链霉菌 LZ35 中 Germicidin 糖苷的发现

史海霞^a 李瑶瑶^b 朱敬^a 王浩鑫^{*,a} 沈月毛^{a,b}^(a) 山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东青岛 266237)^(b) 山东大学药学院 天然产物化学生物学教育部重点实验室 济南 250012)

摘要 利用培养基筛选策略从链霉菌 LZ35 的主产物敲除突变株 SR111 中分离得到 2 个新 germicidin 糖苷衍生物, 通过一维和二维核磁及高分辨质谱等数据分析确定其化学结构分别为 germicidin A-4-*O*- β -D-glucuronide (**1**)和 germicidin D-4-*O*- β -D-glucuronide (**2**). 采用滤纸片法测定了化合物 **1** 和 **2** 的抗细菌和抗真菌活性, 结果显示两者在 20 μ g 条件下均无抗菌活性. 采用噻唑蓝比色法测定了化合物 **1** 和 **2** 的细胞毒活性, 结果显示两者对肝癌细胞 HepG2 和宫颈癌细胞 HeLa 均无明显活性. 本研究发现了含有葡萄糖醛酸基团的 germicidin 衍生物, 丰富了该类化合物的结构多样性.

关键词 链霉菌; 天然产物; 培养基筛选; germicidins

Discovery of Germicidin Glucuronides from *Streptomyces* sp. LZ35Shi, Haixia^a Li, Yaoyao^b Zhu, Jing^a Wang, Haoxin^{*,a} Shen, Yuemao^{a,b}^(a) State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao, Shandong 266237)^(b) Key Laboratory of Chemical Biology, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012)

Abstract Two new germicidin glucuronides were isolated from the metabolites of *Streptomyces* sp. SR111, which is derived from *Streptomyces* sp. LZ35 through deletion of eight biosynthetic gene clusters by screening of culture media. The chemical structures of **1** and **2** were determined to be germicidin A-4-*O*- β -D-glucuronide and germicidin D-4-*O*- β -D-glucuronide, respectively, by analysis of 1-D and 2-D NMR data and high resolution mass spectrometry. The antibacterial and antifungal activities of **1** and **2** were evaluated by disc diffusion assay, and they showed no inhibitory activity at 20 μ g/disc. The cytotoxic activities of **1** and **2** were tested by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric method, and they were inactive against the HepG2 (liver cancer) and HeLa (cervical cancer) cell lines. Remarkably, compounds **1** and **2** represent the first two germicidins with a glucuronic acid moiety, which expands the structural diversity of germicidins

Keywords *Streptomyces*; natural products; screening of culture media; germicidins

微生物天然产物一直是抗生素和小分子药物发现的重要来源^[1]. 近年来, 大规模基因组测序揭示了微生物中蕴藏的丰富天然产物资源. 但是, 由于在常规培养条件下微生物中大多数次级代谢途径处于沉默或低表达状态, 研究者们开发了多种激活手段以获得其编码产物^[2], 如强启动子置换、调控基因过表达、基因敲除与代谢谱比较、异源表达等. 此外, 传统的培养条件优化也被认为是直接有效的激活策略^[3], 包括改变培养基组成(碳氮比、盐度、金属离子的含量等)、培养温度、pH 值、光照和氧气浓度、添加诱导剂以及共培养等.

链霉菌 LZ35 是分离自厦门潮间带土样的一株海洋链霉菌, 生物信息学分析显示, 其基因组中蕴藏着丰富的次级代谢途径. 前期, 我们通过多策略联用已经从中发现了 12 类次级代谢产物^[4-8], 并构建了 8 类主产物连续敲除突变株 SR111, 具体敲除基因包括负责 geldanamycins、nigericins、elaiophylins 和 hygrocins 合成的起始聚酮合酶基因, 负责 galbonolides、azalomycins 和 cuevaenes 合成的全部聚酮合酶基因, 以及负责 echosides 合成的非核糖体肽合酶基因^[9-10]. 为了继续发掘链霉菌 LZ35 中新颖的次级代谢产物, 我们对突变株

* Corresponding author. E-mail: wanghaoxin@sdu.edu.cn

Received January 21, 2021; revised February 10, 2021; published online February 26, 2021.

Project supported by the National Key Research and Development Program (No. 2019YFA0905400), the Young Scholars Program of Shandong University (No. 2016WLJH31), and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT_17R68).

国家重点研发计划项目(No. 2019YFA0905400)、山东大学青年学者计划(No. 2016WLJH31)及长江学者和创新团队发展计划(No. IRT_17R68)资助项目.

SR111 进行了培养基筛选, 通过优选培养基的扩大发酵和产物追踪分离发现了 2 个含有葡萄糖醛酸基团的新 germicidin 类衍生物。

1 结果与讨论

采用 6 种培养基对突变株 SR111 进行了小规模琼脂平板发酵和产物提取, 通过对代谢产物的高压液相色谱 (HPLC) 检测分析发现 6 号培养基发酵产物中存在一簇差异峰, 且具有此类紫外光谱的化合物尚未从菌株 LZ35 中分离获得。为了鉴定差异产物, 采用 6 号培养基对突变株 SR111 进行了 10 L 规模的发酵和产物提取。发酵粗提物经葡聚糖凝胶柱层析、中压液相和高压液相色谱层析获得了化合物 **1** 和 **2**, 并通过一维和二维核磁及高分辨质谱 (HR-ESIMS) 等数据分析确定了其化学结构。

化合物 **1** 为淡黄色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -18.1$ (c 0.1, CH₃OH); UV-vis (CH₃CN) λ_{max} : 203, 298 nm; IR (film) ν : 3362, 2969, 2933, 2878, 1694, 1570, 1274, 1225, 1025, 825, 769 cm⁻¹; 根据高分辨质谱 (HR-ESIMS) 测得化合物 **1** 的分子式为 C₁₇H₂₄O₉ (HR-ESIMS calcd for C₁₇H₂₅O₉ [M+H]⁺ 373.1499, found 373.1504). ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HSQC 数据显示化合物 **1** 含有 17 个碳原子, 包括 3 个甲基碳、2 个次甲基碳、7 个亚甲基碳和 5 个季碳 (表 1, 图 1)。其中, 化学位移值分别为 98.8 d (C-1'), 72.8 d (C-2'), 75.7 d (C-3'), 71.2 d (C-4'), 75.3 d (C-5') 和 170.1 s (C-6') 的碳信号, H-1'/H-2' 和 H-3'/H-4'/H-5' 的 ¹H-¹H COSY 相关信号, 以及 H-2' 与 C-3', H-4' 与 C-6' 和 H-5' 与 C-6' 的 HMBC 相关信号表明, 化合物 **1** 中存在葡萄糖醛酸结构单元, 根据端基碳 (C-1') 的偶合常数 ($J=7.2$) 确定其为 β 构型。通过对苷元部分的核磁数据分析发现, 其与 germicidin A 的化学结构一致。HMBC 数据显示 H-9 与 C-7/C-8、H-10 与 C-6/C-7/C-8、H-8 与 C-6、H-7 与 C-5、H-5 与 C-3/C-4、H-12 与 C-3/C-11、H-11 与 C-2 相关。¹H-¹H COSY 数据显示 H-10/H-7/H-8/H-9、H-11/H-12 相关 (图 1), 进一步确证了苷元部分为 germicidin A。此外, H-1' 与 C-4 的 HMBC 相关信号表明, 糖基连接在 C-4 位羟基。为了进一步明确化合物 **1** 中 C-7 和葡萄糖醛酸的绝对构型, 通过对化合物 **1** 的酸水解分离获得了其苷元 germicidin A 和葡萄糖醛酸。通过测定二者的比旋光度 (Germicidin A, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +20.0$ (c 0.1, CH₃OH); 葡萄糖醛酸, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +9.8$ (c 0.1, H₂O), 并与文献 (Germicidin A, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +21.0$) 对比^[11], 确定了化合物 **1** 中 C-7 和葡萄糖醛酸的绝对构型分别为 *S* 型和 *D* 型。最终, 化合物 **1** 的结构确定为 germicidin A-4-*O*- β -*D*-glucuronide。

化合物 **2** 为白色粉末状固体; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -30.4$ (c 0.1,

图 1 化合物 **1** 和 **2** 的化学结构及化合物 **1** 的关键 ¹H-¹H COSY, HMBC 和 ROESY 相关图

Figure 1 Chemical structures of **1** and **2**, and the key ¹H-¹H COSY, HMBC and ROESY correlations of **1**

CH₃OH); UV-vis (CH₃CN) λ_{max} : 203, 297 nm; IR (film) ν : 3294, 2257, 2128, 1675, 1576, 1456, 1237, 1024, 824, 765, 684 cm⁻¹; 高分辨质谱 (HR-ESIMS) 测得化合物 **2** 的分子式为 C₁₅H₂₀O₉ (HR-ESIMS calcd for C₁₅H₂₁O₉ [M+H]⁺ 345.1186, found 345.1206). 通过核磁数据比对发现化合物 **2** 与化合物 **1** 的结构类似 (表 1, 图 1), 其区别在于化合物 **1** 中 C-3 和 C-7 位的乙基在化合物 **2** 中均变为了甲基。HMBC 数据显示 Me-8 与 C-6/C-7/C-9、Me-10 与 C-2/C-3/C-4 的相关信号, 以及 H-7/H-8 的 ¹H-¹H COSY 相关信号进一步确证了上述结构片段, 表明化合物 **2** 的苷元部分为 germicidin D。此外, 根据葡萄糖醛酸中端基碳 (C-1') 的偶合常数 ($J=7.5$) 确定其为 β 构型。由此, 化合物 **2** 的结构确定为 germicidin D-4-*O*- β -*D*-glucuronide。

采用滤纸片法对化合物 **1** 和 **2** 进行了抗细菌和抗真菌活性测定, 结果显示两者在 20 μg 载样量下对 6 株指示菌均无明显抑菌活性。采用噻唑蓝 (MTT) 比色法测定了化合物 **1** 和 **2** 对肝癌细胞 HepG2 和宫颈癌细胞 HeLa 的细胞毒活性, 结果显示两者无明显活性 (表 2)。

根据研究报道, 化合物 **1** 和 **2** 的苷元部分由 III 型聚酮合酶 germicidin synthase (Gcs) 催化脂肪酸合成的中间体与甲基或乙基丙二酰辅酶 A 缩合并环化而成^[12]。Gcs 在链霉菌中广泛存在, 我们通过对链霉菌 LZ35 基因组的生物信息学分析发现了可能负责 germicidins 合成的 Gcs 基因 (gcs_{LZ35}, GenBank accession no. MW467968), 其与天蓝色链霉菌 Gcs 的氨基酸序列一致性为 83.4%。由于在 gcs_{LZ35} 基因附近未发现乙基丙二酰辅酶 A 合成所需的巴豆酰辅酶 A 羧化/还原酶 (Crotonyl-CoA carboxylase/reductase, CCR) 基因^[13], 我们对菌株 LZ35 基因组中含有的 4 个 CCRs 与已知功能的同源蛋白进行了进化分析, 结果显示其中 3 个 CCRs 可能参与乙基丙二酰辅

表 1 化合物 1 和 2 的 ^1H NMR (400 MHz) 和 ^{13}C NMR (100 MHz) 数据(DMSO- d_6)
Table 1 ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data for compounds 1 and 2 (DMSO- d_6)

Position	1		2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		164.1 (s)		164.9 (s)
3		107.2 (s)		101.7 (s)
4		163.6 (s)		164.3 (s)
5	6.78 (s)	95.6 (d)	6.35 (s)	94.7 (d)
6		166.9 (s)		168.1 (s)
7	2.95~2.85 (m)	39.6 (d)	2.77~2.71 (m)	32.6 (d)
8	2.07~1.95 (m)	26.9 (t)	1.17 (d, $J=6.8$ Hz)	20.4 (q)
9	1.95~1.85 (m)			
9	1.26 (t, $J=7.6$ Hz)	11.4 (q)	1.16 (d, $J=6.8$ Hz)	20.3 (q)
10	1.57 (d, $J=6.8$)	17.8 (q)	1.82 (s)	9.1 (q)
11	2.85~2.76 (m)	16.4 (t)		
12	2.75~2.66 (m)			
12	1.40 (t, $J=7.2$ Hz)	12.4 (q)		
1'	5.63 (d, $J=7.2$ Hz)	98.8 (d)	5.23 (d, $J=7.5$ Hz)	99.3d
2'	3.72~3.67 (m)	72.8 (d)	3.31~3.26 (m)	73.2d
3'	3.74~3.69 (m)	75.7 (d)	3.32~3.27 (m)	76.1d
4'	3.83 (t, $J=9.2$ Hz)	71.2 (d)	3.39~3.34 (m)	71.7d
5'	4.41 (d, $J=10.0$ Hz)	75.3 (d)	3.97 (d, $J=9.5$ Hz)	75.6d
6'		170.1 (s)		170.5 (s)

表 2 化合物 1 和 2 的对两株肿瘤细胞的细胞毒性[IC₅₀/μmol·L⁻¹]

Table 2 Cytotoxicity of compounds 1 and 2 against two cancer cell lines [IC₅₀/μmol·L⁻¹]

样品	HeLa	HepG2
1	>20	>20
2	>20	>20
多柔比星	1.05±0.12	1.32±0.28

酶 A 延伸单元的合成. 此外, *gcsLZ35* 基因附近也未发现糖基化修饰所需的葡萄糖醛酸转移酶(UDP-Glucuronosyltransferase, UGT)基因. 前期, 我们从菌株 LZ35 中发现了含有葡萄糖醛酸基团的 echosides 类化合物^[8], 其生物合成基因簇中也不含有葡萄糖醛酸转移酶基因. 由于菌株 LZ35 基因组中含有 70 余个糖基转移酶基因, 目前仍无法定位可能的葡萄糖醛酸转移酶基因. 由此, 提出了化合物 1 和 2 可能的生物合成途径(图 2). 脂肪酸合成途径的 FabH 催化 2-甲基丁酰辅酶 A 或异丁酰辅酶 A 与丙二酰-ACP 缩合形成 2 酮中间体, III 型聚酮合酶 Gcs 再以其作为起始单元与甲基或乙基丙二酰辅酶 A 缩合并环化形成 germicidins A 或 D, 最后由葡萄糖醛酸转移酶(UGT)进行糖基化修饰生成化合物 1 和 2.

2 结论

本研究通过对链霉菌 LZ35 菌株连续敲除突变株 SR111 的培养基筛选, 从 6 号培养基发酵产物中分离获得 2 个含有葡萄糖醛酸基团的 germicidin 新衍生物, 并

图 2 化合物 1 和 2 可能的生物合成途径
Figure 2 Proposed biosynthetic pathway for 1 and 2

提出了其可能的生物合成途径. 此外, 对化合物 **1** 和 **2** 的抗菌、抗真菌和细胞毒活性进行了评价, 结果显示两者在 20 μg 载样量下对测试菌株均无明显抑制活性, 对肝癌细胞 HepG2 和宫颈癌细胞 HeLa 也无明显细胞毒性. 本研究为首次报道葡萄糖醛酸化修饰的 germicidin 类化合物, 进一步拓展了该类化合物的结构多样性.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振(NMR)由 Bruker DRX-400 核磁共振仪测定; 高分辨质谱(HR-ESIMS)由 Bruker BioESI-Q-TOF 测定; 高效液相色谱系统(HPLC)为 Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000; 中压液相系统(MPLC)为 Buchi C-615; 反相硅胶柱 RP18 填料购自 Merck 公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 购自 GE Healthcare 公司; 旋转蒸发器为 Buchi 公司的 R-100; 所用有机溶剂为分析纯或色谱纯.

3.2 实验方法

3.2.1 培养基筛选及代谢产物检测

首先, 将菌株 SR111 在 ISP4 琼脂培养基(可溶性淀粉 10 g/L, NaCl 1 g/L, MgSO_4 7 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, CaCO_3 2 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4)平板 30 $^\circ\text{C}$ 活化培养 14 d, 然后转接至 6 种琼脂培养基(1 号培养基: 酵母提取物 4 g/L, 麦芽提取物 10 g/L, 葡萄糖 4 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4; 2 号培养基: 燕麦 20 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4; 3 号培养基: 酵母提取物 4 g/L, 豆饼粉 50 g/L, 玉米淀粉 100 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4; 4 号培养基: 豆饼粉 31 g/L, 玉米粉 5 g/L, 葡萄糖 18 g/L, KH_2PO_4 3.8 g/L, MgSO_4 8.5 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4; 5 号培养基: 可溶性淀粉 40 g/L, 豆饼粉 40 g/L, 葡萄糖 40 g/L, 糊精 20 g/L, MgSO_4 0.2 g/L, NaCl 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 0.2 g/L, CaCO_3 6 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4; 6 号培养基: 可溶性淀粉 40 g/L, 酪蛋白氨基酸 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4)平板(40 mL, 20 mL/块) 30 $^\circ\text{C}$ 培养 14 d. 随后, 将发酵培养物连同菌体切成小块, 使用乙酸乙酯/甲醇/冰乙酸($V:V:V=80:15:5$) 浸泡过夜. 次日, 将浸提液减压浓缩至干, 再溶于 1 mL 甲醇中, 取 10 μL 进行 HPLC 检测[YMC-Pack Pro C18, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , 1 mL/min, UV 300 nm, 流动相梯度为 0 min, 20%(体积分数)乙腈; 3 min, 35%(体积分数)乙腈; 10 min, 45%(体积分数)乙腈; 16 min, 90%(体积分数)乙腈;

17~20 min 乙腈; 21~24 min, 体积分数 20%乙腈].

3.2.2 菌株发酵提取和产物分离纯化

采用 6 号培养基对菌株 SR111 进行了 10 L 培养(30 $^\circ\text{C}$, 14 d). 发酵培养物连同菌体切成小块, 用上述浸提液提取 3 次, 合并浸提液后 30 $^\circ\text{C}$ 减压浓缩至干得发酵粗提物. 粗提物经乙酸乙酯-水($V:V=1:1$)萃取 3 次, 乙酸乙酯相合并后 30 $^\circ\text{C}$ 减压浓缩得乙酸乙酯提取物. 乙酸乙酯提取物经石油醚/95%(体积分数)甲醇($V:V=1:1$)萃取 1 次, 体积分数为 95%的甲醇相 30 $^\circ\text{C}$ 减压浓缩至干得甲醇提取物. 甲醇提取物经凝胶柱层析(Sephadex LH-20, 120 g, 甲醇洗脱)得到 4 个组分 I~IV. 组分 Fr.II (1.37 g)经中压液相反相硅胶柱层析(RP-18 80 g, 体积分数为 10%, 15%的乙腈, 各 500 mL 洗脱)得到 5 个组分 Fr.IIa~Fr.IIe. 组分 Fr.IIb~Fr.IId 分别进行 HPLC (YMC-Pack Pro C18, 250 mm $\times$ 10.0 mm, 5 μm , 体积分数为 18%的乙腈-水, 4 mL/min, UV 280 nm)制备, 合并得化合物 **1** (17 mg, $t_R=7.05$). 组分 Fr.III (1.0 g)经中压液相反相硅胶柱层析(RP-18 80 g, 体积分数为 10%, 13%, 15%, 17%, 19%, 23%的乙腈, 各 200 mL 洗脱)得到 5 个组分 Fr.IIIa~Fr.IIIe. 组分 Fr.IIIa 经 HPLC [YMC-Pack Pro C18, 250 mm $\times$ 10.0 mm, 5 μm , 体积分数为 18%乙腈, 4 mL/min, UV 280 nm]制备获得化合物 **2** (3.8 mg, $t_R=5.41$).

3.2.3 化合物 **1** 的酸水解

取化合物 **1** (4 mg)溶于 1 mL 2 mol/L HCl 中反应 5 h, 冷却至室温, 用乙酸乙酯(3 mL $\times$ 3)萃取得有机相与水相. 水相减压浓缩至干得葡萄糖醛酸(约 1 mg), 有机相减压浓缩至干, 经 HPLC 制备(YMC-Pack Pro C18, 250 mm $\times$ 10.0 mm, 5 μm , 30%乙腈, 4 mL/min, UV 280 nm)获得残留的化合物 **1**(约 0.9 mg, $t_R=6.28$)和昔元(约 1.2 mg, $t_R=11.02$).

3.2.4 抗菌活性测定

采用滤纸片法进行抗菌活性测定. 细菌指示菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* PA01)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* UK-1 χ 8956)和大肠杆菌(*E.coli* DH5 α). 将试管斜面保存的上述指示菌在 LB 琼脂培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.2)平板 37 $^\circ\text{C}$ 划线培养过夜. 次日挑取单克隆至 2 mL LB 液体培养基中、200 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ 约为 1.5, 再按 1%比例加入 LB 琼脂培养基中制成细菌指示菌平板. 用灭菌后的镊子取载药滤纸片贴到指示菌平板表面, 37 $^\circ\text{C}$ 培养过夜观察抑菌圈直径. 真菌指示菌为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和梨树腐烂病原菌(*Valsa ambiens*). 配制 PDA 琼脂培养基

(土豆 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.0) 平板, 并打孔器在平板中心取出 0.5 cm 的琼脂块, 再用打孔器分别取同等大小的真菌块放入中心缺口制成真菌指示菌平板. 用灭菌后的镊子取载药滤纸片贴到指示菌平板表面, 30 °C 培养 2~3 d 后观察抑菌圈直径. 抗细菌阳性对照为卡那霉素(Kan, 金黄色葡萄球菌)、阿泊拉霉素(Apr, 铜绿假单胞菌)、氨苄霉素(Amp, 鼠伤寒沙门氏菌)和氯霉素(Cm, 大肠杆菌), 用量均为 5 µg/滤纸片; 抗真菌阳性对照为两性霉素(Amb, 20 µg/滤纸片), 阴性对照为 DMSO; 化合物 **1** 和 **2** 的载样量为 20 µg/滤纸片.

3.2.5 细胞毒活性测定

采用噻唑蓝(MTT)比色法测定化合物 **1** 和 **2** 的细胞毒活性. 将肝癌细胞 HepG2 和宫颈癌细胞 HeLa 分别接种于 96 孔板, 细胞密度控制在 $(3\sim4)\times 10^3$ /孔. 将 96 孔板置于体积分数为 5% 的 CO₂, 37 °C 细胞培养箱培养至细胞贴壁后, 加入指定浓度的待测样品、阳性对照(多柔比星)和阴性对照(相同浓度的 DMSO), 均设置三个平行. 经过细胞培养和 MTT 处理后, 利用酶标仪检测各孔 OD 值(570 nm), 并用 Prism 5.0 软件计算 IC₅₀ 值.

辅助材料(Supporting Information) 突变株 SR111 不同培养基代谢产物的 HPLC 分析, 链霉菌 LZ35 中 CCRs 的进化分析, 化合物 **1** 部分水解后的 LC-MS 分析, 化合

物 **1** 和 **2** 的 ¹H NMR, ¹³C NMR, HSQC, HMBC, ¹H-¹H COSY 和 ROESY 核磁谱图、红外光谱和高分辨质谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770.
- [2] Kalkreuter, E.; Pan, G. H.; Cepeda, A. J.; Shen, B. *Trends Pharmacol. Sci.* **2020**, *41*, 13.
- [3] Bode, H. B.; Bethe, B.; Hof, R.; Zeeck, A. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619.
- [4] Zhang, J.; Li, S.; Wu, X.; Guo, Z.; Lu, C.; Shen, Y. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2442.
- [5] Liu, M.; Lu, C.; Shen, Y. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 49792.
- [6] Liu, C.; Zhu, J.; Li, Y.; Zhang, J.; Lu, C.; Wang, H.; Shen, Y. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 998.
- [7] Li, S.; Li, Y.; Lu, C.; Zhang, J.; Zhu, J.; Wang, H.; Shen, Y. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3706.
- [8] Zhu, J.; Chen, W.; Li, Y.; Deng, J.; Zhu, D.; Duan, J.; Liu, Y.; Shi, G.; Xie, C.; Wang, H.; Shen, Y. *Gene* **2014**, *546*, 352.
- [9] Zhao, G.; Li, S.; Wang, Y.; Hao, H.; Shen, Y.; Lu, C. *Drug Discoveries Ther.* **2013**, *7*, 185.
- [10] Li, Y.; Wang, H.; Liu, Y.; Jiao, Y.; Li, S.; Shen, Y.; Du, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 6221.
- [11] Zhang, H.; Saurav, K.; Yu, Z.; Mandi, A.; Kurtan, T.; Li, J.; Tian, X.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Zhang, C. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1610.
- [12] Chemler, J. A.; Buchholz, T. J.; Geders, T. W.; Akey, D. L.; Rath, C. M.; Chlipala, G. E.; Smith, J. L.; Sherman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7359.
- [13] Wilson, M. C.; Moore, B. S. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 72.

(Cheng, F.)