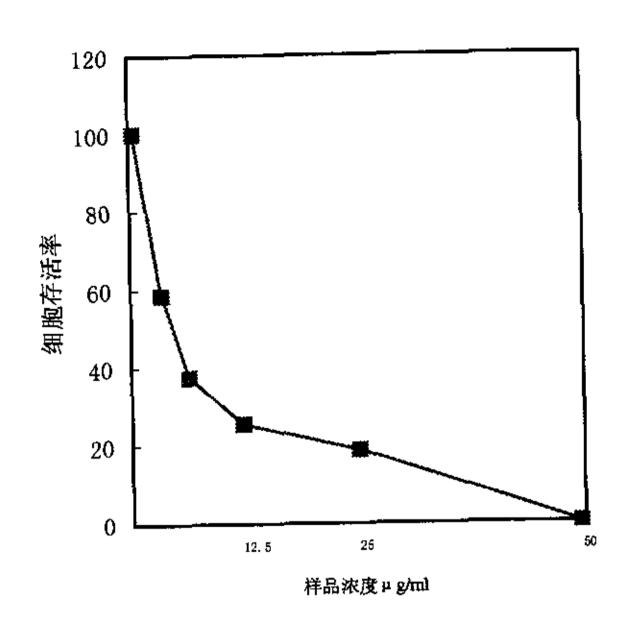


图 2-3 放线菌 1146 提取物对格列卫耐药 K562 细胞的抑制活性

第三章 活性代谢产物的跟踪分离

放线菌 1146 大规模发酵,菌液经丙酮沉淀、过滤、再经乙酸乙酯提取,粗提物采用色谱技术进行生物活性跟踪分离,并对其活性进行测定。

1、材料与方法:

1.1 仪器与材料:

旋转蒸发器 RE-52A

上海亚荣生化仪器厂

ZF-1 型三用紫外分析仪

江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司

高效液相色谱仪

大连依利特有限公司

检测用薄层层析硅胶和分离用柱层析硅胶(100-200 目)均为中国青岛海洋化工集团公司生产,反相薄层层析为 Merck 公司产品,反相 RP-18 填料为 Aldrich 公司生产。液相色谱甲醇为 Fisher Scientific 公司产品

显色剂: 0.5ml Anisadehyde、10ml 冰醋酸、85ml 甲醇和 5ml 浓硫酸溶液,加热显色。

1.2 活性成分跟踪分离

放线菌 1146 发酵提取物用少量氯仿和甲醇溶解,少量硅胶拌样,粗硅胶(300 克,100-200 目)柱层析,以氯仿-甲醇(20:1~1:1)梯度洗脱,TLC 检测,合并相同馏分,得到7个部分,用 MTT 法测定馏分抑制格列卫耐药 K562 细胞的活性。

1.2.1 馏分 GN-II-26B 经 RP-18 反相柱层析 (60cmX2cm), 甲醇-水 (4: 1)洗脱, RP-18 高效液相制备 Kromasil™ C18 制备柱 (250×20mm, 5μm), 以甲醇-水 (4: 1)为流动相,检测波长为 UV254nm,得到化合物 GN-II-29A。

1.2.2 馏分 GN-II-26D 经 RP-18 反相柱层析(40cmX2cm), 甲醇-水(5: 4)洗脱, 得到馏分 GN-II-29C, 经 RP-18 高效液相制备 Kromasil™ C18 制备柱(250×20mm, 5μm), 以甲醇-水(1: 1)为流动相,检测波长为 254nm,得到 GN-II-31A。

1.2.3 馏分 GN-II-26F 经 RP-18 高效液相制备(Kromasil™ C18 制备柱 250×20mm, 5μm),以甲醇-水为流动相(1.5: 1),检测波长为 254nm,得到 GN-II-33A。

1.2.4 馏分 GN-II-26C 经 RP-18 反相柱层析 (30cmX1cm), 甲醇-水为流动相以甲醇-水洗脱 (5: 4), 再经 RP-18 高效液相制备 (Kromasil™ C18 制备柱 250×20mm, 5μm), 以甲醇-水 (5: 4) 为流动相,检测波长为 254nm, 得到 GN-II-34A。

2、结果与讨论

2.1 放线菌 1146 代谢产物的提取分离流程见图 2-1:

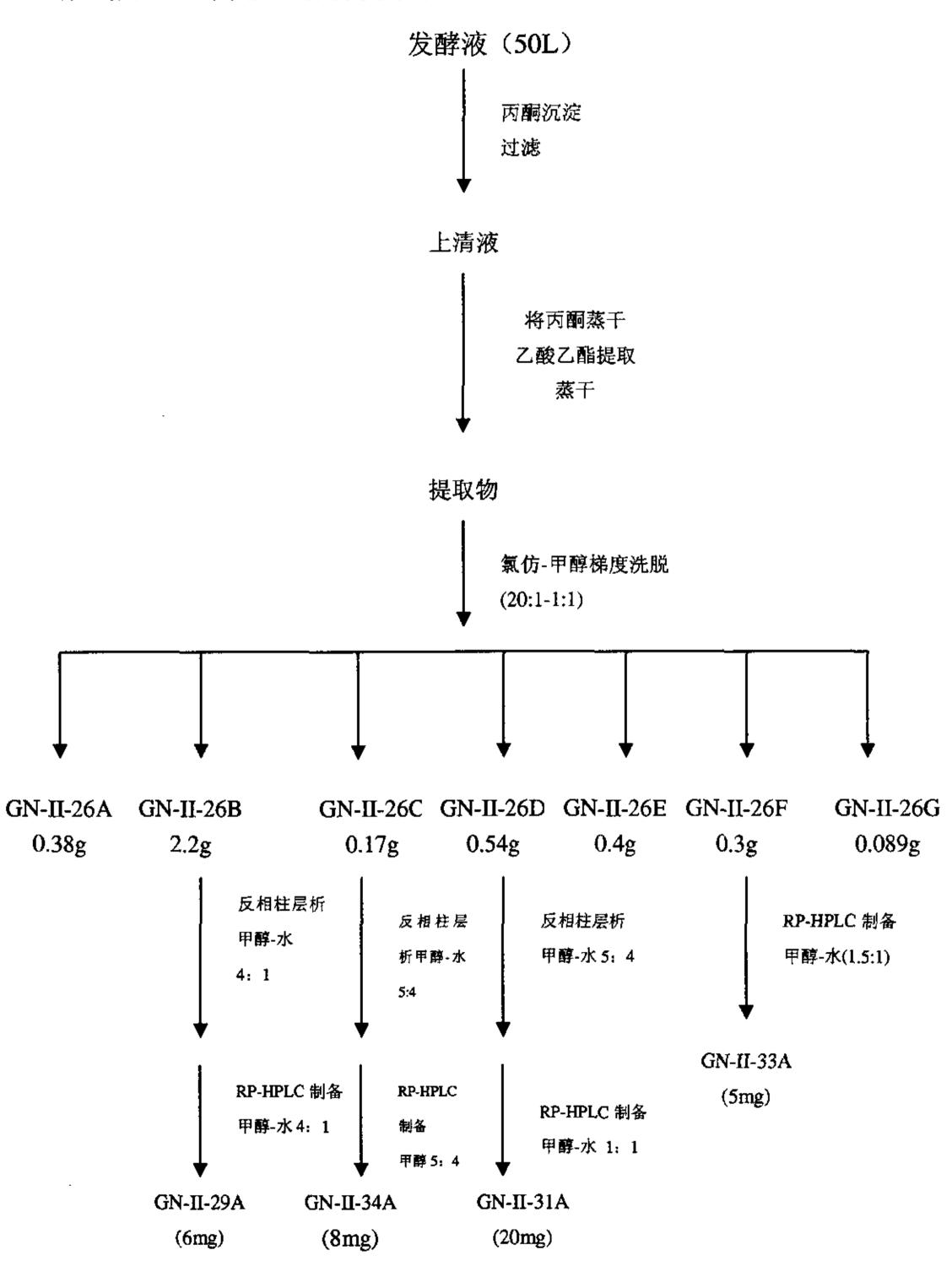


图 2-1 放线菌 1146 提取物分离流程图

2.2 分离出的代谢产物

2.2.1 馏分 GN-II-26B 经用 MTT 法测定显示有较好活性(图 2-2),该馏分经反相柱层析、高效液相制备得到活性化合物 GN-II-29A(6mg),液相分析见图 2-3,抑制格列卫耐药 K562 细胞的活性见图 2-4,对格列卫耐药 K562 细胞半数抑制剂量为 (IC_{50}) 3.31ng/ml。

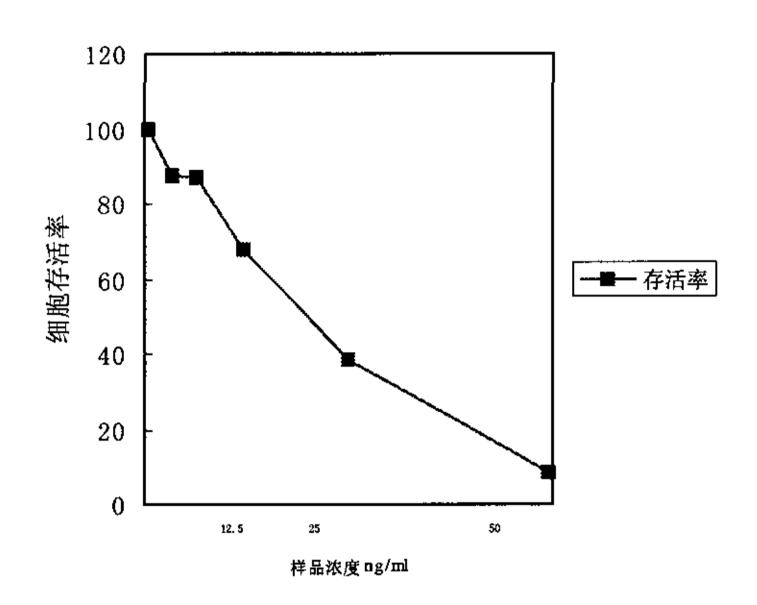


图 2-2 馏分 GN-II-26B 对格列卫耐药 K562 细胞的抑制活性

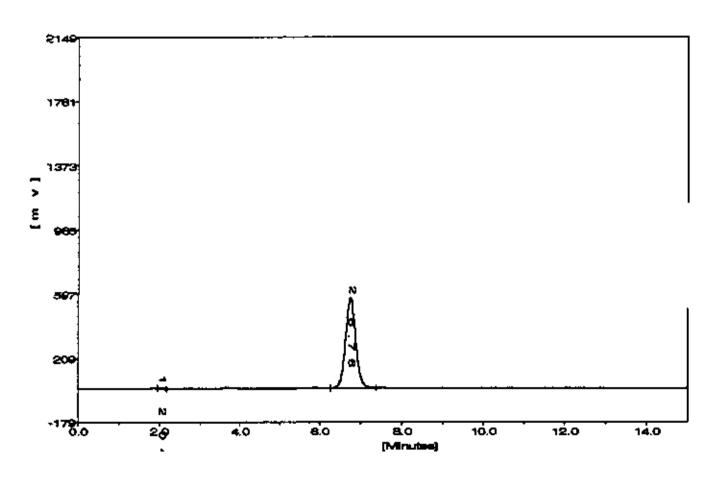


图 2-3 GN-II-29A 液相分析图

Kromasil™ C18 分析柱 (150×4.6mm, 5µm), 流动相: 甲醇-水 (80: 20), 检测波长: UV254nm

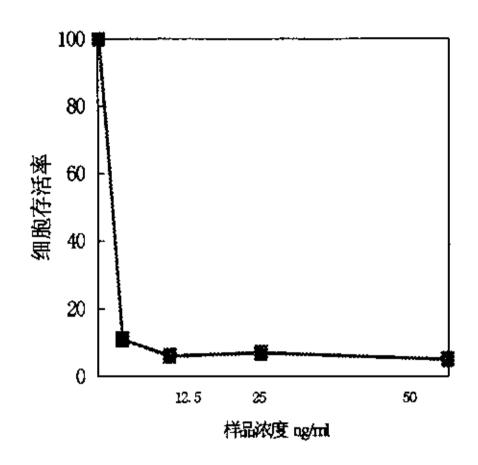


图 2-4 化合物 GN-II-29A 抑制格列卫耐药 K562 细胞的活性

2.2.2 馏分 GN-II-26D 经反相柱层析、高效液相制备得到 GN-II-31A(20mg),液相分析见图 2-5。

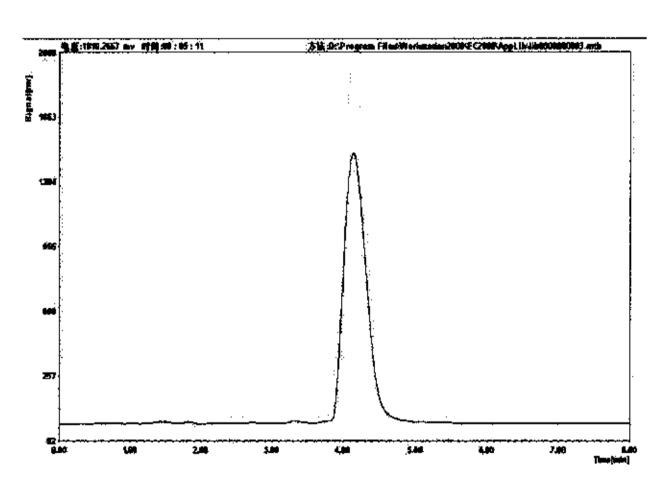


图 2-5 GN-II-31A 液相分析图

Kromasil™ C18 分析柱 (150×4.6mm, 5μm), 流动相: 甲醇-水 (1: 1), 检测波长: UV254nm 2.2.3 馏分 GN-II-26F 经高效液相制备得到 GN-II-33A (5mg), 液相分析见图 2-6。

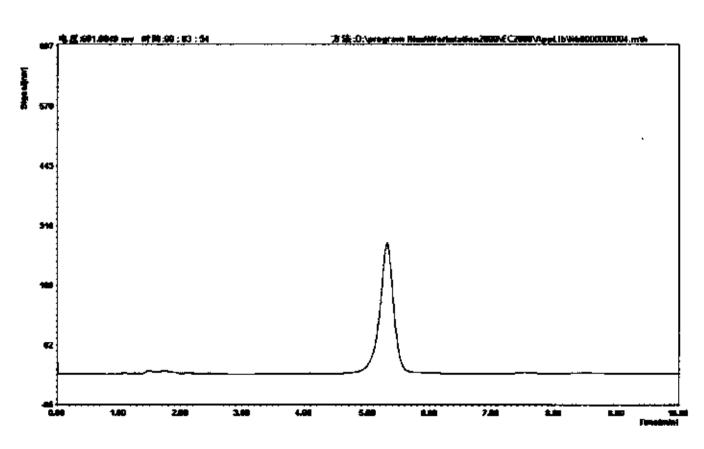


图 2-6 GN-II-33A 液相分析图

Kromasil™ C18 分析柱 (150×4.6mm, 5μm), 流动相: 甲醇-水 (1.5: 1), 检测波长: UV254nm 2.2.4 馏分 GN-II-26C 经反相柱层析, 高效液相制备得到 GN-II-34A (8mg), 液相 分析见图 2-7。

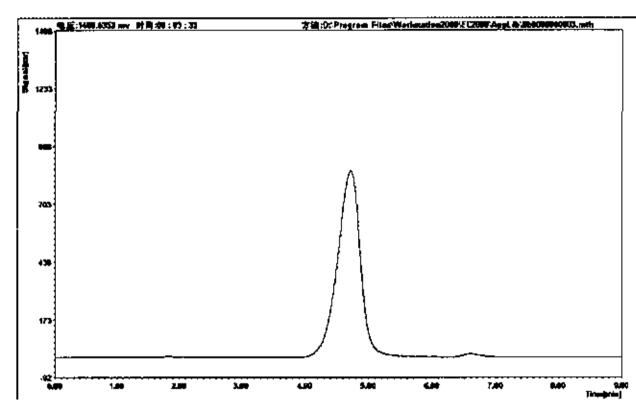


图 2-7 GN-II-34A 液相分析图

Kromasil™ C18 分析柱 (150×4.6mm, 5µm), 流动相: 甲醇-水 (5: 4), 检测波长: UV254nm

第四章 化合物结构鉴定

1、仪器

Varian Inova 600Hz 型超导核磁共振谱仪 (仪器分析中心, TMS 为内标), Micromass ZabSpec 型高分辨磁质谱仪测定 (仪器分析中心)

RY-1 型电热熔点测定仪(未校正)(天津市分析仪器厂)

美国 BIO-RAD-65A 红外波谱仪 (仪器分析中心)

2、化合物结构鉴定

2.1 活性化合物的结构鉴定

化合物 GN-II-29A 为红色结晶,mp: 244~246℃,MALDI-TOP-MS m/z: [M+1][†] 为 1255, IR(KBr) γ max cm⁻¹: 3433,3367,3266,3033,2875,1747,1666,1649,1628,1579,1509,1481,1192。

红外光谱在 1747, 1666, 1649, 1628 cm⁻¹处有强吸收显示有酰胺羰基, 3433、3367、3266 cm⁻¹处中等吸收显示有胺基氢存在,所以推测该化合物有酰胺结构。该化合物分子量为 1254,碳谱显示该化合物共有 62 个碳,其中 10 个碳原子化学位移分别为 168.43,168.92,173.32,173.06,166.48,166.53,166.30,166.01,173.32,173.30,显示为酰胺羰基碳位移,氢谱及 HMBC 谱显示存在 4 个活泼氢,化学位移分别在 7.2,7.8,8.1,7.9,根据以上的过程可推断该化合物可能含有为肽类结构^[16]。结合氢谱和 HMBC 谱可知肽类部分无末端羧酸氢和氨氢存在,所以肽类部分的结构可能为环肽。由氢谱和碳谱低场位移数据可知,该化合物存在共轭双键体系。推测该化合物结构分为两部分:一为肽类结构,另一部分为共轭双键体系,肽类结构可能与共轭双键体系相连。由碳谱氢谱可看到该化合物肽类部分的化学位移有两组数据接近,推测可能为两个对称的肽结构,连接在不对称的基团上,化学位移接近但不完全一致。根据 HMBC 关系确定各碳、氢原子的连接位置,结合化合物分子量与已知化合物文献报道对照^{[17][18]},确定该化合物为放线菌素 D,其分子式为 C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆,含有两个多肽酯环,由 L-苏氨酸,D-缬氨酸,L-脯氨酸,N-甲基甘氨酸,L-N-甲基缬氨酸组成,通过羧基与发色母核吩噁嗪酮相连接,

化合物结构如图 2-1。根据 1 H NMR、 13 C NMR, DEPT,HMQC,HMBC 提供数据对该化合物进行归属见表 2-1,表 2-2。

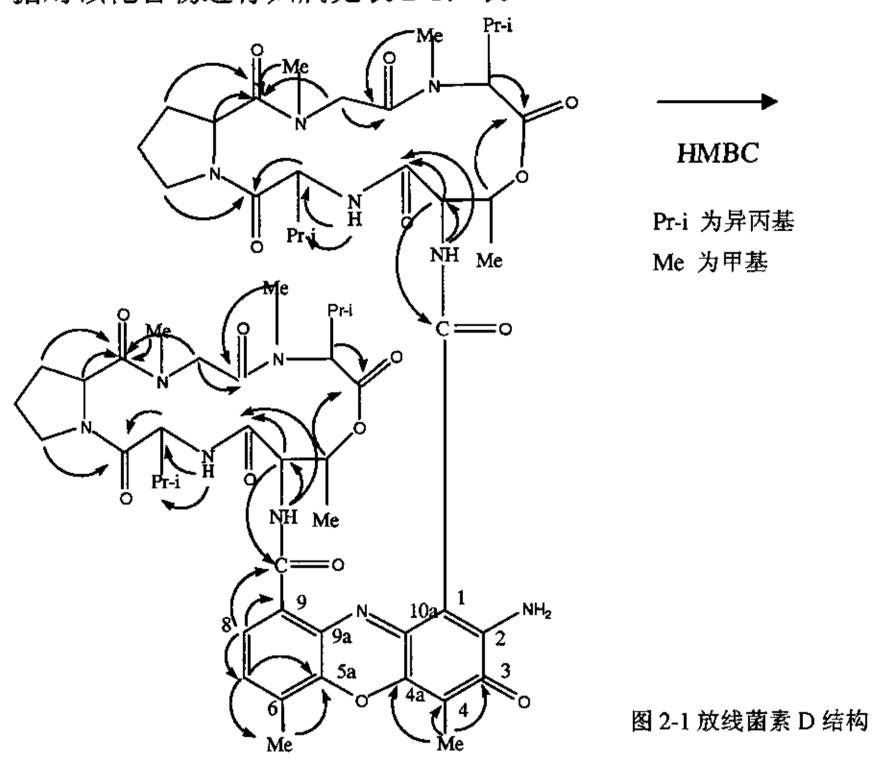


表 2-1 化合物 GN-II-29A 的环肽部分 ¹H 、 ¹³C-NMR 数据(CDCl₃)

氨基酸	编号	α		β	
序列	新	δ (H) (J in Hz)	δ (C)	δ (H) (J in Hz)	
L-Thr	1		168.43(s)		168.92(s)
	2	4.49 dd(J=6.6,3.0)	54.92(d)	4.6 dd (<i>J</i> =6.0,2.4)	55.30(d)
	3	5.1 m	75.07(d)	5.2 (m)	75.01(d)
	4	1.26 d(<i>J</i> =6.0)	17.44(q)	1.27(<i>J</i> =6.0)	17.86(q)
	NH	7.2 s		7.82	
D-Val	1		173.78(s)		173.34(s)
	2	3.56 dd(<i>J</i> =6.0,8.4)	58.94(d)	3.56dd(<i>J</i> =6.0,8.4)	58.91(d)
	3	2.61(m)	31.56(d)	2.16(m)	31.85(d)
	3-Me	0.89 d(<i>J</i> =6.6)	19.08(q)	0.91 d(<i>J</i> =7.2)	19.26(q)
		1.12(<i>J</i> =6.6)	21.71(q)	1.12 d(<i>J</i> =6.6)	19.14(q)
	NH	8.10 d((<i>J</i> =5.4)		7.95 d(<i>J</i> =60)	
L-Pro	1		173.32(s)		173.30(s)

	2	6.04 d(<i>J</i> =9.0)	56.18(d)	5.99 d(<i>J</i> =9.0)	56.33(d)
	3	1.82 m	30.98(t)	2.95 m	31.30(t)
		2.68 m		1.87 m	
	4	2.31 m	22.89(t)	2.3 m	23.05(t)
		2.1 m		2.1 m	
	5	3.85 m	47.34(t)	3.995 m	47.61(t)
		3.75 m		3.754 m	
Sar	1		166.48(s)		166.53(s)
	2	3.65 d(<i>J</i> =17.4))	51.38(t)	3.65 d(<i>J</i> =17.4))	51.42(t)
		4.73 d(<i>J</i> =13.2))		4.79 d(<i>J</i> =13.2))	
	N-Me	2.89 s	34.91(q)	2.89 s	34.85(q)
L-Meval	1		167.50(s)		167.66(s)
	2	2.67 d(<i>J</i> =7.8)	71.48(d)	2.67 d(<i>J</i> =7.8	71.32(d)
	3	2.68 m	26.86(d)	2.68 m	26.86(d)
	3-Ме	0.75 d(J=6.6)	21.61(q)	0.75 d d(<i>J</i> =6.6)	21.71(q)
		0.97 d(<i>J</i> =6.0)	19.14(q)	0.97 d(J=6.0)	19.31(q)
	N-Me	2.95 s	39.22(q)	2.93 s	39.34(q)

表 2-2 化合物 GN-II-29A 的发色基团 ¹H 、¹³C-NMR 数据(CDCl₃)

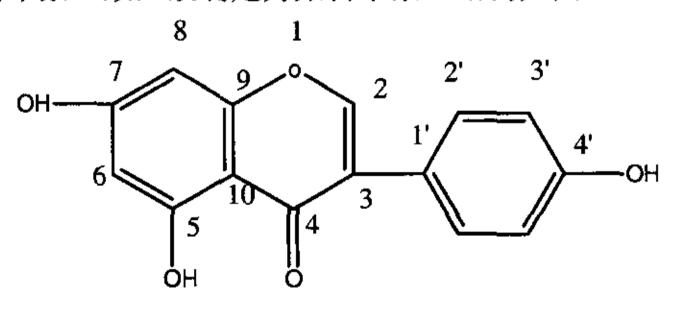
位置	δ (H) (<i>J</i> in Hz)	δ (C)
C -1		101.72(s)
C-2		147.68 (s)
C-4		113.50 (s)
C-4a		145.13 (s)
C-5a		140.40(s)
C-6		127.55 (s)
C -7	7.3 d (<i>J</i> =7.8)	130.25 (d)
C-8	7.6 d (<i>J</i> =7.8)	125.90 (d)
C-9		129.12 (s)
C-9a		132.60 (s)
C-10a		145.90 (s)
4-Me	2.254 (s)	7.80 (q)
6-Me	2.57 (s)	15.06 (q)

1-CO		166.30 (s)
3-CO		179.10(s)
9-CO		166.01 (s)
$2-NH_2$	7.54(s), 7.70(s)	

2.2 其它化合物的结构鉴定

2.2.1 化合物 GN-II-31A 的结构鉴定

化合物 GN-II-31A 为白色粉末, mp: 297~298℃, FAB-MS m/z: [M+H]⁺为 271, IR (KBr) Y max cm⁻¹: 3410, 3347, 3188, 3068, 1655, 1620, 1573, 1517, 1251, 1178。由氢谱可知该化合物无甲基及次甲基,结合碳谱、DEPT 谱和 HMBC 可知该化合物结构中有一个对位取代的苯环结构,碳谱在 181.464 的单峰显示为羰基,氢谱在 7.319 (J=8.4) 和 6.779 (J=9) 为邻位耦合为苯环上的邻位氢,6.281 (J=1.8) 和 6.155 (J=1.8) 为间位耦合,碳谱 165.583 (S, 7-),163.464 (S, 9-),159.048 (S, 4'-),158.415 (S, 5-),154.096 (d, 2-) 显示与-OH 或-O-直接相连且 154.096 (d, 2-) 为-CH-O-片段。氢谱 8.013 (1H, s,) 处的氢为单峰,与氧相连,由此可推断该化合物可能为异黄酮结构,与文献报道对照^[19],其 ¹H NMR、¹³C NMR数据与染料木素一致,故确定为染料木素,结构如图 2-2:



图(2-2)染料木素结构

表 2-3 化合物 GN-II-31A 的 ¹H NMR、 ¹³C NMR 数据 (CD₃COCD₃):

编号	δ (C)	δ (H) (J in Hz)
2	154.096 (d)	8.013 (1H, s,)
3	122.912 (S)	
4	175.806 (S)	
5	158.415 (S)	

1.8)
=1.8
8.4)
= 9)

2.2.2 化合物 GN-II-33A 的结构鉴定

化合物 GN-II-33A 为白色粉末,mp: 315~316℃,FAB-MS m/z: [M+H][†]为 255,IR(KBr) γ max cm⁻¹: 3225,2955,2848,2694,1629,1595,1516,1460,1239。与化合物 GN-II-31A 的 ¹H-NMR、¹³C-NMR、MS 数据比较,确定为 5 位无-OH 取代的异黄酮对照。与文献报道对照^[19],其 ¹H-NMR、¹³C-NMR 数据与大豆黄酮一致,故确定为大豆黄酮,结构如图 2-3:

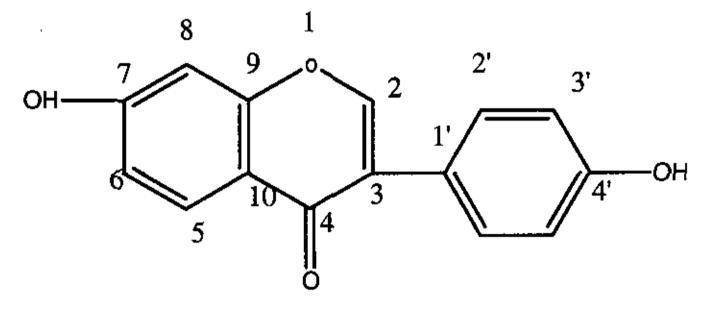


图 2-3 大豆黄酮结构

表 2-4 化合物 GN-II-33A 的 ¹³C NMR、 ¹H NMR(C₆H₅N)数据:

编号	δ (C)	δ (H) (J in Hz)
2	152.478(d)	8.137 (1H , s)
3	123.828(s)	
4	175.806(s)	
5	128.270(d)	8.452 (1H, d, J=9,)
6	115.905(d)	7.215 (1H, dd, J=8.4, J'=1.8)
7	164.162(s)	

8	103.146(d)	7.102 (1H, d, J'=1.8)
9	159.062(s)	
10	118.002(s)	
1'	125.049(s)	
2', 6'	131.063(d)	7.800 (2H, d, J=8.4)
3', 5'	116.228(d)	7.273 (2H, d, J=8.4)
4'	158.601(s)	

2.2.3 化合物 GN-II-34A 的结构鉴定

化合物 GN-II-34A 为白色粉末,mp: 159~161⁰C,FAB-MS m/z: [M+H]⁺为 136,IR(KBr) y max cm⁻¹: 3356, 3171, 3062, 1635, 1413, 1283, 700, 由碳谱和 氢谱数据可知该化合物中有一个单取代苯环,碳谱在 176.971 为羰基,有一个-CH₂-片断,根据分子量可知该结构有一 NH₂ 片段,根据羰基位移可知有酰胺结构。因此结构确定为苯乙酰胺,结构如图 2-4:

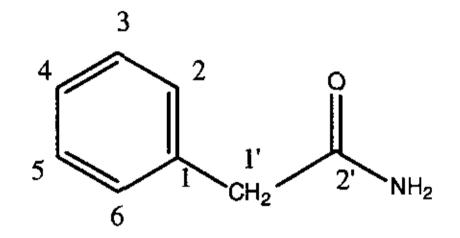


图 2-4 苯乙酰胺结构

¹H NMR (CD₃OD) δ ppm:

7.310 (5H, m), 3.295 (2H, S)

 13 C NMR (CD₃OD) δ ppm:

176.971 (S, 2'), 136.933 (S, 1-), 130.147 (d, 2,6-), 129.566 (d, 4-), 127.901 (d, 3,5), 43.424 (t, 1')

3、讨论:

对 1146 菌种进行培养大规模发酵、经乙酸乙酯提取、柱层析、高效液相分离,从放线菌 1146 代谢产物中分离出 GN-II-29A, GN-II-31A、GN-II-33A、GN-II-34A 等化合物,其中 GN-II-29A 具有很强的抑制 K562 细胞生物活性,经结构鉴定为放

线菌素 D, 又称为更生霉素,更新霉素,新福霉素。具有抗肿瘤作用,现己广泛用于临床,主要用于恶性淋巴瘤、肾母细胞瘤、绒毛膜上皮癌及恶性葡萄胎等。

3.1 放线菌素 D 的结构特点:

线菌素 D 含有两个多肽酯环,由 L-苏氨酸, D-缬氨酸, L-脯氨酸, N-甲基甘氨酸, L-N-甲基缬氨酸组成, 通过羧基与发色母核吩噁嗪酮相连接。

3.2 放线菌素 D 作用机制:

通过其母核吩噁嗪酮嵌入 DAN 的碱基对之间,肽链侧嵌位于 DNA 双螺旋的小沟内, 抑制以 DAN 为模板的 RNA 多聚酶,从而抑制 mRNA 转录和 DNA 合成。

3.3 放线菌素 D 的临床用途

主要用于何杰金病和神经母细胞瘤,有较突出的疗效。毛膜上皮癌疗效较好,对睾丸绒毛膜上皮癌也有效,但较差。洪静娟报道以 5-氟尿嘧啶与放线菌素 D 联合用药治疗恶性滋养细胞肿瘤,其中侵蚀性葡萄胎治愈率为 97.2%,绒癌治愈率为 87.5%^[20]。与放射治疗合并应用治疗儿童肾母细胞瘤,可提高生存率。肾母细胞瘤 是儿童常见的肾脏肿瘤,现使用化疗方案为放线菌素 D 联合长春新碱或加阿霉素 和环磷酰胺。Marcus 报道以含有放线菌素 D 的化疗方案结合放疗治疗成人肾母细胞瘤,结果表明 I 期患者疗效较好^[21]。

本篇结论

本课题以格列卫耐药 K562 细胞(慢性髓系白血病细胞)作为靶细胞,对土壤放线菌 1146 代谢物进行活性跟踪分离,获得对格列卫耐药 K562 细胞具有抑制作用的活性成分。本实验研究得到结果如下:

- 1、本实验从云南等地区收集土壤进行分离、克隆单株放线菌,将得到的单菌株培养后,提取物经过 MTT 方法进行活性测定,最后选出放线菌 1146 为研究对象。
- 2、根据菌种干重、提取物产率对九种不同的培养基进行筛选。由于采用第四号培养基细菌生长最好,提取物产率最高,所以选出第四号培养基对放线菌 1146 大规模发酵。
- 3、发酵液经过乙酸乙酯提取、柱层析和高效液相(HPLC)分离,从放线菌 1146 代谢产物中分离得到生物活性的化合物,该化合物对格列卫耐药 K562 细胞具有较好的抑制作用。结合理化性质、核磁共振和质谱数据该化合物 鉴定为放线菌素 D,现已广泛用于临床治疗恶性淋巴瘤、肾母细胞瘤、绒毛膜上皮癌及恶性葡萄胎等。
- 4、从放线菌 1146 发酵提取物中分离得到的其它化合物经结构鉴定分别为染料木素、大豆素和苯乙酰胺等。

第 II 篇 荨麻药材质量研究

引言

1. 荨麻属(Urtica L)植物的研究概况

荨麻为被子植物门、荨麻科、荨麻属一年生或多年生草本植物,具蛰毛,是一常用的民族药和民间药。该属植物在我国药用的历史悠久,约 15 种荨麻属植物分布于西北、华北、东北及西北各地,资源丰富^[22]。荨麻作为一种草药在各地民间被广泛应用于治疗风湿病、扭伤疼痛、精神不安、荨麻疹、白癜风、皮肤瘙痒等症^[23]。国外对异株荨麻进行了大量的研究和应用,在国外被广泛的应用于治疗风湿病、尿石症、糖尿病、贫血、前列腺炎、前列腺增生等,为荨麻的进一步开发提供了依据。目前对麻叶荨麻的抗炎、镇痛及抑制前列腺增生等药理活性的研究中,发现其很多药理作用可归因于水溶性多糖成分。

1.1 抑制前列腺增生

自从 Ruckle 用异株荨麻(Urtica dioica)根泡的茶治疗尿梗阻起到一定的疗效后,异株荨麻的各种提取物在国外就被广泛的应用于治疗早期良性前列腺增生(BPH)。在一项双盲实验中,32 列 BPH 患者服用异株荨麻根的提取物 4-6 周后,尿流速增加 4%,尿潴留减少 40-53%^[24]。近些年,临床实验中用异株荨麻根-锯叶棕果实的提取物联合治疗 BPH,由 160mg 锯叶棕果实提取物和 120mg 异株荨麻根提取物制成的胶囊,其疗效与非那雄胺接近,均能明显的改善 BPH 症状,且不良反应较轻^{[25][26]}。在一项动物实验研究中,Lichius 等人将小鼠前列腺前侧植入胎泌尿生殖窦组织,诱导产生前列腺过度生长,其结果类似于人类的 BPH。用此动物模型来评价异株荨麻根的环己烷、乙酸乙酯、正丁醇、20%甲醇及水的提取物疗效,结果表明 20%甲醇提取物最有效,其主要成分有蛋白质、多糖、东莨菪苷原^[27]。在另一项动物实验研究中,Lichius 等人用同样的方法制备 BPH 小鼠模型,进一步评价了 20%甲醇提取物中的多糖、凝集素、左旋开环落叶松树脂酚的活性,多糖部分

能显著抑制前列腺叶的生长,而其它成分则无此抑制作用[28]。

1.2 抗炎、抗过敏、镇痛作用

荨麻叶浸膏成分含有比较丰富的黄酮、酚羧酸及其衍生物,其中主要成分是咖啡酰苹果酸,该成分与水杨酸及其他非甾体抗炎药的结构相似,所以荨麻叶浸膏与它们可能有类似的作用原理,同时咖啡酰苹果酸能抑制将花生四稀酸转化为前列腺素的环氧化酶。荨麻多糖的药理实验结果也表明它对角叉菜胶和二甲苯所致的炎症有明显的抑制作用,具有显著的抗炎、镇痛作用。

1.3 增强免疫功能、抗病毒

荨麻能预防疾病增强免疫能力。Akbay 等人报道了荨麻甲醇提取物中的黄酮苷在体外有增强免疫活性,文献报道荨麻多糖、凝集素也能增强免疫功能^[29]。Manganelli 报道荨麻具有抗逆转录病毒的作用,可用于人免疫缺陷病毒(HIV)的治疗^[30]。

1.4 降血糖、降血压

Bnouham 等人报道了异株荨麻水提物具有降血糖作用^[31]。Farzami 等人也报道的异株荨麻叶提取物在体内实验中能够显著增强糖尿病大鼠模型体内胰岛素的分泌,从而降低血糖^[32]。Tahri 报道荨麻具有利尿和降血压作用^[33]。

Legssyer 等人报道了荨麻水提物能激活大鼠 α 肾上腺受体使血管收缩,但它能通过非胆碱类和非肾上腺途径来产生很强的心博徐缓作用,弥补它对血管产生的作用,从而产生降压作用^[34]。Testai 等人报道荨麻根甲醇水提取物通过释放氮氧化物,打开钾通道,产生血管松弛作用,通过副面影响肌肉收缩力的作用而产生降压作用^[35]。

1.5 护肝、降血脂

Mehmet 报道荨麻可降低四氯化碳引起的小鼠脂过氧化酶和肝酶水平升高, 同时升高抗氧化酶水平和增强抗氧化活性^[36]。Daher 报道荨麻的水提取物和石油醚提取物可降低进食高脂食物引起的小鼠血脂总浓度和低密度脂蛋白(VDL)的升高,同时测定谷草转氨酶(GOP)和谷丙转氨酶(GPT)活性,未见肝损伤^[37]。

2. 本课题的研究目的及研究方法

荨麻在我国为民间草药,关于荨麻的质量控制尚无明确定性、定量指标。为了更好地开展对荨麻的开发研究和利用,制定规范的科学的中药质量标准,我们对荨麻药材的质量标准进行了的研究,比较了三种不同产地不同种的荨麻多糖含量的差别。我们选出贵州麻叶荨麻(*Urtica cannabina L.*)为研究对象,按药典规定方法对其进行各项目检测,研究荨麻多糖对角叉菜胶诱发大鼠足爪肿胀的抑制作用,为荨麻及其产品的质量控制奠定基础。

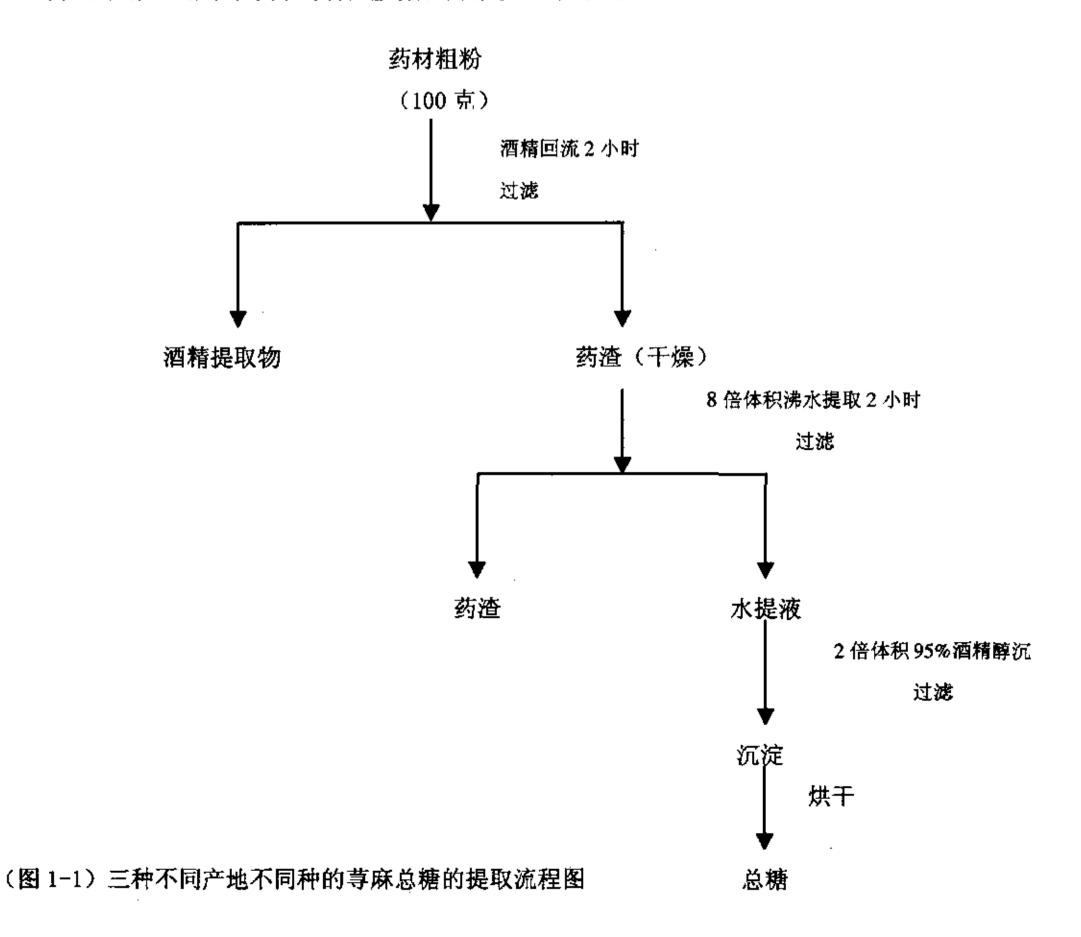
- 1) 对不同产地(贵州、湖南和内蒙)的荨麻根用水提醇沉法制得总糖提取物,并用苯酚-硫酸比色法对总糖含量进行测定,用3,5二硝基水杨酸比色法分析单糖含量(DNS),对不同产地荨麻根多糖含量对比。
- 2) 对多糖含量较高的贵州荨麻的按药典检查项目进行了测定(包括水分、水溶性 浸出物、总灰分及酸不溶性灰分、重金属)。
- 3) 研究荨麻多糖对角叉菜胶诱发大鼠足爪肿胀的抑制作用。

第一章 不同产地荨麻多糖含量测定

多糖作为一类重要的生物大分子,广泛存在于植物、动物和微生物组织中,具有多种重要生物活性,是所有生命有机体的重要组成部分,并与维持生命所需的多种生理功能有关。荨麻多糖不仅有抑制前列腺增生作用还具有抗炎、抗过敏、镇痛作用。因此,通过不同产地荨麻多糖和荨麻根与茎多糖含量的的分析对比,不仅对了解生药中多糖成分含量以观察药物的的疗效与成分间关系具有重要意义,而且对控制荨麻生药内在质量和提高多糖产率,为进一步制定其质量标准提供了依据。,本实验通过对贵州麻叶荨麻、内蒙宽叶荨麻和湖南异株荨麻不同产地不同种的荨麻多糖进行提取,用苯酚-硫酸比色法测定总糖含量、3,5 二硝基水杨酸比色法分析单糖含量(DNS),总糖与单糖的差值为多糖含量,并对含量较高的贵州荨麻进行根与茎的多糖含量对比。

1、材料与方法:

1.1 三种不同产地不同种荨麻总糖的提取流程见图 1-1:



1.2 总糖含量测定

本实验以苯酚-硫酸比色法测定多糖含量,测定波长为 490mm^[38]。

1.2.1 标准品溶液的制备

以葡萄糖为标准品,精密称取 105℃干燥至恒重的葡萄糖 12.0mg 于 50ml 容量瓶中,加蒸馏水定容,贮藏备用。

1.2.2 总糖供试品溶液的制备

精密称取 105℃干燥至恒重的荨麻总糖固体粉末 6.0mg,加蒸馏水定容 10m1,作为供试溶液备用。

1.2.3 标准曲线的绘制

精密移取葡萄糖标准溶液 0、150、300、450、600、750 μ 1,分别加水补至 2m1,然后加 6%苯酚 1.0m1 及浓硫酸 5.0m1,在 40℃水浴中加热 30 分钟后,用可见分光光度计在 490nm 处测定吸光度 A490值。另以蒸馏水 2.0m1,同上操作为空白,以吸光度 A 为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.4 样品的测定

精密移取已配制好的样品溶液 250 μ 1,加水补至 2m1,然后加 6%苯酚 1m1 及浓硫酸 5m1,在 40℃水浴中加热 30 分钟后,用可见分光光度计在 490nm 处测定吸光度 A490 值,代入回归方程计算总糖含量。

1.3 3,5二硝基水杨酸比色法分析单糖含量(DNS)

DNS 试剂配置方法: 3,5 二硝基水杨酸 1%; 苯酚 0.2%; 亚硫酸钠 0.05%; 氢氧化钠 1%; 酒石酸钾 20%

1.3.1 标准品溶液的制备

以葡萄糖为标准品,制备标准曲线:精密称取 105℃干燥至恒重的葡萄糖 30mg 于 50ml 容量瓶中,加蒸馏水定容,贮藏备用。

1.3.2 荨麻总糖供试品溶液的制备

精密称取 105℃干燥至恒重的荨麻总糖固体粉末 30mg,加蒸馏水定容 50m1 容量瓶,作为供试溶液备用。

1.3.3 标准曲线的绘制

精密移取已配制好的葡萄糖标准溶液 0、300、450、600、750、900 μ 1,分别加水补至 3m1,然后加 DNS 试剂 3m1,沸水加热 15 分钟后,用可见分光光度计在510nm 处测定吸光度 A₅₁₀值。另以蒸馏水 3.0m1,同上操作为空白,以吸光度 A 为 纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.3.4 样品的测定

精密移取已配制好的样品溶液 $250 \,\mu$ 1, 加水补至 3m1, 然后加 DNS 试剂 3m1, 沸水加热 15 分钟后,用可见分光光度计在 510m 处测定吸光度 A_{510} 值,代入回归方程计算单糖含量。

2、结果与讨论

2.1 按上述总糖提取流程分别对贵州、内蒙和湖南荨麻根进行提取,对三次得到不同产地提取物进行总糖、单糖含量测定,总糖与单糖的差值为多糖含量(表 2-1)。表 2-1 不同产地荨麻多糖含量对比

	湖南			贵州					
	总糖	单糖	多糖	总糖	单糖	多糖	总糖	单糖	多糖
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	48. 72	10. 21	38. 51	68. 65	8.66	59.99	47. 37	10.06	37. 31
2	50. 76	10.64	40. 12	69. 43	8.65	60. 78	47. 15	10.06	37. 09
3	49. 40	10. 20	38. 20	69. 23	8. 65	60. 58	45. 04	9. 79	35. 25
平均数	49. 63	10. 35	39. 28	69. 10	8. 65	60. 45	46. 52	9. 97	36. 55

2.2 对含量较高的贵州麻叶荨麻根与茎提取物中多糖含量比较。按上述总糖提取流程分别对贵州麻叶荨麻根和茎进行提取,对三次得到根和茎提取物进行总糖、单糖含量测定并得出多糖含量(表 2-2)。

表 2-2 贵州麻叶荨麻根与茎多糖含量对比

		根					
	总糖 (%)	单糖 (%)	多糖(%)	总糖 (%)	单糖 (%)	多糖(%)	
1	68, 65	8. 66	59. 99	46. 24	9. 49	36. 75	
2	69, 43	8. 65	60. 78	53. 78	9. 45	44. 33	
3	69. 23	8. 65	60. 58	47. 27	9. 39	37. 88	
平均数	69. 1	8. 65	60. 45	49. 10	9. 44	39. 66	

以上不同产地(贵州、内蒙和湖南)不同种荨麻的多糖含量对比可知,贵州麻叶荨麻的多糖含量最高为 60.45%,其次为湖南异株荨麻多糖含量为 39.28%,对多糖含量最高的贵州荨麻根与茎测定结果表明根中多糖的含量最高为 60.45%。因此,我们选择贵州荨麻的根为我们进一步实验研究对象。

第二章 贵州荨麻根药材各项指标的测定

本实验根据药典规定测定水分、水溶性浸出物、总灰分和酸不溶性灰分、重金属的方法对贵州荨麻根药材进行以上项目的测定。

1、材料和实验方法

1.1 荨麻根水分的测定

参照《中国药典》(2005 年版,一部) 附录IX H 水分测定法第一法,对贵州荨麻根的原药材进行了水分测定。精密称取荨麻根粗粉 2.4579、2.5110 克,平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中,打开瓶盖在 102℃干燥 5 小时,将瓶盖盖好移置干燥器中,冷却 30 分钟,精密称定,再在上述温度干燥 1 小时,冷却,称重,至连续两次称重的差异不超过 5mg 为止。根据减失的重量,计算供试品中含水量(%)。

1.2 荨麻根水溶性浸出物的测定

参照《中国药典》(2005 年版,一部) 附录 XA 浸出物测定法项下的冷浸法对贵州 荨麻根进行了浸出物测定。取供试品,粉碎,使能通过二号筛,取供试品约 3.9758、4.0130 克,置锥形瓶中,精密加水 100ml,冷浸,前 6 小时内时时振摇,精密称定,再静置 18 小时,用干燥滤器迅速滤过,精密量取续滤液 20ml,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 105℃干燥 3 小时,移置干燥器中,冷却 30 分钟,迅速精密称定重量,计算供试品中水溶性浸出物的含量(%)。

1.3 荨麻根总灰分及酸不溶性灰分的测定

参照《中国药典》(2005 年版,一部) 附录 IXX 灰分测定法,对贵州荨麻根进行了总灰分及酸不溶性灰分的测定。

取供试样品,粉碎,通过二号筛,精密称定样品 3.7634 和 3.5765 克,置已炽灼至恒重的坩埚中,逐渐升温至 560℃炽灼使完全灰化,将坩埚放冷,加热水 2m1,使残渣润湿,然后置水浴上蒸干,至完全炭化并至恒重。根据残渣重量,计算供试品中总灰分的含量(%)。

取上项所得的灰分,在坩埚中加入稀盐酸 10ml,用表面皿覆盖坩埚,置水浴上加热 10 分钟,表面皿用热水 5ml 冲洗,洗液并入坩埚中,用无灰滤纸滤过,坩埚内的残渣用水洗于滤纸上,并洗涤至洗液不显氯化物反应为止。滤渣连同滤纸移至

同一坩埚中,干燥,炽灼至恒重。根据残渣重量计算供试品酸不溶性灰分的含量(%)。

1.4 荨麻根重金属的测定

根据《中国药典》(2005年版,一部)附录 IXE 重金属检查法第二法,对贵州荨麻根进行了重金属检测。取供试品,精密称定1.0005、1.0009克,置恒重坩埚内,完全炭化,加酸溶解,蒸干,放冷,高温炽灼至灰化,加酸,蒸干后加水,加碱调至中性,加入醋酸盐缓冲液,移至纳氏比色管中。另取配制供试品溶液的试剂,置瓷皿中蒸干后,加入醋酸盐缓冲液,移置纳氏比色管中,加标准铅溶液3.0ml,用水稀释,在两管中分别加入硫代乙酰胺试液,同置白纸上,自上向下透视观察,比较两管颜色深浅。

2、结果与讨论:

荨麻根药材各检测项目结果如表 2-1。

表 2-1 为荨麻根药材各检测项目结果

荨麻根检测项目	含量
水分	7. 1%
总灰分	11. 7%
酸不溶性灰分	1. 7%
水溶性浸出物	8.6%
重金属含量(以 Pb 计)	不超过 0.03%
多糖含量	60. 45%

中药水溶性浸出物、总灰分和酸不溶性灰分对于中药各成分的含量具有重要意义,中药中水分含量直接影响中药质量。重金属中药重金属尤其是有毒金属的含量超标问题是当前国内外的热门话题,是影响中药走向世界的关键之一。在提高中药及其制剂的内在质量方面,不仅要对其有效成分的质和量进行控制,而且还应对中药及其制剂中的有害成分进行必要的了解和限制。本实验对荨麻水分、水溶性浸出物、总灰分和酸不溶性灰分、重金属等指标测定,为今后荨麻根药材及其制剂生产中的质量控制和临床应用中的安全用药提供科学依据。

第三章 麻叶荨麻多糖对角叉菜胶诱发大鼠足爪肿胀的抑制作用

1、材料与方法:

本实验通过对大鼠足跖皮下注射角叉菜胶增加致炎局部 PG 合成增加,并与血管活性物质和激肽类一起诱发水肿,用于观察荨麻多糖对急性炎症过程的影响。

- 1.1 受试药: 荨麻多糖蒸馏水溶解到所需浓度
- 1.2 阳性对照药: 阿司匹林泡腾片(阿斯利康 200410), 蒸馏水溶解到所需浓度
- 1.3 实验动物: 军事医学科学院实验动物中心繁殖 Wistar 大鼠,雄性,年龄在 5-6周,体重 145-160g。
- 1.4 角叉菜胶 (carrageenin): Sigma 生产,批号 232-949.3,于使用前 1 天,用注射用水配制成 1%角叉菜胶,置于 4℃冰箱保存备用。
- 1.5 实验分组:大鼠随机分5组,每组8只。实验设溶剂对照组,阳性对照组(阿司匹林),荨麻多糖3个剂量组(见表1-1)。
- 1.6 检测指标:采用大鼠足爪容积测定仪测定致炎前和致炎后不同时间大鼠足爪容积变化,以致炎前、后容积的差值作为肿胀度。
- 1.7 给药方法: 大鼠禁食 8 小时, 于致炎前 45 分钟灌胃给药一次。

表 1-1 实验分组

Arr that			给药剂量	/A -#>\.	
组别 		动物数(只) 	(mg/kg)	给药方法 	
溶剂对照	Į.	8	蒸馏水	药前 45 分钟灌胃	
模型对照	Į.	8	蒸馏水	药前 45 分钟灌胃	
阿司匹林	τ .	8	150	药前 45 分钟灌胃	
	1	8	125	药前 45 分钟灌胃	
荨麻多糖	2	8	250	药前 45 分钟灌胃	
	3	8	500	药前 45 分钟灌胃	

2、疗效评定:

比较用药组与阴性对照组肿胀度差异,用药组抑制率,经统计学处理具有差异显著性,可评定该药对该炎症模型有抗炎作用。

用药组对肿胀的抑制率计算公式如下:

3、数据处理:

计算各组肿胀度均值与标准差、各用药组的抑制率,并作 t 检验,比较各组间差 异显著性。

4、实验结果

大鼠足跖皮下注射 1%角叉菜胶 0. 1ml, 致炎后 3-6 小时出现肿胀高峰。阳性对照阿司匹林,于药前 45 分钟灌服 150mg/kg, 致炎后 1-8 小时的肿胀度受到明显的抑制作用,抑制率均大于 30%,经统计学处理与模型组比较有显著差异,以示阿司匹林具有较强的消炎作用;麻叶荨麻多糖于药前 45 分钟灌胃 125mg/kg、在致炎后 1、6、8 小时肿胀度明显受到抑制,与模型组比较有显著差异(p<0.05-0.001)。药前 45 分钟灌服麻叶荨麻多糖 250mg/kg、在致炎后 1、2、6、8 小时肿胀度受到抑制,与模型组比较差异显著(p<0.05-0.001);药前 45 分钟灌服麻叶荨麻多糖 500mg/kg、在致炎后 1-8 小时肿胀度受到明显抑制,与模型组比较差异非常显著(p<0.01-0.001),肿胀度受到明显抑制,与模型组比较差异非常显著(p<0.01-0.001),肿胀度的抑制率均大于 30%以上。各剂量组之间呈现一定的量效关系,随着剂量的增加,对肿胀的抑制作用更为明显,显示麻叶荨麻多糖具有较强的消炎作用,见图 4-1,表 4-1。

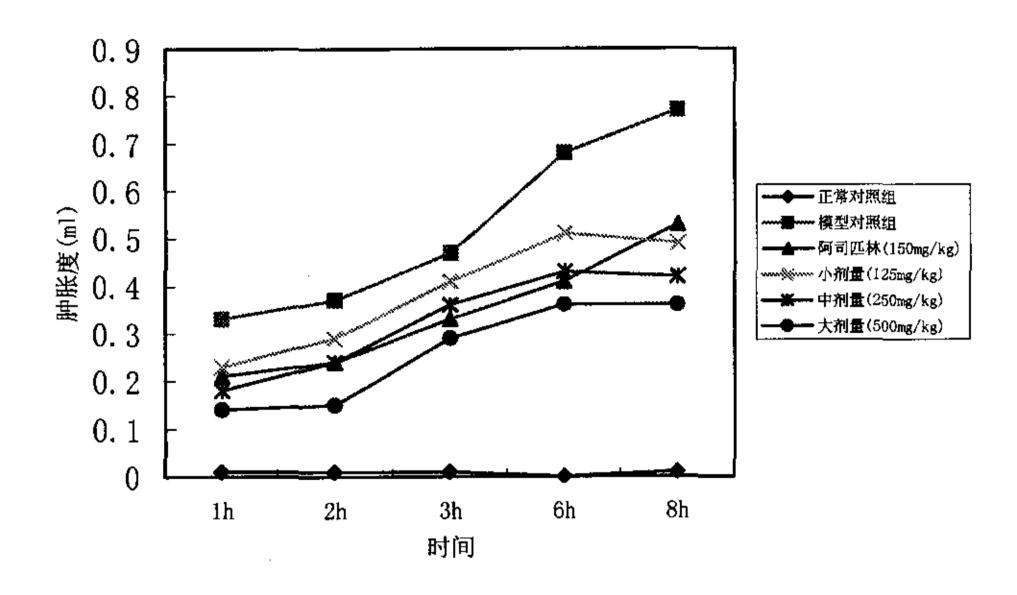


图 4-1 麻叶荨麻多糖对大鼠足肿胀度影响趋势

表 4-1 荨麻多糖对大鼠肿胀抑制率的影响

组别	剂量		肿胀抑制率(%)					
	mg/kg	1h	2h	3h	6h	8h		
正常对照	. 0	_	_	_	_			
模型对照	0	0	0	0	0	0		
阿司匹林	150	37.74	35. 59	30. 67	39. 45	31.71		
小剂量	125	30. 19	20. 34	12.00	25. 69	36. 59		
中剂量	250	37.74	25. 42	16. 00	33. 03	41. 46		
大剂量	500	58. 49	59. 32	38. 67	46. 79	53. 66		

5、讨论:

本实验对大鼠足跖皮下注射角叉菜胶引起急性炎症过程来研究麻叶荨麻多糖的抗^{*}炎作用,采用大鼠足爪容积测定仪测定致炎前和致炎后不同时间大鼠足爪容积变化,差值作为肿胀度。计算各组肿胀度均值与标准差,并作 t 检验,比较各组间

差异显著性,可评定该药对炎症模型有抗炎作用。实验结果表明麻叶荨麻多糖对角 叉菜胶引起的急性炎症过程,具有明显的抑制作用,且各剂量有良好的量效关系, 起始有效剂量为 125mg/kg,随着剂量的增加,抑制作用更为明显。

关于荨麻的抗炎、镇痛的药理作用,王梦月等报道二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验、角叉菜胶致大鼠足跖肿胀实验和小鼠碳粒廓清实验,研究荨麻多糖具有抗炎药理作用。实验结果表明荨麻多糖能明显抑制二甲苯所致小鼠耳廓肿胀、角叉菜胶所致大鼠足跖肿胀并能增强小鼠巨噬细胞的廓清能力,具有抗炎和增强免疫功能的作用^[39]。王亚丽报道二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验和冰醋酸致小鼠扭体实验,研究狭叶荨麻根、茎、叶的 70%已醇提取物和根水提物的抗炎镇痛作用。实验结果表明狭叶荨麻根、茎、叶的 70%已醇提取物和根水提物具有显著的抗炎镇痛活性^[40]。

本篇结论

- 1、不同产地(贵州、内蒙和湖南)不同种荨麻多糖含量对比可知,贵州麻叶荨麻的多糖含量最高为60.45%,其次为湖南异株荨麻多糖含量为39.28%,对多糖含量最高的贵州麻叶荨麻根与茎测定结果表明根中多糖的含量最高为60.45%。因此,我们选取贵州麻叶荨麻为进一步研究的对象。
- 2、根据药典规定对贵州麻叶荨麻根的检查项目进行测定,为今后控制荨麻药材的质量和制定荨麻药材的质量规定提供了依据。
- 3、通过麻叶荨麻多糖对角叉菜胶诱发大鼠足爪肿胀的抑制作用研究表明,麻叶荨麻多糖对大鼠足皮下注射 1%角叉菜胶引起的急性炎症过程,具有明显的抑制作用,且各剂量有良好的量效关系,起始有效剂量为 125mg/kg,随着剂量的增加,抑制作用更为明显。

参考文献

- [1]Fernando P. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-Can history repeat[J]? Biochem Pharmacol, 2006; 71: 981-90
- [2]Hillisch A, Hilgenfeld R. Modern Methods of Drug Discovery. Birkhäuser Verlag. 2002; 94-5
- [3]程元容,郑卫. 微生物生物活性物资的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2002; 27(10): 632-40
- [4] Sujatha P, Bapi Raju K.V.V.S.N. and Ramana T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiol Res, 2005; 160: 119-126
- [5]Zhang LX, An R, Wang JP, et al. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes[J]. Curropin in microbiol, 2005; 8: 276-281
- [6]肖建球. 海洋微生物代谢物抗肿瘤活性的研究进展[J]. 中医药导报, 2005; 11(7): 95-6
- [7]Daniel R. The soil metagenome-a rich resource for the discovery of novel natural products[J]. Curr Opin Biotechno, 2004; 15:199-204
- [8]Tormo J. R., Garcia Juan. B., Mar D, et al. A method for the selection of production media for actinomycete strains based on their metabolite HPLC profiles[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003; 30: 582-588
- [9]Duetz WA, Rüedi L, Hermann R, O'Connor K, Büchs J, Witholt B. Methods of intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates[J]. Appl Environ Microbiol, 2000; 66: 2641-6
- [10]庾石山, 冯孝章. 新型结构活性天然产物的化学研究[J]. 中国医学科学院学报, 2004 Aug; 26(4): 347-350
- [11] Tang YQ, Isabel S, Ralf T, et al. Parallel Chromatography in Natural Products Chemistry: Isolation of New Secondary Metabloite from Streptomyces sp[R]. Fourth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, 2000; WWW.

Mdpi. Org/ecsoc-4. htm

[12]Knight V, Sanglier J. J., et al. Diversifying microbial natural products for drug discovery[J]. Appl Environ Microbiol, 2003; 62: 446-458

[13]Cremin PA, Zeng L. High-throughput analysis of natural product compound libraries by parallel LC-MS evaporative light scattering detetion[J]. Anal Chem, 2002; 74:5492-5500

[14] Gräfe U, Heinze S, Schlegel B. Disclosure of new and recurrent microbial metabolites by mass spectrometric methods[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2001; 27:136-143

[15] James B. McAlpine, Brian O. Bachmann, Mahmood Piraee, Steve Tremblay, Anne-Marie Alarco, Emmanuel Zazopoulos, and Chris M. Farnet. Microbial Genomics as a Guide to Drug Discovery and Structural Elucidation: ECO-02301, a Novel Antifungal Agent, as an Example [J]. J. Nat. Prod, 2005; 68:493-496

[16]周燕, 王明奎, 彭树林, 丁立生. 四棱草中的一个新环八肽[J]. 植物学报, 2001; 43(4): 431-4

[17]Lackner H, Bahner I, Shigematsu N, Pannell LK, Mauger AB. Structures of five components of the actinomycin Z complex from Streptomyces fradiae, two of which contain 4-chlorothreonine[J]. J Nat Prod, 2000 Mar; 63(3): 352-6

[18] Akira K, Haruo S, Masao K, et al. Preparation of fluorinated antibiotics followed by 19F NMR Spectroscopy II. fluorinated actinomycins[J]. J. Antibio, 1985; XXXVIII(11): 1625-8.

[19]于德泉,杨峻山.分析化学手册(第二版)第七分册,化学工业出版社,1999;826 [20]洪静娟.5-氟尿嘧啶联合更生霉素治疗恶性滋养细胞肿瘤疗效评价[J].海南医学,2004;15(12):99-100

[21] Marcus UH, Peter M, Norbert GB, et al. Adult Wilms tumor: report of two cases and review of the literature[J]. Cancer, 1995; 75(2): 545-551

[22]权宜淑. 值得开发的荨麻属药用资源[J]. 中药材, 1997; 20(1): 8-10

[23]李新芳,阿孜古丽,买尔当.维吾尔药荨麻的国内外应用简介[J].中国民族医药杂志,2004;2:19

- [24]Dathe G, Schmid H. Phytotherapie der benignen Prostatahyperplasie (BPH).Doppelblindstudie mit Extraktum Radicis Urticae (ERU) [J]. Urologie [B], 1987; 27:223-26
- [25] Sokeland J. Combined sabal and urtica extract compared with finasteride in men with benign prostatic hyperplasia: analysis of prostate volume and therapeutic outcome [J]. BJU, Int, 2000; 86(4): 439-42
- [26]Bondarenlo B, Walther C, Funk P. et al. Long-term efficacy and safety of PRO 160/120 (a combination of Sabal and Urtica extract) in patients with lower urinary tract symptoms (LUTS) [J]. Phytomedicine, Stuttgart: 2003; 10(2): 53
- [27] Lichius J J, Muth C. The inhibiting effects of Urtica dioica root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse [J]. *Planta Med*, 1997; 63(4): 307-10
- [28] Lichius J J, Renneberg H, Blaschek W, et al. The inhibiting effects of components of stinging nettle root on experimentally induced prostatic hyperplasia in mice [J]. Planta Med, 1999; 65(7): 666-68
- [29] 邱晓. 大荨麻的化学、药理与临床研究[J]. 国外医药植物分册, 2000; 15(1): 9-14 [30] Manganelli R.E. U, Zaccaro L, Tomei P.E. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L[J]. J. Ethnopharmacol, 2005; 98: 323-7
- [31]Bnouham M, Merhfour FZ, Ziyyat A, et al. Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of Urtica dioica[J]. Fitoterapia, 2003 Dec; 74(7-8): 677-81
- [32] Farzami B, Ahmadvand D, Vardasbi S, et al. Induction of insulin secretion by a component of Urtica dioica leave extract in perifused islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats[J]. J Ethnopharmacol, 2003 Nov; 89(1): 47-43
- [33] Tahri A, Sabah Y, Legssyer A, Mohammed A, et al. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat[J]. J Ethnopharmacol, 2000 Nov; 73(1-2): 95-100
- [34]Legssyer A, Ziyyat A, Mekhfi H, Bnouham M, et al. Cardiovascular effects of

Urtica dioica L. in isolated rat heart and aorta[J]. Phytother Res, 2002 Sep; 16(6): 503-7 [35]Testai L, Chericoni S, Calderone V, et al. Cardiovascular effects of Urtica dioca L. roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological strudies[J]. J Ethnopharmacol, 2002 Jun; 81(1): 105-9

[36]Mehmet K, Omer C, Mustafa B. Hepatoprotective effects of *Nigella Sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats[J]. World J Gastroenterol, 2005; 11(42): 6684-88

[37] Daher C F, Baroody K G., George M. B. Effect of Urtica dioica extract intake upon blood lipid profile in the rats[J]. Fitoterapia, 2006 Apr; 77(3): 183-8

[38]卫莹芳, 王梦月. 荨麻多糖的提取和含量测定[J]. 华西药学杂志, 2001; 16(6): 469-470

[39]卫莹芳, 王梦月. 荨麻多糖药理作用初步研究[J]. 中药材, 2001; 24(9): 666-7 [40]王亚丽, 秦民坚, 戴岳, 吴刚. 狭叶荨麻根、茎、叶的抗炎镇痛作用[J]. 现代中药研究与实践, 2005; 19(3): 42-3.

附录 1

化合物光谱图

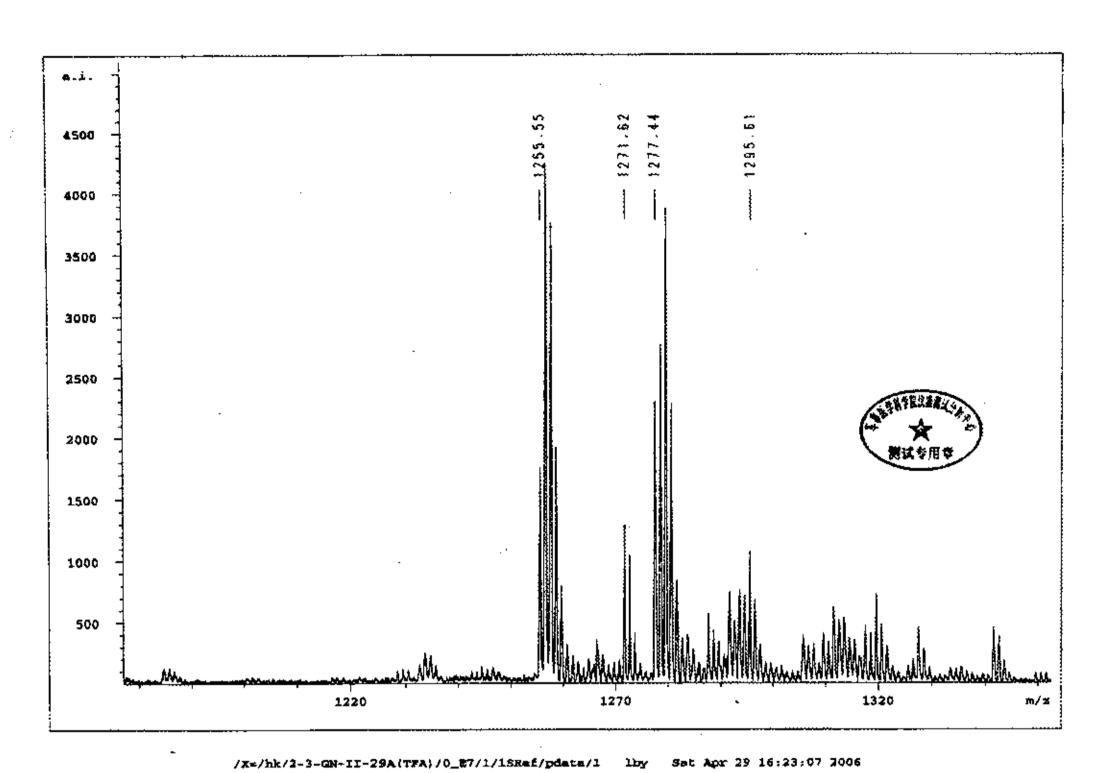


图 1 化合物 GN-II-29A 的质谱图

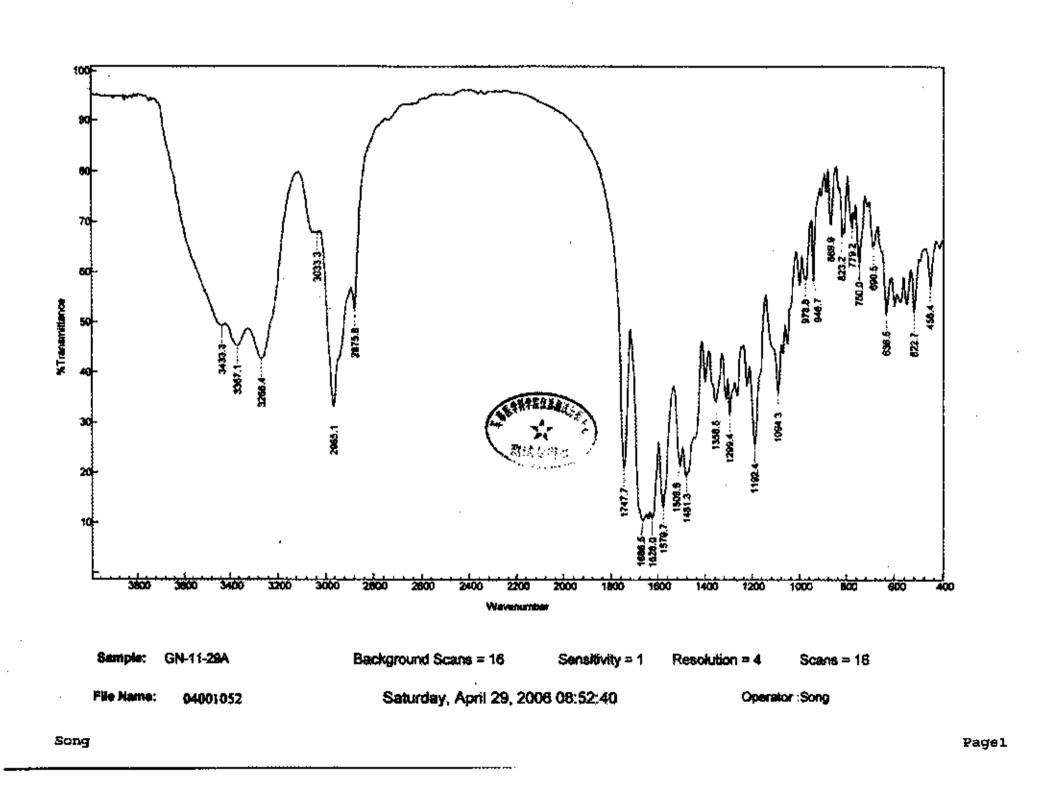


图 2 化合物 GN-II-29A 的红外光谱图

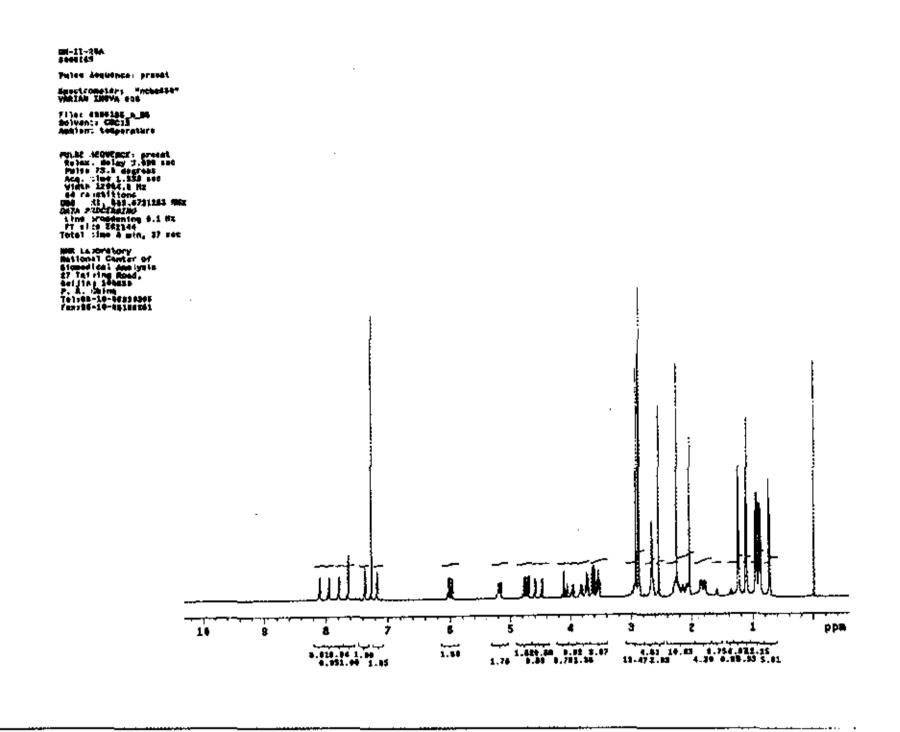


图 3 化合物 GN-II-29A 的 ¹H NMR 氢谱图

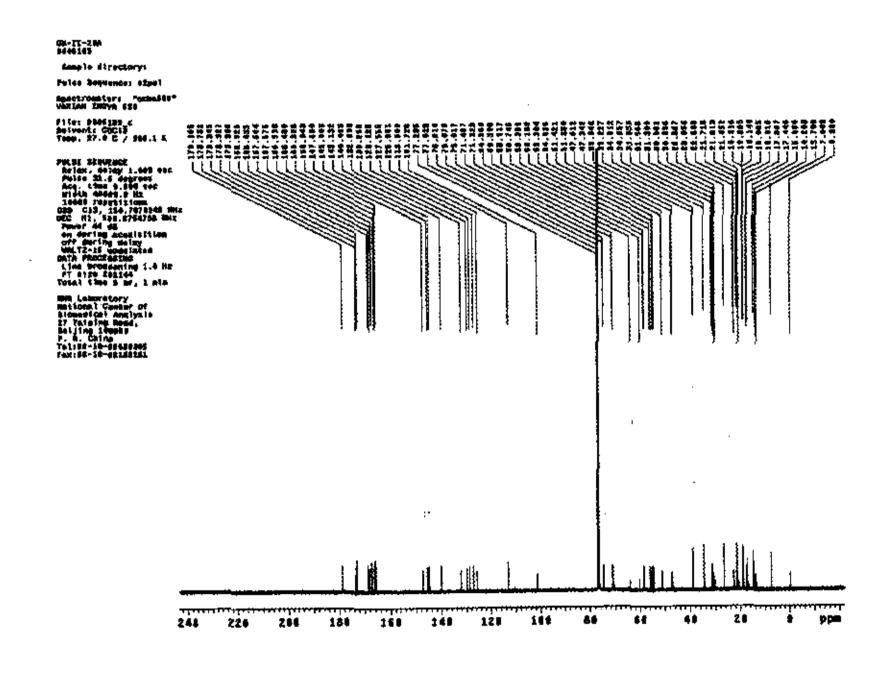


图 4 化合物 GN-II-29A 的 ¹³C NMR 碳谱图

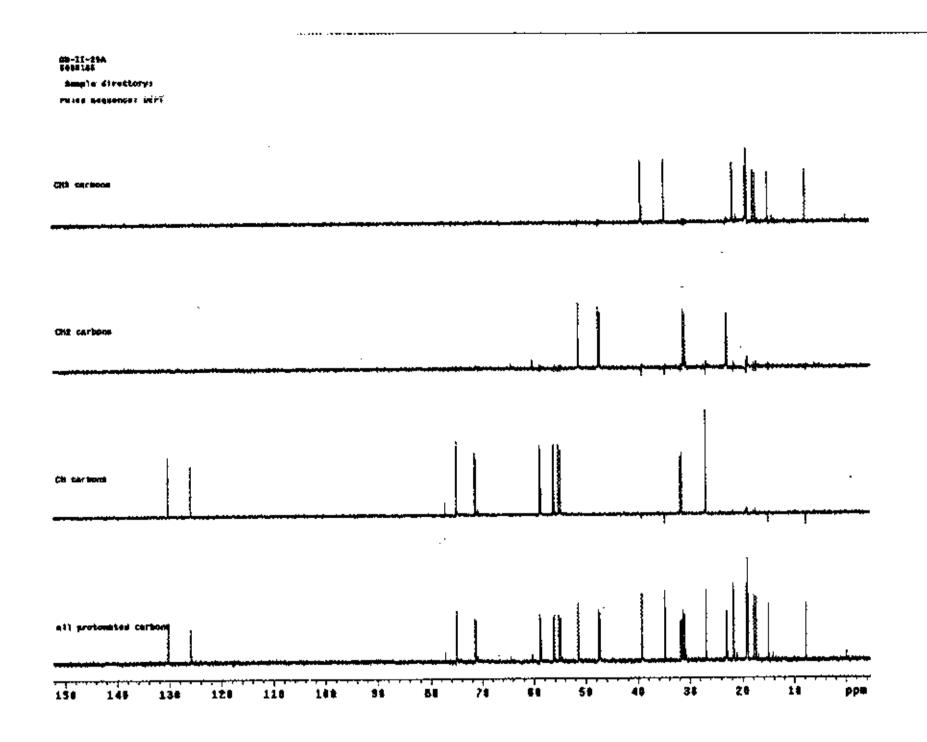


图 5 化合物 GN-II-29A 的 DEPT 谱图

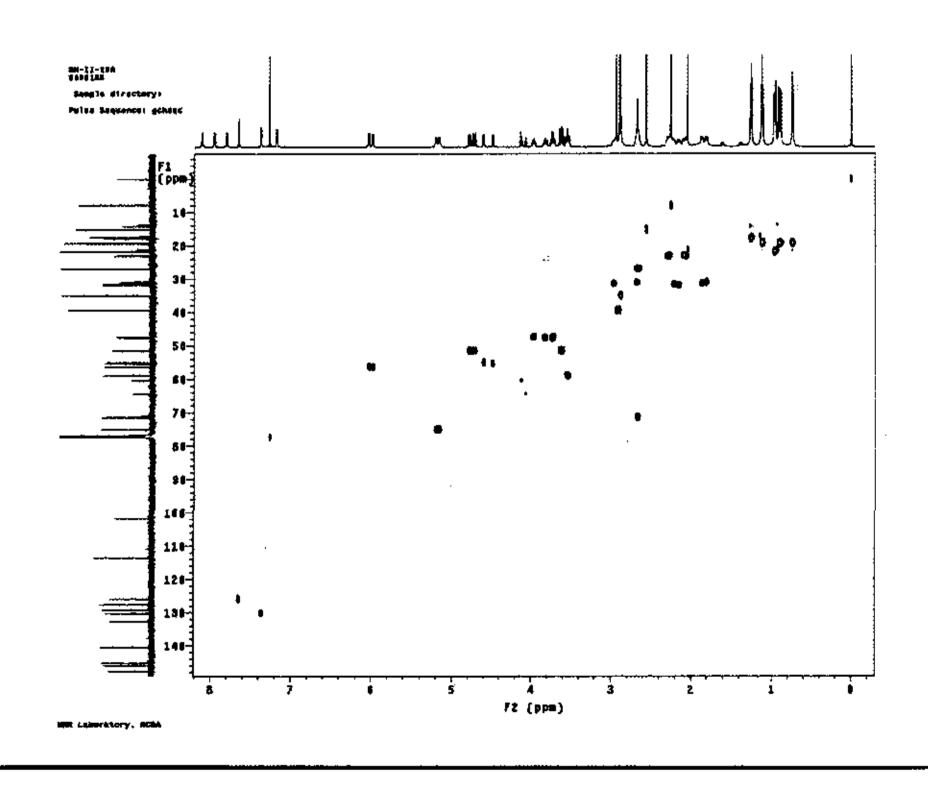


图 6 化合物 GN-II-29A 的 HMQC 谱图

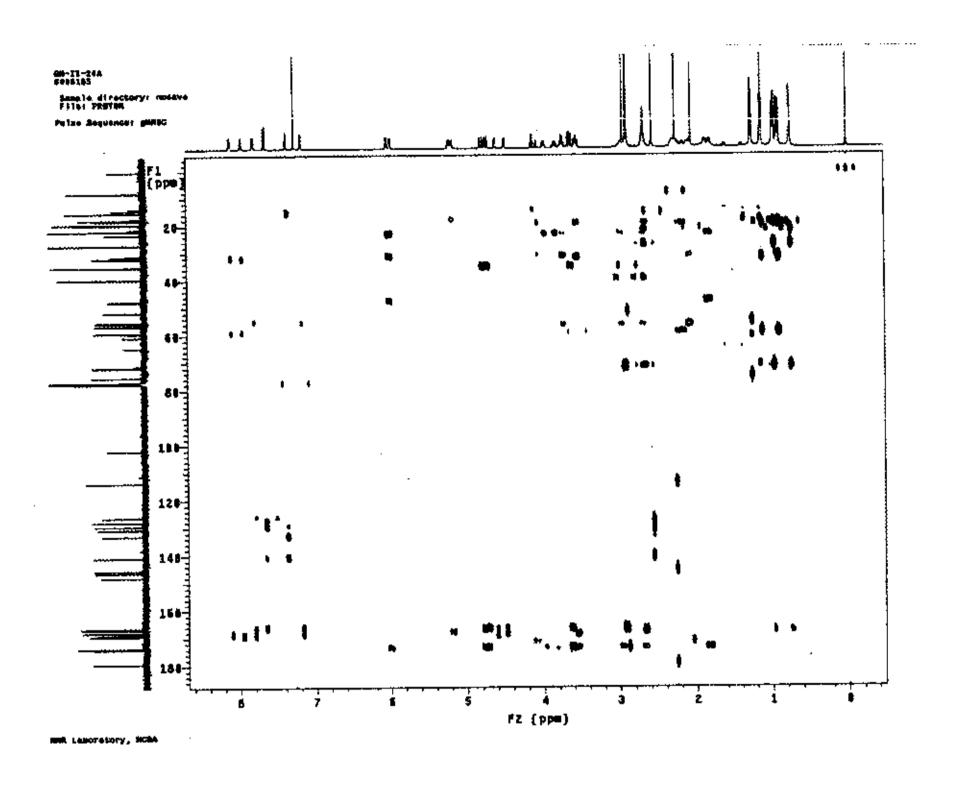


图 7 化合物 GN-II-29A 的 HMBC 谱图

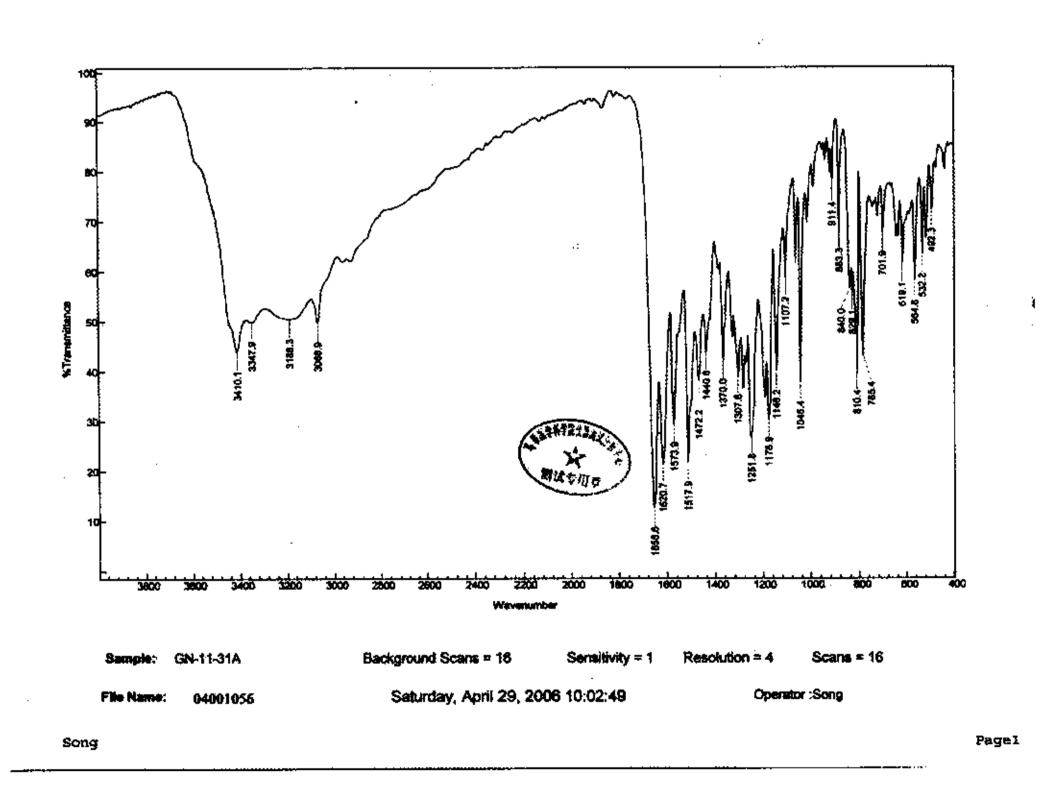


图 8 化合物 GN-II-31A 的红外光谱图

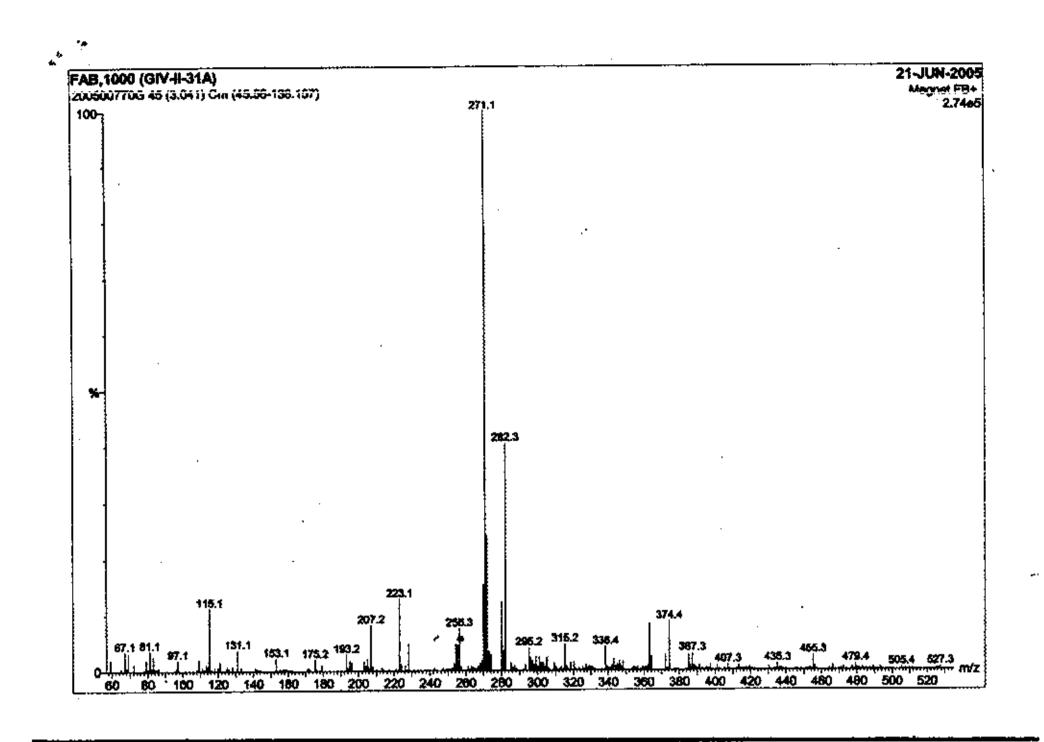


图 9 化合物 GN-II-31A 的 质谱图

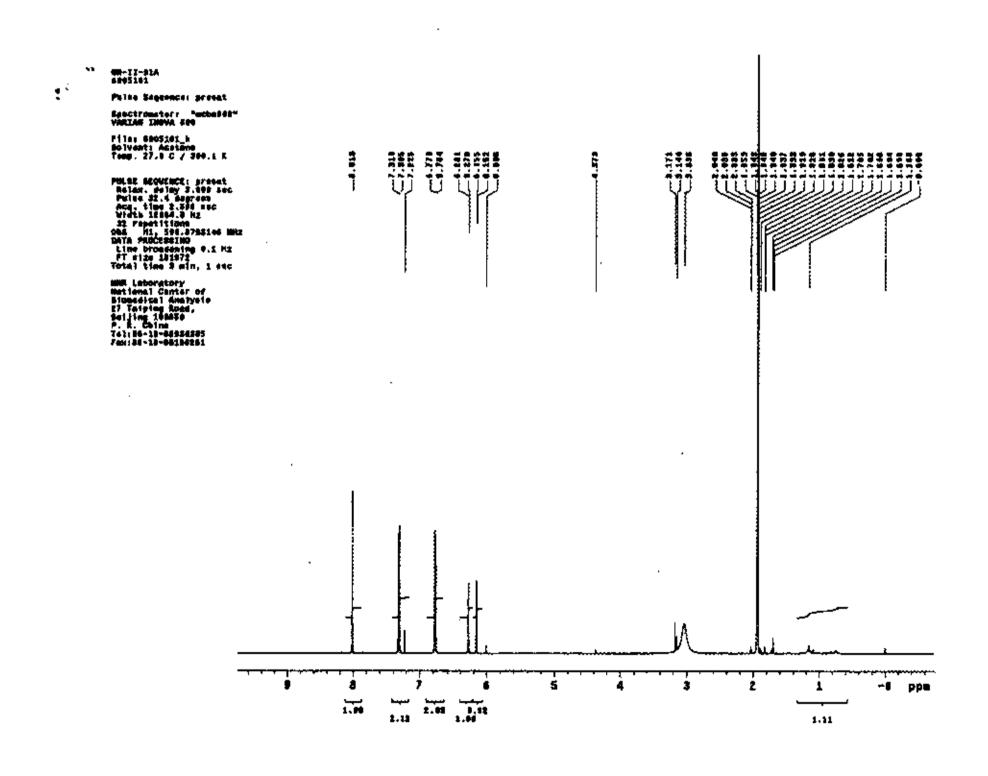


图 10 化合物 GN-II-31A 的 ¹H NMR 氢谱图

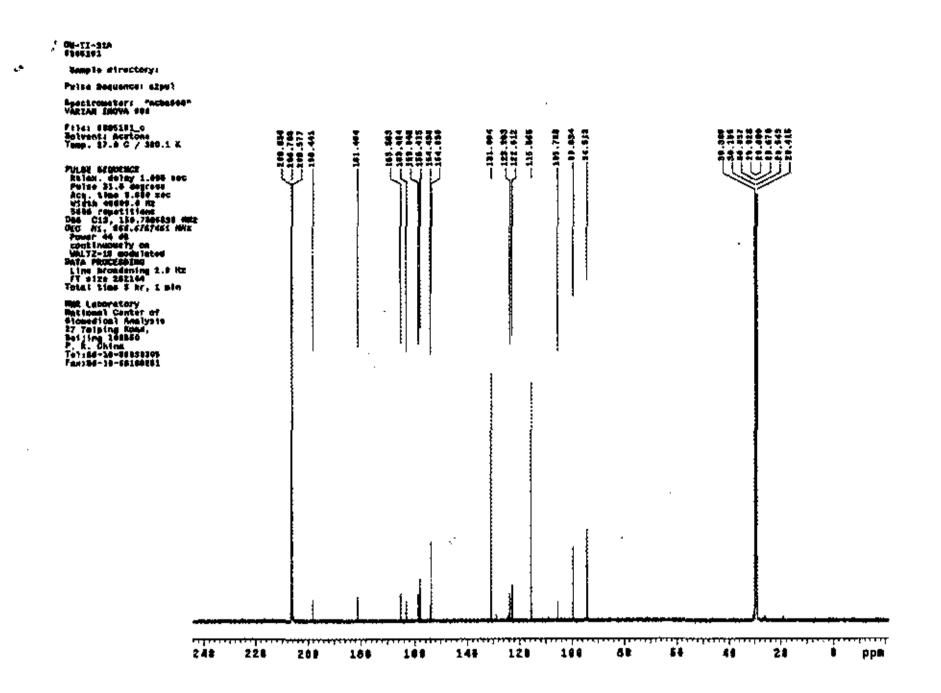


图 11 化合物 GN-II-31A 的 ¹³C NMR 碳谱图

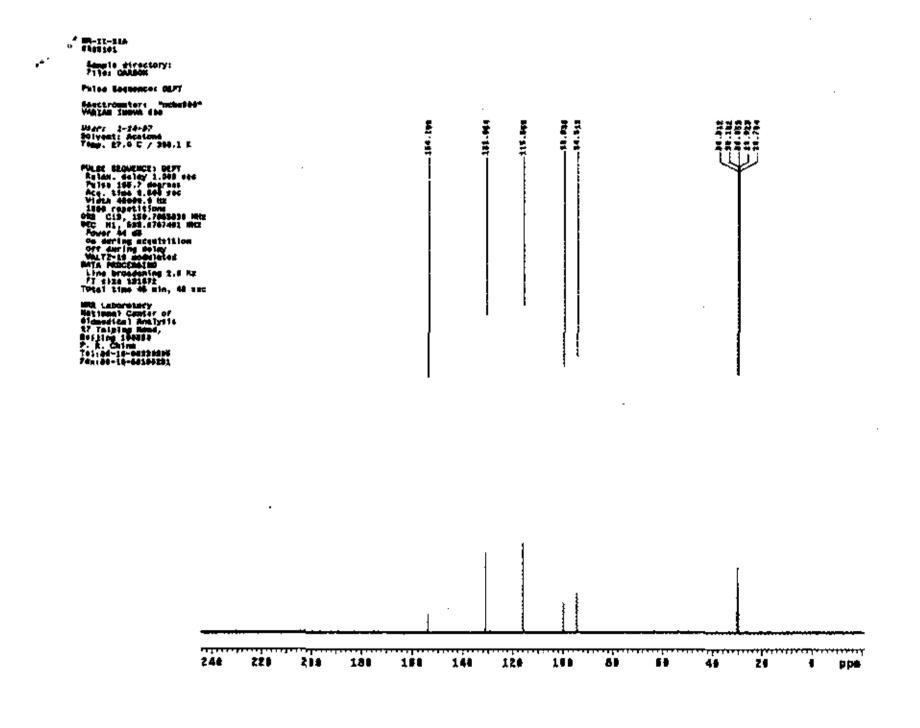


图 12 化合物 GN-II-31A 的 DEPT 谱图

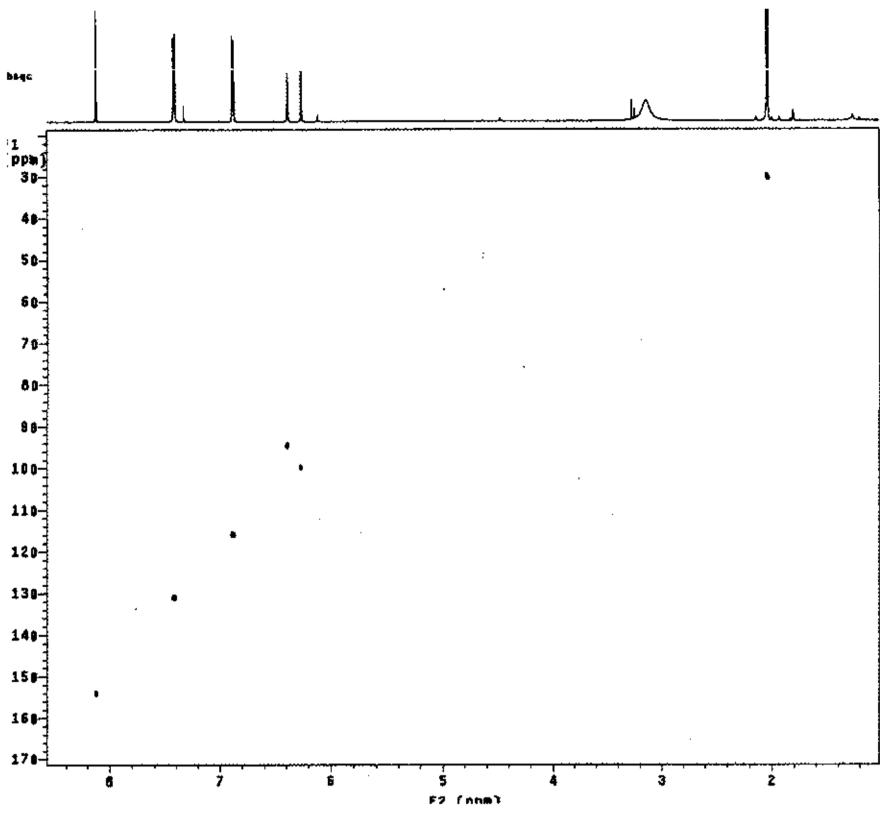


图 13 化合物 GN-II-31A 的 HMQC 谱图

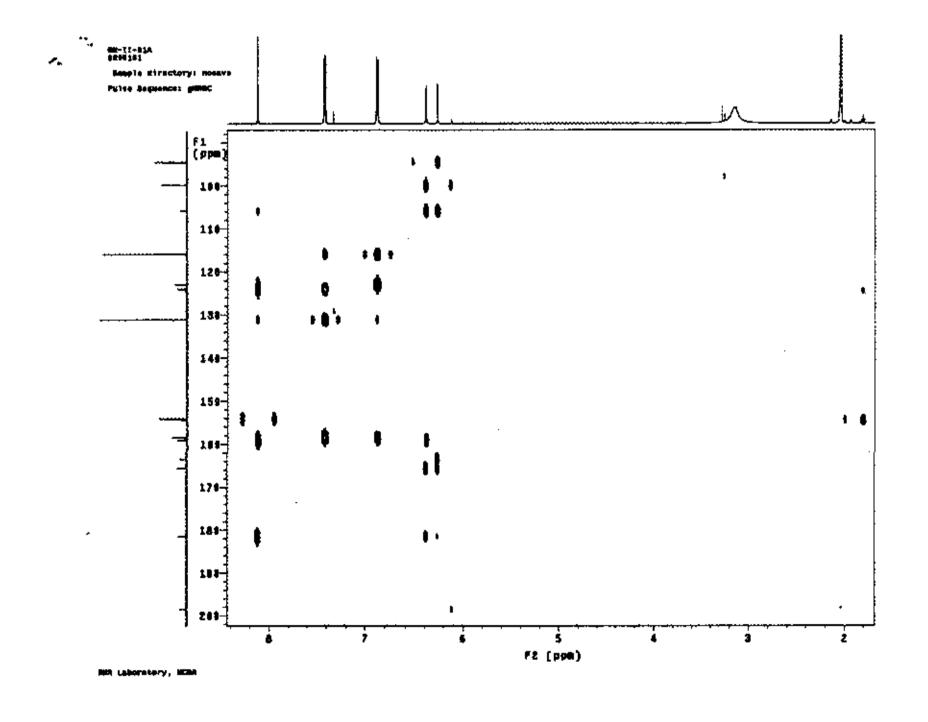


图 14 化合物 GN-II-31A 的 HMBC 谱图

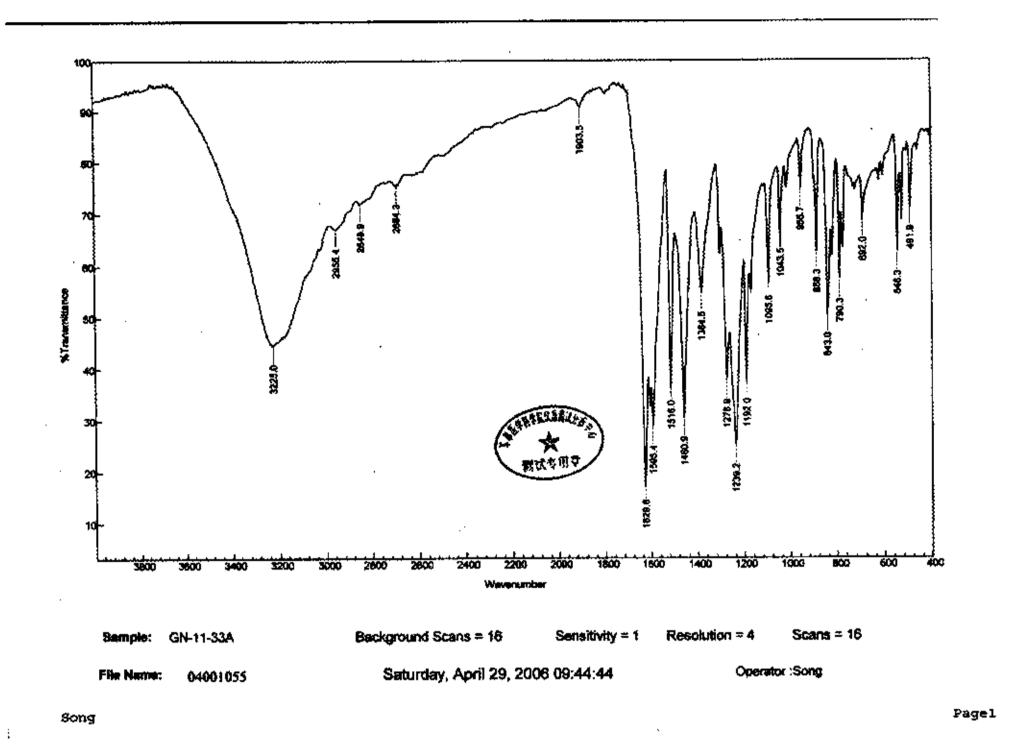


图 15 化合物 GN-II-33A 的红外光谱图

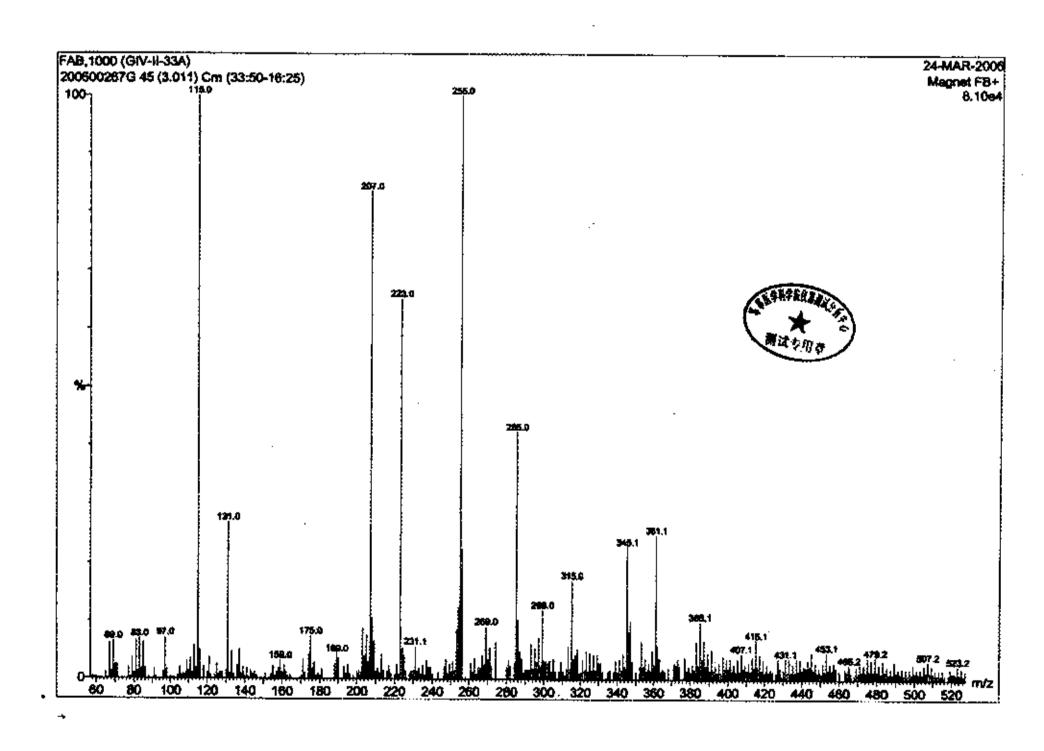


图 16 化合物 GN-II-33A 的质谱图

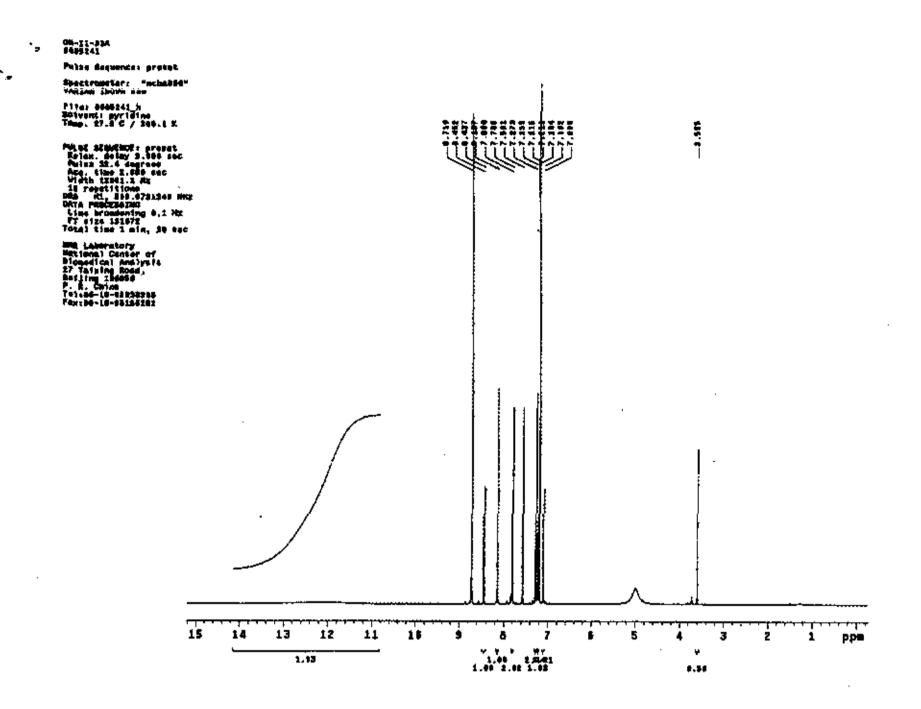


图 17 化合物 GN-II-33A 的 ¹H NMR 氢谱图

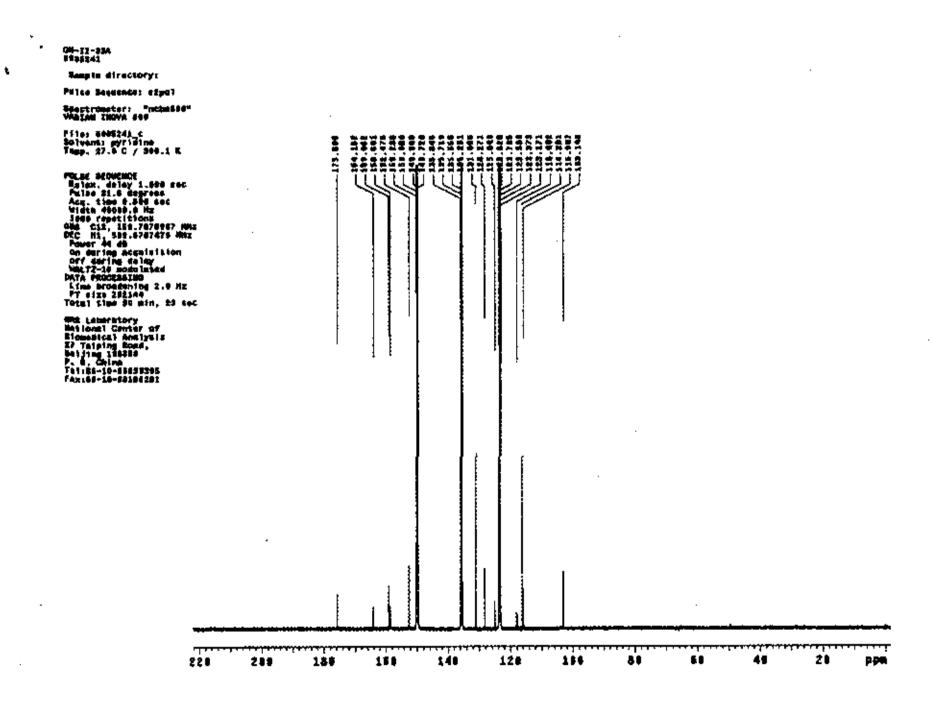


图 18 化合物 GN-II-33A 的 ¹³C NMR 碳谱图

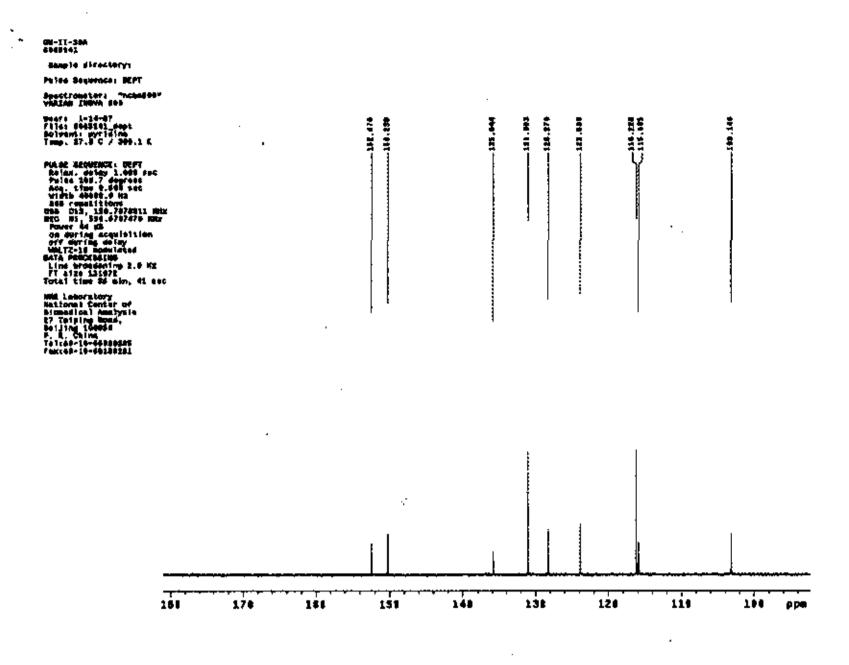


图 19 化合物 GN-II-33A 的 DEPT 谱图

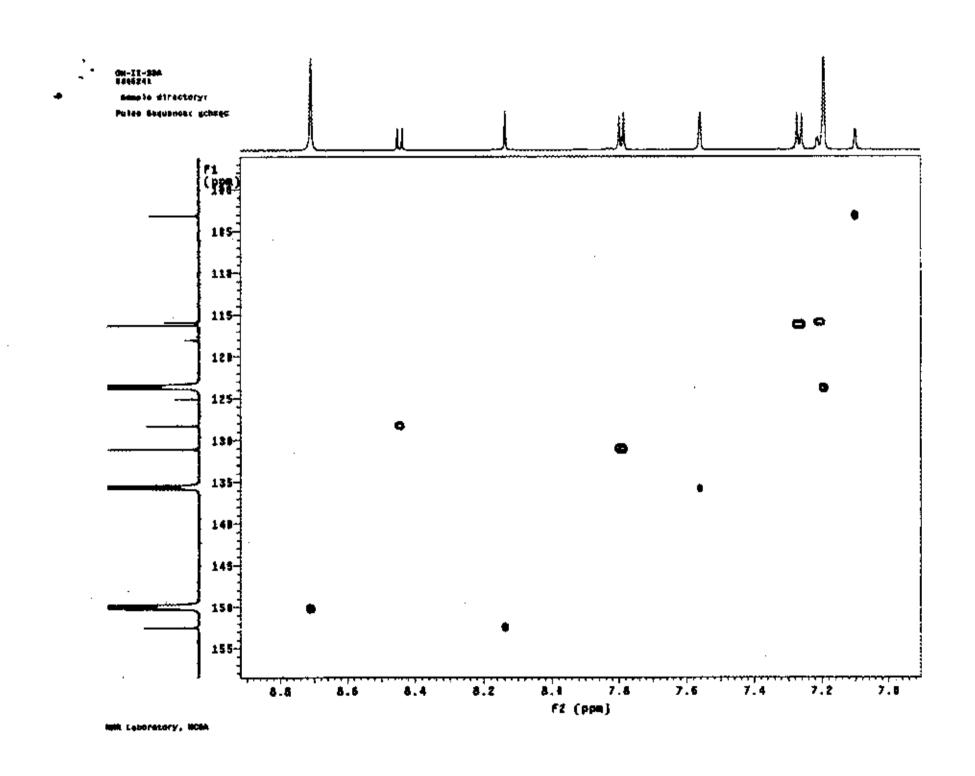


图 20 化合物 GN-II-33A 的 HMQC 谱图

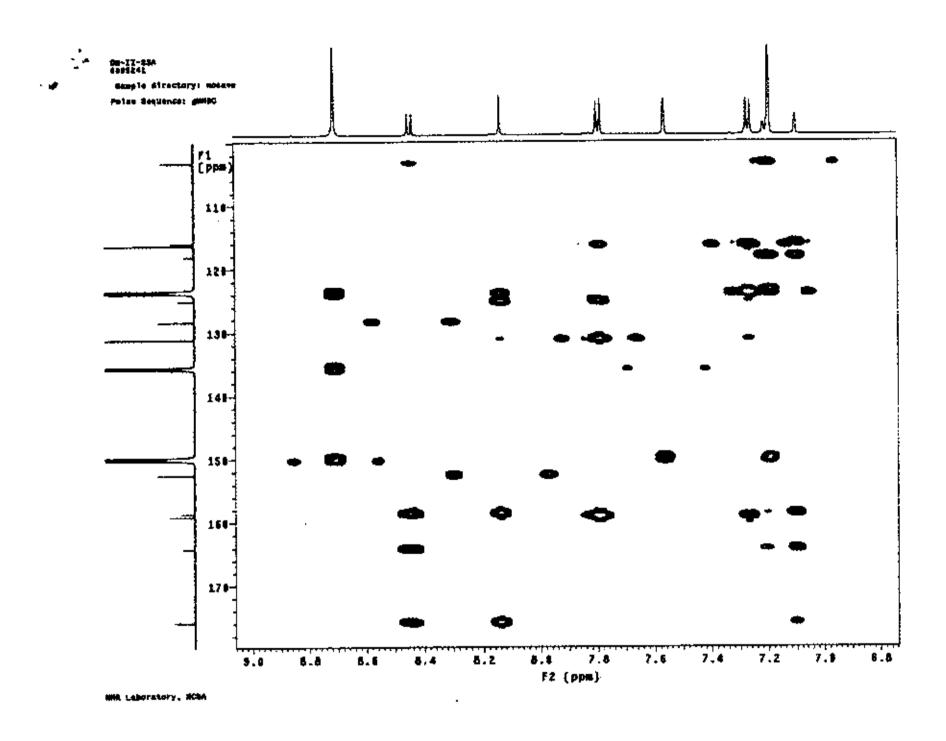


图 21 化合物 GN-II-33A 的 HMBC 谱图

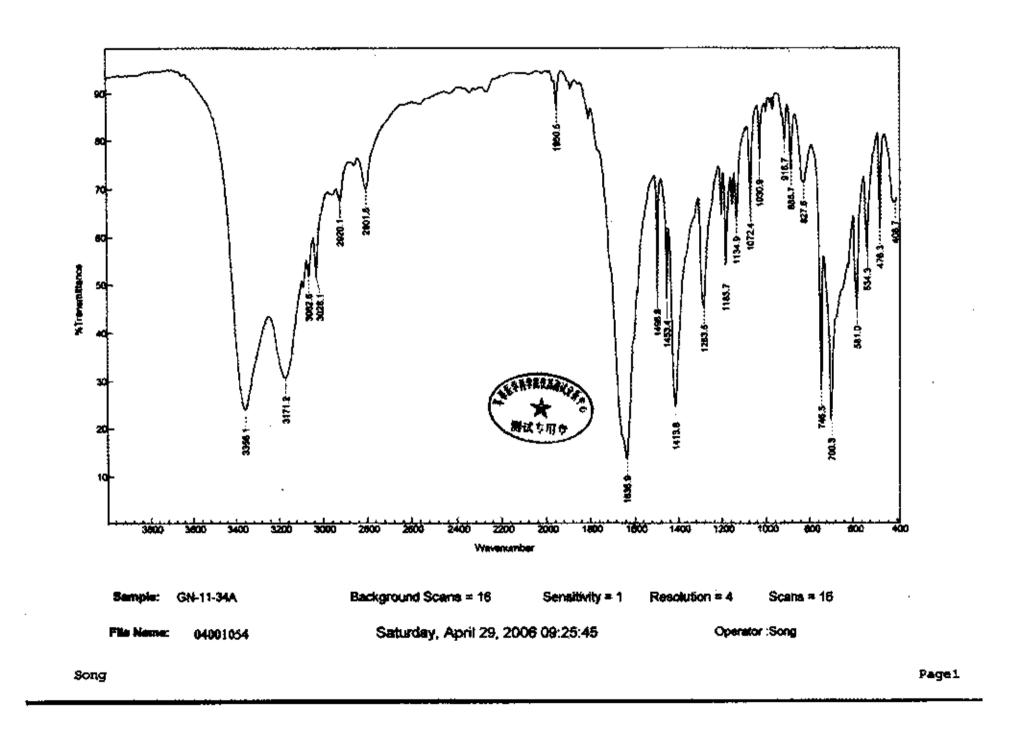


图 22 化合物 GN-II-34A 的红外光谱图

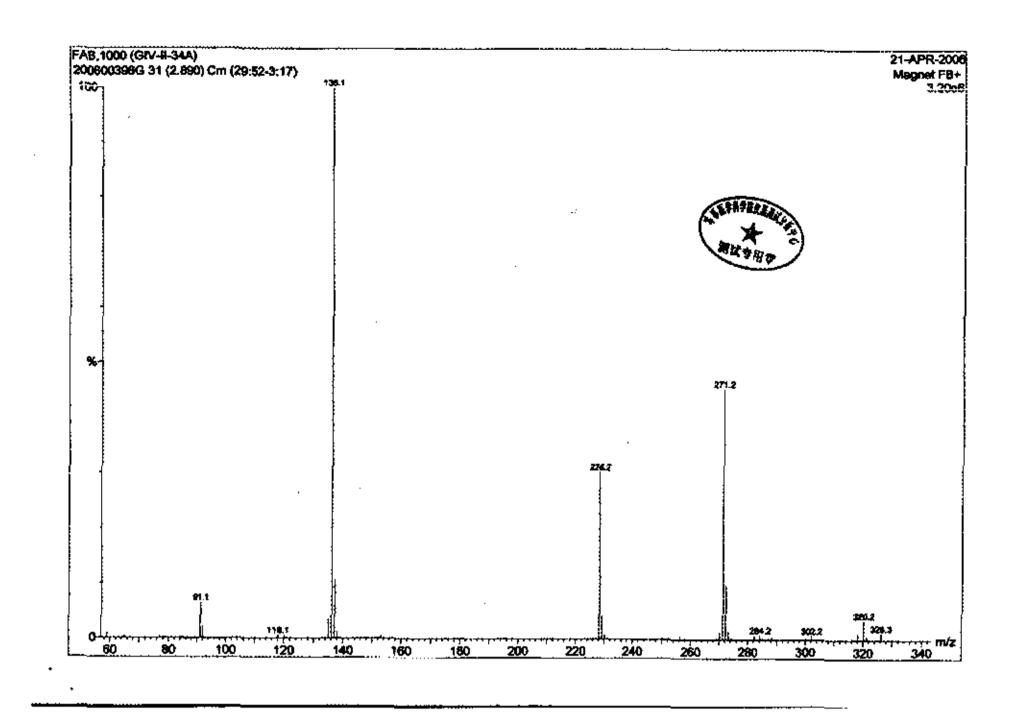


图 23 化合物 GN-II-34A 的质谱图

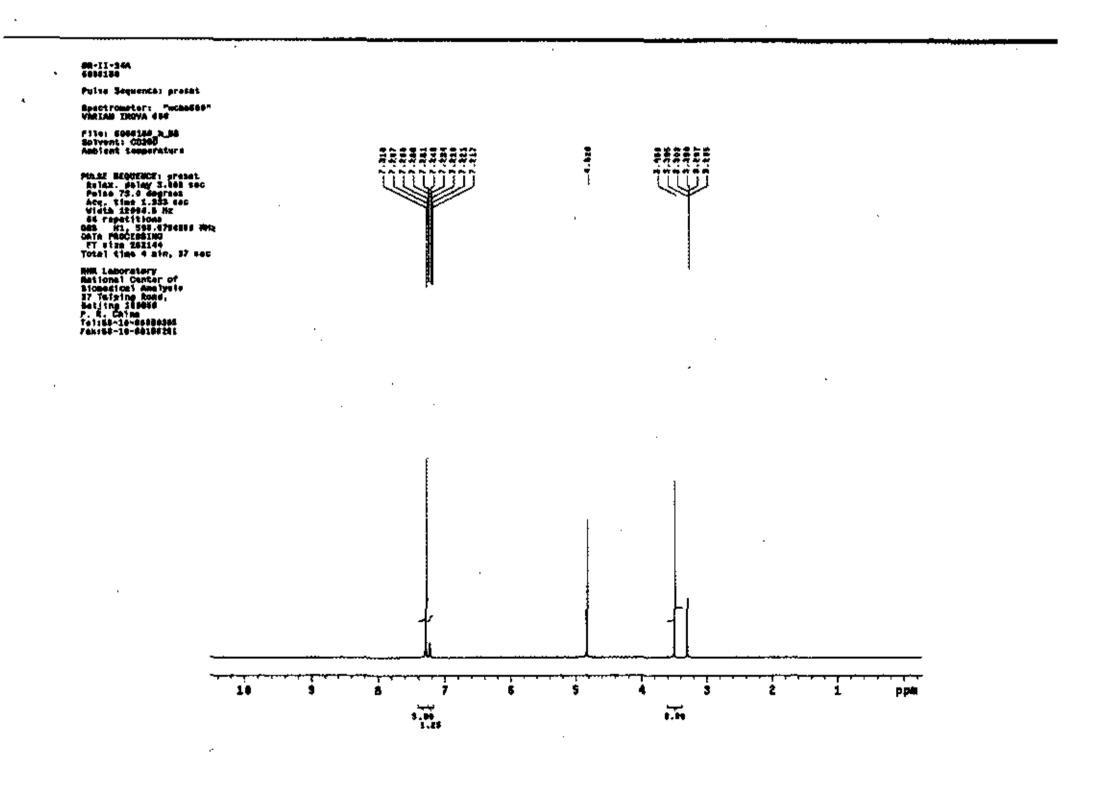


图 24 化合物 GN-II-34A 的 ¹H NMR 氢谱图

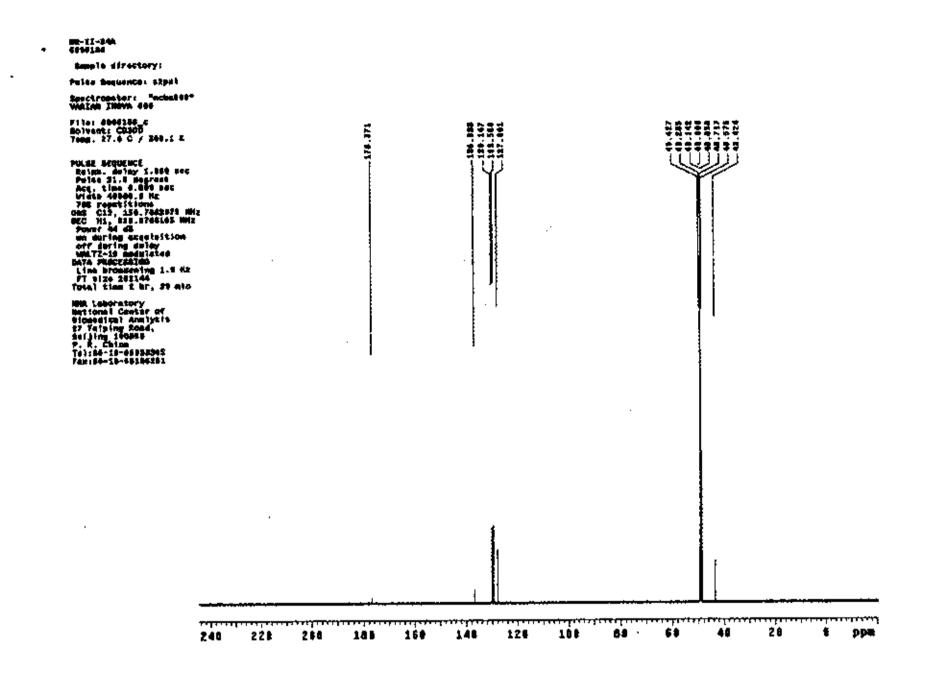


图 25 化合物 GN-II-34A 的 ¹³C NMR 碳谱图

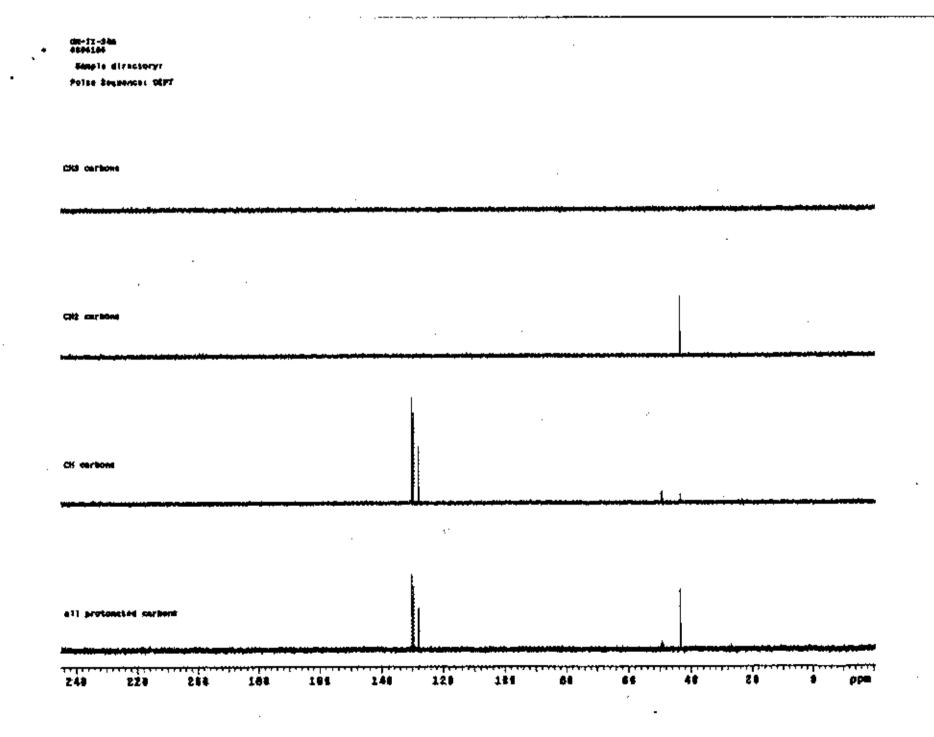


图 26 化合物 GN-II-34A 的 DEPT 谱图

附录二

研究生期间发表的文章

後 生 物 代 谢 产 物 库 研 究 进 展 高楠,张庆林

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

[摘要] 微生物代谢物具有极大的化学结构多样性和复杂性,建立微生物代谢物库对发现新药有重要意义。本文对几种重要的微生物代谢物库及建库方法作一综述。 [关键字] 微生物 代谢产物 化合物库

中图分类号 Q939.406

育 頒

微生物是活性天然产物的重要来源,微生物代谢物具有极大的化学结构多样性和复杂性。在过去的几十年里,对微生物代谢物的研究,发现并开发了许多重要的药物。

随着高通量高内涵筛选平台的建立和发展,需要各种化合物库供筛选。建立微生物代谢物库对药物高通量筛选、发现先导化合物有极其重要意义。

代谢产物库是进行高通量筛的先决条件,包括数据库管理系统、主要从微生物样品中提取的活性部位或单体化合物和少量合成化合物。近年来对微生物代谢物库的研究主要包括预分离库、纯天然产物库、运用平行合成技术产生的合成、半合成天然产物库和类天然产物库⁽¹⁾。

一、預分离代谢物库:

Ulrich Abel 报道 BioLead 公司采用 IsoLeader 系统及 Contiweigher 系统的 半自动化流程建立了结构未知的预纯化代谢物库。该流程首先将 800 种菌株的培养液过滤,得到培养液的滤液和菌丝体两部分。滤液部分经不同吸附性色谱柱处理得到 800 种强极性组分和 6400 种中等极性的组分; 菌丝体部分用有机溶剂提取得到 800 种菌丝体提取物。采用半制备高效液相对以上三部分组分进一步细分得到至少 80000 种纯度大于 85%的天然化合物。最后,对化合物库中活性成分进行液相-质谱、核磁共振分析,排除重复性物质。采用该方法从发现苗头化合物到完成结构鉴定所需时间短。由于仅分析鉴定活性组分的结构,仅培养含不重复化合物

的菌种,因此成本低。影响预分离代谢物库原因:

1、菌种来源:

生态环境的生物地理、采集样品的数量及菌种分离程序等因素影响菌种的数量及种类^②。多样性的地域如深地层、深海及极端温度、盐度及 PH 值的地点往往可分离得到新的微生物,为发现新的化合物提供了可能^③。如 Mincer 报道由一种新型放线菌属 Salinospora 可分离得到强抗癌活性物质 Salinosporamide A,该菌属仅存在海洋环境中^④。另一方面,采用新的菌种分离策略及技术,从相对温和的生态环境中也能分离出许多新颖的物种。

2、培养基成分:

微生物产生次级代谢物的种类和产量受到培养基成分和生长条件影响。如:改变培养基中的氮源可使真菌抑制剂 Cancidas 的天然前体 Pneumocandins 产量提高 10-20 倍。因此改变微生物生长条件来提高菌种代谢产率成为许多制药公司经常使用的策略。J. R. Tormo 建立了高效液相自动化分析方法,从统计学上比较一组放线菌在不同培养基中产生代谢物的能力,以提高微生物代谢库的质量。从土壤和海洋采集样品分离出 250 种放线菌,每种菌分别在十种不同的培养基中小量培养,用高效液相-蒸发散射检测器分析每种提取物,根据某些参数挑选出产生的代谢物成分多样、组成重叠小的三种培养基进行大规模发酵,用来建立代谢物库。试验结果表明该方法通过减少多余的发酵条件和增加菌种代谢物化学成分多样性可提高供药物筛选代谢物的质量⁶⁰。

3、代谢物分离和检测方法:

Yuan-Qing Tang 报道利用 CombiFlash™ si1000s 系统将平行色谱技术与凝胶渗透、硅胶色谱技术相结合,应用于链霉菌 GT061089 代谢产物的分离。从 200 升菌种发酵液中分离得到 16 种化合物,其中两种化合物结构已知。平行色谱技术的应用允许多个样品同时分离,极大地缩短分离时间。该技术将在天然产物的高通量分离方面发挥重要作用。平行色谱技术不足之处主要表现在:由于在线检测系统不能与平行色谱技术相整合,由平行色谱所获得的为数众多的馏分只能由薄层层析技术检测⁶⁸。

U Gräfe 报道利用电喷雾电离质谱技术寻找新的微生物代谢物和排除已知化合物。电喷雾电离源(SI)与不同质量分析器组合可测定混合物中样品的分子量和

分子式,由碰撞诱导解离 (CID-MS/MS) 产生的诊断碎片离子信息可以获得化合物的结构信息。质谱与高效液相、薄层色谱联用,可做为特殊的检测器,提供分析物的分子量、分子式和化学结构等信息。采集分离 150 种放线菌,琼脂平板培养,提取物采用薄层色谱展开,紫外下观察,将斑点刮下、洗脱,经 SI-CID-MS/MS 检测,鉴定出 20 种已知化合物和一种新化合物⁽⁷⁾。

二、纯天然产物库

Kai U. Bindseil 报道 Analyticon Discovery 和 Aventis Pharma AG 两公司合作在十八个月內建成一个纯度大于 80%、包含 2242 种微生物来源化合物及 1758 种植物来源化合物的无重复结构纯天然产物库。此化合物库的构建过程分为以下几个步骤:选择培养条件简单,能产生多种含量丰富未知代谢物的微生物作为实验对象。采用高效液相结合蒸发散射检测器对所选微生物进行预筛选,从中挑选出2665 种细菌和 1425 种真菌做进一步的扩大培养。提取物先采用 Flash™-Biotage系统浓缩,再经由 AnalytiCon AG 公司开发的 SEPBOX*light 系统分离,最后通过查询天然产物数据库结合质谱、核磁共振信息对分离获得化合物进行高通量结构鉴定,得到 2242 种微生物代谢化合物⁶⁰。

James B McAlpine 报道通过分析放线菌 aizunensis NRRL B-11277 基因组发现并鉴定出一种新型抗真菌抗生素。Miyamura 曾报道从该菌种发酵液中分离出双环菌素。James B McAlpine 等通过基因组扫描(genome scanning),确定包括双环菌素基因簇在内共有 12 个天然产物基因簇,挑选出一个包括 35 个开放读写框的基因簇进行全面分析,推断出该基因簇对应代谢物 ECO-02301 结构可能为直链聚烯多肽,通过查询化合物库确定该代谢产物为一种新化合物。为获得这些基因表达,菌种大规模发酵,从菌丝体和菌液中分离得到化合物 ECO-02301,经质谱、核磁共振检测,碳、氢位移与应用基因组分析方法推断得到的结构的位移基本一致。实验结果表明应用基因组分析方法可从许多已知微生物中发现新化合物,此外该技术与质谱、核磁共振谱相结合可快速鉴定许多复杂化合物结构。

三、合成及半合成天然产物库

代谢物提取、分离、纯化过程相对复杂费力,阻碍了天然产物的广泛应用[∞]。 随着高通量有机合成在药物发现过程中的应用,多种设计方法被用于化合物库的 构建,其中包括:通过全合成获得天然产物衍生物库、天然产物类似物库,及由 天然产物而来的化合物库等[©]。

在以天然产物为模板的化合物库合成方面,Waldmann 人报道天然产物核心结构修饰、分子骨架全合成和天然产物来源化合物库的多样性固相合成方法⁶³。 Khosla C 报道运用酶来构造天然产物衍生物的组合生物合成方法是一种很有前景的开发结构多样性的方法⁶³。

结束语

近十年来,天然产物平均以每年 150~300 种的速度增长,其中以抗生素居多,但其它生理活性物质有明显增加的趋势。微生物次生代谢物的筛选是新微生物药物研究开发之源,合成、半合成产物的研究也是探索新微生物药物的重要途径之一。随着越来越多药物作用靶标被阐明,建立与高通量筛选技术相适应的多样化巨型化合物库成为必然。运用新策略寻找发现更多新化合物同时尽量减少重复的已知化合物是建立高质量天然产物化合物库的关键。

[参考文献]

- (1) Abel U, Koch C, Speitling M, Hansske FG Modern methods to produce natural product libraries[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6:453-458
- (2) Foissner W. Notes on the soil ciliate biota (Protozoa, Ciliophora) from the Shimba Hills in Kenya (Africa): diversity and description of three genera and ten new species[J]. Biodiversity Conserv, 1999,8:319-389
- (3) Bull AT. Clean technology: industry and environment, a viable partnershisp[J]? Biologist (London), 2000,47:61-64
- (4) Mincer TJ, et al. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 2002,68:5005-5011
- (5) J. R. Tormo, Juan. B. Garcia, Mar DeAntonio, Julia Feliz, Aurora Mira, et al. A method for the selection of production media for actinomycete strains based on their metabolite HPLC profiles[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003,30: 582-588
- (6) Yuan Qing Tang, Isabel Sattler, Ralf Thiericke, Susanne Grabley and Xiao

- Zhang Feng. Parallel Chromatography in Natural Products Chemistry: Isolation of New Secondary Metabloite from Streptomyces sp[R]. Fourth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, 2000, WWW. Mdpi. Org/ecsoc-4. htm
- (7) U Gräfe, S Heinze, B Schlegel and A Härtl. Disclosure of new and recurrent microbial metabolites by mass spectrometric methods[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2001,27:136-143
- (8) Kai U. Bindseil, Jasmin Jakupovic, Dietmar Wolf, Jacques Lavayre, Jean Leboul and Didier van der Pyl. Pure compounding libraries; a new perspective for natural product based drug discovery[J]. Drug Discov Today, 2001,6: 840-847
- (9) James B. McAlpine, Brian O. Bachmann, Mahmood Piraee, Steve Tremblay, Anne-Marie Alarco, Emmanuel Zazopoulos, and Chris M. Farnet. Microbial Genomics as a Guide to Drug Discovery and Structural Elucidation: ECO-02301, a Novel Antifungal Agent, as an Example[J]. J. Nat. Prod, 2005,68:493-496
- (10)Lutz Weber. High diversity combinatorial libraries[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2000,4:295-302
- (11) Armen M Boldi. Libraries from natural product-like scaffolds[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2004,8:281-286
- (12)Breinbauer R, Manger M, Scheck M, Waldmann H. Natural product guided compound library development[J]. Curr Med Chem, 2002,9:2129-2145
- (13) Khosla C. Natural product biosynthesis: a new interface between enzymology and medicine[J]. J Org Chem, 2000,65:8127-8133

New Progress in Microbial Metabolites Libraries

GAO Nan, ZHANG Qinglin

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850)

[Abstract] Microbial metabolites can offer complex and diverse structures. Establishing microbial metabolites library is of great significance for new drug discovery. In this article some important microbial metabolites libraries as well as methods to generate these libraries are reviewed.

[key word] Microbiology; metabolites; compound libraries

致谢

时间飞逝,转眼三年的硕士生生涯即将结束。借此机会向所有关心、支持和帮助过我的老师、同学、朋友表示最衷心的感谢。

首先,我要感谢我的指导老师张庆林教授,在这三年期间,无论是学习、工作, 还是日常生活中都给予我无微不至的关怀和教诲!

其次,我要感谢实验室匡岩巍、王赫、黄麟、李丽、李宁、王延亮、朱振刚、 陈晶晶等同学在工作学习和生活上给予的关心和帮助。感谢肖凤君、吴斌博士、 曹荣菊老师、毕建进老师及三室其它老师和同学的帮助和支持。

最后,我要感谢我的家人对我的学习、工作上的大力支持关心和在生活上给予的极大照顾。