文章编号：1001-8689(2019)12-1319-09

缩肽类化合物 rakicidins 的研究

环缩肽类 rakicidins 的研究进展

赵薇　江红　林风*
(福建省微生物研究所，福建省新药 (微生物) 筛选重点实验室，福州 350007)

摘要：环缩肽类 rakicidins 于 1995 年被首次发现具有抗肿瘤活性至今，已被陆续发现在乏氧条件下对肿瘤细胞具有更强的选择抑制活性、抗肿瘤干细胞活性及抗厌氧菌活性等，具有进一步研究的价值。本文对 rakicidins 的发现、菌源、结构特征、活性、化学合成、生物合成、作用机制、构效关系等报道内容进行综述，分析研究方向，以期为后续研究者提供一些帮助。

关键词：环缩肽；Rakicidins；活性；合成
中图分类号：R978　　**文献标志码**：A

Advances in the study of cyclic depsipeptide rakicidins

Zhao Wei, Jiang Hong and Lin Feng
(Fujian Provincial Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007)

Abstract　Since 1995 when cyclopetiderakicidin A/B were first identified to have anti-tumor activity, more activities such as selective inhibitory activitieson tumor cells or stem cell-like tumor cells under hypoxic conditions, and strongactivities on anaerobes have been reported. It showed that rakicidins are worthy of further research. In this paper, the discovery, producing strains, structural characteristics, antitumor activities, antibacterial activities, chemical synthesis, biosynthesis pathway, mechanism of action, relation of structure to effect of rakicidins are reviewed, and the research directions were predicted, in order to provide some academic assistance for follow-up investigators.

Key words　Cyclicdepsipeptide; Rakicidins; Activity; Synthesis

近几年来，能选择性地抑制肿瘤干细胞 (tumor stem cells，TSCs) 生长的化合物成了当今药物化学的热门目标。然而，发现这类化合物极为困难，如 2009 年 Gupta[1] 报道了用高通量方法对 16000 个化合物进行筛选，仅发现个别能选择性杀灭乳腺癌干细胞。已经报道的靶向癌症干细胞的天然产物，无论在数量和种类上均极其有限。

目前，美国波士顿生物技术公司与北京强新生物科技有限公司合作研发的抗肿瘤干细胞新药 BBI608[2] 正进行联合紫杉醇针对晚期胃癌的Ⅲ期临床试验。An 等 [3] 研发的抗脑胶质瘤干细胞药物 DMAMCL(即 ACT001)，已获批进入澳大利亚、美国临床试验。此外，处于开发和研究中的也只有盐霉素 (salinomycin)[4]、BE-43547A2[5] 和 rakicidins。因此，rakicidins 有望作为抗乏氧肿瘤细胞的候选药物，具有进一步的研究价值。

本文将从 rakicidins 的发现及其菌源、结构特征、天然活性、化学合成、生物合成、作用机制和构效关系研究等方面进行综述，并对研究方向进行分析，为今后对此类化合物的研究工作者提供参考。

1　Rakicidins 的发现及其生物来源

1995 年以来，国内外同行先后从印度、泰国和

收稿日期：2018-09-13
基金项目：国家重点研发计划 (No. 2018YFC0311001)；十三五重大新药创制项目 ((No. 2019ZX09721001-002-005 和 No. 2018ZX0971001-007-007)
作者简介：赵薇，女，生于 1984 年，硕士，助理研究员，主要从事微生物药物研究，E-mail: zw180@126.com
* 通讯作者，E-mail: life8810@aliyun.com

中国的高山泥土、海泥中分离得到不同的小单孢菌、链霉菌，从中发现了系列天然产物 rakicidins A~I[6-13] 和 B_1[14]，并都被检测出对不同的肿瘤细胞株或者是某些特殊的细菌具有抑制活性。其中 rakicidins A/B/B_1/E/G/H/I 都产自小单孢菌，rakicidins C/D/F 产自链霉菌，产生菌主要来自亚洲地区的陆地或海洋 (表 1)。

2　Rakicidins 及类似物的结构特征

Rakicidins 结构上共同点为：含有罕见特征性性 4- 氨基 -2,4 戊二烯 (APD) 和肌氨酸 (sarcosine，SAR) 等构成的 15 元环肽以及亲脂性长脂肪链结构。Rakicidins C、F 环外 3-OH 位为谷氨酰胺 (glutamine，GLN)，其他 (rakicidinsA/B/B_1/D/E/G-I) 则为天冬酰胺 (asparagine，ASN)。长脂肪链结构在一定程度上也决定同系物之间的活性差异。已经报道的结构类似物有 microtemolide A[18]、vinylamycin[19]，WY1[18] 与 BE-43547A[20]，同样含有 APD 结构单元，但均不含 ASN 基团，且长脂肪链结构各异 (图 1)。

3　Rakicidins 天然产物的活性

Rakicidins 在体外能明显抑制常氧培养条件下多种癌细胞增殖，尤其对一些人高转移性、耐药性、难治性癌细胞均有很强的抑制活性；对肿瘤乏氧细胞有很强的选择性细胞毒性，rakicidin A 除了对 HCT-8、PANC-1 肿瘤细胞株在乏氧条件下有特别显著的抑制效应外，对慢性粒细胞白血病肿瘤干细胞 CML 也同样有显著活性。此外，对部分厌氧菌也有很好的抑制活性。

3.1　抗肿瘤细胞活性

3.1.1　常氧条件下抗肿瘤活性

Rakicidins 在体外常氧条件下对多种肿瘤细胞包括肺癌、结肠癌、白血病肿瘤细胞等都具有较广谱的细胞毒活性作用 (表 2)[6-15,17,21-23,25-27]。

1995 年 Mcbrien 等 [6] 首次发现具有体外抗小鼠 M109 肺癌细胞株活性的 rakicidin A 和 rakicidin B 组分，且 A 的活性高于 B；但在体内对 M109 与 P388 小鼠肿瘤模型无抑制活性 [5]。Rakicidins A/B/E 对小鼠成纤维细胞瘤 L929 细胞株的 MIC 值一致，达到 1.2μg/mL[17]。Rakicidin B 对人类红白血病肿瘤细胞株 K562 细胞生长具有抑制作用，IC_{50} 值为 0.5μg/mL[21]；本研究室发现 rakicidin B_1 对多种人肿瘤细胞株 (HCT-8、MGC803、A549、A375、HepG2 和 CASK Ⅰ) 均有显著抑制活性，且活性与 B 相当，优于 A[14]。近期所得新化合物 rakicidins G~I 经测定也对 HCT-8 与 PANC-1 肿瘤细胞株都有不同程度的抑制活性 [13]。此外，rakicidins A/B/B_1 对多数人高转移性、耐药性、难治性肿瘤细胞均有较强的抑制活性 (数据未发表)。

同时，本研究室对斑马鱼人结肠癌 HCT-8 移植瘤模型的测试结果显示 rakicidins A/B/B1 对移植瘤均有体内抑制作用；rakicidin B1 在水体中浓度为 10ng/mL 情况下即显著抑制移植瘤的生长，抑制率分别达到 29% 和 25%，而 rakicidin A 则不明显 (抑制率仅 10%)[14,27]。

Rakicidin C 对肿瘤细胞株无活性 [7]。Rakicidin D 对小鼠结肠癌肿瘤细胞株 26-L5 具有活性，半致死浓度 IC_{50} 为 3.3μg/mL, 活性低于 rakicidin A 和 B。然而当 rakicdin D 对 26-L5 肿瘤细胞实验浓度达到 10μg/mL 时，对肿瘤细胞生长却没有抑制作用 [10]。Rakicidin F(rakicidin C 的衍生物) 在无细胞毒活性的浓度范围内对小鼠结肠癌细胞生长无抑制作用 [12]。

3.1.2　乏氧选择性抗肿瘤活性

在实体瘤中，由于细胞增殖迅速，且肿瘤血管存在结构和功能的异常，实体瘤中常存在乏氧区域。乏氧区域内的肿瘤细胞为实体瘤中静息状态细胞，

表 1　Rakicidins 系列化合物的天然菌源

Tab. 1　The producing bacteria of rakicidins

序号	组分	来源菌	菌种来源	文献来源
1	Rakicidin A/B	*Micromonospora* No. R385-2	印度 Andhra Pradesh 土壤	Mcbrien[6]
2	Rakicidin A	*Micromonospora chalcea* AL7-5	泰国 Phukradung,Loei 的高山土壤	Songsumanus A[15]
3	Rakicidin A/B	*Micromonospora* sp. DSW705	日本富山湾深海海水	HisayukiK[16]
4	Rakicidin C	*Streptomyces* sp. GT 61042	来自土壤，地点不详	Hu[7]
5	Rakicidin D	*Streptomyces* sp. MWW064	泰国 Samut Sakhon 省海洋沉积物	Igarashi[10]
6	Rakicidin D	*Streptomyces liacinus* NRRL B-1968T	The Agricultural Research Service Collection	Albright[11]
7	Rakicidin A/B/E	*Micromonospora* sp. Guam 1582	关岛浅海海绵 *Rhabdastrella globostellata*	Wiebke[17]
8	Rakicidin F	*Streptomyces* sp. GKU 220	泰国海域海绵内生菌	Kitani[12]]
9	Rakicidin G/H/I	*Micromonospora*	中国福建省海洋沉积物	Chen[13]
10	Rakicidin B_1	*Micromonospora*	中国福建省海洋沉积物	Lin[14]

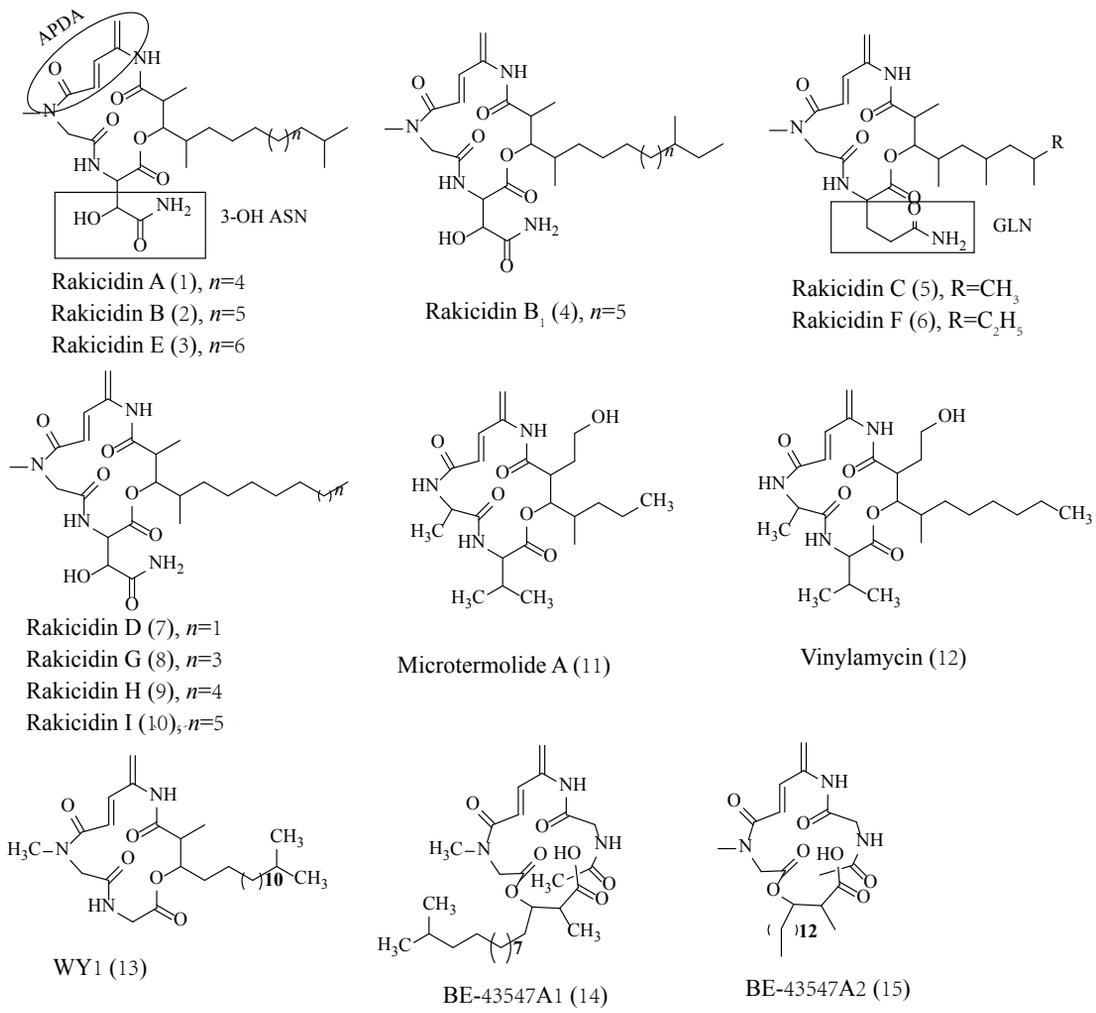


图 1　Rakicidins 以及结构类似物

Fig. 1　Rakicidins and structural analogues

表 2　Rakicidins 常氧条件下对肿瘤细胞株抑制活性 [6-15,17,21-23,25-27]

Tab. 2　Inhibitory activity of rakicidins on tumor cell line under normoxic conditions

RKCs 对细菌的活性	IC_{50}/(μg/mL)									
	RKC-A	RKC-B	RKC-B_1	RKC-C	RKC-D	RKC-E	RKC-F	RKC-G	RKC-H	RKC-I
M109	0.04	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
K562	3.18	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
L929		0.4	-	-	-	-	-	-	-	-
26-L5	0.44	0.17	-	±	3.3	-	7.57	-	-	-
MGC803	0.991	0.104	0.121	-	-	-	-	-	-	-
A549	0.226	0.216	0.394	-	-	-	-	-	-	-
A375	0.040	0.041	0.066	-	-	-	-	-	-	-
HepG2	0.576	2.239	2.516	-	-	-	-	-	-	-
HCT-8	0.731	0.347	0.341	-	-	-	-	0.154	0.150	0.159
PANC-1	0.130	0.183	-	-	-	-	-	0.168	0.163	0.159

注：表中以简写“RKC”替代“rakicidin”；“-”表示数据缺省；“±”表示微弱的抑制活性

对常规的放疗和化疗皆不敏感，但在某种适合条件下会导致肿瘤的复发与治疗的失败。所以，寻找能够杀灭隐藏在肿瘤深处的顽固的肿瘤干细胞药物成为研究者们关注的焦点 [14,27-30]。

2007 年，Yamazaki 等 [28] 在对 20000 个化合物进行细胞乏氧选择性活性筛选的时候发现小单孢菌产

生的 rakicidin A 表现出较广谱的、很强的乏氧选择细胞毒性，在乏氧状态下对胰腺癌细胞 PANC-1 的抑制活性是其在含氧量正常情况下的 14.9 倍，对结直肠肿瘤细胞 HCT-8 的抑制活性是其在含氧量正常情况下的 17.5 倍；rakicidins B 与 B_1 对于人结肠癌 HCT-8 细胞株都表现出较为突出的乏氧选择性抗肿瘤活性，在乏氧状态下对人结肠癌 HCT-8 细胞的抑制活性分别是其在含氧量正常情况下的 14 和 15 倍 [14]。说明 rakicidins 具有良好的抗乏氧肿瘤细胞的能力。

2011 年 Takeuchi[29] 认为酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)——伊马替尼和达沙替尼 (dasatinib) 对慢性粒细胞白血病 K562 型和 KCL22 型疗效显著，对乏氧细胞型不敏感。而 rakicidin A 对乏氧细胞 K562-HA 型和 KCL22-HA 型敏感，对 K562 型和 KCL22 型相对不敏感。

上述研究表明，rakicidins 是目前在肿瘤治疗过程中清除实体瘤中静息状态肿瘤细胞为数不多的潜在药物种类。

3.2　抗菌活性

2006 年江红等 [8] 就已采用纸片扩散法对 rakicidins A 与 B 进行抗菌活性测试，结果它们都未显示出抗细菌与真菌活性，这与 rakicidins A/B 的首次发现者 Mcbrien 等 [6] 的活性测试结果相一致。但是，2016 年德国 Wiebke 等 [17] 从一株小单孢菌中得到 rakicidins A/B/E，96 孔板法活性测试结果，它们表现出了选择性抗革兰阳性细菌活性，尤其对临床耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA N315)、耐万古霉素屎肠球菌 (VREF DSM17050) 具有抑制活性 (表 3)。

2017 年 Kitani 等 [12] 从一株链霉菌中获得了 rakicidin C 与新结构化合物 rakicidin F，采用纸片扩散法检测物质活性，结果当纸片含 25μg rakicidin F 时，表现出对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌表现出抑制活性；当纸片含 50μg rakicidin C 时，仅对枯草芽孢杆菌表现出微弱的活性，该结果与 rakicidin C 的发现者 [7] 所认为的该物质对革兰阳性与阴性细菌均无活性结果相背。

上述同一物质 (rakicidins A/B/C) 前后呈现出截然相反的抗菌活性测试结果，笔者推测其可能的原因有测试方法不同以及选取了对化合物敏感性不同的测试菌。所以，今后的研究可能需要针对该化合物重新建立一个合适的标准生物活性检定方法。

本研究室对 rakicidins A/B/B1 活性检测时发现上述物质均对艰难梭菌、厌氧消化链球菌、牙龈卟啉单胞菌和痤疮丙酸杆菌等革兰阳性厌氧菌具有很强的杀菌活性，MIC 值大多在 0.125~0.25μg/mL 之间，与对照甲硝唑活性相当甚至更强 [31]。对兼性厌氧菌幽门螺杆菌没有明显的杀菌活性。

Rakicidins 具有很好的抗厌氧菌活性 [13,31]，对某些兼性厌氧菌具有弱抑制作用。艰难梭菌、耐万古霉素屎肠球菌是抗生素相关腹泻与结肠炎的主要原因，已经成为临床高病死率之一的感染源。目前用于治疗艰难梭菌感染的药物较少，常用甲硝唑、万古霉素、非达霉素等。此类化合物可能可以开发成用于治疗耐万古霉素屎肠球菌感染、艰难梭菌感染、消化道感染、牙龈感染和面部痤疮等炎症的药物。而在常氧条件下 rakicidins 对常规的细菌与真菌的抑制活性有待更多的实验数据来支持。

正是由于 rakicidins 天然产物在常氧与乏氧条件下表现出对细菌或肿瘤细胞广泛性、差异性的抑制活性，从而引起研究者对该类化合物的绝对结构以及化学合成与生物合成过程的关注。

4　Rakicidins 及其类似物的化学全合成

2011 年以前未见有关 rakicidins 合成 (包括化学合成与生物合成) 的报道，由化学全合成确证 rakicidins 的绝对构型，从而辅助 rakicidins 生物合成途径的推测就显得尤为重要。

4.1　Rakicidin A 的化学全合成

2011 年 Poulsen 等 [32] 首先完成了对 rakicidins 15

表 3　Rakicidins 对细菌的最小抑制浓度 (MIC, μg/mL)

Tab. 3　Minimal inhibitory concentration of rakicidins on bacteria (MIC, μg/mL)

测试菌	Rakicidin A	Rakicidin B	Rakicidin E
Micrococcus luteus (DSM1790)	1.0	1.0	1.0
Bacillus subtilis (DSM10)	4.2	4.2	4.2
Staphylococcus aureus Newman	2.1	4.1	8.3
Staphylococcus aureus N315 (DSM11822) (MRSA)	2.1	2.1	16.5
Enterococcus faecium (DSM20477)	4.1	4.1	8.3
Enterococcus faecium (DSM17050) (VREF)	4.1	4.1	4.1

元缩肽环的合成，但并未确定其绝对构型。2014 年 Sang 等 [23] 全合成了 rakicidin A，确定了碳链上连续 5 个未知的手性中心绝对构型分别为 2*S*、3*S*、14*S*、15*S* 和 16*R*；该立体构型与 Igarashi 等 [30] 通过对天然产物 rakicidin A 进行降解反应的研究结果一致。至此，两种方式确证了天然产物 rakicidin A 的手性中心绝对构型。

4.2 Rakicidins 类似物的化学全合成

2015 年 Yang 等 [19] 首次通过 16 步化学全合成得到了 rakicidins 结构类似物 vinylamycin，总收率为 3.7%，确定了其中 3 个未知的手性原子的构型分别为 14*R*、15*R* 和 16*S*，从而最终确定了 vinylamycin 的天然构型。

2016 年 Poulsen 等 [25] 采用简单不对称合成方式得到 rakicidin A 的对映体 (2*R*、3*R*、14*R*、15*R*、16*S*)。同时，全合成得到了 rakicidin A 结构类似物 WY1，该物质在乏氧条件下对肿瘤细胞 PANC-1 的选择性抑制能力明显优于 rakicidin A。该化学全合成中关键的转化步骤有：①通过非对映体选择性有机催化羟醛缩合反应来构建分子中多聚酮片段；②高位阻酯片段耦合反应；③高效的 HWE 反应使大环环化闭合；④采用 DSC 试剂介导的消去反应来组建 rakicidin A 中敏感不稳定的 APD 基团。

在真菌与细菌中存在着许多具有药物活性的天然产物分子，但绝大多数有待开发研究。其中，BE-43547 分子具有很高的抗肿瘤活性，基于 BE-43547 具有 rakicidins 类天然产物的作用特点，Sun 等 [5] 推测其有杀灭胰腺癌干细胞的可能性，并以线性 15 步完成了 BE-43547A2 分子全合成，且合成路线高效简洁，最终获得 350mg BE-43547A2 的纯品。首次在实验室中进行了 BE-43547A2 的干细胞靶向性测试，实验结果预示着 BE-43547A2 能够使胰腺癌复发几率下降，具有药物开发的潜力。

由于 rakicidins 在化合物的化学合成中主要有 3 个挑战：一是 15 碳元环的封闭，二是环内酯键有很高的空间位阻，三是罕见结构的亲电基团 4- 氨基 -2,4 戊二烯 (APD) 结构不稳定。所以，rakicidin A 及其类似物化学合成过程中最为关键的步骤归纳起来有两点：一是将不稳定的 4- 氨基 -2,4 戊烯酰胺残基留在最后一步来合成，二是通过构建一个简单的反式酰化同分异构体来建立位阻酯键。

5 Rakicidins 的生物合成途径

有关 rakicidins 生物合成途径目前研究很少，仅 Komaki 等 [16] 在 2016 年发表的文章阐明 rakicidins A/B(图 2) 与 rakicidin D 生物合成途径 (图 3)[33]，研究均采用全基因组测序的方式分别获得产生菌 *Micromonospora* sp. DSW705 与 *Streptomyces* sp. MWW064 的全基因序列信息，进行了基因组功能注释和次级代谢产物合成基因簇预测，同时分析 rakicidins 化学结构特点，认为其生物合成过程中包含有典型的 PKS 与 NRPS 有关酶系统，利用次级代谢产物编码基因成簇存在的特点，从菌株全基因组中定位了 rakicidins A/B 与 rakicidin D 的生物合成基因簇，利用 PKS-NRPS 生物合成特点推测了 rakicidins 的生物合成途径。

Rakicidins 的生物合成途径推测为：长链脂肪酸

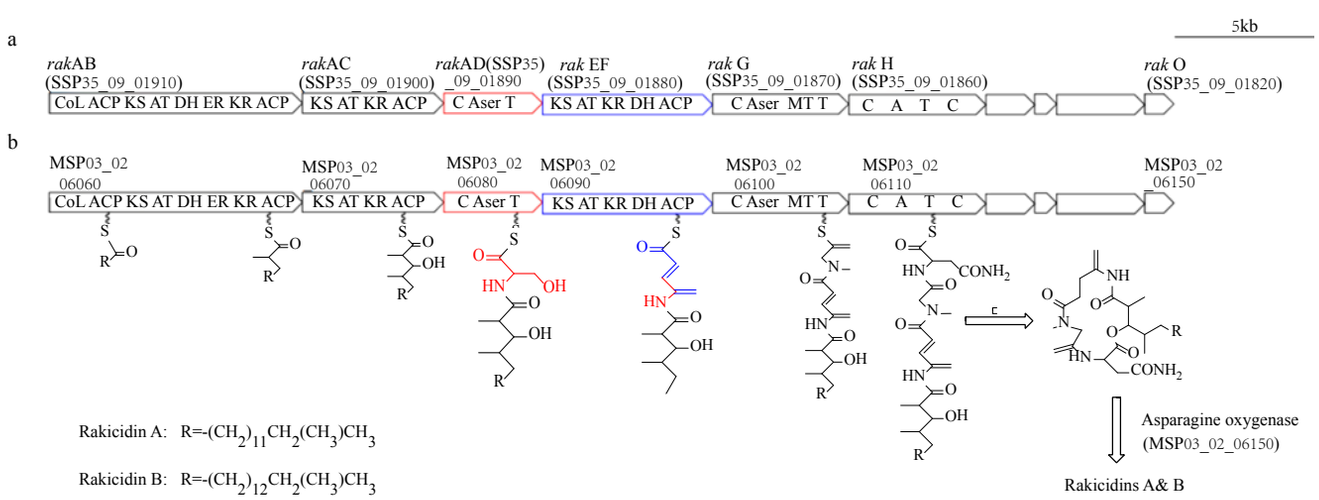


图 2 链霉菌 MWW064(a) 和小单孢菌 DSW705(b) 中 rakicidins A/B 合成基因簇以及生物合成机制 [16]

Fig. 2 Biosynthesis gene cluster and biosynthesis mechanism of rakicidin A/B in *Streptomyces* sp. MWW064 (a) and *Micromonospora* sp. DSW705 (b)

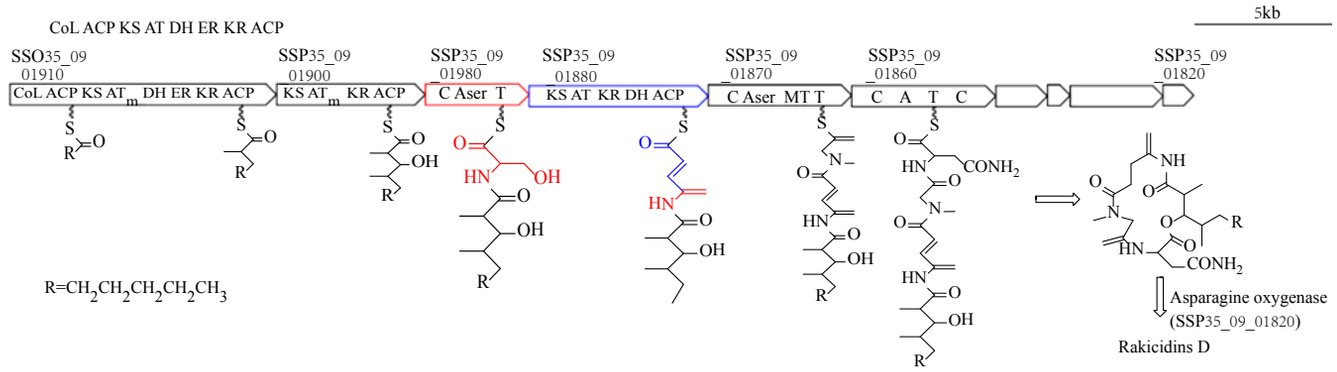


图 3　链霉菌 MWW064 中 rakicidin D 合成基因簇以及生物合成机制 [33]

Fig. 3　Biosynthesis gene cluster and biosynthesis mechanism of rakicidin D in *Streptomyces* MWW064

作为起始物质进入到 PKS-NRPS 合成中，先后依次加载甲基丙二酰 CoA、丝氨酸、丙二酰 CoA、甘氨酸、天冬酰胺以及在硫酯酶催化内酯化下形成核心环骨架，最终经过环化前体侧链的氧化修饰等合成 rakicidins[34]。该合成途径目前仅限于推测，后续还需通过放射性示踪元素喂养菌株以及合成途径关键酶相关基因的敲除来验证。

6　Rakicidins 生物作用机制的研究

在对生物来源的 rakicidins 活性、结构、合成了解的同时，该类物质在生物体 (细胞) 内的作用机制也得到了初步的研究。

在前文提到，尽管当 rakicidin D 对 26-L5 肿瘤细胞作用浓度达到 10μg/mL 时，实验结果没有显示出对肿瘤细胞生长抑制作用，但当浓度为 3.3μg/mL 时却能半数致死细胞 [10]。这说明 rakicidins 化合物对细胞毒性的作用途径并不单一，可能有诱导肿瘤细胞快速走向程序性死亡的途径。2011 年，谢剑君等 [22] 研究结果验证了这一理论，具体为 rakicidin B 在 EC109 细胞内的抗肿瘤机制主要可能是激活细胞凋亡线粒体途径与 MAPK 信号转导途径，抑制细胞信号转导蛋白 p38 和 ERK 的表达，影响细胞骨架系统，降低细胞黏附性等。

2007 年，Yamazaki 等 [28] 在研究 rakicidin A 对肿瘤细胞 CHO 乏氧选择性抑制活性时，以荧光素酶为报告基因，构建了针对 HIF1 下游基因 VEGF 启动子序列的筛选体系，发现 rakicidin A 并未对荧光素酶活性有明显影响，认为 rakicidin A 对肿瘤细胞乏氧选择性细胞抑制作用机制不依赖于 HIF1 信号通路。

2011 年，Takeuchi 等 [29] 的研究中酪氨酸激酶抑制剂对乏氧 CML 细胞抑制作用不明显，而 rakicidin A 对乏氧 CML 细胞有很好的选择毒性，这说明 rakicidin A 除了激活线粒体途径诱导凋亡外，可能还存在与激活半胱氨酸蛋白酶无关的途径诱导细胞凋亡。

2018 年，Jacobsen 等 [35] 首次提出了含 APD 结构的环脂肽类化合物在乏氧条件下对癌细胞的新的作用靶标为线粒体，具体为该类化合物的低氧选择性毒性似乎通过一种不涉及 DNA 靶向的机制来实现，在氧化和内质网应激的同时，可诱导缺氧癌细胞中线粒体完整性与功能的快速丧失。小鼠体内实体瘤的实验数据表明，天然的 APD 环缩肽类及合成的类似物在更广泛的临床前研究中是高优先级的化合物，特别是与其他针对常氧条件下细胞群体的治疗方式，如放疗相比较。

7　Rakicidins 及其类似物构效关系

目前天然来源 rakicidins 类化合物较少，化学结构与功能的信息不全，为加速对该类化合物物理化学性质以及生物活性的了解，相关研究者针对 rakicidins 特征性结构单元 APD、肌氨酸、亲脂性长脂肪链结构、谷氨酰胺或者天冬酰胺结构，进行化学修饰及对相应化合物的活性检测，以建立起该类化合物的构效关系。

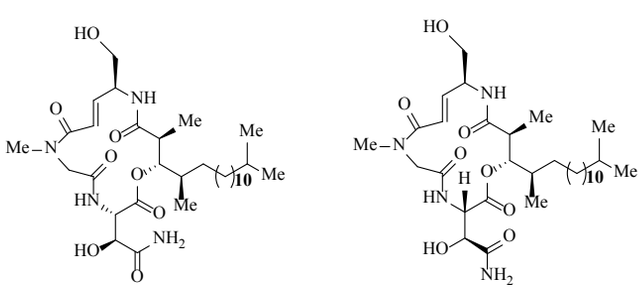


图 4　Rakicidin A 总合成过程中间产物 A 与 B

Fig. 4　Intermediate product A and B of total synthesis of rakicidin A

7.1 APD 基团与生物活性的关系

APD 属于弱亲电基团，是关键活性结构。Tsakos 等 [25] 与 Poulsen 等 [32] 在合成 rakicidin A 的过程中产生了相类似结构的 rakicidin A 前体物 (图 4)，这两个物质在 11 碳的位置还未脱水形成 APD 结构，活性测定表明其完全丧失了对 PANC-1 肿瘤细胞活性，所以该基团的破坏导致 rakicidin A 对肿瘤抑制活性的消失。

Poulsen 等 [24] 采用硫醇消去法来制备 rakicidins 系列化合物中 mc-APD 基团，并且认为该结构在大环未封闭前，mc-APD 结构处于高度不稳定状态，在大环封闭后的环境下比较稳定，该亲电基团与其系列化合物抗癌活性相关。因为许多已通过批准的亲电有机化合物是分子药物的一个来源，采用与蛋白质间高度特异的共价结合的方式对生物体产生相应的活性。

7.2 3- 羟基天冬氨酰 / 谷氨酰胺结构与活性的关系

Rakicidins A\B\D\E 中的 3- 羟基天冬氨酰结构，在化合物中可能起着次要作用，可以在不影响化合物主要生物活性的前提下，具有结构上的灵活性，可以被重新移动或替换，以此产生性能改进的类似物。2016 年，Sang 等 [26] 将 rakicidin A 中 3- 羟基天冬酰胺中的氨基用甲氧基进行替换，结果修饰后的 4- 甲氧基 rakicidin A(1a) 化合物对耐伊马替尼的 K562/G$^+$ 肿瘤细胞株的 IC_{50}=0.047μmol/L，显示出比 rakicidin A 更好的活性，与 rakicidin A 相比活性提高了 2.8 倍，高于伊马替尼近 100 倍。

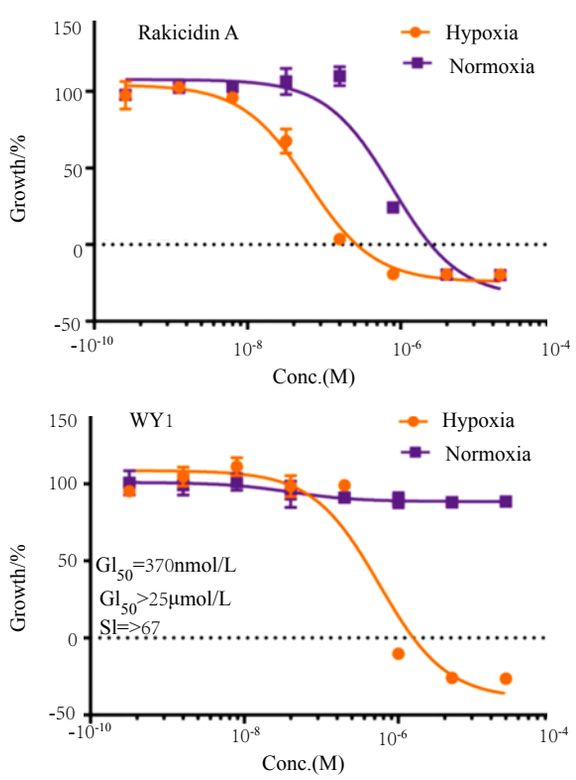


图 5 Rakicidin A 与 WY1 对 PANC-1 肿瘤细胞在常氧与乏氧条件下的活性情况 [18]

Fig. 5 Activity of rakicidin A and WY1 on PANC-1 tumor cells under normoxic and hypoxic conditions

Tsakos 与 Poulsen 等 [18,25] 在合成过程中获得了 WY1 化合物，该物质完全抹去了 3- 羟基天冬氨酰基团，经活性测试表明 (图 5)WY1 对 PANC-1 肿瘤细胞的乏氧选择性活性选择能力大于 67，而 rakicidin A 的乏氧活性选择性能力为 11.8，说明 WY1 的乏氧选择性能力与 rakicidin A 相比提高了 5.68 倍左右。

7.3 脂肪链与活性的关系

Rakicidin A 中脂质片段的长度对活性很重要。Rakicidin B 对 M109 活性低于 rakicidin A 的 5 倍。Rakicidin E 主碳链最长 (33C)，与 rakicidins A/B (31C/32C) 相比，几乎丧失了选择性毒性。Rakicidin D 的主碳链长度 (23C) 最佳，既降低了常氧条件下细胞毒性，又不影响其在乏氧状态下对肿瘤细胞的选择性毒性 [18]。

7.4 同分异构体中不同对映体对 rakicidins 活性的影响

对映体 *ent*-rakicidin A 在体外对肿瘤细胞 K562 的活性比天然构象的 rakicidin A 降低了大约 4 倍；对 K562/G$^+$ 细胞的活性降低了 6 倍。所以说，天然构型 (*2S,3S,14S,15S,16R*) 的 rakicidin A 表现出最好的抗 CML 的活性。当 Sang 等 [23] 在确定 rakicidin A 绝对构型时合成了所有 5 个手性中心可能的同分异构体，并测定了相应化合物的活性。同时认为当 C16 为 *S* 构型，C14、C15 为 *R* 构型时，相比 C14、C15、C16 都为 S 构型的 rakicidin A 类似物的细胞活性略高 [26]。

根据以上关于 rakicidins 构效方面的研究资料与数据可知，保持 rakicidins 中的 APD 基团、15 元环结构以及适当长度的长链脂肪烃结构的完整性，就能保证 rakicidins 对肿瘤细胞的乏氧选择性毒性。其他结构与构象上的修饰仅仅会使 rakicidins 生物活性值上下波动。

8 结语

自 1995 年 rakicidins 化合物首次被发现至今，结合现有文献与本研究室对 rakicidins 的研究工作，总结了几个重要的进展节点 (图 6)。上述活性研究结果表明 rakicidins 具有良好的抗革兰阳性厌氧菌与广谱抗乏氧肿瘤细胞活性，因此 rakicidins 有望作为抗乏氧肿瘤细胞以及抗艰难梭菌感染的候选药物，具



图 6　Rakicidins 的研究历程

Fig. 6　The milestone of rakicidins research

有进一步研究的价值。

但是，目前国内外已经发表的对 rakicidins 系列化合物的研究资料较少，总共约有 26 篇，其中外文文献 22 篇，国内文献 4 篇。本研究室目前已发现并增加了 3 个新结构的 rakicidins 系列化合物，还有许多结构类似物有待发现。

Rakicidins 产生菌范围较窄，目前仅发现存在于小单胞菌与链霉菌属菌株内；需要进一步扩大菌质资源，以便了解菌株代谢产生 rakicidins 系列化合物对于菌株本身以及所处环境微生态的意义。

Rakicidins 的生物合成途径至今仅限于从基因组草图中通过生物信息学分析以及结合 rakicidins 结构特点所进行的粗略推测，还缺乏实质性的实验，如前体同位素标记、生物合成基因簇中关键酶功能的确证 (基因敲除、回补) 等，对推测的生物合成途径进行验证。

Rakicidins 化合物的生物活性范围有待于进一步挖掘与扩大，rakicidins 的作用机制未明；毒理、药学、药代动力学、药效学的研究才刚起步。这些都催促着广大科研工作者加快脚步对之进行深入的研究。

参 考 文 献

[1] Gupta P B, Onder T T, Jiang G, *et al*. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 645-659.

[2] Li Y, Rogoff H A, Keates S, *et al*. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, 112(6): 1839-1844.

[3] An Y, Guo W, Li L, *et al*. Micheliolide derivative DMAMCL inhibits glioma cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): 1-16.

[4] Zhao Y, Zhong L, Liu L, *et al*. Salinomycin induces apoptosis and differentiation in human acute promyelocytic leukemia cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2): 877-886.

[5] Sun Y, Ding Y, Li D, *et al*. Cyclic Depsipeptide BE-43547A_2: Synthesis and activity against pancreatic cancer stem cells[J]. *Angew Chem*, 2017, 56(46): 14627-14629.

[6] Mcbrien K D, Berry R L, Lowe S E, *et al*. Rakicidins, new cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora* sp. fermentation, isolation and characterization[J]. *J Antibiot*, 1995, 48(12): 1446-1452.

[7] Hu J F, Wunderlich D, Sattler I, *et al*. Rakicidin C, A new cyclic depsipeptide from *Streptomyces* sp.[J]. *Eur J Org Chem*, 2000, 2000(19): 3253-3362.

[8] 江红 , 林如 , 郑卫 , 等 . 海洋青铜小单孢菌 FIM 02-523 产生的缩肽类化合物 FW523 的分离鉴别和生物学活性 [J]. 中国抗生素杂志 , 2006, 31(5): 267-270.

[9] Hu J F, Dirk W, Isabel S, Rakicidin C. A new cyclic depsipeptide from *Streptomyces* sp.[J]. *Eur J Org Chem*, 2010, 2000(19): 3353-3356.

[10] Igarashi Y, Shimasaki R, Miyanaga S, *et al*. Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived *Streptomyces* sp[J]. *J Antibiot*, 2010, 63(9): 563-565.

[11] Albright J C, Goering A W, Doroghazi J R, *et al*. Strain-specific proteogenomics accelerates the discovery of natural products via their biosynthetic pathways[J]. *J Ind Microbiol Biot*, 2014, 41(2): 451-459.

[12] Kitani S, Ueguchi T, Igarashi Y, *et al*. Rakicidin F, a new antibacterial cyclic depsipeptide from a marine sponge-derived *Streptomyces* sp.[J]. *J Antibiot*, 2018,71(1): 139-141.

[13] Chen L, Zhao W, Jiang H L, *et al*. Rakicidins G-I, cyclic depsipeptides from marine *Micromonospora chalcea* FIM 02-523[J]. *Tetrahedron*, 2018, 74(30): 4151-4154.

[14] Lin F, Wang C X, Jiang H L, *et al*. Rakicidin B_1, a new rakicidin analogue with antitumor activities from marine *Micromonospora* sp.[J]. *Chin J Antibiot*, 2016, 41(7): 510-515.

[15] Songsumanus A, Kudo T, Igarashi Y, *et al*. Characterization and screening of antimicrobial activity of *Micromonospora* strains from Thai soils[J]. *Malay J Microbiol*, 2013, 9(3): 260-269.

[16] Hisayuki K, Natsuko I, Akira H, *et al*. Draft genome sequence of *Micromonospor*a sp. DSW705 and distribution of biosynthetic gene clusters for depsipeptides bearing 4-amino-2,4-pentadienoate in actinomycetes[J]. *Stand Genomic Sci*, 2016, 11(1): 84-94.

[17] Wiebke L, Sabrina K, Peter J, *et al*. Biological active rakicidins A, B and E produced by the marine *Micromonospora* sp. isolate Guam1582[J]. *Advance Biotechnol Microbiol*, 2016, 1(2): 1-5.

[18] Tsakos M, Jacobsen K M, Yu W, *et al*. The rakicidin family of anticancer natural products-synthetic strategies towards a new class of hypoxia-selective cytotoxins[J]. *Synlett*, 2016, 27(13): 1898-1906.

[19] Yang Z, Yang G, Ma M, *et al*. Total synthesis and determination of the absolute configuration of vinylamycin[J]. *Org Lett*, 2015, 17(23): 5725-5727.

[20] Villadsen N L, Jacobsen K M, Keiding U B, *et al*. Synthesis of ent-BE-43547A_1 reveals a potent hypoxia-selective anticancer agent and uncovers the biosynthetic origin of the APD-CLD natural products[J]. *Nat Chem*, 2017, 9(3): 264-272.

[21] 江红 , 林如 , 江红 , 等 . 海洋小单孢菌来源的轻快菌素 BFW523-3 的体外抗肿瘤活性 [J]. 中国抗生素杂志 , 2008, 33(9): 531-533.

[22] Xie J J, Zhou F, Li E M, *et al*. FW523-3, a novel lipopeptide compound, induces apoptosis in cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(4): 759-763.

[23] Sang F, Li D, Sun X, *et al*. Total synthesis and determination of the absolute configuration of rakicidin A[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(44): 15787-15791.

[24] Clement L L, Tsakos M, Schaffert E S, *et al*. The amido-pentadienoate-functionality of the rakicidins is a thiol reactive electrophile development of a general synthetic strategy[J]. *Chem Commun*, 2015, 51(62): 12427-12430.

[25] Tsakos M, Clement L L, Schaffert E S, *et al*. Total synthesis and biological evaluation of rakicidin A and discovery of a simplified bioactive analogue[J]. *Chem Inform*, 2016, 55(3): 1030-1035.

[26] Sang F, Ding Y, Wang J, *et al*. Structure–activity relationship study of rakicidins: Overcoming chronic myeloid leukemia resistance to imatinib with 4-methylester-rakicidin A[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(3): 1184-1196.

[27] 林风 , 陈晓明 , 周剑 , 等 . 海洋小单孢菌产生的缩肽类化合物 rakicidins 抗肿瘤活性研究 [J]. 中国抗生素杂志 , 2016, 41(7): 516-519.

[28] Yamazaki Y, Kunimoto S, Ikeda D. Rakicidin A: A hypoxia-selective cytotoxin[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(2): 261-265.

[29] Takeuchi M, Ashihara E, Yamazaki Y, *et al*. Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(3): 591-596.

[30] Oku N, Matoba S, Yamazaki Y M, *et al*. Correction to complete stereochemistry and preliminary structure-activity relationship of rakicidin A, a hypoxia-selective cytotoxin from *Micromonospora* sp[J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(11): 2561-2565.

[31] 林风 , 陈丽 , 赵薇 , 等 . 缩肽类化合物 rakicidins 体内外抗艰难梭菌活性研究 [J]. 中国抗生素杂志 , 2017, 42(5): 343-347.

[32] Poulsen T B. A concise route to the macrocyclic core of the rakicidins[J]. *Chem Commun*, 2011, 43(17): 12837-12839.

[33] Hisayuki K, Arisa I, Natsuko I, *et al*. Draft genome sequence of *Streptomyces* sp. MWW064 for elucidating the rakicidin biosynthetic pathway[J]. *Stand Genomic Sci*, 2016, 11(1):