

· 论著 ·

海洋拟诺卡菌 SCSIO 11492 中次生代谢产物的分离及其抗肿瘤活性研究

苏瑞强¹, 李 晏², 彭 坤¹, 李 洁³, 杨 全¹, 杨献文³ (1. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006; 2. 解放军 413 医院器械科, 浙江 舟山 510301; 3. 中国科学院南海海洋研究所热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301)

[摘要] 目的 探索海洋来源的拟诺卡菌(*Nocardopsis* sp.) SCSIO 11492 的抗肿瘤活性次生代谢产物。方法 采用硅胶、凝胶、ODS 等色谱分离方法对海洋来源的拟诺卡菌 SCSIO 11492 的发酵粗提物进行分离、纯化, 根据次生代谢产物的核磁数据及相关的理化性质确定化合物的结构, 最后利用活性测试发现活性成分。结果 从海洋拟诺卡菌 SCSIO 11492 中分离纯化得到 5 个化合物, 经鉴定分别为 2'-脱氧腺苷(2'-deoxyadenosine, **1**)、2'-脱氧胸腺嘧啶核苷(2'-deoxythymidine, **2**)、2'-脱氧尿苷(2'-deoxyuridine, **3**)、尿嘧啶核苷(uridine, **4**)、1-O-棕榈酰基-3-O-β-D-半乳糖基甘油酯(1-O-hexadecanoyl-3-O-β-D-galactopyranosylglycerol, **5**)。活性测试结果表明化合物 **5** 对 RAW264.7 显示出较好的生长抑制活性(IC₅₀ = 10.9 μmol/L)。结论 从海洋拟诺卡菌 SCSIO 11492 中分离得到 5 个化合物, 均为首次从该属中分离得到。其中化合物 **5** 可能是该菌抗肿瘤的活性成分。

[关键词] 海洋放线菌; 拟诺卡菌; 次生代谢产物; 抗肿瘤

[中图分类号] R282.77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)05-0406-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.05.006

Separation and antitumor activities of secondary metabolites from marine actinomyete *Nocardopsis* sp. SCSIO 11492

SU Ruiqiang¹, LI Yan², PENG Kun¹, LI Jie³, YANG Quan¹, YANG Xianwen³ (1. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Instrument Department, No. 413 Hospital of PLA, Zhoushan 510301, China; 3. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

[Abstract] **Objective** To explore cytotoxic secondary metabolites from a marine actinomyete *Nocardopsis* sp. SCSIO 11492. **Methods** Isolation and purification were carried out by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, and ODS structures of the isolates were identified mainly by NMR spectroscopic data. And cytotoxic bioassay was performed using MTT method. **Results** Five compounds were identified as 2'-deoxyadenosine (**1**), 2'-deoxythymidine (**2**), 2'-deoxyuridine (**3**), uridine (**4**), 1-O-palmitoyl-3-d-galactosyl-sn-glycerol spongilipid (**5**). Compound **5** exhibited weak cytotoxic activity with IC₅₀ value of 10.9 μmol/L. **Conclusion** Five compounds were obtained from a marine actinomyete *Nocardopsis* sp. SCSIO 11492. All five compounds were reported for the first time from this genus. Compound **5** could be the bioactive compound responsible for the cytotoxic activity of *Nocardopsis* sp. SCSIO 11492.

[Key words] marine actinomyete; *Nocardopsis* sp.; secondary metabolites; anti-tumor

放线菌是一种非常重要的药源微生物, 在已报道的约 23 000 个具有生物活性的微生物次生代谢产物中, 超过 10 000 个由放线菌所产生。而目前已发现的天然抗生素中有超过 2/3 是由放线菌所产

生^[1]。此外, 放线菌也产生其他生物活性次生代谢产物, 包括临床上使用的抗肿瘤药物丝裂霉素和道诺霉素^[2]及免疫抑制剂雷伯霉素和 FK506 等^[3]。然而, 经过多年的开发研究, 目前从陆生放线菌中获得新活性物质的概率正在逐渐下降^[4]。人们将目光转向资源更加丰富的海洋, 由于海洋环境极大地不同于陆地环境, 因此其次生代谢产物在结构类型及生物活性方面都呈现出与陆生放线菌不同的特点与多样性^[5]。为从海洋放线菌中发现结构新颖、活性较好的次生代谢产物, 笔者前期对一批海洋来源的放线菌进行了体外抗肿瘤活性筛选, 发现其中一株

[基金项目] 国家自然科学基金(21002110, 21372233)

[作者简介] 苏瑞强, 硕士研究生。研究方向: 海洋天然产物研究。E-mail: surui2011@126.com

[通讯作者] 杨 全, 博士, 教授, 硕士生导师。研究方向: 中药资源研究与开发。Tel: (020) 39352353; E-mail: yangquan7208@vip.163.com

拟诺卡菌(*Nocardiopsis* sp.) SCSIO 11492 具有较好的活性,因此对该菌株进行了大规模发酵培养,通过系统的化学成分研究,从中分离得到5个次生代谢产物(图1),利用NMR等波谱数据,结合理化性质鉴定其结构分别为2'-脱氧腺苷(2'-deoxyadenosine, **1**)、2'-脱氧胸腺嘧啶核苷(2'-deoxythymidine, **2**)、脱氧尿苷(deoxyuridine, **3**)、尿嘧啶核苷(uridine, **4**)、1-O-棕榈酰基-3-O-β-D-半乳糖基甘油酯(1-O-hexadecanoyl-3-O-β-D-galactopyranosylglycerol, **5**)。对上述化合物进行了体外抗肿瘤活性检测,发现化合物**5**对RAW264.7显示出生长抑制活性(IC₅₀ = 10.9 μmol/L)。

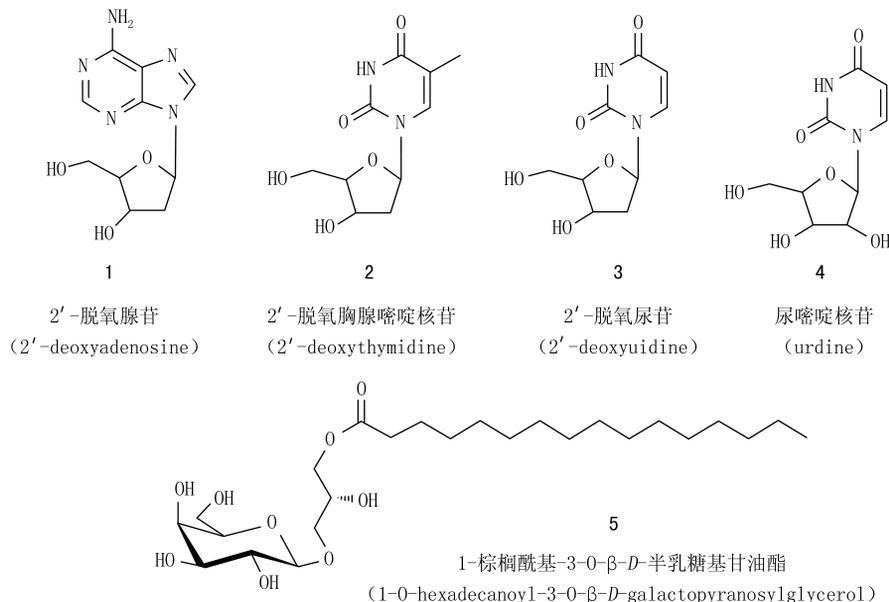


图1 海洋拟诺卡菌 SCSIO 11492 中分离得到的次生代谢产物

1 仪器与材料

1.1 仪器 Bruker AV-500 核磁共振波谱仪(德国bruker公司);API 2000 质谱仪(美国AB公司);薄层色谱硅胶及硅胶板(烟台江友硅胶有限公司);凝胶Sephadex LH-20(40~70 μm, Amersham Pharmacia公司);旋转蒸发仪(日本东京理化公司)。

1.2 材料

1.2.1 菌株 海洋拟诺卡菌 SCSIO 11492 分离自鹿回头岸礁(-6 310 m; 142°19.9' E, 10°54.6' N)多孔鹿角珊瑚(*Acropora millepora*)。经16S rRNA序列(688 bp)比对,与*Nocardiopsis flavescens* SA6(T) GU99763的相似度为100%,故确定为拟诺卡菌 SCSIO 11492。该菌株保存于中国科学院南海海洋研究所海洋微生物研究中心。

1.2.2 细胞 RAW264.7(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)、HepG2(人肝癌细胞)、A549(人肺腺癌细胞),均购自中国科学院上海生化细胞所。

1.2.3 培养基 将可溶性淀粉(15 g/L)、大豆粉(5 g/L)、蛋白胨(15 g/L)、甘油(15 g/L)、CaCO₃(2 g/L)及海盐(3%)加热溶解,调pH至7.4,分装后于121 °C高压灭菌30 min,待其冷却使用。

2 菌株发酵与分离

2.1 发酵 将海洋拟诺卡菌 SCSIO 11492 接种到80瓶250 ml的锥形瓶中(每瓶中30 ml培养液),置28 °C的培养箱内,200 r/min 震荡培养,48 h后分别将锥形瓶中的种子培养液倒入1 L的锥形培养瓶内(内含270 ml的发酵培养液),继续振荡培养7~8 d,得到24 L发酵液。

2.2 次生代谢产物分离 发酵液过滤后的滤液用相同体积的乙酸乙酯萃取3次,萃取液减压蒸干;菌丝体部分用丙酮超声(30 min)提取后过滤,滤液减压蒸干。经TLC检测对比,发现两部分成分相似,合并后得到5 g浸膏。浸膏通过硅胶柱(100~200目)梯度洗脱(氯仿-丙酮,0%→100%),得到2个组分(Fr.1和Fr.2)。将组分Fr.1通过反相中压,经MeOH-H₂O梯度洗脱,最后经凝胶Sephadex LH-20柱(氯仿-甲醇,1:1)反复纯化得到化合物**1**(20.1 mg)、**2**(10.9 mg)和**3**(13.5 mg)。通过相似的方法,从组分Fr.2得到化合物**4**(22.1 mg)和**5**(6.4 mg)。

化合物**1**: 白色粉末,¹H NMR(CD₃OD, 500 MHz) δ_H 8.32(1H, s, H-8), 8.17(1H, s, H-

2), 6.42 (1H, dd, $J=7.9, 6.1$ Hz, H-1'), 4.58 (1H, dt, $J=5.8, 2.5$ Hz, H-3'), 4.07 (1H, m, H-4'), 3.84 (1H, dd, $J=12.3, 3.0$ Hz, H-5'a), 3.75 (1H, dd, $J=12.3, 3.4$ Hz, H-5'b), 2.80 (1H, ddd, $J=13.4, 8.0, 5.8$ Hz, H-2'a), 2.43 (1H, ddd, $J=13.4, 6.0, 2.6$ Hz, H-2'b); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_{c} 157.5 (C-6), 153.5 (C-2), 149.9 (C-4), 141.6 (C-8), 120.8 (C-5), 89.9 (C-1'), 87.1 (C-4'), 73.1 (C-3'), 63.7 (C-5'), 41.5 (C-2').

化合物 2: 白色粉末, ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} 7.81 (1H, s, H-6), 6.27 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-1'), 4.41 (1H, m, H-4'), 3.91 (1H, m, H-3'), 3.80 (1H, dd, $J=12.5, 3.5$ Hz, H-5'a), 3.78 (1H, dd, $J=12.5, 3.5$ Hz, H-5'b), 2.24 (2H, m, H-2') 1.87 (3H, d, $J=0.8$ Hz, 5- CH_3); δ_{c} 166.4 (C-4), 152.4 (C-2), 138.2 (C-6), 111.6 (C-5), 88.8 (C-1'), 86.3 (C-4'), 72.2 (C-3'), 62.9 (C-5'), 41.2 (C-2'), 12.4 (5- CH_3)。

化合物 3: 白色固体, ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} 7.98 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6), 6.26 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-1'), 5.71 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-5), 4.38 (1H, m, H-4'), 3.94 (1H, q, $J=3.5$ Hz, H-3'), 3.77 (1H, dd, $J=12.0, 3.2$ Hz, H-5'a), 3.72 (1H, dd, $J=12.0, 3.8$ Hz, H-5'b), 2.29 (1H, dq, $J=13.6, 3.5$ Hz, H-2'a), 2.20 (1H, m, H-2'b); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_{c} 166.2 (C-4), 152.2 (C-2), 142.5 (C-6), 102.7 (C-5), 89 (C-1'), 86.6 (C-4'), 72.2 (C-3'), 62.9 (C-5'), 41.3 (C-2')。

化合物 4: 白色固体, ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} 8.00 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-6), 5.90 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-1'), 5.70 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5), 4.18 (1H, t, $J=5.1$ Hz, H-2'), 4.15 (1H, t, $J=4.9$ Hz, H-3'), 4.00 (1H, dt, $J=4.3, 3.0$ Hz, H-4'), 3.82 (1H, dd, $J=12.2, 2.7$ Hz, H-5'a), 3.73 (1H, dd, $J=12.2, 3.1$ Hz, H-5'b); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_{c} 166.2 (C-4), 152.6 (C-2), 142.7 (C-6), 102.7 (C-5), 90.7 (C-1'), 86.5 (C-4'), 75.7 (C-3'), 71.4 (C-2'), 62.3 (C-5')。

化合物 5: 白色固体, ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} 4.24 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1'),

3.0-4.2 (11H, m, H-2''-6'', H-1-3), 2.35 (2H, t, $J=7.4$ Hz, H₃-2'), 1.60 (2H, m, H-3'), 1.28 (24H, m, H-4'-15'), 0.87 (3H, t, $J=7.6$ Hz, H₃-16'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_{c} 175.5 (C-1'), 105.2 (C-1''), 76.7 (C-2''), 74.8 (C-3''), 72.6 (C-5''), 71.9 (C-3), 70.3 (C-4''), 69.6 (C-2), 66.5 (C-1), 62.5 (C-6''), 35.0 (C-2'), 30.2-31.0 (C-5'-13'), 28.1 (C-4'), 26.0 (C-3'), 23.8 (C-15'), 14.4 (C-16'); ESI-MS m/z : 515 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 。

3 体外细胞毒性测试

分别将 3 株肿瘤细胞 RAW264.7、HepG2、A549[(1~2) $\times 10^5$ 个/ml]以 200 μl 每孔加入到 96 孔板上,置 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育过夜,24 h 后加药孵育 24 h。每孔加入 100 μl 的 MTT (0.5 mg/ml),继续培养 4 h,小心吸去孔内培养液。每孔加入 100 μl DMSO,置摇床上低速振荡 10~15 min,然后在酶联免疫检测仪波长 570 nm 处测量各孔的吸光值。

4 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末,在其 ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) 谱图中可发现特征的 2-脱氧-D-核糖信号,即高场部分有 6 个 H 信号: δ_{H} 4.58 (1H, dt, $J=5.8, 2.5$ Hz, H-3'), 4.07 (1H, m, H-4'), 3.84 (1H, dd, $J=12.3, 3.0$ Hz, H-5'a), 3.75 (1H, dd, $J=12.3, 3.4$ Hz, H-5'b), 2.80 (1H, ddd, $J=13.4, 8.0, 5.8$ Hz, H-2'a), 2.43 (1H, ddd, $J=13.4, 6.0, 2.6$ Hz, H-2'b), 低场有 1 个端基质子信号: 6.42 (1H, dd, $J=7.9, 6.1$ Hz, H-1')。结合其 ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) 谱图里的 5 个对应的 C 信号: δ_{c} 89.9 (C-1'), 87.1 (C-4'), 73.1 (C-3'), 63.7 (C-5'), 41.5 (C-2'), 确认化合物 1 含有 2-脱氧-D-核糖。此外还发现一个嘌呤的特征片段 [δ_{H} 8.32 (1H, s, H-8), 8.17 (1H, s, H-2); δ_{c} 157.5 (C-6), 153.5 (C-2), 149.9 (C-4), 141.6 (C-8), 120.8 (C-5)], 因此可确定化合物 1 为 2'-脱氧腺苷 (2'-deoxyadenosine), 其波谱数据与文献报道一致^[6,7]。

化合物 2: 白色粉末,与化合物 1 类似,其 ^1H (CD_3OD , 500 MHz) 和 ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) NMR 谱图里有明显相同的 2-脱氧-D-核糖片段: δ_{H} 6.27 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-1'), 4.41 (1H, m,

H-4'), 3.91 (1H, m, H-3'), 3.80 (1H, dd, $J=12.5, 3.5$ Hz, H-5'a), 3.78 (1H, dd, $J=12.5, 3.5$ Hz, H-5'b), 2.24 (2H, m, H-2'); δ_c 88.8 (C-1'), 86.3 (C-4'), 72.2 (C-3'), 62.9 (C-5'), 41.2 (C-2')。此外还发现一个明显的胸腺嘧啶片段: δ_H 7.81 (1H, s, H-6), 1.87 (3H, d, $J=0.8$ Hz, 5-CH₃); δ_c 166.4 (C-4), 152.4 (C-2), 138.2 (C-6), 111.6 (C-5), 12.4 (5-CH₃)。因此,确定化合物**2**为2'-脱氧胸腺嘧啶核苷(2'-deoxythymidine),其波谱数据与文献报道一致^[8,9]。

化合物**3**:白色固体,其¹H、¹³C NMR数据与化合物**2**基本相似,不同之处在于化合物**3**的NMR谱图上,其高场少了一个甲基的信号,同时化合物**2**中的sp²季碳 δ_c 111.6 (C-5)变成了sp²的次甲基 [δ_H 5.71 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-5); δ_c 102.7 (C-5)];而原来化合物**2**中氢谱上低场的一个单峰 [δ_H 7.81 (1H, s, H-6)]也随之变成了双峰 [δ_H 7.99 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6)],由此推测化合物**3**的苷元为尿嘧啶,综上所述,化合物**3**鉴定为2'-脱氧尿苷(2'-deoxyuridine),其波谱数据与文献报道基本一致^[10,11]。

化合物**4**:白色固体,其¹H NMR谱图与化合物**3**非常相似,但也有些明显的差别:低场部分化合物**3**的糖端基质子为三重峰 [δ_H 6.26 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-1')],而在化合物**4**中却明显变成了一个二重峰 [δ_H 5.90 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-1')]。此外,高场部分化合物**3**中H₂-2'信号(δ_H 2.99, 2.20)在化合物**4**中未出现,却相应地在 δ_H 3.5~4.5区间多了一个质子信号,由此推测化合物**4**中的糖为核糖,而非化合物**3**中的2-脱氧核糖。该推测在其¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz)谱图上也得到了进一步的验证,即化合物**3**中的2-脱氧核糖片段在化合物**4**中变成了核糖片段: δ_c 90.7 (C-1'), 86.5 (C-4'), 75.7 (C-3'), 71.4 (C-2'), 62.3 (C-5')。因此化合物**4**鉴定为尿嘧啶核苷(uridine),其波谱数据与文献报道基本一致^[12,13]。

化合物**5**:白色固体,其¹H和¹³C NMR图谱可见明显的1,3-二取代甘油酯片段 [δ_H 3.0-4.0 (5H, m, H-1-3); δ_c 71.9 (C-3), 69.6 (C-2), 66.5 (C-1)],一个半乳糖片段 [δ_H 4.24 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 3.4-4.2 (6H, m, H-2''-6''); δ_c 105.2 (C-1''), 76.7 (C-2''), 74.8 (C-3''), 72.6 (C-5''), 70.3 (C-4''), 62.5 (C-6'')],以及一个长链脂肪酸片段 [δ_H 0.87 (3H, t, $J=7.6$ Hz, H₃-16'), 1.28

(24H, m, H-4'-15'), 1.60 (2H, m, H-3'), 2.35 (2H, t, $J=7.4$ Hz, H₃-2'); δ_c 175.5 (C-1'), 35.0 (C-2'), 30.2-31.0 (C-5'-13'), 28.1 (C-4'), 26.0 (C-3'), 23.8 (C-15'), 14.4 (C-16')],结合质谱(其相对分子质量为492),确定该脂肪酸为棕榈酸,因此化合物**5**的结构鉴定为:1-O-棕榈酰基-3-O-β-D-半乳糖基甘油酯(1-O-hexadecanoyl-3-O-β-D-galactopyranosylglycerol),其波谱数据与文献报道基本一致^[14,15]。

5 体外细胞毒活性测试结果

拟诺卡菌 SCSIO 11492 的发酵提取物对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7、人肝癌细胞 HepG2、人肺腺癌细胞 A549 的 IC₅₀ 分别为 8.9、19.8、23.6 mg/L。进一步将化合物**1~5**在体外对上述3种肿瘤细胞的生长抑制进行活性测试,结果表明仅化合物**5**对 RAW264.7 显示出较弱的活性 (IC₅₀ = 10.9 μmol/L),其他化合物均无细胞毒活性 (IC₅₀ > 20 μmol/L)。

6 讨论

肿瘤是威胁人类健康的重要杀手之一,因此有关抗肿瘤药物的研究开发一直是医药科研工作者的重点所在。海洋微生物是新颖药物先导化合物发现的一个丰富源泉。笔者在体外抗肿瘤活性筛选的引导下,对一批海洋来源的放线菌进行了活性筛选,发现其中一株具有较好抗肿瘤活性的放线菌 SCSIO 11492,该菌属于拟诺卡氏菌,据报道,从该属中分离得到的化合物包括生物碱、环肽、聚酮等^[16,17]。笔者对该菌株进行了次级代谢产物的研究,一共分离鉴定了5个化合物,均为首次从该属中分离得到。据报道,化合物**1**具有刺激种子萌发及 DPPH 自由基清除作用^[18]。笔者对所分离得到的5个化合物进行了体外抗肿瘤活性测试,只有化合物**5**(1-O-棕榈酰基-3-O-β-D-半乳糖基甘油酯)对 RAW264.7 显示出较好的生长抑制活性 (IC₅₀ = 10.9 μmol/L)。根据文献,半乳糖甘油酯具有抗肿瘤、抗菌、抗 HIV、抗炎、增强免疫力等活性,其活性强弱与脂肪酸链的长度及糖基上取代基团类型有关^[19,20],这与本研究的结果一致,提示化合物**5**可能是该菌抗肿瘤的主要活性成分,进一步的代谢产物研究尚在进行中。

【参考文献】

[1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites: a personal view [J].

- J Antibiot, 2005, 58 (1): 1-26.
- [2] Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, et al. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin [J]. Chem Rev, 2005, 105 (2): 739-758.
- [3] Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, et al. Marine natural products as anticancer drugs [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4 (2): 333-342.
- [4] Fenical W, Jensen PR. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria [J]. Nat Chem Biol, 2006, 2 (12): 666-673.
- [5] Williams PG. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics [J]. Trends Biotechnol, 2009, 27 (1): 45-52.
- [6] 陈超, 潘卫东, 肖建辉, 等. 江西青霉甲醇提取物中的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (22): 97-101.
- [7] Evidente A, Iacobellis NS, Vellone R, et al. 2'-Deoxyzeatin riboside and other cytokinins in culture filtrates of *Pseudomonas amygdali* [J]. Phytochemistry, 1989, 28 (10): 2603-2607.
- [8] 蔡杨鹏, 刘璐璐, 闫玉霞, 等. 沙蚕 *Stomopholus meleagris* 核苷类成分研究 [J]. 中国海洋药物, 2011, 30(4): 34-37.
- [9] 李云秋, 王宾, 杨斌, 等. 南海海绵 *Haliclona* sp. 的化学成分研究 [J]. 热带海洋学报, 2011, 30 (1): 124-126.
- [10] Li D, Zhu T, Fang Y, et al. The antitumor components from marine-derived bacterium *Streptovorticillium luteovorticillatum* 11014 II [J]. J Ocean Univ China, 2007, 6 (2): 193-195.
- [11] 王唐, 姜怡, 靳荣线, 等. 一株大象粪链霉菌的次生代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26 (4): 509-512.
- [12] Hu XY, Dou DQ, Pei YP, et al. Chemical constituents of roots of *Ranunculus ternatus* Thunb. [J]. J Chin Pharm Sci, 2006, 26 (2): 127-129.
- [13] Ma YT, Qiao LR, Shi WQ, et al. Metabolites produced by an endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Maytenus hookeri* [J]. Chem Nat Compd, 2010, 46 (3): 504-506.
- [14] 吴博, 马跃平, 袁久志, 等. 土茯苓化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27 (2): 116-119.
- [15] Pettit GR, Bond TJ, Herald DL, et al. Antineoplastic agents. Part 378. Isolation and structure of spongilipid from the Republic of Singapore marine porifera *Spongia* cf. *hispidula* [J]. Can J Chem, 1997, 75 (6): 920-925.
- [16] Sun HH, White CB, Dedinas J, et al. Methylpendolmycin, an indolactam from a *Nocardioopsis* sp. [J]. J Nat Prod, 1991, 54 (5): 1440-1443.
- [17] Kim Y, Ogura H, Igarashi Y, et al. Nocapyrones: α - and γ -pyrones from a marine-derived *Nocardioopsis* sp. [J]. Mar Drugs, 2014, 12 (7): 4110-4125.
- [18] Yuan Y, Tian JM, Xiao J, et al. Bioactive metabolites isolated from *Penicillium* sp. YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba* [J]. Nat Prod Res, 2014, 28 (4): 278-281.
- [19] Cateni F, Bonivento P, Procida G, et al. Chemoenzymatic synthesis and antimicrobial activity evaluation of monogalactosyl diglycerides [J]. Eur J Med Chem, 2008, 43 (1): 210-221.
- [20] 李春霞, 李英霞, 管华诗. 甘油糖脂生物活性研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2003, 22(2): 47-52.

[收稿日期] 2014-12-31 [修回日期] 2015-04-09

[本文编辑] 顾文华

(上接第 400 页)

- [24] 黄健, 徐芹, 孙振钧, 等. 中国蚯蚓资源研究: I. 名录及分布 [J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(3): 9-20.
- [25] 吴文如, 李薇, 赖小平. 地龙类药用动物的简单序列重复区间分子鉴定研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(4): 423-426.
- [26] 吕国庆, 牛宪立, 姬可平. 动物性中药材地龙 DNA 条形码初步研究 [J]. 广东农业科学, 2011, 17: 114-116.
- [27] 徐晋佑, 蓝宗辉, 曾逊生, 等. 人工养殖参环毛蚓的试验研究 [J]. 中药材, 1983, (4): 16-20.
- [28] 贾鹏. 蚯蚓的养殖及应用(上) [J]. 农业知识: 科学养殖, 2007, 9(29): 34-35.
- [29] 刘向辉, 戈峰. 蚯蚓纤溶酶活性影响因子的研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 423-425.
- [30] 王海英, 郭祀远, 李琳. 蚯蚓的研究与应用 [J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24 (4): 17-19.
- [31] 张祖珣, 何俐明, 于培兰, 等. 蚯蚓毒素及其去除方法的初步研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22 (3): 112-113.
- [32] 李兰燕, 王树春, 吴云山, 等. 产地龙的 X 射线衍射 Fourier 谱鉴定 [J]. 中成药, 2002, 24(5): 380-382.
- [33] 卢丽萍, 曹聘. 不同产地地龙质量分析研究 [J]. 广东微量元素科学, 2004, 11 (6): 50-52.
- [34] 姜文红, 张清波. 地龙 HPLC 指纹图谱分析方法的研究 [J]. 中医药学报, 2006, 34(6): 13-15.
- [35] 方铁铮, 杨翠平, 苏薇薇. 地龙及其注射液指纹特征谱研究 [J]. 中药材, 2002, 11(11): 813-815.
- [36] 王光忠, 胡迪, 陈敬炳. 地龙类药材化学成分分析 [J]. 中药材, 1998, 21 (3): 13.
- [37] 胡馨, 黄文辉. 各种沪产地龙与广东产地龙中次黄嘌呤的测定和比较 [J]. 中成药, 1994, 16 (1): 42-43.
- [38] 易八贤, 徐丽珊, 曾漪青, 等. 两种蚯蚓及其不同部位的酶谱研究 [J]. 药物生物技术, 1999, 6 (3): 174-176.
- [39] 施寄村. 中药地龙的含砷量 [J]. 中成药研究, 1981, 3 (5): 17.

[收稿日期] 2014-05-28 [修回日期] 2015-02-18

[本文编辑] 顾文华