

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级

学 号: 200325045

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**(+)-Brefeldin A 的发酵生产及其
衍生物的合成研究**

**Study on the Production of (+)-Brefeldin A by Fermentation
and Synthesizing Derivatives of (+)-Brefeldin A**

刘万云

指导教师姓名: 赵玉芬 教授、院士

专业名称: 有机化学

论文提交日期: 2006年6月

论文答辩时间: 2006年6月

学位授予日期: 2006年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2006年6月

**Study on the Production of (+)-Brefeldin A by
Fermentation and Synthesizing Derivatives of
(+)-Brefeldin A**

Dissertation Submitted to

Xiamen University

In fulfillment of the requirement

for the degree of

Master of Natural Science

By

Wanyun Liu

Dissertation Supervisor: Prof. Yu-Fen Zhao

Department of Chemistry, Xiamen University

June, 2006

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2006年 月 日

摘 要

布雷菲德菌素 A ((+)-Brefeldin A, 简称 BFA), 是一种大环内酯类抗生素, 它具有多种生物活性, 如抗真菌、抗病毒、抗线虫和抗肿瘤等。(+)Brefeldin A 的主要功能是能诱导高尔基体的分解, 抑制蛋白从内质网(ER)中转移为高尔基体的复合物, 从而阻断高尔基体复合物的蛋白质传输。目前被作为一种重要的分子工具广泛用于研究哺乳动物的信号传导途径, 国际肿瘤协会发现(+)Brefeldin A 能够诱导肿瘤细胞分化和凋亡, 作为化学治疗试剂用于抗肿瘤有很大的应用前景。鉴于(+)Brefeldin A 具有多种生物活性及潜在的药用价值, 故开发和研究(+)Brefeldin A 的工作已备受关注。

本文对青霉 SHZK-15 液体和固体发酵生产(+)Brefeldin A 的工艺条件进行了研究, 通过正交试验优化培养基的组成、发酵时间、接种量等条件对(+)Brefeldin A 产量的影响, 最终确定较优的发酵工艺条件。首次对固体发酵生产(+)Brefeldin A 的条件及通过固体发酵生产(+)Brefeldin A 进行研究, 为实验室发酵生产(+)Brefeldin A 提供了一种全新的、简单和方便的方法, 为工业化固体发酵生产提供了实验基础。并对菌株青霉 SHZK-15 固体发酵的其它次级代谢产物进行了研究, 从固体发酵的代谢产物中共分离到 6 个化合物, 并进行了结构表征和解析。确定其中一个是新化合物, 初步测试了其抗菌和抗肿瘤的活性。

本文还设计并合成出一系列未见文献报道的 (+)Brefeldin A 的氢亚磷酸酯和磷酰胺类衍生物, 进行了结构表征和质谱研究。深入研究了(+)Brefeldin A 的氢亚磷酸酯类化合物的正离子模式下的裂解规律, 发现 (+)Brefeldin A 的 4,7-二氢亚磷酸苄酯中苄基经过四元环迁移到(+)Brefeldin A 的羰基氧上跨环重排反应。并初步测试了(+)Brefeldin A 的氢亚磷酸酯类化合物的抗肿瘤活性。

关键词: 布雷菲德菌素 A; 发酵; 代谢产物; 衍生物。

ABSTRACT

(+)-Brefeldin A (BFA) is a macrocyclic lactone antibiotic, it possesses a diverse array of biological activities including antiviral, antifungal, nematocidal and antitumor effects. It was reported that (+)-Brefeldin A inhibited protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus causes reversible disassembly of the Golgi complex, and blocks protein transport beyond the Golgi complex. Now, it is used widely as an important molecular tool for studying signal transduction pathways in mammalian cells. National Cancer Institute discovered that BFA can induce the differentiation and apoptosis of human tumor cells, and it has a great prospect of being used as chemotherapeutic anticancer agents. Therefore due to BFA possesses a diverse array of biological activities and its medicine application research, so it has stimulated a great deal of interest in exploitation and investigation.

In this thesis, the producing conditions for (+)-Brefeldin A by submerged and solid state fermentation of *penicillium* SHZK-15 were investigated. Through orthogonal experiments, component of culture medium, fermentation time and the inoculation quantity were optimized to improve the yield of (+)-Brefeldin A. The conditions of producing (+)-Brefeldin A by solid state fermentation of *penicillium* and produced (+)-Brefeldin A by solid state fermentation were also studied. The results provided the academic base for industrialization of (+)-Brefeldin A by solid state fermentation. The author also investigated other secondary metabolites from Fungi of *penicillium* SHZK-15, there were 6 compounds separated and identified from the product of solid state fermentation. Among those, there is a new compound which antifungal and antitumor activities were also tested.

In this thesis, a series of phosphonate and phosphoramidate derivatives of (+)-Brefeldin A were designed and synthesized. These compounds' structures were studied by mass spectrum. We found that fragmentation pathways of $[M+H]^+$ and $[M+Na]^+$ were different. There was one novel benzyl rearrangement from pseudo-molecular ion $[M+H]^+$ of O-benzyl-4,7-di-H-phosphonate of (+)-Brefeldin A in ESI-MS². We proposed that the benzyl migration undergo through a four-membered cyclic rearrangement, and benzyl group was essential in this migration process. The anticancer activities of these H-phosphonate compounds were tested.

Keywords: (+)- Brefeldin A; fermentation; metabolites; derivatives.

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 绪论	1
1.1 微生物药物在抗肿瘤中的研究进展	1
1.2 布雷菲德菌素 A 的研究概述	4
1.2.1 (+)-Brefeldin A 的抑制作用机理	5
1.2.2 (+)-Brefeldin A 诱导肿瘤细胞凋亡的研究	7
1.2.3 (+)-Brefeldin A 的自身缺陷及其衍生物的合成	7
1.2.4 (+)-Brefeldin A 的化学合成	11
1.2.5 (+)-Brefeldin A 的发酵生产	15
1.3 研究的内容及设想	16
第二章 SHZK-15 发酵生产 (+)-Brefeldin A 条件的优化	18
2.1 材料与方法	18
2.1.1 材料与仪器	18
2.1.2 方法	19
2.2 结果与讨论	22
2.2.1 菌株 SHZK-15 的鉴定	22
2.2.2 样品的 HPLC 测试结果分析	24
2.2.3 样品 TIC 总离子流图和质谱图分析	24
2.2.4 温度对液体发酵的影响	26
2.2.5 正交实验设计法优化液体发酵培养基的配方	26
2.2.6 正交实验设计法优化固体发酵培养基的配方	30
2.3 结论	35
第三章 SHZK-15 固体发酵生产 (+)-Brefeldin A 及其次级代谢产物的研究	36

3.1 材料与方法	36
3.1.1 仪器材料.....	36
3.1.2 方法.....	38
3.2 结果与分析	39
3.2.1 菌株 SHZK-15 的发酵以及次级代谢产物的分离纯化.....	39
3.2.2 化合物结构解析和表征.....	40
3.2.3 化合物生物活性检测.....	54
3.3 结论	55
第四章 (+)- Brefeldin A 的氢亚磷酸酯和磷酰胺类化合物的合成	56
4.1 实验部分	57
4.1.1 仪器与试剂.....	57
4.1.2 (+)- Brefeldin A 的 4, 7-二氢亚磷酸酯的合成.....	58
4.1.3 (+)- Brefeldin A- 4, 7-二磷酰化丙氨酸甲酯的合成.....	60
4.2 结果与讨论	62
4.2.1 (+)- Brefeldin A 的 4, 7-二氢亚磷酸酯的波谱表征.....	62
4.2.2 (+)- Brefeldin A- 4, 7-二磷酰化丙氨酸甲酯的波谱表征.....	64
4.2.3 (+)- Brefeldin A-4, 7-二氢亚磷酸酯 ESI-MS 的裂解规律研究.....	67
4.2.4 (+)- Brefeldin A-4, 7-二氢亚磷酸苄酯[M+H] ⁺ 的重排途径.....	71
4.2.5 (+)- Brefeldin A 的 4, 7-二氢亚磷酸酯的活性测试.....	74
4.3 结论	75
第五章 总结	77
参考文献	79
附录 1 论文图表检索	86
附录 2 核磁图谱	89
致谢	103

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Research Progress in Anticancer of Microbial Medicine	1
1.2 Research Summarization of (+)-Brefeldin A	4
1.2.1 Restrain Effects Mechanism of (+)-Brefeldin A.....	5
1.2.2 Study on (+)-Brefeldin A Inducing Tumor Cells Apoptosis.....	7
1.2.3 The disadvantages of (+)-Brefeldin A and Synthesized Derivatives of (+)-Brefeldin A.....	7
1.2.4 Chemosynthesis of (+)-Brefeldin A.....	11
1.2.5 Product of (+)-Brefeldin A by Fermentation.....	15
1.3 Research Contents and Plans	16
Chapter 2 Optimized the Conditions of Producing (+)-Brefeldin A by Fermentation of SHZK-15	18
2.1 Materials and Methods	18
2.1.1 Materials and Instruments.....	18
2.1.2 Methods.....	19
2.2 Results and Discussions	22
2.2.1 Identified the Fungi SHZK-15.....	22
2.2.2 Samples' HPLC Results and Analyses.....	24
2.2.3 Samples' TIC Results and Mass Analyses.....	24
2.2.4 Temperature Effect on the Liquid Fermentation.....	26
2.2.5 Optimized the Components of Liquid Fermentation Culture Medium by Orthogonal Experiments.....	26
2.2.6 Optimized the Components of Solid State Fermentation Culture Medium by Orthogonal Experiments.....	30

2.3 Conclusions.....	35
----------------------	----

Chapter 3 Produced (+)-Brefeldin A by Solid State Fermentation of SHZK-15 and Study on the Secondary Metabolites

36

3.1 Materials and Methods.....	36
--------------------------------	----

3.1.1 Materials and Instruments.....	36
--------------------------------------	----

3.1.2 Methods.....	38
--------------------	----

3.2 Results and Analyses.....	39
-------------------------------	----

3.2.1 Fermented SHZK-15 and Separated the Secondary Metabolites.....	39
--	----

3.2.2 Determined and Analyzed the Compounds' structures.....	40
--	----

3.2.3 Tested the Compounds' bioactivities.....	54
--	----

3.3 Conclusions.....	55
----------------------	----

Chapter4 Synthesized phosphonate and phosphoramidate derivatives of (+)-Brefeldin A.....

56

4.1 Experiments.....	57
----------------------	----

4.1.1 Instruments and Reagents.....	57
-------------------------------------	----

4.1.2 Synthesized O-alkyl-4,7-di-H-phosphonates of (+)-Brefeldin A.....	58
---	----

4.1.3 Synthesized Alanine acid methyl ester 4,7-di-phosphoramidates of (+)-Brefeldin A.....	60
---	----

4.2 Results and Discussions.....	62
----------------------------------	----

4.2.1 O-alkyl-4,7-di-H-phosphonates of (+)-Brefeldin A were identified by spectrum.....	62
---	----

4.2.2 Alanine acid methyl ester 4,7-di-phosphoramidates of (+)-Brefeldin A were identified by spectrum.....	64
---	----

4.2.3 Investigated O-alkyl-4,7-di-H-phosphonates of (+)-Brefeldin A by ESI-MS.....	67
--	----

4.2.4 Investigated the rearrangement ways of O-alkyl-4,7-di-H- phosphonates of (+)-Brefeldin A's [M+H] ⁺	71
---	----

4.2.5 Tested the bioactivities of O-alkyl-4,7-di-H-phosphonates of	
--	--

(+)-Brefeldin A.....	74
4.3 Conclusions.....	75
Chapter 5 Summary.....	77
References.....	79
Appendix Index of Figures and tables in This Thesis.....	86
Appendix of NMR Spectra.....	89
Acknowledgements.....	103

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章：绪论

1.1 微生物药物在抗肿瘤中的研究进展

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的“恶魔”。据世界卫生组织最近统计结果显示，仅2000年癌症估计死亡7百万，占总死亡人数的12%^[1,2]，近年来全球每年癌症新发病率为1千万，死亡6百万，这些数字还将迅速的上升，癌症将成为新世纪第一杀手，并成为全球最大的公共卫生问题之一。世界卫生组织已经将癌症提到了全球的健康议程^[2]。我国恶性肿瘤的发病率亦呈上升趋势，目前癌症患者每年以180万人递增。城市居民中肺癌已居首位，其次是肝癌、胃癌、结肠癌，恶性肿瘤死亡率增长幅度最大的是肺癌，其次是肝癌，还有结直肠肛门癌、白血病和女性的乳腺癌、子宫颈癌、卵巢癌，其发生瘤谱已接近发达国家。

目前对恶性肿瘤的发病机制及防治研究已取得较大进展，但仍有许多难点有待解决。对恶性肿瘤的治疗常采用外科手术、放射治疗、化学药物治疗及生物治疗。外科手术最简单，但一般只对早期癌症有较彻底的治疗效果；放射性治疗是辅助疗法，副作用大；化学药物治疗(化疗)是一种全身性治疗,并可消灭远距离转移的癌细胞，因此，在肿瘤治疗中占有很重要的地位。占化疗药物绝大多数的是细胞毒类药物，它通过干扰与细胞的生长、死亡、分化及功能等相关的机制，抑制细胞的生长甚至杀死细胞。但是，在临床上化疗药仍存在疗效、副作用以及肿瘤细胞的耐药等问题，使化疗的临床应用受到一定的限制。因此从不同途径寻找高效低毒的天然抗肿瘤药物仍是当务之急，尤其针对实体瘤特别是常见实体瘤如肝癌、肺癌和结直肠癌的高效低毒的药物寻找已成为全世界共同攻关的课题。生物治疗是近十余年来，在分子生物学、分子免疫学、肿瘤学等学科的基础上发展起来的一种新的治疗肿瘤方法，共有四大类即细胞疗法、细胞毒素疗法、基因疗法和抗体疗法。常用的生物制剂有干扰素、白介素、肿瘤坏死因子等。生物治疗还在研究发展中，目前在临床上仅对少数肿瘤

有效，多数不太明显。因而恶性肿瘤的治疗在很大程度上仍依赖于抗肿瘤药物的开发^[3,4]。微生物及其代谢产物的多样性，为天然抗肿瘤药物的筛选提供了丰富的来源。微生物繁殖的快速性与培养发酵的可能性，为工业化生产提供了方便。无疑，来源于微生物的抗肿瘤药物必将获得更大的发展。

微生物在人类的生产生活中具有广阔的应用范围，如治疗药物、精细化工、农用药物、发酵及食品工程、单细胞蛋白、酶制剂、生物多聚物、污水处理、石油勘探及人类蛋白质遗传工程等。其中医药和农用药物更受到特别重视。

来源于微生物的药物总称为微生物药物(Microbial medicine)。微生物药物按其来源可分为三类：来源于微生物整体或部分实体的药物，来源于微生物初级代谢产物(Primary metabolites)的药物和来源于微生物次级代谢产物(Secondary metabolites)的药物。新药主要来源于天然产物^[5,6]和经化学合成修饰的化合物^[7,8]。迄今为止，人类已经发现了12000余种微生物产生的天然活性物质和数万合成，半合成以及用生物技术等手段制得的天然产物的衍生物和结构修饰物^[9]。近年来，微生物天然产物平均以每年150~300种的速度增加，并且有很多重要微生物药物推向了工业化生产，如超广谱抗生素亚胺培南(imipenem)；新型降血脂药洛伐他丁(lovastatin)；新型免疫抑制剂环孢菌素A(cyclosporine A)和FK506；高效抗寄生虫抗生素(ivermectin)；抗MRSA的糖肽类抗生素万古霉素(teicoplanin)等等。在这些新发现的天然产物中，大部分是由微生物次级代谢产生的抗生素和生理活性物质(如酶抑制剂，免疫调节剂，受体拮抗剂和植物生长调节剂等等)。因此，微生物次级代谢产物是筛选新药的重要来源之一。

所谓微生物次级代谢产物，是指在微生物生命活动过程中产生的极其微量的、对微生物本身的生命活动没有明显作用，而对其它生物体往往具有不同的生理活性作用的一类物质。人们主要通过不同的分离培养技术，让不同来源的细菌、放线菌和霉菌这些微生物产生多种多样的次级代谢产

物,然后再通过各种筛选技术和分析、检测技术,寻找、发现其中新的具有各种生理活性的次级代谢产物。这些小分子次级代谢产物往往用化学方法难以合成,或即使能够在实验室得以合成也较难实现产业化。将这些小分子物质作为先导化合物,再通过化学等修饰方法,即可得到具有应用价值的药物,即微生物药物。因此,微生物药物(microbial medicine)就是在微生物生命活动过程中产生的具有生理活性(或称药理活性)的次级代谢产物及其衍生物,微生物药物包括抗生素特异酶抑制剂免疫调节剂和抗肿瘤药物^[10,11]。产抗肿瘤物质的微生物具有广泛的分布它们可以存在于植物体内动物体内广泛分布在陆地和海洋中。

由于微生物的代谢产物极为丰富多彩,迄今为止有报道的抗肿瘤活性微生物产物已超过1500种;另外还有为数众多的经半合成途径得到的同类物,目前应用于临床的抗肿瘤微生物药物有20余种(表1-1),它们在肿瘤化疗中起着重要作用^[4]。

表1-1. 临床应用的主要抗肿瘤微生物药物

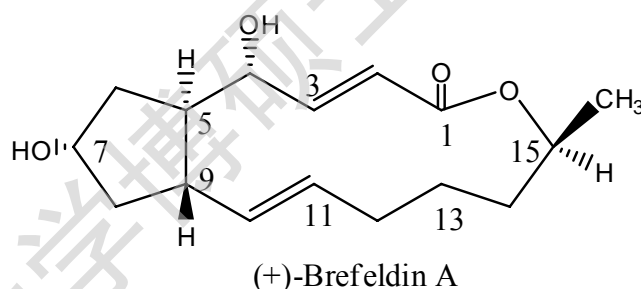
药物类型	药物名称
蒽环类	柔红霉素、阿霉素、表柔比星、依索比星、吡柔比星、地托比星、伊达比星、阿柔比星
博来霉素类(糖肽类)	博来霉素、平阳霉素、培莱霉素
丝裂烷类(苯醌类)	丝裂霉素C
色霉素类(糖苷类)	色霉素A、光辉霉素、橄榄霉素
核苷类	吡唑霉、素嘌呤、霉素等
放线菌类(色肽类)	放线菌素C、放线菌素D
氨基酸类	重氮丝氨酸、氧代赖氨酸及avicin
蛋白质类	新制癌菌素、大分子霉素、C-1027

各种抗肿瘤微生物药物的作用机制亦不尽相同,蒽环类及放线菌素D可嵌入DNA链,与DNA呈非共价结合;博来霉素直接损害DNA模板,使DNA单链断裂;丝裂霉素及链脲霉素属烷化剂,与DNA的双螺旋形成交叉连结,抑制DNA的复制;嘌呤霉素作用于核糖体水平,干扰遗传信息的翻译,抑制蛋白质合成;重氮丝氨酸是谷氨酰胺拮抗剂,干扰嘌呤及嘧啶的

生物合成；另外还有一些作用靶点比较独特的抗肿瘤抗生素如松胞菌素类物质主要作用于细胞的微丝，抑制细胞的分裂；布雷菲德菌素A主要作用于细胞的高尔基体干扰蛋白质的分泌。

1.2 布雷菲德菌素A的研究概述

布雷菲德菌素A ((+)-Brefeldin A, 简称BFA), 也称作斜卧菌素 (Decumbin) 或蓝菌素 (Cyanein) 或壳二孢素 (Ascotoxine), 是一种大环内酯类真菌代谢产物, 最早由Singleton^[12]等在1958年从 *Penicillium decumben* 中分离得到, 随后又分别由Betina^[13], Harri^[14], 及Suzuki^[15]等小组从 *Penicillium cynaneum*, *Penicillium brefeldianum* 和 *Ascochyta imperfecta* 等的培养物中分离得到。虽然(+)-Brefeldin A的平面结构早已被测定, 其绝对构型直到1971年才由Weber^[16]等用X射线晶体衍射法确立。



生物测试表明(+)-BrefeldinA 具有广泛的生物活性, 包括抗病毒^[17,18]、抗真菌^[19-20]、抗线虫^[21]、抗有丝分裂^[22]和抗肿瘤^[23,24]等。二十世纪八十年代中后期一系列重要发现使人们从细胞水平上对(+)-Brefeldin A的生物活性有了认识。这些发现包括抑制蛋白质在哺乳动物细胞中从内质网向高尔基体的转移^[25]并导致高尔基体的分解像抑制蛋白质的转移一样抑制糖蛋白的唾液酸化、岩藻糖化和硫酸化^[26], 抑制异位囊肿和病毒蛋白质做为细胞毒素在T淋巴细胞上的表达^[27]、对人类的肿瘤细胞系列显示出选择性的细胞毒素活性^[28]、以干扰病毒蛋白在细胞内的转移和成熟的形式抑制病毒的复制, 从而达到减少病毒粒子的复制甚至完全消灭病毒粒子例如膜病毒(疱疹病毒和爱滋病病毒)、以阻止膜糖蛋白转移到细胞表面的方式抑制

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库