

海洋环肽研究进展

ADVANCE ON THE STUDY OF CYCLOPEPTIDES FROM MARINE

吴志军 熊慧萍 徐祖洪 李智恩

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

海洋生物种类繁多,其生活环境与陆生生物有着显著的差异,因此,海洋生物具有不同于陆生生物的化学性质。海洋生物中肽类化合物,特别是环肽类化合物,在抗肿瘤、抗病毒、抗菌以及酶抑制剂活性方面显示了巨大的开发潜力,这方面的研究一直是海洋天然产物化学研究中最吸引人、最活跃的领域之一。本文综述了这方面的研究概况。

1 来源

自1980年,美国学者 Chris Ireland 等人报道从海鞘 *Lissoclinum patella* 中分离得到第一个具抗肿瘤活性的环肽 Uithiacyclamide 以来,环肽化合物一直是海洋天然产物研究最活跃的领域之一^[1]。从1980年到

1996年底从海洋生物中已分离并鉴定了197个环肽化合物^[2],其来源于海鞘、海绵、软体动物、绿藻、蓝-绿藻以及微生物,其中大部分化合物来源于海鞘和海绵,原因可能是这两大类生物环肽含量高,样品容易采集的缘故。

2 提取与分离

环肽化合物的提取和分离有两种方法,一是采用经典的生物碱提取法,即酸溶碱化萃取处理后,再用柱层析分离。二是用甲醇或乙醇提取后,提取物经石油醚脱脂,用氯仿或乙酸乙酯萃取划段,再通过柱层

表 1 海洋环肽来源及化合物名称一览表

| 来源 | 化合物名称 | 来源 | 化合物名称 |
|--------------------------------|---|--------------------------------|--|
| 海鞘(Tunicate) | | 海绵(Sponge) | |
| <i>Diazona chinensis</i> | Diazona mide A Diazona mide B | <i>Aciculites orientalis</i> | Aciculitin B Aciculitin C |
| <i>Didemnum molle</i> | Mollamide Cyclodide minamide | <i>Anchinea tenacior</i> | Anchinopeptolide A Anchinopeptolide B Anchinopeptolide C Anchinopeptolide D Cycloanchinopeptolide C |
| <i>Lissoclinum bistratum</i> | Bistratamide A Bistratamide B Bistratamide C Bistratamide D Cycloazoline Nairamide A Nairamide B | <i>Axinella cf. carteri</i> | Axinastatin 2 Axinastatin 3 Axinastatin 4 Axinastatin 5 |
| <i>Lissoclinum patella</i> | Ulithiacyclamide Ulithiacyclamide B Ulicyclamide Preulithiacyclamide Ascidiacyclamide Patellamide A Patellamide B Patellamide C Patellamide D Patellamide E Patellamide F Patellin 1 Patellin 2 Patellin 3 Patellin 4 Patellin 5 Patellin 6 Lissoclina mide 4 Lissoclina mide 5 Lissoclina mide 6 Lissoclina mide 7 Lissoclina mide 8 Trunkamide A Tawicyclamide A Tawicyclamide B Preliossoclina mide 2 Prepatellamide B formate | <i>Axinella sp.</i> | Axinastatin 1 |
| | | <i>Callipelta sp.</i> | Callipeltin A Callipeltin B |
| | | <i>Cribrochalina olmeda</i> | Kapakahine A Kapakahine B Kapakahine C Kapakahine D |
| | | <i>Cymbastela sp.</i> | Geodia molide G |
| | | <i>Discodermia kiiensis</i> | Discokiolide A Discokiolide B Discokiolide C Discokiolide D Discokiolide E Discobahamin F Discobahamin G Polydisca mide H |
| | | <i>Discodermia sp.</i> | Discobahamin A Discobahamin B Polydisca mide A |
| | | <i>Disidea arenaria</i> | Arenastatin A |
| | | <i>Geodia sp.</i> | Geodia molide A Geodia molide B |
| <i>Trididemnum cyanophorum</i> | [D pro ⁴] didemnin B Didemnin H Didemnin M Didemnin N Didemnin X Didemnin Y Nordidemnin N Epididemnin A | <i>Halichondria cylindrata</i> | Halicylindramide A Halicylindramide B Halicylindramide C Halicylindramide D |
| <i>Trididemnum solidum</i> | Didemnin A Didemnin B Didemnin C Didemnin D Didemnin E Nordidemnin B | <i>Hymeniacidon sp.</i> | Hymenistatin 1 Hymenamide A Hymenamide B Hymenamide C Hymenamide D Hymenamide E Hymenamide F Hymenamide G Hymenamide H Hymenamide J |
| 海绵(Sponge) | | | |
| <i>Aciculites orientalis</i> | Aciculitin A | | |

表 1(续)

| 来源 | 化合物名称 | 来源 | 化合物名称 |
|--------------------------------|---|----------------------------------|---|
| <i>Hymeniacidon</i> sp. | Hymenamide K | <i>Theonella</i> sp. | Keramide H Keramide J |
| <i>Ircinia dendroides</i> | Waiakeamide | <i>Theonella swinhoei</i> | Theonellapeptolide Ia Theonellapeptolide Ib Theonellapeptolide Ic Motuparin Theonegramide Thonellapeptolide IID Cyclotheonamide C Cyclotheonamide D Cyclotheonamide E |
| <i>Jaspis johustoni</i> | Jaspadamide | 软体动物(Molluscs) | |
| <i>Leucophloeus fenestrata</i> | Fenestrin A Fenestrin B | <i>Dolabella auricularia</i> | Dolastatin 3 Dolastatin 11 Dolastatin 12 Dolastatin 13 Dehydrodolastatin 13 Dolastatin 14 Dolastatin D Dolastatin G Doliculide Nordolastatin G Aurilide |
| <i>Microscleroderma</i> sp. | Microsclerodermin A Microsclerodermin B | <i>Onchidium</i> sp. | Onchidin Onchidin B |
| <i>Neosiphonia superstes</i> | Neosiphonamide A | <i>Philineopsis speciosa</i> | Kulolide |
| <i>Phakellia carteri</i> | Phakellistatin 3 Isophakellistatin 3 | <i>Pleurobranchus forskalii</i> | Keenamide A |
| <i>Phakellia costata</i> | Phakellistatin 1 Phakellistatin 2 Phakellistatin 4 Phakellistatin 5 Phakellistatin 6 Phakellistatin 7 Phakellistatin 8 Phakellistatin 9 Phakellistatin 10 Phakellistatin 11 | 微生物(Microorganism) | |
| <i>Pseudoaxinella massa</i> | Pseudoaxinellin | <i>Alteromonas luteoviolacea</i> | Alterobactin A |
| <i>Pseudaxinyssa</i> sp. | Malaysiastatin Geodiaamide C Geodiaamide D Geodiaamide E Geodiaamide F | <i>Bacillus cereus</i> | Homocerculide Cerculide |
| <i>Stylotella aurantium</i> | Stylopeptide 1 | <i>Bacillus pumilus</i> | Bacircine 1 Bacircine 2 Bacircine 3 Bacircine 4 Bacircine 5 |
| <i>Stylotella</i> sp. | Stylopeptide 1 | <i>Bacillus</i> sp. | Halobacillin Loloatin B |
| <i>Theonella</i> sp. | Theonellapeptolide Id Theonellapeptolide Ie Theonellamide A Theonellamide B Theonellamide C Theonellamide D Theonellamide E Theonellamide F Cyclotheonamide A Cyclotheonamide B Orbiculamide A Konbamide Keramamide A Keramamide B Keramamide C Keramamide D Keramamide F Perthamide B Keramamide E Keramamide G | <i>Cassiopeia xamachana</i> | Salinamide A Salinamide B |
| | | <i>Lynbya majuscula</i> | Antillatoxin |
| | | 绿藻(Green algae) | |
| | | <i>Bryopsis</i> sp. | Kahalalide A Kahalalide B Kahalalide C Kahalalide D Kahalalide E |

表 1(续)

| 来源 | 化合物名称 |
|-----------------------------------|--|
| 绿藻 (Green algae) | |
| <i>Bryopsis</i> sp. | Kahalalide F |
| 蓝-绿藻 (Blue-green algae) | |
| <i>Horamothonia enteromorphae</i> | Horamothonin A |
| <i>Lynogbrya majuscula</i> | Majusculamide C 57-normajusculamide C |
| <i>Nodularia spumigena</i> | Nodularin |

析、高效液相、制备薄层以及化学衍生化等方法分离^[2]。例如 Orbiculamide A 化合物的提取分离就采用此法。海绵 (*Theonella* sp.) 10.5 kg 用乙醇提取,回收乙醇后,提取物悬浮于适量水中,用乙醚萃取,乙醚层部分回收乙醚后得 70.9 g 样品,样品在正己烷-甲醇/水(9:1)中进行分配,含水甲醇层部分先用闪式硅胶 ODS 柱和葡聚糖凝胶 Sephadex LH20 柱,以含水甲醇溶液洗脱进行粗分,所得活性部分最后用离心薄层层析法(正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水=3:7:5:5)和反相高效液相法(ODS, 60%~70%甲醇溶液,内含 0.05% TFA)进行纯化,分离得到 Orbiculamide A 无色粉末纯品 39.2 mg,得率为 3.7×10^{-4} % (海绵湿重)。

3 结构鉴定

海洋环肽化合物分子中,除含有陆生生物常见的氨基酸亮氨酸、丝氨酸、色氨酸等以外,通常还含有不常见的氨基酸,如 β -氨基酸、N 取代氨基酸以及含有卤素、硫元素和噻唑等基团。一般提取分离得到的环肽化合物样品量都比较少,因此,对这类化合物进行鉴定时必须采取有效的步骤。下面介绍利用现代 NMR、MS 等新技术对海洋环肽结构鉴定步骤^[3]。

(1) 先进行 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 测定。此项不损失样品量,可提供氨基酸残基质子和碳的化学位移大致归属。

(2) 进行质谱 HR-FAB MS 和 FAB MS 测定。此项只损失 μg 级的样品量,可提供环肽化合物精确的分子量和分子式组成,由分子式组成可算出该化合物的不饱和度,同时, FAB MS 还可提供环肽化合物分子某些重要的碎片结构以及氨基酸的连接顺序等信

息。

(3) 应用 HMQC, HMBC, ^1H H COSY, TOSCY, HMQC TOCSY 等二维核磁技术,并结合质谱 FAB MS 提供的信息,对环肽化合物分子的化学位移进行全指定,并确定氨基酸的连接顺序。

(4) 酸水解后应用氨基酸自动分析仪进行氨基酸组成分析。

(5) 应用 L 或 D 型氨基酸氧化酶酶解测定氨基酸绝对构型。

(6) 应用 NOESY 和 ROESY 核磁技术以及 CD 和 X-ray 等方法分析环肽的构象。

最后,综合以上结构所得信息,提出其结构和构象分析结果。在实际环肽化合物分子结构的鉴定中,并不一定照搬以上全部步骤,通常进行(1)~(4)步骤,并结合文献资料,就能解释出环肽的结构。

4 生物活性

环肽化合物具有多方面的生物活性^[5,6],从海兔 *Dolabella auncularia* 中分离得到的 Dolastatin 3,具细胞毒活性,对小鼠 P388 淋巴细胞白血病,其 $\text{ED}_{50} < 1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\text{ml}$ 。Dolastatin 13 能强烈地抑制 PS 细胞的生长,其 ED_{50} 值为 $0.013 \mu\text{g}/\text{ml}$,而 Dehydrodolastatin 13 对 PS 细胞的生长几乎没有抑制作用,这两个化合物表现出来的活性反映了它们之间的构效关系。Dolastatin 10 对 P388 白血病细胞的 IC_{50} 为 $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$,具有很强的抗肿瘤生物活性,目前,该药已进入临床 II 期实验阶段。从海绵 *Theonella* sp. 中分离出含溴元素的环肽 *Theonella* mide F,能够抑制各种病原菌的生长,抗菌浓度为 $3 \sim 12 \mu\text{g}/\text{ml}$,对 E1210 细胞和 P388 淋巴白血病细胞毒 IC_{50} 分别为 $3.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $2.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。从海绵 *Geodia* sp. 中分离得到的环肽 *Geodia* molid A 和 *Geodia* molid B,它们对 E1210 细胞毒活性更强,分别为 $0.032 \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $0.0026 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。从海鞘 *Tiuidenum* sp. 中分离得到的 Dide min 系列环肽,都具有不同程度的抗肿瘤活性,其中 Dide min A、B 和 C,在体外和体内都具有抗病毒和抗肿瘤活性,Dide min B 的活性表现最强,对 E1210 细胞的 IC_{50} 值为 $1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$,对 P388 白血病的 T/C 值为 199%。目前 Dide min B 已能够进行人工全合成,该药完成了临床 II 期实验,最有希望开发成治疗癌症的新药。从海洋微生物 *Altenomonas luteoviolacea* 中

分离得到的 *Alterobactin A* 能强烈地络合铁离子,其络合常数 K 值达 $10^{49} \sim 10^{53}$ 。

5 结语

海洋环肽在过去 20 a 的研究中已发展成为海洋天然产物的一个新领域,发现了许多具独特结构及生理活性的先导化合物,如 *Dide min B*, *Orbiculamide A*, *Dolastatin 10*, *Dolastatin 13* 等。由于环肽化合物的人工合成技术比较成熟,通过从海洋生物中筛选出高活性的先导环肽化合物,然后用人工合成或利用生物技术从海洋生物中大量培养繁殖含高活性环肽化合物,从中开发出抗肿瘤药物,将是海洋环肽研究和

发展的主要方向。

参考文献

- 1 邓松之。天然产物研究与开发,1997,1:56~64
- 2 谭宁华等。药学学报,1997,5:388~399
- 3 赵玉瑞等。 *Chinese Chemical Letters*, 1996, 2: 149~152
- 4 D. John Faulkner. *Natural Product Reports*, 1998, 113~158
- 5 D. John Faulkner. *Natural Product Reports*, 1996, 75~125
- 6 D. John Faulkner. *Natural Product Reports*, 1997, 259~302

(本文编辑:张培新)