

基因工程 FR-008/杀念菌素脱羧衍生物 CS103 的分离提取及毒性和抗白色念珠菌活性研究

毛相朝^{1,2} 陶欣艺¹ 杨亮¹ 沈亚领^{1*} 魏东芝^{1,2*} 邓子新³

- (1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 鲁华生物技术研究所 上海 200237)
(2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物燃料重点实验室 山东 青岛 266101)
(3. 上海交通大学微生物代谢教育部重点实验室 上海 200030)

摘要: 本文在建立了基因工程 FR-008/杀念菌素脱羧衍生物 CS103 分离提取工艺的基础上, 经进一步纯化, 获得一定供试样品。通过对比脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 三种化合物对人胚肾细胞毒性、对人血红细胞的溶血活性和对白色念珠菌的抗菌效果, 发现脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 的毒性较 FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 大大降低, 且保持了较高的抗真菌(*Candida albicans*)活性。

关键词: FR-008/杀念菌素, 脱羧衍生物 CS103, 两性霉素 B, 毒性, 抗真菌活性

Research on the Isolation, Cell Toxicity and Antifungal Activity Against *Candida albicans* of Novel Decarboxylated FR-008/Candicidin Derivative CS103

MAO Xiang-Zhao^{1,2} TAO Xin-Yi¹ YANG Liang¹ SHEN Ya-Ling^{1*}
WEI Dong-Zhi^{1,2*} DENG Zi-Xin³

- (1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Newworld Institute of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)
(2. Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China)
(3. Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: Based on founding the methods for isolation and purification of the novel decarboxylated FR-008/Candicidin derivative CS103, we obtained enough samples for testing from the culture mycelia of the mutant of *Streptomyces* FR-008. Through comparing the cell toxicities on Human Embryonic Kidney Cells 293, haemolytic activities on human erythrocytes and antifungal activities on *C. albicans*, we found that the toxicity of decarboxylated FR-008/Candicidin derivative CS103 had been lower than FR-008/Candicidin and Amphotericin B, while it still had high antifungal activity on *C. albicans*.

基金项目: 上海市创新行动计划重大项目(No. 2007DZ19503-4)

*通讯作者: Tel: 86-21-64252078, Fax: 86-21-64250068; ✉: dzhwei@ecust.edu.cn;
Tel: 86-21-64253156, Fax: 86-21-64250068; ✉: ylshen@ecust.edu.cn

收稿日期: 2009-06-02; 接受日期: 2009-08-17

Keywords: FR-008/Candicidin, Novel decarboxylated derivative, Amphotericin B, Toxicities, Antifungal activities

随着真菌感染尤其是深部真菌感染的发病率日益增高, 开发低毒高效的抗真菌抗生素是筛选新抗生素的一个重要动向。从自然界中直接分离具有新结构化合物的机率越来越小, 基于分子生物学基础的组合生物合成技术和代谢工程技术成为解决上述问题的重要途径^[1-3]。多烯大环内酯抗生素杀念菌素具有广谱抗真菌作用, 被广泛应用于念珠菌阴道炎, 并且能够作用于胆固醇和胆汁代谢^[4]。链霉菌 FR-008 是梁蓉芳等在吸水链霉菌应城变种 10-22 原生质体融合的过程中发现的一株新的抗生素产生菌^[5], 其代谢产物抗生素 FR-008 的化学结构分析表明 FR-008 与灰色霉菌 IMRU3570(*Streptomyces. griseus* IMRU3570)产生的代谢产物杀念菌素具有相同的化学结构, 是一种带有对氨基苯乙酮侧链的 38 元七烯大环内酯类抗生素^[6,7], 且与两性霉素 B 的结构及其相似, 如图 1 所示。FR-008/杀念菌素作为一种强烈而有效的治疗剂, 对大多数真菌尤其对念珠菌有较强的杀灭作用, 可用于治疗念珠菌阴道炎及阴道滴虫感染; 同时发现对前列腺增生有明显的抑制作用; 杀念菌素还被证明具有降低血胆固醇(血脂)的作用^[8,9], 但是因其毒性太大限制了进一步的临床应用。研究证明, 在 FR-008/杀念菌素的生物合成过程中可能要经历至少 3 个后修饰过程: C-21 位的糖基化、C-9 位(或 C-10 位)的羟基化和 C-18 位甲基的羧基化, 陈实等在对 FR-008/杀念菌素生物合成基因簇分析的基础上, 推断细胞色素 P450 单氧化酶 FscP 可能参与反应将 C-18 位的甲基侧链氧化为羧基基团^[6]。陈实和毛相朝等通过实验确证了 *fscP* 基因缺失的突变株 CS103 其发酵产物为脱羧 FR-008/杀念菌素衍生物, 进一步通过观察脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 和 FR-008/杀念菌素对兔血的溶血作用, 初步证明了脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 毒性较 FR-008/杀念菌素大大降低^[6,10]。

本文在建立了脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 分离提取工艺的基础上, 进一步经过高效液相色谱制备获得一定量供试样品, 对脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和临床上用的两性霉素 B 的细胞毒性、溶血活性(人血红细胞)和抗白色念珠

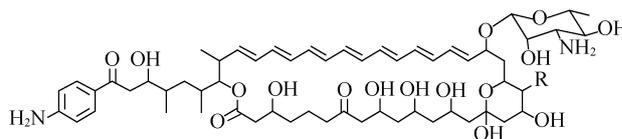


图 1 FR-008/杀念菌素及其脱羧衍生物 CS103 的结构^[6,10]
Fig. 1 Chemical structures of FR-008/candicidin and the novel decarboxylated derivatives CS103^[6,10]

注: FR-008/杀念菌素: R=COOH; 脱羧衍生物 CS103: R=CH₃.
Note: R=COOH is FR-008/candicidin; R=CH₃ is its novel decarboxylated derivatives CS103.

菌活性进行了对比, 为下一步的新药研发奠定了坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 菌种和细胞

缺失 *fscP* 基因的链霉菌 FR-008 突变株 CS103 由上海交通大学邓子新院士实验室惠赠; 白色念珠菌(*C. albicans*)采用甘油管保藏法短期保藏, 冷冻干燥保藏法长期保藏; 人胚胎肾细胞(Human embryonic kidney cells)293: 中科院上海细胞生物学研究所提供, 置 5% CO₂ 培养箱, 37°C 培养, 培养基为 DMEM, 添加 10%的小牛血清。

1.2 抗生素发酵生产方法

将 300 μL 孢子悬液接种至含有 50 mL 种子培养基(葡萄糖 1%, 麦芽糖提取物 0.3%, 酵母粉 0.3%, 蛋白胨 0.5%, 以 NaOH 调 pH 7.2~7.5)的 250 mL 摇瓶中, 接种后置于 28°C 下, 200 r/min 摇床上培养 30 h 左右。按接种量的 10%转接到含有葡萄糖 2%、淀粉 1%、甘油 1.39%、酵母粉 0.3%、工业氨基酸粉 0.5%、蛋白胨 0.1%、NaCl 1%、FeSO₄·7H₂O 0.05%、CuSO₄ 0.004% 的发酵罐中, 450 r/min 搅拌、200 L/h 通气量, 28°C 培养。结合作者前期建立的发酵调控策略进行发酵生产^[11-14], 发酵过程抗生素检测方法参照文献^[15]。

1.3 分析测定方法

1.3.1 抗生素待测溶液配置: 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 用 DMSO (二甲基亚砜)配制成 5000 μg/mL, 因样品溶液不稳定, 每次实验分别使用固体样品现配现用。

1.3.2 细胞毒性实验: 将细胞接种于 96 孔培养板中,

将对数生长期细胞以 0.25%胰酶消化后, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液吹打成单细胞悬液并调节细胞浓度至 2×10^5 个/mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 0.1 mL。实验组分别加入脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B, 根据预实验结果, 每组浓度分别设 5~6 个梯度; 对照组不加药(仅加药物溶剂 DMSO), 阴性空白组仅加入培养液。分别将实验组、对照组和阴性空白组接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 每组浓度设 6 个复孔, 置于 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱培养, 细胞培养 18 h、36 h 后, 每孔加入 5 g/L MTT 10 μ L, 继续培养 4 h 后结束, 吸出孔板中的培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 待 MTT 还原产物完全溶解, 用 BioRad 550 型酶标仪, 以 550 nm 为检测波长, 655 nm 为参照波长测定其吸收度, 计算 HEK293 细胞的存活率和半数抑制浓度(IC₅₀)。

细胞存活率 = 测试组 OD 平均值 / 对照组 OD 平均值 $\times 100\%$,

抑制率 = 1 - 存活率,

半数抑制浓度(IC₅₀) = 细胞存活率达到一半时的药物作用浓度。

1.3.3 溶血活性实验: 取新鲜人血数毫升(约 20 mL), 分别除去纤维蛋白, 使成脱纤血液。加入 0.9%氯化钠溶液约 10 倍量, 摇匀, 以 1500 r/min~2000 r/min 离心 5 min, 除去上清液, 沉淀的红细胞再用 0.9%氯化钠溶液按上述方法洗涤 2~3 次, 至上清液不显红色为止。将所得红细胞用 0.9%氯化钠溶液配成 2% 的红细胞混悬液, 供实验用, 按照文献提供的方法测溶血率^[16, 17]。

溶血率计算公式: $\text{溶血率}(\%) = \frac{(ABS - ABS_0)}{(ABS_{100} - ABS_0)} \times 100$,

公式中 ABS 为样品的吸光值, ABS₁₀₀ 为阳性对照吸光值, ABS₀ 为阴性对照吸光。

1.3.4 抗白色念珠菌活性实验: 将样品的 DMSO 溶液, 用沙堡氏培养基(葡萄糖 4%、蛋白胨 1%、氯霉素 0.0125%)稀释至 0.4 μ g/mL 后, 在 96 孔板上对倍稀释 10 个浓度, 加入等量新鲜的约 10^4 CFU/mL~ 10^5 CFU/mL 白色念珠菌(*C. albicans*)悬液。将肉眼不见生长的孔内培养物接种沙堡氏琼脂培养基, 35°C 培养 24 h, 最低杀死 90%以上微生物生长的浓度即为 MBC 值(最低杀菌浓度)。

2 结果和讨论

2.1 抗生素分离工艺的确定

2.1.1 发酵上清液和菌丝体中目标产物的分布状态: 发酵结束后, 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 以两种形式存在, 部分以游离态存在于发酵液中, 另一部分存在于菌丝体内。通过离心分离得到发酵液上清和菌丝体, 把得到的发酵液和菌丝体再用正丁醇(选择正丁醇的原因是可以与发酵上清液两相分离)萃取 2 h, 分层或者离心得到了正丁醇萃取液。表 1 列出了不同培养条件和培养基配比发酵结束后产物的存在状态, 从表中可以看出, 虽然发酵条件对脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 的存在状态有影响, 但发酵过程产生的产物大部分存在于菌丝体内, 在发酵液的上清中仅占 3.55%。

表 1 发酵上清液和菌丝体中目标产物的分布比例
Table 1 Distributing of the antibiotic in the broth and mycelium

批次 Run	脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 Decarboxylated FR-008/Candidicin Derivative CS103 (μ g/mL)			上清中抗生素百分含量 The ratio of supernatant (%)
	Supernant	Mycelium	Total	
1	1.42	38.84	40.26	3.53
2	1.53	40.82	42.35	3.62
3	1.35	37.22	38.57	3.51
Average	1.38	37.68	39.06	3.55

由于在上清中的产物比例很低, 考虑到成本问题, 因此只将菌体中的产物作为分离纯化的对象。

2.1.2 菌丝体内抗生素分离提取工艺的确定: 鉴于抗生素的有效组分主要存在于菌丝体内, 选择合适的有机溶剂成为提高萃取效率的关键。考虑到它的不稳定性, 在整个分离过程中未采用酸性或碱性溶剂。从产物结构(参见图 1)来看, 是一个典型的两性大分子(指亲水性和亲脂性)。正是这样一种特殊结构, 导致了它只能溶解在两性溶剂或两种不同极性溶剂组成的混合溶剂当中, 并且不会有很高的溶解度。根据前期预实验结果, 综合考虑效率、成本和操作可行性, 我们选择了甲醇(80%)作为产物分离提取过程中使用的第一步萃取溶剂。

分别取 6 份相同量的发酵菌丝体浸泡在 80%甲醇中, 依次萃取 0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h 和 8 h。结果如图 2 所示, 随着萃取时间的增加, 目标产物的含量也逐渐增加, 但是都在 2 h 后达到最大值, 之后保持稳定, 说明抗生素的萃取量在此处达到临界

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

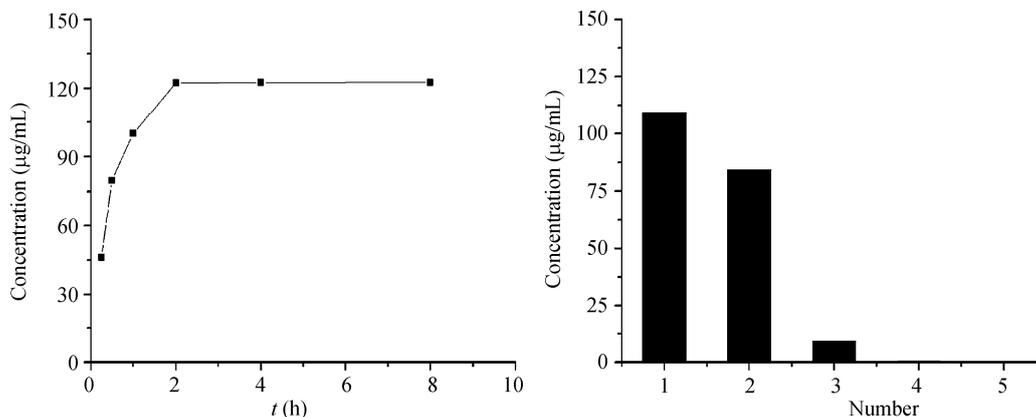


图2 甲醇(80%)萃取参数的确定

Fig. 2 The extraction parameters of antibiotic with methanol (80%)

点。因此在后续实验中,产物提取采取80%甲醇萃取2 h为佳。80%甲醇作为溶剂相萃取发酵液菌丝体,每100 g湿菌体加入300 mL 80%甲醇萃取2 h,共萃取5次。结果显示(图2),萃取3次以后,目标产物的含量已经很少,为了提高效率、节约成本,此后的萃取过程每批萃取3次。

根据上述研究,结合前人文献报道^[18],建立了溶媒萃取和沉淀法相结合的产物分离提取工艺,如图3所示流程图。该工艺的特点是:萃取溶剂选择甲醇更容易减压浓缩;萃取液浓缩到最后,基本为水分,成黑色粘稠状,活性物质基本不溶于水,因此在这一步,我们选择离心,直接除去水分和大量的水溶性杂质,省却一步萃取,节省了溶剂,且效果要更好;采取溶媒萃取技术避免了柱层析过程产物见光分解。在此基础上,进一步经过高效液相色谱

谱技术分离制备了一定量高纯度供试样品。

2.2 细胞毒性实验

按照1.3.2实验方法和计算公式获得细胞存活率,并绘制曲线图(见图4),可以看出,脱羧FR-008/杀念菌素CS103对人胚肾细胞的毒性远远低于FR-008/杀念菌素,同时与市售抗真菌药物两性霉素B相比也明显降低,在HEK293细胞培养36 h后,加入待测样品,脱羧FR-008/杀念菌素CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素B 3种化合物对人胚肾细胞毒性的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为13.60 µg/mL, 0.26 µg/mL和5.94 µg/mL,说明FR-008/杀念菌素环外羧基由甲基取代以后,新衍生化合物脱羧FR-008/杀念菌素CS103细胞毒性明显降低。

2.3 溶血活性实验

溶血(Hemolysis)即红细胞破裂,血红蛋白逸出

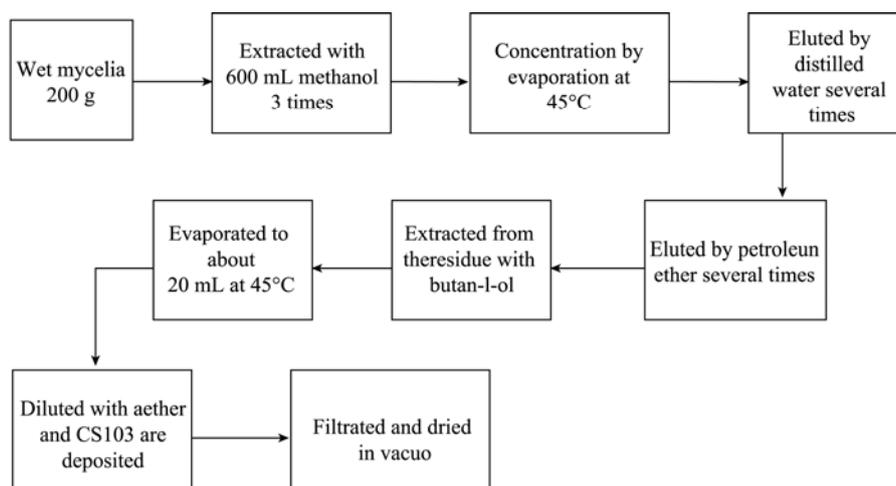


图3 产物分离纯化流程

Fig. 3 The process of separation and purification of antibiotic CS103

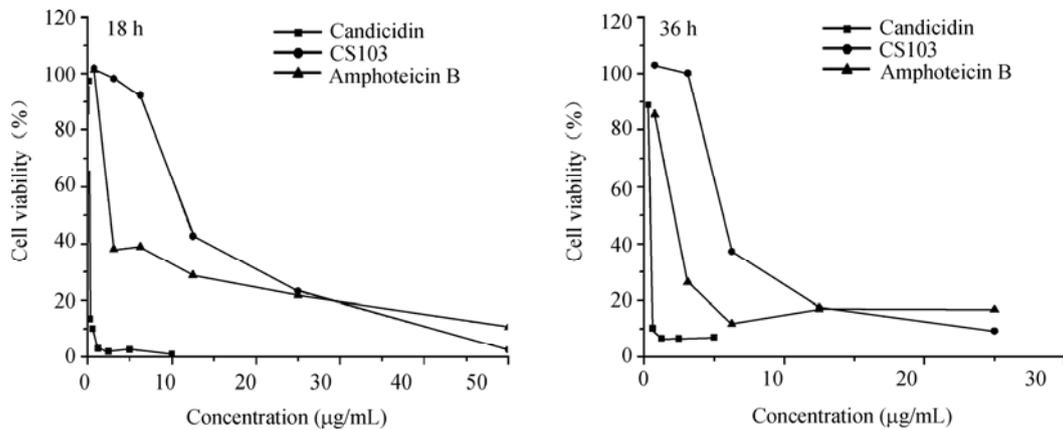


图 4 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 对细胞存活率的影响

Fig. 4 The effect of Decarboxylated FR-008/Candidin derivative CS103, FR-008/Candidin and Amphotericin B on cell viability

称红细胞溶解, 简称溶血。它是衡量药物毒性的一个重要指标。根据 1.3.3 实验方法和计算公式, 得到脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 分别在 200 µg/mL、150 µg/mL、100 µg/mL、50 µg/mL、10 µg/mL、5 µg/mL、0.5 µg/mL、0.1 µg/mL、0.05 µg/mL 浓度下的溶血率, 并作曲线图(图 5)。

从图 5 中可以看出, 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 对人红细胞的溶血活性远远低于 FR-008/杀念菌素和两性霉素 B。杀念菌素和两性霉素 B 均在 1 µg/mL~5 µg/mL 达到 100%溶血, 而脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 直到大于 50 µg/mL 才达到 100%溶血。脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性

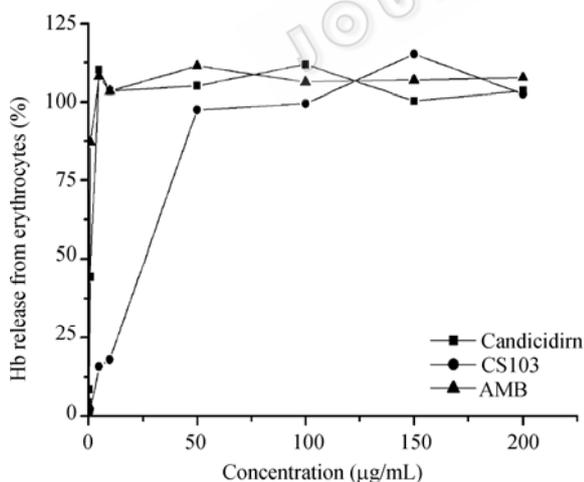


图 5 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 的溶血活性

Fig. 5 Hemolysis of Decarboxylated FR-008/Candidin derivative CS103, FR-008/Candidin and Amphotericin B

霉素 B 3 种化合物引起 50%溶血的浓度分别为: 11.80 µg/mL、0.69 µg/mL 和 0.40 µg/mL。该结果同我们前期的兔红细胞的实验结果一致^[10], 说明 FR-008/杀念菌素环外羧基由甲基取代以后, 新衍生物脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 对人红细胞的溶血活性也明显降低。

2.4 抗白色念珠菌活性实验

抗真菌抗生素脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 等对白色念珠菌(*C. albicans*)的抗菌效果见表 2, 可以看出 FR-008/杀念菌素环外侧链羧基由甲基取代以后, 抗白色念珠菌活性略有降低, 但是降低的程度远没有 2.1 和 2.2 实验结果反映出的毒性降低的程度大, 因此从治疗指数来衡量脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 要优于 FR-008/杀念菌素。而从与两性霉素 B 的对比来看, 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 虽然活性有所降低, 但仍然高于两性霉素 B, 而上述毒性实验结果显示, 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 的细胞毒性和溶血毒性均低于两性霉素 B, 特别是对人红细胞的溶血

表 2 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 抗白色念珠菌活性比较

Table 2 Antifungal activities against *C. albicans* of Decarboxylated FR-008/Candidin derivative CS103, FR-008/Candidin and Amphotericin B on *C. albicans*

白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	最低杀菌浓度 MBC (µg/mL)
Decarboxylated FR-008/Candidin derivative CS103	0.025~0.05
FR-008/Candidin	0.00625~0.0125
Amphotericin B	0.05

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

毒性要降低 50 倍左右, 因此脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 的临床应用前景要优于 FR-008/杀念菌素和两性霉素 B。

3 结论和展望

本文建立了脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 产物的分离提取工艺, 该工艺减少了萃取步骤, 成本大幅降低, 而且避免了产物降解, 提高了效率。在此基础上, 经过进一步纯化, 获得一定量的供试样品。通过细胞毒性实验、溶血活性实验和抗真菌活性实验显示, 脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103、FR-008/杀念菌素和两性霉素 B 三种化合物对人胚肾 HEK293 细胞毒性的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 13.60 μg/mL、0.26 μg/mL 和 5.94 μg/mL, 3 种化合物引起人红细胞 50%溶血的浓度分别为: 11.80 μg/mL、0.69 μg/mL 和 0.40 μg/mL; 而对白色念珠菌(*C. albicans*)的抗菌效果可以看出脱羧 FR-008/杀念菌素 CS103 抗真菌活性高于两性霉素 B, 比 Candicidin 略有降低, 但是没有毒性降低的程度大。因此由上述毒性实验和生物活性实验显示, 基因工程 FR-008/杀念菌素脱羧衍生物 CS103 的毒性大大降低, 而且保持着较高的抗真菌活性, 进一步开发有望为临床提供一种新型抗真菌抗生素。

参 考 文 献

- [1] Hopwood D. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev*, 1997, **97**(7): 2465–2498.
- [2] Bailey J, Birnbaum S, Galazzo J, *et al.* Strategies and challenges in metabolic engineering. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, **589**: 1–15.
- [3] 白林泉, 邓子新. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇与药物创新. *中国抗生素杂志*, 2006, **31**(2): 80–86.
- [4] Singhal A, Mosbach A, Schaffner C. Effect of candicidin on cholesterol and bile acid metabolism in the rat. *Lipids*, 1981, **16**(6): 423–426.
- [5] 梁蓉芳, 周 启. 农抗 5192 产生菌原生质体融合育种的研究. *生物工程学报*, 1987, **3**: 130–136.
- [6] Chen S, Huang X, Zhou X, *et al.* Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/Candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chem Biol*, 2003, **10**(11): 1065–1076.
- [7] 黄 曦, 邓子新, 廖仁安. 多烯大环内酯抗生素——链霉菌 FR-008 代谢产物的研究. *中国抗生素杂志*, 1999, **24**(5): 329–333.
- [8] Fox J. Candicidin, a new antifungal antibiotic: first clinical report. *Antibiotic Med Clin Ther*, 1955, **1**(6): 349–350.
- [9] Gordon H, Schaffner C. The effect of polyene macrolides on the prostate gland and canine prostatic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, **60**(4): 1201–1208.
- [10] Chen S, Mao X, Shen Y, *et al.* Tailoring the P450 monooxygenase gene for FR-008/Candicidin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(6): 1778–1781.
- [11] Mao X, Shen Y, Yang L, *et al.* Optimizing the medium compositions for accumulation of the novel FR-008/Candicidin derivatives CS101 by a mutant of *Streptomyces* sp. using statistical experimental methods. *Proc Biochem*, 2007, **42**(5): 878–883.
- [12] Mao X, Wang F, Zhang J, *et al.* The pH shift and precursor feeding strategy in a low-toxicity FR-008/Candicidin derivative CS103 fermentation bioprocess by a mutant of *Streptomyces* sp. FR-008. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009. (Online)
- [13] 杨 亮, 毛相朝, 周文瑜, 等. 基因工程 FR-008/杀念菌素脱羧衍生物 CS103 发酵过程优化. *中国抗生素杂志*, 2008, **33**(6): 333–337.
- [14] 毛相朝, 杨 亮, 陈 实, 等. 葡萄糖流加策略对基因工程 FR-008/杀念菌素衍生物 CS103 补料分批发酵过程的影响. *工业微生物*, 2009, **39**(2): 1–6.
- [15] Mao X, Shen Y, Wei D, *et al.* Determination of Candicidin/FR-008 and their ramification in fermentation broth by RP-HPLC. *J Chin Pharm Sci*, 2005, **42**(2): 115–118.
- [16] 《中华人民共和国药典》2005 年版附录: 118.
- [17] Larabi M, Yardley V, Loiseau P, *et al.* Toxicity and antileishmanial activity of a new stable lipid suspension of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**(12): 3774–3779.
- [18] Wagman G, Testa R, Patel M, *et al.* New polyene antifungal antibiotic produced by a species of Actinoplanes. *Antimicrob Agents Chemother*, 1975, **7**(4): 457–461.