

纤维堆囊菌活性次级代谢产物的研究进展*

吴斌辉 李越中 胡 玮

(山东大学生命学院微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要: 粘细菌中的纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 在近 20 年的新型天然化合物的筛选中以其产生的化合物种类新、结构多样、作用机理特殊等而崭露头角, 已经报道的 200 多种化合物及衍生物在抗细菌、抗肿瘤、抗病原真核生物中有很强作用, 是很好的天然药物筛选资源, 具有极大的应用价值。本文将对 10 种作用机理具有典型意义的次级代谢产物的生物活性做一概述。

关键词: 纤维堆囊菌, 粘细菌, 次级代谢产物

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0075-04

从微生物资源中获得新型的天然生物活性化合物主要有以下 4 种方法^[1]: 使用新的筛选技术或筛选模型对已经研究过的微生物再次筛选; 筛选新的微生物资源; 理化方法拼接修饰天然化合物前体; 利用遗传工程技术改造菌株。据估计全球大约有几百万种微生物, 仅有很小一部分微生物的代谢产物得到过研究。因此, 分析新的微生物资源是天然药物筛选的重要研究工作内容之一。目前新型微生物资源的筛选可能遇到的困难主要有两个方面^[2], 第一个是如何获得新微生物资源的纯培养, 第二个是分析的微生物群是否具有重要的筛选开发价值。从目前发现新型天然化合物的统计看, 除在传统的活性化合物高产菌群如放线菌中利用新的筛选模型仍有大量的筛选外, 更多的工作是从一些新的、从前较少研究的微生物资源中发现新药。如海洋微生物, 极端微生物等。滑动细菌中的粘细菌^[1]在近 20 年的新型天然化合物的筛选中以其产生的化合物种类新、结构多样、作用机制特殊等而崭露头角。其中, 能够溶纤维素的纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 尤为引人注目。根据德国 GBF 的研究人员分析, 纤维堆囊菌产生抑菌活性的阳性率高达 96%, 甚至比著名的链霉菌还高。纤维堆囊菌是粘细菌中唯一能够降解纤维素的种, 但存在着大量细胞形态、子实体发育形态明显差异的菌株^[3]。这些有差异的菌株在次级代谢产物的合成上也表现明显的差异, 存在很强的菌株特异性。从已经发现的纤维堆囊菌的代谢产物的化学结构多样性和生物学活性机制

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39570013, 39870003)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39570013, 39870003)

收稿日期: 2000-12-21, 修回日期: 2001-03-25

独特性看,这是一个很好的天然药物筛选资源。本文对纤维堆囊菌的代谢产物的研究进展进行综述。

1 纤维堆囊菌次级代谢产物的化学结构

自 1977 年^[3]在纤维堆囊菌中报道第一个次级代谢产物 Ambruticin 以来,已经阐述了几十类几百种化合物的结构和生物活性。从已有的研究结果看,纤维堆囊菌代谢产物不但异常丰富,而且化合物结构类型广泛,大环类如 Disorazol, Chivosazol, Tartrolon, Soraphen, Epothilon; 芳香族类如 Jerangolid, Ripostatin; 醌类如 Sorangiolid; 多烯类如 Ratjadon, Ambruticin 等等。从结构上看,纤维堆囊菌中发现的生物活性代谢产物绝大多数尚未在其它的微生物中有过报道,表明了纤维堆囊菌代谢产物的独特性以及开发利用价值。由于筛选方法的原因,目前在纤维堆囊菌中发现的活性代谢产物较多的是大环内酯类化合物,并且这些大环内酯类化合物均表现出合成途径的多变性,如在一株纤维堆囊菌 (So ce26) 中报道的 Sorphen 类似物有 51 种^[4],在 So ce90 菌株中发现的 Epothilones 类似物也有 50 多种。这为筛选高活性和低毒性的活性化合物提供了选择的可能。

2 纤维堆囊菌次级代谢产物的生物学活性特征

2.1 细胞壁合成抑制剂 目前已经发现的细胞壁合成抑制剂只有 Chivosazols^[5],主要作用真核微生物,尤其对酵母菌细胞壁合成有显著的抑制作用, MIC 值 (最低抑制浓度) 为 $10\mu\text{g/mL}$ 。在已经研究的 206 株菌中只有 9% 可以产生此类物质。Chivosazol A 能抑制 N-乙酰葡萄糖氨的合成。N-乙酰葡萄糖氨是酵母芽痕处几丁质形成的单体。抑制该物质的合成将破坏细胞壁的稳定性而使细胞死亡。在高浓度的情况下 Chivosazol A 也会对丝状真菌有抑制活性,但对细菌的影响小。2 倍 MIC 作用敏感酵母细胞 7h 后只有 10% 存活,10 倍 MIC 则只有 0.2% 存活。但是 Chivosazol A 能改变生长着的动物细胞膜的通透性,对动物细胞也会有一定的毒性。此外, Chivosazol A 的合成不受巴比妥的控制。

2.2 作用细胞膜 Sorangiolid^[6]抑制 G^+ 细菌的生长, MIC 值在 $15 \sim 20\mu\text{g/mL}$,对真菌与酵母没有作用,但对哺乳动物的细胞与细菌的作用十分明显。加入 3 倍 MIC 该物质的细胞悬浮液在营养丰富的培养基上几个小时后活细胞数减到了 1%,而在磷酸缓冲液中则减到了 0.01%。进一步的研究发现很有趣的结果:通过 MIC 与细胞密度之间关系证实,存活细胞不是因为出现了对该物质抗性而是因为附着于细胞群或细胞碎片上与药物隔离。实验表明,营养丰富的培养基可以部分恢复细胞中被破坏的大分子物质功能。由于加入该物质后细胞培养液在紫外吸收明显增加,表明 Sorangiolid 的作用导致细胞膜通透性改变,大量在紫外有吸收的物质从细胞中漏出。此外,它对大多数细胞大分子物质如 DNA、RNA、蛋白质、细胞壁的合成都有抑制作用,但是机理不详。

Jeranglid A^[7]的结构与 Ambruticin 相似,对细菌无作用,可以抑制大部分的真菌与酵母,对生长的鼠细胞 L929 也有抑制活性, IC_{50} (细胞半致死浓度) 是 $1.4\mu\text{g/mL}$,对存在于磷酸缓冲液或 0°C 的细胞没有作用。对 Ambruticin 有抗性的菌株一般对 Jeranglids 也有抗性。

Soraphen^[8]对大多数的酵母和霉菌的抑制强烈 (MIC = $0.003 \sim 4\mu\text{g/mL}$),对很多种植物致病真菌尤其是半知菌的 *Botrytis* 及 *Alternaria*,担子菌的 *Rhizoctonia*,子囊菌的

Venturia 及 *Erysiphe* 和卵菌的 *Phytophthora* 有抑制作用。此外, 对处于生长状态的鼠成纤维细胞的 MIC 值为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$, 但对休眠细胞没有作用。Soraphen 能快速抑制磷酸甘油合成 (抑制细胞膜合成酶)。进一步的研究表明它对乙酰 CoA 羧化酶也有抑制作用。

纤维堆囊菌库的分析表明只有 4% 能产生 Ambruticins^[9]。它能抑制糖的利用, 可完全抑制生长状态的酵母 (MIC = $0.003 \sim 4\mu\text{g}/\text{mL}$), 对 G^+ 细菌和鼠红细胞也有弱作用 (MIC = $10 \sim 50\mu\text{g}/\text{mL}$)。体外的实验表明 Ambruticins 对一些皮肤真菌有很好的抑制作用。Ambruticins 通过抑制乙酰 CoA 羧化酶而抑制糖代谢, 并影响细胞膜的合成。

2.3 稳定微管及蛋白合成抑制剂 在 Epothilones^[10] 产生菌中有 4/5 同时产生 Spirangiens, 另外 1/5 释放出 Icumazols。Epothilone 对细菌没有影响, 但对许多的真菌和肿瘤细胞有强抑制活性, 作用机制与 taxol 相似, 结合在微管上的 taxol 结合位点, 通过增加原丝间的作用强度而增加微管稳定性, 使细胞的纺锤体不能形成^[11]。如同 Ratjadon 一样, Epothilones 的抗菌谱很窄。Epothilones 的 $\text{C}_{12}\text{-C}_{13}$ 形成的环氧化合物对微管的聚合反应没有影响但对准确定位于靶位点是十分重要的。

Tartrolons^[12] 作用与 Sorangiolid 一样只是对 G^+ 细菌与哺乳动物的细胞, 使蛋白质合成完全停止。Sorangiolid B 在其中心含有一个硼原子, 硼结合的结构与 Boromycin 和 Aplasmomycin 与硼结合的方式相同, 且化学性质也相似。

2.4 核酸抑制剂 Disorazol^[13] 能够对许多不同类群的丝状真菌有生物学活性, 对动物细胞的作用更为明显。MIC 为 $0.1 \sim 1\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 倍 MIC 2h 后存活细胞就降到 38%, 在 24h 后只有 0.2%, 其中有 18% 具有抗性, 其余存活是因为细胞碎片阻止了药物与它的接触。从实验可以看出它对多种生物大分子的合成都有影响, 但对 RNA 聚合酶, 尤其对 RNA 聚合酶 I 型与 III 型的作用更为显著。

Ripostatins^[14] 对鼠的红细胞的抑制作用很高。大肠杆菌的大分子合成的实验表明它在 45min 内使蛋白质、DNA 的合成降低, 15min 内使尿嘧啶无法与 RNA 聚合酶结合使 RNA 合成停止。Rifampicin 与 Soangicin 有交叉反应, 但是对 Rifampicin 抗性的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 突变株对 Ripostatins 与 Soangicin 没有活性, 因为它们的作用机理不同。

Ratjadon^[15] 的结构与 Leptomycin 相似, 大约 400 株菌中有 20% 的可以产生。Ratjadon 对酵母和卵菌纲低等真菌有强抑制活性 (MIC = $40\text{ng}/\text{mL}$), 对小鼠 L929 的 IC_{50} 是 $50\text{pg}/\text{mL}$, 对 Hela K133.1 是 $40\text{pg}/\text{mL}$ 。Ratjadon 的作用使酵母的形态变长成菌丝状。结构中的 $\text{C}_1\text{—C}_{11}$ 与抗肿瘤化合物 Anguinomycin A 结构中 $\text{C}_{13}\text{—C}_{24}$ 相同。Ratjadon 与 Anguinomycin A、Leptomycins 和 Kazusamycin 不但在结构上相似, 而且在生物活性上也相似。5 倍 MIC 的量对粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 没有作用, 100 倍 MIC 对 RNA 合成有影响。对 Ratjadon 的作用机制研究表明它抑制 *crm-1-809* 基因的功能。*crm-1-809* 基因与保持染色体高度有序的结构、纠正基因的表达以及与细胞保持正确分裂有关。

3 展望

从以上的分析看, 纤维堆囊菌的代谢产物, 主要的作用对象是真核生物。不但对各种真菌, 而且对肿瘤细胞也有普遍的活性。在我们的分析泛筛工作中也证明了这一点。继续寻找更多的新抗生素可以有 3 种策略^[1]: (1) 增加已知物的产量。改变培养条件可以使产量提高 10 至 50 倍; 克隆聚酮合成酶 (polyketide synthase, PKS) 基因在生

长优势菌中表达也是提高产量的有效途径之一。如 Tang^[16] 等人克隆出纤维堆囊菌的 PKS 基因簇在天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) CH 999 得到表达。(2) 对更多菌株进行筛选。目前只有不到 1000 株的纤维堆囊菌进行过系统的筛选。(3) 建立新的筛选方法。目前用于粘细菌活性代谢产物筛选的模型较为单调简单, 进一步利用各种新建立的筛选模型深入分析纤维堆囊菌的代谢产物, 将使我们对该类资源的认识进一步深入。

从纤维堆囊菌中筛选天然活性化合物的工作在全球也还仅限于少数几个实验室, 国内开展有关工作的单位主要有山东大学, 其困难主要在于资源的分离纯化和培养发酵技术。随着新的药物筛选模型的应用和对粘细菌生长本质的认识, 相信在不久的将来纤维堆囊菌的次级代谢产物会在医药尤其在抗肿瘤领域会有很大的作用。

参 考 文 献

- [1] Hans R, Klaus G, Herbert I, et al. Tibtech, 1988, 6: 115 ~ 121.
- [2] 李越中, 李 健. 微生物学通报, 1997, 24 (4): 237 ~ 240.
- [3] 李越中, 周 路, 张 勇, 等. 微生物学报, 2000, 40 (6): 652 ~ 656.
- [4] GBF Scientific Annual Report, 1994: 20 ~ 21.
- [5] Herbert I, Rolf J, Klaus G, et al. J. Antibiot, 1995, 48 (9): 962 ~ 966.
- [6] Herbert I, Rolf J, Klaus G, et al. J. Antibiot, 1995, 48 (8): 886 ~ 887.
- [7] Klaus G, Peter W, Gerhard H, et al. J. Antibiot, 1996, 49 (1): 71 ~ 75.
- [8] Klaus G, Norbert B, Gerhard H, et al. J. Antibot, 1994, 47 (1): 23 ~ 31.
- [9] Gerhard H, Heinrich S, Klaus G, et al. Liebigs Ann. Chem, 1991, 941 ~ 945.
- [10] Gerth K, Bedorf N, Irschik H, et al. J. Antibiot, 1996, 49 (1): 560 ~ 570.
- [11] Nicolaou K C, David H, et al. Pure Appl Chem, 1999, 71 (6): 989 ~ 997.
- [12] Herbert I, Dietmar S, Klaus G, et al. J. Antibiot 1995, 48 (1): 26 ~ 30.
- [13] Herbert I, Dietmar S, Klaus G, et al. J. Antibiot, 1995, 48 (1): 31 ~ 35.
- [14] Herbert I, Hermann A, Klaus G, et al. J. Antibiot, 1995, 48 (8): 787 ~ 792.
- [15] Klaus G, Dietmar S, Gerhard H, et al. J. Antibiot, 1995, 48 (9): 973 ~ 976.
- [16] Tang L, Shah S, Chung L, et al. Science, 2000, 287: 640 ~ 642.