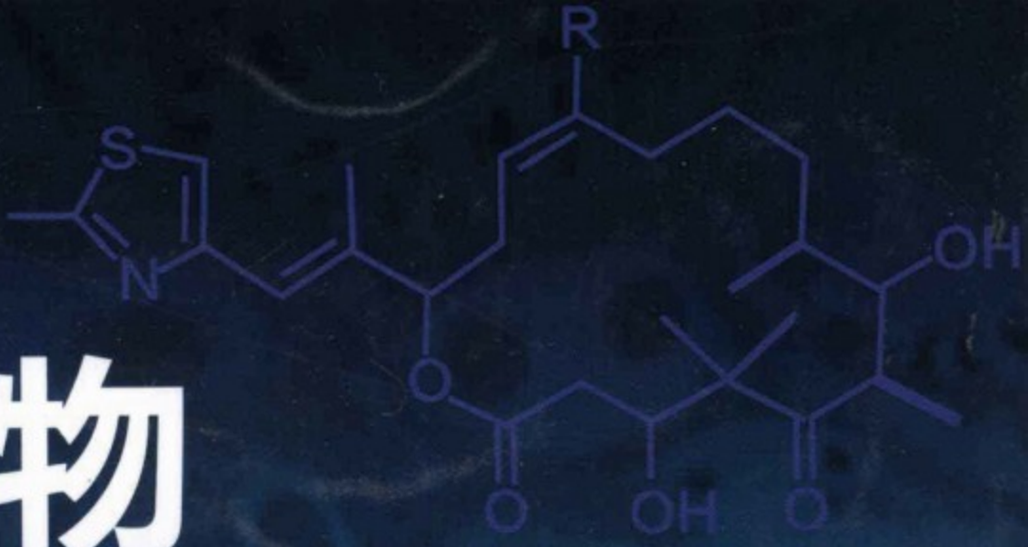
张景红　编著



微生物在药物研究中的应用

Application of Microorganism in Drug Discovery

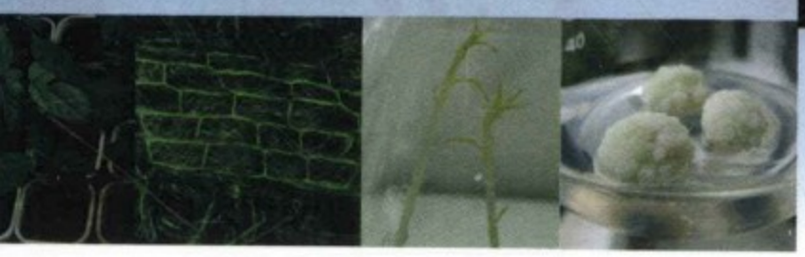




化学工业出版社

微生物在药物研究中的应用

Application of Microorganism in Drug Discovery



销售分类建议：医药卫生 药学

ISBN 978-7-122-10939-2

9 787122 109392 >

定价：78.00元

前　言

微生物作为一种重要的资源，广泛地存在于陆地、海洋以及各种与其共生、寄生和共代谢的自然界生物环境中。近年来，随着分子生物学、基因工程、分离分析等多种学科的技术在微生物这一学科的综合应用，微生物在药物研究中的重要作用凸显。目前，已经应用双向固体发酵、宏基因组学、组合生物催化等多项技术，成功地从陆地、海洋、肠道微生物、共生、寄生、内生和极端等多种微生物资源中分离出各种各样、极为丰富的活性代谢产物。微生物除了作为一种资源外，业已成为药物研究中不可缺少的工具之一。在药物的发酵、转化、代谢，珍稀药用植物的纯培养、新药研发、减毒增效等方面发挥着令人瞩目的作用。

微生物有着非常强大的分解转化和代谢物质的能力，并能产生丰富的次生代谢产物。微生物产生的一些酶在天然药物的修饰和转化、手性药物的合成、消旋药物的拆分以及通过生物转化技术寻找新药等方面取得了长足的进步。许多化学合成工艺相当复杂的药物、重要的药物中间体、肠内菌活性代谢产物、植物激素合成、药物减毒、增效修饰等重要反应，目前已经能够用微生物或酶转化技术得以替代，这一领域的飞速发展，使得微生物转化的概念得到了前所未有的拓展和延伸。特别是，近年来，随着现代基因工程技术在微生物研究中的成功应用以及多种微生物合成基因簇的鉴定，利用微生物药物生物合成的原理，从分子水平改造已有的微生物药物产生菌，也已经成为获得活性药物的一条重要途径。更为重要的是，利用微生物组合生物合成技术，为大量、全新的非天然“天然产物”的创造带来新的前景，蕴藏着极大的生机，为新药的发现提供了一条崭新的途径。微生物必将成为一种开拓性的活性天然药物的重要资源，成为未来药物发现的重点方向。

本书的目的即为读者介绍当今各种微生物，包括：陆地、海洋、肠道微生物、共生、寄生、内生、极端等多种微生物，并系统地介绍微生物与药物研究和新药开发的密切关系，以及在药物研究中的应用；通过对其应用原理、技术方法和研究成果的系统介绍，以便读者从微生物的分离、微生物的发酵、微生物的转化、次生代谢产物、肠内菌代谢、基因测序以及各种药物合成中关键基因簇的鉴定等方面，探究微生物和药物发现之间的关系；通过研究微生物转化、代谢与药物的药理、药效、减毒、增效的关系，让读者深入了解药物的代谢规律，探索各种资源的微生物，特别是海洋微生物、寄生、共生和内生等微生物的各种次生代谢产物；解释已经探明活性的各种天然产物；通过对各种药用价值极高的微生物合成基因以及基因簇的详细介绍，了解目前微生物生物合成的发展趋势，从而有目的地实现对微生物的有效研究和利用，发现和合成更多、更好的有价值活性产物。本书共分为六章，

第 1 章、第 2 章、第 3 章系统地介绍了微生物发酵技术、微生物转化技术、组合生物合成技术。第 4 章、第 5 章分别介绍了肠道菌和海洋微生物的分类、分离的技术方法，肠道菌药物代谢的原理、技术、方法以及海洋微生物的宏基组分离方法，已经鉴定的药物合成基因簇和药物合成的原理和方法，全面地总结了 2000～2010 年期间，已经分离的各种海洋、共生、内生代谢产物。第 6 章，结合自己课题组工作，介绍极端微生物浸出技术的概念、技术原理和微生物浸出技术在相关药物研究中的应用。

本书突出实用性和综合创新性，又兼顾考虑了各种微生物研究方法和试验手段的先进性，以可操作规范化为目的，理论联系实际，尽可能收集整理目前微生物研究领域最新的技术、方法和最新成果，并对该领域已经分离的、具有重要药理活性的化合物结构、活性和分离的微生物进行简明扼要、深入浅出的介绍。第六章中详细介绍了作者课题组，近年利用极端微生物、海洋微生物在矿物中药的炮制减毒、增效方面取得的一些研究进展。

本书所列的每一种微生物均从基本原理入手，以主要的药物和微生物作用的转化、代谢和合成的机理为中心，结合近年来最新的研究成果，倾力合成此书，以期成为一本可供相关行业中从事实际研究和教学的人员使用的工具书。

本书作者的研究团队在多年丰富的科研工作经验基础上，将在微生物药物研究中积累的资料和经验，加以一一筛选，其中张景红博士独立完成本书 40 万字的撰写工作，并整理成文，奉献给各位读者分享。在本书完稿之时，笔者怀着虔诚的心情，时刻期待着本书读者的宝贵意见和批评。微生物药物的研究是一个“经久不衰”的研究领域，真诚期待尽作者绵薄之力，与众多挚爱微生物研究的工作者一起，为微生物药物的发展贡献力量。

本书在福建省自然科学基金（2008J0102）、福建省重点项目基金（2008Y0055）、泉州市科技计划 2008Z12、华侨大学人才启动项目（BS105）、华侨大学基本科研业务费专项基金资助（JB-ZR1134）的鼎力资助下得以完成，本书在编写过程中承蒙华侨大学分子药物教育部工程研究中心的许瑞安教授、刁勇教授的大力支持，李红玉教授和倪永清博士提出诸多有益的建议，在此深表谢意！

张景红　博士
华侨大学分子药物研究所
华侨大学分子药物教育部工程研究中心
zjh@hqu. edu. cn
2011 年 1 月

目 录

第1章 微生物发酵技术在药物研究中的应用 1

1.1 微生物发酵药物的基本概念 …… 1
1.1.1 微生物发酵药物的概念 …… 1
1.2 微生物发酵药物的原理和技术方法 …… 1
1.2.1 微生物发酵药物的原理 …… 1
1.2.2 微生物发酵药物技术方法 …… 2
1.3 微生物发酵技术在药物研究中的应用 …… 7
1.3.1 促进植物药物有效成分溶出，增强药效 …… 7
1.3.2 双向发酵炮制有毒中药，降低有毒成分的含量、提高药用价值 …… 9
1.3.3 利用真菌发酵废弃药渣，变废为宝，拓展和利用资源 …… 11
1.3.4 利用植物内生菌发酵，直接提取植物活性成分 …… 13
1.3.5 利用药用植物毛状根发酵，获得多种活性成分 …… 21
1.3.6 利用共生菌发酵，发现药物新成分 …… 21
1.4 展望 …… 28
参考文献 …… 29

第2章 微生物转化技术在药物研究中的应用 31

2.1 微生物转化药物的基本概念 …… 31
2.1.1 微生物转化药物的概念 …… 31
2.2 微生物转化药物的原理和技术方法 …… 31
2.2.1 微生物转化药物的原理 …… 31
2.2.2 微生物转化药物的技术和方法 …… 42
2.3 微生物转化在药物研究中的应用 …… 47
2.3.1 微生物转化在药物前体和具有治疗作用的活性物质生产中的应用 …… 47
2.3.2 微生物转化在甾体类药物研究中的应用 …… 47
2.3.3 微生物转化在手性药物研究中的应用 …… 57
2.4 微生物转化在天然药物定点修饰研究中的应用 …… 60
2.4.1 甾体类天然药物的转化定点修饰 …… 60
2.4.2 黄酮类中药成分的微生物转化 …… 61

2.4.3 萜类成分的微生物转化修饰 …… 62
2.4.4 皂苷类成分的微生物转化修饰 …… 70
2.4.5 香豆素类成分的微生物修饰 …… 75
2.4.6 生物碱类成分的生物转化 …… 75
2.5 微生物转化在提高天然药物水溶性研究中的应用 …… 77
2.6 物体外转化可以作为模型帮助确定药物代谢途径 …… 79
2.7 展望 …… 87
参考文献 …… 87

第 3 章 微生物组合生物合成技术在药物研究中的应用 94

3.1 微生物组合生物合成的概念 …… 94
3.1.1 微生物组合生物合成的概念 …… 94
3.2 微生物组合生物合成技术的原理和策略 …… 95
3.2.1 微生物组合生物合成技术的原理 …… 95
3.2.2 微生物基因簇和组合生物合成的策略 …… 95
3.2.3 微生物基因簇组合生物合成天然产物的策略 …… 100
3.3 微生物基因簇在药物生物合成中的应用 …… 107
3.3.1 放线菌基因簇在药物生物合成中的应用 …… 107
3.3.2 黏细菌 …… 120
3.3.3 假单胞菌 …… 127
3.4 展望 …… 130
参考文献 …… 130

第 4 章 肠道微生物代谢技术在药物研究中的应用 132

4.1 药物肠道微生物代谢的基本概念 …… 132
4.1.1 肠道微生物概念 …… 132
4.1.2 肠道微生物和药物代谢的关系 …… 133
4.1.3 肠道菌药物代谢的概念 …… 136
4.2 肠道微生物代谢药物的基本原理和技术方法 …… 136
4.2.1 肠道微生物代谢药物的基本原理 …… 136
4.2.2 药物肠道代谢的基本反应 …… 137
4.2.3 药物肠道菌代谢的模型 …… 147
4.2.4 药物代谢的检测方法 …… 160
4.3 肠道微生物对药物的转化在创新药物研究中的应用 …… 166
4.3.1 肠道微生物的种类 …… 167
4.3.2 肠道微生物的转化酶 …… 167
4.3.3 肠道微生物对药物转化的主要反应 …… 168

4.4 应用举例——计算机模拟全自动控制一体外胃肠道模拟系统（TIM）在药物生物代谢解毒中的应用 …… 199
4.4.1 TIM 系统 …… 199
4.4.2 重组酵母对反式-肉桂酸的代谢（实例） …… 201
4.5 展望 …… 203
参考文献 …… 203

第 5 章 海洋微生物在药物研究中的应用 211

5.1 海洋微生物及海洋药物 …… 211
5.1.1 海洋微生物的概念 …… 211
5.1.2 海洋药物的概念 …… 211
5.1.3 海洋微生物药物产物来源 …… 212
5.2 海洋微生物的分类及特点 …… 212
5.2.1 海洋放线菌 …… 213
5.2.2 海洋真菌 …… 215
5.2.3 海洋蓝细菌 …… 215
5.2.4 海洋真核微藻 …… 215
5.2.5 变形细菌 …… 216
5.2.6 假单胞菌、弧菌及其他 …… 216
5.3 海洋微生物药物研究的技术和方法 …… 216
5.3.1 宏基因组的概念 …… 216
5.3.2 宏基因组学的研究方法 …… 220
5.3.3 宏基因组文库的建立及其克隆体系 …… 222
5.3.4 宏基因组学在应用中亟待解决的问题 …… 224
5.4 海洋微生物药物与海洋微生物次生代谢产物的研究 …… 225
5.5 已经进入临床和临床前研究的海洋微生物次生代谢产物 …… 283
5.5.1 Didemnin B …… 283
5.5.2 Dolastatin 10 …… 283
5.5.3 Dolastatin 15 …… 284
5.5.4 Ecteinascidin-743 …… 285
5.5.5 Salinisporamide A …… 285
5.6 海洋微生物的生物合成途径 …… 286
5.6.1 海洋药物研究现状 …… 286
5.6.2 海洋微生物次生代谢物生物合成基因簇 …… 287
5.7 海洋无脊椎动物共生菌次生代谢分离技术 …… 303
5.7.1 研究现状 …… 303
5.7.2 海洋微生物分离方法 …… 305
5.7.3 化学检测方法 …… 307

5.7.4 成像技术 …… 309
5.8 展望 …… 313
参考文献 …… 313

第 6 章 微生物浸出技术在中药创新研究中的应用 317

6.1 微生物浸出的概念 …… 317
6.1.1 微生物浸出炮制中药概念的提出 …… 318
6.1.2 微生物浸出矿物中药的原理 …… 319
6.2 微生物技术在矿物中药创新研究中的应用 …… 335
6.2.1 微生物浸出技术在提高难溶中药水溶解性研究中的应用 …… 335
6.2.2 海洋微生物代谢技术在中药炮制研究中的应用 …… 340
6.3 应用实例 …… 342
6.3.1 雄黄微生物溶解液药物动力学研究 …… 342
6.4 展望 …… 348
参考文献 …… 349

中英文对照 350

第1章 微生物发酵技术在药物研究中的应用

1.1 微生物发酵药物的基本概念

1.1.1 微生物发酵药物的概念

“发酵”的一般概念是“微生物对有机物的作用，获得某种或几种产品”，而广义的发酵概念是“微生物对有机物的分解或合成以取得几种成分，微生物在发酵基质上生长因其酶的作用，分解基质产生多种成分，有的被微生物应用生长菌丝体，也有的留存在基质中，这是一种生物的分解、合成过程”。随着现代生物工程、基因工程和酶学理论和技术的应用，发酵技术也由原来单一的发酵，发展为液体发酵、液体深层发酵、固体发酵、新型（双向性）固体发酵工程，其工艺由原来作坊式的单一发酵，发展成为现代以生物反应器为主的全自动化、可控的、可全程动态分析的现代发酵工艺。

更为可喜的是，该工艺所涉及的微生物从单一、野生、混合的本身无功效的霉菌或酵母菌，发展到了单一纯培养、混合和自身具有药用价值的“菌质”，这一飞跃，也给药物的发酵研究带来了历史机遇，药物的发酵从远古的单纯对药物的发酵炮制，发展到药物有效成分的提取、新的代谢成分的发现、药渣发酵的再次利用、增效减毒以及固体双向发酵培育菌药等领域。

1.2 微生物发酵药物的原理和技术方法

1.2.1 微生物发酵药物的原理

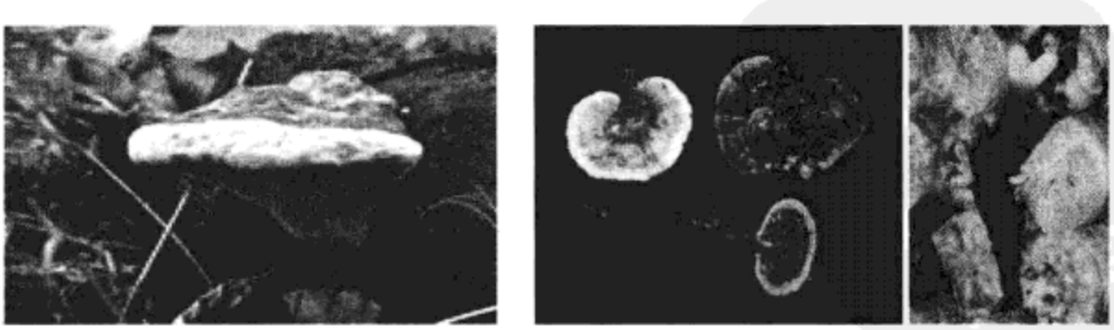
就其本质而言微生物发酵药物也是现代生物转化技术的一种，运用生物工程方

法，通过生物体内的酶体系，将一种外源化合物（如药物）转化成另一种结构上相关的化合物，其本质是催化外源物质进行结构改造的催化化学反应。但是二者既有联系也有一定的区别，生物转化旨在利用微生物体内的丰富酶系，对特定的一种或多种成分，进行多种修饰，包括氧化、还原、水解、结合等反应，产生低毒、高效、多能的转化或代谢成分，这种技术针对某一药物成分。而发酵技术更多地偏向药物的整体成分的变化。

1.2.2 微生物发酵药物技术方法

1.2.2.1 微生物发酵的菌种和应用

（1）灵芝　见图 1.2-1 所示，灵芝是一种以降解木质为生的大型担子菌类药用真菌，具有白色的菌根和坚实的子实体。其中赤灵芝［*Ganoderma. lucidum*（W. Curt.；Fr.）Lloyd］和树舌灵芝［*Ganoderma applanatum*（Pers.）Pat］是两种最常用的药用品系。灵芝在中国被称作“Ling-Zhi”，在日本则被称为“Reishi”，而且据《神农本草经》记载，灵芝作为一种亚洲传统药物被用于治疗各种疾病已有数千年的历史。灵芝主要用于治疗冠心病、动脉硬化、肝炎、关节炎、肾炎、支气管炎、哮喘、肿瘤及胃溃疡等疾病，灵芝在抗病毒，尤其是抗 HIV 病毒感染方面具有极大潜力。灵芝在自然界中稀少罕见，而国际市场对于其子实体及菌丝体生物量的需求与日俱增，野生资源难以满足日益增强的开发需求。国内外，相继开展了各种人工发酵培养技术，成功地通过以木头或秸秆为培养基质袋栽或直接在原木上培养而完成对灵芝的人工栽培。而以固体培养基和深层液体培养基等生物反应器进行的生物技术培养也被引入进行小范围试生产。从灵芝菌丝体及子实体中分离到的多种具有药理活性的化学组分主要包括：三萜类、多糖类、蛋白质、氨基酸、核苷、生物碱、类固醇、内酯、脂肪酸以及酶，其中最重要的是三萜类和多糖类化合物。目前在灵芝属中已经发现了超过 150 种的三萜化合物，如灵芝酸、赤芝酸、灵芝草酸、灵芝-22-烯酸、灵赤酸、树舌环氧酸、赤芝酮、灵芝醛和灵芝醇[1]。具有代表性的化合物如图 1.2-2 所示。



树舌灵芝　　赤灵芝

图 1.2-1　树舌灵芝、赤灵芝的照片

灵芝属微生物凸显出的多种突出的治疗效果和其自身具有的丰富的代谢能力，引发了众多学者的研发兴趣，国内外学者以灵芝菌作为有效的菌质和多种药物联合

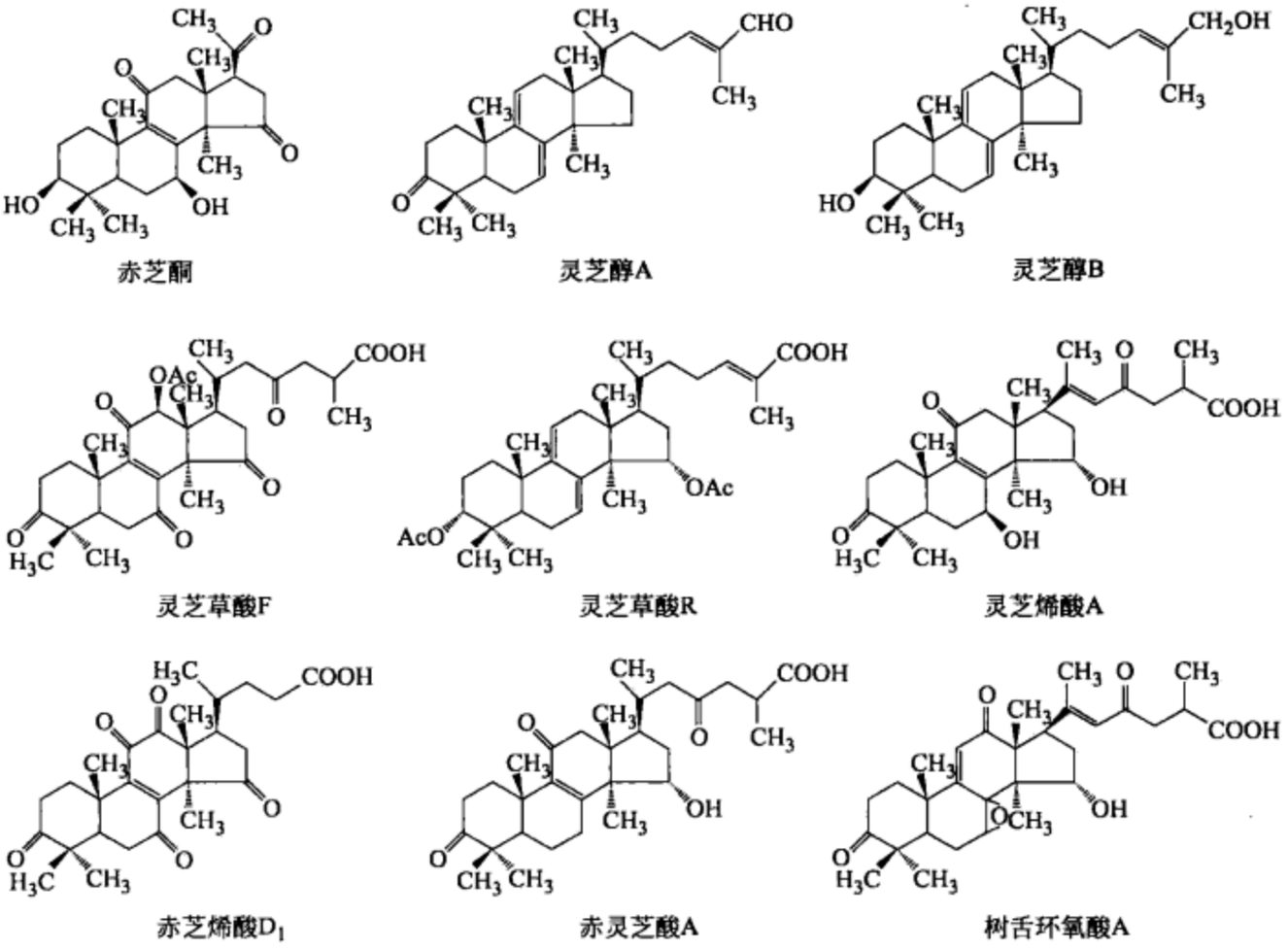


图 1.2-2　灵芝中分离出的化合物

发酵取得一定的效果。魏巍等[2]考察了 6 味中药：黄芪、补骨脂、淫羊藿、巴戟天、红毛五加和川芎，与灵芝进行组合发酵效果。实验结果表明：灵芝-黄芪这一发酵组合能大量增加灵芝发酵液体的多糖含量，具有明显延长小鼠负重游泳时间的作用，具有缓解体力疲劳、改善睡眠、耐缺氧、抗肿瘤的功效作用，起作用效应明显高于单一对照组。徐鹏等[3]研究了 27 味中药对灵芝菌发酵及其酪氨酸酶抑制活性的研究，结果表明，中药黄芩对灵芝发酵液的酪氨酸酶抑制活性显著提高，而且灵芝中的 β-糖苷酶可能对芦丁转化为槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷的过程起关键作用。与此同时，由于糖基的去除，减少了黄酮与酪氨酸酶作用的空间位阻，增加了转化产物对酪氨酸酶抑制活性。由此说明，灵芝和中药配伍发酵过程中产生的酶促反应促进了其代谢过程，而在另一方面，中药黄芩作为一种药性菌质，在促进灵芝生长的同时，产生了协同的药理活性。另外，潘扬等人[4]将马钱子作为“药性基质”，运用双向固体发酵技术，使其和灵芝、槐耳、猴头等 20 种真菌分别发酵，结果马钱子菌质中马钱子类生物碱成分发生了质和量的明显变化，整体毒性明显降低。以中药渣为基质进行灵芝固体发酵，其固体菌丝中多糖含量为子实体中多糖含量的 2.4 倍，氨基酸含量除半胱氨酸外，其余氨基酸含量均高出灵芝子实体中对应氨基酸含量的 2 倍以上，固体菌质中的氨基酸总量为子实体的 2.64 倍，必需氨基酸总量为灵芝子实体的 2.67 倍。利用中药渣作为药用真菌的培养基质，既能促进药用

真菌的生长，增加药用成分的含量，又能为真菌药物增添新的性味功能，废弃药渣的再利用，为药物提取工艺的现代化发展提供了有益的方向。

（2）酵母菌　分布广、体积小、表面积大、代谢旺盛、繁殖速度快，其细胞蛋白质含量高达50%以上，并含有人体必需的氨基酸。中药发酵品如六神曲、半夏曲、建神曲主要是酵母菌发酵的产品，现代工业利用酵母菌体可以提取核苷酸、辅酶A、细胞色素c、凝血质、核黄素、有机酸、甘油等。

（3）霉菌　霉菌在自然界分布也很广，在药物发酵中很常见，次生代谢产物也很多。现代发酵工业用霉菌发酵生产酒精、抗生素（青霉素、灰黄霉素）、酶制剂（淀粉酶、纤维素酶）、甾体激素、维生素等。中药红曲以纯种紫色红曲霉菌（*Monascus purpureus* Went）发酵而得，红曲发酵后产物具有活血化瘀、健脾消食的作用。而对红曲次级代谢产物研究发现，红曲中含有多种生理活性物质，如其中具有降胆固醇功效的洛伐他汀，降血压有效成分为γ-氨基丁酸及葡萄糖胺，天然抗氧化物质黄酮酚等就是红曲和紫色红曲霉菌发酵的产物。白家峰等人[5]利用筛选到的黑青霉HB-2对牛蒡子进行发酵，其分泌的β-葡萄糖苷酶可以在温和的条件下特异性降解牛蒡子苷，将牛蒡子苷元的含量由0.19%提高到1.8%以上，不仅使发酵后的牛蒡子抗炎作用显著增强，还将起效时间缩短了50%，取得了良好的炮制效果，成为牛蒡子现代有效炮制的新方法。

（4）其他类　随着发酵技术的深入研究，在许多杆菌、有色菌和一些植物内生菌的筛选上都做了一些极有意义的尝试。例如，地衣芽孢杆菌，具有分泌糖苷水解酶、纤维素水解酶、淀粉酶等多种酶系能力，利用其能够产生纤溶酶和间接纤溶能力发酵红花（富含纤维素），则提高了红花抗羟基自由基氧化活性和其对小鼠肝脂质过氧化的抑制作用，起到了通过微生物炮制中药，提高疗效的目的。

1.2.2.2　微生物发酵的技术方法

（1）液体深层发酵　液体发酵也称液体深层发酵，是在抗生素发酵技术基础上发展起来的，沿用了传统发酵生产工艺。20世纪80年代后，国内外纷纷开展了有关药用真菌液体发酵（主要是深层发酵）的应用研究。表1.2-1列出了适于深层培养的部分大型食用真菌、药用真菌的液体发酵，既可快速大量生产制备出多糖、多肽、生物碱、萜类、甾醇、苷类、酚类、核酸、氨基酸、蛋白质、维生素等多种物质，与此同时，还可生产出菌龄整齐一致、生命力强、数量巨大的液体菌种，以此满足扩大生产的需要[6]。

表1.2-1　适于深层培养的部分大型食用真菌

中文名	拉丁名	主要应用领域
双胞香菇	*Agaricus bisporus*(J. Lge)Imbach	液体菌种、食品添加剂
香菇	*Lentinus edodes*(BerK)sing.	液体菌种、制药、食品
侧耳	*Pleurotusostreatus*(*Jacq-exFr.*)*Quel*	液体菌种
羊肚菌	*Morchella esculenta* var. conica(Pers.)	食品添加剂
猴头	*Hericium erinacius*(Bull) Pers	液体菌种、制药、食品

续表

中文名	拉丁名	主要应用领域
金针菇	*Flammulina velutipes*(Curt. ex Fr.)Sing	液体菌种、食品
灵芝	*Ganoderma lucidum*(Leyss. exFr.)Karst.	保健食品、药品
草菇	*Volvariella volvacea*(Bull. ex Fr.) sing.	液体菌种
黑木耳	*Auricularia avricula*(L. ; Hook.) Underw.	液体菌种
榆耳菌	*Gloeoatereum incarnatum* S. Ito et Imai	液体菌种、药品
滑菇	*Pholiota nameko*(T. Ito) S. Ito et Imai	液体菌种、食品
银耳	*Tremella fuciformie* Berk.	药品

如图1.2-3所示，药用真菌深层发酵生产工艺流程沿用了传统的发酵生产工艺，即试管斜面菌种→一级摇瓶种→二级种→三级种→发酵罐。有关培养基配方方面的研究包括：碳源、氮源、碳氮比、pH值、无机盐、微量元素、维生素、生长因子、增黏剂等，以及有关发酵过程中参数控制的研究包括：接种量、温度、搅拌速度、空气流量、糖含量、pH值、纯度、活力、菌丝形状、发酵液中菌丝体个数和质量等。但是，液体深层发酵本身也存在很多问题，如对无菌度要求严格、设备繁琐操作复杂、发酵液浓度达到一定程度后搅拌不均匀、传质受阻等，这种技术方法仍需要进行更深入的研究、改进和提高。

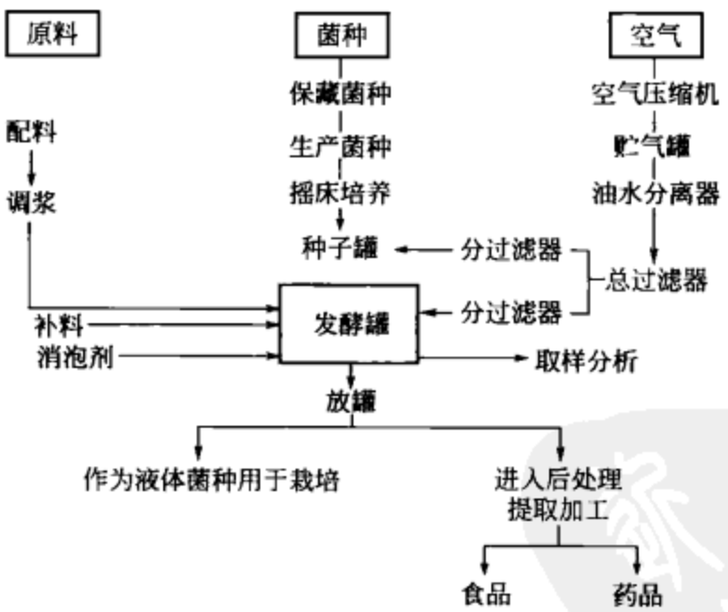


图1.2-3　大型食（药）用真菌深层发酵生产工艺流程

（2）固体发酵　中国古代早有“制曲工艺”，发酵生产多种曲、酱、酒等供药用，如著名中药“神曲”早在1500年前已有记述，其生产工艺认为是中药生物技术固体发酵的原始雏形，固态发酵与液态发酵相比，固体发酵成本低、产物浓度高、能耗少。在生产过程中，无废水、废气产生且固体发酵有利于次生代谢产生，能够克服液体发酵环境抑制微生物代谢的缺点，固体发酵中所产生的大量酶，如表1.2-2所示，包括纤维素酶、木质素酶、蛋白酶、木聚糖酶、淀粉酶、果胶酶、脂肪酶、漆酶等，在酶制剂生产中具有巨大的潜力[7]。

表 1.2-2 固体发酵生产酶的种类与产酶微生物

酶的种类	酶生产所用微生物
纤维素酶、木聚糖酶	曲霉菌、木霉菌属、香菇、青霉菌、脉孢菌、侧孢霉菌等
漆酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶	黄孢原毛平革菌、彩绒革盖菌、毛革盖菌、糙皮侧耳等
蛋白酶(酸性、中性、碱性)	曲霉菌、根霉菌、青霉、杆状杆菌等
脂肪酶	假丝酵母、根霉、曲霉、脉孢霉
植酸酶	曲霉菌
淀粉酶	曲霉菌、根霉菌、毛霉菌、杆状细菌、酵母

(3) 药性基质的双向固体发酵　药性基质的固体发酵，即将一些富含营养成分的药物作为培养基的一部分的发酵过程，一方面微生物通过利用药物基质培养基中的药物作为营养物质进行生长，同时微生物在生长过程中代谢的丰富酶系对基质中的药物成分进行分解代谢，产生的酶系可能将药物中的非淀粉多糖降解从而有利于有效成分的释放，可能将有效成分转化为活性更高的化合物，亦可能将药物中毒性成分降解或转化为其他有益化合物[8]。

(4) 固体发酵生物反应器[9]　随着一些固体发酵生物反应器在药物生产中的大规模应用，多种创新药物得以大规模生产，如表 1.2-3 所示。

表 1.2-3 固体发酵的应用

微生物/生物催化剂	基质	产物	生物反应器类型
黑曲霉	柳叶菜种子	孢子	固定床列
黑曲霉	木薯渣	柠檬酸	柱式反应器
米曲霉	麦麸+椰子油饼(3∶1)	中性金属蛋白酶	静态瓶
解淀粉芽孢杆菌	花生油饼+麦麸(1∶1)	α-淀粉酶	静态瓶
枯草芽孢杆菌	米糠	伊枯草菌素 A	圆筒形反应瓶
德氏乳杆菌	橄榄油饼+甘蔗渣	乳酸	静态瓶
德氏乳杆菌	罗望子籽粉	丹宁酸酶	静态瓶
红曲霉	Jack fruit seed 榴莲种子	天然色素	柱式反应器
高山被孢霉	米糠	未饱和脂肪酸	静态瓶
简青霉	豆粕	脂肪分解酵素	静态瓶
简青霉	橄榄油饼+甘蔗渣(1∶1)	脂肪分解酵素	固定床反应器
米根霉	椰子油饼+芝麻饼肥(1∶1)	肌醇六磷酸酶	静态瓶
链霉菌	大豆饼粉	α-半乳糖苷酶	静态瓶
棒状链霉菌	棉子饼,葵花饼	甲氧头孢菌素 C	静态瓶
嗜热子囊菌	麦秸	纤维素酶	生物反应器
里氏木霉	麦麸	纤维素酶	静态瓶

续表

微生物/生物催化剂	基质	产物	生物反应器类型
木霉 TUBF927	胶体几丁质	壳二糖酶	静态瓶
鲁氏酵母 2547NRRL-Y	芝麻油饼	左旋谷氨酰胺酶	静态瓶
米赫根毛霉	蔗糖+海藻酸钠固定化细胞	帕拉金糖月桂酸己酯	固定床
产脂肪酶的米根霉	以葡萄糖为主的合成废水	有机酸和生物柴油	填充床反应器
产氢污泥	碳水化合物基质，富含聚乙烯辛烷的厌氧污泥	氢气和乙醇	流化床
酪丁酸梭菌 JM1	富含葡萄糖的聚氨酯泡沫体	生物产氢	固定床生物反应器

1.3 微生物发酵技术在药物研究中的应用

1.3.1 促进植物药物有效成分溶出，增强药效

植物类药物资源丰富，其有效成分多存在于胞浆中，而植物细胞壁是由纤维素、半纤维素、果胶质、木质素等物质构成的致密结构。在有效成分提取过程中，当胞浆中的有效成分向提取介质扩散时，必须克服细胞壁及细胞间质的双重阻力，有效成分浸出受阻。见表 1.3-1 所示，微生物可利用药物中的成分为营养物质进行

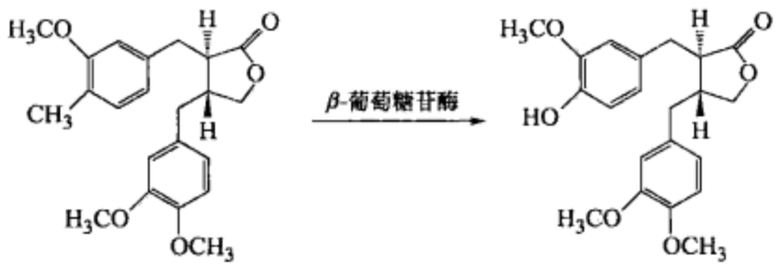
表 1.3-1 微生物及产酶种类

酶的类别	微 生 物
蛋白酶	黑曲霉、米曲霉、枯草杆菌、栖土曲霉等
淀粉酶	黑曲霉(左美曲霉、泡盛曲霉)、根霉(雪白根酶、德氏根霉)、拟内孢霉、红曲霉等
糖化酶	德氏根霉、泡盛酒曲霉、爪哇根霉、河内根霉、台湾根霉、日本根霉、黑曲霉、雪白根霉、宇左美曲霉、米曲霉、臭曲霉、海枣曲霉、伯顿拟内孢霉和红曲霉等
凝乳酶	易脆毛霉、微小毛霉、五通桥毛霉、总状毛霉和米根霉等
脂肪酶	假丝酵母、黑曲霉、黄曲霉、根霉(德氏根霉)、白腐核菌、白地霉(白地霉)、青霉(圆弧青霉)、毛霉(爪哇毛霉)、镰刀霉及假单胞菌、无色杆菌、葡萄球菌等
半纤维素酶	曲霉、根霉、木霉
纤维素酶	木霉菌(绿色木霉，康氏木霉)、黑曲霉、青霉和根霉、漆斑霉、康宁木霉等
单宁酶	真菌中的曲霉属、青酶属、根霉属、毛霉属黑曲霉等
果胶酶	文氏曲霉、苹果青霉、黑曲霉、白腐核菌、米曲霉、胞壁酵母、木质壳霉、芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌、葡萄孢霉、三叶草毛盘孢霉、镰刀霉等
α-半乳糖苷酶	酵母菌中有假丝酵母、毕赤酵母、卡尔斯伯酵母、啤酒酵母、意大利酵母、八孢裂殖酵母等；霉菌有泡盛酒曲霉、烟曲霉、黑曲霉、米曲霉、栖土曲霉、蝇绪曲霉、青霉、根霉、毛霉等；放线菌有费氏链霉菌、橄榄色链霉菌、玫瑰多刺链霉菌
葡萄糖异构酶	包氏链霉菌、多毛链霉菌、黄微绿链霉菌、橄榄色链霉菌、锈红链霉菌、委内瑞拉链霉菌等
葡萄糖氧化酶	黑曲霉、米曲霉、丁烯二酸曲霉、青霉属、点青霉、灰绿青霉、黄色青霉、紫色青霉、尼崎青霉、绳状青霉、拟青霉属、帚霉属等

分裂、生长、繁殖和代谢，在代谢过程中分泌蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶等几十种胞外酶进入培养基[10]，使细胞破裂，细胞间隙增加，减小细胞壁、细胞间质等传质屏障对有效成分从胞内向提取介质扩散的传质阻力，不仅可以将组成致密植物药物组织的纤维素、半纤维素、木质素、果胶等降解为小分子糖类，为发酵菌种提供碳源、氮源等营养物质，催进菌体生长，又能使植物组织变得疏松，有效促进中药活性成分的溶出，从而大幅度提升药效。而在另一方面，微生物生长的同时，大量地消耗药物中的蛋白质、糖、氨基酸等多种成分，有可能对有效成分有浓缩作用，相对而言，植物药物经微生物转化后分子量变小，因而具有在人体中吸收较快、较完全、治疗效果较好等特性。药物进入人体后不能直接被利用的有效活性组分，通过微生物将其降解成小分子活性物质而被直接利用，还能除去大分子杂质，大大提高药物药效。小分子活性物质由于其更易于通过血脑屏障而与人体细胞蛋白结合，因而比大分子物质有更高的活性。

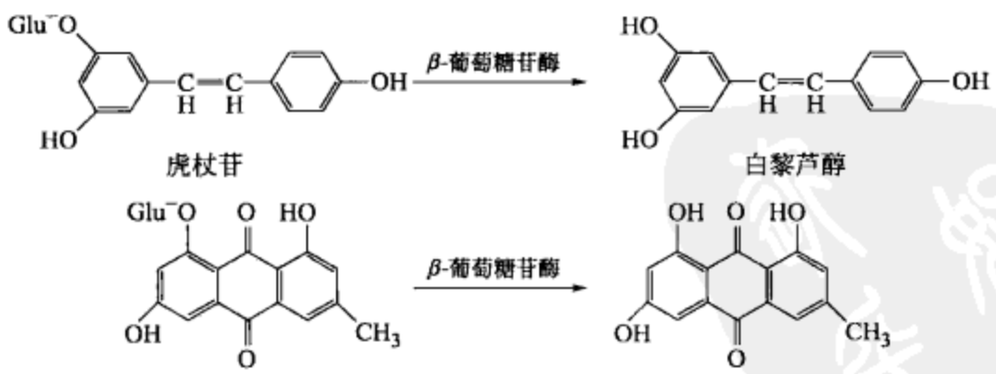
我国学者已经成功地分离、纯化和培养了多种微生物，对多种植物药发酵，取得了很大的进展，例如黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根，是一种疗效确切的常用植物药，其体内代谢的研究结果表明：黄芩苷（baicalin）需要经肠道菌丛代谢产生的β-葡萄糖苷水解酶水解为黄芩素才能发挥正常的药理作用。而采用传统的化学水解法提取产生的黄芩素含量较低、工艺复杂、价格昂贵，酶法处理则需先进行酶提取和底物黄芩苷的提取，从而增加了操作步骤和难度，且提取酶制剂具有酶活不易保存等问题。薛慧玲等[11]利用筛选到的产β-葡萄糖醛酸酶的黑曲霉菌株 HQ-10 直接对黄芩进行带渣发酵提取，结果不仅 94.9%的黄芩苷都生成了黄芩苷元，而且同等剂量的发酵品在抗炎、镇痛的药效试验中效果明显优于未发酵品。这种带渣发酵培养技术，诱导真菌对药材进行酶解，利用中药成分中的纤维素、淀粉等作为营养物质进行生长代谢，几乎不需要添加其他营养成分，大大降低了生产成本，同时具有减少废渣排放量，促使有效成分充分转化及利用等优势。如图 1.3-1 所示，白家峰等人[5]利用筛选到的黑青霉 HB-2 对牛蒡子进行发酵，其分泌的β-葡萄糖苷酶可以在温和的条件下特异性降解牛蒡子苷，将牛蒡子苷元的含量由 0.19%提高到 1.8%以上，发酵后的牛蒡子不仅使其抗炎作用显著增强，而且还将起效时间缩短了 50%，取得了良好提取效果。田天丽等[12]研究表明，利用微生物发酵的同时，同样可以提高一些副产物的发酵效果，同样起到增强疗效的作用，虎杖苷和大黄素同为中药虎杖的活性成分，虎杖苷在肠道中被糖苷酶分解释放出白黎芦醇，发挥抑制肿瘤、抗氧化、抗自由基、抗血栓、抗过敏、抗动脉粥样硬化的药理作用；而另一有效成分大黄素除游离部分外，尚有部分以β-葡萄糖苷键的形式连接为大黄素 8-*O*-β-D-葡萄糖苷类结构形式存在，仍具有抗菌、抗肿瘤、免疫抑制、解痉、止咳、保护心血管、利尿等作用，同样具有开发价值。见图 1.3-2 所示，采用自主分离的特殊微生物根酶发酵虎杖，将虎杖苷转化成白黎芦醇，同时将大黄素 8-*O*-β-D-葡萄糖苷转化为大黄素提高虎杖中白黎芦醇和副产物大黄素含量。冯志华等人[13,14]研究发现，黄酮类化合物清除自由基活性与β环上的羟基取代数目有关，酚羟基减少时，清除能力明显下降。植物药红花富含糖苷类化合物，其中很多糖苷

由酚羟基与葡萄糖缩合而成，如新红花苷、6-羟基山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、6-羟基山柰酚-7-*O*-葡萄糖苷、懈皮苷等。当糖苷水解酶将这些糖苷键上的葡萄糖水解掉后，就会使酚羟基的数目大幅度提高。据此，采用分离并筛选到的一株地衣芽孢杆菌，能分泌糖苷水解酶、纤维素溶解酶、淀粉酶等多种酶系，与红花共同发酵，结果发现发酵后的红花，其抗氧化和活血化淤活性都有不同幅度提高，但是其抗血栓作用并没有显著变化。见图 1.3-3 所示，在此基础上，陈智[15]研究发现，地衣芽孢杆菌发酵后形成的红花黄色素 A，通过进一步深入优化发酵条件后，红花黄色素 A 可以转化为新的化合物查尔酮衍生物。根据上述的实验结果推测，地衣芽孢杆菌在发酵过程中分泌出氧加和酶、水解酶、醛缩酶作用于红花黄色素 A 上的苯环以间位开环的途径生成了查尔酮衍生物。对发酵所得的物质——查尔酮衍生物药效试验表明，相对于红花黄色素 A，其清除羟自由基能力大幅度提高，抑制小鼠自发性肝脂质过氧化、H_2O_2 诱导的肝脂质过氧化、CCl_4 诱导的肝脂质过氧化作用得到进一步提高，降低总胆固醇与甘油三酯含量的功效显著提高。血栓类药效试验还发现新产生的查尔酮衍生物对小鼠血栓形成有一定抑制作用。微生物可以通过发酵过程中分泌的丰富的酶，催化植物代谢产生药效更强的新物质，而且更重要的是新物质能够与其他成分共同起效，使其药效在原有基础上得到极大提高。



牛蒡子　　牛蒡子苷元

图 1.3-1　牛蒡子苷经 β-葡萄糖苷酶作用产生牛蒡子苷元



虎杖苷　　白藜芦醇

大黄素8-*O*-β-D-葡萄糖苷　　大黄素

图 1.3-2　虎杖苷和大黄素 8-*O*-β-D-葡萄糖苷经 β-葡萄糖苷酶作用产生白藜芦醇和大黄素

1.3.2　双向发酵炮制有毒中药，降低有毒成分的含量、提高药用价值

马钱子为马钱科植物 *Trychnos nuxvomica* Linn. 的干燥成熟种子。因为具有

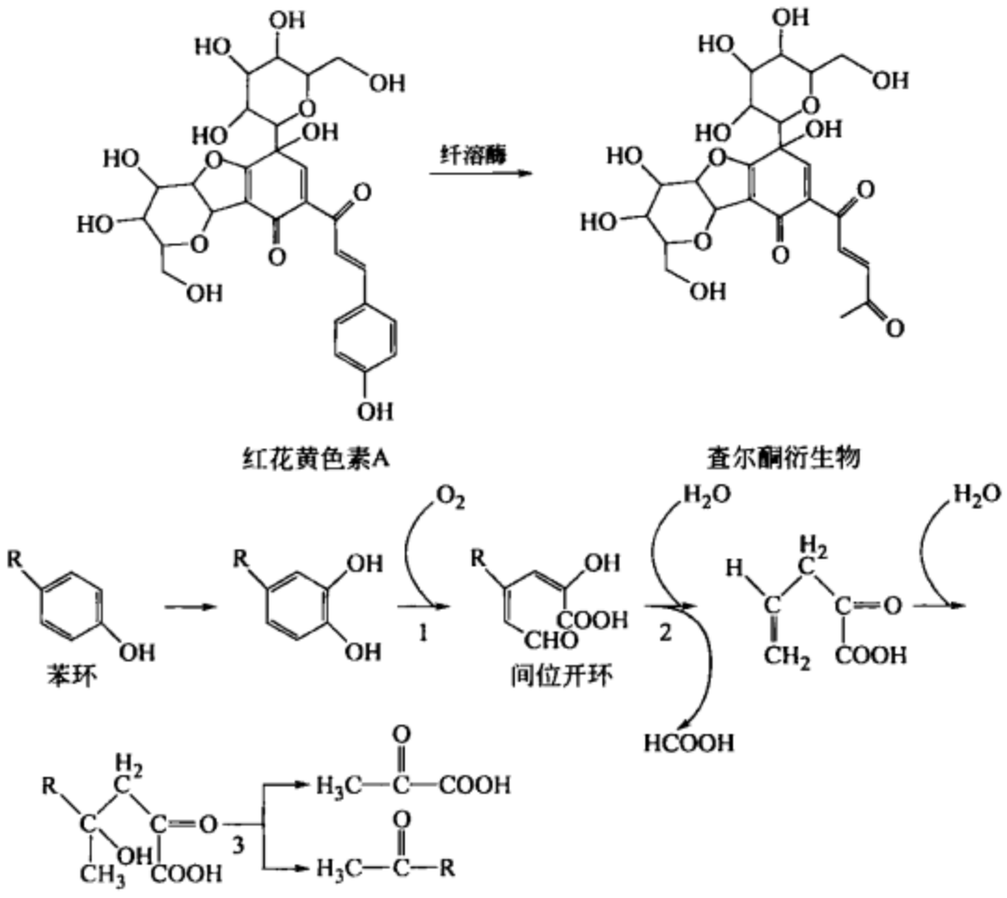


图 1.3-3　地衣芽孢杆菌对红花黄色素 A 酶催化机制

1—氧加合酶；2—水解酶；3—醛缩酶

极强的毒性作用，临床应用受到极大的局限。目前主要采用砂烫法和油炸法炮制以降低毒性，但是由于是在极高温度条件下处理，在降低其毒性成分的同时，有效成分也可能造成损失。潘扬等人[16]将“双向发酵”技术用于马钱子的炮制过程，采用马钱子生品作为药性基质，分别和植物药槐耳、灵芝、猴头等 20 种药用真菌发酵，实验结果表明，10 种菌株与马钱子共同发酵后，有毒成分士的宁、马钱子碱的含量均呈下降的趋势，而减毒后成分士的宁氮氧化物、马钱子碱氮氧化物有不同程度的增加，发酵后其毒性明显降低。其转化路线见图 1.3-4 所示。

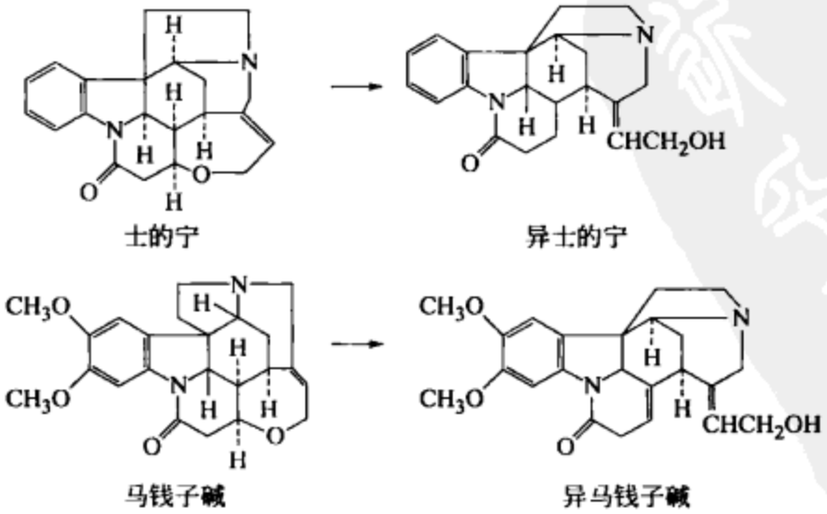


图 1.3-4　药用真菌发酵马钱子的化学变化

雷公藤（*Tripterygium wilfordii* Hook. f.）属卫矛科植物，从最初分离到雷公藤红素（celastrol）至今（见图 1.3-5 所示），已从雷公藤属中分离到 50 多种抗肿瘤成分，其中雷公藤甲素（Triptolide，TP）及其衍生物抗肿瘤作用较为显著，与此同时毒性较大。如何降低雷公藤药物的毒性，是雷公藤药物发展中突出的问题。

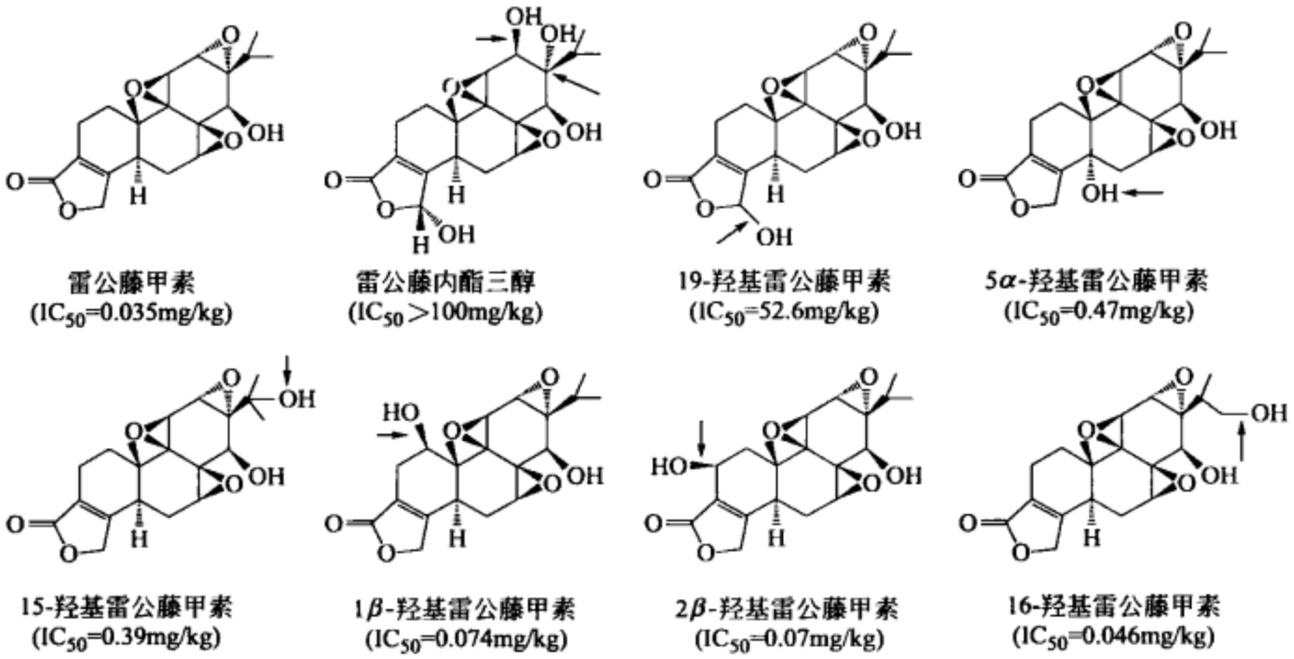


图 1.3-5　雷公藤药物中抑制肿瘤的化学成分

罗闳丹等人[17]认为雷公藤的毒性和活性是由多种成分共同导致的，提出了双向发酵雷公藤减毒的思路，成功利用药用真菌双向发酵技术，将雷公藤与灵芝构成发酵组合进行发酵，结果显示，发酵后获得的各组雷公藤菌质急性毒性普遍降低，其 LD_{50}（28.46g/kg、19.13g/kg 和 16.12g/kg）大大低于雷公藤原药材 LD_{50}（1.2g/kg），药效学结果同时证实雷公藤菌质对 T、B 淋巴细胞的增殖有显著抑制作用，采用雷公藤菌质发酵后，其毒性明显降低，药效保持不变，“双向发酵”为中药炮制减毒增效研究提供了有益的探索和方法。

1.3.3　利用真菌发酵废弃药渣，变废为宝，拓展和利用资源

中药饮片以植物药入药居多，其中一些黄酮、生物碱、甾醇等药理活性成分，只占全部植物成分的 0.1%～5%，而一些木质素、纤维素和果胶质往往作为细胞壁和组织的成分，在植物成分中起到主导地位（占有 20%～30%），而现行传统的提取方法——水提法、有机溶剂提取、超声波提取、热波提取和 CO_2 超临界提取法等，往往不能充分地降解木质素、纤维素和果胶质等多种物质，直接造成了大量的、可利用的活性成分残留在富含木质素、纤维素和果胶质等的中药提取后的废渣中，造成了资源的极大浪费。由于木质素与半纤维素以共价键形式结合，将纤维素分子包埋在其中，形成一种天然屏障，使酶不易与纤维素分子接触，分解纤维素之前，必须先降解木质素。近年来研究发现，一些特殊的微生物包括漆酶、锰过氧化

物酶（MnP）、木素过氧化物酶（LiP）等参与了对木质素大分子的最初降解反应，并在降解过程中在木素聚合物内形成自由基，导致键的不稳定从而打断木素大分子，进而起到了降解木质素的作用。

下面以锰过氧化物酶（MnP）为例[18]，说明木质素的酶促降解过程。

① 木质素的结构。木质素又可以分为松柏醇、香豆素和芥子醇等结构单元（如图 1.3-6 所示）。这些结构单元的多样性以及木质素结合形式的复杂性决定了木质素具有很强的机械强度。

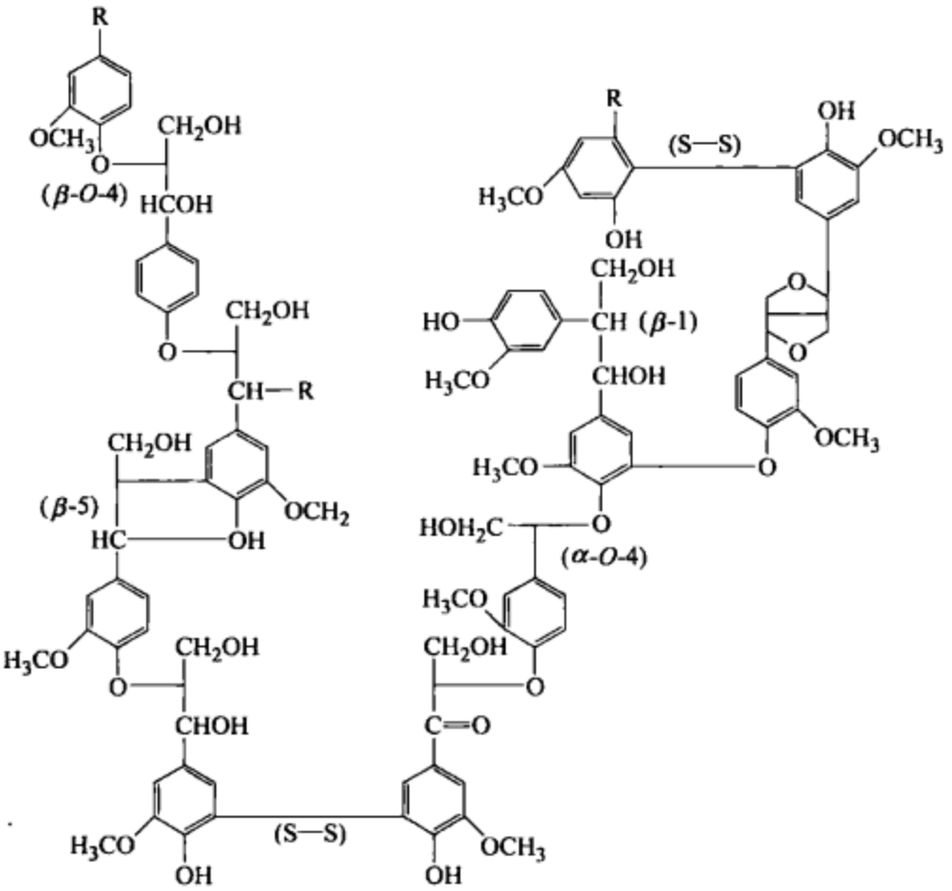


图 1.3-6　芥子醇结构

② 如图 1.3-7 所示，锰过氧化物酶（MnP）以木素和广泛存在的 Mn^{2+} 为酶反应底物，作用形成与有机酸螯合的 Mn^{3+}，其能与多种底物发生电子转移反应。如图 1.3-8 所示，MnP 在降解过程中在木素聚合物内形成自由基，导致键不稳定从而打断木素大分子。

③ 见表 1.3-2 和表 1.3-3 所示，现已成功地分离了可以产生 MnP 和漆酶的多种微生物，MnP 的产生菌多见于担子真菌类，典型菌种包括：木腐真菌——胶皱孔菌科、革菌科和多孔菌科；土壤枯草菌——球盖菇科和口蘑科。而漆酶多涉及真菌中的担子菌、子囊菌，脉孢霉、柄孢壳菌和曲霉等，其中杂色云芝、朱红密孔菌、变色栓菌、脉射菌和平菇等担子菌报道较多。

我国学者成功地分离、纯化和培养了多种微生物，对多种植物进行提取后药渣发酵，取得了很大的进展，秦俊哲等人[19]运用新型双向发酵思路，以花香树果序、辛夷花、夏枯草、黄芪、防风、甘草等六味中草药药渣为主要培养基质代替传

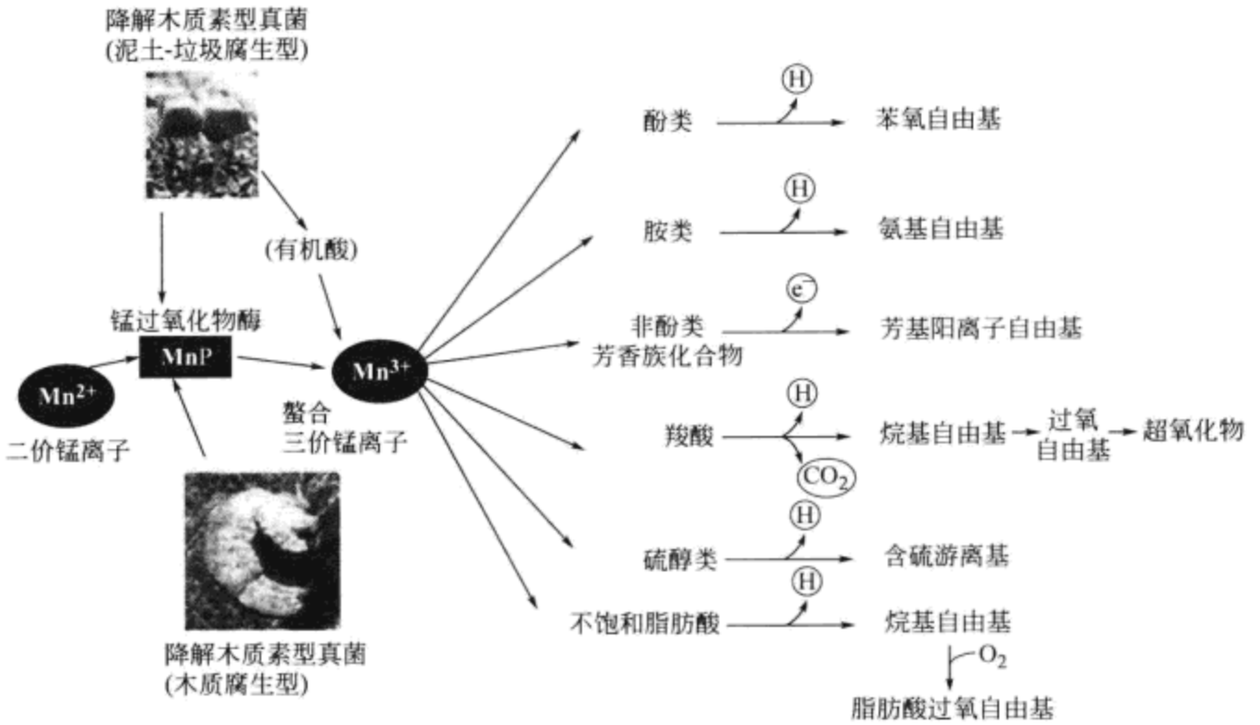


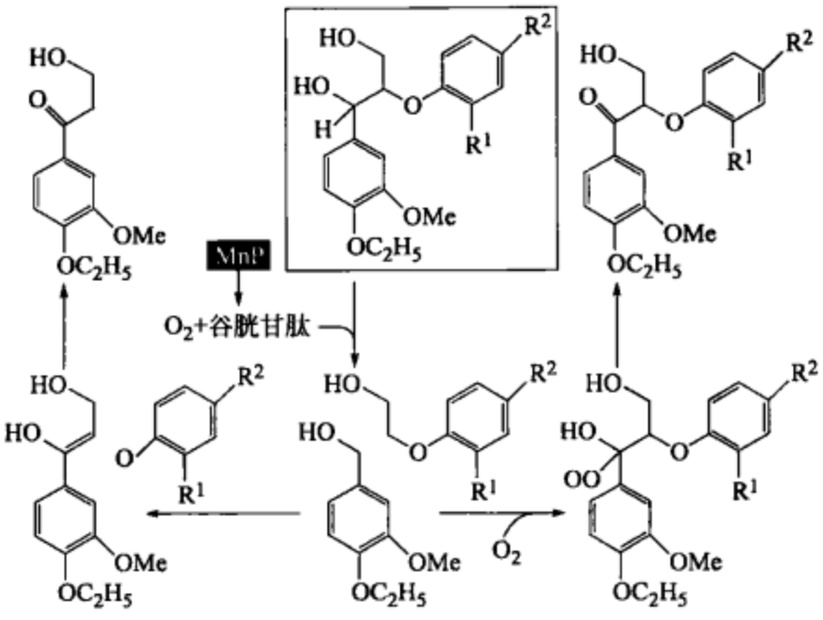
图 1.3-7　MnP 分解系统中形成的活性自由基

统基质进行灵芝固体发酵，发现发酵固体菌质中多糖含量为子实体的 2.4 倍，氨基酸含量提高了 2 倍以上。陈合等人[20]以相同的发酵思路，采用香菊药渣、甘草渣为发酵培养基，进一步研究了灵芝菌的最适发酵条件、子实体生长条件及其生物活性成分和重金属含量。结果表明，这种新型的药性菌质中灵芝多糖、灵芝酸三萜及蛋白质等生物活性成分均明显高于栽培灵芝，且甜芝子实体（中药渣栽培）、甜芝固体菌质和菌质水提粗多糖中 3 种重金属（As、Hg、Pb）含量均低于国家规定的标准。

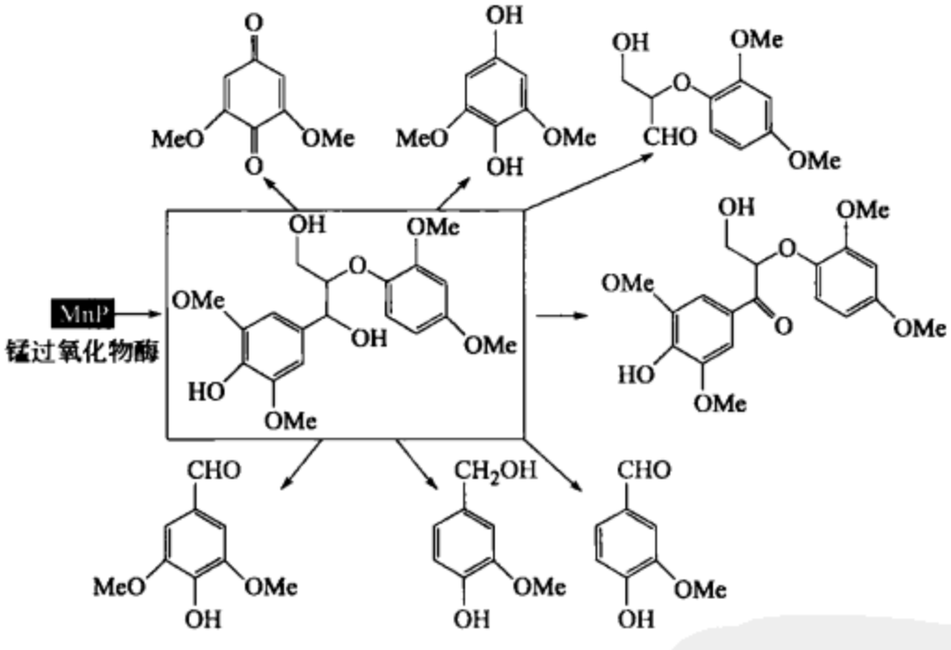
微生物絮凝剂具有无毒、安全、高效等优点，可广泛地应用于各种水处理、发酵工业和重金属的富集等领域。能分泌絮凝剂的微生物其种类繁多包括各种细菌、真菌、放线菌、霉菌、酵母菌和藻类等。目前其发酵生产多采用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、乳糖、淀粉等作为有机碳源，以酵母浸出膏、牛肉膏、蛋白胨、酪蛋白氨基酸等作为有机氮源来培养，存在培养基成本过高的缺点。而中药渣中富含供微生物生长用的碳源、氮源、生长因子、无机盐等营养物质。据此，田春等[21]利用中药渣作为有机碳源和氮源，从含中药渣的发酵泥土中筛选出具有较好产生絮凝剂能力的乳酪杆菌 TC21，并在此基础上利用任意的中药渣作为规模生产的培养基质，以中药渣作为有机碳源和氮源，替代葡萄糖、麦芽糖等，从而降低微生物絮凝剂的生产成本，取得了良好的效果。

1.3.4　利用植物内生菌发酵，直接提取植物活性成分

研究发现，几乎所有的高等植物都有一种或几种内生菌寄生，内生菌之间、内生菌与宿主之间存在着既竞争又互利共生的和谐关系。这种独特的关系很可能是两



木素中无酚结构模型的分解



木素中含酚结构模型的分解

图 1.3-8　木质素酶促降解机制

表 1.3-2　产生锰过氧化物酶（MnP）的微生物

真　菌　种　类	族　　群	培养形式
二年残孔菌	多孔菌科	液体发酵
双孢蘑菇	蘑菇科	固体发酵
硬田头菇	锈伞科	液体发酵、固体发酵
田头菇	锈伞科	液体发酵
蜜环菌	口蘑科	液体发酵
奥氏蜜环菌	口蘑科	液体发酵
耳穴菌 M37	木耳科	液体发酵

续表

真菌种类	族群	培养形式
黑管菌	多孔菌科	液体发酵
黑管菌属	多孔菌科	液体发酵
拟蜡菌属	彩孔菌科	液体发酵，固体发酵
白腐菌	口蘑科	液体发酵
Coriolus pruinosum(Pat.)Donk	革菌科	液体发酵
多带革孔菌	多孔菌科	液体发酵，固体发酵
栎金钱菌	白蘑科	液体发酵，固体发酵
粪生黑蛋巢菌	鸟巢菌科	液体发酵
灰黄曲霉	杯霉菌科	液体发酵
叉丝孔菌	多孔菌科	液体发酵
灵芝	多孔菌科	液体发酵
白囊耙齿菌	球盖菇科	液体发酵，固体发酵
松根异担子	多孔菌科	液体发酵
珍珠尖鳞伞	球盖菇科	液体发酵，固体发酵
库恩菇	灰锤科	液体发酵
香菇	口蘑科	液体发酵，固体发酵
Marasmius quercophilus(Dedeyan 等，2000)	口蘑科	液体发酵
胶质皱孔菌 M15	皱孔菌科	固体发酵
紧缩斑褶菇	鬼伞科	液体发酵
斗菇	侧耳科	液体发酵
灰孔多年卧孔菌	多孔菌科	液体发酵
栗褐暗孔菌	多孔菌科	液体发酵
金孢子菌属	皮壳菌科	液体发酵，固体发酵
Phanerochaete flavidoalba(Cooke)S. S. Rattan	皱孔菌科	液体发酵
黄孢原蘑	皱孔菌科	液体发酵
白色腐朽担子菌	皮壳菌科	液体发酵
白腐菌射脉侧菌	皱孔菌科	液体发酵，固体发酵
胶射脉革菌	革菌科	液体发酵
Physisporinus vitreus(Pers.)P. Karst.	革菌科	固体发酵
杏鲍菇	侧耳科	液体发酵，固体发酵
凤尾菇	白蘑科	液体发酵
糙皮侧耳	侧耳科	液体发酵，固体发酵
凤尾菇	白蘑科	液体发酵，固体发酵
香侧耳	侧耳科	固体发酵
木硬孔菌	鬼笔科	液体发酵
大球盖菇假单胞菌	球盖菇科	液体发酵
冠状球盖菇	球盖菇科	液体发酵
古巴球盖菇	球盖菇科	液体发酵
大球盖菇	球盖菇科	液体发酵，固体发酵
浅囊状栓菌	多孔菌科	液体发酵
毛栓孔菌	多孔菌科	液体发酵
硬毛栓菌	多孔菌科	液体发酵
云芝	多孔菌科	液体发酵，固体发酵
白腐菌	伏革科	液体发酵

表 1.3-3 产生漆酶的微生物

属 名	种 名
鬼伞属	毛头鬼伞、灰头鬼伞、锦绣鬼伞、灰鬼伞
革盖菌属	鲑贝革盖菌、毛革盖菌、彩绒革盖菌
灵芝属	卢氏灵芝、瓦氏灵芝
香菇属	香菇、皮香菇
花褶伞属	大孢花褶伞、紧缩花褶伞
平革菌属	黄孢原毛平革菌、黄白平革菌、平滑平革菌、花脸平革菌
射脉菌属	辐射形脉菌、胶状射脉菌
侧耳属	阿魏侧耳、糙皮侧耳、肺形侧耳、漏斗状侧耳
多孔菌属	光多孔菌、毛多孔菌、多空菌、血红多孔菌、变形多孔菌
云芝属	血红云芝、杂色云芝
丝核菌属	丝核菌、茄形丝核菌
密孔菌	朱红密孔菌、红密孔菌、血红密孔菌
栓菌属	偏肿栓菌、柔毛栓菌、血红栓菌
其他	贝壳状革耳菌、虎斑革耳、双孢蘑菇、小蜜环菌、灰葡萄菇、白腐菌、一色齿毛菌、嗜热毛壳菌、法国革孔菌、弯孢菌、禾顶囊壳小麦变种、米稻梨孢、侧孢霉

者在长期共生的过程中，发生了遗传物质的转化所致，即所谓“内共生理论”，与宿主共同进化的内生真菌可能从宿主获得相关基因的直接传递，具有与宿主相同的次生代谢产物合成途径[22,23]。由于和宿主具有相似的代谢产物合成途径，见表 1.3-4～表 1.3-12 所示，各种内生菌（杆菌、放线菌、真菌）及其各种活性代谢产物被认为是稀缺珍贵资源的替代品，广泛应用于药物研究领域。利用植物内生菌发酵直接提取多种稀缺或珍贵资源的技术方法，已经在抗肿瘤一线药物：紫杉醇、长春碱、长春新碱、喜树碱和鬼臼毒素等药物的开发中得到了实践，见表 1.3-13 所示，目前，已经从短叶红豆杉、雷公藤、长春花、喜树等多种植物中成功分离出了相应的内生菌，涉及茎点霉属、镰刀菌、多毛孢属、寄生曲霉等多种微生物。从植物内生菌中分离得到的抗菌活性物质结构类型多样，见图 1.3-9～图 1.3-15 所示，涉及萜类、生物碱类、芳香类、肽类等多种化合物，具有较强的抑菌、杀菌、抑制肿瘤等多种活性。内生菌作为植物有效成分的新资源，必将加大拓展植物活性成分，为多种天然药物的提取提供新的资源。

表 1.3-4 内生细菌类（endophytic bacteria）及其宿主、代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生物活性	宿 主
洋葱伯克霍德菌	LPSs	抑制过敏反应	洋葱
枯草芽孢杆菌	*	产生抗真菌蛋白	辣椒叶
芽孢杆菌	*	几丁质酶	芥末;芥菜
类芽孢杆菌	*	细胞外果胶酶	咖啡果
醋酸杆菌	*	谷氨酸合成酶	甘蔗
甲基杆菌属	*	合成细胞分裂素	苏格兰松

注：* 表示未鉴定的代谢产物或宿主植物。

表 1.3-5　内生放线菌类（endophytic actinomycetes）及其宿主、代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生物活性	宿　主
拟诺卡菌	*	分泌耐热的 α-淀粉酶	西印度豆薯
链霉菌 *NRRL* 30562	munumbicins A,B,C,D	广谱抗真菌和细菌	蛇藤
链霉菌 *NRRL* 30566	kakadumycins A	抑制炭疽芽孢杆菌和疟原虫，抑制 RNA 的合成	银桦
链霉菌	coronamycins	抗隐球菌和恶性疟原虫	蓬莱蕉

注：* 表示未鉴定的代谢产物或宿主植物。

表 1.3-6　内生细菌类及其宿主、生物碱类代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生物活性	宿主
茎点霉属	CY8262	抗生素，Ras-法尼基转移酶抑制剂	*
线壳囊孢属	Cryptocin	抗真菌，抗稻瘟霉和其他的植物病原菌	雷公藤的茎
交链孢属	细交链孢菌酮酸	抗致病的革兰阳性菌	*
腊叶芽枝霉	aspernigrin A	抑制白色念珠菌	*
黑曲霉	aspernigerin	对肿瘤细胞有弱细胞毒作用：鼻咽上皮 KB、宫颈癌 Hela 和人结肠癌 SW1116	*
镰刀菌	脑苷脂	抗菌剂，黄嘌呤氧化酶抑制剂	栓皮栎
尖孢镰刀菌	长春新碱	抗癌	长春花
球毛壳菌	球毛壳甲素 A	抗癌	美登木
球毛壳菌	penochalasin A	对人鼻咽上皮肿瘤 KB 细胞系有细胞毒作用	白茅

注：* 表示未鉴定的代谢产物或宿主植物。

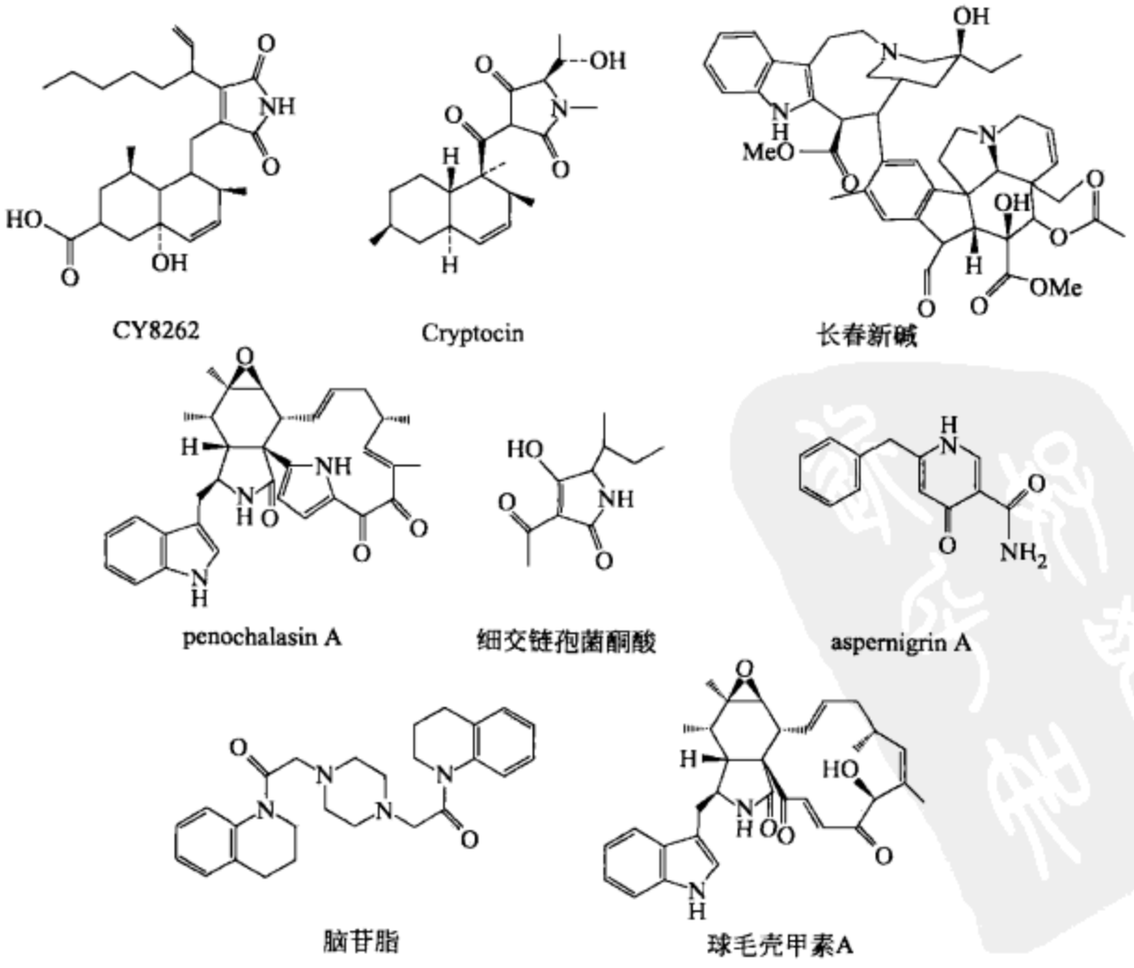


图 1.3-9　表 1.3-6 所列部分生物碱类活性产物的结构

表 1.3-7　内生细菌类及其宿主、萜类代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生　物　活　性	宿主
棉丝菌	倍半萜类	抑制巨大芽孢杆菌，花药黑粉菌	多管藻
露湿漆斑菌	myrothecines A，B	细胞毒	络石藤
*	Guanacastepenes A 和 H	抗耐药菌(金黄色葡萄球菌和粪肠球菌)	黄花蒿

注：* 表示未鉴定的代谢产物或宿主植物。

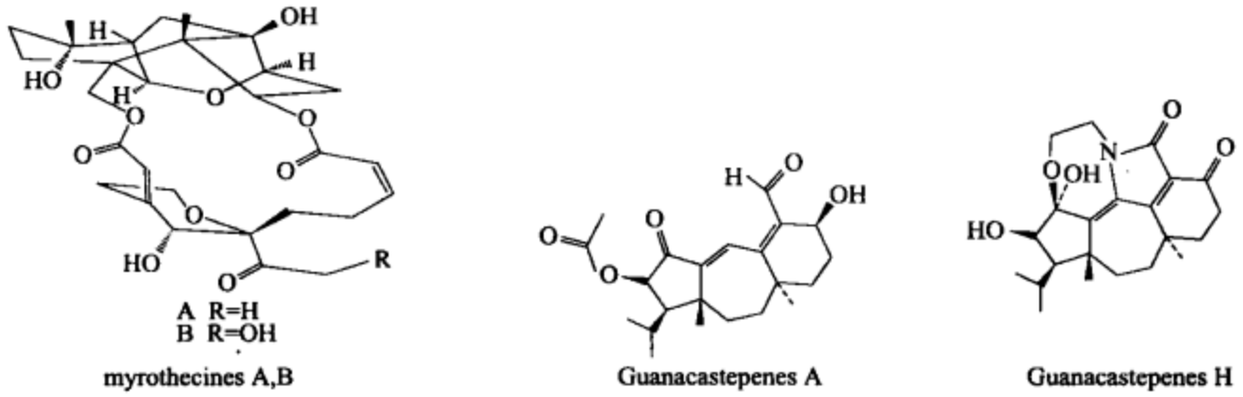


图 1.3-10　表 1.3-7 所列部分萜类活性产物的结构

表 1.3-8　内生细菌类及其宿主、异香豆素衍生物类代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生　物　活　性	宿主
地霉属	异香豆素衍生物	抗疟疾，抗结核，抗真菌	野茼蒿

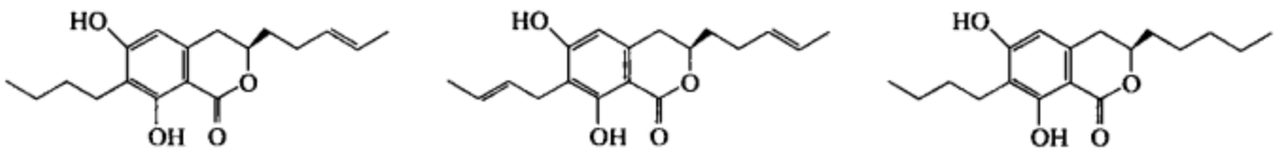


图 1.3-11　表 1.3-8 所列部分异香豆素衍生物活性产物的结构

表 1.3-9　内生细菌类及其宿主、醌类衍生物代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生物活性	宿主
小孢拟盘多毛孢	Jesterone	选择性抗真菌	*Fragraea bodenii*
拟盘多毛孢属，单毛孢属	Ambuic acid	抗真菌	*Torreya taxifolia* 美洲榧
黄青霉	Xanthoviridicatins E，F	抑制 HIV-1 整合酶	*
多孢子菌属	葱醌	抑制人结肠癌(SW1116)和白血病细胞(K562)	*Imperata cylindrical* 白茅花

注：* 表示未鉴定的代谢产物或宿主植物。

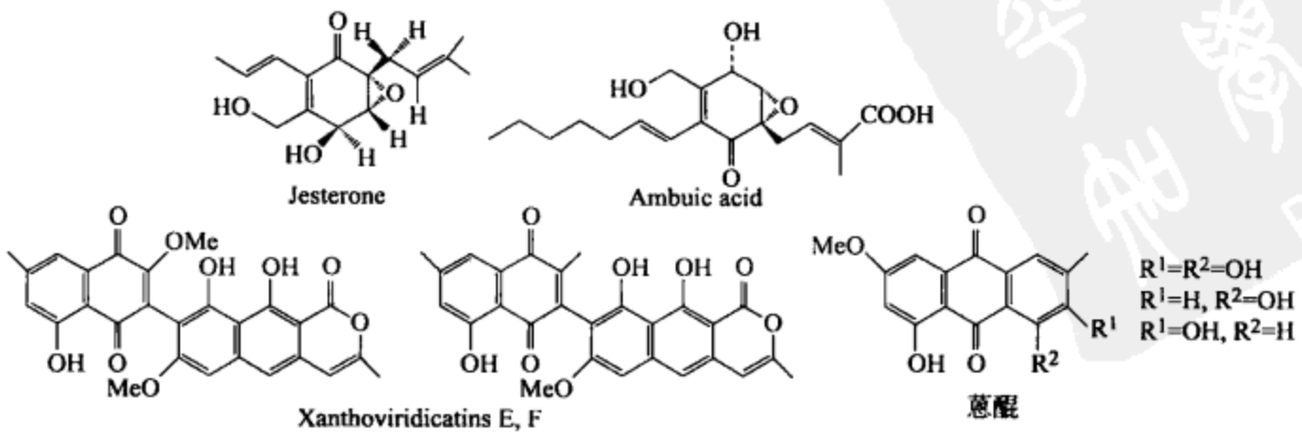


图 1.3-12　表 1.3-9 所列部分醌类活性产物的结构

表 1.3-10 内生细菌类及其宿主、酚类、酚酸类衍生物代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生物活性	宿主
多毛孢属	Pestacin, Iopestacin	抗真菌,抗氧化剂	榄仁树
球毛壳菌	Eersglobosumone A	抑制细胞增殖和肺癌,乳腺癌,中枢神经系统神经胶质瘤和胰腺癌	麻黄

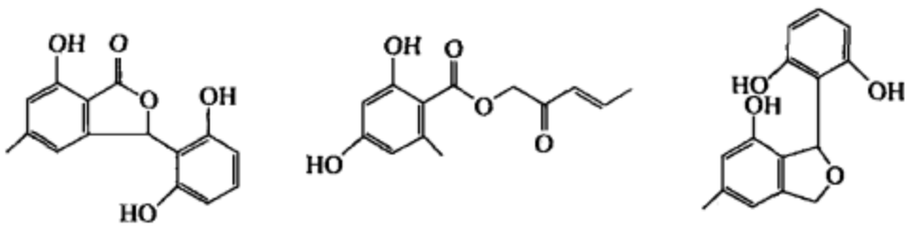


图 1.3-13 表 1.3-10 所列部分酚类、酚酸类活性产物的结构

表 1.3-11 内生细菌类及其宿主、内酯类衍生物代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生物活性	宿主
芦笋茎枯病菌	Phomol	抗生素	鸡冠刺桐嵴草
寄生曲霉	Sequoiamonascins A～D	对癌细胞系表现弱活性,包括 MCF7、NCI-H460 和 SF-268	*
顶头孢霉	graphislactones A,G 和 H	对 SW1116 细胞有显著细胞毒性	络石藤

注：* 表示未鉴定的代谢产物或宿主植物。

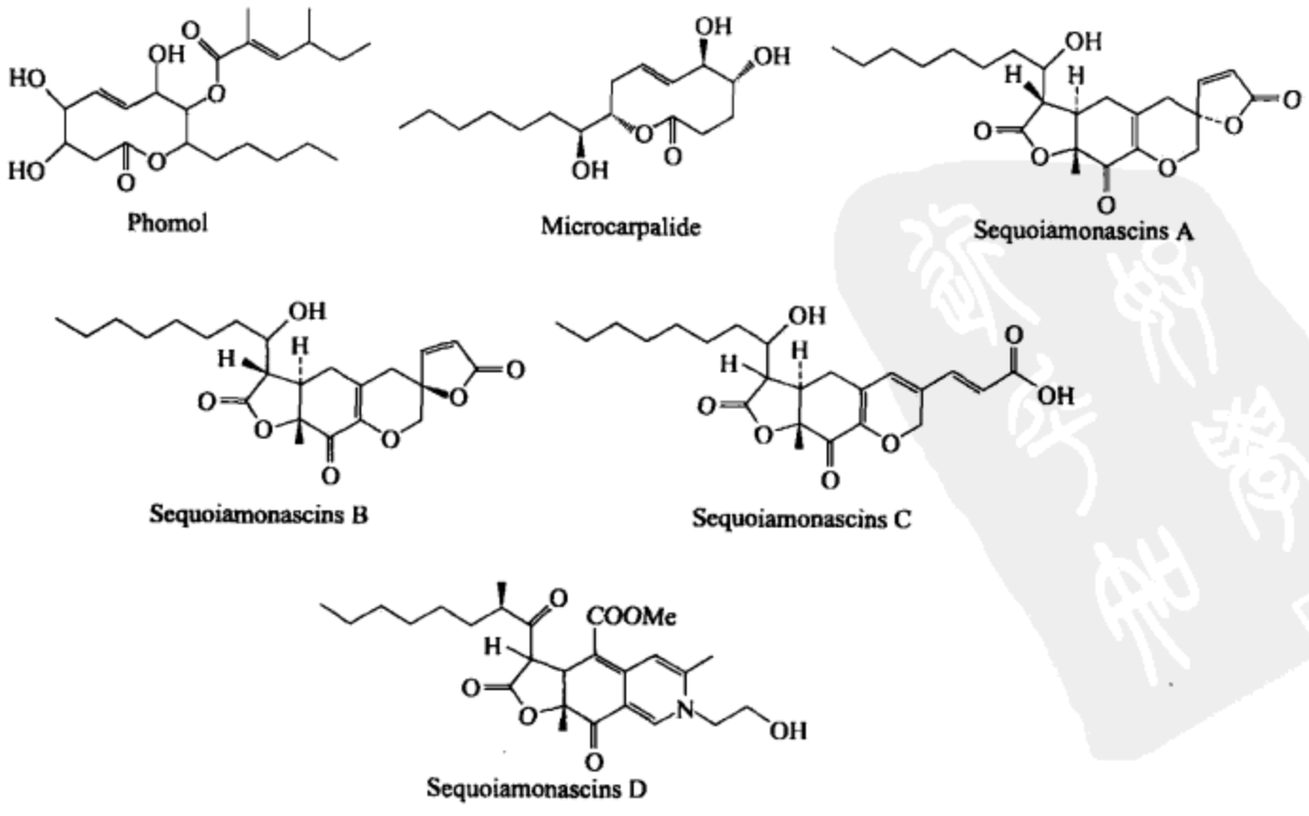


图 1.3-14 表 1.3-11 所列部分内酯类活性产物的结构

表 1.3-12　内生细菌类及其宿主、其他代谢产物和生物活性

共附微生物	代谢产物	生物活性	宿主
寄生曲霉	Sequoiatones C～F	细胞毒	红杉
丝核菌	Rhizotonic acid	抗幽门螺杆菌	狗牙根
黑曲霉	红镰霉素 B	细胞毒 结肠癌细胞系(SW1116)	狗牙根
黑曲霉	aurasperone A	抑制黄嘌呤氧化酶	狗牙根

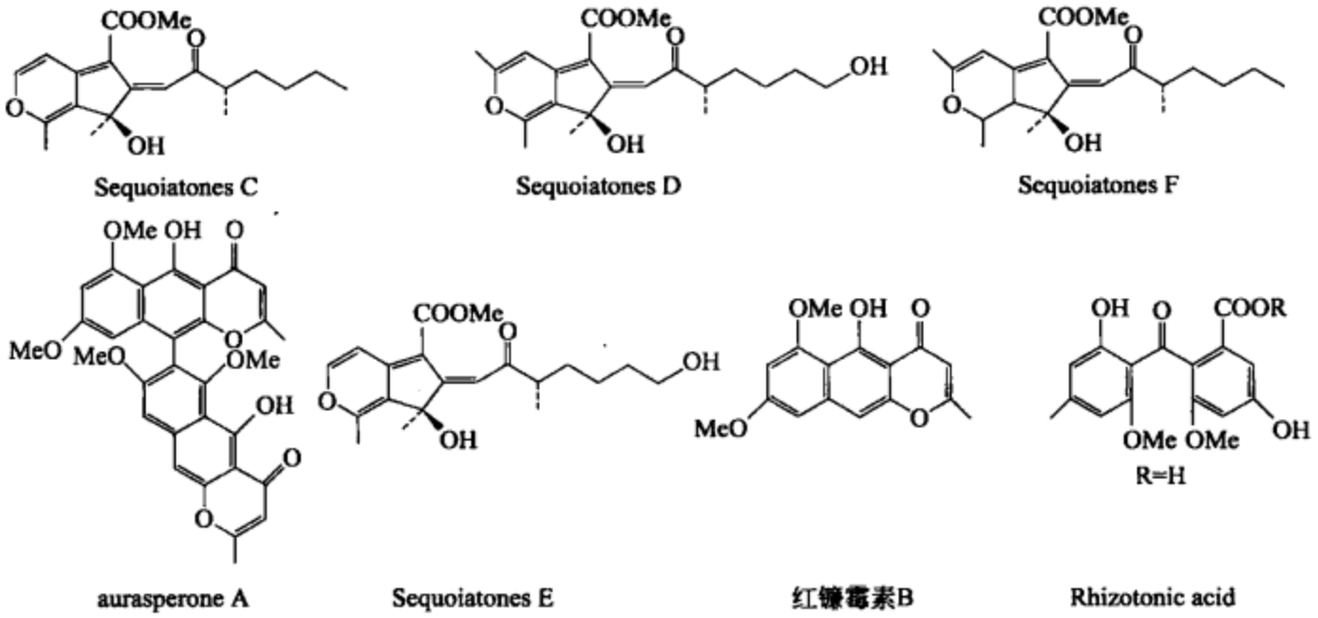


图 1.3-15　表 1.3-12 所列部分其他类活性产物的结构

表 1.3-13　产紫杉醇的内生菌及其宿主[25,26～44]

菌　株	宿　主	菌　株	宿　主
紫杉霉菌	太平洋紫杉	膝葡孢菌 Tax-X	云南红豆杉
盘单毛孢菌 Tbp-2	欧洲红豆杉	青霉菌 Tax-26	云南红豆杉
镰刀霉菌 Tbp-9	欧洲红豆杉	木霉菌 Tax-23	云南红豆杉
交链孢菌 Ja-69	东北红豆杉	毛霉菌 Tax-56	云南红豆杉
盘多拉毛霉菌 Ja-73	东北红豆杉	毛壳孢菌 Tax-60	云南红豆杉
盘多拉毛霉菌 Ne-32	西藏红豆杉	小孢盘多毛孢菌	落羽杉
髓霉菌 P-96	苏门答腊红豆杉	树状多节孢菌	东北红豆杉
双纤毛拟盘多毛孢菌 Tbx-2	欧洲红豆杉	被孢霉菌	南方红豆杉
盘多拉毛霉菌 Cp-4	落羽杉	瘤座孢菌	南方红豆杉
盘多拉毛霉菌	西藏红豆杉	头孢霉菌	南方红豆杉
盘多拉毛霉菌 W-lf-2	瓦勒迈杉	小孢盘多毛孢	西藏红豆杉
黑团孢霉菌	榧树	头孢霉菌	南方红豆杉
链霉菌 YF1	云南红豆杉	瘤座孢菌 TF5	南方红豆杉
丝核菌 Tax-1	云南红豆杉	紫杉霉菌	云南红豆杉
茎点霉菌 Tax-X	云南红豆杉	HQD_{33}	东北红豆杉

续表

菌　株	宿　主	菌　株	宿　主
HQD_{48}	东北红豆杉	茎叶核菌属 XT_5	南方红豆杉
拟茎点霉菌 A05	南方红豆杉	葡萄孢菌 XT_2	南方红豆杉
侧孢座腔菌 HQD_{54}	东北红豆杉	褐色石膏霉菌 XT_{17}	南方红豆杉
链格孢菌 HD_{1353}	东北红豆杉	链格孢菌 HU1353	东北红豆杉
灰霉菌 HD181-23	东北红豆杉	镰刀菌 Y1117	南方红豆杉
瘤座孢菌 TF_5	南方红豆杉	黑团孢菌 154403	南方红豆杉

1.3.5 利用药用植物毛状根发酵，获得多种活性成分

微生物发酵在药物研究中虽然已经做到了定向筛菌，但不是所有的药物都适合各种微生物发酵，有些植物药如黄连还会抑制微生物的生长，而且微生物在发酵过程中产生的酶系往往是有限的，如果提高植物自身有效的代谢量，有可能产生更多的活性成分。而利用发根农杆菌的 Ri 质粒，诱导药用植物的毛状根分化，直接产生多种次生代谢产物，直接将二次代谢物分泌至发酵培养基中，直接获得各种目的活性成分，业已成为近年来研究的热点。发状根发酵生产代谢活性产物的过程如图 1.3-16 所示，表 1.3-14 系统地总结了已经报道的毛状根培养体系及其各种活性发酵产物[47,48]。Parr 等[45]用发根农杆菌 LBA9402 感染长春花的叶片获得毛状根，毛状根除能产生阿玛碱和长春质碱外，还产生悬浮细胞培养不能合成的重要次生物质长春碱（0.05μg/g 干重）。刘展眉等人[46]用 Ri 质粒诱导的喜树毛状根培养生产喜树碱，从培养 30 天的喜树发酵培养基中获得喜树碱干质量浓度为 0.14mg/g。经发根农杆菌侵染植物形成的毛状根是离体培养能够再生植株，而且许多植物的毛状根在离体培养条件下表现出次生代谢产物的合成能力，产物产量较正常植物及悬浮培养细胞要高。因此 Ri 质粒诱导的毛状根可应用于有价值的次生代谢产物的生产。目前已建立大约 100 多种植物发根培养系统，其中药用植物如丹参、决明、紫草、罗芙木、龙胆草、曼陀罗、莨菪、长春花、桔梗等小规模培养已经成功，人参皂苷、黄连素、喜树碱、黄芩、乌头碱等通过毛状根体系得以生产。

1.3.6 利用共生菌发酵，发现药物新成分

研究发现，各种不同类群的微生物能在多种不同的环境中生长繁殖。微生物与微生物之间，微生物与其他生物（细菌 bacteria、甲藻 dinoflagellates、植物 plants、真菌 fungi、海绵 sponges、刺胞动物 cnidarians、苔藓虫 bryozoans、软体动物 molluscs、线虫 nematodes、甲壳类动物 crustaceans、昆虫 insects、被囊动物 tunicates、椎动物 vertebrates）存在共生代谢的关系，例如，根瘤菌与豆科植物共生形成根瘤共生体，是微生物与植物共生的又一典型。由于彼此双赢，所以称为互惠共生。菌固定大气中的氮气，为植物提供氮素养料，而豆科植物根的分泌物能刺激根瘤菌的生长，同时，还为根瘤菌提供保护和稳定的生长条件。许多真菌能在一些植物根上发育，菌丝体包围在根面或侵入根内，形成了两者的共生体，称为菌

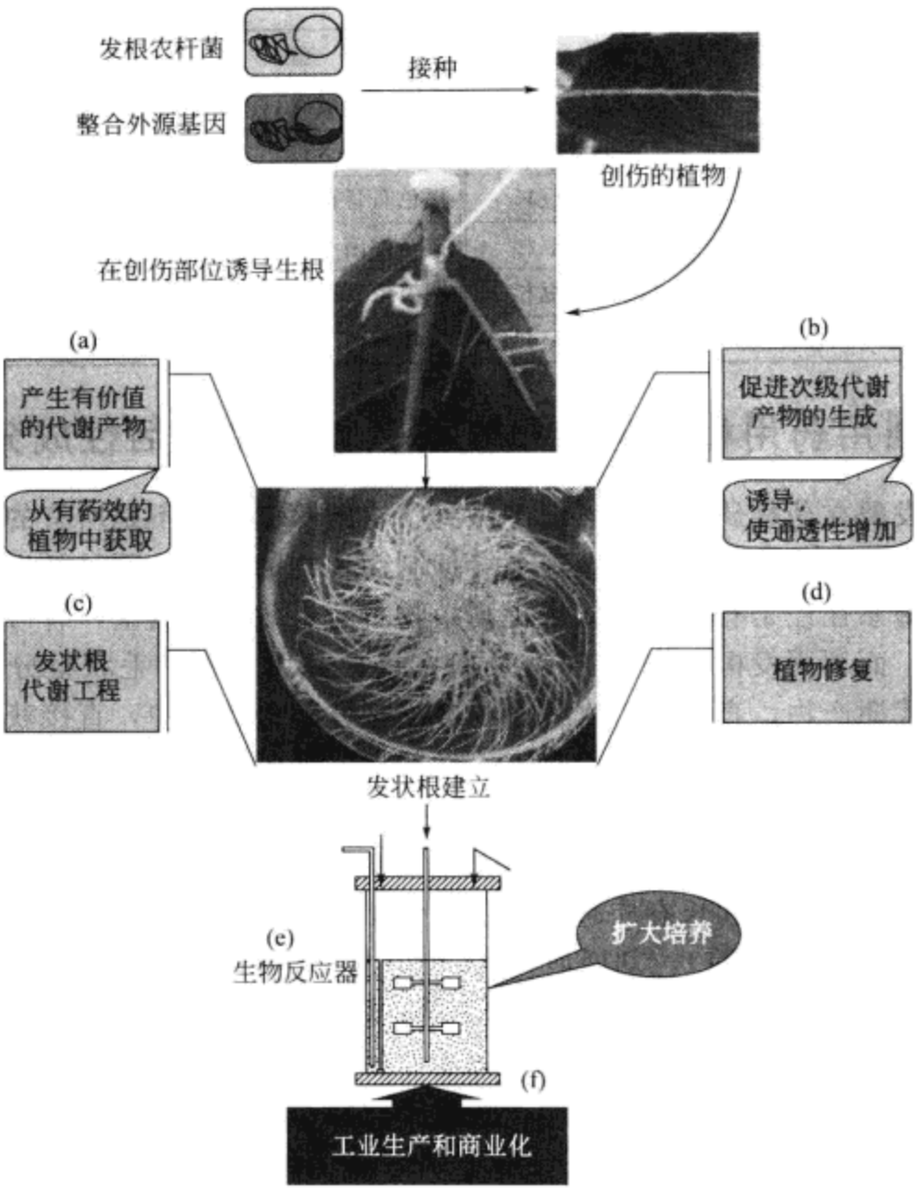


图 1.3-16　发状根发酵生产代谢活性产物的过程[46]

(a) 发根农杆菌整合外源基因于其 Ri 质粒上；(b) 发根农杆菌携带 T-DNA 片段通过其 Ri 质粒，从植物叶片创伤处感染植物体；(c) 几天后，在植物创伤处出现发根农杆菌诱导生成的根状结构；(d) 扩大培养，为了从药用植物中生产大量的有效代谢产物，必须在不断摇动的液体培养基中培养发状根；(e) 外源基因在发状根中表达，产生重组蛋白或使特定蛋白过表达破除代谢途径的限制来最大化地产生次级代谢产物；(f) 工业化发酵生产代谢产物

表 1.3-14　毛状根培养体系及发酵产物[48]

植　物	发酵产物	植　物	发酵产物
赛葵菪	东莨菪碱，莨菪碱	绞股蓝	皂苷、水溶性酚酸
甘草	黄酮类	丹参	丹参酮，隐丹，参酮
甘草	甘草酸	小蔓长春花	丹参酮，隐丹，参酮
甘草	甘草酸	青蒿	青蒿素
金荞麦	双聚原矢车，菊苷元	黄芪	黄芪皂苷甲
萝芙木	利血平，阿马碱	栝楼	天花粉蛋白

续表

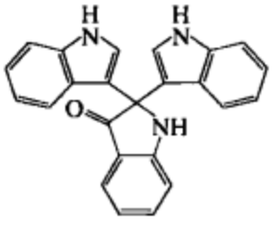
植　物	发酵产物	植　物	发酵产物
露水草	蜕皮激素	曼陀罗	托烷类生物碱
毛喉鞘蕊花	二萜化合物	旋花	红古豆碱
决明	蒽醌类化合物	风铃草	多胺
掌叶大黄	蒽醌类化合物	红花	唾吩
天山大黄	蒽醌类化合物	腊肠树	蒽醌
短叶红豆杉	紫杉醇	长春花	多肽色素
野葛	异黄酮类化合物	长春花	吲哚碱
山葛	异黄酮类化合物	红缬草	吲哚碱
三裂叶葛	异黄酮类化合物	*Chaenatis douglasii* Hook	颉草三酯
粟米草	粟米草皂苷 A	金鸡纳树	Thiarubrins
异叶乌头	乌头碱	毛喉鞘蕊花	奎宁
匍匐筋骨草	植物蜕皮类固醇	红花曼陀罗	多炔
豚草	多胺、噻吩	紫花重瓣曼陀罗	东莨菪碱
水甘草	吲哚碱	紫花重瓣曼陀罗	天仙子胺
喜马拉雅东莨菪	莨菪碱	胡萝卜	天仙子胺
辣根	过氧化物酶，壳梭胞素	铃花紫毛地黄	倍半萜
草莓	呋喃奎宁丙氨酸	澳洲茄	类黄酮，花青素
Geranium thubergee Ishimaru	黄烷醇	*Duboisia leichhardtii* (F. Muell.)	苷
光果甘草	多酚		
绞股蓝	革菜酸	紫锥菊	东莨菪碱
黄天仙子	类黄酮	*Fagra zanthoxyloids* Lam	东莨菪碱，Alkamides
天仙子	皂苷		
莨菪	托烷生物碱	荞麦	Benzophenanthridine
毒莴苣	天仙子氨、莨菪碱	百脉根	多炔葡糖苷
高山火绒草	天仙子氨	西烟草	半边莲碱，多炔
八角莲	倍半萜内酯	黄花烟草	稠合革草酸
甜舌草	花色素苷、精油	烟草	烟碱，新烟碱
红花半边莲	倍半萜	人参	烟碱，新烟碱
路卑利草	紫草宁	桔梗	倍半萜醌
蒿	精油	印度蛇木	精油
黄花蒿	青蒿素	舶来茜草	多炔葡糖苷
黄芪	皂苷	洋茜草	利血平
颠茄	阿托品	丹参	蒽酯
印楝	印苦楝子素	狗尾草	多炔、唾吩
甜菜	色素	黄芩	双萜
鬼针草	多胺	牛膝	天仙子胺

根。一些植物，例如兰科植物的种子若无菌根菌的共生就无法发育，杜鹃科植物的幼苗若无菌根菌的共生就不能存活。微生物与动物互惠共生的例子也很多，如表1.3-15～表1.3-17所示，海绵、刺胞动物、苔藓虫、软体动物、线虫、甲壳类动物、昆虫、被囊动物、脊椎动物等，微生物的代谢作用为其提供了丰富的营养物质。由于共生菌和宿主具有相似的代谢产物合成途径，共生菌被认为是一种丰富资源，在药物研发中受到关注。如图1.3-17～图1.3-19所示，目前，已经从各种来源中，成功地分离了多种共生菌，发酵分离了多种活性代谢产物，具有较强的抑菌、杀菌、抑制肿瘤等多种活性，涉及醇类、大环内酯类、生物碱类、肽类等多种全新化合物[49]。共生菌作为微生物发酵生产活性药物的新资源，在新药的开发和利用方面具有广泛的应用前景。

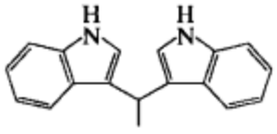
表1.3-15　各类共附微生物、宿主及其生物碱及大环内酯类化合物

种类	共附微生物名称	活性产物	生物活性	宿主
(C)	藻短裸甲藻	双鞭甲藻毒素A	限制RNA进入细胞	烟草天蛾
(C)	酒曲菌属	根霉素M1	细胞毒素	海绵
(C)	海绵细菌	swinholide A	细胞毒素	海绵
(K)	游螺属	苔藓抑素1	蛋白激酶C活化剂	苔藓虫
(D)	原绿藻	海鞘素-743	抗癌	海鞘
(C)	热石杆菌属	BII,BIE	芽孢杆菌属生长抑制剂	*
(C)	中华根瘤菌	左旋刀豆	QS系统抑制剂	苜蓿
(C)	中慢生根瘤菌	二甲(基)异咯嗪	促进豆类植物成长	*
(C)	埃氏慢生根瘤菌	根瘤菌毒素	乙烯合成抑制剂,植物毒素	*
(C)	铜绿假单胞菌	绿皮菌素	诱导水稻瘟病抵抗性下降	*
(C)	小单孢子菌	Manzamine A	抗疟	海绵
(C)	小单孢子菌	8-hydroxymanzamine A	抗疟	海绵

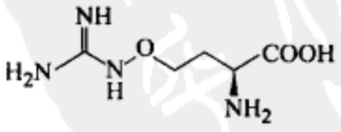
注：A：放线菌；B：真菌；C：细菌；D：蓝藻；E：甲藻；F：红藻；G：绿藻；H：褐藻；I：海绵；J：珊瑚/苔藓虫类；K：棘皮/刺胞/有囊动物；L：其他；*：实验室培养/未见报道。



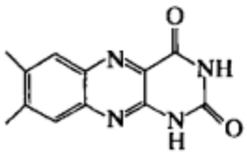
BII



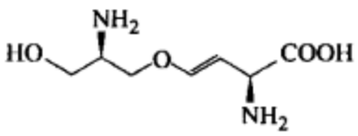
BIE



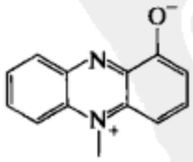
左旋刀豆



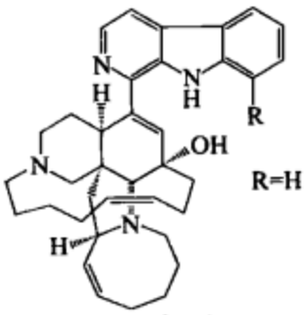
二甲(基)异咯嗪



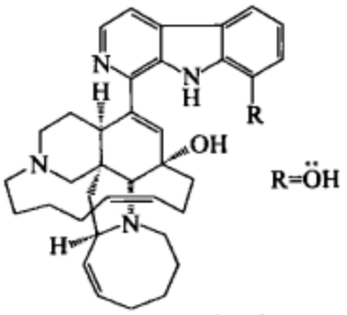
根瘤菌毒素



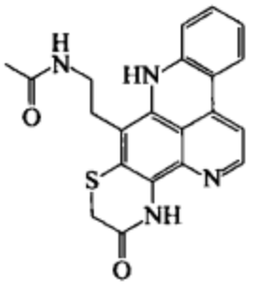
吩嗪



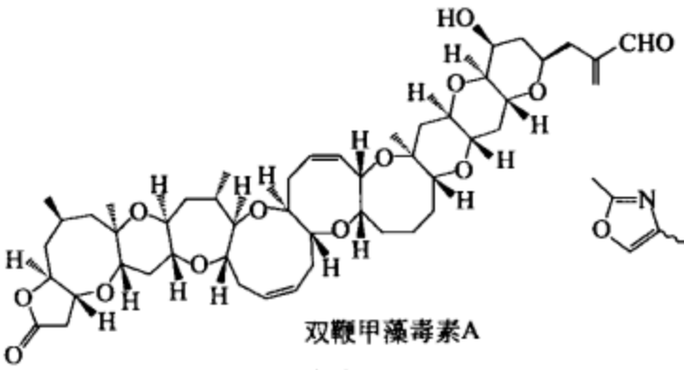
manzamine A



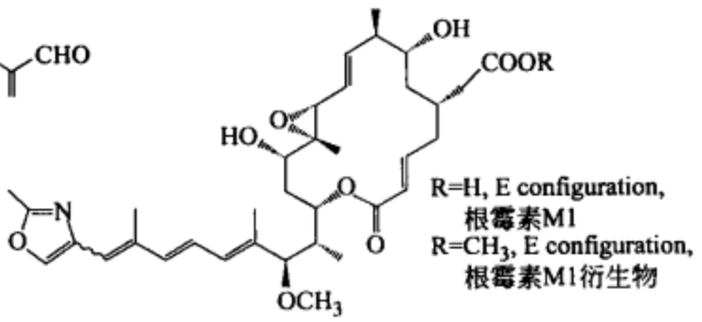
8-hydroxymanzamine A



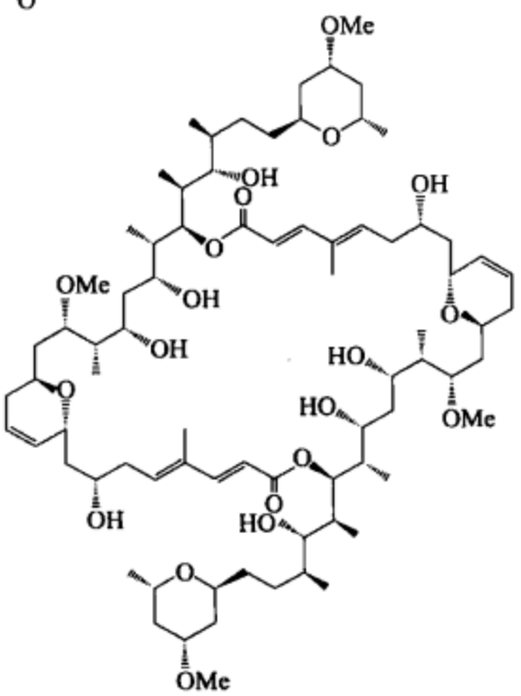
shermilamine B



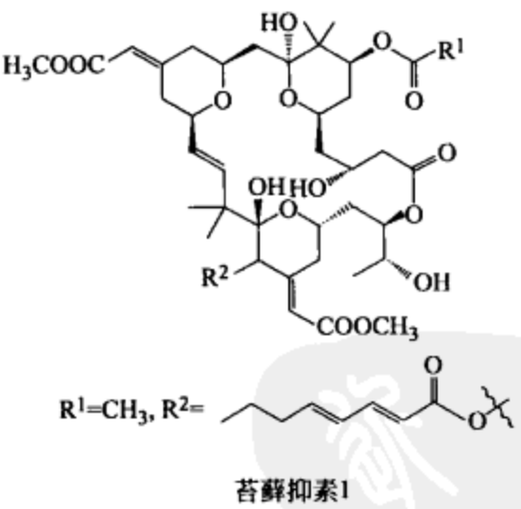
双鞭甲藻毒素A



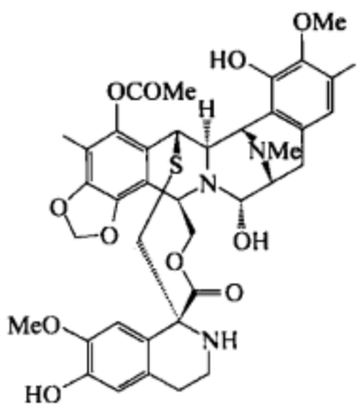
根霉素M1



Swinholide A



苔藓抑素1



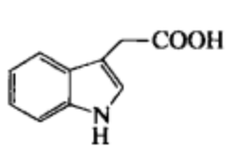
海鞘素-743

图 1.3-17　表 1.3-15 所列部分其他类活性产物的结构

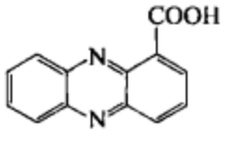
表 1.3-16　各类共附微生物、宿主及其肽类、醇、酸类化合物

种类	共附微生物名称	活性产物	生物活性	宿主	类别
(C)	枯草芽孢杆菌	2,3-丁二醇	植物生长促进剂	*	植物
(C)	假单胞菌	1,1′-(2,4,6-三羟基-1,3-亚苯基)二乙酮	阻止从根部摄取氨基酸	*	植物
(C)	发光光状杆菌	环氧衍生物	细胞毒素,抗生素	蜡蜈	线虫类
(C)	发光杆菌	1,8-二羟基-3-甲基蒽-9,10-二酮	降低烟草天蛾防御作用	烟草天蛾	线虫类
(C)	杆状菌	吲哚-3-乙酸	植物生长促进剂	百脉根	植物
(C)	荧光假单胞杆菌	吩嗪-1-羧酸	诱导细菌产生藤黄绿脓菌素	*	植物
(C)	细菌	WS-5995 B,C	抗真菌	毒蝇伞鹅膏菌	植物
(C)	枯草芽孢杆菌	芬荠素	诱导豆类植物抗性	豆科植物	植物
(C)	枯草芽孢杆菌	Bacillaene	对枯草杆菌不稳定的抗生素	*	植物
(C)	枯草芽孢杆菌	芽孢菌溶素	芽孢菌溶素,抗生素	*	植物
(C)	枯草芽孢杆菌	抗霉枯草菌素	增强生物电控活性	*	植物
(C)	绿针假单胞菌	QS 因子	调节绿针假单胞菌氮蒽的生物合成	烟草	植物
(C)	发菜藻	微囊藻毒素	在水生蓝细菌有广泛毒性	类盘菌鳞叶衣	地衣
(C)	发菜藻	Cryptophycin 1	抗癌	蓝细菌	海绵
(B)	小单孢子菌	噻可拉林	有细胞毒性的非核糖体肽	软珊瑚	刺胞动物
(C)	大肠杆菌	eptifibatide	抗凝血	*	被囊类

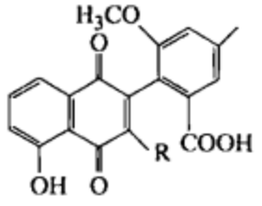
注：A：放线菌；B：真菌；C：细菌；D：蓝藻；E：甲藻；F：红藻；G：绿藻；H：褐藻；I：海绵；J：珊瑚/苔藓虫类；K：棘皮/刺胞/有囊动物；L：其他；*：实验室培养/未见报道。



吲哚-3-乙酸

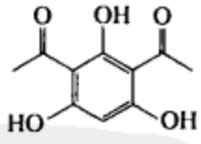


吩嗪-1-羧酸

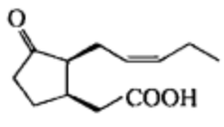


WS-5995 B, C

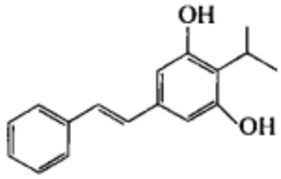
R=H
R=OH



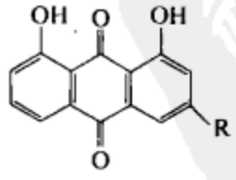
1,1′-(2,4,6-三羟基-1,3-亚苯基)二乙酮



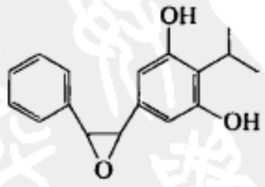
茉莉酸



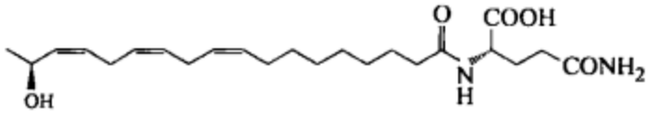
(*E*)-2-异丙基-5-苯乙烯基苯-1,3-二酚



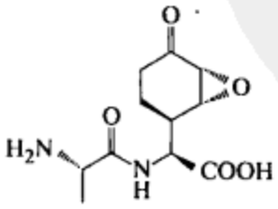
1,8-二羟基-3-甲基蒽-9,10-二酮



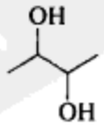
环氧衍生物



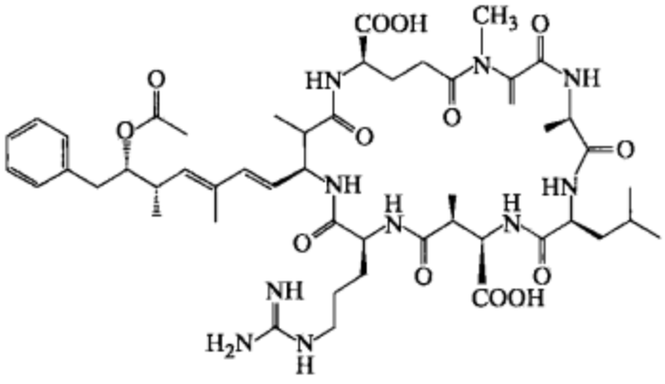
Volicitin



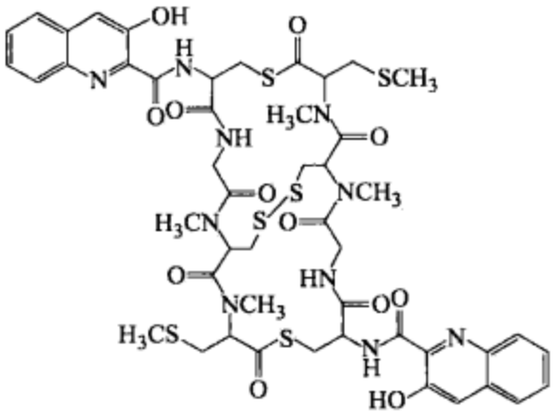
抗霉枯草菌素



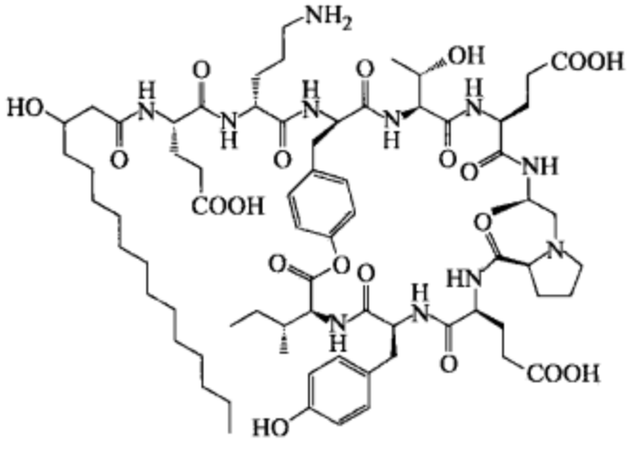
2,3-丁二醇



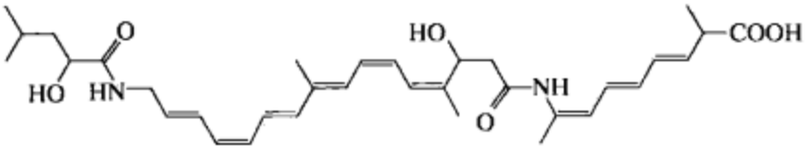
微囊藻素-LR



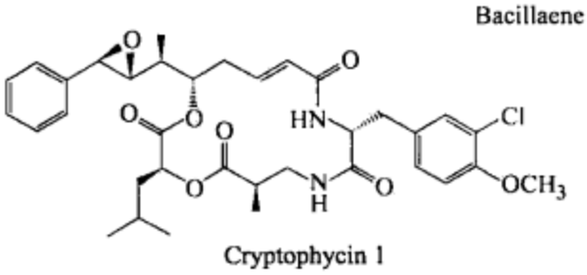
噻可拉林



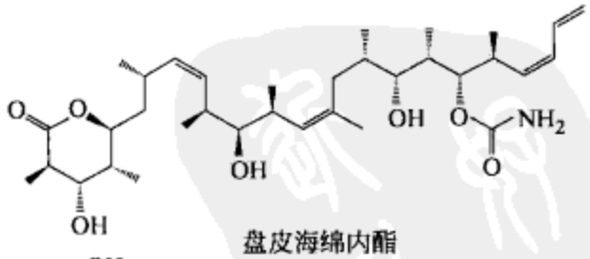
芬荠素



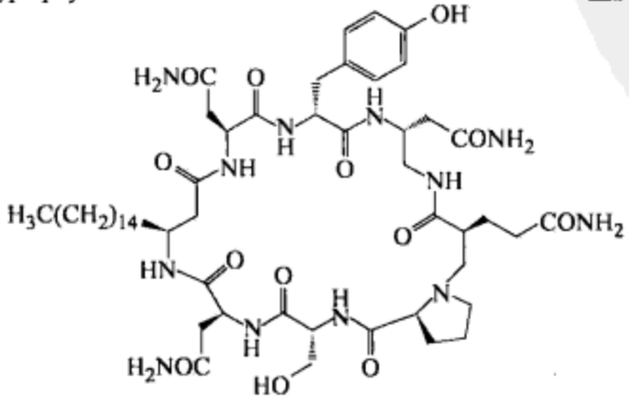
Bacillaene



Cryptophycin 1



盘皮海绵内酯



芽孢菌溶素

图 1.3-18　表 1.3-16 所列部分活性产物的结构

表 1.3-17 各类共附微生物、宿主及其酮类化合物及其他

种类	共附微生物名称	活性产物	生物活性	宿主	类别
(C)	链霉菌	Auxofuran	诱导基因表达	毒蝇伞鹅膏菌	植物
(C)	海绵细菌	萘醌	血管生成抑制剂	澳大利亚厚皮海绵	海绵
(C)	嗜线虫致病杆菌	苯丁烯酮	抑制植物病原菌	斯氏线虫	线虫类
(C)	绿脓杆菌	藤黄绿脓菌素	调节自身生物合成和抑制	*	植物
			2,4-diacetylphloroglucinol 生成		
(C)	假单胞菌属	鸡矢素	抗癌	隐翅虫属	海绵
	*	ircinia statin A	抑制实体瘤	海绵	海绵
(C)	海绵细菌	plakortin	抗疟	*Plakortis simplex*	海绵
(D)	*Vibrio fischeri* P.	3-oxo-C6-HSL,C8-HSL	lux 系统的小分子调节剂	乌贼	软体动物

注：A：放线菌；B：真菌；C：细菌；D：蓝藻；E：甲藻；F：红藻；G：绿藻；H：褐藻；I：海绵；J：珊瑚/苔藓虫类；K：棘皮/刺胞/有囊动物；L：其他；*：实验室培养/未见报道。

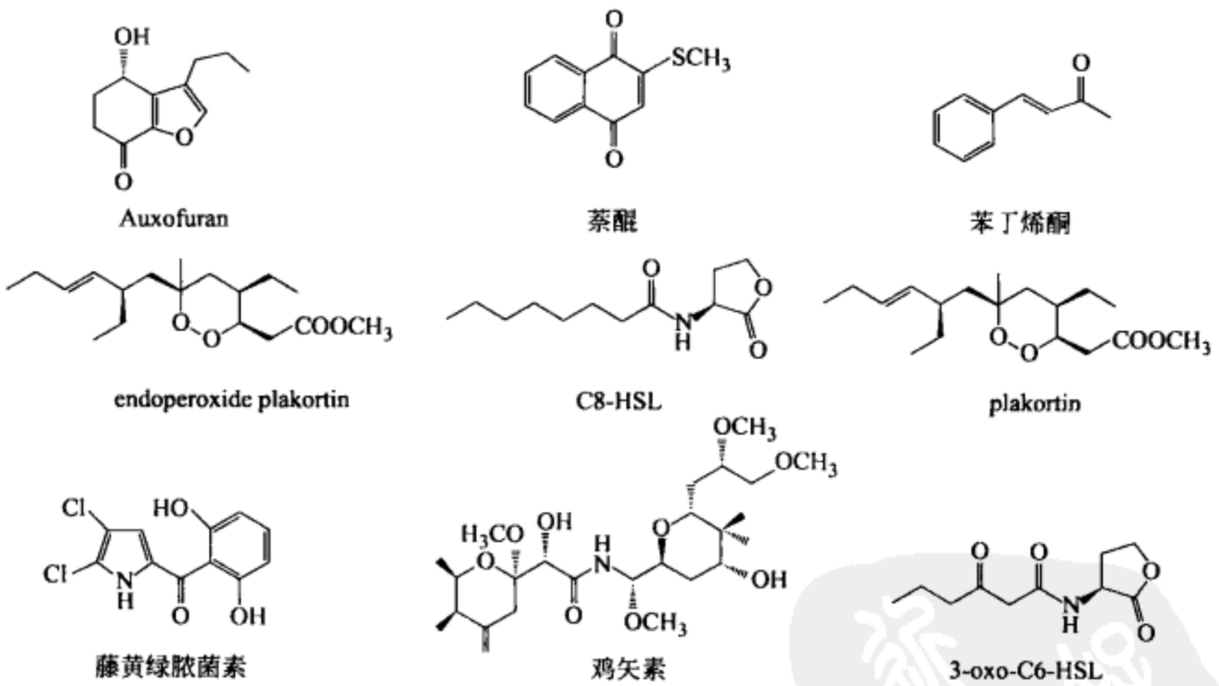


图 1.3-19 表 1.3-17 所列部分活性产物的结构

1.4 展望

以具有一定药理活性的药物构成的基质为培养基，微生物依靠自身产生的丰富酶系和次级代谢产物在其上进行一系列分解合成代谢，最终达到提高中药药效、降低毒副作用、产生新成分及药理活性目的。微生物发酵由原来菌体单方向从培养基中吸收营养物质转变为菌体、培养基和药物互相作用，双向固体发酵对微生物发酵的技术和原理赋予了新的内容。与此同时，由于目前优选到、用于发酵生产的定向

菌种数量较少、酶促反应的种类和能力仍旧不能满足众多药物催化要求，许多药用资源的活性产物急需开发和利用，为此，利用药用植物、动物、海洋资源等共生菌、内生菌作为筛选药物的替代和补充；利用生物工程技术农杆菌诱发药用植物发状根直接产生二次代谢活性成分，都必将成为药物发酵研究中新的技术和方法。

参考文献

[1] R. Russell, M. Paterson. Ganoderma-A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry, 2006 (67): 1985-2001.

[2] 魏巍，罗霞，石珏等. 灵芝与中药共发酵产物的药理学初步研究. 四川大学学报（自然科学版），2007，(44) 6：6-9.

[3] 徐鹏. 添加中药的灵芝发酵及其酪氨酸酶抑制活性的研究. 无锡：江南大学，2006.

[4] 潘扬，张弦，蒋亚平等. 双向发酵前后马钱子生物碱含量及其 HPLC 指纹谱的比较. 南京中医药大学学报，2006，22 (6)：361-363.

[5] 白家峰. 牛蒡子微生物发酵转化的研究. 成都：四川大学，2006.

[6] 王谦. 大型食用真菌和与发酵工程. 广西轻工业，1995，(2)：21-25.

[7] 孙巍，刘学铭. 酶的固体发酵生产研究进展. 生物技术通报，2008，(2)：61-67.

[8] 庄毅. 药用真菌新型（双向型）固体发酵工程. 中国食用菌，2006，21 (4)：3-6.

[9] David A. M, Nadia Krieger MB (Eds.). Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation. NewYork：Springer Verlag Berlin/Heidelberg，2006，PP38-66.

[10] 李旗德，曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容. 中草药，2001，32 (3)：267.

[11] 薛慧玲. 微生物发酵转化黄芩的研究. 成都：四川大学，2006.

[12] 田天丽，沈竞，徐萌萌等. 虎杖中虎杖苷的微生物发酵转化研究. 四川大学学报（自然科学版），2008，45 (2)：437-440.

[13] 冯志华，孙启玲，米坤等. 中药红花与产纤溶酶菌株相互影响的研究. 四川大学学报（自然科学版），2004，41 (2)：395-398.

[14] 冯志华，孙启玲，米坤等. 微生物发酵炮制对红花抗氧化活性的影响. 中草药，2004，35 (6)：630-632.

[15] 陈智. 微生物发酵转化红花增效及其物质基础探索. 成都：四川大学，2006.

[16] 潘扬，蔡宝昌，陈龙，刘学湘等. 一种以药用真菌实现对马钱子降毒存放的固体发酵方法. CN 200810023423. 2008. 4. 14.

[17] 罗阁丹，苏明声，周雪娥等. 灵雷菌质对小鼠免疫功能的影响. 全国药用真菌学术研讨会论文集. 2008.

[18] 王蓓，王圆，周晓云等. 锰过氧化物酶（MnP）的研究进展. 化工技术与开发，2005，34 (4)：29-30.

[19] 秦俊哲，陈明，李玲玲等. 固体菌质中灵芝多糖含量的测定. 西北轻工业学院学报，2003，21 (4)：17-20.

[20] 陈合，陈立，陈明等. 中药渣用于培养灵芝菌及功能成分分析. 农业工程学报，2006，22 增 (2)：167-169.

[21] 田春，张通，兰辉等. 用中药渣制备天然碱泥用生物絮凝剂的研究. 内蒙古工业大学学报（自然科学版），2004，(4)：256-259.

[22] 梁宗琦. 真菌次生代谢产物多样性及其潜在应用价值. 生物多样性，1999，(7)：145-150.

[23] Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. Nat. Prod. Rep, 2006, (23): 753-771.

[24] Hua WZ, Yong CS, Ren X T. Biology and chemistry of endophytes. Nat. Prod. Rep, 2006, 23 (6): 753-771.

[25] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by Taxomycesandreanae, an endophytic fungus of pacificyew. Sci, 1993, 260 (9): 214-216.

[26] Strobel G, Yang XS, Sears J. Taxol from Pestalotiopsismicrospora, an endophytic fungus of Taxus wallachiana. Microbiol, 1996, 142: 435-440.

[27] Strobel GA, Hess WM, Li JY. Pestalotiopsisguepinii, ataxol-producing endophyte of the wollemipine, Wollemia nobilis. Aust J Bot, 1997, 45 (6): 1073-1082.

[28] Strobel GA, Hess WM, Ford E. Taxol from fungal endophytes and issue of biodiversity. J IND MICROBIOL BIOT, 1996, 17 (5-6): 417-423.

[29] Li JY, Sidhu RS, Ford EJ. The induction of taxol production in the endophytic fungus Pericona sp from Torreya grandifolia. J Industrial Micro Biotech, 1998, 20 (5): 259-264.

[30] Li JY, Strobel G, Sidhu, et al. Endophytic taxol-producing fungi from baldcypress, Taxodium distichum. Microbiol, 1996, 142 (8): 2223-2226.

[31] Zhou DP, Ping WX, Sun JQ, et al. Isolation of taxol producing fungi. Microbio, 2001, 21 (1): 18-20.

[32] Zhou DP, Sun JQ, Yu HY, et al. Nodulisporium, agenus new to China. Mycosystema, 2001, 20 (2): 148-149.

[33] Li GL, WangJF, Huang YJ, et al. Screening of endophytic fungi with antitumor activities. Mycosystema, 2001, 20 (3): 387-391.

[34] Wang JF, Lv HY, Huang YJ, et al. A Taxol-producing endophytic fungus isolated from Taxus-mairei and it's antitumor activity. Xiamen Univ, Nat Sci, 1999, 38 (4): 485-487.

[35] Wang W, He XL, Zhong YC. Isoiation of endophytic fungi from Taxus chinensis. varmairei and preliminary identification of taxane products. Zhongshan Univ, Nat Sci Ed, 1999, 38 (3): 116-118.

[36] Strobel G, Yang XS, Sars J, et al. Taxol from Pestalotiopsismicrospora, an endophytic fungus of Taxus wallachiana. Microbiol, 1996, 142: 435-440.

[37] 邱德有，黄美娟，方晓华. 一种云南红豆杉内生真菌的分离. 真菌学报，1994，13 (4)：314-316.

[38] 马天有，董兆麟. 从植物分离产紫杉醇的内生真菌的研究. 西北大学学报（自然科学版），1999，29 (1)：47-49.

[39] 王伟，贺雄雷，钟英长. 南方红豆杉内生真菌及紫杉烷类产物的初步鉴定. 中山大学学报（自然科学版），1999，38 (3)：116-118.

[40] 王建峰，吕华鹰，黄耀坚等. 一株新的紫杉醇产生菌及其抗肿瘤活性. 厦门大学学报（自然科学版），1999，38 (4)：485-487.

[41] 万波，李安明，王晓力. 一株产紫杉醇真菌的分离. 中国科学（C辑），2001，31 (3)：271-274.

[42] 周东坡，平文祥，孙剑秋等. 紫杉醇产生菌分离的研究. 微生物学杂志，2001，21 (1)：18，219，32.

[43] 刘晓兰，周东坡，孙剑秋等. 树状多节孢发酵生产紫杉醇工艺条件的初步研究. 菌物系统，2002，21 (2)：246-251.

[44] 陈毅坚，张灼，王艳等. 云南红豆杉内生真菌中产紫杉醇的筛选. 生物技术，2003，13 (2)：10-11.

[45] Parr AJ, Peerless ACJ, Hamill JD, et al. Alkaloid Production by transformed root cultures of Catharanthus roseus. Plant Cell Rep, 1988, (7): 309.

[46] 刘展眉，崔英德. Ri质粒诱导喜树毛状根培养基中喜树碱的研究. 生态环境，2007，16 (4)：1266-1270.

[47] Guillon S, Tremouillaux-Guiller, J Pati, et al. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects Commentary. Current Opinion in Plant Biology, 2006, (9): 341-346.

[48] 陶均. 发根农杆菌对蓝猪耳的遗传转化及其毛状根再生植株的初步研究. 广州：华南师范大学，2004.

[49] Jorn Piel. Metabolites from symbiotic bacteria. Nat. Prod. Rep, 2009, (26): 338-362.

第2章 微生物转化技术在药物研究中的应用

2.1 微生物转化药物的基本概念

2.1.1 微生物转化药物的概念

微生物转化又称微生物催化，是指利用微生物细胞对天然化合物或有机化合物的某一特定部位进行修饰和改造，使其转化成结构类似但具有更高活性和价值的新化合物，是一类由微生物参与的化学变化，其本质是利用微生物在代谢过程中产生的酶（胞内或胞外酶）对外源底物进行的催化反应。

狭义的微生物转化仅指利用微生物细胞对底物进行修饰，从而产生新化合物的过程，不包括以单一基质为底物进行的微生物合成和将有机或无机高分子化合物降解为小分子化合物的微生物降解过程。广义的微生物转化泛指微生物在代谢过程中对一切物质的修饰和改造过程。鉴于大多数天然活性成分为分子结构复杂的有机化合物，将生物转化和生物催化技术引入创新药物的研究中，从药物设计、资源开发到新天然活性先导化合物的发现与筛选等各环节，开发新型药物原料资源，具有重要的理论意义和实用价值。

2.2 微生物转化药物的原理和技术方法

2.2.1 微生物转化药物的原理

微生物转化是利用微生物细胞或其代谢过程中产生的胞内或胞外酶将一种无效或低效的化合物转化为有效或高效的化合物，来满足常规的化学方法所难以实现的化学反应，其本质是用酶催化的一种特殊的化学反应。微生物转化反应几乎包括了

所有的有机化学反应类型，如氧化反应、还原反应、水解反应、缩合反应、胺化反应、酰基化反应、脱羧反应和脱水反应等，其中氧化反应最为常见，可分为单一氧化反应、羟基化、环氧化、脱氢、氮-杂基团的氧化和硫-杂基团的氧化等。

微生物转化有多种分类方法，分类方法不同，其转化原理也不相同。其中药物微生物转化的分类方法就多种多样，按照转化的研究对象不同可分为甾体类、黄酮类、三萜类、萜内酯类、糖苷类、皂苷类等的微生物转化；按照转化目的的不同又可分为开发新药，改善药物有效成分的水溶性或稳定性，降低毒副作用，提高药品的附加值，研究药物在体内的代谢机制等。本文根据第一种分类方法，对药物微生物转化的原理进行了详细的阐述。

2.2.1.1 甾体类药物的微生物转化

微生物对甾体类化合物进行转化的反应类型是多种多样的，几乎对甾体母核的每一处位置的原子或基团进行转化。其中对甾体类药物生产的转化主要分为两类：①将天然原料转化为生产甾体化合物的普通中间体，如植物皂苷羟化生成皂角苷配基及降解甾醇边链生成有用的甾体化合物中间体，如雄甾-4-烯-3,17-二酮（AD）及雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮（4AD）；②转化成特殊甾体化合物中间体，以生产所希望得到的产物，如甾体 11α、11β 及 16α 羟化、Δ^1 脱氢及甾体边链降解。涉及的反应类型见表 2.2-1，包括的反应主要有氧化、还原、酯化、水解、酰化、异构化、重排及边链降解等，具体实例见表 2.2-2 所示[1]。

表 2.2-1 甾体化合物的微生物转化反应类型

氧化反应	还原反应
(1)羟基化	(1)还原酮到醇
①甾体母核和甲基位置羟基化	(2)还原醛到醇
②边链上羟基化	(3)还原氢过氧化物到醇
(2)醇基氧化	(4)还原烯醇到伯醇
①氧化饱和链上醇基至酮基	(5)双键饱和
②氧化丙烯基或高丙烯基至 α,β-不饱和酮	①还原 $\Delta^{1,4}$-3-酮到 Δ^4-3-酮
(3)环氧化	②还原 Δ^4-3-酮到饱和 3-酮
(4)碳-碳键的裂开	③$\Delta^{4,6}$-3-酮到 Δ^4-3-酮
①氧的插入形成酯、醇、酮、内酯和酸	④$\Delta^{1,6}$-20-酮到饱和 20-酮
②逆醛醇缩合反应	⑤脱羟基
③碳链裂开产生非官能团化的产物	**异构化反应**
(5)双键的导入反应	(1)Δ^5-3-酮异构化成 Δ^4-3-酮
①饱和 3-酮和 Δ^4-3-酮甾体的 1 位脱氢	(2)D-环化
②饱和 3-酮和 Δ'-3-酮甾体的 4 位脱氢	(3)酮重排
③A 环芳香化、1-脱氢	(4)醇差向异构
④$\Delta^{1(10)5}$-3β-甾醇的芳香化	(5)5α,8α-表二氢化合物重排到桥氧醇
⑤羟基、酯或过氧化合物的消除	**缩合反应**
(6)过氧化反应	(1)羟基乙酰化
①5,7-双烯间形成 5,8-表二氢化合物	(2)糖苷化
②氢化、氧化	(3)酚醚形成
(7)杂原子氧化	(4)胺的乙酰化
①氧化硫醚到亚砜	(5)甾体生物碱与碳酸结合
②胺被氧化到酮	

续表

水解反应	①烯醇醚开裂为酮
(1)酯化	②酚醚开裂为酚
①碳酸酯	③苷开裂为醇
②内酯	**引入杂原子反应**
③硫酸酯	(1)氮：由21位醇基甾体形成21-乙酰胺甾体
(2)醚开裂	(2)卤素：卤化氢化酶催化导入卤素

表2.2-2　工业上重要的甾体生物转化反应[1]

反应类型	反应底物→产物	微　生　物
11α-羟基化	黄体酮→11α-羟基黄体酮	黑根霉
11β-羟基化	化合物S或其醋酸酯→氢化可的松	新月弯孢霉 蓝色犁头霉
16α-羟基化	9α-氟氢可的松→9α-氟-16α-羟基氢化可的松	玫瑰产色链霉菌
C_{19}-羟基化	化合物S→19羟甲基化合物S	球墨孢霉、芝麻丝核菌
$C_{1,2}$脱氢	氢化可的松→氢化泼尼松	简单节杆菌
A环芳构化	19-去甲基睾丸素→雌二醇	睾丸素假单胞杆菌
水解反应	21-醋酸妊娠醇酮→去氧皮质醇	中毛棒杆菌
边链降解	胆甾醇→雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮	分枝杆菌

(1) 羟化反应　羟化反应是利用微生物转化甾体药物的重要反应之一，许多甾体药物的合成都需要羟化反应的参与。传统的化学方法除了在C_{17}引入羟基化比较容易外，其余位置都很难。而微生物几乎对碳骨架上的每一位置都能进行羟化反应，且具有很高的空间特异性和产物特异性。最早应用于工业生产的羟化反应就是利用黑根霉转化黄体酮生成11α-羟基黄体酮，从而使甾体类药物被广泛使用。现在微生物转化不仅能实现甾体母核任意一处位置的羟基化，还能实现个别位置的双羟基化甚至多羟基化，如6β-、11α-、12β-、15α-的双羟基化。在甾体微生物羟化反应中，11α、11β和16α羟化反应因其能产生皮质甾类化合物及其类似物，因而受到较多关注，并取得较大成果。

① 11α-的羟化。人和哺乳动物体内的酶均不能将甾体$C_{11}\alpha$-进行羟化，因此甾体的$C_{11}\alpha$-羟化是微生物专有转化反应[2]。由于微生物能将甾体的$C_{11}\alpha$-羟化，不仅解决了药物合成中的难题，而且提高了激素类药物的活性，其中利用黑根霉使孕酮发生$C_{11}\alpha$-羟基化作用生产羟基甾类化合物是一个很好的实例。用于进行甾体$C_{11}\alpha$-羟基化的主要有黑根酶（*Rhizopus stolonifer* Vuill.）、赭曲霉（*Aspergillus ochraceus* Wilh.）以及黄曲霉（*Aspergillus flavus* Ling）、绿僵菌［*Metarrhizium anisopliae*（Metschn.）Sor.］、放线菌、棒状杆菌和诺卡菌等；对孕酮等甾体化合物也可进行$C_{11}\alpha$-羟化，但同时还可形成另一种降解反应，例如，将甾体母核进行降解[3]。

② 11β-的羟化。很多激素类药物之所以有很强的抗炎作用，主要是在甾体母

核的 $C_{11}\beta$-位引入羟基的缘故。最典型的生产实例就是氢化可的松（11β，17α，21-三羟基孕甾-4 烯-3,20-二酮），表 2.2-3 中列举了多种具有 $C_{11}\beta$-羟基化能力的微生物，其中以霉菌居多。目前工业上应用的微生物只有两种，一种是新月弯孢霉，另一种是蓝色犁头霉。新月弯孢霉属于半知菌类，丛梗孢目，暗梗孢科，多孢亚科，弯孢霉属。新月弯孢霉的羟化酶专一性较强，转化率高，副产物少，菌种易于改造。而蓝色犁头霉属于真菌门，藻状菌纲，毛霉目，毛霉科，犁头霉属。蓝色犁头霉生长繁殖速度快，生产周期短，投料浓度高，但酶的专一性较差，副产物多，菌种不易于改造。

表 2.2-3　具有 $C_{11}\beta$-羟基化作用的微生物菌种

属名	种　名	属名	种　名
假单胞杆菌	假单胞杆菌	犁头霉	蓝色犁头霉、淡紫犁头霉
链霉菌	费式链霉菌	弯孢霉	新月弯孢霉、镰刀弯孢霉
薄膜菌	丝状薄膜菌		短刺弯孢霉、瘤座弯孢霉
聚端孢霉	粉红聚端孢霉		不正弯孢霉、膝曲弯孢霉
葡萄孢霉	灰葡萄孢霉	小克银汉菌	布氏小克银汉霉、班氏小克银汉霉
伏革菌	屋木伏革菌		雅致小克银汉霉、刺孢小克银汉霉
		丝核菌	佐佐木丝核菌

（2）脱氢反应　甾体化合物是一类含有环戊烷多氢菲核的化合物，结构式如图 2.2-1 所示。微生物能在母核的 1,2 位、4,5 位、7,8 位、9,11 位等实现脱氢反应，其中以 1,2 位的脱氢反应最为重要。因为 1,2 位的脱氢反应是形成甾体先导化合物雄甾-4-烯-3,17-二酮和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮（ADD）的必要反应，雄甾-4-烯-3,17-二酮和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮的结构如图 2.2-2 所示。同时母核 1,2 位引入双键后能使载体激素类药物的抗炎活性显著提高。如醋酸可的松 1,2 位上导入双键后成醋酸脱氢可的松，抗炎作用提高 3～4 倍。应用微生物在 1,2 位上的脱氢反应实现了甾体药物的发酵法生产，其中以糖皮质激素居多，包括氢化泼尼松、甲泼尼龙、曲安西龙、地塞米松、倍他米松、帕拉米松、氟轻松、氟可龙等。

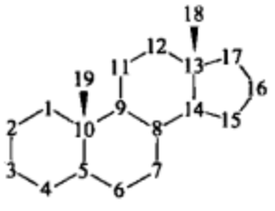


图 2.2-1　甾体化合物骨架结构

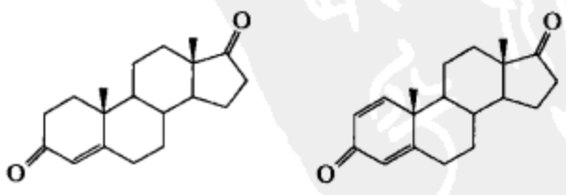


图 2.2-2　甾体药物重要中间体雄甾-4-烯-3,17-二酮（左）和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮（右）的结构式

① $C_{1,2}$脱氢反应的机制。微生物在甾体母核 $C_{1,2}$脱氢的反应机制，早期的研究发现在母核 C_1 或 C_2 的位置上存在羟基，故有这种先形成含羟基的中间体再脱水引入双键的理论。1959 年，Levy 的研究却推翻了这种理论，他通过比较雄甾烷假

单胞菌（*Pseudomonas cunninghamiae* Li et A1）产生的酶对 Δ^4-3-酮甾体和 1-羟基-Δ^4-3-酮类甾体的 $C_{1,2}$ 位脱氢反应认为，微生物是直接脱去 1,2 位氢[4]。1963 年，Ringold 等进一步研究芽孢杆菌对 Δ^4-3-酮甾体 $C_{1,2}$ 脱氢，他认为 $C_{1,2}$ 脱氢是 1α,2β 位氢原子的反式消除，其可能的过程见图 2.2-3[5]所示。

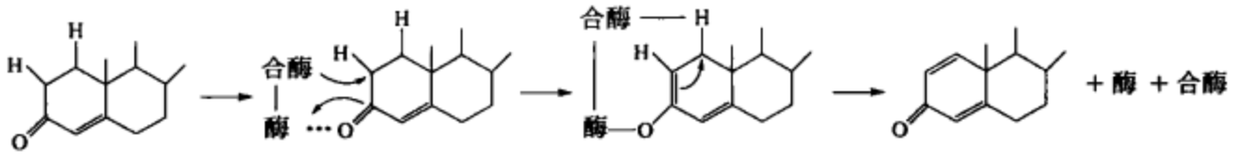


图 2.2-3　芽孢杆菌对 Δ^4-3-酮甾体 $C_{1,2}$ 脱氢

如图 2.2-4 所示，1992 年，Itagaki E 等发现诺卡菌产生的 $C_{1,2}$ 脱氢酶在催化甾体 $C_{1,2}$ 脱氢反应时，要求底物在 3 位上含有酮基。该酶在无氧条件下，可以催化从 3-酮-4-烯甾体到 3-酮-1,4-二烯甾体的转氢反应，并提出了甾体 $C_{1,2}$ 脱氢酶的催化机制。认为甾体 3 位上的酮基与酶的亲电残基发生强烈的相互作用，造成了 $C_2(\beta)$ 氢键的断裂，随后蛋白质中的碱基将这个氢原子以质子形式转移到亲核残基上。此后底物变成了一个负碳离子，而 $C_1(\alpha)$ 氢原子同时断裂形成了一个氢阴离子，最后形成 3-酮-1,4-二烯甾体[6]。

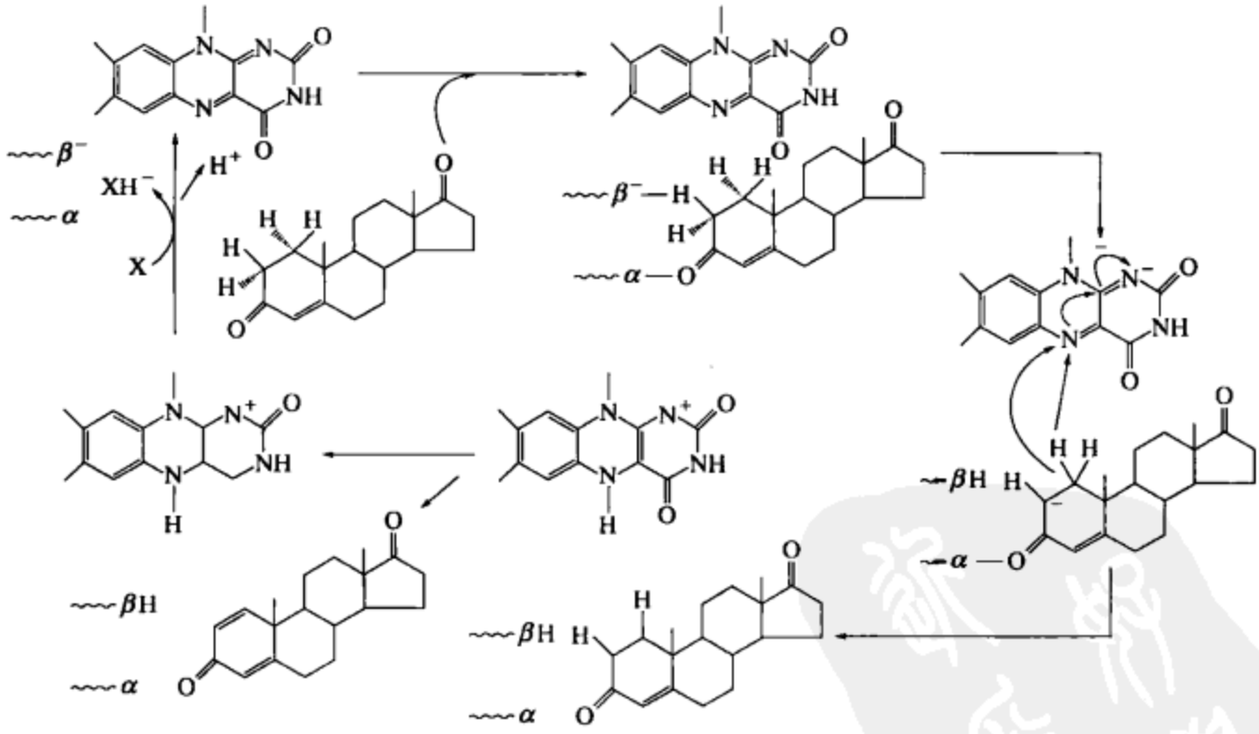


图 2.2-4　甾体 $C_{1,2}$ 脱氢酶的催化机理

② 具有 $C_{1,2}$ 脱氢能力的微生物。具有在甾体母核 A 环上脱氢能力的微生物主要有节杆菌属［*Arthrobacter globiformis*（Conn）conn&Dimmick］、棒状杆菌属（*Corymebacterium* sp.()kumara）、假单胞菌属（*Pseudomonas flaorescens* Migula）、分枝杆菌属（*Mycobacterium fortuitum da* Costa Cruz）、芽孢杆菌属（*Bacillus cereus* Frankland）、诺卡菌属［*Nocardia corallina*（Bergey et al）Waksman&Henrici］等，其中用于 $C_{1,2}$ 脱氢的微生物主要列于表 2.2-4 中。

表 2.2-4 具有 $C_{1,2}$ 位脱氢作用的微生物

属名	种 名	属名	种 名
节杆菌	简单节杆菌、球形节杆菌	产碱杆菌	粪产碱杆菌
假单胞菌	荧光假单胞菌、睾酮假单胞菌 球针假单胞菌、德阿昆哈假单胞菌	游动放线菌	密苏里游动放线菌
芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌、缓慢芽孢杆菌 球形芽孢杆菌	诺卡菌	橘橙诺卡菌、光泽诺卡菌 珊瑚诺卡菌、胭脂诺卡菌 不透明诺卡菌 近缘腐败黏液菌
棒杆菌	简单棒杆菌、革分枝杆菌 耻垢分枝杆菌、红色分枝杆菌 胭脂分枝杆菌、偶发分枝杆菌		

(3) 甾体的微生物降解 微生物对甾体的降解通常包括两个方面：一方面是对甾体母核的降解；另一方面是对边链的降解。其中甾体边链的选择性降解是制备甾体药物的关键反应。

以前生产激素药物的主要原料是薯蓣皂素，其他的天然甾醇因为 C_{17} 侧链的饱和性，利用化学手段难以降解，长期以来被当作废物处理。由于甾体药物工业对薯蓣皂素的需求日增，薯蓣资源日渐枯竭，迫使人们研究新的转化途径来合理地利用这些廉价的天然资源。微生物转化能选择性地对边链降解，以此来获得甾体药物的先导化合物雄甾-4-烯-3,17-二酮及雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮，以这些先导化合物为原料可生产各种甾体药物。目前生产用量较大的有利尿药物螺内酯及计划生育药物炔诺酮、苯丙酸诺龙米、非司酮等。雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮是合成 19-去甲甾体系列雌激素，如雌酮 (Estrone)、炔诺酮 (Norethisterone) 的重要前体物。

① 降解的机制。甾体的降解包括两方面，即边链的降解和母核的降解，边链的降解起始于 C_{27} 位的羟化，随后进行类似于 β 氧化的过程，依次脱去丙酸及乙酸生成 C_{17} 酮甾体。甾体母核的降解一般起始于 9α 的羟化，随后 $C_{1,2}$ 脱氢致使 A 环芳构化，最终使 B 环开裂并进行降解。其降解过程见图 2.2-5 所示。

② 边链选择性降解的途径。微生物通过对天然甾醇边链的降解来获得甾体药物的先导化合物，然而获得的产物往往进行母核的降解，严重影响了产物的数量和质量。目前主要有以下几种方法来抑制母核的降解[7]。a. 采用基因工程手段构建专一性降解边链的工程菌进行边链的降解，如 Ranjit 等构建了一株含有质粒 pJL1 的菌株节杆菌 317TC，能对甾醇进行选择性边链降解，其过程见图 2.2-6 所示。b. 对已有菌株进行诱变育种以获得仅降解甾醇侧链的突变株，如 Marsheck 等将原始菌种进行诱变得到突变株分枝杆菌 NRRL2B3683，无需加入抑制剂便能有效产生雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮；进一步诱变得到分枝杆菌 NRRL2B3805，由于缺乏 $C_{1,2}$ 脱氢酶能有效产生雄甾-4-烯-3,17-二酮[8]，其过程见图 2.2-7 所示。c. 对甾体母核进行结构改造以抑制酶对其的降解或者直接抑制降解母核的酶，如 Sih 和 Wang 将胆固醇先改造成 19-羟基衍生物，再利用微生物转化，一步就可获得 A 环芳香化的雌酚酮[9]；Wix 等以 8-羟基喹啉为抑制剂应用多种分枝杆菌成功地对胆固醇进行选择性边链降解[10]。d. 与此同时，随着对 P450 酶系的深入研究，采用

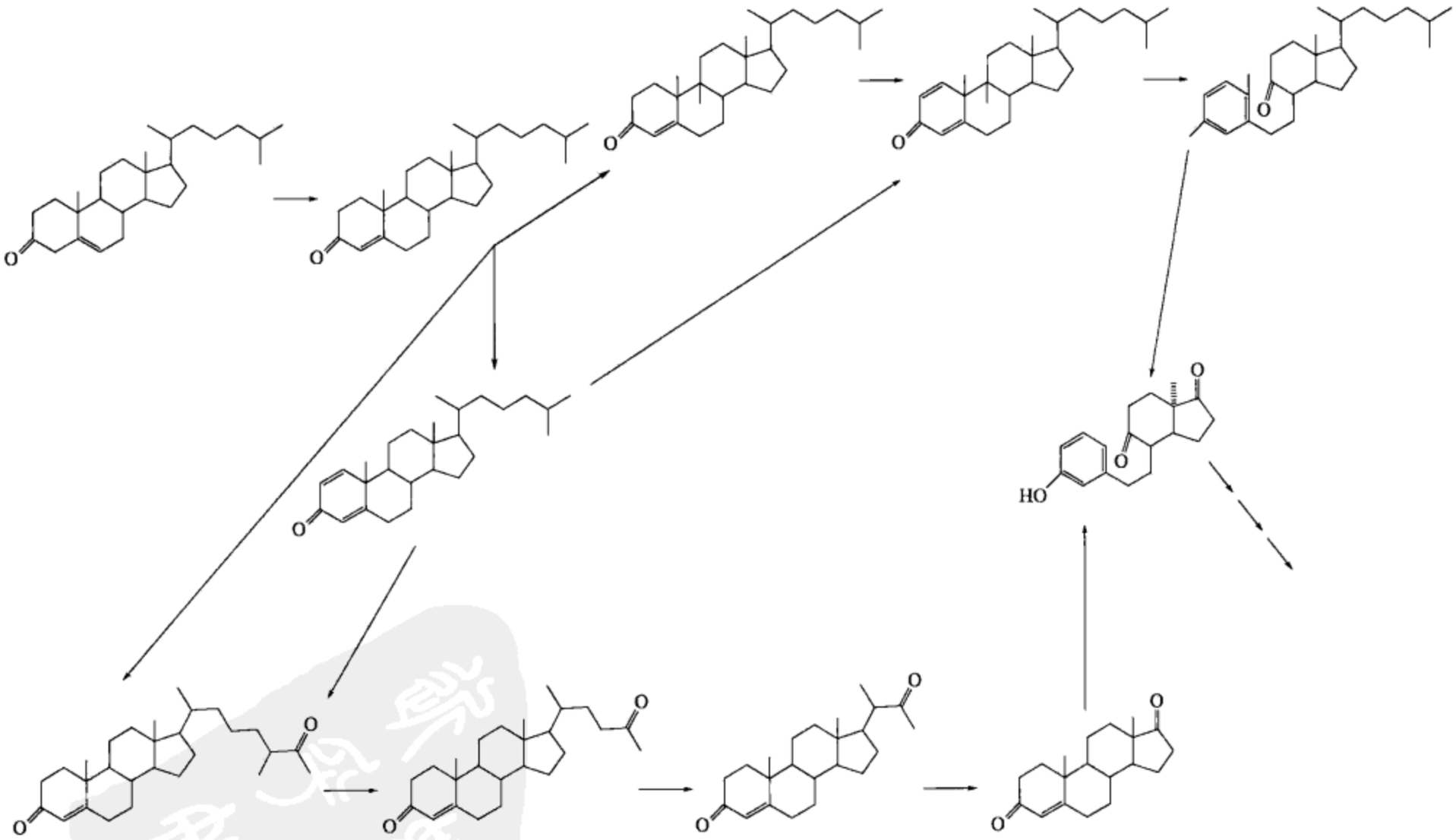
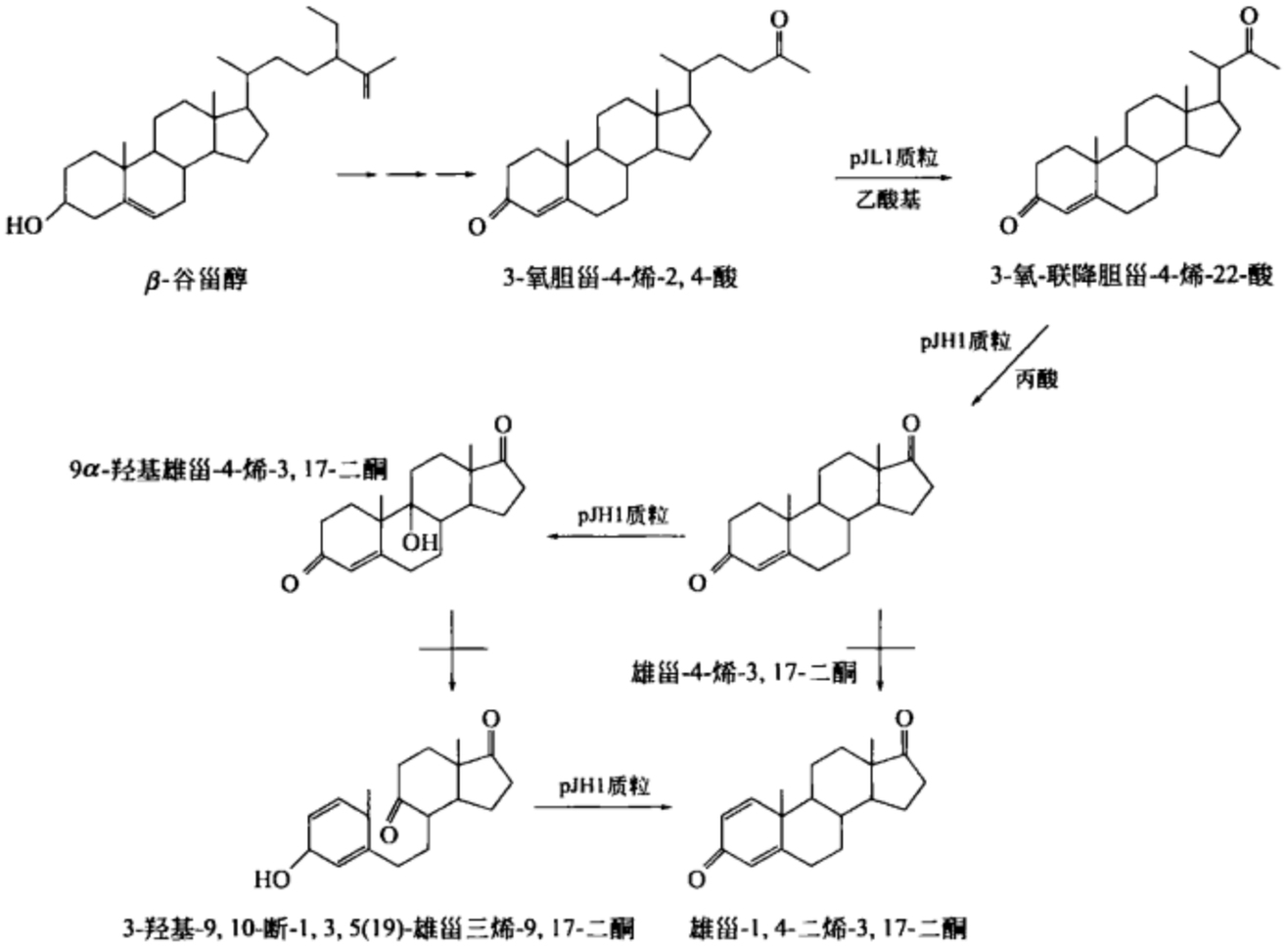


图 2.2-5　甾醇降解的一般途径



β-谷甾醇　3-氧胆甾-4-烯-2, 4-酸　3-氧-联降胆甾-4-烯-22-酸

3-羟基-9, 10-断-1, 3, 5(19)-雄甾三烯-9, 17-二酮　雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮

图 2.2-6　节杆菌 317TC 对 β-谷甾醇的选择性边链降解（ |→表示代谢阻断）

基因工程手段，可以直接构建产生甾体药物的工程菌。

如 Duport 等人[11]将合成麦角甾醇的关键酶 ERGS 基因破坏，并转入了一个羟化酶 CYP11A1 基因，这样就使合成代谢沿着设计路线进行，产生了孕酮。在此基础上 Diane 等人[12]将另两个支路酶 ATF2 和 GCY1-YRP1 的基因破坏，导入了来源于哺乳动物的 P450 羟化酶 CYP17A、CYP21A、CYP11B1 基因，并使其高度表达，从而获得可以直接发酵产生可的松、氢化可的松、皮质酮、11-脱氧皮质酮的一系列工程菌。见图 2.2-8 所示。

（4）手性药物的微生物转化　手性药物以其高活性、低副作用而日益引起人们的注意，特别是美国 FDA 只批准光学纯的手性药物上市，各国更是加强了对手性药物市场的占领。目前微生物转化用于手性药物制备主要集中在手性拆分和不对称合成两个方面，具体涉及三类反应，即不对称还原反应、不对称水解及其逆反应和不对称环氧化反应。

① 不对称还原反应。微生物的不对称还原反应在手性药物合成中的应用主要表现在催化羰基合成单一光学活性的手性醇，手性醇是手性合成中的重要方面，同时它也是合成手性药物的关键中间体。生物催化羰基还原成手性醇是在醇脱氢酶和其他氧化还原酶作用下进行的，同时还需辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADH 或 NADPH）参与，反应过程见图 2.2-9 所示。反应由还原型辅酶

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸［NAD(P) H］提供氢，在氧化还原酶的作用下从R或S面进攻羰基，生成相应的单一对映体醇，同时辅酶被转化成氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸［NAD(P)$^+$］。最先用于不对称还原反应的微生物是面包酵母，随着研究的深入，如表2.2-5所示，发现许多微生物都具有不对称还原功能，包括面包酵母、木兰假丝酵母等[13~18]，且还原底物的范围越来越大。

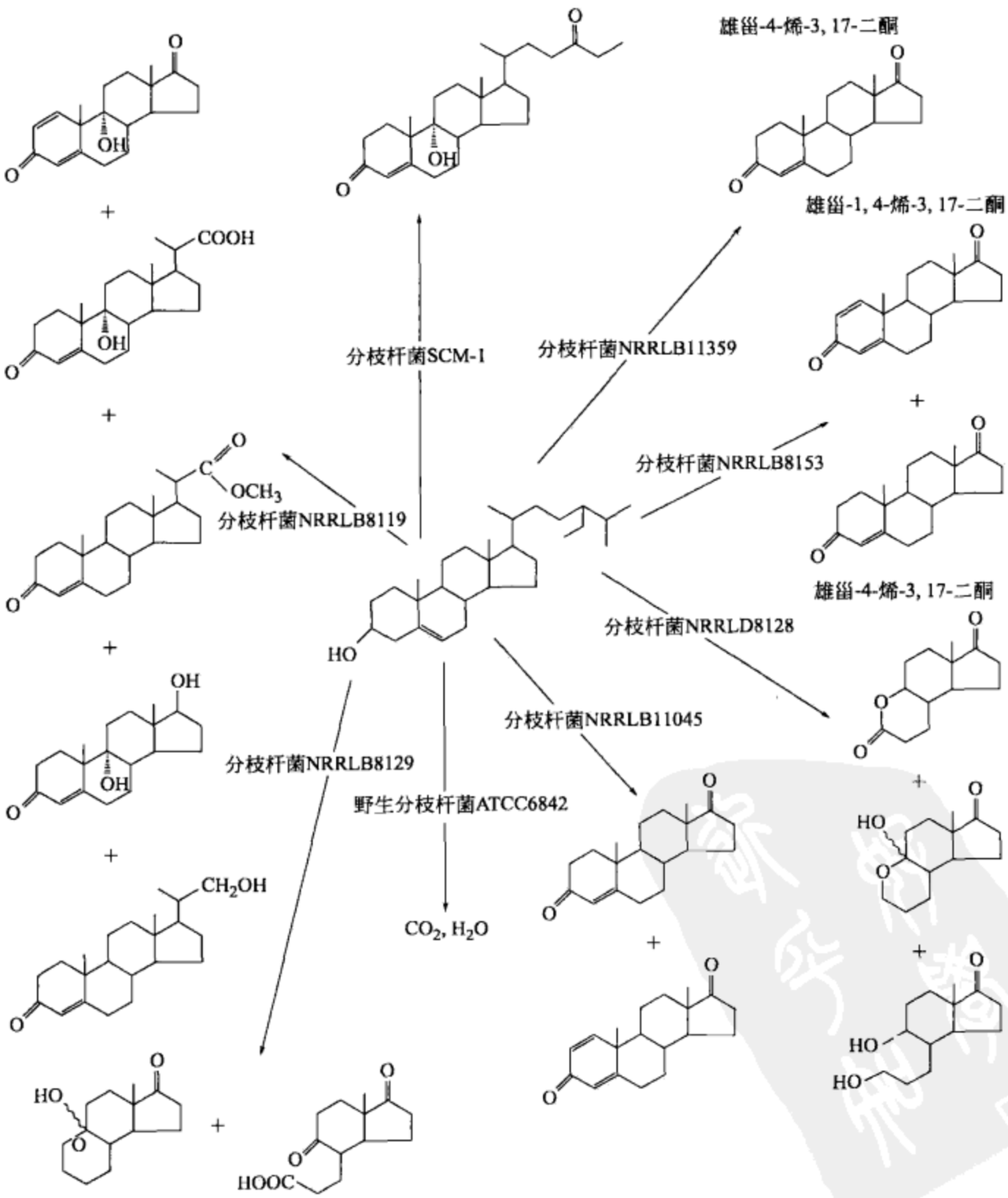


图2.2-7　分枝杆菌突变株转化β-谷甾醇所产生的各种甾体化合物

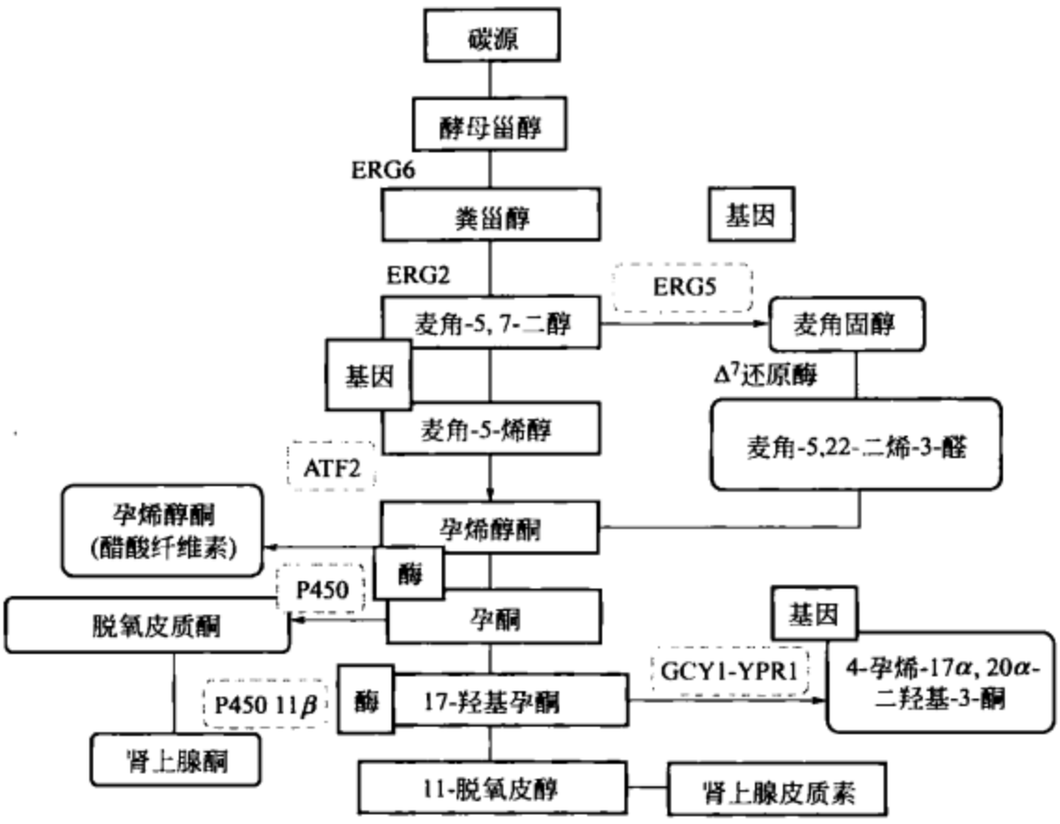
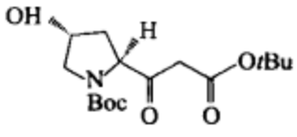
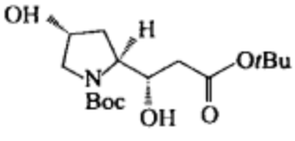
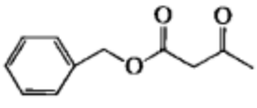
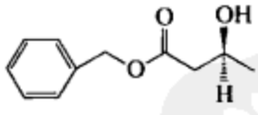
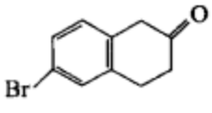
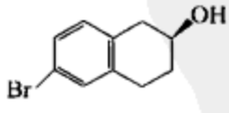
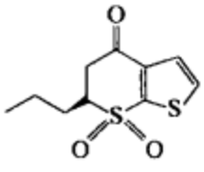
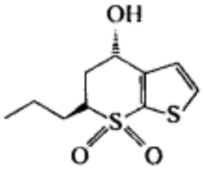
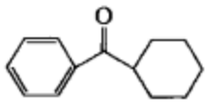
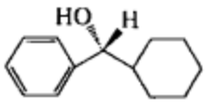
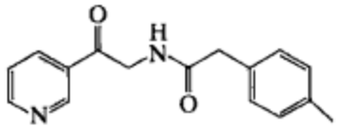
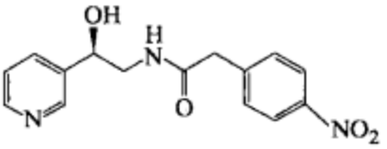
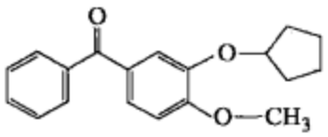
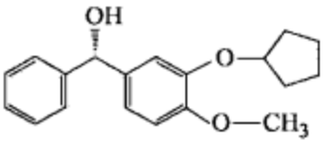
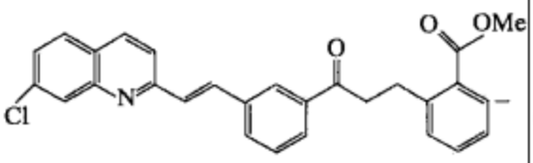
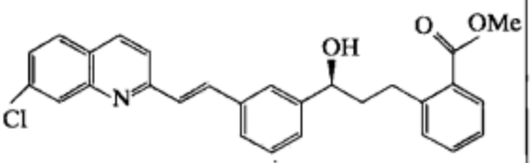
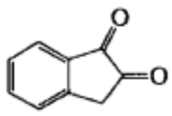
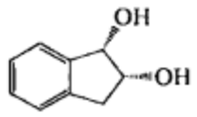
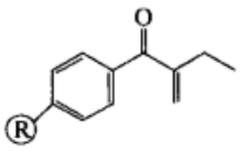
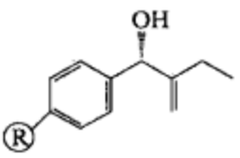
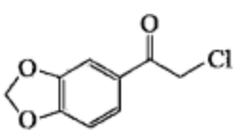
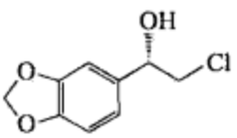
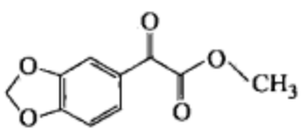
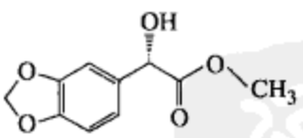
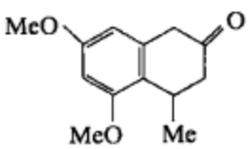
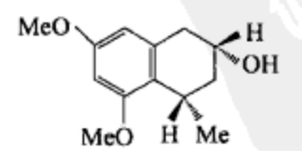
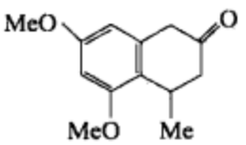
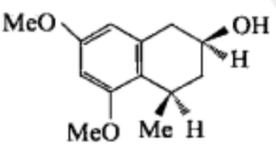
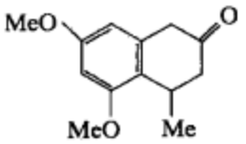
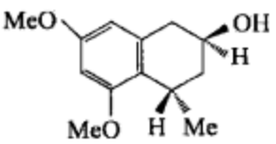


图 2.2-8　产生氢化可的松等的酵母工程菌构建示意图

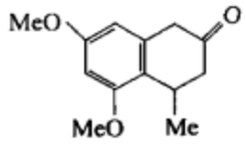
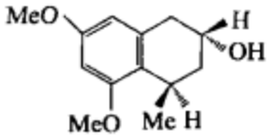
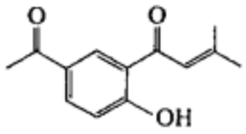
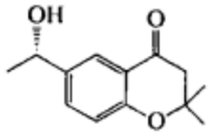
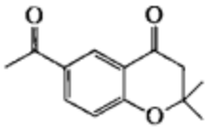
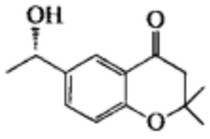
表 2.2-5　用于不对称还原的微生物

底物结构式	产物结构式	菌种	文献
		高山被孢霉 MF 5534	19
		念珠菌 MY 1831	20
		头状丝孢酵母 MY 1890	21
		深红酵母 MY 2169	22
		木兰假丝酵母 MY 1785	23

续表

底物结构式	产物结构式	菌种	文献
		酵母菌子囊菌 MY 1833	24
		涎沫假丝酵母 ATCC 32762	25
		分枝杆菌 MB 5614	26
		皮状丝孢酵母 MY 1506	27
		皮状丝孢酵母 MY 1506	27
		皮状丝孢酵母 MY 1506	27
		皮状丝孢酵母 MY 1506	27
		黑曲霉 IPV 283	28
		白僵菌 ATCC 7159	29
		枝状枝孢菌 IPV F167	30

续表

底物结构式	产物结构式	菌种	文献
		面包酵母	30
		甘蓝型油菜发状根	31
		甘蓝型油菜发状根	31

② 不对称水解。不对称水解反应主要是在水解酶的作用下进行的，特别是不需要辅酶的脂肪酶应用更广泛。不对称水解反应在药物研究领域应用最多的就是萘普生和布洛芬这两类药物。研究最多的微生物主要有芽孢杆菌、红酵母和皮状丝孢酵母等。张先等从土壤中筛选出的镰孢菌［*Fusarium proliferatum*（Mats.）Nirenberg］ECU2002 具有不对称水解能力，能立体选择性地对手性内酯进行水解。催化过程如下图 2.2-10 所示。

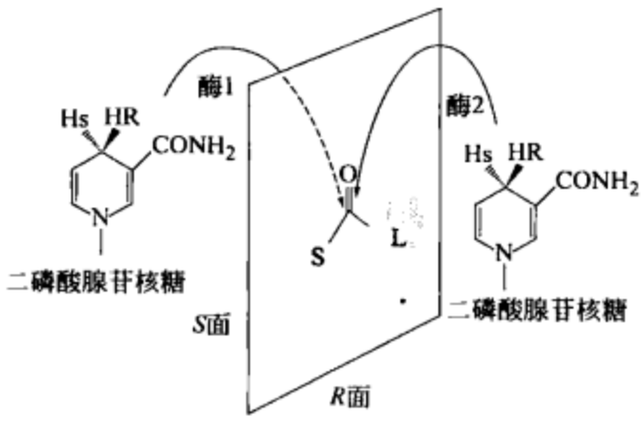


图 2.2-9　生物还原羰基模型图

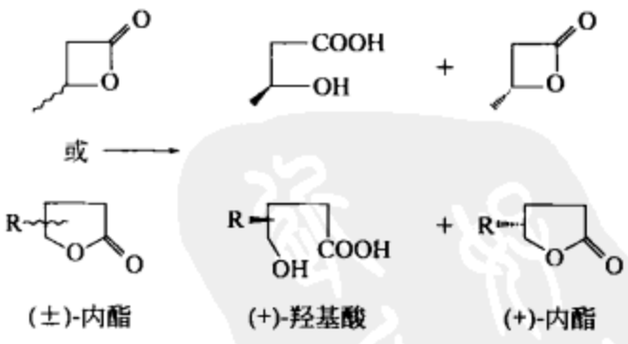


图 2.2-10　镰孢菌 ECU2002 对手性内酯的不对称水解

2.2.2　微生物转化药物的技术和方法

微生物转化的本质是酶催化的转化过程，酶促反应是在溶液中进行的，其中涉及两个动态过程：①底物从固相到液相的扩散过程即溶解过程；②酶从微生物体向反应体系的扩散过程即分泌过程。在这两个过程中，酶的浓度也是由两方面决定的，即酶的初始产量和酶透过细胞屏障向体系扩散的量。酶的初始产量往往是由微生物的生理特性所决定的，不宜进行调控，但是酶透过细胞屏障向体系扩散的量却

可以通过改变细胞膜的通透性来进行调控。酶促反应的另一个关键因素就是酶的活性，酶是一类具有空间结构的生物大分子，其活性往往因立体结构的微弱变化而失活。酶促反应的产物往往就是该酶的抑制剂，通过解除产物的抑制来保持酶活也是提高转化效率的必要措施。微生物转化是一个庞大的转化体系，不同的转化过程涉及不同的底物和微生物，改良生物转化体系的方法大体可以归纳为三类：增加底物溶解性，解除底物（产物）抑制，改变细胞膜（细胞壁）通透性。

2.2.2.1　增加底物溶解性

微生物对药物的转化效率，很大程度上受限于底物在转化体系的溶解度，因此采取有效措施提高底物的溶解度，使底物和微生物能良好的接触，就能提高产物的转化率，缩短转化时间，降低转化成本。

2.2.2.2　有机介质中的微生物转化

对于疏水性底物进行的微生物转化，如甾体类药物的转化，因其在水相中的溶解性极差，在水相反应体系中不能将酶进行充分饱和，因此转化率极低。相反，根据相似相溶原理，那些极性差的底物却在有机介质中有很好的溶解性，根据这个原理，很多学者进行了关于有机体系中微生物转化的研究，并取得了良好的效果。Buckland 等[32]用诺卡菌在有机介质（四氯化碳）中催化胆甾醇转化为胆甾烯酮。Wong 等[33]证明在巨大芽孢杆菌突变株中，一些有机溶剂可以明显增强其细胞色素 P450 酶的活性。周浩力等[34]将浓度为 0.035mol/L 的丙酮添加到转化体系中，使黑根霉转化底物 16α,17α-环氧孕甾酮生成 11α,16α,17α-环氧孕甾酮的转化率提高了 6.8%。姜邵通等[35]用分枝杆菌 BD-696 转化植物甾醇生产雄烯二酮，研究发现在有机相为大豆油，有机相所占比例为 22%，投料量为 4g/L 时，植物甾醇的转化率最高可达到 85.7%。

目前，常用的有机介质剂有乙醇、丙酮、*N*,*N*-二甲基甲酰胺、丙二醇等。有机介质中的微生物转化有望解决因底物的溶解性低而导致的底物相和酶相难以充分接触的难题，当前的任务是筛选出可耐受有机溶剂的具有特殊转化功能的微生物，虽然已经证实假单胞菌具有耐受有机溶剂的能力，但是距离真正意义上的工业化生产还有很长的一段路要走。

2.2.2.3　超临界流体技术

超临界流体指的是处于临界点以上温度和压力区域下的流体，在临界点附近，流体的密度、黏度、溶解度、热容量、介电常数等物理性质会发生急剧的变化，最初用于分离、纯化。由于外界环境的微小变化可引起溶解性能和传质性能的急剧变化，设想如果将其引入反应体系中，不仅解决了底物溶解性差的难题，同时还有利于产物的分离纯化，解除底物对酶的抑制，因此这项技术一直受到制药工业的高度关注。Marazban 等在超临界流体中进行了皱褶假丝酵母［*Candida rugosa*（Robin）Berkh］脂肪酶催化胆甾醇的研究，结果发现在超临界乙烷介质中，胆甾醇的溶解度提高了近 10 倍。

2.2.2.4 微乳化技术

微乳化技术是一种全新的技术，它是由Hoar和Schulman在1943年发现的，并于1959年将油-水-表面活性剂-助表面活性剂形成的均相体系正式定名为微乳液(microemulsion)。根据表面活性剂性质和微乳液组成的不同，微乳液可呈现为水包油和油包水两种类型。在反应体系中通常用水包油型的微乳液，因为水包油型的微乳液，油相均匀地分散在水相中，表面活性剂在水相中自动形成囊泡，亲水端暴露在外面，疏水端包裹在里面。于是，像甾体药物这样水溶性差的底物就被包进囊泡，进而提高了其在反应体系中的溶解性。Smith等[36]利用分枝杆菌对胆固醇进行氧化转化，在培养基中添加体积分数2%的吐温80（Tween 80）与胆固醇的乳浊液。结果表明，投加吐温80与胆固醇的乳浊液比投加仅用超声波处理的胆固醇悬浮液的转化时间缩短2～3天，前者仅需2～4天，而后者需要6～7天。

2.2.2.5 环糊精包埋技术

环糊精（Cyclodextrin，简称CD）是直链淀粉在由芽孢杆菌产生的环糊精葡萄糖基转移酶作用下生成的一系列环状低聚糖的总称，通常含有6～12个D-吡喃葡萄糖单元。其整体结构是一个外亲水内疏水的分子空腔，底物分子可以进入其中，形成超微囊状包结物，增强了溶解度和分散性，但不影响生物催化本身。CD能与底物形成嵌合物，从而增大底物的溶解度，以此来加快转化反应，是一种新型的转化增溶剂[37]。Hesselink等通过试验证明[38]，CD能显著增加分枝杆菌NRRL-B3683降解胆固醇、谷甾醇及Δ^4-胆甾烯酮边链生成雄甾-4-烯-3,17-二酮和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮的产率，而且不会影响细胞生长速度及细胞密度。Schlosser等[39]利用雷斯青霉菌（*Penicillium raistrickii* G. Smith）477对13-乙基雄烯二酮进行C15羟基化反应，加入β-CD比加入甲醇作增溶剂转化率提高了近50%。易奎星等[40]在新月弯孢霉AS3.4381转化生产氢化可的松中采用环糊精包埋技术使甾体底物浓度由2g/L提高至3g/L，发酵罐中氢化可的松收率为57.8%。Wang等[41]用简单节杆菌TCCC 11037对醋酸可的松进行催化生成醋酸波尼松，结果证实在45mg/ml羟丙基-β-环糊精的反应体系中，醋酸可的松和醋酸波尼松的溶解度分别是无羟丙基-β-环糊精反应体系的36.7倍和19.8倍，且也解除了代谢物抑制效应。

2.2.2.6 解除底物（产物）抑制

微生物转化的效率不仅受酶的浓度、酶被底物饱和情况的影响，还受到底物、产物对酶活性抑制的影响。几亿年的进化使得微生物处于非常合理的代谢循环，当环境中产物的量达到一定值，微生物会自行调控终止转化酶的代谢，以节约有限的资源来更好地适应周围的环境，即所谓的产物抑制效应。微生物转化的目的是为了得到大量的产物，所以必须采取有效的措施解除产物抑制效应。目前常用两相反应体系来解决这个问题，现在研究比较多比较热门的有双水相体系和浊点分相系统。

（1）双水相体系　双水相是由两种高聚物如聚乙二醇［PEG/葡聚糖（Dextran)］，或一种高聚物和一种盐溶液（如PEG/磷酸铵）组成，在特定的溶液浓度

下将形成互不相溶的两相。双水相最初用于分离纯化酶或其他生物大分子，近年来开始应用于微生物转化，为酶催化过程引入了一种全新的反应体系。双水相反应体系可以弥补底物溶解度小、解决产物产生抑制效应等问题。高聚物的增溶效应使得底物溶解度增大，转化的产物可以被迅速地转移到另一相中，因而可以解决产物抑制效应，所以近年来一直是新型反应体系研究的热点。Flygare 等[42]在双水相体系中利用分枝杆菌进行胆固醇侧链降解制备雄甾-4-烯-3,17-二酮和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮的研究。在由聚乙二醇（PEG）、葡聚糖或聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、葡聚糖组成的双水相体系中，分枝杆菌聚集在上层聚乙二醇相中，菌体活力较高，转化率高达 80%。王志龙等[43]用分枝杆菌 HCCB006 转化混合植物甾醇（45%β-谷甾醇，30%豆甾醇，25%菜油甾醇）生产雄甾-4-烯-3,17-二酮。在由 16%聚乙二醇 20000/4%葡聚糖 20000/8%OP（表面活性剂）组成的双水相反应体系中，在底物加量为 1%时，雄甾-1,4-烯-3,17-二酮的产量达到 2.858g/L。

（2）浊点分相系统　非离子表面活性剂溶液不同于离子型表面活性剂溶液的特征之一是，达到一定温度或有添加物存在的条件下，溶液自动分相形成表面活性剂浓度很小的稀相和富含表面活性剂的凝聚层相[43]（coacervate phase）。稀相表面活性剂的浓度高于或与临界胶束浓度一致，所以会形成胶束溶液。因为溶液分相时的温度称为浊点，故该系统称为浊点系统（cloud point system，CPS）。在浊点系统中，凝聚层相的表面活性剂对疏水性物质的增溶能力明显高于胶束溶液中的表面活性剂。

图 2.2-11 展示了浊点体系的工作原理[44]。一般来说，底物和产物有相似的理化性质，因此应具有非常相似的分配规律。由于凝聚层相的增溶能力强，底物储存在凝聚层相，并缓慢地向水相或两相界面释放，转化得到的产物被凝层相所吸收，而不会抑制水相中的菌体。因此，浊点系统既可以达到增溶底物的目的，又可解决底物和产物对转化反应的抑制，是一个非常具有开发前景的反应系统。国内的许多学者都对其进行了深入的研究。王志龙等[45~48]在浊点系统中用分枝杆菌转化胆固醇来生产雄甾-4-烯-3,17-二酮和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮，发现转化效率显著提高。并在浊点系统中用分枝杆菌的静息细胞来催化植物甾醇生产雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮，雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮的浓度达到了 12000mg/L。在此基础上，在浊点系统中水解青霉素来生产青霉烷酸，产品的浓度和产量有了明显的提高。与此同时，在非离子表面活性剂介导的浊点系统中进行了酿酒酵母转化苯乙酮来生产苯基乙醇的研究。研究表明，在浊点系统中，底物和产物的抑制效应明显降低，菌体的转化活力和辅因子的再生明显增强。

2.2.2.7　原生质体法[49]

原生质体是无细胞壁、只有细胞膜包裹的卵圆形的对渗透压敏感的细胞。由于无细胞壁，对物质的传质阻力大大降低。Sedlaczek 等[49]用雅致小克银汉霉（*Cunninghamella elegans* Lendn.）的原生质体转化化合物 11-脱氧皮质醇，在 8h 内，转化率比用等量完整菌丝体提高了 40 倍。王敏等[50]研究用新月弯孢霉原生质体进

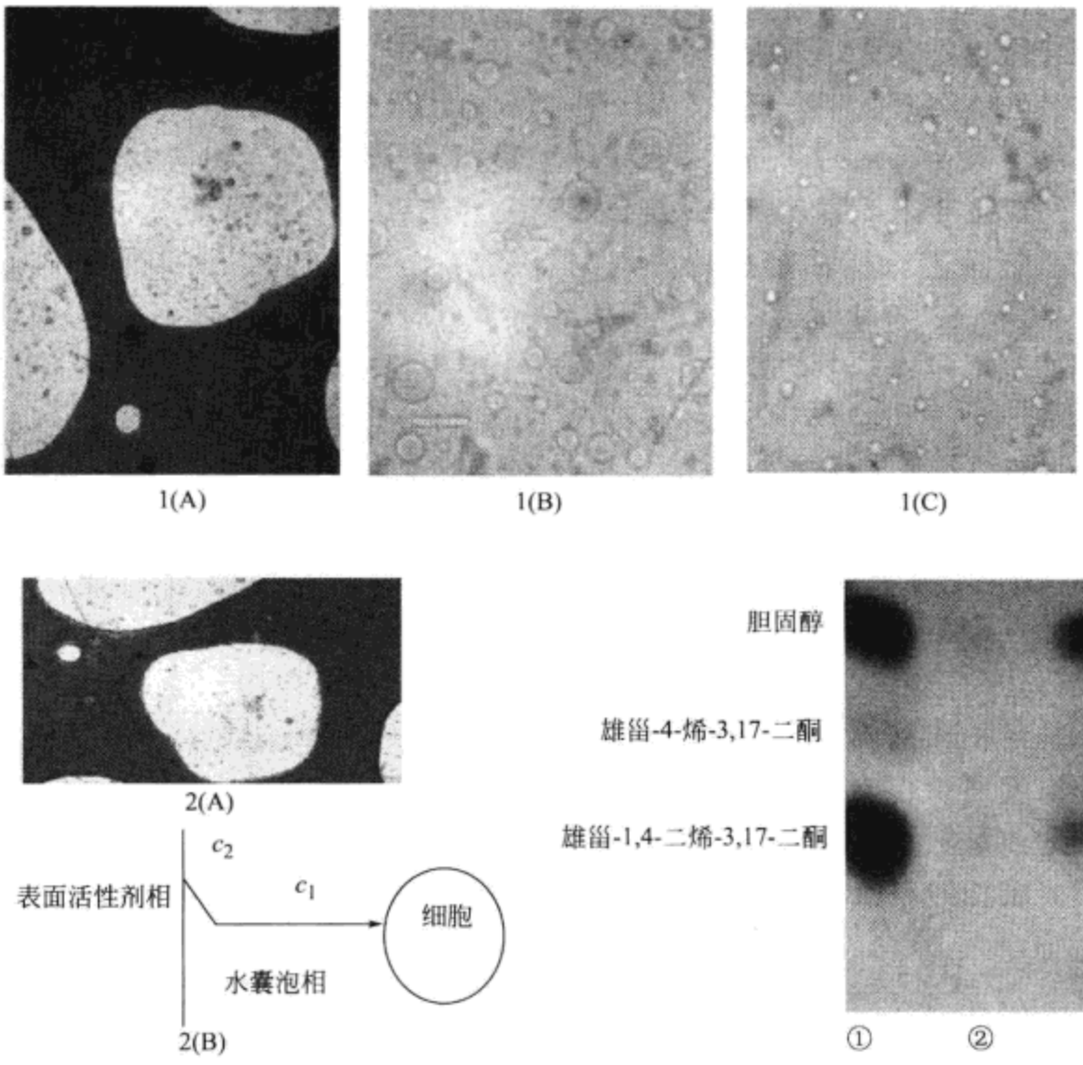


图 2.2-11 显微镜下的凝聚层相和稀相图，浊点系统中物质转运过程，底物和产物在浊点系统中的分布

1(A) 凝聚层相；1(B) 水相；1(C) 稀相；2(A) 浊点系统的显微照片；2(B) 浊点系统中物质转运的可能机制；①标准样品；②稀相；③凝聚层相

行的 11β-羟基化反应，试验表明，原生质体有较高的 11β-羟基化反应活性，与完整的菌丝体相比，转化速度明显提高（原生质体反应进行了 36h，而菌丝体反应进行了 48h）。

2.2.2.8 抑制剂法

细胞膜（壁）在合成过程中需要多种酶的参与，很多环节都可以用抑制剂来阻断其合成，从而达到改变细胞膜通透性的目的。如添加青霉素，因为青霉素的化学结构与组成细胞壁的糖肽 D-丙氨酸-D-丙氨酸（D-Ala-D-Ala）末端结构相似，青霉素取代了合成糖肽的底物与酶活性中心结合进入细胞壁，使五肽末端丙氨酸不能被转肽酶作用，甘氨酸桥一端无法与它前面的丙氨酸相连接，使交联不能形成，失去网状结构，导致细胞壁结构不完整，失去对细胞膜的保护作用。Sedlaczek 等[51]利用分枝杆菌对植物甾醇的边链进行降解试验，添加肽聚糖合成的抑制剂［如甘氨酸（15mg/ml）和万古霉素（150μg/ml）］能使细胞的转化活性提高近 3 倍。Ko-

rycka-Machala 等[52]发现，聚阳离子（例如鱼精蛋白、聚乙烯亚胺）也能增加疏水化合物对分枝杆菌细胞壁的渗透，发酵液中有鱼精蛋白存在时，β-谷甾醇的转化率提高了 3 倍。

2.3　微生物转化在药物研究中的应用

微生物细胞整体作为生物催化剂进行微生物转化与传统的化学合成相比有着多种优势，如具有高度的立体和区域选择性、反应温和条件易于控制、专一性强、反应周期短、转化率高等，它已成为医药研究发展最快的研究手段，特别是与现代的分离和筛选技术相结合，使其已经不单单局限于某些简单化合物的转化，而是广泛应用于天然化合物的生物合成，药物前体化合物的转化，生物催化的有机化合物不对称合成，光学活性化合物的拆分，活性成分筛选及新药开发、药物代谢研究等诸多领域。

2.3.1　微生物转化在药物前体和具有治疗作用的活性物质生产中的应用

众所周知，化学方法有种种弊端，如反应条件苛刻、区域和立体选择性差、反应过程消耗大、污染大等。不仅破坏了环境，还无形中造成了资源的浪费，而将微生物转化引入这一领域，无疑是对制药工业莫大的支持和鼓励。微生物利用生长过程中代谢出的胞内或胞外酶对某一化合物的特定部位进行修饰和改造，使其成为具有药理活性的物质，无论是从反应条件、专一性还是转化成本上都优于传统的化学方法，特别是微生物转化能解决目前化学方法所不能催化的反应。现在，微生物转化法已经成功地应用在诸如甾体类、皂苷类、黄酮类、萜内酯类药物的研究中，下面将对近 30 年来微生物转化在药物研制领域的一些应用进行介绍。

2.3.2　微生物转化在甾体类药物研究中的应用

甾体类化合物（steroids）又称类固醇，是一类含有环戊烷多氢菲核（C17）的化合物，结构通式见图 2.3-1 所示。它是由三个六元环和一个五元环组成，分别称为 A、B、C 和 D 环。一般在母核的 C_{10} 和 C_{13} 位上有甲基，C_3、C_{11} 及 C_{17} 位上可能有羟基或酮基，A 环及 B 环中可能有双键，C_{17} 有长短不同的侧链。目前，涉及甾体药物的微生物转化反应主要有 $C_{11}\alpha$ 羟基化、$C_{11}\beta$ 羟基化及 $C_{16}\alpha'$-羟基化、A 环的 $C_{1,2}$ 位及 $C_{4,5}$ 位脱氢、A 环的芳构化、C_3-OH 的脱氢以及甾醇的边链切除等。甾体药物的研究主要包括两个方面，其中研究最多的是以边链的选择性降解为特征的先导化合物的合成。如图 2.3-2 所示，4-雄烯二酮（化学名称：雄-4 烯-3、17-二酮，简称 4AD）、1,4-雄烯二酮（化学名称：雄-1,4-二烯-3,17-二酮，英文简称 ADD）是甾体药物中两个最关键的先导化合物，雄烯二酮是生产激素类原料药的重要中间体，可以说几乎所有甾体激素药物都可以以雄烯二酮为起始原料进行生

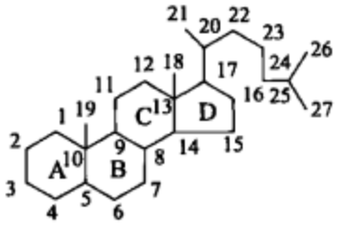


图 2.3-1　甾体化合物母核的基本结构

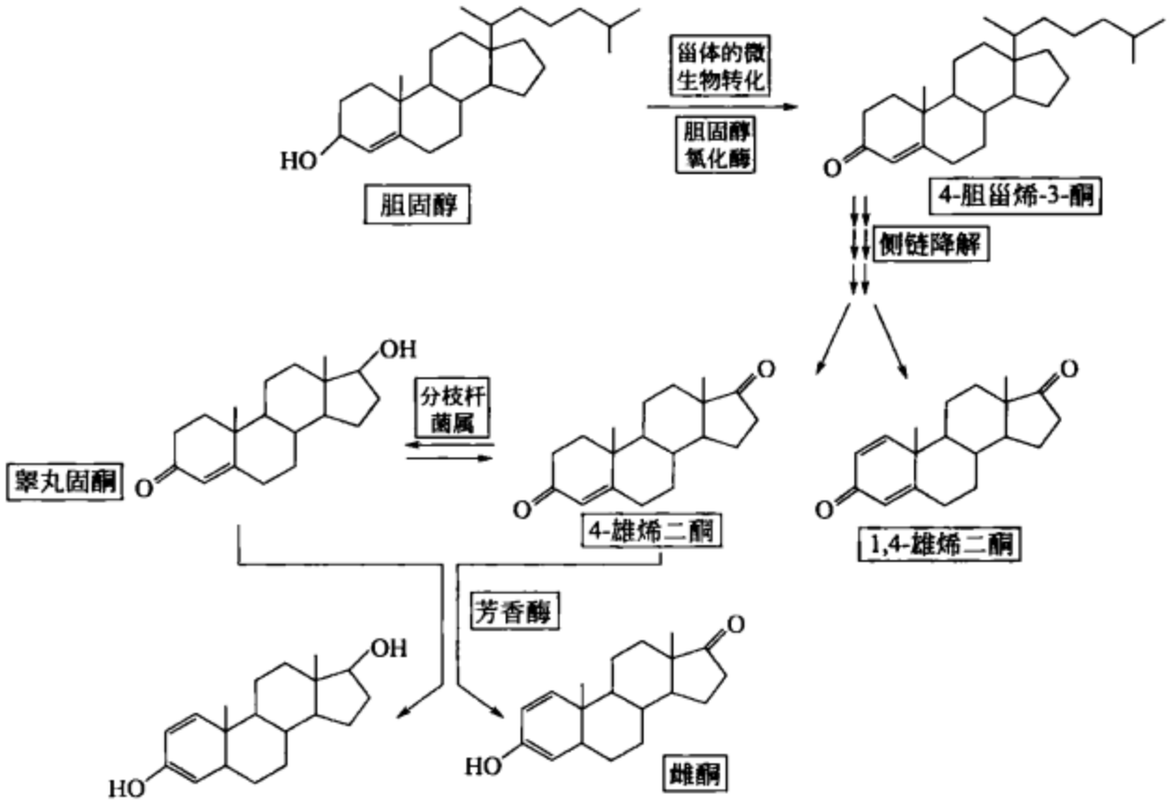


图 2.3-2　微生物转化法生产雄烯二酮的流程图

产，如可用于生产皮质激素、性激素、孕激素及蛋白同化激素，还可用于合成可的松、泼尼松、黄体酮、雌烯醇、地塞米松等 100 余种药物。用于生产 4-雄烯二酮和 1,4-雄烯二酮的原料主要有甾体皂素和甾醇，甾体皂素主要有薯芋皂素、剑麻皂素和番麻皂素 3 种，甾醇类主要是胆固醇、谷甾醇和豆甾醇，其生产过程见图 2.3-3 所示。甾体药物研究的第二个方面就是先导化合物的修饰，主要是 $C_{11}\alpha$-羟基化、$C_{11}\beta$-羟基化、$C_{16}\alpha'$-羟基化、C'_{19}-羟基化、Δ^1 脱氢及边链的降解。图 2.3-4 所示为微生物转化进行甾体药物开发的一般途径。其中 C_{11}、C_{16} 位的氧化是比较困难的，而天然化合物中缺乏这样的药物中间体，微生物转化的方法应用到甾体先导化合物的修饰从而进行甾体药物的生产，极大地推动了甾体药物的工业化生产。例如，黑根霉对黄体酮 $C_{11}\alpha$-羟基化从而产生 11α-OH 黄体酮，玫瑰产色链霉菌［*Strtomyces roseochromoenus*（Duche）Waksman］对 9α-氟氢可的松的 C_{16} 羟基化从而产生活性更高的 9α-氟-16-羟化可的松。微生物转化在甾体类药物研究中发挥着举足轻重的作用，已经成功转化的药物有上百种，如可的松、氢化可的松、泼尼松、氟轻松、地塞米松和倍他米松、孕酮、雌酮、睾酮和炔诺酮等。在治疗风湿关节炎、红斑狼

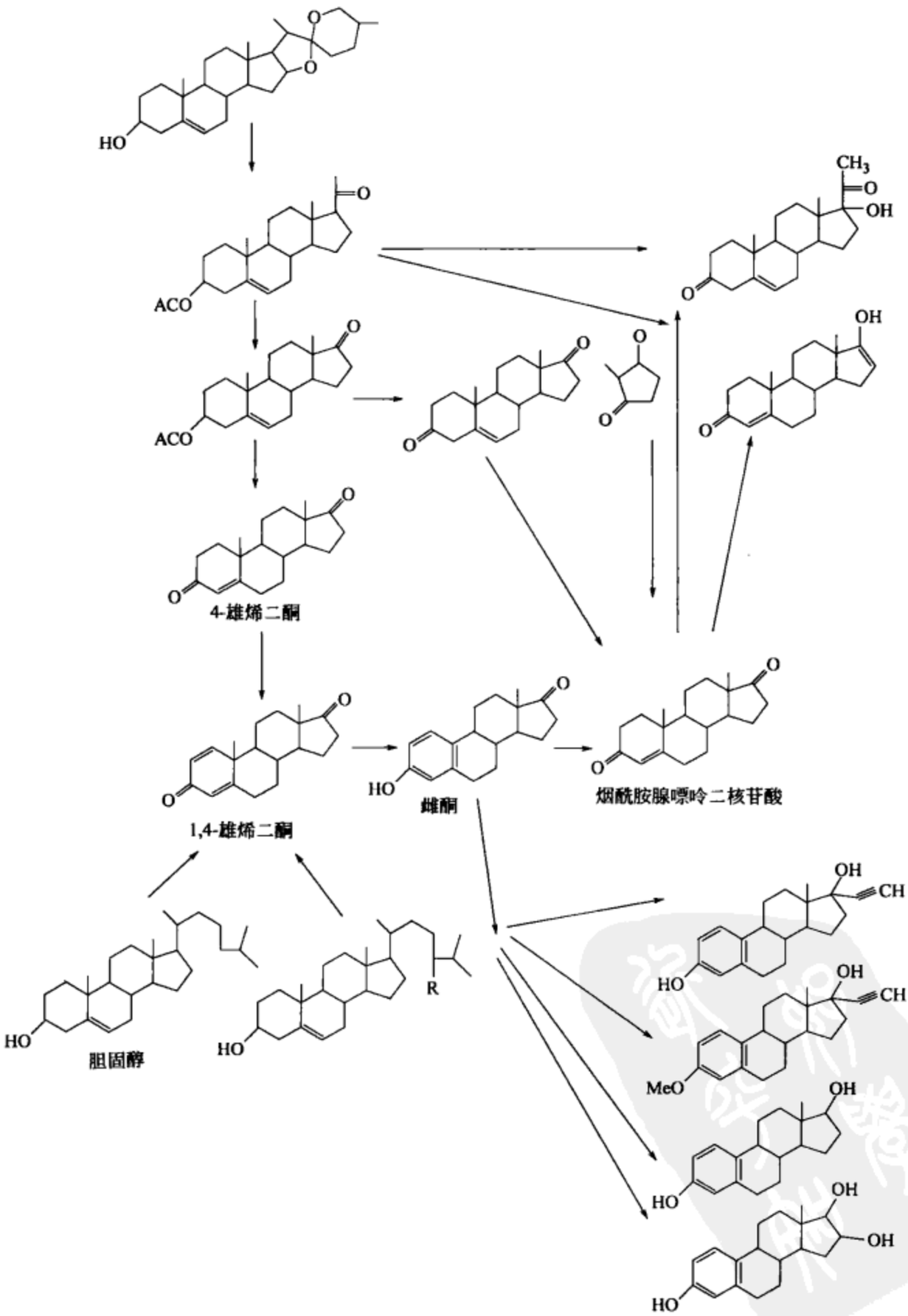


图 2.3-3　由不同原料生产性激素的工艺流程

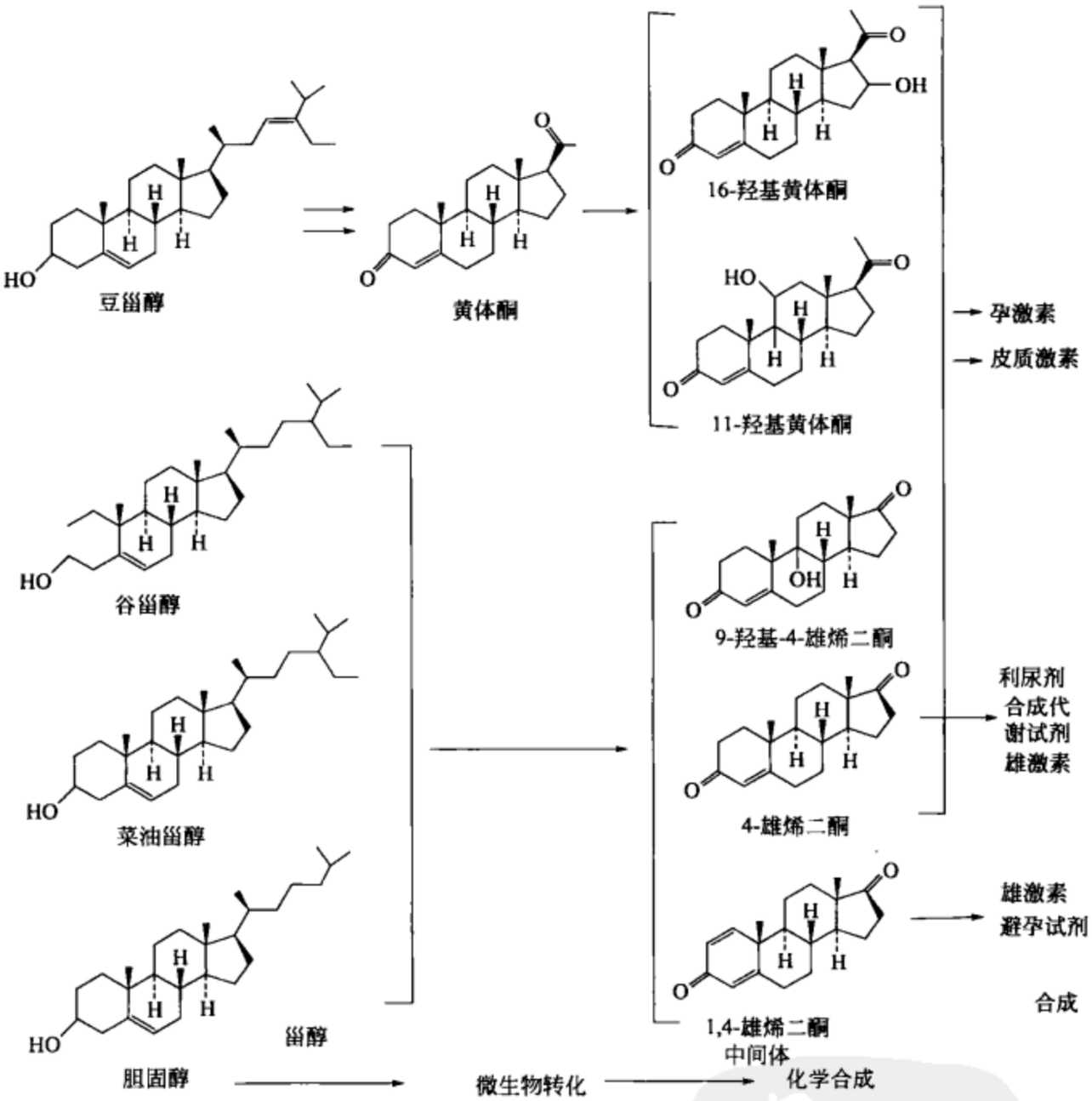


图 2.3-4　以甾醇为原料进行的甾体药物开发

疮，以及计划生育等方面也有着举足轻重的作用。微生物转化真正应用在医药领域应该起始于 20 世纪微生物对甾体化合物的结构改造。1952 年，Peterson 和 Murray 首先发现少根酶，后来发现的黑根酶能使黄体酮转化成 11α-羟基黄体酮。这一步微生物转化可省去 10 步化学反应，从而解决了合成可的松等糖皮质激素的难题[53]。1955 年 Skull 和 Kita 用新月弯孢霉由脱氧皮质醇经 11β-羟基化作用制成了皮质醇。随后又相继发现细菌、放线菌、酵母、霉菌的某些菌种可以使甾体化合物的一定部位发生有价值的转化反应，微生物在甾体激素转化中的应用日益扩大。1958 年，我国黄鸣龙教授等用黑根霉成功地对 16α,17α-环氧孕甾 4-烯-3,20-二酮进行了 11α-羟基化，开创了我国微生物合成甾体药物的先河，从第一个用于甾体药物生产的微生物合成（16α,17α-环氧孕酮的 11α-羟基化）成功以后，接着研制生产了醋酸可的松、醋酸强的松、泼尼松、地塞米松和倍他米松等皮质激素。1965 年 Sih

等将胆固醇先改造成19-羟基衍生物，再利用微生物转化，一步就可获得A环芳香化的雌酚酮[54,55]。G. V. Sukhodolskaya等[56]用分歧杆菌VKM Ac1817D转化谷甾醇得到了9-羟基-雄烯二酮、1,4-雄烯二酮和9-羟基-1,4-雄烯二酮，Lin等用串珠镰孢对植物甾醇进行转化，成功得到产物雄甾-4-烯-3,17-二酮[57]。其过程见图2.3-5所示。近年来，上海工业研究院在去氢表雄酮的7位和15位羟基化、坎利酮的15位和11位羟基化反应成果比较突出。Yasmin（屈螺酮加炔雌醇）为先令公司成功开发的口服避孕药，已经在美国和欧洲上市。7α,15α-二羟基雄烯醇酮（7α,15α-dihydroxyandrostenolone）是合成屈螺酮的重要中间体。应用亚麻刺盘（Colletotrichumlini）的羟化酶系统对去氢表雄酮底物进行生物转化，合成了7α,15α-二羟基雄烯醇酮，过程如图2.3-6所示。坎利酮化合物具有利尿功能和肾上腺皮质激素受体拮抗功能，对其进行结构修饰和筛选获得临床治疗心血管疾病药物——依普利酮（Eplerenone），其中关键的11位羟化反应可以由微生物转化完成。上海工业研究院用赭曲霉羟化酶系统对坎利酮进行转化研究，发现不同的赭曲霉羟化酶对坎利酮进行转化形成多个转化产物，包括15-羟基坎利酮、11-羟基坎利酮和11-羟基-6,7-二氢坎利酮等化合物。除此之外，微生物还能在甾体母

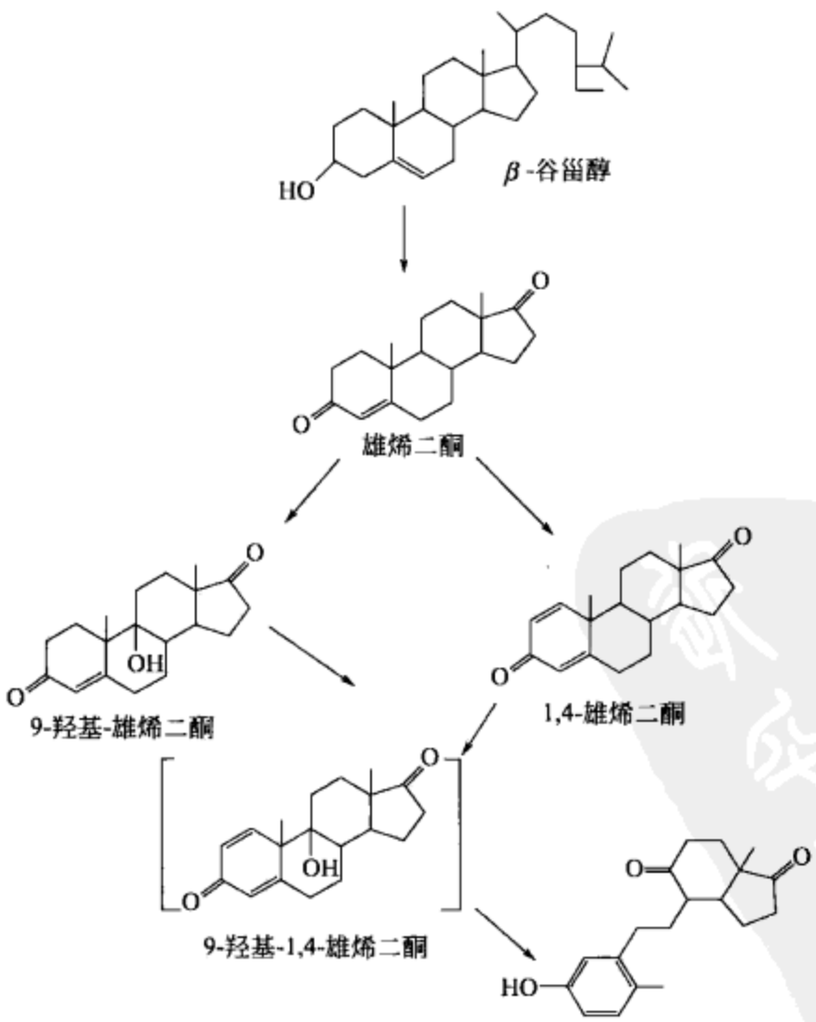


图2.3-5　分歧杆菌VKM Ac1817D转化谷甾醇得到9-羟基-雄烯二酮、1,4-雄烯二酮、雄烯二酮

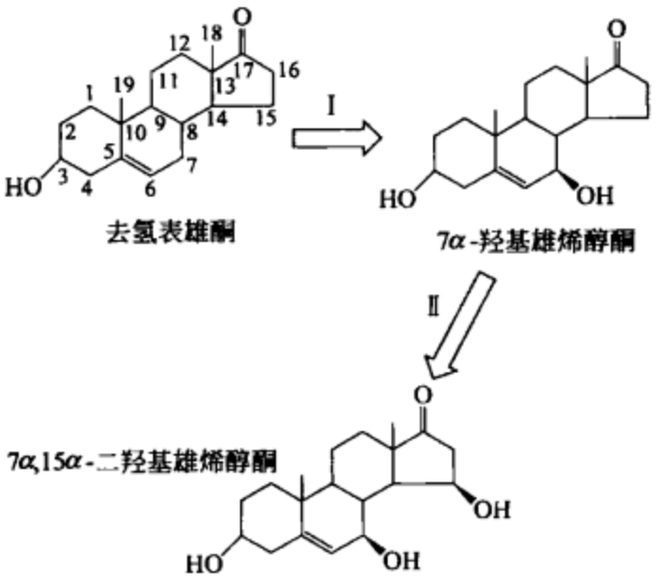


图 2.3-6　7α,15α-二羟基雄烯醇酮微生物转化

核的 3α,7α,9α,11α,6β,15β,17β 等位点进行催化，并产生了很多新化合物。2005 年，Zhi 等用球孢白僵菌 CCTCC AF206001 对雄甾-4-烯-3,17-二酮进行转化发现，不同的 pH 下转化产物不同：pH 为 6 时，主要产物是 11α-4-烯-3,17-二酮和 11α,6β-4-烯-3,17-二酮；pH 为 7 时，主要产物为 11α,17β-二羟基-1-烯-3-酮、17β-羟基-1-烯-3-酮、6β,11α,17β-三羟基-1-烯-3-酮、3α,11α,17β-三羟基雄烷[57]，过程见图 2.3-7 所示。

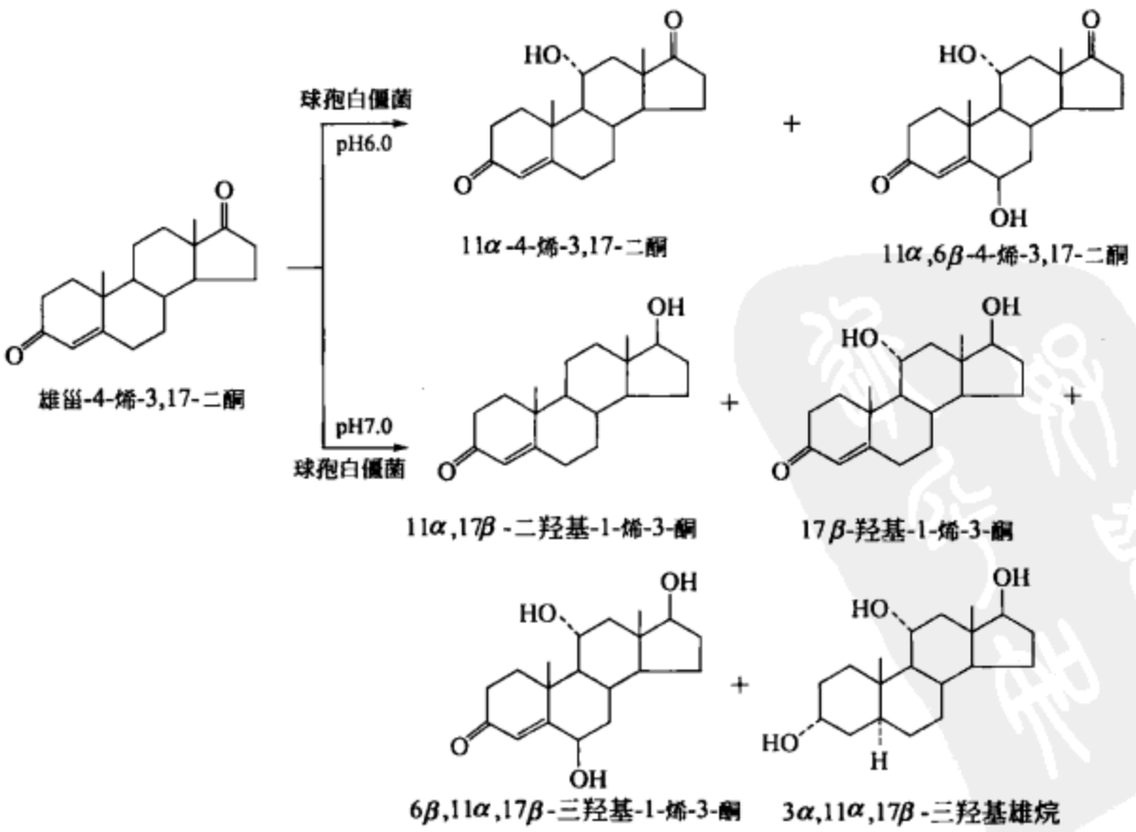


图 2.3-7　球孢白僵菌 CCTCC AF206001 对雄甾-4-烯-3,17-二酮的转化

2005 年，Mojtaba[58]用脉孢菌 FGSC 4335 对癸酸进行转化得到四种甾体衍生

物，分别是雌甾-4-烯-3,17-二酮、17β-羟基雌甾-4-烯-3,17-二酮、6β,17β-二羟基雌甾-4-烯-3,17-二酮、9α,17β-二羟基雌甾-4-烯-3,17-二酮，其转化产物见图 2.3-8 所示。

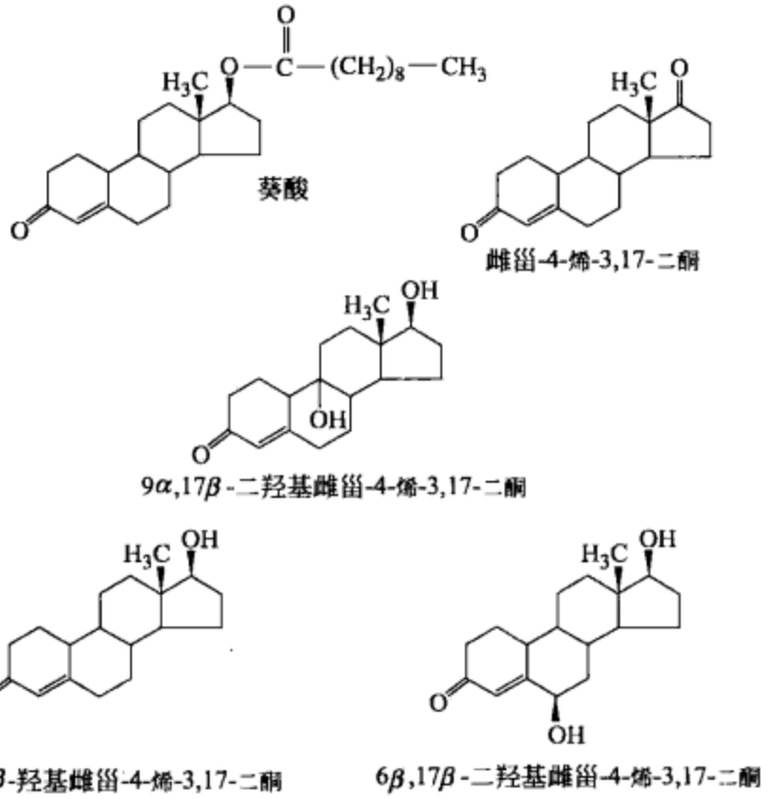


图 2.3-8　脉孢菌 FGSC 4335 对癸酸进行转化反应

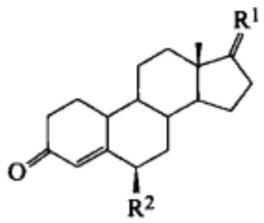
2005 年，Alina 等[59]用黄色镰孢菌对 4-和 17α-睾酮类似物进行转化，结果主要在 6β 和 15α 位进行羟化，其转化产物见表 2.3-1 所示，其转化产物的结构见图 2.3-9 所示。

表 2.3-1　黄色镰孢菌对甾体的微生物转化

底　物	时间/天	转化产物
19-去甲睾酮(1)	3	6β-羟基-19-去甲睾酮(1a) 6β-羟基-19-去甲雄烯二酮(2a)
19-去甲雄烯二酮(2)	3	6β-羟基-19-去甲睾酮(1a) 6β-羟基-19-去甲雄烯二酮(2a)
4-甲氧基睾酮(3)	4	6β-羟基-4-甲氧基雄烯二酮(3a)
4-甲基睾酮(4)	2 10	6β-羟基-4-甲基雄烯二酮(4b) 6β-羟基-4-甲基睾酮(4a) 6β,15α-羟基-4-甲基雄烯二酮(4c) 6β,15α-羟基-4-甲基睾酮(4d)
醋酸氯睾酮(5)	1.5	6β-羟基-4-氯雄烯二酮(5a) 15α-羟基-4-氯雄烯二酮(5b) 3β,15α-二羟基-4-氯-4-烯-17-酮(5c) 3β,15α-二羟基-4α-氯-5α-烯-17-酮(5d)
17α-甲基睾酮(6)	2	6β-羟基-17α-甲基睾酮(6a) 15α-羟基-17α-甲基睾酮(6b) 12β-羟基-17α-甲基睾酮(6c)

续表

底　物	时间/天	转 化 产 物
17α-乙基-19-去甲睾酮(7)	1	6β-羟基-17α-乙基-19-去甲睾酮(7a) 15α-羟基-17α-乙基-19-去甲睾酮(7b) 12β-羟基-17α-乙基-19-去甲睾酮(7c)
4-氯-17α-甲基睾酮(8)	1	6β-羟基-4-氯-17α-甲基睾酮(8a) 15α-羟基-4-氯-17α-甲基睾酮(8b)

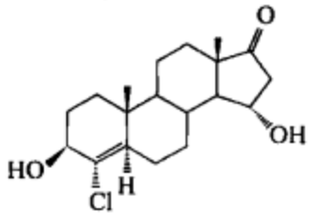


1 19-去甲睾酮
R^1=α—H, β—OH; R^2=H

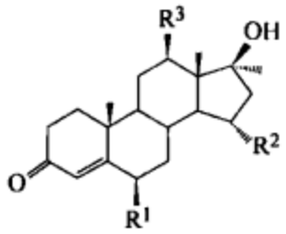
1a 6β-羟基-19-去甲睾酮
R^1=α—H, β—OH; R^2=OH

2 19-去甲雄烯二酮
R^1=O; R^2=H

2a 6β-羟基-19-去甲雄烯二酮
R^1=O; R^2=OH



5d 3β,15α-二羟基-4α-氯-5α-烯-17-酮

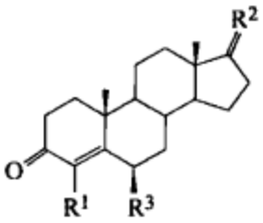


6 17α-甲基睾酮
R^1=R^2=R^3=H

6a 6β-羟基-17α-甲基睾酮
R^1=OH; R^2=R^3=H

6b 15α-羟基-17α-甲基睾酮
R^1=R^3=H; R^2=OH

6c 12β-羟基-17α-甲基睾酮
R^1=R^2=H; R^3=OH



3 4-甲氯基睾酮
R^1=OMe; R^2=α—H, β—OH; R^3=H

3a 6β-羟基-4-甲氯基雄烯二酮
R^1=OMe; R^2=O; R^3=OH

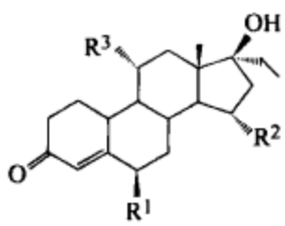
4 4-甲基睾酮
R^1=Me; R^2=α—H, β—OH; R^3=H

4a 6β-羟基-4-甲基睾酮
R^1=Me; R^2=α—H, β—OH; R^3=OH

4b 6β-羟基-4-甲基雄烯二酮
R^1=Me; R^2=O; R^3=OH

5 醋酸氯睾酮
R^1=Cl; R^2=α—H, β—OH; R^3=H

5a 6β-羟基-4-氯雄烯二酮
R^1=Cl; R^2=O; R^3=OH

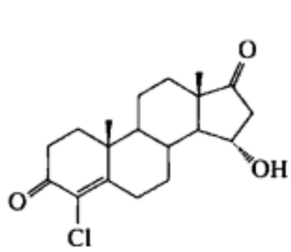


7 17α-乙基-19-去甲睾酮
R^1=R^2=R^3=H

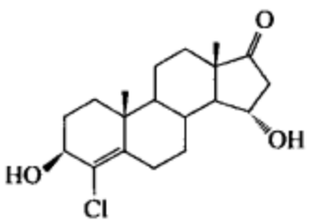
7a 6β-羟基-17α-乙基-19-去甲睾酮
R^1=OH; R^2=R^3=H

7b 15α-羟基-17α-乙基-19-去甲睾酮
R^1=R^3=H; R^2=OH

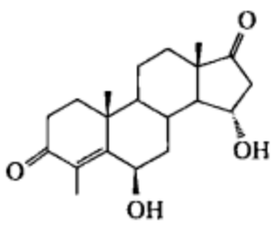
7c 12β-羟基-17α-乙基-19-去甲睾酮
R^1=R^2=H; R^3=OH



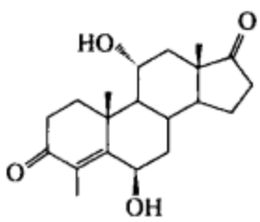
5b 15α-羟基-4-氯雄烯二酮



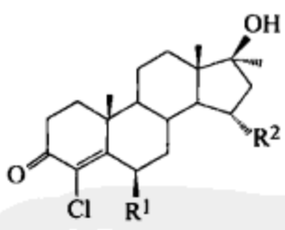
5c 3β,15α-二羟基-4-氯-4-烯-17-酮



4c 6β,15α-羟基-4-甲基雄烯二酮



4d 6β,15α-羟基-4-甲基睾酮



8 4-氯-17α-甲基睾酮
R^1=R^2=H

8a 6β-羟基-4-氯-17α-甲基睾酮
R^1=OH; R^2=H

8b 15α-羟基-4-氯-17α-甲基睾酮
R^1=H; R^2=OH

图 2.3-9　黄色镰孢菌对甾体的微生物转化产物结构图

Teresa Kołek 等[60]用薄青霉 AM111 对脱氢表雄酮、孕烯二酮、雄烯二酮进行转化获得了主要的新产物 3β-羟基-17α-环氧-D-高碳雄甾-5-烯-17-酮，其转化产物见表 2.3-2 所示，其转化产物的结构见图 2.3-10 所示。

表 2.3-2　薄青霉 AM111 对脱氢表雄酮、孕烯二酮、雄烯二酮的微生物转化

底物	复　合　物
脱氢表雄酮(1)	脱氢表雄酮(1)，3β-羟基-17α-环氧-D-高碳雄甾-5-烯-17-酮(4)
雄烯二酮(3)	雄烯二酮(3)，睾内酯(5)
孕烯二酮(2)	孕烯二酮(2)，黄体酮(6)，脱氢表雄酮(1)，雄烯二酮(3)，睾内酯(5)，3β-羟基-17α-环氧-D-高碳雄甾-5-烯-17-酮(4)

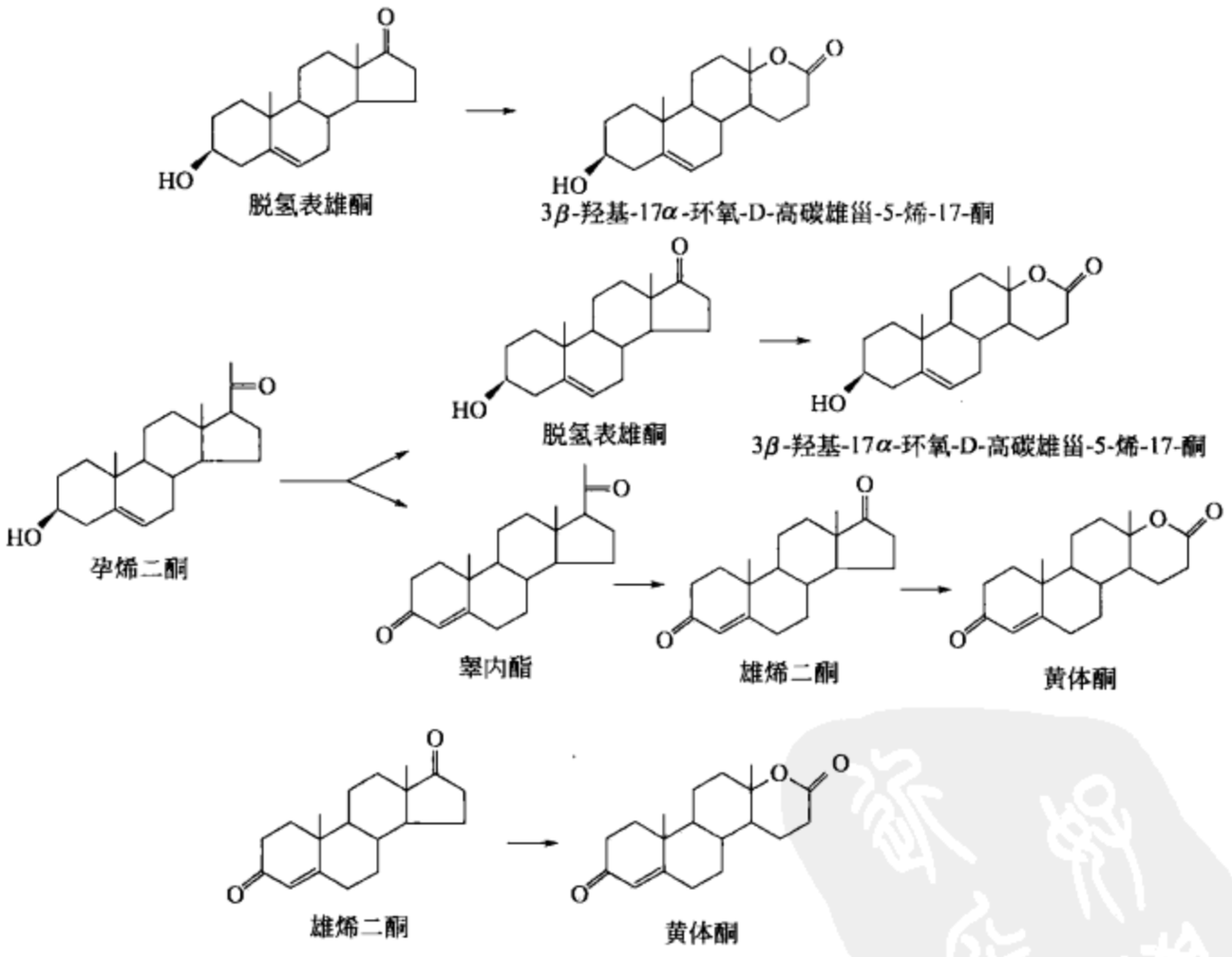


图 2.3-10　薄青霉 AM111 对脱氢表雄酮、孕烯二酮、雄烯二酮的微生物转化

Wenzhong Ge 等[61]用总状毛霉对 3β-羟基-5-烯甾体进行转化，结果得到了 7α-羟基化的产物，其中，16,17 位有双键或 16α,17α-环氧的化合物，在 16 位实现了甲基化。转化的底物和产物见图 2.3-11 所示。微生物不仅可以催化甾体母核上的一些特殊位点，在转化的过程中还能获得大量的新型化合物。2007 年，Choudhary 等[62]用雅致小克银汉霉对肾上腺甾酮进行转化得到三种新化合物，分别是 9α-羟基甾酮、11-酮甾酮和 6β-羟基-11-酮甾酮。转化过程见图 2.3-12 所示。2007 年，Liu 等[63]用木霉属的微生物对 5α,6α-环氧-3β-羟化-16-烯-20-酮转化得到两种新化

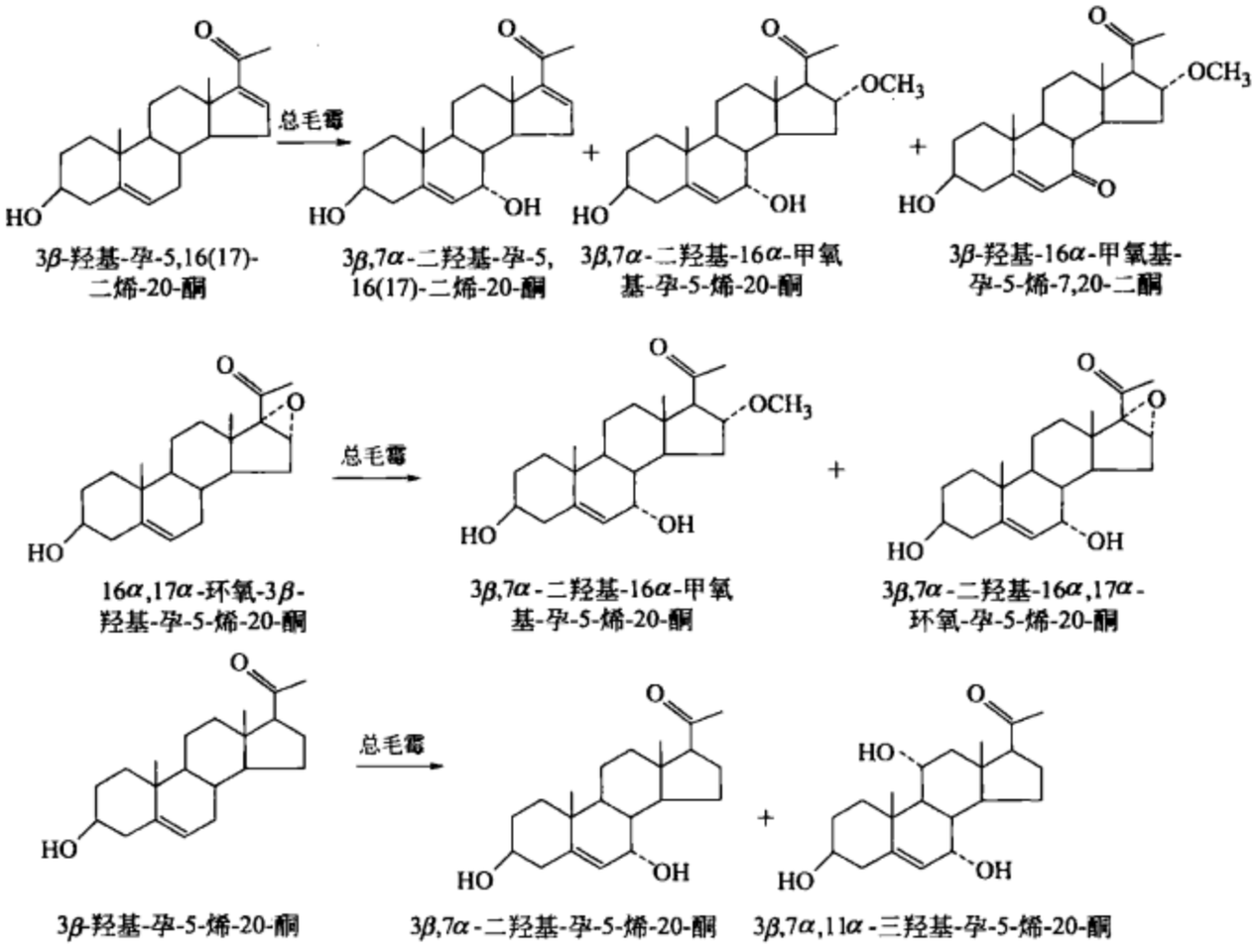


图 2.3-11　总状毛霉对 3β-羟基-5-烯甾体的微生物转化

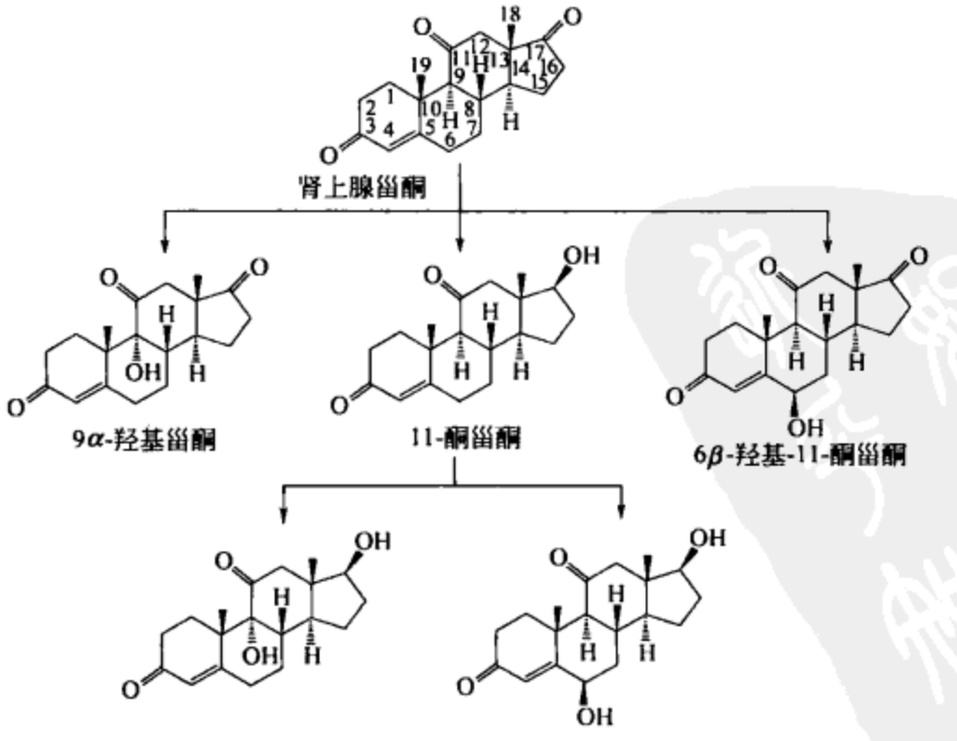


图 2.3-12　小克银汉霉对肾上腺甾酮的生物转化

合物，分别是 3β,5α,6β,15β-四羟基-16-烯-20-酮和 3β,5α,15β-三羟基-16-烯-6,20-酮。2007 年，Wang 等[64]用从土壤中分离出的维吉链霉菌 IBL-14 首次将薯蓣皂苷元转化为 isonuatigenone。Amal Al-Aboudi 等用黑曲霉对胆酸甲酯（1）进行转化，结果得到了两个化合物，分别是 3α,7α,12α,15β-四羟基-5β-胆酸-24 甲酯(2)和 3α,12α-二羟基-7 氧-5β-胆酸-24 甲酯(3)，其中（2）是一个新化合物。

总之，微生物转化在甾体药物的生产和创新性研究中发挥着越来越重要的作用，它不但能简化生产步骤，还能获得一些新的活性更高的化合物，提高生产效率。特别是在现有药物活性不高的情况下，通过微生物转化法生产新型的甾体类药物，有着极为重要的意义。

2.3.3　微生物转化在手性药物研究中的应用

手性药物制备的关键技术是不对称合成技术，虽然传统的化学合成方法也能实现部分手性药物的制备，但是微生物转化生产手性药物有着化学合成无法比拟的巨大优势：①转化底物某一基团的专一性强，即对不需要转化的基团无需保护；②通过对用于某一转化的微生物进行菌种选育和转化条件的优化，可以得到极高的转化率；③生物催化转化的反应条件温和且对环境的污染很小。正是这些优势所在，使得微生物转化在手性药物合成过程中的应用得到越来越广泛的关注。张芳等[65]利用红酵母静息细胞转化 3,5-双三氟甲基苯乙酮，并对影响红酵母细胞转化率的因素进行考察，结果发现，以辛烷作为有机溶剂，体积分数 20%，pH7.0，不使用细胞通透剂，葡萄糖作为辅助底物，转化时间为 36h 时，转化效率最高可达 81.7%，其转化过程见图 2.3-13 所示。

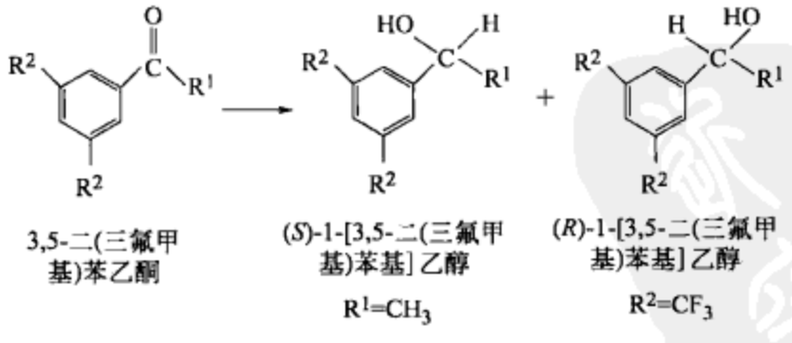


图 2.3-13　双三氟甲基苯乙酮的不对称还原

何春茂等[66]分别用短小芽孢杆菌（*Bacillus pumilus* Meyer & Gottheil）Phe-C3 和菌株肺炎克雷伯菌［*Klebsiella pneumomiae*（Schroeter）Trevisan］Phe-E4 催化相应的酮来合成（*R*）-和（*S*）-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯，其对映体的量分别为 74.5%和 71.7%。BMS-210620 是一种 β_3 受体激动剂，其合成中间体（*R*）-醇可由少动鞘氨醇单胞菌（*Spingornonas paucirnobilis*）SC16113 菌体催化还原制得[67]，其过程见图 2.3-14 所示。

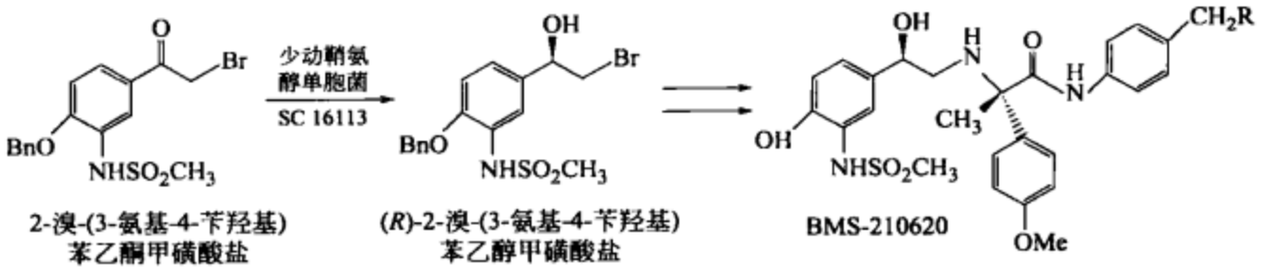


图 2.3-14　微生物法制备 BMS-210620 的手性中间体

Michel Chartrain 等用[68]假丝酵母 MY1833 对酮 [2-(4-*N*-苯基)-*N*-(2-*O*-2-吡啶-3-基-乙基)-乙酰胺]不对称还原生成相应的 (*R*)醇 [(*R*)-*N*-(2-羟基-2-吡啶-3-基-乙基)-2-(4-硝基-苯)-乙酰胺]。对映体过量值大于 98%，其过程见图 2.3-15 所示。

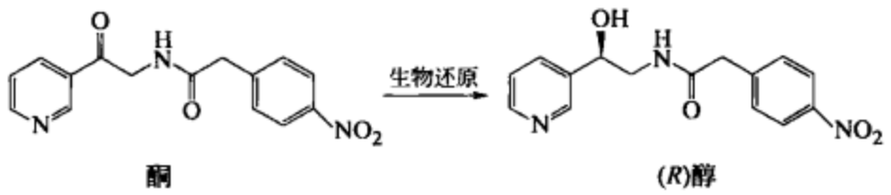


图 2.3-15　不对称还原酮转化成手性醇

化合物 (6) 是一种新型的 β_3-肾上腺素能受体激动剂，一条实用的合成路线是利用酵母菌催化不对称还原 (4) 得到关键的手性中间体 (*R*)-*N*-[2-乙醇(3-吡啶)]-(4-硝基苯基)乙酰胺(5)，产率达到 75%，手性选择性 (ee) 值达到 99.5%以上[69]，其过程见图 2.3-16 所示。

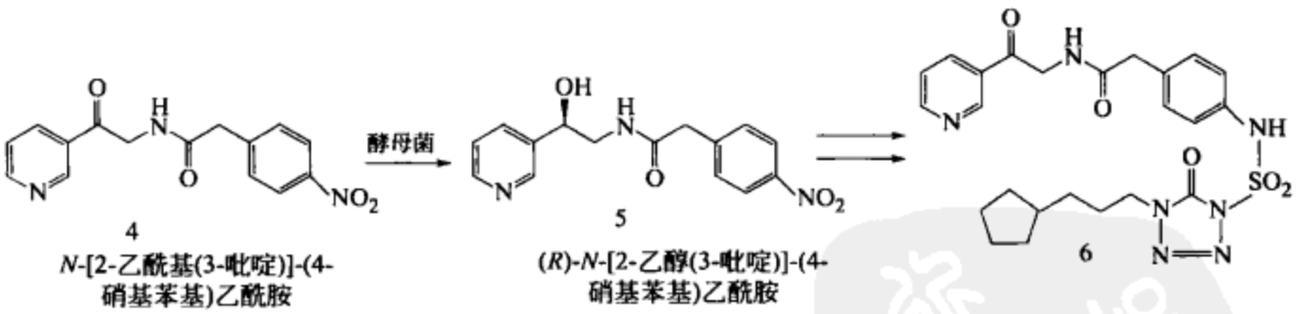


图 2.3-16　酵母菌制备 β_3-肾上腺素能受体激动剂的手性中间体

(*R*)-地诺帕明 [(*R*)-Denoparmine] 是首例具有口服活性和长效性治疗心脏病的药物，用一株具有高还原活力的白地霉菌株 G38 还原 α-羰基羧酸酯 (1) 得到相应光学纯的羟基酸 (2) 中间产物，最终成功地合成了化合物 (3) [(*R*)-地诺帕明][70]，其过程见图 2.3-17 所示。

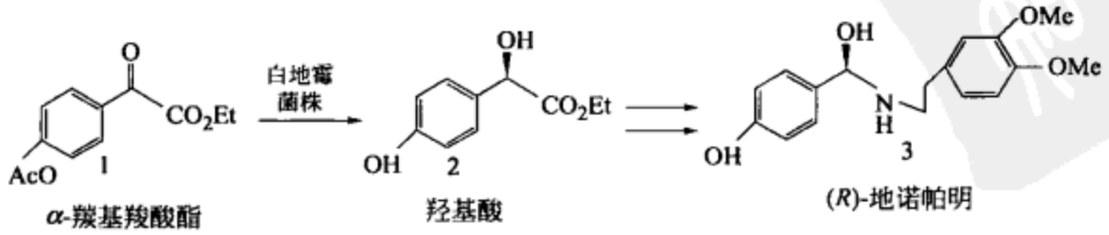


图 2.3-17　白地霉菌株制备 (*R*)-地诺帕明的手性中间体

索他洛尔（Sotalol）因为含有酸性的甲磺酰胺部分，是一种独特的抗心律失常新药。其 *d*-型异构体是一种纯的三类抗心律失常药物。利用微生物菌株催化还原氯代酮（1）得到的具光学活性的相应氯代醇产物（2）成功制备了 *d*-索他洛尔（3）[71]，其过程见图 2.3-18 所示。

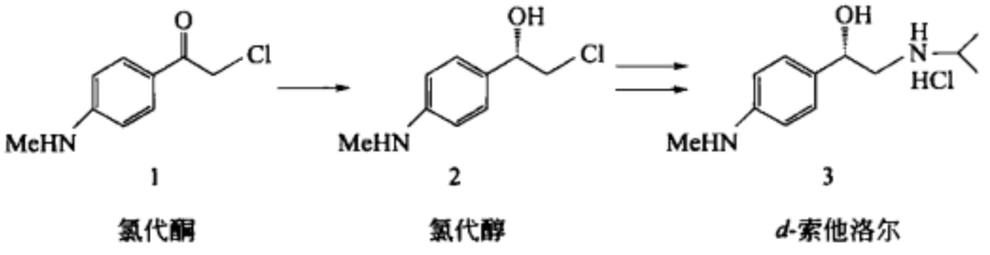


图 2.3-18　微生物法制备 *d*-索他洛尔的手性中间体

顺-1*S*,2*R*-氨基茚满醇是 HIV-1 蛋白水解酶抑制剂茚地那韦（Crixivan）的一个关键中间体，而 1,2-茚二醇是顺-1*S*,2*R*-氨基茚满醇的重要前体。Michel chartrain 等用红球菌 MB 5655 和 MA 7205 对茚进行转化，结果得到了顺反 1,2-茚二醇，可进一步通过化学法得到顺-1*S*,2*R*-氨基茚满醇[72]，其过程见图 2.3-19 所示。

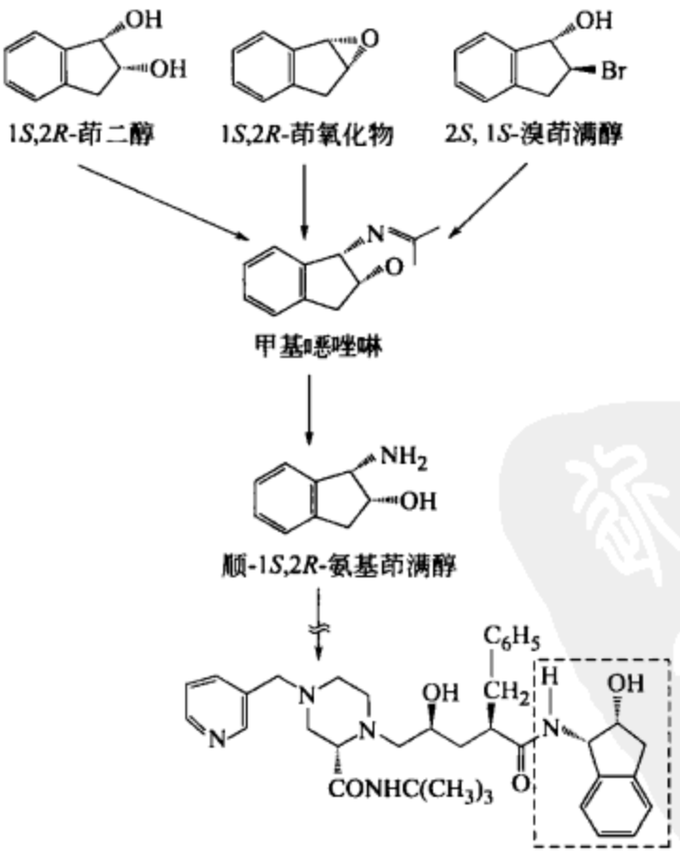


图 2.3-19　关键中间体顺-1*S*,2*R*-氨基茚满醇的不对称合成

近 30 年来，生命科学的飞速发展，新的物种的发现、新的代谢机制的阐明，使得微生物转化在手性药物研制领域取得了一定的成就，它以其无与伦比的优势给手性药物研发带来了广阔的应用前景[73]。

2.4 微生物转化在天然药物定点修饰研究中的应用

2.4.1 甾体类天然药物的转化定点修饰

甾体成分在动物和植物界的分布相当广泛。天然的甾体结构中具有环戊烷多氢菲母核，根据甾体成分 C17 位侧链的不同，可将其分为 C_{21} 甾体、强心苷类、植物甾醇类等。甾体类成分是最早应用微生物进行修饰的化合物，微生物几乎可以修饰甾体上的每一个位点。如图 2.4-1 所示，从转化的反应类型来看，主要有甾体类母核上的羟化反应、甾醇类化合物的侧链断裂以及脱氢反应。例如，蟾酥是一种天然

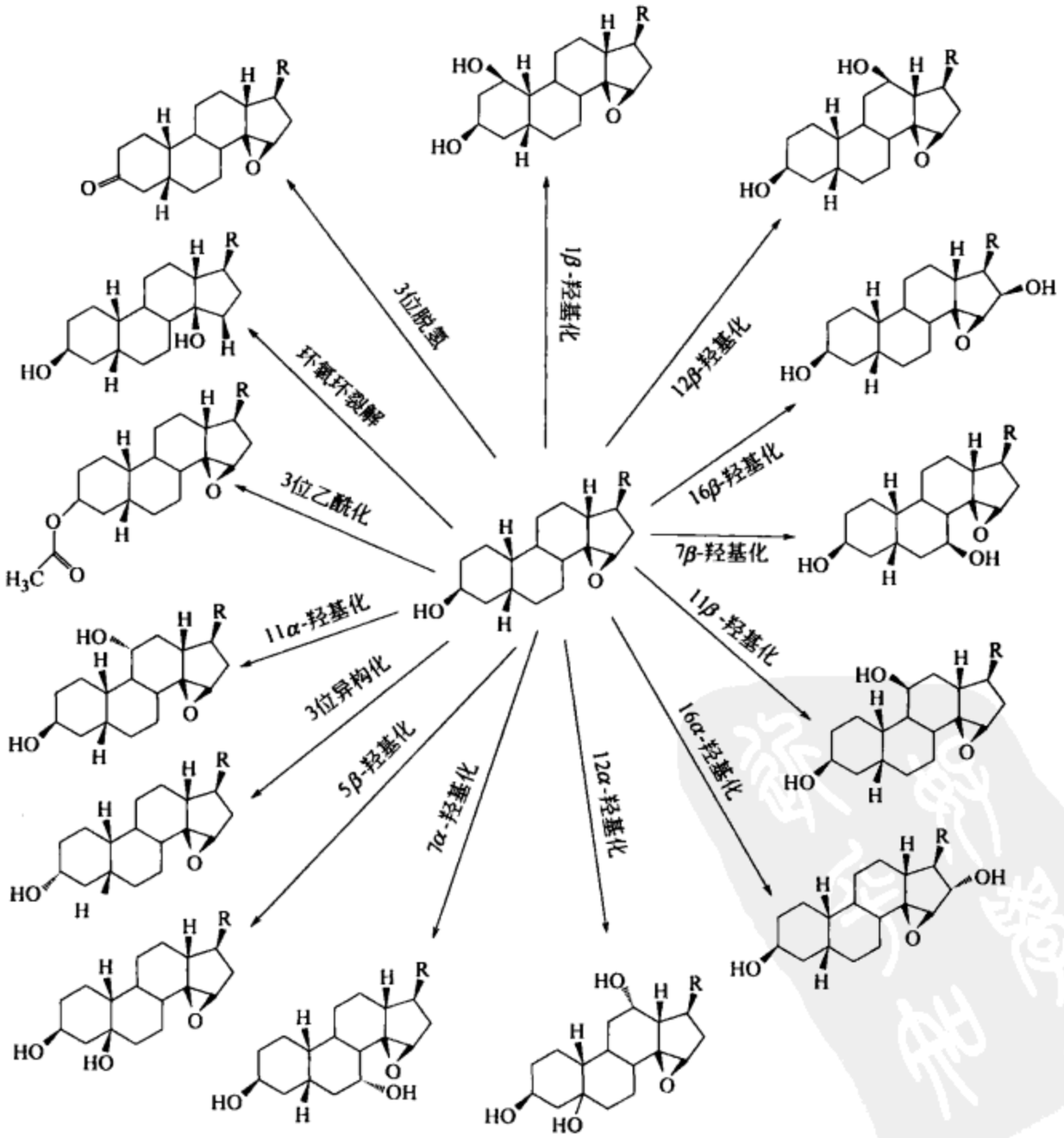


图 2.4-1 蟾毒配基的甾体母核的转化反应

药物，其有效成分蟾毒配基类（包括脂蟾毒配基、蟾蜍灵、华蟾毒精等）是一种比较典型的甾体结构，以环戊烷多氢菲为基本骨架，C3 位有羟基，C17 位有 β 型的 α-吡喃酮环（α-pyrone），具有 14β-羟基或 14β,15β-环氧环。目前，对于蟾毒配基类微生物转化的研究比较多，从报道的文献来看，主要集中在对甾体母核的转化上，包括羟基化、脱氢等。蟾毒配基的母核转化反应包括：羟基化、脱氢、异构化、乙酰化、14β,15β-环氧环的裂解。羟基化反应是微生物对甾体转化的一个重要反应，传统的化学方法除了在 C17 位引入羟基比较容易外，其他的位点则很难。而微生物对蟾毒配基甾体母核的羟基化位点较多，常见的如 1β、5β、7α、7β、11β、12β、16α 等，对于某些位点，还可以进行二羟基化，如 1β 和 12β 位。涉及转化的微生物较多，其中主要为真菌，包括刺囊毛霉、多型孢毛霉、黑曲霉和雅致小克银汉霉等。例如，蟾毒配基类 C3 位有一个羟基，因此，有些微生物产生的脱氢酶可以对该位点进行转化，脱氢产生酮基。C3 位的脱氢一般也是该位点加入其他基团，如 α-OH 等，在加入这些基团之前，需要先脱去 C3 位的氢。能够进行 C3 位脱氢反应的微生物常见的有铜绿假单胞菌、链格孢、多型孢毛霉、黑曲霉、橘灰青霉、腐皮链孢等。蟾毒配基 C3 位具有一个 β 构型的羟基，有些微生物能够将其特异性地转化成 α 构型。在其转化成 α 构型之前，需要先经过脱氢生成酮基这一中间步骤，然后再还原生成 α-OH。而有些微生物，如诺卡菌等则先将 C3 位的 OH 乙酰化，例如，蟾毒配基的 14β、15β 位具有一个环氧环，诺卡菌能够将其裂解，对应的 14β、15β 位分别生成—OH 或—H。微生物对蟾毒配基的甾体母核的转化反应[74]见图 2.4-1。据此，对甾体类中药蟾毒配基类成分的转化反应包括乙酰化[75]、脱乙酰化[76~78]、3-OH 的异构化和脱氢作用[76,79]等，但主要是以羟基化为主[77,80~83]，包括单个位点的羟基化、两个位点的羟基化甚至多个位点的羟基化，其中涉及的位点包括 C-1β、5、7α、7β、12β、15β、16α（脂蟾毒配基），C-1β、4、5β、7、11、12β（华蟾毒精），C-1β、5、7β、11β、12β、15α、15β、16α（蟾蜍灵），对南美蟾毒精 16β 位有羟基化作用。而能够对蟾毒配基进行转化的微生物多种多样，包括绿脓杆菌[76]、刺囊毛霉[78,81,83,84]、链格孢[77,84]、短刺小克银汉霉[84]、多型孢毛霉[80]、黑曲霉[78]、橘皮青霉[85]、雅致小克银汉霉[86,87]、腐皮镰孢菌[79]、诺卡菌[75]等都是报道较多的菌种。利用微生物对如蟾毒配基类成分的转化，获得了一大批新成分，通过对这些新成分进行药理和毒理实验，并对其结构-活性关系（structure-activityrelationship，SAR）进行分析，完全有可能得到更多治疗效果更佳、毒副作用更小的新药成分。

2.4.2 黄酮类中药成分的微生物转化

黄酮类化合物是自然界尤其是植物界分布广泛的一大类天然酚性化合物，是药用植物的活性成分之一。黄酮类化合物微生物修饰的类型包括糖苷水解和甲基化。苯环上的酚羟基的甲基化是生物转化黄酮类化合物的主要反应类型，而且这个反应对于一般的有机合成来说是难以完成的。采用灰色链霉菌［*Streptomyces griseus*

(Waksman) Waksman&Henrici] 转化黄芩苷时，仅有黄芩素-6-甲醚产生，而在其他位点不发生甲基化反应，说明此反应有空间结构的专一选择性。如，王园园等[88]对灰色链霉菌转化黄酮类化合物柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷及木犀草素的产物进行结构分析后认为，柚皮苷中 L-鼠李糖与 β-D-葡萄糖为 α-1,2 连接，而在橙皮苷和芦丁中为 α-1,6 连接。灰色链霉菌能催化芦丁中鼠李糖苷键的断裂而不能催化橙皮苷中鼠李糖苷键的断裂，说明此菌株产生的鼠李糖苷酶对底物的空间结构有专一的选择性。Hosny 等[89,90]利用灰色链霉菌 ATCC13273 对非瑟酮进行转化，除得到 3 种羟基化或甲基化的产物（1、2、3）外，还得到一种新产物（4），其转化产物见图 2.4-2 所示。

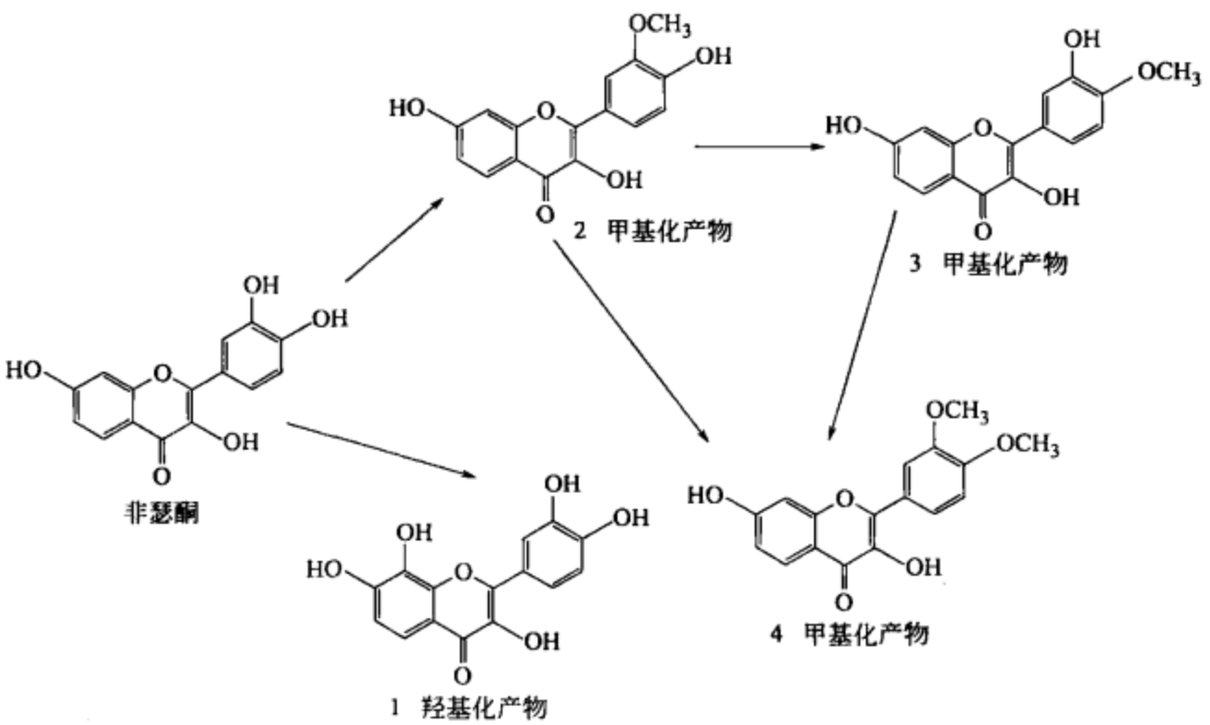


图 2.4-2 灰色链霉菌 ATCC13273 对非瑟酮进行转化

2.4.3 萜类成分的微生物转化修饰

萜类在自然界的分布十分广泛，含量大，结构多样，是一种重要的植物成分。虽然萜类实际由甲瓦龙酸（MVA，mevalonicacid）演化而来，但其分类仍沿用古老经验的异戊二烯规律，即根据其分子的碳架由几个异戊二烯而分类，单萜中含有 2 个异戊二烯单位，倍半萜中含有 3 个异戊二烯单位，二萜中含有 4 个异戊二烯单位，三萜中也含有 4 个异戊二烯单位。许多中药的有效成分为萜类，如抗疟疾特效药青蒿素为倍半萜类，从红豆杉中分离到的抗肿瘤药物紫杉醇为二萜类，被誉为中草药之王的甘草其主要成分为三萜类及其衍生物。萜类成分分布广泛，种类繁多，围绕萜类成分进行的生物转化修饰也是生物转化领域研究的重点。

2.4.3.1 紫杉醇（Taxol）的合成与修饰

紫杉醇（Taxol）是 20 世纪 70 年代由 Wani 等从短叶红豆杉（*Taxus brevifolia*）



树皮中提取出来的具有独特抗癌作用的天然产物，属于萜类化合物，是治疗卵巢癌、乳腺癌的首选药物，对白血病、肺癌、脑癌、直肠癌和其他的一些实体瘤等均有显著疗效，并且毒副作用很小。由于紫杉醇的药源植物红豆杉是国家一级保护植物（严禁砍伐），生长缓慢（30～50年才能成材），紫杉醇的含量又非常低，仅为红豆杉干重的十万分之几到万分之几，所以从天然的红豆杉中提取紫杉醇的方法远远不能满足人们对紫杉醇日益增长的需要（全世界紫杉醇的需求量约为3000kg/年，而产量只有300～400kg/年）。其生物合成可分为两大步骤：①紫杉醇二萜前体的生物合成；②紫杉醇二萜前体的环化及随后的酶促催化反应和修饰直到紫杉醇生物合成完成。

（1）紫杉醇二萜前体的生物合成　目前，对于紫杉醇生物合成的确切机制尚无完全阐明，但现在公认的有两条合成途径，即经典的甲瓦龙酸途径[80]和新发现的1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸（DXP）途径[78]。所有天然萜类都来自于两个基本的5碳通用前体：异戊烯基焦磷酸（IPP）和二甲基烯丙基焦磷酸（DMAPP）。虽然植物萜类都来源于异戊烯基焦磷酸和二甲基烯丙基焦磷酸，但其生物合成却由两条截然不同的途径完成：一是经典的甲瓦龙酸途径，完成于细胞质中；另一是新近发现的1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸途径，完成于质体中[79]。

（2）萜类在细胞质中通过甲瓦龙酸途径生物合成　细胞质中的萜类衍生物通过CO_2固定得来的乙酰辅酶A（acety-CoA）。两个乙酰辅酶A分子在乙酰辅酶A C-酰基转运酶催化下缩合生成乙酰乙酰辅酶A，乙酰乙酰辅酶A与乙酰辅酶A在3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A（HMG-CoA）合成酶作用下缩合生成3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A，3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A在3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶作用下还原为甲瓦龙酸，该反应是甲瓦龙酸途径上的限速反应，所以该条途径被命名为甲瓦龙酸途径。如图2.4-3所示，甲瓦龙酸经由甲瓦龙酸激酶和磷酸甲瓦龙酸激酶依次分别催化的两步磷酸化生成5-焦磷酸甲瓦龙酸（mevalonate5-diphosphate），最后，5-焦磷酸甲瓦龙酸在5-焦磷酸甲瓦龙酸脱羧酶作用下生成异戊烯基焦磷酸，异戊烯基焦磷酸和其异构物二甲基烯丙基焦磷酸在异戊烯基焦磷酸异构酶作用下可以相互转化。

（3）萜类在质体中通过1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸途径生物合成[75,82,83,85]　该途径位于质体中，其最初的前体物质是丙酮酸（pyruvate）和3-磷酸甘油醛（glyceraldehyde3-phosphate G3P）。如图2.4-4所示，丙酮酸和3-磷酸甘油醛在1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶作用下生成1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸，该反应是质体中萜类生物合成的第一个限速反应，正因为如此，该条途径被命名为1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸途径；接下来，在1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶作用下，1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸经原子重排和还原生成2-*C*-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸（MEP），该反应是1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸途径上最重要的限速反应，也是萜类物质代谢工程最重要的靶点。2-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸胱氨酰转移酶和4-二磷酸胞苷（CDP）在2-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸胱氨酰转移酶作用下缩合生成4-(5-焦磷酸胞苷)-2-甲基-D-赤藓醇。5′-焦磷酸胞苷-2-甲基-D-赤藓醇激酶催化-4-二磷酸胞苷-2-甲基-D-赤藓醇（CDP-

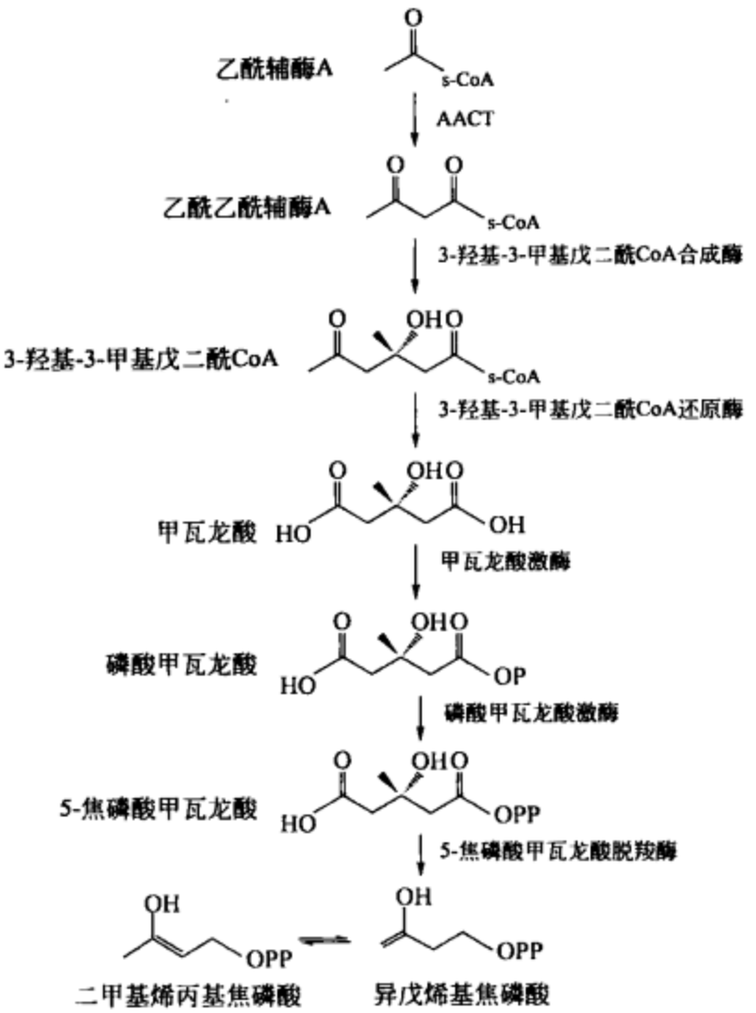


图 2.4-3　甲瓦龙酸途径过程示意

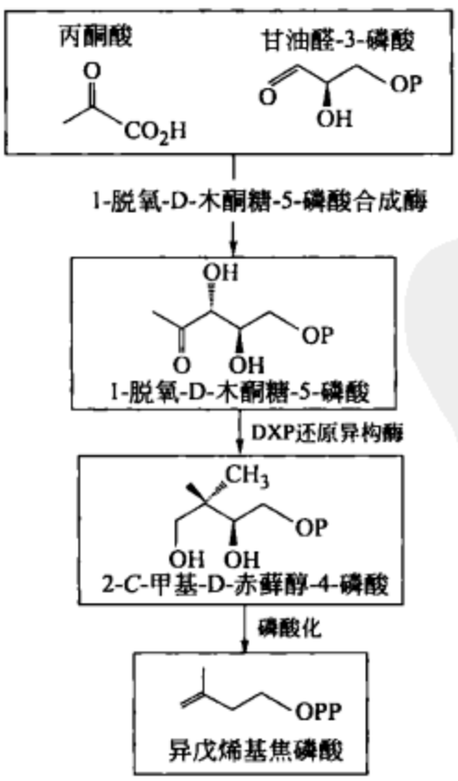


图 2.4-4　DXP 途径过程示意

ME）的磷酸化生成4-(5′-焦磷酸胞苷)-2-甲基-D-赤藓醇-2-磷酸（CDP-MEP）。4-(5′-焦磷酸胞苷)-2-甲基-D-赤藓醇-2-磷酸在2-甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸合成酶作用下转化为2-甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸。1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸途径上最后两步反应是羟甲基丁烯基-4-磷酸合成酶催化2-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸（ME-cPP）生成（*E*)-4-羟基-3-甲基-2-丁烯基-焦磷酸（HMBPP），（*E*)-4-羟基-3-甲基-2-丁烯基-焦磷酸在异戊烯基焦磷酸/二甲基烯丙基焦磷酸合成酶作用下转化为异戊烯基焦磷酸和二甲基烯丙基焦磷酸（5∶1）。

（4）紫杉醇二萜前体的环化和修饰

① 紫杉醇20碳前体骨架香叶基香叶基焦磷酸（GGPP）的生物合成。见图2.4-5所示，香叶基香叶基焦磷酸是所有二萜类化合物的共同前体，它的生物合成是由香叶基香叶基焦磷酸合成酶（GGPPS）催化，将15碳的FPP和5碳的IPP缩合生成20碳的香叶基香叶基焦磷酸。紫杉醇的三环碳骨架是由通用的二萜前体(*E*,*E*,*E*)-香叶基香叶基焦磷酸环化而来，香叶基香叶基焦磷酸的前体法尼基焦磷酸（FPP）和异戊烯基焦磷酸（IPP）在香叶基香叶基焦磷酸合成酶的作用下生成香叶基香叶基焦磷酸。

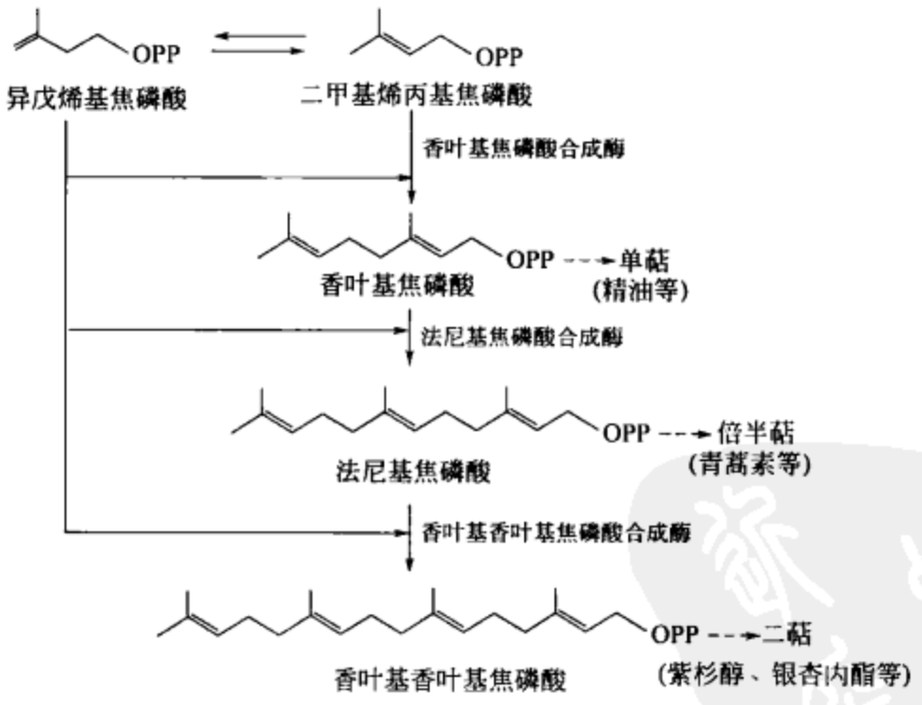


图2.4-5　紫杉醇二萜骨架香叶基香叶基焦磷酸的生物合成

② 紫杉二烯合成酶催化香叶基香叶基焦磷酸环化生成紫杉二烯。见图2.4-6所示，紫杉二烯合成酶（Taxadiene synthase，TS）是紫杉醇生物合成途径上的又一个定位于质体的酶，它催化香叶基香叶基焦磷酸的环化而生成紫杉二烯［taxa-4(5),11(12)-dime］。由于这一步反应是生成紫杉烷类化合物独特的骨架结构而成为紫杉醇生物合成途径中的限速步骤。

③ 紫杉二烯官能化形成紫杉醇。见图2.4-7所示，紫杉二烯经过一系列的氧化、乙酸化和最后一步的苯丙氨酸氨基变位反应生成紫杉醇。

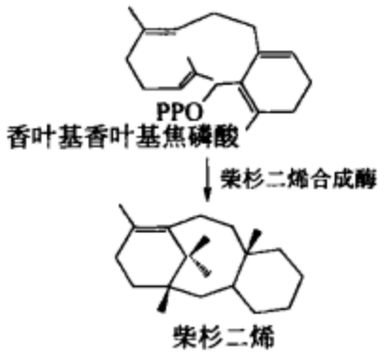


图 2.4-6　香叶基香叶基焦磷酸在紫杉二烯合成酶作用下环化生成紫杉二烯

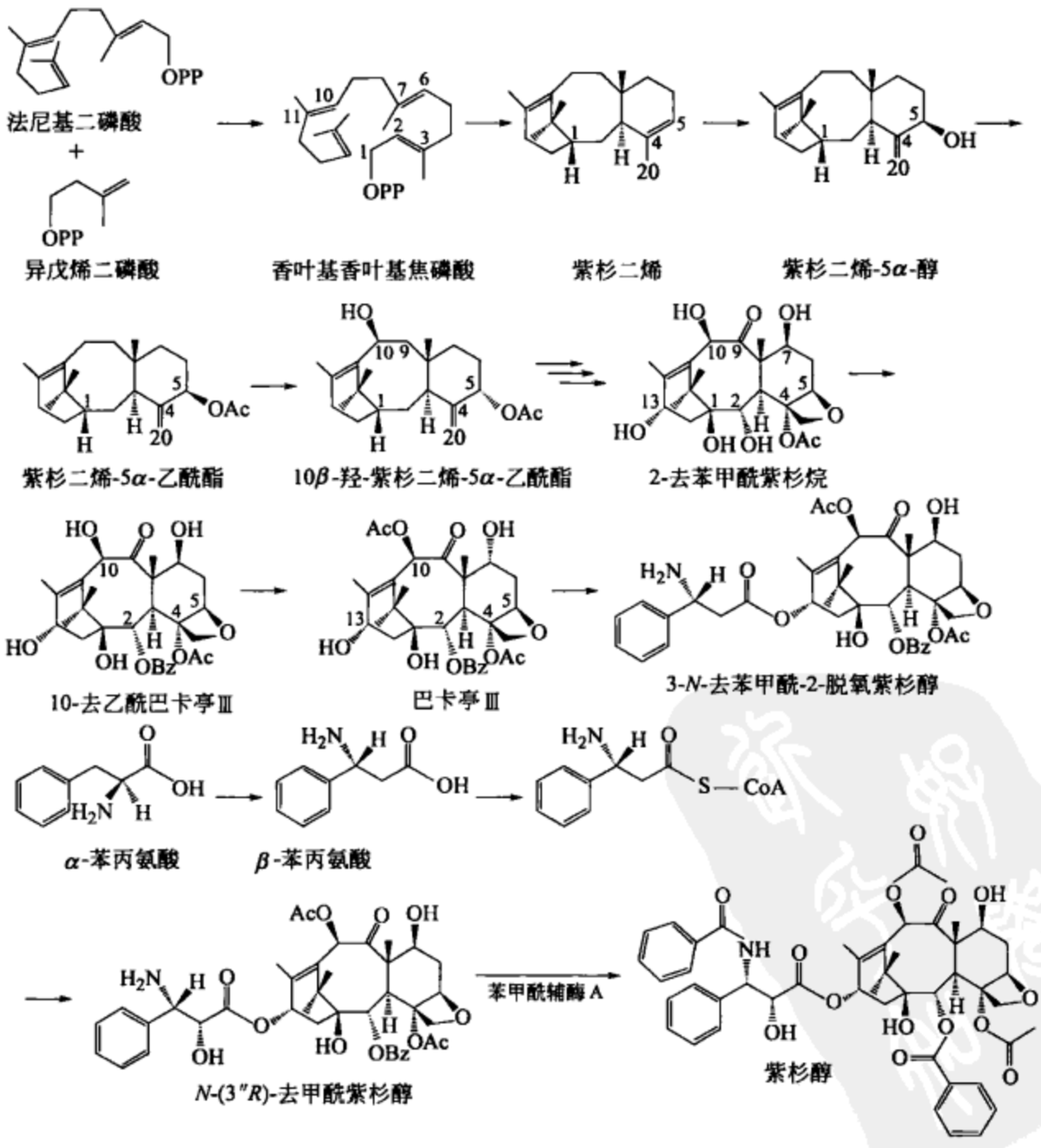


图 2.4-7　紫杉二烯修饰形成紫杉醇

④ 紫杉醇（Taxol）的微生物转化修饰。从紫杉醇的生物合成途径可以看出母核 $C_5\alpha$、$C_{10}\beta$、$C_{13}\alpha$ 的羟化以及 C_2、C_7 的羟化是紫杉醇合成的关键修饰反应，如

果从天然产物或化学合成的方法得到紫杉烷母核，那么就能用相应的内生菌转化得到紫杉醇。如紫杉醇的半合成是从天然红豆杉针叶中提取分离10-去乙酰巴卡亭Ⅲ（10-deacetylbaccatin Ⅲ）或巴卡亭Ⅲ（baccatin Ⅲ）原料，通过选择性保护7位羟基，然后再酰化10位羟基，得到7位保护的巴卡亭Ⅲ，然后与侧链缩合，最后去掉保护基团得到紫杉醇，对这一步修饰反应完全可以用内生菌转化得到；亦或者对紫杉醇进行修饰，从而得到活性更高的新化合物。如用铜绿假单胞菌AS1.860对紫杉醇进行微生物转化产生了三种化合物：巴卡亭Ⅲ、巴卡亭Ⅴ、10-去乙酰巴卡亭Ⅲ，其转化过程见图2.4-8所示。

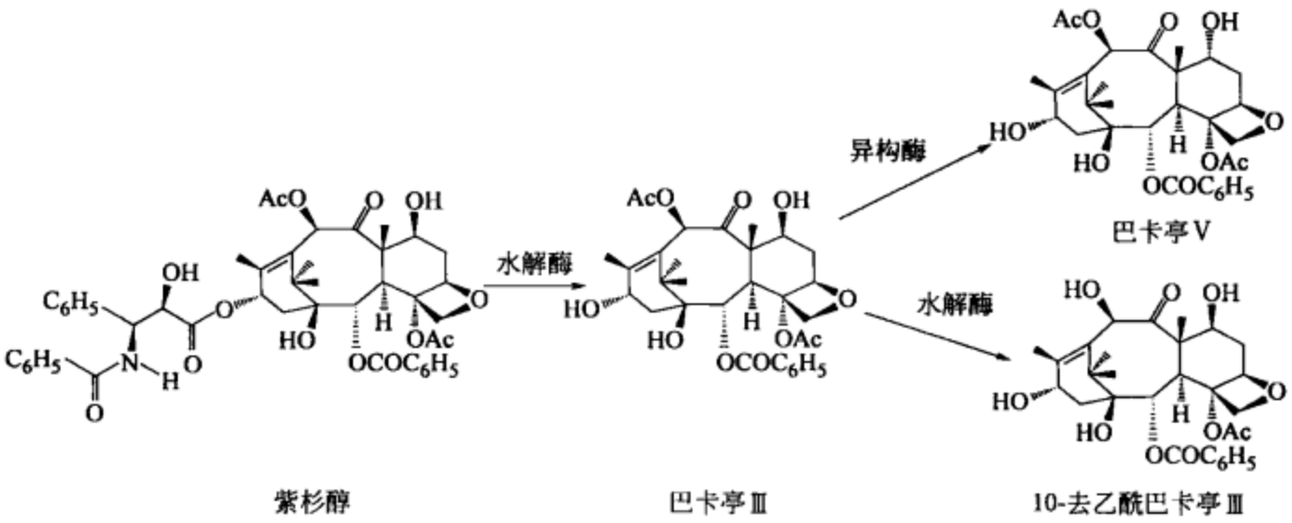


图2.4-8　铜绿假单胞菌AS1.860对紫杉醇的生物转化

对于紫杉醇这类三萜类成分的转化主要包括羟基化、水解、酰基化、重排、环氧化等。紫杉醇6位上的羟基化是最容易发生的，而且羟基化反应总是在6α位上，立体选择性很高，同时，紫杉醇在人体中的主要代谢物也是6α-羟基紫杉醇；其次，紫杉醇9位上的羟基化也较易发生，如图2.4-9所示。

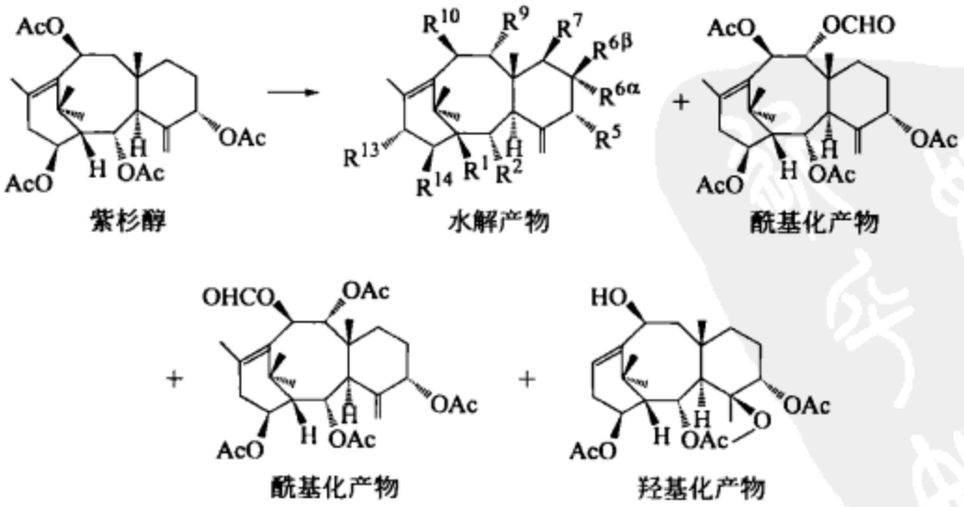


图2.4-9　紫杉醇这类三萜类成分的转化反应

紫杉烷类骨架上的多个位置都可以被羟基化，其中1β、7β、9α、13α羟基化是合成活性紫杉烷类化合物非常重要的反应。羟基化反应亦可发生在紫杉烷的环状骨

架以外，如17位、20位、10位酰基侧链以及3′-苯基对位的羟基化反应。尽管化合物有多个酰氧基可被水解，但生物转化总是能选择性地水解掉其中的一个或几个酰基。就紫杉烷类成分sinenxan A而言，10β和5α位的酰氧基最易被水解去掉酰基，2α位的乙酰氧基是较稳定的。张君增等从云南红豆杉树皮内分离出的微生物中发现3株具有转化天然紫杉烷类化合物的能力，其中内生真菌（*Microsphaeropsis onychiuri* Punith）和毛霉（*Mucor* sp. v. Tiegh.），都可水解10-去乙酰-7-表紫杉醇的13位侧链并可使7位羟基差向异构化，而链格孢（*Alternaria alternata* Keissler）则在1β-羟基巴卡亭Ⅰ的不同位置进行水解。为了获得更多的紫杉醇半合成前体，分别从白色诺卡菌［*Nocardia alba*（Krasil nikov）Waksman］SC13911和腾黄类诺卡菌（*Nocarda lutea* Castellani&Chalmers）SC13912中分离出C13侧链水解酶和C10乙酰水解酶，用此两种酶作用于红豆杉粗提物，可使10-去乙酰巴卡亭Ⅲ这一紫杉醇的关键半合成中间体的产量提高4～24倍。酰化反应在普通的转化系统中较少见，但它对紫杉烷类化合物非常重要，特别是C13位侧链的酰化和C5、C7、C10等位长的疏水侧链的酰化反应。有趣的是，酰基水解酶在特定的条件下也是酰化酶。将腾黄类诺卡菌产生的脱C10乙酰酶固定化，以乙烯基乙酸酯为供体，可将10-去乙酰巴卡亭Ⅲ转化成巴卡亭Ⅲ[91]。其转化反应见图2.4-10所示。



10-去乙酰巴卡亭Ⅲ　　巴卡亭Ⅲ

图2.4-10　腾黄类诺卡菌对10-去乙酰巴卡亭Ⅲ的转化反应

2.4.3.2　其他萜类的合成与修饰

雷公藤甲素和雷公藤内酯酮是中药雷公藤（*Tripterygiumwilfordii* Hook. f.）中的主要二萜类活性化合物。大量研究报道表明雷公藤甲素可有效地治疗自身免疫性疾病和具有较强的抗白血病和抗肿瘤活性。但由于雷公藤甲素和雷公藤内酯酮的毒副作用较大，使它们的应用受到了限制。为了得到活性更好、毒副作用更小的新的活性化合物，一直在寻找有效的方法对这类化合物进行结构修饰和改造。

天然药物雷公藤的主要成分雷公藤甲素和雷公藤内酯酮均为二萜类成分，从目前文献报道的转化产物来看，对于这两种成分的转化主要以羟基化为主，如宁黎丽等利用短刺小克银汉霉（*Cunninghamella blakesleana* Lendn.）AS3.970对雷公藤甲素进行生物转化，得到了7个产物：5α-羟基雷公藤甲素、19α-羟基雷公藤甲素、

19β-羟基雷公藤甲素、雷公藤乙素（2β-羟基雷公藤甲素）、16-羟基雷公藤甲素、雷醇内酯（15-羟基雷公藤甲素）和1β-羟基雷公藤甲素均为羟基化产物[92]。宁黎丽等同时利用黑曲霉（*Aspergillus niger* v. Tiegh）AS3.739对雷公藤内酯酮进行转化分离并鉴定了4个产物（如图2.4-11所示），分别是17-羟基雷公藤内酯酮、16-羟基雷公藤内酯酮、5α-羟基雷公藤内酯酮、雷公藤甲素。对于雷公藤甲素和雷公藤内酯酮的羟基化产物，大多表现出较强的体细胞毒性，但一般较底物低。一直以来，雷公藤甲素和雷公藤内酯酮的低水溶性给其使用带来了很大的不便，对这两种有效成分的羟基化，也在一定程度上增强了其水溶性。

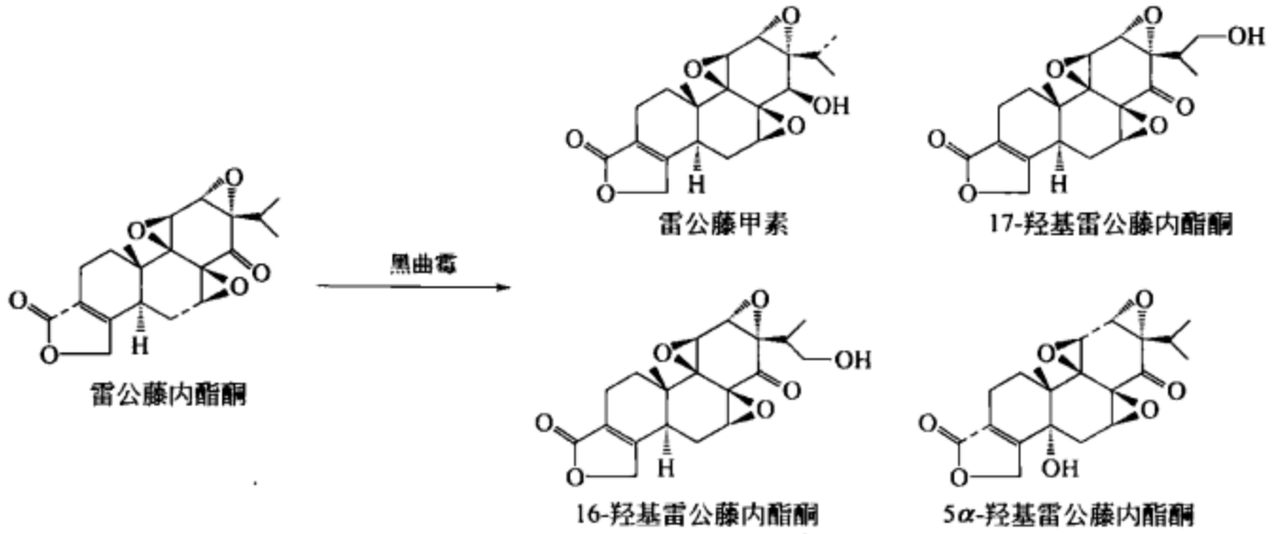


图2.4-11　黑曲霉AS3.739对雷公藤内酯酮转化反应

对于青蒿素的转化，主要以羟基化为主，如占纪勋等从21株微生物中筛选出黑曲霉（*Aspergillus niger* v. Tiegh）AS3.793、刺孢小克银汉霉［*Cunninghamella echinulata*（Thaxt.）Thaxt］AS3.340、多型孢毛霉（*Mucor polymorphosporus* Pispek）AS3.3443、华根霉（*Rhizopus chinensis* Saito）CICC3043和雅致小克银汉霉（*Cunninghamella elegans* Lendn.）AS3.1207等6株微生物对青蒿素（Aemiainin）进行生物转化，共得到6个产物，分别是去氧青蒿素、3α-羟基去氧青蒿素、1α-羟基去氧青蒿素、10β-羟基青蒿素、9β-羟基青蒿素和3β-羟基青蒿素。从目前报道的转化产物来看，以单个位点的羟基化为主，两个位点甚至三个位点的羟基化很少见。羟基化的位点包括1α、3α、3β、4α、6β、7α、7β、9α、9β、10β。也有些微生物能够在青蒿素的过氧桥上去掉一个氧原子，生成去氧青蒿素。如Lee等发现珊瑚色诺卡菌［*Nocardia corallina*（Bergey et al）Waksman & Henrici］ATCC19070转化青蒿素可以得到去氧青蒿素。除此之外，少数微生物也可以在青蒿素分子上引入其他基团，如Liu等发现灰色链霉菌ATCC13273可以在青蒿素的9位上引入一个酮基，生成青蒿素的酮基衍生物[93]，其转化路线见图2.4-12所示。

青蒿素某些位点基团的异构化也是一种常见的现象，如黑曲霉能够将青蒿素的11位甲基由原来的β构型变为α构型[94]。齐墩果酸（Oleanolic Acid）也是一种五环三萜类化合物，在常用的中药，如丁香、大枣、西洋参、青叶胆、枇杷叶、人

参、女贞子、甘草、雪胆、白花蛇舌草等当中都含有齐墩果酸。Zhang 等[95]利用诺卡菌 NRRL-5646 转化齐墩果酸等五环三萜类化合物产生了相应的甲酯衍生物，其转化路线见图 2.4-13 所示。

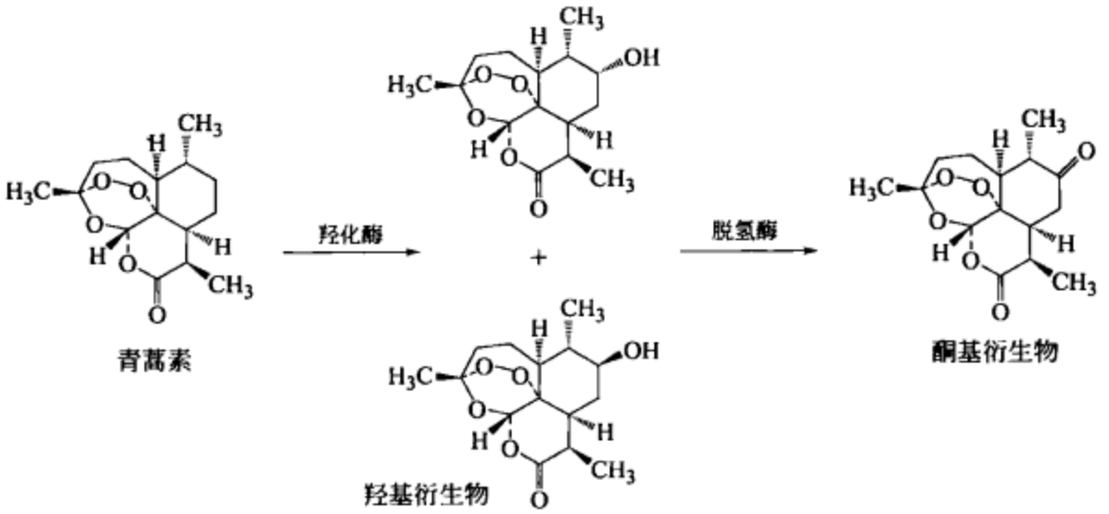


图 2.4-12　灰色链霉菌 ATCC13273 对青蒿素的转化反应

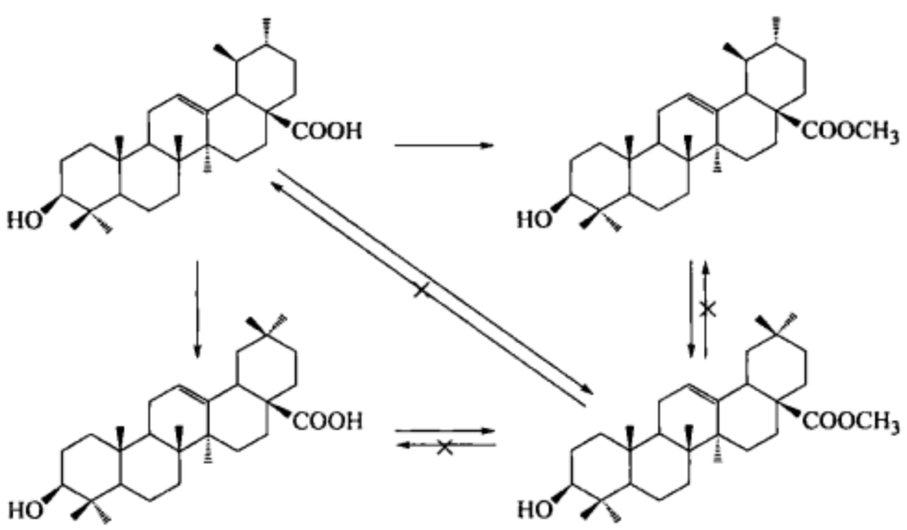
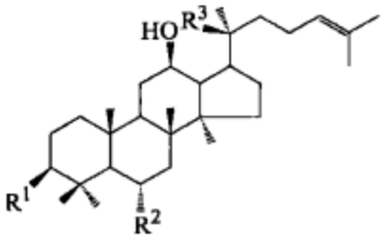


图 2.4-13　诺卡菌 NRRL-5646 转化五环三萜类化合物（齐墩果酸）

2.4.4　皂苷类成分的微生物转化修饰

皂苷是人参的主要活性成分，是由糖和苷元连接而成的糖苷类化合物，属于三萜类皂苷。按照苷元结构可分为三类：一类是齐墩果烷型五环三萜皂苷，皂苷元为齐墩果酸；另两类是达玛烷型的四环二萜皂苷，它们在人参皂苷中占大多数，是人参的主要活性成分之一。依据苷元的不同，可将达玛烷型四环三萜皂苷分为原人参二醇型皂苷，如 Rb-Rb2、Rd、Rc、Rh2、CRgS，及人参三醇型皂苷，如 Re、Rg、Rgz、Rh 等，其中人参皂苷 Ra、Rb、Rd、Re 含量较高，人参皂苷 Rg、Rg3、Rg5、Rh、Rh2、Rh3 含量极少，为稀有人参皂苷。部分皂苷的结构式见图 2.4-14 所示。

如图 2.4-15 所示，皂苷在体内经微生物的作用，糖苷键逐步断裂，将连接在



人参皂苷的结构式

人参皂苷	R^1	R^2	R^3
Rb1	-O-Glc-Glc	-H	-O-Glc-Glc
Rg2	-OH	-O-Glc-Rha	-OH
Re	-OH	-O-Glc$^{2-1}$Rha	-O-Glc
Rg1	-OH	-O-Glc	-O-Glc
Rh1	-OH	-O-Glc	-OH
Rd	-O-Glc-Glc	-H	-O-Glc
F2	-O-Glc	-H	-O-Glc
Rh2	-O-Glc	-H	-OH
Rg3	-O-Glc-Glc	-H	-OH
复合物 K	-OH	-H	-O-Glc

图 2.4-14　部分皂苷的结构式

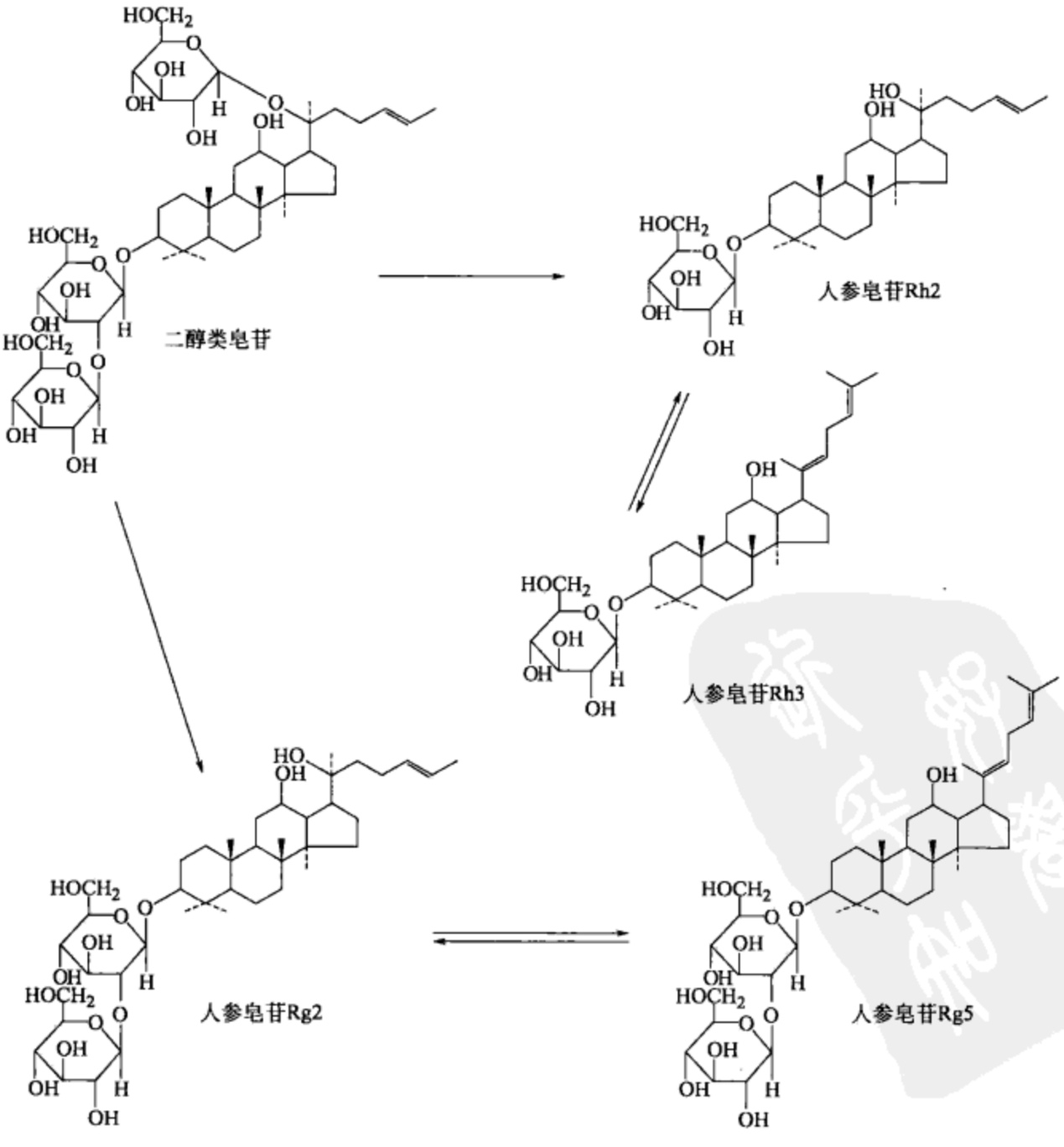


图 2.4-15　二醇系人参皂苷的转化（1）

C_3、C_6 或 C_{20} 位的糖逐步从末端降解下来，经由一些中间产物最终形成复合物 K 或 20（S）原人参二醇［20（S）PPt］，同时复合物 K 也可以进一步降解成 20（S）原人参二醇，来发挥其治疗活性。由此可见，人参皂苷分子中的糖基与其生物活性有着密切的关系，特别在抗肿瘤活性方面，人参二醇型皂苷 C3 和 C20 位侧链所连接糖基的数目和位置影响更加显著。二醇系人参皂苷的转化，通常认为是由 β-葡萄糖苷酶水解侧连糖基而得目标产物，用微生物发酵法对人参皂苷 Rg1 进行转化研究，其转化产物为人参皂苷 Rh1，反应机理见图 2.4-16 所示。

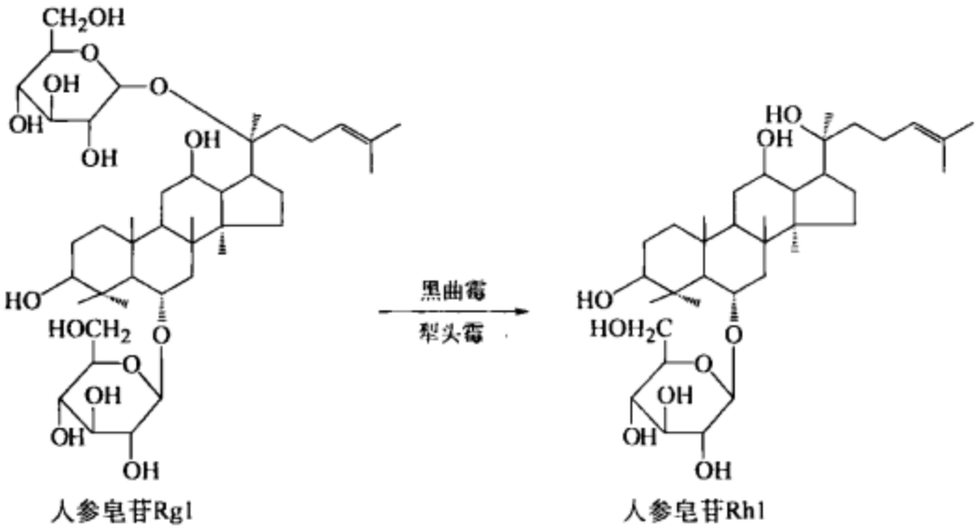


图 2.4-16　人参皂苷 Rg1 转化为 Rh1 反应路线

能进行人参皂苷转化的微生物主要有曲霉属、根霉属、毛霉属、红曲霉属等霉菌和细菌，见表 2.4-1 所示。近年来研究最多的是小型丝状真菌黑曲霉。而二醇系人参皂苷的转化，通常认为是由 β-葡萄糖苷酶水解侧连糖基而得目标产物，不同的微生物水解的位点不同，水解的糖基数目不同，得到的产物也不同。如图 2.4-17 所示，能够在人参皂苷 Rb1 20 位上水解一个末端糖基生成人参皂苷 Rd 的微生物较多，如肠杆菌属、匍枝根霉、新月弯孢酶、欧文菌、假单胞菌、拟青霉菌、微杆菌属、点枝顶孢霉、番茄叶霉病原菌、褐孢霉等，而且有些微生物能够特异性地水解人参皂苷 Rb1 的 C20 位的 β-1,6-葡萄糖苷键而生成人参皂苷 Rd，其转化率达到 100%，如番茄叶霉病原菌[107]和褐孢霉[108]等。相对于水解 C20 位的微生物的多样，能够水解其他糖基的微生物相对较少，如疣孢漆斑菌能水解人参皂苷 Rg3 C3 位一个葡萄糖基转变成稀有人参皂苷 Rh2，再进一步水解掉 C3 位另一个葡萄糖基转化成二醇组皂苷元原人参二醇（PPD），或者直接水解人参皂苷 Rg3 C3 位的两个葡萄糖基直接变成皂苷元原人参二醇[109]。如图 2.4-18 所示，有些微生物能够在水解人参皂苷 Rb1 C20 位末端一个糖基的基础上，再水解 20 位和（或）3 位的一个糖基，如匍枝根霉水解人参皂苷 Rb1 C20 位末端糖基之后，还可以继续水解 20 位和 3 位的糖基，最终得到人参皂苷 Rh2[110]，对于三醇型皂苷的转化，目前报道的不多，其原理同样是水解糖苷键，如董阿玲等报道的黑曲霉 3.1858 和蓝色犁头霉 3.3538 对人参皂苷 Rg1 能水解其 20 位的糖基，生成人参皂苷 Rh1。同样能水解三醇型皂苷的还有犁头霉（*Absidia*. sp. blakesleeana Lendner）[111]以及真菌

表 2.4-1　人参皂苷转化的微生物及药物类型[96～106]

微　生　物	转化底物	转化产物
黑曲霉 848	人参二醇系皂苷(PDS)	人参皂苷 Rh2、Rh3
黑曲霉 48g	人参皂苷 Rg3	人参皂苷 RhS、Rh2
黑曲霉 8488	人参皂苷 Rg3	人参皂苷 Rh2
烟曲霉	人参皂苷 Rb1	GRb1
黑青霉	京尼平苷	京尼平
卷枝毛霉	人参二醇系皂苷	PPd
异常毕赤酵母	人参二醇系皂苷	CK
土壤分离微生物	人参总皂苷	人参皂苷 Rh2、CK
蓝色犁头霉 3.3538	人参皂苷 Rg1	人参皂苷 Rh1
犁头霉 F7	人参皂苷 Rb1	人参皂苷 Rd1
EST-Ⅰ和 EST-Ⅱ(真菌)	人参皂苷 Rg1	人参皂苷 F1
a 疣孢漆斑菌	人参皂苷 Rg3	人参皂苷 Rh2、PPd
节杆菌 红假单胞菌	原人参二醇	人参皂苷 Rg3、人参皂苷 Rh2、CK
罗思河小杆菌属	原人参二醇	人参皂苷 Rd
土壤分离微生物	SFPG	CK
曲霉 M14	人参皂苷 Rb1	人参皂苷 Rd、人参皂苷 F2、CK

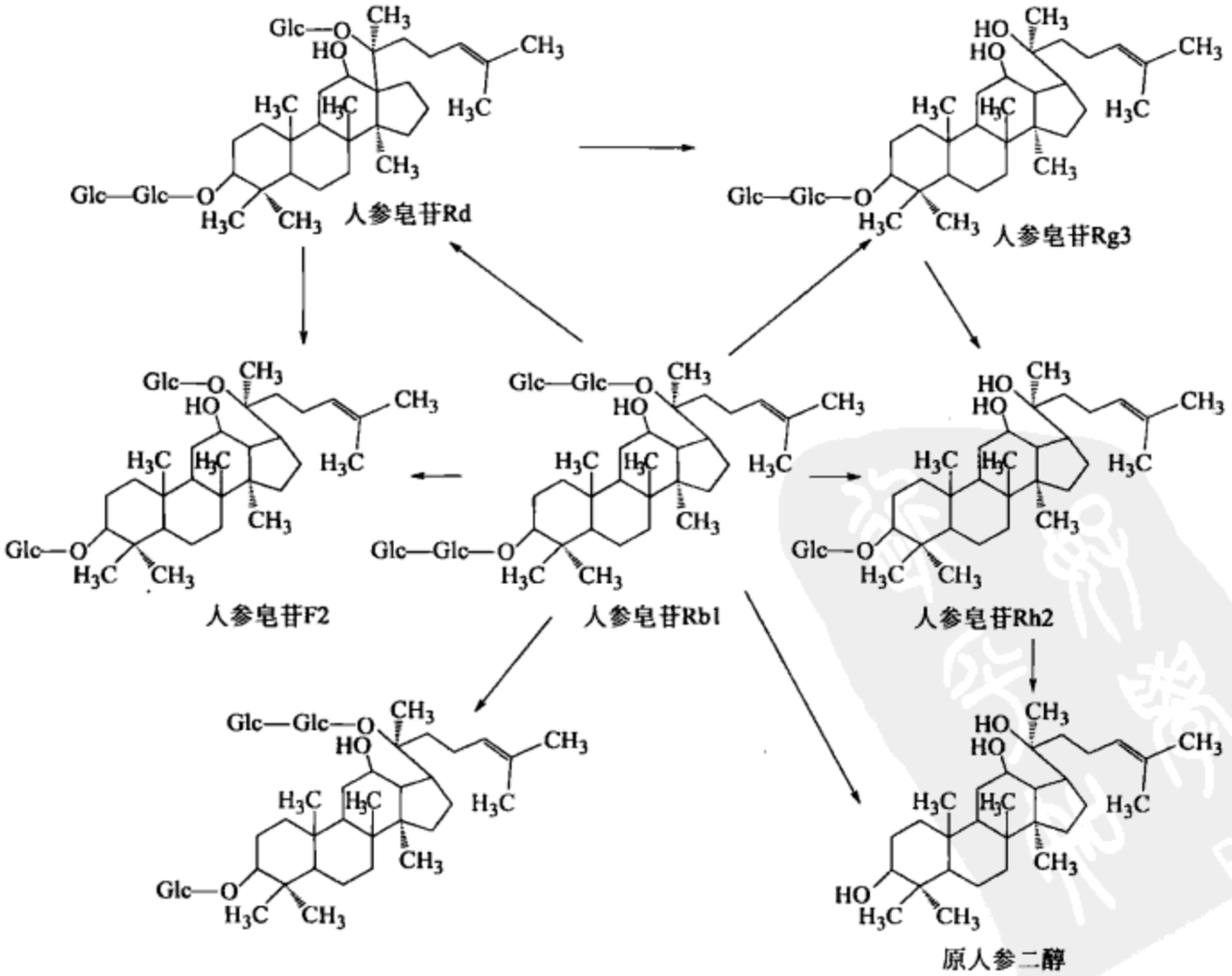


图 2.4-17　二醇系人参皂苷的转化（2）

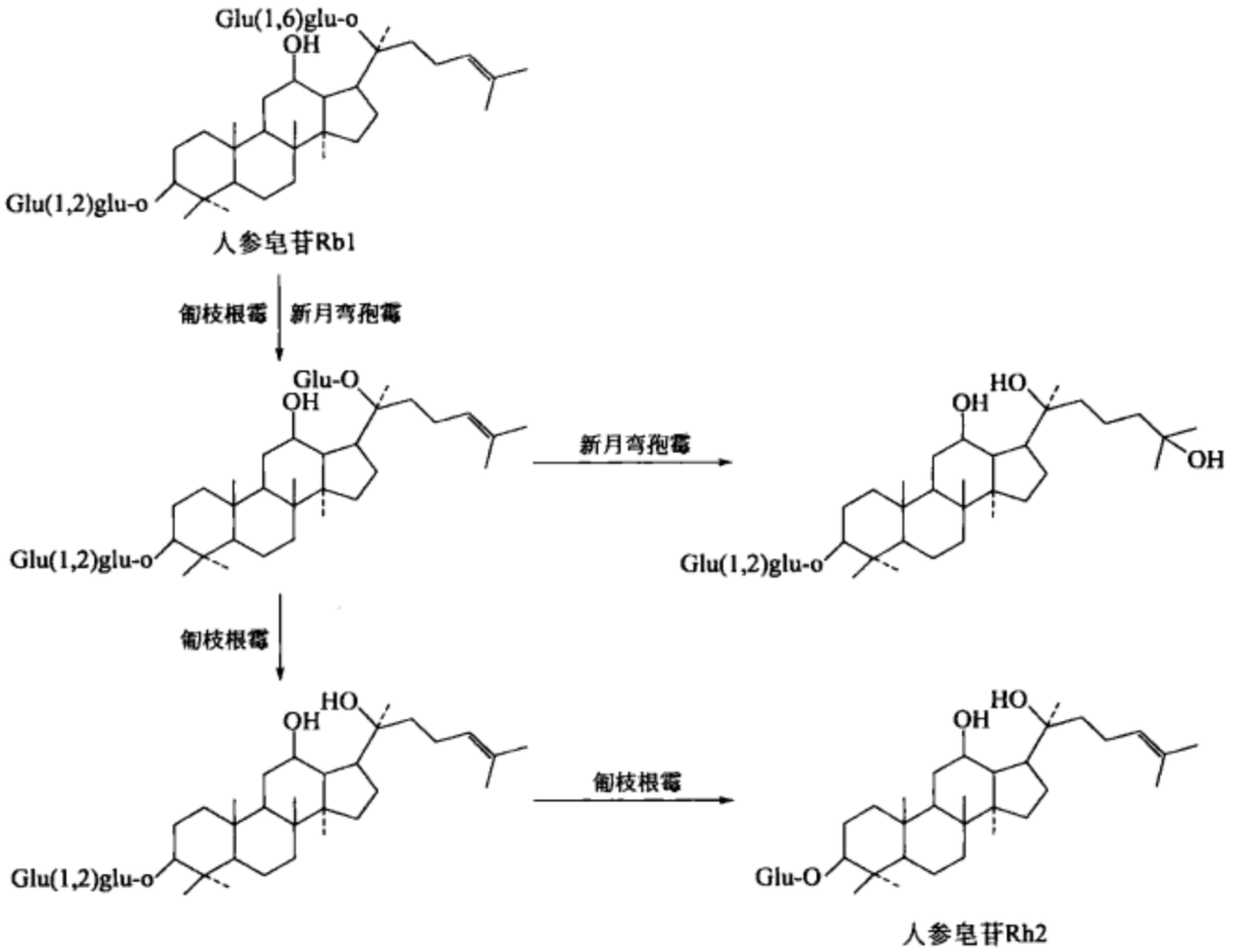


图 2.4-18　二醇系人参皂苷的转化路线

EST-Ⅰ和 EST-Ⅱ[112]等，它们分别产生人参皂苷-α-鼠李糖苷酶和 β-葡萄糖苷酶，从而将人参皂苷 Re、Rg 16 位的鼠李糖、葡萄糖水解得到人参皂苷 Rg1、F1。

重楼皂苷Ⅴ（化合物Ⅰ）和重楼皂苷Ⅵ（化合物Ⅱ）为重楼根茎中的甾体皂苷类化合物，分别由薯蓣皂苷元（diosgenin）和偏诺皂苷元（pennogenin）的 C3 位与 1 分子葡萄糖相连，如图 2.4-19 所示，葡萄糖的 2 位再和一分子鼠李糖连接成苷，冯兵等利用新月弯孢霉将这两种化合物 C3 位末端的鼠李糖基水解掉，转化为相应的单糖基皂苷。全波等在利用米曲霉对穿山龙中水溶性总皂苷进行转化时，从转化产物中分离制备出 11 个甾体皂苷类化合物，米曲霉对甾体皂苷主要有三种转化反应类型：①呋甾皂苷在保留 C26 位葡萄糖的基础上，选择性水解 C3 位糖链中 1→2 连接的鼠李糖；②水解 C22 位羟基，生成相应的含有 C20（22）位双键的呋甾皂苷；③水解 C26 位葡萄糖，生成相应的螺甾皂苷[113]。

三七皂苷大多数为达玛烷型的 20（S）-原人参二醇型和 20（S）-原人参三醇型，田翠[96]通过对筛选的一株黑曲霉菌株 sq13 转化三七的产物进行研究发现，sq13 转化三七皂苷与人参皂苷产物类似，同样存在人参皂苷 Rg1-人参皂苷 Rh1、原人参三醇 Ppt 以及人参皂苷 Rb1-人参皂苷 Rd-人参皂苷 F、复合物 K 和原人参二醇（Ppd）这两条转化途径。

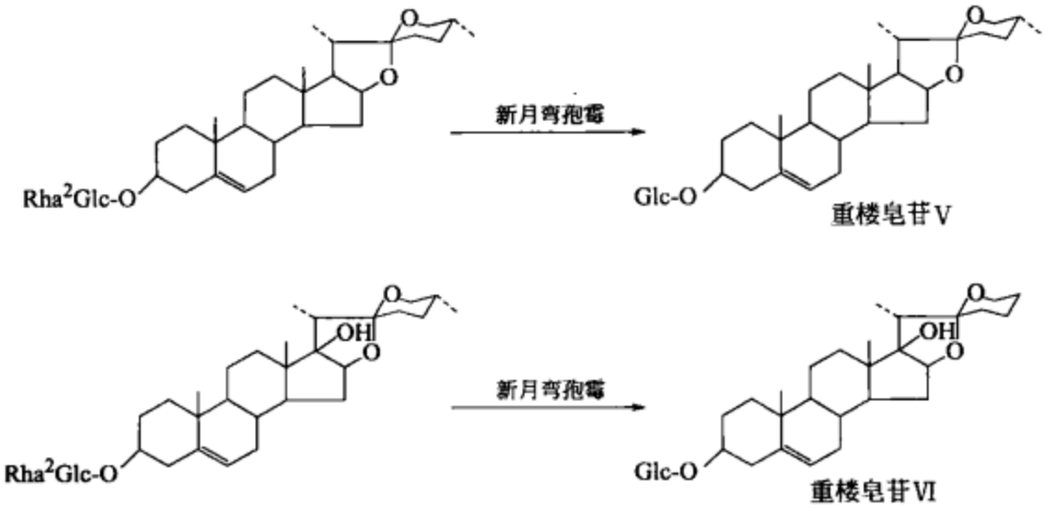


图 2.4-19　重楼皂苷 V 和重楼皂苷 Ⅵ 生成路线

2.4.5　香豆素类成分的微生物修饰

香豆素最早是由豆科植物香豆（*Coumarounaodorata* aubl）中提取的产物，故名香豆素。从结构上看，它是邻羟基桂皮酸的内酯。香豆素的母核为苯骈 α-吡喃酮，但苯环上常有羟基、烷氧基、苯基、异戊烯基等取代基，因此，根据其结构特征可分为四大类，即简单香豆素类、喃喃香豆素类、吡喃香豆素类及其他香豆素类[97]。香豆素的结构见图 2.4-20 所示。一般认为香豆素是二氢香豆素的天然前体，在植物白花草木樨（*Melilotus alba*）中，香豆素先通过加成反应生成二氢香豆素，然后再水解生成黄木樨酸（邻羟基苯丙酸），在真菌茄病镰孢［*Fusarium solani*（Mart.）Sace］和假单胞菌菌株中也是同样的转化途径[105,106]，见图 2.4-21所示。

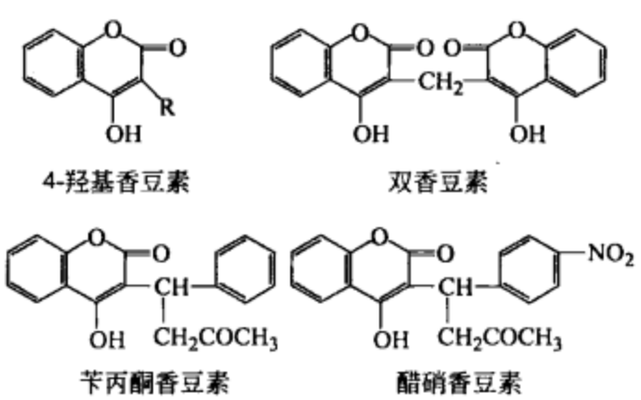


图 2.4-20　香豆素的结构

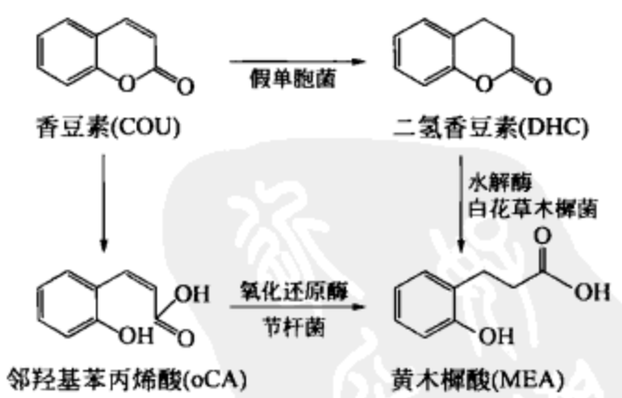
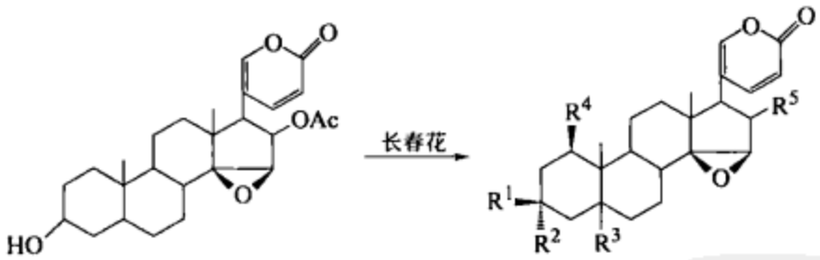


图 2.4-21　茄病镰孢和一种假单胞菌转化株香豆素路线

2.4.6　生物碱类成分的生物转化

在生物体内，含氮碱基的有机化合物，能与酸反应生成盐类，将此类化合物称为生物碱，但不包括氨基酸、蛋白质、卟啉、胆碱甲胺等开链的简单脂肪胺。它是

一类存在于生物（主要是植物）体内、对人和动物有强烈生理作用的含氮的碱性物质。生物碱的分子构造多数属于仲胺、叔胺或季铵类，少数为伯胺类。它们的构造中常含有杂环，并且氮原子在环内。生物碱常常是很多中草药中的有效成分，例如，麻黄中的平喘成分麻黄碱、黄连中的抗菌消炎成分小檗碱（黄连素）和长春花中的抗癌成分长春新碱等。喜树碱（Camptothecin，CPT）是从中国珙桐科植物喜树中分离得到的一种生物碱，同喜树碱相比，10-羟基喜树碱对多种癌症具有明显的疗效，且毒副作用低，是各种天然的或合成的 CPT 类似物中活性最高的一种，因此，对喜树碱的微生物转化研究重点在于将喜树碱转化为 10-羟基喜树碱。朱殿生等[114]从 11 株菌株中筛选得到毛霉和禾谷镰刀菌，其能够将喜树碱转化为 10-羟基喜树碱。此外，*Phomopsis acuminata* 对盐酸罂粟碱、硫酸长春碱等天然活性产物具有转化能力。采用植物细胞悬浮体系对底物进行转化，从而得到新的产物。如叶敏等[115]利用长春花［*Catharanthusro-seus*（Linn.）G. Don］细胞悬浮体系对中药蟾酥中的有效成分华蟾毒精（cinobufagin）进行了研究，获得了 3-氧代-去乙酰蟾酥毒基-16-*O*-D-葡萄糖苷、蟾酥毒基-3-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、去乙酰蟾酥毒基-16-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、3-环氧基-去乙酰蟾酥毒基-16-*O*-D-葡萄糖苷 4 个糖苷化产物（如图 2.4-22 所示）。这些糖苷化产物均为首次报道的华蟾毒精衍生物，大部分转化产物都有足够的量进行生物活性研究。由游离的悬浮培养细胞组成的转化体系具有直接使用前体、无细胞转移限制、不存在影响细胞活力和生理状态的介质等优点，可以弥补传统的有机合成和微生物转化的不足。但是，其也有自身难以克服的缺陷，如生物量倍增时间较长，产生酶的种类较少且酶量低微。



1. R^1=O-glc, R^2=R^3=R^4=H, R^5=OAc
2. R^1+R^2=O, R^3=R^4=H, R^5=O-glc
3. R^1=OH, R^2=R^3=R^4=H, R^5=O-glc
4. R^1=R^3=R^4=H, R^2=OH, R^5=O-glc

图 2.4-22　华蟾毒精及其在长春花的糖苷化产物

藜芦（*Veratrumnigrum*）系百合科多年生草本植物，在《神农本草经》及《本草纲目》中均有记载。藜芦总生物碱对高血压、中风、癫痫、骨折都有治疗作用。Lu[116]对藜芦总生物碱中另一种成分 Vermitaline 进行了微生物转化，在刺孢小克银汉霉［*Cunninghamella echinulata*（Thaxt.）Thaxt］ACCC30369 的发酵液中发现了 5 种成分，分别是：①红藜芦碱；②7*α*-羟基红藜芦碱；③ 7*α*-羟基红藜芦碱 7-*O*-*β*-D-半乳糖苷；④ 7*α*-hydroxy vermitaline；⑤7*α*-hydroxyvermitaline-7-*O*-*β*-*d*-galactoside，其结构式见图 2.4-23 所示。

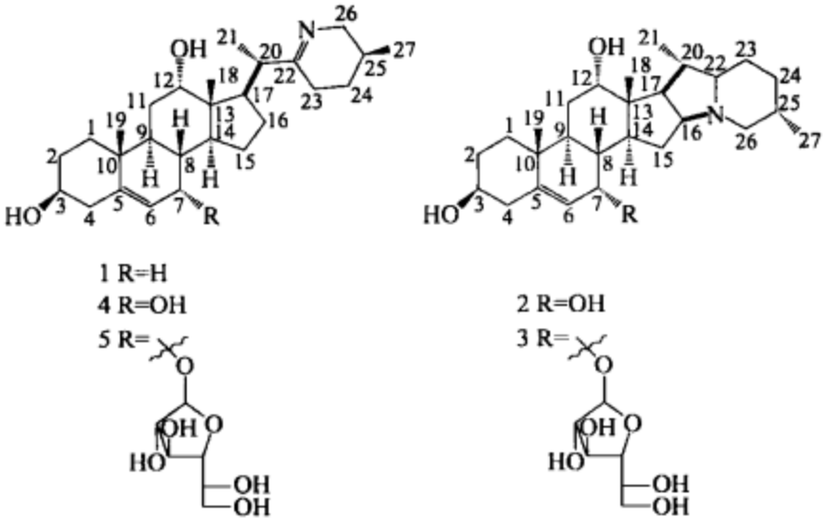


图 2.4-23　刺孢小克银汉霉 ACCC30369 对 Vermitaline 的转化

2.5　微生物转化在提高天然药物水溶性研究中的应用

利用微生物的催化反应对中药有效成分进行结构修饰，主要是利用微生物产生的代谢酶系多样的特点，对中药的有效成分进行结构修饰，从而得到各种产物，并从中筛选水溶性较高且活性强的药物。由于羟基是典型的水溶性基团，且羟基化在微生物转化中尤为常见，因此，目前得到的水溶性提高的产物大多是羟基化的产物。除此之外也有一些糖基化的产物等。莪术油是中药莪术的主要化学成分，其作为抗癌和抗病毒药物已广泛应用于临床，莪术醇（curcumol）为莪术油主要药效成分之一，莪术醇因其水溶性差，易溶于乙醇、丙酮、氯仿等极性相对较小的有机溶剂，长期以来一直不能作为临床用药。孙敏鸽等人[117,118]采用三种菌种——碳黑曲霉［*Aspergillus carbonarius*（Bain.）Thom］IFFI02087、总状共头霉（*Syncephalastrum racemosum* Cohn.）AS3.264 和荨麻青霉（*Penicilliumurticae*）IFFI04015 对莪术醇进行转化，从微生物对莪术醇的转化产物来看，微生物对莪术醇的修饰位点集中在 1、2、3、4、7、9、10、11、12、14、15 位上，转化产物也以羟基化产物为主，为此，各种产物水溶性增加，除此之外，也有烯、羟甲基、异丙基、甲氧基和环氧基等基团出现。同时，从获得的转化产物中可以看出菌种对化合物具有较强的位点选择性和立体选择性，表现出定向转化的能力。其中转化产物 4α-羟基莪术醇（4α-hydroxycurcumol）为新化合物，3α-羟基莪术醇（3α-hydroxycurcumol）是碳黑曲霉、荨麻青霉对莪术醇共同的转化产物，4α-羟基莪术醇（2α-hydroxycurcumol）是碳黑曲霉和总状共头霉对莪术醇共同的转化产物。由此，推测其可能的转化途径是化合物 CA-1～CS-5，CP-7 和 CP-8 是真菌氧化酶对莪术醇进行氧化的产物。化合物 CS-6 也可能是在真菌氧化酶的作用下，发生 9 位羟基化形成 9α-羟基莪术醇（9α-hydroxycurcumol），真菌培养液酸性条件下发生双键移位，形成 9-烯-莪术醇（9-en-curcumol），进而在氧化酶的作用下 14 位发生羟基化，得到转化产物 CS-6。其转化途径见图 2.5-1 所示。

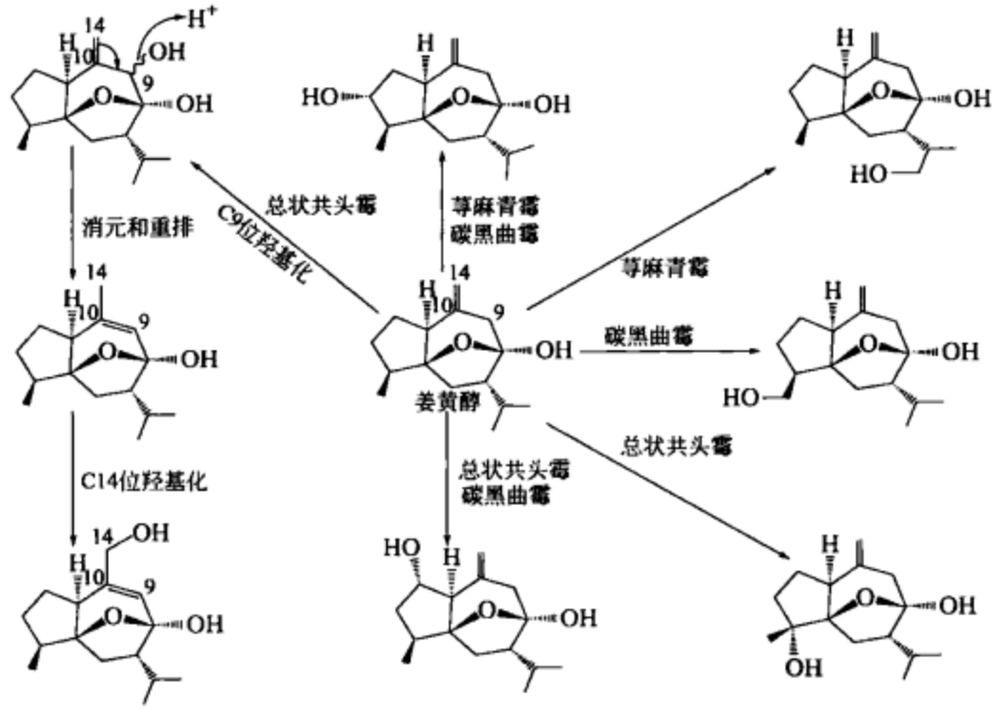


图 2.5-1　碳黑曲霉、苓麻青霉和总状共头霉对莪术醇的转化路线

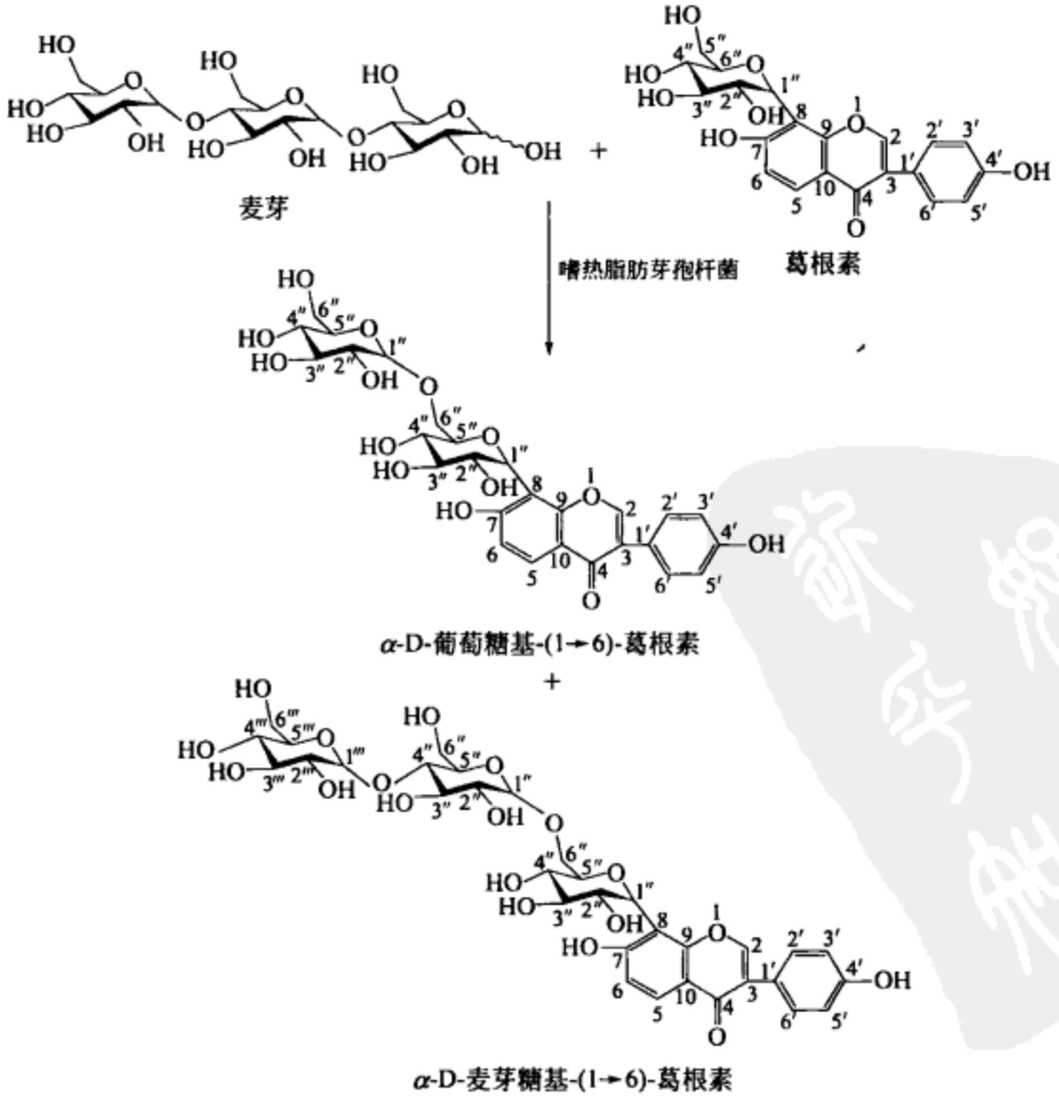


图 2.5-2　嗜热脂肪芽孢杆菌的麦芽糖淀粉酶对葛根素的转化

葛根素是葛根中含量最为丰富的异黄酮，也是葛根的主要有效成分，而开发其口服制剂的难点在于提高葛根素在水中的溶解度，并提高其在体内的生物利用度。为提高其水溶性，Li 等[119]利用嗜热脂肪芽孢杆菌（*Bacillus stearothermophilus* Donk）的麦芽糖淀粉酶（maltogenicamylase）对其进行转化，得到两种主要产物，分别为 α-D-葡萄糖基-(1→6)-葛根素［α-D-glucosyl-(1→6)-puerarin］和 α-D-麦芽糖基-(1→6)-葛根素［α-D-maltosyl-(1→6)-puerarin］，溶解度分别是葛根素的 14 倍和 168 倍。其转化途径见图 2.5-2 所示。

Hui Ye 等[120]从分离自土壤中的 138 株丝状真菌中筛选到一株哈茨木霉（*Trichoderma harzianum*）NJ01，该菌株能够在葛根素的 3 位羟基化产生 3′-羟基葛根素（3′-hydroxypuerarin），其转化路线见图 2.5-3 所示，转化后其溶解度上升 1.8 倍的同时，其活性也提高为葛根素的 20 倍。Jiang 等[121]利用氧化微杆菌（*Microbacteriumoxydans*）CGMCC1788 对其进行转化，获得的两个产物 7-*O*-葡萄糖基葛根素（puerarin-7-*O*-glucoside）和 7-*O*-异麦芽糖基葛根素（puerarin-7-*O*-isomaltoside）的溶解度分别是葛根素的 18 倍和 100 倍。此外，还发现天牛微杆菌（*Microbacteriumsaperdae*）CGMCC1.1906 同样对葛根素具有转化作用。其转化路线见图 2.5-4 所示，不管是对葛根素的羟基化还是糖基化都可以提高葛根素的水溶性，但糖基化后水溶性提高的倍数似乎比羟基化要高，而且加入麦芽糖基的效果比葡萄糖基要好，加入葛根素的糖基数目决定了其衍生物的水溶性。

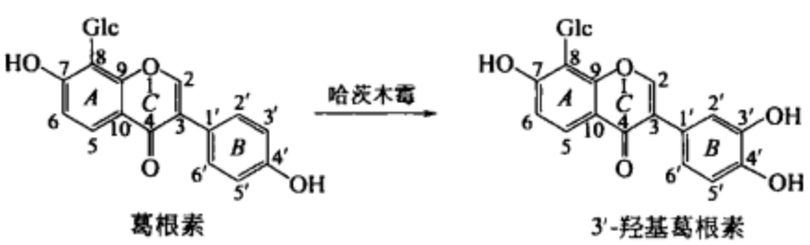


图 2.5-3　哈茨木霉转化葛根素的路线

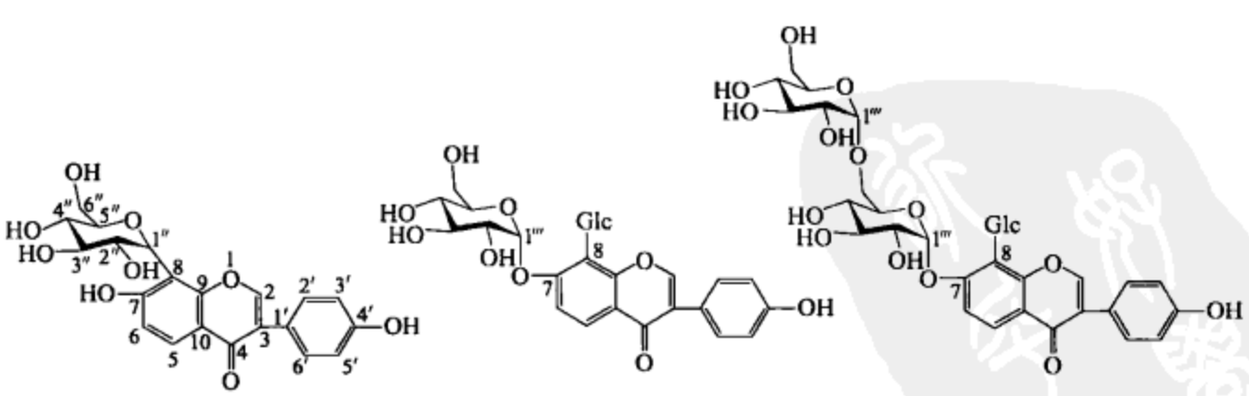


图 2.5-4　天牛微杆菌转化葛根素的糖基化产物

2.6　物体外转化可以作为模型帮助确定药物代谢途径

在研究芳香化合物的微生物羟基化时，Smith 和 Rosazza 注意到微生物代谢物

和哺乳动物代谢产物的相似性，于1974年最先提出了“哺乳动物代谢的微生物模型（microbial models of mammalian metabolism）”的概念[122]，使得微生物转化手段及其研究的思想方法进入到药理学和毒理学的研究领域，推动了药物代谢的研究。其核心内容是“真菌和哺乳动物都是真核细胞生物，因此在主要的生理功能中含有类似的酶的作用机制，所以两者在外源性化合物的代谢过程中就有相似的代谢系统和过程”。微生物可以模拟许多哺乳动物中Ⅰ相药物代谢反应。Ⅰ相反应即官能团化反应，包括氧化、还原和水解反应。氧化反应包括一系列氧化剂，例如单胺氧化酶、黄酮或细胞色素P450单加氧酶等催化的反应；还原反应是指还原酶或氢化酶催化的反应；水解反应是被酯酶或酰胺酶催化的反应。细胞色素P450酶系与Ⅰ相反应中大量的代谢途径有关。它催化一个氧原子加入到不同的底物中。药物经过Ⅰ相代谢反应，将极性基团引入药物分子，即在药物分子上形成羧基、羟基、氨基等基团，从而使水溶性增强，有利于排泄，同时也改变了原有的官能团或增加了新的官能团，使药物解毒或活化。Ⅱ相反应即结合反应，包括药物的结合或Ⅰ相代谢物与内生性底物，如葡萄糖醛酸、氨基乙酸、乙酸、甲基、谷胱甘肽等的结合，从而使得药物及其代谢物的亲水性进一步提高，促进其从体内排出。Ⅰ相和Ⅱ相反应[123]，尽管药物的代谢既可以通过Ⅰ相反应代谢也可以通过Ⅱ相反应代谢，但总的来说，通过细胞色素P450家族酶系介导的Ⅰ相反应对药物进行代谢更为普遍[124]。这样，复杂的药物分子通过这一系列的连续或平行反应的结果就是形成了多样的代谢产物。

近年来，随着微生物转化研究的进一步深入，发现真菌等多种微生物具有与哺乳动物药物代谢酶功能非常相似的细胞色素P450同工酶系和葡萄糖苷酸酶等，可进行某些哺乳动物的羟基化、酰化、*N*-脱烷基化以及葡萄糖醛酸结合反应等Ⅰ相与Ⅱ相药物代谢反应。通过筛选能产生动物（或人）体内所观察到的代谢物的微生物菌株，经优化转化条件，能方便地获得足够数量的目标代谢物，进行结构鉴定以及药理和毒理方面的研究，并与动物或人体内的代谢物相对照，可较容易地阐明药物在生物体内的代谢过程。目前已报道成功利用微生物代谢的化学药品包括华法林、普萘洛尔、非那西丁、奎尼丁、卡巴咪嗪、布洛芬、苯妥英、地西泮、茚胺、茶碱、他莫昔芬、舒林酸、丙咪嗪等[125]。近年来，随着中药现代化进程的加快，国内外学者开始重视中药在人体内代谢途径的研究，开始利用体外多种模式微生物，模拟研究中药有效成分在动物体内的代谢，并取得了一些成果。例如，吴茱萸是一种传统中药，用来治疗脘腹冷痛、呕吐、腹泻、头痛、胃痛、痛经及高血压等疾病，其主要成分为生物碱、香精油和柠檬苦素类化合物。吴茱萸碱作为吴茱萸中的主要生物碱已被证明是主要活性物质之一。Li等[126]从20株微生物菌株中筛选得到9株可以转化吴茱萸碱，其中微紫青霉（*Penicillium janthinellum* Biourge）AS3.510转化形成的10位羟基化转化产物10-羟基吴茱萸碱与大鼠口服吴茱萸碱后尿液中的代谢产物相同。这说明利用体外微生物代谢可以得到与大鼠代谢途径相同的产物。

华蟾毒精、蟾蜍灵和脂蟾毒配基是中药蟾酥中三种典型的蟾毒配基，它们在抑

制肝癌和前列腺癌细胞的同时，导致室性心律失常（ventricularectopy）、房性心律失常（atrialarrhythmias）和高钾血症（hyperkalemia）等毒性反应。因此有必要研究其代谢以阐明其代谢产物。如图 2.6-1 所示，Xiao 等[127]在研究中发现，在所

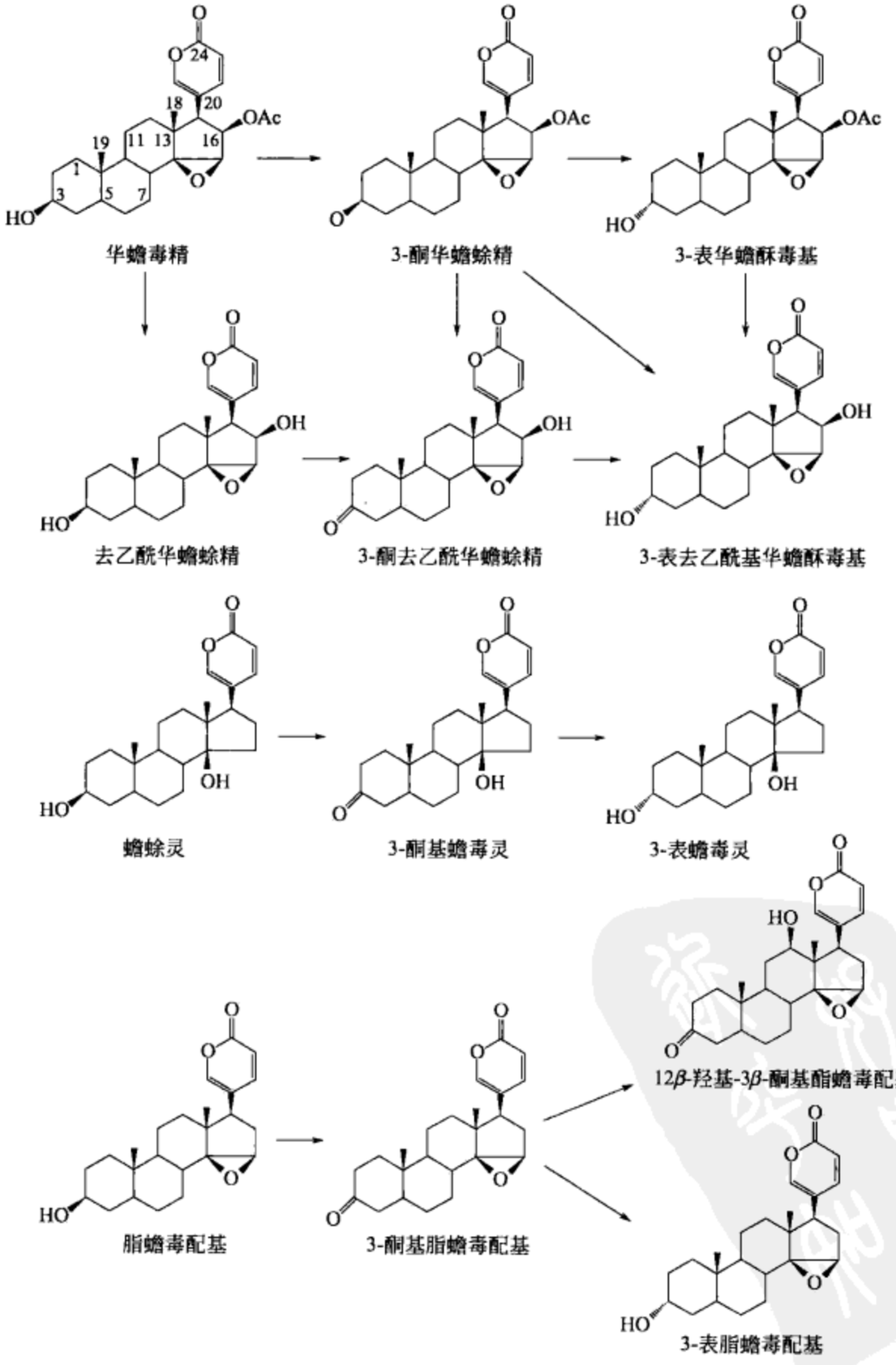


图 2.6-1　黄灰青霉 AS3.4512 对华蟾毒精、蟾蜍灵和脂蟾毒配基转化

筛选的 18 株丝状真菌中黄灰青霉 AS3.4512 对华蟾毒精、蟾蜍灵和脂蟾毒配基的转化与大鼠肝微粒体的代谢最为相近，其 10 种产率较高的转化产物中有 6 种与大鼠肝微粒体体外转化产物相同，其中的 3 种分别是华蟾毒精、蟾蜍灵和脂蟾毒配基在体内的代谢产物。这说明，黄灰青霉对华蟾毒精（cinobufagin）、蟾蜍灵（bufalin）和脂蟾毒配基（resbiufogenin）的转化与动物体内代谢相似。

Chen 等[128]在研究微生物对人参皂苷 Rb1 的转化时发现，如图 2.6-2 所示，头孢霉 AS3.2058 的转化产物 2～6［人参皂苷 Rd2（ginsenoside Rd，2），绞股蓝总皂苷 XVII（gypeno-side XVII，3），人参皂苷 Rg3（ginsenoside Rg3，4），人参皂苷 F2（ginsenoside F2，5），化合物 K（6）］与人参皂苷 Rb1 在哺乳动物体内的代谢产物相同，这表明微生物与哺乳动物的代谢平行。由此可以推测，在人参皂苷这一系列药物的研究中，头孢霉可以作为一种合适的工具用以获得代谢产物并用于结构分析中[123]。随着微生物模式代谢研究的深入，研究发现，真菌等多种微生物具有与哺乳动物药物代谢酶功能非常相似的细胞色素 P450 同工酶系，可进行某些哺乳动物相同的羟基化、酰化、*N*-脱烷基化以及葡萄糖醛酸结合反应等Ⅰ相与Ⅱ相药物代谢反应。例如，小克银汉霉属微生物包括刺孢（短刺）小克银汉霉［*Cunninghamella echinulata*（Thaxt.）Thaxt］、班尼小克银汉霉（*Cunninghamella bainieri* Naumov）、布氏小克银汉霉（*Cunninghamella blakesleeana* Lendner）、绮丽（雅致）小克银汉霉（*Cunninghamella elegans* Lendn.）等，在模拟人体的药物代谢研究方面得到广泛的应用，对其细胞色素 P450 酶相关基因的研究有利于理解其作用机制，并有助于建立一种体外细胞色素 P450 酶体系，通过筛选能产生动物（或人）体内所观察到的代谢物的微生物菌株，经优化转化条件，能方便地获得

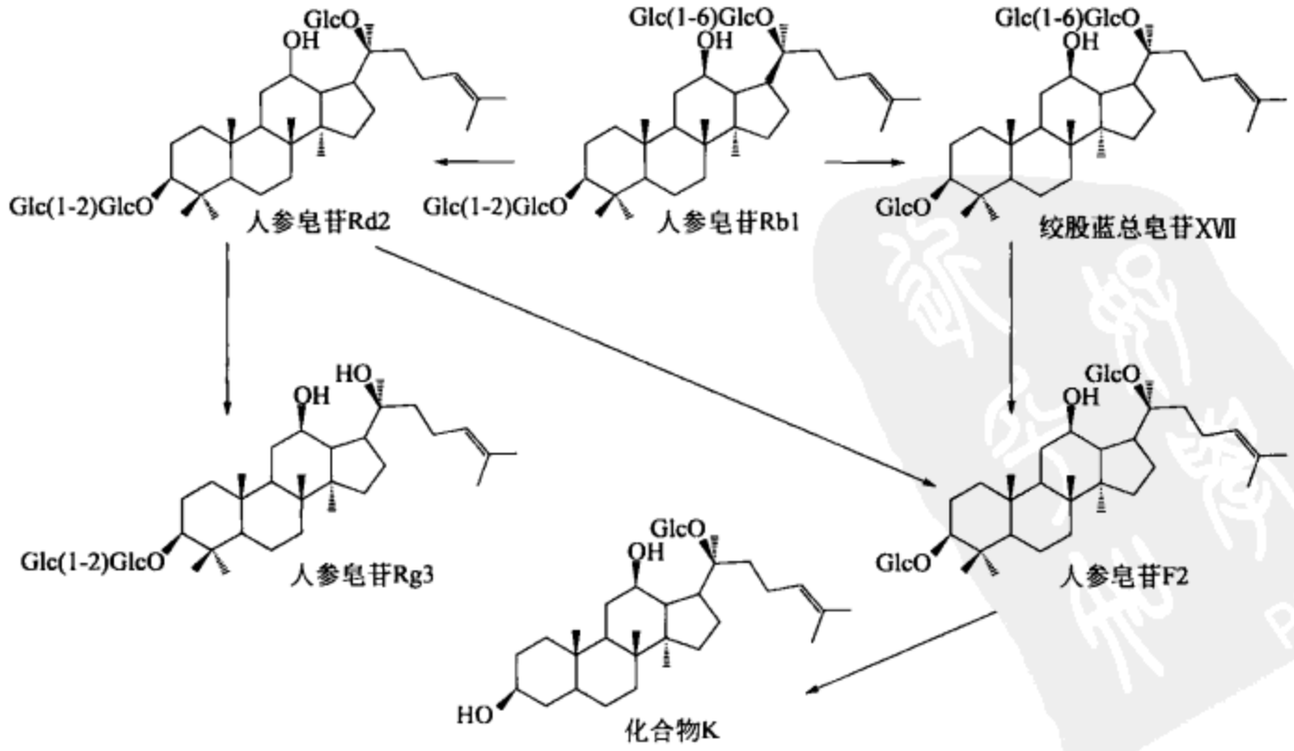


图 2.6-2　哺乳动物对药物的代谢产物人参皂苷 Rb1 的产物



大量通过动物实验难以获得的代谢产物供药理和毒理研究，其潜力已经逐渐被认识，并且已经利用小克银汉霉模式菌的体外代谢或修饰，获得了比在动物实验中观察到的代谢产物种类更多的转化产物，其转化产物见表 2.6-1 所示[129]。

表 2.6-1　药物在动物体内及由小克银汉霉属微生物体外代谢产物

编号	小克银汉霉属	药物	活性	哺乳动物代谢产物	微生物代谢产物
1	雅致小克银汉霉 ATCC 36112	苊	多环芳烃	1-二氢苊酮	6-OH 二氢苊酮、1,2-苊二酮、反式-1,2-二羟基苊、1,5-二羟基苊、1-苊醇、二氢苊酮、顺-1,2-二羟基苊
2	孢小克银汉霉	山油柑碱	抗肿瘤	3-甲基，C9 和 C11 羟基化、6-*O*-去甲基	C9 羟基化
3	雅致小克银汉霉	肾上腺甾酮	抗肿瘤	11*β*-羟基雄甾酮、Δ9(11)-雄甾-3*α*-醇-17-酮、本胆烷-3*α*,11*β*-二醇-17-酮、11-雄甾酮	11-睾酮、6*β*-羟基-11-睾酮、9*α*-羟基-11-睾酮、9*α*-羟基肾上腺甾酮
4	雅致小克银汉霉	阿米替林	三环抗抑郁药	*N*-去甲基化	*N*-去甲基化、*N*-氧化
5	雅致小克银汉霉 ATCC 9245	阿莫沙平	三环抗抑郁药	7-羟基化-阿莫沙平	7-羟基化-阿莫沙平、*N*-甲酰基-7-羟基阿莫沙平、*N*-甲酰阿莫沙平
6	雅致小克银汉霉 ATCC 9244	安非他命	中枢神经系统兴奋剂	*C*-氧化、*N*-氧化	*N*-乙酰基安非他命
7	雅致小克银汉霉 ATCC 1392	芹菜素	抗癌剂	芹菜素-7-硫酸盐、芹菜素-7,4′-硫酸氢盐	芹菜素-7-硫酸盐、芹菜素-7,4′-硫酸氢盐
8	雅致小克银汉霉	青蒿素	抗疟药	7*β*-羟基青蒿素	7*β*-羟基青蒿素、7*β*-羟基-9*α*-青蒿素、4*α*-羟基-1-去氧青蒿素、6*β*-羟基青蒿素
9	雅致小克银汉霉	阿扎他定	抗组胺剂	羟基化、*N*-去甲基化、甲基羟基化	*N*-去氧、*N*-去甲基、甲基羟基化
10	短刺小克银汉霉 ATCC 8688a 小克银汉霉 NRRL 5695	Benzosampangine	抗真菌生物碱	*β*-葡萄糖结合物	*β*-葡萄糖结合物
11	雅致小克银汉霉 ATCC 36112	Besipiridine	胆碱受体或肾上腺素受体兴奋剂	*N*-脱烷基、芳环羟基化、*C*2 氧化	*N*-脱烷基、芳环羟基化
12	小克银汉霉 NRRL 5695	桦木酸	抗黑色素瘤		糖苷化反应
13	雅致小克银汉霉	联苯	抗真菌	2-,3-,4-羟基化、4,4′-二羟基化、2,4′-二羟基化	2-,3-,4-羟基化、4,4′-二羟基、2,4′-二羟基化
14	孢小克银汉霉	比索洛尔	*β*-肾上腺素受体激动剂	甲基氧化	*O*-去异丙基
15	孢小克银汉霉	波那普令	抗胆碱	C5,C6 羟基化，磺酸基共轭、*N*-脱烷基	C5,C6 羟基化

续表

编号	小克银汉霉属	药物	活性	哺乳动物代谢产物	微生物代谢产物
16	雅致小克银汉霉 ATCC 9245 ATCC 36112	溴苯那敏	抗组胺药	*N*-氧化，*N*-去甲基化	*N*-氧化，*N*-去甲基化
17	短刺小克银汉霉	蟾毒灵	细胞毒		12α-羟基、7β，12α-二羟基、7β-羟基、12β-羟基
18	雅致小克银汉霉 ATCC 9245 ATCC 36112	氯苯那敏	抗组胺药	*N*-氧化，*N*-去甲基化	*N*-氧化，*N*-去甲基化
19	雅致小克银汉霉	氯丙嗪	安定药，抗精神病药	硫氧化、*N*-去甲基、*N*-羟基化、*N*-氧化	硫氧化、*N*-去甲基、*N*-去甲基-7-羟基、7-羟基化亚砜、*N*-氧化
20	雅致小克银汉霉 NRRL 1392	白杨素	生物类黄酮	芹菜素、芹菜素-7-硫酸盐、芹菜素-7,4′-硫酸氢盐	芹菜素、芹菜素-7-硫酸盐、芹菜素-7,4′-硫酸氢盐、白杨素-7-硫酸盐
21	雅致小克银汉霉	华蟾蜍精	甾体	12β-羟基-去乙酰基华蟾蜍精、3-*O*-12α-羟基蟾蜍精、12β-羟基蟾蜍精	12α-羟基蟾蜍精、11α-羟基蟾蜍精、12β-羟基-去乙酰基华蟾蜍精、3-*O*-12α-羟基蟾蜍精、12β-羟基蟾蜍精
22	雅致小克银汉霉	克立那托	抗肿瘤	C1 芳环羟基化、1,2-环氧化	C1 羟基化
23	短刺小克银汉霉 AS 3.970	姜黄醇	抗菌，抗癌		3β-羟基姜黄醇、12-羟基姜黄醇、1α-羟基-10β,1-环氧姜黄醇
24	雅致小克银汉霉	环苯扎林	三环抗抑郁药	*N*-去甲基、*N*-氧化	*N*-去甲基、*N*-氧化
25	雅致小克银汉霉 ATCC 9245 ATCC 36112	赛庚啶	抗组胺药	*N*-去甲基、10,11-环氧化、芳环羟基化、*N*-氧化、*N*-葡萄糖醛酸化	*N*-去甲基、10,11-环氧化、芳环羟基化、*N*-氧化
26	雅致小克银汉霉	盐酸司立吉林	抗抑郁药	*N*-去甲基化	*N*-去甲基化
27	短刺小克银汉霉 AS 3.153	右旋美沙芬	镇咳药	右啡烷	右啡烷
28	雅致小克银汉霉 ATCC 36112	二苯并噻吩		二苯并噻吩-5-氧化	二苯并噻吩-5-氧化
29	雅致小克银汉霉 ATCC 9245 ATCC 36112	苯海拉明	抗组胺药	去甲基化、氧化、*N*-乙酰化	去甲基化、氧化、*N*-乙酰化
30	雅致小克银汉霉 ATCC9245	多塞平	三环抗抑郁药	2-羟基化、*N*-去甲基化、3、4-羟基-*N*,*N*-去甲基化	8-羟基-*N*-去甲基、*N*-乙酰基-*N*-去甲基、*N*-去甲基-*N*-甲酰、*N*-乙酰二去甲基、*N*-氧化、*N*-去甲基
31	短刺小克银汉霉	依巴斯汀	抗组胺药	羧酸、芳环羟基化	羧酸
32	短刺小克银汉霉 AS 3.153	乙氧苯柳胺	抗银屑病	葡萄糖醛酸化	葡萄糖醛酸化
33	雅致小克银汉霉	氟甲喹	抗菌	7-羟基氟甲喹	7-羟基氟甲喹、7-*O*-氟甲喹
34	雅致小克银汉霉 ATCC 36112	芴		9-芴酮	9-芴酮、9-芴醇、2-羟基-9-芴酮

续表

编号	小克银汉霉属	药物	活性	哺乳动物代谢产物	微生物代谢产物
35	雅致小克银汉霉	呋塞米	利尿剂	*N*-脱烷基、芳烃氧化物、1-*O*-酰基葡萄糖苷酸	*N*-脱烷基、1-*O*-酰基葡萄糖苷酸
36	雅致小克银汉霉 ATCC 26269	HR325	免疫调节		环丙基、氰基分解
37	短刺小克银汉霉	丙咪嗪	三环抗抑郁药	亚氨基二苄、*N*-氧化、去甲丙咪嗪	亚氨基二苄、*N*-氧化、去甲丙咪嗪
38	短刺小克银汉霉 AS 3.910	吲哚美辛	NSAID 非甾体抗炎药	*O*-去甲基吲哚美辛、*N*-去氯苯甲酰基吲哚美辛	*O*-去甲基吲哚美辛、*N*-去氯苯甲酰基吲哚美辛
39	雅致小克银汉霉 NRRL 1393	异柏酸	半日花烷型二萜	贝壳松烯二羧酸、二氢贝壳松烯二羧酸	7β-羟基化
40	班尼小克银汉霉 短刺小克银汉霉	异甜菊醇	四环二萜类抗高血压	α-羟基化、β-羟基化	α-羟基化
41	孢小克银汉霉	拉帕醇	抗肿瘤，抗菌，抗疟疾	羧酸、葡萄糖苷酸	乳酸酯、葡萄糖苷酸
42	雅致小克银汉霉	左炔诺孕酮	口服避孕药	羟基化作用	羟基化作用
43	雅致小克银汉霉	炔雌醇甲醚	口服避孕药	6β-羟基化	6β-羟基化
44	雅致小克银汉霉 ATCC 9245 ATCC 36112	美沙吡林	抗组胺药	*N*-氧化、*N*-去甲基	*N*-氧化、*N*-去甲基
45	雅致小克银汉霉	甲吡咯嗪	镇痛，止痒，抗菌剂	3-羟基、*N*-氧化	3-羟基、*N*-氧化
46	孢小克银汉霉	甲氧基安非他命	中枢神经系统兴奋剂	*N*-乙酰化、*O*-脱烷基化	*N*-乙酰化、*O*-脱烷基化
47	雅致小克银汉霉	甲氧那明	抗抑郁药	*N*-去甲基化	*N*-去甲基化
48	雅致小克银汉霉 AS 3.1207	甲基原薯蓣皂苷	抗癌		羟基化、脱羟基作用、氧化
49	短刺小克银汉霉 AS 3.153	美托洛尔	肾上腺素受体拮抗剂	*O*-去甲基美托洛尔、美托洛尔酸	α-羟基、脱氨基、羟基-*O*-去甲基、*N*-脱烷基
50	雅致小克银汉霉	美西律	抗心律失常药	苄型2-甲基-羟基化、C3′或C4′芳环羟基化	C4′芳环羟基化
51	雅致小克银汉霉 ATCC 9245	米氮平	三环类抗抑郁药	8-羟基化、*N*-氧化、去甲基化、*N*-去甲基化-13-羟基米氮平	8-羟基化、*N*-氧化、去甲基化、13-羟基化、12-羟基化
52	雅致小克银汉霉	莫格列扎	抗Ⅱ型糖尿病	羟基化、*O*-去甲基、噁唑开环、*O*-脱烷基化	羟基化、*O*-去甲基、噁唑开环、*O*-脱烷基化
53	雅致小克银汉霉	萘		萘-1,2-氧化、1-萘酚、顺式-1,2-二羟基-1,2-二氢萘	萘酚、4-羟基-1-四氢萘酮、1,4-萘醌、1,2-萘醌、2-萘酚、顺式-1,2-二羟基-1,2-二氢萘

续表

编号	小克银汉霉属	药物	活性	哺乳动物代谢产物	微生物代谢产物
54	短刺小克银汉霉 AS 3.153 孢小克银汉霉 AS 3.2004 雅致小克银汉霉 AS 3.156	萘普生	抗炎剂、止痛剂、退热剂	6-*O*-去甲基化	6-*O*-去甲基化
55	雅致小克银汉霉 ATCC 36112	2-Nitrofluorine	硝基多环芳烃	苯酚和环羟基化产物	2-硝基-9-芴酮
56	孢小克银汉霉 ATCC 9244	*N*-甲基咔唑		*N*-羟基甲基咔唑、咔唑	*N*-羟基甲基咔唑、咔唑、3-羟基-*N*-羟基甲基咔唑、3-羟基咔唑
57	雅致小克银汉霉 ATCC 9245	奥美拉唑	质子泵抑制剂	奥美拉唑亚砜、羟基奥美拉唑	硫化物、去甲基吡啶、去甲基苯并咪唑
58	短刺小克银汉霉 AS 3.153	泮托拉唑	质子泵抑制剂	泮托拉唑亚砜、泮托拉唑硫醚、6-OH 泮托拉唑硫醚、4′-*O*-去甲基泮托拉唑硫醚	泮托拉唑亚砜、泮托拉唑硫醚、6-OH 泮托拉唑硫醚、4′-*O*-去甲基泮托拉唑硫醚、泮托拉唑硫醚-1-*N*-β葡萄糖苷
59	孢小克银汉霉	罂粟碱	平滑肌松弛药	4′-,6-,7-去甲基	4′-去甲基
60	班尼小克银汉霉 ATCC 9244	帕苯达唑	驱虫剂	ω-甲基氧化	ω-甲基氧化
61	雅致小克银汉霉	巴吉林	抗抑郁药	*N*-去甲基化	*N*-去甲基化
62	雅致小克银汉霉	非那西丁	镇痛药	*O*-脱烷基化、*N*-羟基化、芳烃氧化物、谷胱甘肽结合物	*O*-脱烷基化
63	孢小克银汉霉	非那吡啶	镇痛药	2′-,4′-和 5-羟基化、*N*-乙酰化	4′-羟基化,4′-*O*-硫酸盐结合物
64	雅致小克银汉霉	苯乙肼	抗抑郁药	*N*-乙酰化	*N*′-乙酰化
65	雅致小克银汉霉	苯异丙肼	抗抑郁药		*N*′-乙酰化
66	雅致小克银汉霉 ATCC 9245、36112	非尼拉敏	抗组胺药	*N*-单和双脱烷基化、*N*-氧化	*N*-单和双脱烷基化、*N*-氧化
67	孢小克银汉霉	吡喹酮	驱虫剂	B-,C-和 D-环单或双羟基化产物	C7 羟基化和 D 环羟基化
68	雅致小克银汉霉	泼尼松	类固醇甾族的抗炎剂	17α,21-二羟基-5α-孕甾-1-不饱和-3,11,20-三酮、17α,20*S*,21-三羟基-5α-孕甾-1-不饱和-3,11-二酮	17α,21-二羟基-5α-孕甾-1-不饱和-3,11,20-三酮、17α,20*S*,21-三羟基-5α-孕甾-1-不饱和-3,11-二酮
69	孢小克银汉霉 班尼小克银汉霉	普萘洛尔	受体阻滞剂	*N*-去异丙基、C4 环羟基化和葡萄糖苷酸化	*N*-去异丙基、羧酸的氧化脱氨基作用、C4 环合、C8 羟基化
70	孢小克银汉霉 ATCC 42616 雅致小克银汉霉 ATCC 9245、36112、22110	Protryptilline	抗抑郁药	去甲基	去甲基、*N*-乙酰基、*N*-醋酸基

续表

编号	小克银汉霉属	药物	活性	哺乳动物代谢产物	微生物代谢产物
71	雅致小克银汉霉 ATCC 9245	马来酸吡拉明	抗组胺药	*N*-去甲基	*N*-去甲基
72	孢小克银汉霉 班尼小克银汉霉	视黄醇	维生素 A	三甲基环己烯环氧化	2-OH 视黄酸
73	班尼小克银汉霉	鱼藤酮	抗肿瘤	鱼藤醇酮Ⅰ、鱼藤醇酮Ⅱ、二羟基鱼藤酮	1′,2′-二氢-1′,2′-二羟基鱼藤酮、3′-羟基鱼藤酮

2.7 展望

近年来，随着具有特殊功能的微生物的发现以及转化机制的阐明，使微生物转化的概念得到了前所未有的拓展和延伸。微生物转化已由原来的定点催化（如甾体先导化合物 11α、11β的羟化）、定向拆分（如光学异构体的拆分）、定向合成开始向组合生物转化方向发展，结合高通量筛选手段，快速地获得更多新型衍生物。微生物转化是一个全新的领域，在发展的过程仍需解决：①广泛的筛选微生物，获得具有新的特殊转化功能的微生物；②构建新的反应体系，提高转化的产率和效率；③充分运用基因工程的优势，通过遗传和分子生物学手段，构建定向转化甾体药物的工程菌。为此，利用基因工程技术，发展多种转化的工程菌，产生丰富的转化产物，满足医药研究和工业生产的需要，必将是微生物转化研究需要发展的方向。

参考文献

[1] 郭勇．生物制药技术．北京：北京轻工业出版社，2000：225-245.

[2] 诸志义．生物合成药物学．北京：化学工业出版社，2000：647-665.

[3] 郭一平，郑璞．甾体微生物 C11a-羟化反应的研究进展．浙江工业大学学报，2004，32（4）：437-441.

[4] Levy RA，Talalay P. Bacterial oxidation of steroids. Ⅱ. Studies on the enrymatic mechanism ofring A dehydrogenation. Biol Che-m，1959，234（8）：2014-2021.

[5] Ringold HJ，Hayano M，Stefanovic V. Concerning the stereochemistry and mechanism of thebacterial C-1，2 dehydrogenation of steroids. Biol Chem，1963，238（15）：1960-1965.

[6] Itakagi E，Matushita H，Hatta T. Essential histidine residue in 3-ketosteroid-Δ-1-dehydrogenase. Biochemistry，1992，111（5）：594-599.

[7] Ranjit K，Dutta，Monoj K，et al. Role of plas mid pJL1 of Arthrobacter oxydans 317 in the degradation of β-sitosterol. Basic Microbiol，1992，14（32）：317-324.

[8] Marscheck WJ，Karychy，Muir RD. Microbal degradation of sterols. Appl Microbiol，1972，32（1）：72-77.

[9] Sih CJ，Wang RC. A new route to estrone from sterols. Amer. Chem Soc.，1965，87（6）：1387-1389.

[10] Wix G，Buki KG，Tomorkeny E，et al. Inhibition of steroid nucleus degradation in Mycobacterial transformations. Steroids，1968，11（3）：401-403.

[11] Duport C，Spagnoli R，Degryse E，et al. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. Nat Biotechnol，1998，16（2）：186-189.

[12] Diane K, Steven K. Rewiring yeast for drug synthesis. Nature Biotechnology, 2003, 21 (2): 133-134.

[13] Nakamura K, Matsuda T. Two Classes of Enzymes of Opposite Stereochemistry in an Organism: One for Fluorinated and Another for Nonfluorinated Substrates. Org. Chem., 1998, 63 (24): 8957-8964.

[14] Stampfer W, Faber K, et al. Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer. Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 41 (6): 1014-1017.

[15] Akakabe Y, Naoshima Y, et al. Biocatalytic Ocatalytic Preparatuon Of Chiral Alcohols By Enantioselective Rrduction With Immobi-lized Cells Of Carrot. Chem. Soc., Perkin Tran., 1995, (10): 1295-1298.

[16] Patel RN, Szarka LJ, et al. Biocatalytic preparation of a chiral synthon for a vasopeptidase inhibitor: enzymatic conversion of N (2) -. Enzyme Microb Technol, 2000, 27 (6): 376-389.

[17] Lagos FM, Sinisterra JV, et al. New yeast strains for enantioselective production of halohydrin precursor of (*S*)-propranolol. Enzyme Microb Technol, 2002, 30 (7): 895-901.

[18] Michel C, John C, et al. Asymmetric bioreduction of [2-(4-nitro-phenyl)-*N*-(2-oxo-2-pyridin-3-yl-ethyl)-acetamide] to its corresponding (*R*) alcohol [(*R*)-*N*-(2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitrophenyl)-acetamide] by using Candida sorbophila MY 183 3. Enzyme Microb Technol, 1999, 25 (6): 489-496.

[19] Chartrain M, Armstrong J, Katz L, et al. Asymmetric Bioreduction of a β-Ketoester to (*R*)-β-Hydroxyester by the Fungus Mortier-ella alpina MF5534. Ferment. Bioeng., 1995, 80 (2): 176-179.

[20] Chartrain M, Mcnamara J, Greasham R. Asymmetric bioreduction of benzyl acetoacetate to its corresponding alcoholl, benzy l (S) - (+) -3-hydroxybutyrate by the yeast Candida schatav Ⅱ MY 1831. Ferment. Bioeng., 1996, 82 (5): 507-508.

[21] Reddy J, Tschaen D, Shi Y, et al. Asymmetric bioreduction of aβ-tetralone to its corresponding (S) -alcohol by the yeast Trichospo-ron capitatum MY 1890. J. Ferment. Bioeng., 1996, 81 (4): 304-309.

[22] Lorraine K, King S, Greasham R, et al. Asymmetric bioreduction of a ketosulfone to the corresponding trans-hydroxysulfone by the yeast Rhodotorula rubra MY 2169. Enzyme Microb Technol, 1996, 19 (4): 250-256.

[23] Chartrain M, Mathre D, Reamer RA, et al. Asymmetric bioreduction of cyclohexylphenyl ketone to its corresponding alcohol (+) cyclohexylphenyl alcohol by the yeast Candida magnoliae MY 1785. Ferment. Bioeng., 1997, 83 (4): 395-396.

[24] Chartrain M, Roberge C, Chung J, et al. Asymmetric bioreduction of [2-(4-nitro-phenyl)-*N*-(2-oxo-2-pyridin-3-yl-ethyl)-acetamide] to its corresponding (*R*) alcohol [(*R*)-*N*-(2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acetamide] by using Candida sorbophila MY 1833. Enz yme Microb Technol, 1999, 25 (6): 489-496.

[25] Chartrain M, Lynch J, Choi WB, et al. Asymmetric bioreduction of a bisaryl ketone to its corresponding (*S*)-bisaryl alcohol, by the yeast Rhdotorula pilimanae ATCC 32762. Molecular Catalysis B., 2000, 8 (4-6): 285-288.

[26] Roberge C, King A, Pecore V, et al. Asymmetric bioreduction of a ketoester to its corresponding. S-hydroxyester by Mi-crobacteri u-m sp. MB 5614. Ferment. Bioeng., 1996, 81 (6): 530-533.

[27] S Stahl, N Ikemoto, A King, et al. Asymmetic direduction of 1, 2-Indandione to cis 1S, 2R indandiol by Thrychospora cutaneum MY 1506. Biosci. Bioeng., 1999, 88: 495-499.

[28] Stahl L, Dagneau P, Wang X. Asymmetric bioreduction of an allylic alcohol to its corresponding R-alcohol. Biocatal, Biotransform, 2001, 19 (4): 267-279.

[29] Barbara K, David T , Paul D. Asymmetric biosynthesis of keyintermediates in the synthesis of an endothelin receptor antagonist. Biocatal, Biotransform, 2001, 19 (4): 267-279.

[30] Aina G, Nasini G, De Pava OV. Asymmetric bioreduction of racemic 5, 4, 7, 8-tetrahydro-8-methyl-1, 3-dimethoxynaphtha-len-6-one to the corresponding chiral b-tetralo is. Molecular Catalysis B, 2001, 11 (4-6): 367-371.

[31] Orden AA, Bisogno FR, Cifuent DA, et al. Asymmetric bioreduction of natural xenobiotic diketones by Brassica napus hairy roots. Molecular Catalysis B, 2006, 42 (3-4): 71-77.

[32] Buckland BC, Dunnill P, Lilly MD. The enzymatic transformation of water-insoluble reactants in nonaqueous solvents. Con-version of cholestero to cholest-4-ene-3-one by a Ncardia sp. Biotechnology and Bioengineering, 1975, 17, (6): 815-826.

[33] Bell SG, Wong LL. P450 enzymes from the bacterium Novosphingobium aromaticivorans. Biochem. Biophys. Res. Commun. , 2007, 360 (3): 666-672.

[34] 周浩力，张妍，卢文玉等. 有机溶剂对黑根霉甾体 11α-羟基化的影响. 工业微生物，2008，38 (2)：52-55.

[35] 姜邵通，赵俊平，杨英等. 两相系统发酵转化植物甾醇为雄烯二酮的研究. 食品与发酵工业，2008，(6)：46-48.

[36] Smith M, Zahnley J, Pfeifer D, et al. Growth and cholesterol oxidation by Mycobacterium species in Tween 80 medium. Appl Environ Microbiol, 1993, 59 (7): 1425-1429.

[37] WANG Jia, GUAN YiXin, WANG HaiQing, et al. Hydroxylation of 16a, 17a-epoxy-4-pregenene-3, 20-dione by Absidia coerulea with Pseudo-crystalto Feed. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22 (4): 662-666.

[38] Hesselink P, Vliet S, Vries H, et al. Optimization of sterols side chain cleavage by Mycobacterium sp. in the presence of cyclode xt-rins. Enzyme Microb Technol, 1989, 11 (7): 398-404.

[39] Schlosser D, I r rgang S, Schmauder H. Steroid hydroxylation with free and immobilized cells of Penicillium raistrick Ⅱ in the pres-ence of-cyclodextrin. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39 (1): 16-20.

[40] 易奎星，杨亚力，杨顺楷等. β-环糊精包合技术在微生物转化生产氢化可的松中的应用. 中国医药工业杂志，2006，37 (5) ：311-313.

[41] Wang M, Zhang LT, Shen YB, et al. Effects of hydroxypropyl-β-cyclodextrin on steroids 1-en-dehydrogenation bio-transforma-tion by Arthrobacter simplex TCCC 11037. Mol. Catal. B-Enzym. , 2009, 59 (1-3): 58-63.

[42] Flygare S, Larsson PO. Steroid transformation in aqueous two-phase systems: side-chain degradation of cholesterol by Mycobacterium sp.. Enzyme Microb Technol, 1989, 11 (11): 752-759.

[43] 王志龙. 两相分配生物反应器——浊点系统在生物转化中的应用. 中国工程科学，2005，7 (5)：73-78.

[44] 陈代杰，朱宝泉. 微生物转化技术在现代医药工业中的应用. 中国抗生素杂志，2006，31 (2)：43-56.

[45] Wang ZL, Zhao FS, Chen DJ, et al. Cloud point system as a tool to improve the efficiency of biotransformation. Enzyme Microb Technol, 2005, 36 (4): 589-594.

[46] Wang ZL, Zhao FS, Chen DJ , et al. Biotransformation of phytosterol to produce androsta-diene-dione by resting cells of Mycoba-cterium in cloud point system. Process Biochem, 2006, 41 (3): 557-561.

[47] Wang ZL, Wang L, Xu JH, et al. Enzymatic hydrolysis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid in cloud point system with discrete countercurrent experiment. Enzyme Microb Technol, 2007, 41 (1-2): 121-126.

[48] Wang ZL, Wang L, Xu J H, et al. Improvement the tolerance of baker's yeast to toxic substrate/product with cloud point system during the whole cell microbial transformation. Enzyme Microb Technol, 2007, 41 (3): 296-301.

[49] Sedlaczek L, Dtugonski J, Jaworski A. Transformation of steroids by fungal protoplasts. Appl Microbiol Biotl, 1984, 18 (9): 166-169.

[50] 王敏，王春霞，路福平等. 蓝色犁头霉原生质体的制备与再生. 工业微生物，2001，31 (6)：20-21.

[51] Sedlaczek L, Bernard M. Effect of inhibitions of cell envelope synthesis on β-sitosterol side chain degradation by Mycobacteri-um sp. NRRL MB3683. Basic Microbiol, 1994, 34 (6): 387-399.

[52] Korycka-Machala M, Zi lkowski A, RumijowskaGalewiez A, et al. Polycations increase the permeability of Mycobacterium vaccae cell envelopes to hydrophobic compounds. Microbiology, 2001, 147: 2769-2781.

[53] Murray HC, Peterson DH. Oxygenation of steroids by Mucorales fungi. (Upjohn Co., Kalamazoo. Michigan). USA 2602769. 1952. 02. 23.

[54] 易奎星. 新月弯孢霉生物转化生产氢化可的松新工艺的研究. 成都：四川大学，2006.

[55] Sih CJ, Wang RC. A new route to estrone from sterols. Amer. Chem. Soc, 1968, 87 (6): 1387-1388.

[56] Sukhodolskaya GV, Nikolayeva VM, Khomutov SM. Steroid-1-dehydrogenase of Mycobacter-ium sp. VKM Ac-1817 D strain producing 9α-hydroxy-androst-4-ene-3, 17-dione from sitosterol. Appl Microbiol Biotechno, 2007, 74 (4): 867-873.

[57] Xiong ZG, Qi W, Chen. HM. Microbial transformation of androst-4-ene-3, 17-dione by Beauveria bassiana. Steroids, 2006, 71 (11): 979-983.

[58] Mojtaba TY, Amir A, Mohammad AF. Nandrolone Decanoate Transformation by Neu-rospora crassa. Pharmaceutical Bio., 2005, 43 (7): 630-635.

[59] Alina Ś, Teresa K. Transformations of 4-and 17α-substituted testosterone analogues by Fusarium culmorum. Steroids, 2005, 70 (12), 817-824.

[60] Teresa K, Anna S, Alina Ś. Baeyer-Villiger oxidation of DHEA, pregnenolone, and androstenedione by Penicillium lilacinum AM111. Steroids, 2008, 14 (73): 1441-1445.

[61] 盛美娜，王艳红，葛文中. 3β，7α，11α-三羟基-孕-5-烯-20-酮-20-肟的合成. 黑龙江八一农垦大学学报，2010，22 (2)：95-97.

[62] Choudhary MI, Khan NT, Musharraf SG, et al. Biotransformation of adrenosterone by filamentous fungus. Cunninghamella elegans steroids, 2007, (72): 923-929.

[63] Liu HM, Ge WZ, Li HP. Microbial transformation of 5alpha, 6alpha-epox y-3beta-hydroxy-16-pregnen-20-one by Trichoderma viride. Steroids, 2007, 72: 509-513.

[64] 王玮，王风清，魏东芝等. 薯蓣皂苷元及其维吉尼链霉菌 IBL-14 转化产物体外抑制人乳腺癌细胞 Bcap37 的作用研究. 华东理工大学学报，2007，(3)：49-55.

[65] 张芳，王旻，江曙等. 红酵母静息细胞催化 (S) -3，5-双三氟甲基苯乙醇的不对称还原反应. 药物生物技术，2007，14 (6)：411-414.

[66] 何春茂，常冬亮，张杰. 生物催化不对称还原法制备 (R) -和 (S) -2-羟基-4-苯基丁酸乙酯. 精细化工，2008，25 (7)：720-723.

[67] Patel RN, Banerjee A, Chu L, et al. Microbial synthesis of chiral intermediates forβ3-receptor agonists. Am. Oil Chem. Soc., 1998, 75 (11): 1473-1482.

[68] Michel C, Christopher R, John C, et al. Asymmetric bioreduction of [2-(4-nitro-phenyl)-*N*-(2-oxo-2-pyridin-3-yl-ethyl)-acetamide] to its corresponding (*R*) alcohol [(*R*)-*N*-(2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acetamide] by using Candida sorbophila MY 1833. Enzyme Microb Technol, 1999, 25 (6): 489-496.

[69] Chung JYL, Ho GJ, Chartrain M, et al. Practical Chemoenzymatic Synthesis of a 3-pyridylethandaminoβ3 adrenergic recepeor agonist. Tetrahedron Leetters, 1999, 40: 6739-6743.

[70] Gu JX, Li ZY, Lin GQ. Reductive biotransformation of carbonylcompounds. Application of fungus,

Geotrichum sp. G38 in org-anic synthesis. Tetrahedror, 1993, 49 (26): 5805-5816.

[71] Wei ZL, Li ZY, Lin GQ. anti-Prelog Microbial Reduction of Aryl a-Halomethyl or a-Hydroxymethyl Ketones with Geotrichurn sp.. Tetrahedron, 1998, 54: 13059-13072.

[72] Michel C, Barbara J, Colleen T, et al. Bioconversion of Indene to cis (1S, 2R) Indandiol and tram (1R, 2R) Indandi-ol by Rhodococcus Species. J. Fermen. Bio., 1998, 86 (6): 550-558.

[73] Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. Science, 2003, 299: 16 94-1697.

[74] 余伯阳. 中药生物技术. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 430.

[75] Zhang J, Sun Y, Liu JH, et al. Microbial transformation of three bufadienolides by Nocardia sp and some insight for the cytotoxic structure-activity relationship. Med Chem Lett, 2007, 17 (22): 60-62.

[76] Zhan JX, Liu WH, Guo HZ, et al. Selective dehydrogenation of resibufogenin and cinobufagin at 3-OH by Pseudomonas aeruginosa. Enzyme Microb Technol, 2003, 33 (1): 29-31.

[77] Ye M, Qu GQ, Guo HZ, et al. Specific 12 beta-hydroxylation of cinobufagin by filamentous fungi. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (6): 3521-3523.

[78] He X, Tang J, Qiao A, et al. Cytotoxic biotransformed products from cinobufagin by Mucor spinosus and Aspergillus Niger. Steroids, 2006, 71 (5): 392-395.

[79] Ma XC, Zheng J, Guo DA. Highly selective isomerization and dehydrogenation of three major bufadienolides at 3-OH by Fusarium solani. Med Chem Lett, 2007, 40 (6): 1585-1590.

[80] Ye M, Han J, An DG, et al. New cytotoxic bufadienolides from the biotransformation of resibufogenin by Mucor polymorphosporus. Tetrahedron, 2005, 61 (37): 8947-8949.

[81] Ye M, Qu GQ, Guo HZ, et al. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships. J Steroid Biochem Mol Bio, 2004, 91 (1-2): 87-89.

[82] Ye M, Han J, An DG, et al. New cytotoxic bufadienolides from the biotransformation of resibufogenin by Mucor polymorpho sporus. Tetrahedron, 2005, 61 (37): 8763-8768.

[83] Ye M, Guo D. Substrate specificity for the 12 beta-hydroxylation of bufadienolides by Alternaria alternata. J Biotechnol, 2005, 117 (3): 253-258.

[84] 张薇. 大黄游离蒽醌及蟾酥毒素的微生物转化研究. 上海: 中国科学院上海冶金研究所, 2001.

[85] Xiao-Chi M, Cui H, Zheng H, et al. Microbial transformation of three bufadienolides by Penicillium aurantigriseum and its application for metabolite identification in rat. J. Mol. Catal. A: Chem., 2007, 48 (1-2): 42-46.

[86] Qiao L, Zhou YZ, Qi XL, et al. Biotransformation of cinobufagin by Cunninghamella elegans. The Journal of Antibiotics, 2007, 60 (4): 261-268.

[87] Li Q, Yu ZZ, Huan C, et al. One new bufadienolide biotransformed from cinobufagin by Cunninghamella elegans. Chinese Chem Lett, 2008, 19 (3): 299-302.

[88] 王园园, 刘吉华, 余伯阳. Streptomyces griseus ATCC 13273 对 4 种黄酮生物转化初步研究. 药物生物技术, 2005, 12 (5): 308-311.

[89] Hosny M, Dhar K, Rosazza J. Hydroxylations and methylations of quercetin, fisetin, and catechin by Streptomyces griseus. J Nat Prod, 2001, 64 (4): 462-469.

[90] Hosny M, Rosazza J. Novel Oxidations of (+)-Catechin by Horseradish Peroxidase and Laccase. J. Agric. Food Chem, 2002, 50 (20): 5539-5545.

[91] Patel RN, Banerjee A, Nanduri V. Enzymatic acetylation of 10-deacetylbaccatin Ⅲ to baccatin Ⅲ by C-10 deacetylase from No-cardioides luteus SC 13913. Enzyme Microb Technol, 2000, 27 (6): 371-283.

[92] Ning LL, Zhan JX, Qu GQ, et al. Biotransformation of triptolide by Cunninghamella blakesleana. Tetrahedron, 2003, 59 (23): 420 9-4211.

[93] Liu JH, Chen YG, Yu BY, et al. A novel ketone derivative of artemisinin biotransformed by Streptomyces griseus ATCC 13273. Bio. org. Med. Chem. Let, 2006, 16 (7): 1909-1931.

[94] Orabi KY, Galal AM, Ibrahim A, et al. Microbial metabolism of artemisitene. Phytochemistry, 1999, 51 (2): 257-263.

[95] Zhang J, Cheng ZH, Yu BY, et al. Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by Nocardia sp NRRL 5646. Tetrahedron Lett, 2005, 46 (13): 2337-2340.

[96] 田翠. 三七皂苷转化菌株的筛选及其转化产物的分离纯化与鉴定. 上海：上海师范大学，2008.

[97] 周荣汉. 药用植物化学分类学. 上海：上海科学技术出版社，1988：406.

[98] 肖永庆，马场江，谷口雅颜等. 中药羌活中的香豆素. 药学学报，1995，(4)：18-24.

[99] 饶高雄，宋红燕，王兴文等. 细裂前胡的香豆素成分. 天然产物研究与开发，1997，(4)：34-51.

[100] 彭维，刘布鸣，黄平等. 前胡中总香豆素的含量测定. 中药材，1997，20 (1)：25-28.

[101] 龚苏晓. 九里香中新的香豆素. 国外医学 中医中药分册，2003，(3)：110-116.

[102] 杜兴旭，王春梅，秦晶等. 中药白芷香豆素类成分的研究进展. 井冈山学院学报，2005，26 (10)：120-122.

[103] 张晓晖，徐敏. 蛇床子香豆素的药理研究进展. 广西中医药，2005，28 (1)：5-8.

[104] 郑艳，徐珞珊，王峥涛等. 球花石斛茎中香豆素类成分的定位与相对定量. 药学学报，2005，40 (3)：236-240.

[105] Shieh HS, Blackwoo A C. Use of coumarin by soil fungi. Can J Microbiol, 1969, 15 (6): 647-651.

[106] Haser K, Wenk HH, Schwab W. Biocatalytic production of dihydrocoumarin from coumarin by Saccharomyces cerevisiae. J. Agric. Food Chem, 2006, 54 (17): 6236-6239.

[107] 王娟. 番茄叶霉病原菌转化人参皂甙的研究. 长春：东北师范大学，2008.

[108] 高聆. 褐孢霉产生的人参皂甙 Rb-1 水解酶的分离纯化及其性质. 长春：东北师范大学，2008.

[109] 吴秀丽，王艳，赵文倩等. 一种真菌对人参皂苷 Rg-3 的转化. 微生物学报，2008，28 (9)：1181-1185.

[110] Dong A L, Ye M, Guo HZ, et al. Microbial transformation of ginsenoside Rb-1 by Rhizopus stolonifer and Curvularia lunata. Biotechnol Lett, 2003, 25 (4): 339-342.

[111] 蒋磊，赵寿经，李然等. 酶法转化人参皂苷 Re 为 Rg-1 的研究. 上海：中国科学院上海冶金研究所，2000.

[112] 吴秀丽，张怡轩，赵文倩等. 真菌 EST-Ⅰ及 EST-Ⅱ对人参皂苷 Rg-1 定向转化为人参皂苷 F-1 的研究. 沈阳药科大学学报，2008，25 (1)：34-41.

[113] 全波. 米曲霉对穿山龙中甾体皂苷的生物转化. 沈阳：沈阳药科大学，2006.

[114] 朱殿生，张彧，于营等. 喜树碱生物转化优良菌株的筛选及其转化条件初步研究. 大连轻工业学院学报，2007，26 (1)：18-21.

[115] Ye M, Dal JG, Guo HZ, et al. Glucosylation of cinobufagin by cultured suspension cells of Catharanthus roseus. Tetrahedron Lett, 2002, 43 (47): 8535-8542.

[116] Lu YF, Chen KY, Li HL, et al. Biotransformation of vermitaline by Cunninghamella echinulata. Helv Chim Acta, 2008 , 91 (5): 819-825.

[117] 孙敏鸽. 三种真菌对莪术醇微生物转化的研究. 沈阳：沈阳药科大学，2007.

[118] 孙敏鸽，康宁，段文娟等. 苎麻青霉对莪术醇的微生物转化. 沈阳药科大学学报，2007，24 (8)：512-514.

[119] Li D, Park SH, Shim JH, et al. In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase. Carbohydrate Res, 2004, 339 (17): 2789-2792.

[120] Ye H, Yuan S, Cong XD. Biotransformation of puerarin into 3′-hydroxypuerarin by Trichoderma harzianum NJ01. Enzyme Microb Technol, 2007, 40 (4): 594-621.

[121] Jiang JR, Yuan S, Ding JF, et al. Conversion of puerarin into its 7-O-glycoside derivatives by Mi-



crobacterium oxydans (CGMCC 1788) to improve its water solubility and pharmacokinetic properties. Appl Environ Microbiol, 2008, 81 (4): 647-651.

[122] Rosazza JP, Smith RV. Microbial models of drug metabolism. J Pharm Sci., 1975, 64: 1737-1746.

[123] Venisetty RK, Ciddi V. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. Curr Pharm Biotechnol, 2003, 4 (3): 153-165.

[124] Fura A, Shu YZ, Zhu M, et al. Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery. J Med Chem, 2004, 47 (18): 4339-4346.

[125] Jezequel SG. Microbial models of mammalian metabolism: uses and misuses (clarification of some misconceptions). J. Mol. Catal. B: Enzym, 1998, 5 (1-4): 371-389.

[126] Li L, Liu RX, Ye M, et al. Microbial metabolism of evodiamine by Penicillium janthinellum and its application for metabolite identification in rat urine. Enzyme Microb Technol, 2006, 39 (4): 561-274.

[127] Xiao CM, Cui H, Zheng H, et al. Microbial transformation of three bufadienolides by Penicillium aurantigriseum and its application for metabolite identification in rat. J. Mol. Catal. B: Enzym, 2007, 48 (1-2): 42-53.

[128] Chen GT, Yang M, Song Y, et al. Microbial transformation of ginsenoside Rb-1 by Acremonium strictum. Appl Environ Microbiol, 2008, 77 (6): 1345-1350.

[129] Asha S, Vidyavathi M. Cunninghamella-A microbial model for drug metabolism studies-A review. Biotechnol Adv, 2009, 27 (1): 16-29.

第3章 微生物组合生物合成技术在药物研究中的应用

3.1 微生物组合生物合成的概念

3.1.1 微生物组合生物合成的概念

药物合成作为增加化合物结构多样性的主要手段，在新药的研究和发现中占有重要地位。然而，通过传统的化学合成手段，一些化学修饰和全合成等的方法结果并不理想。自1990年人类基因组计划实施以来，许多相关学科得到了快速发展，特别是后基因组学时代的到来，使人们对于转化的认识由酶的层次上升到基因的层次，通过应用多种基因工程、遗传代谢工程、基因组学、蛋白质组学以及分子生物学的技术，使得许多药物生物代谢的路线得到了阐明，许多功能基因得到了充分的开发。现代生物学认为，尽管微生物药物的结构多样，但形成这些产物的主要生化反应机制却基本相同，它们通常是由非常简单的化学物质，如小分子羧酸或某些氨基酸作为合成起始单位和延伸单位，由一系列基因编码的多酶体系参与的生物化学反应而形成，参与的多酶体系是由多个结构明显分开的功能区域所组成，而参与这类小分子生物合成的基因通常是特征性地成簇分布于微生物染色体的某一区域而构成一个基因簇，这些理论的形成，为基因的克隆和操作提供了方便。而在另一方面，由于参与次级代谢生物合成酶系对底物的特异性、专一性要求不是很严格，对结构相类似的底物均可识别，这一特点也为不同基因组合产生新的化合物创造了条件。因此有针对性地对某些基因进行操作，如置换、阻断、插入重组以及添加、减少组件等，均有可能改变其生物合成途径而产生新的代谢旁路，继而形成新的化合物。组合生物合成（combinatorial biosynthesis）是指应用基因重组技术，重新组合微生物药物的基因簇（cluster），产生一些新的非天然的基因簇，从而合成许多新的非天然的化合物的技术和方法。



3.2　微生物组合生物合成技术的原理和策略

3.2.1　微生物组合生物合成技术的原理

通过生物信息学和微生物遗传学手段可确定基因簇中的各模块或结构域的功能，将这些模块或结构域进行组合后，就能产生母核、支链以及分子量各异的新型“非天然的天然产物”。相比于传统的化学合成法，该技术利用重组微生物菌株发酵得到大量的产物，具有成本低、环境污染较小的特点，这种以基因工程的方式进行的天然产物多样性的合成方式，就是通常所说的组合生物合成。组合生物合成或组合生物学是近年发展起来的技术，是在微生物次级代谢产物生物合成基因和酶学研究基础上形成的，是指应用基因重组技术，重新组合微生物药物的基因簇，产生一些新的非天然的基因簇，从而合成许多新的非天然的化合物，为微生物药物的筛选提供丰富的化合物资源。因此，如图 3.2-1 所示，利用基因克隆和操作技术，对某些微生物基因簇进行操作，如置换、阻断、插入重组以及添加、减少组件等，形成重组后的基因簇，均有可能改变其生物合成途径而产生新的组合合成产物的基因簇，进而产生新的组合合成产物。另一方面，将不同来源的天然产物生物合成基因簇进行重组，在微生物体内建立组合的新型代谢途径，由此，重组微生物库，也可以产生批量的新型天然产物。为此，探索未知功能的基因簇、异源表达生物合成基因簇、对生物合成基因簇实施突变、重组基因簇结构域或模块这些策略，也必将在药物的研究中扮演重要的角色。

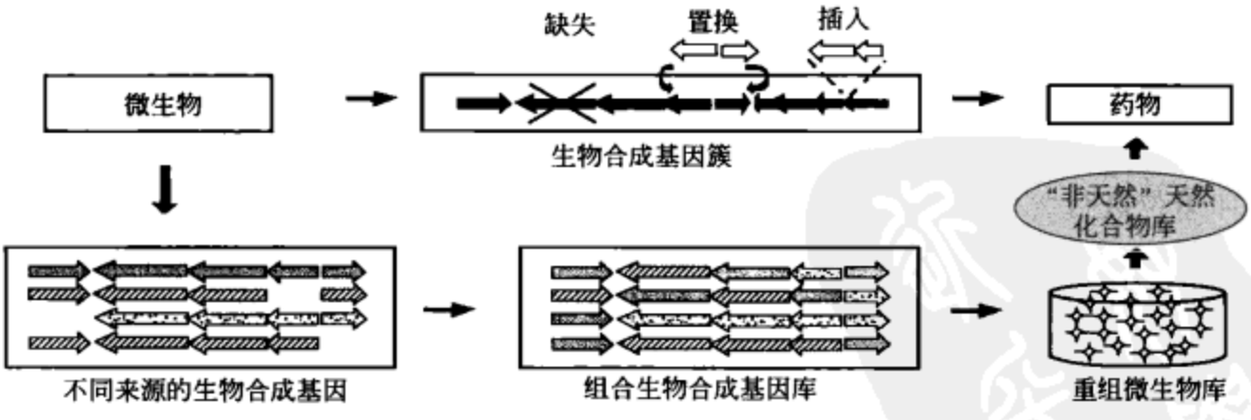


图 3.2-1　微生物组合生物合成技术的原理

3.2.2　微生物基因簇和组合生物合成的策略

3.2.2.1　微生物基因簇

随着大规模测序技术的不断发展，许多隐含的代谢路线或者以前尚未研究的代谢路线都得到了开发，与此同时，也从基因文库中调出了相关的基因，获得了相关的遗传信息，进而发现了许多新的化合物。此外，对遗传信息的加工处理，可以发

现新的合成酶，进而可以对已知合成路线进行重新设计，以此来获得结构新颖的化合物。据基因组在线数据库统计，已经有 700 多种微生物的基因组得到了测序，还有 1000 多项计划正在进行中[1]。目前，多种微生物次级代谢产物的产生，受特殊外界环境的影响，通常的发酵方法可能无法得到这些化合物。而随着基因测序技术的发展，通过对这些微生物全基因组进行生物信息学分析，就有可能重组、合成更多的次生代谢产物。目前已经鉴定的与微生物生物合成相关的基因簇就有 200 多个，其中涉及聚酮合成酶（PKS）、非核糖体多肽合成酶（NRPS）和杂合的聚酮/非核糖体多肽合成酶（NRPS-PKS）等聚合合成酶基因簇的微生物就有 223 种，由此可见，PKS、NRPS 和杂合 NRPS-PKS 等聚合合成酶基因簇，在微生物的组合生物合成中发挥主要作用。现分述如下。

3.2.2.2 聚酮合成酶基因簇与组合生物合成[2]

（1）PKS 聚酮合成酶是催化聚酮化合物形成的关键酶，也是组合生物合成领域研究较透彻的一类酶。目前已经揭示的聚酮合成酶可以分为三类：Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型。

① Ⅰ型 PKS。Ⅰ型 PKS，它是由几个多功能的多肽组成，每一个多肽上都分别携带有参与聚酮生物合成所必需的各种酶的结构域（domain），每个结构域只参与整个聚酮碳链构建中的一步生化反应（noninterative），而参与一轮聚酮生物合成反应的所有结构域称为一个合成酶单位（SU，synthase unit），编码这个合成酶单位的 DNA 称为一个模块（module）。Ⅰ型模块结构的 PKS，它的结构类似一条装配流水线，“装配线”上的酶是按“组块”的形式组合在一起，每一组块催化聚酮链延长一个单位。每一个组块又可再细分为单一“结构域”，每一结构域有一种功能，其装配线包括：

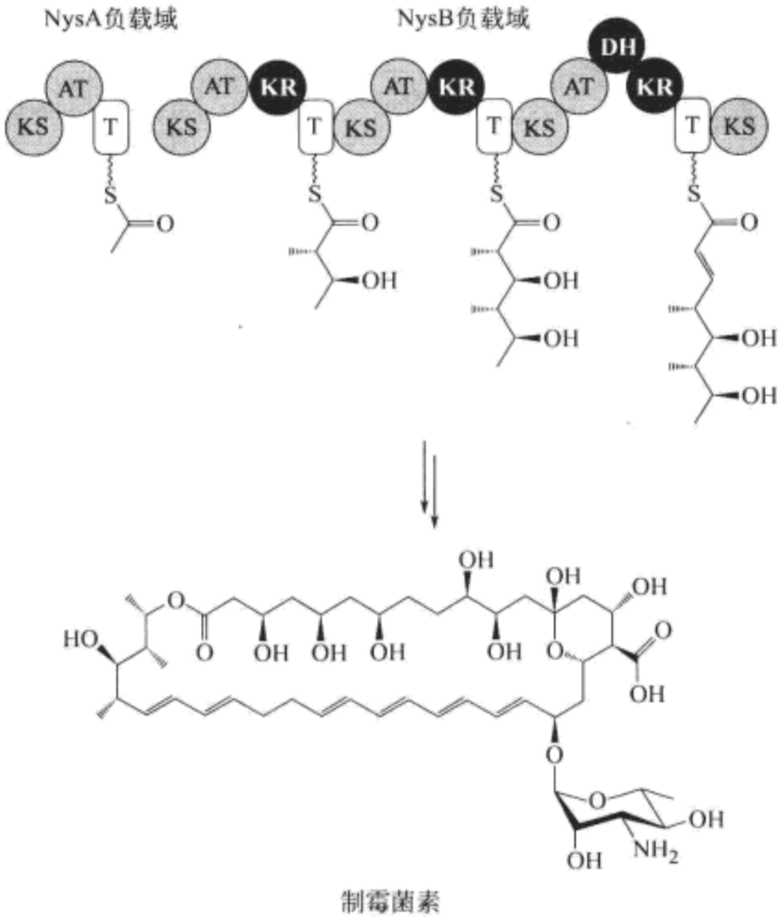
a. 由酰基转移酶（acyl transferase，AT）把不同的起始单位组合，通过酮酯酰 ACP 合成酶（ketoacyl ACP synthase，KS）经过缩合反应将不同的羧酸起始或延伸单位进行组装；

b. 酰基载体蛋白（acyl carrier protein，ACP）延伸聚酮链，在延伸过程中根据模块组成的不同要求，其他各种类型的修饰酶包括脱水酶（dehydratase，DH）、烯醇还原酶（enoyl reductase，ER），酮酯酰 ACP 还原酶（ketoacyl ACP reductase，KR），进行还原（形成 β-羟酯键）或脱水（形成 α,β-烯醇酯键）或进一步还原（形成饱和的亚甲基）等催化系列反应；

c. 在硫酯酶（thioesterase，TE）的催化下，将聚酮前体产物从 PKS 上卸载下来。

如图 3.2-2 所示，制霉菌素 PKS 基因簇代表了典型的模块式 PKS 基因簇，编码的多肽链从氨基端到羧基端分为 NysA 和 NysB 负载域、多个模块区、释放功能域等 3 个部分。其中负载域 NysA 由 2 个活性位点（AT-T 和 KR-T）组成，模块区中每个模块都包含 AT、KS 和 0～3 个修饰 β-C 的功能域，释放功能域为 TE。负载域 NysA 的 AT-T 活性位点特异性选择丙酸为起始物，并将其转到 KR-T 活性位点上。负载域对起始物的选择具有重要的作用，延伸单元的选择由 AT-T 域决

定，AT-T 选择结合的丙二酸单酰基传给 NysB 负载域的 KR-T 上的泛酰磷酸基，在 KS 催化缩合形成 β 酮，KR 以 NADPH 还原 β 酮成羟基，完成第 1 轮循环。当缩合反应完成多轮循环后，NysB 负载域的 TE 将聚酮从 PKS 上水解下来。



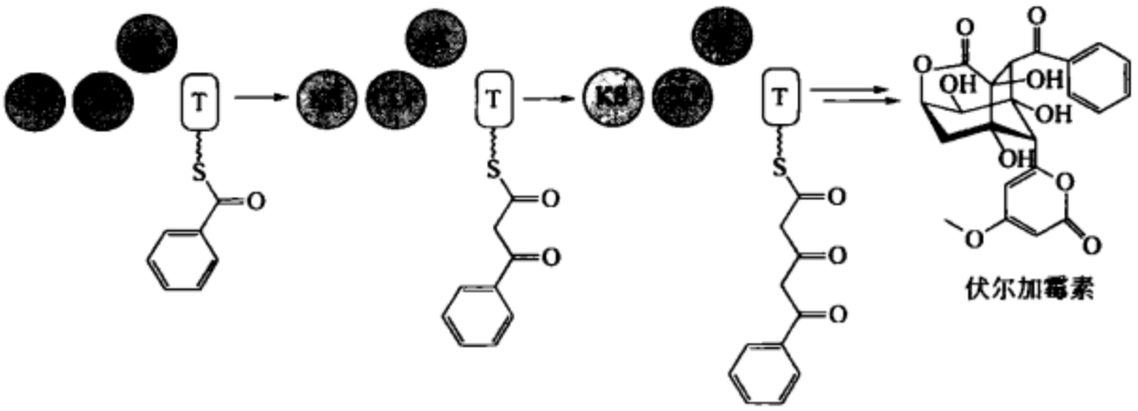
制霉菌素

KS—酮酯酰ACP合成酶; AT—酰基转移酶; T—硫酯酶;
KR—酮酯酰ACP还原酶; DH—脱水酶

图 3.2-2　制霉菌素的Ⅰ型 PKS 模块结构

② Ⅱ型 PKS。Ⅱ型 PKS 是一个多功能酶复合体，只包含一套可重复使用（interative）的结构域，每一结构域在重复的反应步骤中被多次地用来催化相同的反应，以伏尔加霉素（enterocin）合成为例，Ⅱ型 PKS 由一组分开的多功能酶组成，如图 3.2-3 所示，伏尔加霉素的Ⅱ型 PKS 基因簇包括酮酯酰 ACP 合成酶 KS、酰基转移酶 AT、链长决定因子 CLF 和硫酯酶 T。Ⅱ型 PKS 合成机制的研究不如Ⅰ型透彻。其中，KS/AT 控制第 1 次环化的区域专一性，而 CLF 决定链的长度。Ⅱ型 PKS 和Ⅰ型 PKS 相比较，Ⅱ型 PKS 在起始单位和延长单位的选择方面变化不大，所以它的结构多样性主要是来自于聚酮合成后的修饰步骤。

③ Ⅲ型 PKS。Ⅲ型 PKS 和其他两种 PKS 迥然不同，它不依赖于作为酰基载体的 ACP 及其上的 4′-磷酸泛酰巯基乙胺。Ⅰ型和Ⅱ型 PKS 常常通过 ACP 活化酰基 CoA 的底物，而Ⅲ型 PKS 直接作用于酰基 CoA 活化的简单羧酸，所有类型的 PKS 都是通过酰基 CoA 的脱羧缩合和 KS 结构域或亚基催化 C—C 键的形成。



KS—酮酯酰ACP合成酶; AT—酰基转移酶; CLF—链长决定因子; T—硫酯酶

图 3.2-3 伏尔加霉素的Ⅱ型 PKS 模块结构

(2) NRPS 非核糖体多肽合成酶是催化非核糖体聚肽类化合物合成的关键酶，典型的 NRPS 是以模块形式存在的多功能酶，每一模块含有一套独特的、非重复使用的功能域。一个 NRPS 延伸模块至少包含三个催化功能域：缩合结构域 C、腺苷化结构域 A 和肽酰转运蛋白 PCP。其中，腺苷化结构域负责底物氨基酸的选择和活化，并将活化后的氨基酸转运至肽酰转运蛋白功能域上形成氨酰化硫酯，缩合结构域催化肽酰转运蛋白上氨酰化硫酯的氨基与上游模块肽酰转运蛋白上的氨酰化硫酯缩合形成肽键。如图 3.2-4 所示，万古霉素的 NRPS 基因簇包括缩合结构域 C、腺苷化结构域 A 和肽酰转运蛋白 PCP。其合成路线包括：①PCP 的 T 位点活化，T-OH 活化为 T-SH；②模块识别各自编码的底物，包括酪氨酸（tyrosine）、β-羟基酪氨酸（β-OH-tyrosine）、预苯酸（prephenate）、β-羟基预苯酸（β-OH prephenate）、苯甘氨酸（prenylglycine）、牛丙二酰辅酶 A（malonyl-CoA）和 3,5-二羟基苯甘氨酸[3,5-$(OH)_2$-prenylglycine]；③肽链起始、延伸和终止；④新合成的伏尔加霉素前体进行环化、糖基化和卤素取代等结构修饰，并将合成产物伏尔加霉素从 PKS 上卸载下来。

(3) 杂合 NRPS-PKS 聚合酶 PKS 和 NRPS 复合酶的基因主要是由连续的重复模块（module）构成，每个基因模块的产物可催化多聚酮或多肽链的一轮延伸和可能的修饰。近年来，发现许多代谢产物的合成需要 PKS 和 NRPS 共同参与，以博来霉素（Bleomycin）合成为例，如图 3.2-5 所示，博来霉素的 PKS 基因簇中，BlmⅧ基因编码的 PKS，其 KS 活性域与其他已报道的 NRPS/KS 杂合的 KS 之间的相似性要比与一般非杂合 PKS 的 KS 相似性高，NRPS/KS 杂合的 KS 活性域催化上游 NRPS 合成的 MT 酰肽基（peptidyl-*S*-PCP）从 PCP 转移到 KS 上，形成 MT 肽酰基-KS 聚酮链，而非杂合 PKS 的 KS 是催化上游 PKS 模块合成的聚酮链（aeyl-*S*-ACP），从 ACP 转移到 KS 上，形成酰基-KS 聚酮链，然后催化与同一模块上 ACP 结合的丙二酰基（malonyl-*S*-ACP）脱羧而使碳链延伸一个二碳单元。通过序列比较发现，杂合 NRPS-PKS 模块之间，特别是不同肽链之间的连接片段（linker）往往具有特殊的氨基酸组成，形成亲水连接区，这个片段有可能在 NRPS 和 PKS 之间的相互联系中起重要作用。

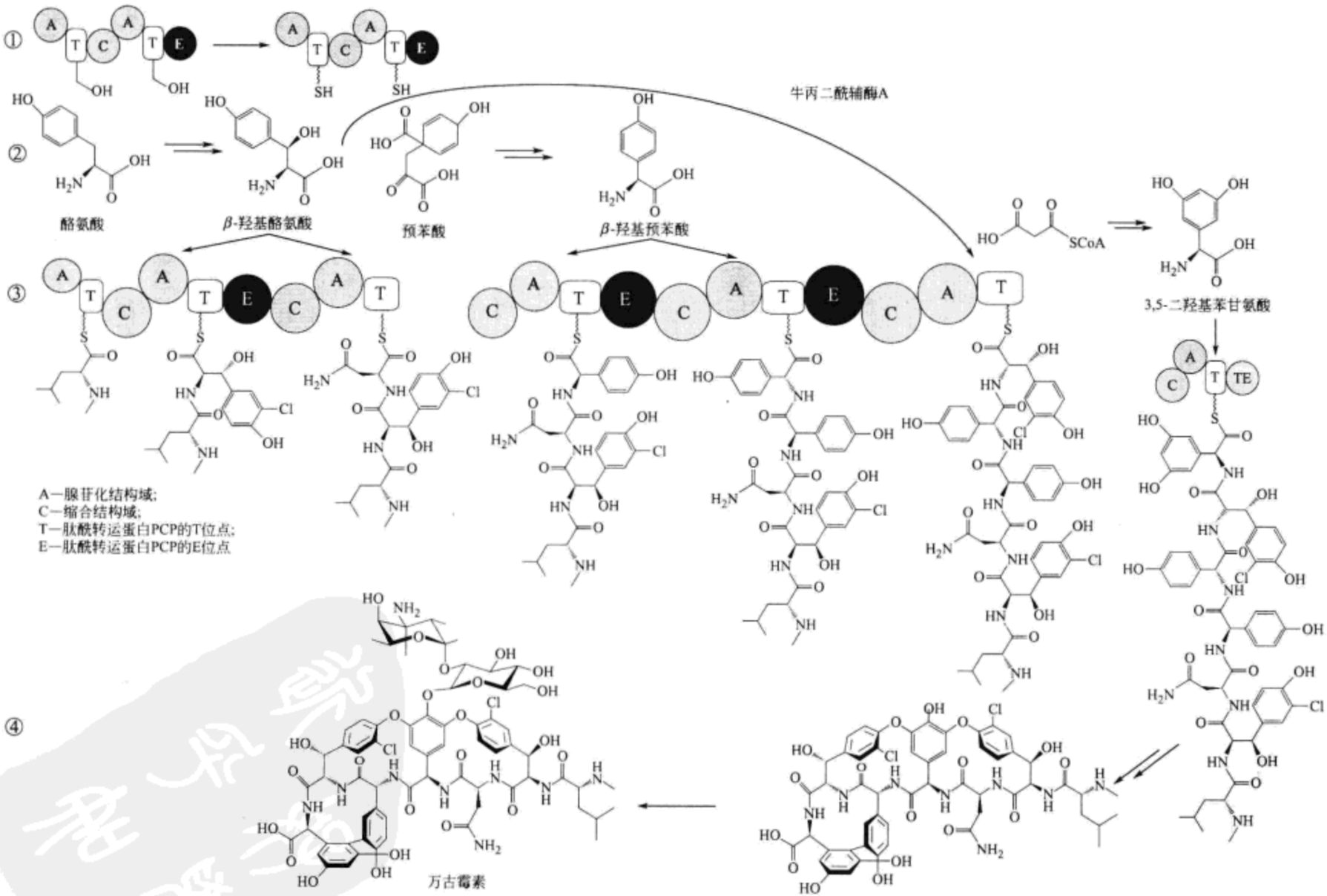


图 3.2-4 万古霉素(Vancomycin)NRPS模块结构
①～④见正文叙述

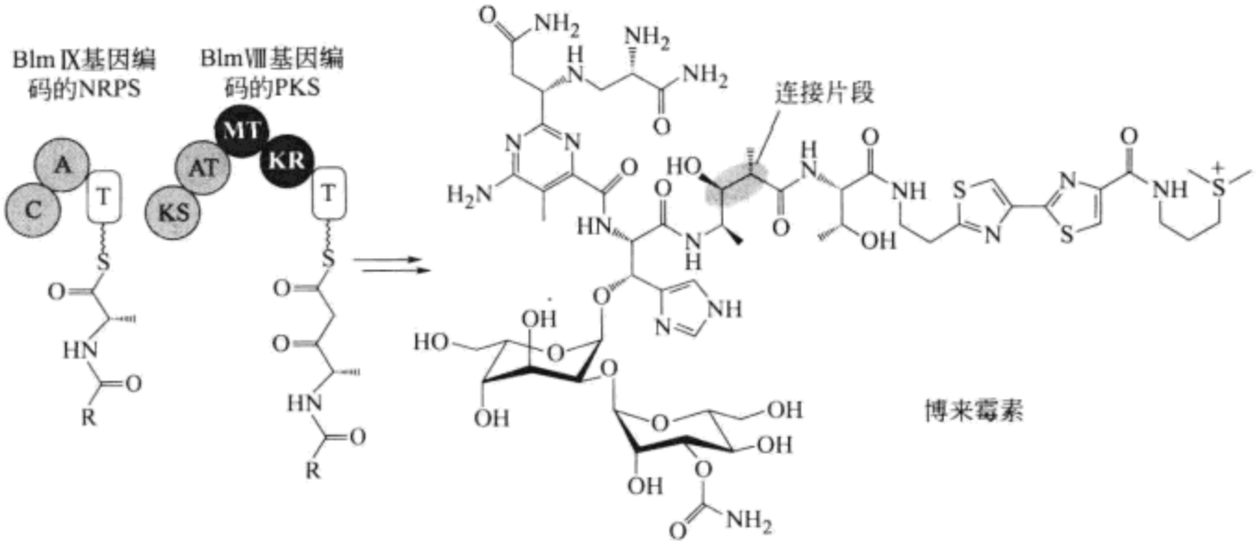


图 3.2-5 博来霉素（Bleomycin）的杂合 NRPS-PKS 聚合酶模块结构

3.2.3 微生物基因簇组合生物合成天然产物的策略

3.2.3.1 异源表达生物合成基因簇

微生物以其生长迅速、代谢旺盛等特性而被公认为是生产小分子化合物的最佳“车间”，诸如大肠杆菌、酿酒酵母等被公认为是对人类有益无害的微生物，它们的遗传背景已经研究得非常透彻。在过去的 20 年里，植物化学、遗传代谢工程学以及微生物基因组学的快速发展，使一些化合物的生物合成路线得到了阐明，与此同时，发现了许许多多新的生物合成路线，利用微生物成功地开发了一些具有商业价值的新型化合物。特别是近年来，基因操作在遗传工程领域的娴熟应用，使得许多异源合成路线可以在宿主菌体内表达，打破了遗传学的限制，使得各国学者对于生产新型化合物的调控达到了新的深度和广度。例如，黏杆菌的合成路线可以在恶臭假单胞菌中表达[3]。目前已报道的由黏杆菌产生的天然产物有数千种，其中聚酮类和非核糖体多肽类占据相当大的比例，这两种化合物骨架的合成分别以聚酮合成酶（PKS）和非核糖体多肽合成酶（NRPS）来催化。近年来的研究热点是通过使上述合成酶基因簇突变改变其催化方式，进而建立新化合物库。但这些催化过程不是在原化合物产生菌中进行的，而是采用了其他表达体系如模式链霉菌、大肠杆菌以及假单胞菌等菌株，异源表达修饰后的生物合成基因簇，以此得到结构新颖、产量高、药物活力增强的系列天然药物。

埃博霉素是由黏细菌纤维堆囊菌产生的一类具有促微管聚合活性的大环内酯类化合物，是一种具有类似紫杉醇微管蛋白聚合和微管稳定作用的新抗肿瘤药物。其被称为“后紫杉醇药”（postpaclitaxel agents），在抗肿瘤候选药物中埃博霉素的抗

肿瘤活性最为理想。埃博霉素的生物合成基因，是由多个功能模块编码的多酶复合体组成，同时含有聚酮合成酶和非核糖体多肽合成酶的大操纵子。根据同位素标记试验结果和合成酶全基因簇功能的推测，埃博霉素的生物合成包括聚酮链的引发、链合成的起始和噻唑环的形成、链的延伸和转移、链合成的终止释放和环化以及产物的后修饰5个阶段。如图3.2-6所示，2006年，Mutka研究小组成功地将纤维堆囊菌中埃博霉素生物合成基因epoA、epoB、epoC、epoD、epoE和epoF克隆到大肠杆菌K207-3中表达，同时将环化酶基因敲除掉，直接得到了埃博霉素C和D。此外，将聚酮类化合物前体SNAC[(*E*)-2-甲基-3-(2-甲基噻唑-4-烃基)丙烯酸]作为底物培养，只表达克隆有epoD、epoE和epoF基因的大肠杆菌，结果同样产生了埃博霉素C和D[4]。

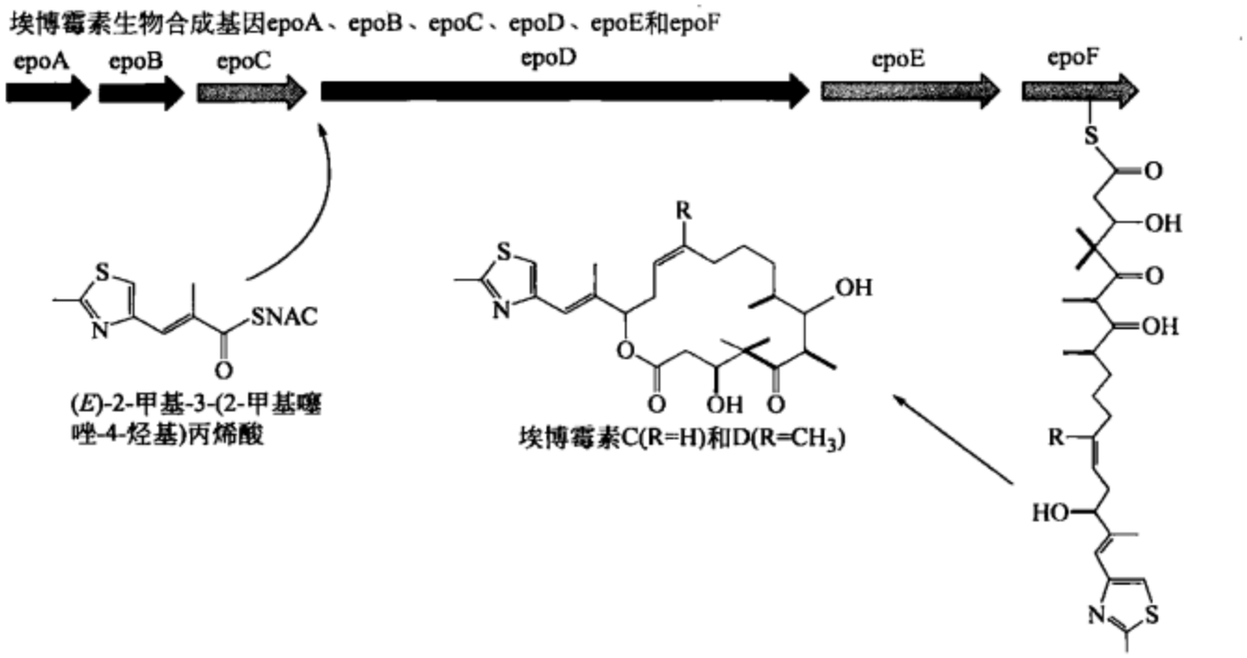


图3.2-6　纤维堆囊菌中埃博霉素生物合成基因

如图3.2-7所示，Park等人将整套埃博霉素合成基因克隆到敲除了苦霉素聚酮合成酶基因簇的委内瑞拉链霉菌中表达，培养4天后，工程菌产生了约0.1μg/L的埃博霉素B。当把编码细胞色素P450的环氧酶的epoF基因敲除后，工程菌特异性地生产（产量为0.4μg/L）埃博霉素D。据此，推测埃博霉素的合成路线。植物来源的天然产物也是筛选新药的重要资源，但由于成本、环境等因素限制，人们无法大量获得此类化合物。组合生物合成则是一个可行的途径。通过分析天然产物在植物中的代谢途径，将其中的关键酶进行表达，在微生物中重建，改造天然产物的生物合成途径，则可大量生产天然化合物及其衍生物。如番茄红素是成熟番茄的主要色素，是一种不含氧的类胡萝卜素，对防治前列腺疾病、前列腺癌、肺癌、胃癌、乳腺癌有奇效，有效抑制癌细胞的扩散和复制，被西方国家称为“植物黄金”，保护细胞DNA免受自由基损害，防止细胞病变、突变、癌变，含强力抗氧化生物活物质，能促使细胞生长和再生，美容，延缓衰老，维持皮肤健康。如图3.2-8所示，Yoon等人将酿酒酵母中的甲羟戊酸合成途径克隆到大肠杆菌中，同时将成团泛菌（*Pantoea agglomerans* Ewing and Fife）和其类胡萝卜素基因（crtE，crtB，

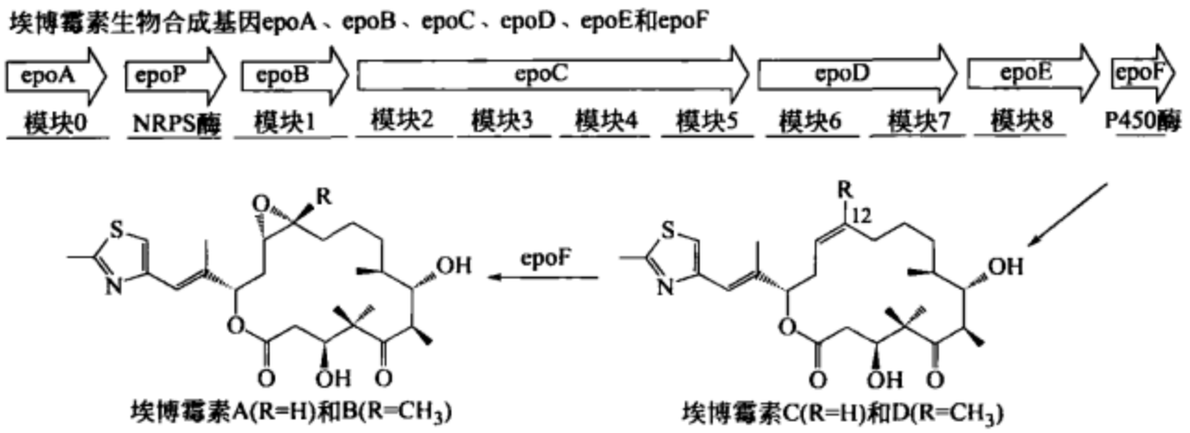


图 3.2-7　委内瑞拉链霉菌中埃博霉素生物合成基因

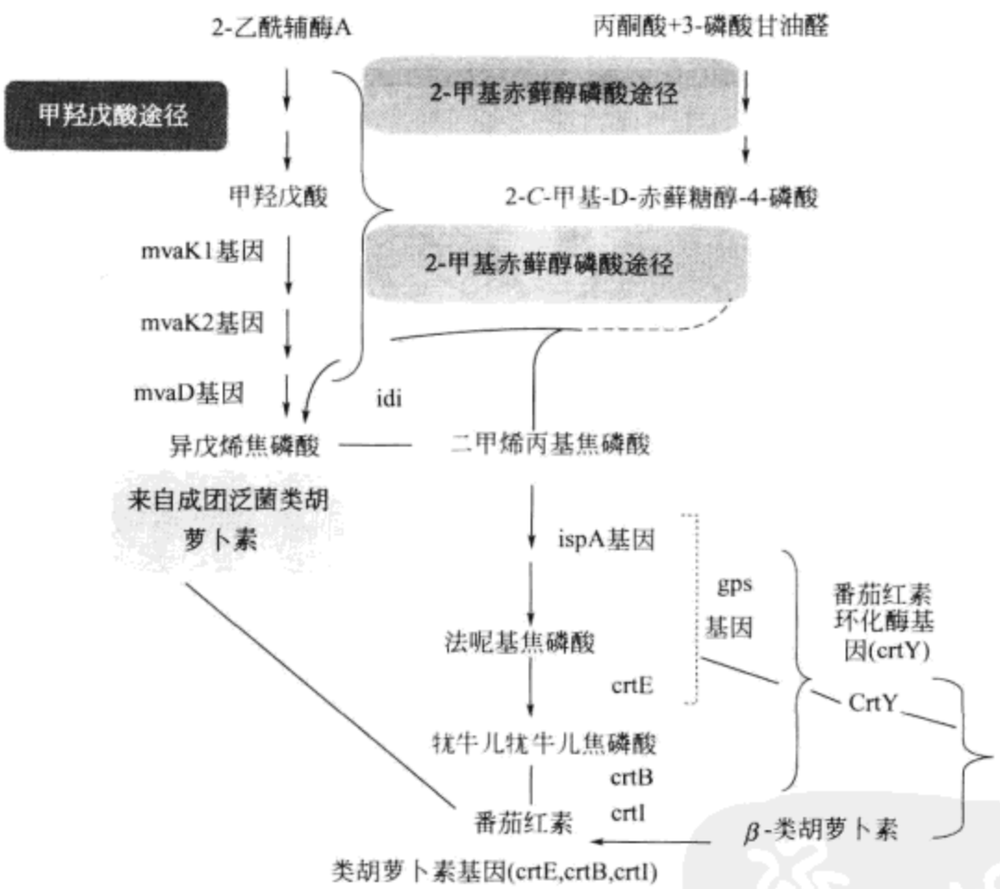


图 3.2-8　番茄红素的生物合成

crtI）分别克隆到大肠杆菌中，在 2YT 培养基上培养，都成功得到了番茄红素，其中 crt 基因来源于成团泛菌的工程菌，产量达到了 60mg/L，而 crt 基因来源于菠萝泛菌的工程菌产量只有 35mg/L[5]。同年，Yoon 等人在原有的基础上将番茄红素环化酶基因（crtY）成功克隆到大肠杆菌中，仅得到了 β-类胡萝卜素的工程菌，且产量达到 503mg/L[6]。

3.2.3.2　对生物合成基因簇实施突变

对参与微生物次生代谢合成的基因簇中部分合成基因中的特定结构域敲除或者替换，突变菌株作用于不同的底物，将会产生与原代谢产物不同的新化合物及衍生

物；而在另一方面，使用含有被替代区域上下游序列的特定突变质粒，其上下游序列之间的原有基因片段被其他生物合成基因片段所代替，原来的合成酶失去被替换基因的活性，转而具有了整合基因的活性。两种突变方法所产生的突变株，对相同或者不同底物改变了催化方式或者对某个特殊的取代基的催化活性缺失，由此改变了合成代谢物的结构，并产生多种结构修饰的代谢产物，为此，对生物合成基因簇实施定向突变，是产生多种代谢衍生物的重要方式之一。例如，糖基基团存在与否，与大环内酯类抗生素的抑菌、生产菌自我保护和控制大环内酯类抗生素内酯环合成方面有着重要的作用。如图 3.2-9 所示，Ora 等[7]采用敲除编码苦霉素聚酮合成酶和脱氧糖胺合成酶基因质粒，重组委内瑞拉链霉菌，重组菌表达了与脱氧糖合成（合成胸苷氯喹 TDP-D-奎诺糖或者 TDP-D-olivose）路线相关的糖基转移酶辅助蛋白对 DesⅦ/DesⅧ，利用构建好的重组菌分别与不同的底物——10-脱氧薇甘菊内酯、narbonolide 和泰乐酮进行培养，发现产生了带有糖基基团的产物：糖基化的 10-脱氧薇甘菊内酯和那波霉素。与此相反，当用来自弗氏链霉菌的 TylMⅡ/TylMⅢ基因取代糖基转移酶辅助蛋白对 DesⅦ/DesⅧ时，则只产生了糖基化的泰乐星衍生物。而没有产生任何糖基化的 10-脱氧薇甘菊内酯和那波霉素，说明突变后的糖基转移酶 TylMⅡ/TylMⅢ对不同的底物有专一的选择性，并由此催化产

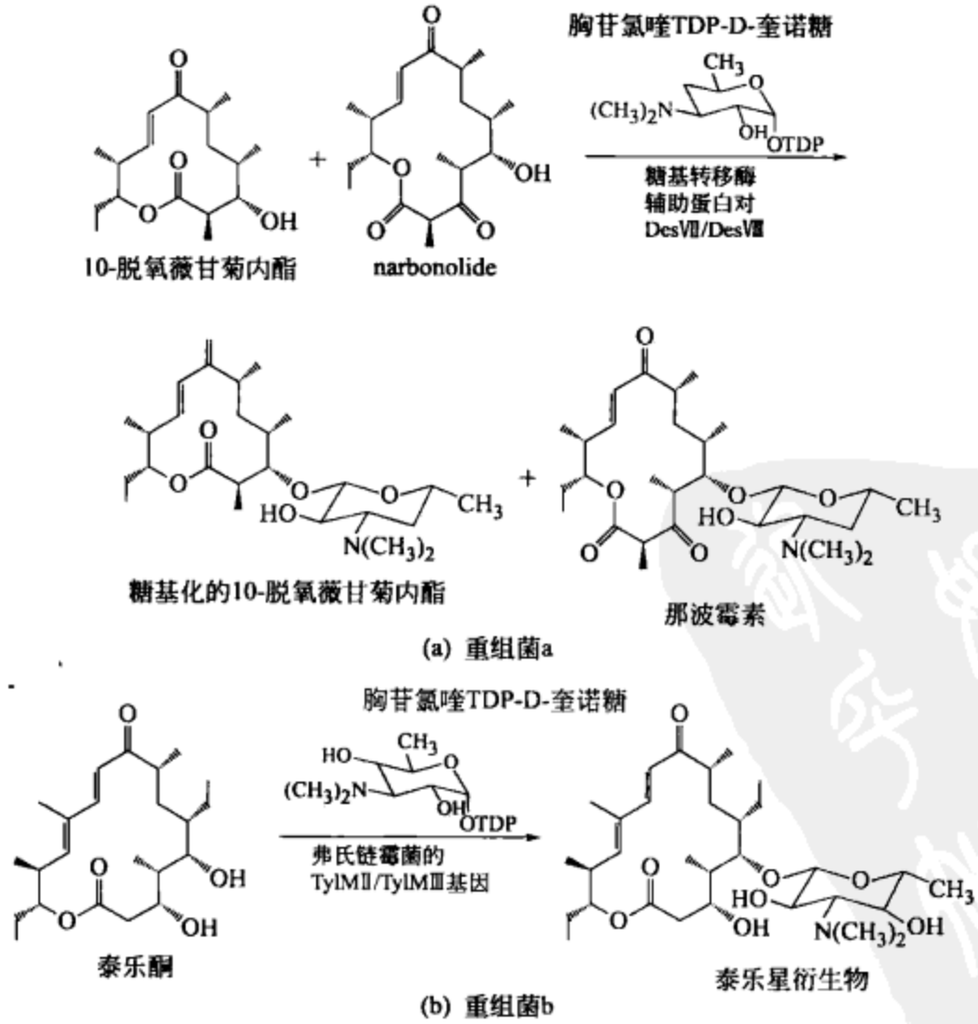


图 3.2-9　那波霉素和泰乐星衍生物的组合生物合成

生不同的代谢产物。而 Ursula 研究小组[8]，用缺少 eryA 的 PKS 基因簇，糖基转移酶辅助蛋白对 eryCⅢ/eryBⅤ以及 *N*,*N*-二甲基转移酶基因，重组构建百金花链霉菌突变体 SGQ_2，突变株 SGQ_2 则高度表达 angAⅠ、angAⅡ、angMⅢ、spnO、ang-ORF14、angB、angMⅠ和 angMⅡ基因，利用构建好的重组菌以泰乐酮为底物对其进行培养，结果产生了新型化合物 5-*O*-*β*-D-angolosaminyltylactone，产量接近底物的一半；同样用百金花链霉菌突变体 SGQ_2 来表达 tylAⅠ、tylAⅡ、tylMⅢ、tylB、tyl1a、tylMⅠ和 tylMⅡ基因，采用相同底物泰乐酮对其进行培养，结果产生了新型化合物 5-*O*-*β*-D-mycaminosyltylactone。由此说明突变后的 SGQ_2，某个特殊的取代基的催化活性缺失，因而对相同底物改变其催化方式，并由突变后不同催化基因簇代谢产生不同的代谢产物。

植物来源的天然产物代谢产物极为丰富，但由于生长周期较长，代谢产物含量极低和提取成本较大等因素限制，很难得到大量的代谢产物及其衍生物。而对组合生物中涉及的关键基因实施点突变，则可能是一个有效的途径，将其关键酶进行突变后修饰，通过微生物异源宿主表达，则有可能得到大量的天然化合物及其衍生物，例如，异胡豆苷合成酶（strictosidine synthase，STR），是吲哚生物碱生物合成的一种关键酶，如图 3.2-10 所示，以异胡豆苷为起始物可以合成各种各样的生物碱，通过定点突变技术，发现将谷氨酸 309 突变为丙氨酸后，转换率下降了近 900 倍，由此可见谷氨酸 309 在催化中发挥着重要作用[9]。

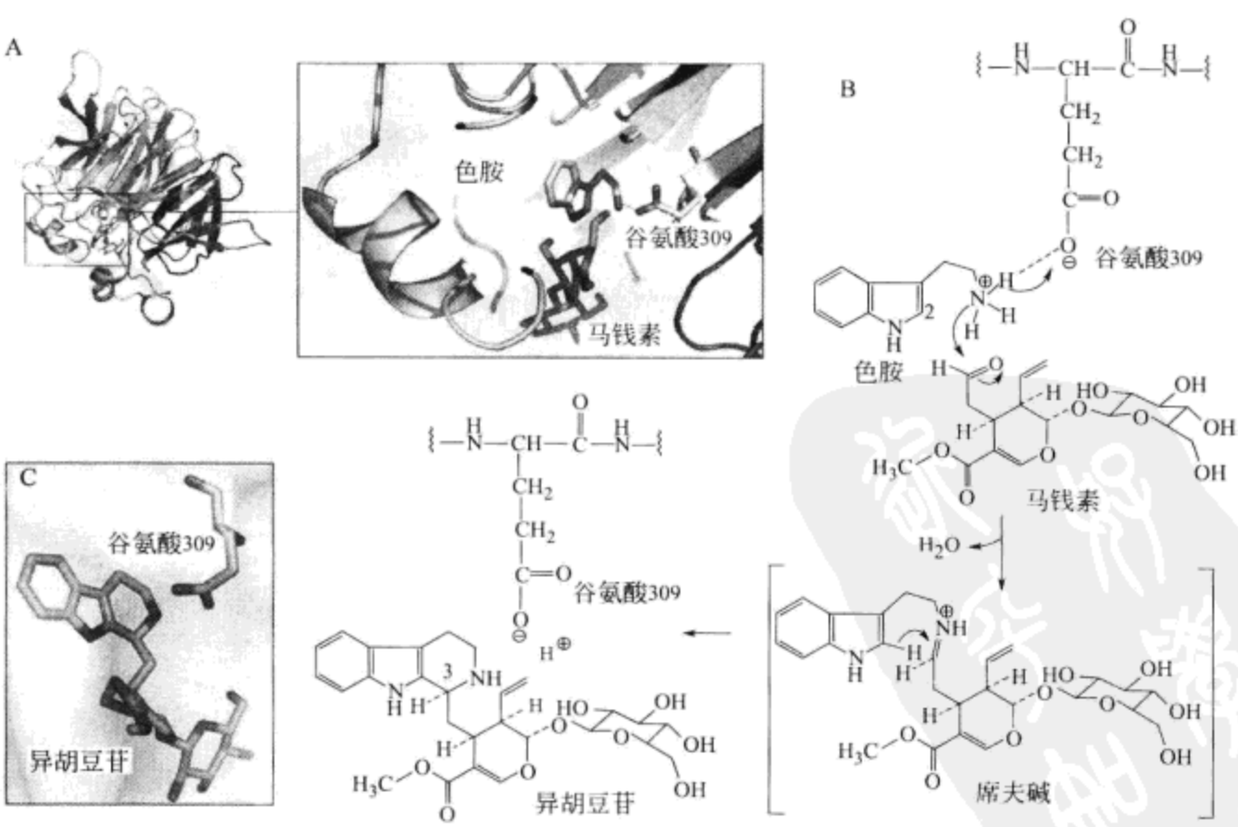


图 3.2-10　异胡豆苷定点突变

A—STR 与色胺和裂环马钱素的侧视图以及活性位点的特写；

B—反应机理；C--谷氨酸 309 与产物异胡豆苷晶体结构的特写

3.2.3.3　重组结构域或模块

将代表不同代谢产物或者底物信息的相关结构域或模块组合，异源宿主表达，亦可产生结构与原产物差异较大的代谢产物或者与代谢产物结构相关的代谢相关衍生物，这一策略也是微生物组合生物技术发展的重要内容之一。例如，植物来源的黄酮化合物，次生代谢产物极为丰富，药理作用广泛，具有抗氧化、抑制肿瘤生长、类雌性激素等多种作用，但由于生长周期较长、代谢产物含量极低和提取成本较大等因素限制，常规的全化学合成的方法很难得到大量的代谢产物及其衍生物。非常可喜的是，随着大量与植物黄酮类化合物相关的基因簇［典型 PKS Ⅲ聚酮合成酶，查尔酮合成酶（chalconesynthase，CHS）］的成功克隆和鉴定，利用基因工程技术，将不同黄酮类化合物合成相关的结构域组合，构建含有多种信息的大型质粒，异源宿主表达，就有可能产生大量的黄酮衍生物。据此，2009 年 Sueharu 研究小组成功地构建了多功能结构域质粒，质粒的构建分别包括三方面结构域信息，见图 3.2-11 所示：①底物合成相关结构域，包括起始底物 pCDF 和延伸底物 pCDF

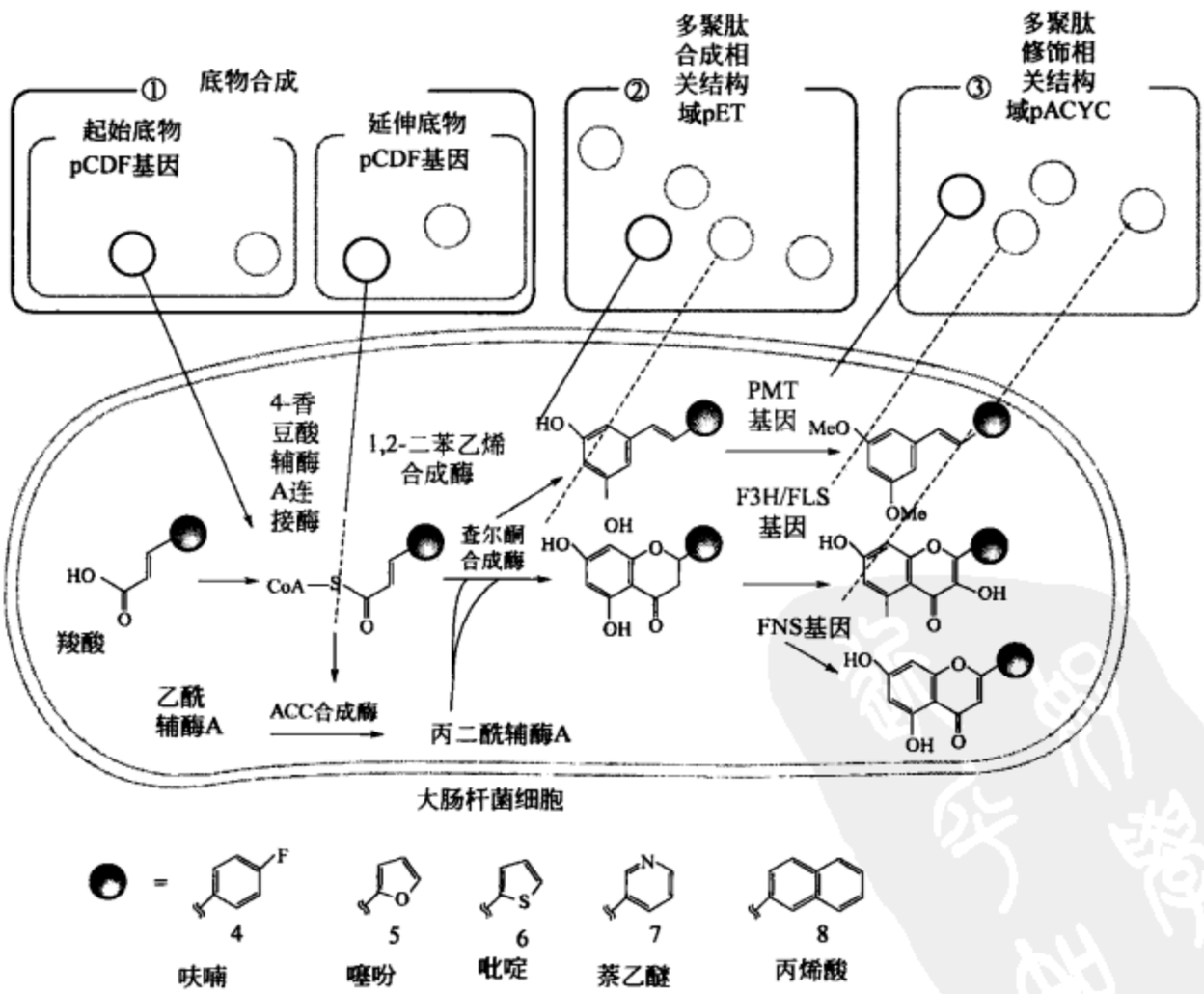


图 3.2-11　多功能质粒合成黄酮和二苯乙烯类化合物的生物合成路线

①底物合成相关结构域，包括起始底物 pCDF 基因和延伸底物 pCDF 基因；②多聚肽合成相关结构域 pET；③多聚肽修饰相关结构域 pACYC，羧酸为前体药物，4～8 为羧酸的延伸前体药物

基因；②多聚肽合成相关结构域 pET；③多聚肽修饰相关结构域 pACYC，重新组合构建为一个多功能的质粒，通过 pET-PT7-4GS 或 pRSF-ACC 载体，组成大肠杆菌重组菌，利用构建好的重组菌分别以呋喃（furyl）、噻吩（thienyl）、吡啶（pyridyl）、萘乙醚（naphthyl）、丙烯酸（acrylic acids）为前体底物，结果产生了多种二氢黄酮类（flavanones）或者二苯乙烯类（stilbenoids）化合物。其催化过程包括：①先由 4-香豆酸辅酶 A 连接酶（4CL）催化羧酸转化为乙酰辅酶 A，再由 ACC 合成酶催化乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A；然后丙二酰辅酶 A 分别在典型 PKSⅢ聚酮合成酶、查尔酮合成酶 CHS 或 1,2-二苯乙烯合成酶（stilbenesynthases，STSs）催化下，形成黄酮或二苯乙烯类化合物；②克隆植物枳实（*Citrus species*）中 F3H/FLS 基因构建 pACYC 质粒，并通过 pET-PT7-4GS 和 pRSF-ACC 载体，导入大肠杆菌（*E. coli*）组成重组菌，形成黄酮醇化合物、山柰酚、kaempferol 或高良姜黄素（galangin 3,5,7-三羟基黄酮）；③克隆植物欧芹（parsley，*Petroselinumhortense*）中 FNS 基因构建 pACYC 质粒，并通过 pET-PT7-4GS 和 pRSF-ACC 载体，导入大肠杆菌（*E. coli*）组成重组菌，形成黄酮醇化合物、芹菜素（apigenin）或白杨素（Chrysin）。由此说明重组后的大肠杆菌，可以通过表达多种催化方式，催化各种底物，产生多种不同的代谢产物[10]。取代基位置的改变，往往会影响天然次级代谢产物的药效和毒性，据此，Kenji Watanabe[11]对具有抗肿瘤作用的化合物棘霉素（echinomycin）的生物合成 NRPS 基因簇，重组其中 3 个模块的个别模块（Ecm7 被 Swb17 模块置换），然后导入异源宿

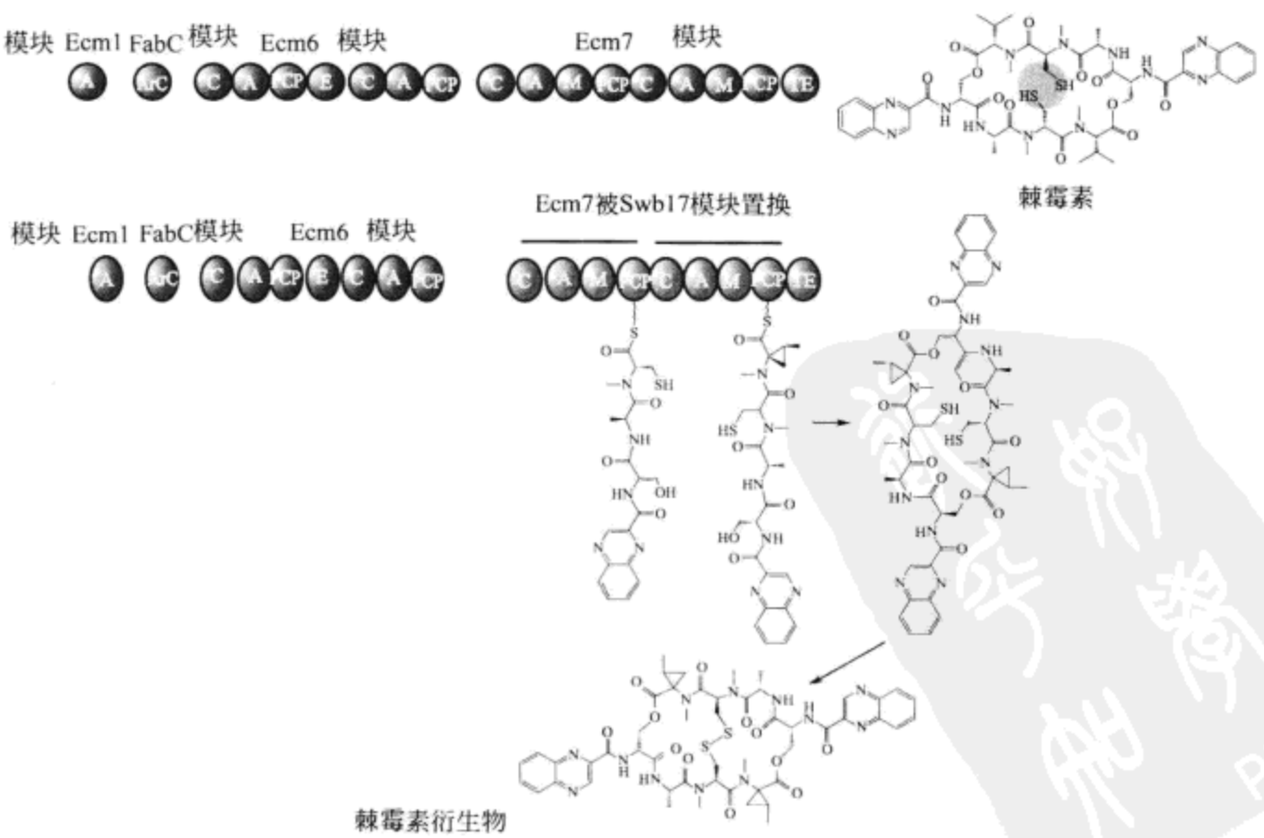


图 3.2-12 棘霉素和棘霉素衍生物在 *E. coli* 中的合成路线，棘霉素 Ecm7 模块被 Swb17 模块置换后合成棘霉素衍生物

主如大肠杆菌，产生了1种棘霉素的衍生物，该衍生物表现出了突出的抑菌活性，由此说明基因簇部分模块重组后，可以产生多种不同活性代谢产物[12]。其转化过程和模块互换过程见图3.2-12所示。

3.3　微生物基因簇在药物生物合成中的应用

3.3.1　放线菌基因簇在药物生物合成中的应用[13]

放线菌（*Actinobacteria*）是一类革兰阳性细菌，曾经由于其形态被认为是介于细菌和霉菌之间的物种。它们具有分支的纤维和孢子，依靠孢子繁殖，表面上和属于真核生物的真菌类似，目前通过分子生物学方法，放线菌的地位被肯定为细菌的一个大分支。放线菌用革兰染色可染成紫色（阳性），和另一类革兰阳性菌——厚壁菌门相比，放线菌的GC含量较高。已描述的放线菌至少有180个属、4000多种，从放线菌中发现了多种活性代谢产物，包括抗生素（红霉素Erythromycin、四环素Tetracycline、万古霉素Vancomycin）、抗真菌药物（两性霉素B，Amphotericin B）、抗肿瘤药物（丝裂霉素C）、抗寄生虫药（伊维菌素Ivermectin）和免疫抑制剂（雷帕霉素Rapamycin）等，这些产物在医药工业生产中占有重要地位，见表3.3-1所示，目前已基本完成全基因组测序的微生物大约有700多种（NCBI数据库），放线菌有71多种。见图3.3-1所示，Markus Nett的研究报告中列出了已经完成次级代谢的基因簇鉴定的单个放线菌46种，其中链霉菌科、小单孢菌科和假诺卡菌等的微生物次级代谢的基因簇，表现极为丰富。天蓝色链霉菌A3（2）[*Streptomyces coelicolor* Muller A3（2）]、红霉糖多孢菌（*Saccharopolyspora erythraea* Waksman NRRL 2338和*Salinispora tropica* Scripps CNB-440）显示出其次生代谢产物的复杂性，涉及PKS、NRPS、terpene和loci等17个基因簇。这些模式菌全基因组序列测序成功，为放线菌次生代谢产物合成基因组的研究奠定了极为重要的生物信息学基础。

表3.3-1　放线菌门（Actinobacteria）16S rRNA的基因组顺序情况

菌的分类	已完成基因组测序菌株	未公布基因组序列菌株	已完成基因组测序但未完成注解菌株	未完成基因组测序菌株
酸微菌亚纲（酸微菌目）	氧化亚铁硫杆菌	世田北里孢菌	奇迹束丝放线菌	*Iamibactermajanohamensis* Kurahashi
	天蓝色链霉菌	密苏里游动放线菌	坐皮肤球菌	*Catenulispora rubra* Tamura
	灰色链霉菌		粪短状杆菌	*Actinospica acidiphila* Cavaletti
	阿维链霉菌			*Nakamurella multipartita* Yoshimi
	疮痂链霉菌			*Microsphaera multipartita* Yoshimi
	嗜酸纤维素分解菌			昏暗地嗜皮菌
	棕木弗兰克菌			*Sporichthya brevicatena* Tamura

续表

菌的分类	已完成基因组测序菌株	未公布基因组序列菌株	已完成基因组测序但未完成注解菌株	未完成基因组测序菌株
酸微菌亚纲(酸微菌目)	弗兰克菌 Cc13			*stackebrandtia flavoalba* Labeda
	弗兰克菌 EAN			哈尔滨糖霉菌
	嗜高温放线菌			玫红小双孢菌
	砂嗜盐产孢菌			小野村长脂链霉菌
	嗜盐产孢菌			白游动单胞菌
	痤疮丙酸杆菌			粉红链孢囊菌
	类诺卡菌			马杜拉放线菌
	红色糖多孢菌			弯曲高温单孢菌
	Corynebacterium efficiens Fudou			嗜盐拟诺卡菌
	谷氨酸棒杆菌			鲑色指孢囊菌
	杰氏棒杆菌			橄榄星孢小单孢菌
	白喉杆菌			陶器发仙菌
	皮疽诺卡菌			克里贝拉·卡塔克姆贝菌
	Rhodococcus jostii RHA1 Takeuchi			阿波纳耳黄球菌
	脓肿分枝杆菌			*Microhunatus ginsengisoli* Cui
	耻垢分枝杆菌			白色类诺卡菌
	微黄分枝杆菌			嗜热假诺卡菌
	麻风分枝杆菌			东方拟无枝酸菌
	牛分枝杆菌			嗜盐放线多孢菌
	结核分枝杆菌			绿色糖单孢菌
	溃疡分枝杆菌			澳大利亚糖单孢菌
	海洋分枝杆菌			星状诺卡菌
	鸟分枝杆菌			玫瑰红红球菌
	耐辐射动球菌			微代谢冢村菌
	节细菌属			*Gordonia rhizosphera* Takeuchi
	鲑肾杆菌			胞内分枝杆菌
	藤黄微球菌			*Janibacter brevis* Imamura
	嗜根库克菌			秃裸间孢囊菌
	Beutenbergia cavernae Groth			刚果嗜皮菌
	番茄细菌性溃疡病菌			反硝化琼斯菌
	密执安棍状杆菌环腐亚种			扩展短杆菌

续表

菌的分类	已完成基因组测序菌株	未公布基因组序列菌株	已完成基因组测序但未完成注解菌株	未完成基因组测序菌株
酸微菌亚纲(酸微菌目)	*Leifsonia xyli* Davis			海洋血杆菌
				纤维化纤维单孢菌
				乳酸细杆菌
				Actinobaculum urinale Hall
				溶血隐秘杆菌
				龋齿放线菌
				克氏动弯杆菌
				牛放线菌
双歧杆菌目	青春双歧杆菌			分叉双歧杆菌
				Alloscardovia omnicolens Huys
Coriobacteridae Coriobacteriales	迟缓埃格特菌			阴道阿托波菌
				Slackia faecicanis Lawson
				克林斯菌属
				产气克林斯菌
红色杆菌亚纲(红色杆菌目)	*Rubrobacter xylanophilus* Carreto			*Solinubrobacter soli* Kim
				港区散生杆菌
				伍氏束缚菌

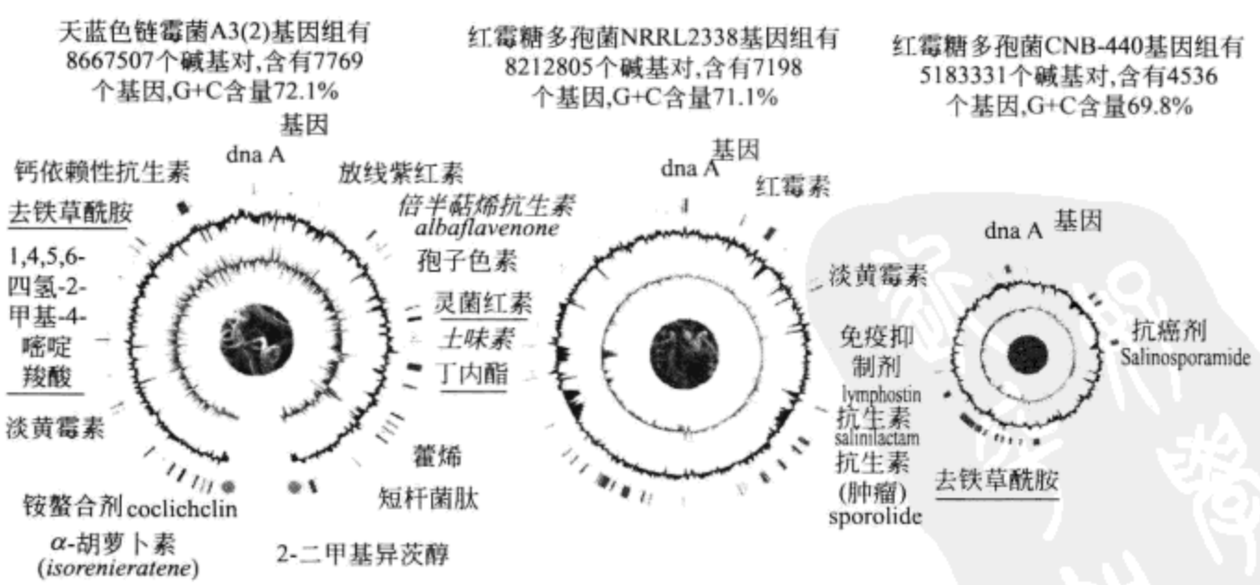
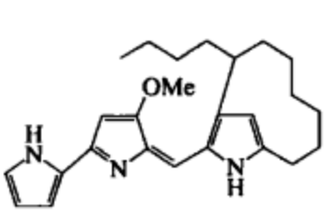
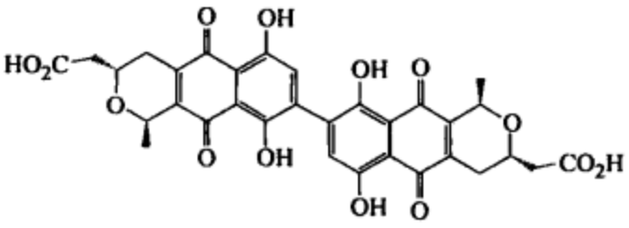


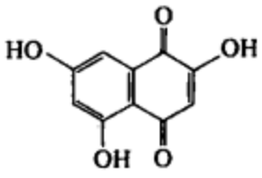
图 3.3-1　天蓝色链霉菌 A3（2）、红霉糖多孢菌（NRRL 2338 和 CNB-440）模式菌全基因组测序结果（包含 dna A 基因），所有的基因组均表明大小和数量，最内侧的环标示 GC 的含量，最外侧的环标示次级代谢的基因簇的种类［PKS，NRPS，terpene 基因簇（加下划线表示的物质），loci 基因簇和次级代谢路线（斜体表示）］

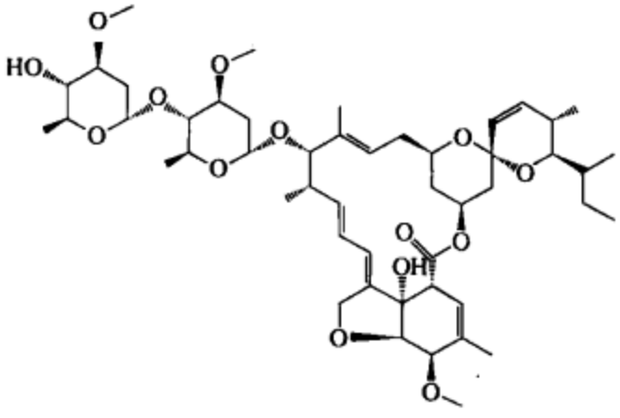
3.3.1.1 链霉菌基因簇和次生代谢产物

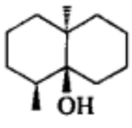
链霉菌被人们称为天然药物的合成工厂，科学家已完成多种链霉菌全基因组序列测定（见图 3.3-1 所示）。链霉菌和其他原核生物相比，可作为细胞分化发育研究的一种模式生物。其中天蓝色链霉菌 A3（2）最为典型，其基因组有 8667507 个碱基对，含有 7769 个基因，G+C 含量 72.1%，有 20 个基因簇与抗生素合成有关。其典型次生代谢产物见图 3.3-2 所示。

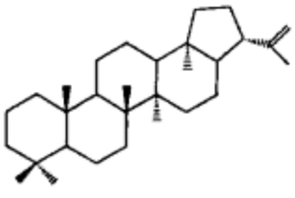

灵菌红素

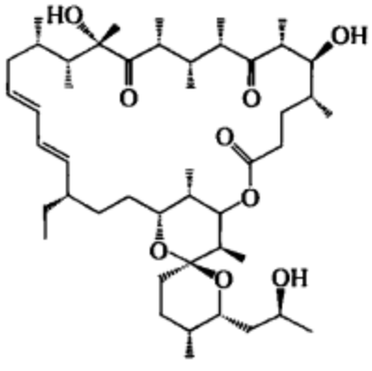

放线紫红素

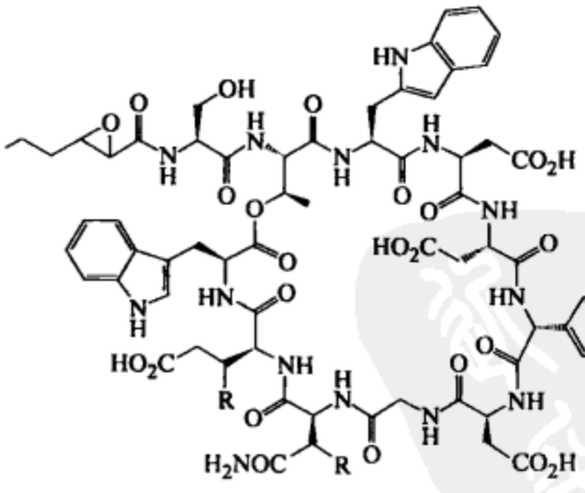

淡黄霉素

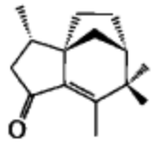

阿维菌素


土味素


藿烯


寡霉素


钙依赖性抗生素


α-胡萝卜素(isorenieratene)

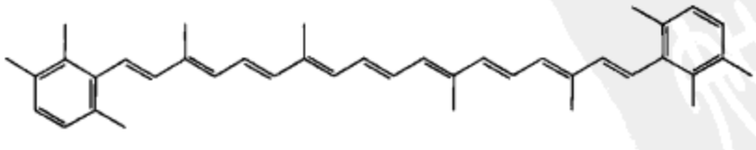

倍半萜烯抗生素albaflavenone

图 3.3-2 链霉菌典型次生代谢产物

3.3.1.2　红霉糖多孢菌基因簇和次生代谢产物

如图 3.3-1 所示，红霉糖多孢菌 NRRL2338 是一种红霉糖多孢菌模式菌，基因组有 8212805 个碱基对，含有 7198 个基因，G+C 含量 71.1%。红霉糖多孢菌 CNB-440，也是一种多孢菌模式菌，其基因组有 5183331 个碱基对，含有 4536 个基因，G+C 含量 69.8%。红霉糖多孢菌至少有 27 个基因簇与 Erythromycin 等抗生素合成有关。

3.3.1.3　放线菌基因簇合成机理

放线菌基因簇合成机理复杂，以链霉菌基因组分析为例，已有多种完整基因簇，已从链霉菌中成功分离包括聚酮合成酶途径（PKS）、非核糖体多肽合成酶途径（NRPS）和萜烯类合成酶等途径。典型的次生代谢途径基因簇长度约为 15～120kb，具有保守性、相似性和流动性等特点。研究发现，位于不同种的基因组岛中，如图 3.3-3 所示，编码类似代谢物的基因簇具有一定的流动性，例如在阿维链霉菌（*Streptomyces. avermitilis* kitasato）中，在 ATPase 操纵元启动子和磷壁酸之间，或者在灰色链霉菌［*Streptomyces griseus*（Krainsky）Waksman et Henrici］中，从精氨酰 tRNA 合成酶启动子和脂肪酸催化基因（fadC）之间插入合成寡霉素基因簇，可以得到同样的次生代谢产物寡霉素。由于放线菌基因簇存在的保守性、相似性和流动性特点，因此，如果一旦定位了某一途径的一个基因，通过分析相邻染色体区域就可以推断和研究整个代谢途径。利用多种基因工程的手段（突变、增加代谢物前体含量、沉默），对已知途径合成基因簇进行修饰和调控，就完全有可能得到丰富的系列次生代谢产物。放线菌多种基因簇的发现和鉴定，极大地丰富了次生代谢产物，也为其代谢产物的生物合成奠定了极为重要的基础。

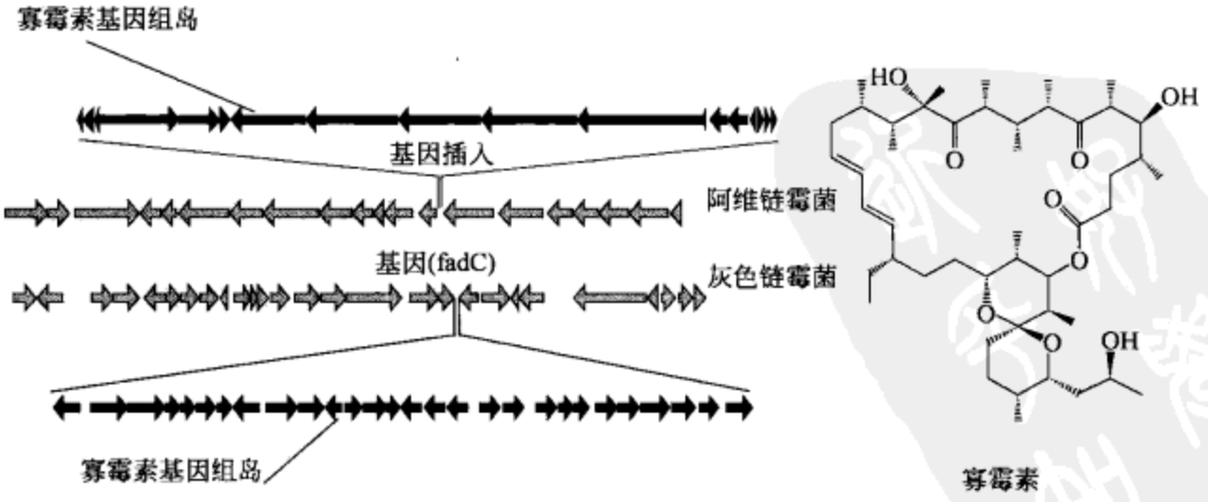


图 3.3-3　链霉素次生代谢产物（寡霉素）基因组岛：阿维链霉菌，灰色链霉菌

3.3.1.4　放线菌基因簇组合生物技术在合成抗肿瘤药物研究中的应用[14]

在 1940～2006 年期间，已经成功开发的 175 种抗肿瘤药物中，有 42%来自于

天然药物及其衍生物，微生物以其天然资源丰富、二级代谢产物丰富、生产绿色环保等突出特点，日益受到重视。近年来，随着微生物代谢基因簇信息的揭示，利用微生物基因簇组合合成技术，新发现或者新合成的抗肿瘤药物越来越多。Carlos 研究小组系统地报道了新近从放线菌基因簇中合成的多种抗肿瘤药物，并且提出了多种从放线菌基因簇组合生物合成具有抗肿瘤活性的代谢产物的各种策略，具体见图 3.3-4 所示。

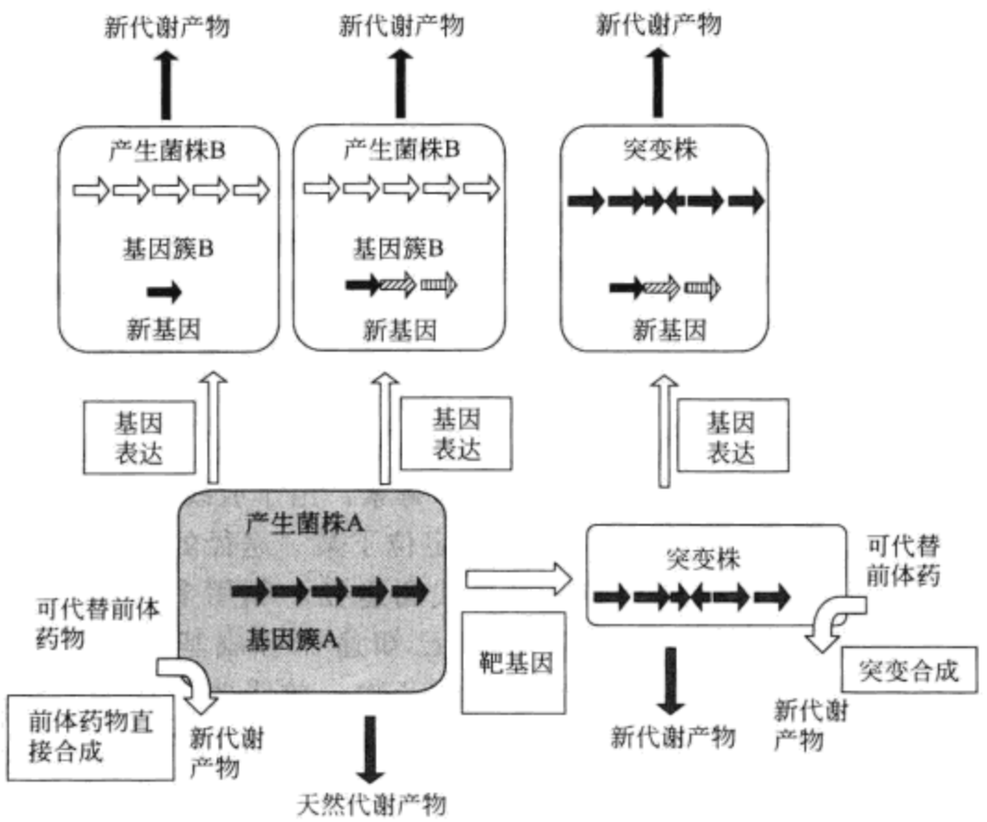


图 3.3-4　组合生物合成具有抗肿瘤活性的代谢产物的策略[15]

① 利用基因组信息研究放线菌基因簇“沉默途径”，发现新代谢物的合成途径。

② 敲除或失活部分前体的代谢途径基因簇，或降低其表达水平，使共同前体代谢物尽可能多地“流经”目标产物代谢途径，提高目标产物的相对量。

③ 修饰部分涉及生物合成基因，外源导入的其他基因簇，产生新代谢产物。

④ 前体的代谢途径基因和其他代谢途径基因异源重组或非宿主表达。

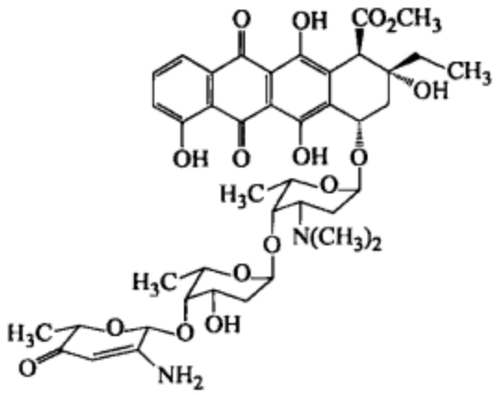
⑤ 敲除或失活部分前体的代谢途径关键基因簇，阻断前体的代谢途径，建立非前体代谢途径。

采用传统的研究方法，发现放线菌及合成新的活性物质非常困难，但是通过多种基因簇组合合成的策略（见表 3.3-2 和图 3.3-5 所示），已经发现了多种结构新颖、抗肿瘤活性强的先导化合物，特别是，近年来已经鉴定了多种海洋放线菌基因簇和多种基因簇组合合成的抗肿瘤化合物（聚酮化合物、非核糖体多肽、杂合聚酮-非核糖体多肽、异戊二烯、Indolocarbazoles、Mitomycins）。

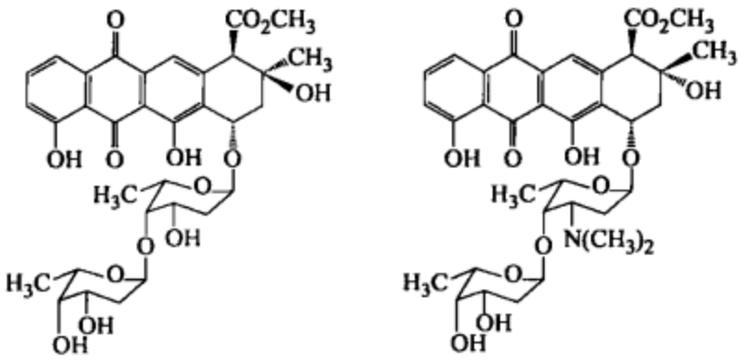


表 3.3-2　近年来已经鉴定的海洋放线菌基因簇和组合合成的抗肿瘤化合物

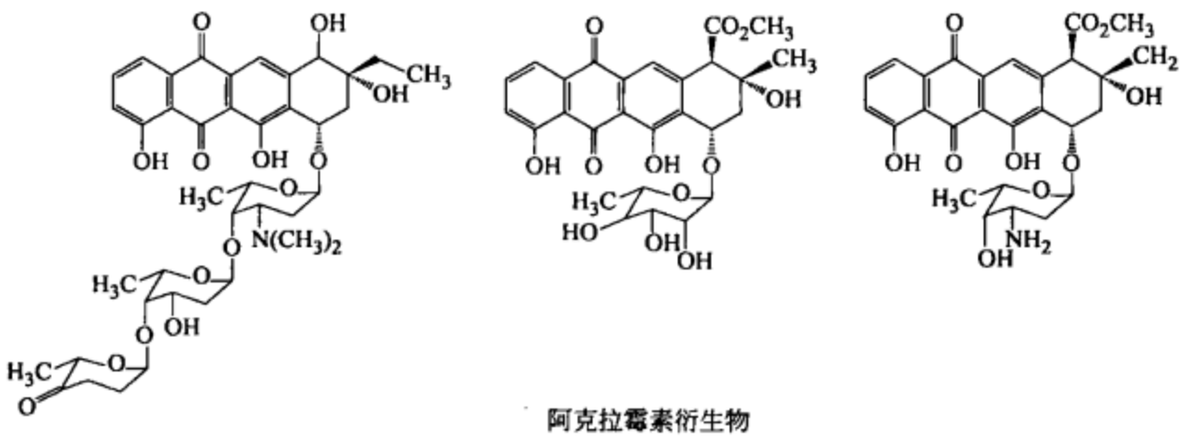
种属来源	化合物	生物活性	基因(簇)
加利利链霉菌	阿克拉霉素及其衍生物	细胞毒作用	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、突变 H028
橙色束丝放线菌	柄型菌素及其衍生物	抑制白血病(U-937)、人卵巢癌 SK-OV-3 细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、突变
土壤放线菌	阿雷西霉素及其衍生物	抑制人乳腺癌 MaTu MCF 细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、突变
链霉菌 A2991200	BenastatinA 及其衍生物	抑制 L-929 和 K-562 肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、突变
链霉菌 Tu4055	疏螺体素及其衍生物	细胞毒、抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、重组
灰色链霉菌	色霉素 A3 及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、cmmGI 突变
橄榄色链霉菌	埃罗霉素及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、突变
吸水链霉菌去势变种	格尔德霉素及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、突变
委内瑞拉链霉菌	嘉德霉素 B 及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、突变
天蓝色链霉菌 S-136	LandomycinA 及其衍生物	抑制耐药肿瘤细胞的活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)
黏土链霉菌	光神霉素及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、糖基转移酶、突变
抗生素链霉菌	殴菲杜霉素及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、FAD 加氧酶
吸水链霉菌 NRRL5491	雷帕霉素及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS-NPRS 突变
Lechevaleria aerocolonigenes R. Shinobu	瑞必克霉素及其衍生物	DNA 拓扑异构酶抑制剂	链霉菌属十字孢碱基因簇、糖基转移酶
浅灰色链霉菌 NRRL1100	SaframycinA 及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	NPRS
红霉糖多孢菌	SalinosporamideA 及其衍生物	蛋白酶体抑制剂(20S、26S)	杂合 PKS-NPRS
黄色长孢链霉菌	星孢菌素及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	瑞必克霉素基因簇、链霉菌属十字孢碱基因簇
斯特菲斯堡链霉菌	斯堡霉素及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)
淡青链霉菌 Tu49	四并菌素 C 及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)
弗氏链霉菌 Tu2717	UrdamycinA	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、突变
赫氏链霉菌 HC34	Vicenistatin 及其衍生物	抑制多种肿瘤细胞活性	PKS(Ⅰ～Ⅲ)、糖基转移酶



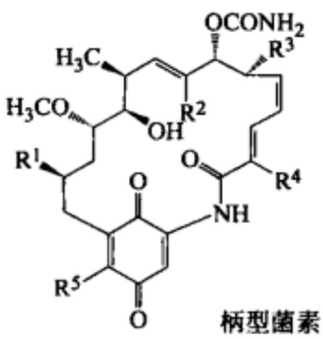
阿克拉霉素



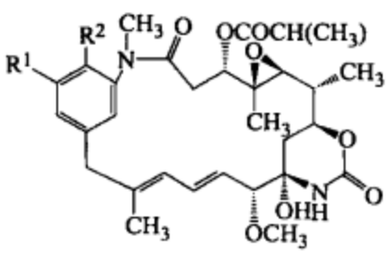
阿克拉霉素衍生物



阿克拉霉素衍生物

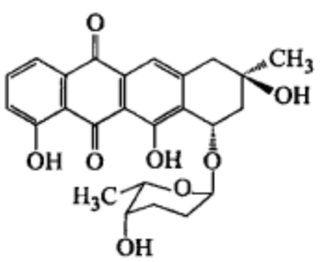


柄型菌素

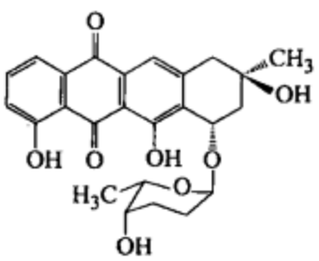


柄型菌素衍生物

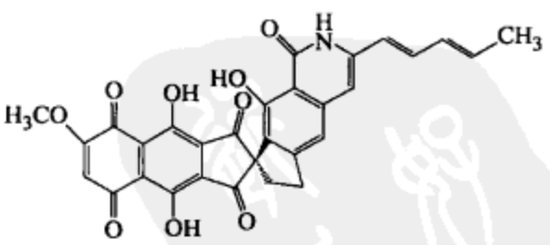
R^1=OCH_3	R^2=Cl
R^1=H	R^2=$CH=CH_2$
R^1=H	R^2=F
R^1=H	R^2=Cl
R^1=H	R^2=Br



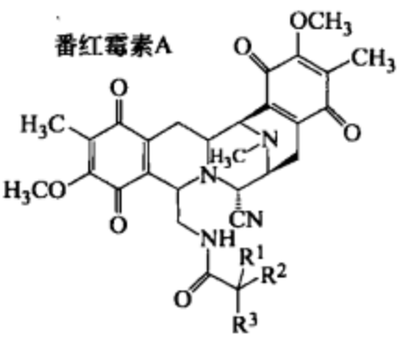
氨茴环霉素



氨茴环霉素衍生物



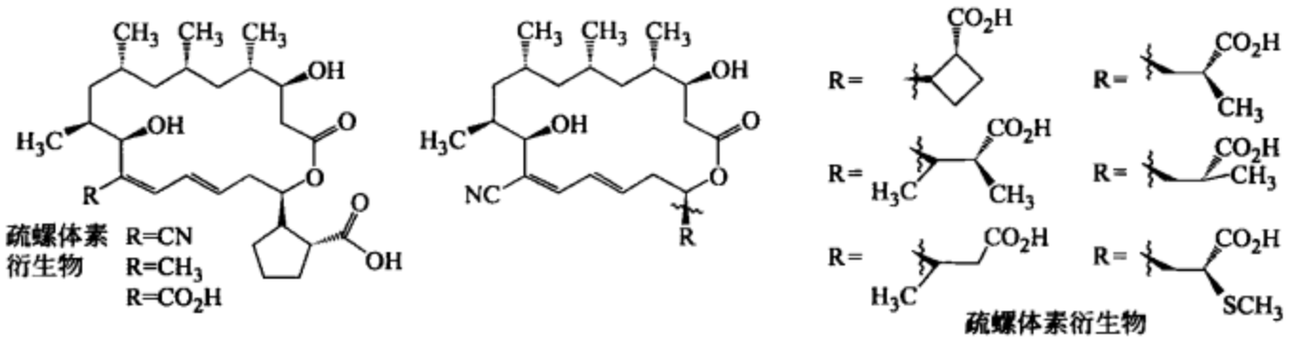
氨茴环霉素衍生物

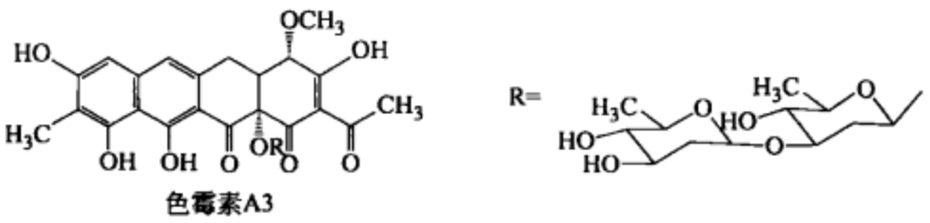


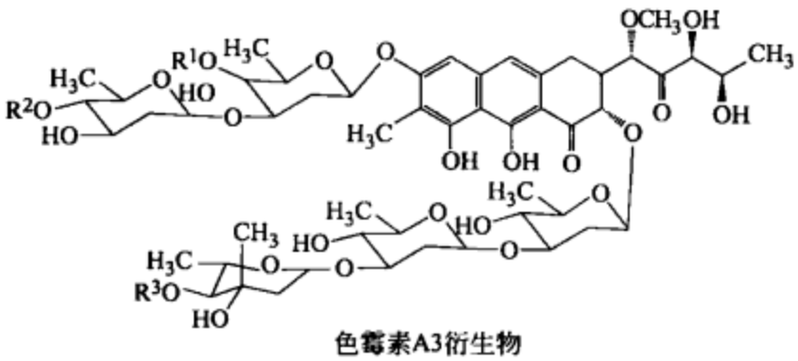
番红霉素A

番红霉素A衍生物

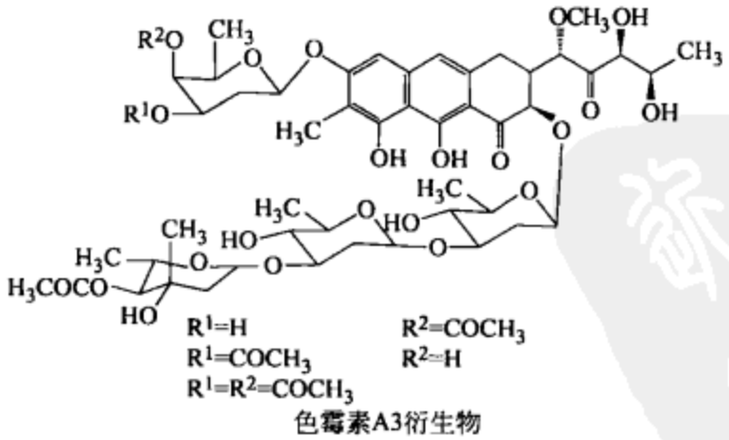
R^1,R^2=O		R^3=CH_3
R^1=NH_2	R^2=H	R^3=CH_2CH_3
R^1=NH_2	R^2=H	R^3=H
R^1=NH_2	R^2=H	R^3=CH_3







R^1=H	R^2=$COCH_3$	R^3=$COCH_3$
R^1=$COCH_3$	R^2=H	R^3=$COCH_3$
R^1=$COCH_3$	R^2=H	R^3=$COCH(CH_3)_2$
R^1=H	R^2=CH_3	R^3=H
R^1=H	R^2=CH_3	R^3=$COCH_3$



R^1=H	R^2=$COCH_3$
R^1=$COCH_3$	R^2=H
R^1=R^2=$COCH_3$	

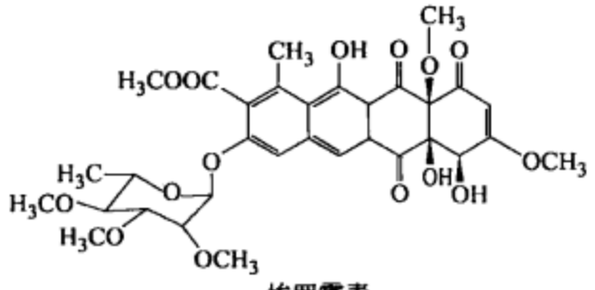
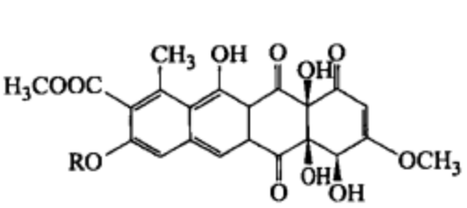
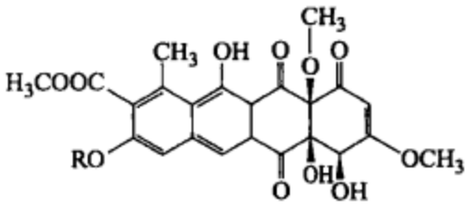
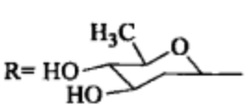


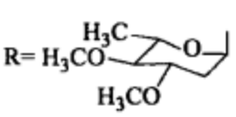
图 3.3-5

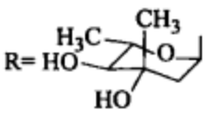


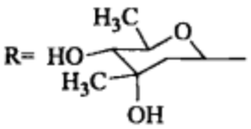


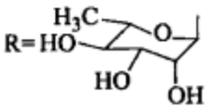
R=H

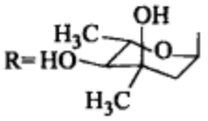


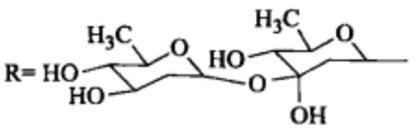


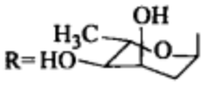


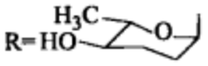


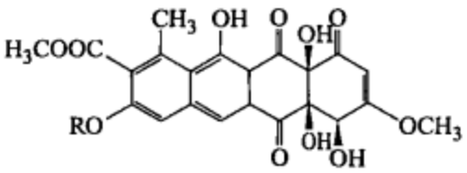




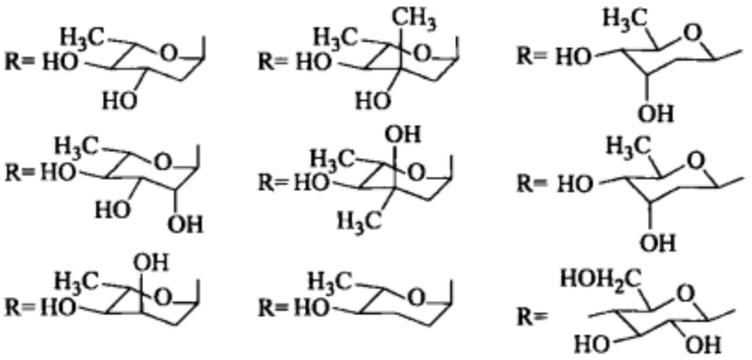


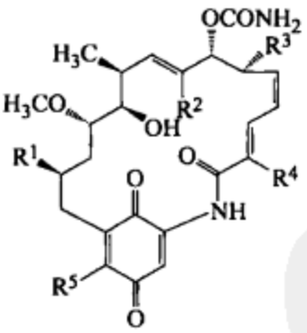




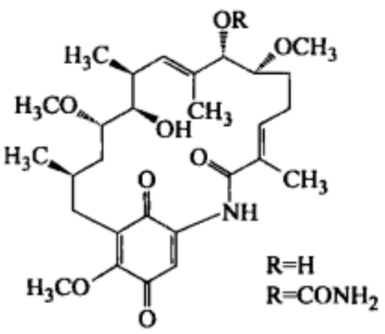


埃罗霉素衍生物

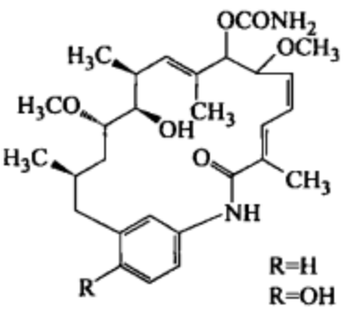




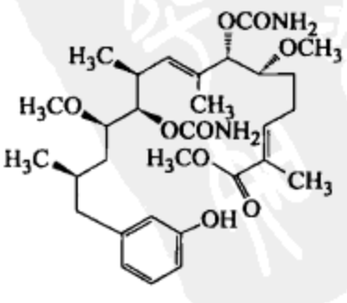
格尔德霉素



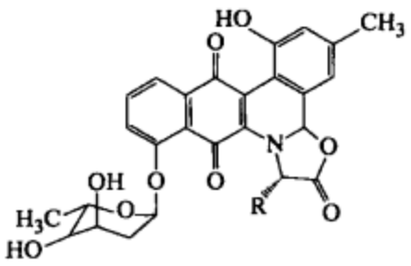
R=H
R=CONH$_2$



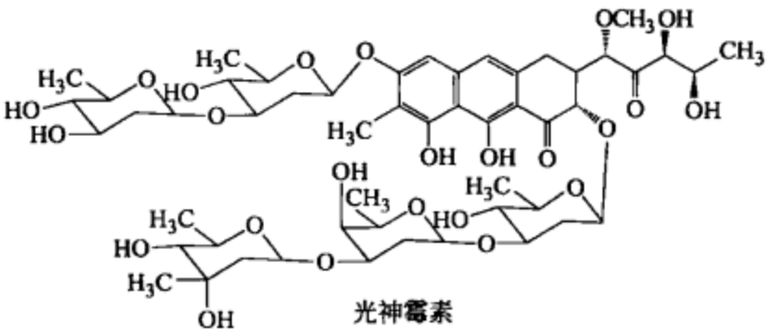
R=H
R=OH



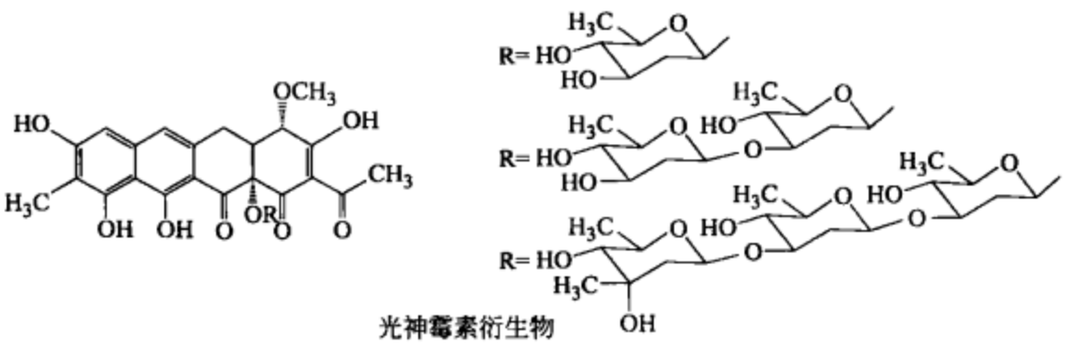
格尔德霉素衍生物



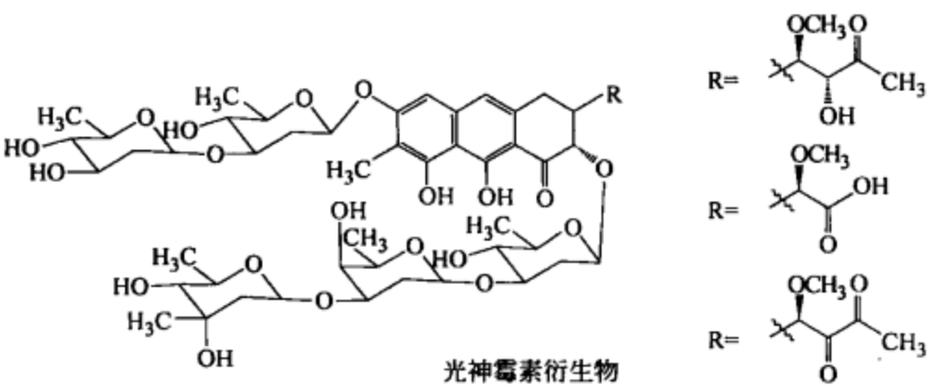
嘉德霉素B



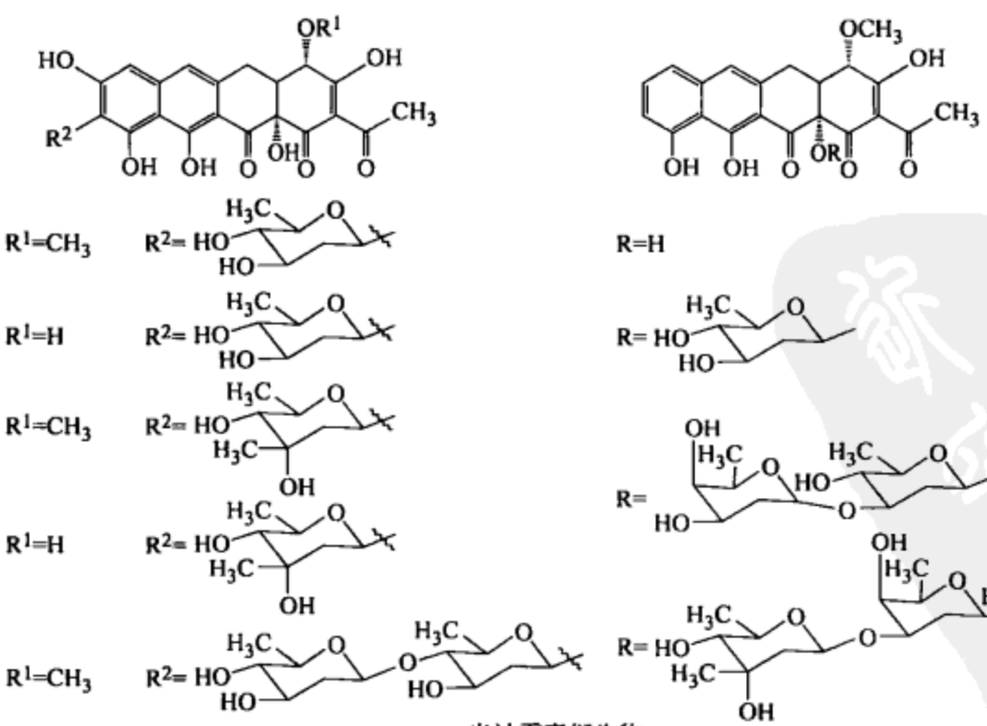
光神霉素



光神霉素衍生物

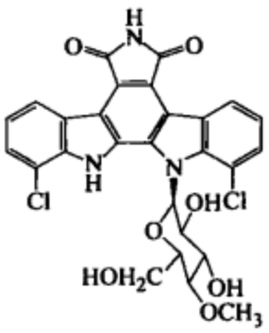


光神霉素衍生物

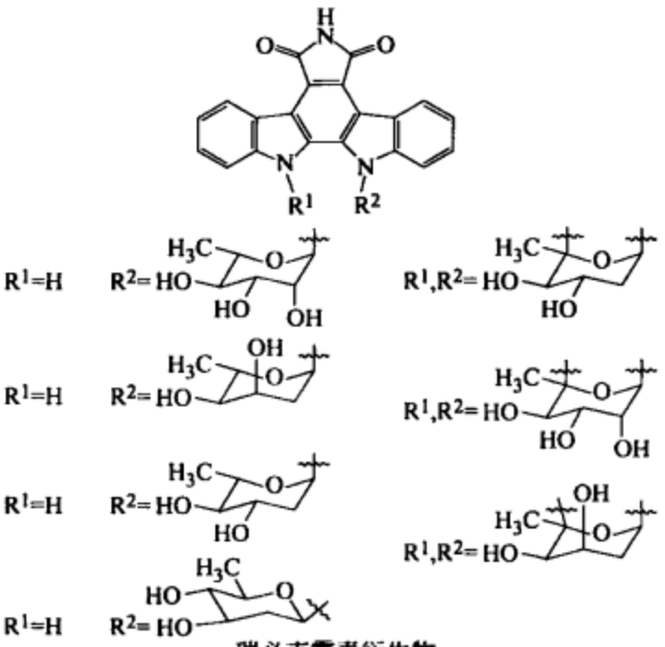


光神霉素衍生物

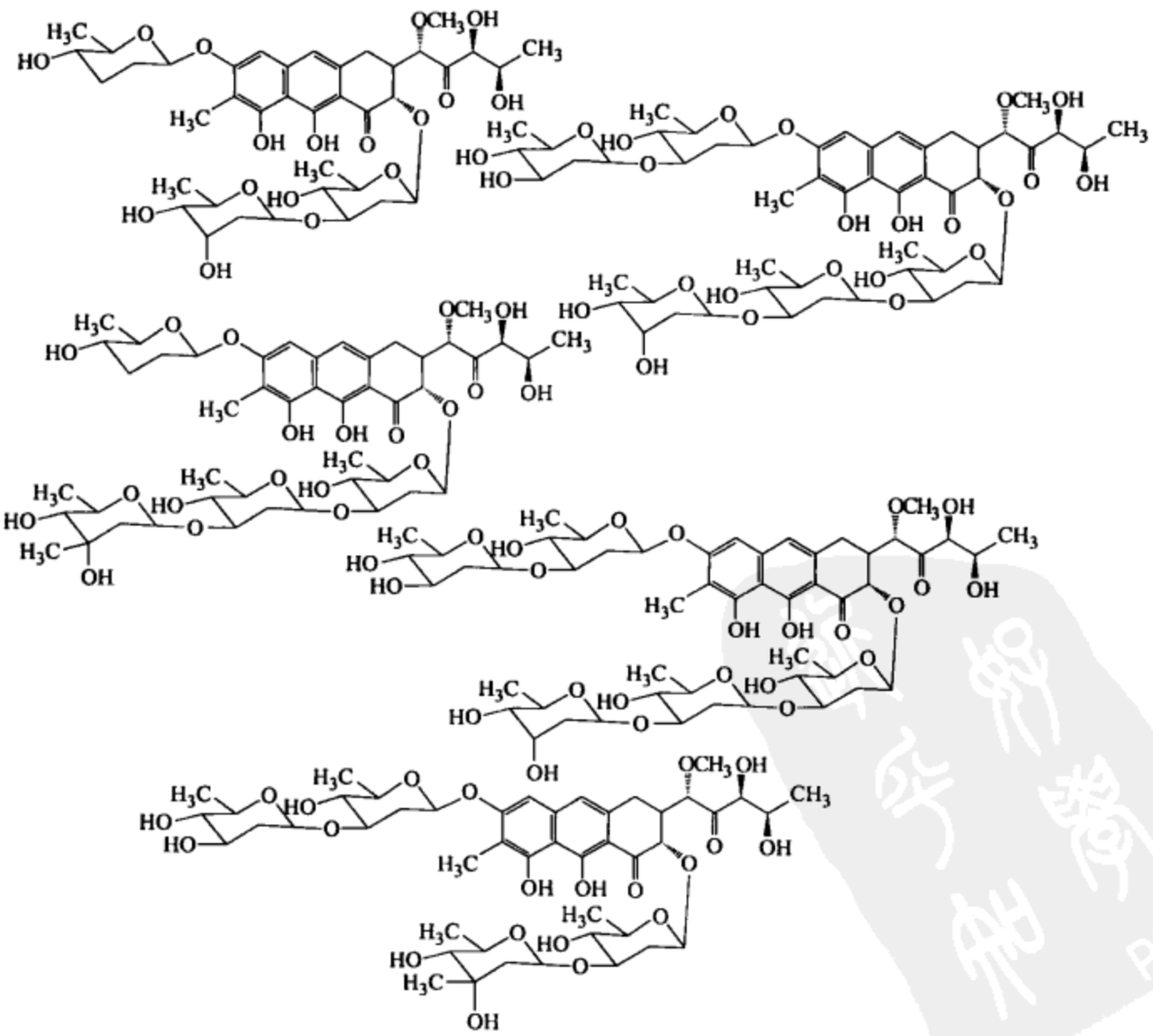
图 3.3-5



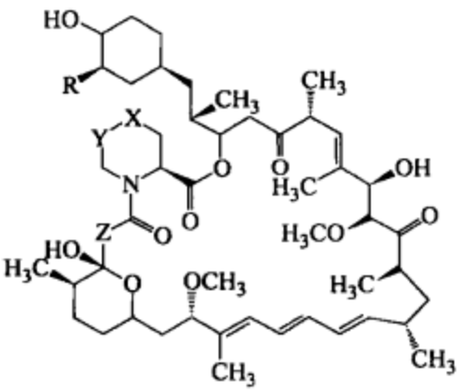
瑞必克霉素



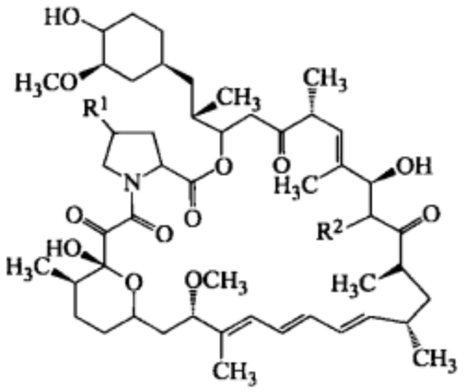
瑞必克霉素衍生物



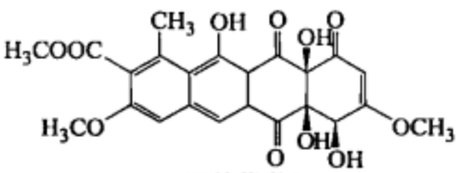
光神霉素衍生物



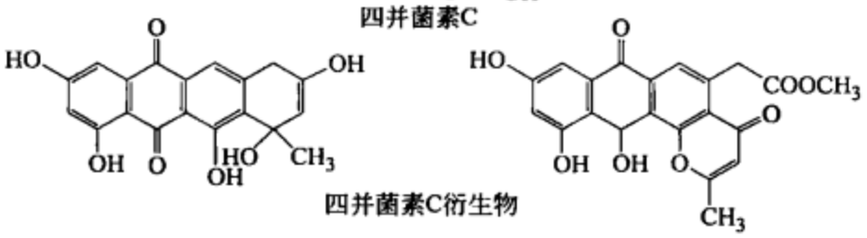
雷帕霉素衍生物　R=OCH_3 X=CH_2 Y=CH_2 Z=CO
R=OCH_3 X=S Y=CH_2 Z=CO
R=OCH_3 X=CH_2 Y=SO Z=CH_2
R=H X=CH_2 Y=CH_2 Z=CO



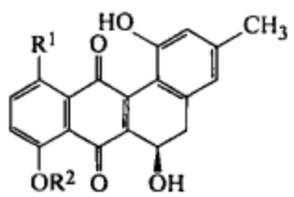
雷帕霉素衍生物　R^1=H R^2=OCH_3
R^1=OH R^2=OCH_3
R^1=OH R^2=H



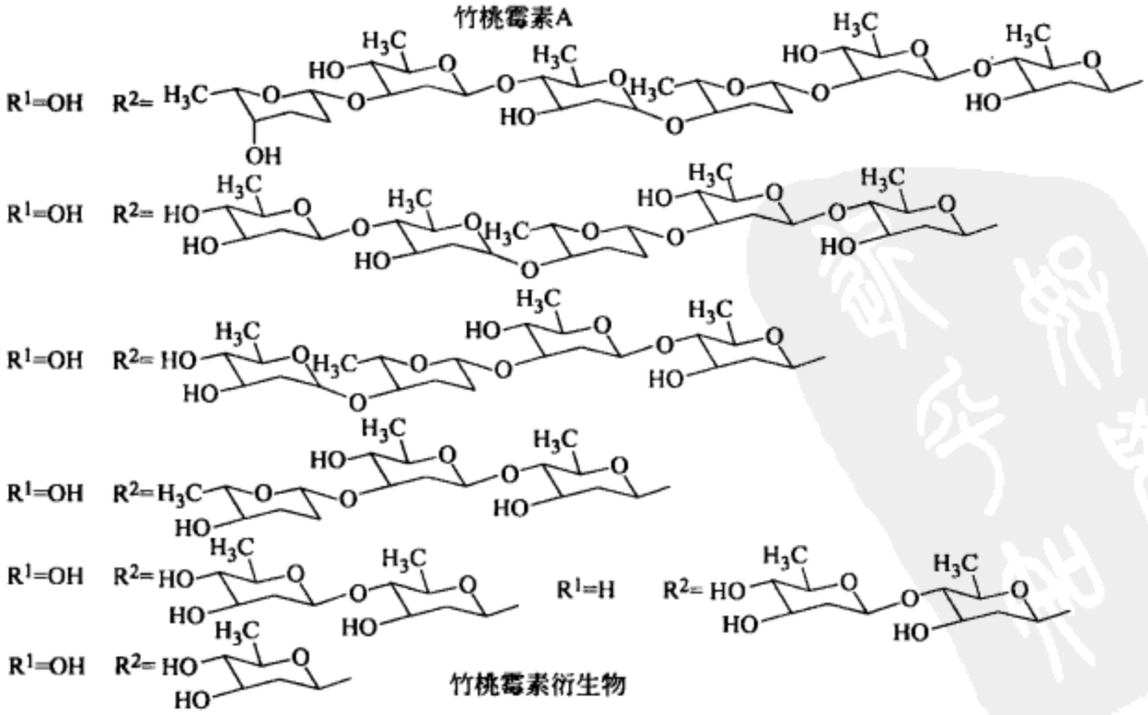
四并菌素C



四并菌素C衍生物



竹桃霉素A



竹桃霉素衍生物

图 3.3-5

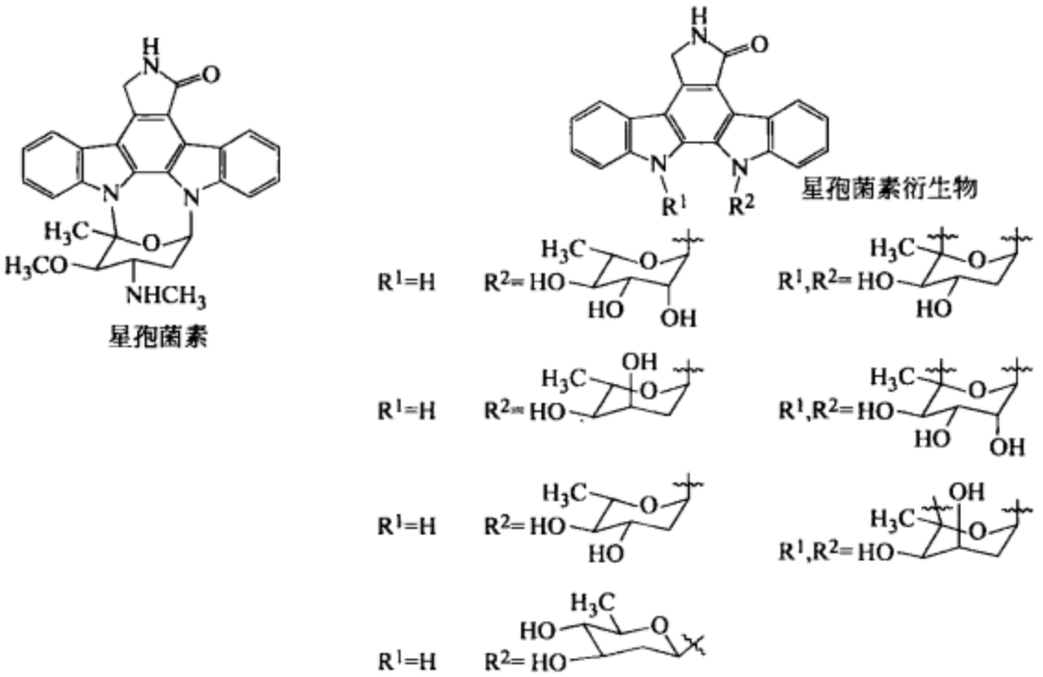
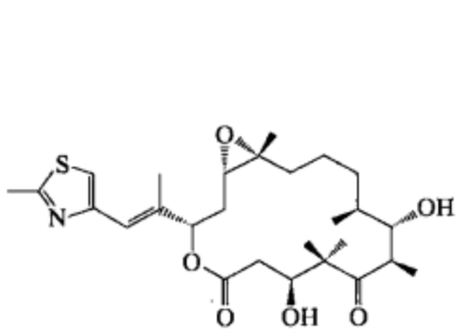


图 3.3-5　表 3.3-2 中典型次生代谢产物的结构式

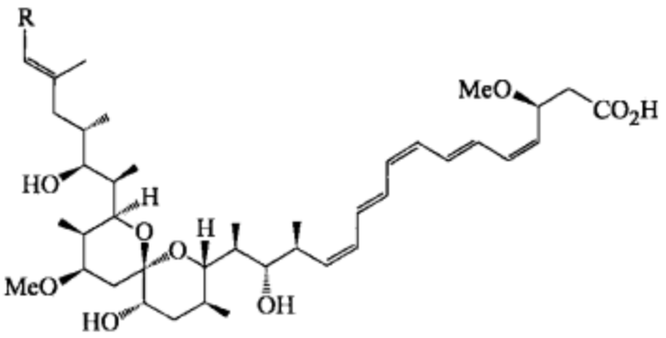
3.3.2　黏细菌[16]

黏细菌（myxobacteria）是一类革兰阳性细菌，广泛存在于自然界，如潮湿的土壤、树皮、干枯的树叶和海洋中，其营养要求不高。黏细菌是一种非常特殊的原核生物，具有独特的生活史和特殊的滑行运动。在干旱或营养缺乏的条件下，一部分黏细菌营养细胞形成黏孢子，另一部分黏细菌自溶后在孢子周围形成孢子囊保护层。细胞富含各种胞外酶，有些种属菌株能够溶纤维或溶细菌（酵母菌）作为营养物质。黏细菌能产生种类众多的次级代谢产物，目前已经鉴定其 100 多种次级代谢产物的基本结构和 500 多种结构类似物，其中很大一部分产物具有高效的生物学活性，涉及抑制电子传递、破坏细胞骨架、抑制 DNA 多聚酶和抑制乙酰辅酶 A 羧化酶活性等多重机制，部分次级代谢产物有很高的抗肿瘤活性。为此，黏细菌作为抗肿瘤药物（埃博霉素 B_2 Saframycin Mx1，黏噻唑，Disorazol A1，Tubulysin A 和 Spirangien B 等）开发的重要资源，在抗肿瘤药物筛选等方面具有重要的经济价值，这些产物的结构式见图 3.3-6 所示。

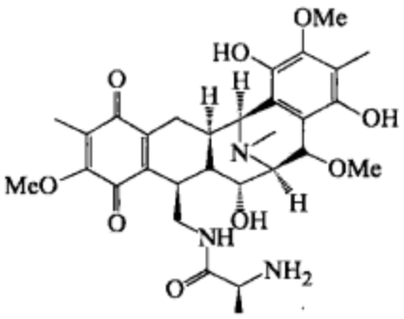
目前测定的模式黏细菌基因组都大于 9Mb，其中纤维堆囊菌具有迄今为止最大的原核生物基因组（如 So ce56 基因组大小为 12.2Mb），尽管黏细菌已成为次级代谢和基因组研究的新焦点，但黏细菌来源的生物合成基因簇报道仍相对较少。目前已经成功鉴定的生物合成基因簇有 20 多种，涉及 PKS、NRPS 和 NRPS-PKS 等多个基因簇。鉴于黏细菌体外培养困难，针对其次生代谢产物的传统化学合成方法难于得到满意的效果，因而黏细菌的研究更注重基因簇和其合成机制的研究。Silke 研究小组报告了新近鉴定的 20 个黏细菌基因簇以及相关代谢产物的合成机制，这项重要的进展为研究黏细菌基因簇次生代谢产物合成提供了有利的研究基础，本文重点介绍目前研究开发的四种抗肿瘤药物（埃博霉素、Tubulysin、



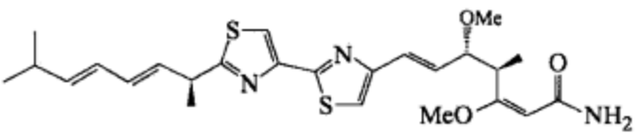
埃博霉素B



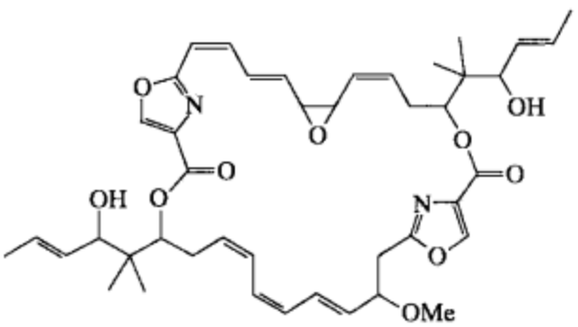
Spirangien B



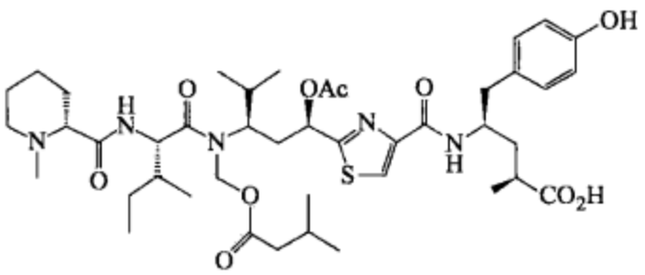
Saframycin Mx1



黏噻唑



Disorazol A1



Tubulysin A

图 3.3-6　黏细菌主要的抗肿瘤代谢产物

Spirangien、Disorazol 和 Saframycin 等）的基因簇及其合成机制。

3.3.2.1　埃博霉素

纤维堆囊菌属（*Sorangium*）来自黏细菌中唯一能够溶解纤维的一类堆囊菌，而纤维堆囊菌（*Sorangium cellulosum* Brockman）是其中的模式菌种。作为重要的微生物药物（著名的埃博霉素）的产生菌，纤维堆囊菌引起了全球的广泛关注。埃博霉素是纤维堆囊菌产生的一类大环内酯类化合物，具有促微管聚合活性，是继紫杉醇（Taxol）之后发现的 7 种具有促微管聚合活性的化合物（埃博霉素、Eleutherobins、Discodermolide、Laulimalide、WS9885B 和 Peloruside）中最受关注的热点研发药物。埃博霉素不但具有与紫杉醇相似的作用模式，而且比紫杉醇具有更好的水溶性，分子量小、结构简单，尤其是对耐紫杉醇类的肿瘤细胞具有高度活性，被认为是紫杉醇的更新换代产品而受到药物研发者的普遍关注。如图 3.3-7 所示，埃博霉素是一类 16 元环的大环内酯类化合物，在 C15 位置连接了一个含噻唑环的侧链。埃博霉素发酵制备时，埃博霉素 A 和 B 是主要产物，埃博霉素 C～F 是次要产物，但 C～F 可以从 A 或者 B 进一步反应得到。埃博霉素 A、B 和 D 对癌

细胞的生物活性与紫杉醇相当，甚至更强，尤其是埃博霉素 B，其活性比紫杉醇强 10～100 倍。在 C12 位上的甲基取代，以及 C12，C13 双键换成环氧基团后，埃博霉素的活性将得到极大提高。

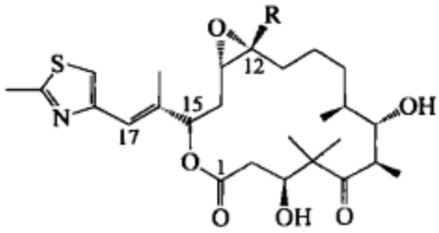


图 3.3-7　埃博霉素的结构式

已经分离出源于纤维堆囊菌的埃博霉素生物合成基因簇，它包括 7 个基因——epoA、epoB、epoC、epoD、epoE、epoF 及 epoK，编码 1 个装载（loading）模块，1 个非核糖体多肽合成酶 NRPS 模块，8 个聚酮合成酶 PKS 模块以及 1 个 P450 环氧化酶模块。每个模块有聚酮化合物链伸长所需的不同功能域。其中 epoA、C、D、E 和 F 基因编码的是典型 PKS，这 5 个亚基分别编码了一个 PKS 起始模块和 8 个延伸模块。而在 epoA 和 epoC 之间的 epoB 基因编码的是典型 NRPS，包括 Cy（环化）、A（腺苷酰化）、ox（氧化）和 PCP（肽酰转移蛋白）四个催化活性域，它的作用是合成埃博霉素侧链上的噻唑环。埃博霉素是由一个典型的 PKS/NRPS/PKS 杂合形式的酶催化合成的，见图 3.3-8 所示，其催化过程包括：①EpoB 蛋白是一个非核糖体多肽合成酶（NRPS），催化 epo 中的噻唑形成，A 活性域识别并腺苷化活化 L-半胱氨酸，形成 L-半胱氨酸-单磷酸腺苷，然后将合成的 L-半胱氨酸-单磷酸腺苷转移到 PCP 上，然后在 Cy 活性域催化下，与 PKS 起始模块上合成的乙酸基缩合，由于 Cy 活性域同时还具有环化酶活性，它能够进一步催化分子内杂环环化形成噻唑啉，随后被氧化活性域氧化脱氢形成甲基噻唑基结合于 PCP 上。②埃博霉素生物合成顺序与其编码 PKS 的基因簇模块顺序相一致。经 EPOSB（1 个模块）、EPOSC（4 个模块）、EPOSD（2 个模块）和 EPOSE（1 个模块）催化 8 个羧酸单位的结合并经适当的修饰产生埃博霉素的碳框架。③EpoK 是一个环氧酶 P450，它可以催化脱氧埃博霉素形成埃博霉素（即将埃博霉素 C 和 D 环化形成埃博霉素 A 和 B）。最终由纤维堆囊菌合成埃博霉素 A 和 B，并且在有单加氧酶诱导作用下 C21 位发生羟基化，产生埃博霉素 E 和 F[17]。

3.3.2.2　Tubulysin[18]

Sasse 等从囊球黏细菌中发现新的抑制细胞生长的环肽化合物 Tubulysin 类化合物。该化合物部分由特殊的氨基酸结构组成，Tubulysin 对酵母菌和丝状（真）菌有抑制作用，对多种肿瘤具有抑制作用，Tubulysin D 的抑制作用高于 Tubulysin A。但是 Tubulysin D 和 E 的毒性要高于相同剂量的羟基化合物 Tubulysin A 和 B。如图 3.3-9 所示，Sasse 等采用点突变的方法鉴定了囊球黏细菌（*Angiococcus disciformis* Thaxter An d48）合成 Tubulysin 基因簇，研究发现，合成 Tubulysin

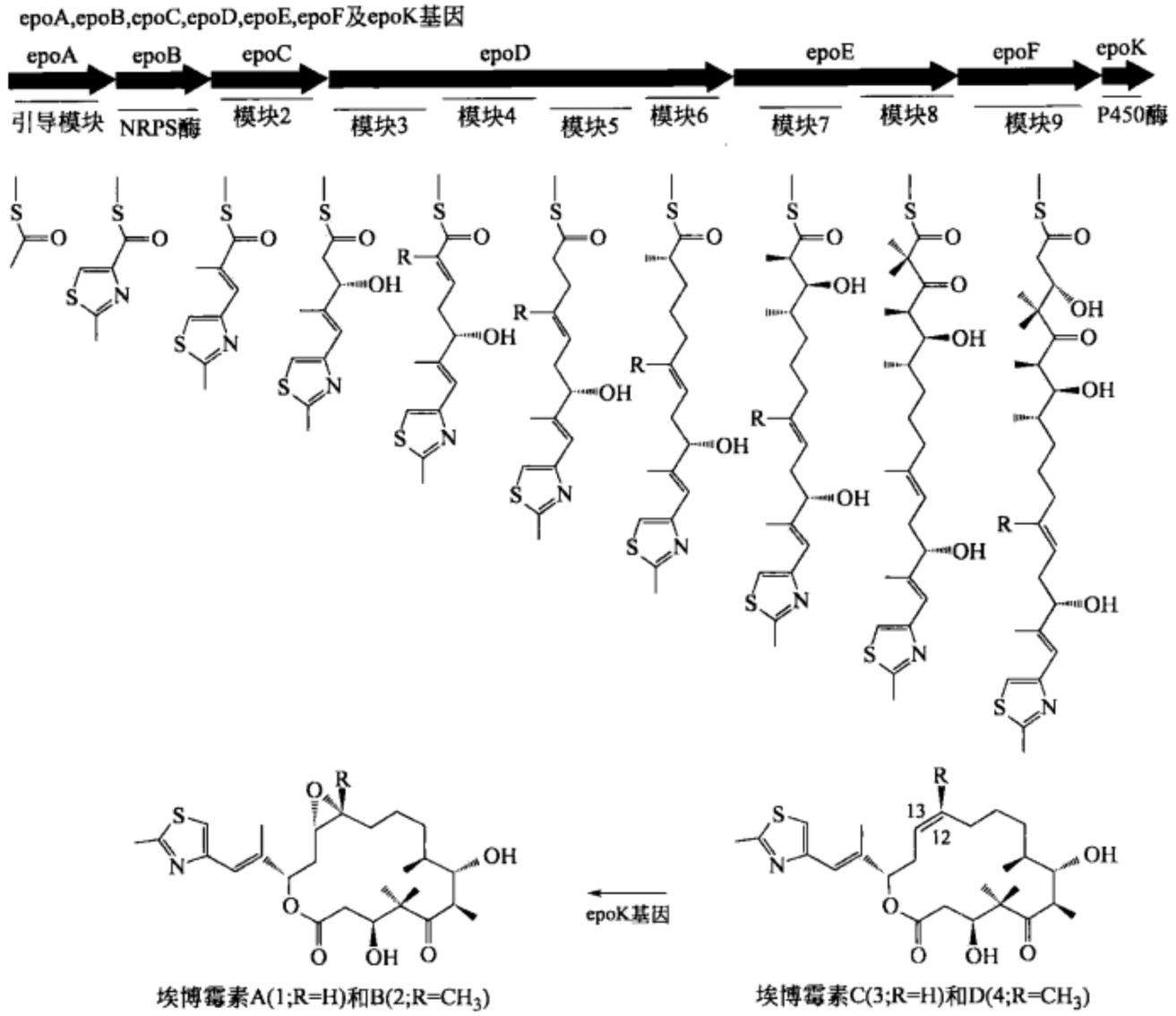


图 3.3-8　纤维堆囊菌合成埃博霉素的基因簇和路线

的基因簇由一个典型的 PKS/NRPS/PKS 杂合形式的酶催化组成，其中 TubB-F 和 TubZ 模块是催化 Tubulysin 合成的中心区域，TubF 催化 Pretubulysin 乙酰化或者氧化形成 Tubulysin[19]。

3.3.2.3　Spirangien

Jutta 等[20]从黏细菌纤维堆囊菌 So ce90（*Sorangium cellulosum* Imshenetski and Solntseva So ce90）中发现新的抑制肿瘤细胞生长的化合物 Spirangien（A、B）。研究发现，这类化合物结构特殊，对真菌和肿瘤细胞有显著的抑制作用。Frank 等人采用点突变的方法鉴定了黏细菌纤维堆囊菌 So ce90 合成 Spirangien 基因簇，如图 3.3-10 所示，Spirangien（A～E）合成机制涉及多种重复 PKS 形式的酶催化的过程，其中 7 个重复 I 型 PKS 模块 Spi D～J 是催化 Spirangien 合成的中心区域，形成 Prespirangien，Spi C、L 和 Spi B、K 负责催化 Prespirangien 形成 Spirangien A；其他附加酶包括：一个酯酶、两个甲基转移酶和两个 P450 环氧化酶直接修饰 Spirangien A，形成系列衍生物[21]。

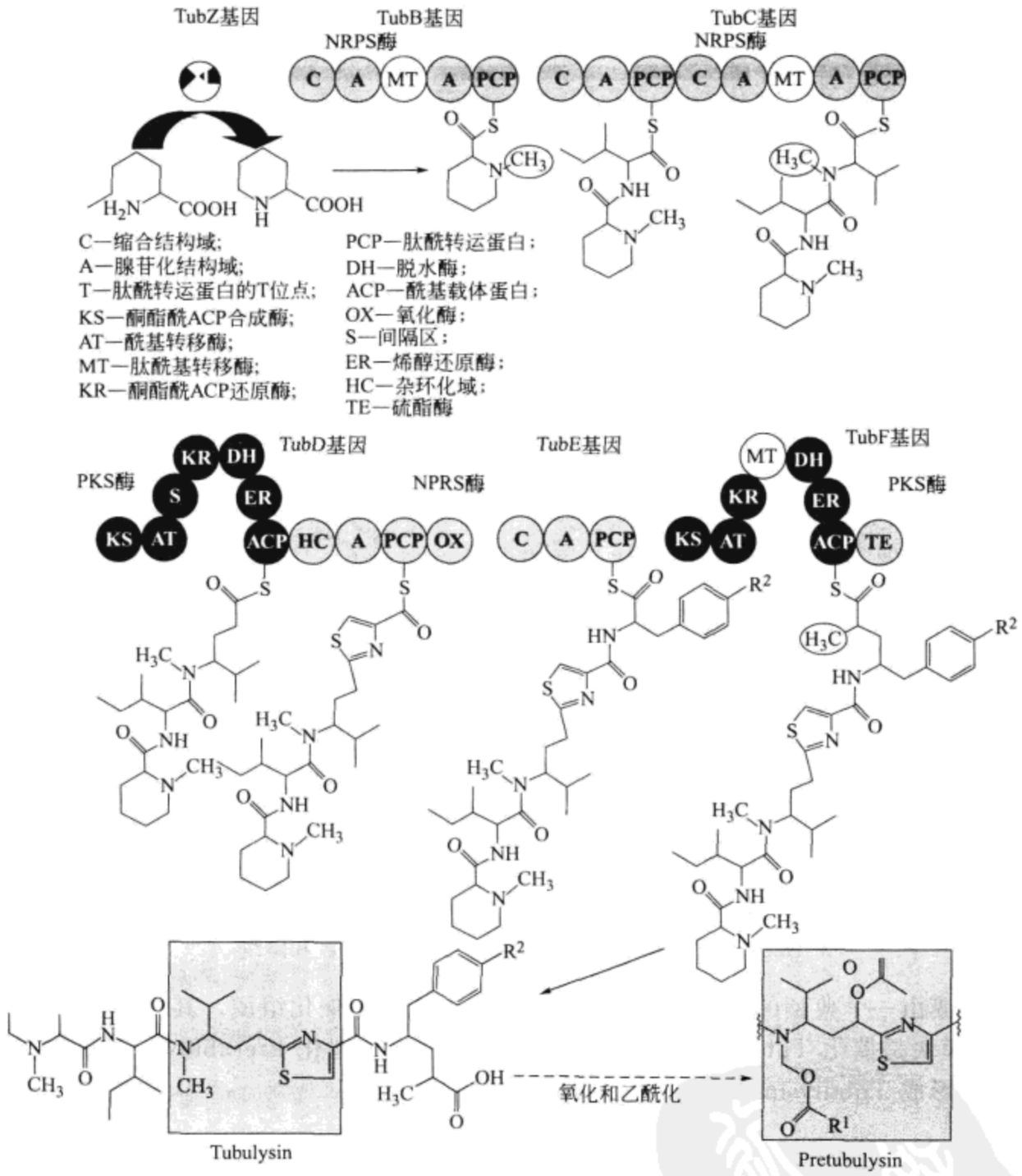


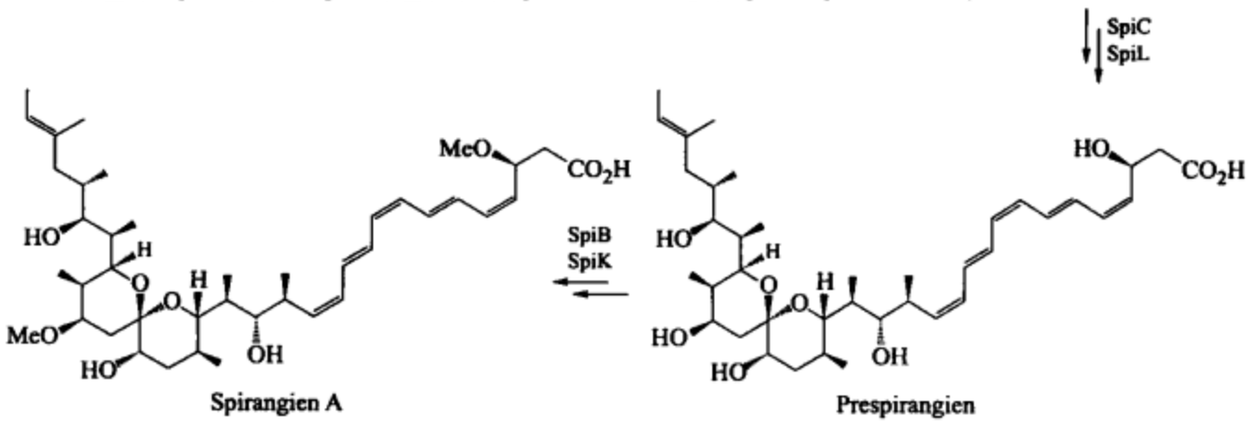
图 3.3-9　囊球黏细菌合成 Tubulysin 的基因簇路线

3.3.2.4　Disorazol[22]

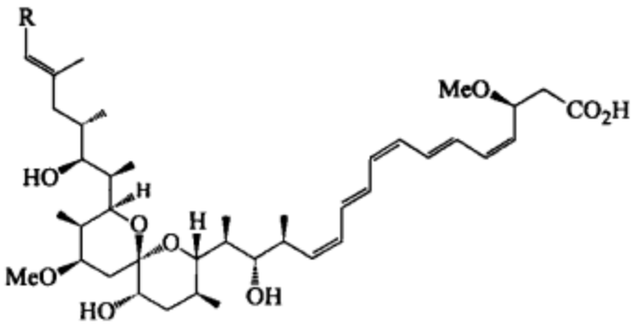
Disorazol 是继紫杉醇（Taxol）和 Epothilones 之后，从黏细菌纤维堆囊菌 So ce12（*Sorangium cellulosum* Imshenetski and Solntseva So ce12）中发现的具有促微管聚合活性的化合物，该化合物作用机制独特，对真菌和肿瘤细胞有显著的抑制作用。Ruby 等人采用点突变的方法鉴定了纤维堆囊菌 So ce12 合成 Disorazol 基因簇，其合成机制涉及 PKS 酶催化的过程，其中 DszA、DszB 和 DszC 是催化 Disorazol 合成的中心区域，形成 predisorazol，而 dszD，属于典型的转移-AT 型I PKS 聚合酶，负责修饰 predisorazol 形成 Disorazol A1。其合成催化过程见图 3.3-11 所示。



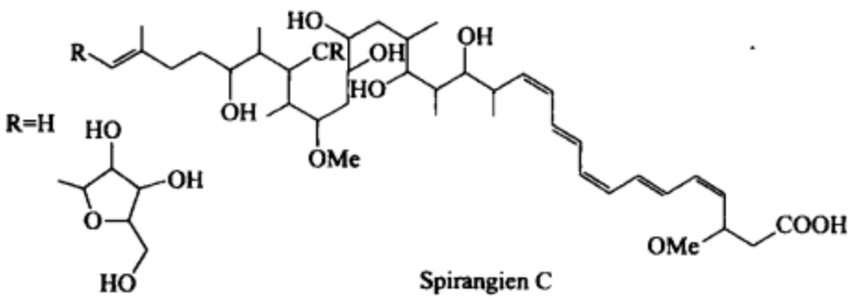
Orff: 转座酶; SpiA: 酯酶II; SpiB: 甲基转移酶;SpiC: P450环氧化酶;SpiD～SpiJ: PKS酶; SpiZ: 转录因子



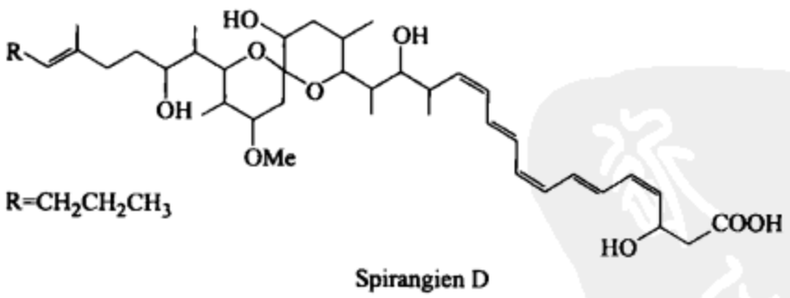
Spirangien A　　Prespirangien



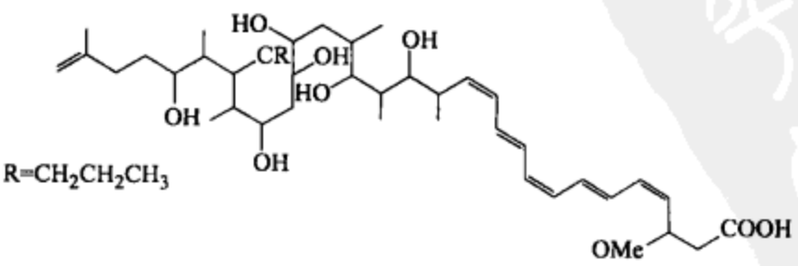
Spirangien B



Spirangien C



Spirangien D



Spirangien E

图 3. 3-10　黏细菌纤维堆囊菌 So ce90 合成 Spirangien 系列衍生物的路线

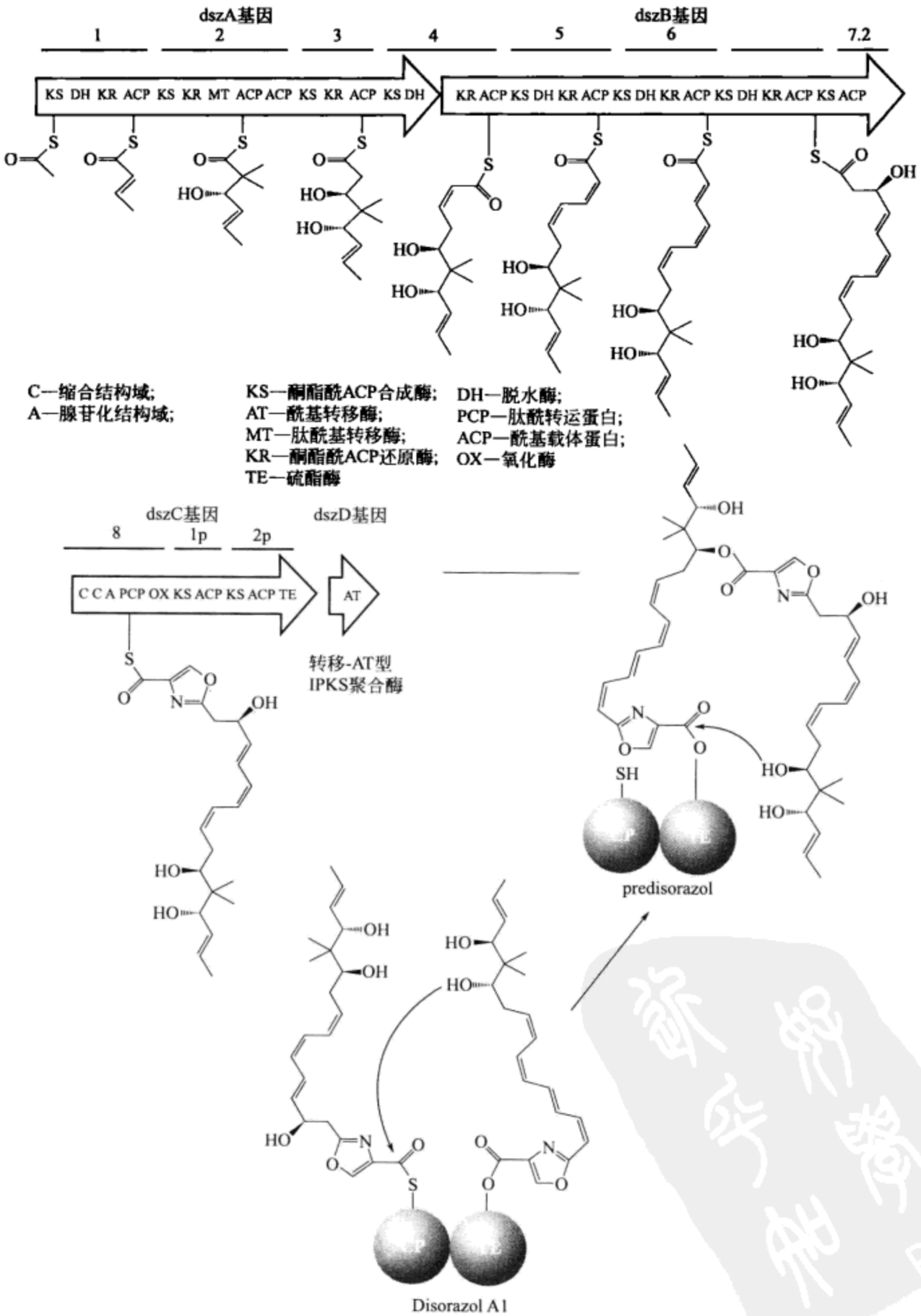
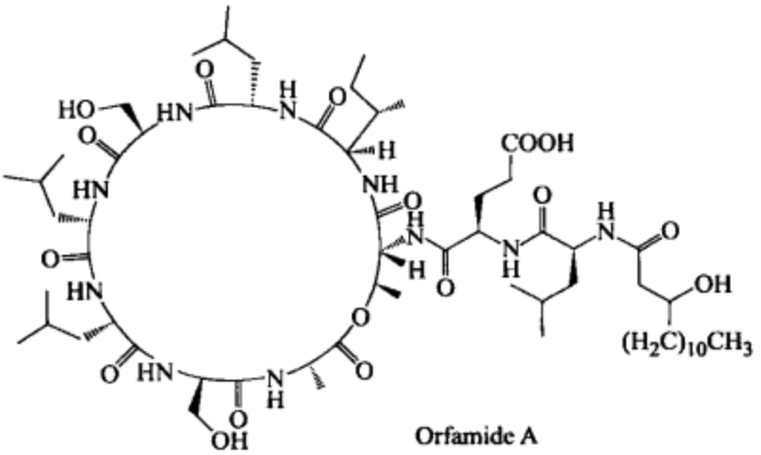
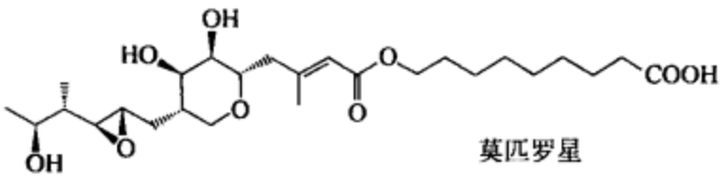


图 3.3-11　黏细菌纤维堆囊菌 So ce12 合成 Disorazol A1 的基因簇

3.3.3　假单胞菌[23]



Orfamide A



莫匹罗星

假单胞菌属（*Pseudomonas*），该属菌为革兰阴性菌，多分布于土壤和水中及各种植物体，有极强分解有机物的能力，可以多种有机物作为能量。已经鉴定的假单胞菌至少有60种。近年来，已在假单胞菌中发现多种活性代谢产物，包括植物抗菌剂2,4-二乙酰基均苯三酚（2,4-DAPG）、Orfamide A、抗菌剂莫匹罗星及抗肿瘤药物番红菌素和Syringolin。这些产物在农艺、化工和医药工业中已经得到广泛应用。Harald的研究报告中列出了已经完成次级代谢基因簇鉴定的单个假单胞菌26种，已经完成测序的基因组大小为4.6～7.1Mb，包含4237～6396个基因，GC含量57.8%～66.6%，其中铜绿假单胞菌［*Pseudomonas aeruginosa*（Schroeter）Migula］、荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens* Migula）和丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae* pv. Syringae van Hall）全基因组序列测序结果显示二次代谢产物丰富，其次生代谢产物的合成机制复杂，涉及PKS、NRPS和NRPS-PKS等多个基因簇。与放线菌的次生代谢产物合成研究相比，假单胞菌的研究更注重于次生代谢产物合成机制的研究，已经发现了多种组合生物合成的新机制，这项重要的进展不仅为假单胞菌次生代谢基因簇的鉴定和组合生物合成的机制的研究奠定了极为重要的生物信息学基础，而且更重要的是，这些进展为以假单胞菌作为重要的宿主，利用基因工程，对假单胞菌相关基因簇进行重组、突变和插入等修饰，开发相关抗肿瘤药物，建立了一个重要的资源基础。

3.3.3.1　番红菌素

番红菌素属于复杂四氢异喹啉类生物碱，利用常规的化学全合成方法很难得到全合成产物。本品在体外检测到极强的抗肿瘤活性，其化学和药理学性质与Ecteinascidin（ET-743，Trabectedin）类似，研究发现，番红菌素的生物合成可以由荧光假单胞菌A2-2的sac基因簇完成。sac基因簇由三个NRPS模块蛋白（SacA、

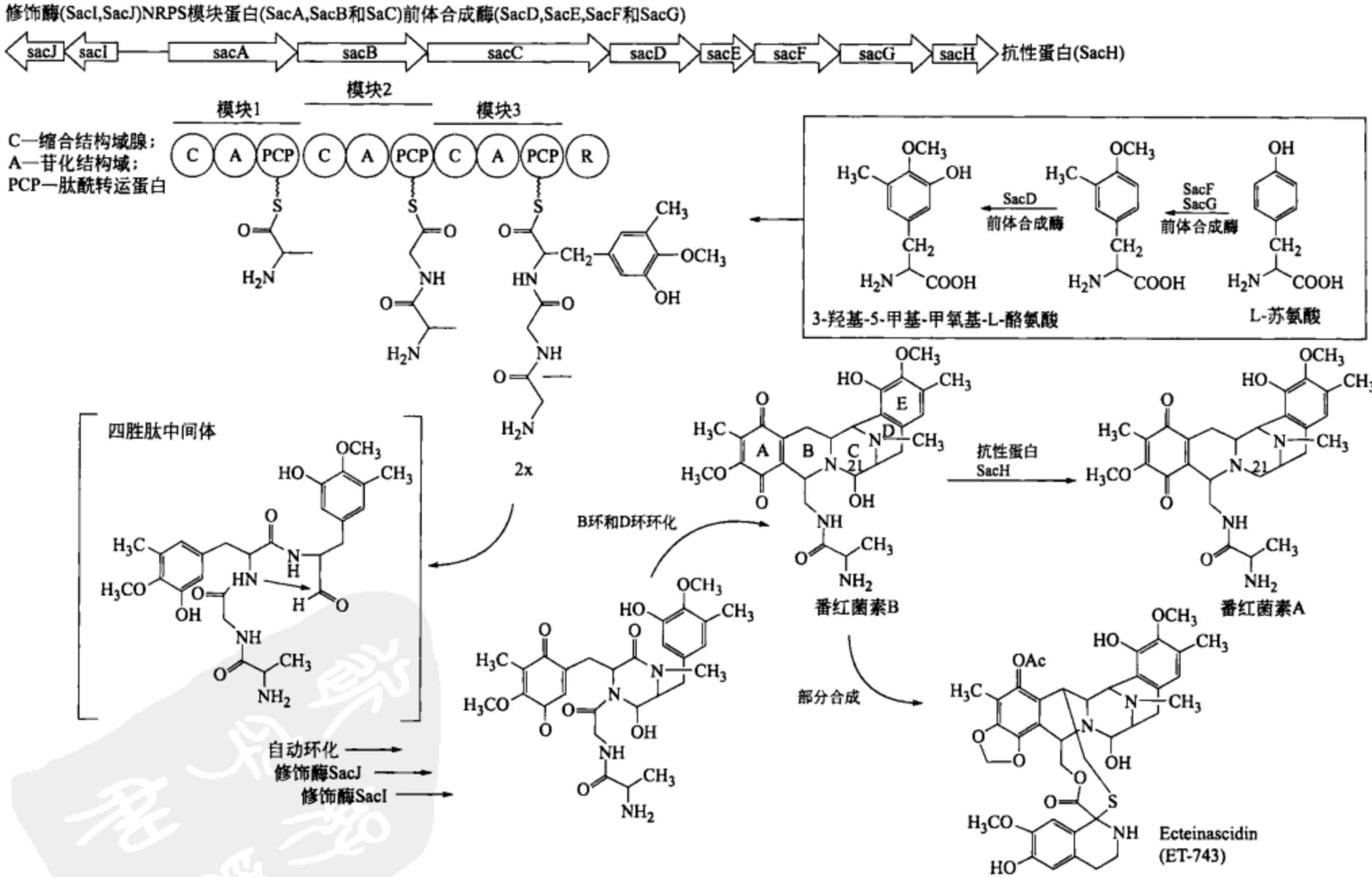
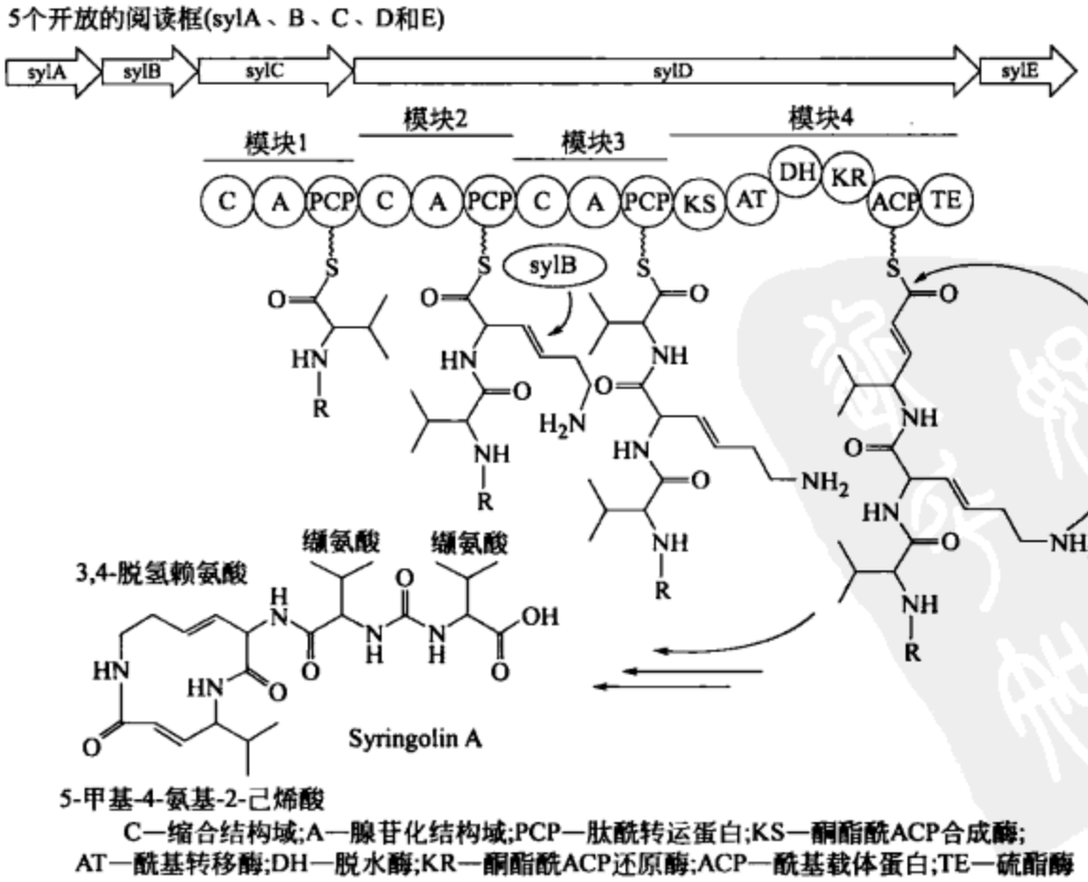


图 3.3-12　荧光假单胞菌 A2-2 的 sac 基因簇结构以及生物合成番红菌素的路线

SacB和SacC)、四个前体合成酶（SacD、SacE、SacF和SacG)、两个修饰酶(SacI、SacJ)、一个抗性蛋白（SacH）和一个未知功能蛋白组成。如图3.3-12所示，其合成路线包括：①甲基转移酶（SacF、SacG）和羟化酶（SacD）分别催化L-酪氨酸形成氨基酸衍生物3-羟基-5-甲基-甲氧基-L-酪氨酸（3h5mOmTyr)；②3-羟基-5-甲基-甲氧基-L-酪氨酸结合Ala和Gly，在NPRS模块蛋白内形成番红菌素的四氢异喹啉类生物碱基本骨架；③SacC基因的R区域催化部分肽链醛化缩合，形成Safracin的C环，单氧化酶SacJ催化Safracin的一分子3-羟基-5-甲基-甲氧基-L-酪氨酸羟基化、甲基转移酶SacI催化Safracin的另一分子3-羟基-5-甲基-甲氧基-L-酪氨酸的氨基酸末端发生*N*-甲基化，从而使Safracin的B和D环环化，最终合成产物番红菌素B；④部分番红菌素B在SacH催化下失去C21羟基产生部分番红菌素A，番红菌素A的毒性和抑制肿瘤活性均低于番红菌素B。

3.3.3.2　Syringolin

Syringolin属于杂合聚酮-非核糖体多肽化合物，是丁香假单胞菌丁香致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. Syringae van Hall）的次生代谢产物。近年的研究发现，其对人体肿瘤细胞具有较强的抑制和诱导凋亡的作用。如图3.3-13所示，Dudler研究小组已经成功鉴定并合成了Syringolin A基因簇syl（28kb)，syl基因簇含有5个开放的阅读框（sylA、B、C、D和E)，其中转录调节蛋白sylE调节代谢产物Syringolins的流动，两个NRPS模块蛋白sylC和sylD催化缬氨酸-赖氨酸-缬



C—缩合结构域;A—腺苷化结构域;PCP—肽酰转运蛋白;KS—酮酯酰ACP合成酶;
AT—酰基转移酶;DH—脱水酶;KR—酮酯酰ACP还原酶;ACP—酰基载体蛋白;TE—硫酯酶

图3.3-13　丁香假单胞菌丁香致病变种的syl基因簇结构以及生物合成Syringolin A的路线

氨酸（Val-Lys-Val）多肽链的合成，一个 PKS 模块蛋白催化缬氨酸的肽链延伸，而饱和酶 sylB 负责合成 L-赖氨酸肽链。有关 Syringolin A 的组合合成机制有待进一步深入研究。

3.4 展望

组合生物技术的出现，无疑给非天然药物的发展带来了新的契机，与传统的提取和化学全合成方法相比，组合生物技术可实现各种催化酶的定点修饰，从而有效地避免了多种副产物的产生。利用基因工程技术，通过改造和替换相应的后修饰基因来实现产物创新，与此同时也为一些药用价值极高、代谢产物含量较低的天然产物的开发，提供了新的思路和方法。而在另一方面，微生物宿主异源表达、基因模块替换或重组以及突变等多种基因工程技术的综合应用，这无疑也为新的非天然“天然产物”的创造带来新的前景，蕴藏着极大的生机。但目前来看，该技术在实际应用中仍有一些问题急需解决：①由于对生物合成中涉及的一些关键酶的调控，异源表达和激活的调控机制，仍不甚明确，某个改造的特定的生物合成途径目前只能产生一个或少数若干个新的产物，与此同时，由于异源表达量较低，为此新产物的产生仍然属于低通量，难以完全满足生产的要求。②PKS 和 NRPS 合成酶分子量较大，给基因操作带来极大的挑战，基因组重组、突变以及基因簇模块的更替等所发生的变化，都会影响到整个酶的选择性、专一性，从而影响代谢物的种类和含量。③微生物的代谢调控，是一个复杂的网络调控机制，而对于单一网络的调控，往往对整个的代谢产生影响，从而影响目的代谢物的流动，难于得到预定的代谢衍生物。为此，组合技术的大规模应用，仍有许多关键问题急需解决，不过可以预见，随着生物信息数据库的不断充实和新型基因工程操作技术的改进，组合技术与传统的微生物生物发酵、转化、代谢相比，具有不受自然条件的限制、易于大规模培养、代谢产物极为丰富等不可比拟的优势，组合生物技术的发展，给微生物的发展带来勃勃生机，组合生物合成技术成为药物研究和开发中一种主流技术将是必然趋势，我们完全有理由相信，微生物必将给多种非天然药物的发现和发展带来希望和强有力的资源支撑，具有良好的应用前景。

参考文献

[1] Steven G VL, Ben S. Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. Ecology and industrial microbiology, 2006, 9 (3): 252-260.

[2] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ polyketide synthesis paradigms. Curr Opin Chem Biol, 2003, 7 (2): 285-295.

[3] Wenzel SC, Gross F, Zhang Y, et al. Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via Red/ET recombineering. Chem Biol, 2005, 12 (3): 349-356.

[4] Sarah C, Mutka, JR, Carney, Liu YQ, et al. Production of Epothilone C and D in Escherichia coli. Biosciences Biochemistry, 2006, 45 (4): 1321-1330.

[5] Sang HY, Ju EK, Lee SH et al. Engineering the lycopene synthetic pathway in by comparison of the carotenoid genes of Pantoea agglomerans and Pantoea ananatis. Chemistry and Materials Science, 2007, 4

(1): 131-139.

[6] Sang HY. Increased β-Carotene Production in Recombinant Escherichia coli Harboring anEngineered Isoprenoid Precursor Pathway with Mevalonate Addition. Biotechnology Progress, 2007, 23 (3): 599-605.

[7] Ora A, Carter RJ, Peters RC. Monoterpene biosynthesis pathway construction in Escherichia coli. Phytochemistry, 2003, 63 (2): 425-433.

[8] Won SJ, Han AR, Jay Sung JH, et al. Won Seok Jung. Bioconversion of 12-, 14-, and16-membered ring aglycones to glycosylated macrolides in an engineered strain of Streptomyces venezuelaee. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76 (6): 1373-1381.

[9] Ma XY, Panjikar S, Koepke J, et al. The structure of Rauvolfia serpentina strictosidine synthase is a novel six-bladed beta-propeller fold in plant proteins. Plant Cell, 2006, (18): 907-920.

[10] Sueharu Horinouchi. Combinatorial biosynthesis of plant medicinal polyketides by microorganisms, Sueharu Horinouchi. Current Opinion in Chemical Biology, 2009, 13 (2): 197-204.

[11] Kenji W, Hiroki O, Hideaki O. Diversification of echinomycin molecular structure by way of chemoenzymatic synthesis and heterologous expression of the engineered echinomycin biosynthetic pathway. Current Opinion in Chemical Biology , 2009, 13 (2): 189-196.

[12] Brandt P BH, Hofle G, Beyer S, et al. New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of Stigmatella aurantiaca DW4/3-1. J Biol Chem, 1999, 274 (6): 37391-37399.

[13] Helge BB, Rolf M. Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular. J Ind. Microbiol Biotechnol , 2006, 33 (7): 577-588.

[14] Olano, Carmen ME , Jose A. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene Clustersto new derivatives by combinatorial biosynthesiscarlos. Nat. Prod. Rep, 2009, 26 (5): 628-660.

[15] Markus Nett, aHaruo Ik, Bradley S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. Nat. Prod. Rep, 2009, 26 (11): 1362-1384.

[16] Silke Christine Wenzel, Rolf Muller. Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry. Nat. Prod. Rep. , 2007, 24 (6): 1211-1224.

[17] fang L, Shah S, Chuug L, et al. Cloning and heterologous expression of the epothiloue gene cluster. Scierue, 2000, 287 (5453): 640-642.

[18] Silakowski B, Schairer HU, Ehret H, et al. New Lessons for Combinatorial Biosynthesis from dentification and Analysis of the Core Biosynthetic Machinery of Tubulysin, a Potent Myxobacteria. Biol. Chem. , 1999, 274 (6): 37391-37399.

[19] Florenz S, Rolf M. Cytotoxin with Potential Anticancer Activity Axel Sandmann. Chemistry & Biology, 2008, 11 (8): 1071-1079.

[20] Jutta N, Norbert B, Ulrich F, et al. Spirangien A and B, Highly Cytotoxic and Antifungal Spiroketals from the Myxobacterium Sorangium cellulosum: Isolation, Structure Elucidation and Chemical Modifications. Eur. J. Org. Chem. , 2005, 23 (12): 5013-5018.

[21] Bettina F, Jens K, Heinrich S, et al. Spiroketal Polyketide Formation in Sorangium: Identification and Analysis of the Biosynthetic Gene Cluster for the Highly Cytotoxic Spirangienes. Chemistry & Biology, 2007, 14 (2): 221-233.

[22] Ruby C, Ralph R, Nina V, et al. The biosynthetic genes for disorazoles, potent cytotoxic compounds that disrupt microtubule formation Bryan Julien. Gene. 2005, 359 (8): 91-98.

[23] Harald G, Joyce EL. Genomics of secondary metabolite production by Pseudomonas. Nat. Prod. Rep. , 2009, 26 (11): 1408-1446.

第4章 肠道微生物代谢技术在药物研究中的应用

4.1 药物肠道微生物代谢的基本概念

4.1.1 肠道微生物概念

肠道微生物是人体的重要组成部分，是一个高度复杂多样的群体。人类是由体细胞（10%）和微生物细胞（90%）共同组成的“超生物体”。人体肠道微生物组是人体最庞大又极为复杂的微生物群落，包含超过 1014 种的微生物，由于大多数微生物很难或不能用现有的技术分离培养，因此一般采用分子生物生态技术研究其组成和结构。如图 4.1-1 所示，Gin 小组基于 16S rRNA 全长基因技术分析了 2 个美国健康个体的肠道菌群的组成，并通过对元基因组进行大规模的鸟枪法测序，从而对肠道微生物的功能基因进行了研究，研究结果发现，微生物基因组中富含参与糖类、氨基酸、外来化合物代谢，甲烷产生，维生素和胆固醇代谢的基因，据此，证明人体不仅是微生物与人类共生的一个的超生物体，而且微生物还是人体代谢的重要参与者。

Gin 的研究资料表明[1]，人体的肠道微生物分属 6 大菌门：壁厚菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）、疣微菌门（Verrucomicrobia）、梭杆菌门（Fusobacteria）等各种丰富的微生物资源。其中有 99%以上为厌氧菌，包括拟杆菌（*Bacteroides*）、链状细菌（*Catenabacterium*）、消化链球菌（*Peptostreptococcus* Garrity）、螺菌（*Spirillum* Hylemon）等专性厌氧菌和乳酸菌（*Lactobacillus*）及双歧杆菌（*Bifidobacterium* Orla-Jensen）等，占有明显的优势。

肠道细菌几乎参与了与宿主代谢相关的各种活动，肠内微生物还具有几乎与宿主同样多的碳水化合物酶，在肠道内参与宿主的“酶池”（enzyme pool），并发挥与宿主代谢相关的作用。这些酶主要有 β-葡萄糖醛酸酶、β-葡萄糖苷酶、β-半

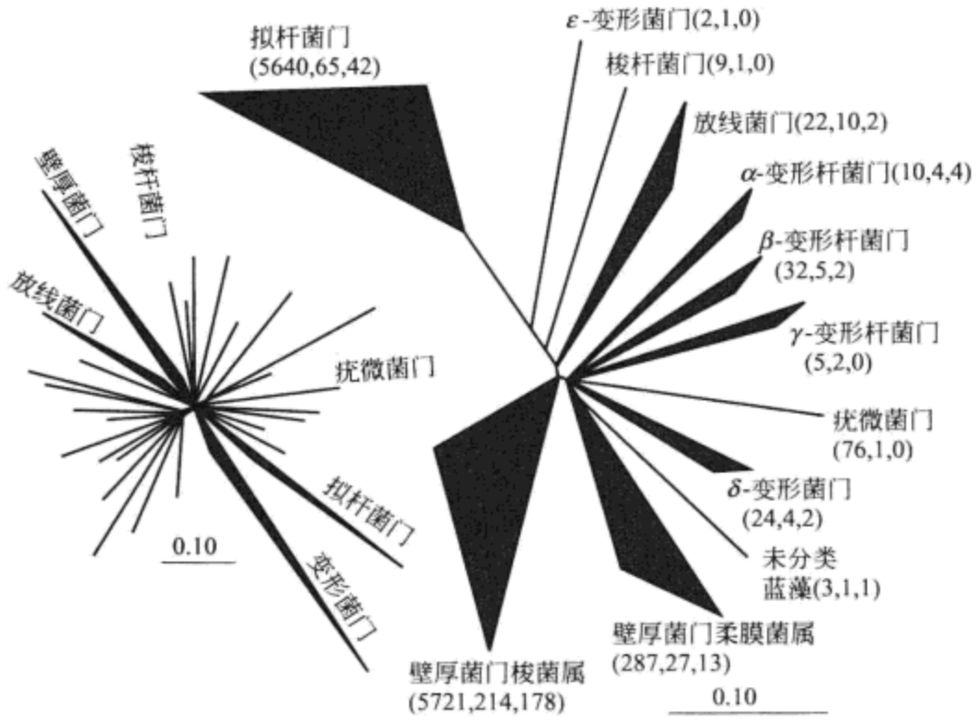


图 4.1-1　基于 16S rRNA 文库序列的 2 个美国健康个体肠道菌群进化树[1]

乳糖苷酶、硝基还原酶、偶氮还原酶、7α-羟基酶、胆固醇脱氢酶、蛋白酶及各种碳水化合物酶等。除此之外，某些宿主缺乏的酶，如溶纤维素酶和脂肪酶，都可从其正常肠道微生物群获得。肠道细菌也可向宿主提供维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 B_6、泛酸、烟酸和维生素 K 等物质或者底物、酶及降解产物都可以为宿主直接或间接利用。而在另一方面，肠道一些菌所具有的酶及其降解产物如硫化物、胺、吲哚等也同样具有毒害作用。另外。肠道菌所具有的部分酶还具有解毒作用，或其本身就有一定的解毒功能。而且尤为重要的是，肠道菌能够广泛地代谢药物和其他（药物、杀虫剂、致癌物等）异生型物质。肠道微生物的代谢潜能就像一个器官，至少等同于肝脏，肝脏是生物体代谢的主要器官，大部分肝脏代谢反应涉及氧化、水解反应，产生极性的高分子量的代谢产物。而肠道细菌的代谢反应包括还原和水解反应，产生非极性的低分子量产物，这样，肠道菌群就为药物代谢提供了独特的、相当重要的场所。当药物以结肠给药或口服缓释剂型给药时，菌群的作用则更为明显。肠道菌的代谢活性与药物释放、药物的疗效及毒副作用存在着极为密切的关系。为此，把肠道菌对药物代谢作为药物肝脏代谢的补充，进行深入研究，将可能作为研究药物吸收、药效基础和药物毒性的重要手段。

4.1.2　肠道微生物和药物代谢的关系

如图 4.1-2 所示，药物的代谢可分为吸收、分布和排泄等过程，首先药物[drug (D)] 的吸收发生在小肠中，之后药物进入肝脏转化为代谢物 [metabolites (M)]，同时通过肝脏、肠和肾脏的排泄作用，分别将这些代谢物排入胆汁、肠腔

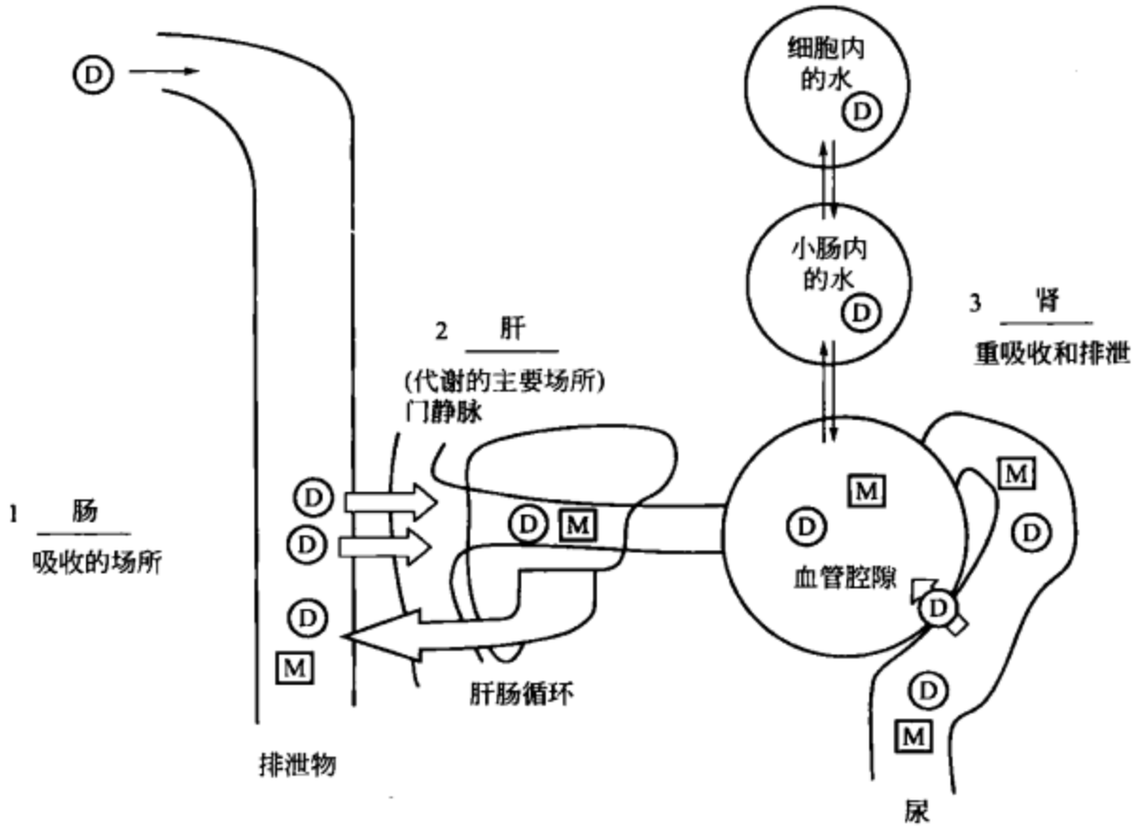


图 4.1-2 肠道菌代谢药物的途径

和尿液，而原药和药物的代谢物从肝脏排泄进入胆汁后，再重新进入胃肠道，之后被重吸收或排入粪便。与此同时，进入血管的原药和药物代谢物也被肾脏排泄进入尿液。值得注意的是，通过静脉传送的药物或者完全被胃肠道上部吸收的药物，都有可能随分泌物或系统的循环扩散进入肠腔而到达肠的底部，或者通过胆汁排泄，或者通过肝肠循环的回收利用形成结合物，进一步利用。在这种情况下，如果药物没有全部代谢就会沉积在大肠中，从而提供了与肠道菌作用的机会，肠道菌调节代谢的机会将大大增加，为此，肠道菌可能在药物的吸收、代谢中起到重要作用。20 世纪 40 年代，由于悉生动物的成功培养以及先进生物物理技术（电镜、质谱和多谱联用等）的综合应用，胃肠菌群与药物代谢及其吸收过程的密切关系，才被逐渐揭示。现代科学认为，药物在胃肠道内被肠道菌群第一次代谢（metabolism）或转化（transformation）后形成各种代谢产物经肠壁吸收入血，再由门静脉进入肝脏，有些成分在肝脏可能被第二次转化，然后再被转运至靶组织及机体各部位，产生药理作用，最后再经肾脏随尿液排出或经胆道随胆汁排至肠道和体外，或再次被吸收后进入肠肝循环。因而可知，肠道内菌群对药物的代谢是人体内除肝脏之外最重要的药物代谢途径，它与肝脏代谢相辅相成，可以作为肝脏代谢的补充和抵抗，与药物的吸收分布具有密切的关系。肠道菌在一些复杂的药物成分的吸收中扮演着重要的角色，而且随着现代药理学及各种现代分析检测技术在药物肠道吸收领域广泛和深入的应用，以及体外肠道微生物纯培养手段和各种体外胃肠道模型的建立和发展，都为肠道菌对一些复杂药物代谢的研究提供了必要的手段，成为众多药

物研发中受青睐和必不可少的工具。近年来，在这一领域的研究已经取得了长足的发展，具体表现在以下几个方面。

① 肠道菌是药物活化、抑制或产生毒性的直接因素。肠道菌群可以与多种不同化学结构和药理性质的药物进行大量的代谢反应，从而导致药物活化、钝化或生成毒性代谢物。虽然，胃肠道菌群主要的作用局限在肠道末端，但药物在全身释放后均有可能面临肠道菌群的代谢作用，因此，在药物开发中，为了评价该药物可能具有的治疗作用，必须充分考虑肠道菌群的代谢作用。

② 肠道菌的作用是前体药物活化的必须手段。肠道菌具有人体丰富的各种活性酶的资源，被称为“天然的酶工厂”。而肠道菌群在生命活动中产生的许多用于药物代谢的酶，其种类可能比肝脏中正常代谢的酶还要多。而且不同类型的肠道菌能够产生不同的酶，并能催化不同类型的药物代谢反应，如水解、还原、芳香化、杂环裂解、脱羧、脱卤素、脱烷基等。这些反应绝大部分属非合成反应，其中最常见的是酶催化水解反应，如配糖体在水解酶作用下生成配基，或者当位于肝脏的β-葡萄糖醛酸、甘氨酸、牛磺酸、硫酸酯等的络合物被排入肠道后，由于肠道菌群含有多种针对这些络合物的水解酶，因而，大多数络合物可以在肠道菌的作用下水解，水解后的产物再经门静脉返回肝脏。其次，为还原反应，例如消化道下部结肠中大部分为厌氧肠道菌，因而，其酶反应主要是还原反应，如偶氮染剂和硝基衍生物被还原成氨基衍生物。肝脏组织代谢的结果，最终往往产生生物活性较低的化合物，如在化合物上添加极性基团，使之更易排出体外；而肠道细菌恰恰相反，化合物经代谢后极性降低，其脂溶性、膜通透性增强，而且部分代谢产物的生物活性发生了显著的变化，其药理活性显著增强、毒性降低。特别是天然药物中，药物往往以前药的形式存在，真正起作用的是其肠道细菌的代谢产物，前体药物的发现不仅诠释了一些天然药物的作用基础，而且为新型药物的发现提供了一种极好的研究思路。

③ 肠道菌作为天然产物强有力的修饰工具，成为一种合成或转化天然药物的有力手段。目前已经发现多种天然成分被肠道菌群代谢后，发生转化反应，产生多种具有较强药理活性或毒性较低的天然产物，而且随着体外各种肠道微生物分离和培养技术的成功，肠道菌对天然产物的修饰，已从近年来研究较多的各种皂苷产物的水解反应，发展为针对黄酮、生物碱、异黄酮、萜类、植物激素等多种天然成分的定点修饰反应，包括氧化、合成、定点转化（羟基化、环化、手性催化）等多种反应。日本富山医科药科大学的小桥恭一、赤尾光昭和服部征雄等著名学者，从20世纪80年代起对中药有效成分的肠道菌群修饰过程做了系统和大量的工作，对中药有效成分的体内过程和作用机制的研究作出了很大的贡献。肠道菌作为天然产物强有力的修饰工具，成为一种合成或转化天然药物的有力手段，已经被许多学者所重视，并成为一个备受国际关注的重要课题。

④ 有益肠道菌和天然产物的配伍研究，不仅符合中医理论，而且为现代天然微生态制剂的研究提供了极大的发展空间。天然药物多为植物药，从广义的角度来讲，可以理解为这些植物药由于不具有排泄器官，所以需要把具有生理活性的二次

代谢产物和糖结合起来形成苷类而加以储存，人吞服苷类药物后，借助肠道菌的作用又把它变回生理活性物质（药物或者毒物）。另一方面，肠道菌可以利用所生成的糖做自我繁殖之用，对细菌来说，药物代谢过程中产生的糖就成了不错的碳源，这一点，使得肠道菌与药物形成一种可能的共生-寄生关系。而部分有益肠道菌对天然产物的代谢过程，不仅可以使天然产物代谢转化成为活性产物，有的甚至能够产生新的活性增强或毒性降低的全新成分，而且其代谢过程中产生的糖、蛋白质、氨基酸等多种营养物质又可以作为肠道益生菌生产的再生能源，为细菌的生长提供必需的能量，再者由于天然产物本身具有的药理活性，在其共生-寄生的过程之中增强了益生菌的药用价值，这种益生菌和天然药物的完美组合，相辅相成，完全符合中医协同配伍的理论，而且更重要的是，这一有机的结合为天然微生态制剂的开发提供了开发前景。

4.1.3 肠道菌药物代谢的概念

肠道菌对药物的代谢，细菌产生各种各样的酶对药物的转化和代谢作用，可使药物发生结构变化，从而使药物的活性发生变化，与此同时，它们亦可使无活性型药物转换为活性型药物，或者使有毒性的天然产物转化为低毒性的产物，即所谓“前体药物活化”，使药物的各种成分在肠道菌的作用下代谢或修饰，实现药物的生物转化。这一过程在药物的吸收过程中起到至关重要的作用。虽然我国利用肠道菌的研究刚刚起步，但利用肠道菌进行中草药体内代谢的研究独具特色，近年来在新药的发现、代谢机理和分离分析等方面取得了一定的进展，本章主要从肠道菌药物代谢的原理、技术方法以及在天然药物创新研究中的应用几方面做一详细的介绍。

4.2 肠道微生物代谢药物的基本原理和技术方法

4.2.1 肠道微生物代谢药物的基本原理

肠道细菌在药物代谢中不仅扮演着重要的角色，而且会对药物在体内的作用产生重大的影响。其主要的原理表现在以下几个方面。

① 肠道菌的酶促作用，是其代谢药物的实质，来自于多种肠道菌所产生的多种丰富酶的代谢作用，其代谢酶包括β-葡萄糖醛酸酶、β-葡萄糖苷酶、β-半乳糖酶、硝基还原酶、偶氮还原酶、7α-羟基酶、胆固醇脱氢酶、蛋白酶及各种碳水化合物酶和溶纤维素酶等，与肝脏代谢的目的不同，肝脏组织代谢的结果，最终往往产生生物活性较低的化合物，如在化合物上添加极性基团，使之更易排出体外；而肠道细菌恰恰相反，化合物经代谢酶作用后极性降低，具有更好的脂溶性，膜通透性增强。从增加药物吸收的角度来讲，肠道细菌的作用，促进一些药物的结构和物理性质的改变，并由此达到促进药物吸收的目的。临床中正在使用一些药物，如乳果



糖、磺胺类、吡啶、中药皂苷等，只有经过肠道菌群的代谢活化，从其无活性的前体物中释放出来，才具有药理活性和治疗价值，肠道菌在药物的药效基础研究中将扮演重要的角色。

② 肠道菌的多种代谢反应，是药物吸收和作用的基础。Thomas[2]、Nagengast[3]和 Narushima[4]研究指出，肠道细菌分布广泛，多集中于回肠、结肠和肠道的基底部，药物在肝脏中结合葡萄糖苷酸后，随胆汁分泌至肠道，被肠道菌水解为母体化合物而重新吸收，如此形成的肝肠循环有利于药物的吸收，而且肠道（尤其是底端部分）菌丛的厌氧环境也使得多种还原反应得以顺利进行，例如，多种偶氮、硝基、羰基类化合物多在此被还原。除此之外，裂解酶也能够破坏 C—C、C—N 键；转移酶则主要催化脱苷酰反应和杂环裂解、脱羧、乙酰化、水解、除去氨基酸分子的羧基等多种反应。通过肠道细菌特殊的酶的代谢反应，产物的化学结构发生了一定的变化。而且，经过特殊的肠道菌的修饰、生物合成、分解等反应，代谢生成各种具有不同生物效应的物质。这其中包括：其一，代谢前体药物，产生真正具有生物效应的物质；其二，代谢产生具有毒性、或者毒性增强的物质，或者产生毒性相关的物质；再者，产生全新结构的、具有特殊生物效应或者增效和减毒的化学物质。从生物反应的本质来讲，肠道菌对药物的代谢反应，也可以看作一种生物转化的过程，而利用肠道菌进行的各种转化，不仅可以用于多种生物合成的修饰、同时也可以作为一种基本的代谢方式，产生所需要的、具有生物效应的物质。正是多种肠道菌的多种生物转化反应，为其代谢的研究提供了理论基础，以下将分别予以介绍。

4.2.2　药物肠道代谢的基本反应

4.2.2.1　还原反应

（1）偶氮还原反应　1937 年 Fuller[5]首次发现偶氮磺胺（Prontosil）可以在肠道菌作用下发生代谢反应，产生著名的抗菌药磺胺，而 Gingell[6]发现偶氮磺酰胺（Neoprontosil）同样也可以在肠道菌作用下代谢产生磺胺。其过程包括：首先由肠道菌代谢酶——偶氮还原酶（azoreductase）作用，联苯胺重排，形成次联氨基化合物，然后劈开氮氧键，形成磺胺化合物。Bachrach[7]和 Svartz[8]同时发现，偶氮磺胺和偶氮磺酰胺同属磺胺类化合物，它们的抗炎作用可能是与代谢过程中产生的乙酰氨基水杨酸相关。而 Peppercorn[9~11]首次应用柳氮化合物柳氮磺吡啶（Salazosulfapyridine），经肠道菌代谢产生 5-氨基水杨酸和磺胺吡啶（Sulfapyridine），但是其中产生的另外一种化合物，却使患者产生了严重的厌食、恶心、皮疹和血液异常等副作用，为了避免这种副产物，Chan[12]又成功地应用肠道菌从巴柳氮（Balsalazide）的代谢中产生 5-氨基水杨酸和对氨基苯甲酰，Wadworth[13]在此基础上，从奥沙拉嗪中成功代谢产生双分子的 5-氨基水杨酸。这一成功，使得奥沙拉嗪成为出色的一线抗炎药物，这其中肠道菌的代谢扮演了重要角色。其反应路线如图 4.2-1 所示。

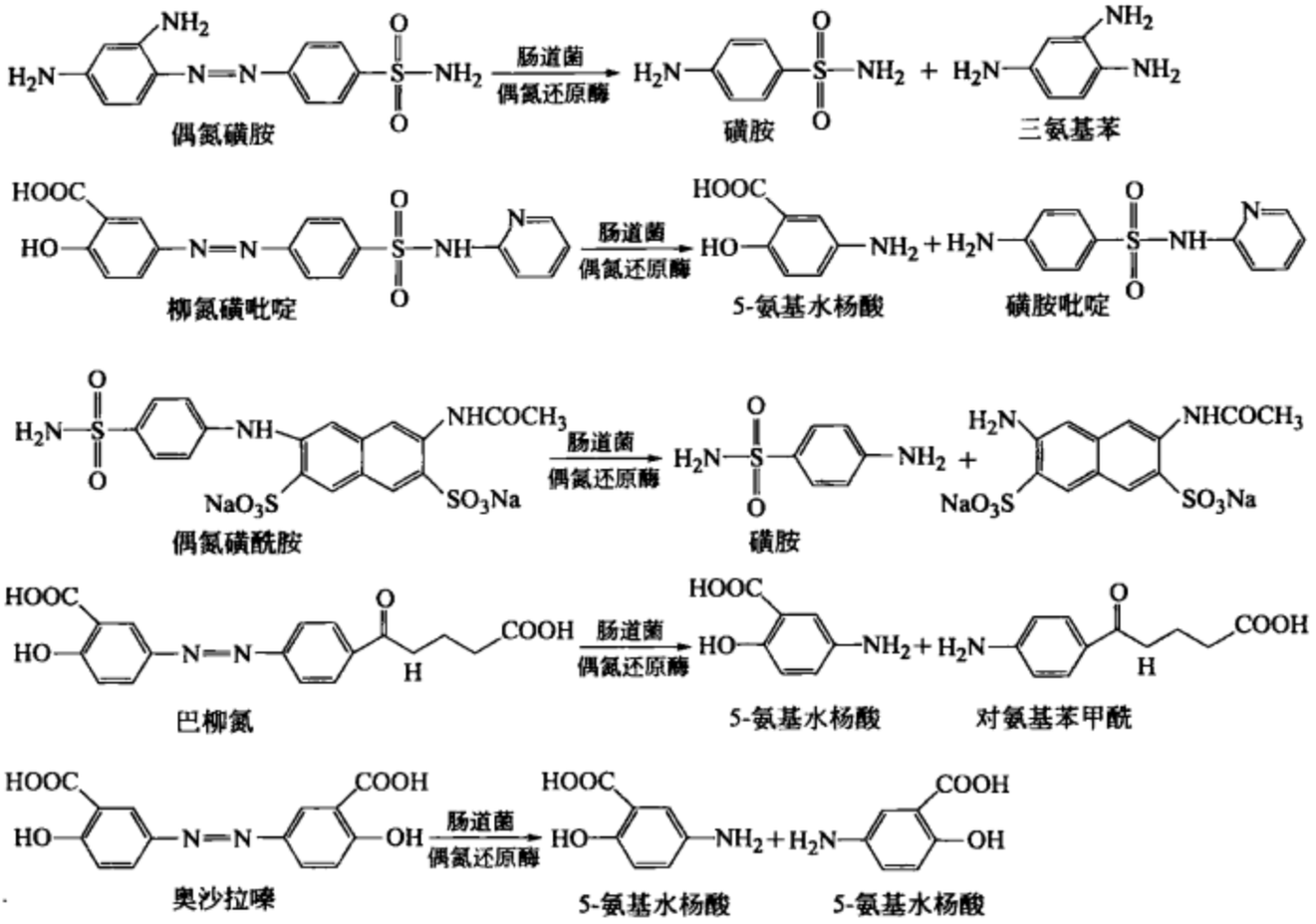


图 4.2-1　还原偶氮磺胺、偶氮磺酰胺、柳氮磺吡啶、巴柳氮和奥沙拉嗪的反应

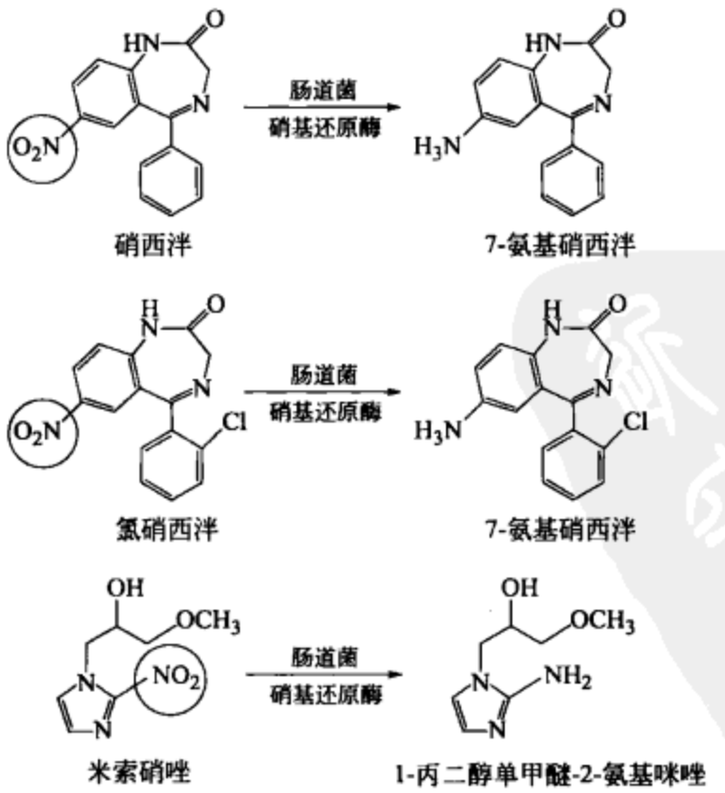


图 4.2-2　还原硝基安定、氯硝西泮和米索硝唑的反应

（2）硝基还原反应　如图 4.2-2 所示，Rafii[14]发现，大鼠肠道菌具有丰富的硝基还原酶（nitroreductase），而且其含量远远高于肝脏线粒体和微粒体，Sa-

kai[15]首次证明了硝西泮（Nitrazepam）在肠道菌硝基还原酶的作用下代谢产生7-氨基硝西泮（7-amino-nitrazepam），该化合物具有强烈的胎儿致畸作用。Takeno[16]由此揭示了硝西泮可能存在的毒性，其中推测可能是硝西泮在肠道菌群的作用下，转化为7-氨基硝西泮，然后在肝脏硝基还原酶的作用下产生7-乙酰氨基硝西泮，二者均具有强烈的致畸作用。Elmer 和 Remmel[17]也从氯硝西泮（Clonazepam）中同样代谢产生7-氨基硝西泮。Koch[18]也采用米索硝唑（Misonidazole）激活肠道硝基还原酶代谢产生1-丙二醇单甲醚-2-氨基咪唑化合物，该化合物具有辅助放射治疗人类癌症的作用，没有致畸作用。

（3）硫酸还原酶　在肠道中同样也存在着丰富的硫酸还原酶，如图4.2-3所示，奥美拉唑（Omeprazole）是一种取代苯并咪唑，能有效地抑制胃酸分泌并能抑制 H^+,K^+-ATP酶的活性。Watanabe[19]检验了肠道菌对奥美拉唑的作用，发现其在肠道菌的作用下，硫酸还原酶活化，代谢产生奥美拉唑的代谢物。Strong[20]发现排尿酸药物苯磺唑酮（Sulfinpyrazone）和非甾体抗炎镇痛药舒林酸（Sulindac）同样可以发生类似的肠道菌代谢反应。由此可以预见，肠道菌中存在的硫酸还原酶的作用是多方面的。

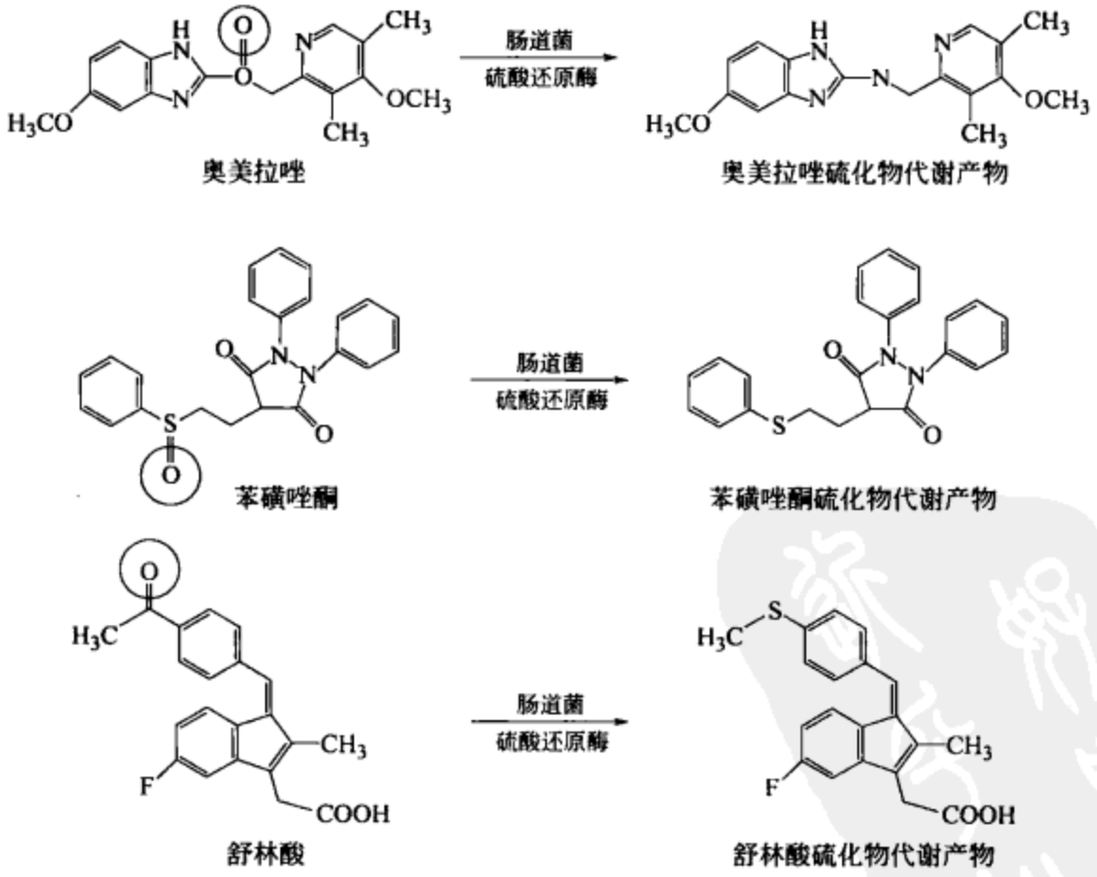


图4.2-3　还原奥美拉唑、苯磺唑酮和舒林酸的反应

（4）其他的还原反应　肠道菌还原反应的机制复杂，涉及的确切酶反应机制尚不清楚，报道的其他反应有内酯的还原、边链的氧化或还原以及杂环的还原等。如图4.2-4所示，Lindenbaum[21]报道了强心药地高辛（Digoxin）在肠道菌的作用下，其内酯环和边链分别发生还原，形成二氢地高辛（Dihydrodigoxin），或其苷元地高辛配基。这些衍生物的形成相对削弱了其药理作用。Kitamura[22]报道了抗

癫痫药物唑尼沙胺（Zonisamide）在肠道细菌的作用下还原代谢，形成2-硫酰氨基苯酚，由此证明肠道细菌可能对其中苯并异噁唑（benzisoxazole）发生还原反应。Koch[23,24]发现肠道菌同样可以作用于抗菌剂甲硝唑（Metronidazole），发生侧链氧化，打开咪唑环形成*N*-(2-羟乙基）草胺酸和乙酰胺代谢物，由此可见，肠道菌在体内的作用是多样的，急需重视和深入研究。

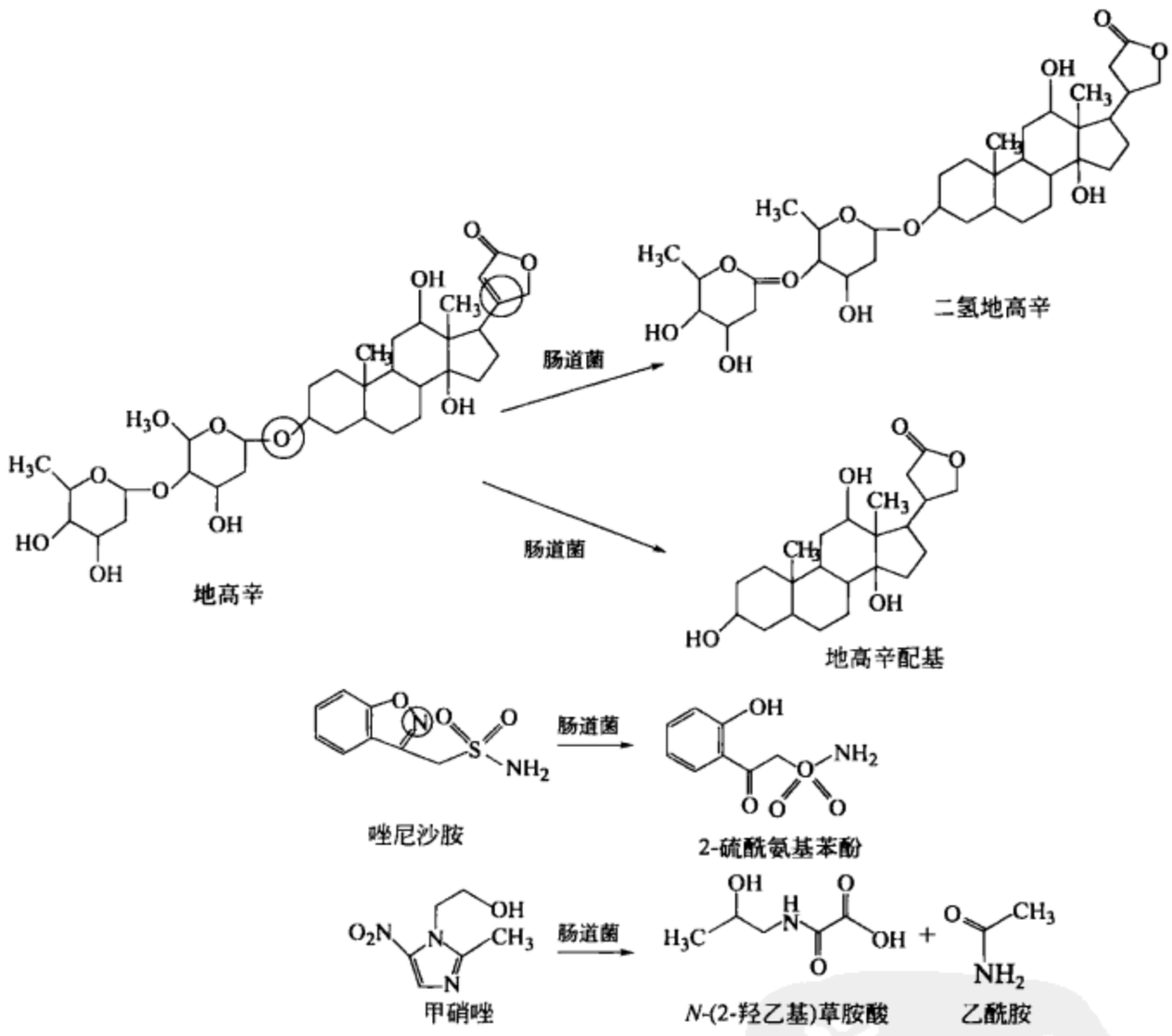


图 4.2-4　还原地高辛、唑尼沙胺和甲硝唑的反应

4.2.2.2　水解反应

（1）乳果糖（Lactulose）水解　Elkington[25]、Peppercorn 和 Goldman[10]先后采用肠道菌（*Enterobacterium*）、乳酸菌（*Lactobacillus*）、杆菌（*Bacillus*）和大肠杆菌（*Escherichia coli*）代谢乳果糖酮类似物 4-吡喃葡萄苷乳糖-D-果糖形成氨和其他胺的代谢物，据此推测这些代谢物和药物具有轻度腹泻的副作用可能有关。

（2）索立夫定（Sorivudine）的水解　1993 年索立夫定作为一种很有前途的抗病毒药物推向日本市场。如图 4.2-5 所示，Nakayama[26]发现它在肠道菌的作用下

被转化为乙烯基尿嘧啶 [(*E*)-5-(2-bromovinyl) uracil (BVU)]，BVU 能够通过灭活体内 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 代谢中的关键酶 DPD，从而造成体内大量的四氢呋喃氟尿嘧啶 (tegafur) 代谢形成 5-氟尿嘧啶，造成组织中大量的氟尿嘧啶药物蓄积，从而引发毒性。索立夫定仅在日本上市的 40 天里，就导致了 80 名病人的死亡，这种药物由肠道代谢引发的毒性，使其在这些病人死后的几个星期内退出了市场。这个药物代谢史中的著名事件，充分显示了研究肠道细菌代谢的重要性，药物代谢过程中是否增强或加剧毒性，已成为制药业关心的问题，现在各国的新药审批规程都将药物的代谢研究作为了考察药物安全性的必需条件。

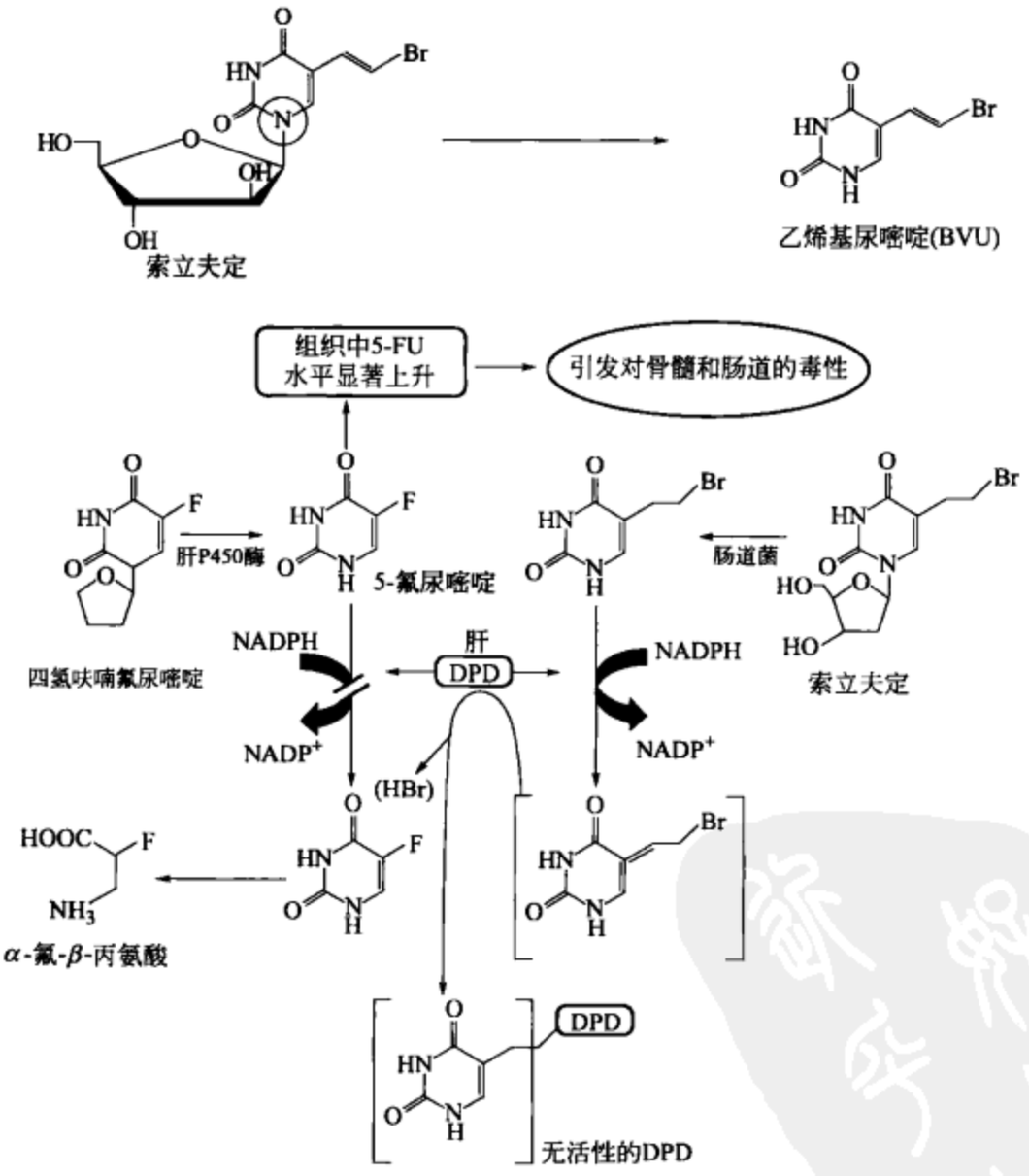


图 4.2-5　索立夫定和 5-氟尿嘧啶的肠道菌转化

(3) 磺胺噻唑 (Sulfathiazole) 的水解　如图 4.2-6 所示，琥珀磺胺噻唑 (Succinylsulfathiazole) 为磺胺类药，由于其胃肠道吸收极差，严重影响了它的使用，Poth[27] 发现，磺胺噻唑能在肠道菌的作用下，水解消除琥珀基团形成抗菌性极强而且吸收好的磺胺噻唑，肠道菌的作用提高了磺胺噻唑的药理活性。

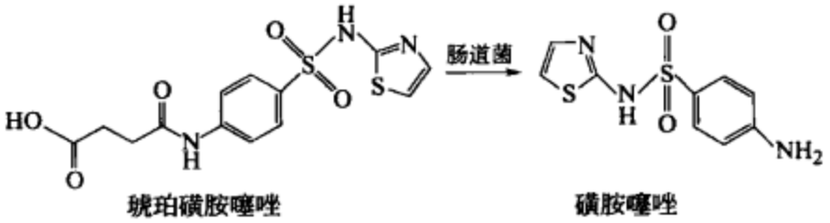


图 4.2-6　琥珀磺胺噻唑的肠道菌转化

（4）脱羧基反应　如图 4.2-7 所示，左旋多巴（L-Dopa）是有效的治疗帕金森病的药物，而该病产生的直接原因和体内多巴胺的水平直接相关，Peppercorn 和 Goldman[10]发现肠道菌可以代谢左旋多巴结构中的邻苯二酚环发生脱羧反应，产生 *m*-酪胺（*m*-tyramine）和 *m*-羟基苯酸，进而起到调节中枢神经系统多巴胺耗竭水平的作用，Goldin[28]提出，大鼠盲肠内微生物与左旋多巴代谢水平密切相关。

（5）乙酰化反应　如图 4.2-8 所示，Dull[29]发现 5-氨基水杨酸（5-aminosalicylic acid）不仅是前面提到的柳氮磺吡啶、巴柳氮和奥沙拉嗪的代谢产物，而且 Hogezand[30]和 Delomenie[31]还发现，其本身可以在肠道菌的作用下，代谢形成 5-氨基水杨酸乙酰化的产物。

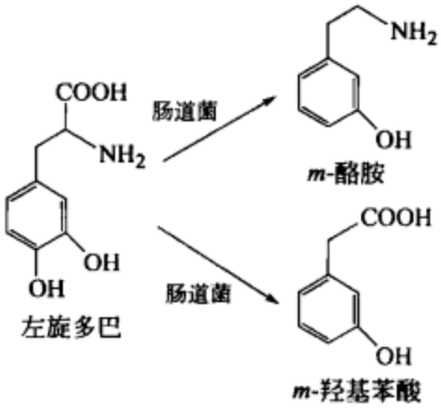


图 4.2-7　大鼠体内左旋多巴的肠道菌转化

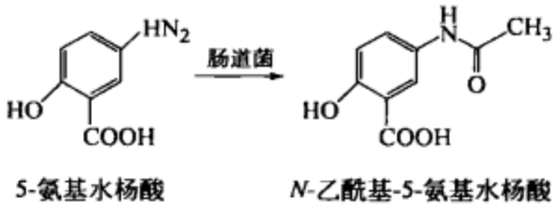


图 4.2-8　5-氨基水杨酸的肠道菌转化

（6）脱乙酰化反应　如图 4.2-9 所示，Smith 和 Griffiths[32]报道，非那西丁（Phenacetin）可以在肠道菌的作用下代谢形成对氨基苯乙醚，这一代谢产物可以引发高铁血红蛋白血症和肾炎，为此应该适当使用解热镇痛药，避免滥用引发的副作用。

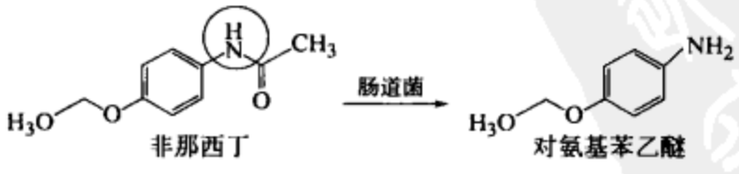


图 4.2-9　非那西丁的肠道菌转化

（7）裂解 *N*-氧化合键　如图 4.2-10 所示，Basit 和 Lacey[33~35]采用体外分批培养发酵系统模拟结肠代谢，并在此条件下，研究了雷尼替丁（Ranitidine）和尼扎替丁（Nizatidine）的代谢，发现随着代谢时间的变化，药物结构中 *N*-氧化物断裂，氧原子消失。雷尼替丁和尼扎替丁分别代谢形成新的代谢物，由此改变了两种药物在结肠内难于吸收的情况。而令人注意的是，同属 H_2 受体拮抗剂的西咪替

丁、法莫替丁却没有发生同样的变化。由此可见，肠道菌的作用具有一定的选择性，这种情况可能与肠道菌对不同的药物作用差异有关。

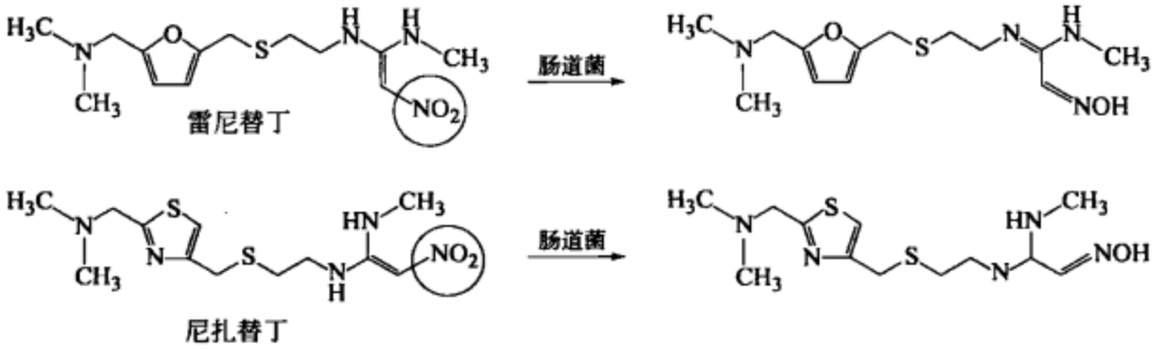


图 4.2-10　雷尼替丁与尼扎替丁的肠道菌转化

（8）蛋白质水解　Tozaki[36,37]研究发现胰岛素（Insulin）和降钙素（Calcitonin）可以在肠道菌的作用下，激活蛋白水解酶（protease），降解氨基酸肽键，而其中降钙素与胰岛素相比，则更容易水解。

（9）脱硝　如图 4.2-11 所示，硝酸甘油和硝酸异山梨酯属于硝酸盐药物，Abu 和 Beckett[38]报道，硝酸甘油可以在肠道菌的作用下，形成甘油-1,3-山梨醇、甘油-1,2-山梨醇、甘油-1,1-硝酸盐和甘油-1,2-硝酸盐，而硝酸异山梨酯则形成硝酸异山梨醇（isosorbide mononitrate），肠道菌发挥了代谢脱出硝基的作用。

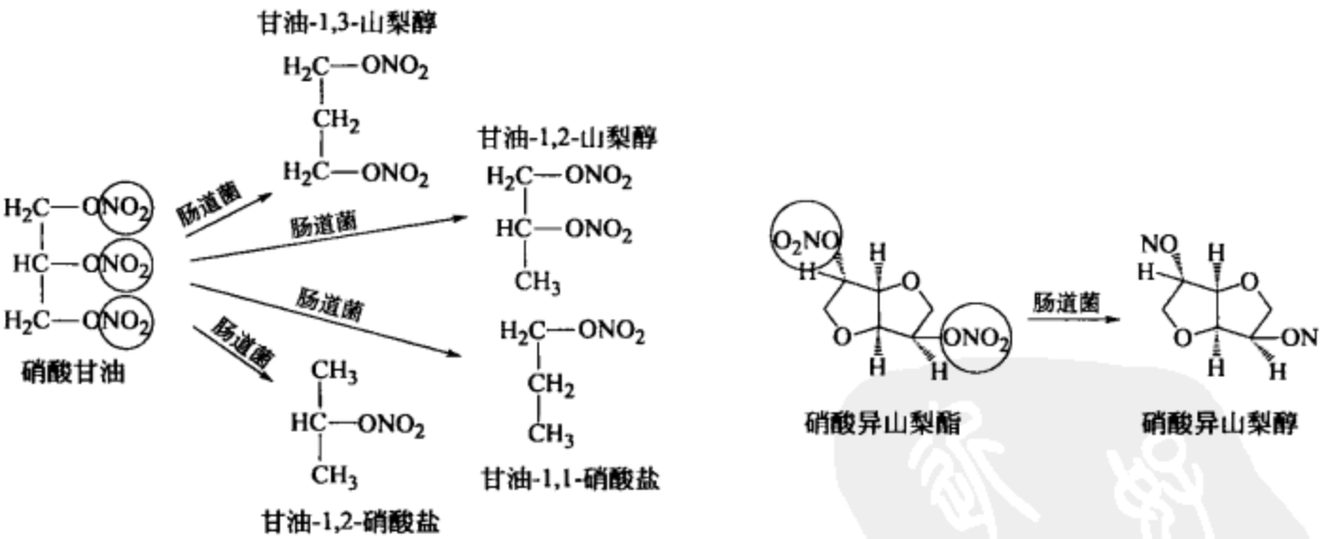


图 4.2-11　硝酸甘油和硝酸异山梨酯在大鼠盲肠内的肠道菌转化

（10）胺的形成和水解酰胺　如图 4.2-12 所示，氯霉素（Chloramphenicol）用于治疗伤寒、立克次体、布鲁菌病和厌氧感染，Holt[39]发现氯霉素口服后，被肠道菌作用，其结构中的硝基水解，形成其酰胺代谢物，这种代谢物可能和氯霉素口服所可能引发的再生障碍性贫血的严重副作用有关。

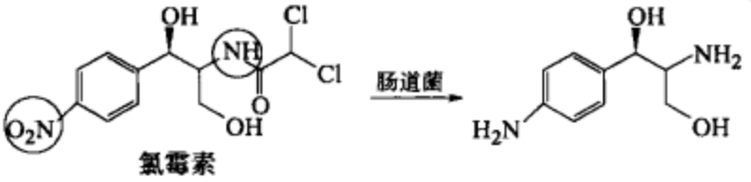


图 4.2-12　氯霉素的肠道菌转化反应

（11）降解：肝脏中未结合的药物由胆汁排泄进入肠道代谢　Thomas[2]、Nagengast[3]和 Schiller[40]研究发现，在肝脏中无效偶联硫酸盐或葡萄糖醛酸的药物，可以经胆汁排泄进入肠道，这就为肠道细菌对这些药物的代谢提供了作用的空间。肠道细菌不仅通过其代谢作用，恢复了药物活性，而且解离后的药物又可以经过肠肝循环，再次进入肝脏代谢，药物吲哚美辛（Indomethacin）和吗啡（Morphine）就是通过这种方式代谢。Smith[41]研究发现，吲哚美辛在狗和猴子的代谢物中，以其酰基葡萄糖苷酸偶联形式经胆汁排泄进入肠道，然后在肠道经微生物的作用从葡萄糖苷酸复合物中解离，以便它可以通过肠循环回到肝脏，再次形成代谢物。肠道菌在肠肝循环中的突出作用，以及对药物的多种作用的阐明，都为肠道菌的作用提供了理论基础。

（12）噻唑开环左旋咪唑　左旋咪唑（Levamisole）作为驱虫药在兽医和人类医学方面已被广泛使用。如图 4.2-13 所示，Shu[42]研究发现，厌氧培养人体肠道菌群可以代谢左旋咪唑，其结构中的噻唑开环，产生了三个噻唑环开环代谢产物，即左旋咪唑代谢产物Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ。

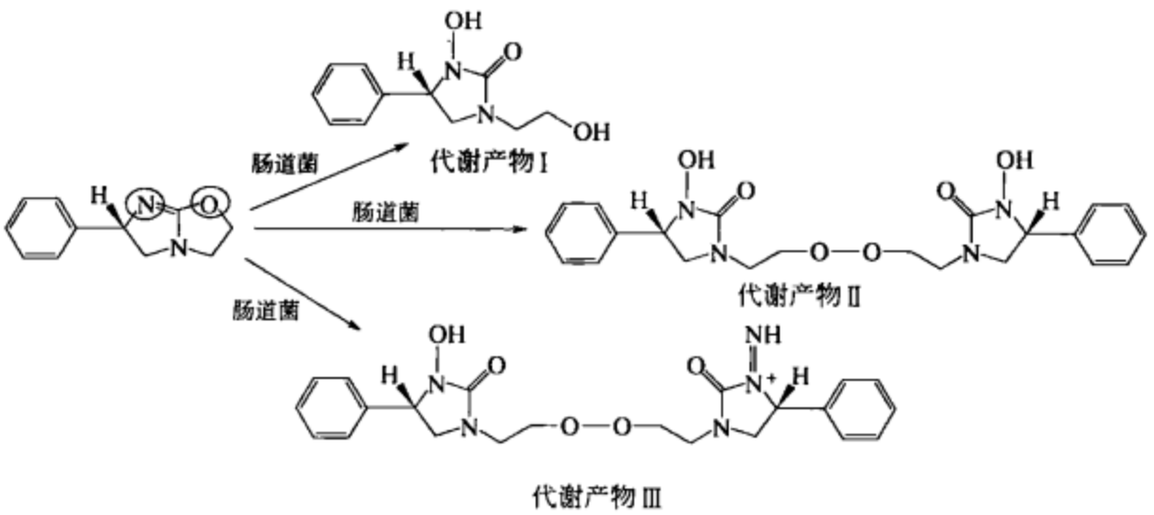


图 4.2-13　左旋咪唑的肠道菌转化

（13）异噁唑劈离　抗精神病药利培酮（Risperidone）是一种非常有效的血清 5-HT 和多巴胺受体拮抗剂，如图 4.2-14 所示，Meuldermans[43]研究了肠道菌对利培酮的代谢，发现其主要代谢途径是劈离其结构中的异噁唑环系统，形成其代谢物。肠道菌对杂环药物的代谢作用，为杂环药物的代谢提供了新的途径。

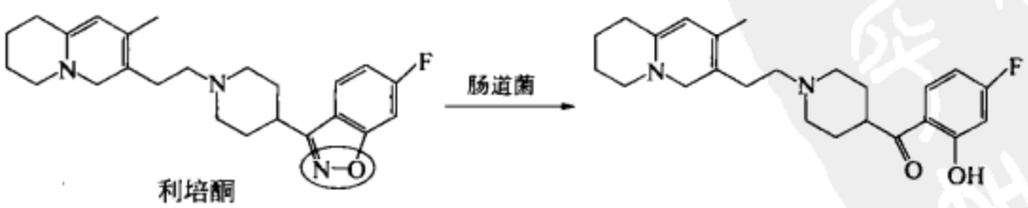


图 4.2-14　利培酮的肠道菌转化

（14）去糖基化反应　槲皮素（Quercetin）是黄酮类化合物，广泛分布于植物药物中，通常以相关的糖苷形式，如葡萄糖苷存在，具有抗氧化以及通过抑制环磷酸二酯酶和环氧合酶达到抑制血小板聚集的药理活性。Schneider[44]研究发现，真杆菌和肠球菌代谢槲皮素-3-葡萄糖苷形成 3,4-二羟基苯乙酸，由于肠道菌能够激

活果糖氨氧化酶和果糖氨激酶以此催化去糖基化反应而释放出自由氨基，据此推测肠道菌在黄酮成分的生物转化中起主导作用。

（15）*N*-去甲基　脱氧麻黄碱（Methamphetamine）是一类比安非他命作用更强的类交感神经兴奋剂，如图 4.2-15 所示，Caldwell 和 Hawksworth[45] 发现，其可以在肠道菌的作用下，发生去甲基化反应，代谢形成甲基苯丙胺（Amphetamine），这是一种剧毒物质，为此肠道菌代谢后造成一些毒性更强的产物形成，应该引起重视，避免此类反应的发生。

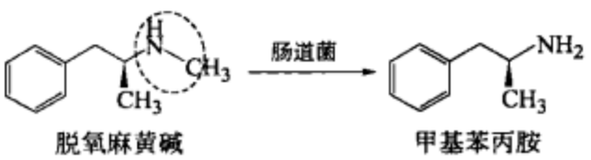


图 4.2-15　脱氧麻黄碱的肠道菌转化

4.2.2.3　其他反应

（1）氮替瑞林（Azetirelin）　氮替瑞林是一种新型的促甲状腺素释放激素药，Sasaki[46] 研究证实，其可以在肠道菌的作用下代谢产生杆菌肽（bacitracin）或嘌呤（purine）。药理活性试验表明，代谢后其促甲状腺素释放激素作用明显增强。

（2）氧嗪酸钾（Potassium oxonate）　氧嗪酸钾是抗癌制剂 5-氟尿嘧啶的衍生物。如图 4.2-16 所示，Yoshisue[47] 研究发现，它可以通过肠道菌的代谢，形成代谢产物氰尿酸（cyanuric acid）。这种产物能够有效地抑制药物磷酸化，并以此来减少胃肠道毒性。

（3）氟胞嘧啶（Flucytosine）　氟胞嘧啶是一种抗真菌药物，如图 4.2-17 所示，Vermes[48] 发现其可以在肠道菌的代谢下转换为 5-氟尿嘧啶，这种代谢反应大大减少了临床病人使用药物的剂量。

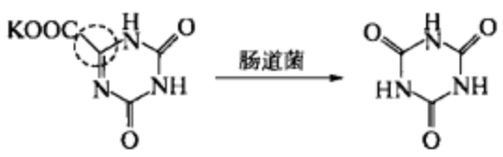


图 4.2-16　氧嗪酸钾的肠道菌转化

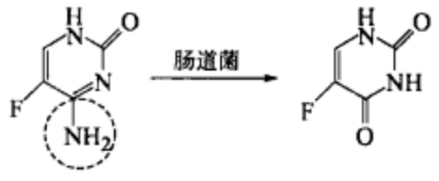


图 4.2-17　氟胞嘧啶的肠道菌转化

（4）橙皮素（Hesperidin）　橙皮素是一种天然产物，如图 4.2-18 所示，Lee[49] 发现其和肠道菌作用可以形成橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷（hesperetin-7-*O*-glucopyranoside），而这种产物具有较强的抗过敏活性，据此推测，橙皮素可能是其发挥抗敏活性的前体药物。肠道菌对天然产物的代谢修饰作用，可能是天然药物发挥药理活性的一种关键因素。

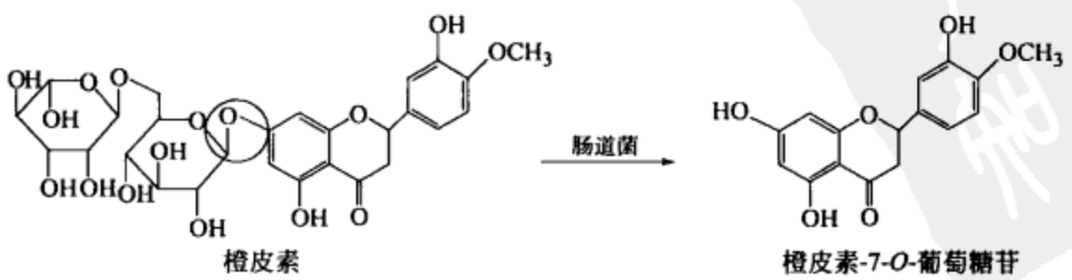


图 4.2-18　橙皮素的肠道菌转化

（5）大豆素（Daidzein） 大豆素是一种弱雌激素化合物，可能对人体健康有益，包括治疗高胆固醇血症与骨质疏松症，其中肠道菌是其转化吸收必不可少的因素，如图 4.2-19 所示，其主要的代谢产物包括 4,7-二羟基异黄酮（4,7-dihydroxy-isoflavone）和雌马酚（equol）。这两种代谢产物在其药理活性的发挥中起到主要作用。

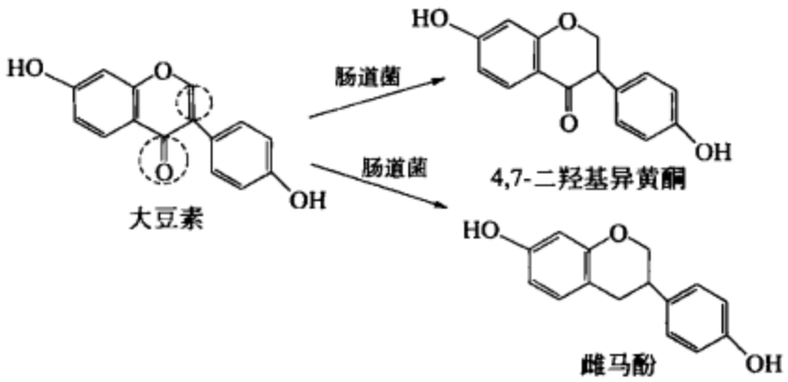


图 4.2-19 大豆素的肠道菌转化

（6）天然皂苷 天然药物代谢反应中最重要的是苷类（glycosides）的水解。肠道细菌，如大肠杆菌、肠球菌、乳酸菌、梭状芽孢杆菌（*Clostridium* Prazmowski）、畸形菌体和双歧杆菌（*Bifidobacterium* Orla-Jensen）等，通常含有 α、β-糖苷酶（α、β-glycosidase），因此可以降解多种糖苷类化合物。中药是一种多成分体系药物，多以口服形式给药，肠道正常菌群在中药代谢中起的作用更重要。肠道菌的微生态环境对中药的吸收起到多种代谢作用，见表 4.2-1 所示，中药中的多种成分只有经过肠道菌群的代谢活化，才能从其无活性的前体物中释放出来，发挥药理活性。

表 4.2-1 中药配糖体的药物前体与发挥药效的活性物质

中药	药效	药物前体	活性成分
芦荟	泻下	芦荟苷	芦荟,大黄素蒽酮
甘草	抗过敏、抗炎症	甘草酸	甘草次酸
黄芩	抗过敏	黄芩苷	黄芩苷元
山栀子	胆汁分泌促进	京尼平苷	京尼平
芍药	镇痉	芍药苷	芍药盐酸硫胺
药用人参	镇静	人参皂苷 Rb1	化合物 K,20(*S*)-原人参二醇

由于“肠道细菌群”是一种复杂的混合菌体，而且不同的因素如性别、年龄、生理因素等都对代谢产生巨大的影响。而且在另一方面，从复杂的人体或动物体内分离或检测各种细菌的代谢物，不仅实验研究中涉及的动物、设备、分析检测等花费大量的资金而且还涉及严重的伦理问题，加之现已发现各种动物和人体肠道代谢所表现出的酶的活性的显著差异都促使我们急需寻找更加合理、科学、可控的体外模型，代替单纯的体内代谢研究方法。近年来，随着各种肠道体外模型的建立和运

用，以及生物检测技术突飞猛进的发展，为天然药物的肠道菌代谢研究提供了有力的技术支持。而且，随着一大批与天然药物肠道菌代谢相关的科研成果的涌现，也为这一领域的研究取得了飞跃式的发展，下面予以详述。

4.2.3　药物肠道菌代谢的模型

4.2.3.1　动物体内模型

（1）动物胆汁代谢和粪便代谢物的比较　这是最简单的一种测量肠道药物代谢的方法，采用代谢笼饲养动物，给予药物后，分别在不同的时间收集动物的胆汁和粪便，测定各种代谢物中药物的浓度，通过比较不同代谢物中分布的浓度高低，确定药物的代谢方式。Meuldermans[43]比较了利培酮在肠道的代谢，发现药物在粪便的浓度远远高于胆汁的浓度，由此推测肠道菌是这种药物的主要代谢方式。

（2）肠的不同部位对药物的代谢比较　肠道菌在胃肠道各个部位的分布数量不仅不同，而且在胃、小肠、盲肠和回肠的菌群分布也有很大的差异，为此有必要对消化道不同部位的吸收做一比较。Yoshisue[47]比较了药物氧嗪酸钾在胃、小肠、回肠和盲肠的分布浓度，发现药物在回肠的浓度最高，可能这一部位是药物的主要代谢场所。

（3）悉生动物和无菌动物的代谢比较　悉生动物（gnotobiotic animals）也称已知菌动物或已知菌丛动物，包括单菌（monoxenie）、双菌（dixenie）、三菌（trixenie）或多菌（polyxenie）的悉生动物模型。是指用与无菌动物相同的方法取得饲养（剖腹取胎，在隔离器内饲养），一般是将1～3种已知的微生物人工接种于无菌动物体内定居，无菌动物接种一种已知菌就是单菌动物，接种两种已知菌就是双菌动物，以此类推。由于此种动物和无菌动物一样是放在无菌隔离器内饲养的，因此选用此种动物做实验准确性是很高的，可排除动物体内带有的各种不明确的微生物对实验结果的干扰，并可按研究目的来选择某种微生物。Coates[50]、Goldman[51]、Edwards和Parrett[52]指出，可以充分利用悉生动物和无菌动物的代谢物比较，确定代谢目的产物的肠道菌，结合目的产物所表现出的药理活性和毒性的差异，选择适当的肠道菌为代表的悉生动物为筛选模型，以无菌动物模型作为阴性对照，比较药物在两种动物模型中的代谢差异，优选药物代谢的肠道菌菌种和最佳的代谢方式。

以上体内模型一般是建立在多种动物体内代谢基础之上的，但由于肠道菌群、代谢物的影响因素复杂，实验动物与人的肠道菌群有显著的差别，而且不同的动物之间也有明显的差异，例如家兔盲肠和结肠缺乏乳酸菌，有较少量的肠杆菌，大鼠和小鼠的肠道菌群与整个胃肠道的黏膜密切相关，而人肠道菌群与大肠壁密切相关。单一动物模型难于完全代表药物在体内代谢的全部过程，为此很有必要研究人体的药物代谢模型，以此深入研究肠道菌对药物的代谢过程。

4.2.3.2　人体内模型

（1）长期扩散和立即释放的比较　这项技术是在比较口服形式下，肠道菌对药

物代谢产物不同的释放特性。目标药物释放能够传送药物到达特定的代谢区域。例如，Lindenbaum[21]研究细菌对地高辛的代谢，发现其中不同的地高辛代谢产物的动力学参数完全不同，经过比较，发现代谢物的释放特性与其胃肠吸收特性紧密相关。充分吸收的地高辛代谢物在近端释放药物，而不充分吸收的代谢物在远端释放，即高细菌浓度的地方。而且，引起了局部代谢产物浓度的急剧上升，而这其中最有可能的解释是由位于远端结肠细菌代谢大量的药物产生的。通过对比立即释放形式和持续释放形式来研究甲硝唑可以得到相似的结论。这些研究的一个缺陷是，药物的不同释放特性取决于研究的药物是否能够引发不同的反应，因而具有一定的局限。

（2）静脉注射和口服给药中的肠道菌代谢的比较　只有药物与肠道菌相互作用后药物的代谢产物才会出现。静脉注射药物，药物分子与细菌接触机会相对较小；相反，口服给药方式，在胃肠道会有充分的机会和肠道菌充分作用，口服药物经胃肠道代谢后，发现大量的代谢物，而静脉注射后药物代谢物的数量极少，远远小于口服给药方式。利用两种方式代谢产物的不同，可以确定肠道菌特有的代谢产物，以此推测药物的吸收过程，而这种方法的缺点是静脉注射的药物有可能被分泌到胃肠道腔内经过胆汁运输到达肝脏，或者通过胃肠道的流出机制与细菌相互作用，由此可能会造成一些比较的误差。

（3）回肠造口术病人与健康志愿者代谢的比较　Gorbach[53]认为，回肠造口术的病人，其小肠被放到体外，不进入结肠，与健康志愿者相比，这种模型的肠道菌的含量非常有限，药物的代谢受到肠道菌作用的影响较弱，采用这种模型和健康的、富含肠道菌的志愿者模型相比，可以推测肠道菌对药物的代谢。为此，Wadworth、Fitton[13]和 Strong[20]研究了在这种模型下奥沙拉嗪、苯磺唑酮、舒林酸的代谢，发现与结肠造口术病人相比，健康志愿者组口服药物后增加了大量的代谢产物，这可能是细菌代谢的产物。虽然，以回肠造口术病人与健康志愿者代谢的比较对研究药物的肠道菌代谢是很有价值的，但是对于药物的早期开发却十分有限。为此寻找更加简便、经济，不涉及伦理、动物差异等因素的体外模型就成为研究药物代谢中急需解决的问题。

4.2.3.3　体外模型研究

在体内评价药物在人类肠道的代谢，就拿肠道菌分布比较丰富的结肠来说，多数情况下，很难得到和人体完全类似的模型，而且受到时间、医疗监管、伦理上等诸多因素的限制。为此，国内外学者通过一些深入的探讨和摸索，发现采用体外静止、半连续、连续和计算机模拟的方法，可以在体外模拟与人体相似的结肠代谢环境，而且模拟的环境与人类结肠的环境十分类似。这就为研究肠道菌的体外代谢提供了非常必要的措施和帮助。现总结如下。

（1）静态体外培养模型　Coates[50]提出的静态培养模型：采取新鲜的动物或人的粪便，加入含有一定培养液的特殊溶液中，培养体系稳定后，加入药物，观察药物在其中的代谢情况。培养期间需要定期补充水、营养液和新鲜菌液（2～4h），

而且，更重要的是，要定期检测培养体系的pH，测定溶液的氧化还原电位和冲入一定量的氮气，维持整个反应体系的厌氧环境。这种测定的方法，是一种最简单的模拟人体代谢的模型，其在实际应用中存在许多难于克服的缺点：①Gibson和Fuller[54]指出，采用这种模型，检测药物代谢的时间非常有限，一般大约2～4h，这样短的时间，对于大多数药物来讲，短期代谢的量非常有限，难于满足代谢要求。②Wilson、Basit[55]、Basit[34]、McConnell[56,57]、Siew[58]和Yang[59]研究发现，这种模型适合于代谢周期较短的药物，而对于复杂的、多组分的药物同时代谢，可能难于满足要求。与此同时，这种模型中，完全靠人工连续补充氮气的方法，也给试验操作过程带来了一定的困难，为此这种模型需要改进。

（2）半连续培养模型　Rumney和Rowland[60]提出了采用半自动化控制的体外肠道模型，它主要包括三个部分：自动发酵的培养系统、pH调控系统和自动气体交换系统。在模型的操作过程中，可以自动调节pH、气体交换以及培养液的流动和交换，解决了静态模型存在的一些缺陷，但这种模型在实际中应用的时间并不长，很快就被先进的连续培养模型所取代。

（3）连续培养模型（三段恒化系统模型）　见图4.2-20所示，Coates[50]研究发现，结肠的上部、中部以及基底部的pH、菌群分布以及对碳源（碳水化合物）的消耗和利用的情况都有很大的差异，结肠是一个长1.5m的软管，表面积约1275m^3，容积为0.5～0.75L，物质在结肠的平均驻留时间为50h，这一数值有很广的变动范围（从25～160h）。Rumney和Rowland[60]发现，部分消化的物质进入结肠，（在通过胃和小肠之后）水含量大约在95%。Cummings[61]报道，结肠内容物的主要组成部分不是食物残留物而是细菌。在动物和人的肠道细菌中数量最多的是拟杆菌和双歧杆菌，它们各自占厌氧菌总数的30%和25%。当物质通过结肠时，它要经历厌氧发酵，例如，碳水化合物通过分解短链脂肪酸为中间产物变为最终产物（例如为二氧化碳和甲烷）。Cummings[61]提出结肠可以分为三段［近端（proximal），横向（transverse）和末端（distal）］，在结肠的不同区段其pH值的变化范围是很大的：在近端上升阶段pH值为5.5～6.0～6.2；横向段，pH值为6.2～6.8；而在结肠的下降末端段pH值为6.5～6.8～6.9。每段的几个重要的发酵条件具有很大的区别。①近端：pH值为5.5～6.0～6.2，碳水化合物经肠道菌发酵代谢比较活跃，肠液的流速比较快。②横向：pH值为6.2～6.8，药物的代谢反应以肠道菌的代谢还原反应为主，药物的反应速度较慢，代谢浓度较低。③末端：pH值为6.5～6.8～6.9，期间蛋白质药物代谢水解活跃，相反碳水化合物的代谢反应较少。通过上述的分析可以预见，模型中各区段建立pH值是非常重要的。如图4.2-21和图4.2-22所示，Cummings[61]在设计模型时，充分考虑了结肠的各阶段pH值的要求，把连续培养的系统分为3个pH值的培养系统，该系统又称为三段恒化系统模型。其主要的特点为：①三段恒化系统是从传统的单段恒化器发展而来的，这个连续的培养系统由三个容器组成，即V1、V2和V3，工作时各自的容积分别是0.22L、0.32L和0.32L，温度是37℃。pH值是自动控制的，分别为5.5、6.2和6.8。每一个发酵槽中，保持的气体是CO_2并且用O_2或N_2连续喷射到生

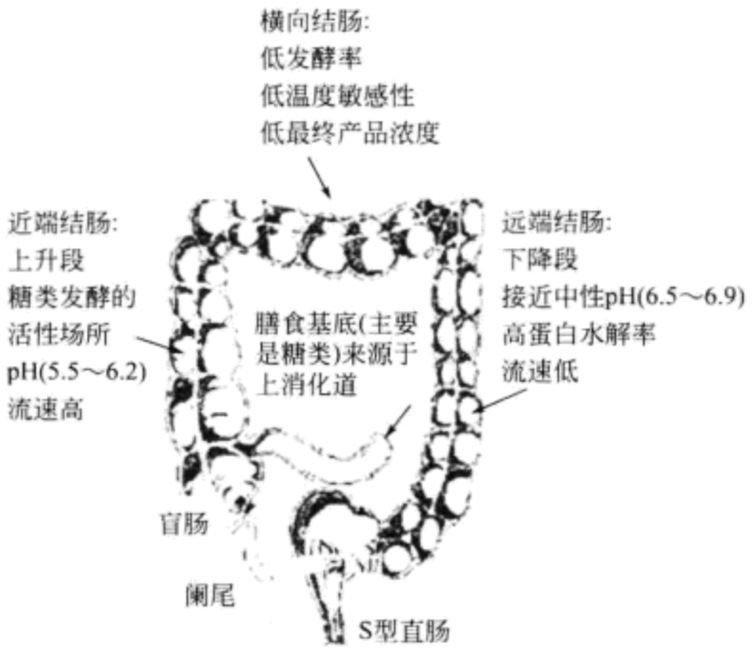


图 4.2-20　人肠解剖图

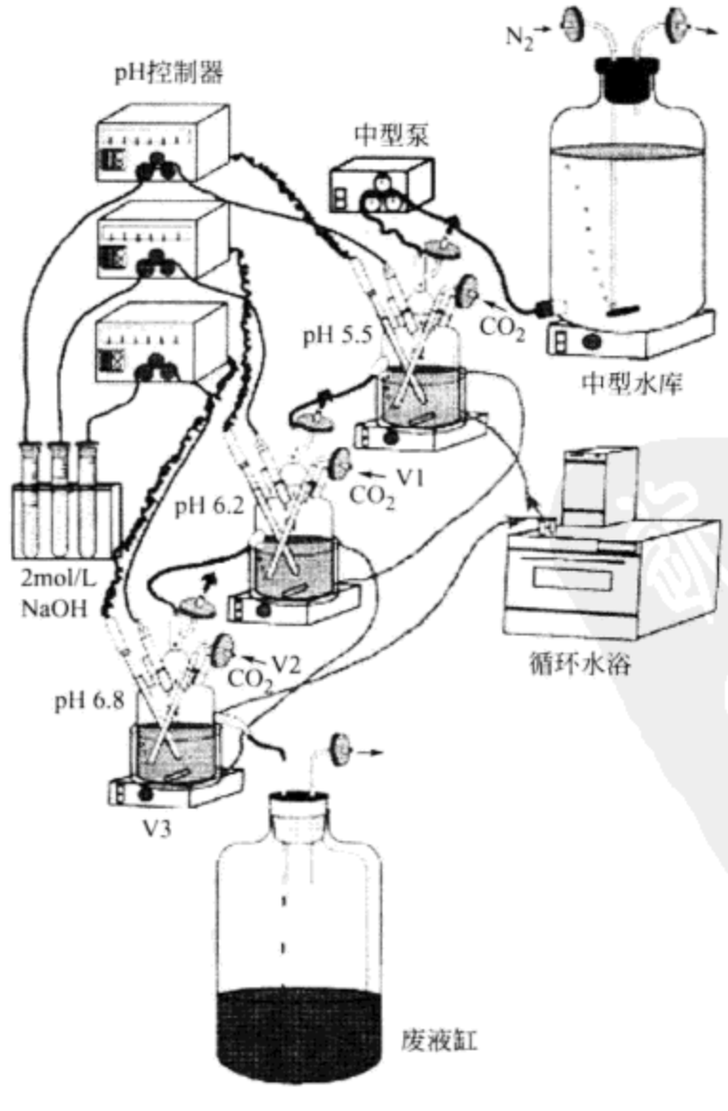


图 4.2-21　三段恒化培养系统示意图（1）

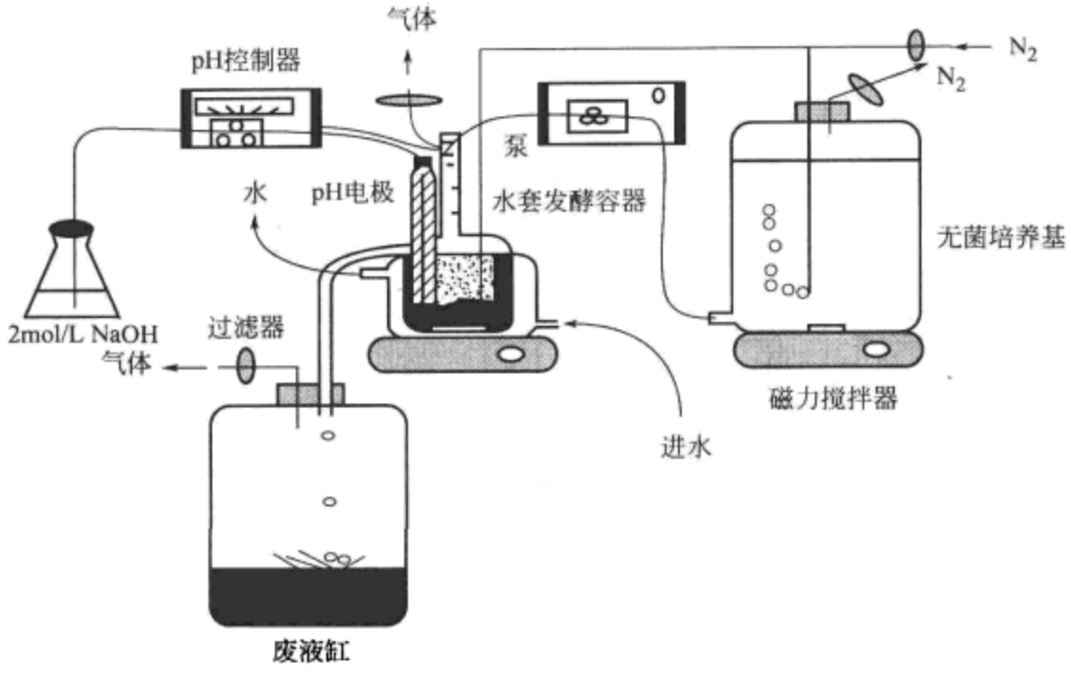


图 4.2-22　三段恒化培养系统示意图（2）

长培养基中。V1 由一个蠕动的泵供给，然后由一系列的管道提供给 V2 和 V3。②系统通过自动或者全计算机控制，可以保证每一段模型具有恒定的细菌数量、温度、氧化还原电位和一定的营养供给。③三部分同时工作，形成一个和结肠非常类似的动态流动的反应系统。

（4）模拟人体肠道系统（SHIME，Simulator of the human intestinal microbial ecosystem）　Molly[62]和 De Boever[63]在上述模型的基础上，发展了五阶段模拟人体肠道生态代谢模型，如图 4.2-23 所示，整个系统由 5 个反应器组成，其中小肠部分由两个反应器（每一个反应器分别含有 300ml 工作液）组成，大肠部分由 3 个反应器（每一个反应器分别含有 1000ml、1600ml 和 1200ml 工作液）组成，其中每一个反应器都由 8 个部分组成：进口端、出口端培养液、样本池、定气交换系统、pH 电极检测系统、pH 调控系统（酸、碱）和气体控制系统。1 和 2 部分反应器，每间隔 8 天接种 10ml 营养液，而在同样的时间间隔，3、4 和 5 反应器接种 50ml 20%的新鲜的粪便悬浮液，期间适当地补充一定的大豆粉，维持营养。测定整个培养系统的 pH、氧化还原电位、细菌量等指标，并以此确定是否达到和人体肠道类似的生态环境以便进行相关药物的代谢研究。Possemiers[64]也同时提出，这个系统仍存在一定的缺陷，即整个系统达到动态稳定至少需要 2 周的时间，这是急需改进的。

（5）计算机控制的全自动蠕动、水循环吸收和药物吸收代谢模型　考虑到大多数药物通常是饭后服用，这样在药物肠道代谢的过程中就免不了存在食物和药物共同进行肠道代谢的情况，为了更加真实地模拟药物在肠道代谢的情况，Minekus[65]设计了这种计算机控制的全自动蠕动、水循环吸收和药物吸收代谢模型，如图 4.2-24 所示，这种模型共由 10 部分组成：A. 混合系统（mixing units）；B. pH 电极系统（pH electrode）；C. 碱泵系统（alkalip ump）；D. 透析泵系统

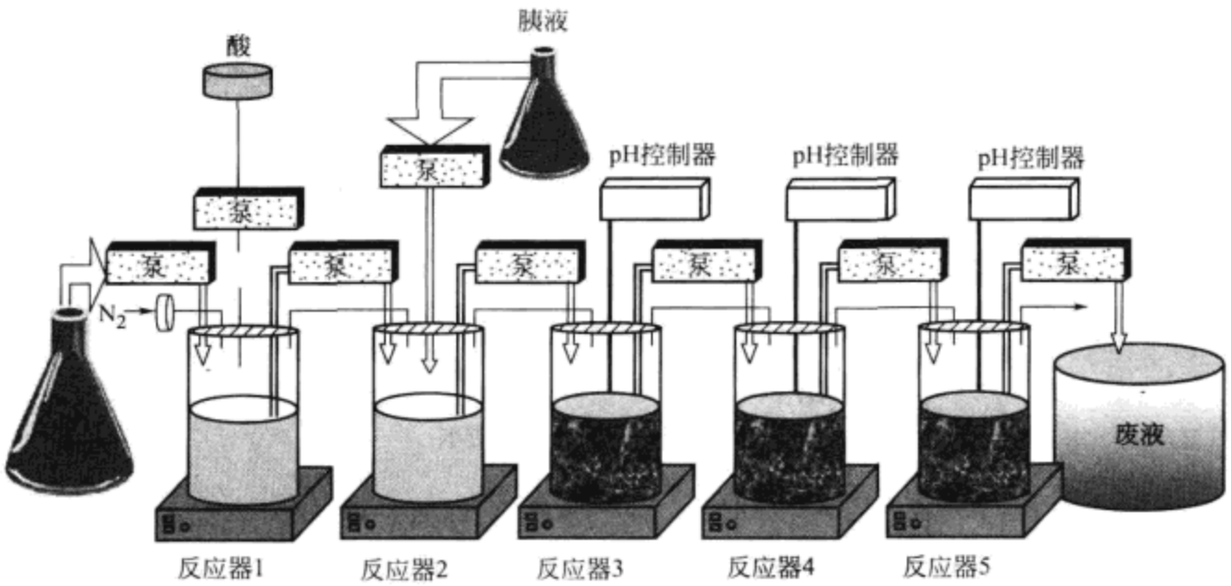


图 4.2-23　模拟人体肠道生态代谢模型示意图

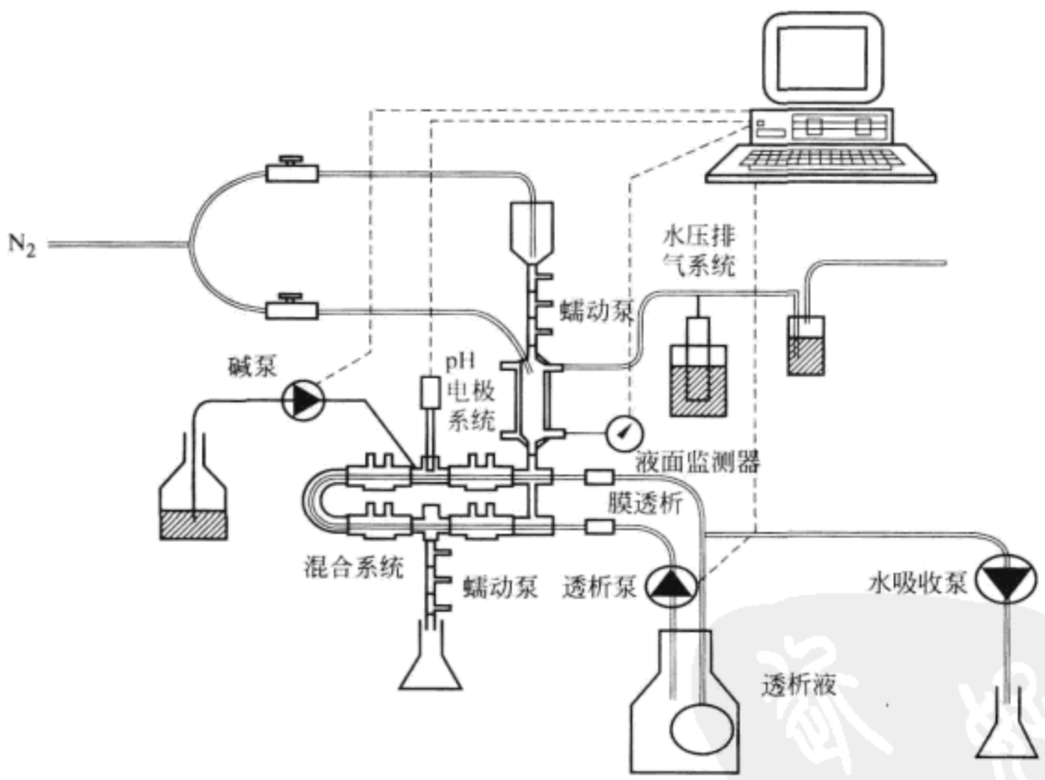


图 4.2-24　计算机模拟的人类肠道全自动蠕动、水循环吸收和药物吸收代谢模型

(dialysis pump)；E. 透析液系统（dialysate)；F. 膜透析系统（dialysis membrane)；G. 液面监测器（level sensor)；H. 水吸收泵系统（water absorption pump)；I. 蠕动泵（peristaltic valve)；J. 水压排气系统（gas outlet with water lock)。四个主要的循环培养单位，期间都通过特殊的、彼此相通的、带孔的洞相互循环和渗透，整个系统依靠计算机全程控制。整个系统控制的温度为 37℃，并通过特殊碱泵的作用调节系统 pH，整个环形循环系统都含有食物、细菌和药物的食糜（食物经胃液消化后变成的浆状物）流动；透析液用于维持一定的氧化还原电

位，并保证维持一定流量，以便维持电极、反应泵和透析膜正常工作所需的浓度；位于环形系统中的压力传感器调节食糜在系统中流动的速度以及水在透析膜中吸收和流动的速度；而在系统中蠕动泵则发挥着厌氧气体交换以及食糜的去除工作。整个系统各部分在计算机的调控下，进行有序的模拟药物代谢的过程，这个系统的特点是非常适合研究食物，特别是未消化食物和药物的肠道代谢研究。

（6）TNO 胃肠道代谢模型

① TNO 简介。荷兰应用科学研究组织 TNO 位于荷兰的泽伊斯特，是一个卓越的科学组织，他们的使命是将基础研究与这些知识在食品、药物和农用化学用品的应用联系起来。TNO 提出了一系列的实验用计算机控制动态的胃肠道模型，TIM 是一项由 TNO 发展的独特的专利技术，它模拟了人类的胃肠道，使用这项技术我们可以准确地复制在有食物消化吸收时人体胃肠道的动态环境。这一系统的显著特征是可以在消化过程中多次抽样，可以获取在各种条件下食物和其他物质消化和吸收的实时信息。

② TIM 的基本原理。栖息在大肠里的微生物群落是一个极为复杂的生态系统，人类结肠的生理状态很难用一般的方法模拟。目前的挑战是，发展可以信赖的体外模型来研究肠道菌群和它们的行为。例如，研究饮食对癌症发展的影响，或是益生菌对人类健康的积极作用。模型系统可能会减少或是避免使用动物对新产品和新的治疗方法进行试验，并由此避免动物试验的繁杂，以及直接采用人体试验而要陷入的伦理窘境。在前面研究的模型中，虽然采用了一系列有关模拟结肠、小肠和大肠环境的模型，在实际应用中也取得了一些成绩，但是作为系统研究药物的代谢来说，把胃和肠道割裂开来，单独研究肠道几个这样的模型，显然是不够的，因此，很有必要建立模拟人体胃肠道代谢的模型，从而全面地研究药物在胃肠道的代谢。

TNO 团队提出的一系列模型中，比较著名的是前面由 Macfarlane[66]介绍过的三阶段恒化系统，它由灵活的管道和蠕动的进给系统组成。虽然以前的这些模型操作相对简便，并复制了一些重要的肠道发酵条件，如 pH 值、温度和有用的养分，但在代表人类肠道方面还是有一些固有的局限性。Cummings[61]提出，涉及胃肠道模拟系统，混合模型的搅拌反应装置过于简单化，不能再现基底和微生物通过肠道停留的时间分布，搅拌槽不能重现流体力学，特别是剪切力在遇到人类大肠壁的情形，这些结果可能是重要的影响因素。而这其中，上述搅拌槽模型缺陷的关键是它没有模仿水和发酵产物（如短链脂肪酸）由肠道自然吸收的过程，换句话说，它代表的是一种腹泻模式。从生理上考虑，例如在肠壁上占有合适的繁殖位点和营养的有效性都是非常重要的但又经常被忽视，这些因素将会影响特定菌群组分竞争性的相互作用。因此，有效地模仿肠壁对于模型来说是非常重要的。如图 4.2-25 所示，TIM 是 TNO 提出的全胃肠道消化模型，在系统技术上做了很大的改进，具有一定的优点。

③ TIM 的优点

a. 准确的模仿。计算机控制的胃肠道模型 TIM 准确地模仿了胃肠道的环境。

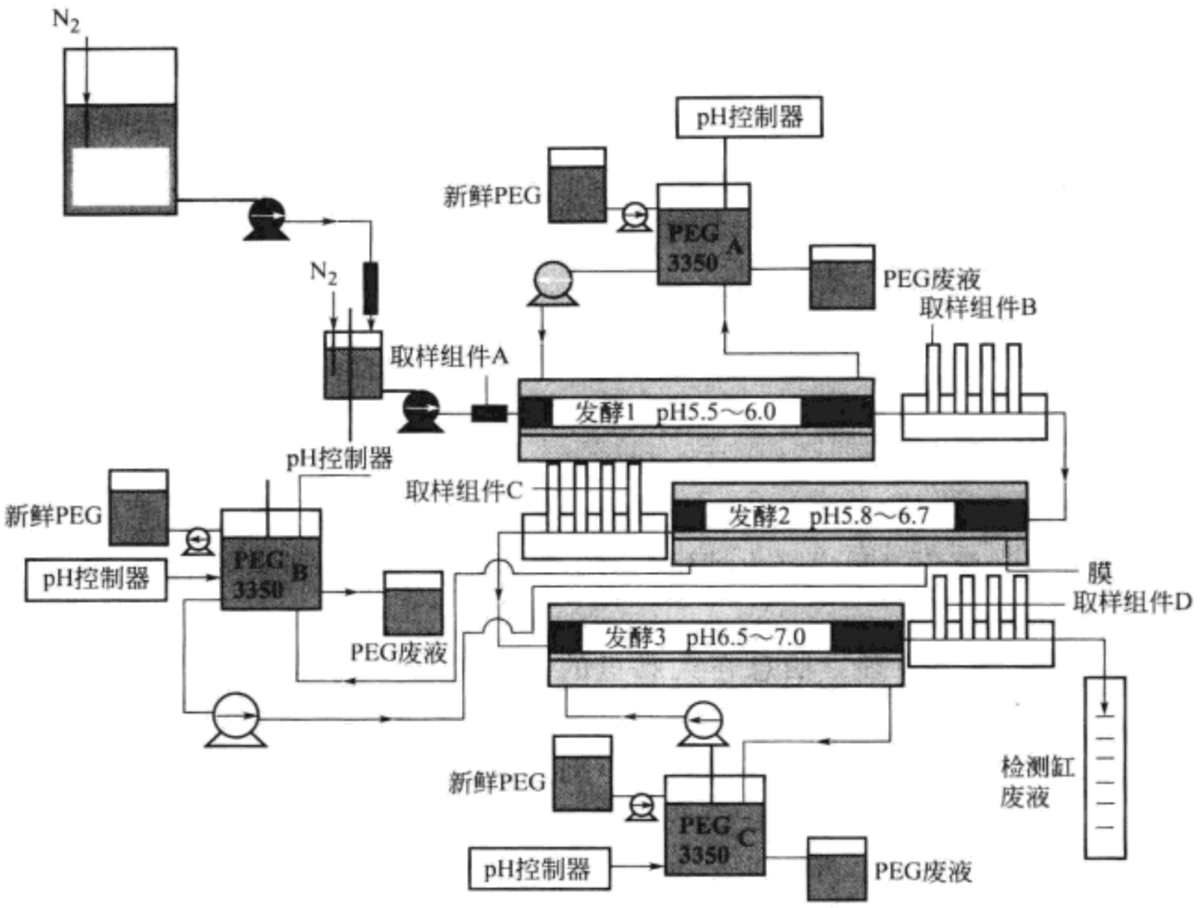


图 4.2-25 TIM 全胃肠道消化模型

它由几个区间组成，由阀门相互连接，并且模拟体温和肠道蠕动。这一系统中酸度和电解液浓度是可以调节的。同时还可以调节唾液的吞咽，胃酸和酶的分泌物，胰液和酶，胆汁盐。TIM-1 系统代表了从胃到小肠，而 TIM-2 代表了大肠，这两个模型与体内研究进行了有效的对比，已应用于大量药物试验。在 TIM 之前还没有任何一个体外消化系统能够满足以下五个参数：（ⅰ）连续使用生理数量的酶；（ⅱ）为酶和相关的共同因子如胆汁盐和辅酶提供合适的 pH；（ⅲ）移除消化产物；（ⅳ）在每一个消化阶段提供合适的混合；（Ⅴ）为每一步消化提供生理运输时间。

b. 成本效益。TIM 另一个主要的优点是与体内环境高度预测评价结合，节省时间和实验经费。有广泛的公式化的物理化学特性并且在这个模型中可以研究药物，包括溶解度、外壳的稳定性、释放情况、吸收的有效性和药物与营养物的相互作用。有了这些信息，就可以为在体内的进一步研究提供更好的构想和化合物的选择，并建立最佳的临床试验方案。在加速药物发展方面，这一系统节省了很多人力和金钱。TIM 试验没有伦理上的束缚，不需要多方的许可过程，甚至可以用毒性化合物或致病菌（在可控的条件下）而不会伤害动物或是人类。

c. 多种用途。TIM 可以详细分析药物在胃肠道的释放、溶解和生物亲和性，还有其他的物理化学特性或是相互作用。这一模型适合于广泛目标群体，如婴儿、年轻人、老年人和所有胃肠道损害的病人；也适用于动物，如狗。

d. TIM的系统概述。ⅰ. 系统。这个系统由三个薄膜发酵器组成，每一个单独的阶段都相同，在连接处有三个取样组件（sampling modle）。如图4.2-25所示，每一个膜发酵部分由独立的聚乙二醇循环系统控制。PEG溶液A通过第一段膜的外壳一侧泵入，初始设定pH为9.0，溶液B环绕在第二段pH为7.8，溶液C环绕在第三段pH为7.0。所有测定体积的流速为520ml/min。期间PEG溶液不断地冲入氮气（N_2）以维持厌氧环境，并且连续搅动保持系统温度为37℃；控制介质泵入的进入流速是12.7ml/h，这相当于通过系统的平均驻留时间是40h。系统在0h开始，第一段膜组件的入口采用接种针和注射器进行接种，发酵持续时间340h，通过在入口槽的发酵物中添加1mol/L NaOH或HCl，并不断搅动介质，使系统pH自动控制在5.5～6.0、5.8～6.7和6.5～7.0。而后系统进入工作状态，药物代谢开始，按照一定的时间间隔取样。ⅱ. 样本。在发酵系统中，用吸液管吸取在每一个膜发酵中的介质，作为测定的第一个样本；而在发酵过程中，从取样组件中采集的样本溶液，即为第二个样本；采用荧光原位杂交技术测定细菌的数量，分析介质和样本溶液中短链脂肪酸的含量。在发酵的最后，残留在膜系统中的内容物（那些没有离开发酵槽黏附在生物膜上和黏性介质上的物质）也要进行取样，这些黏性介质即作为第三个样本；而在三段恒化系统的五个独自运行中的三个容器中取样，作为第四个样本，取样时间是40h。分别分析各个样本中细菌、pH和短链脂肪酸的含量，通过不同样品的含量比较，确定药物代谢的含量。

④ TIM-1的系统概述。TIM-1由四个连续的部分组成，模拟胃和小肠的三个部分：十二指肠、空肠和回肠。如图4.2-25所示。每一个部分由两个相连的基本单元组成，这两个基本单元由玻璃的外套和灵活可变的内壁组成。改变水压使其能够通过可变内壁的压缩和松弛混合食糜。为了控制食糜的运输速度，可根据一个有效的公式进行计算：$f=1-2^{-(t/t_{1/2})\beta}$，$f$代表被传送的半流体的消化物，$t$是传送时间，$t_{1/2}$是传送时间的一半，$\beta$是描述曲线形状的系数，用来描述胃和回肠的传送。食糜的传送由与小室相连的蠕动阀门控制，每一个小室的容积由连接在电脑上的压力传感器监控，pH也由电脑监控，连续不断地控制水或1mol/L HCl（总共每分钟0.25ml）进入胃或者是电解质或1mol/L $NaHCO_3$（总共每分钟0.25ml）进入胃中。模仿的胃液（流速每分钟0.5ml）、胆汁（流速每分钟0.5ml）、胰液（流速每分钟0.25ml）以及胃液素、脂肪酶、胰酶和胆汁盐的混合液体可以在电脑控制的泵的调控下，进入每一个小室中，这个模型装有中空的纤维膜（截止值是相对分子质量5800），与空肠和结肠部分相连。水和小分子（例如，消化产物、溶解的药物）由泵入的通过真空纤维膜的透析液将其从小室的内腔中移出（每分钟10ml），这阻止了由代谢物的积累引起的抑制。在每一个实验之前，这个系统都要用清洁剂清洗，用水漂洗，再用100℃的蒸汽净化45min，然后整个系统开始正常运行，其他药物代谢样品的采取、pH的测定以及代谢产物的测定基本上和TIM系统方法类似。

从体外简单的模拟人体结肠代谢系统到计算机控制模拟人体胃肠道代谢模型的

出现，都给药物的肠道代谢研究提供了强大的实验基础。近年来，随着生物基因技术的发展，以及在药物代谢研究领域的应用和发展，药物代谢的研究也会更多地注重药物肠道代谢吸收机制。进入到消化道的药物原形化学成分及其肠道菌生物转化产物能否进入体循环或靶点是其能否产生生物学效应的关键。因此，利用并建立一定的药物肠道吸收模型可研究药物原形化学成分及其肠道细菌生物转化产物的肠吸收和转化，发现被吸收的化学物质，排除不被吸收的化学物质，建立吸收-结构关系和吸收过程中各化学物质的相互作用；探讨被吸收化学物质在吸收过程中的代谢以及吸收-代谢相关载体或酶的作用；探讨被吸收化学物质对肠道的毒性（包括细胞毒性和对细胞连接的毒性）等，国内外科学家在这一方面做出了许多努力，现在已有比较成熟的模拟人体吸收的细胞体外模型应用于各类肠道菌代谢药物的研究中。

（1）Caco-2 细胞模型　该模型是最近十几年来，国内外广泛采用的一种研究药物肠吸收的体外模型，具有操作相对简单、重复性较好、应用范围较广的特点。该细胞来源于人的直肠癌，其结构和功能非常类似于人小肠上皮细胞，并含有与小肠刷状缘上皮相关的酶系，而且比较易于体外培养。由于体外培养稳定，可应用于多类药物研究，帮助了解药物的吸收机制，预测体内吸收和药物相互作用，对于组合化学药物库高通量（HTS）筛选也是一个很好的工具，其具有非常显著的优点。

① 具有丰富肠系酶的表达系统。存在于正常小肠上皮中的各种转运系统和代谢酶如 P450 细胞色素同工酶、谷氨酰胺转肽酶、碱性磷酸酶、蔗糖酶、葡萄糖醛酸酶及糖、氨基酸、二肽、维生素 B 等多种与主动转运系统相关的酶在 Caco-2 细胞中都有表达，而且与小肠上皮细胞的表达非常类似。Caco-2 细胞微粒体存在多种 UDP-葡萄糖醛酸转移酶、1,6-同工酶、与药物代谢第Ⅰ相反应相关的羧酸酯酶和第Ⅱ相反应中的 *N*-乙酰化酶，而且其中 *N*-乙酰化酶-1 的活性比 *N*-乙酰化酶-2 的活性强。因此，从生化角度考虑，Caco-2 细胞非常适合药物代谢的研究。

② 与药物在人体内的吸收具有相关性。从人类结肠癌细胞中分离产生 Caco-2 细胞株，由于它隔离了肠道代谢的大量的信息，因此 Caco-2 被用于研究模型。这个细胞株的主要优势是一旦合流（confluent），Caco-2 细胞可以从结构和功能上区分出来，类似于成熟的肠上皮细胞。Caco-2 表达一些转运系统，主要运输糖、氨基酸、胆汁酸和外源化学物质，Caco-2 细胞的渗透性和药物在人体内的吸收有着良好的相关性。

③ 与药物在体内转运的受体的作用具有相关性。Caco-2 细胞可以内源性地表达 P450 细胞色素同工酶，如 CYP1A1、CYP1A2、CYP2C8-19、CYP2E1、CYP3A5、CYP2D6 和 CYP3A4 等。例如 CYP3A4 在肠和肝中是主要的药物代谢酶，它的表达水平低于正常组织中的表达水平，这样在正常组织中不能正常表达。为克服这样的限制，已经诱导或者将 CYP3A4 转入 Caco-2 细胞中，建立 Caco-2/CYP3A4 模型，以研究在药物的代谢和排泄中耐药受体 P-糖蛋白（P-gp）和 CYP3A4 之间的关系。Schmiedlin[67]研究指出，用 CYP3A4 导入 Caco-2 细胞，以咪达唑仑（Midazolam，CYP3A4 的底物）药物代谢为模型，通过测定发现，

CYP3A4 蛋白的含量，是丁酸钠和纤溶酶活因子（TPA）诱导量的 40 倍，由此说明 Caco-2 细胞模型与肝脏的代谢酶 CYP3A4 表达密切相关。用同样的模型还研究了药物 K77 和西罗莫司（Sirolimus），它们都是 P-gp 和 CYP3A4 的共同底物。当 P-gp 有选择地被抑制剂 GF129018 作用时，发现二者的含量均有下降，显示在肠道中 P-gp 增高使药物对 CYP3A4 暴露，从而代替了通过扩散和主动流出的药物循环。选择性地抑制 P-gp，K77 代谢下降，显示在 Caco-2 细胞中，导入与体内药物转运相关的酶和肝脏的药物代谢密切相关，通过 CYP3A4/Caco-2 细胞模型，就可以研究药物肠道代谢和肝脏代谢的关系，了解体内代谢与体内转运之间的关系。这种有机的结合和联系，为研究药物肠道吸收和药物肝脏代谢的关系提供了有力的实验手段。

（2）Caco-2 细胞概述

① 模型的制备。Caco-2 细胞来源于人结肠腺癌细胞系，在培养过程中进行肠细胞分化，单细胞层是模型的基础。Caco-2 细胞接种在密度为每平方厘米 1×10^5 个细胞的六孔板上插入过滤器并培养 21 天使其分化。培养液的组成为：小牛血清、非必需氨基酸和含有抗生素的 DMEM 缓冲液（Dulbecco's modified Eagle's medium）。将 Caco-2 细胞放入 37℃的二氧化碳培养箱中，接种后第一周每天换一次培养液，一周后隔天更换一次。Caco-2 单层细胞的完整性和运输能力由经上皮细胞的电阻（TEER，transepithelial electrical resistance）来检测，采用上皮的电压电阻表来测定。通过以下公式来计算 $TEER=R_{total}A$，这里 R_{total} 表示测量的电阻，作为细胞和膜的考察数据；A 表示表面积。在每一个实验前，每一个孔的 TEER 的值都要被测定。在吸收实验中，TEER 值在 1000～1200Ω/cm^2。高 TEER 和低变化率说明 Caco-2 细胞可以用作吸收实验的条件，只有当单层细胞的电阻高于 500Ω/cm^2 时才可以用来作转运分析。分化的 Caco-2 细胞在第 3 天和第 14 天用有活性的碱性磷酸酶（为小肠表皮细胞标志性酶）作为分析工具，并在第 21 天用透射电子显微镜来判断细胞层的分化程度，检测细胞密度达到一定标准就可以用于正常建模。

② Caco-2 细胞测定药物吸收和转运的原理。药物的吸收，可以由跨细胞途径通过肠的上皮细胞来实现。如图 4.2-26 所示，药物由细胞扩散途径（A）通过肠上皮细胞是很微量的，因为这种情况只出现在两个肠上皮细胞之间的紧密连接处。因此，这条路径一般只限于小的亲水性分子。调节连接点可以提高这一途径的渗透性，为促进吸收提供了可能。药物跨细胞被动运输（B）或由特异性的载体从顶部运输到底部膜表面（C），被动运输的显著贡献是吸收全部有合适的分子量、电荷、亲油性和氢键的物质，例如具有合适生化性质的物质能够通过肠上皮的顶部和底部的血浆膜；与被动吸收相关的化合物性质相比，利用特异性载体转运系统的化合物倾向于亲水性并且是营养物和微量营养素，载体提高了底物（例如，葡萄糖、氨基酸和尿素）利用电化学梯度的跨膜运动；活化的载体可以通过各种能量-偶联机制产生跨膜梯度；而此电化学跨膜梯度则由普遍存在的 Na^+，K^+-ATP 酶产生的；二级活化转运是间接地利用 ATP 能量，初级活化转运在转运循环中直接利用

ATP，运输通过肠上皮细胞顶端膜化合物（D）。除此之外，肠道内的 P450 氧化酶例如 CYP3A4/5 酶，也可以转运进入循环（E）或分泌回到肠腔内（F），参与药物的修饰和代谢过程。而在另一方面，这种转运体也包括了与 ATP 连接的多种药物抑制蛋白，如 P-糖蛋白（P-gp）和多药耐药相关蛋白 MRP2，它起的作用与 ATP 型运输相反，其可能限制化合物的吸收，并将化合物运回肠腔内[68]。

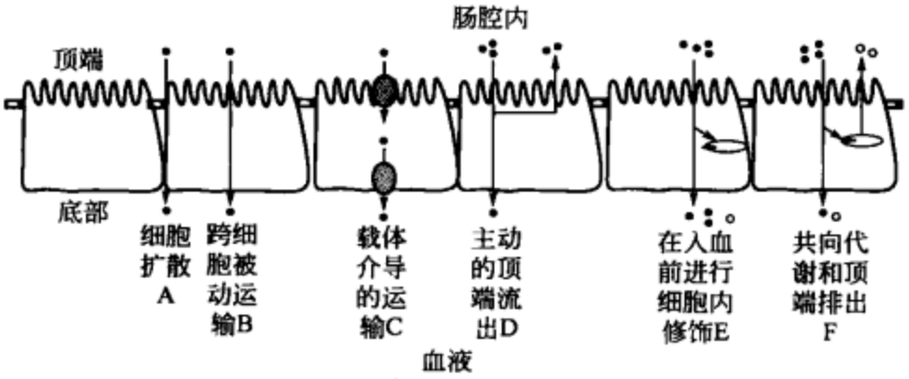


图 4.2-26　药物经肠道吸收的途径

由此说明，Caco-2 细胞在每一个位点的基本运输特点都与人体肠道是相似的，这就支持了假说——Caco-2 细胞对于药物的肠道吸收是一种有效的模型，也为多靶点药物的吸收提供了强有力的实验手段。

③ Caco-2 细胞测定药物吸收和转运的方法。如图 4.2-27 所示，接种一定密度的 Caco-2 细胞于特定的转运池（transwell）中，用预热的 HBSS（缓冲液）溶液冲洗 Caco-2 单层细胞两次后，当接收小室内含有相应体积的转运溶液时转运实验就可以开始了。药物的溶液首先由顶端（AP）或低端（BL）加入。在 37℃水浴中以 55r/min 的转速震荡 1h 后，样品就可以在 Caco-2 单层细胞的两侧收集。收集完毕后，立即冷冻，冻干并且在－20℃下保存，随后可以用 HPLC 进行分析。

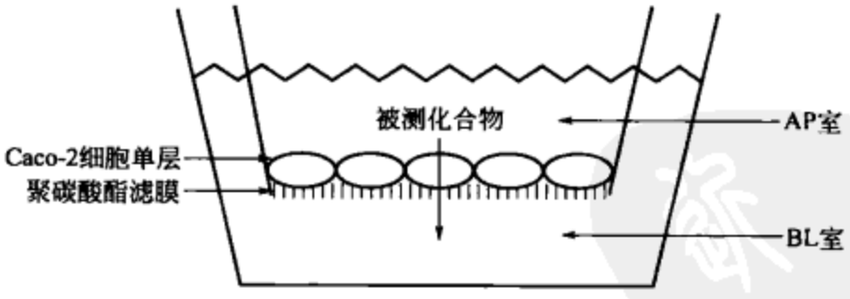


图 4.2-27　Caco-2 细胞测定药物吸收和转运的示意图

④ 测定指标和分析。P_{app}代表表观渗透性系数：

$$P_{app}=\frac{\Delta Q/\Delta t}{Ac_0}$$

$\Delta Q/\Delta t$ 是化合物在接受的一侧的线性表率，mm/s；A 是膜面积，cm^2；c_0 是初始浓度，mm/cm^3。$dQ/(dt\times A)$ 表示转运物质单位时间单位面积通过单层细胞的转运量。

典型的实验过程用 Caco-2 细胞是为了确定在吸收（P_{app}，A-B）和分泌



(P_{app}，B-A）方向上化合物的表观渗透性（P_{app}）。P_{app}，B-A 和 P_{app}，A-B 的比率（流出率）作为用来测量 P-gp 介导的流出活性效果的标准并预测口服吸收的衰减。目前，在 Caco-2 细胞单层吸收模型上，判定药物吸收难易的一般标准是：$P_{app}<1.0\times10^{-6}$ cm/s 为吸收不良的药物，吸收率在 0～20%；P_{app} 在 1×10^{-6}～10×10^{-6} cm/s 为吸收中等的药物，吸收率在 20%～70%；$P_{app}>10\times10^{-6}$ cm/s，为吸收良好的药物，吸收率在 70%～100%。然而，这个流出率可能不能量化在体内 P-gp 介导的流出活性是怎样削弱吸收的。Troutman 和 Thakker[69] 提出了新的实验参数，吸收系数（AQ）和分泌系数（SQ），这样就可以直接读出在两极化的上皮细胞中由 P-gp 介导的流出削弱吸收转运和增强分泌转运的数据。尽管 Caco-2 细胞是研究肠道吸收的有用系统，但要用于胆汁模型仍然需要进一步评估。

⑤ Caco-2 细胞模型缺点。细胞培养时间过长（21 天）；该模型本身为纯细胞系，缺乏小肠上皮细胞中的黏膜层；缺少细胞培养标准以及试验操作标准，使结果有时缺乏可比性；Caco-2 细胞来源于人结肠，因而该细胞的转运特性、酶的表达以及跨膜电阻相对更能反映结肠细胞而非小肠细胞；以及由人结肠腺癌细胞转化本质导致不可预知的鉴别标志物，这一点需要和其他的模型配合使用，弥补使用中的缺陷。

（3）MDCK 模型　目前通过分子生物学方法改造的 Madin-Darby 犬肾（Madin-Darby canine kidney，MDCK）细胞系为马丁达比犬肾上皮细胞培养的一种细胞间连接非常紧密的细胞系。上皮细胞单层模型是一个较先进的模型，即将肝细胞特有的有机阴离子运输多肽（organic anion transporting polypeptide，OATP2）药物吸收载体和广泛存在的多药耐药蛋白（multidrug resistance protein，MRP2）药物外流载体分别表达于 MDCK 细胞单层的两侧，构成一个研究化学物质经胆汁排泄能力的实验模型。其许多生理特性均与脑屏障（blood brain barrier，BBB）相似，因此，可利用 MDCK-MDR1 细胞作为肠道黏膜和 BBB 药物透过的快速筛选模型。细胞培养时间长，实验操作对细胞转运子表达水平影响很大是 Caco-2 细胞的两个突出的缺点，而 MDCK-MDR1 细胞则不存在这些问题，因此后者也被用于肠道模型。如图 4.2-28 所示，目前开发的 MDCK 模型较适合研究药物成分，及肠道菌生物转化产物和肝脏代谢产物经胆汁排泄以及在肾脏的重吸收及其代谢转化过程。通过模型中代谢物的检测分析，确定代谢产物与原形化学成分之间的定量关系，并结合毒性试验，确定有效和（或）有毒化学成分的性质，可以说，MDCK-MDR1 细胞是研究药物双向转运率、快速筛选、吸收转运机制、预测体内吸收和药物相互作用、新药设计说明及评价药物安全性的一个比较理想的体外模型。但是它也存在一些缺点和局限性，如 MDCK 为单细胞层，但转染后会出现多层细胞层的现象，虽然 P-gp 是在最上层细胞的顶侧表达，但是可能由于下层细胞极性的丢失，造成在进行 P-gp 介导的药物转运实验中，两室立体扩散系统（Transwell）无法提供可以解释的数据。而且，实验数据说明 MDCK-MDR1 细胞和 Caco-2 相比，后者可以更好地模拟体内环境，提供与体内药物吸收更相似的信息。Beumer[70] 关于抗癌药他比特啶（ET-743，Trabectedin）的研究显示，虽然 ET-743 是 P-gp 的

底物，但是却只有在 P-gp 达到很高的水平时才会对这种药物有外排作用，即在高表达 P-gp 的 MDCK-MDR1 细胞上进行实验时是外排的，但患者肿瘤细胞中的表达量只达到普通水平，所以对其外排也是有限的。尽管 MDCK-MDR1 细胞有上述缺点，但因为它用途广、作用大、培养周期短，因此是很有前景的实验模型，但需要在今后的实验中进一步完善和发展。

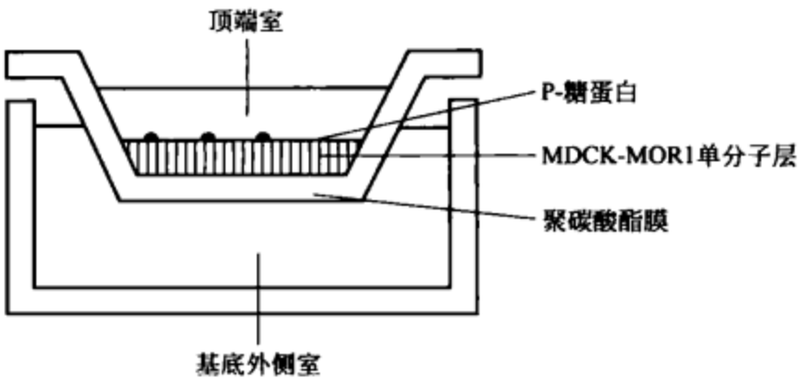


图 4.2-28　MDCK 模型示意图

综上所述，药物肠道代谢模型的广泛建立，对深入研究药物代谢、吸收、转运机制以及排泄，都提供了强有力的支持。但是由于药物的各种代谢物都存在于大量的生理样本液（血、尿、粪便、胆汁或缓冲液）中，其中药物的相对含量较低，有的甚至才有 0～1ng，而且多种代谢物组成了复杂的分离分析体系，这就需要借助于现代分析技术进行深入、细致和全面的分离分析。非常可喜的是，近年来多种现代分离分析技术在这一领域得到了广泛的应用和发展，这一点也为药物肠道菌的代谢研究提供了广阔的应用空间。

4.2.4　药物代谢的检测方法

近年来，一些定性和定量的分析技术已得到快速的发展，这些分析技术包括薄层色谱（TLC）、气相色谱（GC）、酶免疫（EIA）、高效液相色谱（HPLC）、核磁共振波谱分析以及各种联用技术（HPLC-MS、LC-MS、LC-ESI-MS、LC-ESI-MS-MS）和傅里叶变换离子回旋共振质谱仪（FT-ICR-MS）等，而结合这些现代检测、分离技术手段，利用多种肠道模型，进行肠道菌对多种药物代谢的研究正在兴起，以下以各种技术对人参皂苷的代谢物分析为例，具体介绍各种检测分析方法在肠道菌代谢物检测中的应用。

（1）薄层色谱扫描分析方法　在薄层板上展开后的样品在常光下、喷雾显色（有时需加热）后或在紫外灯、荧光灯下检视往往会呈现一定颜色的斑点，这样具有一定颜色的斑点或谱带，叫做薄层色谱（thin-layer chromatography，TLC），可用于化学物质的定性和定量分析。例如，Odani[71]和他的同事，发明了双波长薄层色谱，用来研究在大鼠体内人参皂苷 Rb1 和 Rg1 的吸收、分布、代谢和排泄，取得了良好的分离、检测效果。

（2）气相色谱分析　用气相色谱分析人参皂苷始于 20 世纪 80 年代初，但是分

离效率很低，人参皂苷 Rf 和 Rg1 在分析时峰形被叠加，气相色谱不能测定不同类型的人参皂苷和人参产物的混合物。因此，气相色谱很少用来分析人参皂苷。但是，气相-质谱联用（GC-MS）技术具有足够的灵敏性，可以检测并定量测定口服人参制剂和人尿液样本中的各种人参皂苷代谢物。通过检测发现，代谢产物 20（S）-原人参三醇的含量至少是 20（S）-原人参二醇浓度的 6 倍。由此可以推断，代谢产物在体内发挥主要的药理作用。

（3）酶免疫分析法（ELISA）　酶免疫分析和酶联免疫分析基本上同义，是用反应抗体或对抗抗原的抗体测量化合物浓度的生物检测方法。酶免疫的优势是抗体对抗原的特异性连接，这种方法测定特殊的化合物有更高的特异性，并且准确、快速、灵敏。例如，常采用酶免疫分析技术定量测定植物提取物和体液中人参皂苷的含量，其具体分析过程如下：采用鼠源人参皂苷单克隆抗体（MAbs）识别人参皂苷 Rb1、F1、Rf、Rg1 和 Rg2 及其代谢物，然后用 ELISA 法计算各种代谢物的含量。结果表明：虽然用 ELISA 测定总皂苷的含量与用 HPLC-UV 测定的结果相同，但 HPLC 的检测限为 20～400ng/ml，而用 ELISA 法的检测限为 50pg/ml～20ng/ml，与 HPLC 相比，ELISA 具有更高的检测灵敏度。

（4）高效液相色谱　高效液相色谱（high-performance liquid chromatography，HPLC）是在经典液相色谱法基础上发展起来的分析和分离技术。由于具有适用范围广、分析和分离效率高、灵敏度高、流动相选择性广、色谱柱可以反复使用、流出组分容易收集、室温下高压液体无爆炸危险等优点，因此是药学领域最常用的分析和分离技术。高效液相色谱可用于多种人参植物材料，以及各种人参代谢物检测（胃液，血浆/血清，尿样，排泄物）。这种分析方法往往与多种检测器联用，如紫外（UV）、蒸发光检测仪（ELSD）、荧光和质谱（MS）等，以此来提高其检测性能。

① 紫外检测。在检测人参皂苷的不同技术中，紫外检测是最常应用的技术。高效液相色谱-紫外联用也可以应用于生物分泌液和组织中人参皂苷的测定，但是由于人参皂苷的检测往往受短波长（200～205nm）的限制，因此紫外检测对于人参皂苷的检测灵敏度并不理想。

② 蒸发光检测仪（ELSD）。蒸发光检测仪的原理是由蒸汽（氮气）将色谱流出物雾化，蒸汽进入加热的有着溶剂蒸汽的管道，然后小液滴通过狭窄的光柱，扫描的光由光电倍增管收集。因为 ELSD 对非易失性的被测物有特殊反应，并可以产生一条稳定的基线，以此来获得对非易失性的被测物的检测的更好选择性，为此 HPLC-ELSD 通常比 HPLC-UV 更为灵敏。通常 ELSD 对人参皂苷的检测极限约为 50ng，而 UV 的检测极限约为 1050ng。

③ 质谱检测。随着多种质谱检测器的发展，包括电喷洒游离检测器（ESI）和大气压化学游离检测器（APCI），液相质谱（HPLC-MS）已经成功地应用到人参皂苷的各种代谢物的分析过程。质谱分析的灵敏度和特异性明显优于紫外检测和蒸发光检测。在各种质谱技术中，液质连用技术（HPLC-MS-MS）是人参皂苷的各种代谢物定量中最为灵敏的方法。HPLC-MS-MS 技术已被应用于研究人参皂苷

Rb1 在大鼠体内的代谢过程，研究结果发现：在静脉注射和口服 Rb1 后取样，利用 HPLC-MS-MS 技术，在大鼠尿液和粪便中共检出 9 种代谢物，其中包括 Rb1 的去糖基代谢产物（Rd、Rg3、F2、Rh2 或化合物 K），而这些代谢产物是利用 HPLC-MS-MS 联用检测技术首次发现的，由此推断，人参皂苷 Rb1 可能是通过这些代谢物来发挥正常的药理作用的，Rb1 可能是一种“前药”。

④ 串联质谱分析。许多新的质谱方法在灵敏性、选择性和分析的创新性上都有提高，特别是用串联质谱，如线性离子阱质谱（LTQ）、四极线性离子阱质谱（Q-trap）、四极时间飞行质谱（Q-TOF）、LTQ-傅立叶离子变换回旋加速器共鸣质谱（LTQ-FTICR-MS）和复合型电场轨道阱回旋共振质谱等为药物代谢物［酶、肠道菌各种代谢反应和谷胱甘肽（GSH）相关代谢物］提供了有力的分析工具，下面以谷胱甘肽（GSH）相关代谢物分析为例进行说明。

谷胱甘肽（GSH）是相关代谢产物主要的清除剂，并能够广泛作用相关的亲电物（包括喹啉、芳烃氧化物和醌类等）来形成 GSH 的加合物。在体内自然形成 GSH 的加合物是一个解毒的机制，但 GSH 耗尽可能会引起毒性。Takakusa[72] 最近报道了 10 种典型的化合物与 GSH 加合物形成的比例，这些化合物有不同的结构并且经历 CYP 生物活性转化，且在人和鼠的肝脏微粒体中和蛋白有共价连接。筛选 GSH 化合物的形成可以确定药物相关代谢物。药物候选或新的化学型药物通常依赖 GSH 抑制实验评价相关代谢物的形成。因此，在药物发现过程中要用快速、灵敏和有选择性的方法来测定和表征相关代谢物。而普通的质谱在分析中，特别是分析复杂的生物样品时通常出现假阳性的结果。为了克服这一缺点，用三重四极线性离子阱串联质谱来筛选和表征稳定的代谢物和 GSH 相关代谢物就取得了良好的效果。其机理在于在阴离子 m/z 272 模式下，检测 GSH 的加合物，将极性转换为阳离子模式来获取增强的产品光谱来进行代谢物结构分析，而且这种方法的分析效力已经被证明，可以用于多种类型代谢物的分析，包括对乙酰氨基酚、氯氮平、双氯芬酸、丙咪嗪、甲氯芬那酸、噻氯匹定等多种药物的代谢分析。例如，在人肝微粒体中加入 1mmol/L GSH 在 PIS m/z 272 阴离子模式下检测，检测发现：氯氮平有 7 个 GSH 阱反应代谢物，但是用传统的 129Da 的 CNLS 阳离子模式下只有 5 个代谢物。另外，在阴性 m/z 272 条件下没有假阳性的结果，但是在阳性的 129Da 的 CNLS 模式下，则发现有许多假阳性结果。而在另一方面，三重四极线性离子阱串联质谱的极性转换的方法也能够同时获取 GSH 加合物阳离子 MS/MS 光谱，其可以在单独的 LC-MS/MS 串联质谱的分析条件下提供碎片离子代谢物的信息。这个方法已经成功地应用到曲唑酮、阿米替林和去甲替林的新的代谢物检测，并已经发现多种新的代谢物。而采用谷胱甘肽乙酯作为诱捕剂，在 PIS m/z 300 阴离子模式下检测，联用 EPI 在阳离子模式下表征其结构，鉴定了 GSH-EE 的加合物。上述串联质谱分析方法比起单用阴（阳）离子模式扫描有更强的选择性和灵敏性，提高了 GSH 加合物的高通量筛选。图 4.2-29(a) 所示氯米帕明（Clomipramine）在人肝微粒体培养下形成的 GSH 加合物的分析结果：用传统的 307Da 的 CNLS 阳离子模式下检测，只发现两个小峰与 GSH 加合物 LM1 和 LM2 相关［如

图 4.2-29(b) 所示]；而采用三重四极线性离子阱串联质谱（MRM-EPI 方法）分析：清晰显示 LM1 和 LM2 处有强烈的峰，它的信噪比（S/N）的比率分别是传统的 307Da 的 CNLS 阳离子模式下检测的 13 倍和 24 倍［如图 4.2-29(c)、(d) 所示］[73]。

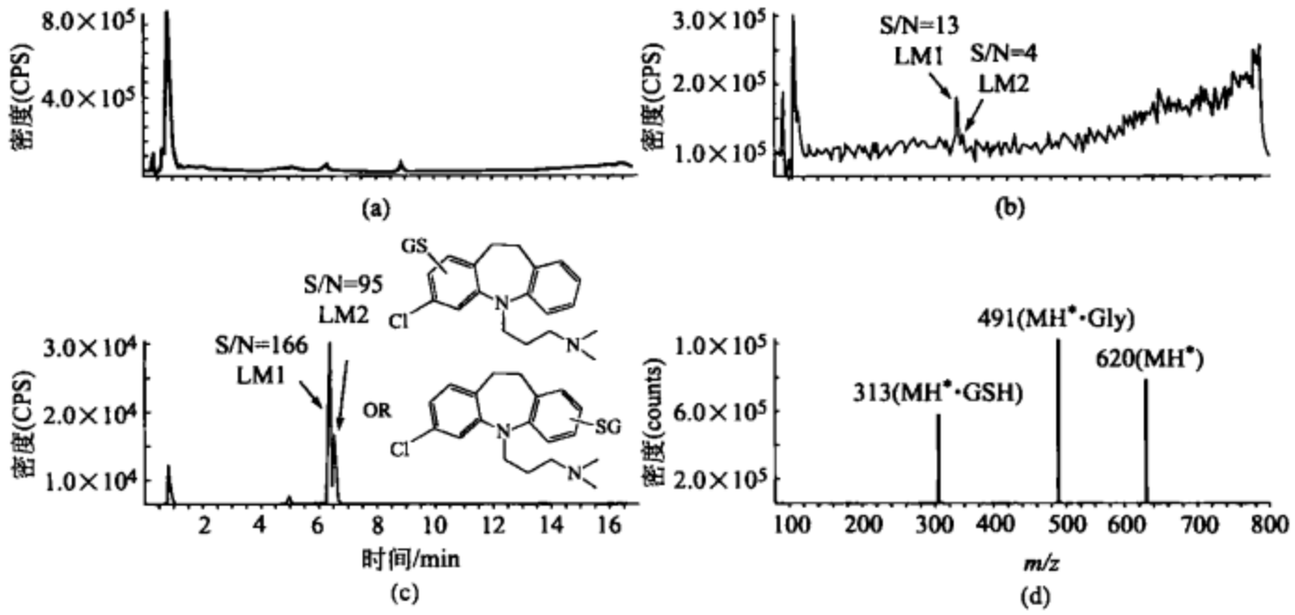
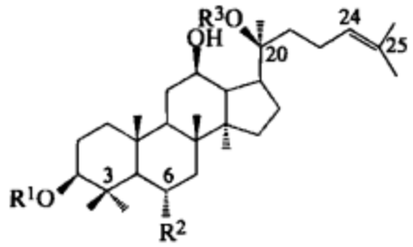


图 4.2-29　CNLS 和 MRM 对氯米帕明-GSH 加合物的分析

因此，新的分析方法提高了体内 GSH 加合物的定量的选择性。质谱联用技术的出现无疑加速了药物代谢的研究。

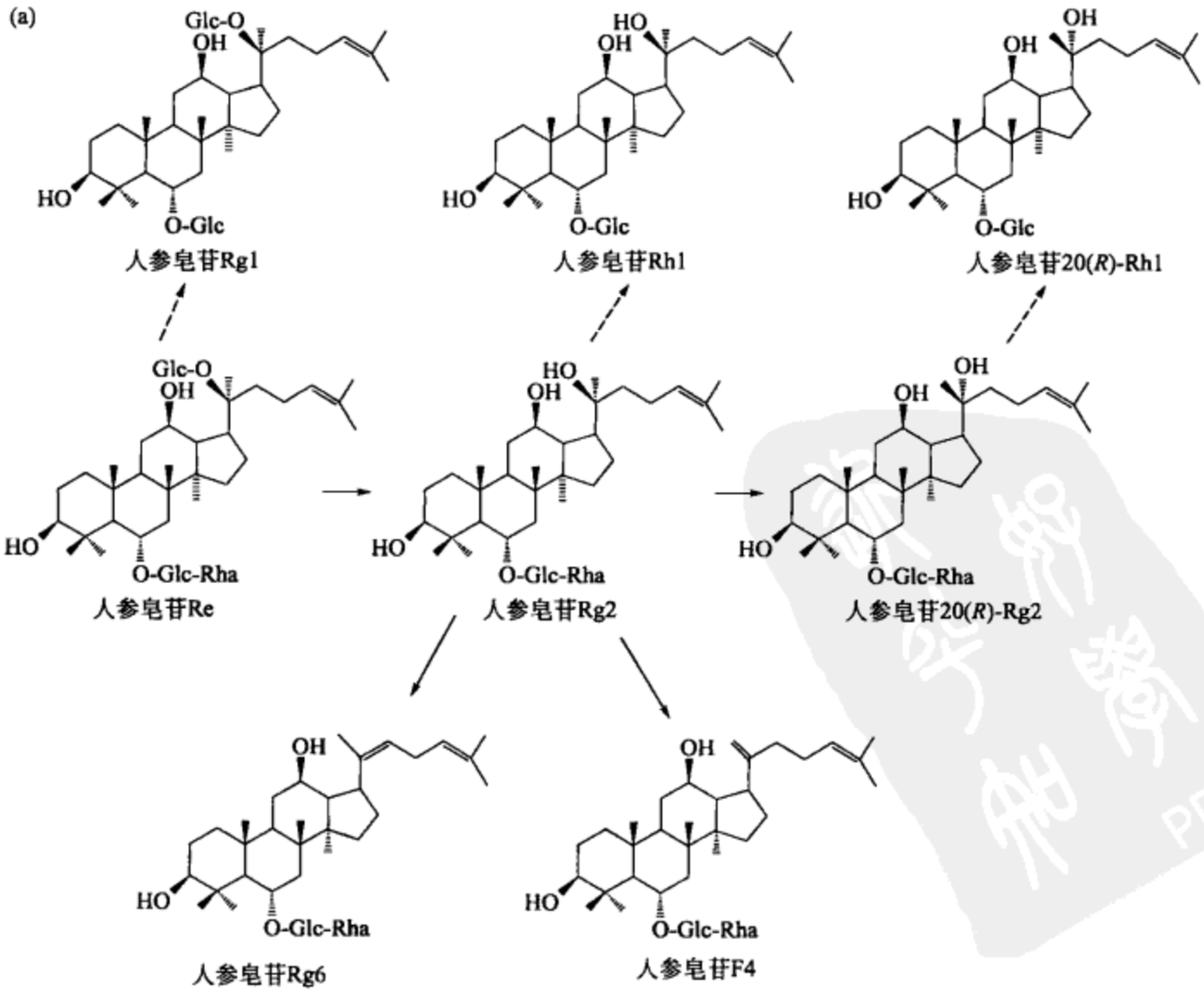
(5) 傅里叶变换离子回旋共振质谱　傅里叶变换离子回旋共振质谱法（Fourier transform ion cyclotron resonance Mass Spectrometry，FT-ICR-MS）具有非常高的析像能力，可以十分精确地测定物质。它的优点是很容易做到多级串联质谱分析，目前可分析质量范围已达 5 万左右，分辨力也可达 1 万。FTICR-MS 通常也被用来研究复杂的混合物，这是由于它所产生的分析图像具有较窄的峰宽，能够将两个质量相近的离子返回的信号（质荷比 m/z）区分开来。FTICR-MS 与其他质谱分析仪器最大的不同点在于，它不是用离子去撞击一个类似电子倍增器的感应装置，只是让离子从感应板附近经过，而且对于物质的测定也不像其他技术手段一样利用时空法，而是根据频率来进行测量。利用 FTICR-MS 检测时，离子会在给定的时空条件下被同时检测出来。这种质谱仪过去由于电离造成真空降低与回旋共振要求高真空条件相矛盾，性能不能过关。近年来由于分离电离源技术日趋成熟，这种分析方法得到较大发展。见表 4.2-2 所示，最近 Kong[74] 应用 FT-ICR-MS 质谱分离仪，一次性同时成功地分离、分析并鉴定了近 42 种人参皂苷代谢物（胃液解离产物、肠道转化物），而且通过对各种代谢物（胃液中降解和肠道菌的转化产物）的鉴定和综合分析，成功地推测了人参皂苷在体外模拟胃肠系统（TIM-2）的代谢路线，其在胃液中降解或肠道转化代谢过程如图 4.2-30 所示，以人参三醇皂苷（Rg1、Rf 和 Re）Re 为代表，其在酸性胃液中的代谢［图 4.2-30(a)］，可以通过脱糖基水解羟基反应或脱羟基反应转化为 Rg2，然后由 Rg2 进一步转化为 20 (*R*)-

表 4.2-2 人参皂苷胃液中降解和肠道菌转化产物



人参皂苷	R^1	R^2	R^3
原人参三醇类			
Rg1	—H	—O-Glc	—Glc
Re	—H	—O-Glc-Rha	—Glc
Rf	—H	—O-Glc-Glc	—H
原人参二醇类			
Rb1	—Glc-Glc	—H	—Glc-Glc
Rc	—Glc-Glc	—H	—Glc-Ara(f)
Rb2	—Glc-Glc	—H	—Glc-Ara(p)
Rb3*	—Glc-Glc	—H	—Glc-Xyl
Rd*	—Glc-Glc	—H	—Glc

注：Glc：葡萄糖；Rha：鼠李糖；Ara：阿拉伯糖；Xyl：木糖。



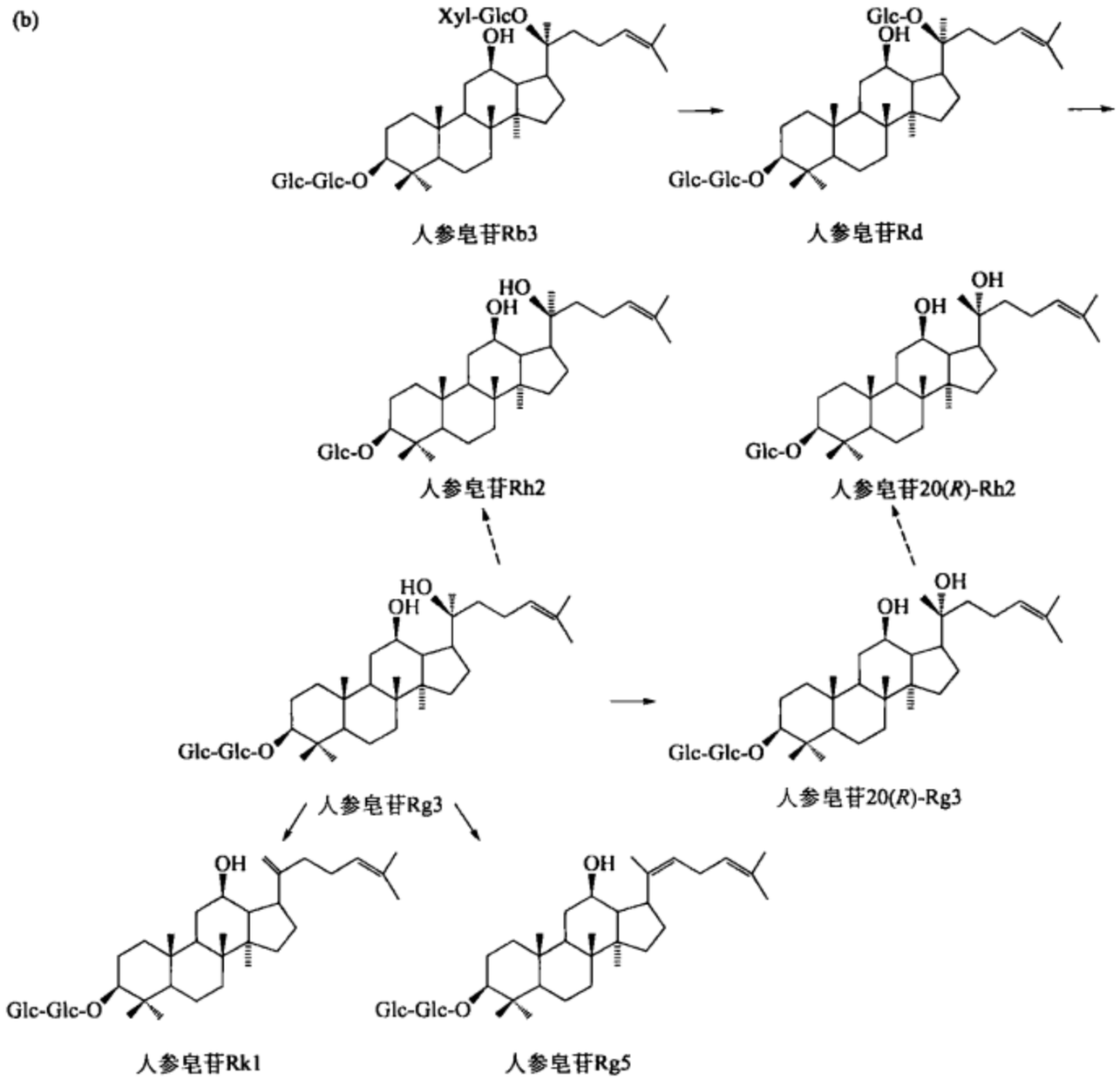


图 4.2-30　人参皂苷 Re（a）和 Rb3（b）在酸性条件下的生物转化路线

Rg2 或者通过脱羟基化转化为 F4 和 Rg6，而其中转化形成 Rg1 和 Rh1 的含量较少。与之类似，以人参二醇皂苷（Rb1、Rb2、Rb3、Rc 和 Rd）Rb3［如图 4.2-30（b）所示］为代表，其在酸性胃液中同样可以通过脱糖基水解、羟基反应或脱羟基反应转化为人参皂苷 Rd、Rg3、20(*R*)-Rg3、Rk1、Rg5 和微量的 Rh2 和 20(*R*)-Rh2。通过比较不难发现，两类人参皂苷在酸性胃液中的各种糖基化水解反应均发生 C20 位。与之截然不同的是，其在大肠部位经肠道菌转化，所发生的糖基化水解反应均发生在 C3 位，如图 4.2-31 所示，人参二醇糖苷（Rb1、Rb2、Rd 和 Rc）Rb2 先水解产生一个糖基生成化合物 O，然后再羟基化形成化合物 Y；与之相似，Rb1 通过脱糖基和羟化反应，由 F2 形成化合物 K，而 Rc 通过 Mb 和 Mc，形成化合物 K，Rb2 则经过化合物 O 和 Y，产生化合物 K。体外药理学实验证明，化合物 K 为多种人参皂苷的最终代谢产物，具有显著地抑制多种肿瘤增殖的作用。基于 HPLC-FT-ICR-MS 等多种分析技术的联用，有效地提高了对复杂代

谢体系的分离、分析效果。以人参皂苷的分离为例，通过对多种糖代谢产物，包括葡萄糖和阿拉伯糖（162.0528→132.0422）质谱峰的有效分离，阐明了在不同的代谢体系（胃液和肠道微生物转化）中，人参皂苷发生糖水解的不同位点，首次确定了 C20 位的水解反应发生在胃液的酸性环境中。而且，非常值得关注的是，随着多种质谱联用技术在各种人参皂苷代谢过程研究中的应用，越来越多分离代谢产物的鉴定（化合物 C～Y）陆续被揭示。为此，各种分离分析技术的发展和广泛的应用，必将为天然产物的代谢动力学研究提供强有力的技术支持。

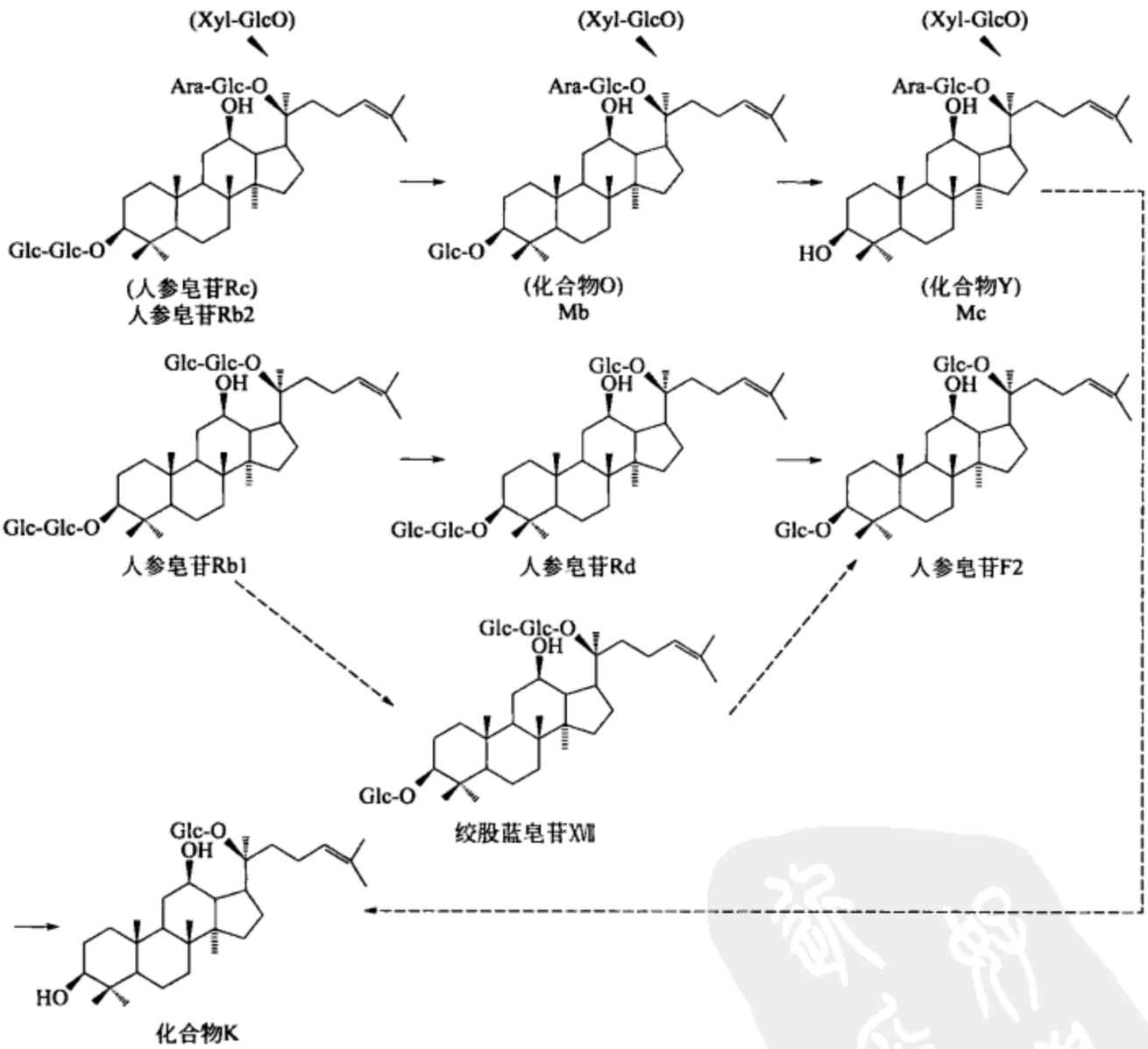


图 4.2-31　肠道细菌对原人参二醇的生物转化路线

4.3　肠道微生物对药物的转化在创新药物研究中的应用

微生物转化技术，又被称为绿色或天然的酶催化剂技术，已经广泛地应用在药物生物合成、药物特定位点的修饰及增效、减毒新药理活性的化学物质的发现等诸多方面。这种技术具有反应温和、设备简单、绿色、环保、价廉等特点。已有一些



学者注意到开展中药肠道菌微生物转化研究的巨大价值并付诸实践，并已经取得了较好的研究成果。与其他微生物催化的反应相比，肠道菌的反应独具特点：①立体选择性强、催化反应大多在厌氧条件下进行，肠道菌可以在有氧或无氧条件下进行各种催化反应；②各种酶作用强大，可以催化（各种糖苷键如O—糖苷、C—糖苷和多糖苷等）水解、甲基化、羟基化、去羟基化等多种反应，而且各种酶的定位作用强大，可以针对不同的结构产生特殊的新酶，转化不同的天然产物，其转化反应具有很强的特异性，可以完成中药多组分成分的转化反应；③肠道菌的转化反应是影响药物体内吸收、分布以及代谢作用至关重要的因素。从20世纪80年代起，国内外学者包括小桥恭一、难波恒雄、赤尾光昭和服部征雄、韩国柱、王本祥和杨秀伟等著名学者，就开始对各种天然药物进行肠道菌的转化或代谢研究，并取得巨大的进展。而对于天然药物（苷类、香豆素类、黄酮类、蒽醌类以及萜类）来说，肠道菌对这些产物的转化，独具特色，这种研究方法和技术已经成为天然药物药效基础、药物毒效关系、新药的发现、药物吸收机制、药物转运机制等方面研究中必不可少的手段，现将其综述如下。

4.3.1　肠道微生物的种类

从人和动物的胃肠道或粪便中可以分离得到大约60种细菌，其中99%是厌氧性的。这些细菌主要以畸形菌体和乳酸菌为主，这其中包括大肠杆菌、肠球菌、乳酸杆菌、梭状芽孢杆菌、畸形菌体和双歧杆菌等，而且随着现代微生物分离技术和分析检测技术的提高，已经发现肠道微生物可以直接参与各种天然药物的多种转化反应如水解、脱糖基、环裂开、脱羟基、脱甲基、氧化等，这些反应具有一定的专一性、选择性和多变性，与其他种类细菌参与的转化反应相比，具有自己独特的特点和优势。

4.3.2　肠道微生物的转化酶

肠道细菌可以产生各种代谢酶，主要有水解酶、氧化还原酶、裂解酶、转移酶等，其中各种水解酶尤为丰富，包括各种糖苷酶、α,β-糖苷酶、β-D-木糖酶、α-鼠李糖苷酶、α-葡萄糖醛酸苷酶和硫酸酯酶等多种酶，可以将药物中多种外源性的糖苷转化为相应的苷元和糖，如表4.3-1所示，由于其转化反应的特异性，出现了许多以天然产物命名的新的菌种，其中最突出的是番泻双歧杆菌（*Bifidobacterium* sp. Strain SEN）、甘草酸真杆菌（*Eubacterium* sp. GLH）、柴胡新双歧杆菌（*Bifidobacterium* sp. Saiko-1或*Bifidobacterium* sp. Saiko-2）。值得注意的是，大量的新菌种的出现以及多种特异的酶的作用（新型β-糖苷酶、3α-羟基甘草次酸脱氢酶、β-D-岩藻糖苷酶、甘草酸-β-D-葡萄糖醛酸苷酶和甘草次酸3-*O*-β-D-葡萄糖醛酸苷-β-D-葡萄糖醛苷酶等），促使多种天然产物发生了多种由特异肠道菌主导的生物转化或修饰作用，产生了多种发挥药理作用的真正的活性成分（吸收入血成分），由此充分说明，肠道菌的多种转化在药物的活化过程中发挥着至关重要的作用。

表 4.3-1 肠道微生物酶催化的生物转化反应

转化反应	微 生 物	酶
京尼平苷—苷元	真杆菌	新型 β-糖苷酶
番泻苷—苷元	番泻双歧杆菌	新型 β-糖苷酶
甘草酸—甘草次酸	瘤胃球菌	3β-羟化类固醇脱氢酶
甘草酸—3α-羟基甘草次酸	梭状芽孢杆菌	3α-羟基甘草次酸脱氢酶
甘草酸—甘草次酸 3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和甘草次酸	甘草酸真杆菌	甘草酸-β-D-葡萄糖醛酸苷酶、甘草次酸 3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷-β-D-葡萄糖醛苷酶
柴胡皂苷 a—柴胡次皂苷 F	柴胡新双歧杆菌 真杆菌	β-D-葡萄糖苷酶，β-D-岩藻糖苷酶 β-D-半乳糖苷酶

4.3.3 肠道微生物对药物转化的主要反应

4.3.3.1 糖苷类水解反应

中药在我国已经有近千年的使用历史，中药中大部分的化学成分不能直接被消化道吸收入血，而大多数中药则需要通过肠道菌的特殊代谢作用，包括转化、降解和合成等发生自身的结构变化，转化为具有药理活性的物质进入血液。例如，糖苷类化合物在天然药物中分布广泛，具有抗肿瘤、降血糖、降血脂、保肝、抗病毒、抗炎、抗过敏等多种药理作用，但是，由于皂苷类成分在肠道内难以吸收，生物利用度低，致使其在肠道内与肠道菌群作用滞留时间长，为此，其在体内以原形物显示药理活性的可能性较小，往往需要经过肠道菌代谢，生成苷元后发挥其药理作用，因此肠道菌的转化是其发挥药理活性作用的重要因素。与此同时，由于皂苷类药物代谢后产生的丰富的糖元，也可以作为细菌生长的能源并被充分利用，二者作用相辅相成。而皂苷类药物进入肠道后，需要通过肠道菌的水解，转化为具有药理活性或毒性变化的成分，进而发挥药理活性作用，为此皂苷类化合物又被称为“天然的前体药物”。研究多种糖苷（皂苷、黄酮、强心苷）的肠道菌水解反应，已经成为研究这类药物药效基础的有力工具。

（1）水解前体药物，直接产生发挥药理活性的成分　番泻叶苷（Sennosides）是中药番泻中具有泻下药理活性的主要成分。如图 4.3-1 所示，自 1984 年开始，Akao[75~78]等人采用人粪便对番泻叶苷的肠道菌代谢进行了深入的研究，提出了其可能的代谢途径。左风[79]等人采用双歧杆菌水解番泻叶苷产生番泻叶苷元，并且从另一方面证实，多种肠道菌株可使番泻叶苷元向大黄酸蒽酮转换，番泻叶苷元可以通过还原型黄素酶还原为大黄酸蒽酮。而番泻叶苷本身没有泻下作用，肠道细菌代谢产物大黄酸蒽酮具有泻下作用，番泻叶苷元是前体药物。

淫羊藿苷（Icariin）是小檗科淫羊藿属植物的主要有效成分之一，在心血管、免疫调节等方面有着广泛的生物活性。为了考察淫羊藿苷的药效基础，刘铁汉[80]采用离体培养方法研究人肠道细菌对淫羊藿苷的代谢作用，结果表明：肠道细菌对淫羊藿苷分子中的糖基发生了水解作用，肠道菌的转化产物为淫羊藿苷的苷元

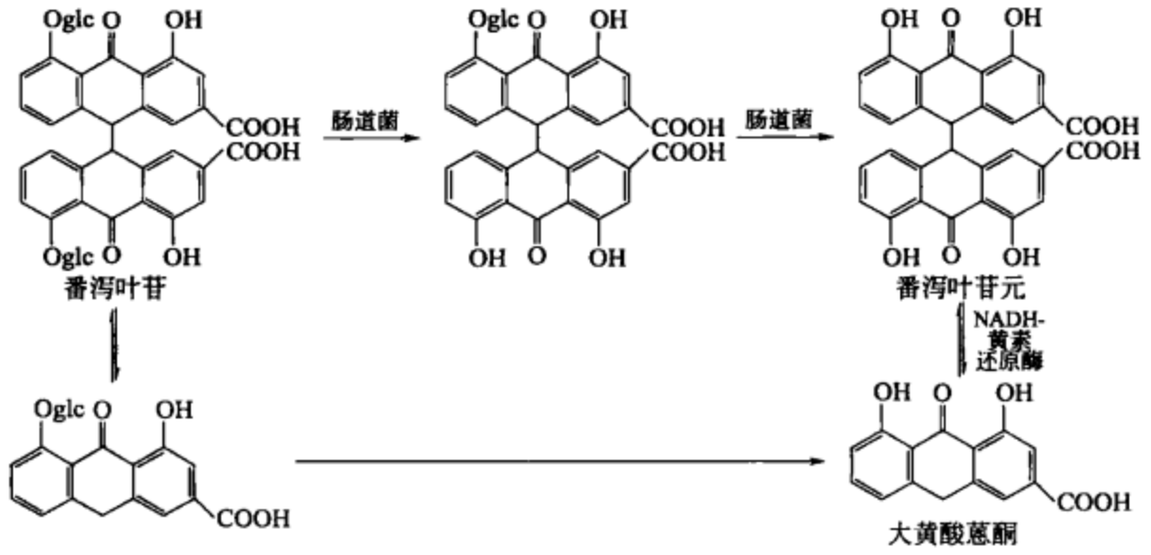


图 4.3-1　肠道菌代谢番泻叶苷的可能途径

(Icaritin) 及其苷元的异戊烯基位异构体。通过对大鼠的各种代谢物（包括粪便、尿液）的分析发现，主要代谢产物为宝藿苷Ⅰ。而在脂多糖（LPS）和佛波醇酯（PMA）的存在下，淫羊藿苷及其肠道菌代谢产物（宝藿苷Ⅰ和淫羊藿苷元）对白介素 6（IL-6）的产生有促进作用，与淫羊藿苷相比，其代谢物的作用更强，而且对白介素 8（IL-8）的产生也有一定的抑制作用。

宝藿苷Ⅰ可能是人肠道菌代谢后吸收入血并发挥药理活性的主要活性成分，而淫羊藿苷应为前体药物，淫羊藿苷被肠道菌代谢成为宝藿苷Ⅰ的可能途径如图 4.3-2所示。

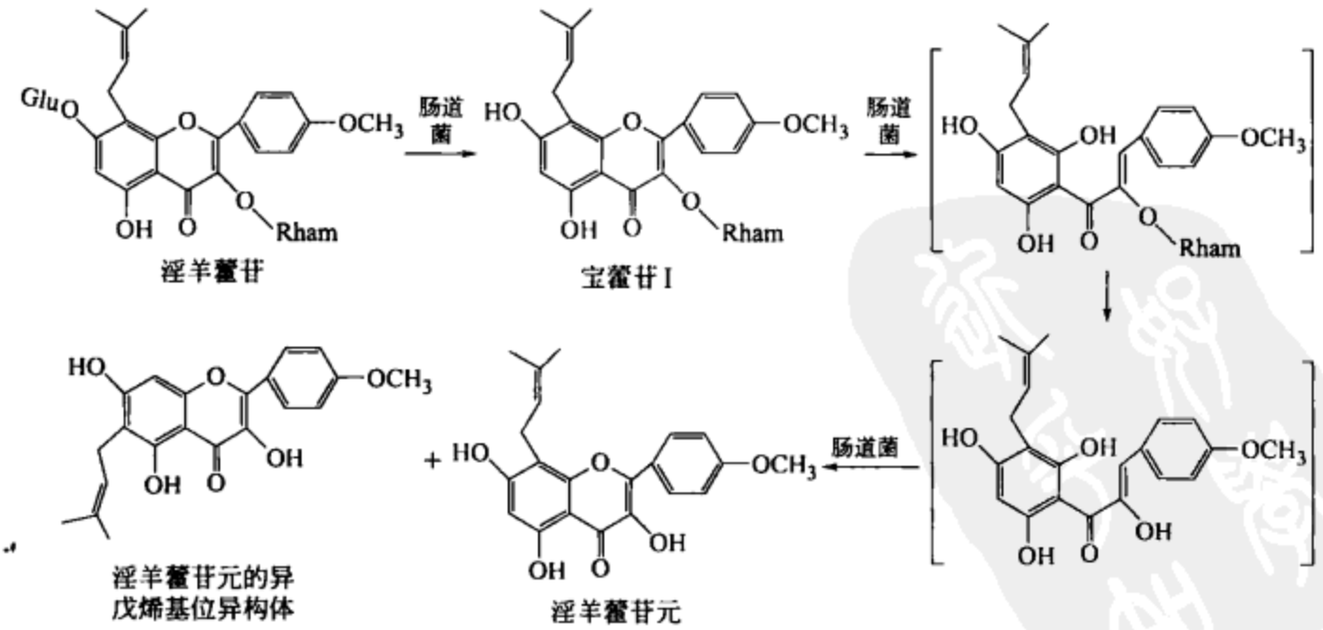


图 4.3-2　肠道菌代谢淫羊藿苷的可能途径

七叶树皂苷（Escins-Ia）为中华七叶树、天师栗和日本七叶树等种子中的三萜皂苷成分，具有抗肿瘤的作用。而七叶皂苷的原型口服生物利用度极低，仅为 0.198%。为探讨其生物利用度低的原因，见图 4.3-3 所示，杨秀伟[81]用短乳杆菌（*Lactobacillus* brevis Ⅱ-46）研究了人肠道细菌对七叶树皂苷-Ia 的代谢。结果表

明：无论是人肠道细菌混合粗酶还是作为人肠道厌氧性优势细菌之一的短乳杆菌粗酶，都能转化七叶树皂苷-Ia为异七叶树皂苷-Ia、去酰基七叶树皂苷-Ia（DAA）、21-β-O_2 巴豆酰基原七叶树皂苷元和原七叶树皂苷元。因此推断，七叶树皂苷-Ia原型药物生物利用度低的原因与肠道细菌代谢活化密切相关。七叶树皂苷-Ia经人肠道细菌转化为有抗肿瘤活性的去酰基七叶树皂苷-Ia，使其活性增强，生物利用度提高。为此，七叶树皂苷-Ia是“前药”，转化产物去酰基七叶树皂苷-Ia具有抗肿瘤活性，是其发挥抗肿瘤活性的物质基础。

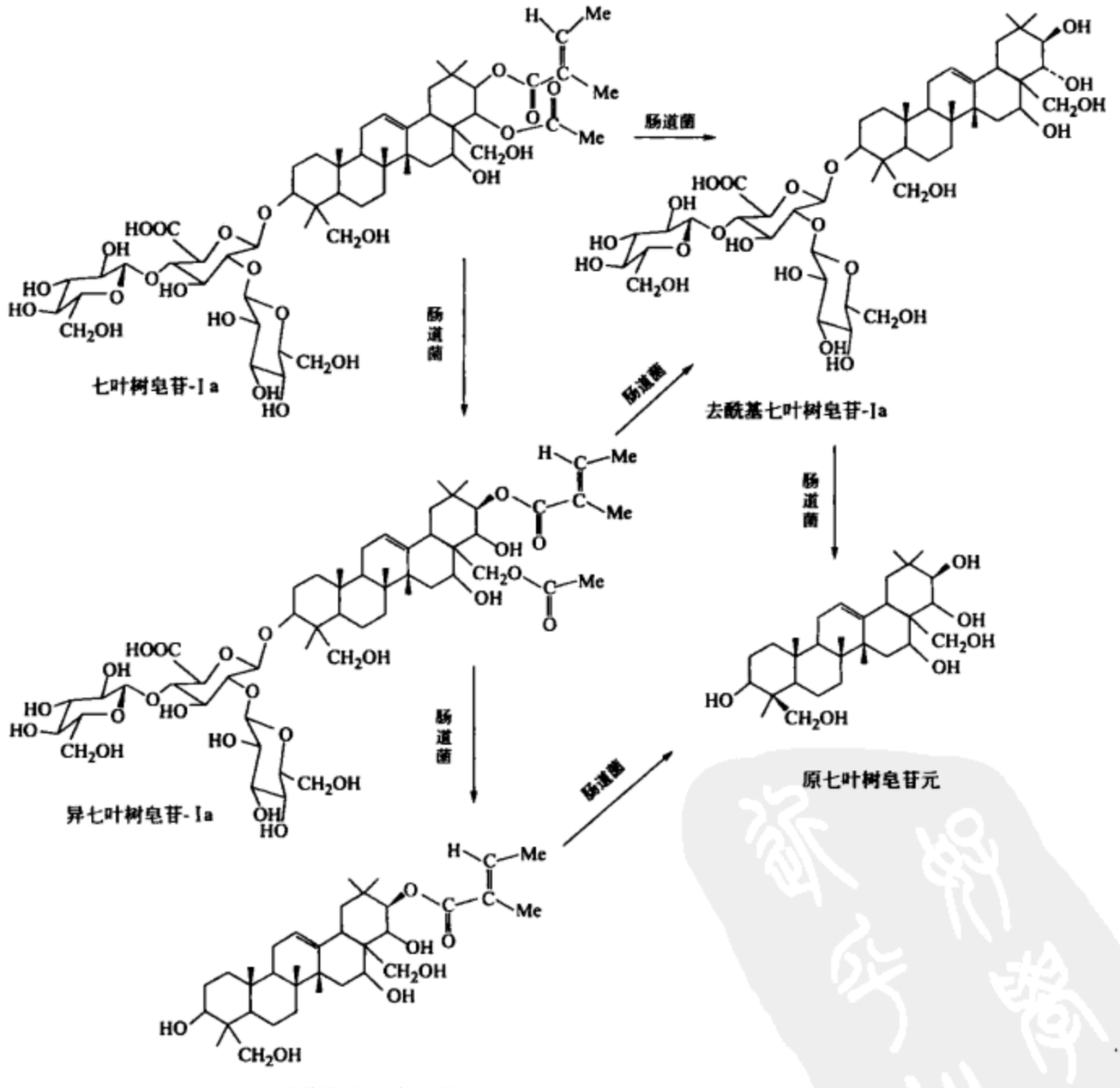


图 4.3-3　肠道菌转化七叶树皂苷-Ⅰa的途径

麦冬皂苷（Ophiopogonin）为中药麦冬治疗冠心病的主要有效成分，为了探索中药制剂中麦冬皂苷发挥药效的机制，沈岚[82]等通过大鼠肠道菌对麦冬皂苷 D′的离体、在体代谢进行转化，试验结果证明麦冬皂苷 D′在大鼠肠道菌作用下能被代谢成薯蓣皂苷元（diosgenin），如图 4.3-4 所示，推测麦冬皂苷 D′在消化道以其苷

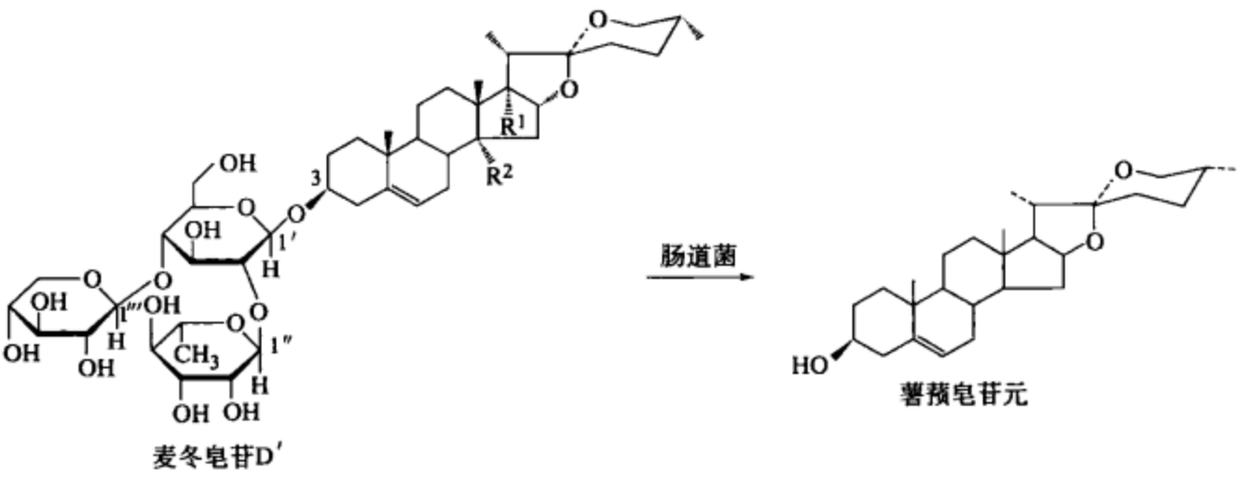


图 4.3-4　麦冬皂苷 D′的肠道菌转化途径

元的形式吸收入血来发挥其药理作用。

葛根素和大豆素是中药野葛［Pueraria lobata（Willd.）Ohwi］中的两种主要成分，其分别具有降低血糖、扩张冠脉血管的活性和解痉的药理活性。为了进一步探究二者的抗血栓和抗过敏活性，Choo[83]研究了口服和静脉注射两种给药方式下，其药理活性的变化。通过比较发现，口服后药物具有抑制 5-腺苷二磷酸二钠盐（ADP）、胶原蛋白所引起的血小板聚集的作用，动物体内血栓明显减少；与此同时，能够减少 β-氨基己糖苷酶的释放，抑制被动皮肤过敏反应，药理活性明显增强；而与此相反，药物静脉注射后活性明显减弱。由此推测肠道细菌的转化，在其抗血栓和抑制过敏反应中起到了重要的作用。葛根素为前药，其具体的转化反应如图 4.3-5 所示。

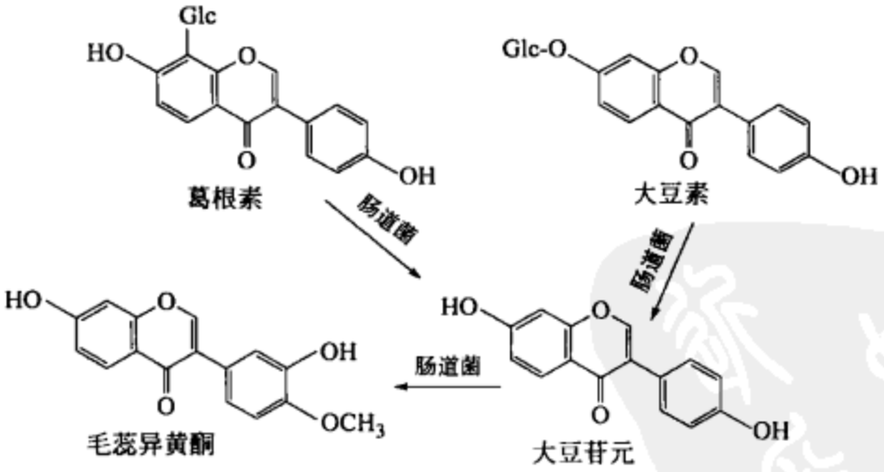


图 4.3-5　肠道菌代谢葛根皂苷的途径

鸢尾苷（Tectoridin）是从中药葛根花中分离出的有效成分，具有抗肿瘤、抗炎等功效，研究发现鸢尾苷的代谢和其抗过敏活性密切相关。Park[84]研究发现，大鼠口服鸢尾苷后，在其尿液代谢物中仅检测到鸢尾黄素（Tectorigenin），这一产物可能是鸢尾苷经过葡萄糖苷酶水解后的产物，而且这种代谢物可以减少 β-氨基己糖苷酶的释放，抑制 IgE 诱导的被动皮肤过敏反应，鸢尾苷水解后，其抗过敏活性明显增强。鸢尾苷可能是一种前药，具体转化路线如图 4.3-6 所示。

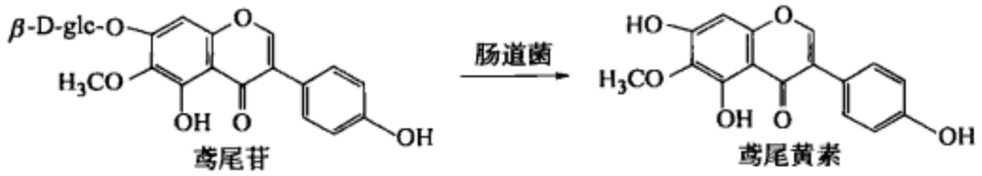


图 4.3-6 肠道菌代谢鸢尾苷的途径

栀子为《中国药典》收载的常用中药，系茜草科植物栀子（*Gardenia* jasminoides Ellis）的干燥成熟果实，而藏红花素（crocin）为其中的主要活性成分，具有泻火、清热、解热和镇痛等功效，随着研究的深入，发现其还有较好的降脂作用。为了探究其作用的机制和物质基础，Lee[85]研究了藏红花素和其肠道菌代谢物藏红花酸（Crocetin）的抗脂作用，结果发现，藏红花素和藏红花酸都具有抑制胰脂酶的活性（IC_{50}分别为 1mg/ml 和 2.6mg/ml），而且其能降低 TWR 诱导的小鼠高血脂水平（胆固醇、胆固醇和甘油三酯），且藏红花酸的诱导效应明显强于藏红花素，由此可见，肠道菌的水解作用增强了藏红花素的药理活性，藏红花酸则是其作用的药效基础。其化学结构见图 4.3-7 所示。

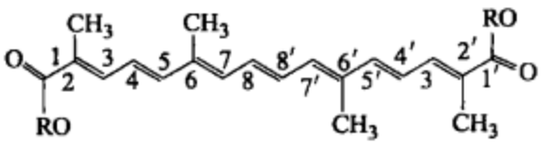


图 4.3-7 从山栀子中分离出的藏红花酸及藏红花素的结构

如图 4.3-8 所示，Chiisanoside（皂苷）是无梗五加（*Acanthopanax* sessiliforus Rupr. Et Maxim. seem）的主要皂苷类成分，为了探究皂苷和其肠道菌代谢物 Chiisanogenin（苷元）药理活性的变化及其机制，BAE[86]研究了 Chiisanoside 和人肠道细菌代谢物 Chiisanogenin 在细胞毒和抑制轮状病毒等药理活性方面的差异，结果发现，二者均能抑制 β-葡萄糖醛酸酶、幽门螺杆菌尿素酶抗原和幽门螺杆菌尿素酶的生长。与 Chiisanoside 相比，Chiisanogenin 具有显著地抑制轮状病毒和

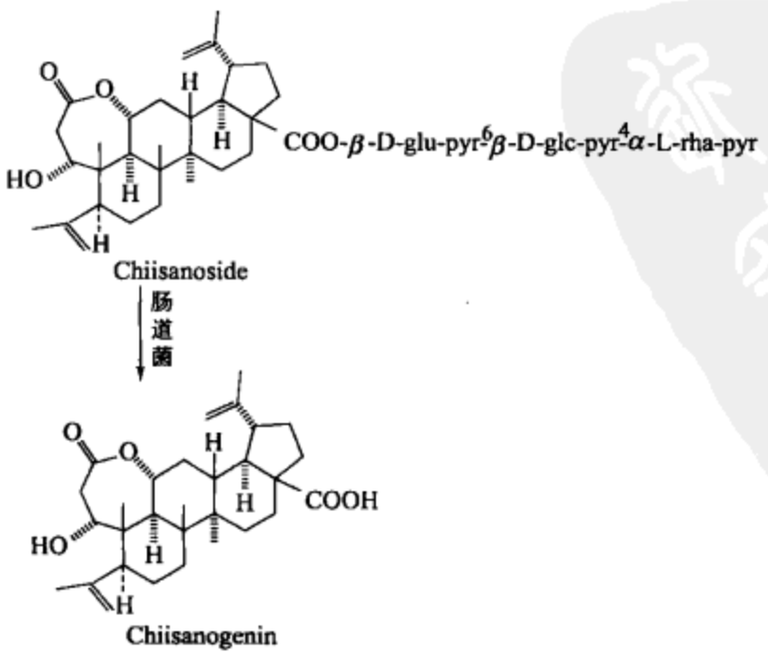


图 4.3-8 肠道菌代谢 Chiisanogenin 的途径

H1/K1-ATPase 分泌的作用，并通过分泌 H1 保护胃和十二指肠。体外的细胞毒试验也同时证实显示了较强的细胞毒作用，由此可以推断，随着肠道菌水解代谢 Chiisanoside 产生具有内酯环的产物 Chiisanogenin 的量的增加，其药理活性明显提升，随着代谢产物的新的药理活性（抑制轮状病毒、H1/K1-ATPase 分泌和细胞毒作用）的发现，可以推断 Chiisanoside 是前体药物，Chiisanogenin 则是其发挥药理活性的重要的物质基础。

（2）阶梯式的糖苷键水解反应，产生各级丰富的代谢物，协同发挥药理作用

积雪草皂苷（Asiaticoside）为五环三萜类皂苷，是伞形科植物积雪草［*Centella asiatica*（L.）Urb.］的主要活性成分，可刺激成纤维细胞的胶原合成，治疗创伤愈合、麻风病和溃疡等病症。但其口服生物利用度很低，为了寻找其生物利用度低的原因，并推测其药物作用的基础，如图 4.3-9 所示，翁骏[87]采用离体方法研究大鼠肠道菌群对积雪草皂苷的代谢作用，结果发现积雪草皂苷在肠道内的代谢呈阶梯式，糖基逐个被水解，直至全部转化为苷元。大鼠肝脏微粒体对积雪草皂苷及其苷元积雪草酸不产生代谢转化，代谢实验也同时证明，积雪草苷在大鼠体内经代谢后可产生 3 种代谢产物，部分原药和代谢产物均吸收入血，经尿液排出，三种代谢产物可能协同发挥药理作用。

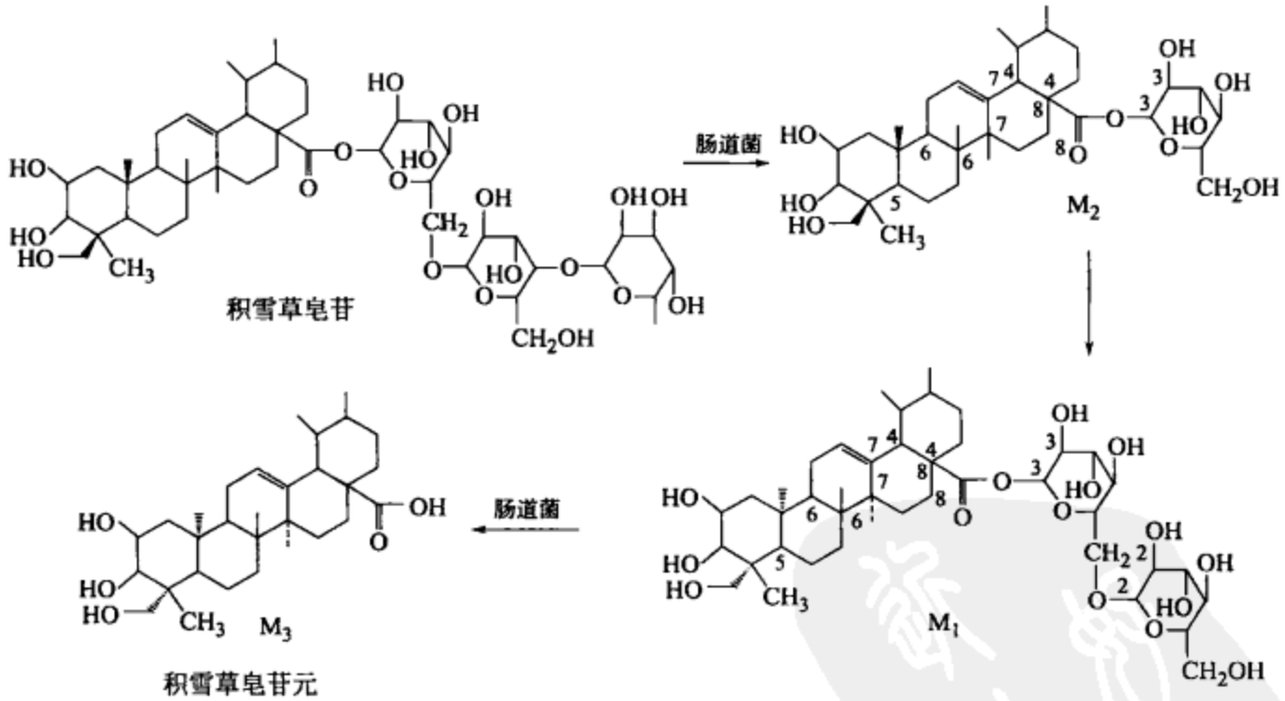
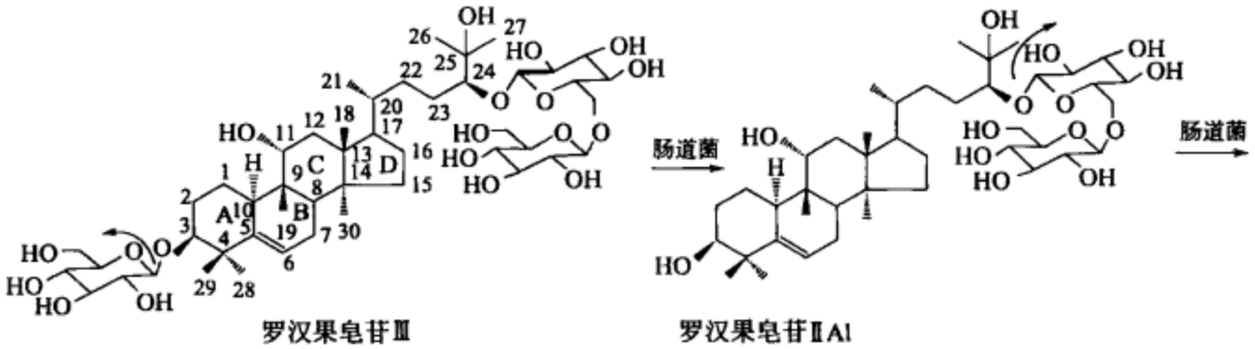


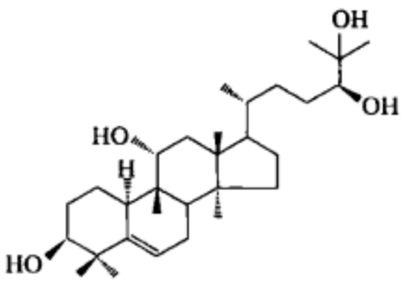
图 4.3-9　积雪草皂苷经大鼠肠道菌群的代谢途径

罗汉果为葫芦科植物罗汉果（*Momordica grosvenori* Swingle）的干燥成熟果实，罗汉果皂苷（mogroside）Ⅲ是其中主要的成分之一，该类成分有镇咳、祛痰、平喘、调节免疫功能、降低血糖、抗病毒和抑制肿瘤细胞生长等药理作用。为了探讨其生物活性的物质基础，如图 4.3-10 所示，杨秀伟[88]采用人肠道细菌与罗汉果皂苷Ⅲ在厌氧条件、37℃共温孵培养的方法对其结构进行生物转化，结果发现：罗汉果皂苷Ⅲ可由人肠道细菌依次脱去 C3 葡萄糖基和 C24 龙胆二糖基转化产生罗汉果皂苷Ⅱ A1 和罗汉果醇。生物活性研究表明，罗汉果醇对 TPA 诱导人类 B 淋巴

细胞株 Raji 细胞 EB 病毒早期抗原（EBV-EA）的形成具有明显的抑制作用，而当分子结构中结合糖基生成糖苷（如罗汉果皂苷Ⅰ A1、Ⅰ E1、Ⅱ E、Ⅲ、Ⅳ、Ⅳ E、Ⅴ和赛门苷Ⅰ）后活性大大降低，提示罗汉果皂苷Ⅲ在人体内产生的生物活性可能是由其生物转化产物罗汉果皂苷Ⅱ A1 和罗汉果醇共同作用的结果。罗汉果皂苷Ⅲ为前药，罗汉果皂苷Ⅱ A1 和罗汉果醇是其发挥药效作用的基础之一。



罗汉果皂苷Ⅲ　　罗汉果皂苷ⅡA1



罗汉果醇

图 4.3-10　人肠道菌代谢罗汉果皂苷Ⅲ的途径

最新的研究结果表明，罗汉果中另一主要成分山柰苷（kaempferitrin），口服后对四氧嘧啶性糖尿病大鼠有很好的降血糖作用。为了阐明其在人体内的代谢变化情况，杨秀伟[89]等人用离体培养的人的肠道细菌对其进行代谢研究，经硅胶柱色谱和薄层色谱法分离、纯化得到 4 个山柰苷的人肠道菌转化产物，通过光谱学鉴定为山柰酚 3-*O*-α-L-吡喃鼠李糖苷、山柰酚 7-*O*-α-L-吡喃鼠李糖苷、山柰酚和对羟基苯甲酸，并推测其代谢途径如图 4.3-11 所示，以此推测各级代谢物糖苷与其药理活性的发挥密切相关。

黄花倒水莲是中医常用药，具有滋阴润肺、益胃生津、清心除烦的功效。现代药理研究表明，黄花倒水莲治疗冠心病的主要有效成分是甾体皂苷。黄花倒水莲皂苷（Reinioside C）是麦冬中主要的甾体皂苷成分之一，为了进一步探究其代谢入血机制，张东明[90]研究了其在大鼠体内的代谢，结果发现，其在大肠中发生阶梯式的水解代谢反应，从其大肠内容物及其粪便中分离得到七个代谢产物，说明大肠为黄花倒水莲皂苷代谢的主要场所，并推测黄花倒水莲皂苷在体内多途径的代谢过程如图 4.3-12 所示，代谢后产生的各级次皂苷，可能是其活性成分，并共同发挥药理作用。

（3）肠道菌具有天然的“酶池”作用，能产生多种特异性酶，促进了多种新皂苷的形成，为皂苷类药物研究提供新的研究思路　Kim 等研究了人体肠道菌对一

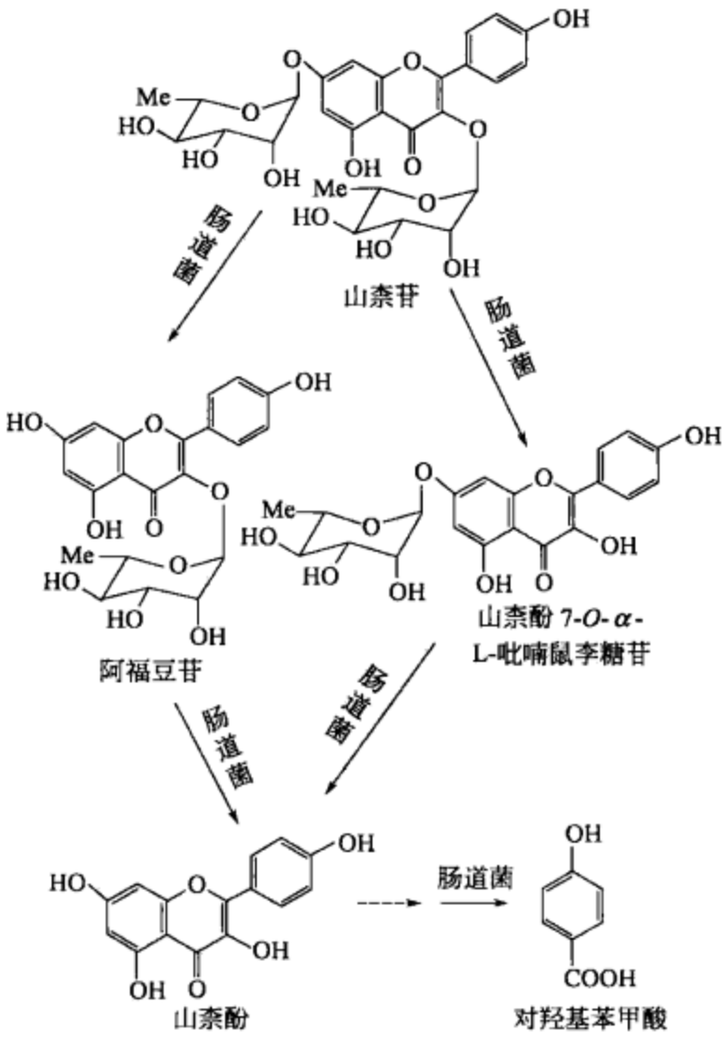


图 4.3-11　人肠道菌代谢山柰苷的途径

些天然产物，包括人参皂苷 Rb1、藏红花素、苦杏仁苷、栀子苷、葛根素、人参皂苷 Re、橙皮素、枸橼苷、甘草酸和黄芩苷的生物转化作用。研究发现，与原型产物比较，各种代谢产物具有较强的细胞毒作用和抑制肿瘤细胞生长的作用，通过对代谢物的结构分析，推测其中各种代谢酶，包括各种糖苷酶，如 β-糖苷酶、α-鼠李糖苷酶和 C-苷酶在各种代谢物的形成中发挥着重要的作用。其转化路线如图 4.3-13 所示。

随着对其催化机理的深入研究，一些新型 β-糖苷酶、3α-羟基甘草次酸脱氢酶、β-D-岩藻糖苷酶、甘草酸-β-D-葡萄糖醛酸苷酶和甘草次酸 3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷-β-D-葡萄糖醛苷酶、新型 C-苷酶的作用，也陆续被国内外学者揭示。如图 4.3-14 所示，日本著名学者小泉恭一（Akao）[91] 对甘草酸（glycyrrhizin，GL）及其苷元——甘草次酸（Glycyrrhetinic acid，GA）的肠道菌转化和其特殊的酶促作用进行了研究，发现人肠道菌对甘草皂苷的作用主要有 3 个途径：①甘草酸在甘草酸真杆菌和瘤胃球菌（*Ruminococcus* sp. PO1-3）的 β-葡萄糖苷酸酶的作用下代谢生成甘草次酸；②甘草次酸在瘤胃球菌的 3β-羟基类固醇脱氢酶（3β-HSD）作用下生成 3-酮甘草次酸，再在无害芽孢梭菌（*Clostridium* limosum ES24-06）的 3α-羟基甘草次酸脱氢酶的作用下，产生 3α-羟基甘草次酸；③3-葡萄糖醛酸甘草次酸（GAMG）

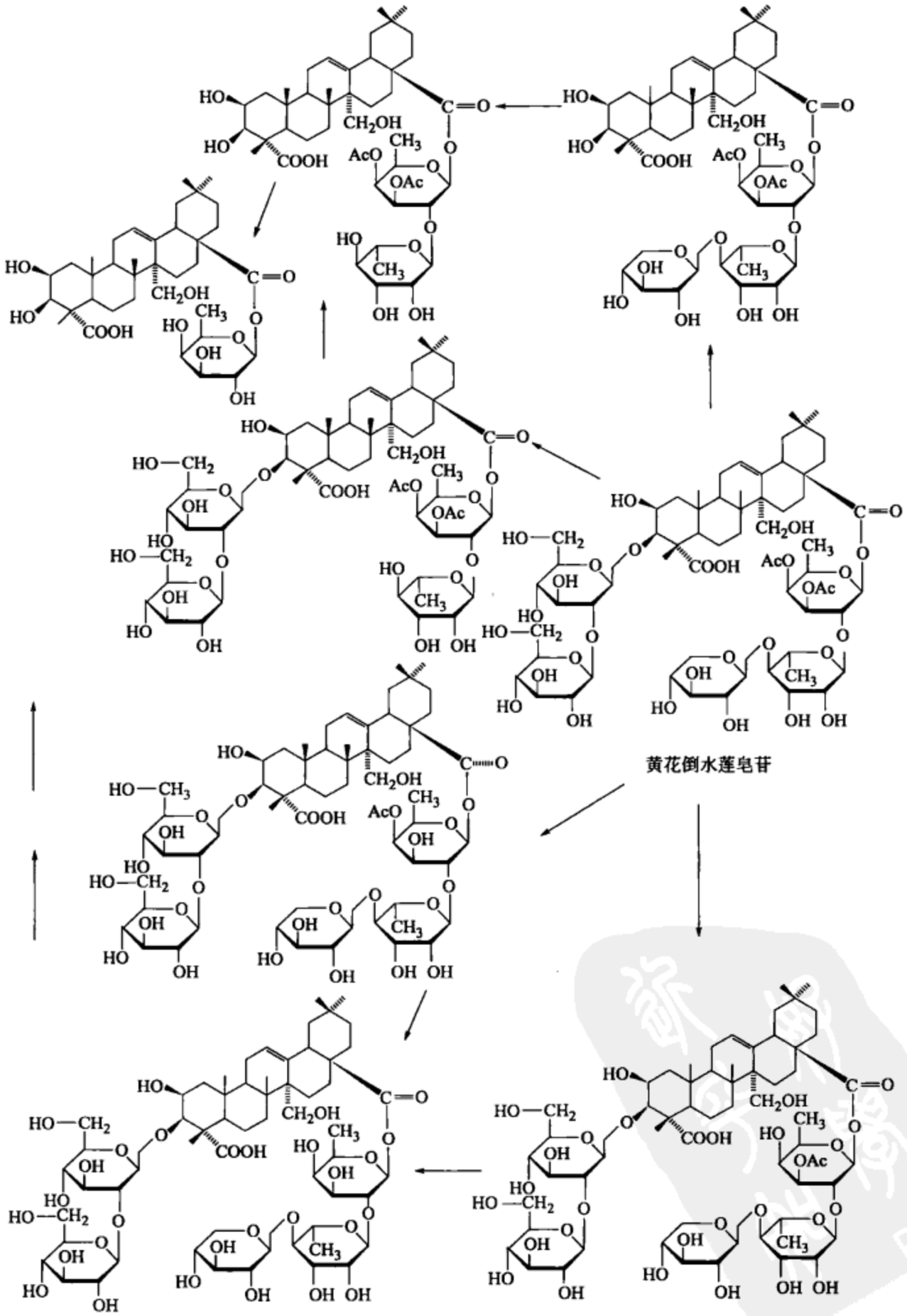


图 4.3-12　人肠道菌转化黄花倒水莲皂苷的可能途径

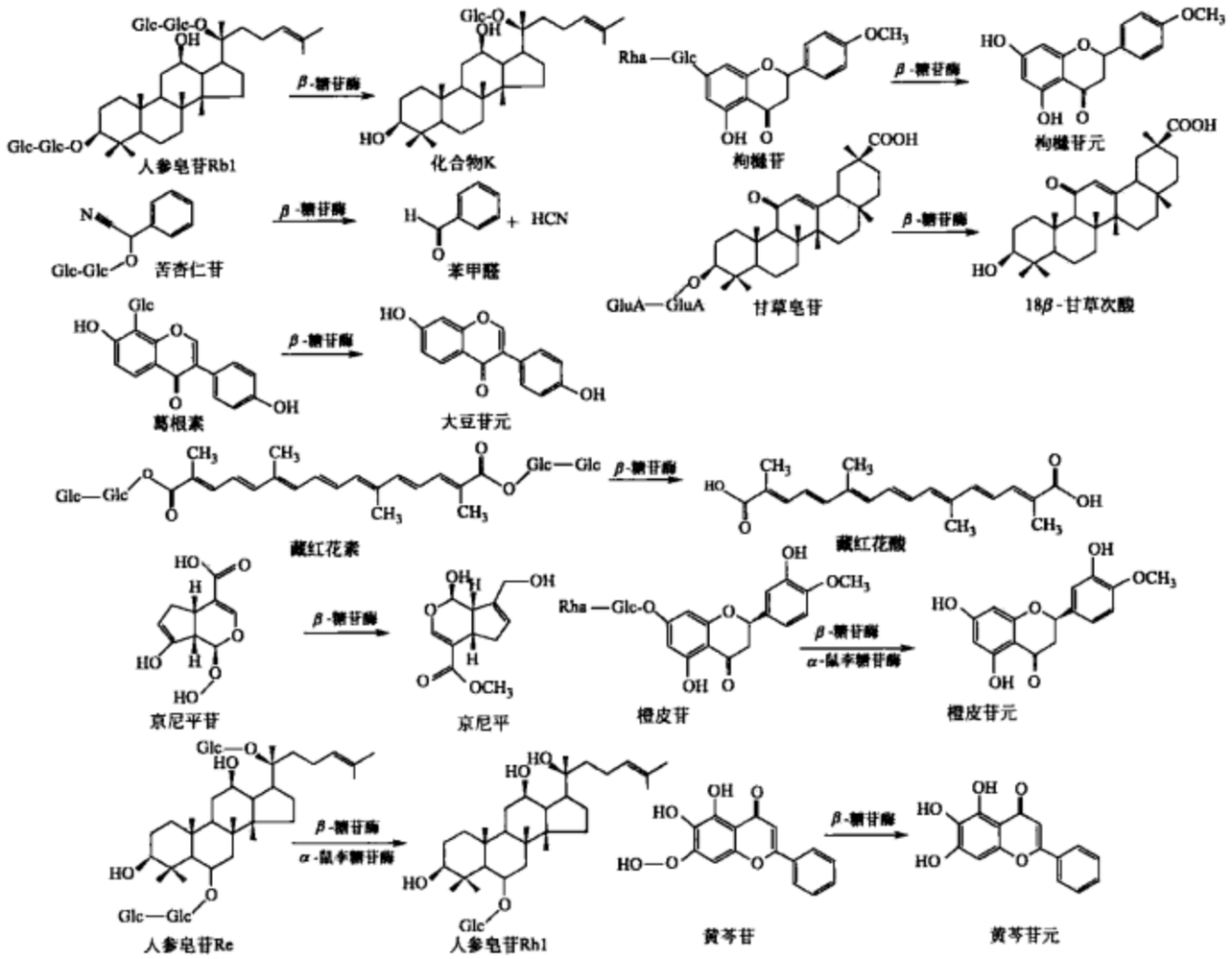


图 4.3-13　肠道菌代谢各种天然产物的路线和催化酶

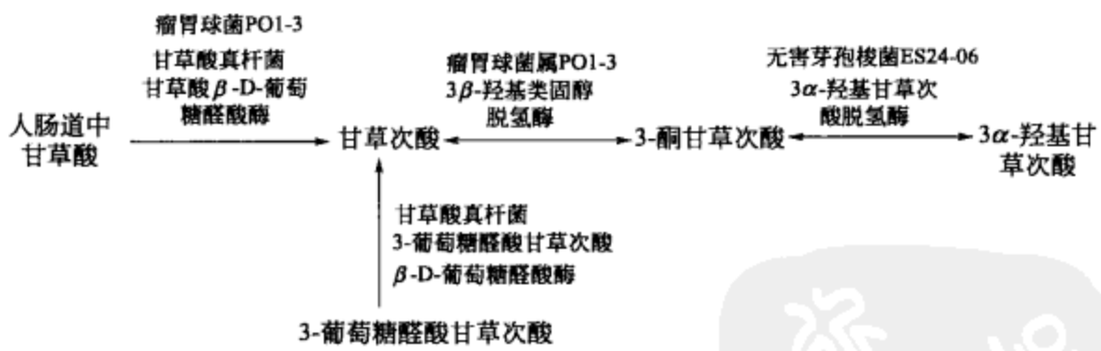


图 4.3-14　甘草酸在人体肠道中的代谢方式

在甘草酸真杆菌的 3-葡萄糖醛酸甘草次酸-β-D-葡萄糖醛酸酶的作用下生成 3α-羟基甘草次酸。其中代谢途径①为甘草酸的主要代谢途径作用，甘草酸真杆菌所产生的-β-D-葡萄糖醛酸酶催化甘草酸代谢为甘草次酸；而③为次要途径，甘草酸真杆菌所产生的 3-葡萄糖醛酸甘草次酸-β-D-葡萄糖醛酸酶催化 3-葡萄糖醛酸甘草酸代谢为甘草次酸。由此可见，如图 4.3-15 所示，甘草酸真杆菌在甘草酸、3-葡萄糖醛酸甘草次酸的代谢过程中起到主要作用，β-D-葡萄糖醛酸酶和 3-葡萄糖醛酸甘草次酸-β-D-葡萄糖醛酸酶的特异作用催化了甘草酸和 3-葡萄糖醛酸甘草次酸的肠代谢过程，甘草次酸可能是代谢后吸收入血的主要成分，是甘草酸发挥药效作用的基础成分。

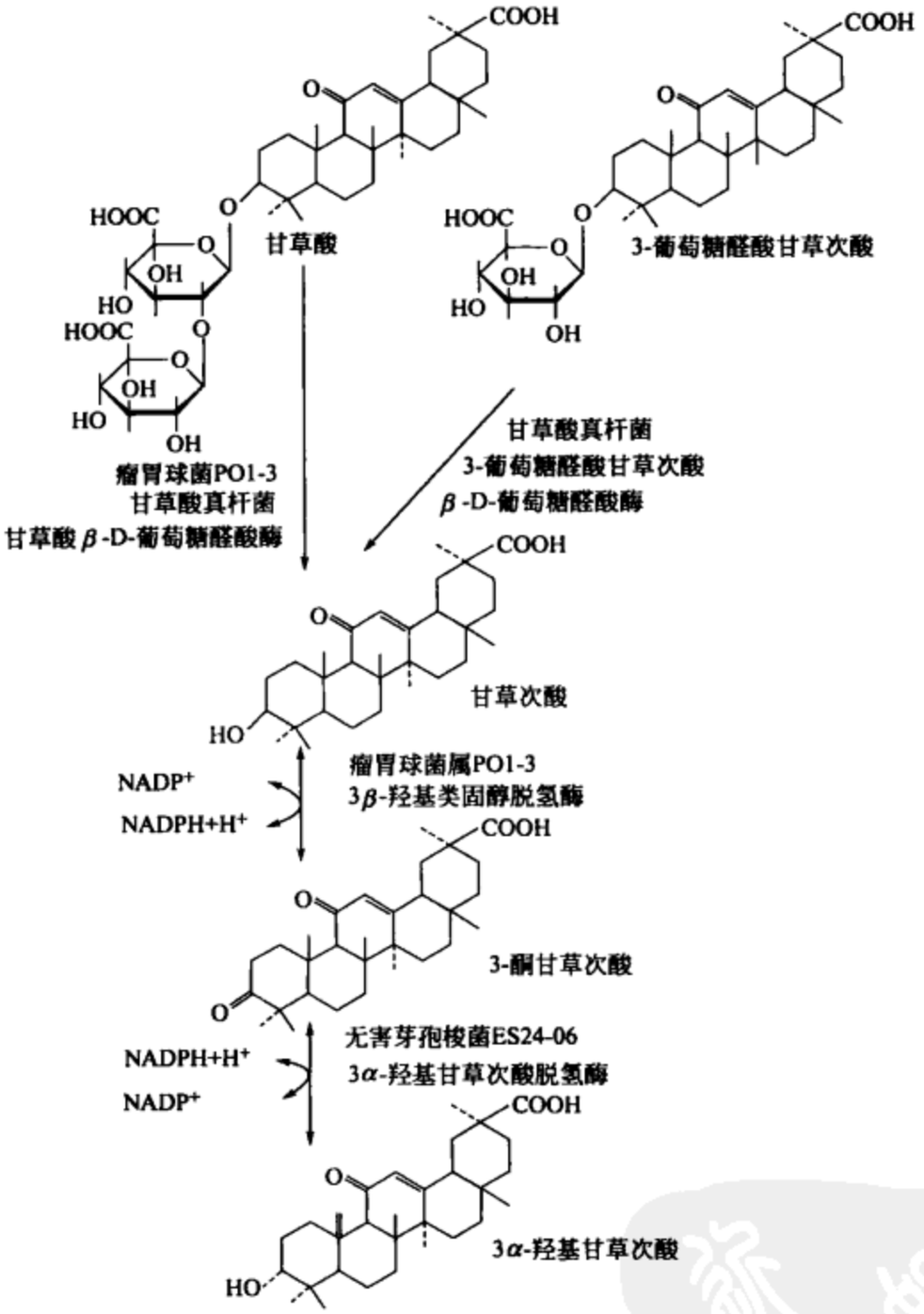


图 4.3-15　肠道菌代谢甘草酸的途径

柴胡皂苷（Saikosapion）a、b1、b2 和 d 是中药柴胡（*B. scorzoneri folium* Willd. 和 *B. chinense* DC. 的干燥根）主要的药用成分，如图 4.3-16 和图 4.3-17 所示，Shimizu K[92]研究证明从人粪便中分离并经鉴定的 31 株菌经筛选后，仅柴胡新双歧杆菌和真杆菌（*Eubacterium* sp. A-44）能将柴胡皂苷 a、b1、b2 和 d 依次水解成相应的前柴胡皂苷元 F、A、D 和 G，其中真杆菌 A-44 能将前柴胡苷元 F 和 A 进一步转化为相应的柴胡苷元 A 和 F，而该菌不能代谢柴胡皂苷 C 和前柴胡苷元 D 和 G，真杆菌 A-44 显示了较强的 β-D-葡萄糖苷酶和 β-D-岩藻糖苷酶的活性，其中 β-D-葡萄糖苷酶（SHGase）具有水解柴胡皂苷活性，而 β-D-岩藻糖苷酶（PHFase）具有水解前柴胡苷元的活性。

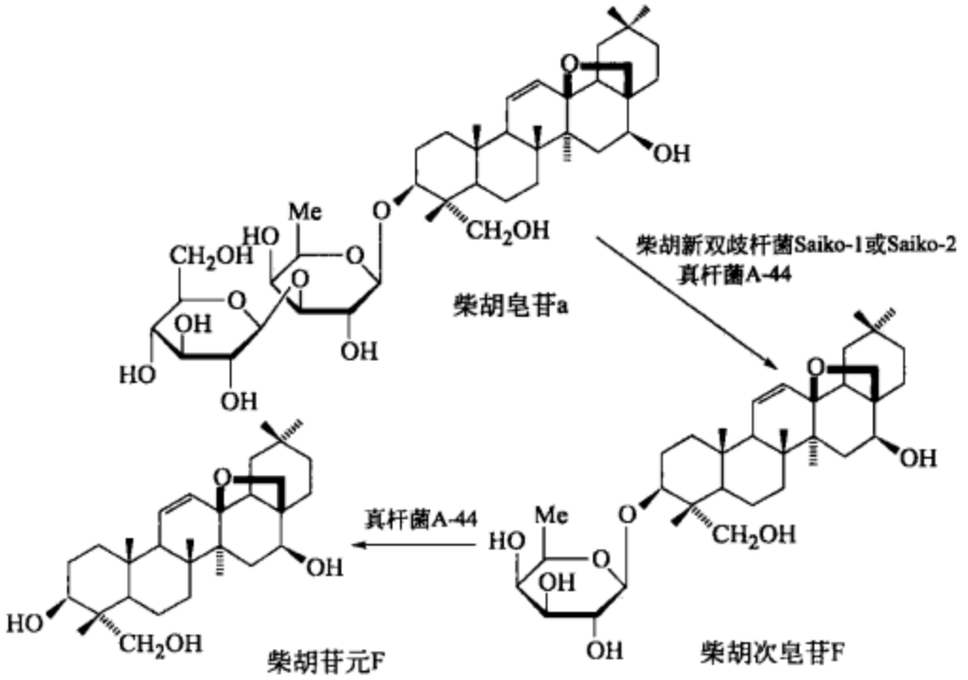


图 4.3-16　柴胡皂苷 a 的人肠道细菌转化途径

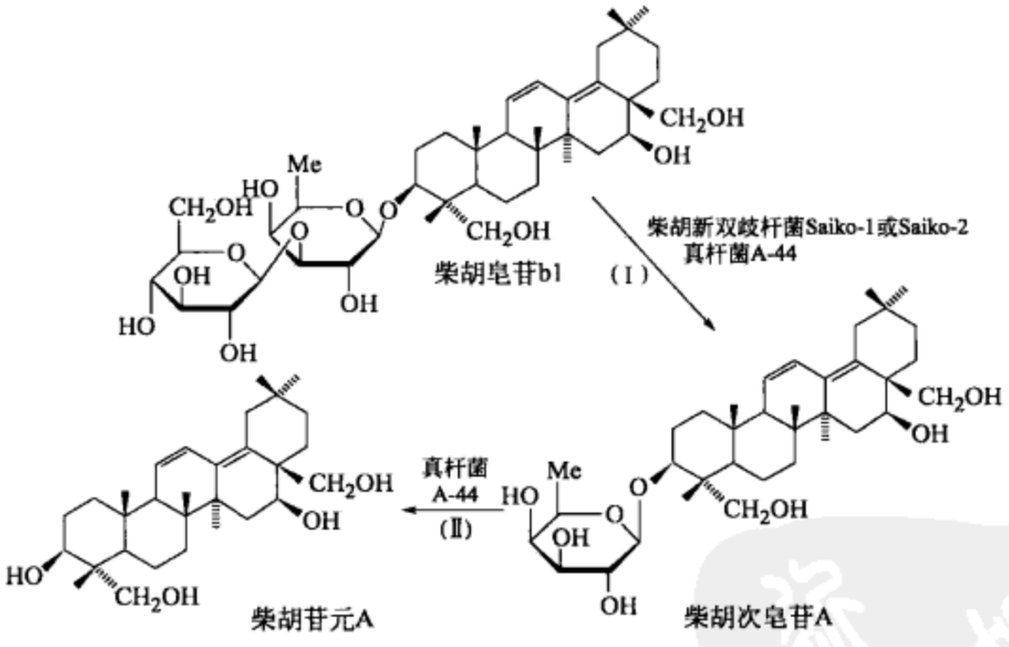


图 4.3-17　柴胡皂苷 b1 的人肠道细菌转化途径

三种肠道细菌均可将柴胡皂苷 a 转化为柴胡次皂苷（prosaikogenin）F 和柴胡皂苷元（saikogenin）F，其中双歧杆菌 Saiko-1 和双歧杆菌 Saiko-2 以及真杆菌 A-44 都能水解柴胡皂苷 a。对于柴胡皂苷 b1 来说，仅能被真杆菌 A-44 转化为柴胡次皂苷 A 和柴胡苷元 A，双歧杆菌 Saiko-1 和双歧杆菌 Saiko-2 仅能转化柴胡皂苷 b1 至柴胡次皂苷 A，不能转化至柴胡苷元 A，见图 4.3-17。由于新双歧杆菌 Saiko-1 或 Saiko-2 和真杆菌二者所含酶的种类和活力的不同，直接影响了柴胡的代谢，产生了不同的柴胡次皂苷或柴胡皂苷元产物。针对新双歧杆菌 Saiko-1 或 Saiko-2 对柴胡皂苷代谢过程的选择性和特殊作用，在国际命名的双歧杆菌微生物中，首次出现了以中药柴胡的名称为命名依据的新柴胡双歧杆菌（*Bifidobacterium* sp. Saiko-1 或 Saiko-2）。由此可见，新型肠道菌和其产生的各种新酶在药物的代谢研究中必将发挥重要的作用。

（4）肠道菌对C-苷键皂苷的水解，促进了皂苷类成分的吸收，产生新的活性产物　如图4.3-18所示，中药成分中尚有一类特殊的成分，称为碳苷。这类成分的糖以碳-碳键形式与苷元相连，是一类很难被酸水解的糖苷，虽然过去针对葛根素、芦荟苷（barbaloin）的碳苷键水解做了一些工作，但是转化率较低。如图4.3-19所示，Jin[93]从人新鲜粪便中分离出两种单一的新种肠道菌——PUE和DUE，提高了C-糖苷的转化和代谢的效果。通过PUE（A）(Genbank序列号no. EU377662）系统进化树分析，显示其与活泼瘤胃球菌［*Ruminococcus* gnavus Moore（X94967)］和*Dorsa longicatena* Taras（AJ132842）具有92%的同源性，而DZE（B）显示与*Slackia faecicanis* sp. Lawson CCUG 48399（AJ608686)、*Slackia exigua* Poco和*Slackia heliotrinireducens* Lanigan（AF101241）分别有89%、88%和87%的同源性。

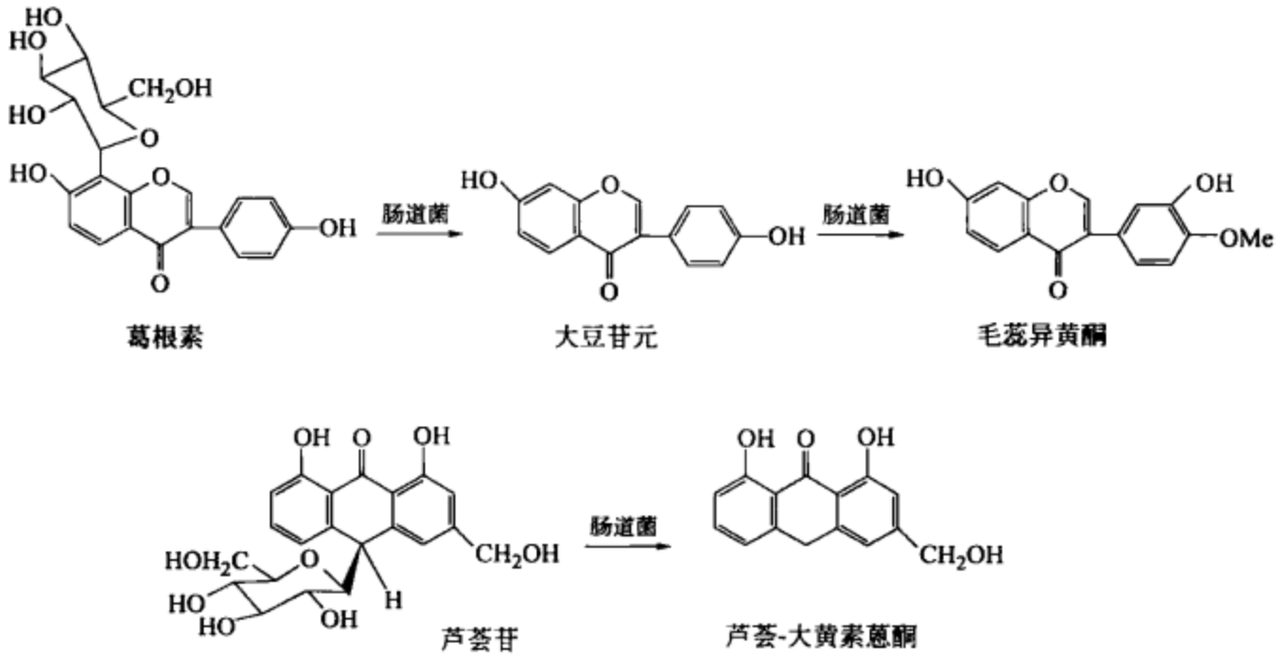


图4.3-18　C-糖苷的人肠道细菌生物转化

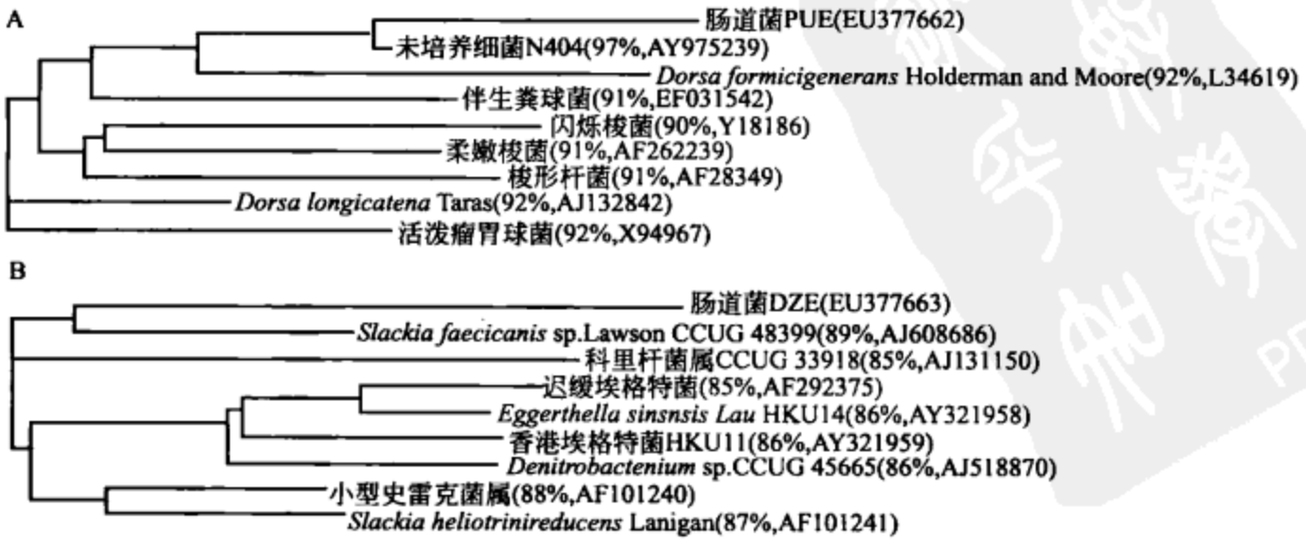


图4.3-19　肠道菌PUE（A）和DZE（B）的系统进化树

PUE能够高产率、特异性转化葛根素或大豆素，劈开C-苷键，形成大豆苷元（daidzein）和毛蕊异黄酮（calycosin）；而DZE则能将大豆苷元转化为二氢大豆苷元（dihydrodaidzein）和雌马酚（equol），如图4.3-20所示，代谢产物雌马酚为近年来研究较热的一种植物雌激素，具有较强的抗氧化、细胞毒天然激素等药理活性。由于肠道菌PUE和DZE的单独或联合作用，代谢葛根素和大豆苷产生新的活性物质雌马酚，而这一成分的产生，不仅给两种药物带来新的药理活性，与此同时，也为利用肠道菌代谢开发葛根素苷和大豆苷提供了一种有益的途径。由此说明，培养、驯化、分离特异性的能水解C-苷键的肠道菌，将对药物的新药开发起到非常有意义的推动作用。

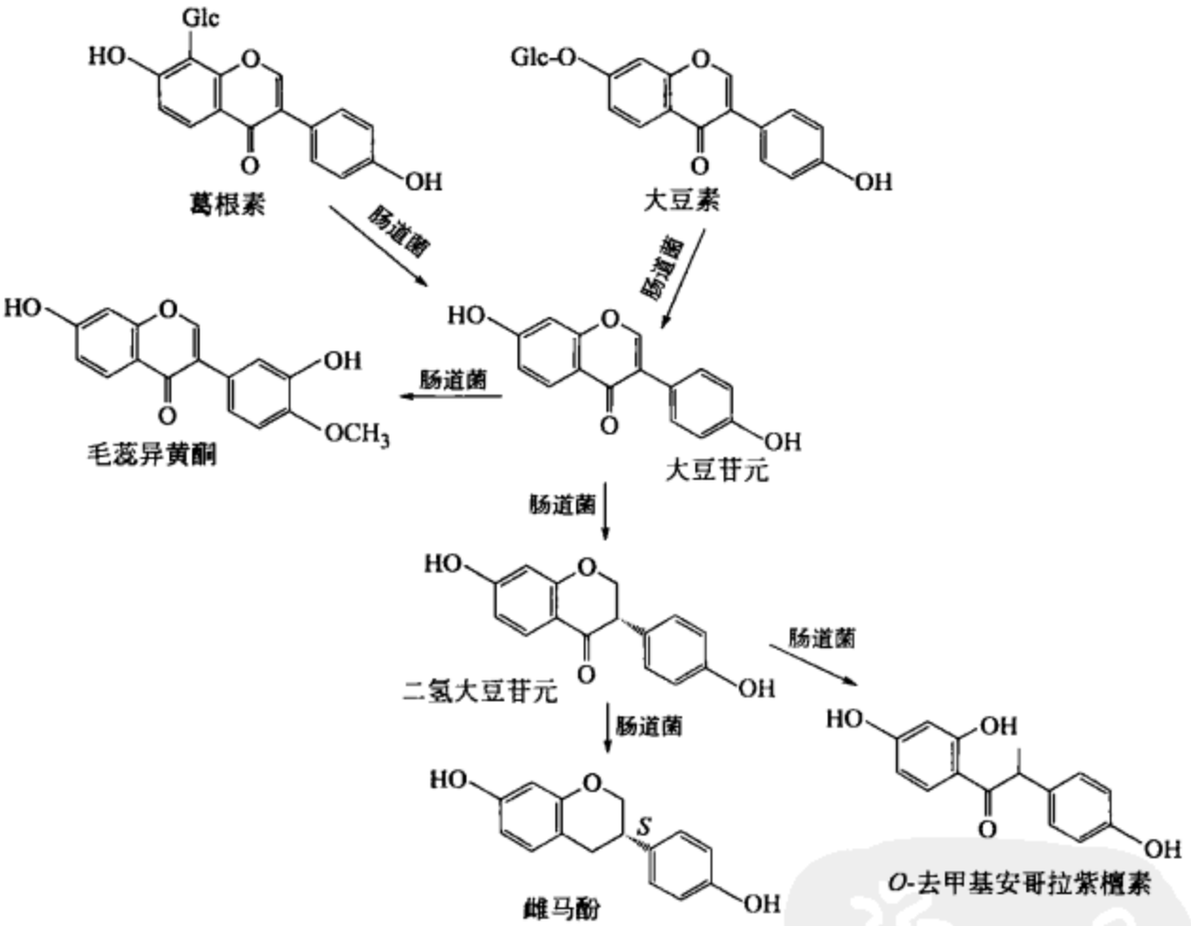


图4.3-20　葛根素和大豆苷的肠道菌代谢路线

与葛根素类似，如图4.3-21所示，Kanjana[94]也从人体粪便中分离出一种单一肠道菌——芒果双歧杆菌，并用芒果双歧杆菌代谢芒果苷（mangiferin）分解C-苷键形成1,3,6,7-四羟基口山酮（Norathyriol）。这一代谢产物具有很强的抗氧化、抗血栓和抗病毒活性，与其他肠道菌相比，芒果双歧杆菌的代谢具有特异性，达到了73.8%的转化率，在这一代谢过程中，不受α或β-糖苷酶的催化，由此推测，芒果双歧杆菌对芒果苷的代谢可能与其他新酶的催化有关。

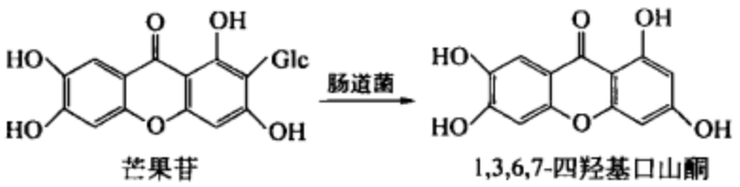


图4.3-21　肠道菌对芒果苷的转化

（5）肠道菌对皂苷的水解，促进多种催化反应同时发生，产生多种活性成分龙胆苦苷（Gentiopicroside）、当药苦苷（Swertiamarin）为裂环烯醚萜苷类，常存在于中药龙胆和当药中，有抗菌、清除自由基、促进胆汁分泌、抗炎、止疼等功能。Adell[95]和赵锐[96]等，分别报道了肠道菌对龙胆苦苷和当药苦苷的代谢过程，发现肠道菌在代谢两种皂苷水解的同时，发生脱水、氧化形成双醛、还原等代谢反应，最终形成多级代谢产物。如图 4.3-22 所示，当药苦苷经肠道细菌的 β-葡萄糖苷酶的作用产生其配基，再经脱水、双醛中间体等转化为龙胆苦醛，还原后产生终产物。如图 4.3-23 所示，类似的例子还有龙胆苦苷，龙胆苦苷由人肠道细菌代谢后，产生龙胆苦醛、赤式矢车菊素、5-羟甲基异苯并二氢吡喃-1-酮、5-羟甲基异苯并吡喃-1-酮、5,6-二氢-5-羟甲基-6-甲基-1*H*,3*H*-吡喃[3,4-*c*]-吡喃-1-酮等。

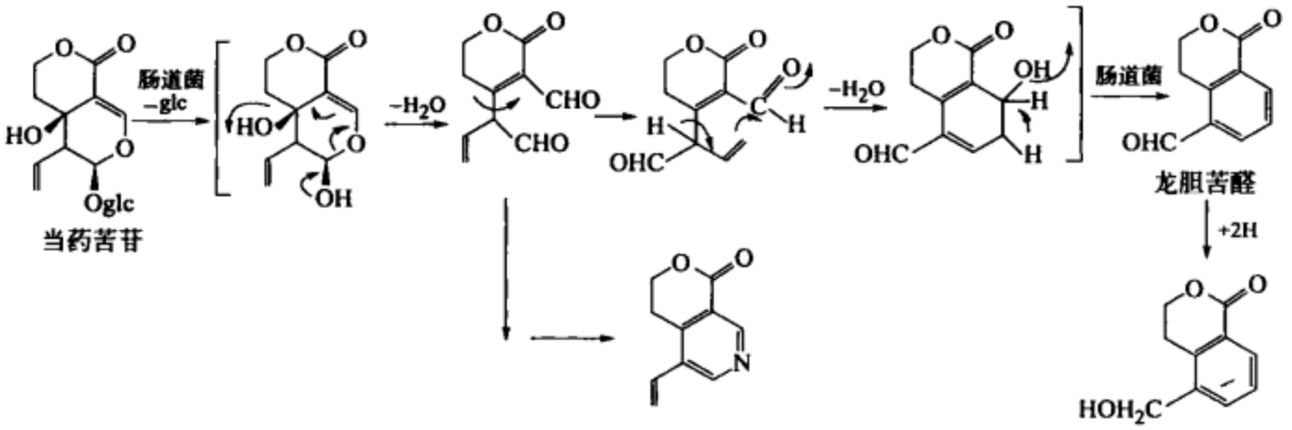


图 4.3-22　肠道菌对当药苦苷的代谢

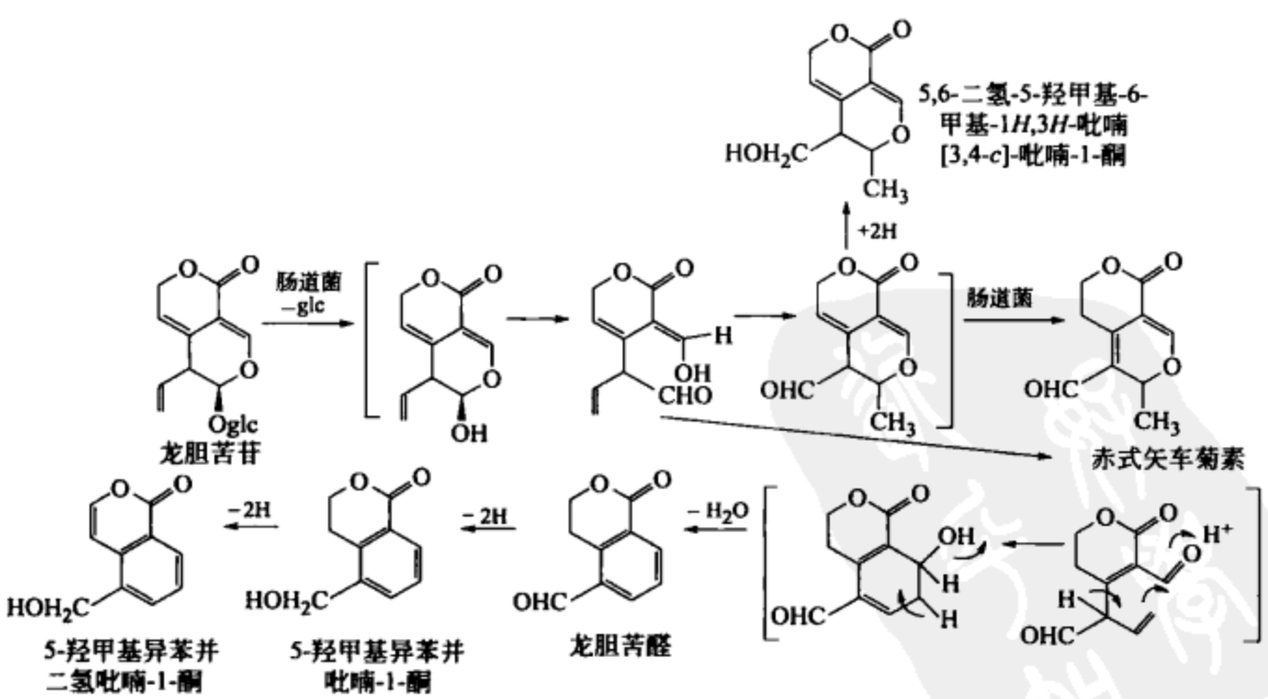


图 4.3-23　龙胆苦苷的人肠道细菌代谢

而在另一方面，肠道菌在代谢过程中不仅通过肠道菌的作用发生水解、环化、芳香化、双键还原、共轭醇氧化等反应，更有趣的是，肠道菌也可以利用细菌代谢过程中产生的氨基酸，把一些天然产物中的含氧化合物代谢氧化为含氮化合物，产

生独特的含碱类代谢产物，生成全新的活性产物，这一点是肠道菌代谢的突出特征，是一般的合成反应不可比拟的，现在已经研究得比较清楚的代谢过程有桃叶珊瑚苷、京尼平苷和栀子苷等代谢过程。

桃叶珊瑚苷（Aucubin）是车前子（*Plantago asiatica* L.）的种子或全草、杜仲（*Eucommia ulmoides*）叶、地黄（*Rehmannia glutinosa*）块根的主要成分之一，如图 4.3-24 所示，由肠道细菌的 β-葡萄糖苷酶将桃叶珊瑚苷水解成其糖苷配基，然后以 Schiff 碱作为中间体，进一步发生环化、芳香化、双键还原、共轭醇氧化等反应，生成珊瑚碱 A，再转化为珊瑚碱 B。

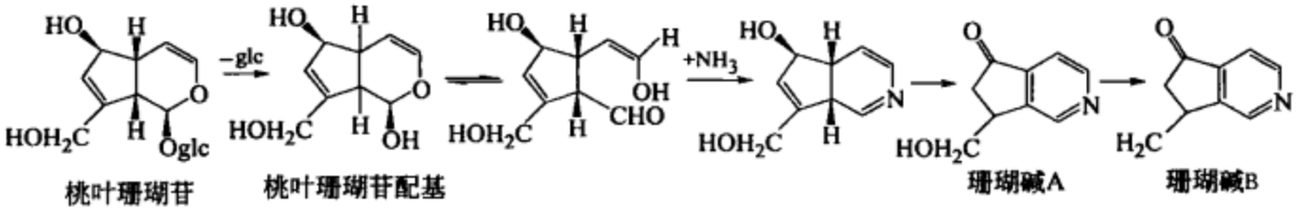


图 4.3-24　肠道菌对桃叶珊瑚苷的代谢

京尼平苷、栀子苷是栀子（*Gardenia jasminoides*）的主要成分之一，如图 4.3-25 所示，京尼平苷水解后形成京尼平。而京尼平的丙酮醇部分开环，形成的双醛与肠道菌产生的氨基酸产生氨反应，生成 Schiff 碱，再闭环，生成京尼平碱。

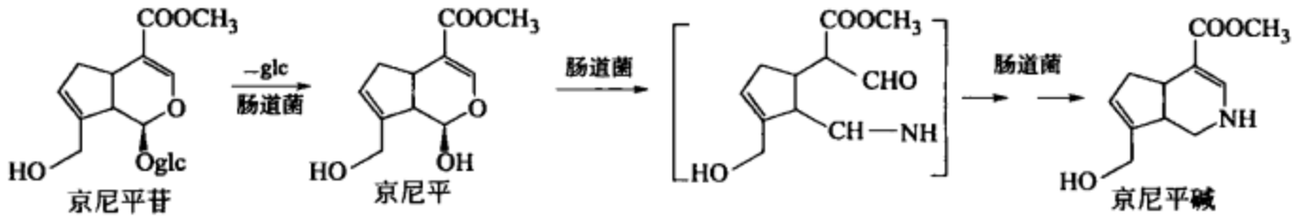


图 4.3-25　京尼平苷的人肠道细菌代谢

如图 4.3-26 所示，栀子苷有 α-羟甲基，经肠道细菌 β-葡萄糖苷酶作用生成的原配基较易转换为稳定的三环性栀子苷配基 A 和 B。同时，一部分原配基亦可与肠道菌氨基酸等代谢产生的氨反应，生成三环性栀子碱。肠道菌代谢各种天然产物产生水解、环化、芳香化、双键还原、共轭醇氧化、氨化等重要的反应，极大地丰富了肠道菌代谢的内容，为各种天然产物药理活性的发挥起到了重要的作用。

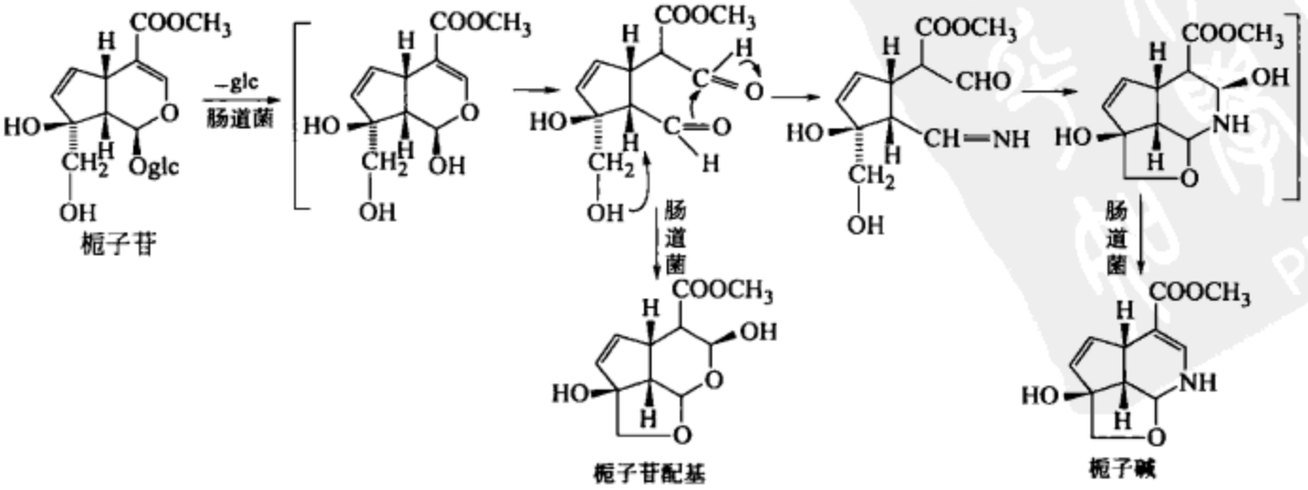


图 4.3-26　栀子苷的人肠道细菌代谢

然而如何能利用肠道菌作为天然的催化剂，对天然产物的目的活性基团做一重要的修饰，提高药理活性，进而充分挖掘和提升天然产物的功效，有目的地开发极具开发潜力的活性产物一直是国内外学者关注的领域。近年来，国外学者利用单一驯化的、分离和培养的肠道菌，通过对天然产物牛蒡子苷和牛蒡子苷元代谢、水解、羟基化以及定点去甲基化，获得雌马酚、肠内醇和肠内酯等代谢产物植物激素，为开发具有抗氧化性、抗病毒活性以及抑制肿瘤活性的天然植物激素做了非常有意义的工作。如图 4.3-27 所示，Xie[97]利用从人体粪便中分离、培养和驯化的消化链球菌（*Peptostreptococcus* sp. SDG-1）和真杆菌（*Eubacterium* sp. SDG-2）对牛蒡子（*Fructus arctii*）体外代谢，通过肠道菌的糖苷键水解、脱甲基化、脱羟基等连续的催化反应，代谢产生 1～7 种代谢产物，其中代谢物 7 具有（－）-(2*R*，3*R*）立体构象，代谢物 6 体外药理实验证明具有较好的抑制乳腺癌（MCF-7）的活性，通过肠道菌的代谢，得到一系列高产量、具有雌激素药理活性的产物，而且得到了普通化学方法难以获得的(－)-(2*R*,3*R*)雌激素，这一研究成果为牛蒡子的新药研发提供了思路。如图 4.3-28 所示，Jin[98]针对牛蒡子苷元 2～7 步代谢过程中去甲化反应，菌种转化效率较低的难题，从人的肠道菌群中筛选出一株具有较高甲基化催化能力的肠道菌（*Eubacterium* sp. ARC-2），并通过对其总酶蛋白和特异性地催化剂四氢叶酸（Tetrahydrofolate，THF）以及 ATP 的相互作用，阐明微生物去甲基化酶促反应的机理。研究结果发现，真杆菌 ARC-2 代谢牛蒡子苷元的转化效率较高，共产生 1～8 种甲基化代谢产物。其中 8→(6,7)→4→1 为主要的肠道菌去甲基化代谢路线，8、6、7、4 和 1 为其主要的代谢产物，随着 THF 和 ATP 的加入，去甲基代谢产物含量显著提高。由此推测，肠道菌的转化作用和甲基转移酶的活性有关。对单一肠道菌甲基化催化机理的深入研究，为提高特定活性位点去甲基化的转化效率和方法提供了坚定的实验基础。通过肠道菌对皂苷类产物的水解及其环化、芳香化、双键还原、共轭醇氧化、氨化等重要的催化反应系统研究，提

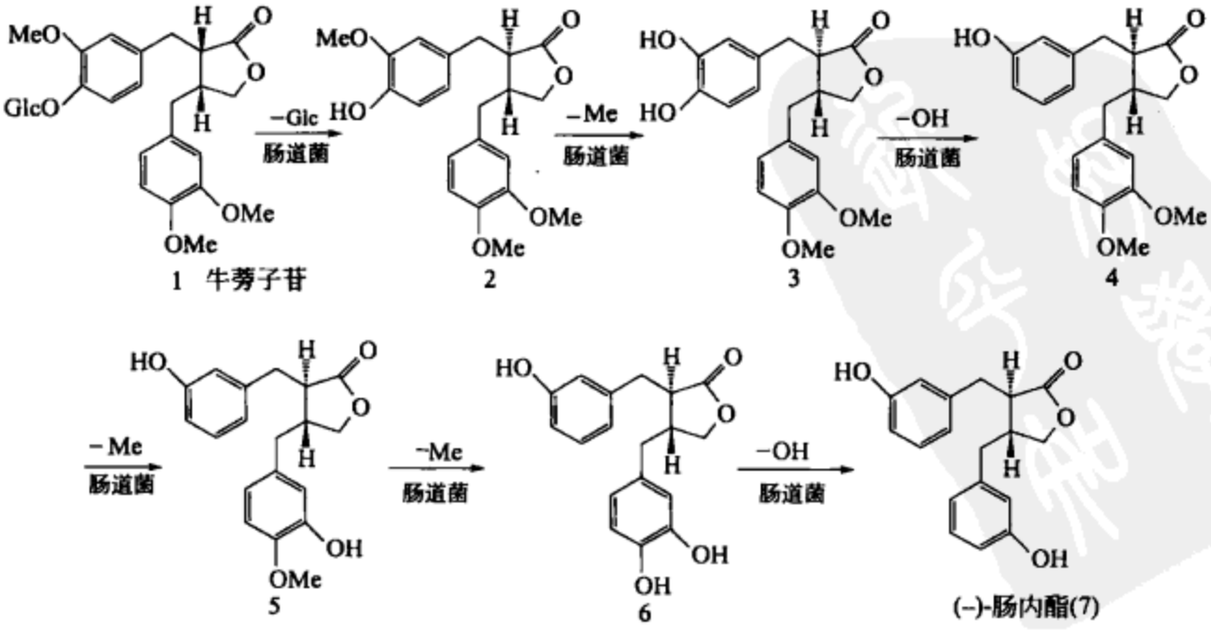


图 4.3-27　肠道菌代谢牛蒡子苷的路线

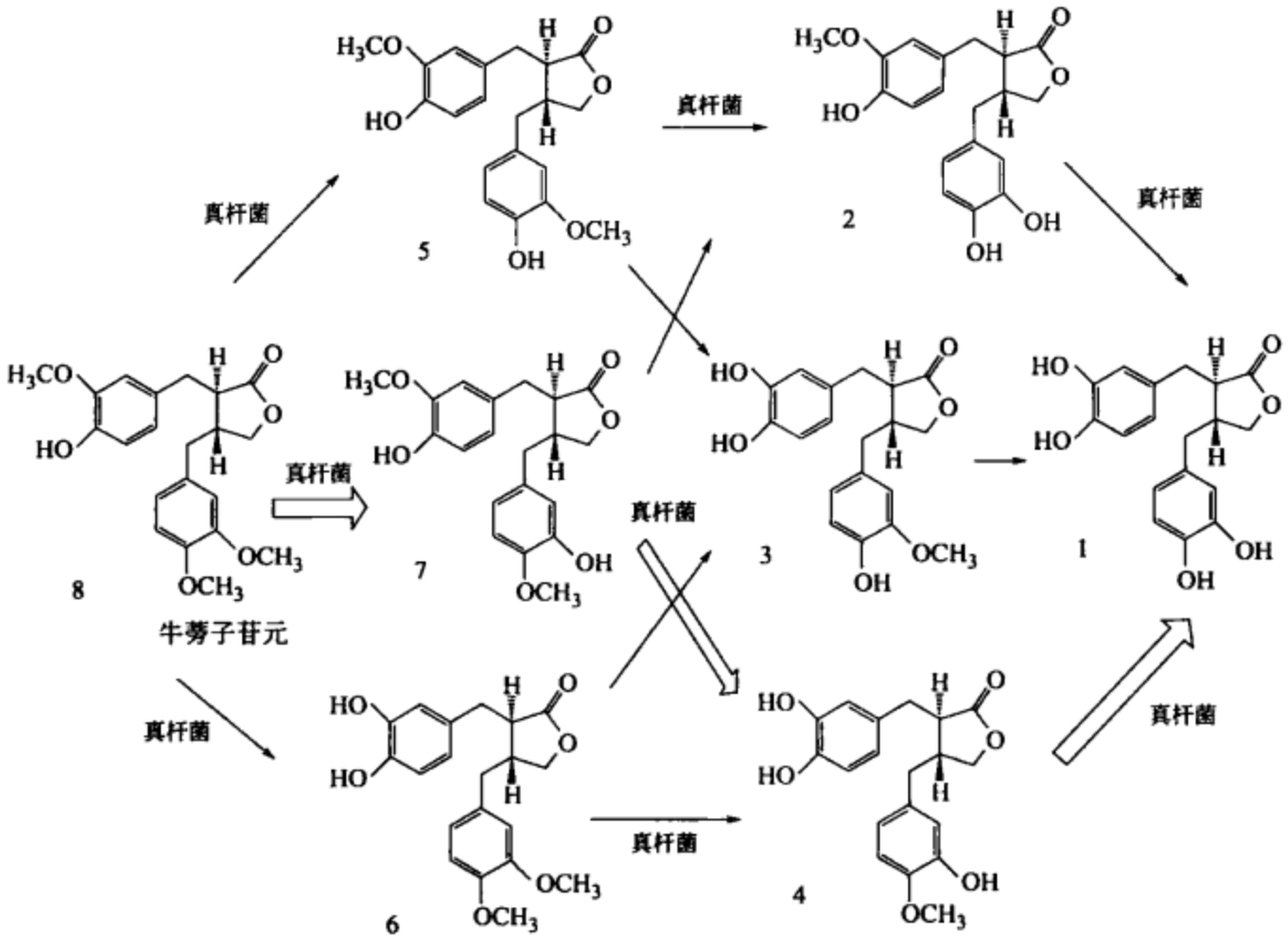


图 4.3-28　真杆菌 ARC-2 代谢牛蒡子苷元的路线

高了普通化学方法难于得到的活性天然产物的含量，提升了部分天然产物的药效。这些可喜的研究进展都必将为天然药物的研究和开发提供全新的思路和方法。

4.3.3.2　酚类药物转化反应

如表 4.3-2 所示，酚类化合物包括黄酮（favonoids）、异黄酮（isofavonoids）、木酚素（lignans）、酚酸（phenolic acids）和丹宁酸（tannin）等。这类化合物不仅在药物中资源丰富，而且在日常服用的多种饮食中分布极为广泛，包括谷类、水果（草莓、柑橘）、茶叶、黑麦等，最近 Jenner[99] 研究证明，一些酚酸的代谢物［苯乙酸、苯丙酸、苯甲酸和羟基肉桂酸（hydroxycinnamic acid）］出现在人的粪便中，而且在人的血液和尿液中也出现了酚酸的代谢物和一些肝脏代谢的产物，体内外对多种代谢产物的药理活性试验证明，这些代谢产物本身或者其肝脏代谢的结合物具有显著的抗肿瘤、抗脂质过氧化、抑制胆固醇合成、血小板激活、抗炎、雌激素活化或抑制等多种作用。最近的研究表明，多种肠道菌可以代谢各种酚类药物发生多种生物转化反应（水解、氧化、去甲基化和羟基化等），代谢产生肠内醇、肠内酯、雌马酚、花青素等一些重要的活性物质，为此，对酚类化合物的肠道菌转化作用进行深入的研究，阐明其代谢物的形成规律，对药物的研究和开发都将产生重要的影响。

氧化反应是肠道菌代谢黄酮化合物的主要方式，其代谢产物分别为苯乙酸、苯

表 4.3-2 来源于食物的酚酸类化合物

化合物分类	名 称	来 源
黄酮醇	槲皮素、杨梅树皮素	洋葱、豆、茶等
黄烷醇	儿茶素、表儿茶素	茶、红酒、巧克力
黄烷酮	柚皮苷、橙皮苷	柑橘
黄酮	芹菜素、木樨草素	芫荽叶、甜椒
花色素	花青素、花翠素、芍药素	红葡萄酒、茄子、卷心菜等
羟基肉桂酸 咖啡酸衍生物		葡萄、蓝莓、苹果等
阿魏酸、安息香酸		谷类
原儿茶酸、没食子酸		草莓(黑、蓝)
异黄酮	染料木素、大豆苷元	豆
丹宁酸、鞣花丹宁		草莓、黄莓、水果等
原花青素		苹果、葡萄、茶
植物雌激素木酚素	罗汉松树脂酚、开环异落叶松树脂酚、丁香树脂酚、松脂酚、落叶松树脂酚	亚麻子、桃、杏等

甲酸、苯丙酸和安息香酸等产物。自然界存在大量的黄酮化合物，包括黄芩苷、黄芩苷元（baicalein）、芦丁（rutin）、杨梅树皮素（myricetin）、儿茶酸（catechin）、表儿茶酸（epicatechin）、柚皮素（naringin）、花色素（anthocyanidin）、羟基肉桂酸、鞣花酸（ellagic）、染料木素（genistein）、大豆苷元、丹宁酸、植物木酚素（plant lignan）等。而由肠道菌代谢的反应，其起始反应类型多以环（A、B、C、D）裂解为主，具体如下。

A 类型：如图 4.3-29 所示，黄酮和黄烷酮（fiavanones），生成 C6-C3 型的酚酸。

B 类型：如图 4.3-30 所示，黄酮醇（Flavonols），生成 C6-C2 型的酚酸。

C 类型：如图 4.3-31 所示，黄烷醇（Flavanols），经过苯基-β-戊酸内酯中间体生成 C6-C3 型酚酸。

D 类型：如图 4.3-32 所示，异黄酮，生成乙基酚衍生物。

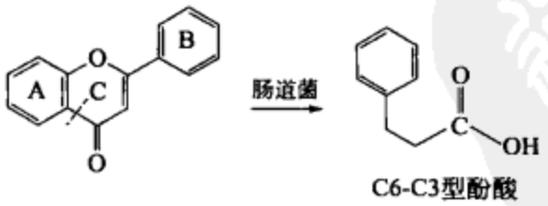


图 4.3-29 黄酮、黄烷酮类化合物 A 型开裂

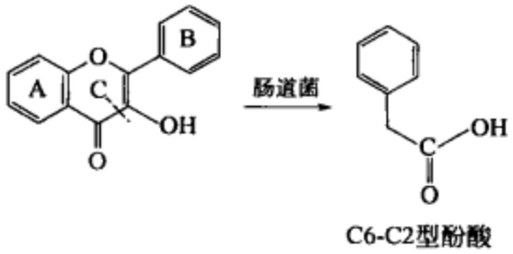


图 4.3-30 黄酮醇化合物结构的 B 型开裂

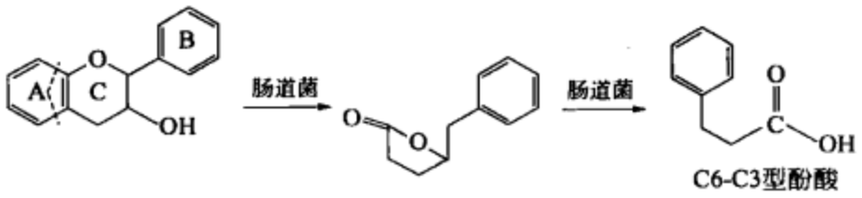


图 4.3-31　黄烷醇类化合物结构的 C 型开裂

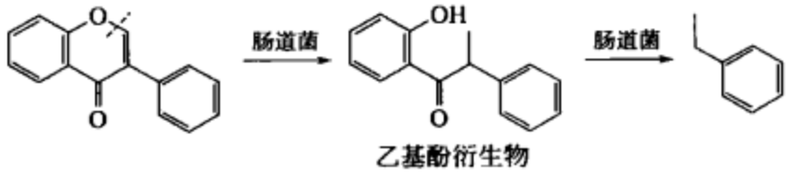


图 4.3-32　异黄酮类化合物结构的 D 型开裂

天然的黄酮产物中，药、食两用的酚酸类黄酮不仅分布广泛，近年来随着对木酚素、大豆异黄酮和儿茶酚酸等黄酮产物研究的深入，针对其在体内的代谢、吸收和分布等过程的研究也取得了一定的进展。如表 4.3-3、表 4.3-4、表 4.3-5 和表 4.3-6 所示，Aura[100]系统地总结了酚酸化合物的体内、外和肠道菌体内代谢的过程，初步阐明了肠道菌在酚酸类黄酮代谢中的作用以及肠道菌对酚酸类黄酮的生物氧化、水解、甲基化等多种催化反应，肠道菌不仅促进了酚酸类黄酮产生多种体内、外代谢产物，以此发挥正常生理、药理以及多种生物效应，而且尤为重要的是，可以产生多种与人体正常活动息息相关的物质，并在人体中发挥重要的作用。

表 4.3-3　肠道菌对酚类药物的生物转化

化合物	浓　　度	药 理 活 性	体内模型
羟基罗汉松树脂酚	4.7mg/kg、(105 ± 44) ng/ml	抑制肿瘤生长	DMBA 所致鼠肿瘤模型
肠内酯	10mg/kg，口服	抑制肿瘤生长	DMBA 所致鼠肿瘤模型
亚麻	每日服用占饮食含量 0.5%的亚麻	抑制腺瘤	Min 基因突变小鼠
原儿茶酸	500mg/kg、1000mg/kg，口服	抑制多发性结肠癌	氧化偶氮甲烷诱发鼠大肠癌模型
原儿茶酸	50～100mg/kg 强饲	抑制肝损伤肿大、白细胞浸润和坏死	化学诱导的肝损伤模型
原儿茶酸	80 ～ 800mg/kg，腹腔注射	影响 P450 和共栖微生物的代谢	鼠肝脏和肾脏
3,4-二羟基甲苯	50μmol/L	抑制肝细胞胆固醇的合成	醋酸盐造模肝实质细胞
	10μmol/L、30μmol/L、100μmol/L	抑制脂质过氧化	三丁基过氧化氢所致鼠肝损伤
花青素及其酚酸代谢产物	花青素 0.1μmol/L	抑制血小板功能	血小板活化、TRAP 诱导的聚集
苯乙酸、苯丙酸、苯甲酸、羟基肉桂酸	代谢物 1μmol/L、单体药物 500μmol/L	降低 COX-2 蛋白的水平以及由其调控的感染	肿瘤坏死因子调控的 HT-29 细胞
鞣花酸	1～100μmol/L	通过线粒体诱导细胞凋亡	CaCo-2 细胞结肠癌
尿石素 A	鞣花酸 1～30μmol/L、(0.44 ± 0.01) μmol/L(a)、(0.75 ± 0.04) μmol/L(b)	雌激素或抗雌激素作用	IC50 型雌激素受体 α 和 β(表达鼠模型)

表 4.3-4 微生物体内代谢酚酸类黄酮的代谢产物（微生物均来源于人、鼠尿液与血液）

黄酮分类	酚酸药物	体外代谢产物
黄酮醇	槲皮素	3,4-二羟基苯乙酸、3-羟基苯乙酸、3,4-二羟基甲苯、4-羟基-3-甲氧基苯乙酸
	杨梅树皮素	3,4-二羟基苯乙酸、3-羟基苯乙酸
黄烷醇	儿茶素	3-羟基苯丙酸、3,4-羟基苯丙酸戊内酯
	表儿茶酸没食子酯	3-羟基马尿酸、3′,4′,5′-三羟基苯丙酸-戊内酯、3′,4′-二羟基苯丙-戊内酯,3′-羟基苯丙酸-戊内酯
黄酮	芹菜素	4-羟基苯丙酸、4-羟基肉桂酸、4-羟基苯甲酸
花色素	花青素葡萄糖苷	3,4-二羟基苯甲酸
羟基肉桂酸	咖啡酸	阿魏酸、3,4-羟基肉桂酸、3,4-羟基苯丙酸、3-羟基苯甲酸、3-羟基马尿酸、马尿酸
异黄酮	大豆苷元	二氢大豆黄酮苷元、四氢大豆黄酮苷元、雌马酚、*O*-去甲基安哥拉紫檀素
	芒柄花黄素	大豆苷元、6-羟基大豆黄酮苷元、6-羟基大豆黄酮苷元、黄豆黄素、二氢大豆黄酮苷元、*O*-去甲基安哥拉紫檀素、4-羟基雌马酚、雌马酚
	染料木素	二羟染料木素、6′-羟基-*O*-去甲基安哥拉紫檀素
	鹰嘴豆芽素 A	染料木素、3′-羟基染料木素、二氢染料木素、6′-羟基-*O*-去甲基安哥拉紫檀素、二氢鹰嘴豆芽素 A、6′-羟基-安哥拉紫檀素、羟化鹰嘴豆芽素 A 的衍生物
安石榴苷	鞣花丹宁	鞣花酸、尿石素 A 和 B
	儿茶酚	3,4-二羟基苯乙酸、3-羟基苯丙酸、3-羟基苯乙酸、阿魏酸、3-甲氧基-羟基苯乙酸、3-羟基苯乙酸、3,4-二羟基苯戊酸、3-二羟基苯戊酸、3,4-二羟基苯甲酸、3-甲氧基-4-羟基苯甲酸
植物木酚素	开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷	肠内醇、肠内酯
	芝麻素	葡萄糖酸化或硫酸化儿茶酚、肠内酯
	羟基罗汉松树脂酚	肠内醇、肠内酯

表 4.3-5 微生物体外代谢酚酸类黄酮的代谢产物（微生物均来源于人与动物的粪便）

黄酮分类	酚酸药物	体外代谢产物
黄酮醇	槲皮素	3,4-二羟基苯乙酸、3-羟基苯乙酸
	杨梅树皮素	3,4,5-三羟基甲苯乙酸、3,4-二羟基苯乙酸、3-羟基苯乙酸
黄烷醇	儿茶素	3,4-二羟基苯丙酸、3-羟基苯丙酸、苯基丙酸、3,4-二羟基苯戊酸、3-羟基苯戊酸、3,4-二羟基苯戊酸
	表儿茶酸	3-羟基苯丙酸、苯基丙酸、3,4-二羟基苯戊酸
	表儿茶酸没食子酯	3-羟基苯戊酸、没食子酸、邻苯三酚、表儿茶酸、3′,4′-二羟基苯丙酸-戊内酯、3′,5′-二羟基苯丙酸-戊内酯、3,4-二羟基苯戊酸、3-羟基苯戊酸、3,4-二羟基苯丙酸、3-羟基苯丙酸
黄烷酮	柚皮苷	柚皮素、4-羟基苯丙酸、苯丙酸

续表

黄酮分类	酚酸药物	体外代谢产物
花色素	花青素鼠李葡萄糖苷	3,4-二羟基苯甲酸
	芍药素	3-甲氧基-4-羟基苯甲酸
	花葵素	4-羟基苯甲酸
	锦葵色素	3,4-二甲氧基羟基苯甲酸
羟基肉桂酸	咖啡酸	3-羟基苯丙酸、苯甲酸、4-乙基苯磷二酚
	鞣花酸	尿石素
异黄酮	大豆苷元	二氢大豆苷元、*O*-去甲基安哥拉紫檀素
	染料木素	二羟基染料木素、6′-羟基-*O*-去甲基安哥拉紫檀素、4-羟基苯丙酸
丹宁酸	原华青素	3-羟基苯丙酸、4-羟基苯乙酸、4-羟基苯丙酸、3-羟基苯丙酸、3-羟基苯乙酸、苯基丙酸
植物木酚素	开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷	肠内酯、肠内酯等
	罗汉松树脂酚单葡萄糖苷	
	松脂酚	
	落叶松树脂酚	
	芝麻素	

表 4.3-6　肠道菌体外代谢酚酸类黄酮的主要代谢反应

黄酮分类	酚酸药物	体外代谢反应	微生物(来源)
黄酮	槲皮素-3-葡萄糖苷	去糖基化	铅黄肠球菌(人粪便菌群)
	槲皮素	环裂解	梭状芽孢杆菌(人粪便菌群)
	芦丁	去糖基化、环裂解	丁酸弧菌 C3(牛瘤胃)
	木樨草素-7-葡萄糖苷、木樨草素、芦丁、槲皮素、山柰酚、柚皮素	环裂解	细枝真杆菌(人粪便菌群)
植物木酚素	开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷	去糖基化	梭状杆菌、狄氏拟杆菌、脆弱拟杆菌、卵形拟杆菌、梭状芽孢杆菌(人粪便菌群)
	松脂醇二葡萄糖苷	落叶松树脂酚	粪肠球菌(人粪便菌群)
	松脂酚、落叶松树脂酚	开环异落叶松树脂酚	迟缓埃格特菌(人粪便菌群)
	开环异落叶松树脂酚、松脂酚、落叶松树脂酚	脱羟基	梭状芽孢杆菌、迟缓埃格特菌(人粪便菌群)
	开环异落叶松树脂酚、松脂酚、落叶松树脂酚、罗汉松树脂酚	去甲基化	丁酸杆菌、嗜甲基丁酸杆菌、迟缓真杆菌(人肠液)、迟缓真杆菌(人粪便菌群)
	开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷	肠内醇	消化链球菌 SDG-1、真杆菌 SDG-2
	开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷	肠内酯	*Lactonifactor longovi formis*

例如，肠道菌可以对药、食两用大豆异黄酮进行代谢，产生具有雌激素活性的*O*-去甲基安哥拉紫檀素（*O*-demethylangolensin），而这一成分具有雌激素样活性，并在人体雌激素的吸收、代谢和分布过程中发挥着重要的作用。肠道菌对药、食两用酚酸类黄酮的代谢反应极为丰富，下面以黄酮醇、黄烷醇、黄酮、花色素、羟基肉桂酸、异黄酮、丹宁酸和植物木酚素等为例，分类详述其典型的代谢反应。

（1）黄酮醇类　肠道菌代谢黄酮醇类化合物的方式，以C环的裂解方式（A或B型）较为多见，代谢的结果往往产生C6-C3或C2型酚酸。其中羟化的芳香族化合物来自于A环、酚酸化合物来自于B环。如图4.3-33所示，Griffiths和Smith[101]、Aura[102]和Rechner[103]研究了槲皮素和杨梅树皮素的肠道菌的代谢，通过对其体内代谢物（尿、粪）、体外代谢物（人肠道菌群或单一肠道微生物）的检测和分析发现，二者先由肠道菌作用，产生C环的裂解形成二羟基化合物，如3,5-二羟基苯乙酸或3,4-二羟基苯乙酸，然后去羟基化产生一羟基产物3-羟基苯乙酸，而多级的羟化酚酸产物是其体内、外代谢的主要产物。Krishnamurty[104]、Vitaglione[105]、Sawai[106]、Winter[107]、Schneider[108]同时也证明了槲皮素经肠道菌代谢产生的其他产物，包括3,4-二羟基甲苯、4-羟基-3-甲氧基苯乙酸。Hollman和Katan[109]提出槲皮素的4-羟基-3-甲氧基苯乙酸可能来自于肝脏代谢。Sawai[106]研究证实，其含有的甲氧基（羟基酚酸）代谢产物仅存在于体液中，并不存在于各种粪便和粪便培养液中。根据Walle[110]的报告，槲皮素中可能含有23.0%～81.1%甲氧基（羟基酚酸）代谢产物，由于多种药、食两用黄酮往往以糖苷的形式存在，其肠道微生物的代谢可能涉及了不同的反应，包括糖苷解离、环裂解、去羟基化、氧化等过程，其中不同的肠道菌代谢可能产生了不同的代谢产物。

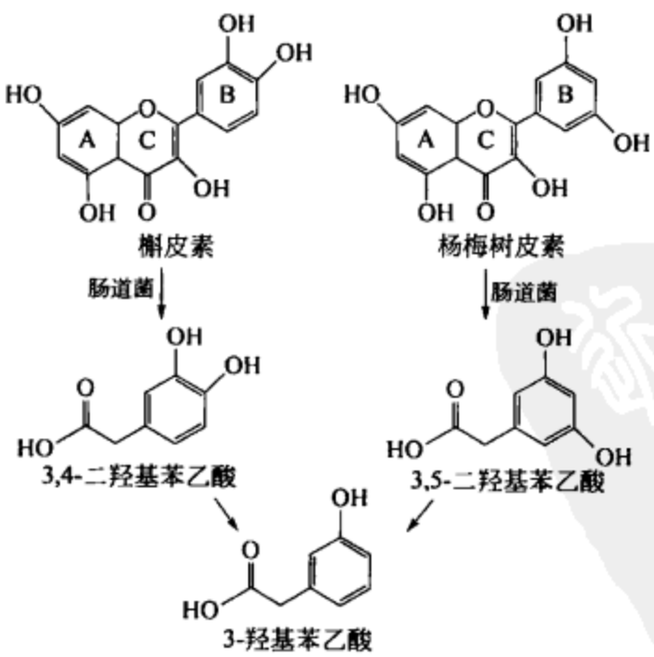


图4.3-33　肠道菌代谢槲皮素和杨梅树皮素路线

（2）花色素　花色素的代谢包括糖苷的解离和环的裂开两部分。Keppler和Humpf[111]、Fleschhut[112]指出，花色素经肠道菌代谢产生芍药素（paeonidin）、丁香酸（syringicacid）、3,4-二甲氧基-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸。如图4.3-34所

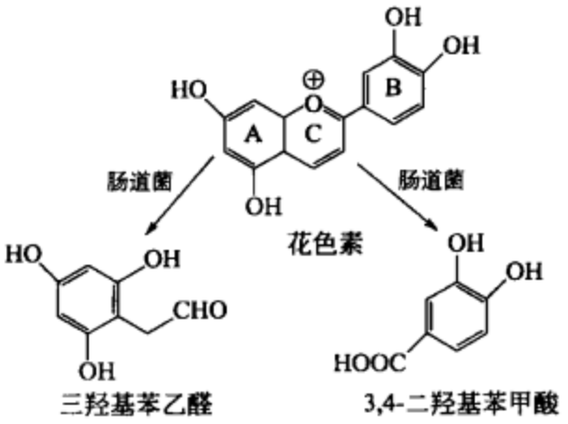


图 4.3-34　肠道菌代谢花色素的路线

示，描述了花色素代谢过程中环裂开的主要方式，可能以黄酮醇化合物 B 型开裂为主，产物为 C6-C2 或 C1 型酚酸。其先由肠道菌作用，产生 C 环的裂解，由 B 环形成羟基取代物；再经 A 环形成三羟基苯乙醛或二羟基苯乙酸。除此之外，Aura[113]也从五种花色素包括锦葵色素（malvidin）、芍药素、牵牛花色素（petunidin）、花翠素（delphinidin）和花青素-3-葡萄糖苷（cyanidin-3-*O*-glucosides）中检测到内酯代谢物。Keppler 和 Humpf[111]同时指出，这种内酯产物在肠道菌的代谢下，极易分解产生酚酸和醛类化合物，不同的花色素可能在肠道菌的作用下产生同样的代谢产物——原儿茶酸（protocatechuic acid，3,4-二羟基苯甲酸）。由此可见，以酚酸产物为主要产物的代谢方式，可能是其主要的代谢方式。

（3）黄烷醇、黄烷酮和黄酮　一般而言，黄烷醇、黄烷酮和黄酮化合物均能通过肠道菌作用发生 C 环的裂解反应，产生一系列酚酸类化合物，包括羟基苯乙酸、羟基苯甲酸、羟基苯丙酸等多羟基化合物，而 Scheline[114]提出羟基戊酸则是儿茶酚酸［(+)-catechin］特有的代谢产物，其中发生 C 环裂解的位置，随着底物的不同，会发生一定的变化，由此产生不同的代谢产物。Aura[115]、Meselhy[116]

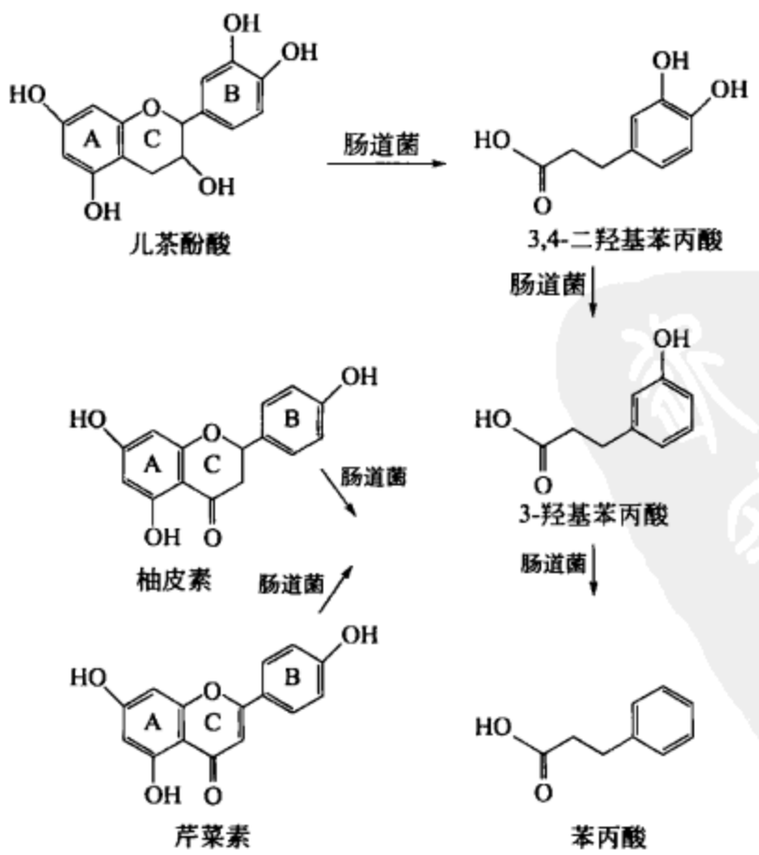


图 4.3-35　肠道菌代谢（+）-儿茶酚酸、柚皮素和芹菜素的路线

指出人体肠道菌群体外代谢（+）-儿茶酚酸［(+)-Catechin］、表儿茶酸［(−)-epicatechin］和表没食子儿茶素没食子酯［(−)-epigallocatechin gallate］分别产生羟基苯乙酸和羟基戊酸衍生物，其代谢产物的数量、种类和反应速度与个体肠道菌群（人、动物）和单一肠道微生物的代谢能力密切相关，不同的微生物可能产生不同的代谢产物。如图 4.3-35 所示，Das[117]发现，人在服用儿茶酚酸后，可以在排泄的尿液中检测到几种不同的代谢物，包括 3′,4′-二羟基苯丙酸-戊内酯、3′,5′-二羟基苯丙酸-戊内酯、3,4-二羟基苯戊酸、3-羟基苯戊酸和 3,4-二羟基苯丙酸等代谢物。Lee[118,119]等的药代动力学研究表明，环裂解代谢物出现在饮茶（富含儿茶酚酸）后的 3h，代谢高峰发生在 8～15h，由此方式产生的代谢产物（二或三羟基衍生物或羟基苯戊酸）总量约占消化道儿茶酚酸的 16%，体内代谢产物的种类和数量与体外基本相同。由此可见，肠道菌在黄酮化合物体内代谢过程中发挥着重要的作用。

（4）儿茶酚　Rios[120]系统研究了原花青素（proanthocyanidins，黄烷-3-醇的三聚体）的肠道菌代谢过程，研究发现儿茶酚可以经肠道菌代谢产生苯丙酸、苯戊酸、苯甲酸等类型的羟基取代产物。

图 4.3-36 中，描述了原花青素在肠道菌的作用下，通过环裂解的方式代谢产生苯丙酸，苯环氧化产生苯甲酸的过程。Groenewoud 和 Hundt[121]也发现，羟基苯戊酸可能仅为鼠肠道菌的代谢产物。人体肠道菌的代谢产物可能为苯乙酸、苯丙酸、3-甲氧基羟基苯丙酸等，而且其聚合物的性质、儿茶酚链的长短、不同生物体的特性等因素都对其代谢物的产生具有重要的影响。

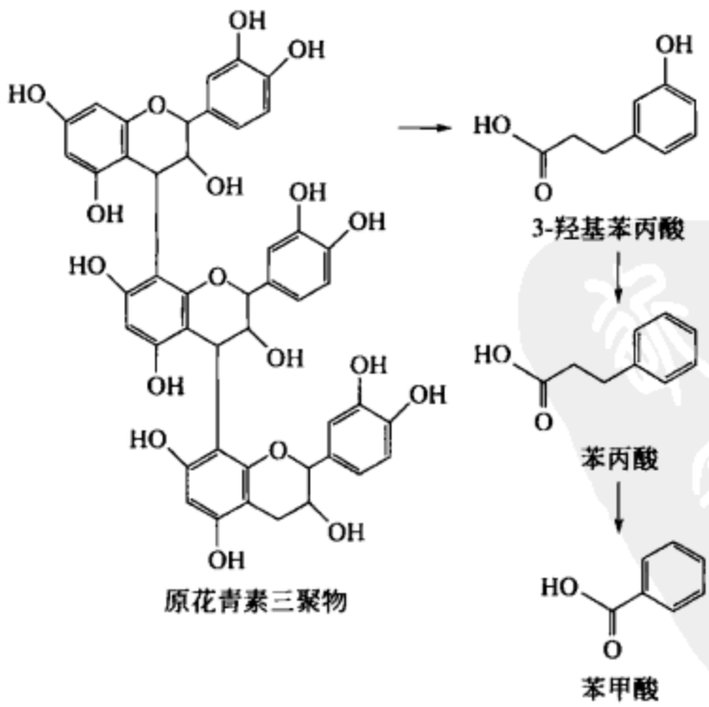


图 4.3-36　肠道菌代谢原花青素的路线

（5）酚酸　研究发现，人肠道菌、酯酶和肠道组织在脂酸的代谢中具有重要的作用。Peppercorn 和 Goldman[122]指出，咖啡酸（caffeic acid）、咖啡酯类和绿原酸（chlorogenic acid）等，在肠道菌的作用下，分别通过脱酯、脱羧、还原和脱羟

基等作用代谢产生3-羟基苯丙酸和苯甲酸等产物。如图4.3-37所示，肠道菌代谢绿原酸和阿魏酸，产生3-羟基苯丙酸，通过体外代谢物的分析表明，服用少量的绿原酸后，可以在尿液和血清中检测到羟基肉桂酸、苯甲酸和马尿酸（hippuric acids）等代谢产物。

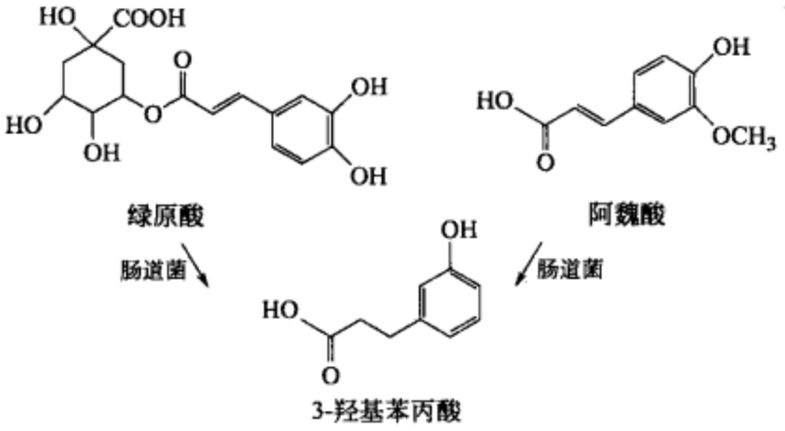


图4.3-37　肠道菌代谢阿魏酸和绿原酸的路线

（6）鞣花丹宁（Ellagitannins）和植物木酚素　Cerda[123]研究指出，安石榴苷可以被肠道菌代谢，通过水解形成丹宁酸，丹宁酸再进一步水解形成含有两个内酯环的产物尿石素（Urolithin）A和B。如图4.3-38所示，Cerda[124]也同时发现，鼠服用鞣花丹宁后，在其血液中可以检测到葡萄糖醛酸化的尿石素，而在尿液中可以检测到尿石素B。三者可能为鞣花丹宁类化合物的主要代谢产物。

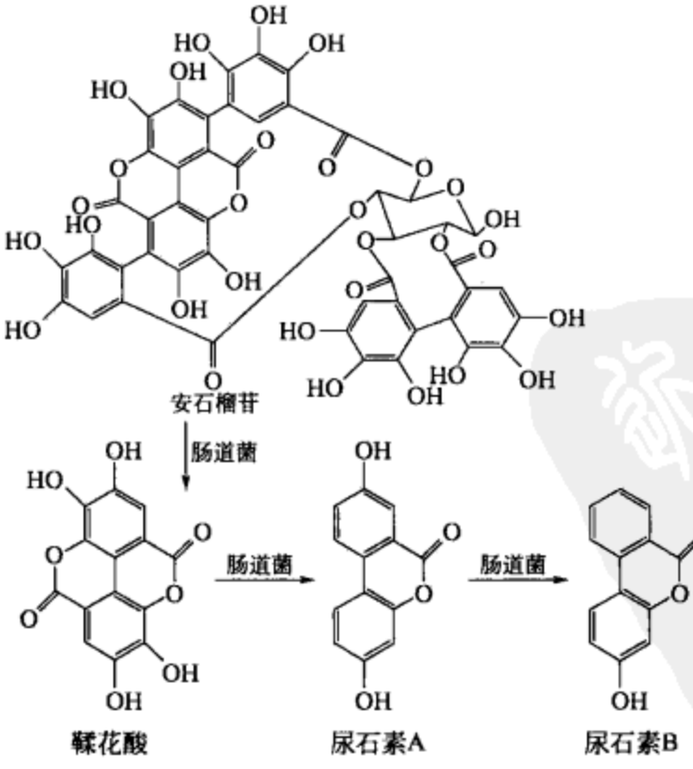


图4.3-38　肠道菌代谢安石榴苷的路线

如图4.3-39所示，肠道菌代谢也是植物木酚素的主要代谢形式，通过肠道菌的作用，植物木酚素可以转化为与哺乳动物木酚素相似的代谢产物——肠内酯

(enterodiol) 和肠内酯 (enterolactone)。研究发现，不同的植物木酚素 [包括开环异落叶松树脂酚 (secoisolariciresinol)、罗汉松树脂酚 (matairesinol)、松脂酚 (pinoresinol) 和落叶松树脂酚 (lariciresinol)] 都可以代谢产生相同的代谢产物——肠内醇和肠内酯，而丁香树脂酚 (syringaresinol)、杜仲树脂酚 (medioresinol) 则可能通过其他转化路线代谢。这一点同样也在 Penalvo[125]、Heinonen[126]的研究中得到进一步的证实。与此作用相反，芝麻素 (sesamin)，经过肠道菌的代谢作用，只有肠内酯这一产物进入体液或血液循环。由此说明，不同的木酚素经肠道菌代谢，可能产生不同的产物，代谢物不仅与化合物性质和种类有关，更重要的是可能与其化合物的手性特征以及肠道微生物的种类密切相关。

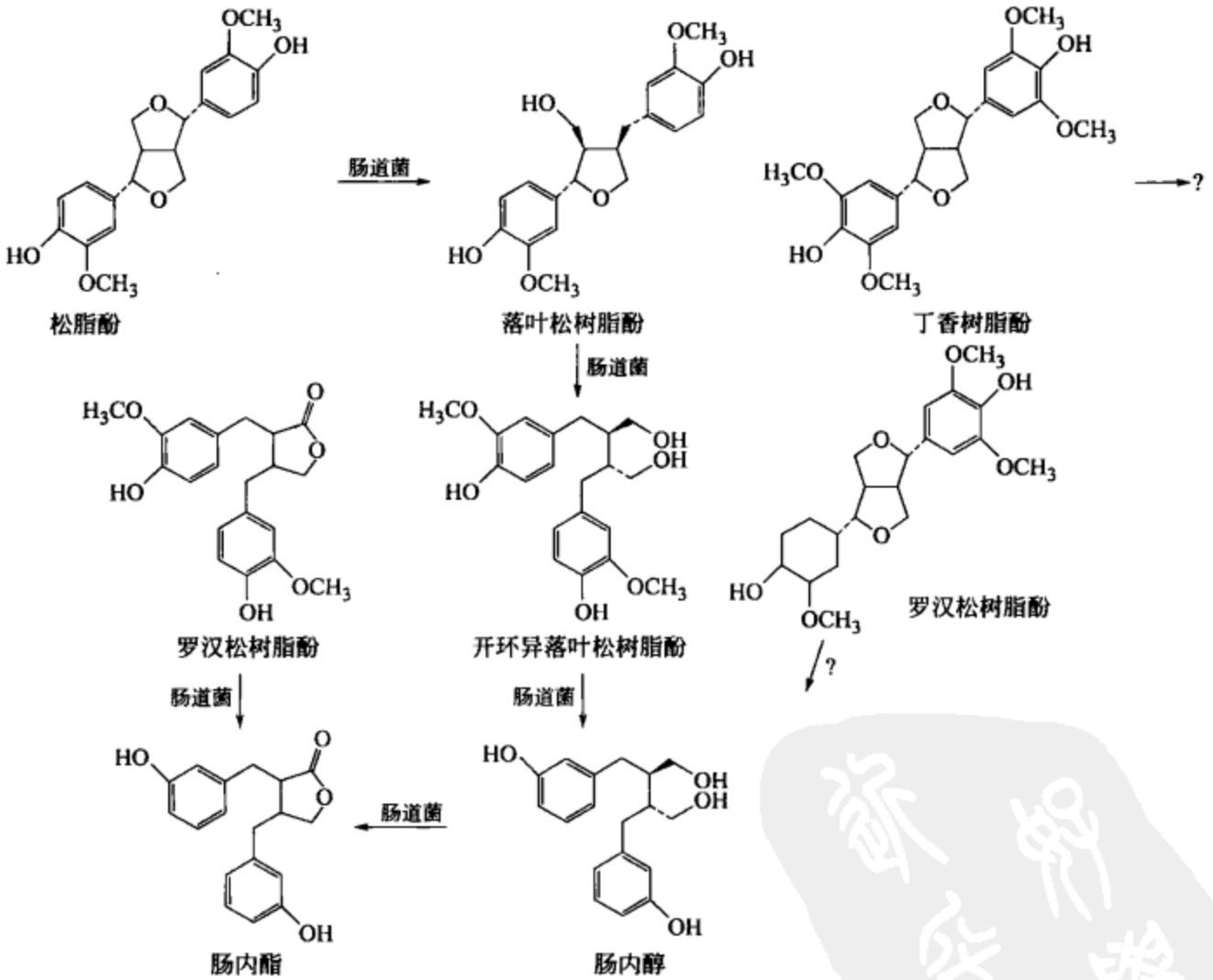


图 4.3-39 肠道菌代谢植物木酚素的路线

Saarinen[127]研究指出，(－)-开环异落叶松树脂酚可以通过肠道菌代谢转化为(－)-肠内酯，而开环异落叶松树脂酚，则先由 (＋)-开环异落叶松树脂酚转化为开环异落叶松树脂酚，然后形成 (＋)-肠内酯。而开环异落叶松树脂酚的代谢方式与手性化合物不同，其可能首先为甲基化的过程，然后转化为肠内醇和肠内酯，这一点可能与 Jacobs[128]、Setchell[129]认为的这一过程可能经过羟基化、结合化的观点有所矛盾，植物木酚素的转化可能受到多种因素的影响，其过程较为复杂，可能与化合物的表征、代谢中间产物、结合反应、不同生物体的性质和微生物的代谢方

式等因素有关。

（7）异黄酮　研究指出，异黄酮包括大豆苷元和染料木素，二者可以通过体内外肠道菌的作用代谢产生二氢大豆苷元、四氢大豆苷元、雌马酚、6-羟基-*O*-脱甲基安哥拉紫檀素和*O*-去甲基安哥拉紫檀素。而且不同的黄酮化合物，其代谢路线具有显著的差异。如图 4.3-40 所示，大豆苷元首先产生二氢大豆苷元和四氢大豆苷元，再分别经过二氢大豆苷元和四氢大豆苷元转化为*O*-去甲基安哥拉紫檀素和雌马酚；而染料木素则可能先通过二氢染料木素，代谢形成 6-羟基-*O*-脱甲基安哥拉紫檀素这一中间产物，然后产生 4-羟基苯-2 丙酸。人或鼠粪便中检测到的 6-羟基-*O*-脱甲基安哥拉紫檀素和 2-羟基苯-2 丙酸，可能是异黄酮 C 环裂解的产物。令人感到非常惊奇的是，不同的黄酮类化合物也可能经肠道菌作用产生相似的代谢物。例如，苎柄花黄素（formononetin），也可以通过肠道菌代谢先形成大豆苷元，然后由大豆苷元代谢形成*O*-脱甲基安哥拉紫檀素或雌马酚。而鹰嘴豆芽素 A（biochanin A）也同样可以通过染料木素这一中间产物形成 6-羟基-*O*-脱甲基安哥拉紫檀素。鉴于脱甲基安哥拉紫檀素可能是一种具有天然雌激素样药理活性的物质，为此，针对肠道菌对异黄酮类化合物、天然药物，食用异黄酮的特殊代谢作用，从中开发具有天然雌激素样药理活性的药物也必将是非常有意义的工作。

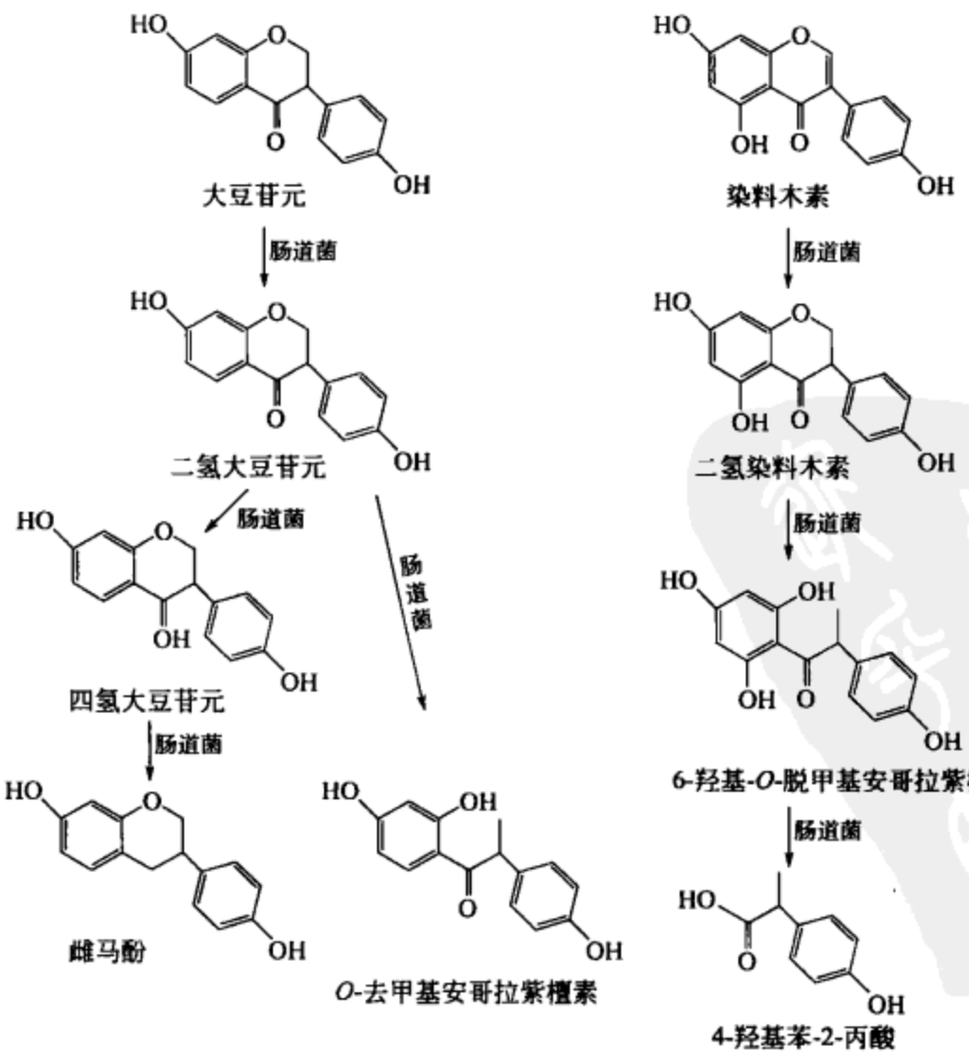
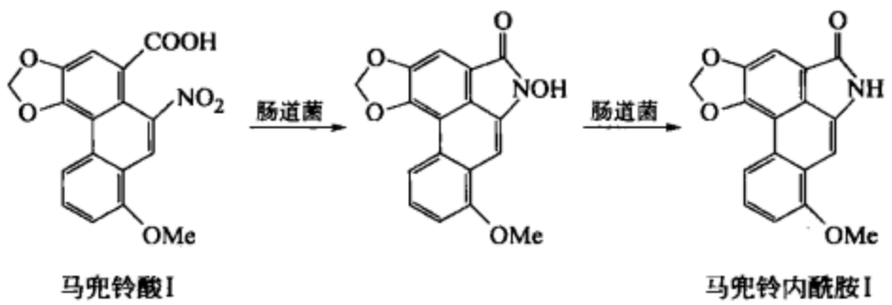


图 4.3-40　肠道菌代谢大豆苷元和染料木素的路线

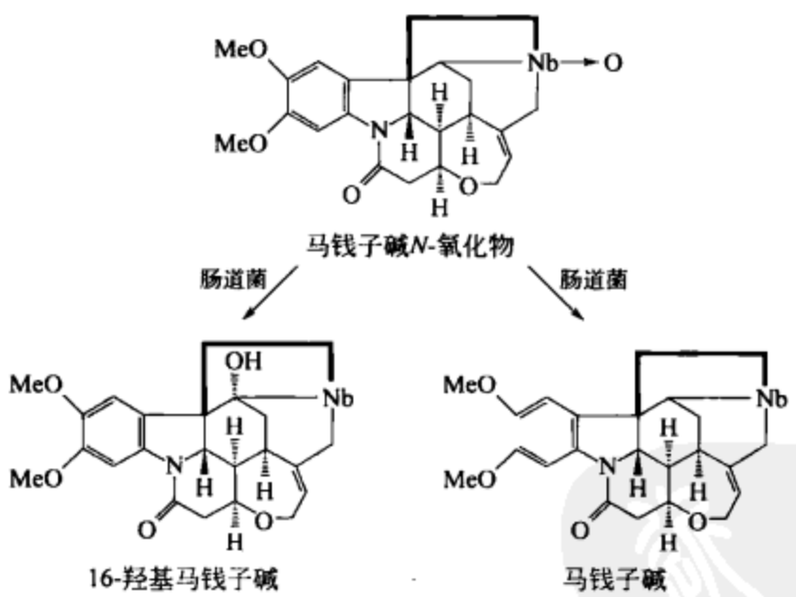
4.3.3.3 生物碱类

肠道细菌含有丰富的硝基还原酶和亚硝基还原酶，而肝脏不含有这些酶，因此，进入人体内的含有硝基和亚硝基的药物，其硝基、亚硝基的生物转化都是在肠道细菌的作用下完成的。而在天然药物中，含有氮、硝基或者亚硝基的生物碱类成分往往在肠道细菌的作用下，极有可能发生各类还原反应，图 4.3-41 和图 4.3-42 显示了肠道菌将马兜铃酸（aristolochic acid Ⅰ）转化为马兜铃内酰胺（aristo-lactam Ⅰ）、马钱子碱 *N*-氧化物（brucine *N*-oxide）转化为马钱子碱（brucine）的路线过程。



马兜铃酸Ⅰ　　马兜铃内酰胺Ⅰ

图 4.3-41　人肠道菌代谢马兜铃酸Ⅰ为马兜铃内酰胺的路线



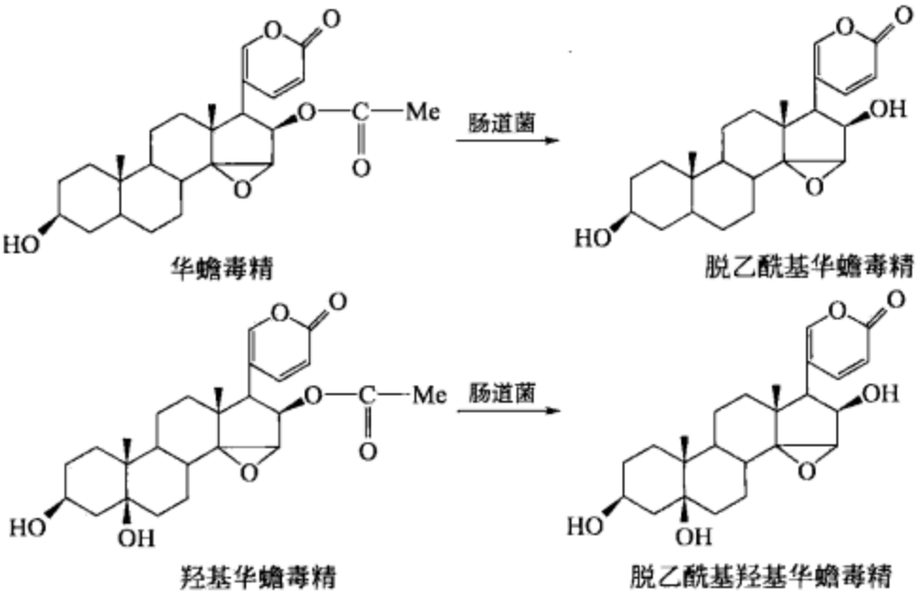
马钱子碱*N*-氧化物

图 4.3-42　人肠道菌代谢马钱子碱 *N*-氧化物为马钱子碱的路线

4.3.3.4 甾类化合物

与其他类天然产物相比，有关甾类化合物的研究报道相对较少，而其中以肠道菌群对蟾酥中的主要成分——华蟾毒精和羟基华蟾毒精的代谢研究较为多见。胃内以链球菌和乳杆菌为优势菌群，十二指肠以韦荣球菌、乳杆菌和链球菌为优势菌群，回肠以韦荣球菌、乳杆菌、链球菌、双歧杆菌和消化链球菌为优势菌群，盲肠和直肠以拟杆菌、双歧杆菌和消化链球菌为优势菌群，均为华蟾毒精和羟基华蟾毒精代谢研究中的优势菌群。而华蟾毒精代谢产物为其脱乙酰化产物——脱乙酰基华蟾毒精，羟基华蟾毒精代谢产物为其脱乙酰化产物——脱乙酰基羟基华蟾毒精。其反应路线如图 4.3-43 所示，两种主要代谢产物的生物活性试验结果表明，与原形

化合物相比，代谢产物几乎丧失了对肿瘤细胞生长的抑制作用。



华蟾毒精　　脱乙酰基华蟾毒精

羟基华蟾毒精　　脱乙酰基羟基华蟾毒精

图 4.3-43　华蟾毒精和羟基华蟾毒精的大肠杆菌代谢

4.3.3.5　萜类化合物

萜类化合物在天然药物中分布广泛，其中研究较多的产物首属人参。人参主要含有人参二醇类皂苷和人参三醇类皂苷化合物，其中人参二醇类皂苷包括 20(*S*)-人参二醇，人参皂苷 Rb1、Rb2、Rbc、Rbd、20 (*R*)-Rg3、RS3，化合物 K 和人参皂苷 Rh2 等；人参三醇类皂苷包括 20 (*S*)-人参三醇，人参皂苷 Re、Rg1、Rg2、20 (*S*)-Rg2、20 (*R*)-Rg2、Rh1 等。当口服人参后，其各种皂苷化合物经过肠道菌的特殊作用代谢产生各种活性成分，Karikura[130]报道指出，如图 4.3-44 所示，人参二醇型的人参皂苷，如 Rb1、Rb2、和 Rc 都可以在各种肠道菌的作用下代谢产生化合物 C～K。而 Hasegawa[131]指出，在尿液和血浆样本中检测到的主要降解物是化合物 K、人参皂苷 Rh1 和人参皂苷 F1 等。由此说明，降解的人参皂苷比未降解的人参皂苷更易于吸收到血液中。与降解的人参皂苷相比，未代谢的人参皂苷的生物活性很低。给小鼠静脉注射化合物 K，化合物 K 大部分由胆汁排泄；而少部分化合物 K，其结构中位于脂肪酸部分的 C3 糖苷键或 C6 糖苷键酯化，而酯化形式化合物 K 更容易在肝脏中积累，而且酯化的化合物 K 比化合物 K 本身更能抑制肿瘤的生长。在各种肠道菌转化人参皂苷为化合物 (C～K) 的过程中，梭杆菌 [*Fusobacterium* sp. (K-60)]、普氏菌 (*Prevotella* Shan and Collins)、双歧杆菌、拟杆菌和真杆菌等都起到一定的作用；真杆菌、拟杆菌和双歧杆菌可以将化合物 K 转化为 20 (*S*)-人参二醇和代谢产物 M1 [20-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖基-20-(*S*)-人参二醇]。与此同时，Wakabayashi[132]将 M1 静脉注射给小鼠后，一部分 M1 可以选择性地在肝脏中蓄积，并经胆汁排泄；而大部分 M1 则在肝脏中转化为相应的脂肪酸酯 EM1，体外药效学试验证明，EM1 对黑素瘤细胞的细胞毒作用弱于 M1，而 EM1 在体内抑制肿瘤生长的作用强于 M1，由此推测 M1 的代谢产物可能为人参皂苷在体内产生生物活性的真正成分。

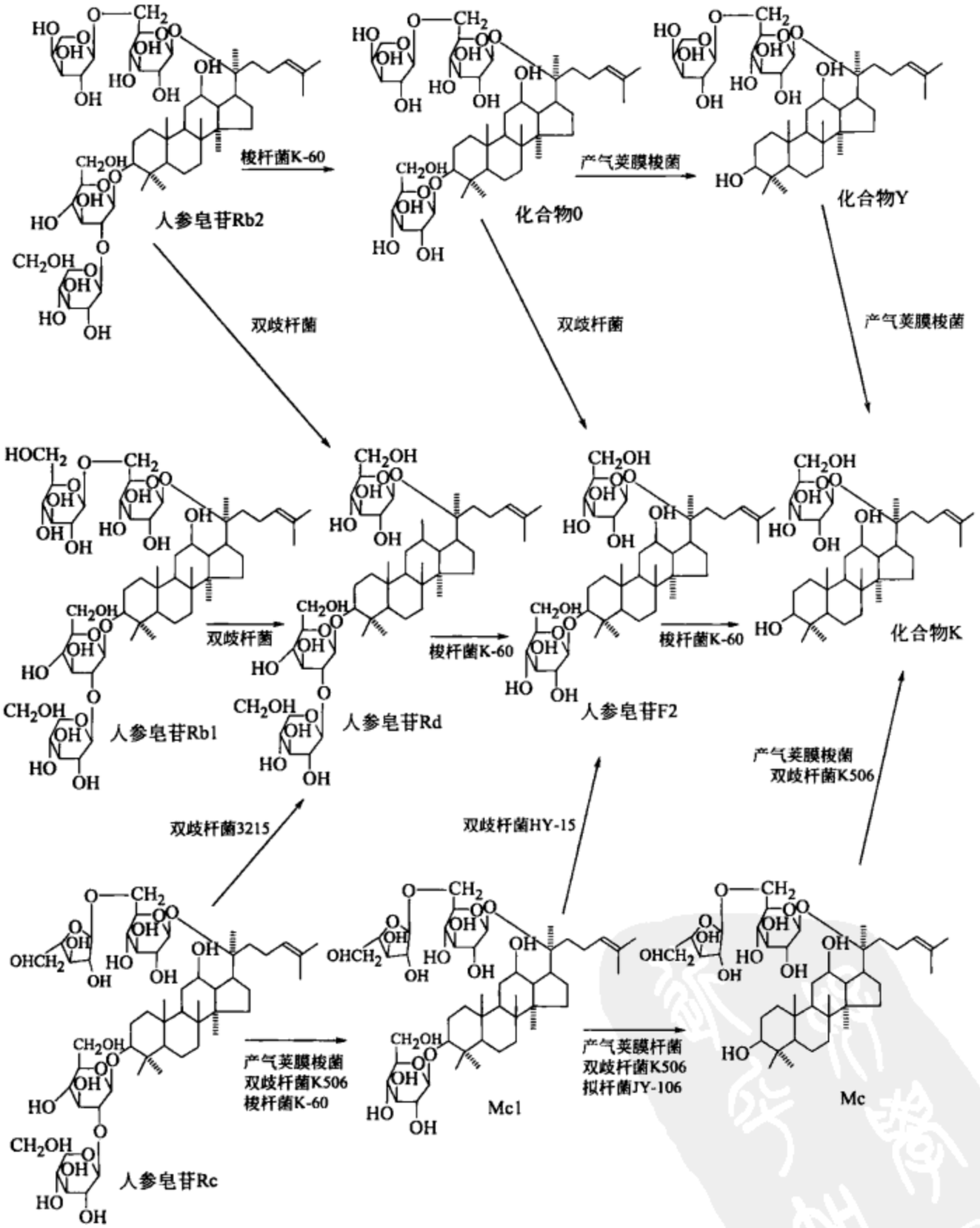


图 4.3-44　口服人参后，肠道菌代谢人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc 和 Rd 为化合物 K 的途径

而人参三醇类皂苷（Re）与上述二醇类代谢产物类似，如图 4.3-45 所示，人参皂苷 Re 可能被肠道菌（类杆菌）水解为 Rg2 或 Rg1，再代谢去除鼠李糖（rhamnose）转变为人参皂苷 Rh1。而未代谢人参皂苷 Re 同样可以到达大肠，并由肠道细菌代谢形成 F1 和 20（S）-原人参三醇。据此推测人参皂苷代谢产物 Rh1

和人参皂苷 F1 及 20（S)-原人参三醇可能是人参皂苷（Re）主要的活性代谢产物。肠道菌在人参的药效发挥中起到“活化”作用。综上所述，由于肠道菌对天然药物的水解、还原、氧化、酯化、乙酰化等多种催化作用，其必将在天然药物在体内发挥作用的过程中扮演越来越重要的角色。而利用这种特殊的催化作用，发现和产生具有全新药理活性的新药候选物，也将是一种非常有意义的工作思路。

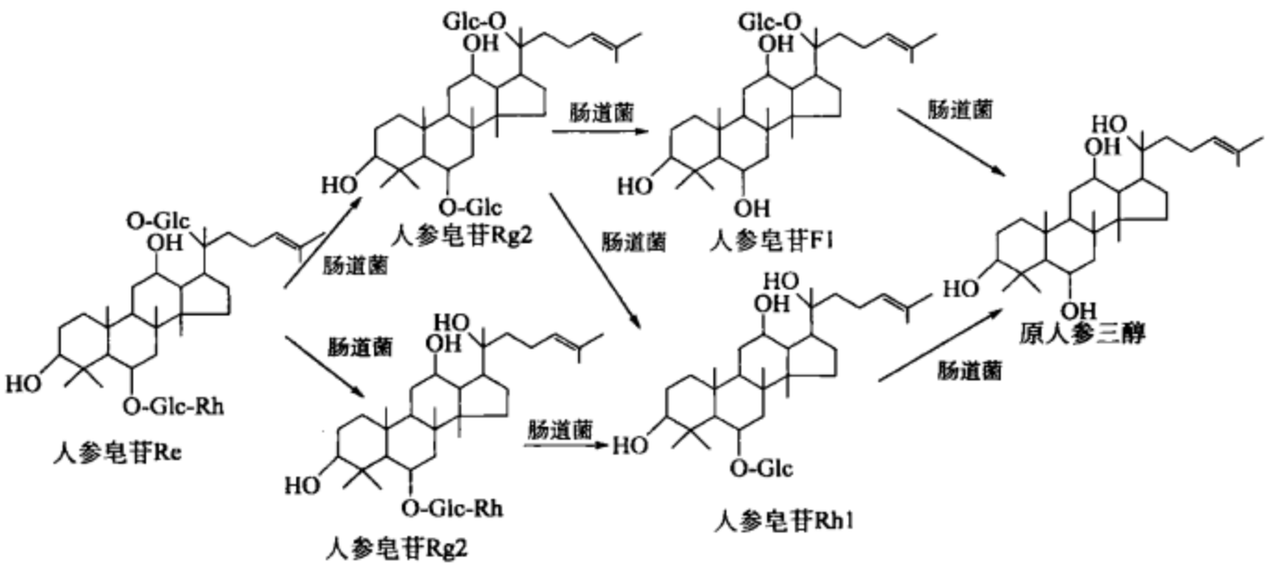


图 4.3-45　人肠道菌代谢人参皂苷 Re 的途径

4.4　应用举例——计算机模拟全自动控制一体外胃肠道模拟系统（TIM）在药物生物代谢解毒中的应用

4.4.1　TIM 系统

由荷兰 TNO 营养和食物研究所研发的 TIM 系统，近年来已经广泛地应用在药物的代谢、转化、生物合成及生物解毒研究等诸多方面，与多种体外的胃肠转化模型包括悉生动物、Caco-2 模型、MDCK 等模型相比，其具有与人体内代谢环境相似度高、计算机全程控制优化程度高及能够多层次、多水平、多部位控制药物的代谢等特点。依据控制位置的不同，该系统分为 TIM1 和 TIM2 两个部分。其工作原理如下。

（1）胃-小肠消化系统（TIM1）　如图 4.4-1 所示，由四个连续部分——模拟胃、十二指肠、空肠和回肠组成。每一个小室有玻璃装置和一个灵活的内壁。由泵入玻璃套和灵活内壁之间空隙中的水来保持系统温度（37℃），以改变水压来模拟肠蠕动，用计算机控制食物的传送。食糜的运输由与小室连接的蠕动管的开或关来调节，每个小室的容积由与计算机连接的压力传感器控制并调节空肠的吸收，pH 值由电脑监控并连续调节各个小室。在胃中，pH 值遵循预先设定的数值变化，在时间分别为 5min、20min、60min、90min 时，其控制的 pH 值分别为 4.5、4.2、

2.1、1.7，而在小肠、十二指肠、空肠、回肠中其 pH 值分别保持在 6.5、6.8、7.2。胃、胆和胰腺部分也由计算机控制，水和消化产物由空肠和回肠部分泵入的透析液通过中空的纤维膜移除（流速，10ml/min），整个系统全程计算机控制，胃和回肠传送的数学模型参数可以由下列动力学方程计算：

$$f=1-2^{-(t/t_{1/2})\beta}$$

式中，f 代表食物碎片的传送；t 代表传送时间；$t_{1/2}$ 代表传送时间的一半；β 代表描述曲线的系数。

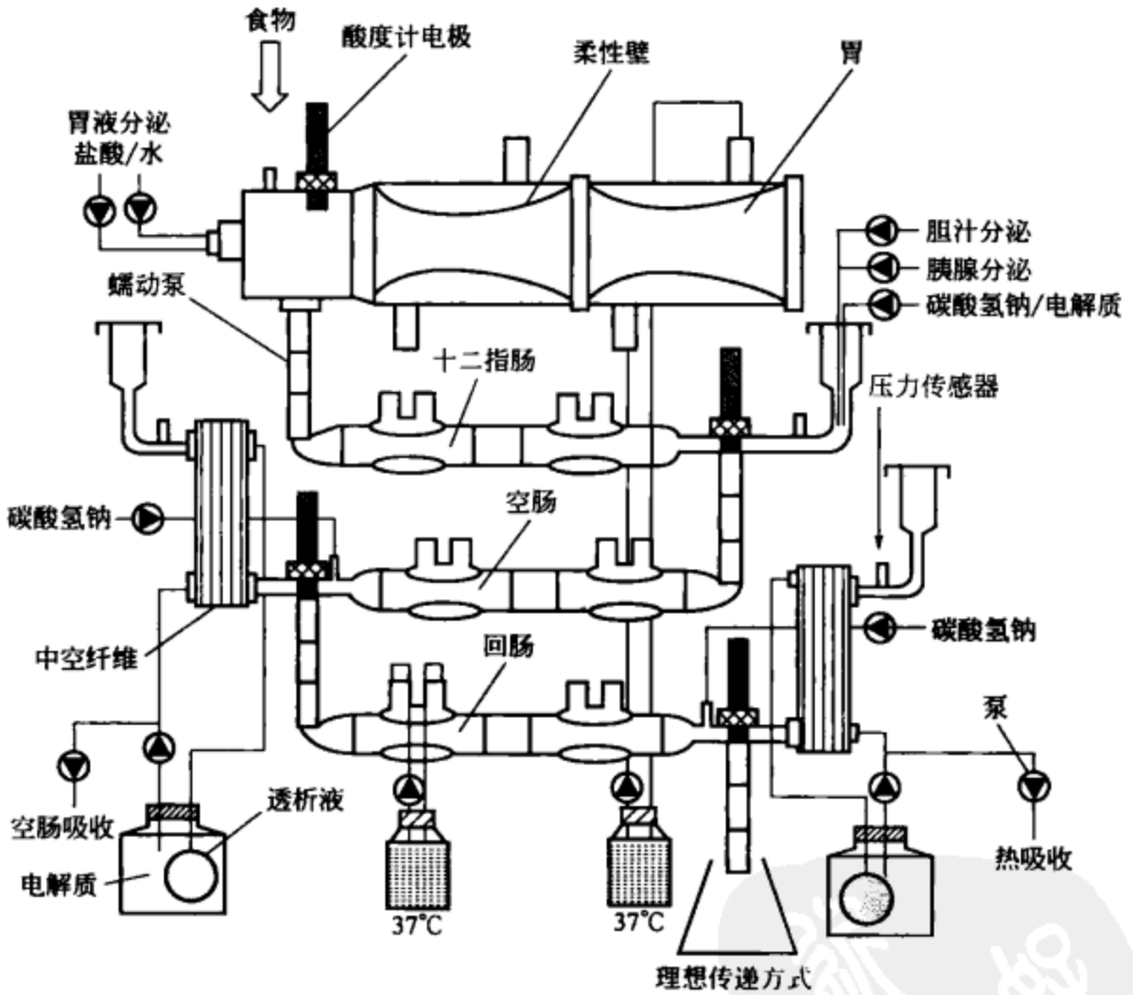


图 4.4-1　胃-小肠消化系统（TIM1）

根据人体的特点，设计的胃-小肠系统参数如下：胃排空时间的一半是 30min，动力学方程的系数 β 是 1，小肠传送食物时间的一半是 160min，β 系数为 1.6。

（2）大肠系统　如图 4.4-2 所示，大肠系统（TIM2）是由 TIM1 发展而来。接种的是新鲜的健康人类志愿者的粪便。在接种前，恒定培养 48h，以保持人类细菌种群的特征。例如，将双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌和梭状芽孢杆菌接种到大肠系统 TIM2 的培养介质中，控制的放料速率是 4ml/h，食糜以 2ml/h 的速度流动，36h 更新一次。系统充满氮气以保持厌氧状态，pH 值保持 5.8 以维持大肠模拟生存环境，而发酵产物，如短链脂肪酸和水通过中空纤维膜透析泵排出，其流速为 2ml/min。整个系统全程计算机控制，以保证大肠系统（TIM2）的正常工作。

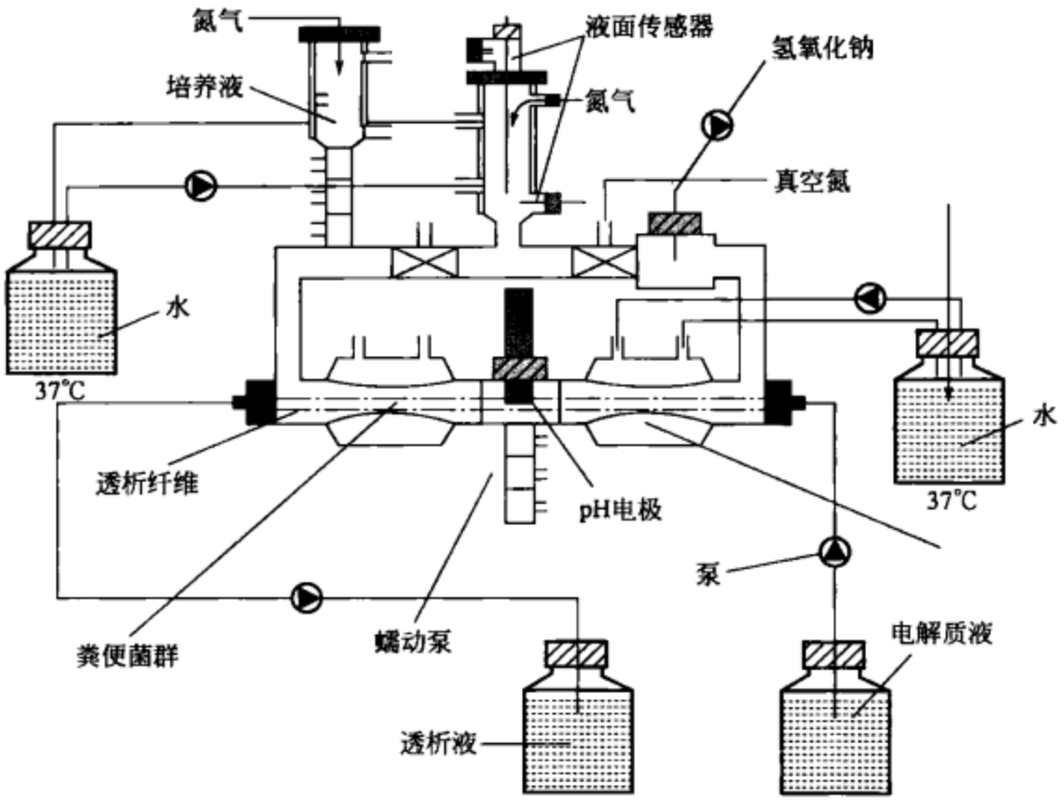


图 4.4-2　大肠系统（TIM2）

4.4.2　重组酵母对反式-肉桂酸的代谢（实例）[133]

以重组面包酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）为载体，体外表达异源肉桂酸-4-羟化酶（CA4H），以 TIM 模型模拟人体内的消化环境，研究重组酵母对反式-肉桂酸的代谢和可能的生物脱毒机制。生物药品发展的第一阶段，其中的一个挑战是发现合适的模型来模拟人体内的消化环境。以 TNO 胃肠道模型（TIM）为例，胃肠道模型由两部分组成：胃-小肠系统（TIM1）和大肠系统（TIM2）。这些多小室的、动态的、计算机控制的系统，是通过人体志愿者获得的参数和数据来设计的，它准确、可重复、容易操作并可在消化道的任何水平上和消化的任一时刻进行样品收集。用这个系统来评价消化道中微生物的代谢能力和机制，对创新药物的研究尤为重要。而应用基因工程设计重组肠道微生物，研究药物在体外的模拟消化环境下的生物转化，这不仅是基因工程技术和人体体外模型的完美组合，对于发展创新生物药物也是一个重要的挑战，也有很多潜在的医学应用，其中包括矫正胃或肠道的缺陷（例如，增加脂肪酶、胰蛋白酶、乳糖酶）或是器官缺陷（例如，在肾脏缺陷的情况下排出尿素）、生物解毒，或是在消化道中发现治疗蛋白的直接产物（例如，发现胰岛素、生长因子，或白细胞介素，或是疫苗的体内过程和代谢产物）。而在模仿人类胃肠道系统中，利用面包酵母为载体，通过重组部分面包酵母基因后，研究重组微生物在消化环境中的生物代谢解毒也同样具备一定的潜力。而利用重组酵母表达第一相反应酶，其中最具代表性的反应酶包括细胞色素 P450 酶或是第二相反应外源物质代谢酶，如谷胱甘肽-*S*-转移酶或 *N*-乙酰基转移酶，而这其中，细胞色素 P450 酶在人类的解毒系统中起重要的作用。而在以往的重组菌的研究中，其

中应用较多的是乳酸菌，乳酸菌也通常被认为是很有潜力的宿主菌，但是近年来的研究表明，与之相比，酵母菌则更具有特点，特别是在真核环境下常常需要异源基因的功能性表达，而面包酵母就是一种有希望的候选者，与前者相比，其具有更高的安全性和用于基因工程的可操作性。在 Blanquet[133] 报道的实验中，已经成功地利用重组面包酵母为载体，体外表达异源肉桂酸-4-羟化酶，并利用 TIM 模型模拟人体内的消化环境，研究重组酵母对反式-肉桂酸的代谢和可能的生物脱毒机制。其过程如下。

（1）生物脱毒酶的选择　如图 4.4-3 所示，P450 酶广泛存在于植物、微生物和人体等生物体内，参与多种生物的解毒机制。其中 P45073A1 肉桂酸 4-羟化酶没有毒性并且底物和产物容易定量，因此，在实验中多选择其作为重组酶，以此研究肉桂酸-4-羟化酶催化反式-肉桂酸-4-羟基化变为 P-香豆素酸（植物的苯丙途径中产生的第一步氧化反应）的代谢及其催化解毒机制。

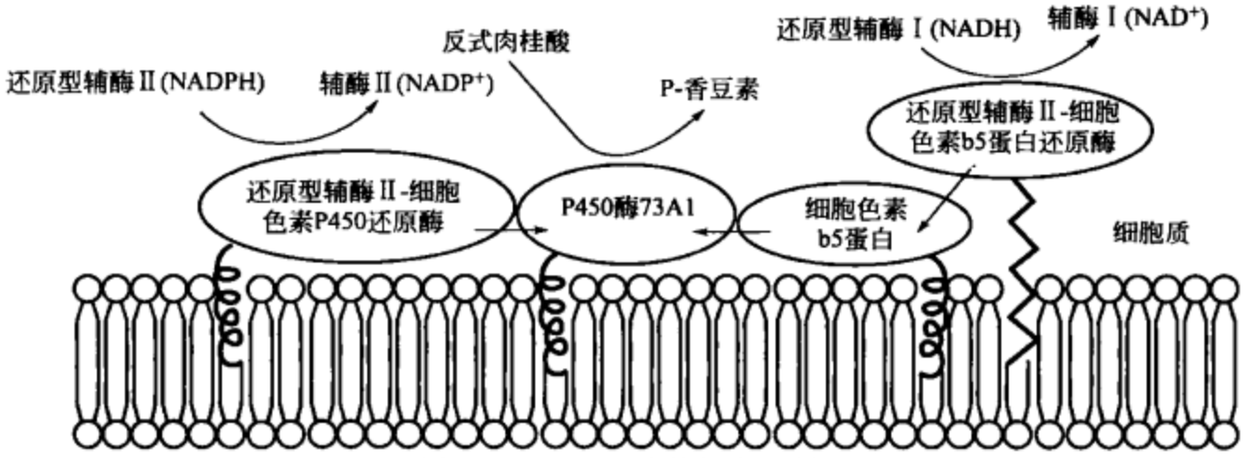


图 4.4-3　P450 酶的解毒机制

（2）重组酶的设计和方法　如图 4.4-4 所示，面包酵母是基因工程重组菌，其重组部分由磷酸甘油酸激酶、肉桂酸-4-羟化酶阅读框和酵母表达携带者 pYeDP60 等组成。这个质粒是根据酵母的微环起始复制，URA3 和 ADE2 作为选择性标记，由 GAL10-CYC1 作为启动子和磷酸甘油酸激酶作为终止子构成的表达框。

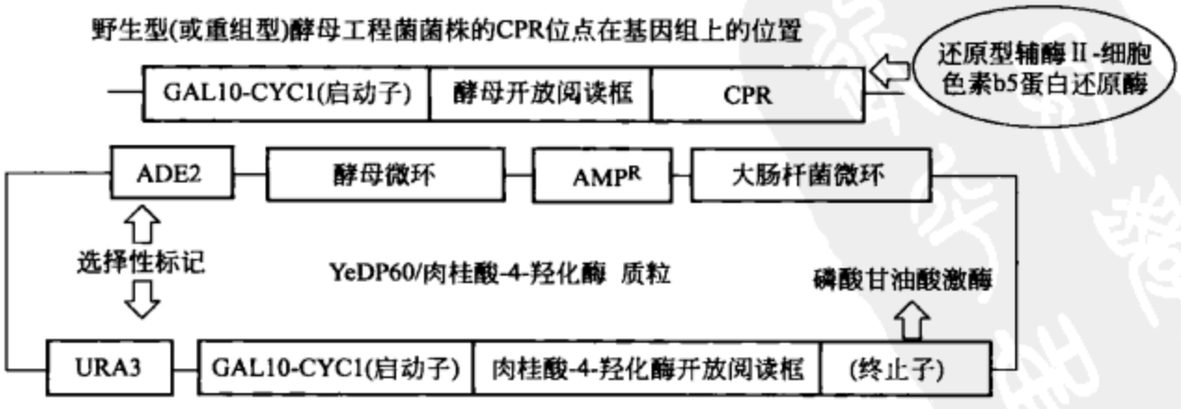


图 4.4-4　面包酵母的重组模型

（3）试验结论　以酵母细胞的残留率和肉桂酸-4-羟化酶的活性作为评价指标，重组酵母对胃和小肠有高水平的抗性（消化 4h 后的残留率为 95.6%±10.1%），

但是对于结肠的环境比较敏感（消化4h后的残留率仅为35.9%±2.7%）。重组面包酵母能在体外模拟的人消化系统中，完成体内肉桂酸-4-羟化酶的特殊生物脱毒转化反应：肉桂酸-4-羟化酶催化反式-肉桂酸-4-羟基化变为P-香豆素酸。研究结果表明，在胃-小肠系统，经4h消化后，吸收的肉桂酸中有41.0%转变为P-香豆素。与此类似，在十二指肠中肉桂酸的转化率为13.8%，依次为空肠11.8%、回肠6.5%。而在大肠系统中，肉桂酸-4-羟化酶含量太少，不能定量测定，由此说明重组酵母——面包酵母可以作为在胃肠道中药物代谢解毒的合适载体，完全有可能模拟药物在人类消化道中直接进行生物转化过程，而研究面包酵母重组菌在人工胃肠道系统（TIM）中表达P450 73A1肉桂酸-4-羟化酶的活性变化，必将为进一步利用基因工程，发现肠道菌转化药物或者代谢解毒机制，提供一种有效的方法和思路。

4.5 展望

肠道菌对药物的代谢，可使无活性型药物转换为活性型药物，或者使有毒性的天然产物、转化为低毒性的产物，使药物的各种成分在肠道菌的作用下代谢或修饰，实现药物的生物转化。围绕肠道细菌的各种体、内外模型的建立，极大地促进了各种药物的代谢学的研究，与此同时，各种模拟胃、肠道代谢的模式菌或者模拟全消化道模型的建立，都为发现新的药物活性成分，提供了有利的研究工具，而利用肠道菌进行中草药体内代谢的研究也独具特色。可以预见，随着多种基因肠道代谢工程菌的建立，更多的药物代谢机理、其体内作用机制以及药物与药效和毒性的关系，将陆续被揭示。虽然我国利用肠道菌的研究刚刚起步，但是，随着认识的深入和各种研究肠道菌药物代谢方法的熟练掌握，药物的肠道菌代谢在药物创新研究中的应用，将日益受到药物研究者的重视和关注。

参考文献

[1] Scheline RR. Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. Pharmacol Rev, 1973, 25 (4): 451-523.

[2] Thomas LA, Veysey MJ, French G., et al. Bile acid metabolism by fresh human colonic contents: a comparison of caecal versusfaecal samples. Gut, 2001, 49 (6): 835-842.

[3] Nagengast FM, Grubben MJ, van Munster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. Eur J Cancer, 1995, 31 (7-8): 1067-1070.

[4] Narushima S, Itoha K, Miyamoto Y, et al. Deoxycholic acid formation in gnotobiotic mice associated with human intestinal bacteria. Lipids, 2006, 41 (9): 835-843.

[5] Fuller A, T Is. p-aminobenzenesulphonamide the active agent in prontosiltherapy. Lancet, 1937, 1: 194-198.

[6] Gingell R, Bridges JW, Williams RT. The role of the gut flora in the metabolism of prontosil and neoprontosil in the rat. Xenobiotica, 1971, 1 (2): 143-156.

[7] Bachrach WH. Sulfasalazine I. An historical perspective. Am J Gastroenterol, 1988, 83 (5):

487-496.

[8] Svartz N. Sulfasalazine: Ⅱ. Some notes on the discovery and development of salazopyrin. Am J Gastroenterol, 1988, 83 (5): 497-503.

[9] Peppercorn MA, Goldman P. Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites. Gastroenterology, 1973, 64 (2): 240-245.

[10] Peppercorn MA, Goldman P. Drug-bacteria interactions. Rev Drug Inter II, 1976: 75-88.

[11] Hayllar J, Bjarnason I. Sulphasalazine in ulcerative colitis: in memoriam. Gut , 1991, 32 (5): 462-463.

[12] Chan RP, Pope DJ, Gilbert AP, et al. Studies of two novel sulfasalazine analogs, ipsalazide and balsalazide. Dig Dis Sci, 1983, 28 (7): 609-615.

[13] Wadworth AN, Fitton A. Olsalazine—a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in inflammatory bowel disease. Drugs, 1991, 41 (4): 647-664.

[14] Rafii F, Sutherland JB, Hansen EB, et al. Reduction of nitrazepam by clostridium leptum, a nitroreductase producing bacterium isolated from the human intestinal tract. Clin Infect Dis, 1997, 25 (2): S121-S122.

[15] Takeno S, Nakagawa M, Sakai T. Teratogenic effects of nitrazepam in rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1990, 69 (1): 59-70.

[16] Takeno S, Hirano Y, Kitamura A, et al. Comparative development toxicity and metabolism of nitrazepam in rats and mice. Toxicol Appl Pharmacol, 1993, 121 (2): 233-238.

[17] Elmer GW, Remmel RP. Role of intestinal microflora in clonazepam metabolism in the rat. Xenobiotica, 1984, 14 (11): 829-840.

[18] Koch RL, Beaulieu BB, Goldman P. Role of the intestinal flora in the metabolism of misonidazole. Biochem Pharmacol, 1980, 29 (4): 3281-3284.

[19] Watanabe K, Yamashita S, Furuno K, et al. Metabolism of omeprazole by gut flora in rats. J Pharm Sci, 1995, 84 (4): 516-517.

[20] Strong HA, Renwick AG, George CF, et al. The reduction of sulphinpyrazone and sulindac by intestinal bacteria. Xenobiotica , 1987, 17 (6): 685-696.

[21] Lindenbaum J, Rund DG, Butler Jr, et al. Inactivation of digoxin by the gut flora: reversal by antibiotic therapy. N Engl J Med, 1981, 305 (14): 789-794.

[22] Kitamura S, Sugihara K, Kuwasako M, et al. The role of mammalian intestinal bacteria in the reductive metabolism of zonisamide. J Pharm Pharmacol, 1997, 49 (3): 253-256.

[23] Koch RL, Goldman P. The anaerobic metabolism of metronidazole forms n- (2-hydroxyethyl) -oxamic acid. J Pharmacol Exp Ther, 1979, 208 (3): 406-410.

[24] Koch RL, Beaulieu Jr BB, et al. A metronidazole metabolite in human urine and its risk. Science, 1981, 211 (4480): 398-400.

[25] Elkington SG, Floch MH, Conn HO. Lactulose in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. N Engl J Med, 1969, 281 (8): 408-412.

[26] Nakayama H, Kinouchi T, Kataoka K, et al. Intestinal anaerobic bacteria hydrolyse sorivudine, producing the high bloodconcentration of 5-(e)-(2-bromovinyl) uracil that increases the level and toxicity of 5-fluorouracil. Pharmacogenetics, 1997, 7 (1): 35-43.

[27] Poth EJ, Knotts FL, Lee JT, et al. Bacteriostatic properties of sulfanilamide and some of its derivatives. Arch Surg, 1942, 44 (2): 187-207.

[28] Goldin BR, Peppercorn MA, Goldman P. Contributions of host and intestinal microflora in the metabolism of l-dopa by the rat. J Pharmacol Exp Ther, 1973, 186 (1): 160.

[29] Dull BJ, Salata K, Goldman P. Role of the intestinal flora in the acetylation of sulphasalazine metabo-

lites. Biochem Pharmacol, 1987, 36 (21): 3772-3774.

[30] Van Hogezand RA, Kennis HM, Van Schaik A, et al. Bacterial acetylation of 5-aminosalicylic acid in faecal suspensions cul-tured under aerobic and anaerobic conditions. Eur J Clin Pharmacol, 1992, 43 (2): 189-192.

[31] Delomenie C, Fouix S, Longuemaux S, et al. Identification and functional characterization of arylamine n-acetyltransferases in eubacteria: evidence for highly selective acetylation of 5-aminosalicylic acid. J Bacteriol, 2001, 183 (11): 3417-3427.

[32] Smith GE, Griffiths LA. Metabolism of n-acetylated and o-alkylated drugs by the intestinal microflora during anaerobic incubation in vitro. Xenobiotica, 1974, 4 (8): 477-487.

[33] Basit AW, Lacey LF. Colonic metabolism of ranitidine: implications for its delivery and absorption. Int J Pharm, 2001, 227 (1-2): 157-165.

[34] Basit AW, Podczeck F, Newton JM, et al. The use of formulation technology to assess regional gastrointestinal drug absorption in humans. Eur J Pharm Sci, 2004, 21 (2-3): 179-189.

[35] Basit AW, Newton JM, Lacey LF. Susceptibility of the H2-receptor antagonists cimetidine, famotidine and nizatidine, to metabolism by the gas-trointestinal microflora. Int J Pharm, 2002, 237 (1-2): 23-33.

[36] Tozaki H, Emi Y, Horisaka E, et al. Metabolism of peptide drugs by the microorganisms in rat cecal contents. Biol Pharm Bull, 1995, 18 (6): 929-931.

[37] Tozaki H, Emi Y, Horisaka E, et al. Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat caecal contents: implications in peptide delivery to the colon. J Pharm Pharmacol, 1997, 49 (2): 164-168.

[38] Abu MS, Beckett AH. Glyceryl trinitrate: metabolism by the intestinal flora. J Pharm Pharmacol, 1983, 35: 71P.

[39] Holt R. The bacterial degradation of chloramphenicol. Lancet, 1967, 1 (7502): 1259.

[40] Schiller LR. Evaluation of small bowel bacterial overgrowth. Curr. Gastroenterol Rep, 2007, 9 (5): 373-377.

[41] Smith RV. Metabolism of drugs and other foreign compounds by intestinal microorganisms. World Rev Nutr Diet, 1978, 29: 60-76.

[42] Shu YZ, Kingston DGI, Van Tassell RL, et al. Metabolism of levamisole, an anti-colon cancer drug, by human intestinal bacteria. Xenobiotica, 1991, 21 (6): 737-750.

[43] Meuldermans W, Hendrickx J, Mannens G, et al. The metabolism and excretion of risperidone after oral administration in rats and dogs. Drug Metab Dispos, 1994, 22 (1): 129-138.

[44] Schneider H, Simmering R, Hartmann L, et al. Degradation of quercetin3-glucoside in gnotobiotic rats, associated with human intestinal bacteria. J Appl Microbiol, 2000, 89 (6): 1027-1037.

[45] Caldwell J, Hawksworth GM. The demethylation of methamphetamine by intestinal microflora. J Pharm Pharmacol, 1973, 25 (5): 422-424.

[46] Sasaki I, Tamura T, Shibakawa T, et al. Metabolism of azetirelin, a new thyrotropin-releasing hormone (trh) analogue, by intestinal microorganisms. Pharm Res, 1997, 14 (8): 1004-1007.

[47] Yoshisue K, Masuda H, Matsushima E, et al. Tissue distribution and biotransformation of potassium oxonate after oral administration of a novel antitumor agent (drug combination of tegafur, 5-chloro-2, 4-dihydro- xypyridine, and potassium oxonate) to rats. Drug Metab Dispos, 2000, 28 (10): 1162-1167.

[48] Vermes A, Kuijper EJ, Guchelaar HJ, et al. An in vitro study on the active conversion of flucytosine to fluorouracil by microorganisms in the human intestinal microflora. Chemotherapy, 2003, 49 (1-2): 17-23.

[49] Lee NK, Choi SH, Park SH, et al. Antiallergic activity of hesperidin is activated by intestinal microflora. Pharmacology, 2004, 71 (4): 174-180.

[50] Coates ME, Drasar BS, Mallett AK, et al. Methodological considerations for the study of bacterial metabolism. In: Rowland, I. R. (Ed.), Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer. London: Academic Press, 2004.

[51] Goldman P. Gnotobiotic rats in studies of drug metabolism. In: Coates, M. E., Gustafsson, B. E. (Eds.), The Germfree Animal in Biomedical Research. London: Laboratory Animals Ltd, 1984.

[52] Edwards CA, Parrett AM. Colonic fermentation—in vitro and in vivo approaches to measurement. Sci. Aliment, 1999, 19 (3-4): 291-300.

[53] Gorbach SL, Nahas L, Weinstein L, et al. Studies of intestinal microflora. IV. The microflora of ileostomy effluent: a unique microbial ecology. Gastroenterology, 1967, 53 (6): 874-880.

[54] Gibson GR, Fuller R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J Nutr, 2000, 130 (2S Suppl): 391S-395S.

[55] Wilson PJ, Basit AW. Exploiting gastrointestinal bacteria to target drugs to the colon: an in vitro study using amylose coated tablets. Int J Pharm, 2005, 300 (1-2): 89-94.

[56] McConnell EL, Tutas J, Mohamed MAM, et al. Colonic drug delivery using amylose films: the role of aqueous ethylcellulose dispersions in controlling drug release. Cellulose, 2007, 14 (1): 25-34.

[57] McConnell EL, Short MD, Basit AW. An in vivo comparison of intestinal pH and bacteria as physiological trigger mechanisms for colonic targeting in man. J Control Release, 2008b, 130 (2): 154-160.

[58] Siew LF, Man SM, Newton JM, et al. Amylose formulations for drug delivery to the colon: a comparison of two fermentation models to assess colonic targeting performance in vitro. Int J Pharm. 2004, 273 (1-2): 129-134.

[59] Yang L. Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. J Control Release, 2008, 125 (2): 77-86.

[60] Rumney CJ, Rowland IR. In vivo and in vitro models of the human colonic flora. Crit Rev Food Sci Nutr, 1992, 31 (4): 299-331.

[61] Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1997, 21 (6): 357-365.

[62] Molly K, Vande Woestyne M, Verstraete W. Development of a 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. Appl. Microbiol Biotechnol, 1993, 39 (2): 254-258.

[63] De Boever P, Deplancke B, Verstraete W. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. J Nutr, 2000, 130 (10): 2599-2606.

[64] Possemiers S, Verthe K, Uyttendaele S, et al. Pcr-dgge-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. FEMS Microbiol Ecol, 2004, 49 (3): 495-507.

[65] Minekus M, Smeets-Peeters M, Bernalier, et al. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 53 (1): 108-114.

[66] Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. Microb Ecol, 1998, 35 (2): 180-187.

[67] Schmiedlin RP, Thummel KE, Fisher JM. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin

D3. Mol Pharmacol, 1997, 51 (5): 741-754.

[68] Patel J, Buddha B, Dey S, et al. In vitro interaction of the H IVp rotease inhibitor ritonavirwith herbal constituents: changes in Pgp and CYP3A4 activity. Am J Ther, 2004, 11 (4): 262.

[69] Knight B, Troutman M, Thakker DR. Deconvoluting the effects of P-glycoprotein on intestinal CYP3A: a major challenge. Curr Opin Pharmacol, 2006, 6 (5): 528-532.

[70] Beumer JH, Franke NE, Tolboom R, et al. Disposition and toxicity of trabectedin (ET-743) in wild-type and mdr1 gene (P-gp) knock-out mice. Invest New Drugs, 2010, 28 (2): 145-155.

[71] Odani T, Tanizawa H, Takino Y, et al. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. IV. Decomposition of ginsenoside-Rg1 and -Rb1 in the digestive tract of rats. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1983, 31 (10): 3691-3697.

[72] Takakusa H, Masumoto H, Makino C, et al. Quantitative assessment of reactive metabolite formation using 35S-labeled glutathione. Drug Metab Pharmacokinet, 2009, 24 (1): 100-107.

[73] Castro PJ. Current and future trends in the application of HPLC-MS to metabolite-identification studies. Drug Discov Today, 2007 12 (5-6): 249-256.

[74] Kong H, Wang M, Venema K, et al. Bioconversion of red ginseng saponins in the gastro-intestinal tract in vitro model studied by high-performance liquid chromatography-high resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. J Chromatogr A, 2009, 1216 (11): 2195-2203.

[75] Akao T, et al. Enzymatic reduction of sennidin and sennoside in peptost reptococcus intermedius. J Pharmacobiodyn, 1985, 8 (10): 800-807.

[76] Akao T, et al. Non-enzymatic reduction of sennidins and sennosides by reduced flavin. Chem Pharm Bull, 1987, 35 (5): 1998.

[77] Akao T, M Kanaoka, K Kobashi. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb1 byintestinal bacteria, in rat plasma after oral administration-measurement of compound K by enzyme immunoassay. Biol Pharm Bull, 1988, 21 (3): 245-249.

[78] Akao T. Differences in the metabolism of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and glycyrrhetic acid monoglucuronide by human intestinal flora. Biol Pharm Bull, 2000, 23 (12): 1418-1423.

[79] 左凤，严梅桢，周钟鸣. 肠道菌群对中药有效成分代谢作用的研究进展. 中国中药杂志，2002，27 (8)：568-572.

[80] 刘铁汉，王毅，王本祥等. 淫羊藿苷的肠菌代谢研究Ⅰ. 肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化. 中草药，2000，31 (11)：834-837.

[81] 杨秀伟，赵静，崔景荣等. 七叶树皂苷 2Ia 的人肠内细菌生物转化产物及其抗肿瘤活性研究. 北京大学学报（医学版），2004，36 (1)：31-35.

[82] 沈岚，徐德生，冯怡等. 大鼠肠内菌对麦冬皂苷 D′代谢的研究. 中国中药杂志，2005，30 (8)：618-620.

[83] Choo MK, PARK EK, YOON HK, et al. Antithrombotic and Antiallergic Activities of Daidzein, a Metabolite of Puerarin and Daidzin Produced by Human Intestinal Microflora. Biol Pharm Bull, 2002, 25 (10): 1328-1332.

[84] Park EK, Shin YW, Lee HU, et al. Passive Cutaneous Anaphylaxis-Inhibitory Action of Tectorigenin, a Metabolite of Tectoridin by Intestinal Microflora. Biol Pharm Bull, 2004, 27 (7): 1099-1102.

[85] Lee IA , Lee JH, Baek NI, et al. Antihyperlipidemic Effect of Crocin Isolated from the Fructus of Gardenia jasminoides and Its Metabolite Crocetin. Biol Pharm Bull, 2005, 28 (11): 2106-2110.

[86] BAE EA, YOOK CS, OH OJ, et al. Metabolism of Chiisanoside from Acanthopanax divaricatus var. albeofructus by Human Intestinal Bacteria and Its Relation to Some Biological Activities. Biol. Pharm. Bull., 2001, 24 (5): 582-585.

[87] 翁骏，吕秋军，田瑛等. 肠内菌群对积雪草苷的代谢转化研究. 中草药，2006，37 (7)：1008-1011.

[88] 杨秀伟，张建业，徐鬼等. 罗汉果皂苷Ⅲ的人肠内细菌生物转化. 北京大学学报（医学版），2007，39 (6)：657-662.

[89] 杨秀伟，张建业，徐鬼等. 山柰苷的人肠内细菌生物转化研究. 药学学报，2005，40 (8)：717-721.

[90] 张东明，宫濑敏男，野口博司等. 黄花倒水莲皂甙 *ReiniosideC* 在大鼠体内代谢产物的鉴定. 高等学校化学学报，2002，23 (1)：63-67.

[91] Akao T，Hayashi T，Kobashi K，et al. Intestinal bacterial hydrolysis indispensable to absorption of 18β-glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats. J Pharm Pharmacol，1994，46 (2)：135-137.

[92] Shimizu K，Amagaya S，Ogihara Y. Structural transformation of saikosaponins by gastric juice and intestinal flora. J Pharmacobiodyn，1985，8 (9)：718-725.

[93] Jin JS，Ishinata TN，Akiuchi NK. Biotransformation of C-Glucosylisoflavone Puerarin to Estrogenic (3S) -Equol in Co-culture of Two Human Intestinal Bacteria. Biol Pharm Bull，2008，31 (8)：1621-1625.

[94] Kanjana SA，T Akao，Li Y. Isolation of a Human Intestinal Bacterium That Transforms Mangiferin to Norathyriol and Inducibility of the Enzyme That Cleaves a C-Glucosyl Bond. Biol Pharm Bull，2005，28 (9)：1672-1678.

[95] Adell ES，et al. Metabolism of gentiopicroside (geutipicrin) by human intestinal bacteria. Chem Pharm Bull，1989，37 (9)：2435-2437.

[96] 赵锐，邢增涛，李向高. 肠内细菌对天然药物的化学修饰. 吉林农业大学学，1998，20 (2)：103-110.

[97] Xie LH，Ahn EM，T Akao，Transformation of Arctiin to Estrogenic and Antiestrogenic Substances by Human Intestinal Bacteria. Chem Pharm Bull，2003，51 (4)：378-384.

[98] Jin JS，Zhao YF，Akamura NN. Isolation and Characterization of a Human Intestinal Bacterium，Eubacterium sp. ARC-2，Capable of Demethylating Arctigenin，in the Essential Metabolic Process to Enterolactone. Biol Pharm Bull，2007，30 (5)：904-911.

[99] Jenner AM，Rafter J，Halliwell B. Human fecal water contents：the extent of colonic exposure to aromatic compounds. Free Radic Biol Med，38 (6)：763-772.

[100] Aura AM，Mattila I，Seppa T，et al. Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota：Comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. Phytochem Lett，2008，1 (1)：18-22.

[101] Griffiths LA，Smith GE. Metabolism of myricetin and related compounds in the rat metabolite formation in vivo and by intestinal microflora in vitro. Biochem J，1972a，130 (1)：141-151.

[102] Aura AM，O' Leary KA，Williamson G，et al. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal microflora in vitro. J Agric Food Chem，2002，50 (6)：1725-1730.

[103] Rechner AR，Smith MA，Kuhnle G，et al. Colonic metabolism of dietary polyphenols：influence of structure on microbial fermentation products. Free Radic Biol Med，2004，36 (2)：212-225.

[104] Krishnamurty HG，Cheng KJ，Jones GA，et al. Identification of products by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by Butyro-vibrio sp. C3. Can J Microbiol，1970，16 (8)：759-767.

[105] Vitaglione P，Donnarumma G，Napolitano A，et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. J Nutr，2007，137 (9)：2043-2048.

[106] Sawai Y，Kohsaka K，Nishiyama Y. Serum concentrations of rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans. Drug Res，1987，37 (6)：729-732.

[107] Winter J，Popoff MR，Grimont P，et al. Clostridium orbiscindens sp. nov.，a human intestinal bac-

terium capable of cleaving the flavonoid C-ring. Int J Syst Bacteriol , 1991, 41 (3): 355-357.

[108] Schneider H, Schwiertz A, Collins MD, et al. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. Arch Microbiol , 1999, 171 (2): 81-91.

[109] Hollman PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids. In: Rice-Evans C, Packer L (eds) Flavonoids in health & disease. New York: Marcel Dekker Inc, 1998: 483-522.

[110] Walle T, Walle UK, Halushka PV. *Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans.* J Nutr, 2001, 131 (10): 2648-2652.

[111] Keppler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. Bioorg Med Chem, 2005, 13 (17): 5195-5205.

[112] Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, et al. Stability and biotransformation of various dietary antho-cyanins in vitro. Eur J Nutr, 2006, 45 (1): 7-15.

[113] Aura AM, Martin LP, O' Leary KA, et al. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. Eur J Nutr, 2005, 44 (3): 133-142.

[114] Scheline RR. The metabolism of (+)-catechin to hydroxyphenylvaleric acids by the intestinal microflora. Biochim Biophys Acta, 1970, 222 (1): 228-230.

[115] Aura AM, Mattila I, Seppnen LT, et al. Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: Comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. Phytochem Lett, 2008, 1 (1): 18-22.

[116] Meselhy MR, Nakamura N, Hattori M. Biotransformation of (−)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. Chem Pharm Bull, 1997, 45 (5): 888-893.

[117] Das NP. Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. Biochem Pharmacol, 1971, 20 (12): 3435-3445.

[118] Lee MJ, Maliakal P, Chen L, et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (−)-epicatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. Cancer Epidemiol Biomarks Prev, 2002, 11 (10 pt1): 1025-1032.

[119] Meng X, Sang S, Zhu N, et al. Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. Chem Res Toxicol, 2002, 15 (8): 1041-1050.

[120] Rios LY, Gonthier MP, Re'mesy C, et al. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. Am J Clin Nutr, 2003, 77 (4): 912-918.

[121] Groenewoud G, Hundt HKL. *The microbial metabolism of condensed (+) -catechins by rat-caecal microflora.* Xenobiotica, 1986, 16 (2): 99-107.

[122] Peppercorn MA, Goldman P. Caffeic acid metabolism by bacteria of the human gastrointestinal tract. J Bacteriol, 1971, 108 (3): 996-1000.

[123] Cerda B, Espín JC, Parra S, et al. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. Eur J Nutr, 2004, 43 (4): 205-220.

[124] Cerda B, Llorach R, Ceron JJ, *et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin*, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. Eur J Nutr, 2003, 42 (1): 18-28.

[125] Penalvo JL, Haajanen KM, Botting N, et al. Quantification of lignans in food using isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. J Agric Food Chem, 2005, 53 (24): 9342-9347.

[126] Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K, et al. In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. J Agric Food Chem, 2000, 49 (7): 3178-3186.

[127] Saarinen NM, Smeds A, Hakala K, et al. Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 777 (1-3):

311-319.

[128] Jacobs E, Kulling SE, Metzler M. Novel metabolites of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol in human urine. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999, 68 (5-6): 211-218.

[129] Setchell KDR, Lawson AM, Borrilello SP, et al. Lignan formation in man microbial involvement and possible roles in relation to cancer. Lancet, 1981, 2 (8236): 4-7.

[130] Karikura M, Miyase T, Tanizawa H. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of Ginseng saponins. VI. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside Rb1 and Rb2 in the digestive tract of rats. Chem Pharm Bull, 1991, 39 (9): 2357-2361.

[131] Hasegawa H, Sung JH, Matsumiya S. Reversal of daunomycin and vinblastine resistance in multidrugresistant P388 leukemia in vitro through enhanced cytotoxicity by triterpenoids. Planta Med, 1995, 61 (5): 409-413.

[132] Wakabayashi C, Murakami K, Hasegawa H. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 246: (3) 725-730.

[133] S. Blanquet, Meunier JP, Minekus M. Recombinant Saccharomyces cerevisiae Expressing P450 in Artificial Digestive Systems: a Model for Biodetoxication in the Human Digestive Environment. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (5): 2884-2892.

第5章 海洋微生物在药物研究中的应用

5.1 海洋微生物及海洋药物

5.1.1 海洋微生物的概念

海洋微生物是指以海洋水体为正常栖息环境，或与海洋动植物为共生体的一切微生物，包括海洋病毒、古细菌、放线菌、真菌和微藻等。海洋占地球表面积的70%以上，海洋中有丰富的生物种类，占地球总量的80%。每毫升海水中含有10^4～10^6个微生物，而实际上海洋中仅有1%左右的微生物被分离鉴定，还有很多海洋微生物资源未得到开发利用。海洋是微生物资源的宝库，海洋环境的特殊条件——低温、高盐、富含矿物质等条件，决定了微生物种类的多样性和特殊性。与此同时，也为产生新的生物活性次生代谢物质创造了可能性。因此，在已有的筛选土壤微生物的方法和经验基础上，结合海洋微生物的特点进行改进或模拟海洋环境条件，分离多种海洋微生物，就极有可能成为微生物新药筛选的一个重要途径。

随着生物技术的发展，海洋活性物质的开发速度显著加快，海洋微生物作为活性物质的新来源正日益受到国内外海洋工作者的重视。起步于20世纪70年代的海洋微生物代谢产物的研究与开发工作，在过去近30年的时间里也取得了极大的进展，特别是近几年，其开发趋势明显上升。如图5.1-1所示，1965～2005年新开发的海洋天然产物平均每年仅为50种，而2007年就达到240多种。目前已从海洋微生物的代谢产物中分离出几百种活性物质。海洋药物的相关开发、资源利用的研究正在兴起[1]。

5.1.2 海洋药物的概念

海洋药物是指从海洋资源中提取、分离纯化后得到的具有生物学活性（例如抗

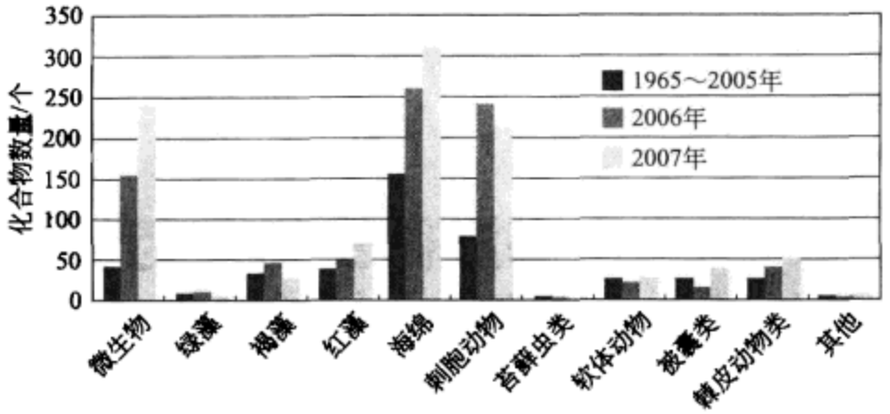


图 5.1-1　一些海洋天然产物在近年来的开发力度

注：1965～2005 年为平均数

菌、抗肿瘤、抗病毒、抗炎等）的多种代谢物。目前，已经从海洋细菌、放线菌、真菌等多种微生物中分离得到多种活性物质，包括大环内酯类、肽类、甾醇类、聚酮类、生物碱类、萜类、醌类、有机酸类和长链多元醇类等多种化合物，其中有些化合物已经进入临床研究或临床前研究工作，如抗肿瘤抗生素 Curacin A、抗病毒抗生素 Loloatins、抗细菌抗生素 Macrolactin A，刺激神经细胞生长的化合物 Epolactaene 和抗炎活性物质 Lobophorins 等，海洋药物开发已经成为当今开发新药、特药的主要方向之一。

5.1.3　海洋微生物药物产物来源

通常海洋微生物药物来源主要为：①一级代谢产物，又称初级代谢产物，指从微生物体内直接产生维持自身正常生理代谢活动的物质，如氨基酸、核酸、蛋白质、脂类和维生素等。②次级代谢产物，指微生物体在生长过程中通过一级代谢产物合成的一些对维持其本身生长无明显影响，但又有明确功能的一类代谢产物，通常海洋微生物药物来源于次生代谢产物。③共代谢产物，指在初级代谢能源存在的情况下，即微生物本身并不产生此种代谢物，微生物可将其转化（如通过基团修饰）成新的代谢物，在共生体中常常可见。

5.2　海洋微生物的分类及特点

海洋微生物分布极其广泛，由于目前对海洋微生物的开发并不完善，大量微生物尚未被发现。现已在海洋中发现的微生物主要属于以下系统类群：变形细菌群；革兰阳性细菌群（包括高 G+C 和低 G+C）；噬纤维菌群（黄杆菌群）；浮霉状菌/衣原体群及其他尚未被培养的系统类群等。早期对海洋细菌的研究多集中于从海水得到最多的革兰阴性菌，而后来在海洋沉积物、海洋共生系统和海水表面微生物群

落中也同样发现革兰阳性菌的广泛分布。在本章仅对一些开发热点微生物进行介绍。

5.2.1　海洋放线菌

5.2.1.1　海洋放线菌（*Marine actinomycetes*）的种系发生树

放线菌曾被认为仅仅是来源于土壤栖息的放线菌被冲刷到海洋环境中。虽然已经清楚某些土壤栖息的放线菌在海洋样品中也有发现（尤其是靠近陆地的海岸线），但是从1984年第一株海洋放线菌——海生红球菌 *Rhodococcus marinonascens*（Helmke & Weyland）的分类开始，到现在已经对海洋放线菌这一特殊种群有了新的认识。如图5.2-1所示，按照海洋放线菌种系发生，已将其分为6家族、13类群，包括新种 Salinispora 和 Mar 群。对其他 Mar 群的分类还未研究清楚，可能还存在很多新种[2,3]。

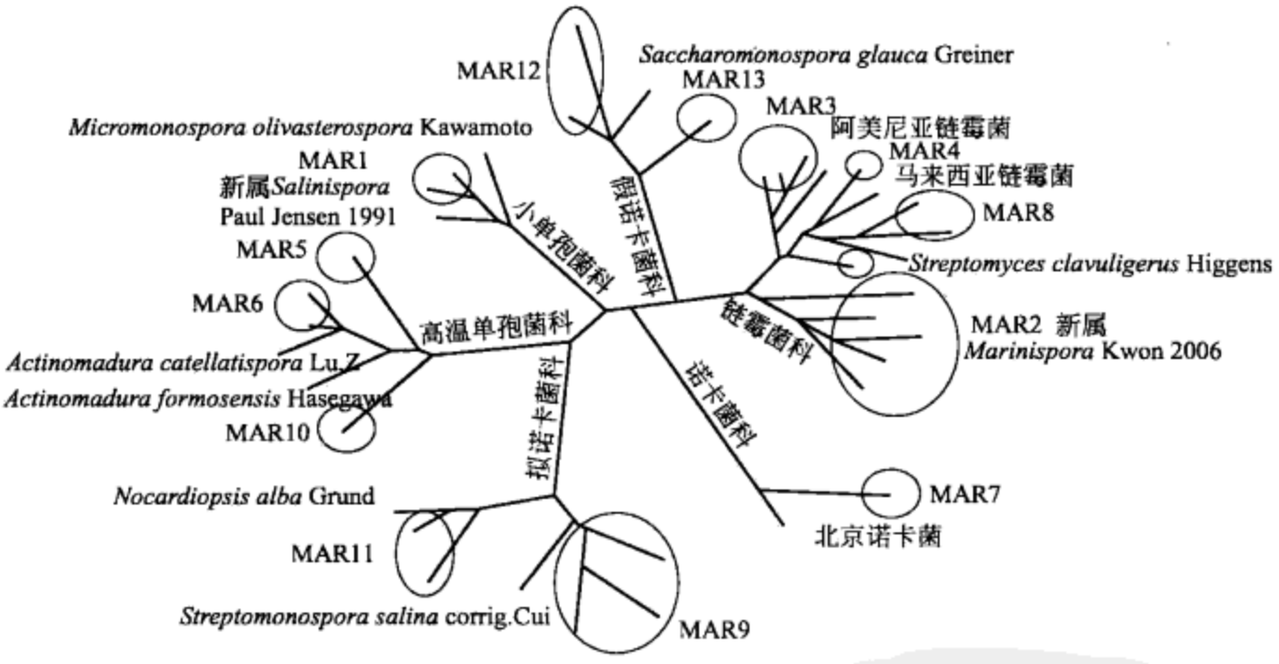


图5.2-1　海洋放线菌的系统发生树

5.2.1.2　海洋放线菌的种系与产生次生代谢物的关系

海洋放线菌是具有重要经济价值的微生物。目前，近年来50%以上的海洋微生物活性物质来自这个庞大的分离种群，仅 *Streptomyces coelicolor* Muller 中就发现20个基因簇能够产生预计超过105种次生代谢物。已经培养分离的多种放线菌，例如 *Salinispora tropica* Scripps 中，80%的菌株具有抑制肿瘤细胞生长的活性，35%的菌株兼有抗菌作用。从MAR2菌株也可获得聚酮化合物衍生的多烯类化合物，如MarinomycinA，具有很强的抗肿瘤、抗炎和抑制人体内耐药细菌的功能。令人兴奋的是，最近从海洋沉积物中培养的放线菌稀有物种——疣孢菌属（*Verrucosispora*），其产生环聚酮类化合物，如Abyssomicin C，作用于 *p*-氨基苯甲酸酯合成途径，有开发成为抗炎药物的潜力，在小单孢菌属（*Micromonospora*）中，

鉴定出 DNA-α 合酶抑制分子 Thiocoralin，已作为抗癌药物进入临床前研究。海洋生物学家 William Fenical 指出“人类对海洋放线菌的研究才刚刚开始”，其种系发生的复杂性，次生代谢物的多样性，究竟应用多广？这将是一个未来值得探究的话题[4]。

5.2.1.3 海洋放线菌基因组及其复杂性

2007 年，随着能够产生抗癌活性药物 Salinosporamide A 的第一个海洋放线菌 *Salinispora tropica* Scripps CNB-440 全基因组序列测序成功，这项重要的进展为研究海洋放线菌的代谢产物和如何通过提高发酵方法来提高它们的产量奠定了生物信息学基础。如图 5.2-2 所示，海洋放线菌 CNB-440 全基因组全长约 5.2Mbp，涉及聚酮合酶 PKS、Salinosporamide A（sal）、Sporolide A（spo）、Ymphostin（lym）和 Alinilactam A（slm）等 17 个基因簇，显示出了其次生代谢产物的复杂性。目前已经测序的放线菌基因组还有：*Salinispora tropica* Scripps（ATCC BAA-916T），*Salinispora arenicola* Maldonado（CNS205 和 ATCC BAA-917），其他放线菌，例如，在南极冰面发现的海洋放线菌 PHSC20C1 正在测序中[5,6]。

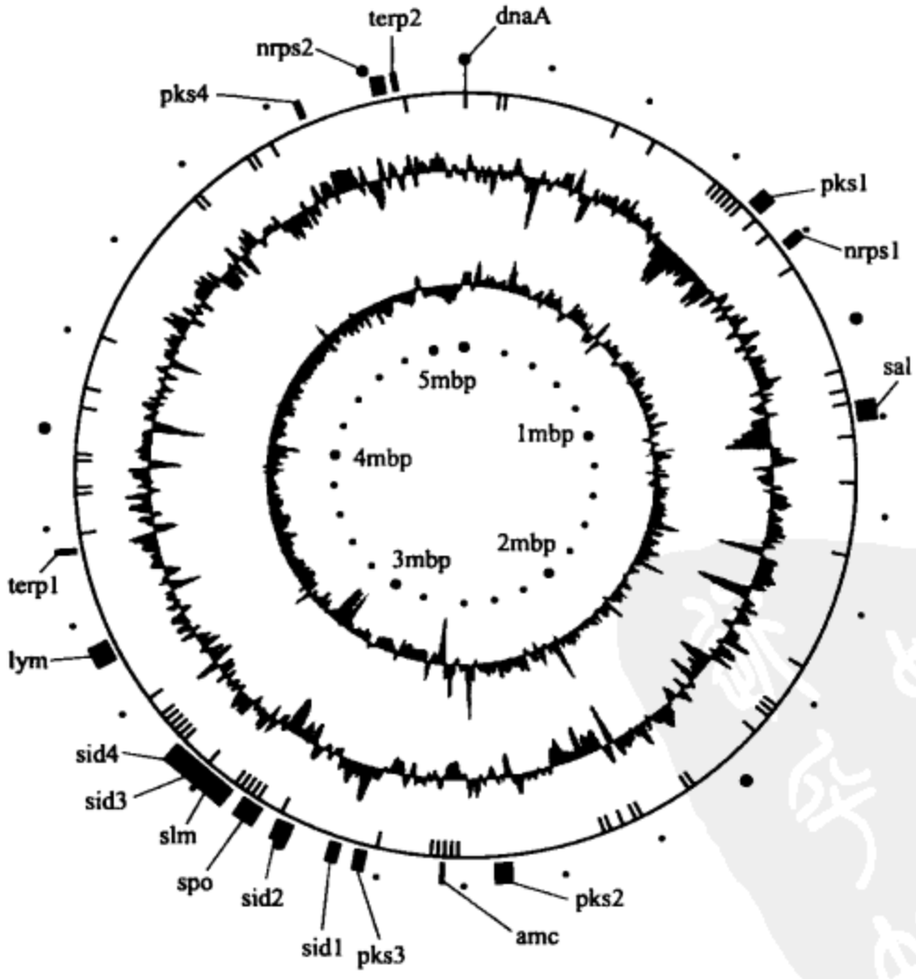


图 5.2-2 对 *Salinispora tropica* Scripps CNB-440 菌株的测序

5.2.1.4 基因簇与药物研发

海洋放线菌基因组测序的成功将带领海洋微生物药物开发进入一个新阶段。天



然药物开发之所以蓬勃兴起，在于次生代谢物本身具有的结构和生物活性。然而，目前海洋天然药物产量极低，严重约束了本领域的发展脚步。目前，随着基因工程技术在海洋微生物研究中的应用，多种方法已经进入这一领域的研究之中，例如：其一，利用基因重组的手段将编码的药物合成相关的基因或者基因簇导入工程菌，体外异源表达，产生大量合成该化合物的酶系，从而促进天然药物的生物合成；其二，随着越来越多的功能基因的发现和印证，将不同的功能基因重组就可以通过组合生物合成的方法，形成多种非天然药物。这无疑为新型药物的开发提供了非常有益的资源和方法。

5.2.2 海洋真菌

海洋真菌单独生长并形成孢子，它们的芽孢能够在海水中萌发。另外，兼性海洋真菌来源于淡水或陆地环境，适应了海洋环境得以生长和生成孢子。海洋真菌中约有800多个种属于目前已报道的水或陆地真菌。其大多属于子囊菌类，少数属担子菌类，还有一些属于网黏菌门和卵菌纲。海洋真菌生存的环境具有多样性，甚至可以在高盐环境下生存，易于感染其他无脊椎动物。海洋真菌在朽木、植物腐殖质和沿海海水中最为常见[7]。陆地真菌已提供了许多有药理活性的天然产物，然而海洋真菌仅仅被研究了很少一部分。截止到2005年已经发现了约272种化合物，包括聚酮类化合物、萜类、类固醇和肽类等[8]。值得注意的是海洋真菌次生代谢产物中约50%为聚酮类化合物，这些聚酮类化合物具有显著的抗氧化、抗炎和抗癌等多种药理活性。而目前海洋真菌的其他类产物的研究相对缓慢，2000～2005年期间，仅报道了20种生物碱和14种肽类海洋真菌次生代谢物，除此之外，萜类化合物在真菌中也很少发现[8]。

5.2.3 海洋蓝细菌

海洋蓝细菌（cyanobacteria）又称蓝藻，为异源革兰阴性菌，可进行有氧光合作用，同时也可固氮。在有光、无机物、CO_2和气态氮的海洋环境中生存，分布广泛。约有1500多种[9]。海洋蓝细菌代谢产物非常复杂，已发现的次生代谢物中含大量的肽类、大环类内酯、苷类和酰胺类等化合物。其中代表性的药物包括dolastatin和curacinA。2001～2006年期间已发现约120种蓝藻生物碱类化合物，具广泛的结构多样性和生物学活性，如抗炎、抑制蛋白酶体、抗真菌、调节Na^+通道和细胞毒作用等[10,11]。

5.2.4 海洋真核微藻

微藻作为异源类群，可快速生长繁殖，广泛分布于海洋中，多内生于海洋动物或一些巨型海藻组织中或以浮游态分布于海洋中，在极端环境中也有所发现。在海洋微藻中发现其自身可合成并富集多不饱和脂肪酸（PUFA），同时还发现的次生代谢物有醚类、兴奋毒氨基酸等。

5.2.5 变形细菌

变形细菌（又称紫色细菌，proteobacteria）是所有细菌中个体最大和生理特性上最具多样性的类群。由4个亚门组成，又称为α-亚族、β-亚族、δ-亚族和ε-亚族。该类群也是海洋细菌中最大的并且是最多样化的一个组群。各亚族在海洋中自由存在或与海洋动植物共生或共栖，分布特点各异。海洋浮游细菌，尤其是利用光能生长的细菌以α-亚族为主。

5.2.6 假单胞菌、弧菌及其他

假单胞菌、弧菌以及广泛分布于厌氧环境的硫酸盐还原菌，海洋动物体内的氧化硫共生菌等绝大部分属于变形细菌（又称紫色细菌）的γ-亚族和δ-亚族。而ε-亚族的细菌常存在于海洋厌氧或热液环境中，部分与该环境中的动物共生。其中，噬纤维菌群——黄杆菌群，是需氧的革兰阴性细菌，在海洋中数量丰富，约占细菌总量的15%～25%。浮霉细菌目前分离培养的较少，但海洋16S RNA基因文库中几乎都能获得与之相关的序列，据此，表明该类群广泛分布于海洋环境中。目前这类海洋细菌中已经发现多种具有生物活性的代谢产物，如大环内酯类、生物碱、环肽类等。其他海洋微生物像海洋古菌、海洋原生动物等目前研究其代谢产物的报道较少，这里不做一一介绍。

5.3 海洋微生物药物研究的技术和方法

5.3.1 宏基因组的概念

是指特定环境或共生体内所有生物遗传物质的总和，是一种不依赖于人工培养的微生物基因组分析技术，它涵盖了统计分析和宏基因组两方面的意义和技术，是统计学的理念在基因组学中的交叉体现。这种方法是建立在微生物基因组学的迅速发展和聚合酶链反应广泛应用的基础之上，旨在直接从环境或共生体中克隆出其中存在的所有基因组DNA，然后筛选和分离感兴趣的目的基因并克隆和异源表达相关合成活性成分的基因或者基因簇，从而得到多种丰富的活性天然产物或修饰的非天然产物。如图5.3-1所示，图中比较了采用传统培养途径和宏基因组途径筛选新的海洋微生物活性物质的研究路线。目前，海洋微生物代谢活性成分已经成为海洋药物开发的重要内容之一。虽然微生物技术相当成熟，但是在海洋微生物研究中这还远远不够，考虑到海洋微生物生存环境的特殊性，目前缺乏适当的培养方法分离大量的海洋微生物。已有的研究显示，超过95%的海洋微生物在现有实验条件下不能人工培养，传统的活性物质筛选方案无法应用到这些未培养微生物之中，从而极大程度上限制了海洋微生物的开发和应用范围，导致发现次生代谢活性物质的速度大大降低。虽然Schroder等人，以海绵为例提出了一些化学合成、体细胞培养

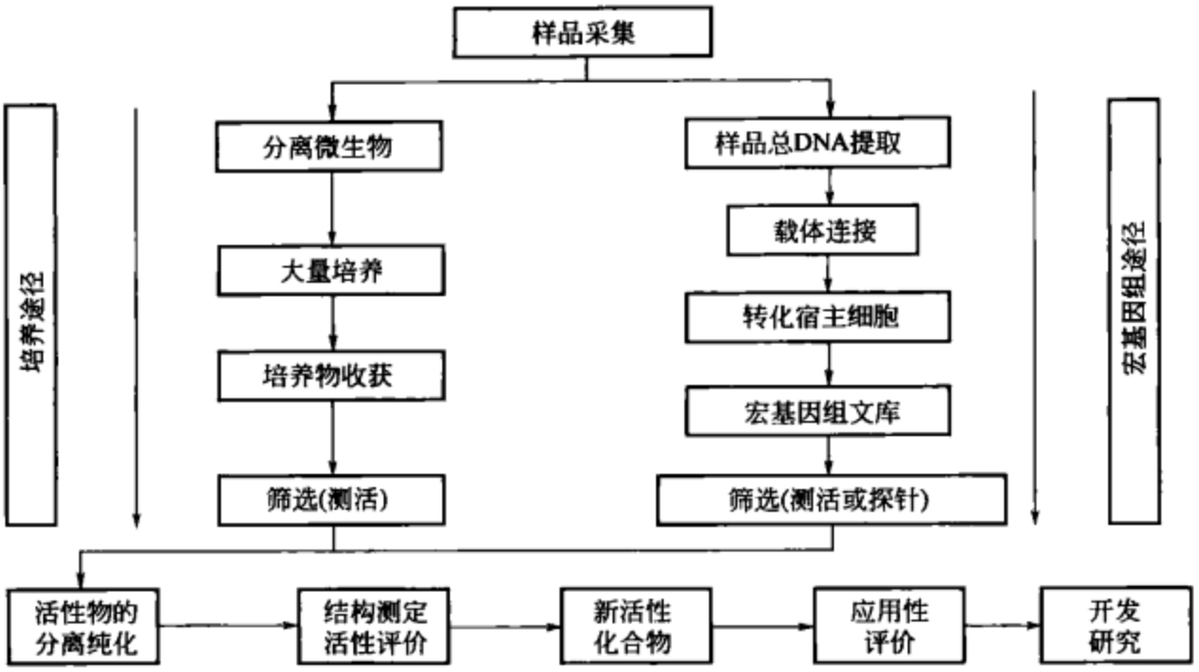


图 5.3-1　采用传统培养途径和宏基因组途径筛选新的海洋微生物活性物质研究流程的简略比较

等解决方法，这些方法虽也提高了生物材料的产量，但仍不能从根本上解决生物量缺乏和未培养微生物等方面的瓶颈问题，宏基因组学的诞生为解决这个问题提供了新的途径[12]。自 1991 年 Pace 首次提出环境基因组学的概念并在同年构建了第一个克隆环境样品中 DNA 的噬菌体文库以来，有关环境基因组学（也称微生物环境基因组学、宏基因组学、元基因组学、生态基因组学）的研究受到广泛关注。

5.3.1.1　海洋微生物宏基因组学、宏蛋白质组学、宏代谢组学

（1）海洋微生物基因组　环境微生物基因组又称宏基因组，是由 Handelsman 等人 1998 年提出的，即生境中全部微小生物遗传物质的总和，主要是指环境样品中的细菌和真菌的基因组总和。环境微生物基因组技术是基于功能和序列的基础上对所得到的环境样品基因组进行分析的技术。自然界 99%以上的微生物是不可培养的，人们对这部分微生物的生态、遗传以及代谢性能了解很少。环境微生物基因组技术是在 PCR 技术和对自然环境基因中的相似性基因（16S rRNA、nif、recA 基因等）的克隆技术的基础上发展起来的，是一种可以不需要获得实验室纯培养物而对自然界的样品的生物多样性进行分析的强有力手段。环境微生物基因组技术的研究用途十分广泛，可以用于筛选新的功能基因，在微生物分类学和微生物生态学以及改进微生物培养基和培养技术等方面具有重要的科学意义。由于环境微生物基因组技术建立在不需要对环境微生物进行培养的基础上，因此避开了微生物分离培养的问题，极大地扩展了微生物资源的利用空间，在挖掘和利用那些未能培养微生物的基因资源方面显示了强大的能力，最大限度地获取微生物资源并为人类服务带来了前所未有的机遇，已经成为国际生命科学技术研究和开发最重要的热点之一。

（2）海洋环境微生物基因组技术的研究策略　环境微生物基因组技术研究的步骤通常是：环境样品 DNA 的提取、将 DNA 克隆到合适的载体中、将载体转化到

宿主细胞建立环境微生物基因组文库以及对环境微生物基因组文库的分析。

① 海洋环境微生物基因组文库的筛选策略。对环境微生物基因组文库进行筛选分析有三种策略：以功能为基础的筛选、以序列为基础的筛选以及最近提出的底物诱导基因表达筛选。以序列为基础的筛选方法不需要在不同的宿主中表达所克隆的基因。通常是基于已知的基因序列对文库中的靶标序列例如 16S rRNA 或 recA 基因进行分析。最初也是最有名的以序列为基础的分析例子是 Craig Venter 采用序列分析的方法分析马尾藻海域的微生物，鉴定出大量的新基因。

目前微生物生态系统泛基因组研究中一个最成功的模式就是研究极端酸矿废水中各种微生物的功能及其作用。这个研究成果发表于 2004 年的 Nature 杂志。研究表明在酸矿废水中，氧化铁钩端螺菌群Ⅱ在数量上处于优势菌群，这类细菌和铁原体属细菌通过铁的氧化负责群落能源的供应，在氧化铁钩端螺菌群Ⅱ、Ⅲ细菌中均发现与细胞色素 c 相类似的电子传递链，负责能量的传递。但研究发现氧化铁钩端螺菌群Ⅱ没有与固氮相关的基因，而氧化铁钩端螺菌群Ⅲ细菌有相关的基因，虽然群Ⅲ细菌在群落里不占优势，但认为这是非常关键的一类细菌，它可能负责整个群落一个不可或缺的要素，即群落氮源的供应。此外还发现铁原体属也没有与固氮相关的基因，但细胞中有许多转运体，很可能这类细菌负责氨基酸和氮素营养成分的转运。对这个群落基因组的研究表明，酸矿环境中细菌的功能基因大多是负责解除重金属离子及强酸对细胞危害的相关基因，维持细胞内中性的 pH 值，维持正常生理范围内的离子浓度。

② 海洋微生物基因组研究。微生物基因组的研究基于鸟枪法的全基因组测序策略主要有 2 种：以克隆为基础的鸟枪法测序和全基因组鸟枪测序法。以克隆为基础的鸟枪法测序是构建微生物基因组物理图谱和随机测序相结合的方法，首先构建微生物的随机 BAC 文库，文库覆盖整个基因组，从中挑选出 1 组重叠效率较高的克隆群，再对每一个选定的克隆进行鸟枪法测序。这种方法在对基因组较大的物种进行测序时有优势，因为每个克隆的测定序列在克隆内独立组装，这样计算机的拼接和缺口填充都相对简单得多；同时可以在不同的实验室之间开展合作，每个合作单位可以单独完成一部分克隆的全部工作。早期的微生物全基因组测序也是采用的这种方法。

全基因组鸟枪测序法是直接将全基因组随机打断成小片段，构建质粒文库，然后对质粒两端进行随机测序。这种方法的优点是省去了复杂的构建物理图谱这一限制基因组测序进程的步骤，使整个基因组的测序简单化，速度加快，因而用这种方法对微生物全基因组进行测序已经越来越普遍。流程为：基因组随机文库构建和测序、序列组装和缺口填充、基因组注释。

1995 年成功地完成了流感嗜血杆菌全基因组序列测定和组装，为微生物基因组研究揭开了历史性的新的一页。之后许多微生物的序列相继被测定，包括病原微生物、重要的工业微生物以及特殊环境下生活的微生物等。截至 2006 年，已经完成测序的微生物基因组达到 160 多个，正在测序的有 200 多个。

美国国家能源部（DOE）和国立卫生研究院（NIH）是美国微生物基因组计

划（MGP）的启动和发展者，两个部门所关注的分别是资源微生物和病原微生物，其研究发展策略对全球 MGP 研究发展趋势起着决定性的影响作用。

美国国家能源部认为 MGP 不仅是研究和应用极端环境微生物特定功能的科学基础，而且将是 21 世纪微生物学的信息基础。目前 DOE 资助的 MGP 已经完成 30 多个微生物基因组测序，更多重要微生物的基因组测序也将在 10 年内迅速完成。MGP 所涉及的这些微生物在系统发生学上具有代表性，科学家能够通过一一对应地比较它们的基础序列变异程度，研究它们的进化关系。

DOE 和 MGP 的主要注意力，仍将放在与 DOE 之需要相关的微生物基因组测序上。DOE 项目领域包括能源利用和生产、生物整治，特别是自然和加速生物整治研究（NABIR）项目，最近还启动了研究气候变化的新领域。DOE 突出了能消费 CO_2 或生产替代燃料资源（如甲烷或氢）的微生物的序列测定。DOE 希望从这些努力中发现微生物和酶调节这些重要气体的机理。根据 DOE 新的遴选标准和近期发展需求，一批新目标菌的全基因组测序已经立项，如生氢氧化碳嗜热菌、新月柄杆菌、绿硫菌、厌氧性梭孢杆菌、除氯菌、脱硫弧菌、产电模式菌、甲烷氧化菌、硝酸单胞菌蓝细菌、聚球蓝细菌、乌兹炽热球菌、生物修复菌、胶州湾聚球菌和氧化亚铁硫杆菌等。

③ 海洋微生物功能基因组学。随着各种微生物基因组测序工作的不断完成和序列信息的积累，微生物基因组学研究的重点已由结构基因组学向功能基因组学转移。微生物功能基因组学研究不仅要阐明微生物基因组内每个基因的作用或功能，还要研究基因的调节及表达谱，进而从整个基因组及其全套蛋白质产物的结构、功能、机理的高度去了解微生物生命活动的全貌。

未知功能基因的鉴定方法可分为两大类：一类是高通量的初步鉴定技术；另一类是系统分析技术。高通量的鉴定方法主要是生物信息学技术、基因芯片技术和蛋白质组学技术等。利用生物信息学技术研究未知功能的基因，主要依靠两个途径：一是在 DNA 层面上进行比较分析，根据该基因与已知功能基因的同源性，可以初步明确基因的功能；二是比较该基因编码产物（蛋白质）的序列和结构，对基因进行功能分类。基因芯片技术主要是通过检测环境因素对未知功能基因表达的影响，推测基因的可能功能。克隆、突变体构建及表型分析等是鉴定未知功能基因的有效方法。通过克隆，一方面能够纯化靶基因编码的蛋白，通过研究基因产物的功能及定位来确定基因的功能；另一方面通过克隆，可以为芯片制备等研究提供 DNA。由此可以看出，鉴定未知基因的功能是一项复杂的工作，需要多种技术综合应用。我国比较重视疾病相关基因的研究，在微生物基因的研究方面相对较薄弱。

④ 宏基因组克隆表达技术与海洋药物开发。目前，相关研究主要集中在探索微生物的基因序列，着重通过 16S rRNA 基因序列的系统进化研究，使环境微生物的多样性分析趋于完整客观。通过结合宏基因组工程与海洋生物学，形成一项旨在揭示海洋环境中微生物宏基因组特点并用于发现新药物的研究计划。宏基因组克隆表达技术利用 BAC 或其他大片段 DNA（35～160kb DNA 片段）的克隆载体如黏粒和 Fosmid 等，从环境样品如土壤和海洋底泥中未知生物群体中分离 DNA，建构

大片段 DNA 文库，进而一方面通过 16S rDNA 测序鉴定，了解该未知生物群体的生物多样性；另一方面通过异源表达，了解文库中未知生物群体功能基因的表达产物。

5.3.2 宏基因组学的研究方法

如图 5.3-2 所示，宏基因组路线基本可分为四个步骤：大片段 DNA 的提取、宏基因组文库的构建、筛选感兴趣的基因、功能基因的表达以及产物的分子生化鉴定[12~18]。如图 5.3-3 所示，环境宏基因组学技术的前端关键性技术是 eDNA（environmental DNA）的提取，提取方法的精确程度将直接决定文库中微生物信息的精确度，下游关键性技术是文库的分析与筛选。

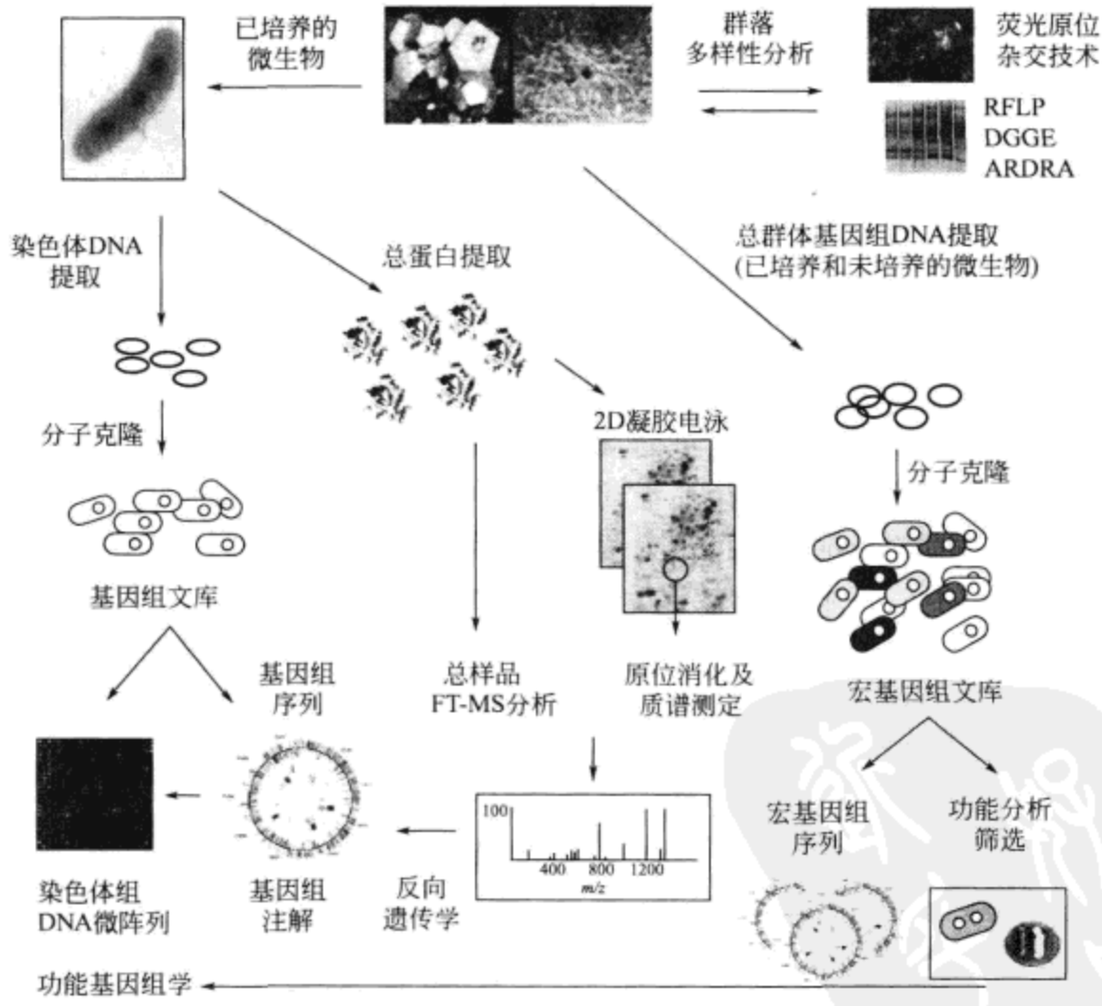


图 5.3-2 海洋环境微生物基因组学、蛋白质组学、宏基因组学技术路线

5.3.2.1 样品富集

宏基因组筛选过程中，目的基因仅少量存在于总核酸中。适合的样品富集方法能够大大提高筛选率。通过以下方法能够有效提高发现目的基因的概率。虽然 Substrate 使用的方法最为普遍，但仍可以采用物理或化学等标准方法。例如用羧甲基纤维素钠在少量表达文库中培养富集含纤维素酶基因菌株。富集培养方法通过对快速生长菌株的选择，淘汰掉了大量他种微生物。在样品短期严格处理后，可通

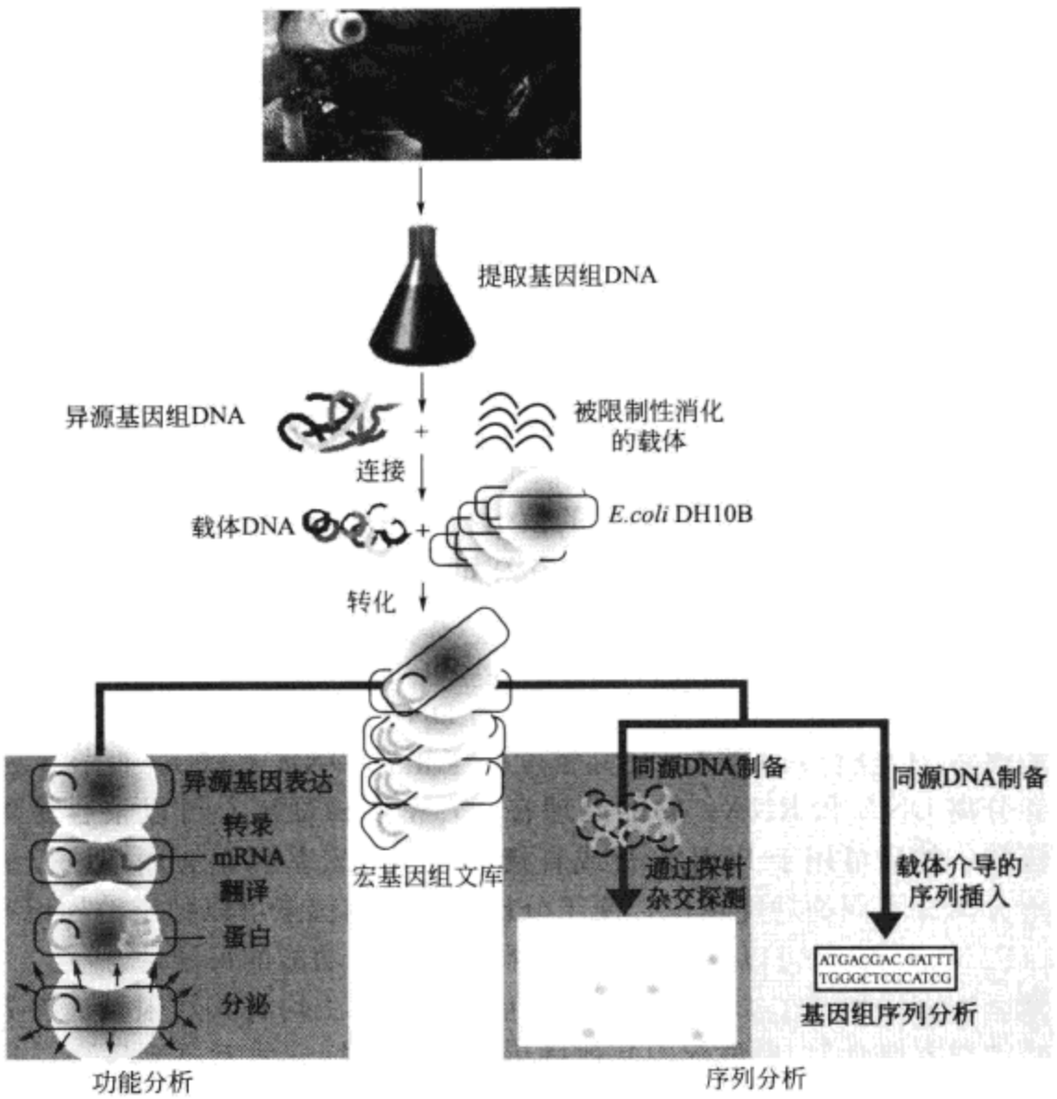


图 5.3-3　海洋微生物宏基因组学文库的构建及筛选方法

过减少选择条件来部分降低负面影响。物理方法虽然能够获得更多的基因多态性，但是条件剧烈，DNA 易断裂。化学方法条件温和，可获得大片段 DNA，且化学方法能够获得特殊菌种的 DNA 特异性片段。

5.3.2.2　核酸提取和富集技术

目前有很多群落核酸提取方法，常用方法一般有从微生物细胞中提取和直接裂解提取 DNA。即先将样品分离，然后再用溶菌酶裂解，这种方法能够获得片段较大的 DNA（20～500kb），具有覆盖整个基因簇的能力。而异位溶菌法适合用柯斯质粒或者用细菌人工染色体（BAC）为载体进行克隆。

直接裂解提取，虽然可以得到大量总 DNA，但是由于提取时 DNA 易断裂，且 DNA 片段较小（1～250kb），适合用质粒或 λ 噬菌体为载体进行克隆。而 mRNA 回收技术，近年才引入到原核细胞宏基因组研究之中，即通过 mRNA 的回收构建出宏基因组 cDNA 文库，这为进一步鉴定原核生物基因功能奠定了基础。

而环境中直接提取的样品总 DNA，并不能如实表征群落基因组。占群落总

DNA 很少部分的少量有机体，其基因组可能被在群落中 DNA 水平显著的有机体所掩盖。用 $CsCl_2$ 密度梯度离心可以取得很好的效果，如利用基因组 G/C 含量不同，浮力密度不同进行分离，浮力相同聚集，链接成正常化宏基因组。正常化可以通过将染色体 DNA 变性，在严格条件下重新复性（68℃，12～36h）。较含少量 DNA 物种相比，大量单链 DNA 能够更快复性后将单链序列分离，环境样品中少量 DNA 就可以照此方法富集。

5.3.2.3 基因组和基因富集

BrdU 标记技术：基因组富集策略可用于瞄准活性微生物群落进行测定。这种技术的原理基于有生物活性的有机体能够结合 BrdU 标记到其 DNA/RNA 上，BrdU 进入样品中并标记微生物，可用免疫捕捉方法进行回收。例如，将 BrdU 标记在微生物特异性底物上，群落中的目的微生物以此底物为食，检测到微生物体内含此标记的便为目的微生物，从而富集相关如以淀粉、蛋白为消化底物的菌群的 DNA，进而得到编码相关酶类宏基因组数据。

稳定性同位素示踪法（stable-isotope probing，SIP）：SIP 技术包括使用稳定同位素标记和密度梯度离心分离分子量大的 DNA 或 RNA。SIP 法利用 ^{13}C 标记，微生物能够将 ^{13}C 整合入 DNA，使其密度高于正常 DNA（^{12}C），此技术已成功用于标记和分离 DNA 和 RNA。它的原理在于，密度梯度离心可以很容易除去末端标记的核酸，然后可用于 PCR 分析或直接克隆构建宏基因组文库。该方法可将微生物群落分离成不同的功能单位，便于分析。如果同位素可以稳定地标记在其他如磷或氮（P/N）上，就可以大大提高研究群落基因多功能的可能性。

虽然上述方法加速了 DNA 的富集，但这两种方法均有其局限性。首先考虑的问题就是“交差喂食”，即群落中其他微生物也可将标记物吞进到体内，这样“污染的”DNA 就会在目的富集库中出现。BrdU 标记适合底物特异性强的微生物的筛选。其次是对时效性的考虑，加入标记物的时间越长，标记物就会越多地出现在群落中，从而导致目的 DNA 的富集度大大降低。最后，一些分离方法，如免疫捕捉和密度梯度离心会导致 DNA 片段的断裂，加大了回收编码代谢途径的大片段 DNA 的难度[19,20]。

环境宏基因组文库的筛选策略主要分为序列筛选和功能筛选两种。序列筛选策略是先从文库中获得目的基因，继而对其进行异源表达，得到具有生物活性的产物。功能筛选策略则是先获得具有生物活性的阳性克隆，再通过插入片段测序，得到相应的基因结构。两种分析策略对于充分利用宏基因组文库资源均是十分必要的。通过将文库中序列与已知数据库中序列进行比对，有可能找到同源序列，从而推断文库中的基因功能。而功能筛选是“逆向过程”，两种筛选策略相辅相成，但现在大部分研究仍旧是由功能到基因，随着一些数据库的完备，从基因到功能的研究进度将大大加快。

5.3.3 宏基因组文库的建立及其克隆体系

基因富集后，就需要建立文库，以便找到功能基因。建立文库的步骤主要有：



载体的选择，克隆体系以及功能基因的筛选与分析。

5.3.3.1 克隆载体

常用载体有质粒、细菌人工染色体、柯斯黏粒、福斯黏粒等，此外还有噬菌体P1克隆系统（P1-clone）、由P1衍生的人工染色体（P1-derived artificial chromosome，PAC）、酵母人工染色体（Yeast artificial chromosomes，YAC）和哺乳动物人工染色体（Mammalian artificial chromosome，MAC）等。选择时主要依据目的基因大小，是否有利于目的基因的扩增、表达及在筛选细胞活性物质时表达量的调控等。一般情况下载体用于克隆小于10kb的DNA片段，适用于单基因的克隆与表达。适用于黏粒载体的DNA插入片段在40kb左右，主要用于克隆表达相对简单的天然产物合成途径。而很多微生物产生的活性物质，其代谢途径由多基因簇调控，DNA片段较大，此时可以采用Cosmid、BAC、P1或者PAC载体。原始BAC载体以大肠杆菌作为寄主，是1992年开发成功的。随后经过充分研究，一系列承继了BAC载体的穿梭BAC载体构建成功并投入使用，这些穿梭BAC载体能够克隆超过120kb大小的外源DNA片段，在大肠杆菌、链霉菌或者假单胞杆菌中稳定表达，适用于克隆表达绝大多数已经发现的天然产物生物合成途径。

5.3.3.2 宿主菌选择

基于BAC载体的宏基因组工程中，找到一套适用于宏基因组功能表达的寄主是取得成功的关键，BAC克隆株可同时在同源和异源寄主中表达宏基因组功能，这对天然产物药物开发尤其重要。目前，链霉菌被认为是半自动化的海洋药物开发平台中高效表达具生物活性的海洋次生代谢产物的最好的微型生物反应器。链霉菌中编码次生代谢产物的生物合成基因簇的表达受细胞内和细胞外信号传导调控。这些已经存在的生物合成途径能作为与外源基因簇适应的分子基础，通过互相作用，产生全新的具生物活性的化合物。

5.3.3.3 宏基因组文库筛选

DNA文库的构建已有30多年历史，鉴于其在宏基因组文库构建和筛选中没有明显翻译限制，该技术在20世纪90年代中期才开始成功应用于海洋宏基因组文库的建立。构建宏基因组文库是为了获得其中丰富的基因资源，挖掘新生物活性物质。目前已有的筛选方案主要有4种：功能驱动筛选（Function-driven screening）、序列驱动筛选（sequence-driven screening）、化合物结构筛选（compound configuration screening）和底物诱导基因表达筛选（substrate-induced gene-expression screening，SIGEX）。

5.3.3.4 宏基因组学在海洋药物研究中的应用

目前，海洋微生物药物研发中，备受青睐的当属海洋聚酮类和非核糖体多肽类的生物合成基因簇。通过对其的深入研究，揭示了多种抗肿瘤活性物质，如Bryostatin A、Barbamide、Pederin等的生物合成途径，为海洋微生物宏基因组学和抗肿瘤药物的研发提供了新的思路[21,22]。2004年，Mark等人用宏基因组学的方法

从苔藓虫共生的未培养微生物中分离出苔藓虫素 Bryostatin A 的 PKS 基因簇，采用两种分离 eDNA 的方法（总 DNA 制备、富集细菌量），并使用两种载体成功地克隆到几种不同大小的 DNA 片段（如 Cosmids，30242kb；λ_2 噬菌体，9223kb），筛选到一个约 15kb 的 PKS 基因簇，并构建出相关系统进化树。分离得到的 bryA 基因包含 13 个结构域、4 个模块（ML、M1、M2、M3），其中每个模块均含有 1 个 ACP，M1 和 M2 模块含有酮还原酶，M3 模块则含有甲基转移酶，ML 模块含有较独特的类似于脱氢酶、酮还原酶等结构[11]。近年来利用宏基因组学研究无脊椎动物内生菌方面也取得显著进展，如表 5.3-1 所示，使用该方法已经在海绵中发现多种内生菌基因[23]。

表 5.3-1　海绵内生菌发现的基因及基因产物

海　　绵	基因(基因簇)，酶	产物和功能
Axinella mexicana de Laubenfels	PKS、DNA 聚合酶 PKS、DNA 聚合酶 PKS、DNA 聚合酶	DNA 复制和细胞分裂 聚酮化合物 氨酰 tRNA 合酶、TCA 循环相关酶、氨氧化相关酶
Theonella swinhoei Gray	PKS Ⅰ(trans-AT)、聚合酶 海绵类 PKS Ⅰ	聚酮化合物 甲基支链脂肪酸
Discodermia dissolute Mickel	多种 PKS Ⅰ(trans-AT，海绵类型)，混合 NRPS/PKS、聚合酶	聚酮类化合物、甲基支链脂肪酸
Pseudoceratina clavata Carter	海绵类 PKS Ⅰ	甲基支链脂肪酸
Aplysina aerophoba Nardo	PKS、DNA 聚合酶 PKS 含钼氧化还原酶	聚酮化合物 节能作用

海绵相关的菌类被认为能够产生多种活性物质。但是，目前对海绵体内微生物群落了解甚少。基于荧光原位杂交和 16S 序列比对发现，虽然海绵为单一群落生长，但其微生物种系间却有明显差异。研究人员可以通过此种方法找到一些和抗癌类药物相关的潜在基因。2005 年，Andreas 及其同事，在研究海绵 *Discodermia dissolute* 时，利用探针标记的方法，发现海绵内生菌编码合成 PKS 和 NRPS 基因的多样性，从而加速了研究其他海绵内生菌的 PKS 和 NRPS 基因的步伐[19,24]。

5.3.4　宏基因组学在应用中亟待解决的问题

5.3.4.1　eDNA 提取

编码的药物基因簇一般都为高分子量 DNA 片段，如何获得这些片段显得尤为重要。因此，插入片段与从文库中获得新天然药物的可能性成正相关。而在海洋沉积物中，由于微生物与土壤颗粒紧密结合的特性以及腐殖酸等抑制性物质存在等原因，难以获得适于构建宏基因组文库的高分子量片段，为此，获得含高比率大片段的 DNA 则更加困难。而在另一方面，选用温和的提取方法，环境中大部分革兰阴性细菌能被裂解，革兰阳性细菌几乎不能被裂解；而采用剧烈的提取方法，有可能获得环境中革兰阳性细菌的信息，但所得 DNA 又将被严重剪切，无法满足构建大片段环境宏基因组文库的要求。宏基因组文库所包含的微生物基因组信息的偏差将

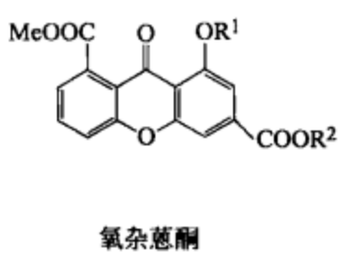
直接导致“基因遗漏”现象发生。

5.3.4.2 阳性克隆筛选

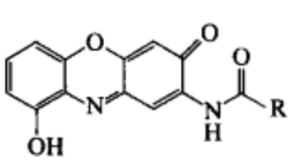
运用经典的筛选方式，往往是在数千个，甚至数百万个重组克隆子中才能检测到有用的活性克隆。造成此局面的一个重要原因是外源基因的异源表达水平低下。目前根据核酸序列相似性及基因保守区设计探针或引物的杂交、筛选方法，从文库中发现新基因的比率尚不到已知基因的40%。但是，我们有理由相信，随着基因工程技术的高速发展，以上瓶颈的突破终将彰显出宏基因组学强大的技术魅力。

5.4 海洋微生物药物与海洋微生物次生代谢产物的研究

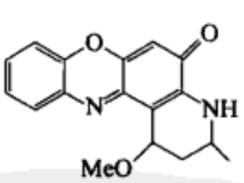
海洋微生物次生代谢产物以其复杂的新颖的结构，在药物的研究中独具特色。见图5.4-1～图5.4-8所示，已经发现的天然产物结构多样，包括生物碱类、醌类、肽类、甾醇类、脂类、香豆素类、聚酮类、多糖类和萜类等多种类型。而更为重要的是，这些产物不仅结构多样，而且具有显著的抗癌、抗炎、抑菌和抗病毒等多种功效。见表5.4-1～表5.4-62所示，目前，已有多种海洋微生物次级代谢产物，成功开发进入临床或临床前研究的海洋微生物涉及放线菌、真菌、细菌、蓝藻、甲藻、红藻、绿藻、褐藻、海绵和珊瑚/苔藓虫类等多种丰富的资源，业已成为药物研发的新的重要资源，日益受到国内外学者的关注。本节对2003～2010年期间，发现的各种海洋微生物代谢物和部分临床前和临床研究的海洋微生物药物做系统总结[1,8,19,25～28,61]，现介绍如下。



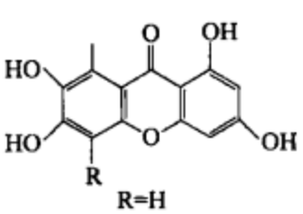
氧杂蒽酮



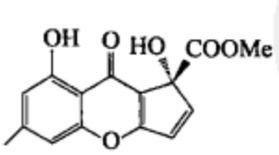
chandrananimycins A, B



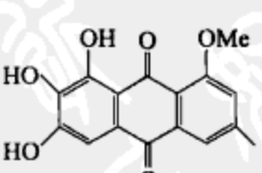
chandrananimycins C



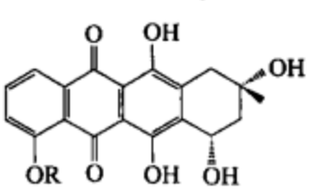
R=H
R=OH
anomalins A, B

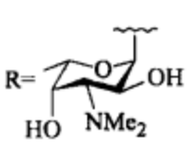


Remisporine A

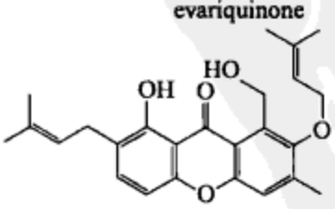


evariquinone



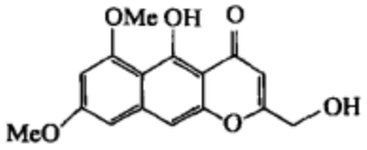


komodoquinone A

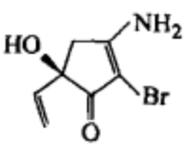


isoemericellin

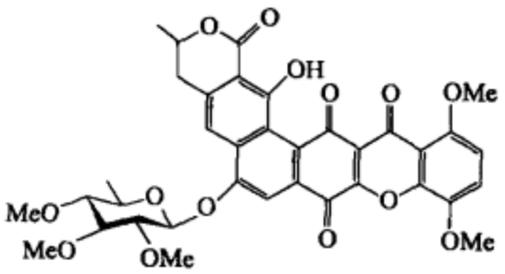
图5.4-1



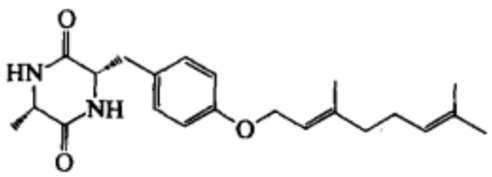
Nigerasperones B



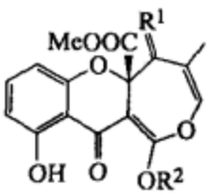
romomyrothenone



多环氧杂蒽酮

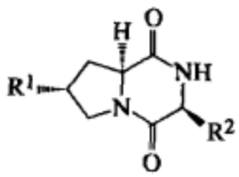


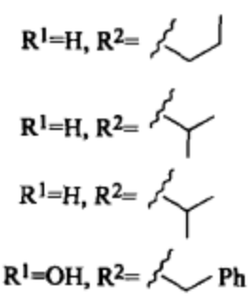
botrytinone(葡萄孢酮)



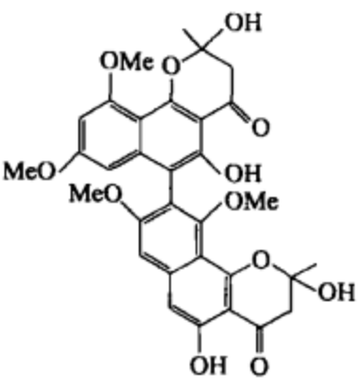
R^1=αOH, βH, R^2=H
R^1=O, R^2=Me
R^1=2H, R^2=H

brocaenols A～C

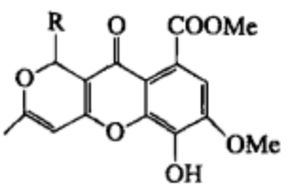




DD-二酮哌嗪A～D

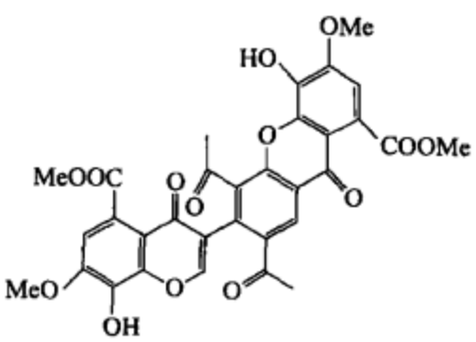


Nigerasperones A

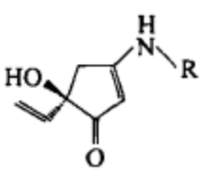


R=OMe
R=H

chaetocyclinones A, B

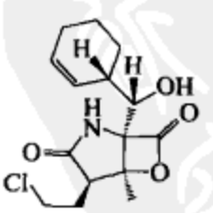


chaetocyclinones C

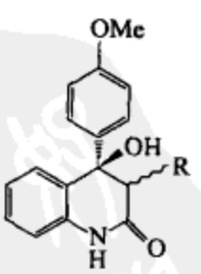


A=CHO
B=H

myrothenones A,B

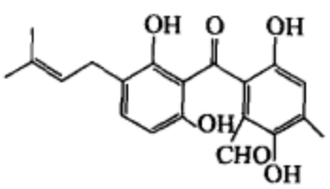


salinosporamide A

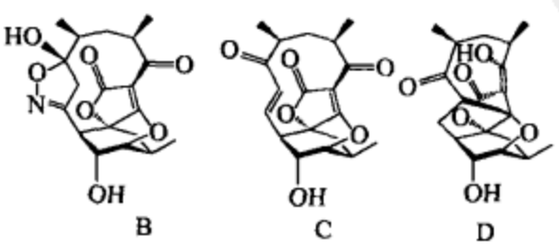


R= α OH/β OH

Quinolinones

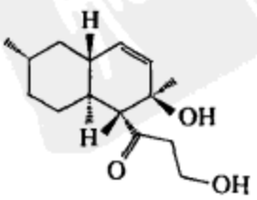


arugosins H

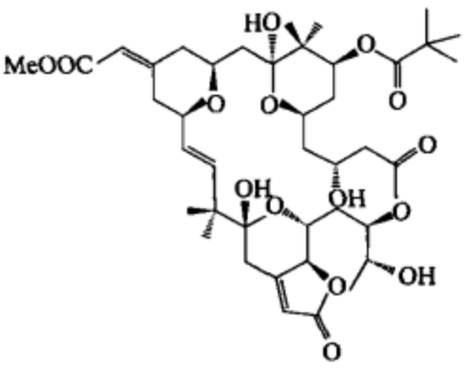


B C D

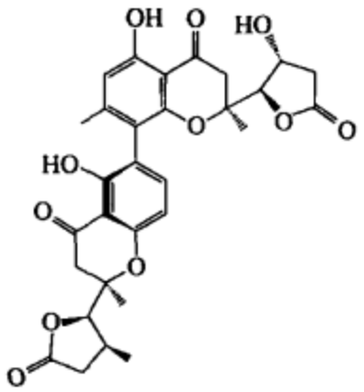
Abyssomicins B～D



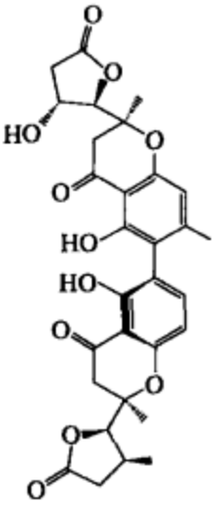
aspermytin A



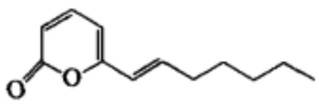
bryostatin 20(苔藓抑素20)



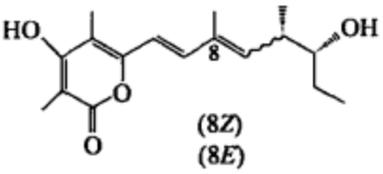
monodictyochrome A



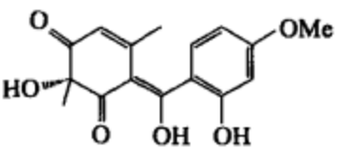
monodictyochrome B



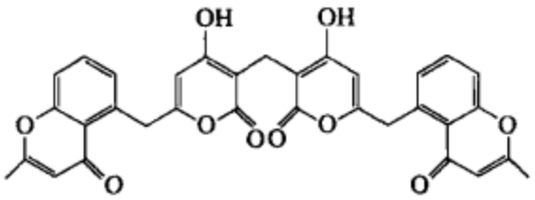
6-[(*E*)-环戊二烯]-α-吡喃酮



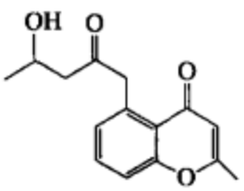
(8*Z*)
(8*E*)
pacificanone A



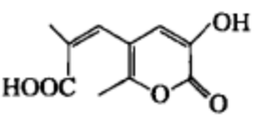
penicillenone



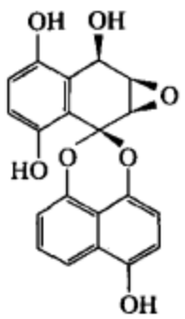
Phaechromycins F



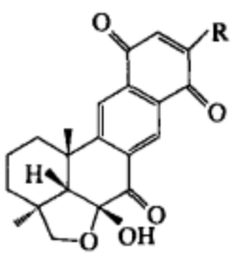
Phaechromycins H



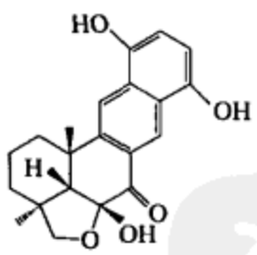
Alcanivorone

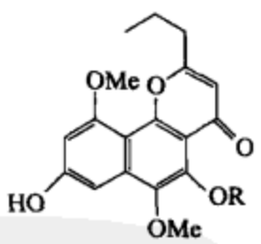


2-deoxyru-bralactone

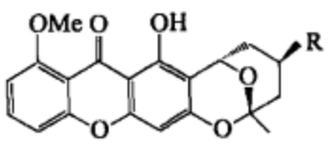


R=H
R=OMe
alisiaquinones A～C

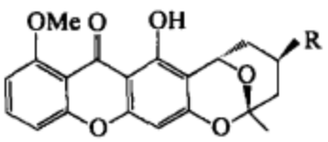




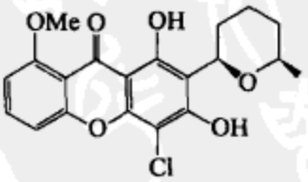
R=H
R=Me
alisiaquinol萘并吡喃酮



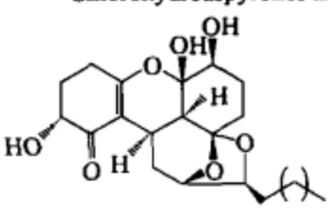
R=OH
Chlorohydroaspyrones B



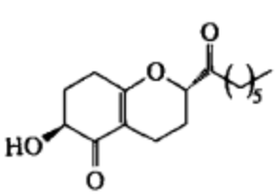
R=H
chaetoxanthone B



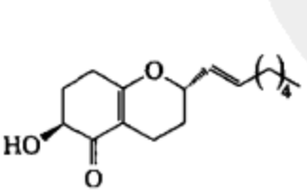
chaetoxanthone C



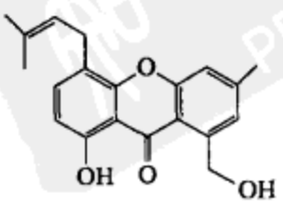
trichodermatide A



trichodermatide B

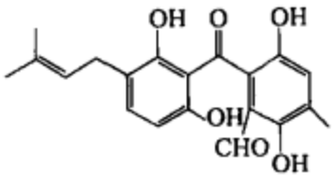


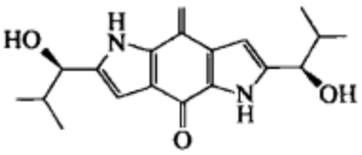
trichodermatide C

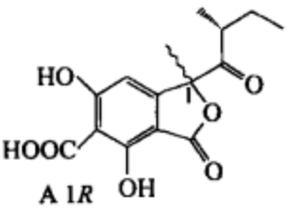


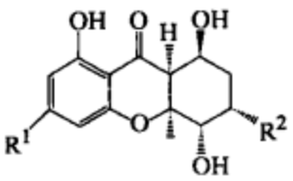
xanthone paeciloxanthone

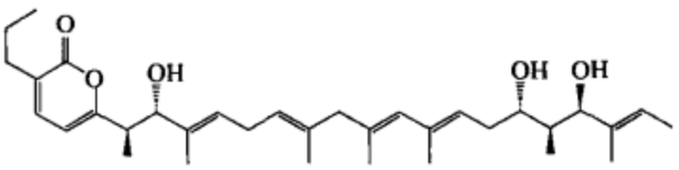
图 5.4-1

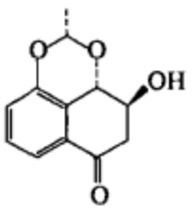

Arugosins H

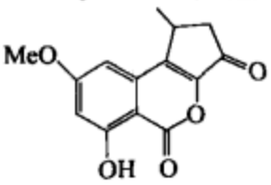

Terreusinone

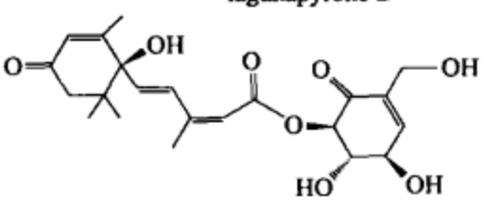

A 1*R*
B 1*S*
ascolactone A, B

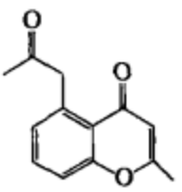

A R^1=Me, R^2=OH
B R^1=H, R^2=Me
C R^1=OMe, R^2=Me
monodictysin A～C(丝孢菌素)

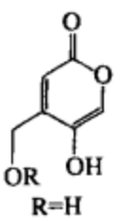

lagunapyrone B

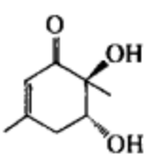

humicolone

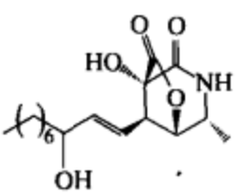

1-deoxyru-bralactone

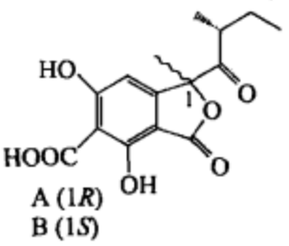

Nigrospoxydons A

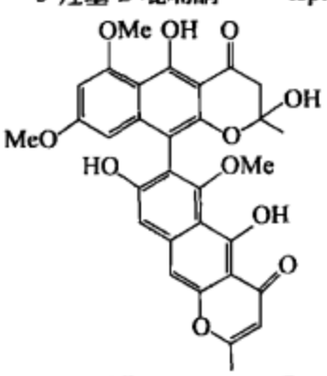

Phaechromycins G

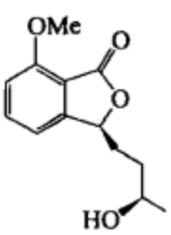

R=H
5-羟基-2-吡喃酮

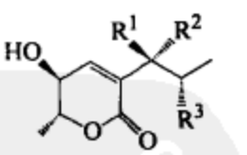

leptosphaerone

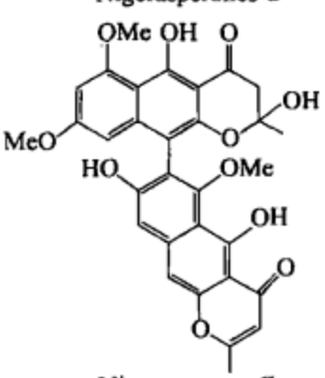

Awajanomycin


A (1*R*)
B (1*S*)
ascolactone A, B


Nigerasperones C


(3*S*,30*R*)-3-(30-hydroxybutyl)-7-methoxyphthalide


R^1=H, R^2=OH, R^3=Cl
Chlorohydroaspyrones A


Nigerasperone C

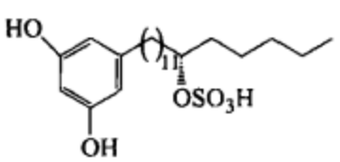
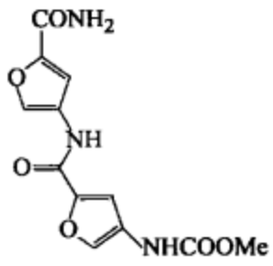
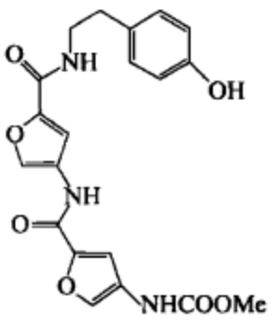

3-deoxyru-bralactone

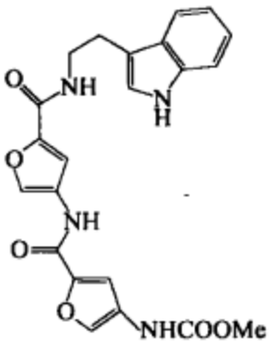
图 5.4-1　部分海洋微生物酮类或聚酮类活性代谢产物结构式



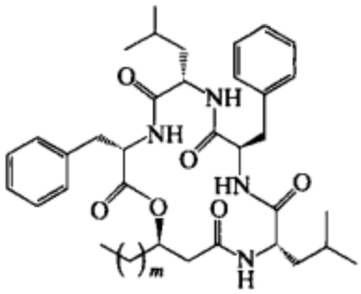
Proximicin A



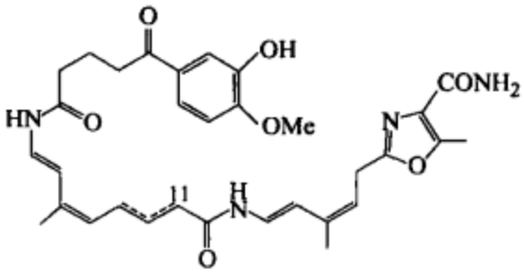
Proximicin B



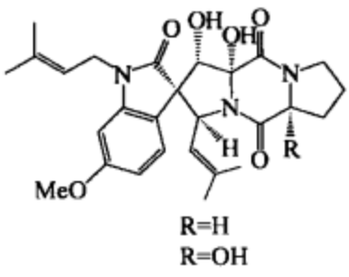
Proximicin C



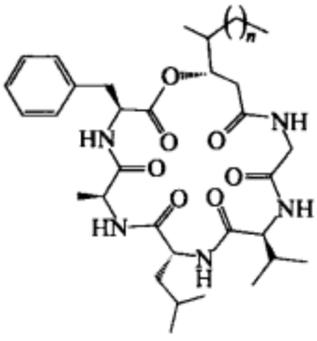
unnarmicin A(m=4)



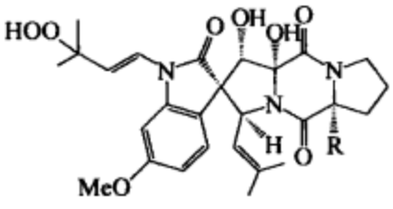
ariakemicins A(Δ^{12}), B(Δ^{11})



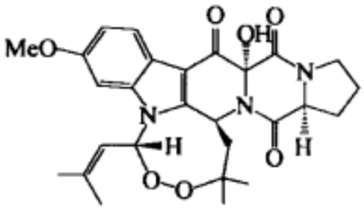
spirotryprostatin C～D



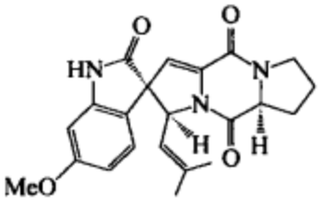
Scopularides A(n=5), B(n=3)



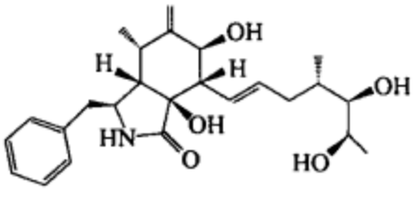
spirotryprostatin E



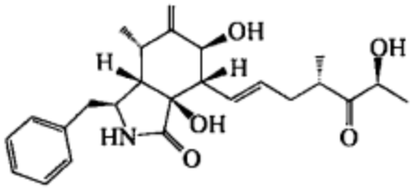
13-oxyverruculogen

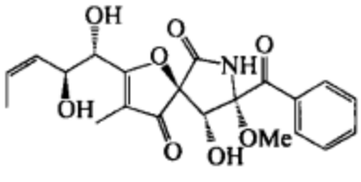


6-methoxyspirotryprostatin

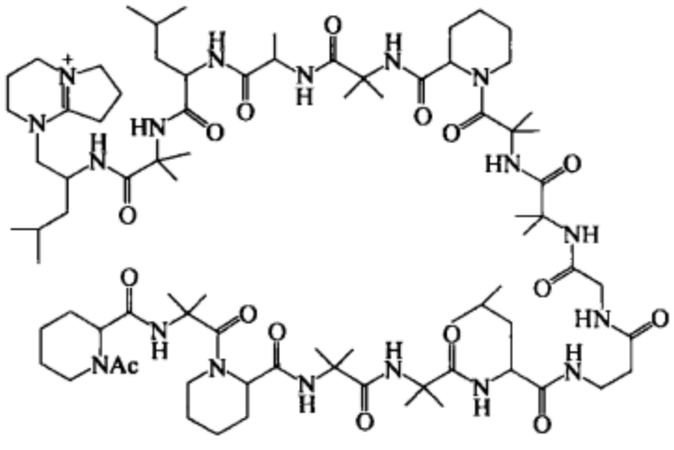


细胞松弛素 Z10-Z11

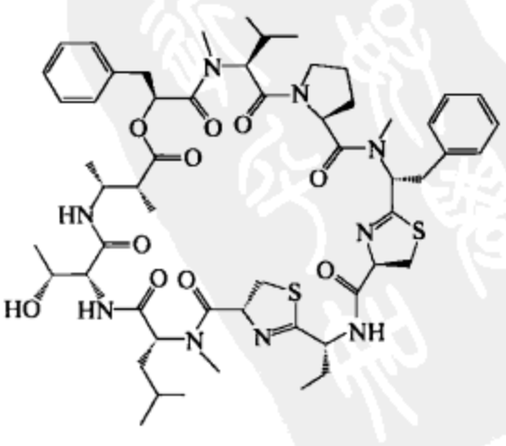




14-norpseurotin A

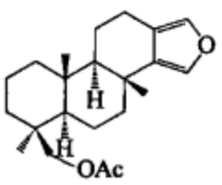


Efrapeptin J

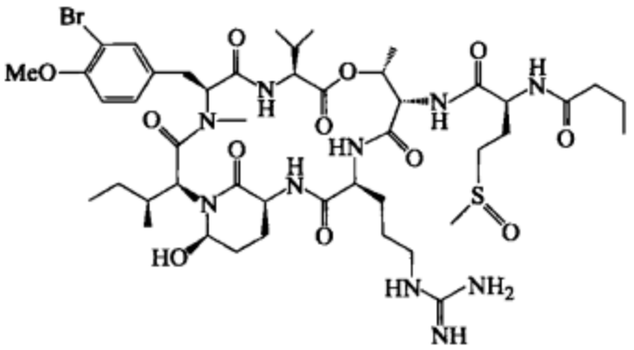


grassypeptolide

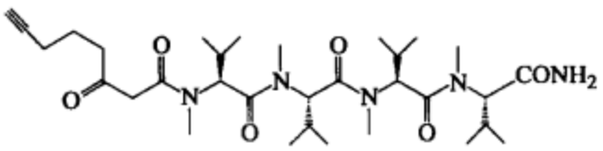
图 5.4-2



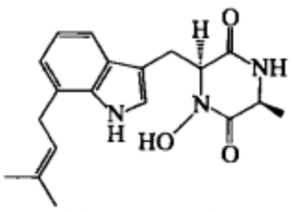
Seragamides F



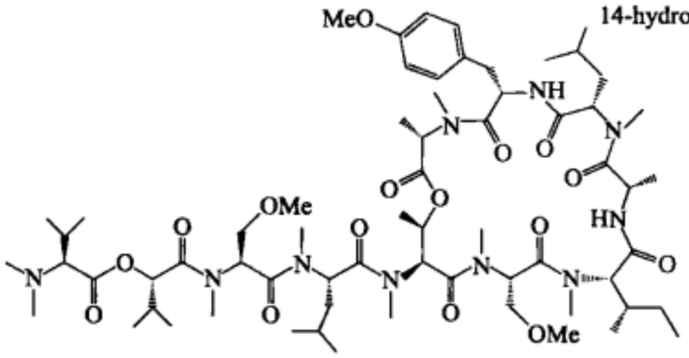
Pompanopeptin A



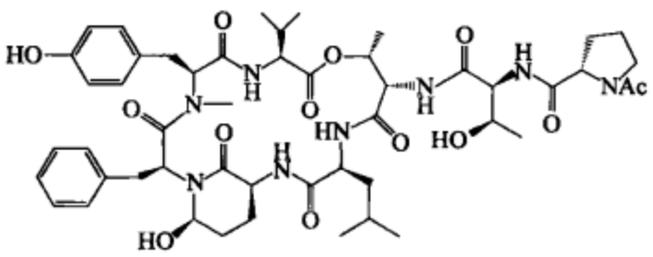
dragonamide C , D



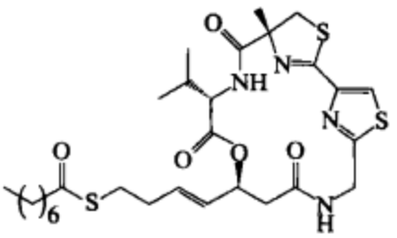
14-hydroxyterezine D



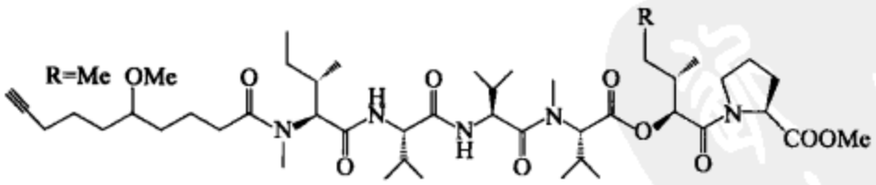
Kempopeptin A



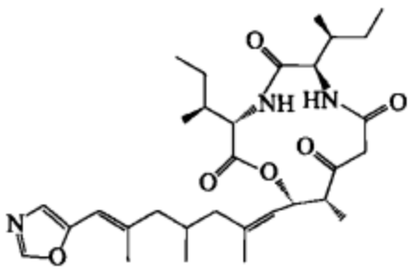
Kempopeptin B



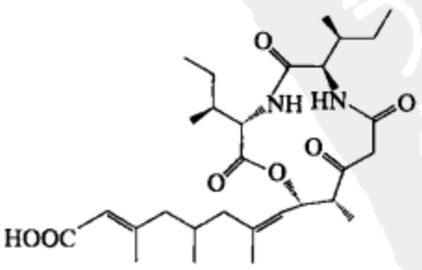
Largazole



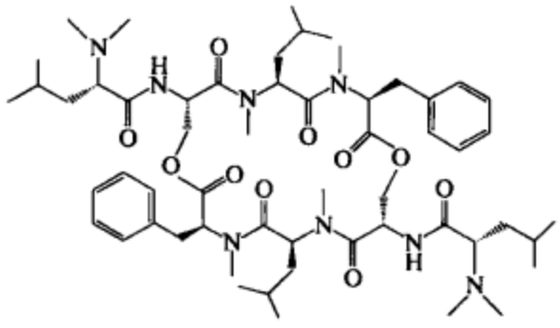
Viridamide A



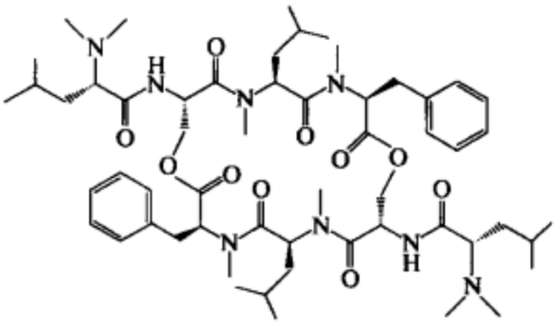
taumycin A



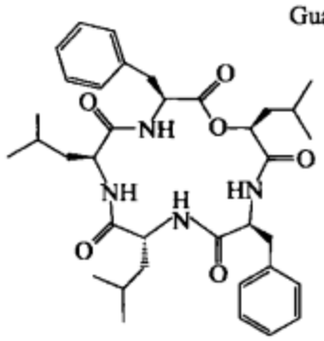
taumycin B



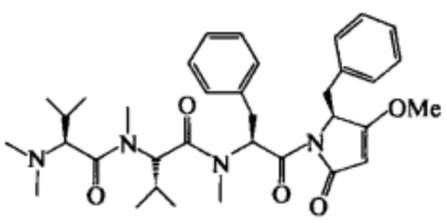
Guangomides A,B



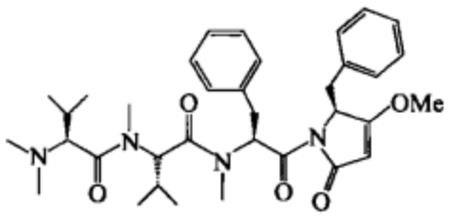
Cyclodepsipeptide



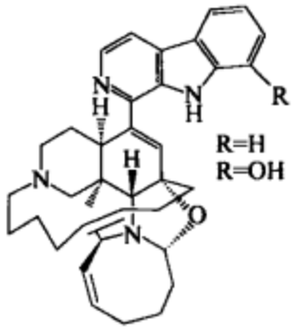
Zygosporamide



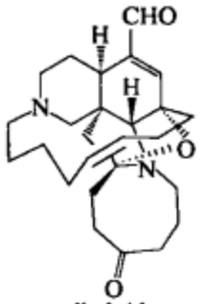
Trungapeptin A



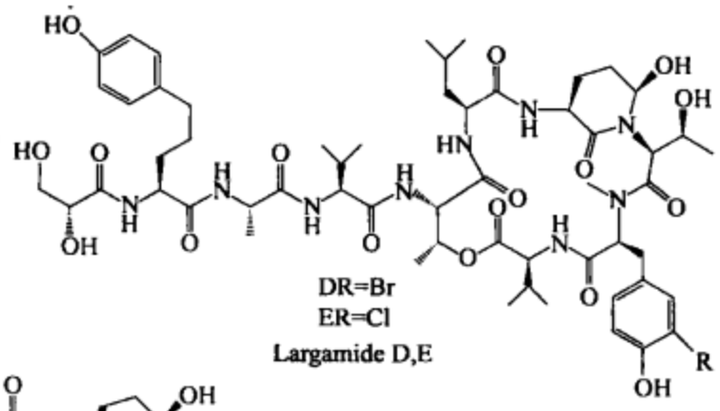
belamide A



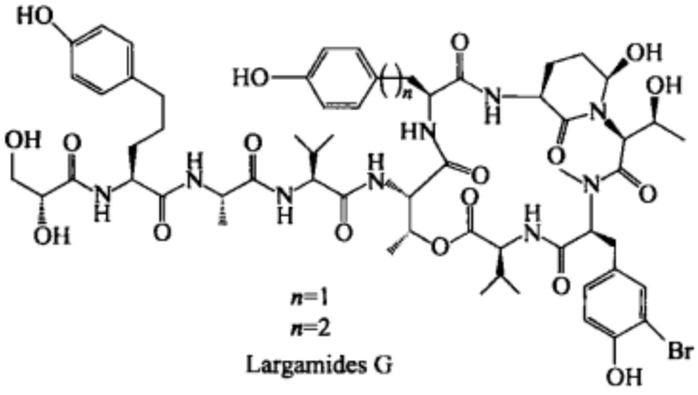
manzamine



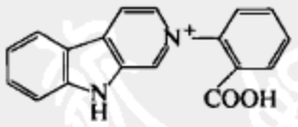
alkaloids



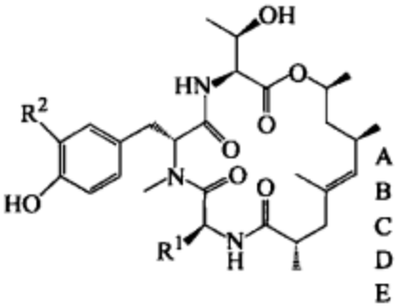
Largamide D,E



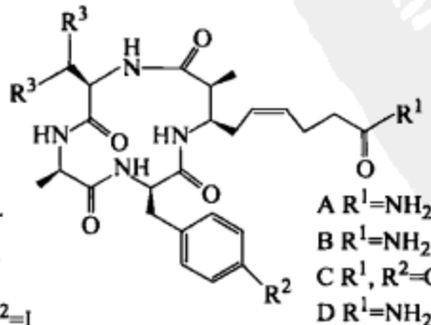
Largamides G



β-咔啉生物碱

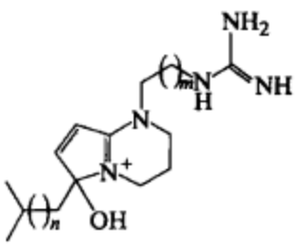


Seragamides A～E



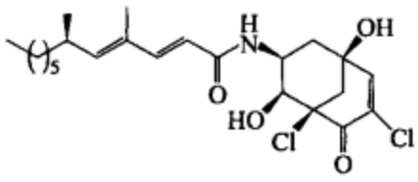
Azumamides A～E

图 5. 4-2

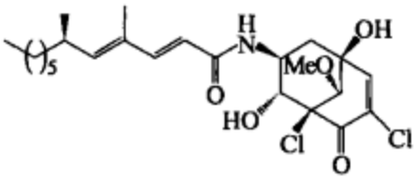


n=7, *m*=3
n=8, *m*=3
n=9, *m*=3
n=10, *m*=3
n=12, *m*=3
n=6, *m*=4
n=7, *m*=4
n=8, *m*=4
n=9, *m*=4
n=11, *m*=4
n=12, *m*=4

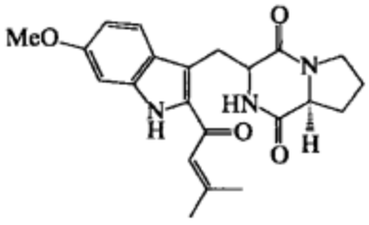
phloeodictine alkaloids



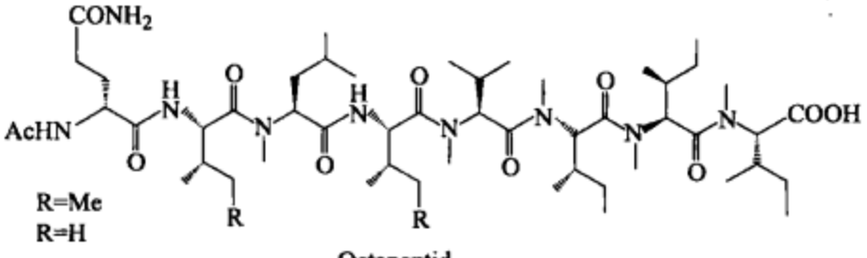
Gymnastatins Q,R



unnarmicin B

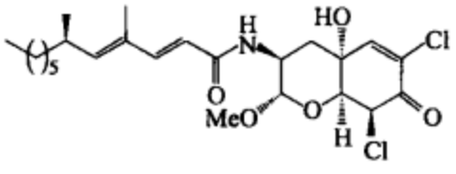


18-oxotryprostatin A

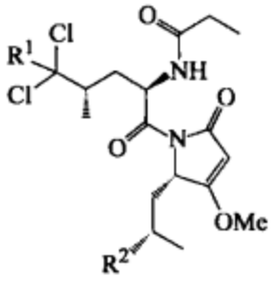


R=Me
R=H

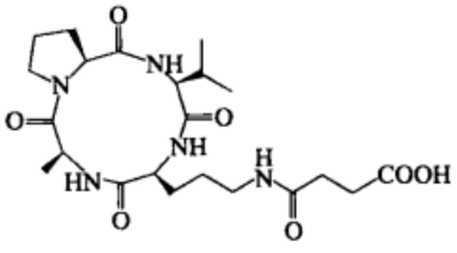
Octapeptid



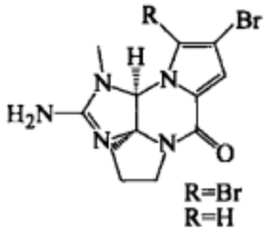
dankastatins A,B



sintokamide A

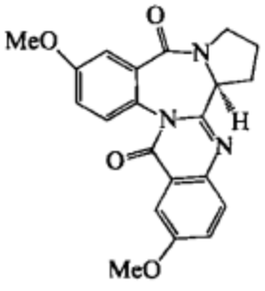


trichoderide A

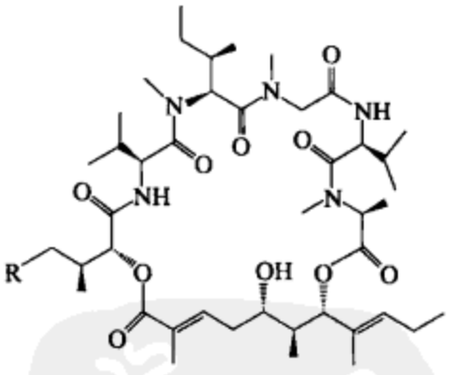


R=Br
R=H

phakellin alkaloids

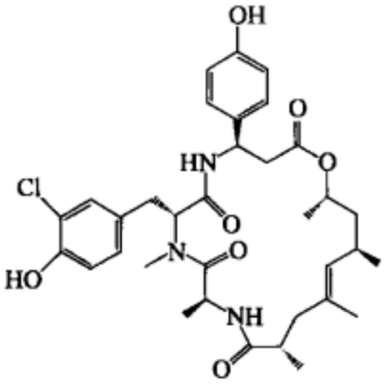


circumdatin J

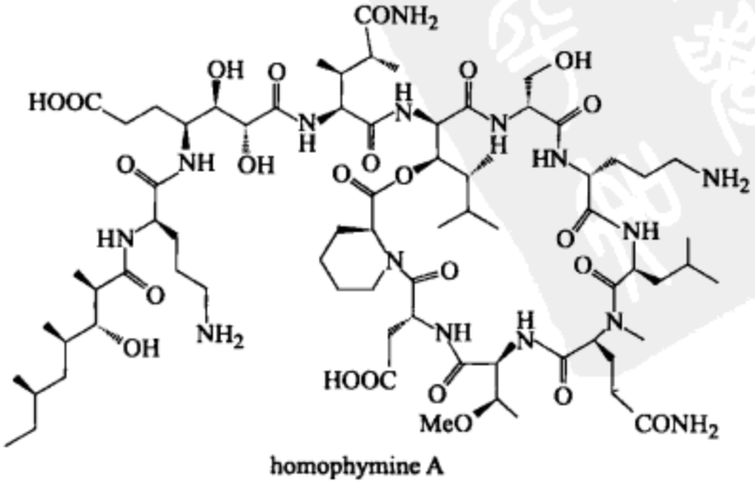


B R=Me
C R=H

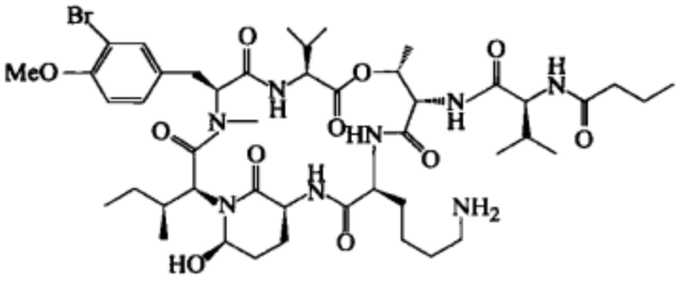
Aurilide B, C



furanoditerpenoid

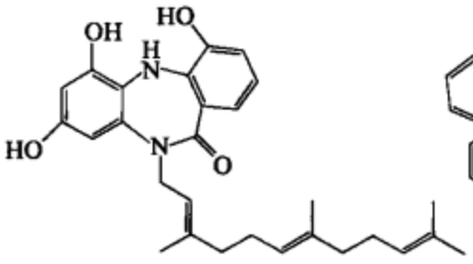


homophymine A

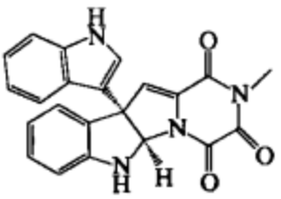


Coibamide A

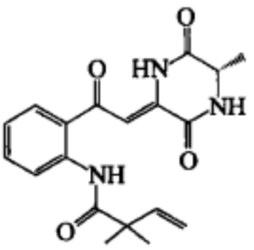
图 5.4-2　部分海洋微生物肽类活性代谢产物结构式



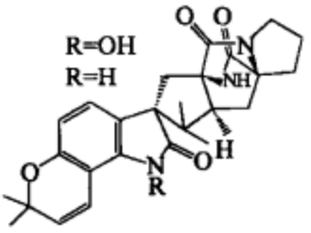
Diazepinomicin



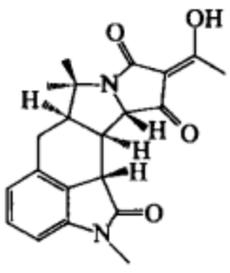
Gliocladins C



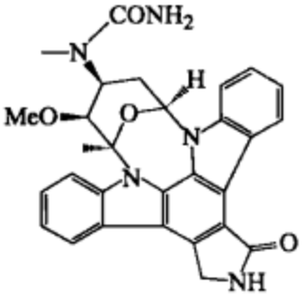
Golmaenone



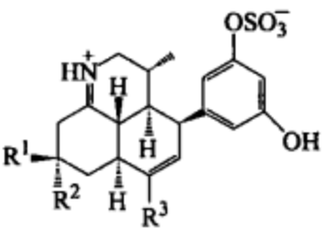
notoamides A,B



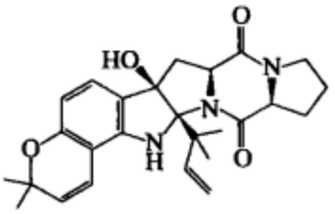
speradine A



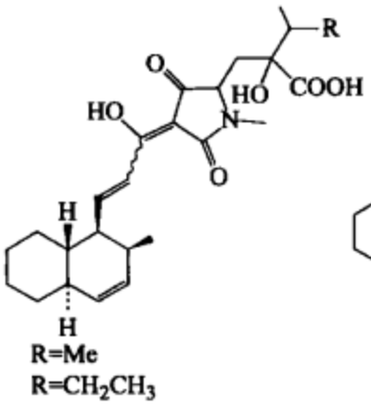
lipoxazolidinones A～C



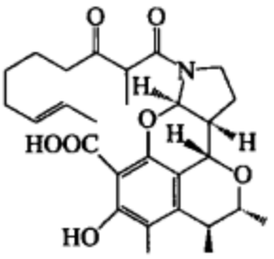
Neosymbioimine



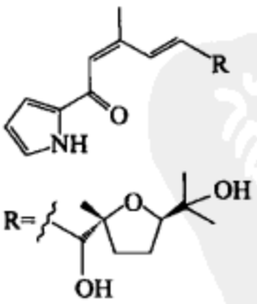
notoamides D



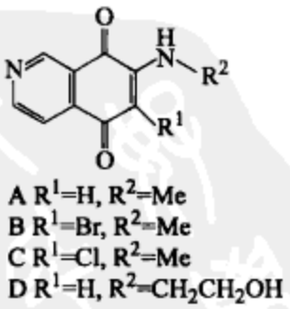
zopfiellamides A,B



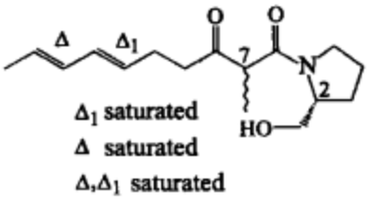
perinadine A



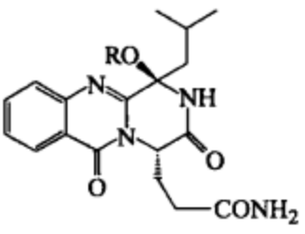
glaciapyrroles A



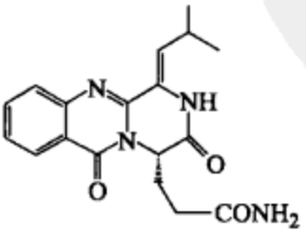
Calibugulones A～D



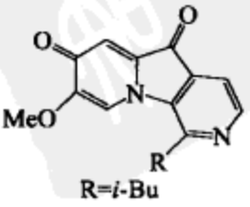
scalusamides A～C



aurantiomides A

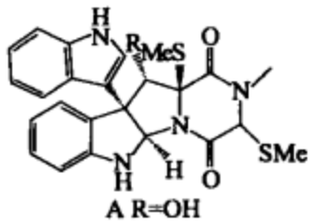


aurantiomides C



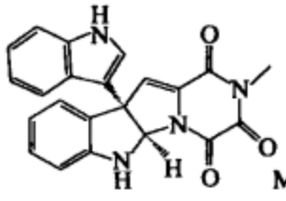
pterocellins A,B

图 5.4-3

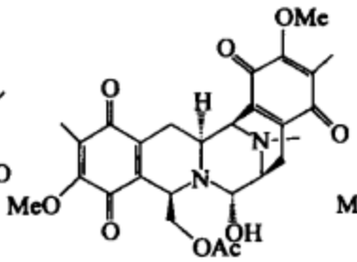


A R=OH
B R=H

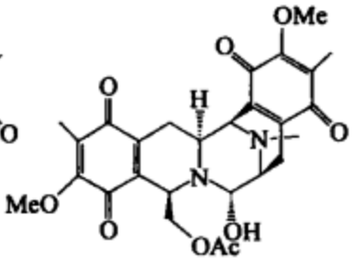
gliocladins A,B



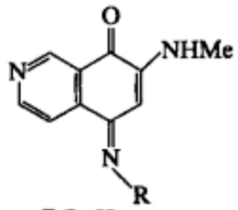
Gliocladins C



jorumycin

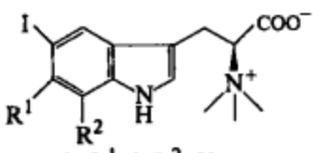


Jorumycin



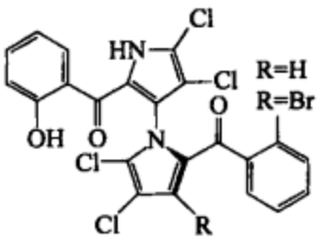
E R=H
F R=CH_2CH_2OH

Calibugulones E,F

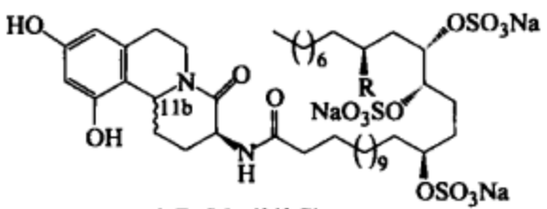


D R^1=I, R^2=H
E R^1=R^2=I
F R^1=H, R^2=Cl

plakohypaphorines D～F

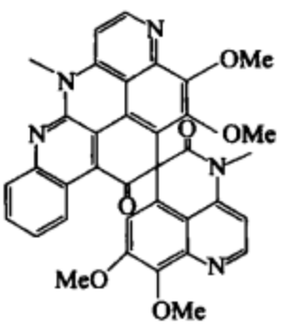


Marinopyrroles A,B

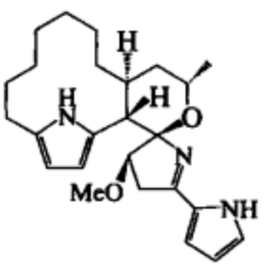


A R=Me,(11b*R*)
B R=H,(11b*S*)
C R=H,(11b*R*)

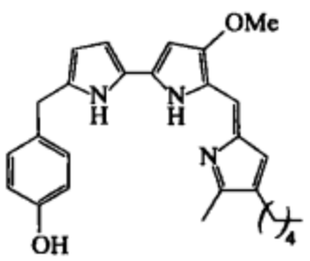
schulzeines A～C



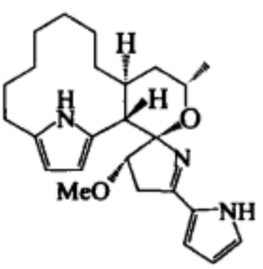
Lihouidine



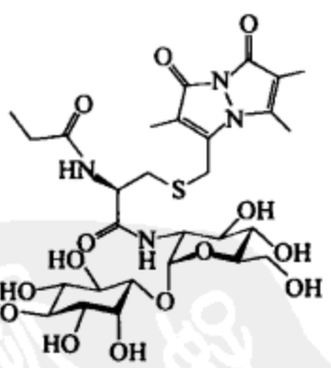
Spiroaminals marineosin A



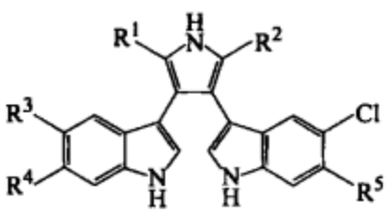
2-(*p*-hydroxybenzyl)prodigiosin



Spiroaminals marineosin B

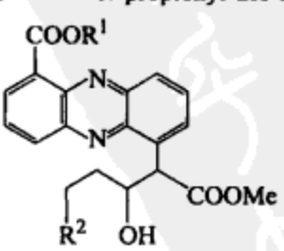


N-propionyl-des-acetyl-mycothiol



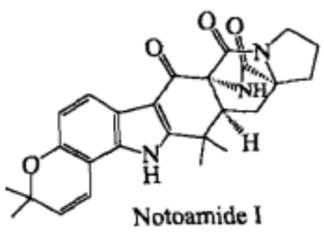
R^1=R^4=R^5=H, R^2=COOMe, R^3=Cl
R^1=R^5=H, R^2=COOMe, R^3=R^4=Cl
R^1=R^2=H, R^3=R^4=R^5=Cl
R^1=R^2=COOMe, R^3=Cl, R^4=R^5=H
R^1=R^2=COOMe, R^3=R^4=R^5=H

ynamicins A～E

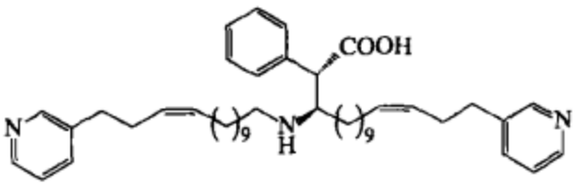


R^1=Me, R^2=$(CH_2)_3Me$
R^1=H, R^2=CH_2CHMe_2
R^1=Me, R^2=$CHMe_2$
R^1=Me, R^2=CH_2Me
R^1=Me, R^2=$CH_2CH_2CHMe_2$
R^1=Me, R^2=$CH_2CH(Me)CH_2Me$
R^1=Me, R^2=CH_2COHMe_2

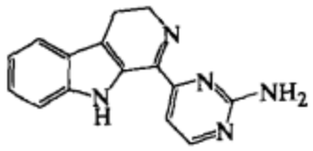
streptophenazines A～H



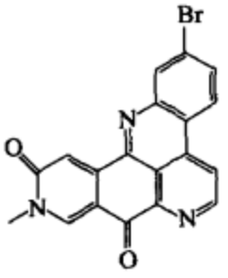
Notoamide I



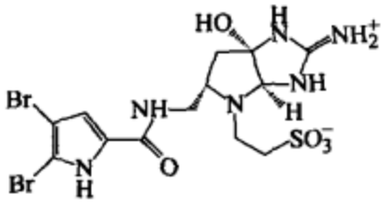
nakinadines D



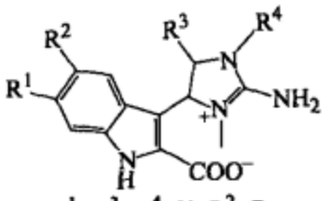
acanthomine A



2-bromoamphimedine

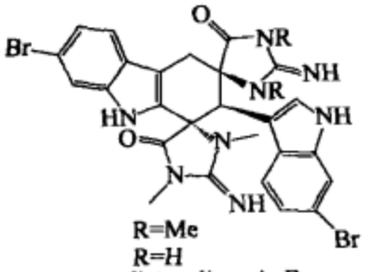


nagelamides M



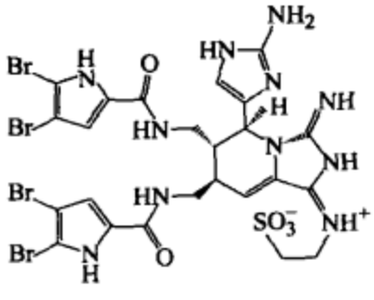
R^1=R^3=R^4=H, R^2=Br
R^1=R^3=H, R^2=Br, R^4=Me
R^1=OH, R^2=Br, R^3=R^4=H
R^1=OH, R^2=Br, R^3=H, R^4=Me
R^1=H, R^2=Br, R^3=OH, R^4=Me
R^1=R^3=OH, R^2=Br, R^4=Me
R^1=R^2=R^3=R^4=H

trachycladindole A～G

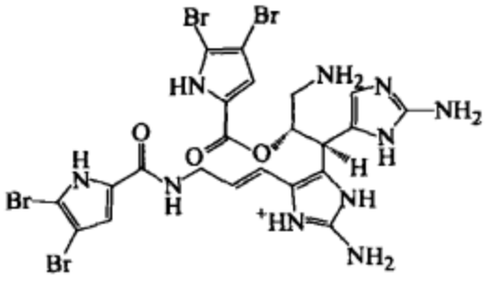


R=Me
R=H

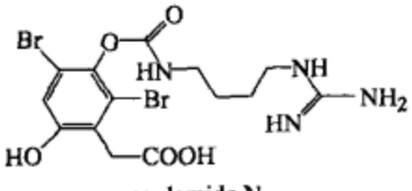
dictazolines A, B



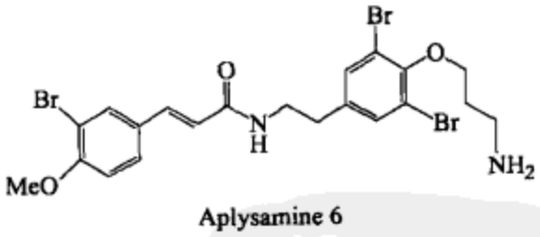
nagelamides K



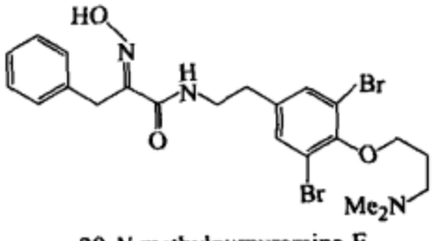
nagelamides L



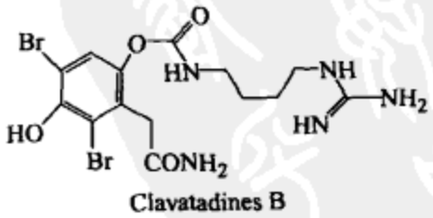
nagelamide N



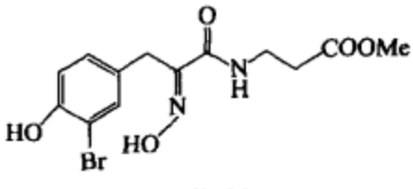
Aplysamine 6



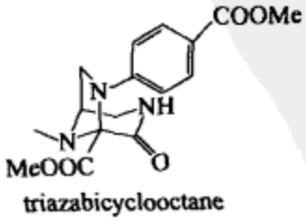
20-*N*-methylpurpuramine-E



Clavatadines B

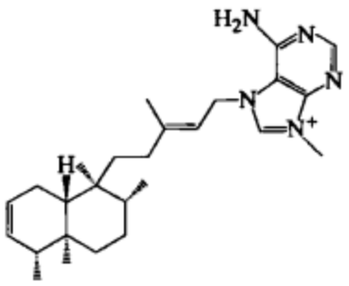


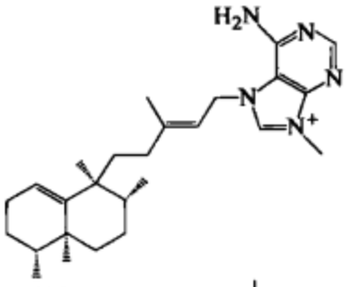
psammaplin M



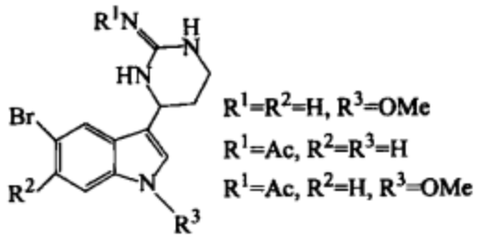
triazabicyclooctane

图 5.4-3

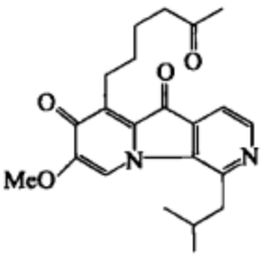


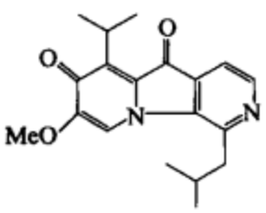


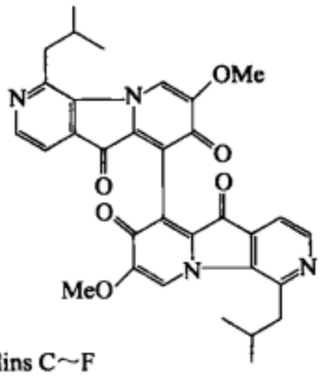
agelasines K,L

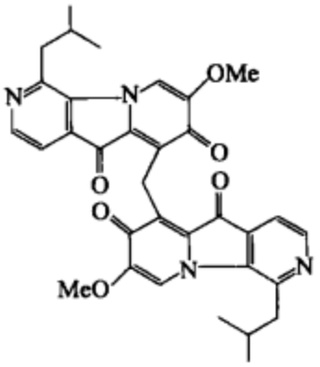


Aplicyanins B,C,D

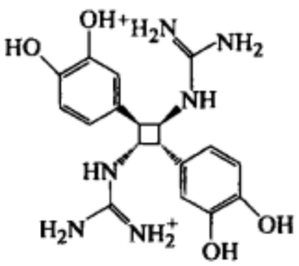




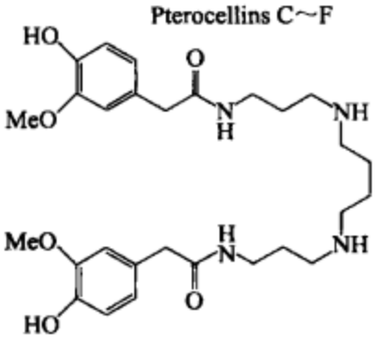




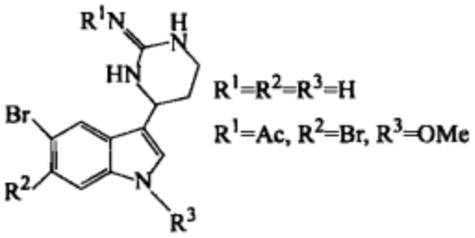
Pterocellins C~F



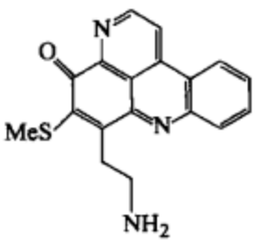
二聚物



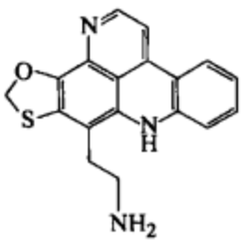
亚精胺衍生物



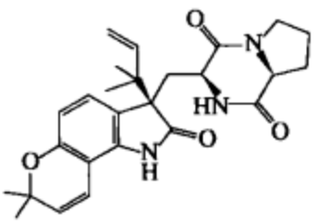
Aplicyanins A,E



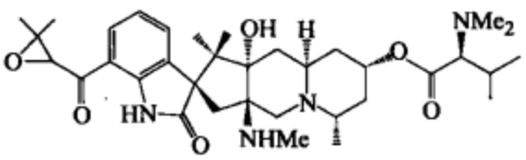
alkaloids diplamine B



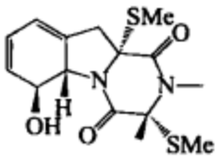
lissoclinidine B



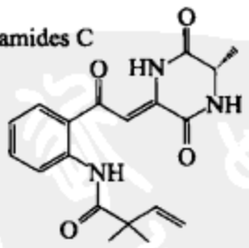
notoamides C



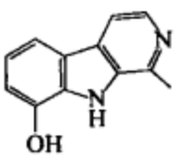
Citrinadin A



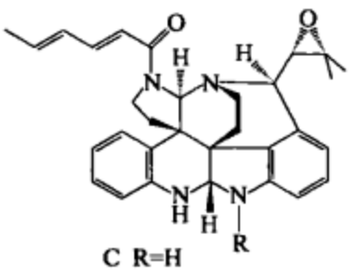
二酮哌嗪生物碱



Golmaenone

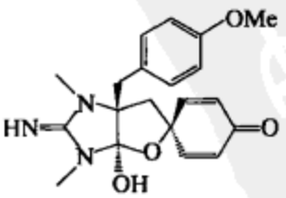


8-hydroxyharman



C R=H
D R=CHO

Communesins C,D



spiroleucettadine

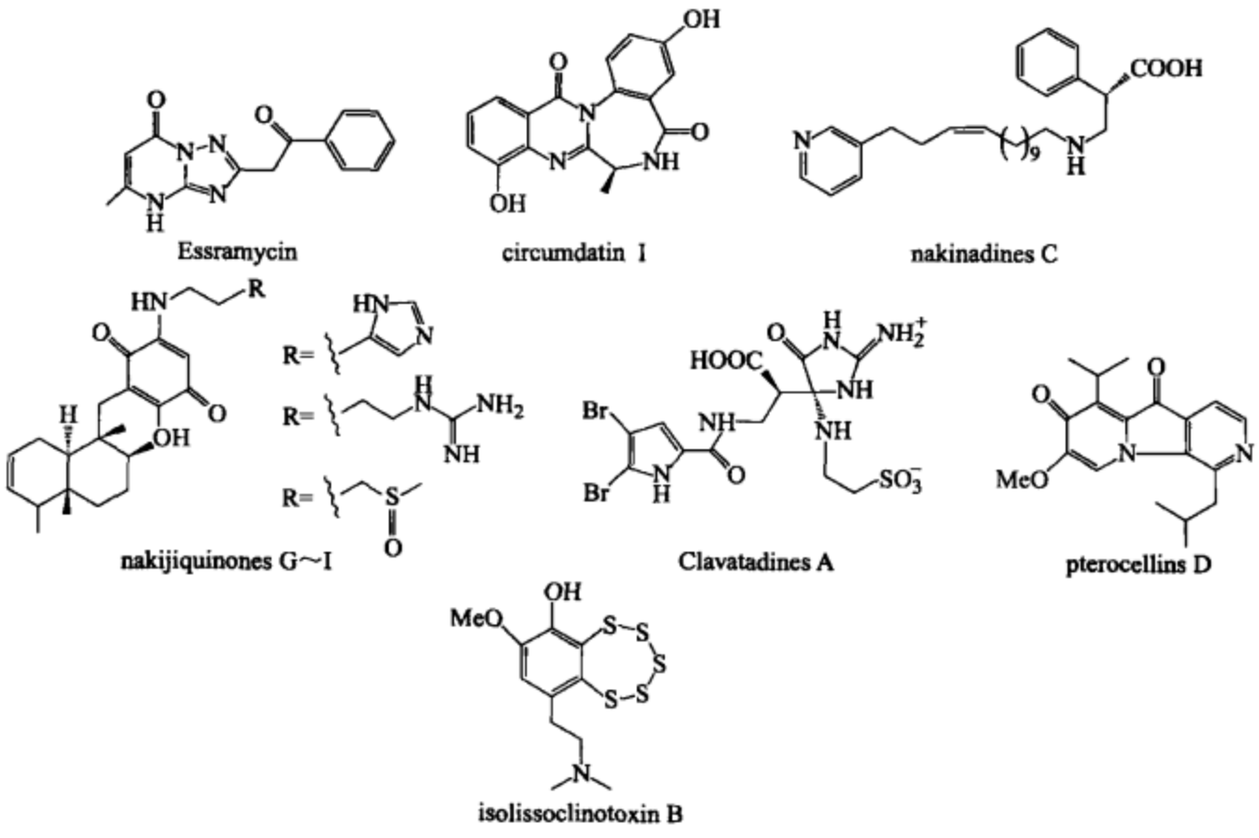


图 5.4-3　部分海洋微生物生物碱类活性代谢产物结构式

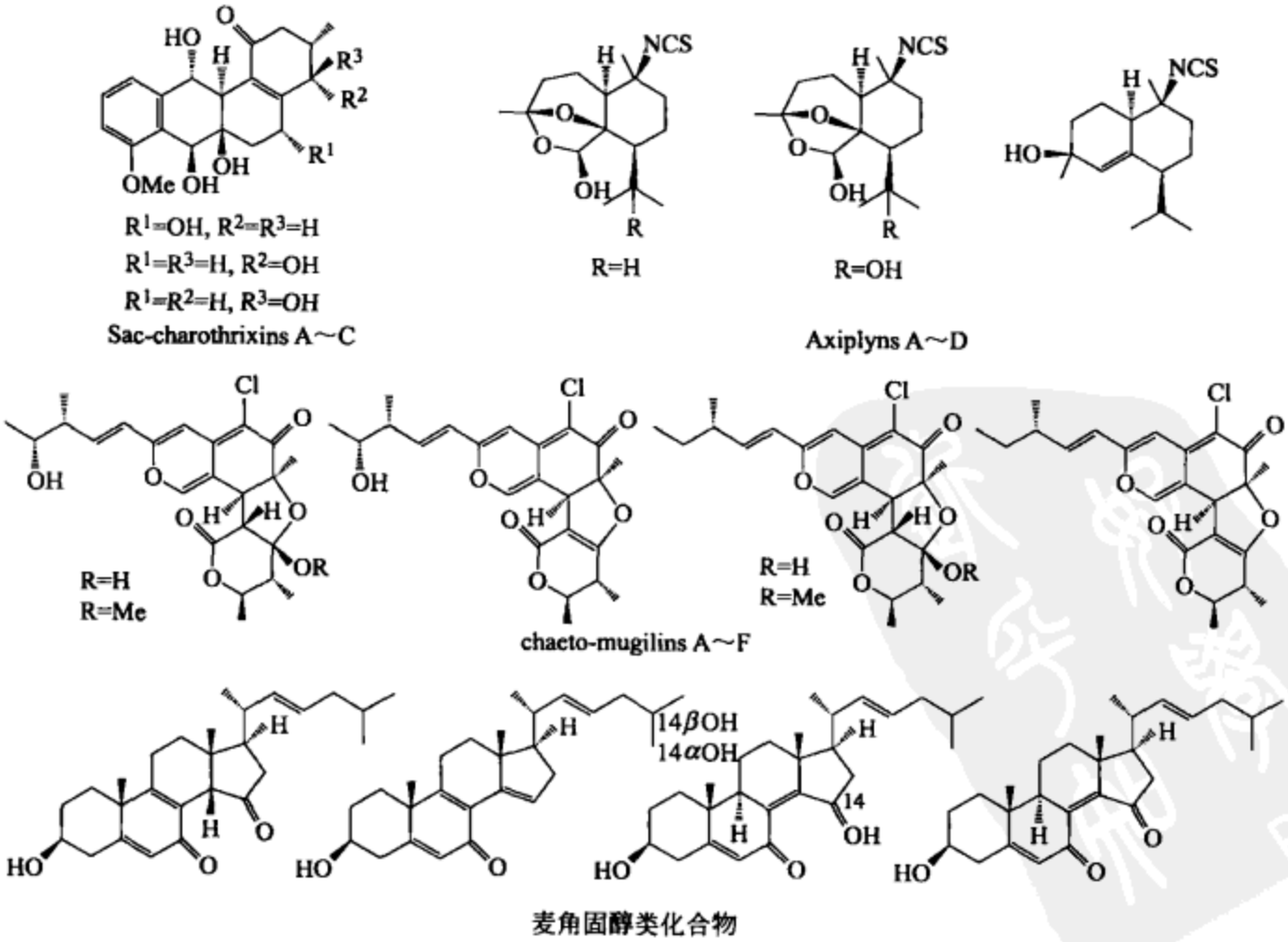
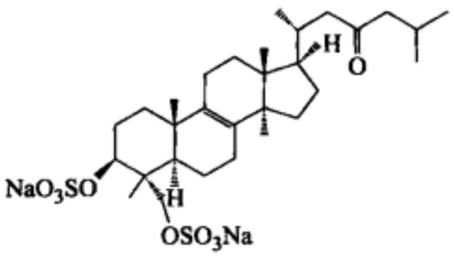
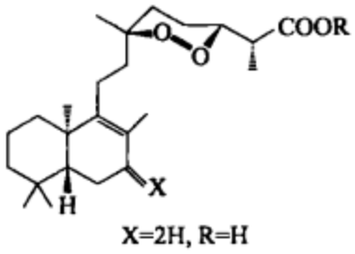


图 5.4-4

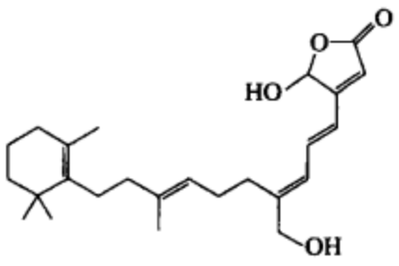


lanostane-typetriterpenoid disulfate

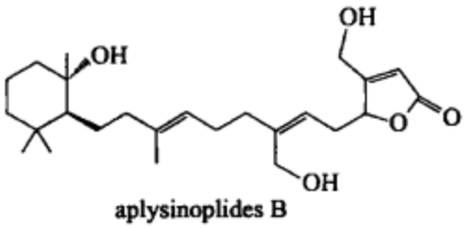


X=2H, R=H

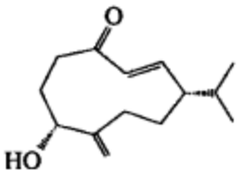
diacarperoxide D



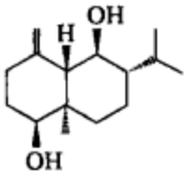
aplysinoplides A



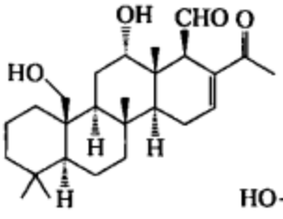
aplysinoplides B



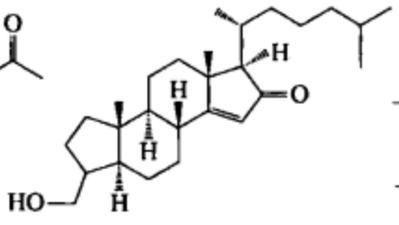
aplysinoplides C



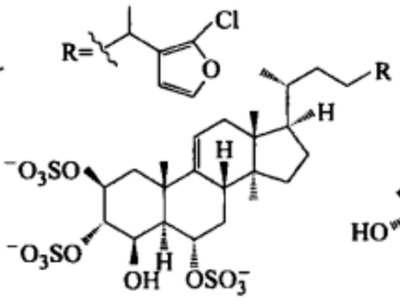
Polydactins A和B



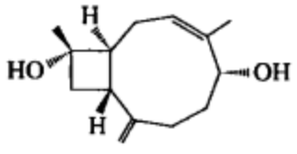
terpenoid



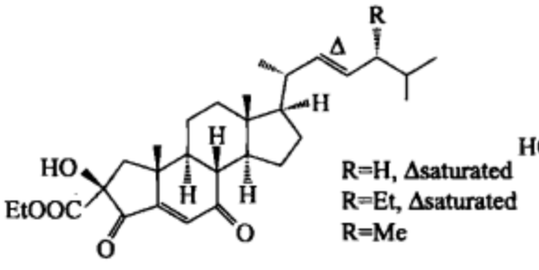
norsterol



Chlorotopsentiasterol sulfate D

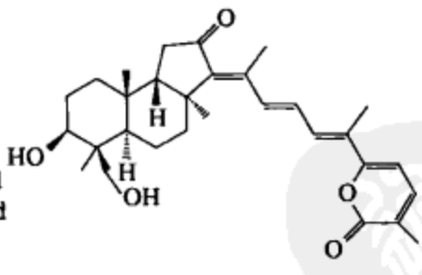


sinunorcaryophyllenol

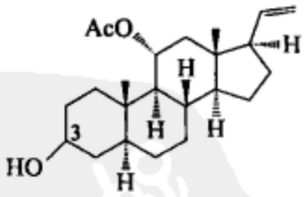


R=H, Δsaturated
R=Et, Δsaturated
R=Me

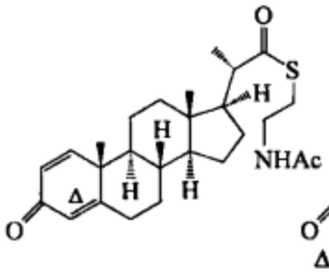
去甲类固醇



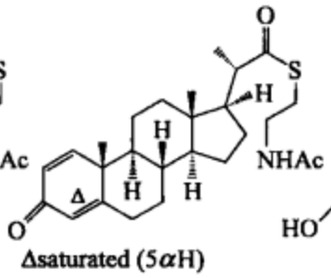
triterpenoids rhabdastrellins A



孕甾烷

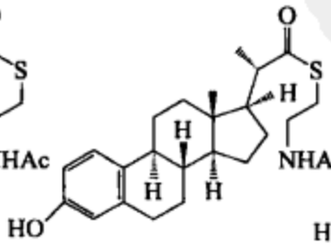


Parathiosteroids A

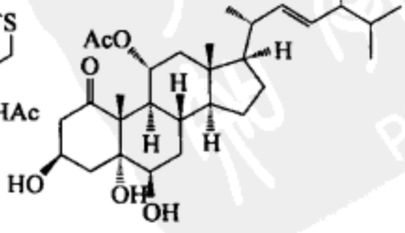


Δsaturated (5αH)

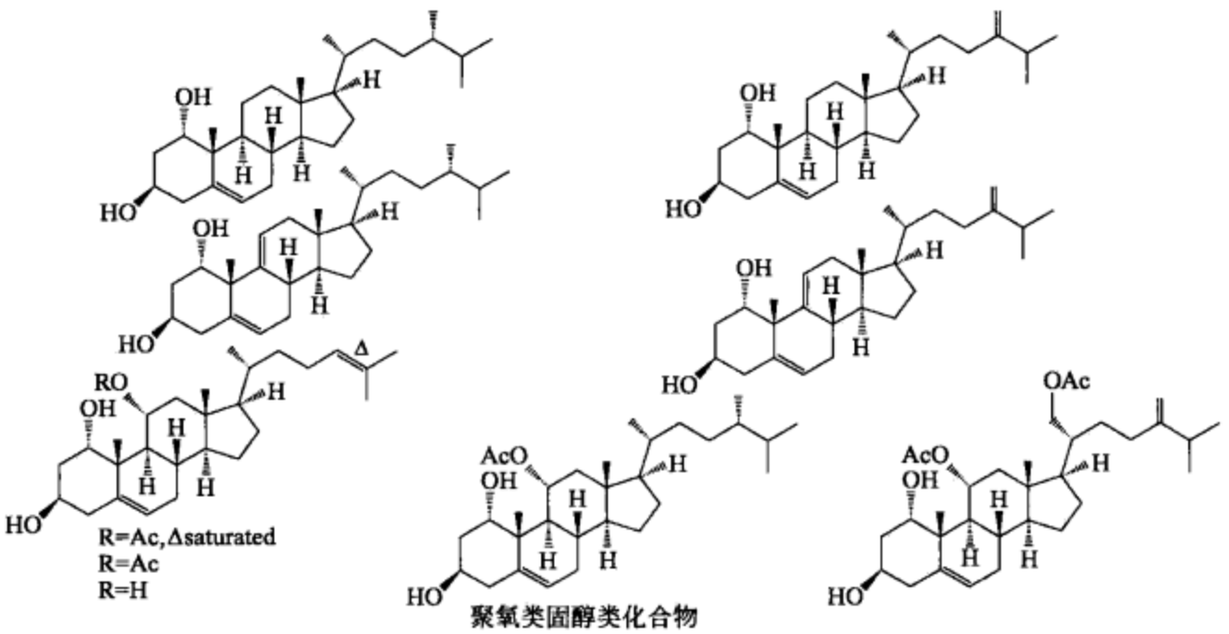
Parathiosteroids B



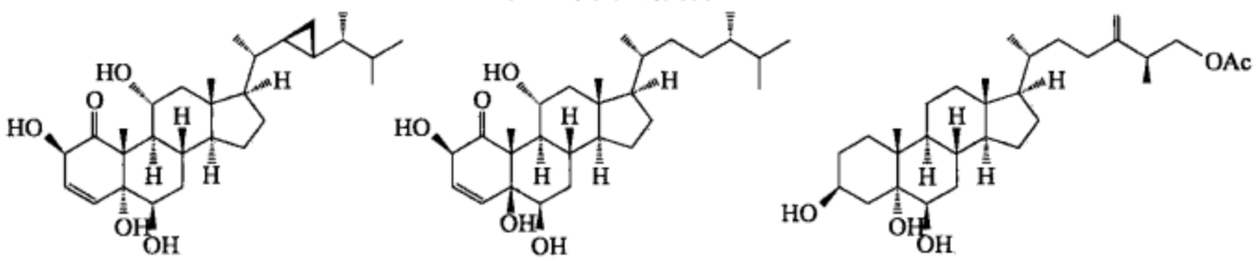
Parathiosteroids C



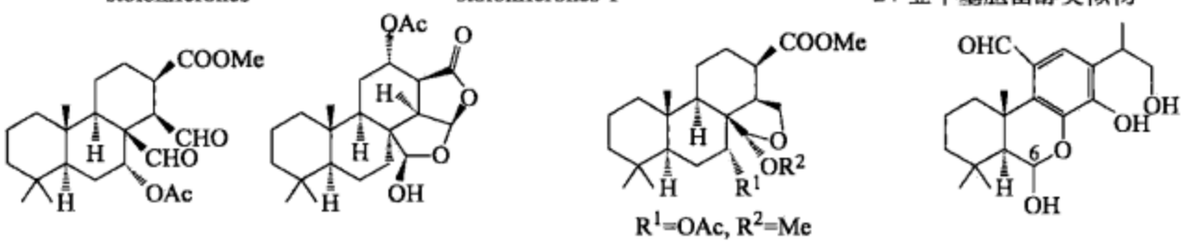
stoloniferones R



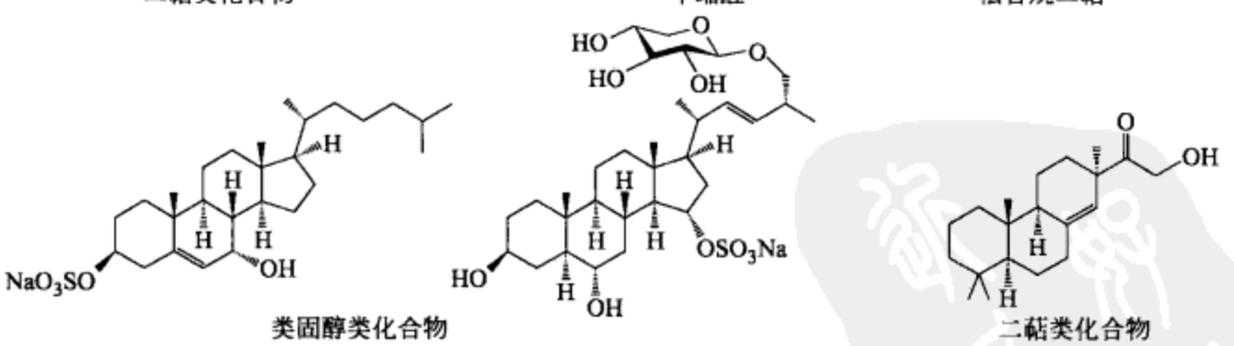
聚氧类固醇类化合物



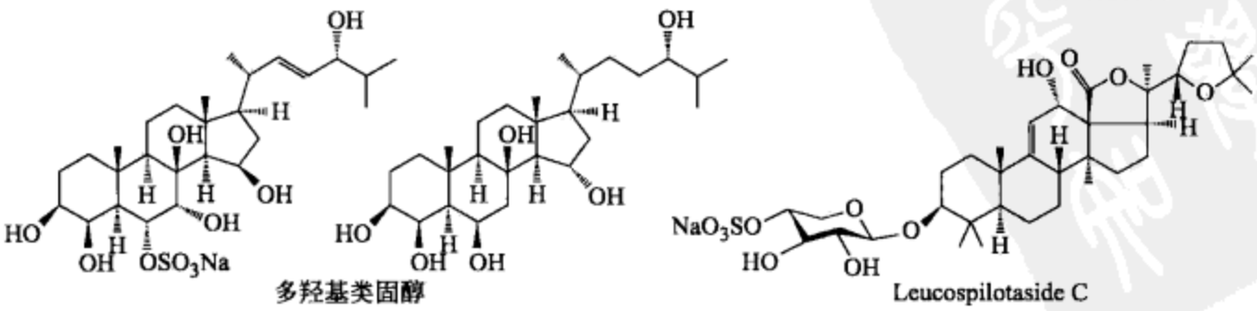
stoloniferones　　stoloniferones T　　24-亚甲基胆甾醇类似物



二萜类化合物　　半缩醛　　松香烷二萜

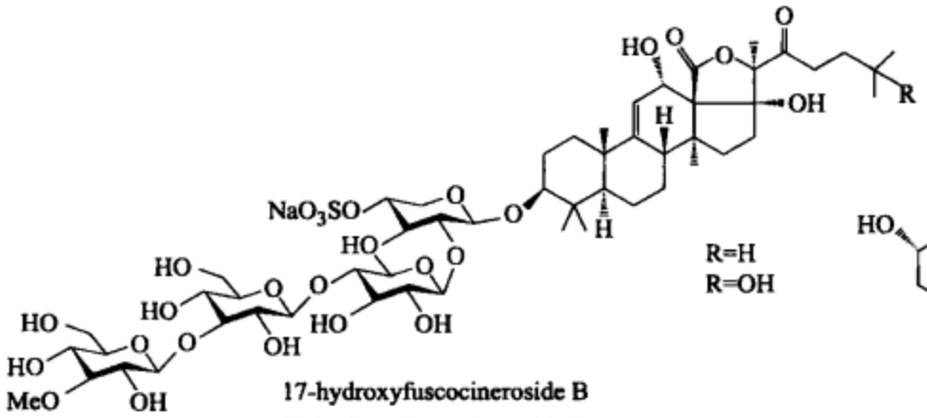


类固醇类化合物　　二萜类化合物

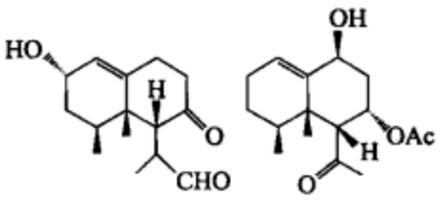


多羟基类固醇　　Leucospilotaside C

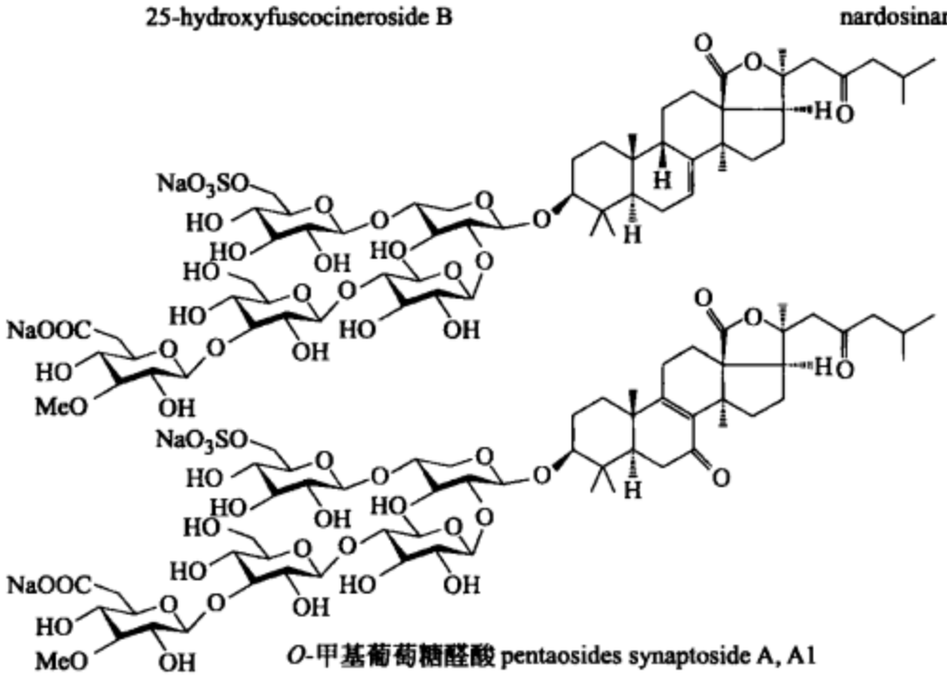
图 5.4-4



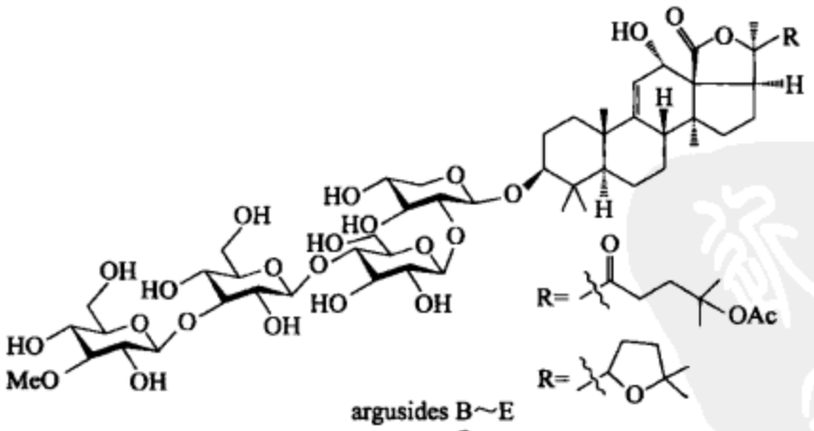
17-hydroxyfuscocineroside B
25-hydroxyfuscocineroside B



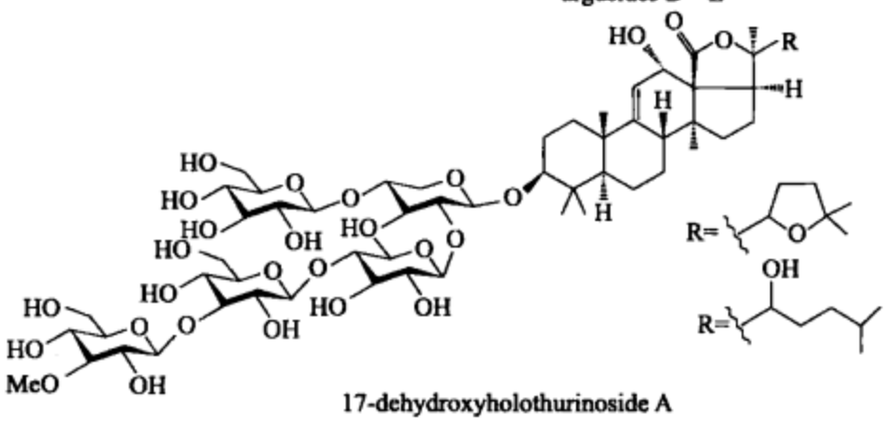
nardosinanols C
nardosinanols G



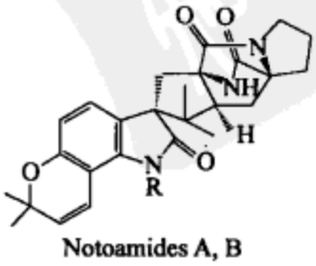
O-甲基葡萄糖醛酸 pentaosides synaptoside A, A1



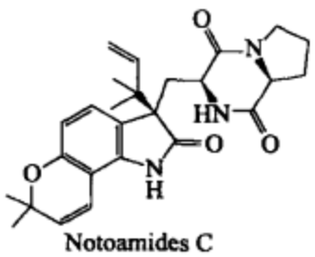
argusides B~E



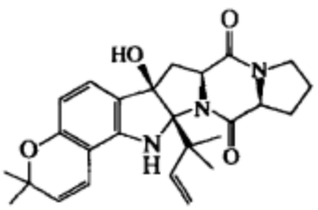
17-dehydroxyholothurinoside A



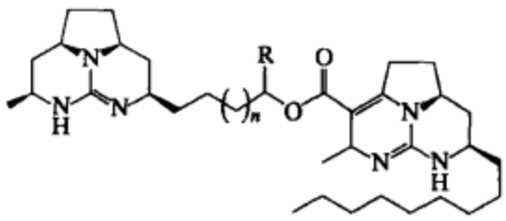
Notoamides A, B



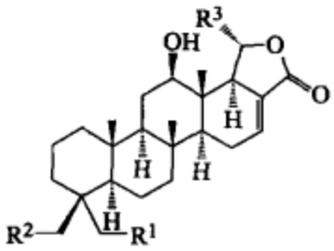
Notoamides C



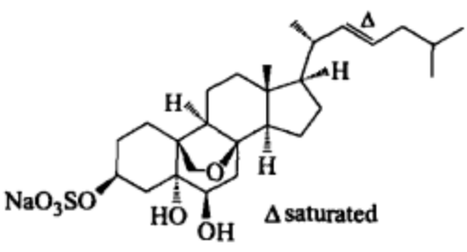
Notoamides D



Batzelladines M

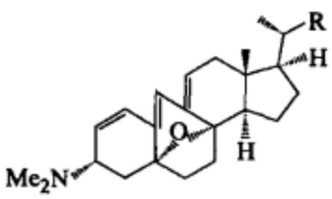


Irregularasulfate

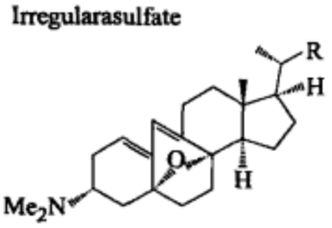


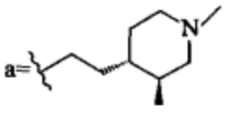
eurysterols A, B

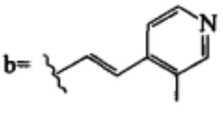
Δ saturated

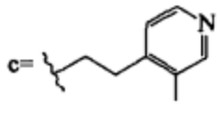


R=a New cortistatins F

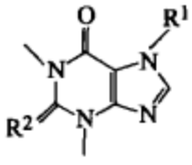


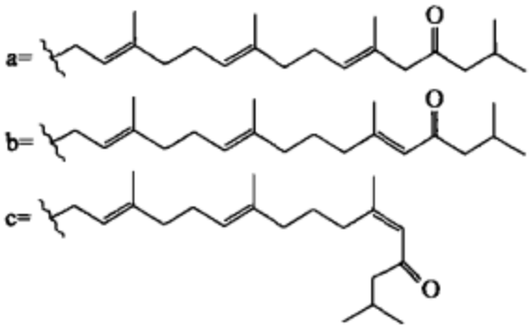




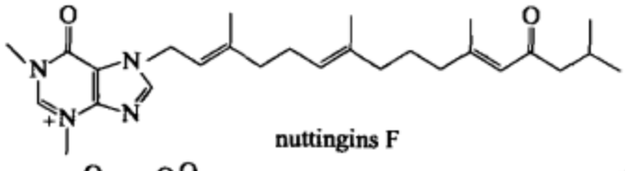


R=a New cortistatins E, R=b New cortistatins G, R=c New cortistatins H

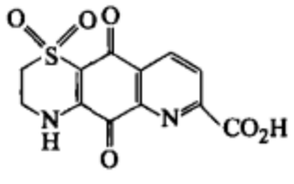




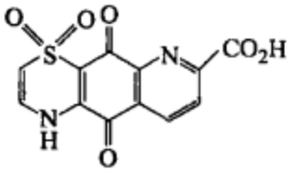
R^1=a	R^2=O	nuttingins A
R^1=c	R^2=O	nuttingins B
R^1=b	R^2=2H	nuttingins C
R^1=c	R^2=2H	nuttingins D



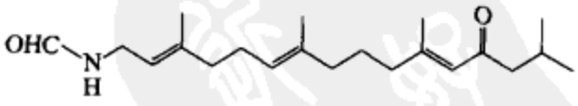
nuttingins F



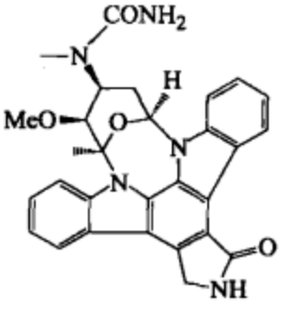
ascidiathiazones A



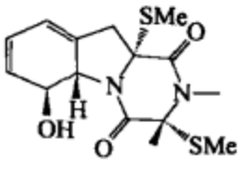
ascidiathiazones B



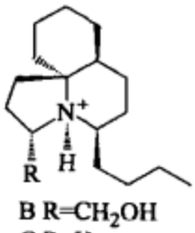
Malonganenones I



Staurosporine(星形孢菌素)

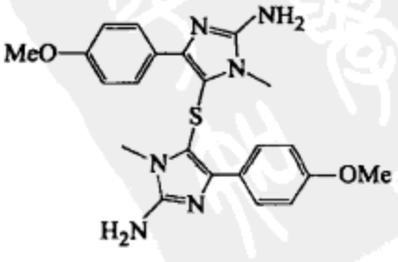


dioxopiperazine alkaloid



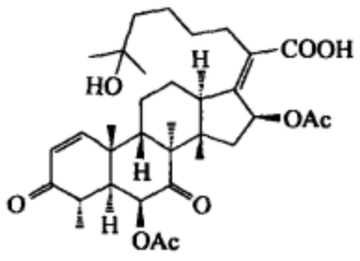
B R=CH_2OH
C R=H

lepadiformines B, C

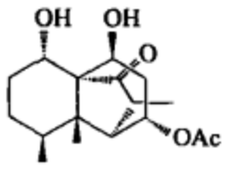


Polycarpaurines A

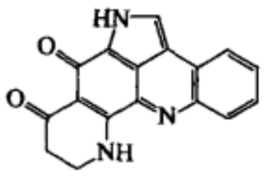
图 5.4-4



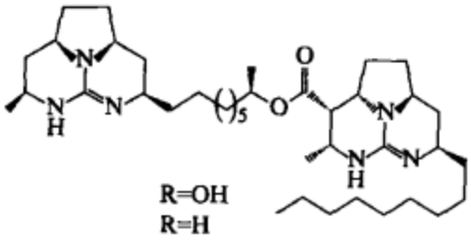
29-nordammarane triterpenoid



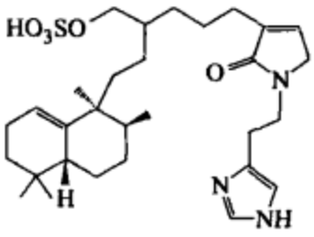
lemnafricanol



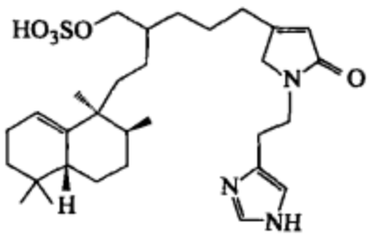
plakinidine E



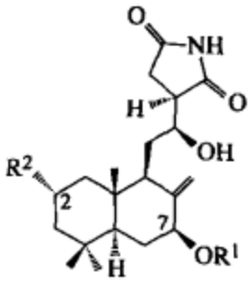
Batzelladines L



fasciospongines A

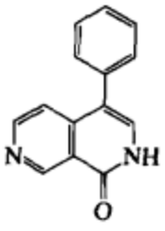


fasciospongines B

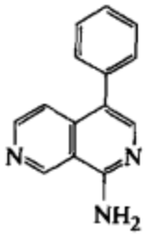


N R^1=Ac, R^2=Cl
Q R^1=R^2=H

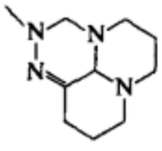
labdane alkaloids N, Q



lophocladines A

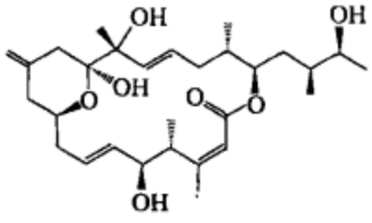


lophocladines B

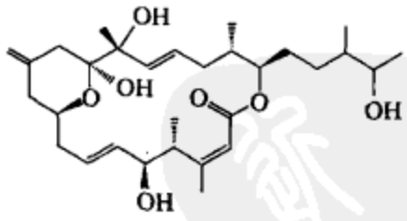


Cinachyramine

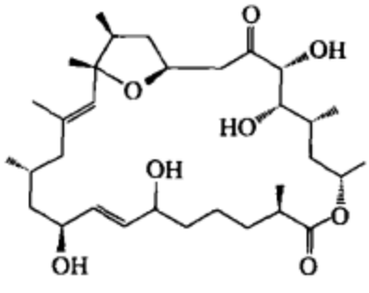
图 5.4-4　部分海洋微生物萜类活性代谢产物结构式



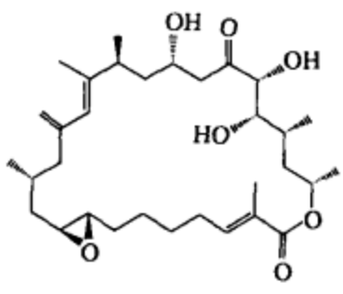
iriomoteolides-1a



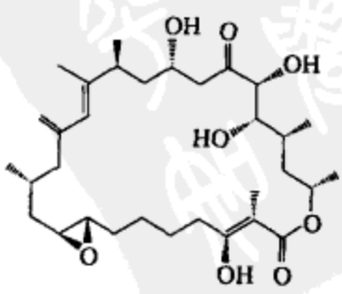
iriomoteolides-1c



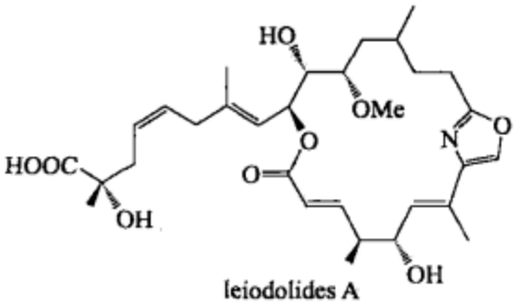
amphidinolactone B



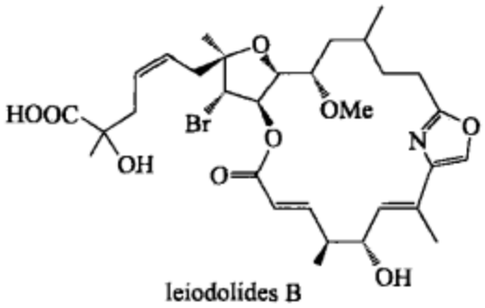
amphidinolides B6



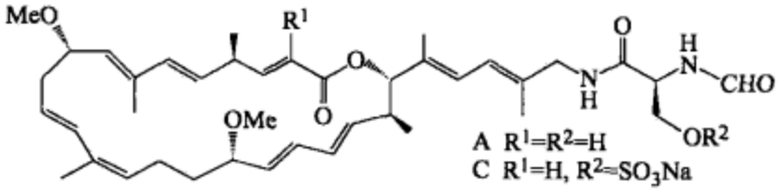
amphidinolides B7



leiodolides A

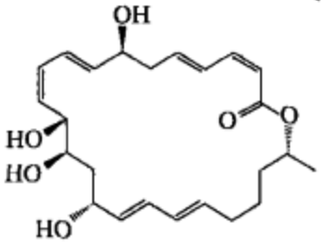


leiodolides B

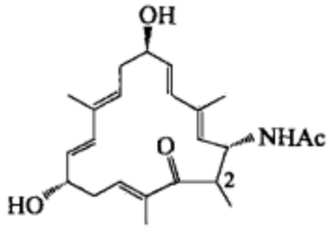


A R^1=R^2=H
C R^1=H, R^2=SO_3Na
D R^1=Me, R^2=SO_3Na

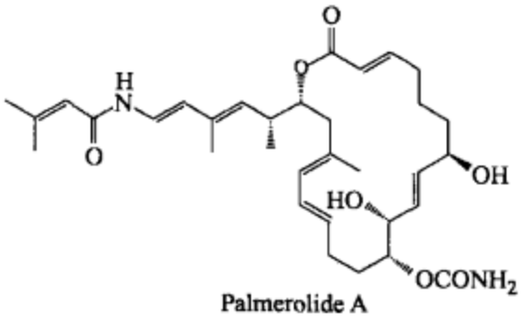
iejimalides A, C, D



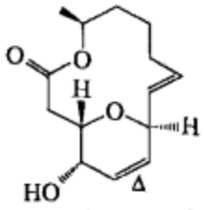
macrolactin S



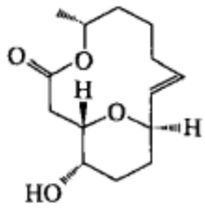
Chejuenolides A (2*R*), B(2*S*)



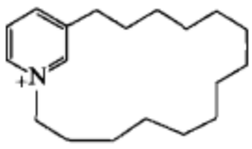
Palmerolide A



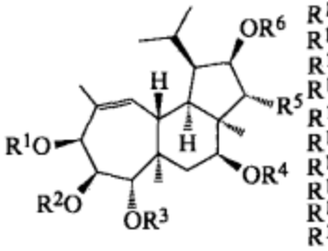
Δ saturated



aspergillide A～C

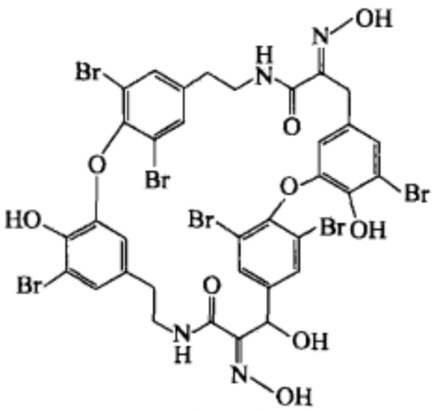


生物碱类化合物

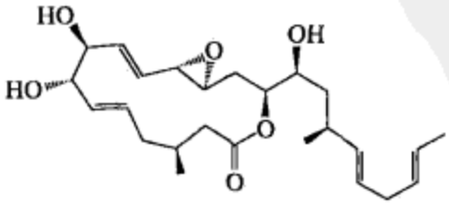


R^1=H, R^2=Ac, R^3=R^6=*n*PrCO, R^4=EtCO, R^5=*n*PrCOO
R^1=H, R^2=R^4=Ac, R^3=R^6=*n*PrCO, R^5=*n*PrCOO
R^1=H, R^2=Ac, R^3=R^4=R^6=*n*PrCO, R^5=EtCOO
R^1=H, R^2=Ac, R^3=R^4=*n*PrCO, R^5=*n*PrCOO, R^6=*n*BuCO
R^1=R^5=H, R^2=R^4=Ac, R^3=R^6=*n*PrCO
R^1=R^5=H, R^2=Ac, R^3=R^6=*n*PrCO, R^4=*i*BuCO
R^1=R^4=Ac, R^2=R^5=H, R^3=R^6=*n*PrCO
R^1=Ac, R^2=H, R^3=R^4=R^6=*n*PrCO, R^5=*n*PrCOO
R^1=H, R^2=R^3=Ac, R^4=R^6=*n*PrCO, R^5=*n*PrCOO
R^1=H, R^2=EtCO, R^3=R^4=R^6=*n*PrCO, R^5=*n*PrCOO

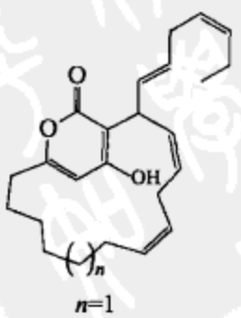
Gagunins H—O



Bastadin



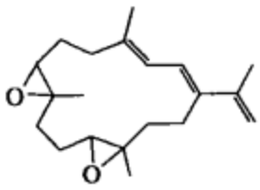
iriomoteolide-3a



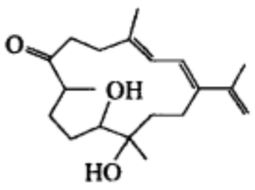
n=1
n=3

neurymenolide A, B

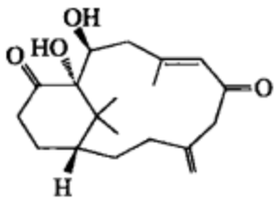
图 5.4-5



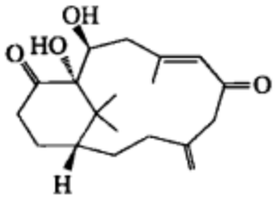
diepoxysarcophytonene



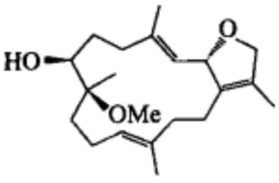
sarconphytonol



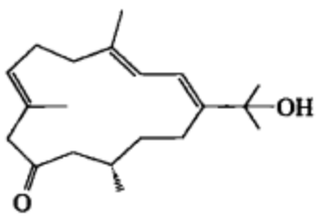
10-oxocembranoids grandilobatins D



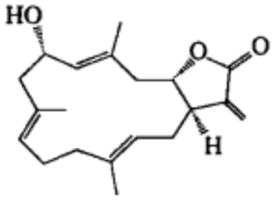
10-oxocembranoids grandilobatins A



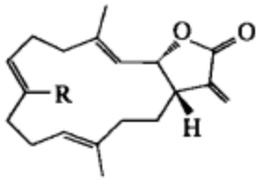
cespihypotins T



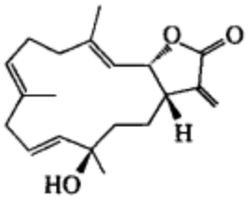
烟草烷类化合物



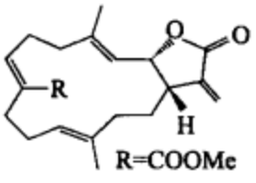
crassumolides A



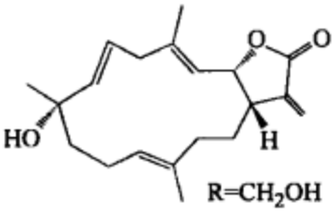
crassumolides B



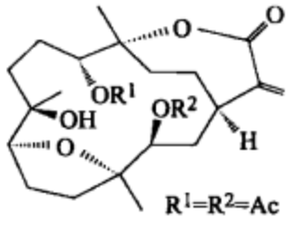
crassumolides D



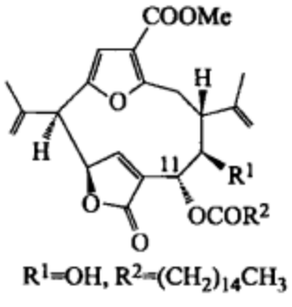
crassumolides C



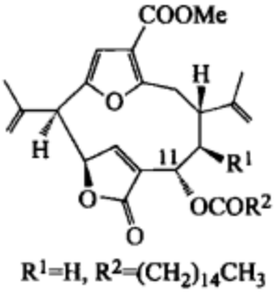
crassumolides F



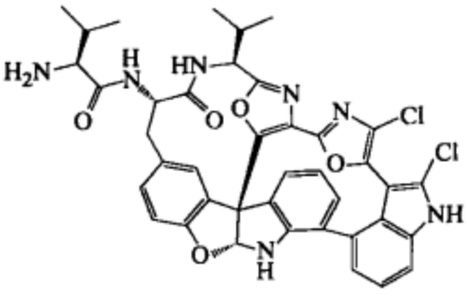
3-lactones queriformolide C



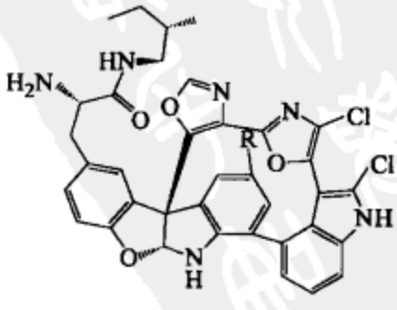
Lipidyl pseudopteranes A



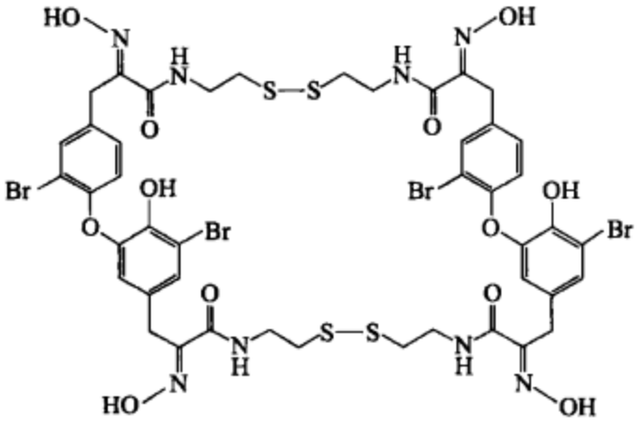
Lipidyl pseudopteranes D



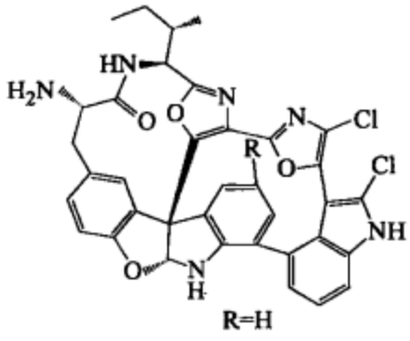
diazonamides C



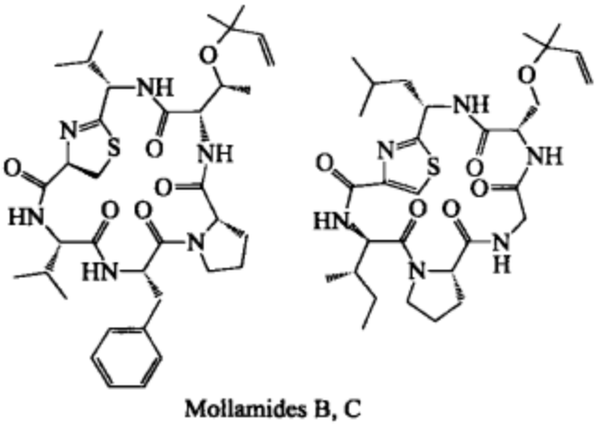
diazonamides D



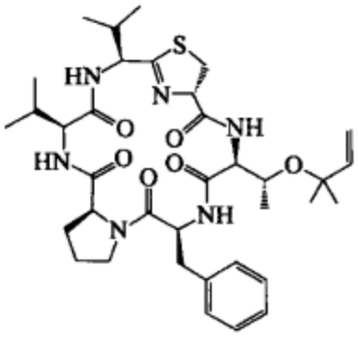
cyclobispsammaplin A



diazonamides E

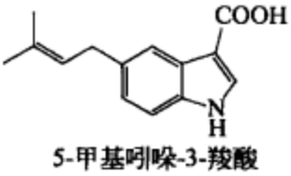


Mollamides B, C

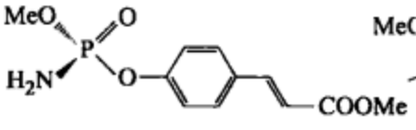


hexamollamide

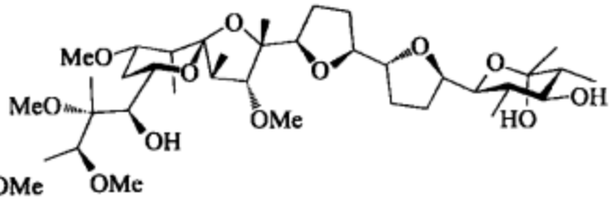
图 5.4-5　部分海洋微生物大环内酯类活性代谢产物结构式



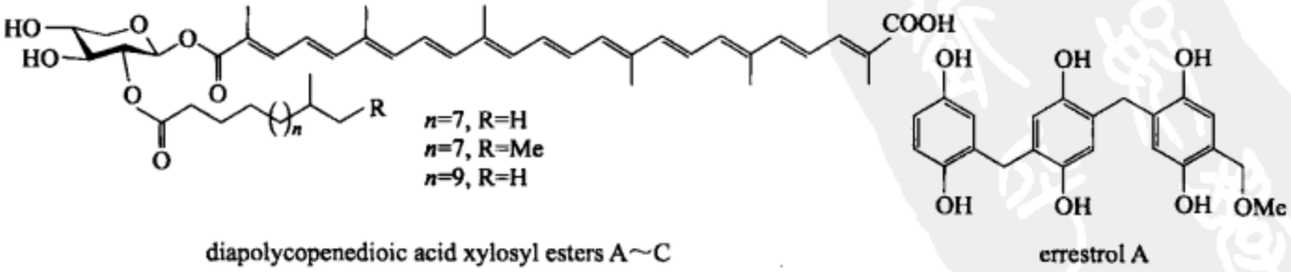
5-甲基吲哚-3-羧酸



cinnamoylphosphoramide

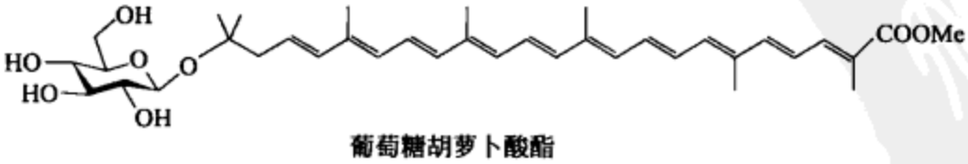


聚醚代谢物



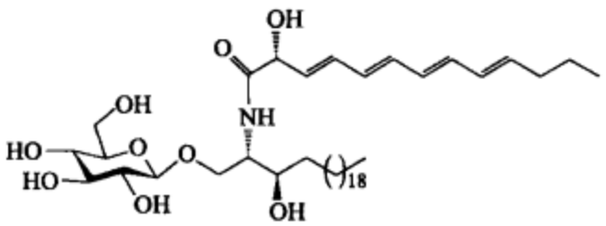
diapolycopenedioic acid xylosyl esters A～C

errestrol A

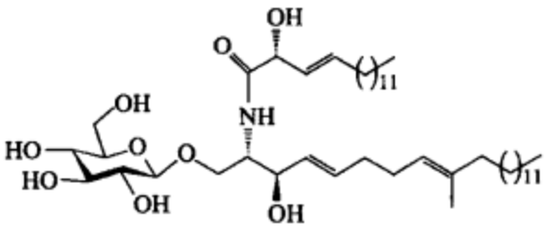


葡萄糖胡萝卜酸酯

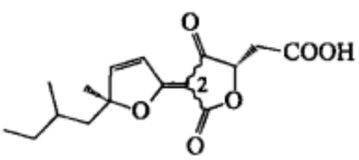
图 5.4-6



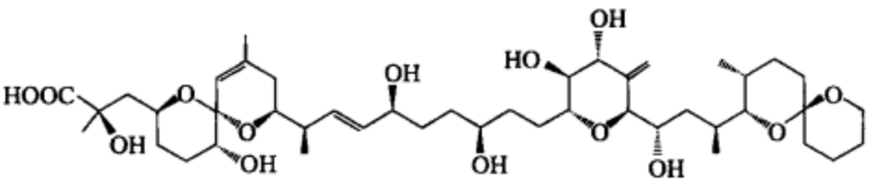
Ayamycin



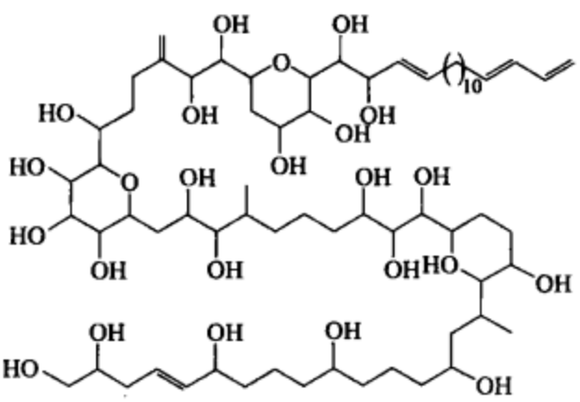
Asperiamides B, C



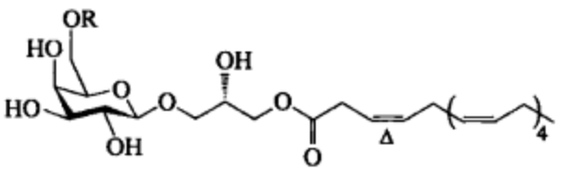
nodulisporacid A



Belizeanic acid

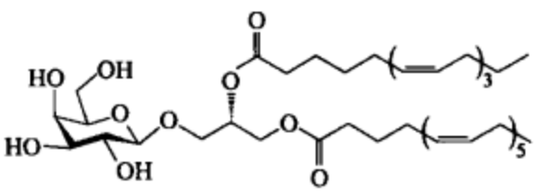


karlotoxin 1

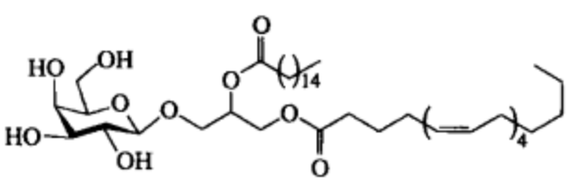


R=H
R=X
Δ saturated, R=X

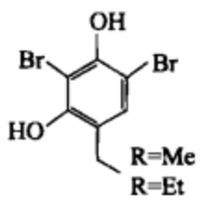
糖脂类化合物



半乳糖脂类化合物

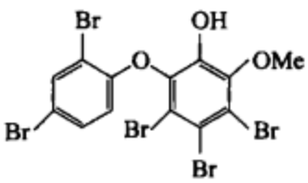


lithanoside

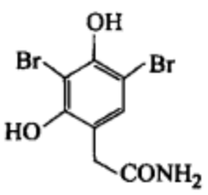


R=Me
R=Et

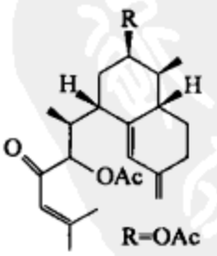
subereaphenols B, C



溴苯酚类化合物

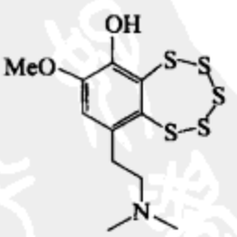


subereaphenol A

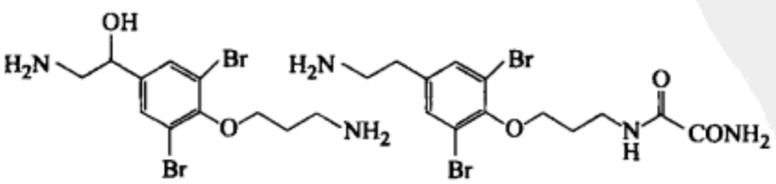


R=OAc

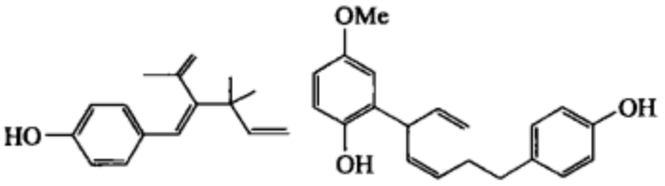
inulodurins A



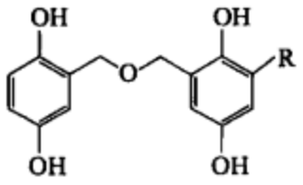
isolissoclinotoxin B



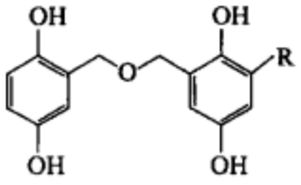
Hydroxymolokai'amine, moloka'iakitamide



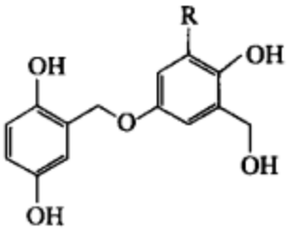
diarylheptanoids, meroterpenoid



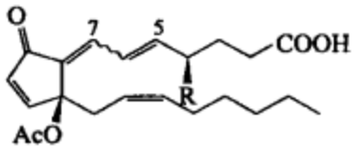
Terrestrol C (R=H)



Terrestrol D (R=Cl)

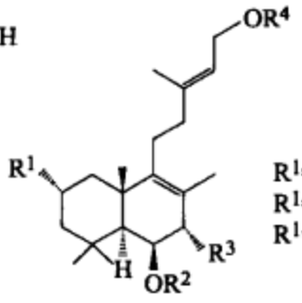


Terrestrol B (R=Cl)



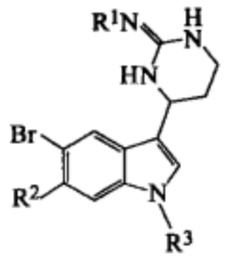
R=H, (5*E*,7*E*)
R=OH, (5*E*,7*E*)
R=OAc, (5*Z*,7*E*)
R=OAc, (5*E*,7*Z*)
R=OAc, (5*Z*,7*Z*)

Claviridic acids A～E



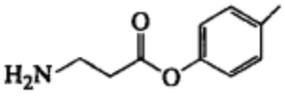
R^1=H, R^2=R^4=Ac, R^3=OAc
R^1=OAc, R^2=Ac, R^3=OAc, R^4=H
R^1=R^2=R^3=R^4=H

代谢物

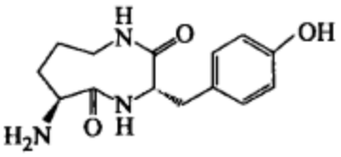


R^1=Ac, R^2=Br, R^3=OMe

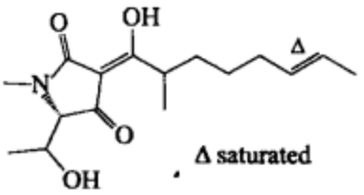
Aplicyanins F



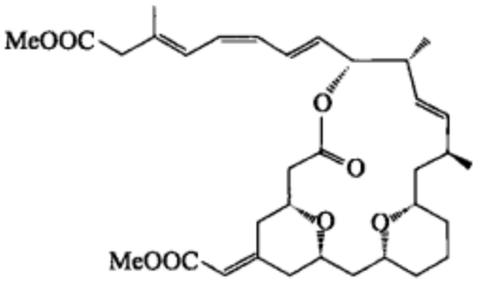
p-tolyl-3-aminopropanoate



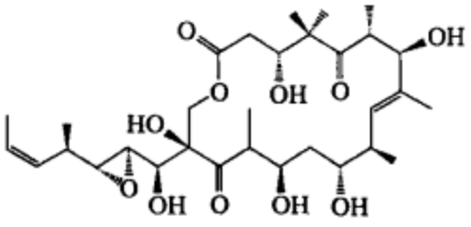
6-amino-3-(4-hydroxy-benzyl)-1, 4-diazonane-2, 5-dione



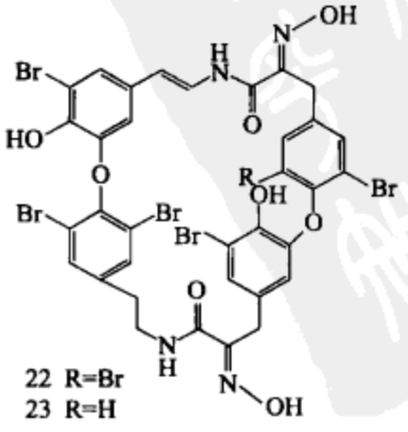
Penicillenols A1



Exiguolide



Tedanolide C



22 R=Br
23 R=H

bastadins-22, 23

图 5.4-6

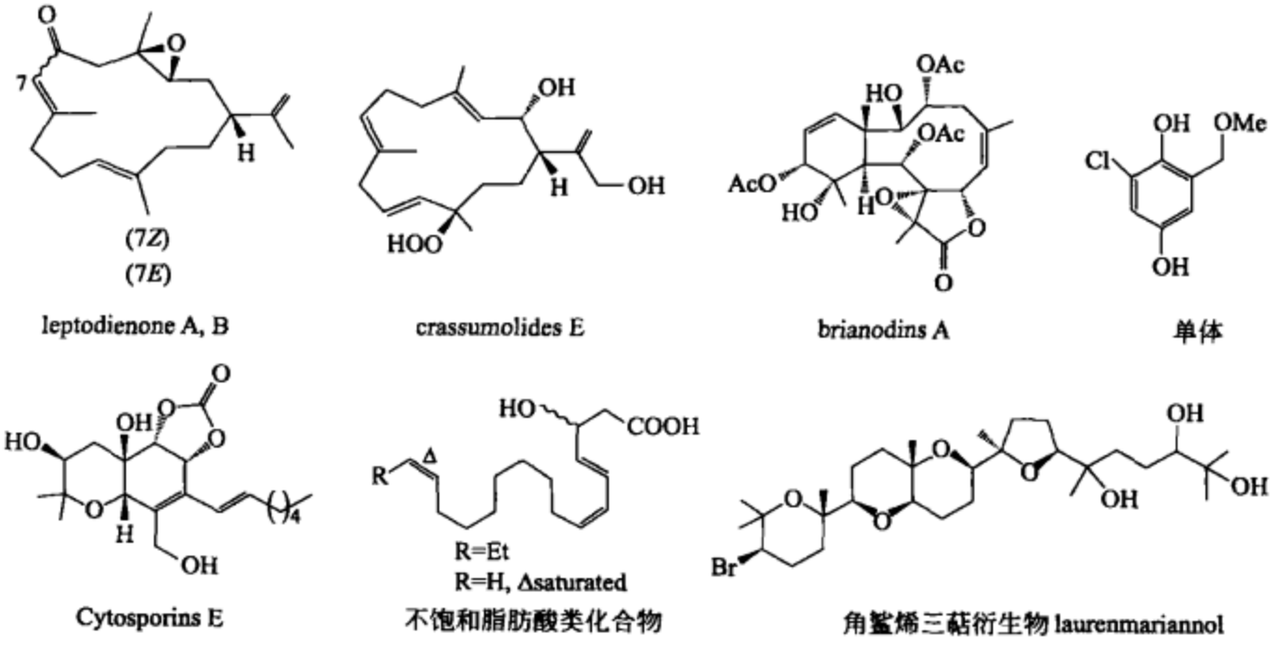
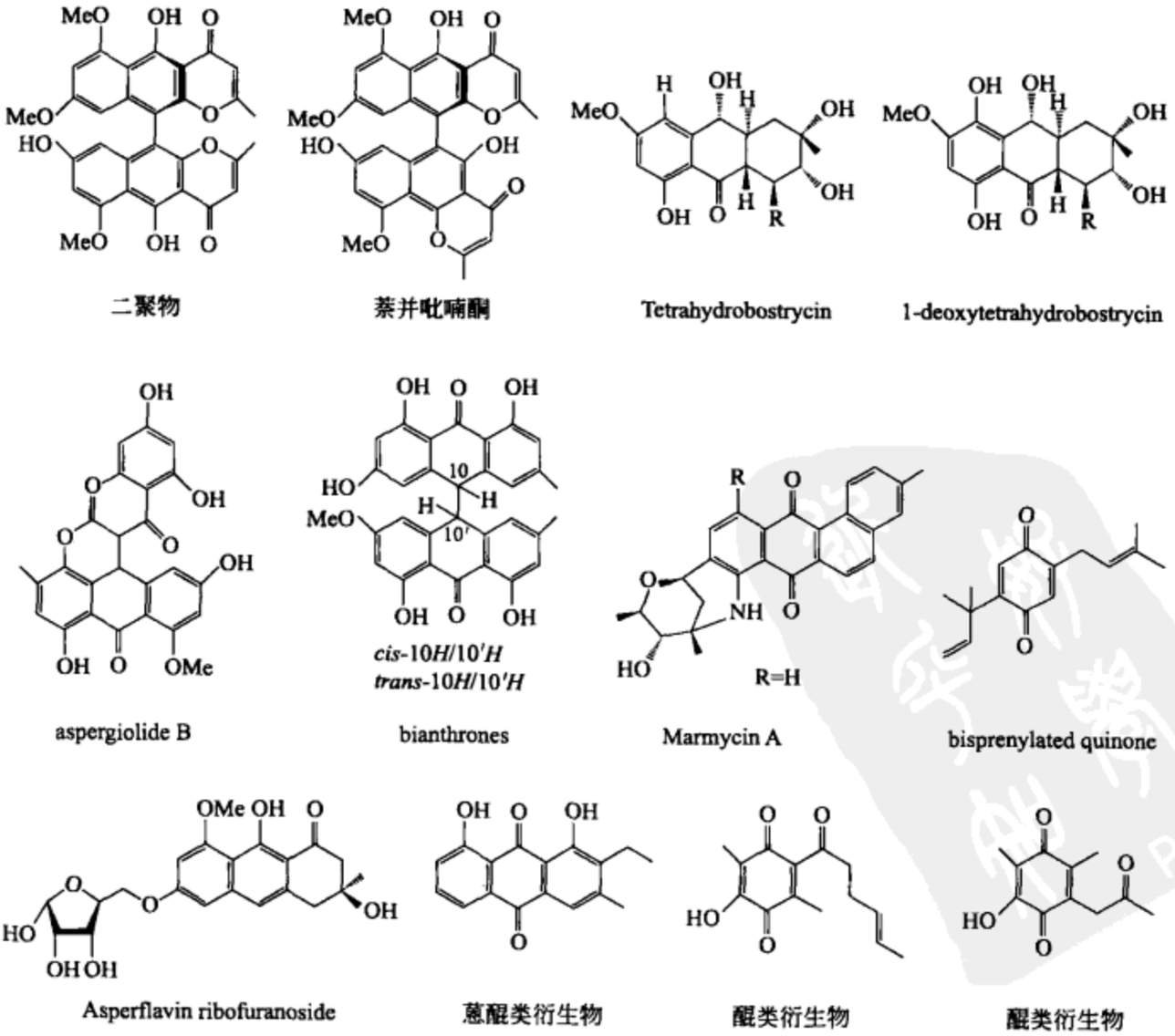
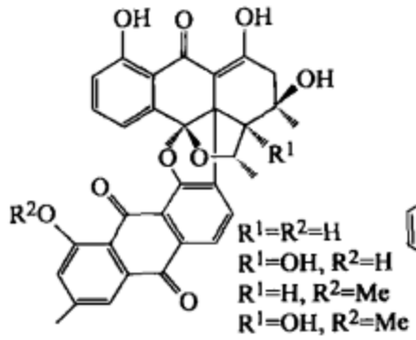
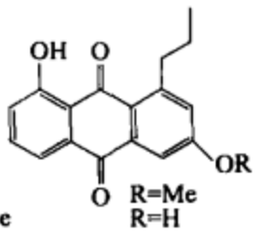


图 5.4-6　部分海洋微生物醇/酸/酯类活性代谢产物结构式

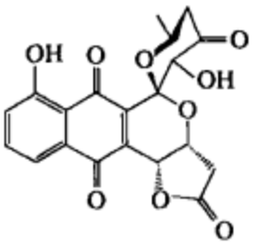




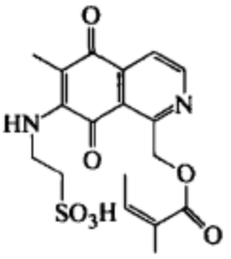
二蒽酮类化合物



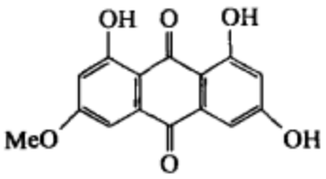
蒽醌类衍生物



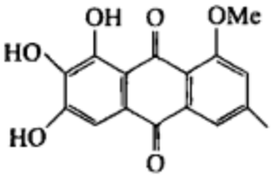
griseusin C



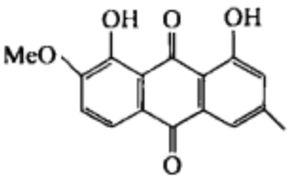
Cribrostatin 7



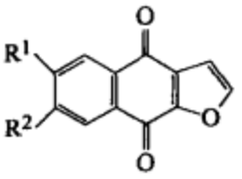
lunatin



evariquinone

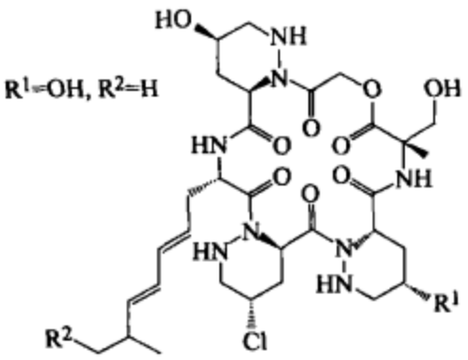


monodictyquinone A

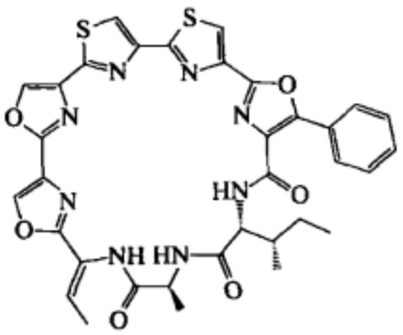


R1=OH, R2=H avicennones D
R1=H, R2=OH avicennones

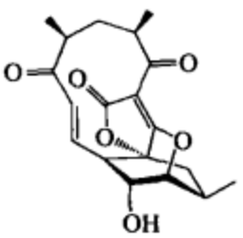
图 5.4-7 部分海洋微生物醌类活性代谢产物结构式



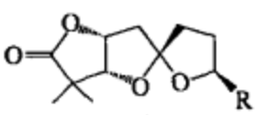
Piperazimycin A



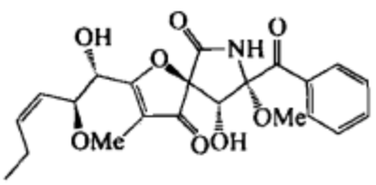
rukthapelstatin A



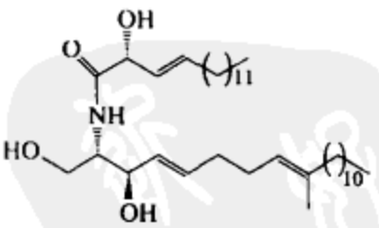
Atrop-abyssomicin C



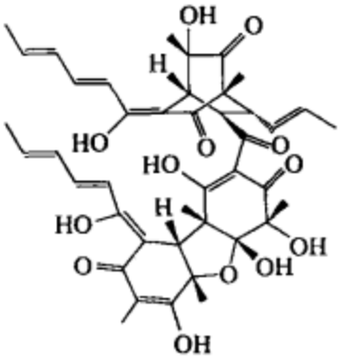
cephalosporolides H, I



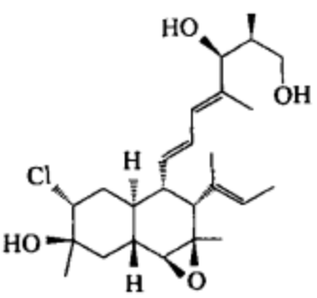
11-*O*-methylpseurotin A



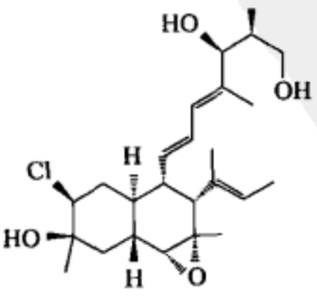
Asperamide A



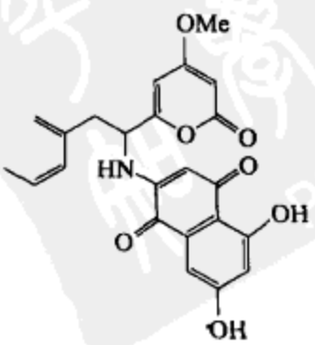
Trisorbicillinone A



dehydroxychlorofusarielin B

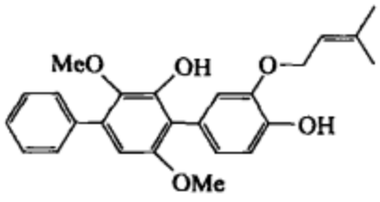


Fusarielin E

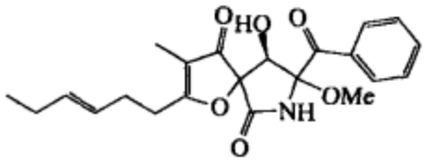


naphthoquinoneimine

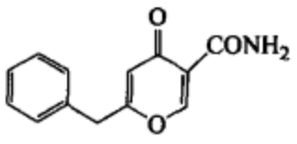
图 5.4-8



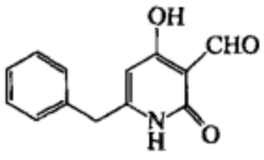
4″-deoxyisoterprenin



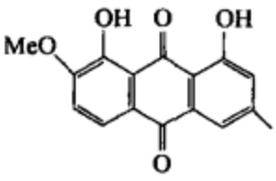
Cephalimysin A



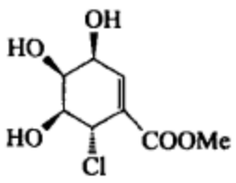
carbonarones A



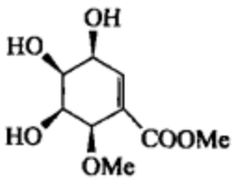
carbonarones B



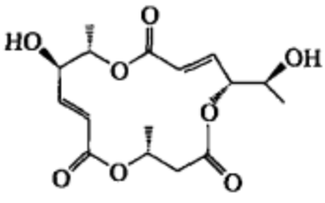
Monodictyquinone A



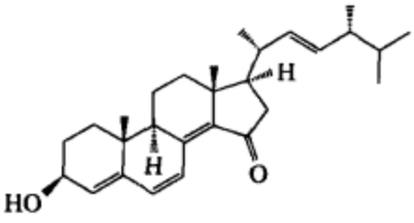
Pericosines D



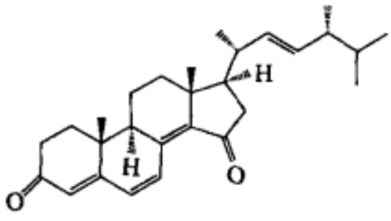
Pericosines B



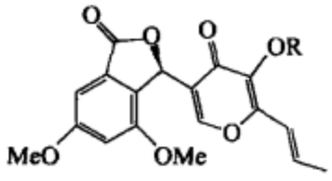
Peribysin M



gymnasterones C

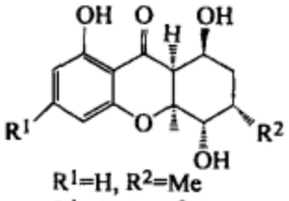


gymnasterones D



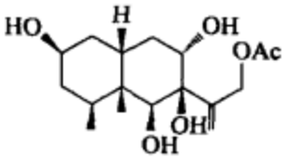
R=Me

Methoxyvermistatin

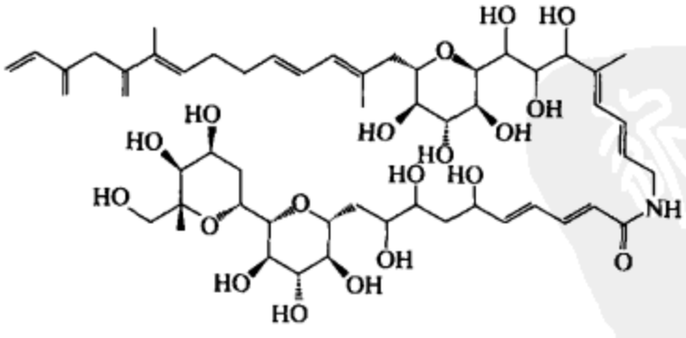


R^1=H, R^2=Me
R^1=OMe, R^2=Me

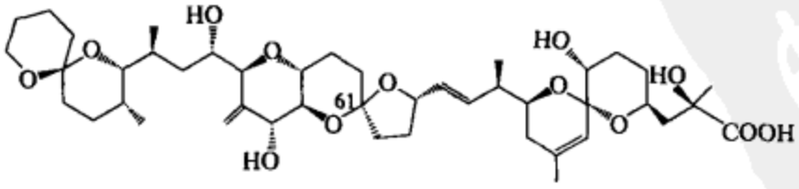
Monodictysin B,C



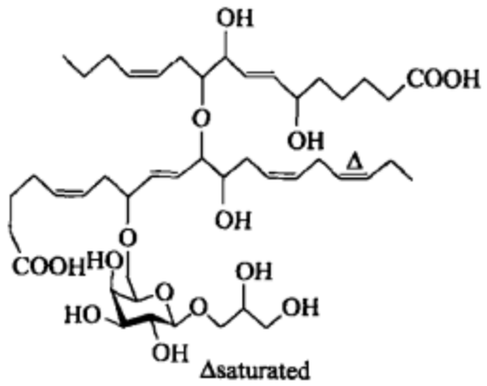
peribysin



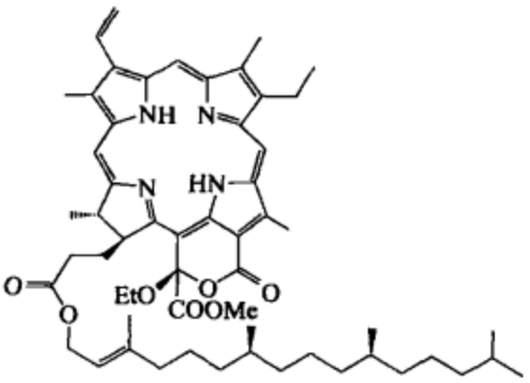
zooxanthellamide D



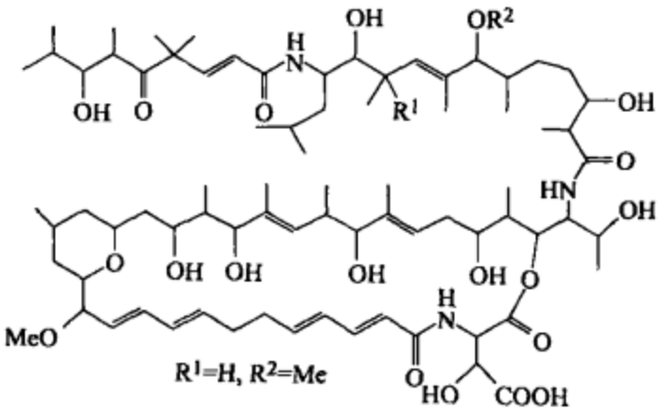
19-冈田酸



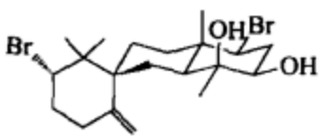
nigricanosides A



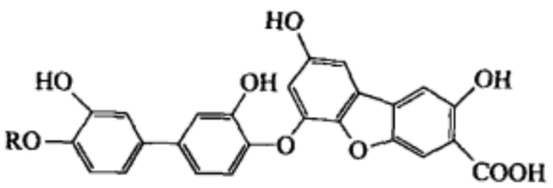
Porphyrinolactone



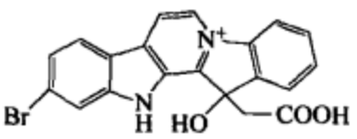
poecillastrin D



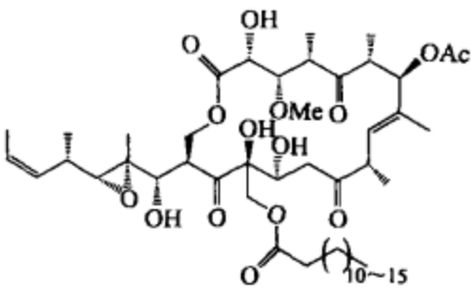
10-hydroxykahukuene B



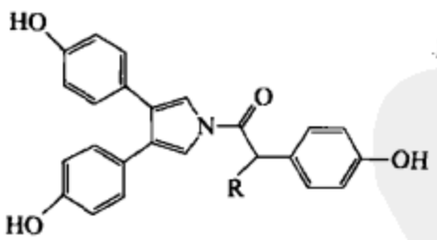
sulfate adduc



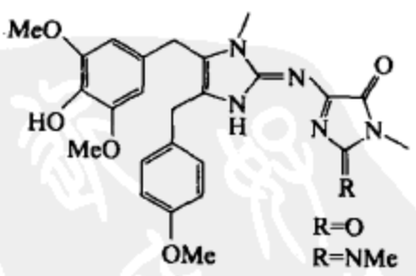
10-bromohomofascaplysate A



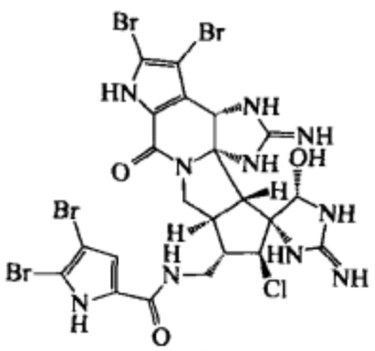
Candidaspongiolide



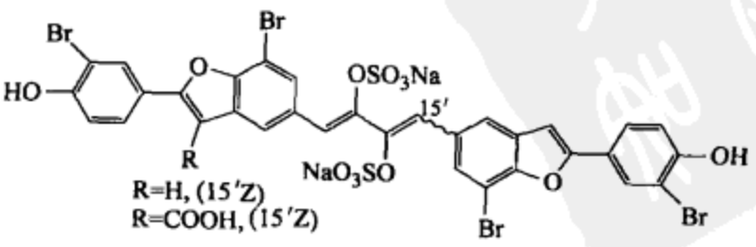
7-Hydroxyneolamellarin B



naamidines H, I

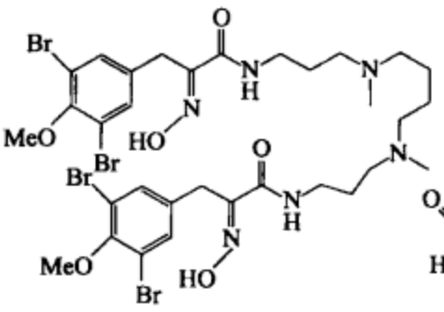


carteramine A

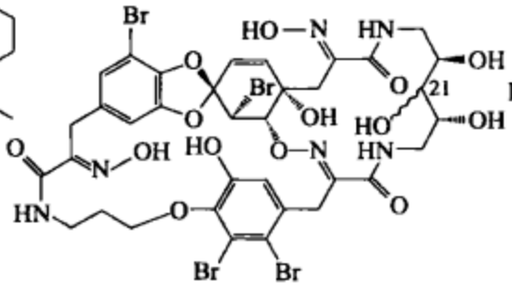


Isoiantheran A,8-carboxy-iso-iantheran A

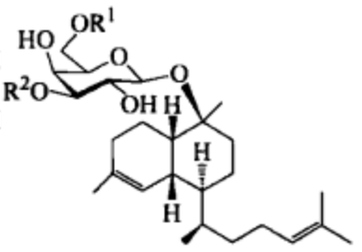
图 5. 4-8



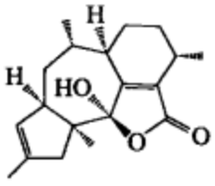
Spermatinamine



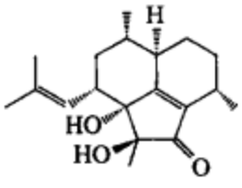
(21*S*)pseudoceratins A
(21*R*)pseudoceratins B



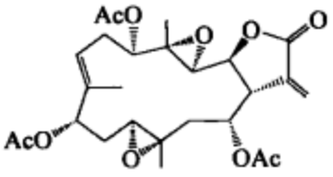
R^1=Ac R^2=H lemnalosides A
R^1=H R^2=Ac lemnalosides B



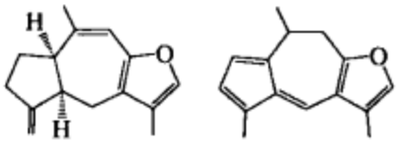
Caribenols A



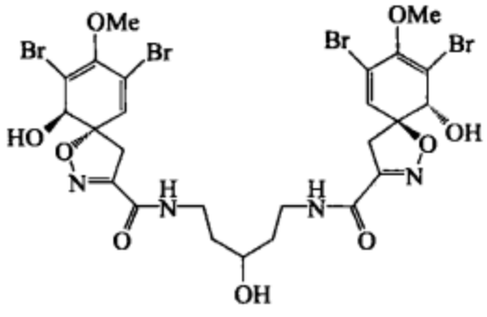
Caribenols B



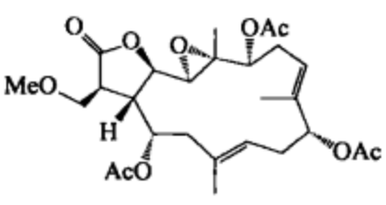
michaolides G



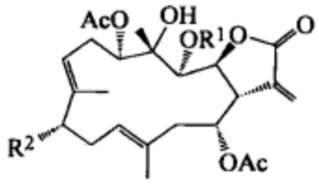
Isoechinofurans



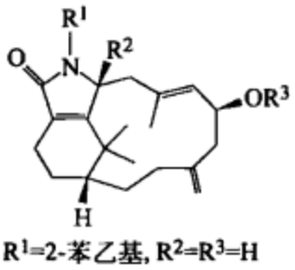
(+)-12-hydroxyhomoaerothionin



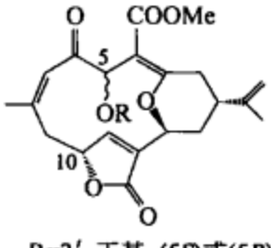
michaolides H



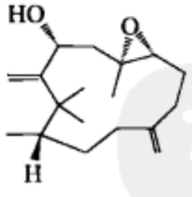
R^1=H R^2=OAc michaolides I
R^2=Ac R^2=OAc michaolides G
R^1=R^2=H michaolides K



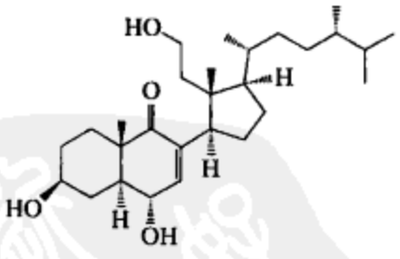
R^1=2-苯乙基, R^2=R^3=H
cespitulactams A



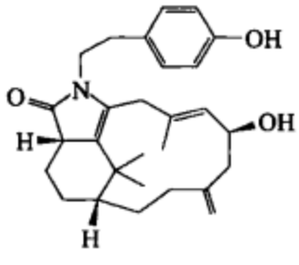
R=2′-丁基, (5*S*)或(5*R*)
Cembranoid



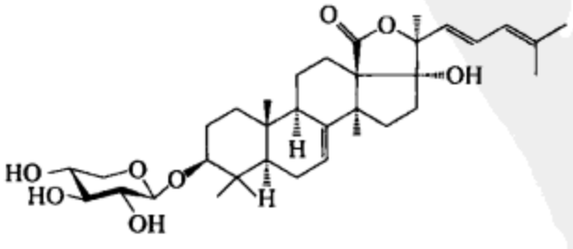
cespihypotin K



sarcomilasterol



cespitulactams K



hillasides A

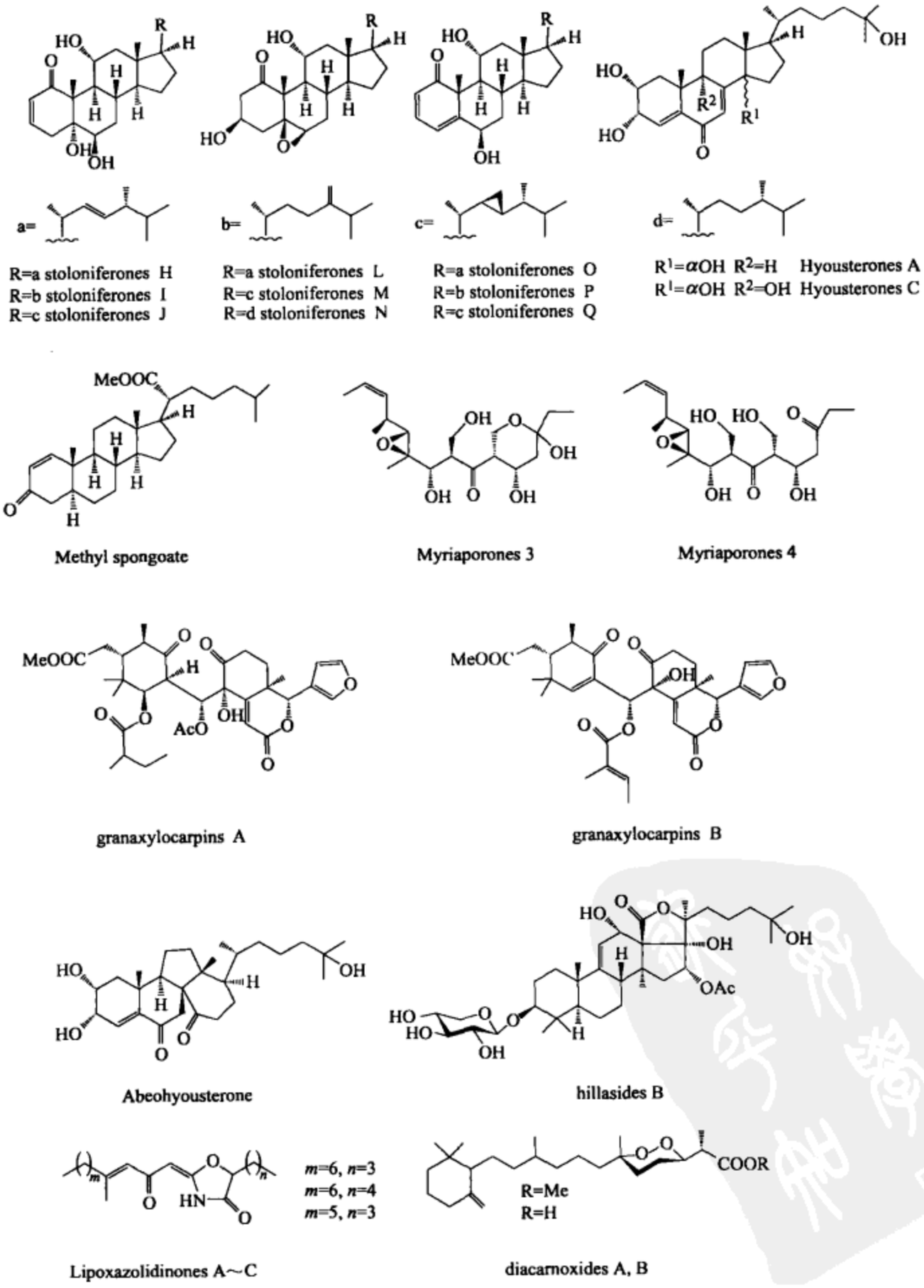


图 5.4-8 部分海洋微生物酮类或聚酮类活性代谢产物结构式

表 5.4-1 海洋微生物放线菌类（Actinomycetes）及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
马杜拉放线菌属	xanthone 氧杂蒽酮	细胞毒素	*
马杜拉放线菌属	多环氧杂蒽酮	晶状毒素	
放线菌	拉古纳吡喃酮 B	细胞毒	
砂嗜盐产孢菌	二环聚酮化合物 A,B	抑制鸟氨酸脱羧酶	沉积物,关岛
太平洋嗜盐产孢菌	二环聚酮化合物 A	抑制白细胞介素-5	沉淀物,帕劳群岛(西太平洋)
结节链霉菌	内酯-γ-内酰胺抗生素	抗药物敏感和耐药革兰阳性菌,抑制小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10	斯克里普斯峡谷,加州
链霉菌属	抗肿瘤抗生素 A,B	抗肿瘤	胶州湾,中国
链霉菌属	5-二甲基-烯丙基吲哚-3-羧基苯醌	抑制枯草芽孢杆菌	盐湖淤泥,日本德岛
链霉菌属	聚酮化合物 F～H	对 HeLa 细胞有细胞毒作用	西大洋,深海沉淀物
疣孢菌属	多环聚酮类 atrop-abyssomicin C abyssomicin G	化合物 C 为 *S. aureus* N315(MRSA)抑制剂	海洋沉积物,日本
疣孢菌属	多环聚酮类 abyssomicins B～D	抑菌(革兰阳性菌)	深海沉积物,日本

注：*表示未知，表 5.4-1～表 5.4-62 皆为此意。

表 5.4-2 海洋微生物真菌类（fungi）及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
*	1-脱氧-rubralactone	真核 DNA 选择性抑制剂	日本
毛壳菌属	chaetoxanthone B	对原生动物疟原虫选择性抑制	卡马利,圣托里尼,希腊
毛壳菌属	chaetoxanthone C	选择抑制克氏锥虫	卡马利,圣托里尼,希腊
构巢裸胞壳	argosies H	抗真菌(Mycotypha microora)	绿藻
灰腐质霉	Humicolone	胞毒(KB)	浮木
腐生单格孢	monodictyochrone A,B	抑制细胞色素 P450 1A 和雌激素合成酶 CYP19(芳香)和诱导醌还原酶活性	特内里费岛,西班牙
里氏木霉	trichodermatide A～D	对 A375-S2 黑色素瘤细胞株有弱毒性	海泥,连云港,中国
支顶孢菌	Awajanomycin	抑人肺腺癌 A549 细胞活性	淡路岛,日本
Ascochyta salicorniae Magnus	ascolactone A,B	抑制分枝杆菌络氨酸磷酸酶 B 活性	绿藻 *Ulva* sp.,德国
Ascochyta salicorniae Magnus	ascosalipyrrolidinones A	抑制恶性疟原虫,抑菌,抑制酪氨酸激酶	

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
壳二孢属	2-deoxyrubralactone	抑制革兰阳性菌和白色念珠菌	长崎县，日本
曲霉属	Aspermytin A	诱导大鼠嗜铬细胞瘤细胞神经突增生	贻贝，富山海湾，日本
黑曲霉	Asperazine	选择性抑白血病细胞	
黑曲霉	Nigerasperones A～C	其中化合物C有缓和DDPH自由基作用	青岛
孔曲霉	Asperlactone	抗生素	海洋沉积物
孔曲霉	Asperlactone衍生物	抗生素	
孔曲霉	aspyrone衍生物	抗生素	
土曲霉	手性二吡咯并苯醌衍生物 Terreusinone	细胞毒素	韩国
葡萄孢属	6-[(*E*)-环戊二烯]-α-吡喃酮	酪氨酸酶抑制剂	朝鲜
毛壳菌属	Chaetocyclinone A	抗马铃薯晚疫病	海藻
裸孢壳属	arugosins H	抗真菌作用(微孢子和绿藻小球藻)	撒丁岛，意大利
裸孢壳属	shimalactone B	诱导神经突在神经母细胞瘤2α中细胞低浓度生长	海洋沉积物，日本
异冠裸胞壳	shimalactone A	低浓度诱导神经瘤细胞生长	海洋沉积物，日本
异冠裸胞壳	varixanthone	抑菌	*
外瓶霉属	Chlorohydroaspyrones A，B	抑制金黄色葡萄球菌和MRSA	全罗南道，韩国
镰刀菌属	Neofusapyrone，fusapyrone，deoxyfusapyrone	抑曲霉菌	男鹿半岛，日本
黏帚霉属	cladionol A	杀伤L1210和KB细胞	前田角，冲绳
黏帚霉属	gliocladride	细胞毒(人黑素瘤A375-S2)	海泥，中国
小球壳孢属	betaenone衍生物	抑PKC，CDK4激酶和EGFR受体活性	地中海
腐败丝状菌	monodictysin A～C	B抑制细胞色素P450活性，C诱导鼠Hepalclc7细胞NAD(P)H还原酶活性	绿藻，西班牙
漆斑菌属	环戊烯酮衍生物 Myrothenones A	抑制酪氨酸酶	釜山，韩国
黑孢霉属	Nigrospoxydons A物	抑制金黄色葡萄球菌和MRSA活性	泰国
杨奇青霉	喹啉酮	胞毒作用(卵巢癌细胞SKOV-3)	表层海水，德国
土青霉	青霉酮A，B	抗P388和A-549细胞活性	胶州湾
青霉菌属	Bisorbicillinoids	抑制癌细胞增殖(P388、A-549)	海洋沉积物，胶州湾
青霉菌属	氧杂蒽酮	对枯萎病有抑制作用	深圳，广东，中国

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
布洛卡青霉	缩酮化合物 Brocaenol	细胞毒素	
橘青霉	isocyclocitrinol A	抗耐久肠球菌和表皮葡萄球菌	巴布亚新几内亚
土青霉	青霉酮 A	弱细胞毒性	胶州湾，中国
多毛孢属	氯代苯甲酮	抑 VREF(万古霉素耐药的肠球菌)	巴哈马群岛
彼得壳属	Dihydroinfectopyrone	抑制小鼠 L5178Y 淋巴瘤细胞	亚得里亚海北部，克罗地亚
Phialocephala sp. Wang	trisorbicillinone A	胞毒(P388、HL60)	*
异形沃德霉	anomalies A，B	络氨酸激酶 $p56^{lck}$ 抑制剂	
Zygosporium gibbum Sacc	3-deoxyrubralactone	抑制微管蛋白聚合的同源体，抑制多药耐药细菌	帕劳群岛

表 5.4-3 海洋微生物细菌类（bacterium）及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
亚德食烷菌	α-吡喃酮衍生物	抑制枯草芽孢杆菌，金黄色葡萄球菌	德国

表 5.4-4 海洋微生物红藻类（red alga）及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
树枝软骨藻	异软骨藻酸 G	抗菌	九州岛，日本

表 5.4-5 海洋微生物绿藻类（green alga）及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
管浒苔	5-羟基-2-吡喃酮	诱导磷酸生产 GPR12 激酶	莆田，平海路，中国

表 5.4-6 海洋微生物褐藻类（brown alga）及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
蜡杨梅囊链藻	蜡杨梅囊链藻醋酸盐	对 KA3IT 有细胞毒性，但减轻 NIH3T3 细胞毒性	

表 5.4-7 海洋微生物海绵类（Spong）及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
深海海绵	醌类衍生物 alisiaquinones A～C alisiaquinol	法呢基蛋白转移酶抑制剂，抗疟原虫	Norfolk Rise，新苏格兰
Crella spinulata Hentschel	苯并硫醚衍生物 Benzylthiocrellidone	细胞毒作用	大堡礁
丹喀小棵囊菌	丹喀小棵囊菌素 A～C	对 P388 淋巴细胞性白血病有细胞毒性	
黑色软海绵	Trichodenones A～C	对 P388 白血病细胞系有弱细胞毒作用	日本

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
小球腔菌属	大花金鸡菊苷 A 和 C	抗肿瘤	
小球腔菌	大花金鸡菊苷 M	抑 PTK 和 CaMKⅢ，抑制拓扑异构酶Ⅱ活性	
Merrianum oxeato Britton	27-*O*-乙酰基鲭藻毒素	细胞毒作用	英国
Merrianum oxeato Britton	27-*O*-乙酰基软海绵酸	细胞毒作用	英国
Plakortis simplex Schulze	聚酮衍生物 lehualides A～D	细胞毒作用	夏威夷
黑海绵	14,15-secocurvularin	抑枯草芽孢杆菌	印度尼西亚

表 5.4-8　海洋微生物海棘皮/刺胞/有囊动物及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
蜡烛果	Leptosphaerone	对 A549 细胞的细胞毒性	福建，中国
蜡烛果	青霉酮	对 P388 白血病细胞毒性	福建，中国
Agardhiella subulata Kraft	二十烷酸	通过诱发凋亡来杀伤 DLD-1 细胞	
海百合属小卷海齿花	萘并吡喃酮	通过抑制 IKKβ 激酶来抑制肿瘤 TNF-α 活性	CaqalaiIs，斐济
欧洲大扇贝	D,D-二酮哌嗪类 A～D	强烈抑制 *Vibrio anguillarum* 活性	Galicia，西班牙

表 5.4-9　其他海洋微生物及其种属来源、酮类/聚酮类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
拟青霉属	拟青霉氧杂蒽酮	抑制 HepG2 细胞的细胞毒性，抑制乙酰胆碱酯酶的活性	中国台湾海峡
石莼属	ascolactone A 和 B	抑制分枝杆菌蛋白酪氨酸磷酸酶 B (MPtpB)活性	德国
*	二氢苯醌 5～8	抗 MRSA、VREF 活性、HCT-116 细胞毒	加州

除了聚酮类化合物，近年来发现的海洋微生物肽类化合物也同样家族庞大。

表 5.4-10　海洋微生物放线菌类及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
酸菌属	Asperazine	广谱抗细菌	
诺卡菌属	Gymnastatins A～C	广谱抗细菌	
诺卡菌属	诺卡菌素Ⅰ～Ⅲ	广谱抑菌	*
卢森坦拟诺卡菌	卢森坦拟诺卡菌素 A～D	A,B 抑制肿瘤 HCT-116 活性	盐湖沉积物，巴哈马群岛
链霉菌属	Dehydroxynocardamine	抑制重组酶 Sortase B 活性	海绵，韩国

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
链霉菌属	piperazimycins A～C	胞毒(HCT-116)，A 对实体瘤细胞有较强活性	海洋沉积物，关岛
高温放线菌属	Mechercharmycin A	杀伤 A-549 和 Jurkat 肿瘤细胞	海泥，帕劳群岛
Verrucosispora maris Goodfellow	Proximicin A	抑制癌细胞、p53 激酶抑制剂	沉淀物，日本海
疣孢菌	Proximicin C	抑制短芽孢杆菌	沉淀物，挪威 Raune 峡湾
疣孢菌	Proximicin B	抑制革兰阴性菌	沉淀物，挪威 Raune 峡湾

表 5.4-11　海洋微生物真菌类及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
孔曲霉	circumdatin J	抑制 MRSA 的活性	波纳佩，密克罗尼西亚
萨氏曲霉	6-methylxyspirotryprostatin B	抑制肺癌 A549 细胞	在白沙海滩，海南，中国
支顶孢属	八肽	弱细胞毒性 L1210，同时抑制葡萄球菌	海绵 Teichaxinella，新几内亚
弯颈霉属	肽抑制素 J	向下调节的分子伴侣 GRP78	海泥，青森县日本
绿木霉	Trichodermamide A，B	对 HCT-116 具有细胞毒性	巴布亚新几内亚
烟曲霉	spirotryprostatin C～E，13-oxyverruculogen	抑制癌细胞	灵山，青岛，中国
支顶孢属	efrapeptinsEa 123	细胞毒(H125)	*Teichaxinella* sp.，新几内亚
肉色曲霉	aspergillicin A～E	对捻转血矛线虫有细胞毒作用	塔斯马尼亚，澳大利亚
Clonostachys rogersoniana Schroers	clonostachysins A，B	抑制甲藻的垂直移动	软海绵素 japonica，日本
螺旋聚孢属	环羧酚酸肽	抑制肿瘤细胞包括 LNcaP，SK-BR3，HT29 和 HELA 活性	日本
螺旋聚孢属	环缩肽	强抗肿瘤活性、LN-caP，SK-BR3，HT29，HELA	海绵，日本
裸孢壳属	emericellamides A	抑菌、细胞毒(HCT-116)	仙掌藻属，新几内亚
小孢子癣菌	alisiaquinones A～C，alisiaquinol	HDAC 抑制剂，细胞毒(HCT-116)	维尔京群岛
Paraphaeosphaeria sp. Tsuda	戊烯酮	抗真菌	冲绳岛
帚霉属	环缩酚酸肽 Scopularides A，B	肿瘤细胞和革兰阳性菌弱抑制剂	Limski 峡湾，克罗地亚

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
柱霉属	halovirs A～E	抗疱疹病毒	海草（*Halodule wrightii*），加勒比海
柱霉属	scytalidamide A,B	对HCT-116细胞系具有中度细胞毒性	巴哈马群岛、红海
玫红穗状霉	spicellamides A,B	细胞毒（成神经细胞瘤）	*
玫红穗状霉	Leptosphaerone	细胞毒（成神经细胞瘤）	多米尼加
里氏木霉	环四肽 trichoderideA	弱细胞毒，抑制A375-S2黑色素瘤细胞	海洋沉积物，连云港，中国
Zygosporium masonii Oh	环肽 Zygosporamide	高度选择性抑制SF-268（中枢神经系统）和RXF393（肾）细胞	毛伊岛，夏威夷
Zygosporium masonii Oh	环肽 Zygosporamide	抑制癌细胞SF-268、RXF393	蓝藻，夏威夷
绮丽穗霉	开链细胞松弛素 Z10-Z11	对A549细胞有细胞毒作用	沉积物，胶州湾，中国

表 5.4-12 海洋微生物细菌类及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
蜡样芽孢杆菌	含硫环状多肽	抑菌活性（葡萄球菌、肠道球菌）	软海绵素（日本产植物）
α-蛋白质海旋菌	Thalassospiramides A,B	免疫抑制作用	*
蜡样芽孢杆菌	Trichodenones A～C	抑制葡萄球菌和肠球菌	sponge Halichondria japonica
杆菌属	mixirins A～C	抗人肿瘤细胞HCT-116	海泥，北极
杆菌属	Bacillamide	抗甲藻、鞭毛藻	韩国
侧孢短芽孢杆菌	Tauramamide	选择性抑制致病原 *Enterococcus* sp. 活性	海生蠕虫，新几内亚
嗜盐芽孢杆菌	halolitoralins A～C	抑制人胃癌细胞BGC、抗真菌	海洋高盐沉积物，黄海
Mechercharimyces asporophorigenens Matsuo	环肽 urukthapelstatinA	抗肺癌和卵巢癌活性	海洋沉积物，新几内亚
发光杆菌属	unnarmicin A,C	选择性抑制 *Pseudovibrio* 细菌株	日本，冲绳
Pseudoalteromonas maricaloris Ivanov	溴化氯肽 bromoalterochromide A	海胆卵细胞细胞毒性	海绵
假单胞菌属	环四肽	广谱抗细菌	意大利

表 5.4-13 海洋微生物蓝藻类（Cyanobacteria）及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
丝状鞘丝藻	缩酚酸肽 grassypeptolide	对人肿瘤细胞株有抗增殖活性	佛罗里达州
丝状鞘丝藻	环肽 Pompanopeptin A	选择性抑制胰蛋白酶	庞帕诺比奇，劳德代尔堡，佛罗里达州
藓状束藻	malevamide D	细胞毒作用（P388、A549、HT-29、MEL-28）	*
吉特勒线状蓝藻属	Mitsoamide	抑制肺癌细胞 NCI-H460	马达加斯加
巨大鞘丝藻属	jamaicamides A～C	细胞毒，钠通道阻滞和鱼毒性	赫克托耳海湾，牙买加
巨大鞘丝藻属	lyngbyastatin 3	杀伤 KB 和 LoVo 细胞系	关岛
丝状鞘丝藻	lobocyclamide B	抗真菌	巴哈马群岛
丝状鞘丝藻	Obyanamide	胞毒作用	塞班岛
瘦鞘丝藻属	Coibamide A	对 NCI60 癌细胞有细胞毒作用	巴拿马
巨大鞘丝藻	Trungapeptin A	细胞毒	泰国
鞘丝藻属	Kempopeptin A	弹性蛋白酶和糜蛋白酶抑制剂	肯普通道，佛罗里达群岛
鞘丝藻属	kempopeptin B	抑制胰蛋白酶	肯普通道，佛罗里达群岛
丝状鞘丝藻	lyngbyastatin 4	体外选择性抑制弹性蛋白酶和糜蛋白酶	佛罗里达
巨大鞘丝藻	dragomabin	抗疟	巴拿马
巨大鞘丝藻	homodolastatin 16	杀伤食道癌、宫颈癌细胞	肯亚海岸
巨大鞘丝藻	aurilides B,C	细胞毒作用（NCI-H460、鼠神经母细胞瘤）	海洋沉积物，新几内亚
巨大鞘丝藻	Dragomabin	对耐药性疟原虫有抑制活性	巴拿马
巨大鞘丝藻	guineamides A～F	细胞毒（成神经母细胞瘤）	新几内亚
半极性鞘丝藻	wewakpeptins A～D	细胞毒	新几内亚
鞘丝藻属	palau'amide	强 KB 细胞毒素	帕劳群岛
鞘丝藻属	ulongamides A～E	胞毒（KB、LoVo 细胞系）	帕劳群岛
鞘丝藻属	ulongapeptin	细胞毒素	帕劳群岛
鞘丝藻属	15-norlyngbyapeptin	KB 细胞毒素	关岛
鞘丝藻属	apratoxin C	胞毒（KB、LoVo 细胞系）	关岛
鞘丝藻属	lyngbyastatins 5～7	弹性酶抑制剂	劳德代尔堡，佛罗里达
黑斑颤藻	Viridamide A	抗锥体虫活性和抗利什曼虫活性	库拉索岛，荷属安的列斯，巴拿马

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
颤藻属	Largamides D~G	抑糜蛋白酶	佛罗里达群岛
颤藻属	venturamides A,B	抗疟活性	巴拿马
束藻属	largazole	细胞毒	基拉戈,佛罗里达
束藻属	symplostatin 3	强细胞毒作用,抑制微管生成	*
束藻属	Tasiamide	胞毒作用(KB、LoVo 细胞系)	帕劳群岛
束藻属	tasiamide B	KB 细胞毒素	帕劳群岛
束藻属	tasipeptin A,B	KB 细胞毒素	帕劳群岛
束藻属	belamide A	抑制微管蛋白聚集,细胞毒作用(乳腺癌细胞 MCF7、HCT-116)	巴拿马

表 5.4-14 海洋微生物红藻类及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
海绵 *Lamellodysidea chlorea* de Laubenfels	dysinosins B~D	抑丝氨酸蛋白酶因子Ⅶa和凝血酶	昆士兰,澳大利亚
滑行细菌属	聚酮肽类化合物 ariakemicins A,B	选择性抑制革兰阳性菌,对 A549 细胞和小仓鼠肾脏细胞有细胞毒作用	明海内海,日本

表 5.4-15 海洋微生物绿藻类及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
羽藻属	kahalalides P,Q	对 HL-60 细胞系有弱抑制作用	瓦胡岛,夏威夷

表 5.4-16 海洋微生物海绵类及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
伴绵藻	聚酮化合物 14,15-secocurvularin	抑制枯草芽孢杆菌	冲绳
Clathria abietina Lamarck	microcionamides A,B	细胞毒,抗结核	菲律宾
软海绵	milnamide D	微管蛋白聚合抑制剂	巴布亚新几内亚
掘海绵属	sintokamide A	抑制癌细胞的雄性激素受体	印尼,帕劳群岛
Fascaplysinopsis sp. Jimenez	泰托霉素 A,B	对 UT-7 细胞有细胞毒性	马达加斯加岛
丹喀小裸囊菌	gymnastatin Q	对 P388 细胞毒性,抑制 BSY-1 和 MKN7 癌细胞	日本
丹喀小裸囊菌	gymnastatins Q,R;dankastatins A,B	P388 细胞有细胞毒性	日本
蜂海绵属	KendarimideA	逆转 P 糖蛋白调节的肿瘤耐药作用	苏拉威西岛,印度尼西亚

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Homophymia sp.	homophymine A	抑制 HIV-1 活性	新喀里多尼亚
Ianthella sp. Minale	环肽 GuangomidesA,B	抑菌素,抑葡萄球菌和肠球菌	新几内亚
Jaspis splendens Crews	色氨酸衍生物 jaspamides D～G	细胞毒素	*
Jaspis splendens Crews	色氨酸衍生物 Jaspamides H、J～L	细胞毒性	瓦纳阿图 汤加
Mycale izuensis Tanita	海绵衍生物 azumamides A～E	组蛋白去乙酰化酶抑制剂	日本
Mycale adhaerans Lambe	13-Deoxytedanolide	抑制蛋白质合成	
Neamphius huxleyi Sollas	海绵环肽 neamphamide A	细胞保护,抗 HIV-1	新几内亚
Phakellia sp. Sakai	海绵环肽 phakellistatin 14	细胞毒素类	楚克,密克罗尼西亚
Scleritoderma nodosum Schmidt	scleritodermin A	细胞毒	菲律宾
皮海绵属 *Suberites japonicus* Thiele	seragamides A～F	细胞毒、可促进 G-肌动蛋白多聚化并能稳定 F-肌动蛋白肌丝	冲绳,日本
寄居蟹皮海绵	cyclicpeptides 环肽	抑菌(枯草芽孢杆菌)	那不勒斯,意大利

表 5.4-17 海洋微生物珊瑚/苔藓虫类及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
沙蹋	arenicin-1 和 2	抑菌	白海,俄罗斯

表 5.4-18 海洋微生物棘皮/刺胞/有囊动物类及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
淘沙芋螺	Lo959	激活高电压钙离子通道,增加钙离子电流	印度
疣荔枝螺	TEP-1 和 TEP-2	电压门控性钙通道抑制剂	日本
字码芋螺	12-氨基酸芋螺毒素	阻断河豚毒素敏感的钠通道	中国海
黄石芋螺	芋螺毒素	致中风和死亡	
截尾海兔	aurilide 酯肽类活性代谢物	细胞毒	日本

表 5.4-19 其他海洋微生物及其种属来源、肽类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
海洋水螅类 *Gymnangium regae* Jaderholm	线性五肽类化合物	细胞毒	菲律宾

表 5.4-20 海洋微生物放线菌类及其种属来源、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
马杜拉放线菌属	ZHD-0501	抑制鼠、人癌细胞系生长	海洋沉积物，胶州湾，中国
放线菌	N-丙酰去乙酰甲醛	*	关岛
Marinispora sp. Kwon	Lipoxazolidinones A	抑菌(革兰阴性菌)	关岛
Marinispora sp. Kwon	二吲哚吡咯烷生物碱 lynamicins A～E	抑制革兰阴性菌、革兰阳性菌	沉淀物，圣地亚哥米慎湾
小单孢菌属	二苯二氮平类生物碱 Diazepinomicin	抑菌(革兰阳性菌)	志志岛，日本
链霉菌属	吡咯烷类生物碱 glaciapyrroles A	抑制 HT-29，B16-F10 细胞	海洋沉积物，Alaska
链霉菌属	星形孢菌素	抑制人实体瘤细胞，抑制链霉菌	深海沉积物，胶州湾，中国
链霉菌属	卤代吡咯生物碱 Marinopyrroles A，B	抑制 MRSA 和 HCT-116 癌细胞	沉淀物，美国加州
链霉菌属	恩拉霉素	抑制革兰阴性菌和革兰阳性菌	沉淀物，埃及

表 5.4-21 海洋微生物真菌类及其种属来源、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
黑曲霉	Asperiamides B，C	抑制烟草花叶病毒增殖	海水，泉州湾，福建省，中国
热带海鞘	海鞘类毒素 B	抑制泛素化和降解抑癌基因 p53	巴布亚新几内亚
拟茎点霉	毛壳球菌素	抗微丝蛋白，细胞毒作用(L1210、C38)	海绵
曲霉属	二酮哌嗪类生物碱 Golmaenone	清除自由基，抵御紫外线作用	蔚山，韩国
曲霉属	NotoamideI	HeLa 细胞的细胞毒性	能登半岛，日本海
曲霉属	notoamides A～D	细胞毒(HeLa L1210)	紫贻贝，日本
溜曲霉	14，15-secocurvularin	抑制枯草芽孢杆菌	冲绳岛
黏帚霉属	三氧哌嗪类生物碱 gliocladins A～C	细胞毒	日本
曲霉菌	spreading A	抑制剂(组氨酸脱乙酰基酶)、抑菌	浮木，冲绳
青霉菌	citrinadin B	细胞毒作用(L1210)	红藻 *Actinotrichia fragilis*，冲绳
青霉菌	sorbicillactones A，B	A 具有抗 HIV、抑制 L5178y 细胞活性和神经保护功能	海绵 *Ircinia fasciculata*
橘青霉	吡咯烷生物碱类 scalusamides A～C	有较弱抗细菌和抗真菌活性	鹦哥鱼
橘灰青霉	喹唑啉类生物碱 aurantiomides A～C	细胞毒(肿瘤细胞)	海绵，胶州湾

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
橘青霉	橘青霉四环生物碱 perinadine A	对 L1210 肿瘤有抑制作用	
橘青霉	吡咯烷生物碱 Scalusamide A	抗新型隐球菌和藤黄微球菌有抗菌作用	冲绳
青霉菌属	communesins C 和 D	抗白血病细胞增殖活性	厄尔巴岛，意大利
假埃希菌属	吡嗪二酮类生物碱 dioxopiperazine alkaloid	抑菌(MRSA、MDRSA)	褐藻，韩国
阔足柄孢壳菌	zopfiellamides A，B	抑菌	印度洋土壤

表 5.4-22　海洋微生物细菌类及其种属来源、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas tunicata* Holmström	pigment 12 色素	具有抗氧化活性	

表 5.4-23　海洋微生物蓝藻类及其种属来源、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
巨大鞘丝藻	喹啉类生物碱 quinoline alkaloid	细胞毒素	波多黎各

表 5.4-24　海洋微生物甲藻类（dinoflagellate）及其种属来源、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
天蓝韭	溴代吲哚类生物碱 Aplicyanins A，C	仅有轻微的细胞毒性	威德尔海，南极洲
天蓝韭	溴代吲哚类生物碱 Aplicyanins B～D	submicromolar 生长抑制剂	威德尔海，南极洲
天蓝韭	溴代吲哚类生物碱 Aplicyanins F	submicromolar 生长抑制剂和强有力抗有丝分裂活动	威德尔海，南极洲
黄青霉	sorbicillactones A	抵抗 HIV，对 L5178Y 细胞有抑制活性	西西里岛，意大利
橘青霉	citrinadin A	对 L1210 和 KB 细胞有弱细胞毒作用	冲绳，日本
共生甲藻属	neosymbioimine	抑制 COX-2 酶活性	鞭毛虫，冲绳

表 5.4-25　海洋微生物红藻类及其宿主、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Lophocladia sp. Harald	lophocladines A，B(2，7 萘啶)	A 表现出对 NMDA 受体的亲和性，同时亦是 δ-鸦片受体的拮抗剂；B 对 H460 人肺癌细胞和 MDA-MB-435 乳腺癌细胞系有弱抑制活性，抑制微管形成	萨武，斐济

表 5.4-26 海洋微生物海绵类及其种属来源、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Agelas sp. Thomas	nagelamides K,L	抗菌剂	冲绳
Agelas sp. Thomas	nagelamidesM,N	抗真菌	冲绳
Amphimedon sp. Matsunaga	Leptosphaerone	细胞毒性	日本
cf. mauritiana Carter	9-甲基腺嘌呤二萜类化合物 agelasines J～L	抗疟	瓜达康纳尔岛
Mycale armata Thiele	alisiaquinones A～C, alisiaquinol	抑制人类恶性腺瘤细胞	卡内奥赫湾,瓦胡岛,夏威夷
Petrosia sp. Fusetani	2-bromoamphimedine	抑制乙酰胆碱酯酶活性	泰国 Phuket Is.
Pseudoceratina sp. Aiello	溴代酪氨酸不饱和脂肪酸衍生物 Aplysamine 6	isoprenylcysteine 羧酸转移酶抑制剂	昆士兰州,澳大利亚
Smenospongia cerebriformis Duchassaing	dictazolines A,B	对老鼠有抗抑郁作用	Solarte 岛,巴拿马太平洋海岸
Acanthostrongylophora sp. Rao	manzamine alkaloids	抗炎,抗真菌,抗 HIV-1	印度尼西亚
Acanthostrongylophora sp. Rao	manzaminetype alkaloids A～C	抗疟疾和抗结核活性	印尼
Agelas sp. Thomas	phakellin alkaloids	抑制人脂肪氧化酶	巴布亚,新几内亚
Agelas sp. Nakamura	Asperazine	MT1-MMP 抑制剂	日本
角骨海绵	nakijiquinones	HER2 激酶抑制剂	冲绳
Calibugula intermis Palau	calibugulones A～F	细胞毒	帕劳群岛
Cinachyrella sp. Wilson	Cinachyramine	弱细胞毒	冲绳
Corticium niger 伏革菌属 *Maldonado*	plakinamines I～K	细胞毒	菲律宾
Cribricellina cribraria Prinsep	8-hydroxyharman	抗海洋细菌	新西兰
宽海绵属	硫酸甾醇 A,B	抗白色念球菌	帕劳科罗尔
面包软海绵	链球菌吩嗪 A～H	抑制 *B. subtilis* 和葡萄球菌	德国,波罗的海
Hyrtios erectus Mohamed	hyrtioerectines A～C	细胞毒性	红海,埃及
Leucetta sp. Moraes	spiroleucettadine	抑制耐久肠球菌	巴布亚,新几内亚
Leucetta sp. Moraes	calcaridine A	抑菌	
Leucetta sp. Moraes	spirocalcaridine A	抑菌	
Leucetta sp. Moraes	spirocalcaridine C	抑菌	
Monanchoraunguifera Hui-ming	Batzelladines L 和 M	抗 AIDS	牙买加
Oceanapia fistulosa Bowerbank	phloeodictinealkaloids	杀疟原虫	新喀里多尼亚

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Penares schulzei Thiele	四氢异喹啉(类)生物碱 schulzeines A～C	抑制 α-葡萄糖苷酶活性	八丈岛,日本
Plakortis simplex Fattorusso	plakohypaphorines D～F	抗组胺活性	巴哈马群岛
Plakortis quasiamphiaster Zampella	plakinidine E	细胞毒素	瓦努阿图
Plakortis simplex Fattorusso	simplexidine	抗菌	巴哈马群岛
Plakortis simplex Fattorusso	细胞抑制素 Gymnastatins A～C	保护淋巴细胞	加勒比海
Pseudoceratina purpurea Pina	溴代酪氨酸衍生物 20-*N*-methylpurpuramine E	细胞毒性	冲绳
Ptilocaulis spiculifer Lamarck	Sch 575948	抗菌	
Spongia irregularis Lendenfeld	不规则硫酸盐	钙调磷酸酶抑制剂	新几内亚岛
Stylissa aff. Massa N. Fusetani	Trichodenones A～C	香叶烯基转移酶Ⅰ型抑制剂	日本
Cribricellina cribraria Prinsep	四聚吡咯溴吡咯生物碱 stylissadinesA 和 B	抑菌	巴哈马群岛
Suberea aff. clavata Pulitzer-Finali	Clavatadines A,B	凝血因子Ⅱ抑制剂	大堡礁
Suberea mollis Row	Hydroxymoloka'iamine	对离体的兔子心脏和空肠有副交感效应	红海
Suberea sp.	螺环芳香生物碱类化合物 Lihouidine	细胞毒	珊瑚海
Thorectandra sp.	β-咔啉类生物碱	弱细胞毒	帕劳群岛
Trachycladus laevispirulifer Carter	trachycladindole A～G	细胞毒性	澳大利亚南部
网角海绵目海绵	Furanoditerpenoid	抑 DNA 聚合酶β裂解酶活性	巴布亚,新几内亚
Fasciospongia sp.	fasciospongines A,B	抗菌	帕劳

表 5.4-27 海洋微生物珊瑚/苔藓虫类及其种属来源、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Euplexaura nuttingi Kükenthal	nuttingins A～F	抗增殖,促凋亡	坦桑尼亚
Euplexaura nuttingi Kükenthal	malonganenones D～H	抗增殖,促凋亡	坦桑尼亚
苔藓虫属 *Pterocella vesiculosa* Lamarck	Pterocellins C～F	抑制枯草芽孢杆菌	新西兰
苔藓虫属 *Pterocella vesiculosa* Lamarck	pterocellins A,B	强抗菌和抗肿瘤活性	新西兰
苔藓虫属 *Pterocella vesiculosa* Lamarck	pterocellins D	抑制 P388 细胞和毛癣菌	新西

表 5.4-28 海洋微生物棘皮/刺胞/有囊动物类及其种属来源、生物碱代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
黑斑海兔	Triazabicyclooctan	适度的结构毒性	海洋
海鞘属 *Cystodytes solitus* Monniot	星形孢菌素生物碱	体外抑制人类肿瘤细胞株生长	坦桑尼亚
海鞘属 *Aplidium orthium* Millar	imeric 类似物	人类中性粒细胞呼吸酶抑制剂	新西兰
短腹海鞘属	ascidiathiazones A,B	治疗严重痛风关节炎	新西兰北岸
海鞘属	Rigidins B～D	杀伤 A431，p53 基因缺陷 HCT-116 细胞	冲绳
斑刺海牛属 *Jorunna funebris* Kelaart	斑刺海牛素	细胞毒	印度
柳珊瑚属 *Leptogorgia* gilchristi Hickso	Malonganenones A～C	弱细胞毒	莫桑比克

表 5.4-29 海洋微生物放线菌类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
链霉菌属	1-hydroxy-1-norresistomycin	抑菌活性；抗肿瘤活性（HMO_2、$HepG_2$）	
西班牙糖丝菌	Saccharothrixins A～C	抗菌	彼得大帝湾 日本海，俄罗斯
链霉菌属	倍半萜	*	Sediment，胶州湾

表 5.4-30 海洋微生物真菌类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
萨氏曲霉	14-norpseurotin A	对大肠杆菌、枯草杆菌显著抑制	在白沙海滩，海南，中国
支顶孢属 *Acremonium striatisporum* Onions	virescenosidesO,Q	细胞毒（Ehrlich 癌细胞）	*
支顶孢属	virescenosides R～U	细胞毒	日本
支顶孢属	virescenosides	细胞毒（海葵卵细胞发育）	*
曲霉属	tropolactones A～C	细胞毒（HCT-116）	马内尔，夏威夷
曲霉属	tropolactones A～D	细胞毒性（HCT-116）	海绵，夏威夷
杂色曲霉	Trichodenones A～C	抑制 NCI60 细胞	加勒比海
球毛壳菌	chaeto-mugilins A～F	细胞毒性（P388 和 HL-60）	胜浦湾，日本
内脐蠕孢属	drechslerines E,G	抗疟	*
Drechslera dematioidea Bubak	Gymnastatins A～C	抑藻，抑菌	
裸孢壳属	6-epi-ophiobolin G,N	细胞毒，抗神经母细胞瘤细胞系	海底沉积物，五所湾，日本
腐质霉	倍半萜类 Fuscoatrol A	抑菌，细胞毒，	千岛群岛

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
盘针孢菌属	libertellenones D	杀伤结肠癌 HCT-116 细胞	日本
青霉菌属	吲哚三萜类 Shearinines D，E，G	激活钾通道	厦门
Periconia byssoides Pers. exMérat	Peribysins H 和 I	抑制 HL-60 细胞	
大腐败螺旋菌	neoverrucosane diterpenoid	抗菌	

表 5.4-31 海洋微生物蓝藻类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Laurencia intricata Schmitz 凹顶藻属	Laurenditerpenol	抑制缺氧诱导因子-1，抑制 T47D 细胞	迪斯卡弗里海湾，牙买加
Laurencia microcladia Kützing	二聚二萜	细胞毒（NSCLC-N6 和 A549）	希腊
蒲枝凹顶藻	Laurebiphenyl	细胞毒性	硇洲岛，中国
钝形凹顶藻	neorogioldiol B	强细胞毒性（MCF7，PC3，HeLa，A431，K562）	希腊
钝形凹顶藻	prevezols B	强细胞毒性（MCF7，PC3，HeLa，A431，K562）	希腊

表 5.4-32 海洋微生物甲藻类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Pyrrhosoma elisabethae V. Kalkman	二萜类生物碱 Ileabethoxazole	抗分枝杆菌	加勒比海

表 5.4-33 海洋微生物红藻类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Callophycus serratus Kubanek	bromophycolides A，B	抗菌和抗真菌，抗 HIV	福建
Callophycus serratus Kubanek	Bromophycolides C～I	抗多种人肿瘤细胞、对白色念珠菌有弱抑制	斐济
Callophycus serratus Kubanek	callophycols A，B	抗疟，抗肿瘤，抗真菌	斐济
钝形凹顶藻	3，7- dihydroxydihydrolaurene；perforenol B	抑制肿瘤细胞系和 CHO 细胞系	希腊
三列凹顶藻	Debromoepiaplysinol	杀死 HeLa 细胞	中国海
Plocamium corallorhiza（Turner）J. D. Hooker	卤代单萜化合物 Plocaralides B，C	细胞毒（食道癌细胞 WHCOI）	
Plocamium corallorhiza（Turner）J. D. Hooker	醛类化合物	细胞毒	南非洲
红藻松香藻	单萜类化合物	DNA 甲基转移酶抑制剂	马达加斯加



表 5.4-34　海洋微生物绿藻类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
蕨藻	倍半萜烯化合物 caulerpals A 和 B	抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(hPTP1B)活性	南鹿岛，中国
Tydemania expeditionis JiangRW	环菠萝烷硫酸氢盐	抑制肿瘤细胞，抗真菌	关岛

表 5.4-35　海洋微生物褐藻类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
锯齿网地藻	二萜类化合物	抗菌	复活节岛
双叉网地藻	二萜类化合物	抗菌	阿拉伯海
双叉网地藻	pachydictyol A 衍生物	抗菌	红海
双叉网地藻	seco-dolastanesdichotone A，B	抗菌	阿拉伯海
网地藻属	4，18-dihydroxydictyolactone	抗结核	泰国
网地藻属	8*a*，11-dihydroxypachydictyol A	细胞毒性(NCI-H187)，抗疟	泰国
裂叶马尾藻	sargachromanols	丁基胆碱酯酶抑制剂	韩国
裂叶马尾藻	sargachromanols A～P	在 DPPH 分析化验中有显著活性	韩国

表 5.4-36　海洋微生物海绵类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Acanthella cavernosa. Chang	非甾醇类化合物	白脊藤壶无节幼体沉淀物抑制剂	印尼
Axinella carteri Pettit	非甾醇类化合物	细胞毒素	印尼
Axinyssa aplysinoides Dendy	Axiplyns A～E	对盐水虾有毒性作用	坦桑尼亚
Topsentia sp.	类甾醇硫酸盐	*endo*-1，3-*b*-D-glucanase 抑制剂	越南
Aplysinopsis digitata Lendenfeld	二倍半萜类化合物 aplysinoplides A～C	细胞毒素，抗菌	鹿儿岛，日本
Axinella cf. bidderi Carletti	单环不规则三萜化合物 yardenones A，B	轻度细胞毒性	也门
Axynissa sp. Pettit	Axinyssen	轻度细胞毒性	日本
Batzella sp. Sakemi	batzellasides A～C	Raf 激酶抑制剂	马达加斯加
美丽属海绵	Isoakaterpin，ilhabelanol，ilhabrene	利什曼原虫藻腺苷磷酸转移酶抑制剂	伊利亚贝拉岛，巴西
Dactylospongia elegans Thiele	5-epi-smenospongorine	促 K562 白血病细胞分化	弗洛勒斯岛，印度尼西亚
Diacarnus megaspinorhabdosa Kelly-Borges	氨基醌化合物 diacarperoxide D	细胞毒素	印尼帕劳群岛

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
掘海绵属	sinunorcaryophyllenol	轻度抑制人体释放中性粒细胞弹性蛋白酶	海南省三亚市中国南海
Erylus formosus Sollas	alisiaquinones A～C, alisiaquinol	促使早期癌细胞凋亡	波多黎各莫雷洛斯,墨西哥
Erylus formosus Sollas	Eryloside F 4	促进钙离子流动	波多黎各莫雷洛斯,墨西哥
Erylus goffrilleri Gulavita	Leptosphaerone	细胞毒性	塞科礁,古巴
蜂海绵属	14,15-secocurvularin	抑制枯草芽孢杆菌	
Lendenfeldia sp.	萜类化合物	HIF-1 抑制剂	密克罗尼西亚,马里亚纳群岛
Negombata sp.	negombin D	细胞毒素	奔巴岛,坦桑尼亚
沙海绵属	psammocinins A1,A2,B	细胞毒	韩国
Rhabdastrella aff. distincta	triterpenoids rhabdastrellins A	细胞毒性	中国湖南
角质海绵属	pyrrolosesterterpenoids A～D	中度细胞毒性	韩国
角质海绵属	倍半萜类化合物	中度细胞毒性	韩国
Spongia sp. *Fontana*	metachromins L,M,S,T	细胞毒素	格西,冲绳
Spongia sp. *Fontana*	五环倍半萜类甾醇	蛋白酶抑制剂	日本
Spongia sp. *Fontana*	cyclosmenospongine	杀伤小鼠艾氏癌细胞	大堡礁
Thorectandra sp. Tetrahedron Lett	16-hydroxyl-luffariellolide	具有磷酸酶 Cdc26B 抑制活性	
Thorectandra sp. Tetrahedron Lett	16-oxo-luffariellolide	具有磷酸酶 Cdc25B 抑制活性	
Darwinella australensis Makarieva	二倍半萜类硫酸盐 A～C	*	澳大利亚

表 5.4-37　海洋微生物珊瑚/苔藓虫类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
草苔虫 *Briareum excavatum* Natting	西松烷型二萜化合物 E 和 G	有弱的抑制人中性粒细胞弹性蛋白酶活性	中国台湾
	麦角甾醇	对癌细胞系细胞毒性	胶州湾,中国
Clavularia viridis Quoy	24-亚甲基胆甾醇类似物	*	中国台湾
海鳃	7,8-dihydroflabellatene A	抑制抗肿瘤细胞增殖	南非
粗枝竹节柳珊瑚	isishippuric acids A 和 B	细胞毒,抗肿瘤	中国台湾
白穗软珊瑚 *Nephthea* cf. elongata Kükenthal	苯基二环大根香叶烷 K,L	细胞毒性(P388)	中国台湾
白穗软珊瑚 *Nephthea chabrolii* Audouin	chabrolonaphthoquinone C	细胞毒性	屏东,中国台湾

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Plexaura flexuosa Esper	3,5-环氧甾醇	细胞毒性,抗菌,	委内瑞拉
Pseudopterogorgia kallos Bielschowsky	bielschowskysin	抗人肿瘤细胞系,抗恶性疟原虫	加勒比海
软珊瑚 *Xenia novae brittanniae* Tetrahedron	xeniolide I	抑菌	肯尼亚

表 5.4-38 海洋微生物棘皮/刺胞/有囊动物类及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
平底海星	甾醇	* 能促进成骨细胞增殖	广西,中国北海
蛇目白尼参	三萜皂苷 Argusides B～E	细胞毒性 *	海南,中国南海
玉足海参	三萜皂苷 Leucospilotaside C	利什曼病,杀精,溶血活性	海南,中国南海
扭曲肉芝软珊瑚	四萜 methyl tortuoates A 和 B	弱细胞毒	海南岛
海茄苳	二萜松香烷	细胞毒性和革兰阳性抗菌活性	厦门,中国
Cadlina luteomarginata Hellou(多彩海蛞蝓属)	半缩醛	诱导 DNA 链断裂和细胞凋亡	澳大利亚
多彩海蛞蝓属	氧化二萜	轻度细胞毒性	澳大利亚
鞭形羽软珊瑚	类固醇 Stoloniferones R～T	*	中国台湾
Eunicella cavolini Koch(柳珊瑚)	孕甾烷	对乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抑制作用	群岛,希腊
黄疣海参	hillaside C	对肿瘤细胞表现出弱细胞毒性	诏安湾,中国
沙柳豹蛾	三萜皂苷 Arguside A	杀死肿瘤细胞	三亚湾,中国海
糙海参	海参素 A3,A4	细胞毒素	海防市,越南
Hippasteria kurilensis Fisher	多羟基类固醇	*	鄂霍次克海
灰海参	17-dehydroxyholothurinoside A 和灰海参三萜皂苷 A	对肿瘤细胞有温和的毒性	广州,中国南海
黑乳海参	黑乳海参皂苷 A～C	对多组肿瘤细胞表现出细胞毒性	中国
二色桌片参	二色桌片参皂苷 A	杀伤 Lewis 肺癌和 S180 肉瘤肿瘤	中国南海
白穗软珊瑚属	19-羟基甾醇	细胞毒性	中国南海,西沙群岛
多型短指软珊瑚	多型短指软珊瑚素 A 和 B	细胞毒性	海南,中国南海

表 5.4-39 其他海洋微生物及其种属来源、萜类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
红茄苳	红茄苳素 A～C	A 抑制 NK-kB 和 COX-2 活性	泰国
角果木	二萜	*	海南，中国
白鞭珊瑚	frajunolid C	抑制超氧化物和中性白细胞弹性酶的产生	中国台湾，中国
刚毛根管藻	三萜 A，B	细胞毒素	海洋硅藻

表 5.4-40 海洋微生物放线菌类及其种属来源、大环内酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
海蚯蚓链霉菌	海蚯蚓素 A～C	抗人结肠癌细胞 HCT-116	海洋沉积物，关岛
吸水链霉菌	大环内酯化合物 Halichoblelide	细胞毒（鼠 P388 和人癌细胞）	*
金黄垂直链霉菌	环色氨酸生物碱 Asperazine	对人肿瘤细胞系有弱抑制作用	海洋沉积物
链霉菌属	大环单端孢霉烯族毒素类化合物 Deoxyroritoxin D	抑制酵母	胶州湾，中国
链霉菌属	查耳霉素 B	抑制多种微生物和微藻	夏威夷
链霉菌属	杆孢菌素 Q	细胞毒 L1210	胶州湾，中国

表 5.4-41 海洋微生物真菌类及其种属来源、大环内酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
孔曲霉	曲霉素 A～C	对 L1210 细胞有细胞毒性	罗尼西亚
Aigialus parvus Isaka	间二羟苯基大环内酯 Aigialomycin C，D	抗疟	红树林
枝孢霉	单端孢霉烯 A～C	细胞毒，抗真菌，抗黄色微球菌	冲绳，日本
漆斑菌属	2′，3′-deoxyroritoxin D	细胞毒，抗 L1219 细胞，抗啤酒酵母细胞	帕劳群岛
Paraphaeosphaeria sp. Peterson	十元大环内酯化合物 Modiolides A，B	抑菌	贻贝
Paraphaeosphaeria sp. Peterson	Gymnastatins A～C	抗真菌	冲绳岛
青霉菌	聚酮化合物 14，15-secocurvularin	抑制枯草芽孢杆菌	
Penicillium brocae Peterson	聚酮化合物 brocaenols A～C	胞毒（HCT-116）	福建，中国
黑团孢	16 元大环内酯 macrosphelide M	抑制剂（HL-60 细胞）	*

表 5.4-42 海洋微生物细菌类及其种属来源、大环内酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
杆菌	MacrolactinS	抑制大肠杆菌，金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌	东海

表 5.4-43 海洋微生物蓝藻类及其种属来源、大环内酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
巨大鞘丝藻	Hectochlorin	促进肌动蛋白聚合	牙买加
鞘丝藻属	2,3,4-三氧-甲基-6-脱氧-α-吡喃甘露糖大环内酯 B	弱细胞毒作用(KB)	
Lyngbya bouillonii L. Hoffmann	鞘丝藻代谢物	细胞毒作用	新几内亚
巨大鞘丝藻	36 元大环内酯 caylobolide A	细胞毒作用(HCT-116)	巴哈马群岛
鞘丝藻属	二氯噻唑羟基酸 lyngbyabellin C	KB、LoVo 细胞系	新几内亚

表 5.4-44 海洋微生物甲藻类及其种属来源、大环内酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
前沟藻属	前沟藻代谢物 B6,B7	细胞毒性(人 B 淋巴细胞 DG75)	冲绳
共生甲藻属	共生甲藻衍生物	抑制 Ca^{2+} 依赖的细胞膜通道,抑制 COX-1 酶活性	冲绳
前沟藻属	amphidinolactone B	杀死 KB 表皮癌细胞	
前沟藻属	iriomoteolide-3a	对 B 淋巴细胞与病毒(EBV)感染 Raji 细胞有强烈细胞毒性	日本
前沟藻属	前沟藻衍生物 X,Y	杀伤 L1210、人表皮癌细胞 KB	鞭毛虫
前沟藻属	前沟藻衍生物 C2	细胞毒	冲绳
前沟藻属	前沟藻衍生物 B4,B5	强细胞毒(L1210、KB)	冲绳
前沟藻属	iriomoteolides-1a,-1b,-1c	强细胞毒性	海沙,日本
利玛原甲藻	利玛原甲藻素	DLD-1RP-MI7951 细胞抑制剂	中国台湾海峡
共生甲藻属	长链多羟基多烯氨基化合物 zooxanthellamide D(ZAD-D)	人肿瘤细胞系 A431 和鳞状上皮癌细胞毒性	*

表 5.4-45 海洋微生物红藻类及其种属来源、大环内酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
膜藻	apyronemacrolides, neurymenolide A,B	抑制 MRSA 和 VREF	斐济

表 5.4-46 海洋微生物海绵类及其种属来源、大环内酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
溶藻菌	17 元大环四烯类 Chejuenolides A,B	弱蛋白质酪氨酸酶抑制剂	韩国
蜂海绵 *Haliclona viscosa* Topsent	生物碱	细胞毒性、抗菌、抑制 IMPDH	挪威
Phorba sp. A Klontz	Gagunins H～O	细胞毒素	朝鲜
杂星海绵属	cyclobispsammaplin A,psammaplin M	细胞毒素	朝鲜
Ianthella quadrangulata Coll	Bastadin 24	细胞毒素作用	澳大利亚
Ircinia sp. Hooper	18 元环大环内酯 TedanolideC	细胞毒,抑制 S 期蛋白合成	新几内亚
Leiodermatium sp.	19 元环大环内酯 leiodolidesA 和 B	细胞毒	帕劳群岛
黑色海绵 *Dendrilla cactos* Selenka	bastadins-22 和 bastadins-23	细胞毒	印度

表 5.4-47 海洋微生物棘皮/刺胞/有囊动物及其种属来源、大环内酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Persoonia acerosa Sieber ex Schult	Lipidyl pseudopteranes A 和 D	蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂	巴哈马
睫形羽软珊瑚	cespihypotins T	细胞毒性	中国台湾
Sarcophyton latum Dana	二环氧肉芝软珊瑚，肉芝软珊瑚醇	抑制 COX-2 蛋白表达	海南，中国
耳状截尾海兔	海兔毒素 19	细胞毒	加利福尼亚
海鞘属	diazonamides C～E	细胞毒性	印度尼西亚
柔软壶海鞘	Mollamides B，C	轻微的细胞毒性	印度尼西亚
挪威鸟尾蛤	crassumolides B～F	细胞毒	垦丁，中国台湾
Leptogorgia laxa hickson	leptodienone A，B	细胞毒性	加利福尼亚湾
草皮珊瑚属	西松烷型二萜 brianodins A	细胞毒性	冲绳
肉芝软珊瑚 *Sarcophyton mililatensis* Verseveldt	西松烷	对体外培养成骨细胞表现出刺激作用	越南
指形软珊瑚	3-内酯指形软珊瑚 C	抑制 iNOS 和 COX-2 蛋白表达	中国台湾

表 5.4-48 海洋微生物放线菌类及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
小单孢菌属	salinosporamides B	抗人体结肠癌细胞系 HCT-116	*
链霉菌属	利帕汀	抗真菌、细菌	夏威夷
轮枝链霉菌	丁烯羟酸内酯	对 K562 细胞和鼠淋巴瘤 P388 细胞有细胞毒活性	青岛，中国

表 5.4-49 海洋微生物真菌类及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
腐皮壳菌属	腐皮壳内酯	细胞毒作用(KB、Raji 细胞)	红树林腐叶，福建，中国
多节孢属	多节孢酸 A	对癌细胞有细胞毒性作用	攀牙府，泰国
黑曲霉	天冬酰胺 A	抗白色念珠菌	*
曲霉属	腐殖酸 A	抑制泛素激活酶 E1 酶活性	紫贻贝，日本
棵孢壳属	多聚乙酰类 Varitriol	抑癌 CNS 和乳腺癌	海绵，加勒比海
炭团菌属	环形多元酯	抗植物真菌，抑菌	红树林，深圳
黄灰青霉	苯甲酸盐	细胞毒作用	青岛，中国
青霉菌	内酯 A～C	仅 B 具有抗白色念珠菌活性	*
土壤青霉菌	terrestrol A～H	对癌细胞有细胞毒作用	胶州湾，中国
瓦克青霉	聚酮 14，15-secocurvularin	抑制枯草芽孢杆菌	*
小单孢菌属	salinosporamide A	20S 蛋白酶体抑制剂	巴哈马

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
小单孢菌属	Gymnastatins A～C	蛋白酶抑制剂	巴哈马群岛
炭角菌属	xyloketal G	钙离子通道抑制剂	香港，中国
海绵 *Zyzzya fuliginosa* Van Soest	zyzzyanones B～D	温和细胞毒性	澳大利亚

表 5.4-50 海洋微生物细菌类及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
中慢生根瘤菌属	内酯	抗芽孢杆菌及抑制 Jurkat 和 HeLa 细胞活性	
单胞菌属	吲哚哌嗪 Asperazine	*	海绵，帕劳群岛
单胞菌属	环戊烯酮化合物 Trichodenones A～C	杀菌，对 MRSA 强力抑制	日本

表 5.4-51 海洋微生物蓝藻类及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
巨大鞘丝藻	环酯肽 Guineamide B,C	对小鼠神经母细胞瘤细胞株具有毒性	巴布亚新几内亚
巨大鞘丝藻	lyngbyabellin 类似物	细胞毒(NCI-H460)	几内亚
巨大鞘丝藻	类酰胺化合物 malyngamide T	细胞毒素	波多黎各
未鉴定的海洋蓝藻	majusculoicacid	抗真菌活性	巴哈马群岛

表 5.4-52 海洋微生物甲藻类及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
前沟藻属	luteophanol D	弱抗菌活性	冲绳，日本
前沟藻属	amphezonol A	DNA 聚合酶 α 抑制剂	冲绳，日本
前沟藻属	Lingshuiol	细胞毒	陵水湾，中国海南
前沟藻属	karatungiols A,B	强抑菌活性	印度尼西亚
Prorocentrum belizeanum Morton	Belizeanic acid	蛋白质磷酸酶抑制剂	
共生甲藻属	symbioimine	抑制 RAW264 的破骨细胞的生成	红树林，中国
共生甲藻属	脂肪酸衍生物 Zooxanthellacton	细胞毒，抑制人鳞癌细胞	日本
共生甲藻属	多羟基多烯酰胺 zooxanthellamide A	KB 细胞毒素	夏威夷

表 5.4-53 海洋微生物红藻类及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
叉珊藻	醋酸盐 deoxyparguerol-7-acetate	驱虫，抗埃利希腹水瘤	红海，埃及
凹顶藻 *Laurencia spectabilis* Bernart	绫霉素	抗菌剂	红海，埃及

续表

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
马岛凹顶藻	胶鲨烯衍生物 马岛凹顶藻三萜化合物	抑制 P388 肿瘤细胞	海南，中国
Tichocarpus crinitus Yabe	苯基丙酸衍生物 tichocarpols A 和 B	*	桂川，日本

表 5.4-54　海洋微生物绿藻类及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
梅氏绒扇藻	梅氏绒扇藻糖脂 nigricanosides A	抗有丝分裂剂	朴次茅斯

表 5.4-55　海洋微生物海绵类及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
掘海绵属	溴苯酚	细胞毒性抗菌	密克罗尼西亚
Cacospongia sp.	Isojaspic acid	抑制金黄色葡萄球菌	米尔恩湾，巴布亚新几内亚
链状裸甲藻	石房蛤毒素 GC1～GC3	海藻毒素	塔斯纳尼亚
Mycale izuensis Tanita	mycapolyols A～F(聚酮合酶)	细胞毒素类	日本
Oceanapia sp.	鞘氨醇类四氢异喹啉 β 糖苷 oceanalinA	抗真菌	澳大利亚
Oceanapia sp.	硫氰酸红霉他汀 D1 和 D2；硫氰酸红霉他汀 E1 和 E2	杀线虫	澳大利亚
Pachymatisma johnstonia Bowerbank	羟基脂肪酸糖脂 pachymoside A	细菌蛋白酶抑制剂	曼岛
Penares sp. Cheng	penasulfate A	α-糖苷酶抑制剂	日本
Plakortis sp. Chi	α-亚甲基-γ-内酯 plakolide A	抑制诱导型 NO 合酶	卡纳里岛
Rhabdastrella globostellata Carter	异臭椿类三萜化合物 globostellatic acid X	杀死内皮细胞，抗血管生成	苏拉威西岛，印度尼西亚
薄星芒海绵	星芒海绵素 Land M	细胞毒性	三亚
Suberea mollis Row	二溴苯酚 subereaphenol A	抗菌剂	赫尔格达，红海
Suberea mollis Row	二溴苯酚 subereaphenols B,C	抗氧化	赫尔格达，红海

表 5.4-56　海洋微生物棘皮/刺胞/有囊动物及其种属来源、醇/酸/酯类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
草皮珊瑚	前列腺素化合物 Claviridicacids A～E	轻度分离前列腺素的细胞毒性	垦丁，中国台湾
紫贻贝	氯硫脂	细胞毒	意大利
瘤枝藻	不饱和脂肪酸	抑制癌细胞	Herald Pass
肢梢节属	ircinamine B	细胞毒	日本

表 5.4-57　海洋微生物放线菌类及其种属来源、醌类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
链霉菌属	五环碳苷 marmycins A,B	化合物 A 对肿瘤细胞具细胞毒作用	墨西哥
链霉菌属	蒽醌	抗 KHL-60,BCTC-823 和 MDA-MB-435 细胞	青岛,中国
链霉菌属	蒽醌	抗葡萄球菌,抗链霉菌	墨西哥湾
链霉菌属	二蒽醌	抑制 MRSA,抗耐万古霉素肠球菌	波多黎各
链霉菌属	蒽环霉素 komodoquinone A	抑制 Neuro-2A 细胞活性	印度尼西亚
链霉菌属	蒽醌 E	抗 HL-60、BCTC-823 和 MDA-MB-435 细胞	中国
链霉菌属	二蒽醌	抑制 MRSA	海鞘
链霉菌属	2,3-二甲基氢醌、茜素、螺旋霉素(Parimycin)	抑菌,抗肿瘤	墨西哥

表 5.4-58　海洋微生物真菌类及其种属来源、醌类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
灰绿曲霉	二蒽酮	细胞毒性	福建,中国
异冠裸胞壳	蒽醌 Evariquinone	抑制肿瘤细胞生长(KB、NCI-H460)	意大利
单格孢属	蒽醌 monodictyquinone A	抑菌活性	日本海
炭黑曲霉	二聚萘醌-g-吡喃酮	对结核分枝杆菌抑制	涠洲岛,广西省
曲霉属	蒽酮衍生物 1-deoxytetrahydro-bostrycin	抑制金黄色葡萄球菌	万鸦老,印尼
曲霉属	蒽酮衍生物 Tetrahydrobostrycin	弱抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌	万鸦老,印尼
月状弯孢霉	大环内酯 Lunatin	抑菌,但对白色念珠菌无抑制作用	印尼
异冠裸胞壳	曲霉素 Asperazine	对 KB 和 NCI-H460 细胞有抗增殖效力	意大利
小球壳孢属	聚酮化合物 14,15-secocurvularin	抑制枯草芽孢杆菌	地中海
小孢子菌属	蒽糖 Asperflavinribofuranosid	清除 DPPH、抑制 MRSA 和 MDRSA(耐药葡萄球菌)活性	蔚山,韩国
青霉菌属	灰色菌素 C	抑制 3α-HSD 活性	海南岛,中国
土壤青霉菌	醌衍生物	抗 P388 和 A-549 细胞活性	胶州湾
褐藻 *Perithalia capillaris* Agardh	二异戊烯基苯醌	抑制中性白细胞超氧化物的生成和 HL-60 细胞的增殖	新西兰
海绵 Petrosia sp.	环戊烯酮化合物 Trichodenones A～C	细胞毒	菲律宾
异形沃德霉	Gymnastatins A～C	具有酪氨酸激酶、p56 酶抑制活性	波罗的海

表 5.4-59 海洋微生物红藻类及其种属来源、醌类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
多管藻	高度氧化的溴苯酚 Urceolatin	有显著清除 DPPH 自由基活性	青岛，中国

表 5.4-60 海洋微生物海绵类及其种属来源、醌类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
Ircinia spinosula Schmidt	对苯二酚 A，B	猪白细胞三烯抑制剂	希腊
桶状海绵属	CDC25A	蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂	印尼

表 5.4-61 海洋微生物棘皮/刺胞/有囊动物及其种属来源、醌类代谢产物和生物活性

种属来源	化合物	生物活性	地域来源
海茄苳	萘醌衍生物 avicennonesD，E	抗真菌，抗增殖	厦门，中国

表 5.4-62 其他海洋微生物及其种属来源、代谢产物和生物活性

来源	化合物	生物活性	地域来源
棕环海参	alisiaquinones A～C，alisiaquinol	细胞毒	雷州湾，中国
多室草苔虫	苔藓虫素 20	*	北卡罗林纳
青霉菌属	生物碱 Communesins A 和 B	抑制 P388 淋巴白血病细胞	
Rubritalea squalenifaciens Halichondria	diapolycopenedioic acid xylosyl esters A～C	抗氧化	日本神奈川半岛
Asterina pectinifera Müller	GP-3 807	诱导 PC-12 细胞系生长	日本
异冠裸胞壳	Gymnastatins A～C	抑制大肠埃希菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌	
蓝指海星	多羟基甾类糖苷 Linckosides F～K	诱导 PC-12 细胞系生长	冲绳，日本
粉色杆状菌属	*N*，*N*-二乙酰基色胺	细胞毒，抗哺乳动物细胞系	日本
Phorbas amaranthus Duchassaing & Michelotti	类固醇 phorbasterones A～D	细胞毒	佛罗里达
Gymnacella dankaliensis(Castell.)Currah	Leptosphaerone	P388 生长抑制剂	大阪湾，日本
Himerometra magnipinna A. H. Clark	(+)-12-hydroxyhomoaerothionin	抑制霉菌 85E 菌丝生成	中国海，马来西亚
软海绵属	10-甲酰氨基-4-杜松萜烯	抑制 *Balanus ainphitrite* 幼虫着生	日本
小球壳孢菌	聚酮化合物 14，15-secocurvularin	抑制枯草芽孢杆菌	
柔荑软珊瑚属	19-acetoxysterolsarmatinols A，B	弱细胞毒	中国台湾
双鞭甲藻属	19-冈田酸	PP2A 抑制剂	

续表

来源	化合物	生物活性	地域来源
橘青霉	22-乙酰基异环柠檬醛	抗耐久肠球菌和表皮葡萄球菌	巴布亚新几内亚
掘海绵属	3,5-二溴-2-(2,4-二溴苯氧基苯酚)	在血管生成中作为 Tie2 激酶抑制剂	
变异曲霉	4-环氧-同分异构物	对胚胎和精子有杀伤作用	萨哈林岛,俄罗斯
前沟藻属	AM7	溶血活性	日本
强壮前沟藻	前沟藻素 A～E	杀伤 P388 白血病细胞,抗真菌	新西兰
蓝藻属	Ankaraholides A	抑制 NCI-H460,neuro-2a 和 MDA-MB-435 细胞增殖	马达加斯加
葡萄状单隔霉	Asperazine	p56 酪氨酸激酶抑制剂	
多棘海盘车	鞘胺醇型神经酰胺 Asteriaceramide A, Asteriacerebroside G	促进植物生长	日本
巨大鞘丝藻	Besarhanamide A	对盐水虾生物有中等毒性	汉图岛,新加坡
结节青霉	哌嗪类 bilains A～C	*	Huon estuary,塔斯马尼亚
烟囱壶状海牛	四氢异喹啉生物碱 A,C	细胞毒性	
链霉菌属	Bonactin	抗细菌、真菌	夏威夷
短裸甲藻	Brevenal	保护免疫系统	佛罗里达
海扇贝	短裸甲藻毒素 B5	抑菌	新西兰
Briareum excavatum Nutting	聚氧西松烷型二萜 briaexcavatolides S～V	杀伤 Vero 和 MDCK 细胞系	中国台湾
Symphyocladia latiuscula Harvey	溴苯酚 A～C	醛糖还原酶抑制剂	大连,中国
Penicillus capitatus Lamarck	三萜烯硫酸酯 Capisterones A 和 B	*	
刺瓜参	CEG-3、CEG-4、CEG-5、CEG-6、CEG-8、CEG-9	诱导 PC-12 细胞系生长	幻海,日本
多型短指软珊瑚	西松烷型化合物 Cembranoid	杀死肿瘤细胞	珊瑚混合物
烟曲霉	cephalimysin A	细胞毒(P388,HL-60)	尾鳚鱼
青霉菌属	cephalosporolides H,I	黄嘌呤氧化酶和 3α-羟基脱氢酶抑制剂	秋茄叶
Nephthea chabrolii Audouin	chabrolosteroids B,I	细胞毒性	
天门冬拟茎点霉	毛壳球菌素-542	对 L1210 和 C38 有杀伤作用	美国
马杜拉放线菌	chandrananimycins A～C	抗肿瘤、有抑菌、抑藻作用	海洋沉积物,胶州湾

续表

来源	化合物	生物活性	地域来源
链霉菌属	chinikomycins A,B	抗人肿瘤细胞活性	海洋沉积物，胶州湾
Haliangium ochraceum Fudou	顺式 13-甲氧基丙烯酸酯类	抗疫霉属植物真菌	
Corticium simplex Lendenfeld	皮质抑素 A	抗淋巴因子	弗洛尔斯，印尼
噬胞菌属	环聚硫化物	*	北海，日本
曲霉菌属	聚氧十氢化萘衍生物	抗金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐药金黄色葡萄球菌	马尾藻月见草
曲霉菌属	2,3-dimethylosoate	细胞毒(K562 白血病细胞)	海洋沉积物，北海，中国
海绵属	溴化吲哚磺酸衍生物 echinosulfonic acid D	细胞毒素类	新喀里多尼亚
半丰满鞘丝藻	脂肪酰胺 A～G	细胞毒素	巴布亚新几内亚
三角褐指藻	半乳糖脂 Galactolipid	引起哺乳动物分泌薄壁细胞死亡	
脉指形软珊瑚	多氧化甾醇	弱细胞毒	中国台湾
Planococcus maritimus Yoon	胡萝卜糖酸酯	抗氧化活性(超氧抑制)	克莱德河口，英国
环状异帽藻	糖脂	对牡蛎的心脏和鳃的细胞有溶解作用	广岛，日本
Haliangium ochraceum Fudou	甲氧基丙烯酸酯类 haliangicin B～D	抗疫霉属植物真菌	
黄刺参	hillasides A,B	细胞毒素	东山岛，中国
曲霉菌属	腐殖酸 A	抑制泛素激活酶 E1	富士湾，日本
链霉菌属	吲哚类	抗多种肿瘤活性	海洋无脊椎动物
Ircinia oros Schmidt	Ircinin-1	诱导细胞周期停滞和细胞凋亡	
交链孢菌属	异香豆素类	细胞毒，抑制人 A375-S2 和 HELA 细胞	舟山，中国
橘青霉	异环柠檬醇 A,B	抑菌：葡萄球菌、肠道球菌	海绵 Axinellasp.，新几内亚
红树林真菌	异苯基醚	抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、真菌枯萎病和肝癌细胞	S. 中国海岸
羽藻属	环缩肽 kahalalide A	抗结核活性	
Hexadella sp. Pers	溴代酪氨酸衍生物 Kuchinoenamine	抗鱼类病原体活性	日本
链霉菌属	内酯-γ-内酰胺类 Lajollamycin	抑制革兰阳性菌	加利福尼亚
小球腔菌属	吲哚衍生物 Leptosins O～S	细胞毒，O～P 抗 P388 细胞；O～S 抗肿瘤细胞	田边海湾，日本

续表

来源	化合物	生物活性	地域来源
Henricia leviuscula Stimpson	鸡爪海星单糖苷 leviusculoside J	可诱导红细胞溶血	俄罗斯
放线菌属	4-噁唑烷酮类 Lipoxazolidinones A～C	抗革兰阳性菌	科科斯礁湖
Nocardiopsis lucentensis Yassin	嗜盐放线菌素 A	细胞毒性(HCT-116)	咸水沉积物
巨大鞘丝藻	巨大鞘丝藻脂肽类 lyngbyabellins E～I	对 NCI-H460 和 neuro-2a 有杀伤作用	巴布亚
海杆菌属	海杆菌素 F	治疗狂犬病	东赤道大西洋
Fromia milleporella Lamarck	深红海星类固醇糖苷 milleporosides A,B	对受精的海胆卵有弱的细胞毒性	塞舌尔
单格孢属	单格孢菌苯醌 Monodictyquinone A	抗枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和白色念珠菌	日本海
Monodictys putredinis Hughes	单格孢菌素 Monodictysin B	抑制 P450 1A 环氧化酶活性	绿藻,西班牙
Monodictys putredinis Hughes	单格孢菌素 Monodictysin C	NAD(P)H QR 抑制剂,芳香酶抑制剂	绿藻,西班牙
Mycale cecilia Javier Salva	长链吡咯 mycalenitriles 1～3	细胞毒	加利福尼亚
Myriapora truncata Pallas	Myriaporones 3,4	抑制鼠白血病细胞 L1210	地中海西部
Terpios hoshinota Rützler	nakiterpiosin	杀伤 P388 白血病细胞	冲绳
Stylotella sp. Pers	吡喃酮类化合物 nectriapyrone A,B	*	
Neopetrosia sp. Pers	多肽类化合物 neopetrosiamides A,B	抑制肿瘤细胞	巴布亚新几内亚
Stelletta tenuis Lindgren	环多醇衍生物 norsarcotride A	细胞毒素	
Periconia byssoides Pers	peribysin J,M	抑制 HL-60 对 HUVEC 的黏附性	大阪,日本海
Periconia byssoides Pers	Peribysins E～G	抑制人白血病 HL-60 细胞黏附抑制剂	日本
Periconia byssoides Pers	peribysins H,I	抑制 HL-60 与人脐带血管内皮细胞的黏附	*
Periconia byssoides Pers	pericosines A～E	抑制 P388 细胞生长,抑制 EGFR 受体和拓扑异构酶Ⅱ	日本海
Oceanapia sp. Guzii	Petrosamine B	幽门螺杆菌、天冬氨酸半醛脱氢酶的抑制剂	澳大利亚
链霉菌属	杀粉蝶菌素 piericidins C7,C8	鼠神经胶质细胞毒性	海鞘,帕劳群岛
S. micracanthum Amaharashi	质体醌 Plastoquinone	抑制 26-L5 的细胞增殖,对 HCMV 具有强细胞毒性	韩国
Jaspis serpentina Wilson	poecillastrin D	细胞毒素	日本

续表

来源	化合物	生物活性	地域来源
Laurencia brongniartii J. Agardh	三溴代吲哚类化合物 Polybromoindole	对 P338 和 HT-29 有细胞毒性	中国台湾
链霉菌属	聚醚代谢物	*	沉淀物，夏威夷
Acanthodendrilla australis Bergquist	多羟基类固醇	蛋白酶抑制剂	日本
Protoceratium aceros Bergh	原角藻素 protoceratins 2～4	抗肿瘤	岩手，日本
Pseudoceratina purpurea Carter	二环溴代酪氨酸衍生物 pseudoceratins A 和 B	抗真菌	日本
Stichopus chloronotus Brandt	SCG-1-3	杀伤 PC12 细胞	日本海
Topsentia aurantiaca Schmidt	Sch 572423	可与 P2Y12 受体结合	
Mycale sp. Pers	三噁唑大环内酯 secomycalolide	抑制蛋白酶的活性	日本
Ceratodictyon spongiosum Zanardini	Seragikinone A	抑制白色念珠菌	冲绳
L. microcladia K tzing	倍半萜类化合物	对 A-549 癌细胞有杀伤作用	希俄斯岛，爱琴海
Siphonodictyon coralliphagum f. obrutum	硫酸对苯二酚倍半萜 siphonodictyal C	抗菌	
Erylus placenta Thiele	含异丙基侧链类固醇苷 sokodosides A 和 B	对 P388 细胞有细胞毒作用，对酵母有抑制作用	八丈岛，日本
多皱软海绵	硫酸甾醇	细胞毒性	三亚湾，中国海
Amphiscolops *blumi* Achatz	甲藻生物碱衍生物 Symbioimine	抑制环氧合酶-2 活性	冲绳
Microascus longirostris Zukal	呋喃酮类化合物 Trichodenones A～C	抑制半胱氨酸蛋白酶	
Phialocephala fusca W. B. Kendr	Trisorbicillinone A	具有细胞毒性(P388 和 HL-60)	深海样品
Erylus trisphaerus De Laubenfels	trisphaerolide A	细胞毒作用	波多黎各
Mechercharimyces asporophorigenens YM11-542	urukthapelstatin A	抗人类肿瘤细胞	Urukthapel 岛
Kirkpatrickia variolosa Kirkpatrick	Variolin B	抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)的活性	
木果楝	木果楝素 xylogranatins A～D	弱细胞毒	红树林，海南，中国
环状异帽藻	二半乳糖二酰基甘油	胞毒作用(牡蛎心细胞)	日本
棕色扁海绵	氟尿嘧啶衍生物 A～E	抗癌	中国

5.5 已经进入临床和临床前研究的海洋微生物次生代谢产物

目前已有多种海洋微生物次生代谢产物进入临床/临床前研究，如环肽 Didemnin B、Dehydrodidemnin B、生物碱 Ecteinascidin、线型肽 Dolastatin、大环内酯 Salinosporamide A、噻唑脂类 Curacin A、缩酚肽 Thiocoraline 等[11,19,29,30]。

5.5.1 Didemnin B

Didemnin B（图 5.5-1 为其结构式）为第一个进入抗肿瘤临床实验的海洋天然产物。Rinehart 基于对已知蓝细菌代谢产物结构的鉴定，推断这个有细胞毒性的化合物可能来源于与被囊动物共生的蓝细菌。已经进入Ⅱ期临床研究的 DidemninB 具有多种治疗乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、骨髓瘤、恶性胶质瘤和肺癌的作用。其作用的分子机制独特，能够抑制 RNA、DNA 和蛋白的合成，非竞争性抑制软酯酰硫酯酶[31]。尽管 Didemnin B 有多种抗癌功效，但是该化合物毒性过高，1990 年，美国国立癌症研究所（NCI）取消了对它的应用研究。后来相继开展了低细胞毒性的 Didemnin B 及其类似化合物 Aplidine 的人工合成工作。试验证明，Aplidine 具有干扰 DNA 和蛋白合成，抑制肿瘤细胞周期、鸟氨酸脱羧酶以及肿瘤与血管生成的活性。与 Didemnin B 不同，Aplidine 抑制蛋白的合成是在多肽延伸阶段，Aplidine 可通过降低血管内皮生长因子-γ_1 分泌和受体的表达而发挥其抗血管生成的功效[32]。临床前研究表明，其抑制实体瘤（包括对 Didemnin B 有耐药性的实体瘤）功效要强于 Didemnin B，而且 Aplidine 本身并不引起血液毒性、黏膜炎和秃发等副作用，而且它能够选择性地作用于淋巴瘤和白血病细胞，目前 Aplidine 的Ⅰ期实验已经完成，并成功进入Ⅱ期研究。

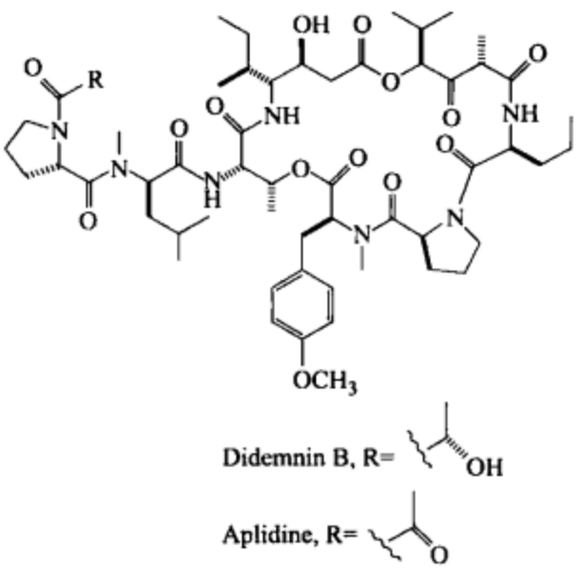
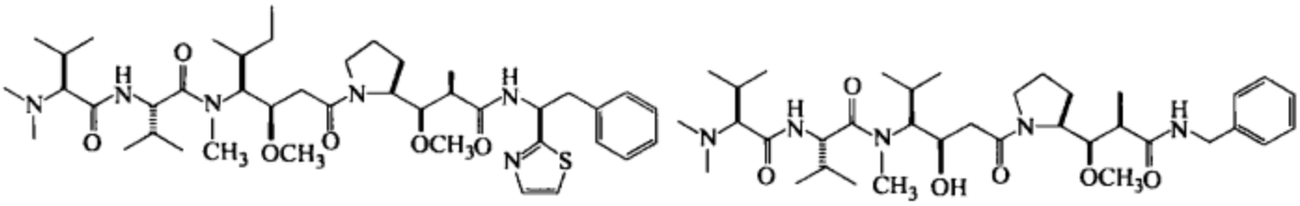


图 5.5-1 Didemmin B 结构式

5.5.2 Dolastatin 10

早在 1970 年，Pettiet 等人就从海洋腹足类软体动物截尾海兔（*Dolabella auricularia* Lightfoot）中提取出海兔毒素 Dolastatin 10，并发现了其具有极强的抗癌特性。根据其分离特性，推测其可能是蓝藻的次生代谢物，后来在海兔子的共栖微生物束藻属中成功地分离到 Dolastatin 10。Dolastatin 10 为五肽化合物，研究发现

Dolastatin 10 非竞争性抑制长春花碱与微管蛋白的结合，强烈影响微管蛋白的聚集和微管依赖的鸟苷三磷酸水解[33]，其可能参与竞争力索新（Rhizoxin）及美登素（Maytansine）的结合位点，能够与结合在微管蛋白上的鸟苷三磷酸互换，导致细胞周期停滞在 S 期。经验证其作用位点是微管蛋白的 Cys_{12}[34,35]。到 1990 年，Dolastatin 10 通过 NCI Ⅰ期临床，进入Ⅱ期。不幸的是，由于该药物导致 40%患者的神经末梢病变，对腺癌病患者激素分泌失常的作用效果不明显，而不得不放弃Ⅱ期临床。然而，见图 5.5-2 所示，其人工合成类似物 TZT-1027，该物质的毒性明显低于母核化合物 Dolastatin 10。TZT-1027 与 Dolastatin 10 的结构差异，仅仅在于 TZT-1027 除去了母核化合物的噻唑环。体外试验证实，与 Dolastatin 10 相比，TZT-1027 对实体瘤细胞系（结肠癌 26、B16 黑素瘤、M5076 肉瘤、MX-1 乳腺癌和 LX-1 肺癌）表现出同等或更高的抑制作用。

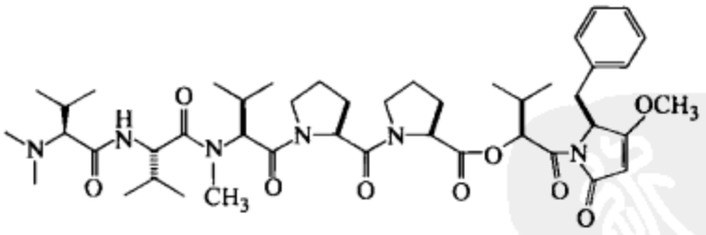


Dolastatin 10　　TZT-1027

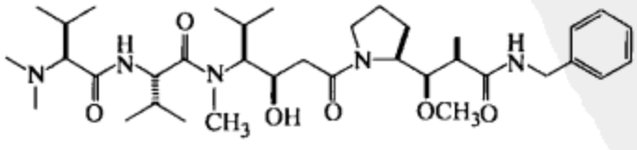
图 5.5-2　Dolastatin 10 与 TZT-1027 的结构式

5.5.3　Dolastatin 15

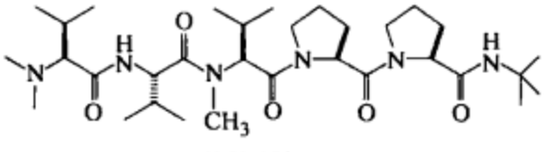
如图 5.5-3 所示，Dolastatin 15 也是从印度洋海兔子 *Dolabella auricularia* Lightfoot 中分离得到，推测其可能是蓝藻的代谢产物，Dolastatin 15 能够通过与长春碱类的结构域结合直接作用于微管。阻碍其进一步临床评价的主要因素是其化合物合成的复杂性以及产量低、水溶性差等因素。为了解决这一问题，1995 年合



Dolastatin 15



Cemadotin



ILX-651

图 5.5-3　化合物 Dolastatin 15、Cemadotin、ILX-651 的结构式

成了 Dolastatin 15 的类似物西马多丁（Cemadotin）。西马多丁也具有很高的体外细胞毒性（$IC_{50}=0.1\mu mol/L$）、抑制微管蛋白聚集及阻滞细胞周期作用。近年来在Ⅱ期临床研究中发现其在黑素瘤、乳腺癌转移和肺癌研究中没有明显疗效，因此目前尚未对其进行进一步的临床评价。ILX-651 为口服第三代 Dolastatin 类似物。

5.5.4 Ecteinascidin-743

Ecteinascidin 是一类来自加勒比海鞘 *Ecteinascidia turbinata* Murray 的四氢异喹啉生物碱代谢物，具有强抗癌作用。见图 5.5-4 所示，Ecteinascidin-743（ET-743）为 Cyanosafracin B 的半合成产物，可从海洋荧光假单胞菌大量发酵而得。Ecteinascidin 的结构与微生物来源的 Saframycins 结构一致，二者均为海鞘的共生菌代谢物，用 16S rDNA 序列鉴定产生 Ecteinascidins 的内生菌为 *Endoecteinascidia frumentensis* SEQ ID NO：1。半合成完成后，ET743 迅速进入Ⅰ期临床研究，其作用机理是通过多重途径干扰肿瘤细胞内核苷酸转录，诱导细胞凋亡[36]。Ⅰ期临床发现，ET-743 对晚期卵巢癌、乳腺癌作用显著。Ⅱ期临床实验中，ET-743 对软组织肉瘤、卵巢癌、乳腺癌的效果最好。目前，欧盟已经批准该药作为卵巢癌（顽固型）的药物，用于临床治疗。

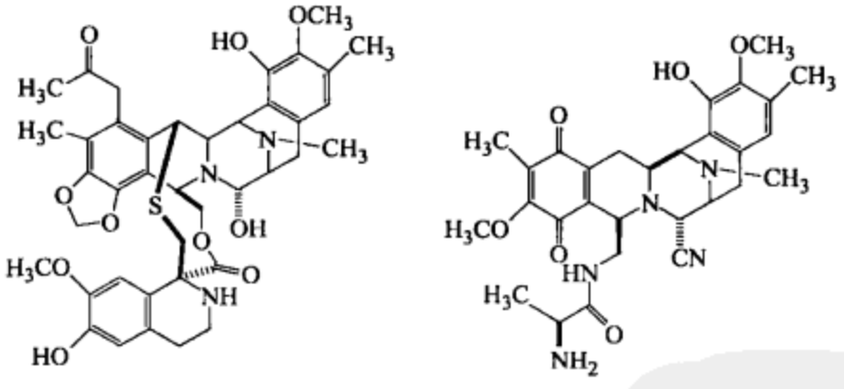


图 5.5-4 Ecteinascidin-743 和 Cyanosafracin B 的结构式

5.5.5 Salinisporamide A

2003 年从 *Salinispora tropica* Scripps CNB-440 中分离得到了 Salinisporamide A。Salinisporamide A 对 20S 蛋白酶体有很强的抑制作用。见图 5.5-5 所示，Salinisporamide A 能够共价结合 20S 蛋白酶体活性位点的丝氨酸残基，形成四氢呋喃环，进而使蛋白酶体失活。Salinisporamide A 在极低浓度下就可以显著抑制耐药恶性疟原虫的感染［$IC_{50}=(11.4\pm1.9)nmol/L$］[37]。另外它还用于多种骨髓瘤的治疗。尽管该药物已经可以全化学合成，但要得到大量产物仍需通过发酵完成。虽然目前上市的海洋药物中，微生物来源的药物较少，但是可以预见随着组合生物合成技术在微生物代谢产物合成方面的应用和发展，更多的、具有高药理活性的海洋微生物次生代谢产物最终均会进入临床研究。

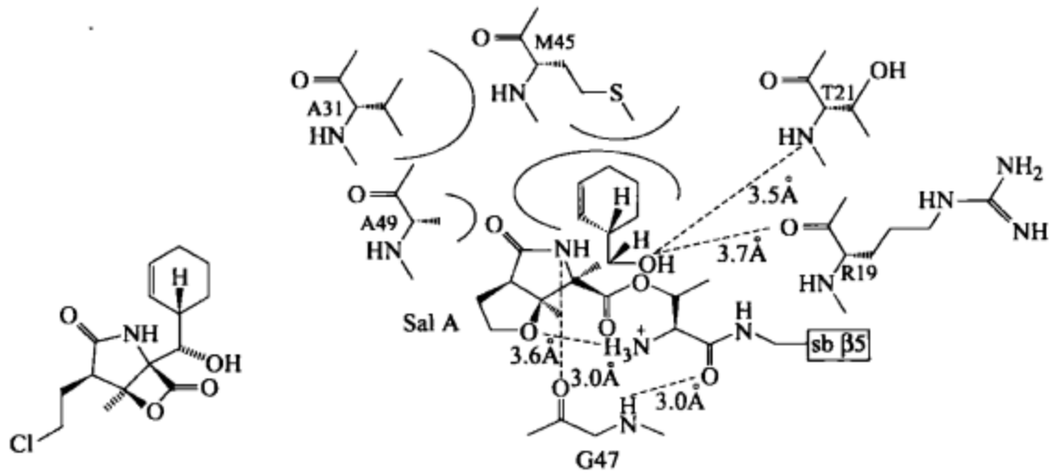


图 5.5-5　SalA 与 20S 蛋白酶活性位点的作用机理

1Å=0.1nm

5.6 海洋微生物的生物合成途径

5.6.1 海洋药物研究现状

从聚酮类合成酶（PKS）、非核糖体多肽合成酶（NRPS）和混合 PKS/NRPS 中生物合成丰富的海洋次生代谢产物，已经成为目前海洋药物的研发热点。克隆编码活性药物的基因簇以及对各基因编码功能的研究正迅速开展。表 5.6-1 列出了目前进入临床或临床前药物研究的多种海洋天然产物，从其生物合成途径、化合物类型、组织来源以及药效作用的分析不难看出，PKS、NRPS 和混合 PKS/NRPS 涉及多种产物的合成，微生物来源极为丰富，包括多种海绵（*Petrosia contignata* Thiele、*Discodermia dissolute* Gunasekera、*Cymbastella* sp. Kelly 和 *Cacospongia mycofijiensis* Mooberry 等）、软体动物 *Conus magnus* Olivera、背囊动物 *Ecteinascidia turbinata* Herdmann 和软珊瑚 *Eleutherobia* sp. Fenical 等多种海洋生物。而且更重要的是从这些资源中已经成功地鉴定出了多种丰富的、有效治疗肿瘤、神经性疼痛、牛皮癣等疾病的化合物及其衍生物。而且随着这些药物合成机理的揭示，将会极大地促进这些药物的研发进程。

表 5.6-1　海洋临床或临床前药物

化合物	生物学合成途径和化合物类型	来源	药效	临床应用现状
齐考诺肽	NRPS	僧袍芋螺	神经性疼痛	Ⅲ期
Ecteinascidin-743	NRPS	红树海鞘	癌症	Ⅱ/Ⅲ期
苔藓抑素	混合 PKS/NRPS	苔藓动物 *Bugula neritina* Linnaeus	癌症	Ⅱ期
Dolastatin 10	NRPS	软体动物 *Dolabella auricularia* Lightfoot	癌症	Ⅱ期
Dehydrodidemnin B	NRPS	背囊动物 *Aplidium albicans* Milne-Edwards	癌症	Ⅱ期

续表

化合物	生物学合成途径和化合物类型	来源	药效	临床应用现状
Kahalalide F	NRPS	背囊动物/蓝藻 *Elysia* rufescens/*Bryopsis* sp. Hamann	癌症	Ⅱ期
角鲨胺	氨基类固醇	鲨鱼 *Squalus acanthias* Linnaeus	癌症	Ⅱ期
IPL-576092（HRM-4011A）	类固醇	海绵 *Petrosia contignata* Thiele	牛皮癣	Ⅱ期
IPL-550260	类固醇	海绵 *Petrosia contignata* Thiele	炎症	Ⅰ期
HalichondrinB 衍生物(E7389)	PKS	海绵 *Lissodendoryx* sp. Hajdu	癌症	Ⅰ期
Discodermolide	PKS	海绵 *Discodermia dissolute* Gunasekera	癌症	Ⅰ期
Hemiasterlin derivative(HTI-286)	NRPS	海绵 *Cymbastella* sp. Kelly	癌症	Ⅰ期
Bengamide 衍生物(LAF389)	混合 PKS/NRPS	碧玉海绵	癌症	Ⅰ期
Agelasphin 衍生物(KRN-7000)	鞘糖脂	海绵 *Agelas mauritianus* Natori T	癌症	临床前
Laulimalide	PKS	海绵 *Cacospongia mycofijiensis* Mooberry	癌症	临床前
Vitilevuamide	NRPS	背囊动物 *Didemnum cuculiferum* Sluiter	癌症	临床前
Diazonamide	NRPS	背囊动物 *Diazona angulata* Lindquist	癌症	临床前
Eleutherobin	二萜类糖苷	软珊瑚 *Erythropodium caribaeorum* Duchassaing	癌症	临床前
Sarcodictyin	萜类	海绵 *Sarcodictyon roseum* Philippi	癌症	临床前
Peloruside A	PKS	海绵 *Mycale hentscheli* West	癌症	临床前
Salicylhalimides A,B	PKS	海绵 *Haliclona* sp. Sakai	癌症	临床前
ES-285(Spisulosine)	烷基化氨基醇	软体动物 *Spisula polynyma* Stimpson	癌症	临床前
Thiocoraline	NRPS	细菌 *Micromonospora marina* Tanasupawat	癌症	临床前

5.6.2 海洋微生物次生代谢物生物合成基因簇

目前已有三种完整基因簇（PKS、NRPS 和杂合 PKS/NRPS）已经成功地从海洋放线菌、蓝细菌和黏细菌等多种微生物中分离。除了完整基因簇的发现外，还有大量相关基因簇也被相继发现，包括海洋甲藻、海绵和海洋无脊椎动物中的共生菌在内，大量涉及生物合成的基因和前期推测的基因簇已经被相继鉴定。与多种陆地微生物的 PKS 和 NRPS 生物合成基因簇相比，大多数海洋微生物的 PKS 和 NRPS 同样具有保守性，除此之外，还发现一些特有的具催化酶功能的基因簇。PKS、NRPS 和杂合 PKS/NRPS 基因簇，在海洋次生代谢的生物合成中占有重要角色。

5.6.2.1 海洋放线菌次生代谢物的生物合成

陆地放线菌已经提供了大量结构独特的具生物学活性的代谢物，部分药物显示了极强的药理活性。近年来，随着多种海洋放线菌的分离以及多种有重要价值的活

性化合物相继出现，海洋放线菌已经成为药物研究的一个重要资源。

（1）伏尔加霉素（Enterocin）和 wailupemycins　由海洋放线菌 *Streptomyces marinus* Hummand Shepard. 产生的肠道菌素（Enterocin）及其衍生物以及 wailupemycin A～D 均为聚酮类化合物，图 5.6-1 所示，由Ⅱ型 PKS 基因簇编码，肠道菌素类化合物普遍具有较强抑菌活性。肠道菌素（enc）基因簇由 20 个 ORF（21.3Kb）组成，其核心结构由苯甲酸和丙二酸组成，enc 基因簇中至少有 5 个 ORF（EncP、H、I、J 和 EncL）参与从苯丙氨酸到苯甲酸的合成。但是之前推测的催化 β-酮-肉桂酰-CoA 氧化的 β-酮类脱氢酶基因在此基因簇中并没有发现。而且Ⅱ型 PKS 基因簇中典型的环化酶也不存在。早期 Seto 等人研究认为，肠道菌素来源于类 Favorskii 碳重组。这种少见的碳重组在一些天然产物中也有所发现，如从沟鞭藻类分离得到细胞毒素冈田酸。据此，初步推测，这种重组阻碍了Ⅱ型 PKS

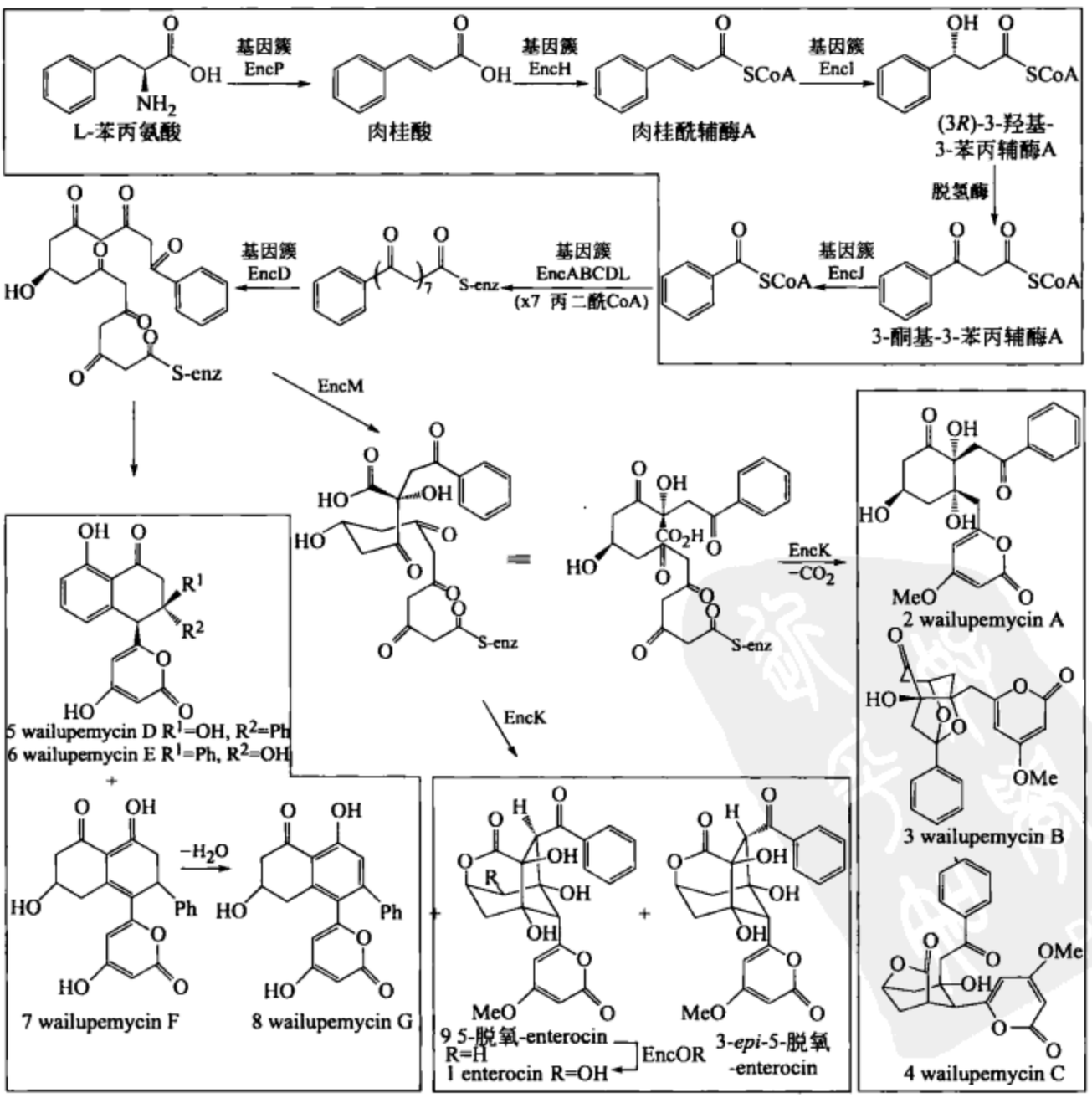


图 5.6-1　wailupemycins 类化合物的生物合成途径

典型的连续醛醇反应。与此同时，基因敲除方法证明了 EncM 为编码“avorskiiase”酶的基因；EncK 编码甲基转移酶，其可能负责 α 吡喃环的氧甲基化并协同 EncK 进行碳重组，最终合成肠道菌素和 5-脱氧-enterocin[38]。

（2）灰紫红菌素（Griseorhodin） 分离自链霉菌 *Aplidium lenticulum* Kott 的灰紫红菌素，是类玉红霉素化合物。而玉红霉素是一类高度氧化的聚酮类化合物，具有较强的抗 HIV 反转录酶和 DNA 解旋酶活性。这类化合物的一些成员有螺酮缩醇，可抑制端粒酶活性。Li 等人鉴定并克隆表达了编码灰紫红菌素 A 的基因 grh。基因簇 grh 是一个典型的 II PKS 基因簇，长约 34kb。在单 Cosmid 质粒中有 33 个 ORF，由丙二酰 CoA 通过核心基因（grhABC）与醋酸盐的作用进行分子的延长。ACP 基因位于 grhC 基因中酮合酶编码区 grhA 和 grhB 的上游 26kb 处。据此，推测延长链的环化由两个芳香酶基因 grhE 和 grhQ 作用。grhSTL 基因编码获得类普拉定霉素前体。此外还发现大量编码氧化还原酶类的基因在环氧螺酮缩醇和萘醌环化系统中起到一定的作用。这可能是与 Baeyer-Villiger 反应之前的一个氧化降解途径——逆醇醛重排、C_2 断裂、环化过程有关。P450 酶可能参与了催化 C═C 的环氧化过程。该基因的鉴定是通过重组 Cosmid 质粒并在 *S. lividans* 中表达而得到灰紫红菌素 A[39]。灰紫红菌素 A 的生物合成途径见图 5.6-2 所示。

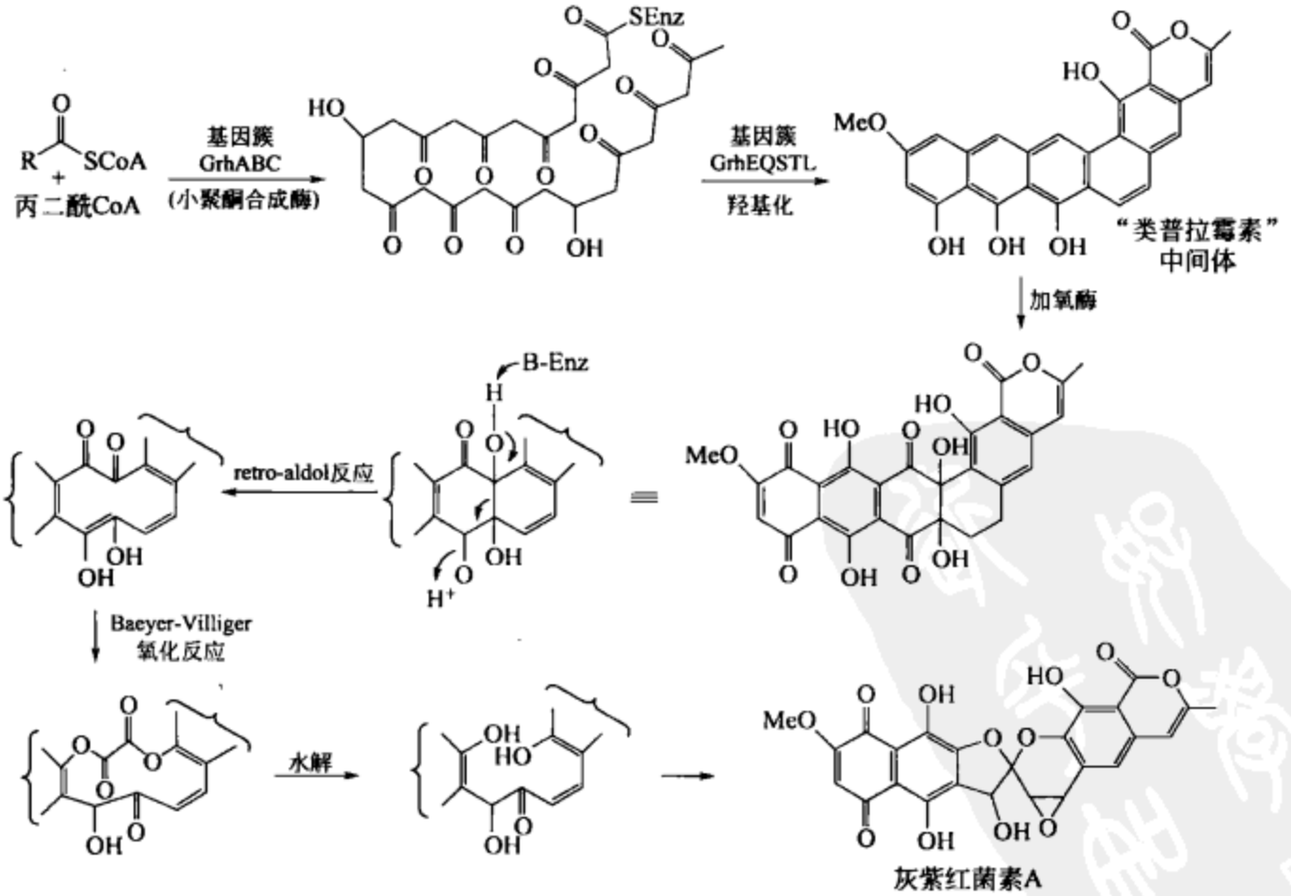


图 5.6-2 灰紫红菌素 A 的生物合成途径

5.6.2.2 海洋真菌代谢物的生物合成

与其他海洋微生物相比，涉及海洋真菌的生物合成途径很少。Mangicol A 是从海洋真菌镰孢霉属分离出的二倍半萜多元醇化合物。用 ^{13}C 标记的醋酸盐显示，五

分子甲羟戊酸最终生成焦磷酸香叶基金合欢酯（GFPP），其中的三个异戊二烯分子并合成环状结构。一种推测是 GFPP 通过形成蛇麻烯中间体，通过闭环和质子转移，完成 1、2 烷基转移，进而完成碳骨架的重排。数据显示^{13}C 标记得到 3/5 的碳原子被标记，而且包括该产物的所有甲基，由此可推测 MVA 途径可能起始于醋酸盐的 C_2。而从拟茎点霉属真菌中分离得到的抑制有丝分裂的聚酮类化合物 Phomopsidin，其来源于 9 个醋酸单元，三个甲基来自 S-腺苷甲硫氨酸。研究显示 Phomopsidin 可能是通过类 Diels-Alder 反应生成九酮体化合物。虽然研究 β-内酰胺抗生素并未成功，但是已经从 *Kallichroma tethys* Kohlm 得到 β-内酰胺合成基因 pcbA、pcbB 和 pcbC[39]。Mangicol A 的生物合成途径，如图 5.6-3 所示。

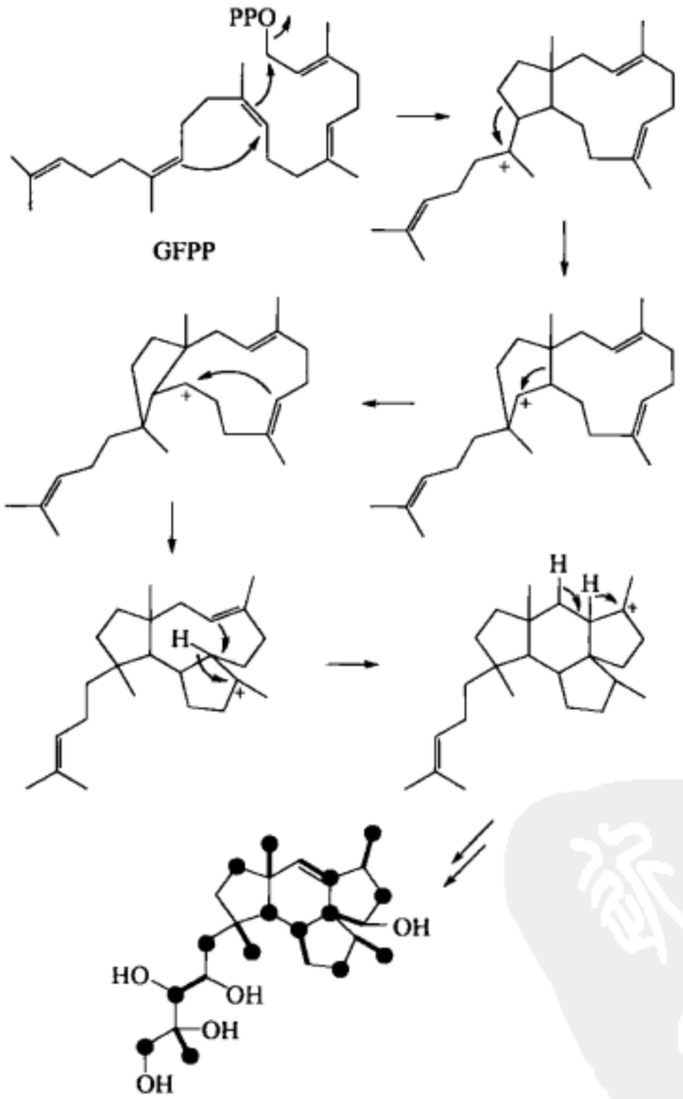


图 5.6-3　Mangicol A 的生物合成途径

5.6.2.3　海洋细菌代谢物的生物合成

如图 5.6-4 所示，由嗜冷海洋细菌——希瓦菌（*Shewanella* sp. SCRC2738 knowlet）分离提取到的长链多不饱和脂肪酸的合成途径为新聚酮类化合物合成途径。海洋细菌的厌氧合成途径不同于植物和动物的需氧条件下合成不饱和脂肪酸和已知合成脂肪酸的延长反应途径。这可能是因为海洋食物链拥有众多信号前体来源。其合成基因片段长 38kb，拥有合成二十碳五烯酸 PKS 有关的 5 个阅读框

(ORF)。其 PKS 结构域不同于典型 I PKS。其结构域编码基因包括有磷酸泛酰巯基乙胺结合位点保守区的六个 ACP 重复序列，磷酸泛酰巯基乙胺结合位点保守区和一个使 C═C 的反式结构生成顺式结构的脱水酶/异构酶。类似的基因簇在其他海洋细菌如 *Moritellamarina* Baumann、裂殖壶菌 SR21 和深海细菌 SS9 中已经发现。

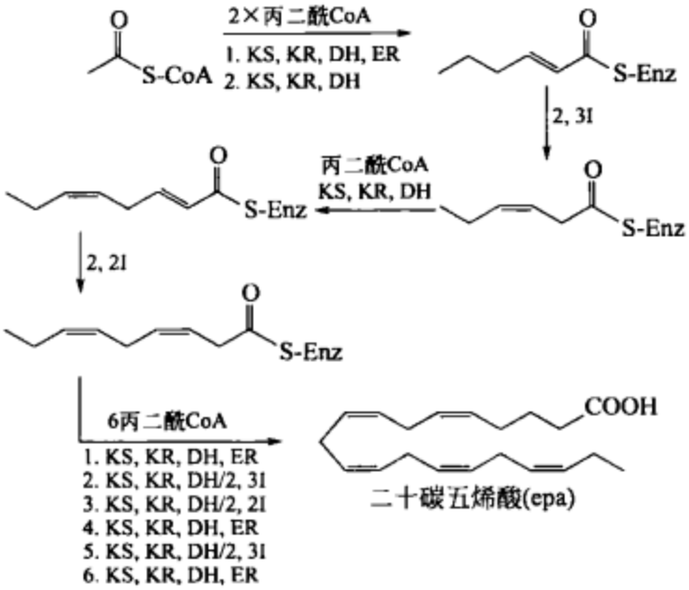


图 5.6-4　海洋细菌 *Shewanella* sp. SCRC2738 的二十碳五烯酸合成途径

KS—酮合酶；KR—酮还原酶；DH—脱水酶；ER—烯酰还原酶；2,3I—2,3-异构酶；2,2I—2,2-异构酶

Bryostatin（图 5.6-5）是从海洋细菌 *Candidatus endobugula* sertula 体内提取到的蛋白激酶 C 抑制剂。其合成由 PKS 聚酮类合成酶完成。编码苔藓抑素的基因模块仅仅在细菌中找到，而苔藓虫 *B. neritina* 为苔藓抑素的首选生物合成来源。如图 5.6-6 所示，从苔藓虫中克隆得到的 bryA 含四个连续 PKS 模块，与苔藓抑素起始合成有关。Bryostatin 合成起始于 bryA。bryA 为加载模块，包括 4 个结构域，分别是：类脱氢酶（DH）、类 β-酮-ACP 还原酶（KR）、类 FkbH 和一个与其他蛋白共同起催化作用合成甲氧基丙二酸延伸单元的结构域，ACPFkbH。糖酵解中间产物在 bryA 整个模块作用下得到 D-乳酸酯，其途径可能是 FkbH 先将磷酸甘油酸转运至酰基载体蛋白（ACP），经类脱氢酶的脱氢反应，生成酶连烯醇式丙酮酸，从而很容易形成酶连丙酮酸。类 KR（β-酮-ACP 还原酶）能够催化去除丙酮酸-α-酮基。用放射标记法示踪甘油可推测出 C_3 为起始单元前体。甘油进入糖酵解后异构生成甘油醛-3-磷酸，再氧化生成磷酸甘油酸。但 bryA 缺少其他 PKS 聚合酶具有的酰基转移酶模块。bryD 包括 β-酮-ACP 还原酶酰基载体蛋白，编码蛋白可以进行酮基的还原。因为 M_{11a} 的 KR 在 BryD 的 *N* 端，所以不需要将聚酮转移至 M_{11} 上的酰基载体蛋白就可以还原酮基。如图 5.6-7，有趣的是 C_{13}、C_{21} 处含两个外环烯烃，可能是由 bryR/bryS 起作用，但并不清楚烯化发生在延长时还是环化、释放阶段。修饰可能由 BryR（β-羟基-β-甲基戊二酰辅酶 A，HMG-CoA 合酶）来完成，Margo G. 推测 bryR 可将乙酰-CoA 加载到 C_{13} 和 C_{21} 的 β 酮基上。脱水后，羧酸将被（转甲基化酶）M_3 和 M_7，或 BryS 氧甲基化。BryQ 是否具有脱羧功能目前尚不清楚。

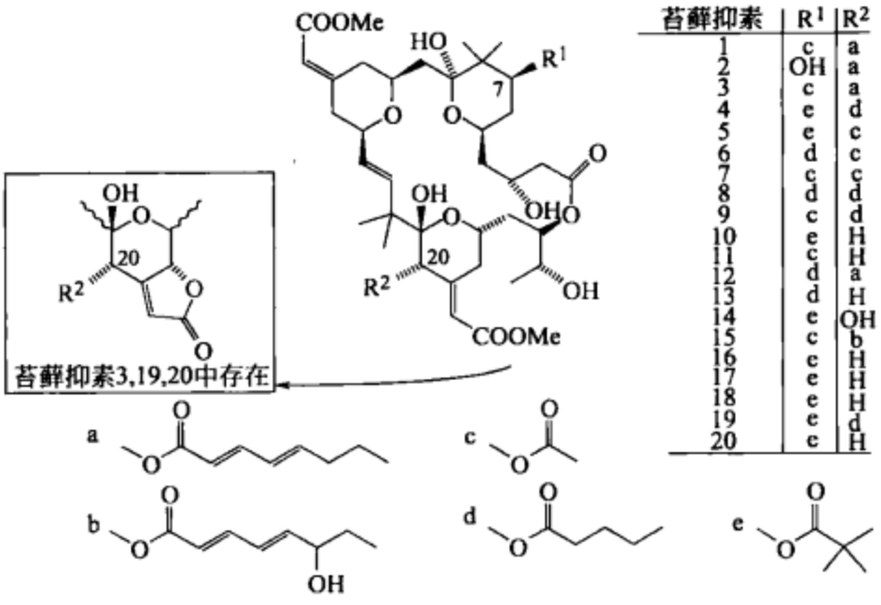


图 5.6-5　已发现的 20 种苔藓抑素，其中 Bryostatin 1 已经进入临床

如图 5.6-6 所示，基于已知 20 种 Bryostatins 的结构，假设出了合成 bryostatin 0 的途径。如图 5.6-7 所示，所有的 Bryostatins（除 3、19、20 需要进一步内酯化）的进一步修饰均在 C_7 和 C_{20} 上。聚酮类生物合成的基因与蛋白之间并不是绝对的共线性关系。bryA 在参与生物合成中，作为第一个反应阶段，但是却是基因簇中最后一个基因。而在模块中被忽略的 bryX，其连续的 ORF 和 RT-PCR 显示，此基因是重要的，但其结构域尚未研究清楚。苔藓抑素的生物合成机制有待于进一步研究[40]。

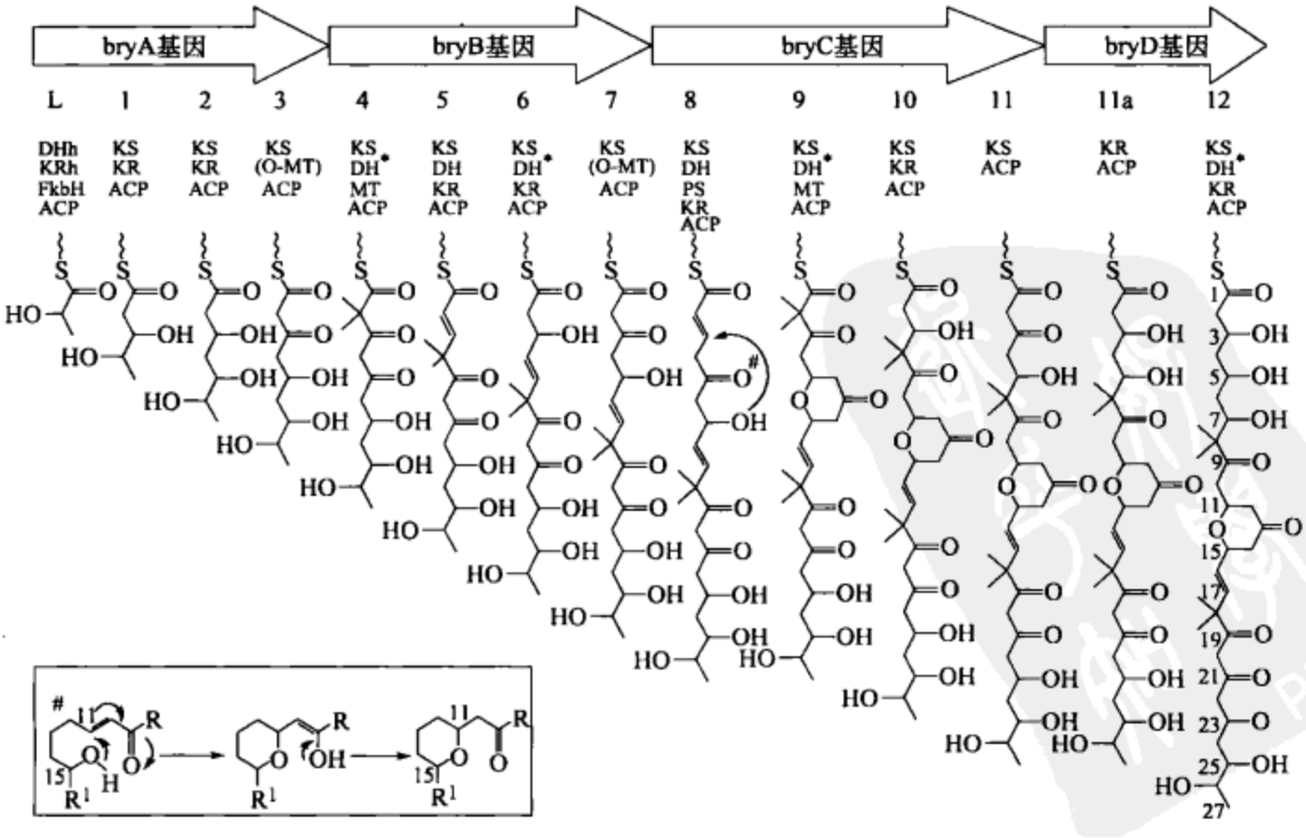


图 5.6-6　推测未环化的 Bryostatins 生物合成途径

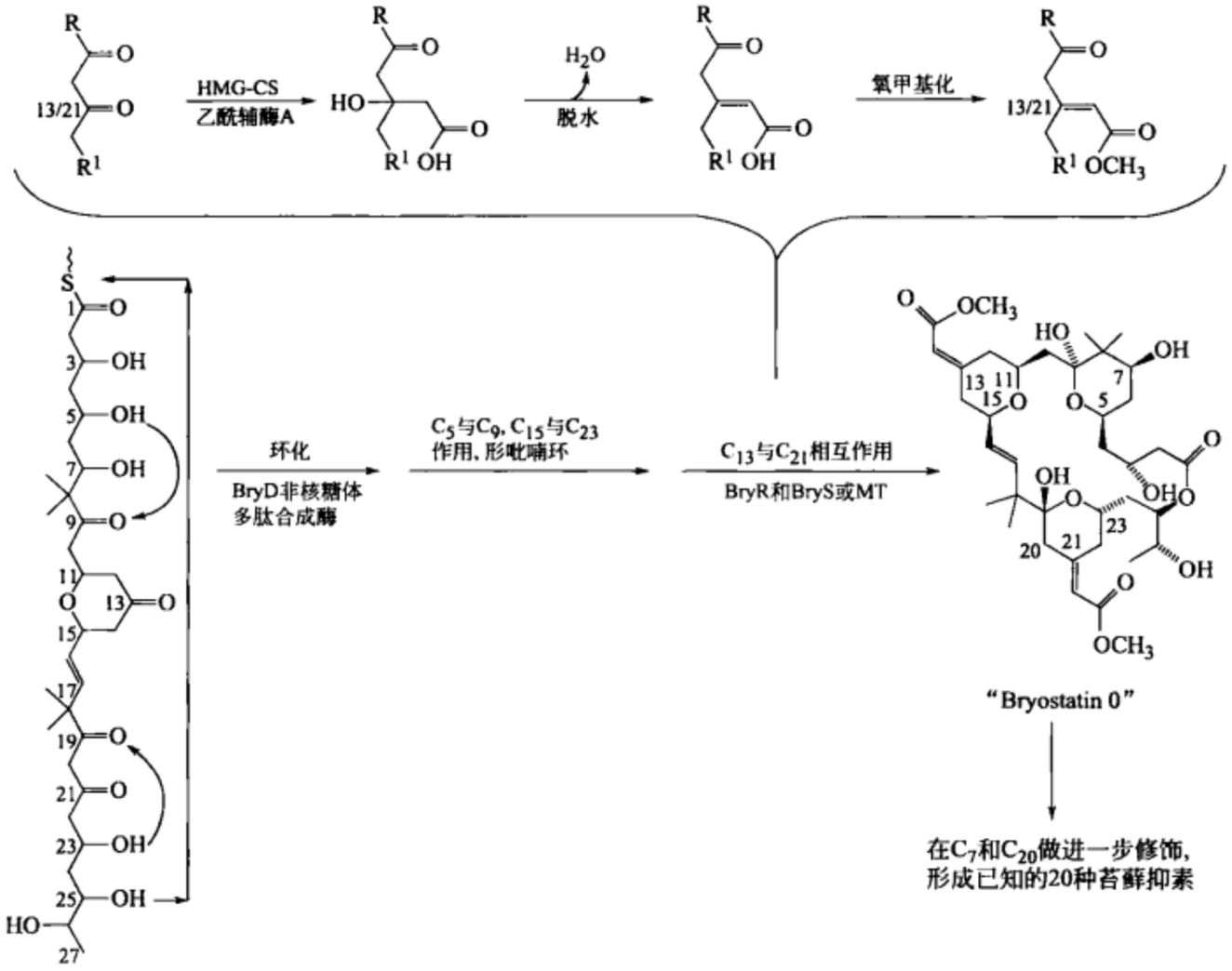


图 5.6-7　推测 Bryostatin 0 的合成途径

5.6.2.4　海洋蓝细菌代谢物的生物合成

陆地蓝细菌能够产生非核糖体编码衍生的肽类和缩肽类细胞毒素，这已是众所周知的。在已经发现的点形念珠藻中至少有 16 种完全不同的 NRPS/PKS 基因簇。目前已经发现的海洋蓝细菌产生的肽类和聚酮类代谢物多于 450 种。从培养蓝细菌、研究分子遗传和先导化合物的生物合成过程中发现，该类次生代谢产物居多。

（1）Barbamide（巴尔巴酰胺）　从海绵 *Dysidea herbacea* Keller 中已经成功地分离出一些含三氯甲基化合物的小肽类，如 demethylisodysidolide 和 herbacic acid。该海绵往往与蓝细菌 *Oscillatoria spongeliae* Schulze 共生，*Oscillatoria spongeliae* Schulze 可能为很多代谢物真正的生物合成源头。利用同位素标记方法，Sitachitta 研究了一些产生脂肽 barbamide 的蓝细菌，并推测其三氯甲基部分来自 L-亮氨酸。Sherman 等鉴定并克隆了 barbamide 的基因簇。见图 5.6-8 所示，该基因簇涉及 PKS/NRPs 酶系统，半胱氨酸（curacin A、carmabin、antillatoxin 和 malyngamide）被认为以腺苷酰化作用参与噻唑环的环化过程。由于 bar 基因簇长达 40kb，故采用双质粒克隆 bar 基因簇。该基因簇含 12 个 ORF，而 barA-barH 为 barbamide 合成过程的核心基因。亮氨酸残基可能参与 BarD 腺苷酰化作用，位于 BarA 肽基转运蛋白上。虽然三氯亮氨酸的连接由 BarE 连接到肽转运蛋白（PCP），

但亮氨酸氯化作用可能由 BarB1、BarB2、BarC 和 BarE 基因共同作用，BarJ 可能通过氧化作用脱氨，并通过单碳脱羧形成 α-酮中间体，再由丙二酰作用形成二酮。通过 BarF 基因的 *O*-甲基结构域催化形成烯醇或起到稳定 α-羰基作用。BarF 功能尚未研究清楚。进一步链延长由苯丙氨酸通过 NRPS（BarG）基因 *N*-甲基化作用，最终与半胱氨酸残基结合、环化形成噻唑环。barbamide 的合成过程中，必须经过由 BarJ 基因催化的脱羧作用。该基因簇鉴定得到了 NRPS 聚合酶腺苷酰化结构域和 ATP-PPi 标记实验证实。氨基酸的特殊性（亮氨酸、三氯亮氨酸、半胱氨酸）与 barbamide 的生物合成密切相关[41]。该基因簇至少清晰显示了海洋微生物与陆地微生物使用相同生物合成途径。这种机制的认知，为分子遗传研究中研究可培养的海洋微生物提供了新策略。

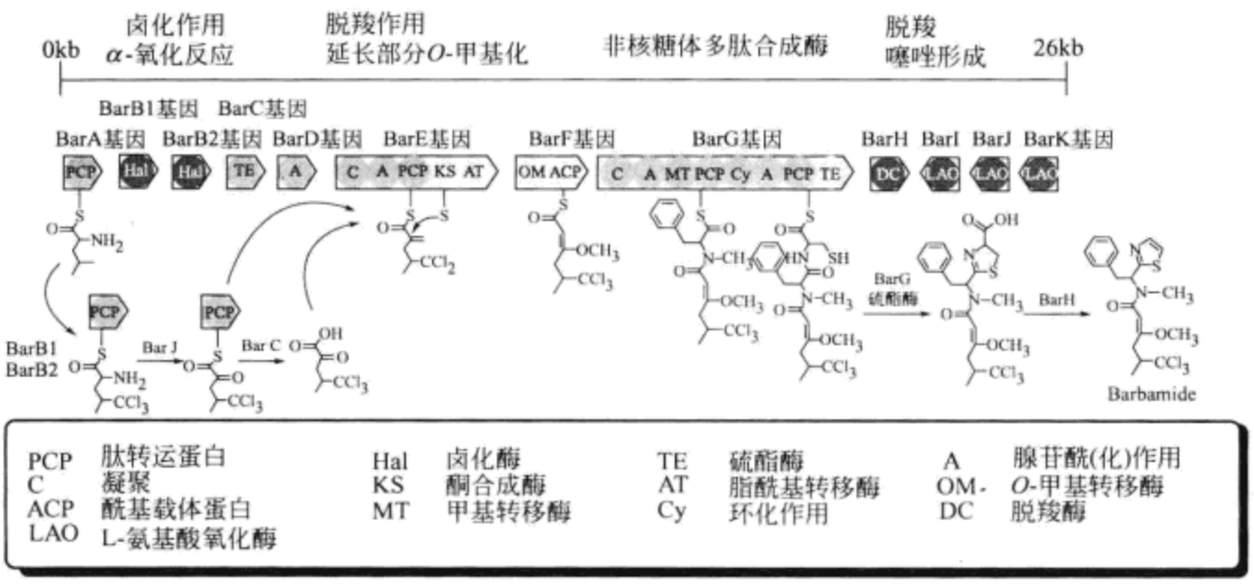


图 5.6-8　海洋蓝细菌酯肽 barbamide 生物合成途径

（2）Curacin A　Curacin A 为从热带海洋蓝细菌 *Lyngbya majuscula* Gomont 中分离出的细胞毒素，其独特的结构在于其噻唑环和环丙基相连。它能够与秋水仙素微管结合位点相作用，从而起到细胞毒作用。该基因簇含 31 个阅读框（ORF），G+C 含量（45.5%）相对较低，序列比对显示出 14 个跨度约 63.7kb 的 ORF 可能与 curacin A 的生物合成有关，curA-curN 功能见表 5.6-2 所示。

CurA 编码 2311 个氨基酸序列，其基因单元（ATA1）ACP_{A1}、KS_A、AT_{A2}、ACP_{A3}和 ACP_{A4}类似于其他微生物的 PKS 聚合酶。其特性在于生物合成的酰基载体蛋白（ACP_{A2}、ACP_{A3} 和 ACP_{A4}）在 PKS 聚合酶的 *C*-末端、酰基载体蛋白 ACP_{A1}在 KS_A 前，AT_{A1}在 CurA 的 *N*-末端。在 CurA 中，基于没有保守区活性位点 GHSxG，其 AT_{A1}被认为无活性。丙二酰-CoA 加载至 ACP_{A1}可能由 KS_A 结构域下游 A 的 T_{A2}结构域完成。AT_{A2}可能也将丙二酰-CoA 加到 ACP_{A2}。在 SorA 和 MtaB 中两个连续的酰基转移酶结构域参与不同底物的加载。如图 5.6-9 所示，CurA的生物合成以丙二酰-CoA 为起始单元。$CurAKS_A$ 结构域可能催化形成二酮中间物。

表 5.6-2　CurA 基因簇编码的蛋白特性

蛋白	结构域	功能
CurA	AT,ACP,KS,AT,ACP,ACP,ACP	PKS
CurB	ACP	酰基载体蛋白
CurC	KS	β-酮-ACP 合成酶
CurD	HCS	HMG-CoA 合酶
CurE	ECH	烯酰-CoA 水合异构酶
CurF	ECH,ER,KS,AT,UNK,ACP,C,A,PCP	PKS/NRPS
CurG	KS, AT KR,DH, ACP	PKS
CurH	KS,AT,ER,DH,KR,ACP	PKS
CurI	KS, AT,DH,KR, ACP	PKS
CurJ	KS, AT,MT,DH,KR, ACP	PKS
CurK	KS, AT,ER,DH,KR, ACP	PKS
CurL	KS, AT,MT,KR, ACP	PKS
CurM	KS, AT,KR, ACP,ST,TE	PKS/TE
CurN	UNK	水解酶

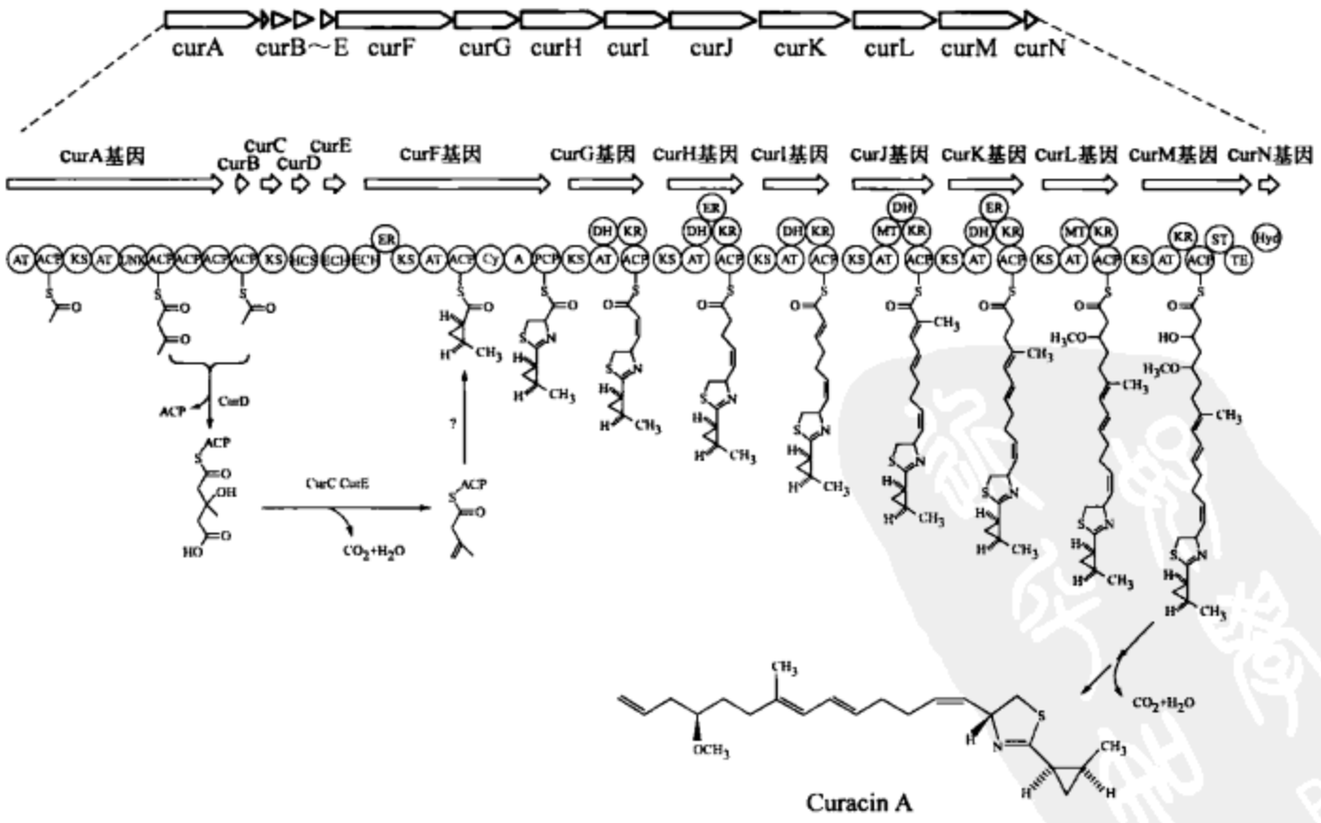


图 5.6-9　推测 Curacin A 的合成路径

ACP—酰基载体蛋白；KS—β酮-ACP 合成酶；KR—β-酮-ACP 还原酶；AT—酰基转移酶；
HCS—HMG-CoA 合酶；ECH—烯酰-CoA 水合异构酶；DH—β-羟基、酰基 ACP 脱氢酶；
MT—甲基转移酶；ER—烯酰还原酶；PCP—肽运蛋白；Cy—环化结构域；
A—腺苷化结构域；ST—磺基转移酶；TE—硫酯酶；Hyd—水解酶；UNK—氧化酶

CurA 末端串联的结构域酰基载体蛋白有四个小的阅读框，分别编码 CurB、CurC、CurD 和 CurE。CurF 基因可能与形成环丙基环有关。CurD 编码 β-羟基-β-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶，催化醋酸与乙酰乙烯基-酰基载体蛋白的缩合形成 HMG-ACP，中间产物可能经过脱羧和脱水形成异戊烯-酰基载体蛋白后发生异构形成环丙烷。序列分析表明，原本 CurC 结构域的活性位点半胱氨酸残基由丝氨酸替代，由此推测此酶没有缩合功能。与 PKS 聚合酶系统模块结构域相比较，推测其功能可能与 β-羟基-β-甲基戊二酰-酰基载体蛋白中间体的脱羧有关。UNK 可能与植烷酰辅酶 A 的羟化形成环丙烯有关，在 CruF 结构域中有 ECH 和 ER。推测环丙基环化完成后与中间物形成酰基-酰基载体蛋白中间体。虽然在 CurF 有 cys 残基，但将 Asn 替代保守区 His-173，显示其酶活性明显降低，证明了 CurF 的 His_{173} 参与环丙基环化的推断[41,42]。

(3) lyngbyatoxin A（鞘丝藻毒素 A） lyngbyatoxin A～C 由 *Lyngbya majuscula* Gomont 产生，其生物活性是抑制 PKC 蛋白激酶，化学及药理学性质与 Teleocidin 类似。2004 年 Edwards 和 Gerwick 成功克隆了 ltx 合成基因。如图 5.6-10 所示，lyngbyatoxin 的生物合成起始于 ltx 的两个 NRPS 模块蛋白。第一个模块含 A 区，含有一个 N-Met 结构域和一个肽基载体蛋白（PCP）。第二个模块包括一个缩合结构域，含 L-色氨酸的 A 结构域，此外还含有一个肽基载体蛋白。依赖 NADPH 还原酶结构域（Red），负责降低从 *N*-甲基-L-缬氨酸-L-色氨醇形成 *N*-甲基-L-缬氨酸-L-色氨酸。*N*-甲基-L-缬氨酸-L-色氨醇可能进一步由 LtxB（P450 单氧化酶）修饰，推测 LtxB 催化 *N*-甲基-L-缬氨酸-L-色氨醇吲哚环的氧化从而导致

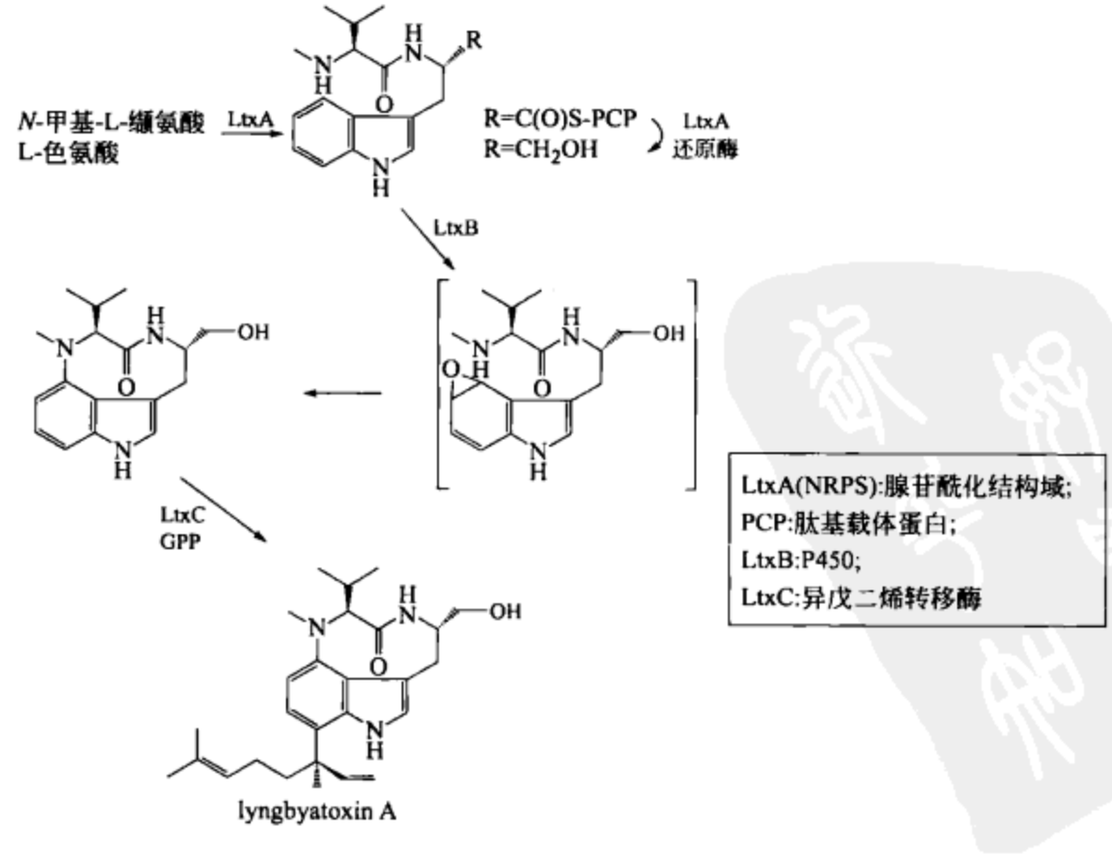


图 5.6-10 lyngbyatoxin 生物合成基因簇以及可能的合成路径

下游反应环化。lyngbyatoxin 是微生物产生的相对较少的萜类化合物，LtxC 催化与已知的异戊烯转移酶的不同之处在于，3-磷酸甘油磷酸酶（GPP）形成 C_3 碳四元中心。这种异戊烯的转移可能首先通过异戊烯吲哚氮原子的 Claisen 重排形成 lyngbyatoxin。第四个编码 lyngbyatoxin 合成途径的蛋白为 LtxD，它的作用可能就是以 LtxD 转化其他代谢物如 lyngbyatoxin B 和 C。对 Ltx 的基因簇分离有助于研究人员解释 PKC 家族中 indolactam-生物合成路径，如 teleocidins 和 olivoretins，同时该基因簇也为利用 Ltx 途径产生新 PKC 调节基因奠定了基础。由 LtxB 和 LtxC 催化的吲哚修饰具体机制将在对 lyngbyatoxin 合成途径的进一步研究中揭示[41]。

5.6.2.5 海洋甲藻

由甲藻可生成一些结构较复杂的聚酮类化合物，如梯形聚醚类、线形聚醚类和大环内酯类。虽然同位素示踪已经探明其化合物的来源，但一些含大量甲基的结构独特的聚酮类骨架显示出其聚酮类的 C 重排中醋酸盐中失去 C-1 是一种新的机制。目前甲藻聚酮类的合成机制尚不清楚甚至存在争论亟待解决。

鳍藻毒素（DTX）家族，包括软海绵酸的生物合成在早年已经有所报道，早期研究描绘了原子的来源，醋酸盐衍生氧原子并没有 ^{18}O，暗示了一种新的乙酰辅酶 A 合成机制。从亚热带甲藻 *Prorocentrum maculosum* Faust 得到的 DTX-5a 和 DTX-5b 毒素，通过 [2-^{13}CD3] 乙酸、[1,2-^{13}C]、[2-^{13}C，^{15}N] 甘氨酸研究生物合成。虽然二者仅仅只一个碳原子的不同，但是标记研究显示其侧链的氧原子是通过局域特殊化的方式（推测可能是 Baeyer-Villigerase 反应）插入的。如果这种氧化反应确实在聚酮类合成中起作用，那么它就能够有力地说明 Favorski 去除步骤是聚酮类化合物合成步骤的一部分。侧链 N 原子的进一步标记表明其来源于 Gly 基因，说明 PKS-NRPS 系统可能也是甲藻聚酮类化合物的合成系统。已经在产生多种聚酮类化合物的甲藻中发现了与Ⅰ型 PKSs 相关的酮合酶（KS）基因，在产生细胞毒性的海洋甲藻 *Pfiesteria shumwayae* Steidinger 中并没有广泛存在，这意味着如果海洋甲藻确实产生鱼卵毒素（ichthyotoxins），那么它们并不来源于聚酮类化合物。甲藻中含有产生大环内酯类细胞毒素家族 Amphidinium。用 ^{13}C 标记乙酸盐前体已经鉴定出 Amphidinolides B、H、G、C、W、T_1、X 和 Y 的生物合成。见图 5.6-11 所示，标记数据显示：①大环内酯的碳骨架完全来源于醋酸衍生物。②所有侧甲基和次甲基来源于醋酸盐而不是 *S*-腺苷甲硫氨酸（AdoMet）。③氧合的碳来自醋酸的 C_1 和 C_2 甲基。这提示了在 Amphidinolide 合成过程中氧化作用的可能来源。这种活性通过 X、Y 的氧化分裂半缩醛得到 X、H 和 G 的合成关系已经证明。B 来源于另一个种（Y-47）。同样，Amphidinium 能产生 60 碳长链聚酮类聚羟基和聚烯烃类，而 Amphidinol 2、Amphidinol 4 分别分离自 *A. klebsii* 和 *A. carterae*，并且来自五种特殊聚酮类片段，由氧化和甲基化的醋酸盐衍生物合成。3,3-dimethylsulfoniopropionate 是含硫化合物，可能是其他代谢物的前体。生物合成途径从 L-甲硫氨酸（L-met）开始，其合成的酶从双鞭甲藻 *Crypthecodinium*

cohnii Seligo 分离得到，由脱羧作用得到 3-甲基硫代丙胺，依赖于磷酸吡哆醛酶——L-met 脱羧酶。同样利用^{13}C 标记醋酸盐、丁酸盐、油酸，且用去饱和酶抑制剂——氟草敏、丙基没食子酸共同研究 PUFA 二十二碳六烯酸生物合成途径，结果表明，脂肪酸的生物合成被该系统紧密调节。甲藻产生的荧光素产生自叶绿素 α 衍生物，通过光合反应生成。用 [^{15}N] Gly 和 [^{15}N] Glu 表明，*Pyrocystis lunula* Schütt 甲藻荧光素来自甘氨酸和 L-谷氨酸，叶绿素 α 为生物合成前体[41]（见图 5.6-12 所示）。

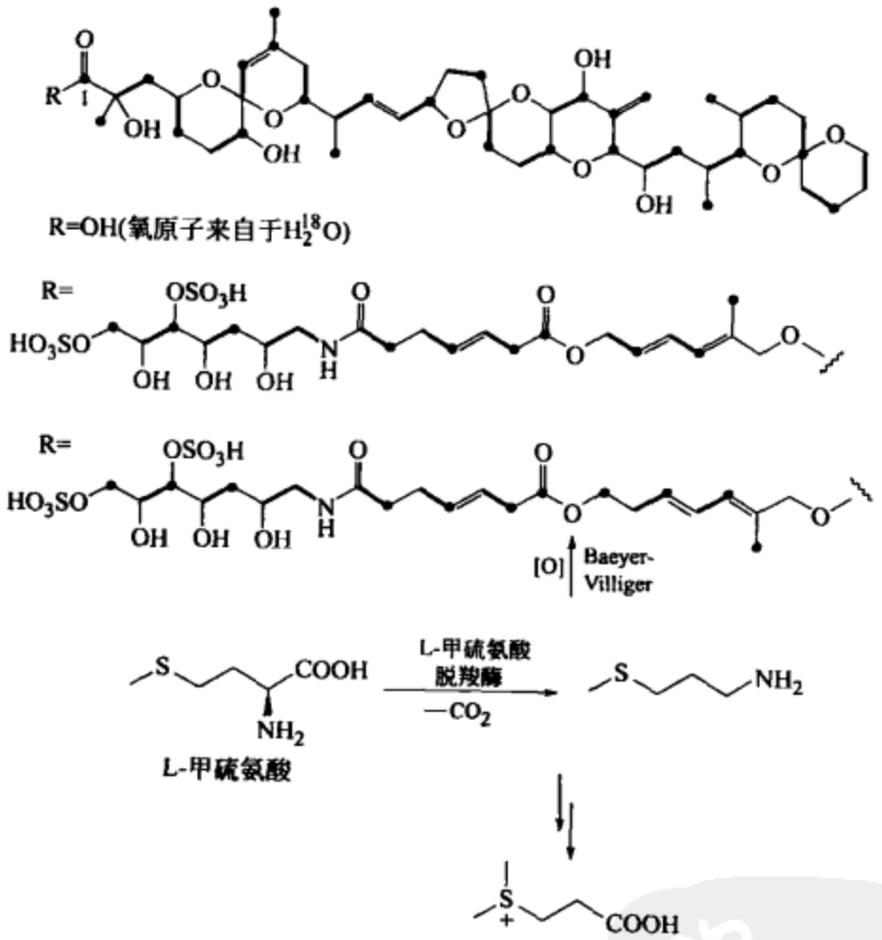


图 5.6-11　3-甲基硫代丙胺中间体合成途径

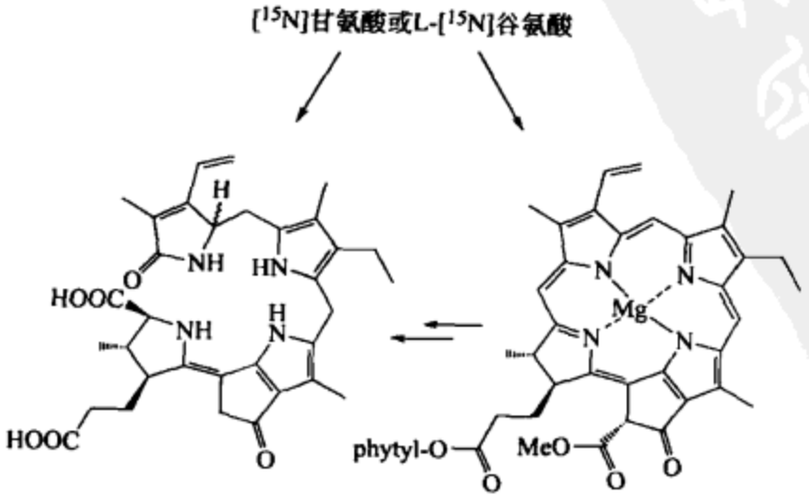


图 5.6-12　甲藻荧光素的合成途径以及原子的来源

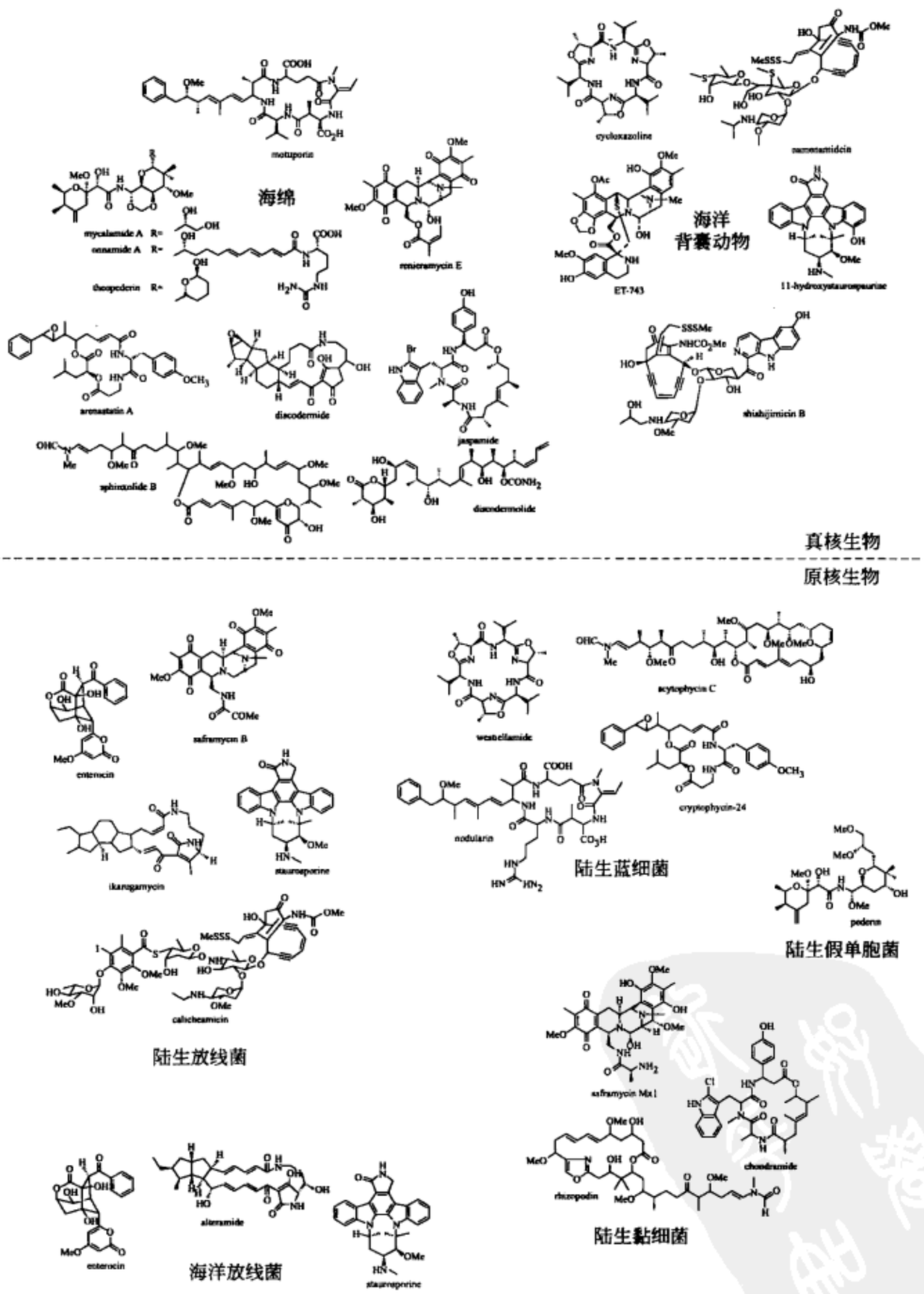


图 5.6-13　海洋天然产物和陆生微生物代谢产物的相似性

长期以来，关于海洋无脊椎动物（如海绵、海鞘、珊瑚和苔藓动物）中次生代谢物是否来源于海洋微生物的问题引起了海洋天然产物化学家的关注。许多从海洋大型生物中分离出的化合物与陆地微生物产生的代谢物相似度较高。这使得研究人员推测这些化合物是由无脊椎动物的内生菌产生的。虽然直接的证据较少，但是微生物产生的大量代谢物类似物证据大量存在。下面举例进一步说明陆地微生物和海洋微生物代谢物的系统进化和海洋生物合成的相似度。如图 5.6-13 所示，Salomon 等构建的图中化学分类树表明，海洋无脊椎动物和微生物的代谢物相似度较高，从海洋生物中得到的各种天然产物，尤其是海洋微生物的代谢产物均与陆地微生物非常相似，甚至有相同化合物的发现，如在陆生蓝细菌和海鞘中分别发现的 westiellamide 和 cycloxazoline。在一些特殊功能基团和骨架方面，二者尤为相似。例如在 calicheamicin 和 namenamicin 中的烯二炔“弹头”部分、在 saframycin B 和 ecteinascidin-743 中的异喹啉环以及 nodularin 和 motuporin 中都非常突出地表现出了其整体结构的相似性[43]。表 5.6-3 和表 5.6-4[43]分别列举了已经发现的海洋与陆地结构相似/相同的天然微生物代谢物。除此之外，在海洋中发现的天然产物如苔藓抑素（bryostatin）、软海绵酸（okadaic acid）等多种产物在陆地中并未发现相关的类似物。

表 5.6-3　近年发现的已知基因簇中陆地微生物和海洋微生物相似天然产物[43]

陆地化合物	微生物来源	合成途径	海洋相关化合物	微生物/无脊椎动物来源
十字孢碱	棍孢链霉菌	莽草酸途径	十字孢碱 11-羟基十字孢碱	海洋放线菌 海鞘 *Eudistoma clavatum* Rocha &. Bonnet
沙加霉素 Saframycin B	黄色黏球菌	NRPS 基因簇	renieramycin E ET-743	日本矶海绵 红树海鞘
隐翅虫素	隐翅虫属虎甲虫共生菌 类似于假单胞菌属	混合型 I 型 PKS 或 NRPS 基因簇	mycalamide A onnamide A theopederin	纽西兰海绵 蒂壳海绵
刺孢霉素	棘孢小单孢菌	I 型 PKS 基因簇	namenamicin shishijimicin B	斐济海鞘 海鞘 *Didemnum proliferum* Shishijima
节球藻素	铜绿微囊藻 阿氏浮丝藻	混合型 I 型 PKS 或 NRPS 基因簇	Motuporin	海绵 *Theonella swinhoei* Michael C.

表 5.6-4　已发现的海洋和陆地微生物中结构相似的化合物（未知基因簇）[43]

海洋化合物	来源(微生物/无脊椎)	合成途径(基因簇)	陆地化合物	微生物来源
Arenastatin	海绵 *Dysidea arenaria* Bergquist	混合型 I 型 PKS 或 NRPS	cryptophycin-24	念珠藻属
Alteramide discodermide	细菌 *Alteromonas haloplanktis* ZoBell 海绵 *Discodermia dissoluta* Schmidt	混合型 I 型 PKS 或 NRPS	斑鸠霉素	链霉菌属
Jaspamide	海绵 *Jaspis splendins* de Laubenfels	混合型 I 型 PKS 或 NRPS	chondramide	番红软骨霉菌
sphinxolide	海绵 *Neosiphonia superstes* Sollas	PKS	scytophycin	双歧藻属
sphinxolide	海绵 *Neosiphonia superstes* Sollas	PKS	rhizopodin	叶柄黏球菌

5.6.2.6　其他预测的海洋次生代谢物合成途径

（1）Discodermolide（盘皮海绵内酯）　该化合物对鼠白细胞有较高的抑制活性（$IC_{50}=0.5\mu g/mL$），后来发现其作为免疫抑制剂可以抑制细胞周期，使其停留在

G_2/M 期，而且它比紫杉醇结合微管的能力更强。鉴于它的这种特殊的生物学活性和手性结构，目前已经开始了对该化合物的化学合成、结构活性及其生物合成的相关研究。尽管目前合成手段已经可以满足提供临床Ⅰ期药物研究的需求，但是现代的生物学研究更倾向于用生物发酵方法大量生产，为此探究其合成基因簇及其机理就显得尤为重要。见图 5.6-14、图 5.6-15 所示，目前，已经成功利用探针推测的盘皮海绵内酯基因簇以及其生物合成途径乙酰辅酶 A 可能通过丙二酸和甲基丙二酸进行链的延长，其生物合成中特异之处在于有三个顺反异构化。异构化可能在还原 β-羰基时，由 β-酮-ACP 还原酶、脱氢或异构酶共同完成，在链延伸过程中可以生成 8,9-顺式双键，最终线形分子通过分子内环化形成 6 元酮环，最后通过末端硫酯酶结构域将其从蛋白复合体中分离。而 C-甲基转移酶和氨甲酰转移酶在内的剪切酶可能分别与 C_3 甲基化和 C_{19} 氨基甲酸酯羟化有关，9(13)环化-盘皮海绵内酯可能是通过分子内 C—C 键的 π 键环化（萜环化酶中典型存在）形成 5 元环。因为海绵 *D. dissoluta* Treitschke 内有多种微生物，需要大量质粒克隆得到所有基因组（包括海绵，推测其基因组大小约 1.7Gb），为此研究海绵基因簇难度较大。利用荧光激活细胞分类（FACS，针对光合菌）、离心过滤、密度梯度离心以及利用探针寻找相关基因簇是目前使用的常规办法。目前使用的探针包括：可用酮合酶结构域、C-甲基转移酶基因和氨甲酰转移酶探针。而氨甲酰转移酶仅在极少微生物次生代谢物合成中出现，如新生霉素、博来霉素、头霉素 C 和丝裂霉素 C。目前利用上

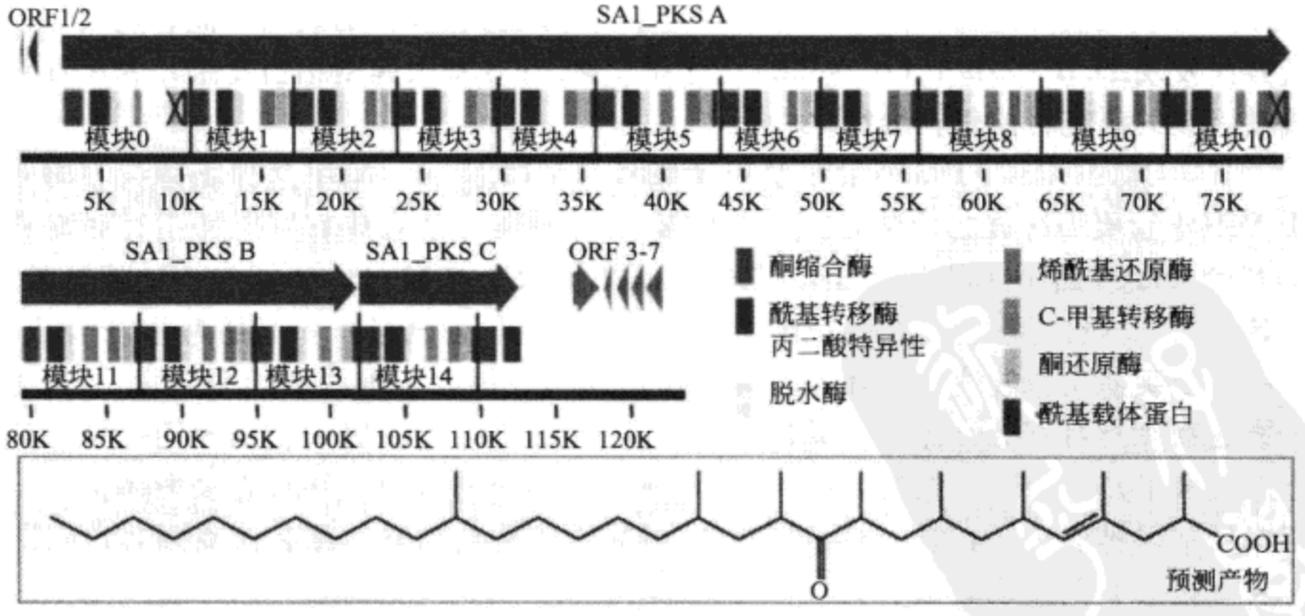


图 5.6-14　*D. dissoluta* Treitschke 的宏基因组文库中 PKS 基因簇组成（底部为预测聚酮产物，顶部为 PKS 基因编码结构域）。ORF 与其他基因的相似度为：ORF1，34% *Stigmatella aurantiaca* Schmidt 和 *D. verrucosa* Topsentde 的转移酶 MtaA（AAF19809）；ORF2，46%除虫链霉菌 SIMX4（AAK06800）；ORF3，60%鞘氨醇单胞菌属 KA1 插入序列（ATP 结合蛋白）（BAC56754）；ORF4，57%与磁螺菌 MC-1 转座酶（ZP _ 00291288）；从 ORF5 到 ORF7，42%～49%慢生根瘤菌整合酶/重组酶

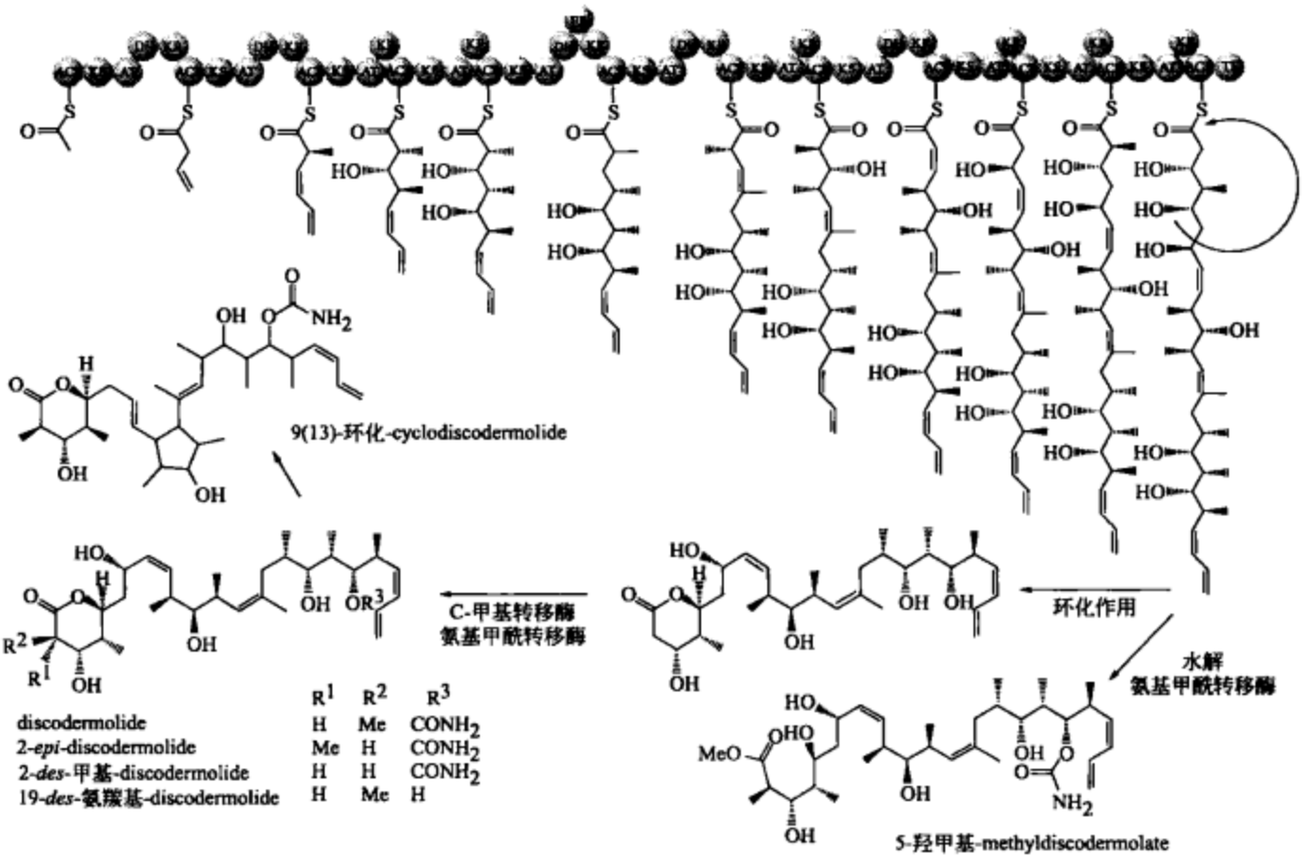


图 5.6-15　盘皮海绵内酯（Discodermolide）及其衍生物的生物合成途径

述此方法，在盘皮海绵内酯基因簇的研究中尚未取得较满意的效果，而利用宏基因组方法发现 *D. dissoluta* Treitschke 内生微生物 PKS 基因簇则相当复杂，为此针对其基因簇的研究目前仍在继续之中[44,45]。

（2）Didemnins　Didemnins 基因簇如图 5.6-16 所示，*N*-甲基亮氨酸为膜海鞘素 NRPS 肽聚酶合成起始单元。膜海鞘素 A 无侧链，这意味着侧链并不在膜海鞘素 B 的合成线路中形成。起始阶段由延伸的蛋白氨基酸（L-亮氨酸、L-脯氨酸、苏氨酸）、非蛋白氨基酸（*N*-甲基-酪氨酸、*N*-甲基-亮氨酸）和脂肪酸参与合成，并由硫酯酶催化释放硫代大环并有环化反应参与。由此可推测出膜海鞘素 A 作为修饰底物参与对侧链修饰，合成其他衍生物。对 *silico* 的研究中仍然利用探针标记方法找到了其他基因。例如，若要推测合成 A_{leu} 的基因序列，可以在染色体上、下游找到基因簇信息。如果下游序列有 *N*-甲基转移酶结构域，那么该克隆片段可能与膜海鞘素 B 的生物合成有关[44,45]。

一直以来，培养共生菌得到稳定代谢物存在很多困难。然而随着对多种微生物次生代谢产物生物合成相关基因簇的鉴定与克隆，可能将会为研究其他共生菌的更复杂代谢物建立良好的基础。如果能将已知微生物的多样性信息和靶向生物合成基因技术结合起来，就有可能为鉴定和培养多种新型并具有丰富药理活性的微生物代谢物提供有力工具。为此，从陆地系统研究中所获得的关于有机体中特殊基因信息不仅为开发天然产物多样性提供了新舞台，而且为从源头上了解生物合成提供了一个非常有益的框架。

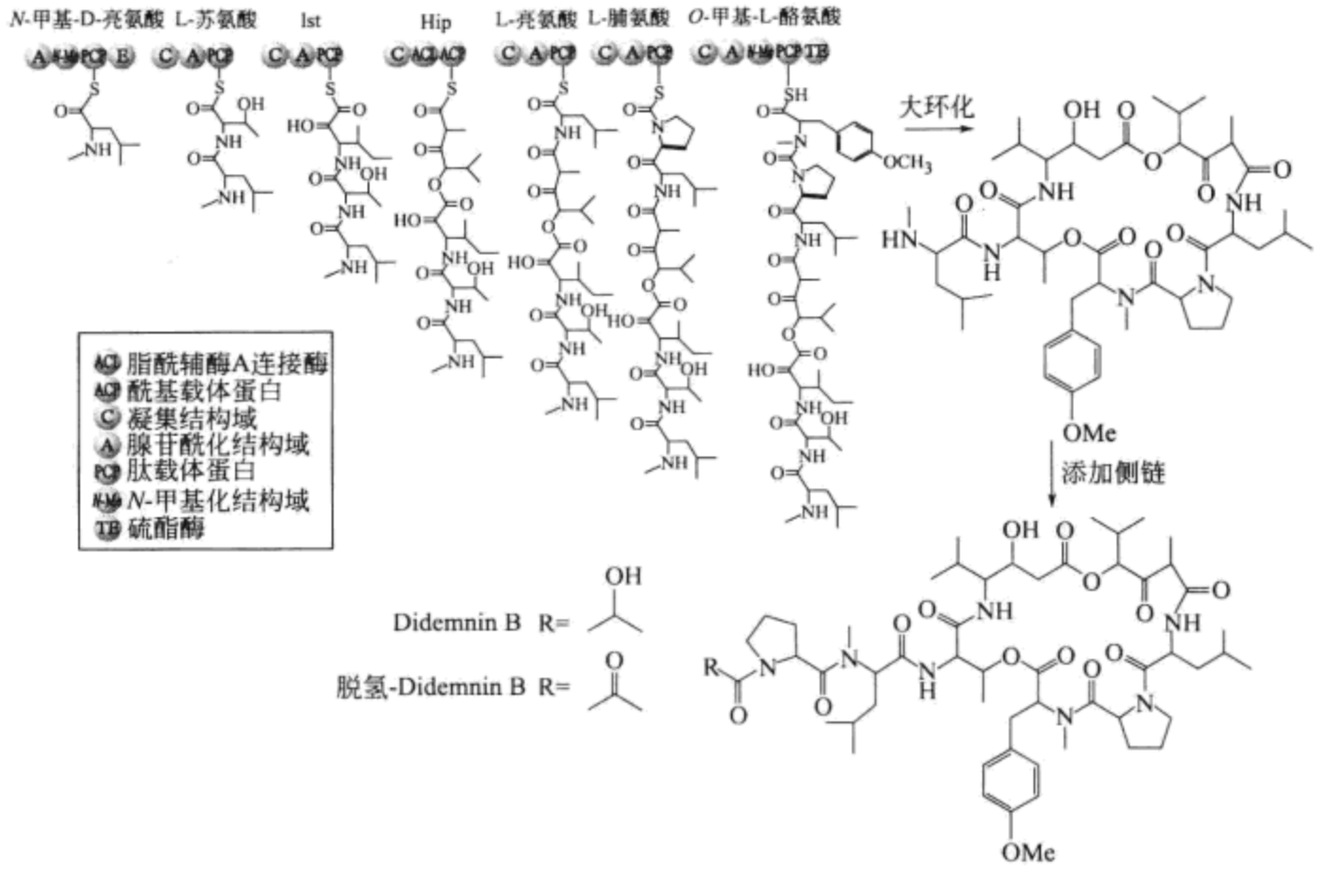


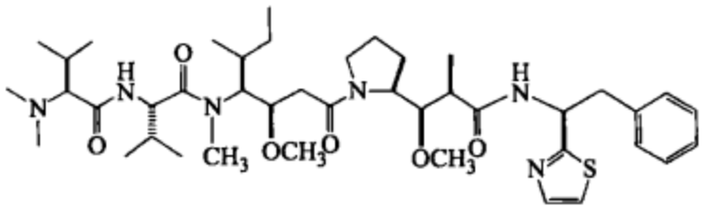
图 5.6-16　膜海鞘素（Didemnin B）的生物合成途径

5.7　海洋无脊椎动物共生菌次生代谢分离技术

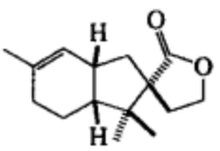
5.7.1　研究现状

过去 20 年的新药研发实践表明，海洋有机体中含有大量结构多样和高活性的天然产物。在早期的研究分析中，这些化合物被认为产生自海绵、海鞘、珊瑚、软体动物、真菌以及来自海洋沉积物中的细菌等。然而，随着研究的不断深入，发现这些“收集的产物”并不都是它们自身的代谢产物，而是由无脊椎动物将海洋细菌或蓝藻作为食物从中吸收或者代谢的结果（例如，海兔以蓝细菌为食），菌类与这些海洋无脊椎动物间的共生关系才是这些活性分子的真正来源[40]。

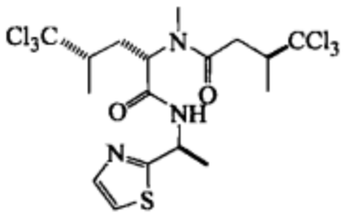
目前，如图 5.7-1 所示，已经进入临床或临床前研究的，来自海洋的 20 种天然抗癌产物中，有 15 种已经成功地从海绵、海鞘和软体动物中分离，仅有 5 种直接来自海洋微生物。而在另一方面，其中 16 种抗癌活性产物来自于共附微生物，只有 4 种来自大型生物体本身。例如，Dolastatin 10 和苔藓抑素（bryostatin）、Herbadysidolide 等均来自共附微生物。尽管许多海洋天然产物的生态作用并不为人所知，目前公认的说法认为，代谢产物的产生可能与其宿主御敌或与空间和营养的竞争有关[46]。一直以来，与无脊椎动物相关的微生物代谢产物的真实来源很难被阐明。



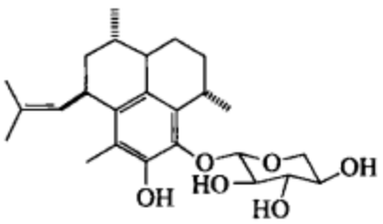
Dolastatin 10



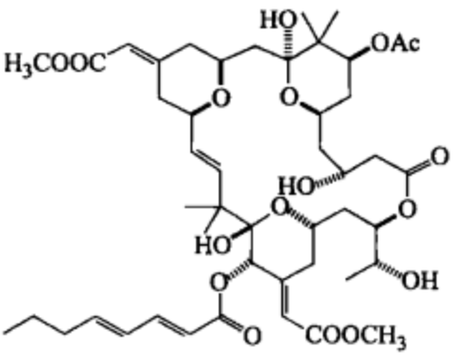
Herbadysidolide



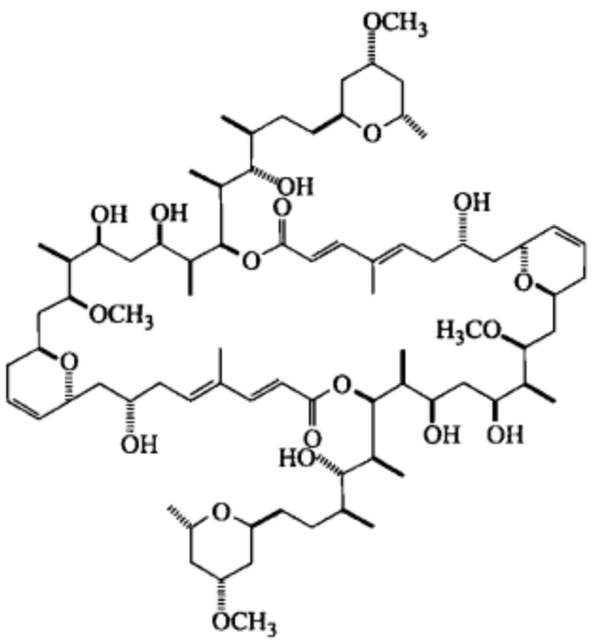
Dysidenin



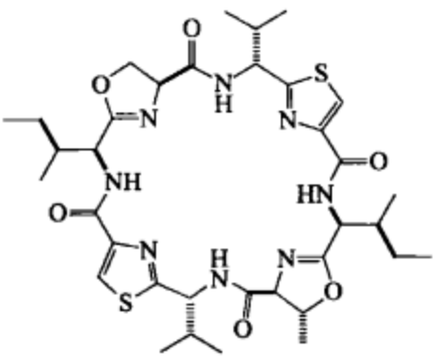
Pseudopterosin A



Bryostatin 1



Swinholide A



Patellamide A

图 5.7-1　来自共附微生物的部分次生代谢产物

近年来开始采用了一些新技术方法来研究海洋无脊椎动物和共生菌的关系。首先，微生物细胞分选新方法、细胞培养技术和化学检测已经成功应用于相关物种的分离；其次，在研究混合种群时，质谱分析技术已经成为分析产物来源的有力工具，另外，基因探针技术和酶联荧光原位杂交（catalyzed reporter deposition fluorescent in situ hybridization，CARD-FISH）技术：完成杂交后，洗去游离探针，加入荧光标记的酪胺（Tyramide）和过氧化氢，将荧光连接在有探针结合的细胞的蛋白质上，这样，一个探针可以将很多荧光分子沉积在细胞内，起到信号放大的作用。此方法比普通 FISH 更为敏感，可为从无脊椎动物相关的微生物代谢产物中鉴定活性产物提供强有力的支持。

5.7.2 海洋微生物分离方法

在分析海洋微生物混合种群中产生的重要次生代谢产物时，最简单有效的方法是分离到相关细胞类型后再分析感兴趣的化合物。然而次生代谢物从一种生物产生后，会通过同化作用被其他生物吸收。例如，在定位海鞘 *Lissoclinum patella* Gottschaldt 生成肽类化合物时，表面上看来该肽类在海鞘中大量存在，显然不会想到是由共生蓝藻 *Prochloron* sp. Lewin 代谢产生的。然而，异源表达和基因组序列分析表明，这些肽确实是由蓝细菌编码和合成的[47,48]。

海绵组织中含有大量细菌，占到生物总重量的 40%，早期通过使用福尔马林或戊二醛固定（海绵-蓝藻）组织来研究热带海绵 *Dysidea herbacea* Keller 中特殊的宿主细胞类型以及其中天然产物分布，并将组织断裂后使用流式细胞术（FACS）进行细胞的逐个分离。化学分析这些细胞类型的试验结果表明，倍半萜往往存在于海绵细胞中，而肽类则在富含氯的蓝藻中多有发现。在研究海绵 *Theonella swinhoei* Gray 的一些复杂代谢物（swinholide A 和 theopalauamide）的细胞定位时，将解剖和差速离心结合进行细胞分离，以用于化学分析。见图 5.7-2 所示，研究发现 theopalauamide 的分布在丝状菌群（与 *Beggiatoa* 相关）中存在，而 swinholide A 存在于单细胞菌群中。后来 Gerwick 等人将其进一步分离发现，由蓝细菌 *Geitlerinema* sp. Huszar 代谢产生了 swinholide A[49]。

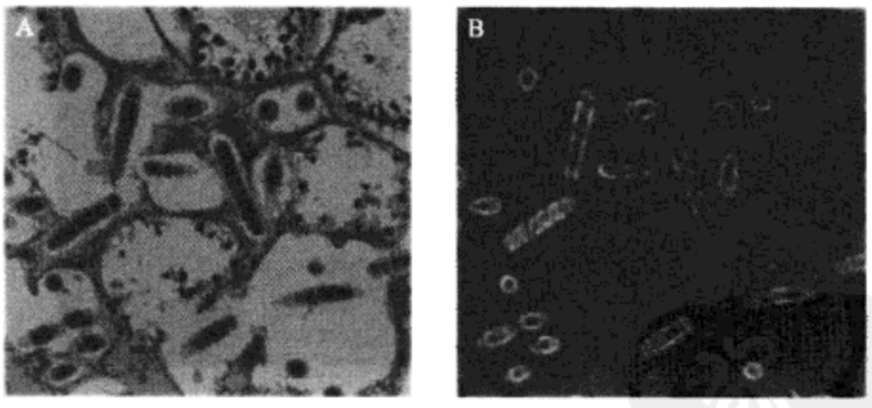


图 5.7-2 海绵组织内含蓝藻细胞的电镜图

（A）海绵 *Dysidea herbacea* Keller 交叉部分显示细胞类型组成（氧甲苯胺染色）；

（B）蓝藻细胞叶绿素自发荧光（522nm）

使用独立培养和共培养方法研究海绵相关的微生物群落已经得到广泛的应用[49]。从海绵中分离到可培养的 α-变形菌，包括 *Mycale laxissima* Duchassaing，利用 FISH 并使用荧光标记的 16S RNA 探针进行分析的结果表明，细菌多存在于海绵幼虫的体表，这意味着共生在海绵世代中存在垂直传播[50]。

最近，利用变性梯度凝胶电泳（DGGE）和 16S rRNA 也克隆成功并分析了荔枝海绵 *Tethya aurantium* Pallas 中细菌的分布情况。此研究表明屈挠细菌的新种系存在于海绵的皮层中，而且其内涵体中有聚球藻存在。使用 α-变形菌的 16S rDNA序列分析也同时发现，海绵内涵体和皮层中均有聚球藻分布[51]。

利用各种基因探测方法（FISH、PCR 筛选、印迹杂交、基因组序列分析等）已经能够鉴定（特别是从分离的细胞中）多种海洋微生物次生代谢物生物合成基因的来源。例如，Haygood 实验室的研究结果表明，在 *B. neritina*（游螺属）幼虫中含有大量的 Bryostatin（苔藓抑素）合成基因簇中的酮合酶基因[28]，对海鞘 *Lissoclinum patella* Gottschaldt 共生聚球藻基因组序列分析以及对其核糖体编码肽 patellamides A、C 分析结果表明，该基因存在于蓝细菌基因组中[47,48]。

真核甲藻普遍共生于珊瑚中，已经从柳珊瑚中发现多种甲藻的二萜类代谢产物。例如从柳珊瑚得到的抗炎萜类 pseudopterosins（伪蕨素）已经成功开发为护肤产品。目前已经用差速离心方法得到了纯度为 99%的甲藻伪蕨素，并进行了伪蕨素的生物合成的相关研究。见图 5.7-3 所示，研究发现藻类中大多含有伪蕨素 A，用 ^{14}C 标记的 CO_2 或氢同位素、氚标记的牻儿基牻儿醇焦磷酸，在 HPLC 中达到峰值与伪蕨素相符，据此，说明，甲藻与伪蕨素的生物合成密切相关[52]。直接从聚集的海洋微生物中分离目的单一微生物并不容易，而这其中，丝状蓝细菌（如巨大鞘丝藻），由于其外观菌丝宽度可达 100μm，则相对易于分离。由于其外壳菌丝有聚糖包裹，导致有大量异生菌群附着，较难除去这一点，为其分离增加了一定的多样性。

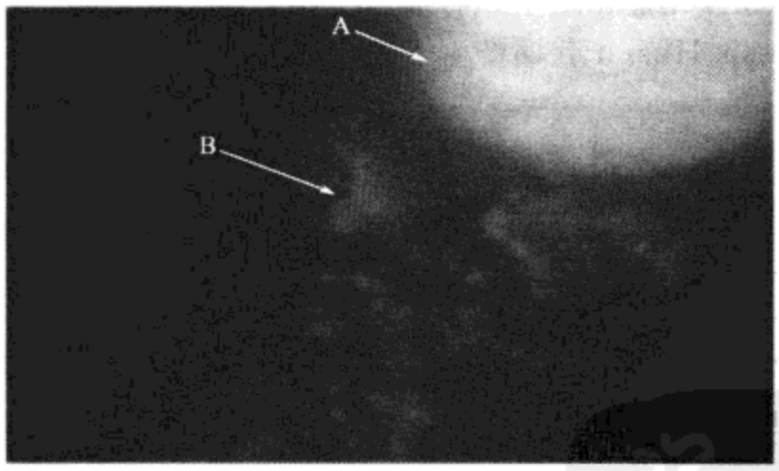


图 5.7-3　海洋蓝藻 *Lyngbya majuscula*-3L 菌丝结构。图示为用 DAPI 染色后荧光成像（×1000）：A—蓝细菌菌丝端枣红蛋白；B—与蓝藻菌丝相关的细菌 DNA

而这些异生菌群可能来自变形菌门和拟杆菌门的革兰阴性菌，其中 α-变形杆菌门包括柄杆菌、红螺菌和根瘤菌等，β-变形菌门包括产碱杆菌、假单胞菌和硫杆菌等，γ-变形菌门包括弧菌、克雷伯菌和变形杆菌等，而拟杆菌门包括拟杆菌、紫单胞菌和理研菌等[53,54]。其中一些菌群在海绵和海鞘中也有发现。而蓝藻的无菌培养极其困难，相关研究报道很少。研究调查显示，早期主要使用辐射和加入抗生素进行除菌，是否完全达到除菌效果仍然存在争议。许多寡养有机体生长十分缓慢，细胞密度低，因此在经典的生长法检测（营养依赖性检测）中可将其忽略。外壳相关细菌与报道的蓝细菌次生代谢物（或者与次生代谢物的修饰）是否相关，目前仍不能确定。



5.7.3　化学检测方法

5.7.3.1　质谱（MS）微量分析

与上述物理和遗传方法相比，化学分析方法有着显著的优势。尤其是质谱分析已经在定位特殊代谢产物的生物合成源头的研究中取得成功。使用生物标记手段，使得现代质谱分析能够使用少量样品同时还能提高精确度，这无疑加速了预分离方法的改进。离子化质谱的应用、滤器质量的提高、为提高时间尺度检测而加快的扫描速率以及其他天然产物常规检测的新技术为在超微量水平分析代谢物结构成为可能。

（1）电喷质谱分析（ESI—Electrospray ionization）和基质辅助激光解吸附质谱技术（MALDI MS）为软电离分析方法带来革命，使得质谱分析对生物分子变得灵敏。ESI分析已经成为天然产物样品的离子化最常用的方法。它能够将质谱数据与分子洗脱特性相结合。这些数据能够快速分析出样品中含有已知还是未知化合物。早期更多使用HPLC-ESI-MS技术，而现在毛细管LC-ESI-MS技术已经成为蛋白质组学中进行样品分析的有力工具。图5.7-4显示了毛细管LC-ESI-MS的作用机理，其分析所需样品量极少（$<1.0\mu g$）（反向C_{18}、C_4等），例如，William H. Gerwick检测了$0.1\mu g$蓝藻粗提物，鉴定分析其中抗癌先导化合物Iejimalide A，而在以前的分析实践中，这种大环内酯仅在日本冲绳的背囊动物中找到。鉴定分析过程中使用$100\mu m$熔融石英毛细管。10cm的C_{18}柱，颗粒为$5\mu m$。Iejimalide A分析范围做到了在皮摩尔至飞摩尔，而传统LCQ质谱联用和4.6mm直径HPLC，所需粗样品量需要$>100\mu g$，有效地提高了Iejimalide A检测灵敏度[55,56]。

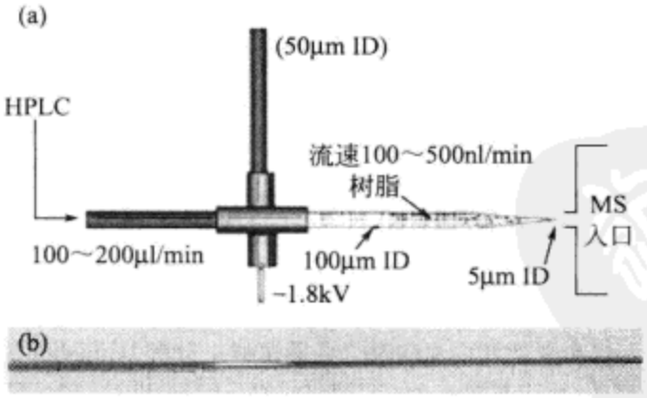


图5.7-4　(a) 毛细管LC-ESI-MS作用机理简图；(b) 少量注射后毛细管柱图片

（2）钠硫喷雾傅里叶变换-离子回旋共振质谱（FT-ICRMS）[Nanospray Fourier transform (FT)-ion cyclotron resonance MS (ICR-MS)] 高分辨MS为分析粗混合物中特殊天然产物的又一有力的分析工具。如图5.7-5所示，尽管在其分析过程中有40多种离子在m/z 675～705出现，但钠离子化的Iejimalide A特征峰出现在m/z 701.418（之前预测为m/z 701.414），很好地说明了Iejimalide A的存在[51]。虽然分离物在单光谱下显示有几百种独特的分子离子（包括羟基化Iejimalide A的类似物），Iejimalide A的成功鉴定得益于FT-ICRMS的高分辨率。应

当指出使用 FT-ICRMS 与串联质谱联用能够进一步对代谢物进行特性分析。这种对海洋蓝细菌次生代谢物“快速分析”的方法必将成为一种重要工具应用于多种海洋微生物活性代谢产物的分离。

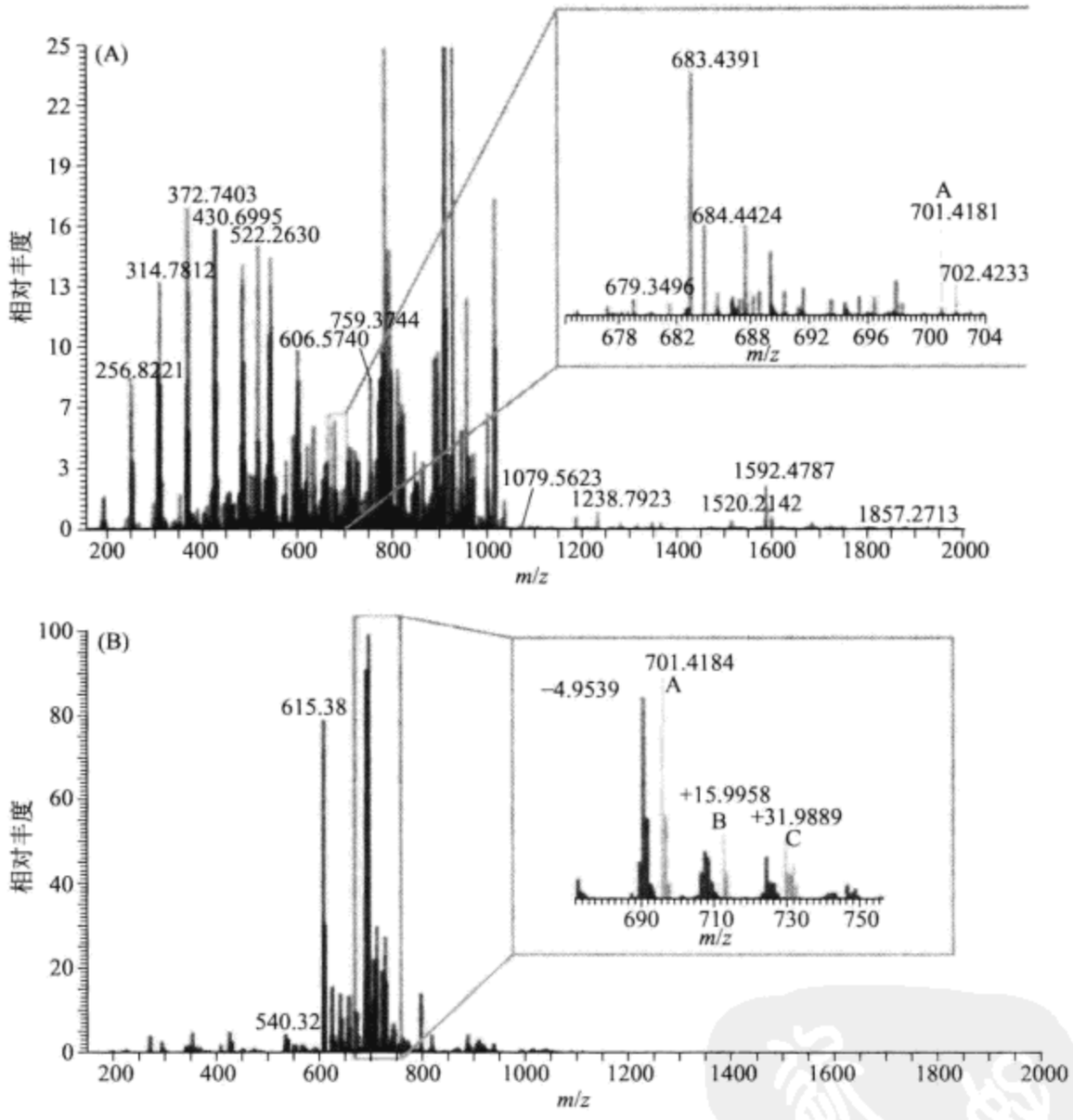


图 5.7-5 Nanospray-FT-ICRMS 分析含 Iejimalide A 样品

（A）巴布亚新几内亚的混合蓝藻菌群中分析 Iejimalide A；

（B）基化或其他氧化型 Iejimalide 衍生物标记为 B、C。Iejimalide A 为 m/z 701.418 的特征峰

（3）基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 MALDI-TOF-MS（matrix-assisted laserdesorption/ioniza tion-time-of-flight） MALDI-TOF-MS 在分析复杂的海洋生物聚集物时也是一种非常有力的工具。其对样品（单一的细胞/组织）的成功分析，已经在生物医学和天然产物应用中得到论证。例如，William 等人已经使用该技术成功地进行了海洋蓝细菌 *Microcystis* 的全克隆鉴定[57]。最近，ICM 评估了“完整细胞”MALDI-TOF 技术在海洋无脊椎动物组织（海绵）微生物多样性研究中的应用效果。研究通过“蛋白序列集合”方法可鉴定次生代谢活性物，并为已有物种提供分类学鉴定。



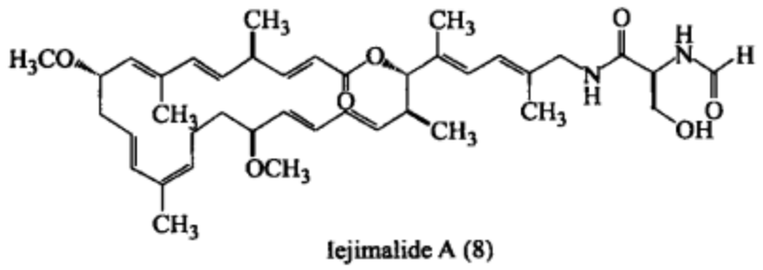
最近，研究人员扩大了 MALDI-TOF-MS 的应用，通过将其应用于海洋蓝藻的单菌丝分析来鉴定已知或新的次生代谢产物。菌丝分析可以进行特殊菌丝类型上的特异次生代谢物的定位。采用 MALDI-TOF-MS 分析新鲜的单菌丝 *Lyngbya bouillonii* Hoffmann，结果表明［已知该菌代谢生成强细胞毒素（apratoxin A）］：*m/z* 840 处有很强的 apratoxin A 准分子离子峰表明 apratoxin A（$C_{45}H_{69}N_5O_8SH$）可能是 *Lyngbya bouiuonii* Hoffmann 的代谢产物。将 MALDI-MS、ESI-FTMS、LC-ESI-MS 和 NMR 综合使用，对新型 Curacin A（10）类似物进行鉴定。除两个双键异构体 Curacins B、C 和 8-去甲基类似物 Curacin D 外，未发现其他天然类似物。前文中已经介绍了 Curacin A 的合成途径，MALDI 分析 *L. majuscula* 的单菌丝结果表明，在准分子离子峰 *m/z* 374 $[M+H]^+$，与 Curacin A 一致。另外一个峰在 *m/z* 372 $[M+H]^+$，与已知蓝藻代谢物均一致，使用 FT-ICRMS 分析发现，该菌种提取物 *m/z* 372 峰精确值为 2.015Da 低于 Curacin A，推论该分子组成为 $C_{23}H_{33}NOS$。因此，可能存在 Curacin A 的结构同系物。使用 NMR 和其他技术分离并定性了 Curacin A 的氧化发生在噻唑环，并非二氢噻唑环。早期 William H.、Gerwick 等通过半合成 Curacin A，合成其类似物 Curazole（11）。序列分析表明，氧化噻唑到二氢噻唑的氧化酶并不在 Curacin A 的基因簇中，其上下游也均未发现，由此可以推断出其氧化过程不是由专一的蛋白或蛋白结构域完成。图 5.7-6 为已经鉴定的多种活性产物结构式[57]。

直接用 MALDI 分析生物组织，如上述菌丝中 Iejimalide A 的鉴定，操作要求极高，早期进行有机提取后一般使用 NMR 和 FT-ICRMS 方法进行鉴定。MALDI-TOF-MS 从该样品进行分析并未获得化合物 8。而且分析纯的 Iejimalide A 时，MALDI-TOF 法中并未发现其离子信号。分析可能是由于化合物中缺少 N 原子。MALDI 和 ESI 具有互补性，在天然产物 Dereplication 和开发中这两种方法可共用。

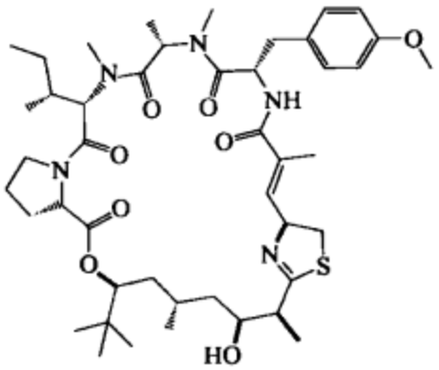
其他重要的 MS 技术起源于新型的离子化方法。改进的质量分析器、电喷雾解吸电离（DESI）、电喷射辅助激光解吸电离（ELDI）和实时直接分析（DART -Direct Analysis in Real Time）离子源技术均是制备少量样品后能直接将样品离子化的新方法。FT-质量转换器能够提供高质量且无需专门技术，这些优点使其在代谢组学中被选用。虽然上述几种方法并未在研究蓝藻天然产物中应用，但联合其他一些技术可能比现在更具优势。

5.7.4 成像技术

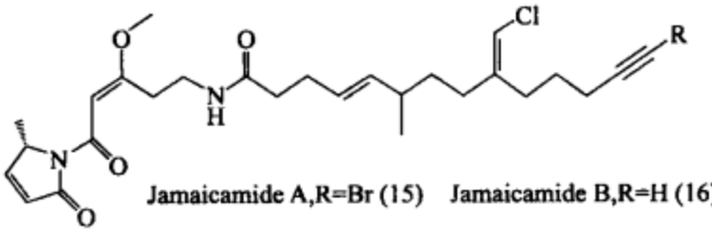
1983 年，Faulkner 及其同事使用 X 射线和透射电镜（TEM）成功地分析了海绵-微生物共生体中两种溴代谢物 Aerothionin（12）和 Homoaerothionin。虽然该实验记录中有特殊细胞（海绵小球细胞）表明溴含量有所上升，但不能表明所鉴定的溴化物确实是目标产物。后来采用落射荧光、激光扫描共聚焦显微镜和透射电镜三种方法直接成像，研究 polyaromatic alkaloid dercitamide 的分布情况取得了较好



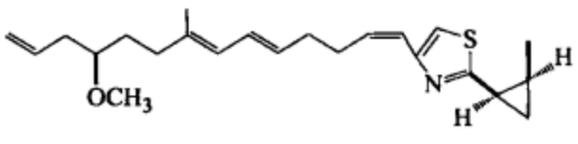
Iejimalide A (8)



Apratoxin A (9)



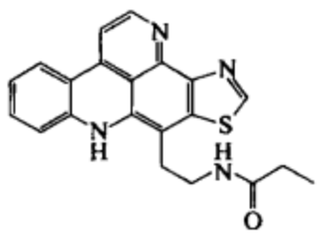
Jamaicamide A,R=Br (15)　Jamaicamide B,R=H (16)



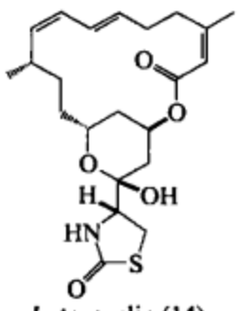
Curazole (11)



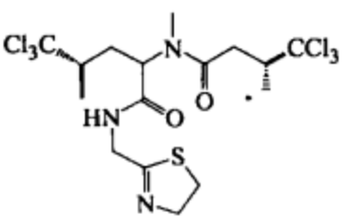
Aerothionin (12)



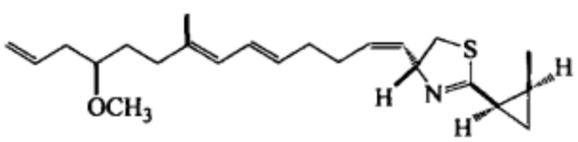
Dercitamide (13)



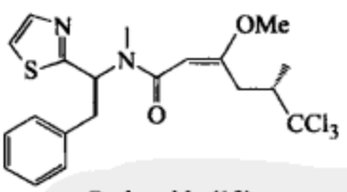
Latrunculin (14)



13-demethylisodysidenin (17)



Curacin A (10)



Barbamide (18)

图 5.7-6　经鉴定的多种活性产物结构式

的效果，但却将产物定位在海绵细胞（*Oceanapia sagittaria* Sollas）中，而和微生物无关。在此基础上，使用光镜水平的免疫金染色和 TEM 综合成像分析，才从海绵 *Negombata magnifica* Keller 中鉴定到 Latrunculin B（14）的存在，据此认为海绵细胞参与 Latrunculin B 的生物合成[40]。

（1）基质辅助激光解吸电离质谱成像技术（MALDI）　单菌丝 MALDI-TOF 分析成为直接观察新的或已知次生代谢物的有力工具。是否 MALDI-TOF 也能在研究复杂环境微生物聚集物中鉴定产生代谢物的种群？由于共同生存的菌种很难纯化培养，许多样品准备中存在假阳性，使得该技术在此方面应用受限。MALDI-TOF 成像可以完成特异细胞分子的空间精确定位。使用特异颜色（核质比），可以准确地鉴定代谢物及其种群。

① 两个巨大鞘丝藻 *Lyngbya majuscula* Gomont——JHB 和 3L（JHB 取自牙

买加共和国，3L 取自库拉索岛），使用 MALDI-TOF 成像。已知 JHB 能产生 Jamaicamide B，3L 菌种能产生 Curacin A，分别在 511 m/z 钠离子化，374 m/z 质子化，如图 5.7-7 所示，图像清楚分辨了它们包含的次生代谢物，从观察的 $^{35}Cl/^{37}Cl$ 同位素比率表明 Jamaicamide B 含氯分子离子簇[58~60]。

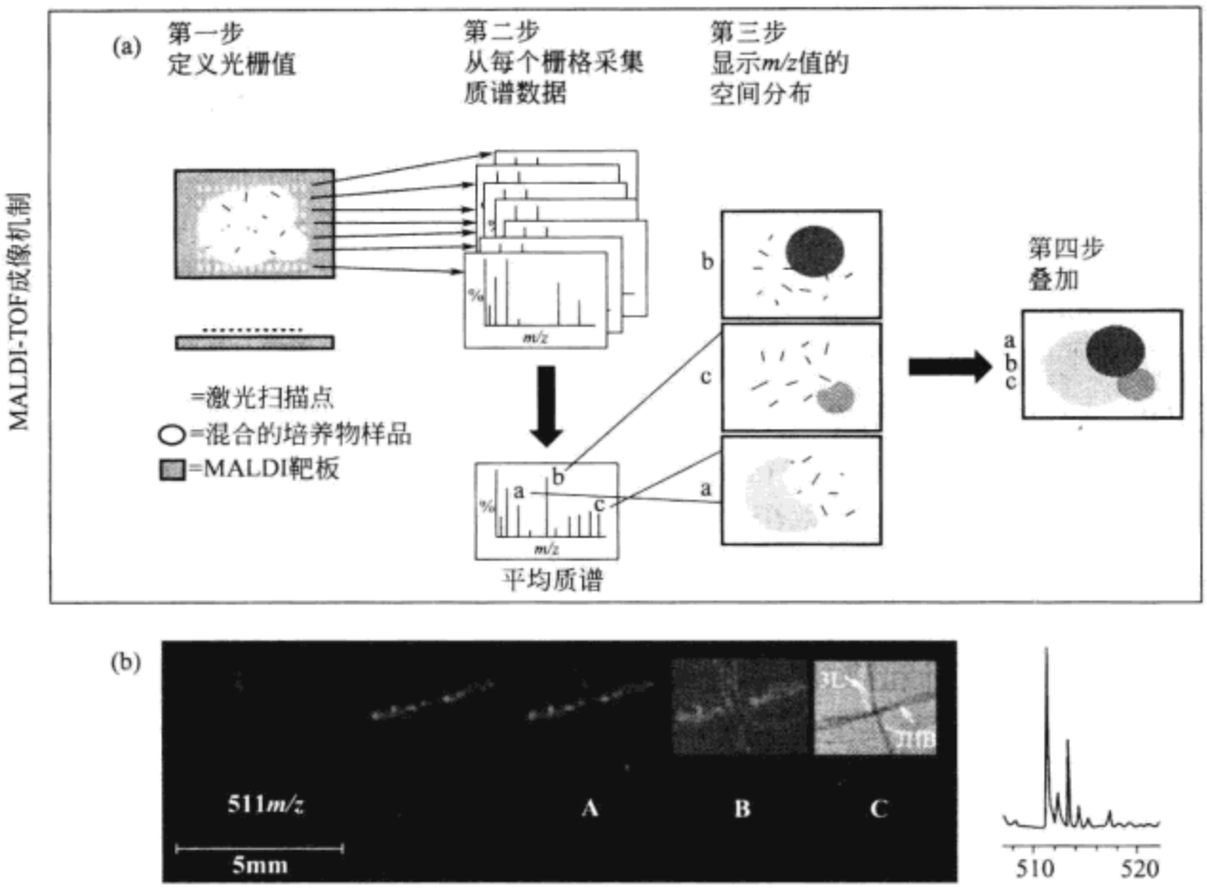


图 5.7-7　MALDI-TOF 成像显示生物组织中不同天然产物分布

(a) MALDI-TOF 成像机制；(b) 从左到右 MALDI-TOF 成像分别为质子化 Curacin A，m/z 374；Jamaicamide B，m/z 511；同时符合 m/z 374 和 511 的 MALDI-TOF 成像定位 [A]，不同时符合图 m/z 374 和 511 的 MALDI-TOF 成像定位 [B]，成像定位菌丝分别为“3L”产生 Curacin A，JHB 产生 Jamaicamide A 和 B [C]

② 海绵 *Dysidea herbaceae* Keller 中许多代谢物与蓝细菌 *Oscillatoria spongeliae* Schulze 代谢物有关。*Dysidea herbaceae* Keller 已经作为研究次生代谢物和生物合成基因簇的模型，利用荧光显微技术和 MALDI 成像技术观察低温切片中自发荧光（如图 5.7-8 B、C 所示）后使用 MALDI-TOF，于 m/z 530 下成像（如图 5.7-8 D、E、G）。结果表明，代谢产物分子与蓝细菌代谢产物——同位素簇六氯肽分子 13-demethylisodysidenin 一致，另外一个于 m/z 1028 下成像（如图 5.7-8 F、G 所示），可能是海绵基质中未知的代谢物。

MALDI-TOF 图像显示了复杂环境中次生代谢物的不同分布。MALDI 图像因为空间精确度不足而影响到它的应用，这主要是因为要求均匀基质结晶包埋。基质包埋允许晶格内的分析物进行分子扩散，限制了其空间分辨率。随着基质包埋和激光技术不断提高，预测精度可达到 7～10μm。最近技术进展中，可将结构特性和



图 5.7-8 海绵 *Dysidea herbaceae* MALDI-TOF 成像

(A) MALDI；(B) *D. herbaceae* 590nm 自发荧光；(C) *D. herbaceae* 420nm 下自发荧光；(D) MALDI，m/z 530 成像说明含有 13-demethy-lisodysidenin；(E) E=C+D 显示化合物分布；(F) MALDI 成像未知化合物，m/z 1028；(G) MALDI 成像显示两种分子不同分布 G=B+C+D+F

MALDI、FT-ICR 成像相连，LTQ 成像系统和串联质谱相容[59, 60]。

(2) 基于基因成像方法 Haygood 实验室检测了 Bryostaitin（苔藓抑素）及其衍生物的生物合成。为了确定代谢物的来源，该小组使用简并引物克隆聚酮合酶元件——酮还原酶基因，从幼虫和成虫均有发现，得到 9 种独特的 β-酮-ACP 合成酶 (KS) 序列，其中一个在幼虫中为显性。显性序列后来作为生产生物素标记的 RNA 基因探针，探针和辣根过氧化物酶系统鉴定发现，幼虫仅在外套窦的薄带中检测到，包括 γ-变形菌共生细菌 *Endobugula sertula* Lopanik。虽然就此不能得出 β-酮-ACP 合成酶在苔藓抑素生物合成中存在，但后来基因克隆表明这个可能性较大。分析显示克隆的 β-酮-ACP 合成酶与原有 KS 有 98% DNA 序列相似度。

1996 年，如图 5.7-9 所示，William H. Gerwick 等人报道 barbamide BarB1 同系物——dysB1，编码与 BarB1 类似 (93%) 氨基酸序列。dysB1 含蓝细菌特有的 16S rDNA 序列，使用 FISH 法检测海绵相关的蓝细菌共生体。用蓝细菌特有 16S rDNA 基因荧光标签，叶绿素自发荧光（如图 5.7-9 A 所示），实验中使用荧光标记 dysB1 探针，海绵中蓝藻细胞自发荧光（如图 5.7-9 B 所示）。由此证明，含蓝细菌特有的 16S rDNA 序列在蓝藻细胞而不是海绵细胞，因此，蓝藻细胞表达卤化酶 mRNA 是氯化肽段合成必需的[61]。

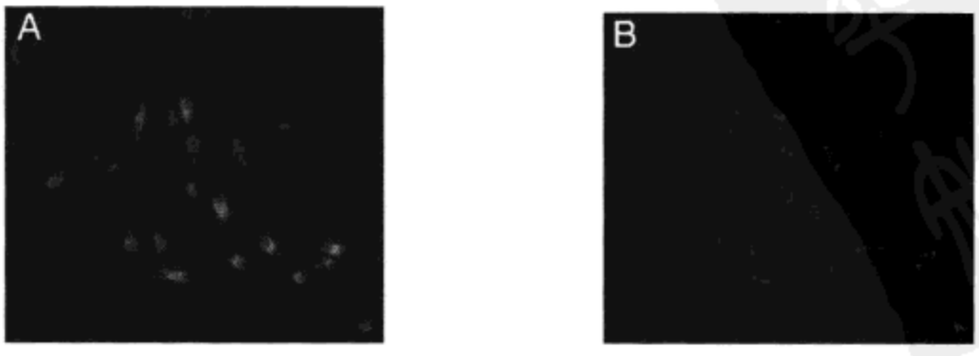


图 5.7-9 CARD-FISH 分析

(A) *Dysidea herbacea* 叶绿素自发荧光 (522nm)；(B) dybB1 互补的杂交特异性探针 (dysB1 为 barB1 生物合成基因的同系物)

5.8 展望

目前，在特异细胞中的天然产物只有在环境条件满足情况下才进行生物合成。上面介绍了早期一些分析技术，并对新型技术做了探讨。一些技术适合分析已分离的细胞，包括 HPLC、NMR 和 MS 技术。其他技术也适合样品成像，如 X-ray（X 射线衍射）、荧光显微分析技术和 MALDI 技术。然而，所有方法在提供清晰生物合成的证据上都有缺陷。理论表明，在化合物、蛋白和基因水平上分析给定细胞类型中天然产物的生物合成是能够达到的，而在化合物水平上阐明分离细胞中新的化合物合成难度较大，可能需要所列举的所有化学分析方法，以及需要更多同位素标记的先导化合物，从而在遗传水平，分离分析 DNA 或 RNA 编码生物合成酶序列可在分离的细胞中定位。虽然已经利用 CARD-FISH 法成功分析海绵/蓝细菌复合体（*Dysidea herbacea* Kelle/*Oscillatoria spongeliae* Schulze）中蓝细菌相关的代谢产物，从而揭开海鞘 *Lissoclinum patella* Gottschaldt 中的 Patellamide 合成基因，但是目前总体对海洋微生物蛋白质的生物合成了解很少，近年在蛋白水平研究的成果极少，所以从复杂的海洋环境中进行研究难度更大。然而，我们有理由相信，越来越多的生物合成途径基因簇必将通过海洋基因组和宏基因组技术进行克隆和定性[62]。而且随着更多技术的出现，对于能够培养的或收集的菌体定位全结构和推断生物学功能将会变得越来越容易。虽然目前，在海洋天然产物中已经鉴定多种代谢产物，但是是有机体次生代谢产物还是潜在的生物转化的代谢产物，除了个别例子外，大多还无法从基因水平解释，这还有待于科学的进一步发展。

参考文献

[1] John W Blunt, Brent R. Copp, Wan-Ping Hu, et al. Marine natural products. Nat Prod Rep, 2009, 26 (2): 170-244.

[2] DeLong EF, DM Karl. Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature, 2005, 437 (7057): 336-342.

[3] Watve MG, Tickoo R, Jog MM, et al. How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces? Archives of Micro-biology, 2001, 176 (5): 386-390.

[4] Fenical W, PR Jensen. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. Nat Chem Biol, 2006, 2 (12): 666-673.

[5] Ward AC, N Bora. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. Curr Opin Microbiol, 2006, 9 (3): 279-286.

[6] Udwary DW. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete Salinispora tropica. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104 (25): 10376-10381.

[7] Raghukumar C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. Fungal Diversity, 2008, (31): 19-35.

[8] Saleem M, Ali MS, Hussain S, et al. Marine natural products of fungal origin. Nat Prod Rep, 2007, 24 (5): 1142-1152.

[9] Laura Steindler, Dorothée Huchon, Adi Avni. 16S rRNA phylogeny of sponge-associated cyanobacteria.

Appl Environ Microbiol, 2005, 71 (7): 4127-4131.

[10] Harvey A L. Natural products in drug discovery. Drug Discov Today, 2008, 13 (19-20): 894-901.

[11] Simmons TL, Andrianasolo E , McPhail K, et al. Marine natural products as anticancer drugs. Molecular Cancer Therap-eutics, 2005, 4 (2): 333-342.

[12] Singh SB, F Pelaez. Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. Prog Drug Res, 2008, 65 (141): 143-174.

[13] Schloss PD, J Handelsman. Biotechnological prospects from metagenomics. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14 (3): 303-310.

[14] Cowan D. Metagenomic gene discovery: past, present and future. Trends Biotechnol, 2005, 23 (6): 321-329.

[15] Streit WR. , RA Schmitz. Metagenomics the key to the uncultured microbes. Curr Opin Microbiol, 2004, 7 (5): 492-498.

[16] Ferrer M, F Martinez-Abarca, PN Golyshin. Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. Curr Opin Biotechnol, 2005, 16 (6): 588-593.

[17] 贺纪正，张丽梅. 宏基因组学（Metagenomics）的研究现状和发展趋势. 环境科学学报，2008，28 (2): 209-217.

[18] 周通，牛蓉丽，林秀坤. 宏基因组学在海洋药物研究中的应用. Chin J Mar Drugs, 2006, 25 (2): 1-6.

[19] Baker DD, Chu M, Oza U, et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. Nat Prod Rep, 2007, 24 (6): 1225-1244.

[20] Galbraith EA, DA Antonopoulos, BA White. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. Environ Microbiol, 2004, 6 (9): 928-937.

[21] Colquhoun JA, Heald SC, Li L, et al. Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. Extremo-philes, 1998, 2 (3): 269-277.

[22] Donadio S, P Monciardini, M Sosio. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. Nat Prod Rep, 2007, 24 (5): 1073-1109.

[23] Grozdanov L, U Hentschel. An environmental genomics perspective on the diversity and function of marine sponge-associated microbiota. Curr Opin Microbiol, 2007, 10 (3): 215-220.

[24] Schirmer A, et al. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge Discodermia dissoluta. Appl Environ Microbiol, 2005, 71 (8): 4840-4849.

[25] John W Blunt, Brent R. Copp, Wan-Ping Hu, et al. Marine natural products. Nat Prod Rep, 2007, 24 (1): 31-86.

[26] John W Blunt, Brent R. Copp, Wan-Ping Hu, et al. Marine natural products. Nat Prod Rep, 2008, 25 (1): 35-94.

[27] Tim S Bugni, Chris M Ireland. Marine natural products. Nat Prod Rep, 2004, 21 (1): 1-49.

[28] John W Blunt, Brent R. Copp, Wan-Ping Hu, et al. Marine natural products. Nat Prod Rep, 2005, 22 (1): 15-61.

[29] Piganeau G, Moreau H. Screening the Sargasso Sea metagenome for data to investigate genome evolution in Ostreococcus (Prasinophyceae, Chlorophyta). Gene, 2007, 406 (1-2): 184-190.

[30] Newman DJ, Cragg GM. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. J Nat Prod, 2004, 67 (8): 1216-1238.

[31] Johnson KL, Lawen A. Rapamycin inhibits didemnin B-induced apoptosis in human HL-60 cells: Evidence for the possible involvement of FK506-binding protein 25. Immunol Cell Biol, 1999, 77

(3): 242-248.

[32] Broggini M, Marchini SV, Galliera E, et al. Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4. Leuke- mia, 2003, 17 (1): 52-59.

[33] Bai RL, Pettit GR, Hamel E. Binding of dolastatin 10 to tubulin at a distinct site for peptide antimitotic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites. J Biol Chem, 1990, 265 (28): 17141-17149.

[34] Amador ML, Jimeno J, Paz-Ares L, et al. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. Ann Oncol, 2003, 14 (11): 1607-1615.

[35] Bai R, Covell DG, Taylor GF, et al. Direct photoaffinity labeling by dolastatin 10 of the amino-terminal peptide of beta-tubulin containing cysteine 12. J Biol Chem, 2004, 279 (29): 30731-30740.

[36] Zewail-Foote M, Hurley LH. Ecteinascidin 743: A minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. J Med Chem, 1999, 42 (14): 2493-2497.

[37] Prudhomme J, McDaniel E, Ponts N, et al. Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. PLoS One, 2008, 3 (6): e2335.

[38] Moore BS, Kalaitzis JA, Xiang L. Exploiting marine actinomycete biosynthetic pathways for drug discovery. Antonie Van Leeuwenhoek, 2005, 87 (1): 49-57.

[39] Moore BS. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms (Part A). Nat Prod Rep, 2005, 22 (5): 580-593.

[40] Sudek S, Lopanik NB, Waggoner LE, et al. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from " Candidatus Endobugula sertula", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan Bugula neritina. J Nat Prod, 2007, 70 (1): 67-74.

[41] Ramaswamy A. The secondary metabolites and biosynthetic gene clusters of marine cyanobacteria. Applications in biotechnology. Frontiers in marine biotechnology. Horizon Bioscience, Norfolk, 2006: 175-224.

[42] Chang Z, Sitachitta N, Rossi JV, et al. Biosynthetic Pathway and Gene Cluster Analysis of Curacin A, an Antitubulin Natural Product from the Tropical Marine Cyanobacterium Lyngbya majuscula. J Nat Prod, 2004, 67 (8): 1356-1367.

[43] Christine E. S, Nathan A. M, David HS. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. Natural Product Reports , 2004, 21 (1): 105-112.

[44] Gallimore AR. The biosynthesis of polyketide-derived polycyclic ethers. Nat Prod Rep, 2009, 26 (2): 266-280.

[45] Kopp F, Marahiel MA. Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. Nat Prod Rep, 2007, 24 (4): 735-749.

[46] Paul VJ, Puglisi MP, Ritson-Williams R. Marine chemical ecology. Nat Prod Rep, 2006, 23 (2): 153-180.

[47] Schmidt EW, Nelson JT, Rasko DA, et al. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in Prochloron didemni, the cyanobacterial symbiont of Lissoclinum patella. Proc Natl Acad SciUSA, 2005, 102 (20): 7315-7320.

[48] Milne BF, Long PF, Starcevic A, et al. Spontaneity in the patellamide biosynthetic pathway. Org Biomol Chem, 2006, 4 (4): 631-638.

[49] Andrianasolo EH, Gross H, Goeger D, et al. Isolation of swinholide A and related glycosylated derivatives from two field collections of marine cyanobacteria. Org Lett, 2005, 7 (7): 1375-1378.

[50] Piel J. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuti-

cals. Curr Med Chem, 2006, 13 (1): 39-50.

[51] Feng X, Siegel MM. FTICR-MS applications for the structure determination of natural products. Anal Bioanal Chem, 2007, 389 (5): 1341-1363.

[52] Coleman A, Kerr R. Radioactivity-guided isolation and characterization of the bicyclic pseudopterosin diterpene cyclase product from Pseudopterogorgia elisabethae. Tetrahedron, 2000, 56 (49): 9569-9574.

[53] Zehr JP, Mellon M, Braun S, et al. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. Appl Environ Microbiol, 1995, 61 (7): 2527-2532.

[54] Paerl H, Carr NG, Whitton BA. The biology of cyanobacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982.

[55] Nozawa K, Tsuda M, Ishiyama H, et al. Absolute stereochemistry and antitumor activity of iejimalides. Bioorg Med Chem, 2006, 14 (4): 1063-1067.

[56] Kobayashi J, Cheng J, Nakamura H, et al. Ascididemin, a novel pentacyclic aromatic alkaloid with potent antileukemic activity from the Okinawan tunicate *didemnum* sp. Tetrahedron letters, 1988, 29 (10): 1177-1180.

[57] Welker M, Brunke M, Preussel K, et al. Diversity and distribution of Microcystis (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. Microbiology, 2004: 1785-1796.

[58] Dieckmann R, Graeber I, Kaesler I, et al. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67 (4): 539-548.

[59] Taban IM, Altelaar AF, van der Burgt YE, et al. Imaging of peptides in the rat brain using MALDI-FTICR mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom, 2007, 18 (1): 145-151.

[60] Verhaert PD, Maria TM, Pekar KM. Neuropeptide imaging on an LTQ with vMALDI source: The complete 'all-in-one' pepti-dome analysis. Int J Mass Spectrom, 2007, 260 (2-3): 177-184.

[61] Simmons TL, Coates RC, Clark BR, et al. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism- invertebrate assemblages. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (12): 4587-4594.

[62] John WB, Brent RC, Murray HG, et al. Marine natural products. Nat. Prod. Rep, 2010, (27): 165-237.

第6章 微生物浸出技术在中药创新研究中的应用

随着微生物在中药发酵、珍稀药用植物的纯培养、稀有天然产物的转化等方面研究的深入，微生物与中药创新研究的关系日趋密切。微生物有着非常强大的分解转化物质的能力，并能产生丰富的次生代谢产物，通过微生物的生长代谢和生命活动来炮制中药，可以比一般的物理或化学的炮制手段更大幅度地改变药性，提高疗效，降低毒副作用，扩大适应证。而现在运用的微生物转化的方法只适用于植物、动物类药材。对于矿物质中药来讲，普通的微生物发酵和转化技术应用效果并不理想，寻找有效的微生物技术，解决矿物质中药的炮制问题一直是中药创新研究中需要迫切解决的问题。微生物提取矿物药物的技术是在继承中药炮制学发酵法的基础上，吸取了微生物浸出技术在冶金领域研究成果，结合现代生物工程的浸出技术而形成的高科技中药制药新技术，是以优选的浸矿微生物中的一种或几种、细菌作为菌种，加入中药提取液中，再按照现代炮制工艺制成产品，它是一种含有中药活性成分、菌体及其代谢产物的全组分炮制液的新型中药发酵加工制剂。

6.1 微生物浸出的概念

近年来，一种特殊的微生物技术正在广泛的兴起，即利用微生物从废弃的、贫乏的金属硫化矿中提取回收贵金属的技术，这种技术也称为湿法冶金技术，已广泛地应用于环境学、地理化学、地质学、化学工程、矿物学、生物技术、矿物工程、湿法冶金等多个学科。如图 6.1-1 所示，通过细菌的生物氧化和代谢活动从不溶解的硫化矿或者氧化物中浸出各种金属离子的技术称为生物浸出（bioleaching）。即利用微生物的促进作用将固态的各种金属从金属硫化矿中，转变成为水溶性的金属硫酸盐，进而回收溶液中的目标金属化合物。

根据回收金属的种类不同，又把这种浸出技术分为直接浸出技术和间接浸出技术。直接浸出技术主要是指，从细菌作用后的浸出溶液中直接回收金属的技术，这

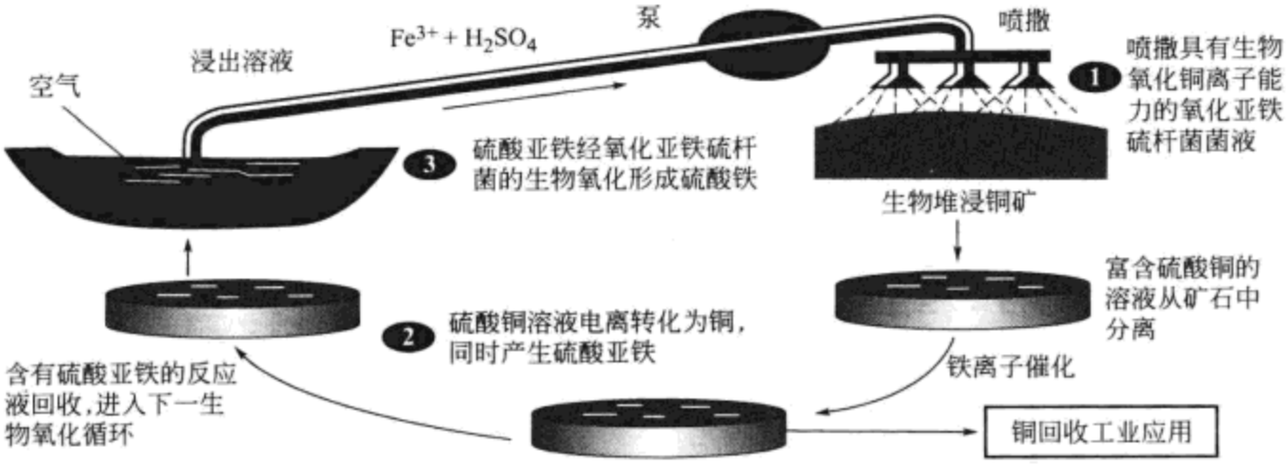


图 6.1-1　微生物湿法冶金工艺简略示意图

些金属元素包括铜、钴、锌、镍、钼和锰等。相反，对于一些贵金属的回收来说，浸出的主要目的是从含这些贵金属的硫化矿中去除不需要的难溶解的硫化物，然后对剩余的矿石进行氰化处理，进一步回收不溶解的贵金属，因此这种技术称为间接浸出也成为生物氧化（bioxidation）。这种技术，工艺简单、投资成本低、不污染环境、经济效益显著，因而在世界冶金业得到广泛推崇。目前世界铜产量的 30% 已来自微生物冶金技术。

6.1.1　微生物浸出炮制中药概念的提出

早在千余年前，我国已开始用微生物发酵的方法制药，中药发酵的目的主要为改变药物原有性能，产生新的治疗作用；或增强原有疗效的治疗作用，扩大用药品种。由于其疗效确切，至今对六神曲、半夏曲和淡豆豉等仍在进行微生物发酵工艺改进研究，并取得了相应成绩。从某种意义上说，采用微生物对中药进行炮制，同样可以起到减毒增效的作用。然而，由于菌种和采用的炮制方法的限制，微生物炮制的应用有相当的局限，分析其中的原因可能有以下几个方面：①由于能够采用炮制的微生物种类仅仅限于真菌、霉菌、杆菌等，现行的微生物炮制工艺形式，只有单一的、传统的类似于食品发酵的一种形式，而且长期以来缺乏系统的、符合现代技术的科学体系去系统地拓展更多的微生物资源，因而微生物炮制的应用范围受到一定的限制。②中药应用源远流长，我国东汉时期的《神农本草经》就已经载药 365 种（植物药 252 种、动物药 67 种、矿物药 46 种），虽然，随着科学技术的应用，在中药研究中先后引入了能够产生特定的水解、羟化、氧化、还原等代谢酶的微生物，通过发酵、转化、代谢等方式在中药创新研究中得到了一定的拓展和应用，但是值得提出的是，目前应用的微生物也同样存在一定的局限性，一些真菌、霉菌、杆菌等只适用于一些具有特定的活性位点的药用植物，而临床应用的一些动物药、特别是矿物药仍缺乏有效的微生物炮制方法。③近年来，许多国家制定了严格的重金属限量标准，限制我国一系列含矿物中药和中成药出口，其中不乏一些我国著名的出口创汇中成药品种，如安宫牛黄丸、牛黄解毒片、大活络丹等，这一迫

切形式，急需我们寻找有效的炮制方法，解决制约矿物中药应用的瓶颈问题——服用大剂量“粗、大、黑”的矿物原粉，导致体内重金属蓄积而引发中毒、甚至造成病人临床死亡的严重现象。而解决这一问题的实质要从两方面考虑：其一与现代科学技术结合寻找有效的增效、减毒的炮制方法；其二对其毒性、药效和关系以及在中药组方中配伍关系重新评价。反观目前的矿物中药炮制方法，仍然沿用传统的水飞、酸碱炮制等方法，这些方法虽然已经使用多年，但由于炮制后临床使用的仍旧是粗糙的矿粉，因而难于解决大剂量服用引发的毒性问题。近年来国内外学者结合物理、材料和化学等学科技术对矿物中药进行微分化、纳米化或微射流技术处理得到一些粒径很小的药物混悬溶液，在提高药效和生物利用度方面取得了一些进展，但由于是混悬形式入药，仍存在着制剂形式单一、服用不便和毒性仍然较大的问题，加之这些工艺的处理需要大型、昂贵的仪器，普及使用仍有相当的局限。

通过上述系统分析我们指出，应用现代先进微生物炮制技术完全有可能解决上述弊端，其中的理论思想依据来自于冶金业广为推崇的微生物氧化（代谢）技术，利用一些特殊的浸矿用嗜酸性微生物（海洋微生物），通过这些微生物特殊的生物氧化或代谢的促进作用，促进这些难溶矿物中药的溶解、转化或代谢作用，产生具有活性增强和或毒性降低的溶液组分，拓宽这些药物的制剂范围，在提高药效、减低毒性的同时，对其配伍、炮制机理进行系统研究，诠释药效、毒性和活性之间的关系，揭示其复方配伍机理，这无疑将是有意义的工作。该技术成本低廉，工艺简单，对人体和环境无害。以下从其应用的原理和技术方法做一详述。

6.1.2 微生物浸出矿物中药的原理

微生物对中药的浸出过程是一个复杂的过程，它包括对中药的生物氧化、代谢、溶解等一系列生物反应，决定这一过程的因素很多，但是其中起到决定作用的有三个方面：①微生物的种类；②微生物作用的机理；③微生物与药物是否具有一定的相互作用或利用关系，药物在研究中遇到的难题，考虑到用微生物方法去解决时，对选择的微生物是否符合药物作用原理就显得尤为重要。本章仅以矿物中药为例，将适合其生物浸出和代谢的微生物做一详述。

6.1.2.1 浸出矿物中药的微生物种类[1]

（1）生物氧化作用的微生物　最经典的依靠生物氧化达到生物浸出作用的就是嗜酸微生物，这类微生物来自我们常见的矿上废弃物的矿水中，一般称为酸矿废水（acid mine drainage，AMD 或者 acid rockdrainage，ARD）。在许多硫化矿含量中，往往伴生铁元素。在有氧气和水的情况下，硫化矿以分子氧和高价 Fe^{3+} 作为电子受体开始自发的非生物作用的氧化。在一些无机化能自养细菌的作用下，可将亚铁离子 Fe^{2+} 再次氧化为高铁离子 Fe^{3+}，以多个数量级的倍数（约 10^4）加速了这个反应的速度。同时一些细菌可以氧化分解硫代硫酸盐、硫单质以及各种还原态的无机硫化合物，同时产生了大量的硫酸，使所处的环境强烈酸化。因此产生的 AMD 不仅有很强的酸度，而且含有各种高浓度的金属离子，如铜（Cu^{2+}）、镍（Ni^{2+}）、

钴（Co^{2+}）、镁（Mg^{2+}）、砷（As^{3+}）、砷（As^{5+}）、汞（Hg^{2+}）；生存在这种环境下的微生物，将其称为嗜酸菌，它是微生物浸出的主要菌种，也是微生物冶金实践中应用最广泛的一类细菌。

根据嗜酸菌生物氧化作用和氧化产物的不同，如表 6.1-1 所示，又可以将其分为铁氧化微生物、硫氧化微生物、硫铁氧化微生物、铁还原微生物等，这其中应用最广泛的有氧化亚铁硫杆菌（*Thiobacillus ferrooxidans* Leathen and Braley）、氧化硫硫杆菌（*Thiobacillus thiooxidans* Waksman et Jofe）、氧化亚铁钩端螺旋菌（*Leptospirilum ferrooxidans* ex Markosyan），它们可以分别氧化铁和或硫元素，也是生物氧化中最典型的菌种。

表 6.1-1　生物浸出的微生物

类　别	原核生物	生存温度	营养类型	系统学归属
铁氧化微生物	氧化亚铁钩端螺旋菌	嗜中温微生物	专性需氧微生物	硝化螺菌属
	氧化亚铁钩端螺旋菌	嗜热微生物	专性需氧微生物	硝化螺菌属
	嗜热铁氧化钩端螺旋菌	嗜热微生物	专性需氧微生物	硝化螺菌属
	固氮氧化亚铁钩端螺旋菌	嗜热微生物	专性需氧微生物	硝化螺菌属
	嗜酸氧化亚铁硫杆菌 m-1	嗜中温微生物	专性需氧微生物	β-变形菌门
	嗜酸铁氧化硫杆菌	嗜中温微生物	异养微生物	—
	嗜酸自养亚铁氧化硫杆菌	嗜中温微生物	—	热源体属
硫氧化微生物	氧化硫硫杆菌	嗜中温微生物	专性需氧微生物	γ-变形菌门
	嗜酸硫杆菌	嗜热微生物	混合营养微生物	γ-变形菌门
	铜氧杆菌	嗜中温微生物	混合营养微生物	β-变形菌门
	嗜酸氢杆菌	嗜热微生物	—	—
	金属球菌	嗜高温微生物	混合营养微生物	硫化叶菌目
	硫化叶菌	嗜高温微生物	混合营养微生物	硫化叶菌目
硫、铁氧化微生物	嗜酸氧化亚铁硫杆菌	嗜中温微生物	专性需氧微生物	γ-变形菌门
	嗜酸菌	嗜热微生物	混合营养微生物	硫化叶菌目
	金属硫化叶菌	嗜热微生物	混合营养微生物	硫化叶菌目
铁还原微生物	嗜酸菌	嗜中温微生物	异养微生物	α-变形菌门
	嗜温、嗜酸氧化亚铁硫杆菌	嗜中温微生物	混合营养微生物	放线菌门
铁的氧化与还原、硫的氧化相关微生物	嗜酸硫杆菌	嗜中温微生物	混合营养微生物	低 G+C 含量革兰阳性菌
其他嗜酸微生物	酸胞菌	嗜中温微生物	异养微生物	α-变形菌门
	酸球性菌	嗜中温微生物	异养微生物	α-变形菌门
	甲醇醋杆菌	嗜中温微生物	异养微生物	乳杆菌属
	环脂酸芽孢杆菌	嗜中温微生物	异养微生物	低 G+C 含量革兰阳性菌
	热原体细菌	嗜热微生物	异养微生物	热源体属

① 氧化亚铁硫杆菌。氧化亚铁硫杆菌是一种硫杆菌，属化能自养，嗜酸，专性好氧，革兰染色阳性，以亚铁和硫为其能源物质，是目前生物湿法冶金中应用最广的一个菌种。它的特点就是氧化亚铁离子 Fe^{2+} 为高铁离子 Fe^{3+} 而获得能量，还可以氧化硫化矿物、元素硫以及还原性硫化物，如硫代硫酸盐。研究表明，在缺氧的状态下，氧化亚铁硫杆菌能够以高铁离子 Fe^{3+} 作为最终电子受体而厌氧生长。最适生长温度 28～30℃，最高生长温度约 37～40℃，最适 pH2.5，最低 pH1.3～1.5。此外这种细菌非常耐受各种有毒的金属离子，如银（Ag^{+}）、汞（Hg^{2+}）、金（Au^{+}）、砷（As^{3+}），有报道指出氧化亚铁硫杆菌耐受 As^{3+} 的浓度可以达到 18μg/ml，在生物冶金工业中常将该菌用于毒砂（主要含量砷 As^{3+} 或砷 As^{5+}）含量很高的金矿的生物浸出。

② 氧化硫硫杆菌。氧化硫硫杆菌不能氧化亚铁离子，但是其具有硫氧化酶和亚硫酸盐氧化酶系统能够把还原态的硫化物和单质硫最终氧化为硫酸而释放出 H^{+}，使氧化硫硫杆菌的生长环境呈强酸性，从而使矿物溶解而浸出。氧化硫硫杆菌生理上非常类似于氧化亚铁硫杆菌，但不能够氧化亚铁离子 Fe^{2+} 作为能源而生长，其上限生长温度一般为 35℃，但其与后者相比更耐酸，生长范围在 pH0.5～5.5，最适生长范围 pH2～3。这种菌对各种金属离子也有一定的耐受作用，但是其对有毒金属离子的耐受要比氧化亚铁硫杆菌作用弱。研究认为，氧化硫硫杆菌和氧化亚铁硫杆菌混合作用，氧化硫硫杆菌往往能增强氧化亚铁硫杆菌的生物浸出作用，这一特点可能和氧化硫硫杆菌能加速硫元素的氧化，进而间接促进氧化亚铁硫杆菌对硫化矿的生物氧化有关，氧化硫硫杆菌的这一特点，也决定它在生物浸出过程中起到的促进作用。

③ 氧化亚铁钩端螺旋菌。氧化亚铁钩端螺旋菌与上述两种菌相比，它只能氧化溶液中的亚铁离子，对元素硫及硫化矿物无氧化作用，但可以和其他的菌混合培养，改善浸矿能力。本菌革兰阴性，耐酸（最适 pH1.5～1.8），完全的化能无机自养，以亚铁离子 Fe^{2+} 作为唯一的电子供体而获能生长，但不能氧化单质硫。氧化亚铁钩端螺旋菌对亚铁离子 Fe^{2+} 有较高的亲和性，不容易被氧化产物高铁离子 Fe^{3+} 抑制，而且在常温 30℃、亚铁离子 Fe^{2+} 以及 pH 值大于 2.0 的环境中，氧化亚铁硫杆菌为优势菌种，而在常温 30℃、亚铁离子 Fe^{2+} 以及 pH 值小于 1.5 的环境中，氧化亚铁钩端螺旋菌为优势菌种。为此，根据嗜酸菌各自的不同特点和生存环境差异，在实际应用中往往混合使用，协同发挥生物浸出的作用。

（2）具有生物代谢或氧化作用的微生物　通过生物浸出作用，可以大大提高矿物中药的溶解度，但是如果溶出或溶解的是有毒元素比如雄黄（砷）、朱砂（铜）、自然铜（铜）等，就要充分考虑到控制有毒元素含量。虽然目前除去溶液中过量有害元素的物理或化学方法很多，可以考虑使用膜透析法、分布沉淀法、电化学等方法，但是常规的化学方法在除去有害元素的同时，大量的有益元素同时被除去，这样就违背了通过微生物技术产生更多有益的活性成分、减毒增效的初衷。研究微生物炮制中药的目的在于：第一，经济、方便、易于普及；第二，要在保留其原有活性的基础上减毒、增效。为此，通过微生物技术，炮制矿物中药将是一个非常有意

义的思路和方法。这个全新的思路和方法来自于对自然界和人体砷元素的代谢的启示。如图 6.1-2 所示，目前认为自然界有毒元素砷的代谢脱毒生态循环一共有两条途径：①利用微生物代谢产生的特殊还原酶的形式，将有毒元素直接还原成更易于生物体排泄的价态（五价砷 As^{V} → 三价砷 $As^{Ⅲ}$）；②利用微生物特有的甲基化能力，直接将某些有毒元素转化成毒性较小的甲基化合物价态（三价砷 $As^{Ⅲ}$ → 五价砷 As^{V} → 五价甲基砷酸 MMA^{V} → 五价二甲基砷酸 DMA^{V}）。

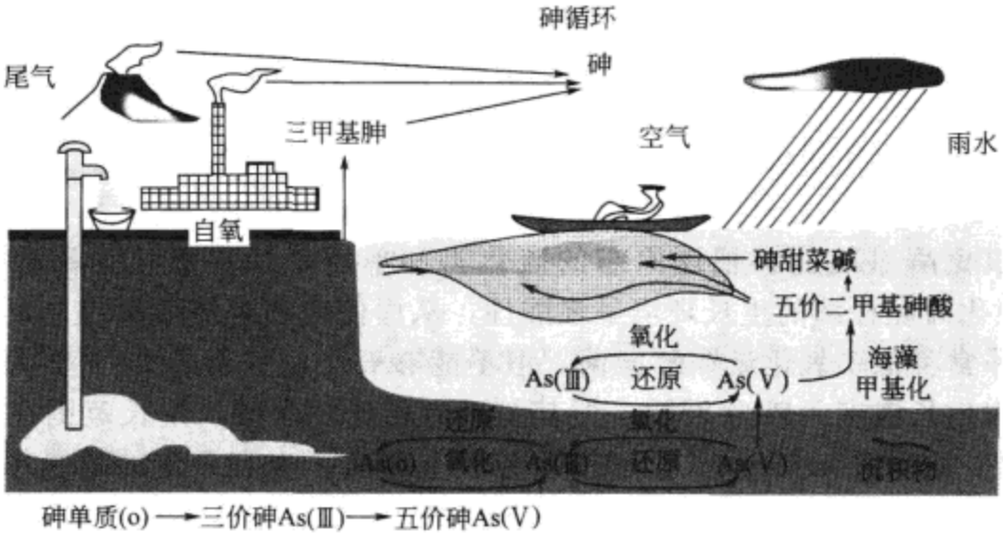


图 6.1-2　砷的生物循环

具有氧化或代谢能力的微生物比较复杂，氧化每一种元素的微生物种类可能是不同的，如图 6.1-3 所示，在此，仅以砷元素为例，介绍三类微生物。

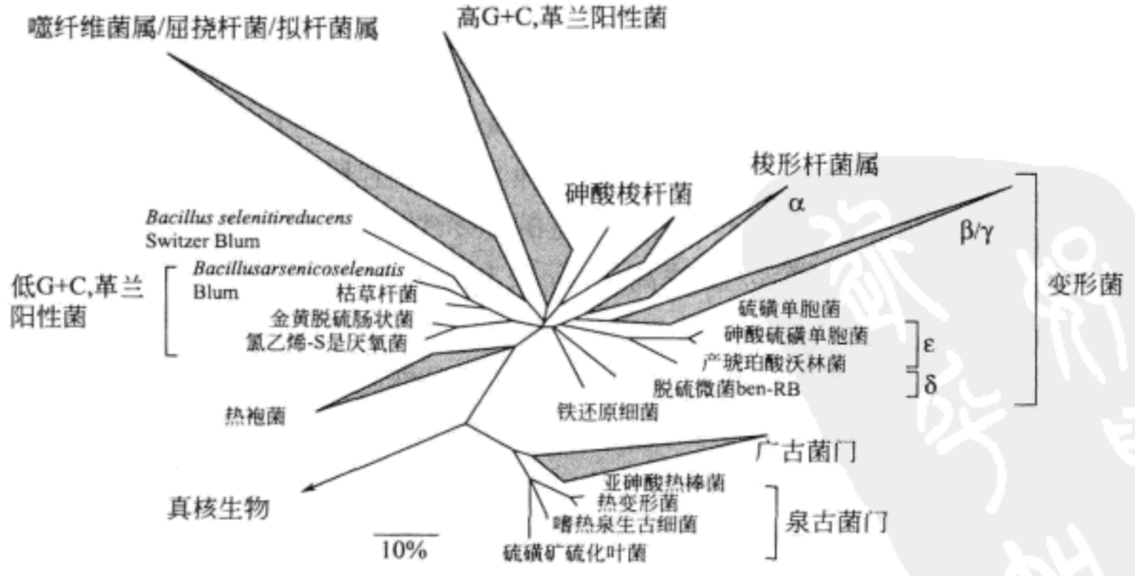


图 6.1-3　具有还原砷酸（As^{V} → $As^{Ⅲ}$）能力的微生物系统图

① 具有还原砷酸 As^{V} → $As^{Ⅲ}$ 能力的微生物。这类微生物中应用最广泛的有：a. 高或低 G+C，革兰阳性菌；b. 变形菌（Proteobacteria）；c. 古细菌（Crenarchaeota）。这些微生物的作用特点：革兰阳性，完全或部分化能无机自养，可以以砷酸（V）作为唯一的电子供体而获能生长，但不能直接氧化硫化矿。在有氧或缺

氧的状态下，能够以砷酸作为最终电子受体而生长。最适生长温度 28～30℃，最高生长温度约 40～60℃，最适 pH2.5～7.0，此外由于这种细菌非常耐受各种有毒的金属离子（Cr^{3+}，Hg^{2+}，Au^{+}，As^{3+}），为此，这些细菌同时也是海洋环境工程治理和各种重金属废水治理中主要应用的菌种之一。

② 具有氧化 As^{3+}→As^{V} 价态的微生物。自然中存在的各种元素所表现的毒性往往和其存在的价态密切相关，对于砷元素来说，无机砷(Ⅲ)≥无机砷(Ⅴ)≥一甲基砷（MMA^{V}）≥二甲基砷（DMA^{V}）≥单质砷，为此控制 As^{3+} 的量，增强砷 As^{V} 价态的量，也是定量控制砷毒性的一个有效的思路和方法。具有 As^{3+}→砷 As^{V} 作用的微生物有变形杆菌和嗜温菌两类。它们可以氧化砷 As^{3+}→砷 As^{V} 而获能生长，但不能直接氧化硫化矿。研究也表明，在有氧或缺氧的状态下，最适生长温度 28～50℃，最高生长温度约 40～90℃，最适 pH2.5～7.0，此外这种细菌也耐受各种有毒的金属离子（Cr^{3+}，Hg^{2+}，As^{3+}），是处理各种砷污染环境中常用的菌种。

③ 具有甲基化砷 As^{3+}→甲基砷 MMA^{V} 价态的微生物。微生物甲基化观点的提出，约有 150 多年的历史。微生物甲基化，不仅是自然界生物对有毒元素砷的抵御机制，而且也是生物体内包括哺乳动物中砷的代谢机制。试验证明，鼠服用三价和五价砷，24h 内由鼠盲肠中存在的厌氧细菌将其全部转化成甲基砷，进入鼠的正常代谢。由于缺乏足够的纯培养物和 16S rRNA 基因序列信息，目前对微生物甲基化的研究比较有限，仅报道有黄杆菌属（*Flavobacterium-Cytophaga*）、假单胞菌属（*Pseudomonas* 或 *Pseudomonas putida*）、克雷伯菌属（*Klebsiella oxytoca*）和无色菌属（*Achromobacter*）等的细菌具有砷甲基化能力，至于甲基化的机理，目前的研究仍缺乏系统的研究报道。这里需要指出的是，寻找更多、有效的砷甲基化细菌来解决砷化合物的毒性仍旧不失为一个比较好的策略，见图 6.1-4 所示，有毒金属的解毒，主要有五种机制在发挥着作用（按顺时针方向）：a. 将有毒金属排出细胞，例如通过砷酸还原酶 ArsB 蛋白将砷 As^{3+} 排出细胞；b. 在细胞内/细胞外对重金属进行绑定，以降低重金属的毒性；c. 通过渗透障碍阻止重金属进入细

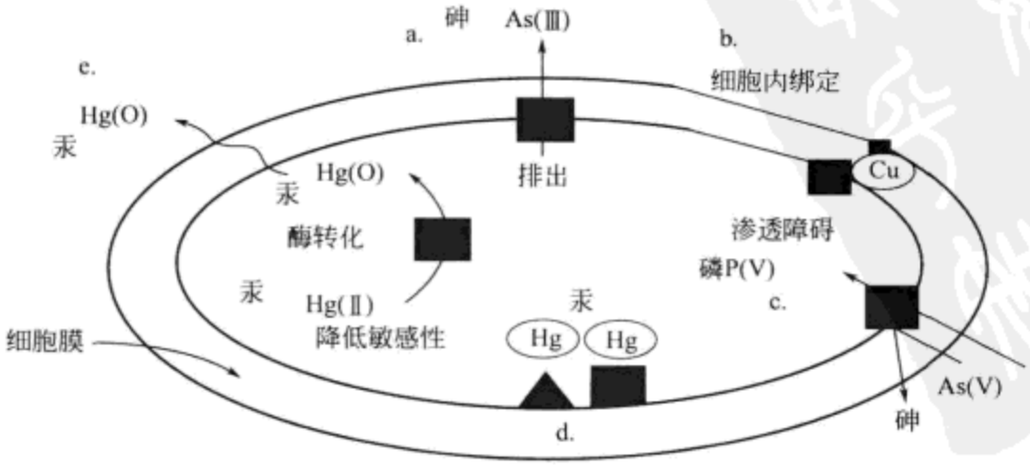


图 6.1-4　嗜酸菌抗重金属机制

胞，例如磷酸盐特异性运输蛋白只运输磷酸盐，而不运输砷 As^{5+}；d. 调节细胞中某些成分，使其降低对重金属的敏感性，例如某些汞（Hg）抗性菌株的细胞色素C对 Hg 的敏感性就很低；e. 将重金属转化为无毒形式，排出体外，例如将汞 Hg^{2+} 还原为单质汞 Hg，单质汞随之挥发出细胞。

6.1.2.2 微生物作用矿物中药的原理

（1）微生物生物氧化的机理[2] 尽管微生物氧化技术在冶金业得到了广泛的应用，但是有关微生物作用的机理和各种细菌之间的关系，一直是人们探讨和研究的问题。微生物的作用常常需要一些辅助离子的参与，共同完成微生物对细菌的氧化过程，这其中应用最多的就是铁（Fe）元素，因为铁元素既是许多矿物本身的组成部分，也是细菌生长的必需元素，也就是说，细菌通过氧化（亚铁离子 Fe^{2+} → 高铁离子 Fe^{3+}）来获得细菌生长必需的能量。如图 6.1-5 所示，细菌是如何对矿物发生氧化作用的，是细菌直接与矿物作用还是高铁离子 Fe^{3+} 对矿石直接发生氧化作用，围绕着这一问题，在细菌生物氧化理论上发生了很多争论，现在，比较达成共识的理论是把细菌和矿物之间的作用分为直接作用和间接作用。细菌间接作用的产生主要针对于它对浸出体系中亚铁离子 Fe^{2+} 的氧化，使之转化成氧化能力强的高铁离子 Fe^{3+}，因此，将利用 Fe^{3+} 离子作为氧化剂的金属硫化物的浸出称之为细菌的间接作用。另外一种机理就是细菌对矿物的直接作用，研究表明，在固体硫化物上培养的细菌表面，可以发现某种类似蛋白质的有机物，这种有机物使得细菌能够黏在矿物表面，为细菌对硫化矿物存在直接浸出提供了有利的证据。

根据微生物的作用方式、生物氧化产生的中间产物以及硫化矿本身对酸性介质的溶解性的不同，把细菌的氧化分为硫代硫酸盐途径（thiosulfate mechanism）和多硫化物途径（polysulfide mechanism）（图 6.1-5）。硫代硫酸盐途径的原理如下所示。

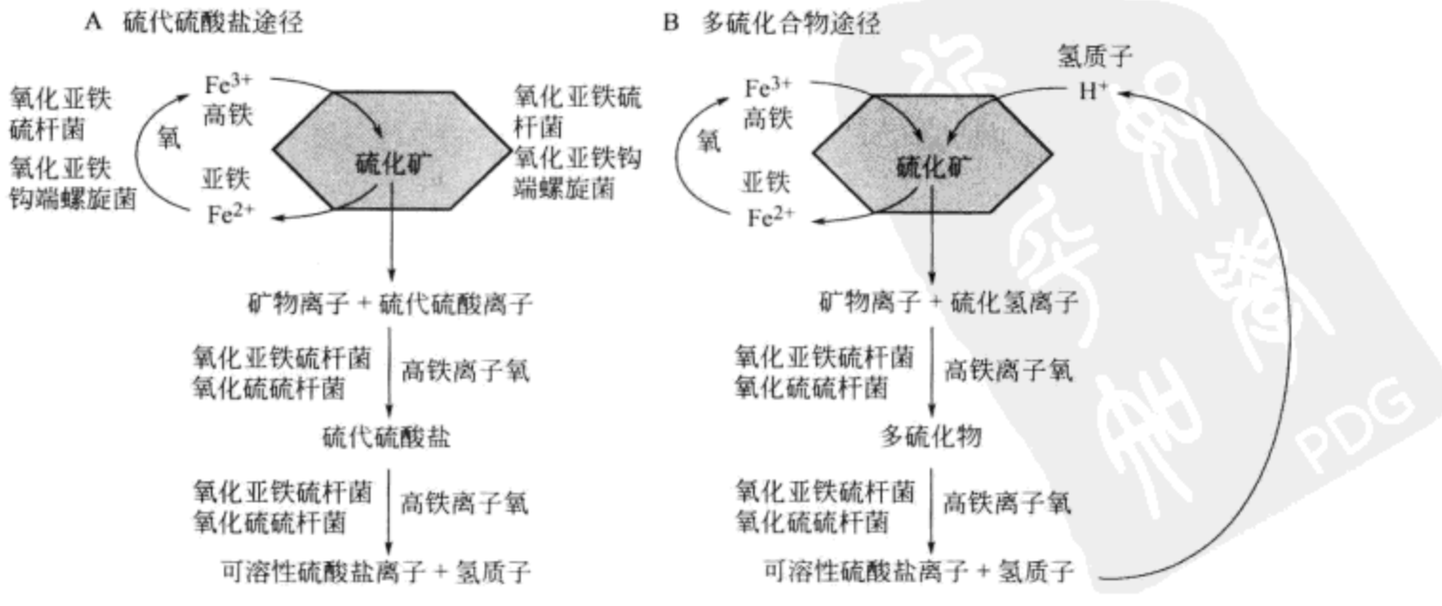


图 6.1-5 细菌浸出机理

A－非酸参与的硫代硫酸盐途径作用机理；B－酸参与的多硫化物途径作用机理

$$FeS_2 + 6Fe^{3+} + 3H_2O \longrightarrow S_2O_3^{2-} + 7Fe^{2+} + 6H^+ \quad (6.1\text{-}1)$$

$$S_2O_3^{2-} + 8Fe^{3+} + 5H_2O \longrightarrow 2SO_4^{2-} + 8Fe^{2+} + 10H^+ \quad (6.1\text{-}2)$$

就是细菌对矿物的作用途径不需要酸，而是利用细菌氧化（亚铁离子 Fe^{2+} → 高铁 Fe^{3+}），并以高铁 Fe^{3+} 直接作用于矿体，中间产物为硫代硫酸盐，最终产物为硫酸。这一途径往往适合一些酸不溶性硫化矿，如黄铁矿（FeS_2）、辉钼矿（MoS_2）或者辉钨矿（WS_2）；而后者的氧化途径，则是利用细菌氧化高铁 Fe^{3+} 和矿物溶解所产生的 H^+，共同作用于矿物表面，中间产物为多硫化合物，终产物可见反应式(6.1-3)～式(6.1-5) 也为硫酸。

$$MS + Fe^{3+} + H^+ \longrightarrow M^{2+} + 0.5H_2S_n + Fe^{2+} \quad (n \geqslant 2) \quad (6.1\text{-}3)$$

$$0.5H_2S_n + Fe^{3+} \longrightarrow 0.125S_8 + Fe^{2+} + H^+ \quad (6.1\text{-}4)$$

$$0.125S_8 + 1.5O_2 + H_2O \longrightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ \quad (6.1\text{-}5)$$

通过对两种综合机理的比较我们非常有兴趣地发现，两者机理尽管作用方式不同、中间产物和过程都不同，但是二者最终的产物均是硫酸，由此可以预见，大量的硫酸的产生导致参与矿物氧化的微生物最终必须适应强酸环境，也就可以推测参与矿物分解氧化的微生物虽然种类不同，但是它们有可能共同作用在同一酸性环境中，共同参与着对矿石的氧化分解作用。从这一角度来看就很自然地提出了多种细菌的复合氧化机理。见图 6.1-6 所示。

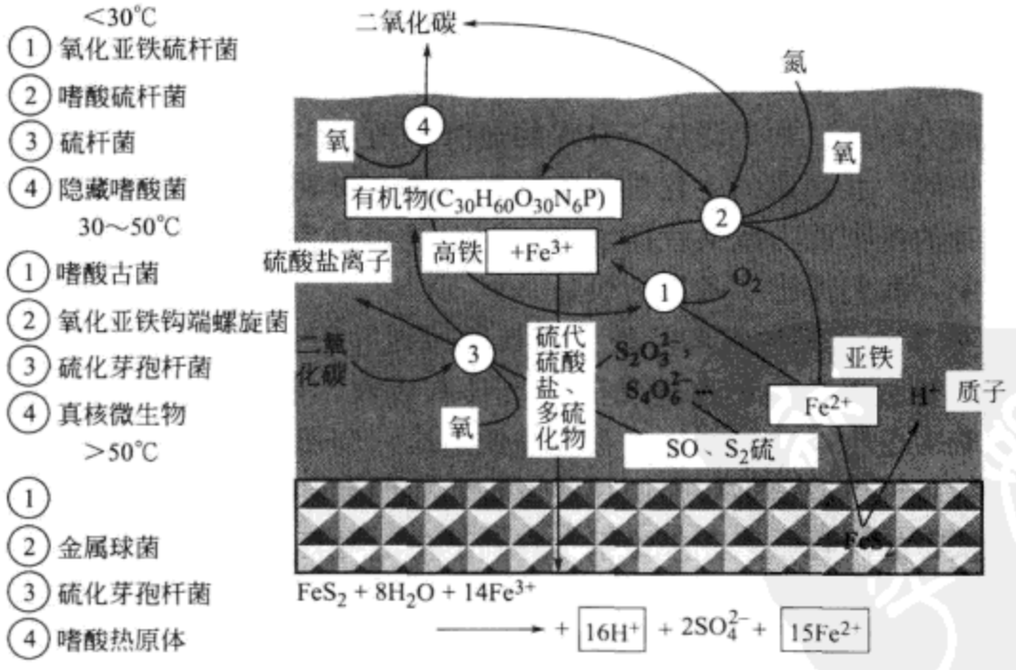


图 6.1-6　黄铁矿（Fe_2S）在 AMD（酸性矿水）中被多种嗜酸微生物复合氧化机理包括：多种硫杆菌③（硫杆菌、嗜酸硫杆菌和硫化芽孢杆菌等），①和②（氧化亚铁硫杆菌、硫杆菌、嗜酸古菌、氧化亚铁钩端螺旋菌、金属球菌等），硫代硫酸盐或多硫化物途径（S_0、$S^{2-} \rightarrow S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$）④（隐藏嗜酸菌、嗜酸热原体和原核微生物等），有机物（$C_{30}H_{60}O_{30}N_6P$）

黄铁矿（Fe_2S）在 AMD（酸性矿水）中被多种嗜酸微生物复合氧化机理包括：由于元素硫存在于黄铁矿表面从而抑制其的溶解过程，而多种硫杆菌③（硫杆

菌、嗜酸硫杆菌和硫化芽孢杆菌等）能够以硫为能量并通过生物氧化硫的作用，从而解除硫对黄铁矿表面抑制加速黄铁矿的溶解过程，与此同时，黄铁矿溶解后产生的亚铁离子又可以作为多种微生物——①和④（氧化亚铁硫杆菌、硫杆菌、嗜酸古菌、氧化亚铁钩端螺旋菌、金属球菌等）的能量促进亚铁离子 Fe^{2+} → 高铁离子 Fe^{3+}，而且随着高铁离子 Fe^{3+} 浓度在酸性矿水中升高，高铁离子 Fe^{3+} 氧化酸性矿水中的硫通过硫代硫酸盐或多硫化物途径（S_0、S^{2-} → $S_2O_3^{2-}$ → $S_4O_6^{2-}$ → SO_4^{2-}）形成可溶性硫酸盐。而在另一方面，异样菌或混合营养细菌③（隐藏嗜酸菌、嗜酸热原体和原核微生物等）可以利用系统中的有机物（$C_{30}H_{60}O_{30}N_6P$）以及自养菌代谢的废物，通过碳的固定、氮的固定、有机物的氧化分解，解除了对自养菌生长的抑制作用，自养菌代谢旺盛，繁殖快加速了矿物的氧化分解，提高了生物技术的利用价值，即浸出速率和效率。自养菌代谢的有机物也为异养或者兼性自养细菌的生长提供了营养，异养细菌与自养菌混合营养细菌在缺养及微氧环境中，可以还原性地溶解金属硫化物，加速矿物分解，提高了异养细菌的使用价值。为此，多种细菌的复合氧化机理，在黄铁矿的溶解过程中占有主导地位。

（2）微生物生物代谢的机理[3] 微生物生物代谢按照常规的定义为，只有在初级能源物质存在时，才能进行的各种产物的生物降解过程。在这一过程中，微生物体依赖初级基质的消耗而生长，然而在有机物的生物转化中还存在着另一种尚未被人们透彻了解的生物过程——共代谢（co-metabolism）。共代谢是指微生物依赖可利用碳源和能源在正常生长过程中氧化非生长基质的过程，微生物在可利用碳源支持下其休眠细胞（resting cell）对非生长基质的氧化同时具有降解不可利用碳源和能源物质的能力，通过共代谢这一方式的显著作用，一些环境中的有毒化合物可以共代谢方式去除。共代谢的生化机制如何呢？微生物氧化某些砷化合物的同时，是否能利用自身的抵御能力或共代谢能力，同时是否具有氧化或代谢产物的能力呢？针对这一现象，我们提出了各种假设。

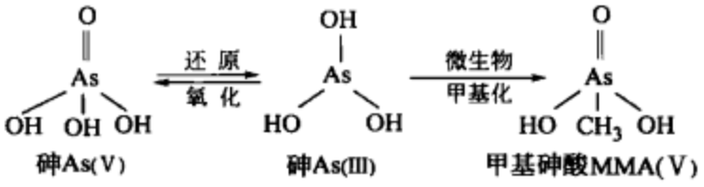
① 微生物不能在某种有毒基质上生长的原因并不是由于微生物无法分解代谢这种物质，而是由于微生物本身无法同时具有吸收、氧化、代谢含砷化合物的能力。但是随着微生物对这种产物生存环境的适应，利用其自身的抵御能力或共代谢能力，微生物则可以产生一些代谢这些有毒物质的酶和一些辅助因子，共代谢有毒产物，产生低毒的产物，以此来维系生存和适应这种环境的能力。虽然，这种假设在一些特殊的微生物甲基化代谢途径中得到证实，但仍需要更广泛的理论和实践去诠释。

② 一些微生物同时具有氧化或代谢的能力，虽然它不能将有毒产物作为能源或者基质氧化，但是它可以把有毒的产物氧化或者代谢为无毒或更有利于排泄的化合物状态，然后进一步代谢解毒，从而达到代谢解毒的目的。以微生物甲基化解毒的过程为例，这一解毒过程已经广泛地应用在环境、生物、医学等领域，例如海洋微生物对砷污染环境的代谢解毒过程就广泛采用微生物甲基化解毒这一技术。下面通过公式列举微生物甲基化代谢脱毒的作用机理。

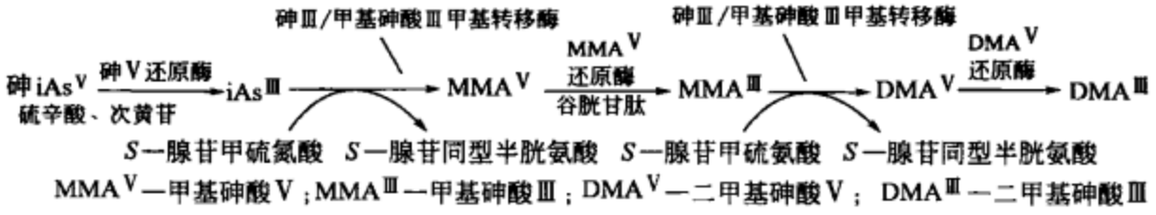
a. 还原砷铁矿物（MAsFe）中的砷 As^{V} 成为更易代谢的砷 As^{III} 形式

$$MAsFe(V)\xrightarrow[\text{有氧或厌氧}]{\text{细菌作用}}M^{+}+As^{3+}+\text{亚铁离子}\ Fe^{2+}$$

b. 砷 $As^{Ⅲ}$ 作为细菌甲基化的底物，进行甲基化代谢脱毒



砷无处不在，不仅存在于自然环境中，同样也存在于人体的代谢过程。而针对砷在人体代谢氧化机制的研究表明，人体中砷的代谢与自然界砷的氧化、还原以及共代谢有着相似机制，同样可以在人体内的一些特殊肠道微生物下，发生氧化、还原、甲基化等代谢反应。而在这一过程中，一些特定的微生物酶起到了决定性的作用，这一机制可以表述为：



在这一过程中，iAs^{V} 作为磷（phosphate，Pi）的类似物，首先通过 Pi 载体运输系统被转运到细胞内，进入细胞后，在砷酸还原酶（arsenate reductase，ArseC）催化下可被还原为 $iAs^{Ⅲ}$，随之进入 $iAs^{Ⅲ}$ 的甲基化过程。部分 iAs^{V} 也可直接经肾排出体外，而 $iAs^{Ⅲ}$ 主要通过水甘油通道蛋白（quaglyceroporins）AQP7 和 AQP9 被运送到胞内。在随后的 $iAs^{Ⅲ}$ 代谢过程中，以 *S*-腺苷甲硫氨酸（*S*-adenosylmethionine，SAM）作为甲基供体，谷胱甘肽、硫氧还蛋白或硫辛酸等作为电子供体，最终产生以 MMA^{V} 和 DMA^{V} 为主的甲基化砷代谢物。在此过程中，$MMA^{V}\rightarrow MMA^{Ⅲ}$ 的还原反应构成了整个酶促反应的限速步骤，且 MMA^{V} 还原酶（MMA^{V} reductase）是 GST 超家族中的一员，需要 GSH 的参与。还有研究显示，iAs^{V} 还原成 $iAs^{Ⅲ}$ 有丙酮酸激酶的参与[4]。还原型有机砷（$MMA^{Ⅲ}$ 和 $DMA^{Ⅲ}$）是砷在体内生物转化过程中重要的中间产物。试验证明[5]，鼠服用三价和五价砷，24h 内由鼠盲肠中存在的厌氧菌将其全部转化成甲基砷，进入鼠的正常代谢。而且研究发现，一些特殊的自然环境中（酸性矿水、海洋、污泥、湖水等）也已发现多种微生物具有甲基化能力，是否能利用微生物特有的氧化、还原、甲基化和其他微生物共代谢的能力，去代谢一些有毒药物，达到有毒药物脱毒的能力？环境中分离的微生物是否能够应用于有毒药物的脱毒、难溶药物的溶解、生物利用度的提高呢？对上述问题的思考集中在以下两个方面。

a. 对嗜酸浸矿细菌应用的思考。随着对浸矿微生物的深入研究，给予我们很大的启示和思考，嗜酸细菌是否可以应用于难溶性矿物中药研究。非常巧合的是，临床使用的许多矿物中药，其本身就是粗糙的硫化矿粉，利用嗜酸细菌对含硫化物

矿物中药（朱砂、雄黄和自然铜）等的作用，通过特殊的生物氧化作用不仅能解决其溶解性问题，而且为中药创新研究提供了提取、分离、炮制的全新方法。

$$\text{矿物中药（不溶）} \xrightarrow[\text{酸性条件（}H^+\text{）}]{\text{细菌作用}} \text{溶解活性状态（可溶）}$$

b. 对具有代谢能力细菌应用的思考。对于一些难溶矿物中药来说，它所发挥的药理活性是否是其代谢物？如果单纯从单一的化合物角度来推测难溶药物的有效作用是不科学的。因为药物的作用可能与其在体内代谢、转化、分解有关。探索难溶矿物与其药理活性成分的关系，就应当重视对其药物代谢的研究。目前，虽然已经利用肠道细菌如瘤胃球菌、真杆菌、梭状芽孢杆菌及无菌或伪无菌、悉生动物对中草药单体化合物进行了系统的代谢研究，并取得了一定的研究成果。但对于一些难溶药物，特别是一些有毒的难溶矿物中药，能否利用多种具有氧化、还原和甲基化等代谢能力的特殊微生物，提高这些药物的溶解性、减毒增效，将是一个全新的思路和方法。国内张景红、苏丽春等研究小组[6]在这一领域做了有意义的尝试，采用嗜酸浸矿菌（氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌和氧化亚铁钩端螺旋菌等），对一些难溶的矿物中药（朱砂、雄黄和自然铜）进行生物氧化、还原和甲基化等代谢，提高其溶解度、生物利用度，与传统的提取和炮制方法相比，微生物提取液抑制肿瘤的效应增强，动物体内蓄积毒性大幅度降低，在动物体内几乎没有蓄积[5]。下面重点介绍上述微生物生物氧化或代谢矿物中药（朱砂、雄黄和自然铜）的技术方法。

6.1.2.3 微生物生物氧化或代谢矿物中药的技术和方法

微生物技术在冶金业发展迅速，已从试验的摇瓶浸出发展到现代工业的堆浸和生物反应器技术，到目前为止，世界上已建成许多大型的生物反应器，用于铁矿、砷铁矿和黄铁矿的生物浸出，而微生物对矿物中药的生物氧化或代谢技术，虽然其核心的技术来自于成熟的生物冶金技术，但是把这种技术科学地、创新性地应用到中药的创新研究中仍需从基础的理论和技术加以探索，目前的研究仍旧处于试验研究阶段，实际应用仍需做大量的工作，以下从微生物的富集、分离、纯化、驯化、生物氧化或代谢等方面做一介绍。

（1）微生物的采集　如何从自然界中采集、分离并在实验室中培养并获得能够在试验室扩大培养的菌株，是微生物生物氧化或代谢 矿物中药的关键步骤。而一株高效菌株的获得，往往会带来意料不到的处理药物的效果。当然，对研究与使用者而言，工作微生物也可从菌种保藏机构直接购买，这样可节省时间和提高效率。但是，这样获得的菌种常常没有从自然界采集的野生菌适应性和生物氧化或代谢能力强，为此，在多数情况下微生物需要从自然界中采集、分离和培养。故此，我们课题组开展了广泛的微生物采集工作，采集环境分别来自于湖北、湖南、江西等铁矿、金矿、铜矿及福建等伴生环境。例如，见图 6.1-7 所示，典型的金属矿的酸性矿坑水附近，采集重点集中在有明显的棕红色废水（铁氧化，高铁离子 Fe^{3+} 的颜色）或棕黄色废水区域（硫氧化，硫的颜色）[9]。

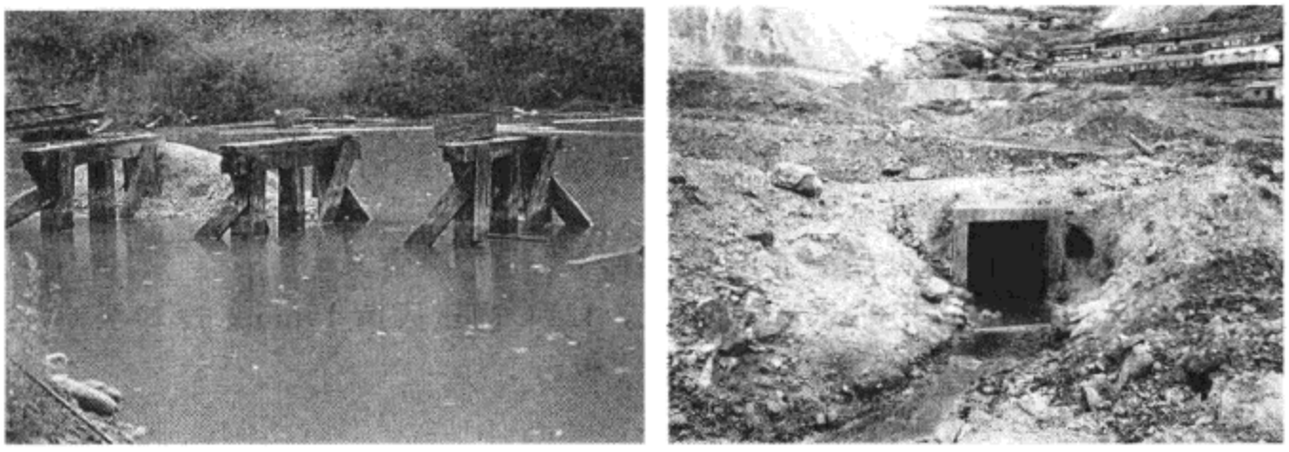


图 6.1-7　典型的金属矿的酸性矿坑水采样外景

采集时取 100～250ml 的细口瓶，洗净并消毒处理，瓶口不盖盖子，用牛皮纸或棉塞塞住。取样瓶中可装入适当的培养基，其量约占瓶容积的 1/3。取样既可取上述矿山的酸性排水，也可取矿坑岩壁上已氧化变为棕褐色的潮湿矿块。取样量以瓶中物总量不超过瓶容积的 2/3 为宜。取完样后应立即贴上标签，标明取样地点及时间。为便于将来可用矿物培养基培养和保存细菌，可顺便采取该采样矿山的矿样少许，因为矿样为该菌所适应的，因此十分适合于该菌的培养。装水样的容器不能灌满，须留一定的空间存空气。如果采集的材料不能及时分离，可往水样中加入少许硫化物或硫磺以保证细菌存活，并放置于 4℃冰箱等待下一步分离。

(2) 微生物分离培养基[7]

① 氧化亚铁硫杆菌的分离培养基

a. 液体培养基 (9K)

溶液 A：硫酸铵 3.0g，氯化钾 0.1g，磷酸氢二钾 0.5g，硫酸镁 0.5g，硝酸钙 0.01g，蒸馏水 700ml，用 20%硫酸调 pH1.6～2.0。

溶液 B：硫酸亚铁 44.3g 浓度 14.78%，溶液 300ml。

A 液＋B 液混合，用 1∶1 硫酸调 pH2～2.5，固体平板分离。

b. 固体培养基 (TSM)

溶液 A：硫酸铵 3.0g，氯化钾 0.1g，磷酸氢二钾 0.05g，硫酸镁 0.5g，硝酸钙 0.01g，蒸馏水 600ml。用稀硫酸调 pH2.5，121℃高压灭菌 15min，冷却至 60℃。

溶液 B：硫酸亚铁 22.0g 溶于 150ml 蒸馏水，用稀硫酸调 pH2.5，滤膜过滤除菌。

溶液 C：6g 琼脂 (微生物专用) 溶于 250ml 蒸馏水，pH7.0，121℃高压灭菌 15min 后，冷却至 60℃后，依次加入溶液 A 与 B、C 混合均匀，无菌条件下，倒平板 (约 25ml)，备用即可。

② 氧化硫硫杆菌的分离培养基。目前用于实验室研究的培养基有如下几种：瓦克斯曼培养基，9K 培养基和改良 9K 培养基等，但是用得最多的是瓦克斯曼培养基。

瓦克斯曼液体培养基：硫酸铵 0.2～0.4g/L，磷酸氢二钾 3g/L，硫酸镁

0.5g/L，氯化钙 0.2g/L，硫酸亚铁 0.01g/L，1ml 微量元素，pH＝3.5 硫粉 1g/100ml。

固体平板溶液 A：硫酸铵 0.2～0.3g/L，磷酸氢二钾 3g/L，硫酸镁 0.5g，氯化钙 0.2g/L，硫酸亚铁 0.01g/L，1ml 微量元素，蒸馏水 580ml，pH＝3.5，121℃高压灭菌 15min 冷却至 60℃。

溶液 B：10g 硫代硫酸钠溶于 20ml 蒸馏水，过滤除菌。

溶液 C：15g 琼脂溶于 400ml 蒸馏水，121℃高压灭菌 15min，冷却至 60℃。混合 A、C 后，加入 B 液，混合均匀后倒平板。

③ 铁氧化钩端螺旋菌的分离

a. Leathen 液体培养基

溶液 A：硫酸铵 0.15g，氯化钾 0.05g，磷酸氢二钾 0.05g，硫酸镁 0.5g，硝酸钙 0.01g，蒸馏水 1000ml。

溶液 B：10%硫酸亚铁溶液 10ml，过滤除菌，即得。

b. 固体培养基 ISP

溶液 A：硫酸亚铁 33.4g 溶于 300ml 蒸馏水，用稀硫酸调 pH2.5，滤膜过滤除菌。

溶液 B：硫酸铵 6.0g，氯化钾 0.2g，硫酸镁 1.0g，硝酸钙 0.02g，蒸馏水 550ml，用稀 H_2SO_4 调 pH2.5，121℃高压灭菌 15min 后，冷却至 60℃。

溶液 C：纯化琼脂 7g 溶于蒸馏水 150ml，121℃高压灭菌 15min，冷却至 60℃。混合 B、C 后，加入 A 液，混合均匀后倒平板，可在培养基中加入 0.05%的微量元素混合液（硫酸锌 10g/L，硫酸铜、硫酸钼、硫酸钴各 1g/L，硫酸铬、四硼酸钠、钼酸钠各 0.5g/L，偏钒酸钠 0.1g/L，pH2.0），更有利于平板上菌落的形成。

④ 氧化硫或氧化亚铁细菌的双层培养基。培养基一般是利用琼脂作介质，但是琼脂经高压灭菌后，往往产生较高浓度的、对化能自养菌具有毒性的水溶性有机物（葡萄糖、柠檬酸、半乳糖、甘露糖）这一点可能是导致单层平板检出率较低的重要原因，而双层平板下层的异养菌因能消耗上层的水溶性有机物从而可大幅度提高硫杆菌的检出效率。根据这些机理，发明了双层培养基，尤其是在培养基中加入了少量的培养细菌的混合有机物 TSB（胰酪胨大豆肉汤），鉴于从层培养基的这一特点，双层培养基从开始的单层的 FeTSB 培养基到双层的 FeTSBo、最后发展到不仅适合培养铁氧化细菌而且适合培养硫氧化细菌的 FeSo 固体培养基。

a. FeTSB 混合固体培养基。预培养的异样菌液，接入下层含琼脂胶之前，将细菌培养在含 25mmol/L 硫酸亚铁，5mmol/L 连四硫酸钾、10mmol/L 半乳糖以及 0.025%胰蛋白胨大豆肉汤，pH2.5 的基础盐溶液中使之适应培养备用。

溶液 A：10g 硫酸亚铁溶于 20ml 蒸馏水，调 pH2.0，过滤除菌。

溶液 B：1.25g 硫酸铵，0.25g 胰蛋白胨大豆肉汤，硫酸镁 0.5g，蒸馏水 680ml，调 pH2.0～2.5，121℃高压灭菌 15min，冷却至 60℃。

溶液 C：细菌用琼脂 7g，蒸馏水 300ml，121℃高压灭菌 15min，冷却至 60℃。

混合 B、C 后，加入 A 液，混合均匀后倒平板即得。

b. FeTSB 混合固体培养基。将上述 FeTSB 液体培养基混合均匀后，按体积比 2∶1 分为两份 A 和 B，其中 A 液加入 2.5%的一种嗜酸异样菌（如 *Acidiphilium cryptum* Harrison），混合均匀，每个培养皿无菌地倒入 20ml，同时 B 液保持温度在 50～60℃，待琼脂凝固后，在每个平板中再加入 B 液 10ml，旋转使之涂布均匀，即得。

c. FeSo 双层固体培养基。配制 100mmol/L 的连四硫酸钾溶液，再将连四硫酸钾溶液加入 FeTSB 培养基的 B 液中，使连四硫酸钾终浓度为 1～5mmol/L，然后将之与 C 液、A 液分别混合，其他步骤同 FeTSB 固体培养基配制方法。菌液倒于底层平板并均匀涂布，放置 1～2h，再将用于分离细菌的 B 液迅速倒入混匀，作上层平板，凝固后备用。

以 FeSo 双层固体培养基培养硫杆菌为例，见图 6.1-8 所示，分别涂布氧化亚铁硫杆菌菌液（A）和氧化硫硫杆菌菌液（B），培养 11 天后，可以同时观察到两株菌在同一培养基上同时生长的菌落形态。

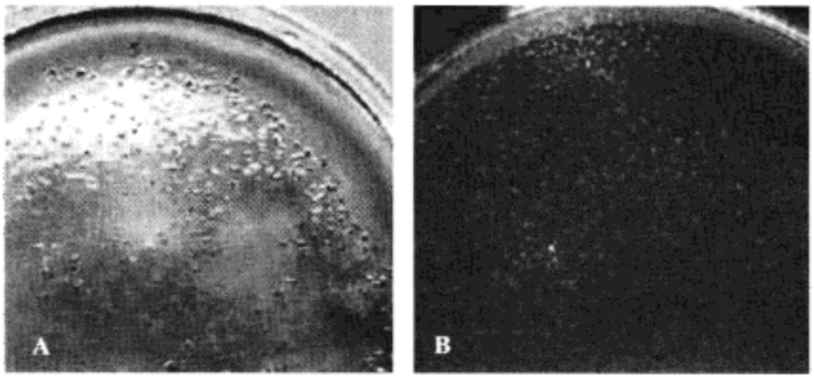


图 6.1-8　涂布氧化亚铁硫杆菌菌液
（A）和氧化硫硫杆菌菌液（B）培养 11 天后双层平板上硫杆菌的菌落形态

⑤ 海洋产酸克雷伯菌的分离培养基（*Klebsiella oxytoca* Knowles）

a. 液体培养基。LB 液体培养基：胰蛋白胨 10g，酵母粉 5g，氯化钠 10g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 20min，冷却至 60℃，即得。

b. 固体培养基。液体培养基加入琼脂 20g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 15min，冷却至 60℃，即得。

c. W-F（Worfrl-Ferguson）培养基。蔗糖 20g，酵母粉 2g，氯化钠 2g，硫酸钾 1g，硫酸镁 0.25g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 20min，即得。

d. 种子培养基。蔗糖 20g，胰蛋白胨 10g，氯化钠 2g，硫酸钾 1g，硫酸镁 0.25g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 20min，即得。

e. 发酵培养基。蔗糖 40g，胰蛋白胨 20g，酵母粉 1g，硫酸钾 1g，硫酸镁 0.25g，磷酸二氢钾 4g，磷酸氢二钠 3g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 20min，即得。

⑥ 海洋无色菌属（*Achromobacter* sp. Wilson）

a. 液体培养基。磷酸二氢钾 0.5g，磷酸氢二钾 0.5g，氯化钙 0.1g，氯化钠

0.2g，硫酸镁 0.2g，硫酸锰 0.03g，氯化亚铁 0.005g，硫酸钾铵 1.0g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 30min，即得。

b. 琼脂平板和斜面培养基。牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，琼脂 20g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 30min，即得。

⑦ 海洋粪产碱杆菌（*Alcaligenes faecalis* Castellani and Chalmers）

a. 种子培养基。葡萄糖 20g，酵母膏 10g，磷酸二氢钾 1.74g，硫酸镁 0.49g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 20min，即得。

b. 分批发酵培养基。葡萄糖 50g，酵母膏 2g，氯化铵 1.6g，磷酸二氢钾 2.0g，硫酸镁 0.5g，无机盐浓缩液 1%（体积分数），消泡剂 0.2ml，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 20min，即得。

c. 补料培养基。葡萄糖 10g，酵母膏 1g，氯化铵 3.6g，磷酸二氢钾 2.0g，磷酸氢二钾 1.7g，硫酸镁 0.5g，无机盐浓缩液 1%（体积分数），消泡剂 0.2ml，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃高压灭菌 20min，即得。

d. 基础培养基与补料培养基组成相同。

e. 固体斜面培养基。葡萄糖 40g，酵母膏 5g，琼脂 20g，$CaCO_3$ 10g，蒸馏水 1000ml，调 pH7.0，121℃灭菌 20min。

（3）富集、分离和纯化　采集回来的菌种富集，可在 100ml 的锥形瓶中进行。首先，在锥形瓶中加入 30ml 已灭菌处理的液体培养基，并向其中接种 5～10ml 采集的原菌种，置于生化培养箱中于 30℃恒温培养，直至有细菌生长。而是否有细菌生长，可通过观察培养液的颜色变化及测定 pH 变化来确定。如细菌生长则溶液变为乳白色，均匀浑浊，并且 pH 下降。经过这样富集培养的培养液，细菌浓度较自然环境中的细菌浓度大大增加，约可达 $10～10^8$ 个/ml。在相同的液体培养基上连续接种几次后即可做进一步的分离纯化。

而分离、纯化的步骤，其逐级稀释的过程见图 6.1-9 所示，采用常规的梯度稀释方法，取已富集好的细菌培养液 1ml，溶液按每次稀释 10 倍，依次稀释成 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 和 10^{-6} 浓度的稀释液。吸取稀释度为 10^{-4}、10^{-5} 和 10^{-6} 的稀释样各 0.2ml，分别接种到三个预先准备好的固体培养皿中，涂布均匀。记下对应稀释度，于培养箱中倒置培养。直至固体培养基表面出现白色圆点状小菌落。将单独小菌落挑起，每个小菌落分别接种到 4～6ml 液体培养基的小锥瓶中振荡培养。这样培养出的即为单一菌，这一过程也就是微生物的纯化、培养过程。

（4）微生物驯化与筛选

① 适应驯化。取适量的含有矿物中药的提取液或者是纯品化合物，例如朱砂就可以用 HgS 来代替，在无菌操作条件下取 10ml 纯化菌悬液接入 100ml 含有一定初始浓度的药物的筛选培养基中，在 30℃ 150r/min 条件下振荡培养驯化 7 天后，再取驯化培养液 0.1ml，涂布琼脂平板培养，若有菌落长出，则再提高药物浓度继续驯化；若无菌落长出，则将上一次驯化的药物浓度定为最终驯化浓度；如此逐级驯化，筛选培养基的药物浓度，进入药物驯化试验。

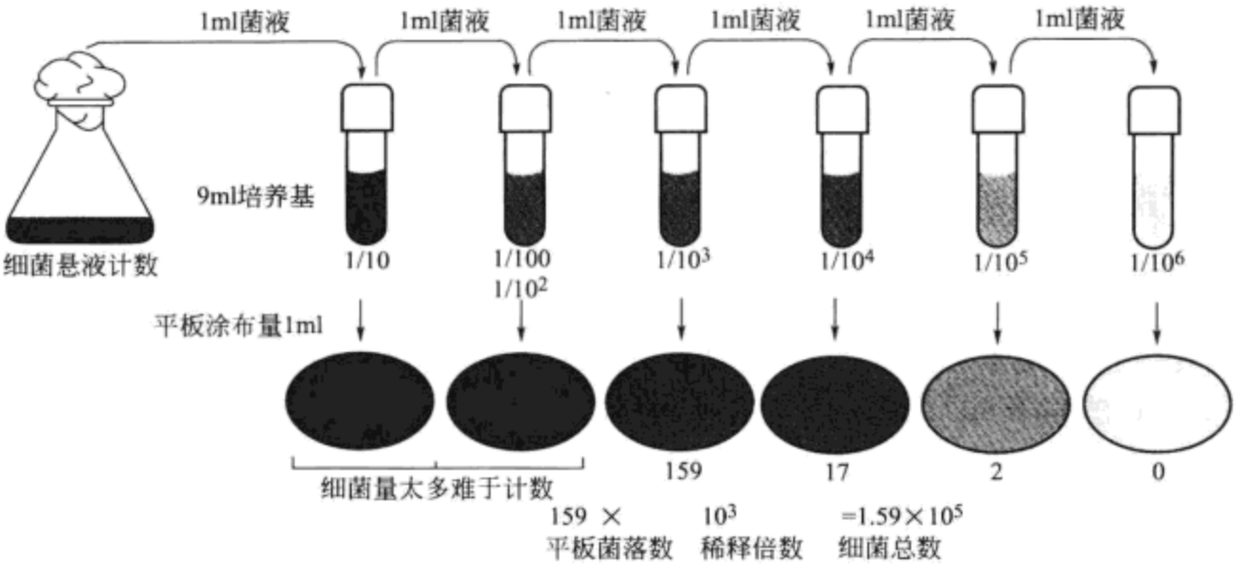


图 6.1-9　稀释涂布平板法

② 驯化。取适量的含有矿物中药的提取液，在无菌操作条件下取 10ml 适应驯化菌悬液接入 100ml 含有一定浓度的药物的筛选培养基中，在 30℃150r/min 条件下振荡培养驯化，中间每隔一定时间间隔取样，结合现代分析手段（HPLC、CE、HPLC-MS）检测，分析目标成分的浓度，如果未达到要求，则继续提高浓度逐级驯化，直至达到目标药物浓度。

（5）生物浸出试验（氧化、代谢）

① 摇瓶实验。一般采用摇瓶试验，从微生物学上讲，它是一种分批培养方法。这种培养方法是在反应器中一次性加入培养基，然后接种并在一定条件下培养。此后直到培养结束不再加任何物料。浸出结束后放出培养液进行处理。摇瓶实验的设备是锥形瓶和恒温生物摇床。使用摇床实验的最大好处是它可以同时进行多个条件的实验，获得多种信息，故特别适合于工艺条件优化及菌种选育。摇床有单层与双层两种。为避免产生矿物中药的沉积，缩短浸出时间，要求药物一般粉碎至 200～250 目，实验一般用 250ml 锥形瓶进行，瓶中加粉碎好的药物 0.1～1g，培养基 100ml。为避免药物在浸出过程中产生硫酸盐、硫酸铁和一些副产物造成 pH 变化，应先用硫酸调浸出液 pH 值，使之稳定在细菌生长所需的适合 pH 值。pH 稳定后才能进行接种。接种量一般为 1～15ml（根据种菌浓度定）。所有试验摇瓶准备完毕之后，即可封口（棉塞或牛皮纸）、贴上标签（记下起始参数），然后放入恒温摇床恒温培养，摇床振动效率以 250～300r/min 为宜。过低易沉淀，过强又易使药物溅出。为保证浸出结果的可信度，同一条件实验最少重复 2 个。实验开始时，先测定浸出体系的 pH，并取样分析，取样量应尽可能少，只要够分析即可。然后按一定的时间间隔，定时取样分析。每次取样前应补蒸馏水以补偿水的蒸发损失，根据药物和菌的适应程度，摇瓶实验可持续数天甚至数周。

② 分析检测方法

a. 细菌计数。采用血细胞计数板在显微镜（油镜头）下直接观察计数，随机选取 10～15 小格，记录每一小格中的细菌数目，并计算细菌数目的平均值 Q。菌

液浓度按下式计算：$c=4\times Q\times 10^6$（个/ml）。若菌液浓度较大，则须进行适当稀释。

b. 物相分析（XRD）。浸出后的药物粗粉残渣，经分离、干燥后，采用X射线衍射（XRD）分析仪鉴定浸出前后药物物相组成的变化。

c. Fe^{2+}浓度的测定。采用邻菲罗琳分光光度法测定上述待测溶液中剩余Fe^{2+}浓度。

d. 浸出元素的含量测定。采用等离子发射原子光谱仪（ICP-AES）测定药物浸出液中各种元素浓度的变化。而固态渣中元素含量的测定，则先需用10ml、1.0mol/L硝酸于80℃消化3h后，再用同法测定。

e. 胞内及胞外蛋白提取与测定方法。

ⅰ. 菌丝体蛋白的提取。取菌丝体粉末0.1g，研磨匀浆，置1.5ml Ep管中加入Tris-柠檬酸（pH8.2）样品缓冲液，浸提过夜；4000r/min离心5min后，取上清液。再向沉淀中加入200ml样品缓冲液，匀浆离心1次，合并上清液，再向其中加入800ml 10%三氯乙酸沉淀蛋白，离心收集沉淀，沉淀再溶于200ml 1mol/L氢氧化钠中。

ⅱ. 发酵液中蛋白的提取。取发酵液40ml，浓缩至少量再定容至5ml。再向其中加入200ml 10%三氯乙酸沉淀蛋白，以下同前。

ⅲ. 蛋白含量的测定。采用Lowry法。配制溶液A：硫酸铜0.5g、酒石酸钾钠1g，加双蒸水至100ml。溶液B：碳酸钙20g、氢氧化钠4g加双蒸水至1L。溶液C：51ml（1ml溶液A，50ml溶液B）。溶液D：20ml（10ml Folin-酚试剂、10ml双蒸水）。

ⅳ. 检测。用双蒸水稀释样品至0.5ml，加2.5ml溶液C，混匀后，在室温下放置5～10min，再加入0.25ml溶液D，混匀20～30min后，A_{750}检测［标准曲线：以双蒸水代替样品作为空白对照，用牛血清蛋白（BSA）作标准曲线，取14只试管分成两组，分别加入0、0.05ml、0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml、0.5ml标准蛋白溶液（250μg/ml），然后按上述方法进行操作，绘制标准曲线］。

f. 浸出液药效活性和急性毒性分析检测方法

药效活性的测定：评价一个药物的药效，在药物研究中至关重要，现代的研究分为体外评价（细胞，靶细胞，特殊的转基因体外模型等）和体内模型（动物的病理模型，动物的病症模型和一般药理模型等）等，在实际应用中可以选择经典的药效模型标准，分别采用药物、主要成分（化合物）作为阳性对照，进行比较研究，选择药理活性最强的生物浸出方式，结合生物浸出液急性毒性的大小选择浸出优势菌种。

药物急性毒性的测定：ⅰ. 按文献［8］方法找出0及100%致死剂量。ⅱ. 采用改良寇氏方法对小鼠给药，根据预试结果，分别采用药物、主要成分（化合物）作为阳性对照，进行比较研究，每组取小鼠10只，雌雄各半，体重18～20g，实验前小鼠禁食（不禁水）14h后，腹腔注射或灌胃给药，给药体积均为每20g体重0.2ml。组间数根据公式$\gamma=\frac{1}{K}\left(n-1\sqrt{\frac{D_{max}}{D_{min}}}\right)$计算。各组给药均用等体积，给药后



于常温下观察动物行为活动，记录死亡情况，观察至7天，进行大体解剖，肉眼观察。采用LD_{50}数据处理软件1.0进行数据处理。

g. 生物浸出的机理的研究。采用现代的分析方法（HPLC、HPCE和HPLC-MS）对浸出液成分进行分离分析、测定其中各个有效成分的变化，根据浸出前后的产物变化，结合现代微区技术（SEM、XRD和EDS）等对浸出过程中某些药物的表征加以分析，分析药物活性成分的变化，推断微生物作用药物的可能机理和机制。

一种矿物中药是否适于生物浸出，取决于其化学组成与矿物组成。这其中最重要的是要确定浸出的化合物是否具有毒性，以其选择合适的细菌和相应的浸出方法，如果这类细菌的生物氧化性能很好，但是它对有毒金属的耐受性很差，我们就要做充分考虑，考虑该种细菌能否通过严格的驯化提高它的耐受能力，如果不甚理想，就要考虑选择更加适合的菌种。以主要成分是硫化物的矿物中药为例，一般原则是，选择能氧化元素硫的细菌，比如可以选择氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌和氧化亚铁钩端螺旋菌等，如果浸出的矿物中药有一定的溶解性，则考虑选择氧化硫硫杆菌；如果是矿物中药溶解性差，但是其含有一定的铁元素，则要选择氧化亚铁钩端螺旋菌；反之，如果上述的两种情况都不具备，而且具有一定的毒性，那就要选择氧化性和金属耐受性都较强的氧化亚铁硫杆菌。总之选择一个适合生物浸出的微生物是试验成功的第一步。生物技术在冶金业的应用，目的比较单一，为最大程度地得到高纯度和高含量的金属元素，而生物浸出的目的在于利用特殊微生物的氧化或代谢药物，最大限度地提取药理活性高的元素的含量，发现新型的目标产物或减毒目标成分，在提高其药物的生物利用度和药理活性的同时，最大程度地避免和降低其毒性，二者目的相互依存，缺一不可。在这一方面的研究中，虽然我国研究者已经在植物药红花、雷公藤、牛蒡子等植物药材中取得了一定的进展，但是由于微生物资源选择和对一些药物成分提取方面的困难，在矿物中药领域的研究一直停滞不前。非常可喜的是，我们课题研究小组，在矿物中药的生物浸出方面作出了有益的探索，特别是采用生物浸出技术，对有毒矿物中药雄黄、朱砂做了一些生物浸出试验，但这仅仅只是开始，比如已经成功地利用氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌和二者的混合菌，提取了这两位中药的活性成分，但是其毒性的研究仍不甚理想，我们大胆设想利用参与生物体代谢解毒的其他细菌，共同作用，比如在利用氧化亚铁硫杆菌或氧化硫硫杆菌的基础上，引入可以甲基化或氧化代谢脱毒能力较强的海洋产酸克雷伯菌、海洋无色菌和海洋粪产碱杆菌等多种微生物联合作用，对其进行生物氧化和代谢，以期达到体外生物代谢解毒以及药效增效减毒的目的，这可能会是一个有益的尝试。

6.2　微生物技术在矿物中药创新研究中的应用

6.2.1　微生物浸出技术在提高难溶中药水溶解性研究中的应用

对于大多数药物来讲，制剂多样化，比如采用多种制剂形式如口服、注射、靶

向制剂、膜剂、喷雾和灌肠等形式给药，以此来最大程度地满足临床病人的需要，乃是药物充分发挥疗效的必由途径。但是，在实际应用中，许多有前景的药物，往往受制于水溶性差，不能做成多种剂型来方便临床使用，而在另一方面，其水难溶性也造成生物利用度低，影响了临床疗效的充分发挥，这一点，也是导致某些具有药理活性物质，最终不能成为治疗药物的主要原因。据报道，大约40%以上的新活性物质由于水溶性差、制剂处方工艺复杂、口服生物利用度低等因素，限制了进一步的研究和使用，更有甚者，为了达到提高活性药物溶解性目的，而让病人大剂量服用难溶性的药物，从而直接造成病人的胃肠道刺激，继而造成组织蓄积毒性，从而引发病人中毒死亡。在我国一些难溶矿物中药，比如朱砂、雄黄、石膏、代赭石等，以及一些以这些药物为主要成分的中成药，这一情况就尤为突出，而且业已被世界各国学者普遍重视，一些国家甚至已经制定了严格的法律，开始限制这一类药物的出口，这一严峻的形势，已经大大阻碍了我国中药制剂产品的出口创汇。为此解决难溶中药的溶解性问题也是目前迫切需要解决的问题，而在以往的研究策略中，往往采用选择合适的晶型、超细粉碎、成盐、添加增溶剂、助溶剂、通过改变难溶性药物的分子结构、选用合适的载体等方法，但是中药成分往往比较复杂，而且每一种药物的物理、化学性质差异很大，上述手段不一定完全满足所有药物需要，而且伴随着创新药物的不断发现这种要求则更加迫切。近年来，随着纳米技术、微生物技术和基因技术等的综合应用，越来越多的水难溶解性药物，其溶解性能得到很大程度的提高，例如，利用纳米技术对黄连、珍珠、雄黄纳米化；利用微粉化技术对珍珠、雄黄微粉化；利用微生物对自然铜、雄黄、朱砂的有效浸出等都取得了一些长足的进展，这些技术的渗透为这一领域的研究，提供了新的思路。

6.2.1.1 传统技术

（1）加入辅助溶剂增溶[9] 增溶是指某些药物采用表面活性剂（阴离子型、非离子型）、第二物质（能与药物形成有机分子络合物、有机分子配位物、螯合物、可溶性复盐或分子缔合物等复合物）和混合溶剂（指能与水以任意比例混合、与水分子能形成氢键结合并能增加它们的介电常数）等方式，增加难溶药物溶解度。这些方法，比较简便，往往适合成分明确、结构简单的单一化合物，但是中药成分往往结构复杂，寻找与之制剂相适应的增溶剂，往往比较局限。

（2）制成可溶性盐[10] 复方中药中的有效组分，若按其酸碱性分类，大都可分为弱酸、弱碱两类，如甘草酸、绿原酸等弱的有机酸类成分；小檗碱、粉防己甲素等弱的有机碱类。研究表明，这两类成分以游离状态存在时，大多数在水中溶解度较小，而当前者与碱、后者与酸成盐后，其溶解度将显著增加。所以“成盐”是增加难溶性弱酸、弱碱药物溶解度的重要方法之一。这些措施的采用，对一些有酸碱性的药物提供了比较直接的方法，但是仍不能适用于其他成分的中药，例如萜类、香豆素、甾类等成分，为此，这一方法急需拓展。

（3）制备成固体复合体[11] 将难溶性药物制成固体复合体，也是常用的增加药物溶解度的方法之一。如以聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、聚乙二醇6000与吐温80

混合载体，制备水飞蓟素固体分散体，载药量大，增溶效果显著；冰片制成β-CD包合物后，增溶效果也非常显著；也有将紫杉醇制备成紫杉醇和磷脂酰胆碱/磷脂酰甘油酯的脂质体，使紫杉醇溶解度达1.0～1.5mg/ml。使用这些方法，虽然可以有效增加药物的溶解度，但有些助剂的加入会影响溶液的吸收、生理活性、毒性、刺激性、稳定性，为此，使用固体复合体增溶时，应该同时考虑到其制剂使用的特性。

(4) 磷脂复合物[12] 将天然活性成分与磷脂在一定条件下进行复合，得到天然活性成分磷脂复合物（phytosanes）。难溶性药物与磷脂形成复合物，可使药物的脂溶性显著增强。尽管药物在水中的溶解度并没有提高，实际还有所下降，但是由于磷脂与细胞膜的高度亲和性，可促进药物分子与细胞膜结合而促进吸收，提高药物的生物利用度。吴建梅等[13]制备了黄芩苷的磷脂复合物，选择黄芩苷与大豆磷脂的比例为1∶2.5（质量比），最佳制备条件即在室温下以四氢呋喃为反应溶剂，反应时间为1.5h，其中药物反应浓度为10mmol/ml，经验证其药物结合率为100%。磷脂复合物在大鼠体内的分布特性与黄芩苷类似，在各组织器官均有分布，但在胃液和血浆的分布较多；抗肝损伤活性实验结果表明，半剂量的黄芩苷磷脂复合物与黄芩苷药效相当，黄芩苷磷脂复合物增加了黄芩苷在胃肠的吸收并增强了药效。虽然天然活性成分磷脂复合物有着很好的研究和应用前景，但是由于制备过程中要采用有机溶剂分离方法，对天然产物成分的选择和要求都比较高，目前研究的中药产物的磷脂复合物品种比较少，普及仍有困难。

(5) 纳米中药 随着纳米技术的飞速发展，纳米技术已在药物研究中发挥着越来越重要的作用，中医药也不例外。采用纳米技术对一些难溶药物改造，增加其溶解性、提高生物利用度，也是提高难溶药物水溶性研究的一个崭新的领域。药物在生物体内的起效时间、作用强度和持续时间除了与药物本身的化学结构有关外，还与药物的物理状态密切相关。粒径＜5μm的微粒可以通过肺；粒径＜300nm可进入血液循环；粒径＜100nm可进入骨髓，当药物粒子的粒径在纳米尺寸分布时，粒子的表面积和化学势将显著增大，呈现出新奇的物理、化学和生物学特性。运用纳米技术制备的粒径＜100nm的中药有效成分、原药及其复方制剂往往被称之为纳米中药。

① 纳米粒子。利用现代的粉碎技术（细胞破壁）、化学气象沉积法（在气体状态下发生化学变化形成所需要的化合物，并在保护气体环境下快速冷凝形成纳米粒子）、超临界流体技术（利用超临界快速膨胀法和气体反溶剂法可制备纳米粒子）、固体分散技术（通过物理分散而获得纳米药物粒子）、聚合物纳米粒载体等技术，可以将一些特殊的药物（矿物、天然药物的单体、植物药），制备成纳米粒子。例如Deng等[15]，研究了不同粒径（100nm、150nm、200nm、300nm）的雄黄纳米粒子对人脐静脉内皮细胞（ECV304）细胞存活率、凋亡的影响。结果表明，随着雄黄纳米粒子粒径的减小，其相对应的凋亡率增强，表现出了突出的尺寸效应。

② 微乳。Danielsson和Lindman 1981年提出，微乳（microemulsion，ME）就是由水、油两性分子组成的光学上均一，热力学上稳定的液态溶液。其乳滴的粒

径只有 10～100nm，近年来在药学上的应用越来越广泛。O/W 型微乳是水难溶性药物的良好载体，它对药物的增溶作用显著。例如，水飞蓟素为水难溶性药物，口服生物利用度低。李馨儒等[14]制备了水飞蓟素自微乳化浓乳，并以市售水飞蓟素胶囊为对照，结果发现，水飞蓟素微乳可迅速自发形成粒径均匀、液滴呈球形的微乳，且长期放置的稳定性良好，体外释放特征和家犬体内生物利用度均优于市售水飞蓟素胶囊。

③ 固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticle，SLN）制备技术。它是近年来正在发展的一种新型给药系统。SLN 采用生理相容耐受性好的类脂材料为载体。将药物包裹于类脂核中或吸附于纳米粒表面形成固体胶粒给药体系。SLN 主要用于静脉给药，达到靶向或控释作用，也用于口服给药，以控制药物在胃肠道内的释放。紫杉醇是新颖的抗肿瘤生物碱，属水不溶性药物，单纯口服的生物利用度几乎为零。而目前临床制剂泰素帝，是将紫杉醇溶于聚氧乙烯蓖麻油与无水乙醇 1∶1 的混合液中，但是在稀释时由于溶剂的转换，紫杉醇容易析出，并且泰素帝引起的过敏反应已经被证实是来自于其增溶剂聚氧乙烯蓖麻油，同时增溶剂还导致静脉输液袋和输液管的塑化剂渗出。因此有必要改善紫杉醇的水溶性问题，改变制剂方式，同时避免增溶剂引起的过敏反应。刘敏等研制了紫杉醇新型纳米载体——紫杉醇纳米脂质载体（TAX-NLC），采用高压乳匀法，以硬脂酸∶胆固醇∶卵磷脂∶玉米油为 100∶25∶5∶6（w/w），表面活性剂浓度为 1%（w/v），乳匀压力为 60 psi（1psi＝6894.76Pa），在此条件下得到 TAX-NLC。此方法制备的 TAX- NLC，平均包封率分别为 68.78%±0.02（n＝3）和 81.27%±0.03（n＝28），平均载药量分别为 1.44%±0.02（n＝3）。激光共聚焦显微镜观察到荧光标记的 TAX-NLC 能够进入肿瘤细胞中，发现细胞对 TAX-NLC 的摄取存在主动转运机制，NLC 改变了紫杉醇被动转运的机制，同时用核素示踪法定量观察了口腔上皮癌 KB 细胞株摄取 TAX-NLC 的情况，发现细胞内浓度可以达到胞外浓度的 29 倍，NLC 的载带使紫杉醇在胞内富集，起到了靶向的作用[16]。

但是，目前纳米脂质载体对中药难溶制剂的研究刚刚起步，由于中药成分复杂，每一种药物的溶解特性都不相同，选择可用纳米脂质载体的药物仍旧比较有限。目前的方法只局限于单体化合物，而且处理的药物剂量较小，加之制备需要的大型设备，普及仍有相当困难。虽然应用纳米技术，一些难溶性中药的研究已经取得了一定的进展。但是，这些技术在应用过程中存在以下问题。①纳米中药的毒副作用：由于纳米材料的特殊性，除了可穿透靶器官，同样也可穿透正常的细胞器和机体的屏障系统，是否会影响中枢神经系统，精子的生成及其活力、胎儿的发育等，这些问题均无法回避。急需深入研究。②纳米中药的制备：纳米技术需要专业的技术和设备，而且纳米设备的投入较高，加之技术比较繁杂，制备需要专业人员，因而普及尚有困难。而在另一方面，药物制成纳米微粒后，往往是混悬液入药，其药理活性成分和毒性成分难于认识清楚，造成了药理、毒理和制剂改进困难，急需寻找更加理想的方法，做深入的研究。

综上所述，将纳米技术应用于传统的中医药，在一定程度上提高了难溶药物的

溶解性、提高了中药的生物利用度，丰富了中药剂型。但是由于其处理方式仍局限于混悬液形式，往往难于认识药物真正的作用，目前我国的中药创新研究正在兴起，新的交叉学科对中药领域不断渗透和影响，必将给中药的改革和创新提供新的方法和思路。而在难溶矿物中药这一领域，最近又有一些新的进展，其中应用微生物浸出技术对一些极其难溶药物如雄黄、朱砂、自然铜和石膏等的研究引发了众多研究者的关注，并取得了一定的进展，现介绍如下。

微生物浸出技术：利用一些特殊的微生物，对药物的生物氧化或代谢的促进作用，促进这些难溶中药的溶解，形成完全溶解的溶液。这种方法最大的优点是，不仅能够提高难溶药物的溶解性，提高其生物利用度，而且由于其提供的形式是溶液形式，为药物的药理作用研究、活性成分提取，诠释药效、毒性和活性之间的关系创造了一个研究基础，提供了一个全新的技术方法，这种方法处理的药物可以是难溶的化合物、药物甚至一些有毒的矿物中药，极大拓展了难溶药物研究的范围，创造出了一种全新的药物前处理技术。该技术成本低廉，产量大，工艺简单，对人体和环境无害，无需专业的技术人员，极易普及，现将我们课题组，针对矿物中药雄黄、朱砂、自然铜的研究总结如下。

雄黄的主要成分为 As_2S_2 和/或 As_2S_3，是一种药用的硫化矿物，水溶性极低。长期以来，一直是以粗大的矿物原粉入药，不仅会因服用剂量过大，给患者带来不便，而且长期服用往往引发砷在组织中大量蓄积，进而引发毒性，严重影响了其在体内的吸收和分布。目前，虽已尝试利用纳米技术、微粉化和微射流等方法将传统的雄黄加工至纳米级尺寸，这些方法，虽在一定程度提高了雄黄的生物利用度，但由于是混悬液入药，仍然存在有效成分不明确、不能完全溶解、体内作用不清等原因造成研究困难，这些现状都严重地制约了雄黄进一步的开发和临床应用。为此，本课题组成功地利用多种微生物浸出和海洋微生物转化或代谢技术，生物溶解雄黄，提高了雄黄中有效砷的溶出含量。通过比较发现，雄黄在微生物作用下，其中砷在水溶液中的溶解量提高了 150 倍（0.52μg/ml→ 79.08μg/ml），初步的药效学试验也已证实，雄黄微生物溶解液具有良好的抑制多种肿瘤细胞增殖的效果，研究发现，雄黄溶解液药代动力学参数与砷酸组接近，其中砷在大鼠各组织中的蓄积量大幅度降低，几乎没有分布，与砷酸相比具有显著的差异。雄黄经生物溶解后，以无机砷或有机砷的形式存在，与对照组相比，砷的形态成分发生明显变化，药物生物利用度明显提高，砷在组织中几乎没有蓄积。这一结果为微生物技术在研究、开发雄黄的应用方面提供了有力依据。

朱砂是常用的镇静安神药，最早在《神农本草经》中就有记载，朱砂的药用成分是一种硫化物矿石，其中硫化汞（HgS）是其主要化学成分，溶度积为 1×10^{-52}，因而是一种极难溶的化合物，在水中几乎不溶，生物利用度极低，现行的工艺难于解决其难溶性问题，造成制剂研究和改进困难，目前的现状只能以未溶解状态的粗糙矿物原粉入药，造成用量大、毒性严重超标，常有使用朱砂造成不良反应者。因而朱砂和含朱砂中成药在国际市场上受到了限制。苏丽春、张景红研究小组，采用氧化亚铁硫杆菌对矿物中药朱砂进行微生物溶解，制备朱砂微生物提取

液，其水溶解性分别是水飞朱砂混悬液（将药物粉末 1g 分散于水溶液中）、酸＋水飞溶液（将药物粉末 1g 分散于水溶液中和 20％稀硫酸溶液）的 150 倍和 15 倍，与此同时，朱砂浸出液的小鼠动物实验结果证明，朱砂浸出液能和水合氯醛及戊巴比妥钠协同作用促进小鼠的睡眠率，能显著缩短睡眠潜伏期，也能明显延长戊巴比妥钠的睡眠时间。抑菌实验中，朱砂浸出液具有很好的抑菌作用，在相同汞离子浓度下比升汞的杀菌效果好，革兰阳性菌和革兰阴性细菌对朱砂浸出液高度敏感，小鼠各组织器官内未检测出汞。

自然铜（Pyritum）是常用的一种理血接骨药，首载于《开宝本草》，其药用已有 1000 多年的历史，主要成分二硫化铁（FeS_2），是一种极难溶的化合物，现行的工艺比如煅制、醋（水、酒、姜汁）难于解决其难溶性问题，造成服用和制剂困难，目前的现状只能以未溶解状态的粗糙矿物原粉入药，造成用量大、活性成分难以发挥以及传统炮制工艺劳动强度大、效率低、需要高温设备、污染环境、严重影响操作员的身体健康等诸多问题。庞仁俊、张景红研究小组，分别采用氧化亚铁硫杆菌和海洋微生物 HQ-12 对矿物药自然铜进行微生物浸出，制备微生物自然铜浸出液，浸出实验表明，氧化亚铁硫杆菌能够很好地氧化、代谢自然铜，其水溶解性显著提高，是醋煅＋水飞自然铜混悬液的 50 倍，与此同时促进铁、铜、锰、锌、硒等人体所需的微量元素的有效溶出。药效学试验证明，自然铜浸出液能够提高骨折大鼠血清的碱性磷酸酶活性、钙离子浓度、磷离子浓度，并且能促进大鼠骨折处骨组织的生长。

如何增加难溶性药物溶解度是目前药剂研究的一个热点。在药物筛选中，很多体外药理活性很高的药物大多为难溶性药物，要对其进行开发创新，必须增加其溶解度，解决制剂困难。近年来，在传统研究方法的基础上，引入交叉学科的技术，如纳米、微生物浸出技术、海洋微生物代谢等技术，已经显示出了较好的前景。难溶中药的研究范围业已从单一的化合物和植物药单体，拓宽到有毒矿物中药的研究中，而且其解决的方法也从原来单一的物理化学方法拓展到纳米和一些新型的微生物技术，制剂的工艺和设备也越趋简单、普及和经济；而且难溶药物转化为水溶液后，为难溶中药的创新研究（药效、毒性、分离分析研究等）开辟了一个全新的研究视野，我们有理由相信，这些技术和手段也必将在我国中药宝库的发掘中发挥巨大作用。

6.2.2 海洋微生物代谢技术在中药炮制研究中的应用

6.2.2.1 新的留毒增效理论和技术

尽管有毒中药饮片具有不良反应或毒副作用，国际上也有一些“马兜铃”、“小檗碱”和“含雄黄和朱砂”的中成药中毒事件，但临床上常常必须利用药物的独特作用治疗或控制一些疾病，例如，在中医理论上自古就有以毒攻毒治疗癌症、病毒、疮证的治则和方法。例如，雄黄，其主要成分是硫化砷，在以往的炮制策略中采用水飞、水飞＋醋淬、水飞＋盐制、水飞＋碱制、水飞＋酸奶飞等去除可溶性砷



的办法，以减轻它的毒性作用，可是仍有大量的中毒反应发生，国内学者也针对这类药物开展了组方、纳米制剂改造、化学精制减毒等系列研究，取得了一些成绩，但是仍未从根本上解决减毒增效问题，一些学者甚至提出去除这一组分，以此来缓解临床中毒现象的发生，为此，一些矿物中药（朱砂、雄黄和自然铜）面临着严重的生存危机。而张景红、苏丽春、庞仁俊小组的研究，为这类药物的研究，提供了一个全新的思路，他们成功地利用试验室分离的浸出用细菌氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌以及二者的混合菌，对雄黄、朱砂和自然铜进行了微生物的炮制研究，证明可以通过微生物特殊的氧化作用，有效地促进药物的溶出，提高了药物的生物利用度。与传统炮制方法相比，微生物炮制液在抗肿瘤、抗菌和促进骨质愈合方面表现出了更强的药物效应，微生物的炮制起到了增效的效果。而在另一方面，减毒研究中也同时发现，在动物给药剂量范围内，没有发生动物体内的蓄积毒性。为此，可溶的砷、汞既是活性成分又是毒性成分，溶解的砷、汞是一种“双刃剑”，而现行药典方法，仅仅限制可溶性砷、汞的含量，我们认为，建立在减少可溶性砷基础上的炮制理论存在严重质疑，对于有毒中药来说，其毒性成分可能就是其活性成分，不能单纯减少某种有毒元素的量作为炮制依据，为此，我们提出“留毒增效”的炮制理论，“留毒增效”这一炮制原理是指，保留具有药理活性的毒性元素的含量，通过微生物对其炮制，控制有毒元素的形态变化，使毒性较强形态元素的含量减少、效应增强形态元素的含量增强，以此达到留毒增效的目的。

6.2.2.2　海洋微生物炮制中药雄黄及其减毒增效的思路和方法

许多海洋微生物，在微生物分类上与体内参与肠道代谢微生物同属一个菌群，体外应用这种海洋微生物炮制雄黄，通过体外微生物的氧化、代谢作用，以及作用后所产生的雄黄各种不同的形态成分，与体内肠道微生物代谢雄黄所产生的各种形态作用成分有很强的可比性。而在我们课题组的前期研究中发现：雄黄的毒性与其摄入雄黄的代谢砷的化学形式及价态密切相关，不同化学形态的代谢砷在机体内所表现的药理活性也不尽相同。为此，我们认为，科学地利用微生物技术产生毒性和或药效相关的雄黄氧化溶解或微生物甲基化代谢后的各种价态的砷化合物，是定量控制炮制雄黄减毒增效工艺的关键所在。而在这一技术中，要求选择的微生物，同时具有氧化溶解雄黄和微生物甲基化代谢砷的能力，尽管在以前的研究中发现，浸矿微生物具有氧化和溶解雄黄的能力，但由于其微生物甲基化的能力较弱，微生物甲基化减毒的效果较差，往往会造成溶解后毒性增大的客观现象。据此，在本课题组后期研究中，我们选择了甲基化代谢砷能力较强的海洋微生物，如棒杆菌、海水产碱菌和有色菌等海洋微生物氧化溶解雄黄和微生物甲基化代谢溶解砷，海洋微生物作用于雄黄的原理可大致表述为：

$$\text{雄黄}\xrightarrow[\text{排硫氧化}]{\text{细菌作用}}\text{溶解后各种无机砷价态}\xrightarrow[\text{甲基化}]{\text{细菌作用}}\text{代谢后各种有机砷价态}$$

根据海洋微生物氧化能力和代谢能力的不同，可以在微生物炮制雄黄的过程中产生雄黄的各种形态，为研究和筛选雄黄炮制后的毒性和药效成分建立理论研究基础。而在以往的研究中发现，无机砷酸盐($iAs^{Ⅲ}$)或有机砷（Ⅲ）的毒性均大于

As_2O_3，为此，控制炮制雄黄过程中Ⅲ价态的砷化合物，是开展雄黄炮制减毒研究的基础。而目前应用的化学和生物技术方法，往往通过加入一些氧化剂辅助（Fe^{3+}等）来加速这一过程，这种处理的方法所加入的辅助元素往往会干扰雄黄炮制过程中对毒性或药效目标成分的研究。为此，我们课题组，在现在的研究中，之所以采用一些特殊的海洋微生物，主要依据在于海洋微生物具有独特的氧化毒性较大的无机砷酸盐（$iAs^{Ⅲ}$）或有机砷（Ⅲ）转变为毒性较小的无机砷酸盐（$iAs^{Ⅴ}$）或有机砷（Ⅴ）的作用，这一全新的思路，为海洋微生物炮制减毒提供了全新的理论基础。而在另一方面，海洋微生物具有独特的、氧化、甲基化代谢的能力，可以产生雄黄炮制后的各种形态，这一点也为海洋微生物炮制矿物中药的增效提供了全新的理论基础。以往的研究表明，$iAs^{Ⅲ}$或$iAs^{Ⅴ}$是As_2O_3治疗慢性白血病和其他实体瘤的化疗药物的有效成分，而$MMA^{Ⅴ}$和$DMA^{Ⅴ}$也被认为是$iAs^{Ⅲ}$或$iAsI^{Ⅴ}$主要代谢脱毒的甲基化产物，而$DMA^{Ⅴ}$、$MMA^{Ⅴ}$同样具有诱导白血病细胞凋亡的生物活性，建立在这些试验基础上，我们有理由推测，同时产生表现药效增强和毒性减少的$iAs^{Ⅴ}$和或$MMA^{Ⅴ}$和或$DMA^{Ⅴ}$等各种形态成分，就可能会产生雄黄炮制后的减毒、增效的结果。通过上述前三点分析，可以看出，海洋微生物完全具备炮制雄黄产生$iAs^{Ⅴ}$和或$MMA^{Ⅴ}$和或$DMA^{Ⅴ}$的理论和应用基础，用海洋微生物炮制雄黄来达到雄黄减毒和增效的目的从理论上是完全可行的，有实际应用的价值，这不仅是我们课题组正在进行研究的一个重要方向，与此同时，也为海洋微生物在矿物中药创新研究中的应用，提供了重要的发展方向。

6.3 应用实例

6.3.1 雄黄微生物溶解液药物动力学研究

6.3.1.1 仪器与色谱条件

ICP-AES，中阶梯光栅一棱镜交叉色散系统，波长范围175～800nm，CID二维电荷注入式固体检测器，仪器最佳工作条件：As的分析谱线189.04nm，功率1350W，频率27.12MHz，雾化压力151.68kPa，提升量1.85ml/min，辅助气流量1L/min，积分时间（短波20s，长波10s），将一系列含有2.0mol/L盐酸的As标准溶液和1.5%$NaBH_4$-0.5%NaOH溶液分别由蠕动泵的两个通道同时泵入“Y”形反应管中，反应生成的砷烷由氩气载入ICP火焰。以砷信号强度-砷浓度作标准曲线，计算所测的砷的浓度。MILESTONE-1200MG，温度为60℃，时间共设两档，分别为20min和30min。微波功率750W，压力为2.0MPa。

6.3.1.2 药品配制

（1）雄黄微生物提取液（RBS）[4] 在100ml改良9K培养基[$(NH_4)_2SO_4$，3.0g；KCl，0.1g；K_2HPO_4，0.50g；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.50g；$Ca(NO_3)_2$，0.01g；$FeSO_4 \cdot 7H_2O$，1g；蒸馏水，1000ml；pH1.8]中加入1g雄黄，同时按10%接种量

接种海洋硫杆菌 HQU-J-1(3×105)，接种于 100ml 摇瓶，调节 pH 至 1.8，在 30℃，转速为 160r/min 的生物摇床上进行摇瓶浸出试验，浸出期间定期调节溶液 pH，并补充一定的水分，28 天后停止，减压抽滤收集上清液，调节溶液 pH 至 7 左右，过 0.22μm 滤膜除菌得雄黄微生物溶解液备用。临用前用生理盐水稀释至提取液中砷的含量为 60μg/ml 备用。

(2) 砷酸溶液 (ATO)　取 As_2O_3 适量，用 1.0mol/L NaOH 溶解至浓度为 0.5mol/L 溶液，并用 0.1mol/L HCl 调节 pH 值为 7.0，配制砷酸储液。实验前用 0.9%的生理盐水稀释，稀释至提取液中砷的含量为 60μg/ml 备用。

6.3.1.3　给药方案与样品采集

(1) 大鼠的用药剂量　按照人临床用药 (砷酸) 剂量 10mg/人[8]进行换算，大鼠等效剂量(350g)=(Xmg/70kg×6.3)×1.75×0.2，其中按照体表面积计算，体重为 200g 的大鼠和人 (体重 70kg) 等效剂量折算系数为 6.3，1.75 为老鼠体重之间折算系数 (350/200)，0.2 为砷酸的稀释倍数 (10/50)，X 为人临床使用的雄黄剂量，计算结果，砷酸组大鼠给药剂量应为 (含砷量 0.3mg/kg)，RBS 给药组同样采用 0.3mg/kg (含砷量 0.3mg/kg) 剂量，大鼠腹腔注射给药。

(2) 血样样品　350g 左右的清洁级大鼠 72 只，随机分为两组：RBS (实验组) 和 ATO (对照组)。每一组各 36 只，每一组又随机分为 6 个小组，每小组各 6 只，禁食 12h。分别按雄黄微生物溶解液 (ip，0.3mg/kg，含砷量 0.3mg/kg) 和砷酸 (ip，0.3mg/kg，含砷量 0.3mg/kg) 给药，于给药前、给药后 0.25h、0.50h、1h、2h、4h、6h、8h、12h、16h、24h、36h、48h，从大鼠心脏采血 0.5ml，置于肝素抗凝试管内充分摇匀，密闭，−20℃保存至测定。其中第 1、第 2 只大鼠给药前及给药后 1h，6h，16h 采血；第 3、第 4 只大鼠给药后 0.25h、2h、8h、24h 采血；以此类推。每组 6 只大鼠完成一条药时曲线的采血。每个试验组每个采血点具有 6 个数据。

(3) 组织采样　350g 左右的清洁级大鼠 72 只，雌雄各半，随机分为两组：RBS (实验组) 和 ATO (对照组)。每一组各 36 只，每一组又随机分为 6 个小组，每小组各 6 只，禁食 12h，分别按雄黄微生物溶解液和砷酸实验组给药，于给药前、给药后 6h 后，断头处死，解剖取脏器组织，包括心脏、肝、脾、肺、肾和脑。用生理盐水冲洗各脏器组织，滤纸吸干水分，−70℃保存，测定前取出组织样本，解冻，称质量，剪碎，微波消解后测定。

6.3.1.4　样品处理方法

血药样品 0.5ml，放入试管内，加 2ml 现配消化液 (HNO_3 ∶ H_2O_2=5 ∶ 2)，消解至澄清，随后转移到 25ml 容量瓶中，加入超纯水定容 25ml，作为血液样品储备液。组织脏器样品 0.5g，放入聚四氟乙烯的溶样罐，加 5ml 现配消化液 (HNO_3 ∶ H_2O_2=4 ∶ 1)，按操作要求装好微波消解装置，放入消解器进行消解。温度为 60℃，时间共设两挡，分别为 20min 和 30min，消解完毕后，自然冷却至常温后取出，定容至 50ml 作为样品检测液。

6.3.1.5 样品中砷的形态分析

分别取 RBS 和 ATO 药物溶液，用 0.45μm 微孔滤器过滤后，取滤液 200μl，采用高效毛细管电泳仪，测定各种样品的电泳色谱，确证其中砷的各种形态。

毛细管电泳鉴定色谱条件采用优化条件 BGE：PDC 10mmol/L 和 CTAOH 1mmol/L。分离条件：电压 25kV，温度 25℃，pH11.0，紫外检测波长设定在 216nm，iAs^{V}、MMA^{V} 和 DMA^{V} 的储液浓度均为 1000μg/L±5μg/L，iAs^{III} 的储液浓度为 1000μg/L± 5μg/L。

6.3.1.6 数据统计分析

应用 kinetica 5.0 药代动力学软件，对药时曲线进行房室或非房室模型拟合，求出药代动力学参数。采用 3P97 软件，进行生物等效性分析，采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计分析。

6.3.1.7 结果

① 全血标准曲线。分别取正常大鼠空白抗凝全血 0.5ml，再分别加入砷标准储备溶液，使全血中药物浓度分别为 0.04mg/L、0.2mg/L、0.4mg/L、0.8mg/L、1.6mg/L 同“6.3.1.5”项下处理。

② 组织标准曲线。按照“6.3.1.4”项下方法，取正常大鼠组织（心脏、肝、脾、肺、肾和脑组织）各一份，每份 0.5g，混匀后加生理盐水在冰浴中制成匀浆。分别称取组织匀浆液 0.5ml，加入 50ml 三角瓶中，再分别加入砷标准溶液，使其中砷含量分别为 0、0.2μg、0.4μg、0.8μg、1.6μg，同“6.3.1.5”项下处理。在选定的最佳工作条件下，以砷信号强度（Y）-砷浓度（X）作标准曲线，进行线性回归，分别得到标准曲线如下：全血 $Y_b = 0.2701X_b + 0.0040$（$r=0.9998$）；组织 $Y_g = 0.0269X_g + 0.0006$（$r=0.9999$），线性范围：0.04～1.6mg/L。以信号/噪音=3 计算，全血中最低检测限为 0.01mg/L。

③ 精密度实验。分别取 0.04mg/L、0.4mg/L、1.6mg/L 三种浓度砷全血样品，同“6.3.1.5”项下处理并测定药物浓度，测定后置室温保存，每种浓度平行作 5 份，计算日内差异；于第 1、第 2、第 3、第 4、第 5 天重复测定，计算日间差异。结果表明，在上述 3 种浓度下，日内 RSD 分别为 3.6%、2.4%和 1.6%；日间 RSD 分别为 4.1%、3.4%、1.8%；按前述方法处理样品并测定其中药物浓度，结果表明，在上述 3 种浓度下，组织日内 RSD 分别为 2.6%、3.1%和 2.8%；组织日间 RSD 分别为 3.3%、5.7%和 4.6%。

④ 准确度实验。分别取 0.04mg/L、0.4mg/L、1.6mg/L 三种浓度砷全血样品，同“6.3.1.4”项下处理，每种浓度平行作 5 份，其结果按标准曲线法计算浓度，所得浓度与实际浓度的比值即为回收率。结果表明，在上述 3 种浓度下，全血样品的相对回收率分别为（91.2±2.9）%、（90.6±3.8）%、（93.6±3.2）%。按前述方法处理样品并测定其中药物浓度，结果表明，在上述 3 种浓度下，组织相对回收率分别为（98.1±5.3）%、（100.3±3.8）%、（97.2±2.9）%。

⑤ 药物稳定性考察。4 只大鼠，雌雄各半，分别按雄黄微生物溶解液（ip，0.3mg/kg，含砷量 0.3mg/kg）和砷酸（ip，0.3mg/kg，含砷量 0.3mg/kg）给药，6h 后心脏采血或取组织，各自样品混匀后分装于 12 支试管中，立即取其中 3 管按样品处理同“6.3.1.4”项下处理程序操作后，进行测定。将余下 9 管置于 −20℃保存，分别于第 3、第 5、第 8 天时取出 3 管进行测定。结果表明，血液或组织样品保存后与立即测得的浓度差别≤5%，表明血液或组织样品稳定性良好。

⑥ 样品测定中的质量控制样品。实验中样品进行每次药物浓度测定时，同时制备低、中、高浓度的质量控制样品，随行分析。若质控样品的相对误差超过 20%，则重新制备标准曲线。结果表明，质控样品变异均≤10%。

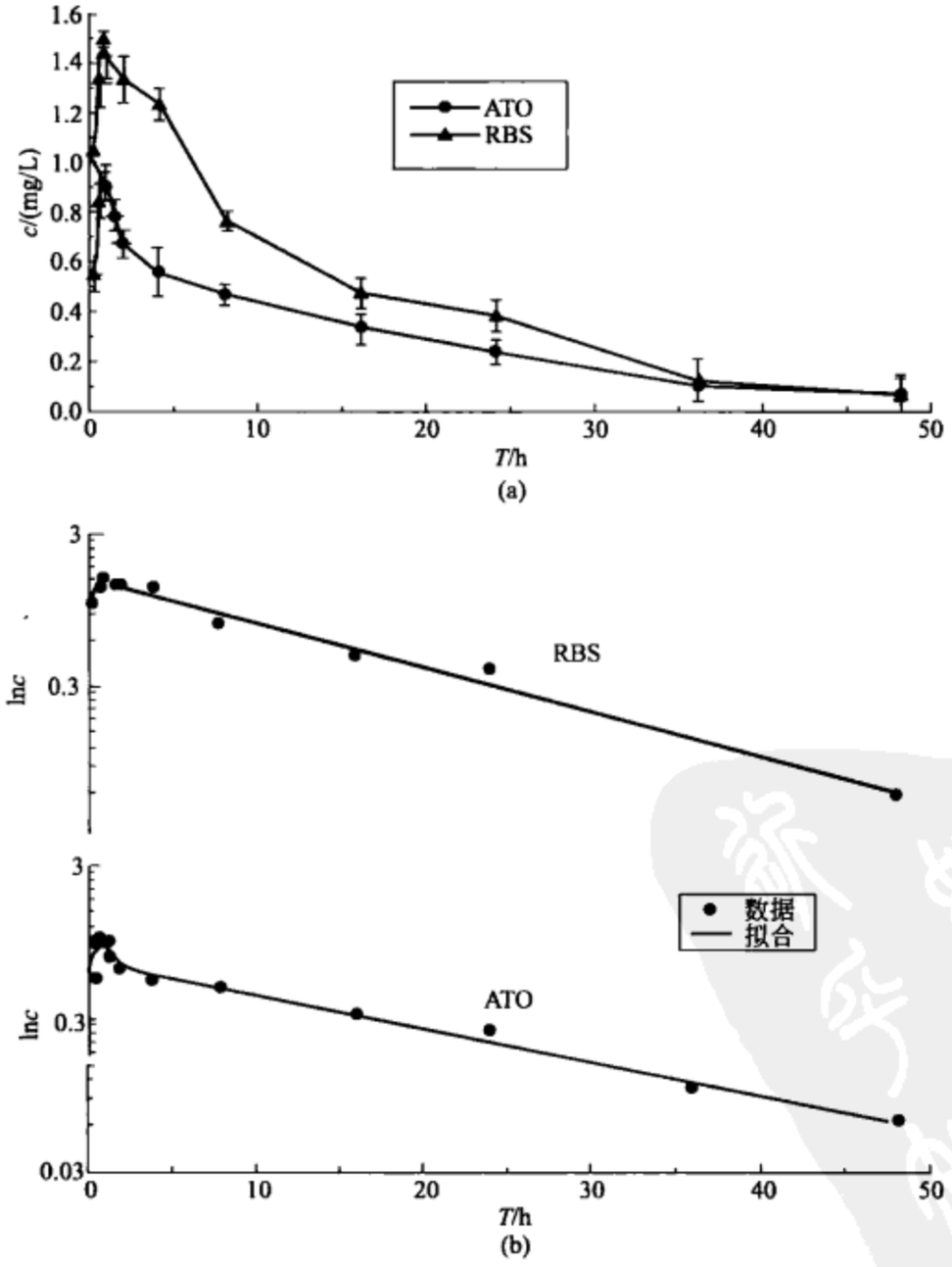


图 6.3-1　给药组［雄黄微生物溶解液（RBS）和砷酸（ATO）］药时曲线（a）和拟合药时曲线（b）ln$c$-T 图

RBS--雄黄微生物溶解液腹腔注射（含砷量 0.3mg/kg）；

ATO—砷酸腹腔注射（含砷量 0.3mg/kg）（$\overline{X}\pm S$，$n=6$）

⑦ 大鼠给药后药代动力学结果分析。两组药物［雄黄微生物溶解液（RBS）和砷酸（ATO）］分别按照“6.3.1.3”项下的剂量和时间分别给药，各组大鼠给药后不同时间点取血，测定血浆药物浓度，绘制各时间点平均药时曲线［图 6.3-1(a)］。采用 kinetica 5.0 药代动力学软件对药-时数据进行拟合处理［图 6.3-1(b)］，计算各组药代动力学参数见表 6.3-1，结果显示，两组药时曲线分别符合一室（RBS）和二室（ATO）房室模型，权重系数分别为：C/1（RBS）和 C/1* C/1（ATO）。由于两组药物药代动力学参数，按照房室模型计算，具有显著差异。为此，本文进行非房室拟合，分别计算 RBS 和 ATO 组各种主要药代动力学参数，采用 SPSS 软件进行数据统计分析，比较各组药代动力学参数的差异。结果表明，雄黄经微生物溶解后，其药代动力学参数发生了改变，在含砷量相同的条件下，雄黄微生物溶解液与 ATO 组动力学参数变化比较相似，但其 c_{max}、AUC_{0-t}、$AUC_{0-\infty}$、$AUMC_{0-t}$、$AUMC_{0-\infty}$ 值的变化，明显高于 ATO 组（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），两组药物 MRT_{0-t} 和 $MRT_{0-\infty}$ 没有明显变化，其 c_{max}/AUC 则没有显著的差异。

表 6.3-1　给药组［雄黄微生物溶解液（RBS）和砷酸（ATO）］药代动力学参数表（$\overline{X}\pm S$，$n=6$）

房室模型	参数	给药组	
		RBS	Arsenic acid
非房室	c_{max}/(mg/L)	1.49 ±0.08①	0.95±0.06
	T_{max}/h	0.75±0.12	0.75±0.08
	AUC_{0-t}/(mg·h/ml)	21.92±1.11①	13.09±1.68
	$AUC_{0-\infty}$/(mg·h/ml)	22.79±2.18①	14.30±2.36
	c_{max}/AUC	0.07±0.01	0.07±0.02
	$AUMC_{0-t}$/(mg·h/ml)	301.71±6.32②	197.42±4.29
	$AUMC_{0-\infty}$/(mg·h/ml)	356.74±9.23②	269.76±3.49
	MRT_{0-t}/h	13.76±2.46	15.09±2.86
	$MRT_{0-\infty}$/h	15.65±1.21	19.56±1.31

① RBS 与 ATO 组相比 $P<0.05$。

② RBS 与 ATO 组相比 $P<0.01$。

⑧ 大鼠给药后砷在组织中分布结果分析。两种给药组，砷在大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑中的分布情况，分析结果见表 6.3-2。从表中可以看到，两组药物给药 6h 后，砷在各组织中的分布情况有明显变化。砷酸给药后，其中砷在各种组织中仍有蓄积，值得注意的是，采用微生物溶解的雄黄溶解液，其中砷在各个组织分布极少，几乎没有蓄积，与对照给药组相比，具有非常显著差异（$P<0.01$）。

表 6.3-2　给药组［雄黄微生物溶解液（RBS）和砷酸（ATO)］给药 6h 后，砷在大鼠脏器内的分布/(ng/g)（$\overline{X}\pm S$，$n=6$）

药物组	心脏	肝	脾	肺	肾	脑
RBS ip	0.02±0.01①	0.04±0.02①	0.05±0.02①	0.03±0.01①	0.08±0.03①	0.00±0.00①
ATO ip	16.12±1.35	89.38±7.32	98.61±6.21	10.16±2.08	98.48±6.18	16.46±2.39

① RBS 与 ATO 组相比，$P<0.01$。

⑨ 生物等效性评价[10]。以ATO组为参比，对雄黄微生物溶解液的药代动力学参数 AUC_{0-t}、$AUC_{0-\infty}$、c_{max}经对数转换后进行方差分析，结果显示，与ATO组相比，两组 $lnAUC_{0-t}$、$lnAUC_{0-\infty}$ 和 c_{max} 的差异具有统计学意义（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）。经双单侧 t 检验及90%置信区间分析结果（表6.3-3）表明，雄黄微生物溶解液与ATO相比具有生物等效性。

表6.3-3　雄黄微生物溶解液（RBS）和砷酸（ATO）溶液生物等效性分析

试　验	RBS-ATO		
	$lnAUC_{0-t}$	$lnAUC_{0-\infty}$	lnc_{max}
T_{x_1}（$t_{1-0.05}=2.92$）	34.37	28.51	14.73
T_{x_2}（$t_{1-0.05}=2.92$）	35.35	29.09	15.65
90% upper limit of confidence interval	98.00	97.80	95.60
90% lower limit of confidence interval	101.40	101.80	103.20

⑩ 样品中砷的形态分析。取待测各药品溶液，按优化好的电泳条件进样分离，电泳色谱分离效果见图6.3-2，通过比较可以看出，两种药品所含砷的种类部分相同（iAs^{V}）。与对照药物砷酸相比，雄黄微生物溶解液所含砷形态成分明显增加，同时含有两种形态的砷化合物（iAs^{V} 和 MMA^{V}）。

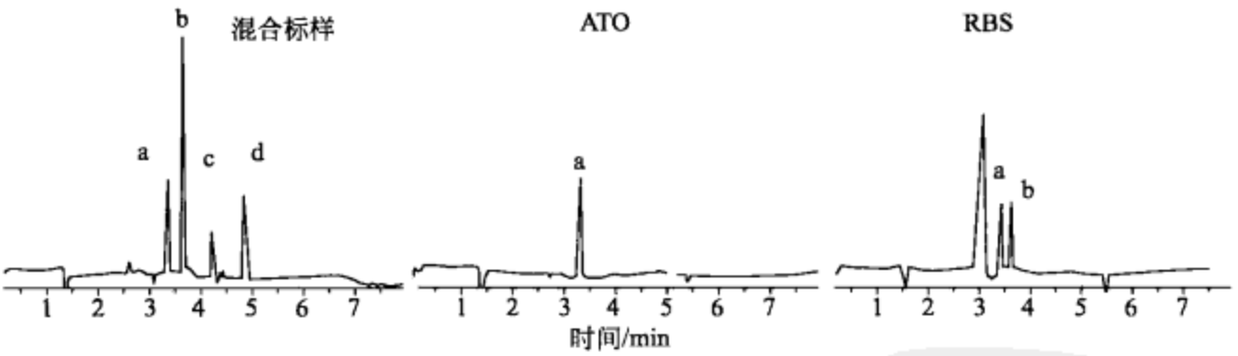


图6.3-2　毛细管电泳分离色谱图

(a) iAs^{V}（3.354min）；(b) MMA^{V}（3.650min）；(c) iAs^{III}（4.217min）；(d) DMA^{V}（4.825min）。电泳条件 BGE：PDC10mmol/L 和 CTAOH1mmol/L，分离条件：pH11.0，电压 25kV，温度 25℃。紫外检测波长设定在 216nm，混合标样浓度分别为 9mg/ml

6.3.1.8　讨论

雄黄微生物溶解液砷在体内代谢过程符合一室模型（权重 C/1）、而对照组（ATO C/1* C/1），为二室开放模型。这表明雄黄制成生物溶解液后可能会引起其在动物体内的药代动力学模型的改变。在含砷量相同的条件下，同属砷剂的雄黄制成溶解液后，体内可溶解砷的吸收情况与砷酸（溶解砷的主要方式）变化趋势比较类似，与砷酸比较，其生物利用度显著提高。而二者 c_{max}/AUC 无显著差异[10]，生物等效性分析结果表明，二者等效。由此推测，雄黄中砷生物溶出后的药物吸收规律，符合含可溶砷化合物的代谢规律。但是，在药物的分布方面，却表现了一定

的差异，与砷酸相比，在其生物利用度提高的同时，砷在组织中分布的含量大幅度降低，在心、肝、脾、肺、肾、脑等组织的分布极低，几乎没有蓄积。对砷酸来说，其中可溶砷，属于二室模型，砷在上述组织则都有分布，其中肝和肾含量为最多。这一实验结果与 Lindgren 的研究报告是一致的。报告指出，小鼠以静脉注射途径给予不同价态（Ⅲ，Ⅴ）的砷后，一开始时在肝、胆、肾中浓度最高，并且很快地从这些器官中消除。静脉注射^{76}As-氧化砷（Ⅲ）（0.1～0.2mgAs/kg）10min 和 1h、6h、48 h 后，在小鼠的肝、肾组织内，每克组织所含^{76}As 的含量最高[12]。而在本实验中，在含有相同砷剂量条件下，雄黄微生物溶解液中砷在大鼠脏器组织中的分布与砷酸截然不同。本文推测，这可能与二者药品中砷的赋存形态差异有关。比较巧合的是，雄黄溶解液含有 As^{V} 和 MMA^{V} 两种价态，而砷酸溶液在溶液中只有 As^{V} 一种价态。按照生物体内砷的代谢机制，As^{V} 中有 50%～70%的量，很快地还原为 $As^{Ⅲ}$，并很快由血液进入肝脏甲基化，再经肾脏排泄体外[13]。Buchet 的研究指出，MMA^{V} 按照静脉方式给药，仅以 MMA^{V} 原型经尿液排出体外。与砷酸不同的是，雄黄溶解液含有 40% MMA^{V}[15]，这一形态成分的存在有可能对雄黄中可溶性砷的分布过程产生影响，这一点，也可能是雄黄溶解液在肾、肝和肺等组织中分布比砷酸少的主要原因。雄黄溶解后，其中成分不仅含有可溶性砷，而且还包括砷在体内代谢减毒后的产物（MMA^{V}），由此说明，砷形态成分的变化可能与其组织蓄积量密切相关。控制溶解砷的形态成分，则有可能降低砷在动物组织中的蓄积量，进而降低由此引发的毒性反应。为此采用微生物技术，溶解雄黄，产生微量、组织蓄积量较小的各种形态的溶解砷[16]，代替组织蓄积毒性强的粗糙雄黄，可能为雄黄的减毒研究提供了一种新的思路和方法。

中药雄黄，近年来在治疗白血病、实体瘤和逆转多种耐药肿瘤治疗中发挥了良好的疗效，但由于其体外水溶解性极差，生物利用度较低（AUC：6.36mg·h/L，ig，60mg/kg，含砷量 2.76mg/kg），其中砷在大鼠组织蓄积含量较高（肾脏 832.65ng/g，肺脏 689.69ng/g，肝脏 456.86ng/g，脾脏 363.79ng/g，心脏 297.65ng/g，脑 36.90ng/g)[15]，目前临床上和研究中仅有粗糙的原粉、微粉化和纳米雄黄混悬液等形式出现，对该药的药代动力学研究多集中在不溶性砷（包括部分可溶性砷）的体内代谢比较研究，而对其中溶解砷的体内动力学的研究则很少涉及。本实验从药代动力学角度进行雄黄中可溶性砷的药物动力学研究，药代动力学结果表明，雄黄溶解后，生物利用度提高了 3.45 倍（21.92→7.76），其中砷在大鼠组织中蓄积量大幅度降低，几乎没有分布。本文首次从药物动力学角度探讨了以微量、组织蓄积量低、生物利用度高的多种形态砷溶液，代替传统的粗糙雄黄的合理性。这一试验结果，可能为采用微生物技术深入研究雄黄的减毒、增效提供了有利的试验依据。

6.4 展望

微生物在自然界资源极为丰富，从海洋、陆地、极端微生物，共生、寄生无处

不在，随着生命科学对微生物的研究越来越快、越来越深入，微生物除了作为一种资源以外，业已成为药物研究中不可缺少的工具之一。在药物的发酵、转化、代谢、珍稀药用植物的纯培养、新药研发、减毒增效等方面发挥着令人瞩目的作用。微生物与药物创新研究的关系日趋密切。微生物有着非常强大的分解转化和代谢物质的能力，并能产生丰富的次生代谢产物，随着现代基因工程技术在微生物研究中的成功应用以及多种微生物合成基因簇的鉴定，微生物必将成为一种开拓性的、活性天然药物的重要资源，成为未来药物发现的重点方向。

参考文献

[1] 倪永清. 中国不同环境中嗜酸浸矿细菌的分子系统学研究. 兰州：兰州大学博士论文，2007：6-32.

[2] Rawlings DE, Dew D, Du P. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. Trends in Biotechnol, 2003, 21 (1): 38-44.

[3] Rawlings DE. Microbially assisted dissolution of minerals and its use in the mining industry. Pure Appl. Chem, 2004, 76 (4): 847-859.

[4] 叶寒青. 纳米雄黄抗肿瘤作用机理研究. 武汉：华中科技大学博士论文，2005：2.

[5] 汤毅珊，王宁生. 含砷化合物中药及制剂的药物动力学和代谢机制研究进展. 中药材，2005，28 (12)：1130-1134.

[6] 苏丽春. 朱砂的微生物浸出及其朱砂药效、毒性的重新评价. 兰州：兰州大学博士论文，2007：6-32.

[7] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, et al. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2003, 63 (33): 239-248.

[8] 陈奇主编. 中药药理研究方法学. 北京：人民卫生出版社，1996：278-279.

[9] 兰顺. 提高难溶性药物固体制剂溶出度的方法研究进展. 海峡药学，2004，16 (3)：27-30.

[10] 吴佩颖，徐莲英，陶建生. 难溶性药物增溶方法研究进展. 中成药，2005，27 (9)：7-9.

[11] 冯少华，肖小河，高文远等. 提高难溶性药物生物利用度方法研究概述. 解放军药学学报，2005，21 (5)：372-375.

[12] 唐晓荞. 灯盏花素磷脂复合物的制备及其药理作用研究. 武汉：华中科技大学硕士论文，2004：2-10.

[13] 吴建梅，陈大为，刘艳. 黄芩苷磷脂复合物制备工艺的研究. 中国中药杂志，2001，26 (3)：167-169.

[14] 李鼐儒，袁泉，李晓燕等. 水飞蓟素自微乳化浓乳的制备和体内外评价. 中国新药杂志，2010，19 (5)：423-425.

[15] Deng Y, Xu H, Huang K, et al. Size effects of realgar particles on apoptosis in a human umbilical vein endothe-lial cell line: ECV-304. Pharmacol. Res, 2001, 44 (6): 513-518.

[16] 刘敏. 紫杉醇纳米脂质载体的制备与特性研究. 无锡：苏州大学硕士博士，2007：2-10.

中英文对照

1,2-acenaphthanedione	1,2-苊二酮
1,5-dihydroxyacenaphthene	1,5 二羟基苊
10-deacetylbaccatin Ⅲ	10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ
11-ketoandrosterone	11-雄甾酮
11-Ketotestosterone	11-睾酮
11β-Hydroxyandrosterone	11β-羟基雄甾酮
12-hydroxy curcumol	12-羟基姜黄醇
12β-hydroxy bufagin	12β-羟基蟾蜍精
12β-hydroxyl desacetyl cinobufagin	12β-羟基-去乙酰基的华蟾毒精
1-Acenaphthenone	6-OH 二氢苊酮
1-Acenaphthenone	1-二氢苊酮
1-acenaphthenone	二氢苊酮
1-acepnaphthenol	1-苊醇
1α-hydroxy-10β,1-epoxy curcumol	1α-羟基-10β,1-环氧姜黄醇
3′-hydroxypuerarin	3′-羟基葛根素
3-oxo-12α-hydroxy bufagin	3-*O*-12α-羟基蟾蜍精
3β-Hydroxyl curcumol	3β-羟基姜黄醇
4,4-dihydroxy	4,4′-二羟基化
4α-hydroxy-1-deoxo artemisinin	4α 羟基-1-去氧青蒿素
5-Aminosalicylic acid	5-氨基水杨酸
6β-hydroxy artemisinin	6β-羟基青蒿素
6-OH-pantoprazole thioether	6-OH 泮托拉唑硫醚
6β-hydroxyl-11-ketotestosterone	6β-羟基-11-睾酮
7-Amino-nitrazepam	7-氨基硝西泮
7-hydroxylationsulfoxide	7-羟基化亚砜
7-OH amoxapine	7-羟基化-阿莫沙平
7α,15α-dihydroxyandrostenolone	7α,15α-二羟基雄烯醇酮
7α-hydroxyrubijervine	7α-羟基红藜芦碱
7β-hydroxy artemisinin	7β-羟基青蒿素
7β-hydroxy-9α-artemisinin	7β-羟基-9α-青蒿素
9-fluorenol	9-芴醇
9-Fluorenone	9-芴酮
9α-hydroxyl adrenosterone	9α-羟基肾上腺甾酮
9α-hydroxyl-11-testosterone	9α-羟基-11-睾酮
Aspergillus ochraceus	赭曲霉
A. sydowi	萨氏曲霉
Absidia	犁头霉
Absidia coerulea	蓝色犁头霉
Absidia orchidis	淡紫犁头霉

Acenaphthene	苊
Acetaminophen	对乙酰氨基酚
Acetate	醋酸盐
acety-CoA	乙酰 CoA
Achromobacter sp.	无色菌属
Acidimicrobiales	酸微菌目
Acidimicrobidae	酸微菌亚纲
Acidiphilium cryptum	嗜酸异样菌
Aconites	乌头碱
Acremonium sp.	支顶孢属
Acronycine	山油柑碱
Acrothrix pacifica	顶毛藻
acrylic acids	丙烯酸
Actinobacteria	放线菌
Actinobacteria	放线菌门
Actinobacteridae	放线菌亚纲
Actinomadura sp.	马杜拉放线菌属
Actinomycetales	放线菌目
Actinoplanes	游动放线菌
Actinoplanes missouriensis	密苏里游动放线菌
Actinosynnema pretiosum spp. Auranticum	橙色束丝放线菌
acyl carrier protein	酰基载体蛋白
acyl transferase	酰基转移酶
Adrenosterone	肾上腺甾酮
Agaricus bisporus	双孢蘑菇
Agathic acid	贝壳松烯二羧酸
Aglycone	苷元
Agrocybe dura	硬田头菇
Alcaligenes	产碱杆菌
Alcaligenes faecalis	粪产碱杆菌
Alternariaalternata	链格孢
Aminopyrene	芘胺
Amitriptyline	阿米替林
Amoxapine	阿莫沙平
Amphetamine	安非他命
Amphidinium	前沟藻
amphotericin B	两性霉素 B
Amsonia elliptica	水甘草
Amycolatopsis sp.	拟无枝酸菌
Amygdalin	苦杏仁苷
Anaerobic Campylobacter	厌氧性曲杆菌
Analgesic	镇痛剂

anatabine	新烟碱
Angiococcus disciformis	碟形囊球菌
*Angiococcus disciformis An d*48	囊球黏细菌
Anthelmintic	驱虫剂
Anthiaquinone	蒽醌
Anthocyanins	花青素
Anthocyanins	花色素苷
Antiarrhythmic	抗心律失常的
Antibacterial	抗菌
Anticholinergic	抗胆碱
Antifungal agent	抗真菌
Antifungal alkaloid	抗真菌生物碱
Antihistamine	抗组胺药
Antimelanoma agent	抗黑色素瘤
Antipruritic	止痒剂
Antipsoriatic	抗银屑病
Antipsychotic	安定药
Antitumor	抗肿瘤
Antitussive	镇咳药
Apigenin	芹黄素
Apigenin	芹菜素
Apigenin-7,4′-disulfate	芹菜素-7,4′-硫酸氢盐
Apigenin-7-sulfate	芹菜素-7-硫酸盐
Aristolactam	马兜铃内酰胺
Aristolochic acid	马兜铃酸
Armillaria mella	蜜环菌
Armillaria ostoyae	奥氏蜜环菌
Aromatic hydroxylation	芳环羟基化
arsenate reductase	砷酸还原酶
Artemisia annua	黄花蒿
Artemisinin	青蒿素
Arternisia annua	青蒿
Arthobacter	节杆菌
Arthobacter globiformis	球形节杆菌
Arthobacter simplex	简单节杆菌
Arthrobacter sp.	节杆菌属
Asiaticoside	积雪草苷
Aspergillus carneus	肉色曲霉
Aspergillus flavus	黄曲霉
Aspergillus niger	黑曲霉
Aspergillus oryzae	米曲霉
Aspergillus ostianus	孔曲霉

Aspergillus tamarii	溜曲霉
Asterias amurensis	多棘海盘车
Astragalus membranaceus	黄芪
Atopobium	奇异菌属
Atrialarrhythmias	房性心律失常
Atropine	阿托品
Auriculara sp. M37	耳穴菌 M37
Azadirachtin	印苦楝子素
Azatadine	阿扎他定
Azetirelin	氮替瑞林
Azo reductase	偶氮还原酶
baccatin Ⅲ	巴卡亭Ⅲ
Bacillus	杆菌属
Bacillus	芽孢杆菌
Bacillus amylolique faciens	解淀粉芽孢杆菌
Bacillus cereus	蜡样芽孢杆菌
Bacillus laterosporus	侧孢芽孢杆菌
Bacillus lentus	缓慢芽孢杆菌
Bacillus pumilus	短小芽孢杆菌
Bacillus sp.	芽孢杆菌属
Bacillus sphaericus	球形芽孢杆菌
Bacillus subtilis	枯草芽孢杆菌
Bacillus thuringiensis	苏云金芽孢杆菌
Bacillusstearo-thermophitus	嗜热脂肪芽孢杆菌
Bacitracin	杆菌肽
Bacteroidaceae	拟杆菌科
Bacteroideae	拟杆菌族
Bacteroidetes	拟杆菌门
Baicalein	黄芩苷元
Baicalin	黄芩苷
Balsalazide	巴柳氮
Barbaloin	芦荟苷
Barchytrichia quoyi	海雹藻
benzoic acid	苯甲酸
Betaadrenoceptorantagonist-β	β-肾上腺素受体激动剂
Betalain pigments	色素
Betamethasone	倍他米松
Betulinic acid	桦木酸
Bifidobacteriale	双歧杆菌目
Bifidobacterium	双歧杆菌
Bifidobacterium sp.	柴胡新双歧杆菌
Biochanin	鹰嘴豆芽素

Bioflavonoid	生物类黄酮
bioleaching	生物浸出
bioxidation	生物氧化
Biphenyl	联苯
Bisoprolol	比索洛尔
Bjerkandera adusta	黑管菌
Bllidinggia micrococca	小球盘苔
Bllidinggia minima	盘苔
Bornaprine	波那普令
Botrytis	葡萄孢霉
Botrytis sp.	葡萄孢属
Botrytis cinerea	灰葡萄孢霉
Brevibacillus laterosporus	侧孢短芽孢杆菌
Brompheniramine	溴苯那敏
Brucine	马钱子碱
Bryopsis plumosa Huds.	羽藻
Bryopslis corticulans Setchell	假根羽藻
Bufalin	蟾毒灵
Butyrate	酪酸盐
C-4′-aromatic hydroxylation	C4′-芳环羟基化
Caffeic acid	咖啡酸
Calcitonin	降钙素
Calothrix crustacea Thur.	苔垢藻
Calothrix parasitica	寄生眉藻
Calycosin	毛蕊异黄酮
Camptothecin	喜树碱
Candidaru gosa	皱褶假丝酵母
carbamazepine	卡巴咪嗪
Carbazole	咔唑
Cardioactive glycosides	心脏药用苷
Carthamin	红花苷
Cassia obtusifolia	决明
Catechin	儿茶素
Catenabacterium	链状细菌
Catharanthusminor	小蔓长春花
Catharanthusroseus	长春花
Chaetomium sp.	毛壳菌属
Chaetomorpha aeresa	气生硬毛藻
chalconesynthase	查尔酮合成酶
Chlorella pyrenoidosa	球藻
Chlorogenic acid	绿原酸
Chlorpheniramine	氯苯那敏

Chlorpromazine	氯丙嗪
Chondria armata	树枝软骨藻
Chroococcus turgidus	膨胀色球藻
Chrysin	白杨素
chrysin-7-sulfate	白杨素-7-硫酸盐
cinobufagin	莪术醇
Cinobufagin	华蟾毒精
cis-1,2-dihydroxy acenaphthene	顺-1,2-二羟基苊
Cladophora fascicularis	束生刚毛藻
Cladphora sp.	刚毛藻
Clomipramine	氯米帕明
Clonazepam	氯硝西泮
Clonostachys rogersoniana	枝穗霉属
Clostridium	梭状芽孢杆菌
Cloud point system	浊点系统
Clozapine	氯氮平
cluster	基因簇
CNS stimulant	中枢神经系统兴奋剂
co-oxidation	共氧化
Coacervate phase	凝聚层相
Codeine	鸦片碱
Codium divaricatum Holm.	叉枝松藻
Codium fragile	刺松藻
Coleus forskoklii	毛喉鞘蕊花
Colletotrichum lini	亚麻刺盘
Collybia dryophila	栎金钱菌
Colpomenia sinuose	囊藻
combinatorial biosynthesis	组合生物合成
co-metabolism	共代谢
Condensed tannins	稠合革草酸
Coriolopsis polyzona	多带革孔菌
Corticium	伏革菌
Corticium sasakii	屉木伏革菌
Cortisone	可的松
Corymebacterium	棒杆菌
Corymebacterium fortuium	偶发分枝杆菌
Corymebacterium phlei	草分枝杆菌
Corymebacterium rhodochrous	胭脂分枝杆菌
Corymebacterium rubrum	红色分枝杆菌
Corymebacterium sinplex	简单棒杆菌
Corymebacterium smegmatis	耻垢分枝杆菌
Corymebacterium sp.	棒状杆菌

Corynebacterium	棒状杆菌属
Coumarounaodorata Aubl	香豆
Crenarchaeota	古细菌
Crisnatol	克立那托
Crocetin	红花酸
Cunninghamella echinulata	孢小克银汉霉
Cunninghamella elegans	小克银汉霉
Cunninghemella	小克银汉菌
Cunninghemella blakeleeana	布氏小克银汉霉
Cunninghemella echinulaatas	刺孢小克银汉霉
Cunninghemella elegans	雅致小克银汉霉
Cunninghemella japonica	班氏小克银汉霉
Curcumol	姜黄醇
Curvularia	弯孢霉
Curvularia blakesleeana	短刺弯孢霉
Curvularia geniculata	膝曲弯孢霉
Curvularia inaequalis	不正弯孢霉
Curvularia lunata	新月弯孢霉
Curvularia tuberculata	瘤座弯孢霉
Curvularia uncinata	镰刀弯孢霉
Cuscohygrine	红古豆碱
Cyanidin	花色素
Cyanidin	矢车菊素
Cyanotis arachnoidea	露水草
Cyanuric acid	氰尿酸
Cyathus stercoreus	粪生黑蛋巢菌
Cyclobenzaprine	环苯扎林
Cyclodextrin	环糊精
Cyproheptadine	赛庚啶
Cystoseira crinita Cysto-seira barbata	囊叶藻
Cytotoxic	细胞毒性
Daidzein	大豆苷元
Daidzein	大豆黄酮
Daidzin	大豆异黄酮苷
Deacetylation	脱乙酰化作用
deaminated	脱氨基
Decarboxylation	脱羧
Defense related proteins	防御相关蛋白
Deglycosylation	去糖基化反应
dehydratase	脱水酶
Dehydroxylation	脱羟基作用

Delphinidin	飞燕草素、翠雀色素
demethylated benzimidazole	去甲基苯并咪唑
demethylated pyridine	去甲基吡啶
Demethylation	脱甲基作用
Denitration	脱硝基作用
Denoparmine	地诺帕明
Deprenyl	盐酸司立吉林
Desipramine	去甲丙咪嗪
Desmarestia viridis	酸藻
Dexamethasone	地塞米松
Dextro methorphan	右旋美沙芬
Dextrorphan	右啡烷
Diatyopteris divaricata	叉开网翼藻
diazepam	地西泮
Dibenzo thiophene	二苯并噻吩
Diclofenac	双氯芬酸
Dictyota indica Sond.	印度网地藻
Dictyota dichotoma	网地藻
dihydro agathic acid	二氢贝壳松烯二羧酸
Dihydrodaidzein	二氢大豆苷元
dihydroxy rotenones	二羟基鱼藤酮
Dinophisis	鳍藻
Diosgenin	薯蓣皂苷
Diphenhydramine	苯海拉明
Diterpenoid	双萜
Dixenie	双菌
Doxepin	多塞平
E. coli	大肠杆菌
Ebastine	依巴斯汀
Ecdysteroid	蜕皮甾类
ellagitannins	鞣花丹宁
Emericella nidulans	巢状翘孢霉属
Emericella sp.	裸孢壳属
Emericella variecolor	异冠裸胞壳
enoyl reductase	烯醇还原酶
Enterobacteriaceae	肠杆菌科
Enterococcus	肠球菌
Enteromorpha compressa Grev.	扁浒苔
Enteromorpha coziana P. Dange	异胞浒苔
Enteromorpha Intestinales	肠浒苔
Enteromorpha linza	缘管浒苔

Enteromorpha tubulosa	浒苔
Entophysalis gianulosa	颗粒石囊藻
enzyme pool	酶池
ephedrine	麻黄碱
Epicatechin	表儿茶酸
Equol	雌马酚
erythromycin	红霉素
Escins	七叶树皂苷
Essential oils	精油
Estrone	雌酮
Etiocholane-3α,11β-diol-17-one	胆烷-3α,11β-二醇-17-酮
Etofesalamide	乙氧苯柳胺
Eubacterium	真杆菌
Eubacterium sp.-GLH	甘草酸真杆菌
Eudesme vriescens	真丝藻
Exophiala sp.	外瓶霉属
Fagopyrum cymosum	金荞麦
Ferulic acid	阿魏酸
Firmicutes	壁厚菌门
Flavanol	黄烷醇
flavanone	黄烷酮
flavanones	二氢黄酮类
Flavobacterium-Cytophaga groups	黄杆菌属
flavone	黄酮
Flavonoids	类黄酮
Flavonol	黄酮醇、黄烷醇
Flaxseed	亚麻子
Flucytosine	氟胞嘧啶
Flumequine	氟甲喹
Fluocinoloe acetonide	氟轻松
Fluocortolone	氟可龙
Fluorene	芴
fluorocinnamic acids	氟肉桂酸
Formononetin	刺芒柄花素
Forskolin	毛喉素
Furosemide	呋塞米
furyl	呋喃
Fusarium sp.	镰刀霉属
Fusicoccin	壳梭胞素
Fusobacteria	梭杆菌门
galangin	高良姜黄素

gallic acid	没食子酸
Ganoderma lucidum	灵芝
Gardenia	栀子
Gemmiger	吉米菌属
genera Streptomyces	紫色链霉菌
Geniposide	栀子苷、京尼平苷
Genistein	染料木素
Gentiopicroside	龙胆苦苷
Geotrichum candidum	白地霉
Giffordia indica	褐茸藻
ginsenoside	人参皂苷
Gliocladium sp.	胶枝霉属
Glucosidation	葡萄糖苷酸
Glucosidation	糖苷化反应
Glucuronidation	葡糖醛酸化作用
glutathione conjugate	谷胱甘肽结合物
glyceraldehyde 3-phosphate	3-磷酸甘油醛
glycoside	苷类
Glycyrrhetinic acid	甘草次酸
Glycyrrhira uralensis	甘草
Glycyrrhizin	甘草皂苷
Gnotobiotic Animals	悉生动物、已知菌动物、已知菌丛动物
Gymnodinium、*Gyrodinium*	裸甲藻
Gynostemma pentaphyllum	绞股蓝
Gyrophyllum sibogae	海鳃
H. scabra	糙海参
Haemonchus contortus.	捻转血矛线虫
Haliangium ochraceum	嗜盐海洋黏细菌
Hallucinogen	致幻剂
Halobacillus literals	喜盐芽孢杆
Halothrix lumbricalis	褐毛藻
Hesperidin	橙皮苷
Heterobasidion annosum	松根异担子
hippuric acid	马尿酸
Holothuria nobilis	黑乳海参
Humicola grisea	灰腐质霉属
Hyalosiphonia caeswpitosa Okam.	亮管藻
hydrocortisone	氢化可的松
hydroxy cinnamic acid	羟基肉桂酸
hydroxy omeprazole	羟基奥美拉唑
Hydroxybenzoic acid	安息香酸

hydroxybenzoic acid	羟基苯酸
Hydroxylation	羟基化作用
hydroxyl-*O*-desmethyl	羟基-*O*-去甲基
Hydroxymatairesinol	羟罗汉脂素
Hyella caespitosa Born	簇生蓝枝藻
hyoscyamine	天仙子胺
hyperkalemia	高钾血症
ibuprofen	布洛芬
icariin	淫羊藿苷
Ifidobacterium sp.	番泻双歧杆菌
Iminodibenzyl	亚氨基二苄
imipramine	丙咪嗪
Immuno modulator	免疫调节
Indole alkaloids	吲哚碱
Indomethacin	吲哚美辛
insulin	胰岛素
Irpex lacteus	白囊耙齿菌
Isocupressic acid	异柏酸
isoflavone	异黄酮
Isosorbide dinitrate	硝酸异山梨醇
Isosteviol	异甜菊醇
Jania rubens	叉珊藻
Jorunna funebris	海蛞蝓
Junceella fragilis	柳珊瑚
kaempferol	山柰酚
ketoacylACP synthase	酮酯酰 ACP 合成酶
ketoreductase	酮基合酶
Klebsiella oxytoca	克雷伯菌属
Klebsiella pneumomiae	肺炎克雷伯菌
L. majuscula	巨大鞘丝藻
Labdane-diterpene	半日花烷型二萜
lactate	乳酸盐
Lactobacillus	乳酸杆菌
Lactobacillus brevis	短乳杆菌
Lactobacillus delbrueckii	德氏乳杆菌
Lactulose	乳果糖
Lapachol	拉帕醇
lariciresinol	松树脂醇
Laurencia obtusa	钝形凹顶藻
L-Dopa	左旋多巴
Leathesia difformis Aresch.	黏膜藻
Leathesia nana	小黏膜藻

Lentinula-lentinusedodes	香菇
Leptolyngbya sp.	细纤菌属
Leptosphaeria sp.	小球腔菌属
Leptospirilum ferrooxidans	氧化亚铁钩端螺旋菌
levamisole	左旋咪唑
Levonorgestrel	左炔诺孕酮
lignans	木脂素
Lobeline	半边莲碱
Luteolin	毛地黄黄酮
Lyngbya epiphytica Hieronymous	附生鞘丝藻
Lyngbya confervoides	丝状鞘丝藻
Lyngbya semiplena	半极性鞘丝藻
Lyngbya sp.	鞘丝藻属
maltogenicamylase	麦芽糖淀粉酶
Malvidin	锦葵色素
mangiferin	芒果苷
Mastigocoleus tsetarum Lagerheim	鞭鞘藻
matairesinol	马台树脂醇
meclofenamic acid	甲氯芬那酸
Megasphaera	巨球型菌属
Mesorhizobium sp.	中慢生根瘤菌属
Mestranol	炔雌醇甲醚
Metarhizium sp.	绿僵菌
methamphetamine	甲基苯丙胺
Methapyrilene	美沙吡林
Methdilazine	甲吡咯嗪
Methoxy phenamine	甲氧那明
Methoxyamphetamine	甲氧基安非他命
methyl hydroxylation	甲基羟基化
Methyl protodioscin	甲基原薯蓣皂苷
Metoprolol	美托洛尔
metoprolol acid	美托洛尔酸
mevalonate 5-diphosphate	5-焦磷酸甲瓦龙酸
mevalonicacid	甲瓦龙酸
Mexiletine	美西律
Microbacterium	微杆菌属
Microbacteriumoxydans	氧化微杆菌
Microbacteriumsaperdae	天牛微杆菌
Microchaete grisea Thur.	灰色微毛藻
Micrococcus luteus	藤黄微球菌
Microemulsion	微乳液
Micromonosporaceae	小单孢菌科

Microsporum cf. gypseum	小孢子癣菌
midazolam	咪达唑仑
Mirtazapine	米氮平
misonidazole	米索硝唑
module	模块
mogroside	罗汉果皂苷
Mollugo pentaphylla	粟米草
Momordica grosvenori	罗汉果
Monascus purpureus	红曲霉
Monodictys putredinis	单格孢属
Monostroma angicava	袋礁膜
Monoxenie	单菌
Mortierella alpina	高山被孢霉
m-tyramine	*m*-酪胺
Mucor sp.	毛霉
Mucorpolymorphosporus	多型孢毛霉
Muraglitazar	莫格列扎
Mycobacterum sp.	分枝杆菌属
Myelophycus caespitosus	肠髓藻
Myricetin	杨梅树皮素
Myrothecium sp.	漆斑菌属
myxobacteria	黏细菌
myxochromide S	黏杆菌
N-acetyl amphetamine	*N*-乙酰基安非他命
Naphthalene	萘
Naphthol	萘酚
Naphthoquinone	萘醌
naphthyl	萘乙醚
Naproxen	萘普生
Naringin	柚皮苷
N-dealkylation	*N*-脱烷基
N-demethylation	*N*-去甲基化
N-demethylation to nortriptyline	*N*-去甲基化成去甲替林
N-deschlorobenzoyl indomethacin	*N*-去氯苯甲酰基吲哚美辛
N-desmethyl-7-hydroxyl	*N*-去甲基-7-羟基
Nemacystus decipiens	海蕴
neoprontosil	偶氮磺酰胺
Neurospora crassa	粗糙脉孢菌
N-formyl amoxapine	*N*-甲酰阿莫沙平
N-formyl-7-hydroxy amoxapine	*N*-甲酰基-7-羟基阿莫沙平
N-glucuronidation	*N*-葡萄糖醛酸化
N-hydroxy methyl carbazole	*N*-羟基甲基咔唑

Nicotina	烟碱
Nigrospora sp.	黑孢属
Nitrazepam	硝西泮
nitroreductase	硝基还原酶
nizatidine	尼扎替丁
N-methyl carbazole	*N*-甲基咔唑
Nocardia aurantia	橘橙诺卡菌
Nocardia corallina	诺卡菌
Nocardia corallina	珊瑚诺卡菌
Nocardia lucida	光泽诺卡菌
Nocardia opaca	不透明诺卡菌
Nocardia rhodocrous	胭脂诺卡菌
Nocardia sp.	诺卡菌属
Nocardioidesalbus	白色诺卡菌
Nocardiopsis lucentensis	诺卡土壤菌属
noninterative	生化反应
nonribosomal peptide synthase	非核糖体多肽合成酶
non-ribosomal peptides	非核糖体聚肽类
Norethisterone	炔诺酮
N-oxide	*N*-氧化
N-oxidation	*N*-去氧
O-dealkylation and oxidation tocarboxylic acid	*O*-脱烷基氧化成羧酸
O-deisopropylation	*O*-去异丙基
O-Desmethyl metoprolol	*O*-去甲基美托洛尔
O-Desmethylindomethacin	*O*-去甲基吲哚美辛
OleanolicAcid	齐墩果酸
Omeprazole	奥美拉唑
Omeprazole sulfone	奥美拉唑亚砜
Oral contraceptive	口服避孕药
Oscillatoria	颤藻
Osscillatoria laetevirena	艳绿颤藻
oxamic acid	草胺酸
oxazole-ring opening	噁唑开环
oxidation of methyl group	甲基氧化
Oxidation of trimethyl cyclohexenyl ring	三甲基环己烯环氧化
Oxidative deamination and reduction to 2-ol	氧化脱氨基作用并还原为 2-醇
Padina crassa Yamada	大团扇藻
Panaeolus sphinctrinus	紧缩斑褶菇
Pantoea agglomerans	团泛菌
Pantoea ananatis	成团泛菌
Pantoprazole	泮托拉唑
Pantoprazole sulfone	泮托拉唑亚砜

Pantoprazole thioether	泮托拉唑硫醚
Papavarine	罂粟碱
Paramethasone	帕拉米松
Parbendazole	帕苯达唑
Pargyline	巴吉林
parsley	欧芹
Pecten maximus	欧洲大扇贝
Pellicularia	薄膜菌
Pellicularia filamentosa	丝状薄膜菌
Penicillium aurantiogriseum	橘灰青霉
Penicillium Chrysogenum	产黄青霉
Penicillium Citrinum	橘青霉
Penicillium raistrickii	青霉菌
Penicillium simplicissimum	简青霉
Penicillium. Terrestre	陆生青霉
Penicilliumjanthinellum	微紫青霉
pennogenin	偏诺皂苷元
peonidin	芍药花青素
Peptococcaccae	消化球菌科
peptostreptococcus	消化链球菌
Peroxidase	过氧化物酶
Petriella sp.	彼得壳属
petunidin	矮牵牛苷
Phanerochaete chrysosporium	金孢子菌属
Phanerochaete sordida	黄孢原蘑
Phenacetin	非那西汀
Phenazopyridine	非那吡啶
Phencyclidine	苯环己哌啶
Phenelzine	苯乙肼
Pheniprazine	苯异丙肼
Pheniramine	非尼拉敏
phenolic acids	酚酸
Phenothiazine	吩噻嗪
phenylacetic acid	苯乙酸
phenylpropionic acid	苯丙酸
phenytoin	苯妥英
Phomopsis Asparagi	芦笋拟茎点霉
Phormidium corium Gomont	皮状席藻
Phormidium fragile Gomont	脆席藻
Photobacterium sp.	发光细菌
Pinoresinol	松酯醇
Pleurotus ostreatus	糙皮侧耳

Pleurotus pulmonarius	凤尾菇
Polyacctylene	多炔
Polyacctylene glucosides	多炔葡萄糖苷
Polyacctylenes	多胺
Polycyclic aromatic hydrocarbon	多环芳烃
polyketide synthase	聚酮合成酶
Polyphenol	多酚
polysulfide mechanism	多硫化合物途径
Polyxenie	多菌
Poncirin	枸橼苷
post -paclitaxel agents	后紫杉醇药
Potassium oxonate	氧嗪酸钾
Praziquantel	吡喹酮
Prednisolone	氢化泼尼松
Prednisone	泼尼松
Prevotella	普氏菌
Proanthocyanidins	原花色素
Progesterone	孕酮
prontosil	偶氮磺胺
propionate	丙酸盐
propranolol	普萘洛尔
Prorocentrum	原甲藻
prosaikogenin	柴胡次皂苷
Proteobacteria	变形菌
Proteobacteria	变形菌门
Proteolysis	蛋白质水解
proteolytic enzymes	蛋白水解酶
Protocatechuic acid	原儿茶酸
Proton pump inhibitor	质子泵抑制剂
Psammocinia sp.	沙海绵
Pseudallescheria sp.	假性阿利什霉属
Pseudomonas	假单胞杆菌
pseudomonas aeruginosa	铜绿假单胞菌
Pseudomonas chlororaphis	球针假单胞菌
Pseudomonas dacunhae	德阿昆哈假单胞菌
Pseudomonas fluorsens	荧光假单胞菌
Pseudomonas sp.	某种假单胞杆菌
Pseudomonas sp.	假单胞菌属
Pseudomonas syringae	丁香假单胞菌
Pseudomonas testerone	雄甾烷假单孢菌
Pseudomonas testosteroni	睾酮假单胞菌
Pseudonocardiaceae	假诺卡科

Pueraria lobata	野葛
Pueraria lobata var-montana	山葛
Pueraria phaseoloides	三裂叶葛
Puerarin	葛根素
puerarin-7-*O*-glucoside	7-*O*-葡萄糖基葛根素
puerarin-7-*O*-isomaltoside	7-*O*-异麦芽糖基葛根素
Punctaria latifolia Grev.	点叶藻
purine	嘌呤
pyridyl	吡啶
Pyrilaminemaleate	马来酸吡拉明
pyruvate	丙酮酸
quaglyceroporins	水甘油通道蛋白
Quercetin	槲皮素
quinidine	奎尼丁
Quinine	奎宁
Ralfsia verrucosa	疣状褐壳藻
ranitidine	雷尼替丁
Rauvolfia verticillate	萝芙木
reduction to primary alcohol	还原为伯醇
Reserpine	利血平
resting cell	休眠细胞
Retinol	视黄醇
rhamnose	鼠李糖
Rheum palmatum	掌叶大黄
Rhizoclonium tiparium (Roth) Harv.	根枝藻
Rhizoctonia	丝核菌
Rhizoctonia sp.	佐佐木丝核菌
Rhizops nigricans	黑根霉
Rhizopus oryzae	米根霉
Rhizopuschinensis	华根霉
Rhizosolenia setigera.	硅藻属
Rhwum wittrochii	天山大黄
risperidone	利培酮
Rivulria atra Roth	黑色胶须藻
Rotenone	鱼藤酮
Rubrobacterales	红色杆菌目
Rubrobacteridae	红色杆菌亚纲
Ruminococcus	胃瘤球菌
Rutin	芦丁
Scerevisiae	啤酒酵母
Saccharopolyspora	糖多孢菌
Saccharopolyspora erythraea	红霉糖多孢菌

Saccharothrix espanaensis	西班牙糖丝菌
S-adenosylmethionine	S-腺苷甲硫氨酸
saikogenin	柴胡皂苷元
Salinispora	小单孢菌属
Salvia miltiorrhiza	丹参
Saponin	皂苷
Sarcotragus sp.	角质海绵
Sargassum siliquastrum	裂叶马尾藻
Scopolamine	东莨菪碱
Scopolia lurida	赛莨菪
Scopulariopsis	短帚霉
Scytalidium sp.	柱霉属
secoisolariciresinol	司可异罗叶松甘油二酯
Septomyxa	近缘腐败黏液菌
Sesamin	芝麻素
sesquiterpene	倍半萜
Sesquiterpene coumarin-ether	倍半萜烯香豆素醚
Sesquiterpene ladones	倍半萜内酯
Shikonin	紫草宁
Sinularia sp. S. facile	软珊瑚属
sirolimus	西罗莫司
Smooth muscle relaxant	平滑肌松弛药
Solanum photeinocarpum	少花龙葵
Sorangium cellulosum So ce90	黏细菌纤维堆囊菌 So ce90
Sorivudine	索立夫定
Sorocarpus uvaeformis	聚果藻
Sotalol	索他洛尔
Sphacelaria subfusca	黑顶藻
Sphaerotrichia divaricata	索藻
Spicaria elegans	绮丽穗霉
Spirastrella vagabunda	黑海绵
Spirillum	螺菌属
Spirulina	螺旋藻
Spirulina subsalsa- Oestedt	盐泽螺旋藻
Spirulina subtilissima Kutz.	细致螺旋藻
Staphylococcus	葡萄球菌属
Steroidal antiinflam-matory	类固醇的甾族的抗炎剂
Steroidal saponins	甾类皂苷
steroids	甾体类化合物
stilbenesynthases	1,2-二苯乙烯合成酶
stilbenoids	二苯乙烯类
Streptococcus	链球菌

Streptomyces	链霉菌
Streptomyces actinomycete	放射链霉菌
Streptomyces antibioticus ATCC11891	抗生素链霉菌
Streptomyces argillaceus	黏土链霉菌
Streptomyces clavuligerus	棒状链霉菌
Streptomyces coelicolor A3(2)	天蓝色链霉菌 A3(2)
Streptomyces cyanogenus S-136	天蓝色链霉菌 S-136
Streptomyces echinatus	土壤放线菌
Streptomyces fradiae	费式链霉菌
Streptomyces galilaeus	加利利链霉菌
Streptomyces hygroscopicus NRRL5491	吸水链霉菌 NRRL5491
Streptomyces hygroscopicus var. geldanus	吸水链霉菌去势变种
Streptomyces lavendulae NRRL1100	浅灰色链霉菌
Streptomyces nodosus	结节链霉菌
Streptomyces olivaceus	橄榄色链霉菌
Streptomyces parvulus Tu4055	链霉菌 Tu4055
Streptomyces sp .	链霉菌属
Streptomyces sp. A2991200	链霉菌 A2991200
Streptomyces venezuelae ISP5230	委内瑞拉链霉菌
Streptomycesgriseus	灰色链霉菌
Streptomycetaceae	链霉菌科
strictosidine synthase	STR 合成酶
Stropharia aeruginosa	大球盖菇假单胞菌
Stropharia coronilla	冠状球盖菇
Stropharia cubensis	古巴球盖菇
Stropharia rugosoannulata	大球盖菇
Strtomyces roseochro-moenus	玫瑰产色链霉菌
structure-activityrelationship	结构-活性关系
strychnine	士的宁
Subvermispora	拟蜡菌属
succinylsulfathiazole	琥珀磺胺噻唑
sulfanilamide	磺胺
Sulfapyridine	磺胺吡啶
Sulfathiazole	磺胺噻唑
Sulfide	硫化物
sulfo-conjugatio	磺酸基共轭
Sulfoxidation	硫氧化作用
sulindac	舒林酸
Swainsonine	苦马豆碱
swertiamarin	当药苦苷
Symbiodinium sp.	共生甲藻属
Symploca hydnoides	蘚状束藻

Symploca sp.	海洋藻青菌属
tamoxifen	他莫昔芬
Tannic Acid	丹宁酸
Tannins	革菜酸
Taxadiene synthase	紫杉二烯合成酶
Taxol	紫杉醇
Taxus brevifolia	短叶红豆杉
Taxus chinnsis var. mairei	南方红豆杉
Taxus cuspidata	东北红豆杉
Tectoridin	鸢尾苷
Tectorigenin	鸢尾黄素
tegafur	四氢呋喃氟尿嘧啶
Terpenoids	类萜
Testoterone	睾酮
Tetracyclic diterpenoid	四环二萜类
tetracycline	四环素
tetrahydrofolate	四氢叶酸
Thais clavigera	疣荔枝螺
theophilline	茶碱
Thermoactinomyces sp.	热放线菌属
thienyl	噻吩
Thiobacillus ferrooxidans	氧化亚铁硫杆菌
Thiobacillus thiooxidans	氧化硫硫杆菌
thioesterase	硫酯酶
Thiophenes	唾吩
thiosulfate mechanism	硫代硫酸盐途径
Tichocarpus crinitus	微藻属
ticlopidine	噻氯匹定
Tiichosanthes kirilowii	栝楼
Torreya Grandifolia	榧树
Trametes gibbosa	浅囊状栓菌
Trametes trogii	硬毛栓菌
Trametes versicolor	云芝
trans-1,2-dihydroxy acenaphthene	反式-1,2-二羟基苊
trazodone	曲唑酮
Treponema	密螺旋体属
treptomyces avermitilis MA-4680	链霉菌阿维链霉菌
Triamcinolone	曲安西龙
Trichodermaharzianum	哈茨木霉
Trichothecium	聚端孢霉
Trichothecium roseum	粉红聚端孢霉
Tricyclic antidepressant	三环抗抑郁药

Tripterygiumwilfordii Hook. f.	雷公藤
Trixenie	三菌
Tropane alkaloids	莨菪碱
Ulothrix flacca Thur.	软丝藻
Ulva conglobata Kjellm.	蛎菜
Ulva pertusa Kjellm.	孔石莼
Ulva rigida	石莼
Valepotriates	颉草三酯
vancomycin	万古霉素
Veillonella	韦荣球菌属
ventricularectopy	室性心律失常
Veratrumnigrum	藜芦
Verrucomicrobia	疣微菌门
Vitamin A	维生素 A
warfarin	华法林
Withanoloides	醉茄内酯
Wollemia nobilis	瓦勒迈杉
Xylaria sp.	炭角菌属
Yeasts	酵母菌
α-D-glucosyl-(1-6)-puerarin	α-D-葡萄糖基-(1-6)-葛根素
α-D-maltosyl-(1-6)-puerarin	α-D-麦芽糖基-(1-6)-葛根素
α-hydroxy	α-羟基
α-pyrone	α-吡喃酮环
β-blocker	β受体阻滞剂
β-Glucopyranose conjugate	β-葡萄糖结合物
Δ9(11)-Androsten-3α-ol-17-one	Δ9(11)-雄甾-3α-醇-17-酮
ω-Methyl group oxidation	ω-甲基基团氧化

欢迎订阅药物研究及制药专业图书

书号	书　　名	单价
08013	超声介导药物靶向递送系统	29
04883	国外药学专著译丛——制剂工艺放大	69
06775	华夏英才基金学术文库——中药提取分离新技术	95
08134	世界上市新药 2	95
04232	微生态药物研究与应用	49
05954	微生物药物学简明教程(陈代杰)	28
09803	胃肠动力中药的基础与临床	59
00388	现代生物技术制药丛书——基因工程药物(二版)	49
04549	药品多指标 HPLC 快速检测(中药材)	52
04394	药品多指标 HPLC 快速检测——化学药	49
04921	药品多指标 HPLC 快速检测——中成药	49
09533	药物化学进展(7)	69
04925	药物化学进展(6)	69
05085	药物剂型与制剂设计	69
06926	药物贴膏剂生产与开发	78
03340	药学实验室技术系列——NMR 核磁共振	25
03138	药学实验室技术系列——PCR 聚合酶链反应	36
03825	药学实验室技术系列——流式细胞术	29
04283	药学实验室技术系列——药物合成路线设计	39
03279	药学实验室技术系列——药学实验室仪器设备手册	25
04939	药用辅料及其管理	39
05066	药用真菌深层发酵生产技术	45
05668	尤特奇(聚甲基丙烯酸酯)应用技术指南	49
08227	有机合成常用试剂手册:制备与处理	36
04169	有机合成反应速查手册	39
06012	中华海洋本草:海洋天然产物(上、中、下)	660
07735	中药成分的胃肠转运与剂型设计	128
02770	中药提取分离手册	89
04344	中药药物代谢动力学	59
01139	中药有效成分提取分离技术(二版)	49
06092	中药指纹图谱——质量评价、质量控制与新药研发	118
07919	中药猪苓的现代研究与应用	29
01115	分析化学复习指南与习题精选	29.8
07810	临床药学系列图书(21)——实用药师英语 500 句	15
02319	生物化学学习指导	18
9548	有机化学复习指南与习题精选(药学专业)	35
02667	230 种中药颗粒剂和胶囊剂制备关键技术	175
03649	滴眼剂的开发和生产	75
04533	化学制药工艺过程及设备	49
06364	药物制剂工艺及设备选型	88
06954	药物制剂疑难解析	59
03746	液体制剂技术	25
01946	制药工程学(王志祥)(二版)	49
05219	制药工程制图	39
08383	制药工艺学(林强)	29.8
7131	制药化工原理(王志祥)	49
03924	中药浸提物生产工艺学	75

如需以上图书的内容简介、详细目录以及更多的科技图书信息，请登录 www.cip.com.cn。

邮购地址：(100011) 北京市东城区青年湖南街 13 号　　化学工业出版社

服务电话：010-64518888，64518800（销售中心）

如要出版新著，请与编辑联系。联系方法：010-64519363