

# 解淀粉芽孢杆菌 Q-426 Bacillomycin D 的分离纯化及其抗肿瘤活性

权春善<sup>1</sup>, 刘静<sup>1</sup>, 周伟<sup>1</sup>, 郑维<sup>1</sup>, 金黎明<sup>1</sup>, 赵晶<sup>1</sup>, 赵朋超<sup>2</sup>, 范圣第<sup>1</sup>

1 大连民族大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116600

2 河南科技大学 医学技术与工程学院, 河南 洛阳 471023

权春善, 刘静, 周伟, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Q-426 Bacillomycin D 的分离纯化及其抗肿瘤活性. 生物工程学报, 2018, 34(2): 235–245.

Quan CS, Liu J, Zhou W, et al. Isolation, purification and antitumor activity of Bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 235–245.

**摘要:** 环脂肽化合物因其独特的结构特点和生物活性在医药领域具有广泛的应用前景。本研究旨在从解淀粉芽孢杆菌 Q-426 发酵液中分离纯化获得高纯度的环脂肽单体, 并对分离得到的环脂肽 C-15 Bacillomycin D 和 C-16 Bacillomycin D 的抗肿瘤活性及机制进行初步研究。首先, 联合使用酸沉淀和双树脂层析去除大量杂质, 然后通过制备型 HPLC 分离得到纯度较高的两种环脂肽, 经 ESI-MS/MS 对其进行结构鉴定, 分别确定为 C-15 Bacillomycin D 与 C-16 Bacillomycin D。其次, 将两种环脂肽单体及其 1:1 混合液 (摩尔比) 按不同浓度梯度作用于人癌细胞 (Hela、MG、Hep-G2、HT-29), 结果表明环脂肽对 Hela 与 MG 细胞增殖的抑制作用呈浓度依赖性, 长链环脂肽的抑制率较链短环脂肽略高。最后, 采用细胞划痕实验和 PI 染色法考察了 C-16 Bacillomycin 对细胞侵袭与迁移能力、细胞凋亡和周期的影响, 结果显示, C-16 Bacillomycin D 可有效影响细胞的迁移能力, 诱导细胞凋亡呈浓度依赖性, 且阻滞细胞 G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> 期。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌 Q-426, C-15 Bacillomycin D, C-16 Bacillomycin D, 抗肿瘤活性

## Isolation, purification and antitumor activity of Bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426

Chunshan Quan<sup>1</sup>, Jing Liu<sup>1</sup>, Wei Zhou<sup>1</sup>, Wei Zheng<sup>1</sup>, Liming Jin<sup>1</sup>, Jing Zhao<sup>1</sup>, Pengchao Zhao<sup>2</sup>, and Shengdi Fan<sup>1</sup>

1 College of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

2 School of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

**Abstract:** Cyclic lipopeptide has extensive application prospect in the field of medicine due to its unique chemical structure

**Received:** June 16, 2017; **Accepted:** August 28, 2017

**Supported by:** the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. DC201502020201).

**Corresponding author:** Chunshan Quan. Tel: +86-411-87656219; Fax: +86-411-87656215; E-mail: mikyeken@dlmu.edu.cn

中央高校基本科研业务费专项资金 (No. DC201502020201) 资助。

and biological activity. This study aims to obtain high purity of cyclic lipopeptide monomer from *Bacillus amyloliquefaciens* strain Q-426, and illuminate preliminary antitumor mechanism of C-15 Bacillomycin D and C-16 Bacillomycin D. Firstly, crude cyclic lipopeptide solution was prepared by two-steps purification of acid precipitation and double-resins chromatography. In order to obtain purer product preparative HPLC was utilized to separate and purify cyclic lipopeptide. Component 1 and component 2 were detected as C-15 Bacillomycin D and C-16 Bacillomycin D by HPLC-MS and ESI-MS/MS. Secondly, the effect of C-15 Bacillomycin D, C-16 Bacillomycin D and their mixture (1:1, mol:mol) on cell proliferation was measured using human cancer cells (Hela, MG, Hep-G2 and HT-29). The cyclic peptide showed a dose dependent manner on the cell proliferation inhibition of Hela and MG cells. Finally, the results of the scratch wound healing assay and FACS analysis revealed that C-16 Bacillomycin D can effectively influence the cells migration and the cells treated with C-16 Bacillomycin D showed typical apoptotic morphology with the increase of drug concentration in the early apoptosis, late apoptosis percentage increased, and G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> arrest was induced significantly.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426, C-15 Bacillomycin D, C-16 Bacillomycin D, antitumor activity

环脂肽是由微生物发酵产生的一类双亲性化合物,其一端由多个氨基酸组成肽环形成亲水基,另一端由脂肪烃链形成亲油基。它们具有独特的化学结构和生理功能。环脂肽的理化性质较为稳定,在高温高压处理后仍可保持较高的抗菌活性,对氯仿等有机溶剂有一定的耐受力,抗紫外线,对蛋白酶类不敏感。环脂肽类化合物主要由革兰氏阳性芽孢杆菌代谢产生,具有抗菌、抗肿瘤、抗炎、抗支原体、降低胆固醇等生物活性<sup>[1]</sup>。

芽孢杆菌产生的环脂肽化合物主要分为三大类,即表面活性素家族 (Surfactins)、芬枯草菌素家族 (Fengycin family) 和伊枯草菌素家族 (Iturin family)。表面活性素 Surfactin 是由 Arima 等<sup>[2]</sup>首次在 *Bacillus subtilis* 发酵产物中分离获得,具有抗病毒、抗肿瘤、抗支原体、抗真菌以及抗菌活性,具有很强的表面活性<sup>[3]</sup>。它的化学结构特点是一个 3-羟基脂肪酸连接在由 7 个氨基酸形成的肽链上,并以内酯键的形式构成环状。又由于其 2 位 (Leu/Ile/Val)、4 位 (Val/Leu/Ile/Ala) 和 7 位 (Leu/Val/Ile) 氨基酸残基的不同和脂肪酸链长短 (C12–C16) 的不同,出现了较多的类似物(包括同系物)<sup>[4]</sup>。芬枯草菌素由 3-羟基脂肪酸与 10 个氨基酸形成的肽链组成,由肽链的第 10 位氨基酸上的羧基和第 3 位 Tyr 上的羟基缩合形成环状结构<sup>[5-7]</sup>,已发现 6 种类型 (Fengycin A、B、A<sub>2</sub>、

B<sub>2</sub>、C 和 S)<sup>[8-9]</sup>。它对丝状霉菌有良好的抑制作用,但对酵母和细菌仅有微弱的活性<sup>[10-11]</sup>。伊枯草菌素家族包括伊枯草菌素 (Iturin) A、C、D、E 及其类似物芽孢菌霉素 (Bacillomycin) D、L、F,芽孢菌肽素 (Bacillopeptin) 和抗霉枯草菌素 (Mycosubtilin)<sup>[12-14]</sup>。它们的化学结构中都含有一个 C14–C17 脂肪酸链和由 7 个氨基酸组成的肽链,由脂肪酸上的氨基和肽链中 C 末端氨基酸的羧基形成酰胺键形成环状结构。

Bacillomycin D 是 Iturin 家族中的主要成员,1980 年由 Peypoux 等首次从枯草芽孢杆菌发酵液中分离提取并确定其化学结构<sup>[15]</sup>。Bacillomycin D 是由非核糖体肽合成酶 (Non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs) 通过一种称为“多载体硫模板机制 (Multiple carrier thiotemplate mechanism)”的方式合成<sup>[16-17]</sup>。芽孢杆菌全基因组序列分析结果表明,很多菌株都携带有 Bacillomycin D 合成酶基因序列,但其生物合成和调控机制尚不清楚。Bacillomycin D 对酵母菌和丝状真菌具有较强的抑制作用,对细菌抑菌活性较弱,对于其抗病毒、抗肿瘤活性还鲜有报道。由于其对很多植物病原真菌具有很好的抑制作用,因此很多研究将其焦点放在生物防治的应用中。

由于环脂肽化合物具有广谱抗菌活性,其抗菌机理不同于目前上市的任何一类抗生素,临床

上表现出高效、低毒、不易产耐药性的特点,使其在医药领域具有良好的应用前景。另外,多种环脂肽化合物表现出显著的抗肿瘤活性。但是,由于环脂肽类化合物的表面活性显著,发酵液中同时存在多种环脂肽及其同系物,并且溶液中的环脂肽所表现出的溶解性、极性和胶束状态会随着样品浓度、杂质种类和杂质数量的变化而变化,因此获得高纯度的产品难度很大<sup>[18]</sup>。目前,仅放线菌来源的环脂肽化合物达托霉素的开发较为成功,2003年9月首次在美国上市,用于万古霉素抗性的粪肠球菌(VRE)及对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)等革兰氏阳性细菌感染导致的并发性皮肤感染和皮肤结构感染<sup>[19]</sup>。

解淀粉芽孢杆菌 Q-426 菌株由本研究室从堆肥中分离所得,能够代谢产生至少 7 种环脂肽化合物,对多种植物病原真菌具有较强的生物活性。前期研究中,我们鉴定了 Q-426 菌株基因组中存在的芬枯草菌素(Fengycins)和伊枯草菌素(Iturins)合成酶基因序列,并用生物信息学以及分子生物学软件对其合成酶序列进行了详细的分析。同时,综合利用抑菌活性、HPLC、HPLC-MS、随机突变、定向基因敲除和双向电泳等方法研究了对 Bacillomycin D 和 Fengycins 生物合成影响较显著的内外调控因子<sup>[20-23]</sup>。然而,由于该菌株同时产生多种环脂肽化合物,并且由于环脂肽的特殊化学结构,使得获得单一种类的高纯度的环脂肽样品较为困难,限制该菌及其代谢产物的应用。因此,本文对原有 Q-426 菌株环脂肽的分离纯化方法进行了改进,最终分别获得 C-15 Bacillomycin D 和 C-16 Bacillomycin D,纯度均达到 90% 以上,同时,对其抗肿瘤活性及机制进行了初步探讨,为其在医药领域的应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

解淀粉芽孢杆菌 Q-426 为本实验室从堆肥样

品中筛选分离获得并保藏。宫颈癌细胞 Hela 由大连医科大学肿瘤研究中心王丽娜馈赠,人神经胶质瘤细胞 MG 由大连医科大学基础医学院冯斌教授馈赠,人肝癌细胞 Hep-G2、人结肠癌细胞 HT-29 购于上海细胞库。

### 1.2 环脂肽粗提样品的制备

将解淀粉芽孢杆菌 Q-426 划线培养于 LB 固体培养基上,37℃培养 16 h,挑取生长较好的单菌落活化于 20 mL LB 液体培养基中,37℃、200 r/min 振荡培养 12–14 h,按 1% 接种于 500 mL FM 液体培养基(g/L:胰蛋白胨 12.4,葡萄糖 20,氯化钠 5,  $K_2HPO_4$  1.5,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.04,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1.7,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.2, pH 9.0), 30℃、180 r/min 振荡发酵 72–76 h。离心去除菌体,用 6 mol/L 盐酸溶液将上清液 pH 调至 2.0,4℃静置过夜,8 000 r/min 离心 15 min 去掉上清,用 pH 1.8 超纯水洗涤沉淀 3 次,以 10% (V/V) 的甲醇分别抽提 3 次,每次抽提 2 h,离心收集甲醇抽提液。42℃减压蒸干,加入 5 mL 超纯水溶解,pH 调至中性,12 000 r/min 离心 10 min 除去沉淀,上清液经 0.22 μm 醋酸纤维素滤膜过滤保存于 4℃。

### 1.3 环脂肽的分离与纯化

将上述环脂肽粗品通过双树脂联合层析去除大部分杂质,最后利用高效液相色谱分离纯化得到纯品,具体过程如下。向填有 HD-8 树脂的层析柱中加入 500 μL 环脂肽粗提样品,用 50% 甲醇以 0.5 mL/min 的流速冲洗树脂。冲洗过程中,当柱子流出端出现白色浑浊状流出液时开始收集,当流出液变澄清透明时停止收集。将收集的白色浑浊流出液经旋转蒸发除去甲醇,pH 调至 2.0,12 000 r/min 离心 5 min,除去上清,用 500 μL 的超纯水溶解,保存于 4℃。

向已预处理好的 HZ-20ss 树脂中加入 500 μL 经 HD-8 处理过环脂肽粗样品,室温、100 r/min 静态吸附 8 h,将吸附样品的树脂进行装柱。用

5 BV 的 50% 甲醇以 6 BV/h 的流速冲洗柱子, 再用 12 BV 的 90% 甲醇以 3 BV/h 的流速洗脱环脂肽, 收集洗脱液。将洗脱液经 42 °C、旋转蒸发除去甲醇, 用 500  $\mu$ L 的超纯水溶解, 经 0.22  $\mu$ m 醋酸纤维素膜过滤保存于 4 °C。

经过 HZ-20ss 树脂处理的样品利用制备型高效液相色谱进一步纯化。所用色谱柱为 ShodexAsahipak ODP-50 6D, 检测波长为 210 nm, 进样量 20  $\mu$ L, 所使用的流动相 A 为水(0.08% 三氟乙酸, TFA); 流动相 B 为 80% 乙腈水溶液(0.08% TFA)。流动相流速: 0.7 mL/min; 洗脱流程: 0–31 min, 流动相 A 含量变化从 50% 到 13%, 流动相 B 含量变化从 50% 到 87%。

#### 1.4 环脂肽的 ESI-MS/MS 分析

质谱条件: 气体温度 350 °C; VCap 3.5 kV, Capillary 0.078  $\mu$ A, Chamber 14.58  $\mu$ A; 碰撞电压 75 V, Slimmer 65 V, OCT 射频电压峰值 750 V。MS 范围: 100–1 500  $m/z$ , acquisition rate/time: 1 spectra/s, 1 000 ms/spectrum, transients/ spectrum: 5 976。MS/MS 范围: 50–1 100  $m/z$ , acquisition rate/time: 1 spectra/s, 1 000 ms/spectrum, transients/ spectrum: 5 976。

#### 1.5 MTS 法检测环脂肽对肿瘤细胞增殖的影响

将肿瘤细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 按梯度浓度加入环脂肽作用 48 h, 每孔加入 20  $\mu$ L MTS 工作液, 37 °C 孵育 4 h, 在 490 nm 读取吸光值。每个样品重复 3 次, 对照组以 1 mmol/L DMSO 代替样品。细胞存活率 =  $1 - (\text{对照组平均值} - \text{空白}) - (\text{实验组} - \text{空白}) / (\text{对照组平均值} - \text{空白})$

#### 1.6 Hela 细胞划痕实验

采用划痕实验检测环脂肽对 Hela 细胞迁移的影响。取 12 孔板, 每孔加入约  $5 \times 10^5$  细胞, 其数量以过夜铺满为佳, 隔日用移液器枪头在每孔中央纵轴及横轴方向各划一条创伤区域, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 加入无血清培养液稀释不同浓度

的环脂肽, 每隔一段时间观察两侧细胞向中间迁移的情况并拍照。

#### 1.7 PI 染色法检测 Hela 细胞凋亡与周期

取对数生长期的 Hela 细胞接种于 6 孔板 ( $10^5$  个/mL), 培养 24 h, 分别加入 50  $\mu$ g/mL 和 70  $\mu$ g/mL 的 C-16 Bacillomycin D, 对照组加入 DMSO(与最高浓度样品等量), 继续培养 48 h, 小心收集细胞培养液到 1.5 mL 无菌离心管内, 再将胰酶消化收集的贴壁细胞悬液至同一离心管内, 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 1 mL 提前预冷的 PBS 重悬细胞, 并转移至 1.5 mL 无菌离心管, 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, 重复 2 次, 最后用 1 mL PBS 重悬细胞。加入 1 mL 的 70% 冰乙醇, 轻轻吹打混匀, 4 °C 固定 24 h。于 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 洗细胞沉淀数次。在每个待检细胞样品中, 加入 500  $\mu$ L PI 染色工作液, 轻轻重悬细胞沉淀, 置于 37 °C 避光水浴 30 min。用流式细胞仪在激发波长 488 nm 波长处检测红色荧光, 同时检测光散射情况。

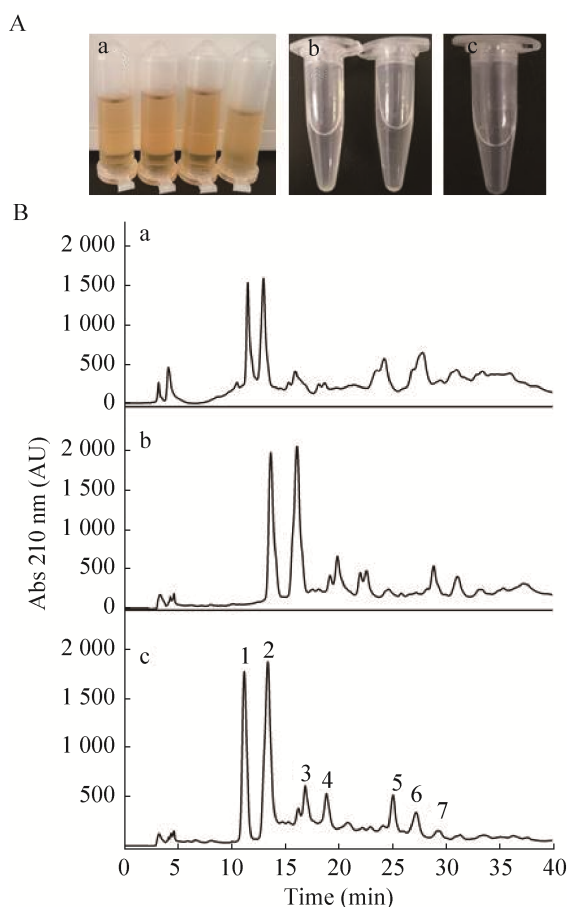
## 2 结果与分析

#### 2.1 解淀粉芽孢杆菌 Q-426 环脂肽的分离纯化

我们在之前建立的解淀粉芽孢杆菌 Q-426 环脂肽制备方法的基础上, 对其分离纯化方法进行了补充修改, 增加了双树脂处理步骤。在第一步酸沉淀并甲醇抽提过程中, 除环脂肽类物质, 还有一些易溶于有机溶剂的物质、杂蛋白及色素溶于甲醇中, 因此此时环脂肽提取液呈棕黄色(图 1A-a)。粗提液接着用大孔型强酸阳离子交换树脂(HD-8)处理, 由于环脂肽带有负电荷, 所以 HD-8 树脂不能与环脂肽进行离子交换, 故在酸性环境中环脂肽经过该树脂后以白色浑浊液的状态优先被冲洗下来, 而大部分的杂质和色素类物质被 HD-8 树脂吸附, 环脂肽粗品呈无色(图 1A-b)。接着将环脂肽样品经过 HZ-20ss 色谱柱, 用甲醇

溶液将活性物质洗脱下来, 此步可进一步除去杂质和残留色素。

分别将甲醇抽提物、HD-8 色谱柱流出液、HZ-20ss 色谱柱流出液进行了 HPLC 检测, 结果如图 1B 所示, 检测到共 7 组活性组分, 可明显看出



**图 1** 解淀粉芽孢杆菌 Q-426 环脂肽样品的分离纯化  
Fig. 1 Cyclic lipopeptides from *B. amyloliquefaciens* Q-426. (A) Products of lipopeptides. a: after methanol extraction; b: after treatment with HD-8 resin; c: after treatment with HD-8 and HZ-20ss resins. (B) HPLC chromatogram of cyclic lipopeptides purified by different method. a: after methanol extraction; b: after treatment with HD-8 resin; c: after treatment with HD-8 and HZ-20ss resins. Peaks 1–7 are main components with antifungal activity.

双柱联合处理后的样品组分杂质较少, 分离度较好, 基线稳定。根据峰面积归一化法计算得出组分 1–7 的产率分别为 23.65%、36.29%、12.21%、9.80%、8.25%、7.79% 和 2.00%, 相对于未纯化的粗提样品, 活性组分产量 (峰面积) 均有提高, 其中组分 1 和组分 2 的产率占总产一半以上, 可将其单独制备, 作进一步研究。

## 2.2 组分 1 和组分 2 的结构鉴定

分别收集产率最大的组分 1 和组分 2, HPLC 检测结果表明其纯度分别为 95.7% 和 93.1%, 采用 LC-ESI-MS 方法测定分子量, 如图 2 所示, 组分 1 得到两个离子峰, 其  $m/z$  分别为 1 045.556 8 和 1 067.537 3, 分别推测为  $[M+H]^+$  和  $[M+Na]^+$  的分子离子峰; 组分 2 得到两个离子峰, 其  $m/z$  分别为 1 059.574 2 和 1 081.556 8, 分别推测为  $[M+H]^+$  和  $[M+Na]^+$  的分子离子峰。由于组分 1 和组分 2 的  $m/z$  相差为 14, 即  $-CH_2-$ , 猜测两个化合物互为同系物, 且相差一个亚甲基。

如图 3 所示, 环状肽链的断开较易发生于苏氨酸残基 (Thr) 的 C 末端、天门冬酰胺残基 (Asn) 和脯氨酸残基 (Pro) 之间的酰胺键。当前者发生断裂时会产生一些碎片离子, 其  $m/z$  分别为 944.5 (b5)、857.4 (b4)、631.4 (b3/y3)、517.2 (b2)、355.2 (b1)、240.2 (b0) (图 3A 和 B)。相应地, 可以得到肽链的部分序列为 N-Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu-Ser-Thr-C。与此同时, Asn 和 Pro 残基之间的肽键断开, 获得了一些碎片离子 ( $m/z$ ): 769.4 (b6)、656.4 (b7)、415.6 (b8)、947.5 (y1)、732.4 (y2) 和 392.2 (y4)。从而可以得到脂肪酸残基 C 和 N 末端的氨基酸残基序列, 分别为 N-Asn-Tyr-Asn-C 和 N-Pro-Glu-Ser-Thr-C (图 3A 和 C)。根据 b0, 脂肪酸残基的分子量 240.2, 即  $CH_3(CH_2)_{11}CHNHCH_2CO-$ , 因此可以确定为 C-15  $\beta(3)$ -氨基脂肪酸, 最终确定组分 1 为 C-15 Bacillomycin D, 同理分析组分 2 为 C-16 Bacillomycin D (图 4)。

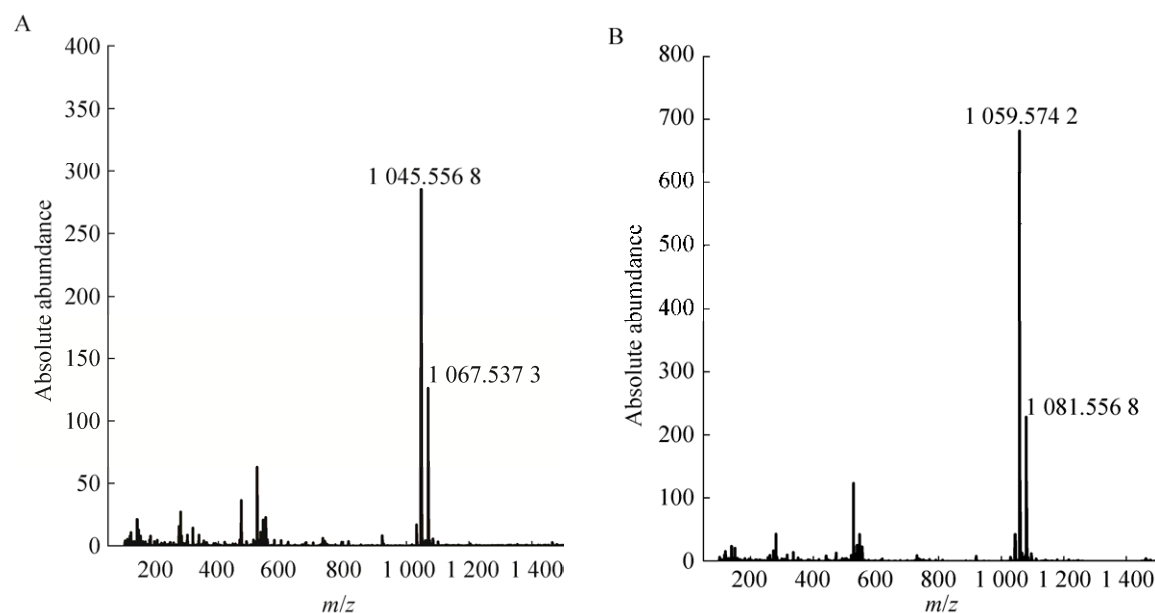
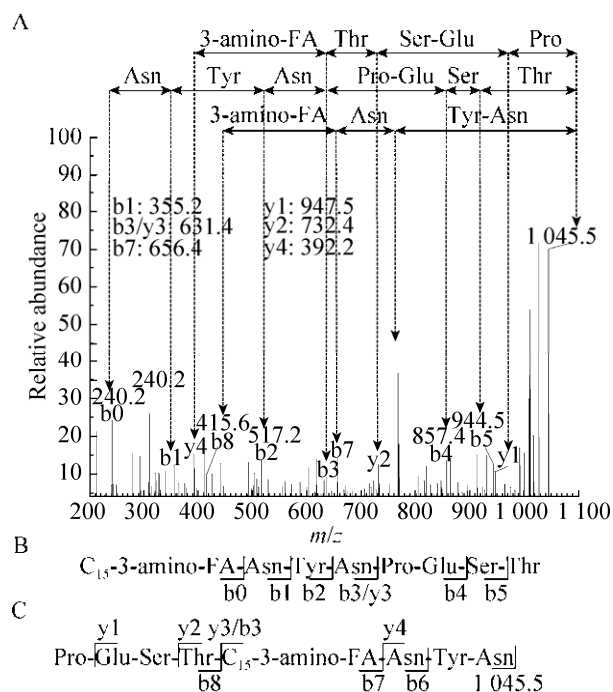
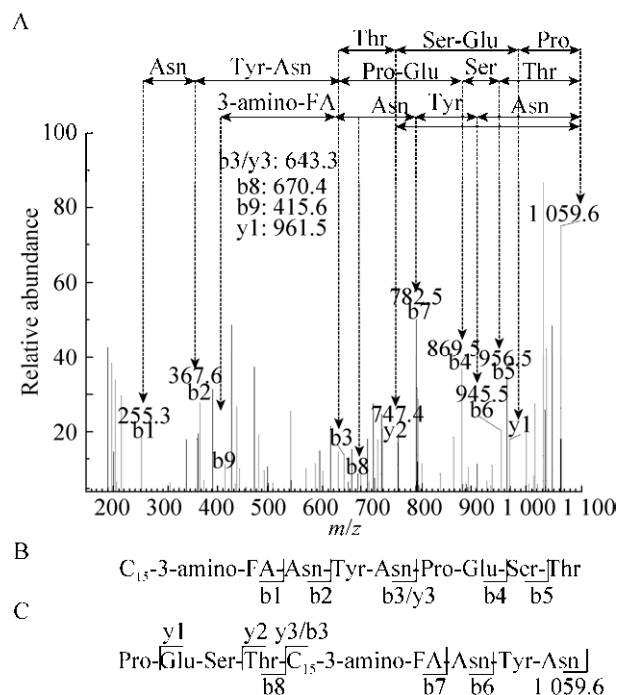


图2 活性组分1和2的质谱图

Fig. 2 Mass spectrometry of components 1 and 2. (A) Component 1. (B) Component 2.

图3 组分1单分子离子在  $m/z$  1045.5 Da 的 MS/MS 分析  
Fig. 3 MS/MS analysis of a single peak obtained at  $m/z$  1045.5 Da. (A) MS/MS profile. (B) Cleavage at C terminal of Thr. (C) Cleavage between Asn and Pro.图4 组分2单分子离子在  $m/z$  1059.6 Da 的 MS/MS 分析  
Fig. 4 MS/MS analysis of a single peak obtained at  $m/z$  1059.6 Da. (A) MS/MS profile. (B) Cleavage at C terminal of Thr. (C) Cleavage between Asn and Pro.

2.3 环脂肽对肿瘤细胞增殖的抑制作用

MTS 法检测结果显示,Bacillomycin D (C-15、C-16) 混合物均能抑制 Hela、MG、Hep-G2、HT-29 四种肿瘤细胞的增殖。当 Bacillomycin D 混合液浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  时,Hela、MG、Hep-G2、HT-29 四种细胞的存活率分别为 75.00%、85.50%、33.15%和 96.34%;当样品浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  时,存活率分别为 64.50%、52.80%、33.09%和 73.84%;当浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$  时,存活率分别为 25.60%、29.40%、24.30%和 44.0%;当浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时,存活率分别为 5.30%、2.70%、20.24%和 22.48%;当浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时,肿瘤细胞存活率均低于 20%,细胞增殖依次呈浓度依赖抑制。MTS 细胞活性实验表明,相较之下,环脂肽对 Hela 细胞、MG 细胞增殖抑制作用更加呈现浓度依赖性,即在相同作用时间下,细胞活力随着样品浓度的增加而逐渐降低(图 5)。

由于 Bacillomycin D 混合物对 Hela 细胞增殖的抑制作用明显,因此,分别考察了 C-15 Bacillomycin D、C-16 Bacillomycin D 和两者混合物对 Hela 细胞增殖的抑制作用(表 1)。C-16 Bacillomycin D

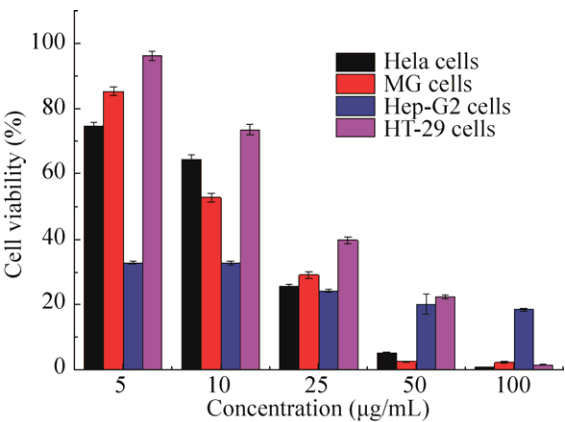


图 5 Bacillomycin D 混合液对肿瘤细胞增殖的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect of Bacillomycin D mixture on the proliferation of tumor cells.

表 1 Hela 细胞存活率(%)

Table 1 Viability of Hela cells disposed by Bacillomycin D

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	5	10	25	50	100
C-15 Bacillomycin D	94.7	76.1	64.8	54.7	48.4
C-16 Bacillomycin D	87.1	81.4	71.0	58.6	52.9
Bacillomycin D mixture	87.1	70.8	64.5	50.8	49.0

的细胞抑制率略大于 C-15 Bacillomycin D,而混合物的细胞抑制率又略大于 C-16 Bacillomycin D。总之,长链环脂肽的抑制率较短链环脂肽略高,浓度达 50  $\mu\text{g/mL}$  时,细胞抑率可达 55%以上,故后续试验选用 C-16 Bacillomycin D 进行细胞凋亡研究。

2.4 C-16 Bacillomycin D 对 Hela 细胞侵袭和迁移的影响

划痕实验是测定肿瘤细胞运动特性的方法之一。在体外培养的单层细胞上划痕使细胞致伤,加入样品后观察其对肿瘤细胞迁移的影响。肿瘤细胞在转移过程中需要侵袭和迁移能力使其顺利进入淋巴管和血管,并侵入其他器官与组织,细胞只能对相邻组织或器官侵袭,若想转移,还需特异性粘附因子等特异性物质及其他复杂过程协助,所以划痕实验可考察细胞致伤后是否还能愈合,继续具备相应的侵袭与迁移能力。将不同浓度的 C-16 Bacillomycin D 作用于 Hela 细胞,如图 6 所示,与 DMSO 相比,细胞的迁移能力明显减弱,并呈现浓度依赖性,70  $\mu\text{g/mL}$  样品处理细胞 24 h 后,细胞迁移能力明显被抑制。

2.5 C-16 Bacillomycin D 对 Hela 细胞凋亡和周期的影响

利用细胞流式仪 PI 染色法检测 C-16 Bacillomycin D 对人乳腺癌 Hela 细胞凋亡影响结果表明,未用环脂肽处理的细胞主要为活细胞,随着药物浓度的增大凋亡早期细胞所占比例不断



增加, 凋亡晚期细胞所占比例也呈增加趋势, 当达到一定浓度后凋亡早期细胞逐渐减少。

不同浓度 C-16 Bacillomycin D 作用于 Hela 细胞后, 随浓度增加,  $G_0G_1$  期细胞比例逐渐减少, S 期细胞比例逐渐增多,  $G_2M$  期比例变化不大。在样品浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时,  $G_0G_1$  期细胞比例从对照组的 89.03% 减至 74.07%, 浓度为 70  $\mu\text{g/mL}$  时, 急剧减至 22.81%, 说明 C-16 Bacillomycin D 诱导  $G_0G_1$  期阻滞 (图 7)。

### 3 讨论

解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 是芽孢杆菌 *Bacillus* 属中的一员, 与枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 亲缘性很高。多株解淀粉芽孢杆菌已被报道能够代谢产生多种环脂肽化合物, 还有一些菌株的全基因测序结果表明其携带环脂肽合成基因<sup>[24]</sup>。截至目前, 对解淀粉芽孢杆菌环脂肽的研究主要集中于其化合物结构的鉴定、发酵液或混

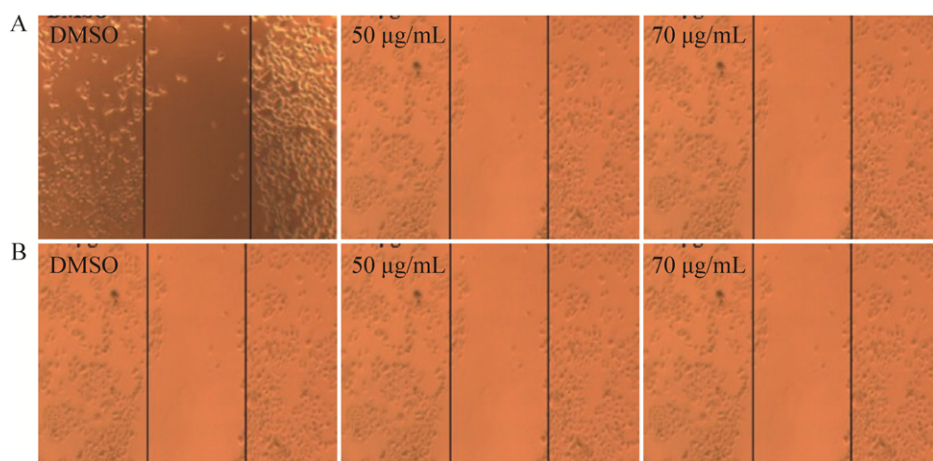


图 6 C-16 Bacillomycin D 对 Hela 细胞迁移能力的影响

Fig. 6 Effect of C-16 bacillomycin D on Hela cell migration ability. (A) 0 h. (B) 24 h.

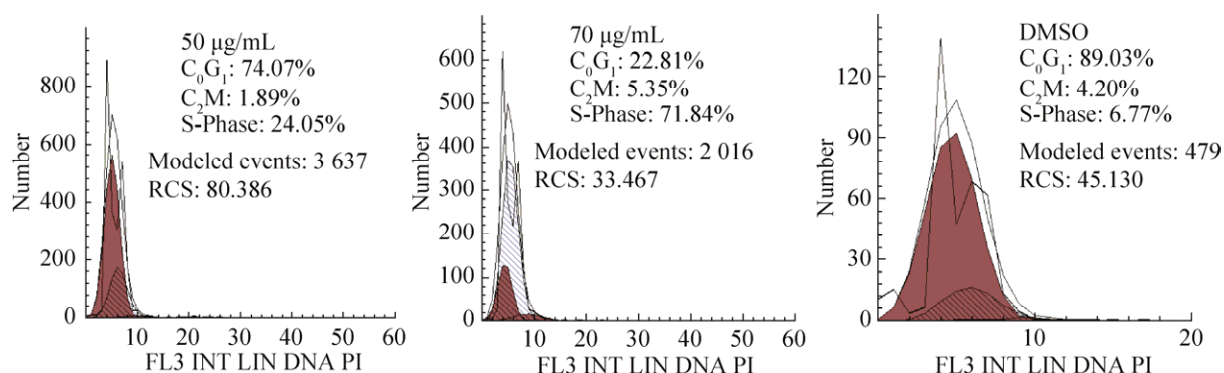


图 7 流式细胞术检测 C-16 Bacillomycin D 对 Hela 细胞周期影响

Fig. 7 Cell cycle distribution of Hela cells treated with C-16 Bacillomycin D.



化合物的生物活性的测定以及发酵液或菌液在生物农药领域的应用等方面<sup>[25]</sup>。由于芽孢杆菌往往在其生长过程中代谢产生多种环脂肽或同类环脂肽的同系物,因此,对其单一化合物的生物活性的研究遇到瓶颈,阻碍了其在医药领域的研究和应用。环脂肽化合物由于其独特的结构特性及生物活性,已成为各大医药公司争相开发的对象,而目前只有达托霉素成功应用于医疗领域。达托霉素是玫瑰孢链霉菌发酵产物脂肽类化合物 A21978C 的 N-癸酰基衍生物,为酸性环脂肽类抗生素,含有 13 个氨基酸,其中 10 个氨基酸形成环十脂肽,另外 3 个氨基酸与癸酰基相连形成侧链,结构复杂,很难进行化学合成。

为了获得纯度较高的环脂肽单体,本文对以前的制备工艺进行了优化,经过发酵、两步酸沉淀法、甲醇抽提、双树脂联合层析,从 500 mL 发酵液中分离纯化得到 61 mg 环脂肽混合物(主要成分为 Iturins 和 Fengycins),7 种环脂肽组分的产率分别为 23.65%、36.29%、12.21%、9.80%、8.25%、7.79%和 7.00%。其中,组分 1 与组分 2 的产率最大,经 HPLC-MS 和 MS/MS 分析鉴定为 C-15 Bacillomycin D 与 C-16 Bacillomycin D。

Surfactin 是由 Arima 从枯草芽孢杆菌 IFO3039 发酵液中发现的脂肽化合物,具有很强的表面活性,故命名为 Surfactin。Surfactin 也是由 7 个氨基酸和 1 个 C13-C16 脂肪酸链组成,但是与 Bacillomycin D 不同,其由脂肪酸的 3 位羟基和肽链 C 末端亮氨酸形成内酯键而构成环状结构。Surfactin 除具有较强的表面活性外,还具有抗菌、抗病毒、抗支原体、抗肿瘤和抗炎活性。Kim 等报道 Surfactin 对人结肠癌 LoVo 细胞增殖具有很强的抑制活性,其抑制活性呈浓度和时间依赖性,其  $IC_{50}$  (作用 48 h) 值为  $26 \mu\text{mol/L}$ ,在  $80 \mu\text{mol/L}$  浓度下处理 24 h 可使 80% 以上的细胞发生凋亡。LoVo 细胞经  $30 \mu\text{mol/L}$  Surfactin 处理

24 h 后,  $G_0/G_1$  期的细胞增多 10%, 25%–30% 的细胞被阻滞于细胞周期  $G_0/G_1$  期内。RT-PCR 和 Western blotting 实验证明, Surfactin 是通过抑制 ERK 和 PI3K/Akt 活性从而使 LoVo 细胞发生凋亡和细胞周期阻滞。Vollenbroich 等测定了来源于枯草芽孢杆菌的 Surfactin 对 Molt、HeP2、H9、Vero、MT-4 等细胞增殖的影响,发现它们的  $IC_{50}$  值在  $30\text{--}65 \mu\text{mol/L}$  <sup>[26]</sup>。Cao 等研究了 Surfactin 对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖与凋亡的影响,发现 Surfactin 对乳腺癌细胞 MCF-7 的  $IC_{50}$  值 (作用 48 h) 为  $27.3 \mu\text{mol/L}$ ,可引发细胞周期  $G_2/M$  的阻滞,并且通过 ROS/JNK 信号通路来诱导细胞的凋亡 <sup>[27-28]</sup>。

目前除 Surfactins 外,还没有其他环脂肽化合物单体是否具有抗肿瘤活性的报道。为研究解淀粉芽孢杆菌 Q-426 环脂肽对肿瘤细胞的抑制活性,本文选用 MTS 法检测 C-15 Bacillomycin D、C-16 Bacillomycin D 及两种环脂肽 1 : 1 混合液对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用。将环脂肽混合液以不同浓度作用于 HeLa、MG、Hep-G2、HT-29 细胞,经 MTS 法检测,样品对 HeLa 和 MG 细胞呈浓度依赖性。C-16 Bacillomycin D 的细胞抑制率略大于 C-15 Bacillomycin D,而混合液的细胞抑制率又略大于 C-16 Bacillomycin D。总之,长链肽的抑制率较短链肽的略高。Bacillomycin D 混合液对 HeLa、MG、HT-29 细胞的  $IC_{50}$  值 (作用 48 h) 分别为 13.4、11.5、 $15.4 \mu\text{mol/L}$ ,其抑制肿瘤细胞增殖的效率略高于 Surfactin。

以 MTS 法检测 C-16 Bacillomycin D 对宫颈癌细胞 HeLa 的增殖抑制,当其浓度为  $50 \mu\text{g/mL}$  时,细胞增殖抑制率可达 55% 以上,细胞凋亡率达 59.1%;浓度为  $70 \mu\text{g/mL}$  时,细胞的迁移能力明显被抑制,细胞凋亡率达 71.1%,  $G_0G_1$  期细胞的比例减少, S 期细胞的比例增多,  $G_2M$  期细胞的比例变化不大,则初步证实 Bacillomycin D 诱导  $G_0G_1$  期阻滞。Bacillomycin D 引发 HeLa 细胞

凋亡的具体机制和信号通路还有待进一步研究。

新抗生素达托霉素的上市,使环脂肽类化合物成为医药研发的热点。但是目前对于环脂肽的研究主要集中在其抗菌活性的研究上,对其抗肿瘤活性的研究比较少。同时,不同种类环脂肽及其同系物与其生物活性之间的相互关系也不清楚,主要原因是由于很难得到纯度高且成分单一的产物。若利用基因编辑技术规划其生物合成路径,或利用代谢调控和分离技术可得到单一组分纯品,将加快环脂肽化合物在医药领域的基础及应用研究。

## REFERENCES

- [1] Zhao PC, Wang JH, Quan CS, et al. Progress on biosynthesis of antimicrobial peptides from *Bacillus subtilis*. China Biotechnol, 2010, 30(10): 108–113 (in Chinese).  
赵朋超, 王建华, 权春善, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌肽生物合成的研究进展. 中国生物工程杂志, 2010, 30(10): 108–113.
- [2] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem Biophys Res Commun, 1968, 31(3): 488–494.
- [3] Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51(5): 553–563.
- [4] Liu XY, Yang SZ, Mou BZ. Molecular structures of microbial lipopeptides. Biotechnol Bull, 2005, 21(4): 18–26 (in Chinese).  
刘向阳, 杨世忠, 牟伯中. 微生物脂肽的结构. 生物技术通报, 2005, 21(4): 18–26.
- [5] Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J Bacteriol, 2004, 186(4): 1084–1096.
- [6] Nihorimbere V, Cawoy H, Seyer A, et al. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. FEMS Microbiol Ecol, 2012, 79(1): 176–191.
- [7] Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, et al. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J Antibiot, 1986, 39(7): 888–901.
- [8] Sang-Cheol L, Kim SH, Park IH, et al. Isolation, purification, and characterization of novel fengycin S from *Bacillus amyloliquefaciens* LSC04 degrading-crude oil. Biotechnol Bioprocess Eng, 2010, 15(2): 246–253.
- [9] Chen LL, Wang N, Wang XM, et al. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. Bioresour Technol, 2010, 101(22): 8822–8827.
- [10] Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ Microbiol, 2007, 9(4): 1084–1090.
- [11] Hofemeister J, Conrad B, Adler B, et al. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. Mol Genet Genomics, 2004, 272(4): 363–378.
- [12] Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. Toxicology, 1994, 87(1/3): 151–174.
- [13] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol, 2005, 56(4): 845–857.
- [14] Kajimura Y, Sugiyama M, Kaneda M. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. J Antibiot, 1995, 48(10): 1095–1103.
- [15] Peypoux F, Marion F, Michel G, et al. Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin Group. Eur J Biochem, 1981, 118(2): 323–327.
- [16] Shen QT, Chen XL, Sun CY, et al. Dissecting and exploiting nonribosomal peptide synthetases. Acta Biochim Biophys Sin, 2004, 36(4): 243–249.
- [17] Khan NH, Roets E, Hoogmartens J, et al. Quantitative analysis of oxytetracycline and related substances by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A, 1987, 405: 229–245.
- [18] Gu KB, Guan C, Xu JH, et al. Pilot-scale purification

- of lipopeptide from marine-derived *Bacillus marinus*. Chin J Biotech, 2016, 32(11): 1549–1563 (in Chinese). 顾康博, 管成, 许家慧, 等. 中试规模纯化海洋芽孢杆菌源脂肽类化合物. 生物工程学报, 2016, 32(11): 1549–1563.
- [19] Kleinkauf H, Von Döhren H. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. Eur J Biochem, 1990, 192(1): 1–15.
- [20] Zhao J, Zhao PC, Quan CS, et al. Comparative proteomic analysis of antagonistic *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 cultivated under different pH conditions. Biotechnol Appl Biochem, 2015, 62(4): 574–581.
- [21] Zhao PC, Quan CS, Wang YG, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. J Basic Microbiol, 2014, 54(5): 448–456.
- [22] Zhao PC, Quan CS, Jin LM, et al. Sequence characterization and computational analysis of the non-ribosomal peptide synthetases controlling biosynthesis of lipopeptides, fengycins and bacillomycin D, from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426. Biotechnol Lett, 2013, 35(12): 2155–2163.
- [23] Zhao PC, Quan CS, Jin LM, et al. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. World J Microbiol Biotechnol, 2013, 29(3): 401–409.
- [24] Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nat Biotechnol, 2007, 25(9): 1007–1014.
- [25] Zhang DJ, Liu RF, Li YG, et al. Two new antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. Chem Pharm Bull, 2010, 58(12): 1630–1634.
- [26] Kim SY, Kim JY, Kim SH, et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. FEBS Lett, 2007, 581(5): 865–871.
- [27] Cao XH, Wang AH, Jiao RZ, et al. Surfactin induces apoptosis and G<sub>2</sub>/M arrest in human breast cancer MCF-7 cells through cell cycle factor regulation. Cell Biochem Biophys, 2009, 55(3): 163–171.
- [28] Cao XH, Wang AH, Wang CL, et al. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. Chem Biol Interact, 2010, 183(3): 357–362.

(本文责编 陈宏宇)