

· 论著 ·

中国南海海绵 *Mycale* sp. 的化学成分研究

孙佳宝¹, 王淑萍¹, 王洁², 刘莉¹, 韩兵男¹, 林厚文¹ (1. 上海交通大学医学院附属仁济医院药学部, 上海 200127; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的 对采自中国南海海绵 *Mycale* sp. 的化学成分进行研究。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相色谱等多种色谱学分离手段, 对海绵 *Mycale* sp. 的乙酸乙酯萃取层进行分离纯化; 应用现代波谱技术, 结合理化性质与文献报道对化合物进行结构鉴定; 用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法对化合物进行体外人乳腺癌细胞株 MCF-7 及人肺癌细胞株 PC9 细胞生长抑制活性进行测试。结果 共分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为: 环(脯-异亮)二肽 [*cyclo*(Pro-Ile)] (1), 环(脯-亮)二肽 [*cyclo*(Pro-Leu)] (2), 环(异亮-亮)二肽 [*cyclo*(Ile-Leu)] (3), 环(苯丙-脯)二肽 [*cyclo*(Phe-Pro)] (4), 环(苯丙-缬)二肽 [*cyclo*(Phe-Val)] (5), 环(苯丙-亮)二肽 [*cyclo*(Phe-Leu)] (6), 环(苯丙-异亮)二肽 [*cyclo*(Phe-Ile)] (7), 2'-deoxythymidine (8), 胸腺嘧啶 (thymine) (9), 5-hydroxy-3,4-dimethyl-5-pentyl-2(5H)-furanone (10)。经体外活性筛选发现, 这些化合物对 MCF-7 及 PC9 未显示明显的生长抑制活性。结论 化合物 1、2、4、5、6、7 和 10 均为首次从该属海绵中分离得到, 本研究首次对化合物 1~10 的抗肿瘤活性进行了评价。

[关键词] *Mycale* sp.; 化学成分; 环二肽; 生长抑制活性

[中图分类号] R284

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)04-0308-07

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.006

Study on chemical constituents of sponge *Mycale* sp. from the South China Sea

SUN Jiabao¹, WANG Shuping¹, WANG Jie², LIU Li¹, HAN Bingnan¹, LIN Houwen¹ (1. Department of Pharmacy, Renji Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200127, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the chemical constituents of marine sponge *Mycale* sp. collected from the South China Sea. **Methods** The ethyl acetate extract of the marine sponge *Mycale* sp. was separated and purified by repeated column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The structures of these compounds were identified by means of various modern spectroscopic techniques and comparison with their physicochemical properties to reported data. The tumor cell growth inhibitory activities of these compounds against human breast cancer cell lines MCF-7 and human lung cancer cell lines PC9 were tested by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) method. **Results** Ten compounds were isolated and identified as *cyclo*(Pro-Ile) (1), *cyclo*(Pro-Leu) (2), *cyclo*(Ile-Leu) (3), *cyclo*(Phe-Pro) (4), *cyclo*(Phe-Val) (5), *cyclo*(Phe-Leu) (6), *cyclo*(Phe-Ile) (7), 2'-deoxythymidine (8), thymine (9), 5-hydroxy-3,4-dimethyl-5-pentyl-2(5H)-furanone (10). These compounds showed weak tumor cell growth inhibitory activities toward cells MCF-7 and PC9 *in vitro*. **Conclusion** Compounds 1, 2, 4, 5, 6, 7 and 10 were isolated from the sponge *Mycale* sp. for the first time. It is the first time to report the antitumor activity evaluation for compounds 1~10.

[Key words] *Mycale* sp.; chemical constituents; cyclic dipeptide; growth inhibitory activity

海绵属 (*Mycale*) 为寻常海绵纲 (Demospongiae)、异骨海绵目 (Poecilosclerida)、海绵科 (Mycaleidae), 主要分布在西印度洋、太平洋热带、北大西

洋及亚热带水域。该属海绵的研究报道起始于 20 世纪 80 年代, 主要集中在 *Mycale laxissima*, *Mycale adhaerens*, *Mycale hentscheli* 等种, 其次代谢产物主要包括: 生物碱类, 如 2-甲醛基-5-烷基吡咯类衍生物; 聚酮类, 如三咪唑大环内酯类; 萜类, 如环内过氧降二倍半萜类; 脂类, 如神经酰胺类; 肽类, 如环四肽等^[1-6]。肽类化合物作为该属海绵的特征性化学成分, 具有较为突出的生物活性, 如从 *M. izuensis* 中得到的 5 个环四肽 azumamides A~E,

[基金项目] 国家自然科学基金 (81373321)

[作者简介] 孙佳宝, 硕士研究生。研究方向: 海洋药物化学。Tel: 13764518896; Email: sunjiabaojiayou@163.com

[通讯作者] 韩兵男, 博士, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 海洋药物化学。Tel: 17721088007; Email: hanbingnar@shsmu.edu.cn

对组蛋白脱乙酰基酶有很强的抑制作用^[6]。山海绵属的次生代谢产物具有广泛的生物活性,如细胞毒、抗菌、抗病毒等^[7-9]。

本课题组基于该属海绵的化学和生物学多样性,为寻找潜在的高效低毒先导化合物,对采自我国

南海山海绵 *Mycale* sp. 的乙酸乙酯萃取部分的化学成分进行了研究,从中分离得到 10 个化合物,包括 7 个环二肽(1~7),2 个核苷类化合物(8~9),1 个内酯类化合物(10)。应用现代波谱技术,结合理化性质与文献报道对这些化合物的结构进行了鉴定(图 1)。

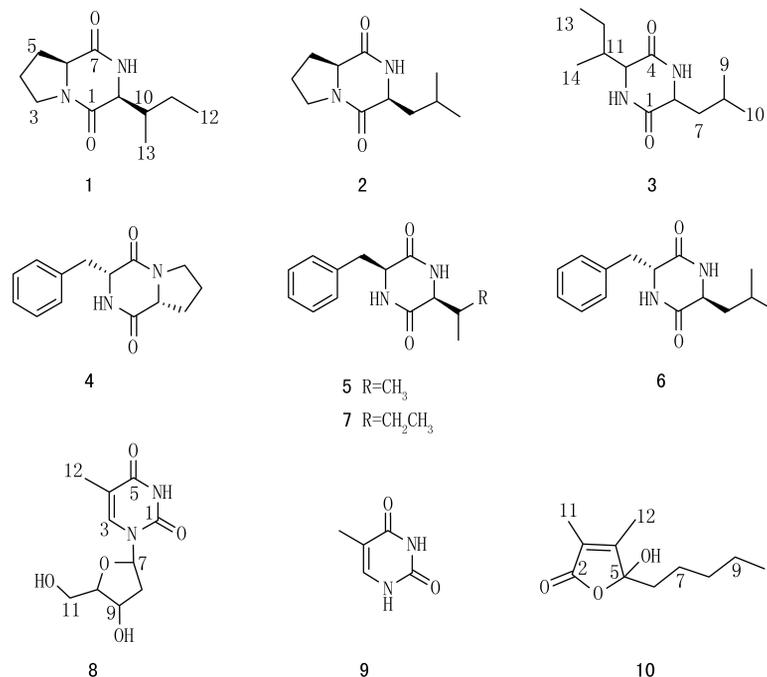


图 1 化合物 1~10 的结构图

1 材料和方法

1.1 实验仪器与试剂 Bruker AVANCE-600 核磁共振仪(德国布鲁克仪器有限公司);Waters Q-Tof micro YA019 质谱仪(美国沃特世科技有限公司);Waters 1525/2996、2998 高效液相色谱仪(美国沃特世科技有限公司);EYELA-1000 型旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社);Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech 公司);硅胶(200~300 目,烟台江友硅胶开发有限公司);ODS (C₁₈ 反相硅胶,粒径 15 μm,北京绿百草科技发展有限公司);色谱级甲醇、乙腈(上海阿达玛斯试剂有限公司);其他有机试剂均为分析纯(中国医药集团上海化学试剂公司);氘代试剂(Cambridge Isotope Laboratories, Inc.);显色剂为 10% 硫酸香草醛溶液。

1.2 样品来源及鉴定 海绵样品于 2013 年 6 月采自中国南海西沙群岛,由中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定为 *Mycale* sp.,标本存放于上海交通大学医学院附属仁济医院药学部海洋药物研究中心。

1.3 样品的提取分离与纯化 将干燥后的海绵样品(*Mycale* sp. 干重 650 g)粉碎,甲醇超声提取 4 次(3 L/次,120 min),合并提取液,减压浓缩得到总浸膏 92 g。将总浸膏混悬于 90% 的甲醇水溶液中,用石油醚等体积萃取 3 次,合并萃取液并浓缩得到石油醚层浸膏 14.7 g;加水将混悬液的甲醇浓度调整至 60%,用二氯甲烷等体积萃取 3 次,合并萃取液并浓缩得到二氯甲烷层浸膏 3.6 g;加水将混悬液的甲醇浓度调整至 40%,用乙酸乙酯等体积萃取 3 次,合并萃取液并浓缩得到乙酸乙酯层浸膏 2.2 g。乙酸乙酯层浸膏经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱法(甲醇洗脱)分离得到 8 个组分 E1~E8。其中,E2(1.5 g)经反相硅胶柱色谱梯度洗脱(30%~100% 乙腈-水,6 h)得到 10 个组分 E2A~E2J,E2B 组分(93 mg)再经反相硅胶柱色谱梯度洗脱(10%~100% 乙腈-水,7 h)得到 13 个组分 E2B1~E2B13,其中,E2B5(5.7 mg)、E2B7(6.8 mg)、E2B9(6.6 mg)、E2B10(10.3 mg)和 E2B11(5.8 mg)分别经反相高效液相色谱仪(RP-HPLC, YMC-Pack Pro C₁₈ 柱,10 mm × 250 mm,5 μm,流速:2 ml/min)纯化得到化合物 1(2.4 mg,15% 乙腈-

水, 20.5 min)、化合物 **2** (5.3 mg, 15% 乙腈-水, 24.0 min)、化合物 **5** (2.0 mg, 20% 乙腈-水, 31.0 min)、化合物 **3** (2.0 mg, 25% 乙腈-水, 21.5 min)、化合物 **6** (1.5 mg, 25% 乙腈-水, 26.0 min)、化合物 **7** (1.6 mg, 25% 乙腈-水, 27.5 min)、化合物 **10** (2.2 mg, 50% 甲醇-水, 41.5 min), E2C 组分 (19 mg) 经 RP-HPLC (YMC-Pack Pro C₁₈ 柱, 10 mm × 250 mm, 5 μm, 流速: 2 ml/min) 纯化得到化合物 **4** (5.3 mg, 20% 乙腈-水, 19.0 min)。E3 (310 mg) 经反相硅胶柱色谱梯度洗脱 (10% ~ 100% 乙腈-水, 5 h) 得到 6 个组分 E3A ~ E3F, 其中 E3B (19.3 mg) 和 E3C (20 mg) 分别经 RP-HPLC (YMC-Pack Pro C₁₈ 柱, 10 mm × 250 mm, 5 μm, 流速: 2 ml/min) 纯化得到化合物 **9** (10 mg, 10% 甲醇-水, 11.0 min) 和化合物 **8** (8.4 mg, 7% 甲醇-水, 24.0 min)。

2 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。10% 硫酸香草醛显白斑, 紫外灯下观察无荧光点, 提示可能为环肽类成分。ESI-MS m/z 211.11 [M+H]⁺, 提示分子量为 210, 结合 ¹H NMR 及 ¹³C NMR 确定分子式为 C₁₁H₁₈N₂O₂, 其分子不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) 在低场区显示出 1 个亚氨基质子信号 δ_H 5.81 (1H, s), 在高场区显示出 2 个甲基质子信号 δ_H 1.05 (3H, d, J=7.2 Hz), 0.93 (3H, t, J=7.2 Hz)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) 结合 DEPT 谱共显示出 11 个碳信号, 2 个羰基碳信号 (δ_C 169.8, 164.9), 3 个次甲基碳信号 (δ_C 60.5, 58.8, 35.3), 4 个亚甲基碳信号 (δ_C 45.1, 28.5, 24.0, 22.4), 2 个甲基碳信号 (δ_C 15.9, 12.1)。其核磁共振数据如下: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_H 5.81 (1H, s, N-H), 4.07 (1H, t, J=8.4 Hz, H-6), 3.97 (1H, brs, H-9), 3.63 (1H, m, H-3a), 3.55 (1H, m, H-3b), 2.37 (1H, m, H-10), 2.31 (1H, m, H-5a), 2.04 (2H, m, H-5b, H-4a), 1.90 (1H, m, H-4), 1.43 (1H, m, H-11a), 1.17 (1H, m, H-11b), 1.05 (3H, d, J=7.2 Hz, H₃-13), 0.93 (1H, t, J=7.2 Hz, H₃-12)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ_C 169.8 (C-1), 164.9 (C-7), 60.5 (C-9), 58.8 (C-6), 45.1 (C-3), 35.3 (C-10), 28.5 (C-5), 24.0 (C-11), 22.4 (C-4), 15.9 (C-13), 12.1 (C-12)。以上数据与文献[10]报道基本一致, 故确定化合物 **1** 为环(脯-异亮)二肽 [cyclo-(Pro-Ile)]。

化合物 **2**: 白色粉末。10% 硫酸香草醛显白斑,

紫外灯下观察无荧光点, 提示可能为环肽类成分。ESI-MS m/z 211.21 [M+H]⁺, 提示分子量为 210, 结合 ¹H NMR 及 ¹³C NMR 确定分子式为 C₁₁H₁₈N₂O₂, 为化合物 **1** 的同分异构体, 其分子不饱和度为 4。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) 在低场区显示出 1 个亚氨基质子信号 δ_H 5.98 (1H, s), 在高场区显示出 2 个甲基质子信号 δ_H 1.00 (3H, d, J=6.6 Hz), 0.95 (3H, d, J=6.6 Hz)。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) 结合 DEPT 谱共显示出 11 个碳信号, 2 个羰基碳信号 (δ_C 170.2, 166.1), 3 个次甲基碳信号 (δ_C 59.0, 53.4, 24.7), 4 个亚甲基碳信号 (δ_C 45.5, 38.6, 28.1, 22.7), 2 个甲基碳信号 (δ_C 23.3, 21.2)。其核磁共振数据如下: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_H 5.98 (1H, s, N-H), 4.11 (1H, t, J=7.8 Hz, H-6), 4.01 (1H, dd, H-9), 3.59 (1H, m, H-3a), 3.54 (1H, m, H-3b), 2.35 (1H, m, H-5a), 2.12 (1H, m, H-5b), 2.06 (1H, m, H-4a), 2.02 (1H, m, H-10a), 1.90 (1H, m, H-4b), 1.75 (1H, m, H-11), 1.52 (1H, m, H-10b), 1.00 (1H, d, J=6.6 Hz, H₃-12), 0.95 (3H, d, J=6.6 Hz, H₃-13)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ_C 170.2 (C-1), 166.1 (C-7), 59.0 (C-6), 53.4 (C-9), 45.5 (C-3), 38.6 (C-10), 28.1 (C-5), 24.7 (C-11), 23.3 (C-12), 22.7 (C-4), 21.2 (C-13)。以上数据与文献[11]报道数据基本一致, 故确定化合物 **2** 为环(脯-亮)二肽 [cyclo-(Pro-Leu)]。

化合物 **3**: 白色粉末。10% 硫酸香草醛显白斑, 紫外灯下观察无荧光点, 提示可能为环肽类成分。ESI-MS m/z 227.23 [M+H]⁺, 提示分子量为 226, 结合 ¹H NMR 及 ¹³C NMR 确定分子式为 C₁₂H₂₂N₂O₂, 其分子不饱和度为 3。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) 在高场区显示出 4 个甲基质子信号 δ_H 1.03 (3H, d, J=7.2 Hz), 0.98 (3H, d, J=6.6 Hz), 0.96 (3H, d, J=6.6 Hz), 0.95 (3H, t, J=7.2 Hz)。¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) 结合 DEPT 谱共显示出 12 个碳信号, 2 个羰基碳信号 (δ_C 171.2, 169.6), 4 个次甲基碳信号 (δ_C 60.9, 54.3, 40.5, 25.3), 2 个亚甲基碳信号 (δ_C 45.8, 25.9), 4 个甲基碳信号 (δ_C 23.6, 21.9, 15.7, 12.1)。其核磁共振数据如下: ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ_H 3.95 (1H, dd, J=9.6, 4.8 Hz, H-3), 3.85 (1H, dd, J=4.2, 0.6 Hz, H-6), 1.94 (1H, m, H-7a), 1.86 (1H, m, H-7b), 1.75 (1H, m, H-11), 1.61 (1H, m, H-8), 1.54 (1H, m, H-12a), 1.25 (1H, m, H-12b), 1.03 (3H, d, J=7.2 Hz, H-14), 0.98 (3H, d, J=6.6 Hz, H-10), 0.96 (3H, d, J=6.6 Hz, H-9), 0.95 (3H, t, J=

7.2 Hz, H-13)。¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 171.2 (C-1), 169.6 (C-4), 60.9 (C-3), 54.3 (C-6), 45.8 (C-7), 40.5 (C-11), 25.9 (C-12), 25.3 (C-8), 23.6 (C-10), 21.9 (C-9), 15.7 (C-14), 12.1 (C-13)。以上数据与文献[12]报道基本一致,故确定化合物**3**为环(异亮-异)二肽[*cyclo*-(Ile-Leu)]。

化合物**4**:白色粉末。10% 硫酸香草醛显白斑,紫外灯下观察无荧光点,提示可能为环肽类成分。ESI-MS m/z 245.13[M+H]⁺,提示分子量为244,结合¹H NMR及¹³C NMR确定分子式为C₁₄H₁₆N₂O₂,其分子不饱和度为8。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃)在低场区显示出5个芳香质子信号 δ_H 7.36 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 7.29 (1H, t, $J=7.2$ Hz), 7.23 (2H, t, $J=7.2$ Hz),说明分子中有1个单取代苯环,低场区还显示出1个亚氨基质子信号 δ_H 5.60 (1H, brs), 2个羰基(质子信号 δ_H 4.28 (1H, dd, $J=10.8, 3.6$ Hz), 4.08 (1H, t, $J=7.8$ Hz))。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃)结合 DEPT 谱共显示出14个碳信号,2个羰基碳信号(δ_C 169.5, 165.2),1个芳香季碳信号(δ_C 136.1),5个芳香次甲基碳信号(δ_C 129.5, 129.5, 129.2, 129.2, 127.7),2个次甲基碳信号(δ_C 59.3, 56.3),4个亚甲基碳信号(δ_C 45.6, 36.9, 28.5, 22.7)。其核磁共振数据如下:¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_H 7.36 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-13, H-15), 7.29 (1H, t, $J=7.2$ Hz, H-14), 7.23 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-12, H-16), 5.60 (1H, brs, N-H), 4.28 (1H, dd, $J=10.8, 3.6$ Hz, H-9), 4.08 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-6), 3.65 (1H, m, H-3a), 3.63 (1H, m, H-10a), 3.57 (1H, m, H-3b), 2.78 (1H, dd, $J=14.4, 10.8$ Hz, H-10b), 2.34 (1H, m, H-5a), 2.02 (2H, m, H-5b, H-4a), 1.91 (1H, m, H-4b)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 169.5 (C-1), 165.2 (C-7), 136.1 (C-11), 129.5 (C-13), 129.5 (C-15), 129.2 (C-12), 129.2 (C-16), 127.7 (C-14), 59.3 (C-6), 56.3 (C-9), 45.6 (C-3), 36.9 (C-10), 28.5 (C-5), 22.7 (C-4)。以上数据与文献[10]报道基本一致,故确定化合物**4**为环(苯丙-脯)二肽[*cyclo*-(Phe-Pro)]。

化合物**5**:白色粉末。10% 硫酸香草醛显白斑,紫外灯下观察无荧光点,提示可能为环肽类成分。ESI-MS m/z 248.24[M+H]⁺,提示分子量为247,结合¹H NMR及¹³C NMR确定分子式为C₁₄H₁₈N₂O₂,其分子不饱和度为7。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃)在低场区显示出5个芳香质子信号 δ_H 7.35 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 7.29 (1H, t, $J=7.2$ Hz), 7.22 (2H, d, $J=7.2$ Hz),说明分子中有1个单取代苯

环,低场区还显示出2个亚氨基质子信号 δ_H 6.07 (1H, s), 5.84 (1H, s), 2个羰基 α 位质子信号 δ_H 4.23 (1H, brd, $J=10.2$ Hz), 3.89 (1H, t, brs)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃)结合 DEPT 谱共显示出14个碳信号,2个羰基碳信号(δ_C 167.4, 166.8),1个芳香季碳信号(δ_C 135.5),5个芳香次甲基碳信号(δ_C 129.8, 129.7, 129.7, 129.3, 129.3),3个次甲基碳信号(δ_C 60.4, 56.2, 31.5),1个亚甲基碳信号(δ_C 40.7),2个甲基信号(δ_C 18.9, 16.2)。其核磁共振数据如下:¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_H 7.35 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-13, H-15), 7.29 (1H, t, $J=7.2$ Hz, H-14), 7.22 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-12, H-16), 6.07 (1H, s, 5-NH), 5.84 (1H, s, 2-NH), 4.23 (1H, brd, $J=10.2$ Hz, H-3), 3.89 (1H, brs, H-6), 3.46 (1H, dd, $J=13.8, 3.0$ Hz, H-10a), 2.89 (1H, dd, $J=13.8, 10.2$ Hz, H-10b), 2.34 (1H, m, H-7), 1.02 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-8), 0.83 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-9)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 167.4 (C-1), 166.8 (C-4), 135.5 (C-11), 129.7 (C-13), 129.7 (C-15), 129.3 (C-12), 129.3 (C-16), 127.8 (C-14), 60.4 (C-6), 56.2 (C-3), 40.7 (C-10), 31.5 (C-7), 18.9 (C-8), 16.2 (C-9)。以上数据与文献[13]报道基本一致,故确定化合物**5**为环(苯丙-缬)二肽[*cyclo*-(Phe-Val)]。

化合物**6**:白色粉末。10% 硫酸香草醛显白斑,紫外灯下观察无荧光点,提示可能为环肽类成分。ESI-MS m/z 261.16[M+H]⁺,提示分子量为260,结合¹H NMR及¹³C NMR确定分子式为C₁₅H₂₀N₂O₂,其分子不饱和度为7。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD)在低场区显示出5个芳香质子信号 δ_H 7.31 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 7.26 (1H, t, $J=7.2$ Hz), 7.20 (2H, d, $J=7.2$ Hz),说明分子中有1个单取代苯环,低场区还显示出2个羰基 α 位质子信号 δ_H 4.31 (1H, t, $J=4.8$ Hz), 3.65 (1H, dd, $J=9.6, 4.2$ Hz),高场区显示出2个甲基质子信号 δ_H 0.73 (3H, d, $J=6.6$ Hz), 0.69 (3H, d, $J=6.6$ Hz)。¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD)结合 DEPT 谱共显示出15个碳信号,2个羰基碳信号(δ_C 170.6, 168.9),1个芳香季碳信号(δ_C 136.7),5个芳香次甲基碳信号(δ_C 131.8, 131.8, 129.6, 129.6, 128.5),3个次甲基碳信号(δ_C 57.4, 54.1, 24.6),2个亚甲基碳信号(δ_C 45.2, 40.2),2个甲基信号(δ_C 23.4, 21.4)。与化合物**5**的核磁数据比较,化合物**6**多了1个亚甲基碳信号,分子中有亮氨酸的特征性信号。其核磁共振数据如下:¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ_H 7.31 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-14, H-16), 7.26 (1H, t, $J=$

7.2 Hz, H-15), 7.20 (2H, d, $J=7.2$ Hz, H-13, H-17), 4.31 (1H, t, $J=4.8$ Hz, H-6), 3.65 (1H, dd, H-3), 3.29 (1H, dd, $J=13.8, 4.2$ Hz, H-11a), 2.95 (1H, dd, $J=13.8, 4.8$ Hz, H-11b), 1.42 (1H, m, H-7a), 0.92 (1H, m, H-7b), 0.87 (1H, m, H-8), 0.73 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-9), 0.69 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-10)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 170.64 (C-1), 168.9 (C-4), 136.7 (C-12), 131.8 (C-14), 131.8 (C-16), 129.6 (C-13), 129.6 (C-17), 128.5 (C-15), 57.4 (C-6), 54.1 (C-3), 45.2 (C-7), 40.2 (C-11), 24.6 (C-8), 23.4 (C-9), 21.4 (C-10)。以上数据与文献[13]报道基本一致,故确定化合物**6**为环(苯丙-亮)二肽[cyclo-(Phe-Leu)]。

化合物**7**:白色粉末。10%硫酸香草醛显白斑,紫外灯下观察无荧光点,提示可能为环肽类成分。ESI-MS m/z 261.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$,提示分子量为260,结合 ^1H NMR及 ^{13}C NMR确定分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$,其分子不饱和度为7,与化合物**6**为同分异构体。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD)在低场区显示出5个芳香质子信号 δ_{H} 7.27 (2H, m), 7.23 (3H, m),说明分子中有1个单取代苯环,低场区还显示出2个羰基 α 位质子信号 δ_{H} 4.33 (1H, td, $J=4.8, 1.8$ Hz), 3.73 (1H, dd, $J=4.2, 1.8$ Hz),高场区显示出2个甲基质子信号 δ_{H} 0.72 (3H, d, $J=7.2$ Hz), 0.68 (3H, d, $J=6.0$ Hz)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD)结合DEPT谱共显示出15个碳信号,2个羰基碳信号(δ 169.3, 169.2),1个芳香季碳信号(δ 137.0),5个芳香次甲基碳信号(δ 131.6, 131.6, 129.5, 129.5, 128.2),3个次甲基碳信号(δ 60.8, 57.2, 39.8),2个亚甲基碳信号(δ 39.8, 24.7),2个甲基信号(δ 15.3, 12.0)。分子中有异亮氨酸的特征性信号。其核磁共振数据如下: ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ_{H} 7.27 (2H, m, H-14, H-16), 7.23 (3H, m, H-13, H-15, H-17), 4.33 (1H, td, $J=4.8, 1.8$ Hz, H-3), 3.73 (1H, dd, $J=4.2, 1.8$ Hz, H-6), 3.27 (1H, dd, $J=13.8, 4.8$ Hz, H-11a), 3.01 (1H, dd, $J=13.8, 4.8$ Hz, H-11b), 1.43 (1H, m, H-8a), 0.91 (1H, m, H-7), 0.80 (1H, m, H-8b), 0.72 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-10), 0.68 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-9)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 169.3 (C-1), 169.2 (C-4), 137.0 (C-12), 131.6 (C-14), 131.6 (C-16), 129.5 (C-13), 129.5 (C-17), 128.2 (C-15), 60.8 (C-6), 57.2 (C-3), 39.8 (C-7), 39.8 (C-11), 24.7 (C-8), 15.3 (C-10), 12.0 (C-10)。以上数据与文献[13]报道基本一致,故确定化合物**7**为环(苯丙-异亮)二肽[cyclo-(Phe-Ile)]。

化合物**8**:白色粉末。ESI-MS m/z 243.22 $[\text{M}+\text{H}]^+$,提示分子量为242,结合 ^1H NMR及 ^{13}C NMR确定分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$,其分子不饱和度为5。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO)在低场区显示出1个亚氨基质子信号 δ_{H} 11.26 (1H, s),1个烯烃质子信号 δ_{H} 7.69 (1H, s),2个羟基质子信号 δ_{H} 5.22 (1H, d, $J=4.2$ Hz), 5.01 (1H, t, $J=4.8$ Hz),高场区显示出1个甲基质子信号 δ_{H} 1.77 (3H, s)。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO)结合DEPT谱共显示出10个碳信号,其中包括2个羰基碳信号(δ 163.7, 150.4),1个次甲基碳信号(δ 136.1),1个季碳信号(δ 109.3),1个甲基碳信号(δ 12.3)。其核磁共振数据如下: ^1H NMR (600 MHz, DMSO): δ_{H} 11.26 (1H, s, N-H), 7.69 (1H, s, H-3), 6.16 (1H, t, $J=6.6$ Hz, H-7), 5.22 (1H, d, $J=4.2$ Hz, 9-OH), 5.01 (1H, t, $J=4.8$ Hz, 11-OH), 4.23 (1H, m, H-10), 3.75 (1H, dd, $J=6.6, 3.6$ Hz, H-9), 3.59 (1H, m, H-11a), 3.54 (1H, m, H-11b), 2.06 (1H, m, H-8), 1.77 (3H, s, H-12)。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO): δ 163.7 (C-5), 150.4 (C-1), 136.1 (C-3), 109.3 (C-4), 87.2 (C-7), 83.7 (C-10), 70.4 (C-9), 61.3 (C-11), 39.4 (C-8), 12.3 (C-12)。以上数据与文献[14]报道基本一致,故确定化合物**8**为胸腺嘧啶核苷(2'-deoxythymidine)。

化合物**9**:无色结晶,易溶于二氯甲烷。ESI-MS m/z 127.13 $[\text{M}+\text{H}]^+$,提示分子量为126,结合 ^1H NMR及 ^{13}C NMR确定分子式为 $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$,其分子不饱和度为4。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO)在低场区显示出2个亚氨基质子信号 δ_{H} 10.79 (2H, brs),1个烯烃质子信号 δ_{H} 7.24 (1H, s),高场区显示出1个甲基质子信号 δ_{H} 1.72 (3H, s)。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO)结合DEPT谱共显示出5个碳信号,2个羰基碳信号(δ 165.3, 151.9),1个次甲基碳信号(δ 138.2),1个季碳信号(δ 108.0),1个甲基碳信号(δ 12.2)。其核磁共振数据如下: ^1H NMR (600 MHz, DMSO): δ_{H} 10.79 (2H, brs, 1, 2-NH), 7.24 (1H, s, H-6), 1.72 (3H, s, H-7)。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO): δ 165.3 (C-4), 151.9 (C-2), 138.2 (C-6), 108.0 (C-5), 12.2 (C-7)。以上数据与文献[5]报道基本一致,故确定化合物**9**为胸腺嘧啶(thymine)。

化合物**10**:无色油状物。ESI-MS m/z 199.21 $[\text{M}+\text{H}]^+$,提示分子量为198,结合 ^1H NMR及 ^{13}C NMR确定分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_3$,其分子不饱和度为3。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3)在高场区显示出3

个甲基质子信号 δ_{H} 1.94(3H, s), 1.82(3H, s), 0.88(3H, t, $J=6.6$ Hz)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) 结合 DEPT 谱共显示出 11 个碳信号, 4 个季碳信号, 1 个羰基碳信号 (δ : 172.1), 2 个烯基碳信号 (δ : 157.7, 125.5), 1 个杂原子取代季碳信号 (δ : 107.0), 4 个亚甲基碳信号 (δ : 36.2, 31.7, 22.7, 22.6), 3 个甲基碳信号 (δ : 14.1, 10.8, 8.6)。其核磁共振数据如下: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ_{H} 1.98(1H, ddd, $J=13.8, 11.4, 4.2$ Hz, H-6a), 1.94(3H, s, H-12), 1.82(3H, s, H-11), 1.76(1H, ddd, $J=13.8, 11.4, 4.2$ Hz, H-6b), 1.32(1H, m, H-7a), 1.29(4H, m, H₂-8, H₂-9), 1.17(1H, m, H-7b), 0.88(3H, t, $J=6.6$ Hz, H-10)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ : 172.1 (C-2), 157.7 (C-4), 125.5 (C-3), 107.0 (C-5), 36.2 (C-6), 31.7 (C-8), 22.7 (C-7), 22.6 (C-9), 14.1 (C-10), 10.8 (C-12), 8.6 (C-11)。以上数据与文献[15]报道基本一致, 故确定化合物 **10** 为 hydroxydihydrobovalide (5-羟基-3,4-二甲基-5-戊烷基-2(5H)-咪喃酮)。

3 细胞毒活性测试

实验选择人肺癌细胞株 PC9 与人乳腺癌细胞株 MCF-7, 采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法进行活性检测实验。步骤如下: ①取对数生长期细胞制备细胞悬液, 细胞计数; ②接种到 96 孔板中: PC9、MCF-7 细胞以 1.0×10^5 个/ml 接种, 每孔 100 μl 细胞悬液, 每个样品 3 个复孔; ③37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养; ④待细胞贴壁后, 加入不同浓度的待检测化合物(化合物 **1**~**10**; 浓度为 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$; 空白组为 DMSO 处理); ⑤37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养 72 h; ⑥每孔加入 10 μl CCK8; ⑦避光培养 0.5 h 后测定 450 nm 处吸光度 (A), 并计算细胞的存活率: 细胞存活率 = $(A_{\text{处理}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。实验结果显示, 这些化合物对 MCF-7 及 PC9 细胞株未显示出明显的生长抑制活性。

4 讨论

对来自中国西沙群岛海域的海绵 *Mycale* sp. 进行了化学成分研究, 从中分离鉴定出 10 个化合物, 其中包括 7 个环二肽类化合物(**1**~**7**), 2 个核苷类化合物(**8**~**9**), 1 个内酯类化合物(**10**), 化合物 **1**、**2**、**4**、**5**、**6**、**7** 和 **10** 均为首次从该属海绵中分离得到。本实验采用人肺癌细胞株 PC9、人乳腺癌细胞株 MCF-7 进行活性检测实验。实验结果显示, 这些化合物并没有对 MCF-7 及 PC9 细胞株显示出明显的

生长抑制活性。环二肽类化合物一般多出现于海洋微生物的代谢产物中, 海绵与真菌间经常形成共生, 所以笔者猜测这些环二肽类化合物可能来自于与海绵共生的真菌而非海绵本身^[16], 故这些化合物的真正来源以及生物学意义仍有待深入研究。

【参考文献】

- [1] Ortega MJ, Zubia E, Carballo JL, et al. New cytotoxic metabolites from the sponge *Mycale micracanthoxea* [J]. Tetrahedron, 1997, 53(1):331-340.
- [2] Fusetani N, Yasumuro K, Matsunaga S, et al. Mycalolides A-C hybrid macrolides of ulapualides and halichondramide, from a sponge of the genus *Mycale* [J]. Tetrahedron Lett, 1989, 30(21):2809-2812.
- [3] Capon RJ. Two new norsesterterpene cyclic peroxides from a marine sponge, *Mycale* (*Carmia*) cf. *spongiosa* [J]. J Nat Prod, 1991, 54(1):190-195.
- [4] Capon RJ, Macleod JK. Structural and stereochemical studies on marine norterpene cyclic peroxides [J]. Tetrahedron, 1985, 41(16):3391-3404.
- [5] Zhou XF, Lin XP, Guo XY, et al. Chemical constituents of the sponge *Mycale* species from South China Sea [J]. Rec Nat Prod, 2013, 7(2):119-123.
- [6] Nakao Y, Yoshida S, Matsunaga S, et al. Azumamides A-E: histone deacetylase inhibitory cyclic tetrapeptides from the marine sponge *Mycale izuensis* [J]. Angew Chem Int Ed, 2006, 45(45):7553-7557.
- [7] Perry NB, Blunt JW, Munro MHG, et al. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale* [J]. J Am Chem Soc, 1988, 110(14):4850-4851.
- [8] Northcote PT, Blunt JW, Munro MHG. Pateamine: a potent cytotoxin from the New Zealand marine sponge, *mycale* sp. [J]. Tetrahedron Lett, 1991, 32(44):6411-6414.
- [9] West LM, Northcote PT, Battershill CN. Peloruside A: a potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. [J]. J Org Chem, 2000, 65(2):445-449.
- [10] Adamczeski M, Reed AR, Crews P. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx* cf. *podatypa*. [J]. J NatProd, 1995, 58(2):201-208.
- [11] Zhao PJ, Wang HX, Li GH, et al. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces* sp. Lz531 [J]. Chem Biodivers, 2007, 4(5):899-904.
- [12] Wang S, Tan N, Yang Y, et al. Cyclodipeptides from the roots of *Panax notoginseng* [J]. Nat Prod Res Dev, 2004, 16:383-386.
- [13] Shu ZP, Li XL, Xu BQ, et al. Piperazine constituents in fruits of *Physalis alkekengi* var. *francheti* [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2014, 45(4):471-475.
- [14] Ouyang MA. A new adenosyl-alkaloid from *Ostrea rivularis* [J]. Nat Prod Res, 2006, 20(1):79-83.
- [15] 苏丽丽, 唐旭利, 张婧, 等. 中国南海海底柏柳珊瑚化学成分

研究[J]. 中国海洋药物, 2011, 30(5):18-22.

[16] Degenkolb T, Gams W, Br ckner H. Natural cyclopeptaibiotics and related cyclic tetrapeptides: structural diversity and

future prospects[J]. Chem Biodivers, 2008, 5(5):693-706.

[收稿日期] 2017-03-20 [修回日期] 2017-05-19

[本文编辑] 李睿旻

(上接第300页)

因此,临床上为了避免不良反应的发生,应加强关注药物相关不良反应,合理选用抗菌药物,如用药前应仔细询问患者用药史,加强对特殊患者的用药关注等。在用药期间,应根据所用药物可能发生的不良反应及时进行监测,发现问题及时停药,必要时进行相应的对症治疗,以减少不良反应对患者的伤害,提高医疗服务质量。

【参考文献】

[1] Yilmaz C, Ozcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 133:43-62.

[2] De Wilde M, Speeckaert M, Callens R, et al. Ceftriaxone-induced immune hemolytic anemia as a life-threatening complication of antibiotic treatment of "chronic Lyme disease"[J]. Acta Clin Belg, 2017, 72(2):133-137.

[3] Hanai Y, Matsuo K, Ogawa M, et al. A retrospective study of the risk factors for linezolid-induced thrombocytopenia and anemia[J]. J Infect Chemother, 2016, 22(8):536-542.

[4] Wong RS, Cheng G, Chan NP, et al. Use of cefoperazone still needs a caution for bleeding from induced vitamin K deficiency[J]. Am J Hematol, 2006, 81(1):76.

[5] Garratty G. Immune hemolytic anemia caused by drugs[J]. Expert Opin Drug Saf, 2012, 11(4):635-642.

[6] Macy E. Penicillin and beta-lactam allergy: epidemiology and diagnosis[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2014, 14(11):476.

[7] 张兵, 冯变玲, 赵晓红, 等. 青霉素类药物不良反应报告分析[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(5):524-526.

[8] 张小林. β -内酰胺类抗生素对血液系统的影响[J]. 国际输血及血液学杂志, 1997, 20(2):68-71.

[9] Ruiz-Irastorza G, Barreiro G, Aguirre C. Reversible bone marrow depression by high-dose piperacillin/tazobactam[J]. Br J Haematol, 1996, 95(4):611-612.

[10] 李楚倩, 周陈西, 刘孟娟, 等. 第3代头孢菌素致血液系统不良反应文献分析[J]. 中国药业, 2012, 21(24):98-100.

[11] Shearer MJ, Bechtold H, Andrassy K, et al. Mechanism of cephalosporin-induced hypoprothrombinemia: relation to cephalosporin side chain, vitamin K metabolism, and vitamin K status[J]. J Clin Pharmacol, 1988, 28(1):88-95.

[12] Neuman G, Boodhan S, Wurman I, et al. Ceftriaxone-induced immune hemolytic anemia[J]. Ann Pharmacother, 2014, 48(12):1594-1604.

[13] 刘代红. 药物诱发的免疫性溶血性贫血[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(5):338-339.

[14] Garratty G. Drug-induced immune hemolytic anemia[J]. Clin

Adv Hematol Oncol, 2010, 8(2): 98-101.

[15] Kim S, Song KS, Kim HO, et al. Ceftriaxone induced immune hemolytic anemia: detection of drug-dependent antibody by ex-vivo antigen in urine[J]. Yonsei Med J, 2002, 43(3):391-394.

[16] Robinson HE, Maxwell EL, Prince HM, et al. Cefotetan-induced life-threatening haemolysis[J]. Med J Aust, 2006, 184(5):251.

[17] 云璐, 王帅, 李杰. 注射用拉氧头孢钠引起凝血障碍1例[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(9):860-860.

[18] Cazzola M, Brancaccio V, De Giglio C, et al. Flomoxef, a new oxacephem antibiotic, does not cause hemostatic defects[J]. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol, 1993, 31(3):148-152.

[19] 吴昕. 临床应用氯霉素的不良反应[J]. 临床合理用药杂志, 2008, 1(1):36-37.

[20] Turton JA, Andrews CM, Havard AC, et al. Haemotoxicity of thiamphenicol in the BALB/c mouse and Wistar Hanover rat[J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40(12):1849-1861.

[21] 马勤, 黄滔敏. 眼用制剂致不良反应208例文献分析[J]. 中国药房, 2013, 24(44):4192-4195.

[22] 孙元玲. 氯霉素滴眼液致再生障碍性贫血1例[J]. 中国药事, 2000, 14(2):136.

[23] Leiter LM, Thatté HS, Okafor C, et al. Chloramphenicol-induced mitochondrial dysfunction is associated with decreased transferrin receptor expression and ferritin synthesis in K562 cells and is unrelated to IRE-IRP interactions[J]. J Cell Physiol, 1999, 180(3):334-344.

[24] Harthan AA, Heger ML. Stenotrophomonas infection in a patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. J Pediatr Pharmacol Ther, 2013, 18(2):137-141.

[25] 王静, 赵睿, 李明芬. 复方新诺明的少见不良反应[J]. 中国药业, 2006, 15(3):77-78.

[26] 张爱芬, 郝敬旺, 项林海. 磺胺类药物不良反应及应对措施分析[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(20):20-21.

[27] Gorchynski J, Rose JK. Complications of MRSA treatment: linezolid-induced myelosuppression presenting with pancytopenia[J]. West J Emerg Med, 2008, 9(3):177-178.

[28] Bernstein WB, Trotta RF, Rector JT, et al. Mechanisms for linezolid-induced anemia and thrombocytopenia[J]. Ann Pharmacother, 2003, 37(4):517-520.

[29] Dawson MA, Davis A, Elliott P, et al. Linezolid-induced dyserythropoiesis: chloramphenicol toxicity revisited[J]. Intern Med J, 2005, 35(10):626-628.

[收稿日期] 2016-12-06 [修回日期] 2017-05-03

[本文编辑] 李睿旻