

## · 研究报告 ·

质谱导向的肾指海绵 *Reniochalina* sp. 中环肽类成分研究

吴宗梅<sup>1</sup>, 吴莹<sup>1</sup>, 张帅帅<sup>2</sup>, 孔灿<sup>3</sup>, 王淑萍<sup>1</sup>, 林厚文<sup>1</sup> (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; 3. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103)

**[摘要]** 目的 以质谱为导向对肾指海绵 *Reniochalina* sp. 中的环肽类成分进行研究。方法 采用质谱引导的程序性分离手段定向追踪并分离纯化海绵中的环肽类成分; 通过理化常数测定、波谱数据比对确定化合物结构; 利用 CCK-8 法对化合物进行初步细胞毒性活性评价。结果 从肾指海绵 *Reniochalina* sp. 中分离获得 3 个环肽类化合物, 分别鉴定为 stylopeptide 1 (1)、hymenamide D (2)、axinastatin 2 (3)。化合物 1 对 6 种人肿瘤细胞株具有细胞毒性, IC<sub>50</sub> 值范围为 6.09 ~ 17.26 μmol/L。结论 化合物 1 ~ 3 首次分离自 *Reniochalina* 属海绵, 化合物 1 是细胞毒性环七肽。

**[关键词]** 肾指海绵; 化学成分; 环肽; 结构鉴定

**[文章编号]** 2097-2024(2023)05-0316-05

**[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202206044

## Mass spectrometry-guided study on cyclic peptides from sponge *Reniochalina* sp.

WU Zongmei<sup>1</sup>, WU Ying<sup>1</sup>, ZHANG Shuaishuai<sup>2</sup>, KONG Can<sup>3</sup>, WANG Shuping<sup>1</sup>, LIN Houwen<sup>1</sup> (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; 3. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the cyclic peptides from sponge *Reniochalina* sp. under the guidance of mass spectrometry. **Methods** Mass spectrometry-guided procedural separation methods were used to track and isolate the cyclic peptides from the sponge genus *Reniochalina*. The structures of compounds were elucidated by the determination of physicochemical parameters and comparison of spectroscopic data. The preliminary cytotoxic activity of compounds was assessed by the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) method. **Results** Three cyclic peptides were isolated from the sponge *Reniochalina* sp. and identified as stylopeptide 1 (1), hymenamide D (2) and axinastatin 2 (3). Compound 1 exhibited cytotoxicity against six human cancer cell lines with IC<sub>50</sub> values ranging from 6.09 to 17.26 μmol/L. **Conclusion** Compound 1 - 3 were isolated from *Reniochalina* sp. for the first time, and compound 1 was a cytotoxic cyclic heptapeptide.

**[Key words]** *Reniochalina* sp.; chemical constituent; cyclic peptide; structure identification

肾指海绵属(*Reniochalina*)海绵为寻常海绵纲(Demospongiae)软海绵目(Halichondrida)小轴海绵科(Axinellidae)的海洋多细胞动物。目前, 针对该属海绵进行的化学成分研究主要包括甾类<sup>[1]</sup>、低极性化合物(如脂肪酸类、邻苯二甲酸类、烃类)<sup>[2]</sup>、炔醇<sup>[3]</sup>和环肽<sup>[4]</sup>等类型。其中, 环肽 reniochalistatins A-E 由我们课题组获得, 而环八肽 reniochalistatin

E 因对人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 的 IC<sub>50</sub> 值为 4.90 μmol/L, 已有两个团队采用不同策略对其完成全合成<sup>[5-6]</sup>。

为进一步高效挖掘肾指海绵中的潜在新型活性环肽, 课题组基于环肽类化合物质谱响应度好, 灵敏度高, 二级质谱中存在明显的氨基酸单元碎裂的 b 和 y 特征离子, 以质谱为导向, 继续追踪分离该属海绵中的环肽类成分。最终, 分离鉴定了 3 个环七肽(图 1), 并对它们进行了初步细胞毒性活性评价。

### 1 材料和方法

#### 1.1 仪器与试剂

600、700 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); Xevo G2-XS QTOF 质谱仪(美国 Waters 公

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82173730, 22137006)

**[作者简介]** 吴宗梅, 硕士研究生, Tel: 19121698972, Email: tsungmei@163.com

**[通信作者]** 王淑萍, 博士, 助理研究员, 研究方向: 海洋药物化学, Tel: 15800612058, Email: shupingwang2007@163.com; 林厚文, 博士, 教授, 研究方向: 海洋药物化学, Tel: 13801985620, Email: franklin67@126.com

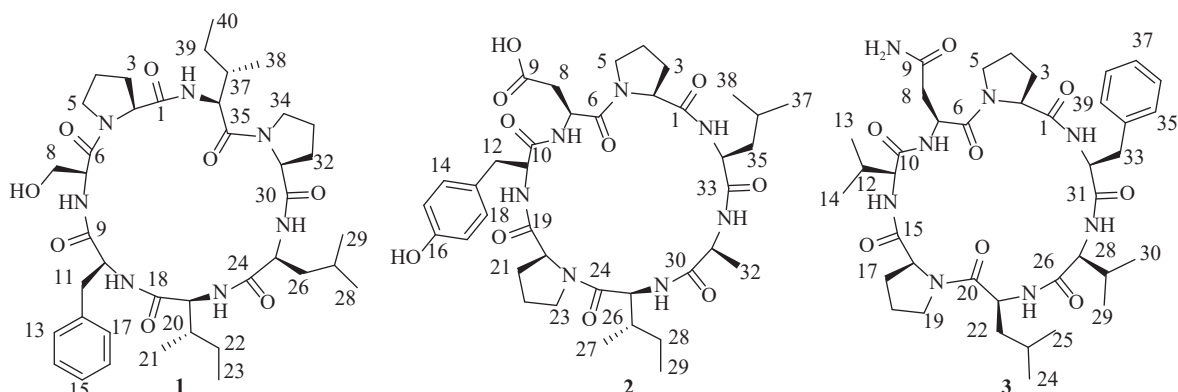


图 1 化合物 1 ~ 3 的化学结构

司); 质谱引导的自动纯化系统(美国 Waters 公司); Acquity UPLC 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Interchim PuriFlash 450 中压色谱仪(法国 Interchim 公司); SK5200H 型超声仪(上海科导超声仪器有限公司); BT224S 电子天平(德国 Sartorius 公司); EYELAN-1000 型旋转蒸发仪(日本东京理化公司); 低温高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司); XBridge C<sub>18</sub> 半制备型液相色谱柱(10 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司); ODS 柱色谱填料(日本 YMC 公司); Sephadex-LH20 柱色谱填料(瑞典 Pharmacia 公司); 色谱级试剂(德国 Merck 公司); 分析纯试剂(上海化学试剂公司); 氘代试剂(美国 Cambridge Isotope 公司)。

## 1.2 海绵样本

海绵样本由课题组颜益珍老师于 2021 年 4 月采集自中国南海永乐群岛附近海域(25 ~ 30 m 深度)。样本呈橙黄色, 质地较硬。经课题组杨琪博士鉴定为 *Reniochalina* 属海绵。凭证标本(编号: 212604)现保存于上海交通大学医学院附属仁济医院海洋药物实验室。

## 1.3 分步萃取

将干重 78.5 g 的海绵剪碎成块, 先后加入等体积甲醇、二氯甲烷-甲醇( $V/V = 1:1$ )分别超声提取 3 ~ 5 次, 每次 30 min, 合并提取液经减压浓缩得粗提物 23.7 g。先将粗提物混悬于 90% 的甲醇水中, 用等体积石油醚萃取 3 ~ 5 次, 再将 90% 的甲醇水层加水稀释至 60%, 用等体积二氯甲烷萃取 3 ~ 5 次, 合并萃取液经减压浓缩得二氯甲烷层浸膏 1.2 g, 其经 LC-MS 分析确认富含潜在的大分子量环肽。而 60% 的甲醇水层稀释至 30% 后再用乙酸乙酯萃取, 经 LC-MS 检测已无大分子量环肽。故通过质谱导向的分步萃取, 潜在的大分子量环肽主要分布于二氯甲烷层。

## 1.4 追踪分离

基于环肽类化合物分子量大的特点, 通过两次 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 并采用质谱定位追踪的方式将潜在环肽富集。第一次以二氯甲烷-甲醇( $V/V = 1:1$ )为洗脱剂, 二氯甲烷层浸膏经凝胶柱色谱分离得到组分 Fr.A ~ Fr.C。第二次以正己烷-二氯甲烷-甲醇( $V/V/V = 4:5:1$ )为洗脱剂, 富含潜在大分子量环肽的 Fr.B 经凝胶柱色谱分离得到亚组分 Fr.B1 ~ Fr.B5。其中, Fr.B2 ~ Fr.B4 先后经中压 ODS 柱色谱分离(紫外监测波长设为 210 nm, 以甲醇-水为流动相, 以流速 15 ml/min 在 10 h 内梯度洗脱 10% ~ 100%), 通过质谱定位追踪分别获得一系列精细组分。

上述精细组分经质谱引导的自动纯化系统制备获得环肽单体。质谱条件: 质量扫描范围  $m/z$  100 ~ 1250, 锥孔电压 15 V, ES<sup>+</sup>模式下扫描采集数据。色谱条件: 以半制备型 C<sub>18</sub> 柱为固定相, 以乙腈-水(含 0.1% 甲酸)为流动相, 以流速 6 ml/min 进行梯度洗脱。其中, Fr.B2-27 在 32 min 内线性梯度洗脱 40% ~ 48% 获得化合物 1(2.7 mg,  $t_R = 21$  min); Fr.B4-5 在 52 min 内线性梯度洗脱 20% ~ 23% 获得化合物 2(3.3 mg,  $t_R = 36$  min); Fr.B2-11 在 32 min 内线性梯度洗脱 30% ~ 40% 获得化合物 3(3.4 mg,  $t_R = 18$  min)。

## 2 结构鉴定

化合物 1: 无色结晶固体, 茚三酮显色阴性。HRESIMS 给出准分子离子峰  $m/z$  768.4661 [ $M+H$ ]<sup>+</sup> (calcd 768.4660), 确定其分子量为 767。结合 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C-NMR 谱确定其分子式为 C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>, 计算不饱和度为 14。1D NMR 谱图给出典型的肽类化合物特征信号。其中, <sup>1</sup>H NMR 谱显示有 5 个低场区的酰胺氨基质子信号( $\delta_H$  9.45, 8.90, 8.71, 7.23,

7.16), 7 个  $\alpha$ -次甲基质子信号 ( $\delta_{\text{H}}$  4.69, 4.32, 4.16, 4.12, 4.03, 3.89, 3.51)。 $^{13}\text{C}$  NMR 谱提示有 7 个酰胺羰基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  171.6, 171.1, 170.9, 170.8, 170.6, 169.6, 168.5), 7 个  $\alpha$ -次甲基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  60.7, 60.6, 59.2, 55.4, 55.1, 55.0, 54.1)。由此推断该化合物可能为七肽。结合 2D NMR 谱图, 确定该七肽由两个脯氨酸残基、一个亮氨酸残基、两个异亮氨酸残基、一个苯丙氨酸残基和一个丝氨酸残基组成。残基连接顺序由 HMBC、ROESY 相关信号和 ESI-MS/MS 质谱数据确定, 绝对构型由高级 Marfey 法确定<sup>[7-8]</sup>。综上, 该化合物结构为 *cyclo*-(L-Pro-L-Ser-L-Phe-L-Ile-L-Leu-L-Pro-L-Ile)。将核磁共振数据归属如下:  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  9.45 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, 36-NH), 8.90 (1H, br s, 7-NH), 8.71 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, 25-NH), 7.23 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz, 19-NH), 7.16 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz, 10-NH), 7.31 (2H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-13, H-17), 7.25 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-14, H-16), 7.20 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-15), 4.69 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-2), 4.39 (1H, m, H-34a), 4.32 (1H, dd,  $J = 11.0, 8.4$  Hz, H-36), 4.16 (1H, m, H-10), 4.12 (1H, t,  $J = 10.5$  Hz, H-19), 4.03 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-31), 3.89 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-7), 3.57 (1H, m, H-34b), 3.51 (1H, m, H-25), 3.50 (1H, m, H-5a), 3.49 (1H, m, H-8a), 3.47 (1H, m, H-8b), 3.36 (1H, m, H-5b), 3.13 (1H, dd,  $J = 13.1, 2.8$  Hz, H-11a), 2.84 (1H, dd,  $J = 13.0, 9.5$  Hz, H-11b), 2.38 (1H, m, H-3a), 2.18 (1H, td,  $J = 12.7, 4.3$  Hz, H-26a), 2.08 (1H, m, H-32a), 2.05 (1H, m, H-37), 2.01 (1H, m, H-33a), 1.92 (1H, m, H-3b), 1.90 (1H, m, H-4a), 1.79 (1H, m, H-33b), 1.73 (1H, m, H-32b), 1.55 (1H, m, H-26b), 1.53 (1H, m, H-39a), 1.52 (1H, m, H-4b), 1.43 (1H, m, H-20), 1.42 (2H, m, H-22a, H-27), 1.15 (1H, m, H-39b), 1.09 (1H, m, H-22b), 0.87 (3H, m, H-21), 0.85 (3H, m, H-29), 0.83 (6H, m, H-23, H-38), 0.82 (3H, m, H-28), 0.75 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-40);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  171.6 (C-30), 171.1 (C-35), 170.9 (C-9), 170.8 (C-1), 170.6 (C-24), 169.6 (C-18), 168.5 (C-6), 136.9 (C-12), 129.9 (C-13, C-17), 127.9 (C-14, C-16), 126.4 (C-15), 60.7 (C-31), 60.6 (C-2, C-8), 59.2 (C-19), 55.4 (C-7), 55.1 (C-10), 55.0 (C-36), 54.1 (C-25), 48.2 (C-34), 46.3 (C-5), 37.0 (C-11, C-26), 36.7 (C-20), 34.8 (C-37), 30.8 (C-3), 29.4 (C-32), 24.7 (C-27, C-33), 24.2 (C-22), 23.9 (C-39), 23.2 (C-29), 22.2 (C-4), 20.8 (C-28), 14.9 (C-40), 14.5 (C-23), 10.1 (C-38), 9.5 (C-21)。以上数据与文献 [9]

基本一致, 故将化合物 **1** 鉴定为 *stylopeptide 1*。

化合物 **2**: 无色无定形粉末, 茚三酮显色阴性。HRESIMS 给出准分子离子峰  $m/z$  770.4102  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd 770.4089), 确定其分子量为 769。结合  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱确定其分子式为  $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_{10}$ , 计算不饱和度为 15。1D NMR 谱图给出典型的肽类化合物特征信号。其中,  $^1\text{H}$  NMR 谱显示有 5 个低场区的酰胺氨基质子信号 ( $\delta_{\text{H}}$  8.77, 8.43, 8.33, 8.03, 7.55), 7 个  $\alpha$ -次甲基质子信号 ( $\delta_{\text{H}}$  4.53, 4.38, 4.34, 4.28, 4.05, 4.03, 3.99)。  $^{13}\text{C}$  NMR 谱提示有 7 个酰胺羰基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  172.6, 172.4, 170.6, 170.5, 170.3, 170.0, 169.9), 7 个  $\alpha$ -次甲基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  62.5, 60.4, 57.5, 56.9, 51.6, 49.9, 47.4)。据此推断该化合物可能为七肽。结合 2D NMR 谱图, 确定该七肽由两个脯氨酸残基、一个亮氨酸残基、一个酪氨酸残基、一个天冬氨酸残基、一个丙氨酸残基和一个异亮氨酸残基组成。残基连接顺序由 HMBC、ROESY 相关信号和 ESI-MS/MS 质谱数据确定, 绝对构型由高级 Marfey 法确定。综上, 该化合物结构为 *cyclo*-(L-Pro-L-Asp-L-Tyr-L-Pro-L-Ile-L-Ala-L-Leu)。将核磁共振数据归属如下:  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  8.77 (1H, br s, 31-NH), 8.43 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, 11-NH), 8.33 (1H, br s, 25-NH), 8.03 (1H, s, 7-NH), 7.55 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, 34-NH), 6.97 (2H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-14, H-18), 6.66 (2H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-15, H-17), 4.53 (1H, m, H-7), 4.38 (1H, m, H-31), 4.34 (1H, m, H-20), 4.28 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-34), 4.05 (1H, m, H-11), 4.03 (1H, m, H-2), 3.99 (1H, m, H-25), 3.63 (1H, m, H-5a), 3.56 (1H, m, H-5b), 3.26 (2H, m, H-8a, H-23a), 2.99 (1H, m, H-12a), 2.88 (1H, m, H-12b), 2.83 (1H, m, H-8b), 2.59 (1H, m, H-23b), 2.22 (1H, m, H-3a), 2.10 (1H, m, H-21a), 1.87 (1H, m, H-4a), 1.77 (1H, m, H-4b), 1.68 (1H, m, H-35a), 1.67 (2H, m, H-21b, H-26), 1.58 (1H, m, H-35b), 1.57 (1H, m, H-3b), 1.55 (1H, m, H-36), 1.54 (1H, m, H-22a), 1.53 (1H, m, H-28a), 1.24 (1H, m, H-22b), 1.16 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-32), 1.10 (1H, m, H-28b), 0.86 (3H, d,  $J = 5.8$  Hz, H-37), 0.82 (3H, m, H-38), 0.80 (6H, m, H-27, H-29);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  172.6 (C-1), 172.4 (C-24), 172.1 (C-9), 170.6 (C-19), 170.5 (C-10), 170.3 (C-6), 170.0 (C-33), 169.9 (C-30), 155.9 (C-16), 129.6 (C-14, C-18), 127.8 (C-13), 115.1 (C-15, C-17), 62.5 (C-2), 60.4 (C-20), 57.5 (C-31), 56.9 (C-34), 51.6 (C-7), 49.9 (C-11), 47.4 (C-25), 47.0 (C-5), 45.7 (C-23), 40.4 (C-



35), 36.1 (C-8), 35.4 (C-12, C-26), 30.4 (C-3), 29.5 (C-21), 25.1 (C-4), 24.7 (C-36), 24.3 (C-28), 22.9 (C-37), 21.4 (C-38), 20.9 (C-22), 15.1 (C-32), 14.9 (C-29), 10.9 (C-27)。以上数据与文献 [10] 基本一致, 故将化合物 **2** 鉴定为 hymenamide D。

化合物 **3**: 无色无定形粉末, 茚三酮显色阴性。HRESIMS 给出准分子离子峰:  $m/z$  767.4468  $[M+H]^+$  (calcd 767.4456), 确定其分子量为 766。结合  $^1H$  和  $^{13}C$ -NMR 谱确定其分子式为  $C_{39}H_{58}N_8O_8$ , 计算不饱和度为 15。1D NMR 谱图给出典型的肽类化合物特征信号。其中,  $^1H$  NMR 谱显示有 5 个低场区的酰胺氨基质子信号 ( $\delta_H$  8.80, 8.13, 7.98, 7.95, 7.25), 7 个  $\alpha$ -次甲基质子信号 ( $\delta_H$  4.65, 4.28, 4.24, 4.19, 4.14, 3.89, 3.83)。  $^{13}C$  NMR 谱提示有 7 个酰胺羰基碳信号 ( $\delta_C$  171.4, 171.1, 170.9, 170.3, 170.2, 170.1, 169.6), 7 个  $\alpha$ -次甲基碳信号 ( $\delta_C$  62.3, 61.5, 60.2, 57.1, 55.2, 51.0, 49.3)。据此推断该化合物可能为七肽。结合 ESI-MS/MS 质谱数据确定其氨基酸残基组成为两个脯氨酸残基、一个亮氨酸残基、一个苯丙氨酸残基、一个天冬酰胺残基和两个缬氨酸残基, 残基连接顺序为 *cyclo*-(Pro-Asn-Val-Pro-Leu-Val-Phe)。通过高级 Marfey 法确定所有氨基酸残基均为  $L$  构型。将核磁共振数据归属如下:  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  8.80 (1H, d,  $J$  = 5.4 Hz, 21-NH), 8.13 (1H, d,  $J$  = 9.5 Hz, 32-NH), 8.01 (1H, s, 9-NH<sub>2</sub>), 7.98 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, 11-NH), 7.95 (1H, d,  $J$  = 6.1 Hz, 7-NH), 7.28 (1H, m, 9-NH<sub>2</sub>), 7.25 (3H, m, 27-NH, H-35, H-39), 7.18 (1H, d,  $J$  = 7.4 Hz, H-37), 7.14 (2H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-36, H-38), 4.65 (1H, m, H-7), 4.28 (1H, d,  $J$  = 7.7 Hz, H-32), 4.24 (1H, m, H-16), 4.19 (1H, m, H-21), 4.14 (1H, t,  $J$  = 8.6 Hz, H-27), 3.89 (1H, t,  $J$  = 8.6 Hz, H-2), 3.83 (1H, t,  $J$  = 7.9 Hz, H-11), 3.75 (1H, m, H-5a), 3.46 (2H, m, H-5b, H19a), 3.26 (1H, m, H19b), 3.06 (1H, m, H-8a), 2.94 (3H, m, H-8b, H33a, H33b), 2.34 (1H, m, H-17a), 2.19 (2H, m, H-3a, H12), 2.02 (1H, m, H-28), 1.96 (1H, m, H-18a), 1.85 (1H, m, H-4a), 1.71 (2H, m, H-18b, H-23), 1.61 (1H, m, H-22a), 1.46 (1H, m, H-4b), 1.23 (1H, m, H-17b), 1.19 (1H, m, H-22b), 0.99 (1H, m, H-3b), 0.92 (3H, d,  $J$  = 6.7 Hz, H-13), 0.89 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-14), 0.86 (6H, d,  $J$  = 6.7 Hz, H-29, H-30), 0.84 (3H, d,  $J$  = 6.7 Hz, H-25), 0.79 (3H, d,  $J$  = 6.4 Hz, H-24);  $^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$  172.5 (C-9), 171.4 (C-26), 171.1 (C-20), 170.9 (C-31), 170.3 (C-1), 170.2 (C-15), 170.1

(C-10), 169.6 (C-6), 138.4 (C-34), 128.9 (C-35, C-39), 128.1 (C-36, C-38), 126.2 (C-37), 62.3 (C-2), 61.5 (C-11), 60.2 (C-16), 57.1 (C-27), 55.2 (C-32), 51.0 (C-21), 49.3 (C-7), 47.6 (C-5), 45.8 (C-19), 37.9 (C-22), 37.0 (C-33), 35.5 (C-8), 30.5 (C-17), 30.1 (C-28), 29.5 (C-12), 29.2 (C-3), 25.1 (C-4), 24.2 (C-23), 23.3 (C-24), 21.3 (C-18), 20.6 (C-25), 19.7 (C-13), 18.7 (C-14, C-29), 18.3 (C-30)。以上数据与文献 [11] 基本一致, 故将化合物 **3** 鉴定为 axinastatin 2。

### 3 活性测试

采用 CCK-8 法初步评估化合物对 6 种人肿瘤细胞株 (A2780、HCT-8、HepG2、NCI-H460、SW480、PC-9) 的体外细胞毒活性。主要步骤为: 取对数生长期的细胞制成细胞悬液, 约  $4 \times 10^3$  个细胞/孔接种至 96 孔板内, 每组设 3 个复孔。过夜培养后, 各株细胞分别加入 20  $\mu\text{mol/L}$  化合物, 并设对照组 (顺铂) 和空白组 (DMSO), 继续孵育 48 h。随后, 避光情况下每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 溶液。孵育 0.5 ~ 2 h 后, 450 nm 处测其吸光度, 每株细胞测 3 次以上, 并计算其细胞活力 (%)。对于肿瘤细胞生长抑制率大于 50% 的化合物, 进一步测试其活性剂量依赖关系。结果显示, 化合物 **1** 对 NCI-H460、HepG2、PC-9、HCT-8、A2780 和 SW480 均具细胞毒性,  $IC_{50}$  值分别为 6.09、9.31、13.24、14.31、14.38 和 17.26  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 4 讨论

环肽具有许多独特的生化和治疗特性, 目前已有抗生素类达托霉素、止痛剂齐考诺肽、抗肿瘤药帕瑞肽等环肽类药物获批用于临床 [12]。海绵是环肽类化合物的重要多产来源, 然而, 其体内环肽因含量低微、紫外吸收不佳、核磁灵敏度差等, 特异识别和定向获取极富挑战。将质谱高灵敏度、高准确度和高选择性的技术优势与环肽独特的质谱碎裂模式有机结合, 有助于提高环肽发现的通量和选择性。

本研究以质谱为导向, 追踪分离肾指海绵中的潜在新颖活性环肽, 分离鉴定出 3 个环七肽, 它们均为首次从该属海绵分离获得。此外, 本研究还发现化合物 **1** 对多种人肿瘤细胞株具有中等抑制活性。而有趣的是, 早期由 George R. Pettit 课题组分离获得的源于 *Stylotella* 属和 *Phakellia* 属海绵的同一化合物 **1**, 其抑制 P388 小鼠白血病细胞生长的能力却相差十倍以上 [9, 13]。这可能与天然来源环肽

能与某些仅生物方法才能检测到的微量强活性抗肿瘤物结合<sup>[9,13]</sup>,或不同溶剂环境致使环肽分子构象发生改变有关<sup>[14]</sup>。化合物 **2** 先后发现于 *Hymeniacidon* 属<sup>[10]</sup> 和 *Stylissa* 属<sup>[15-16]</sup> 海绵,对多种肿瘤细胞株开展的活性试验显示其无明显细胞毒性。化合物 **3** 此前发现于 *Axinella* 属海绵,其对小鼠 P388 细胞和一系列人肿瘤细胞具有较强的体外细胞毒性<sup>[11]</sup>。

不同种属的海绵能够产生相同类型的环肽分子,同一类型的环肽分子表现出不同的细胞毒活性,可能和与海绵共生互作的微生物相关。本研究进一步丰富了肾指海绵中环肽类化合物的多样性,也为研究特征结构类型的海洋天然产物提供了新思路、新方法。

### 【参考文献】

- [1] 薛松. 海绵活性天然产物分离及结构确定[D]. 大连: 中国科学院研究生院(大连化学物理研究所), 2003.
- [2] 闫小燕, 靳艳, 虞星炬, 等. 气相色谱-质谱分析新种海绵 *Reniochalina* sp. 中的低极性组分[J]. 色谱, 2004, 22(6): 652-654.
- [3] LEE H S, LEE J H, WON H, et al. Identification of novel acetylenic alcohols and a new dihydrothiopyranone from the tropical sponge *Reniochalina* sp. [J]. *Lipids*, 2009, 44(1): 71-75.
- [4] ZHAN K X, JIAO W H, YANG F, et al. Reniochalistatins A-E, cyclic peptides from the marine sponge *Reniochalina stalagmitis* [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(12): 2678-2684.
- [5] ATINO A, BACA G, WEERAMANGE C, et al. Total synthesis of reniochalistatin E [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(12): 3234-3240.
- [6] ZHOU R, SUN Y G, LI H B, et al. Synthesis and biological evaluation of reniochalistatins A-E and a reniochalistatin E analogue [J]. *ChemMedChem*, 2018, 13(20): 2202-2207.
- [7] FUJII K, IKAI Y, MAYUMI T, et al. A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of

constituent amino acids in a peptide: elucidation of limitations of marfey's method and of its separation mechanism [J]. *Anal Chem*, 1997, 69(16): 3346-3352.

- [8] FUJII K, IKAI Y, OKA H, et al. A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: combination of marfey's method with mass spectrometry and its practical application [J]. *Anal Chem*, 1997, 69(24): 5146-5151.
- [9] PETTIT G R, SRIRANGAM J K, HERALD D L, et al. Isolation and crystal structure of stylopeptide 1, A new marine Porifera cycloheptapeptide [J]. *J Org Chem*, 1995, 60(25): 8257-8261.
- [10] TSUDA M, SHIGEMORI H, MIKAMI Y, et al. Hymenamides C ~ E, new cyclic heptapeptides with two proline residues from the Okinawan marine sponge *hymeniacidon* sp. [J]. *Tetrahedron*, 1993, 49(31): 6785-6796.
- [11] PETTIT G R, GAO F, CERNY R L, et al. Antineoplastic agents. 278. Isolation and structure of axinastatins 2 and 3 from a western Caroline Island marine sponge [J]. *J Med Chem*, 1994, 37(8): 1165-1168.
- [12] ZHANG H Y, CHEN S Y. Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001-2021) [J]. *RSC Chem Biol*, 2022, 3(1): 18-31.
- [13] PETTIT G R, TAYLOR S R. Synthesis of the marine sponge cycloheptapeptide stylopeptide 1 [J]. *J Org Chem*, 1996, 61(7): 2322-2325.
- [14] 刘晓庆. 生物大分子序列、结构及活性的计算模拟[D]. 大连: 大连理工大学, 2009.
- [15] AFIFI A H, EI-DESOKY A H, KATO H, et al. Carteritins A and B, cyclic heptapeptides from the marine sponge *Stylissa carteri* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57(11): 1285-1288.
- [16] SUN J Y, CHENG W, DE VOOGD N J, et al. Stylissatins B-D, cycloheptapeptides from the marine sponge *Stylissa massa* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57(38): 4288-4292.

[收稿日期] 2022-06-11 [修回日期] 2023-02-16

[本文编辑] 崔俐俊

(上接第 272 页)

- [80] SATO Y T, UMEZAKI K, SAWADA S, et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21933.
- [81] MENTKOWSKI K I, SNITZER J D, RUSNAK S, et al. Therapeutic potential of engineered extracellular vesicles [J]. *AAPS J*, 2018, 20(3): 50.
- [82] PIFFOUX M, SILVA A K A, WILHELM C, et al. Modification of extracellular vesicles by fusion with liposomes for the design of personalized biogenic drug delivery systems [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(7): 6830-6842.
- [83] KHONGKOW M, YATA T, BOONRUNGSIMAN S, et al. Surface modification of gold nanoparticles with neuron-targeted exosome for enhanced blood-brain barrier penetration [J].

*Sci Rep*, 2019, 9(1): 8278.

- [84] WANG J, CHEN P, DONG Y, et al. Designer exosomes enabling tumor targeted efficient chemo/gene/photothermal therapy [J]. *Biomaterials*, 2021, 276: 121056.
- [85] CHENG G, LI W Q, HA L, et al. Self-assembly of extracellular vesicle-like metal-organic framework nanoparticles for protection and intracellular delivery of biofunctional proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(23): 7282-7291.
- [86] PENG H, JI W H, ZHAO R C, et al. Exosome: a significant nano-scale drug delivery carrier [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(34): 7591-7608.

[收稿日期] 2022-07-07 [修回日期] 2022-09-06

[本文编辑] 崔俐俊