

DOI: 10.14188/j.ajsh.20250519001

7-羟基环庚三烯酚酮的绿色合成及抗肿瘤功效

徐沫, 郭林菲, 苏子涵, 谢志雄*, 龙燕*

(武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 乳腺癌化疗药物副作用较大, 新型抗乳腺癌药物开发迫在眉睫。7-羟基环庚三烯酚酮(7-hydroxytropolone, 7-HT) 是一种由假单胞菌株分泌的具有抗肿瘤潜力的非荧光铁载体, 但天然产量低限制其应用。通过优化东湖假单胞菌(*Pseudomonas donghuensis*) HYS 菌株的培养条件提高 7-HT 的产量, 并利用乳腺癌细胞 MDA-MB-231 探究其抗乳腺癌的生物活性及机制。结果表明, 东湖假单胞菌 HYS 生产 7-HT 的最佳碳源为甘油: 蔗糖(4:1), 最佳氮源为酸水解酪素(casein acids hydrolysate, CAA), 结合外源添加 0.2 g/L 苯乙酸, 可将 7-HT 产量提升至原产量的 1.41 倍。机制研究发现, 7-HT 通过同时激活内源和外源凋亡通路, 诱导细胞凋亡抑制乳腺癌细胞活力。

关键词: 7-羟基环庚三烯酚酮; 东湖假单胞菌 HYS; 绿色合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2025)04-0389-08

Green synthesis and antitumor effect of 7-hydroxytropolone

Xu Mo, Guo Linfei, Su Zihan, Xie Zhixiong*, Long Yan*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China)

Abstract: Chemotherapy drugs for breast cancer have significant side effects, making the development of new anti-breast cancer drugs extremely urgent. 7-hydroxytropolone (7-HT) is a non-fluorescent siderophore with antitumor potential secreted by *Pseudomonas* strains, but its low natural production limits its application. By optimizing the culture conditions of *Pseudomonas donghuensis* HYS, the biosynthesis production of 7-HT was enhanced. And breast cancer cells MDA-MB-231 was used to explore its bioactivity and mechanism against breast cancer. The results showed that the optimal carbon source for the production of 7-HT by *Pseudomonas donghuensis* HYS was glycerol: sucrose (4:1), the optimal nitrogen source was casein acid hydrolysate (CAA). And combined with exogenous addition of 0.2 g/L phenylacetic acid, 7-HT production could be increased to 1.41 times of the original yield. Mechanism studies revealed that 7-HT inhibited the viability of breast cancer cells by simultaneously activating endogenous and exogenous apoptosis pathways and inducing apoptosis.

Key words: 7-hydroxytropolone; *Pseudomonas donghuensis* HYS; green synthesis; antitumor activity

0 引言

乳腺癌是女性过早死亡的最常见原因之一, 而且其治疗以化疗为主, 副作用较大, 故更多新的抗乳腺癌药物有待开发。20 世纪 80 年代以来, 真菌的次级代谢产物特殊的结构和独特的生物活性引起广泛

关注, 在抗肿瘤药物中扮演着重要角色。环庚三烯酚酮(tropolone)类化合物最早发现于真菌的次级代谢产物^[1-3]。其由于环上羰基的作用增加了羟基的酸性, 使环庚三烯酚酮及其衍生物普遍具有烯醇与酚类物质的特性。这使得这一类化合物均表现出高

收稿日期: 2025-05-19 修回日期: 2025-06-10 接受日期: 2025-06-25

作者简介: 徐沫(2003-), 男, 研究方向为细胞生物学, E-mail: 2021303061023@whu.edu.cn

* 通讯联系人: 谢志雄(1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向为微生物生理生化, E-mail: zxxie4@whu.edu.cn; 龙燕(1980-), 女, 博士, 正高级实验师, 研究方向为环境微生物, E-mail: skyjck4@whu.edu.cn

引用格式: 徐沫, 郭林菲, 苏子涵, 等. 7-羟基环庚三烯酚酮的绿色合成及抗肿瘤功效[J]. 生物资源, 2025, 47(4): 389-396.

Xu Mo, Guo Linfei, Su Zihan, et al. Green synthesis and antitumor effect of 7-hydroxytropolone [J]. Biotic Resources, 2025, 47(4): 389-396.

度多元的生物活性,如具有抗细菌、抗真菌、抗线虫、抗疟疾、抗肿瘤等功能^[4-7]。而在其丰富的生物活性中,抗肿瘤的生物活性是最热点的研究领域。含环庚三烯酚酮七元环天然产物具有金属结合和氧化还原特性,为人类癌细胞生长的有效抑制剂。例如,早期发现的一些微生物天然代谢产物 β -thujaplicinol能够抑制畸胎瘤细胞F9的生长,影响分化进行,诱导细胞死亡;Eglerisine则是一个包含环庚三烯酚酮骨架的倍半萜类化合物,其作用机制较为特殊,通过磷酸化H2 AX蛋白减少S期,增加细胞周期G2期,使细胞周期在72 h后停止,进而造成细胞绝对数目减少,对人类急性髓系白血病细胞系Kasumi-1具有抗增殖作用。有研究对多种实体瘤及癌细胞系体外活性进行了筛选,结果表明,环庚三烯酚酮类化合物展现出多样的抗肿瘤活性^[8]。其中,抗肿瘤活性最强的环庚三烯酚酮类化合物是在1988年由百时美施贵宝公司的研究员报告的3,7-二羟基环庚三烯酚酮(3,7-dihydroxytropolone,后被命名为BMY-28438)。其对B16黑色素细胞有强大的细胞毒性,IC₅₀值可达260 nmol/L。同时,3,7-二羟基环庚三烯酚酮对DNA、RNA和蛋白质合成也有非特异性的抑制作用,IC₅₀值分别为60 mmol/L、90 mmol/L和70 mmol/L。其功效在动物模型上得到了验证,在携带来自B16细胞的肿瘤的小鼠中,每天1.3 mg/kg的浓度下,小鼠可存活约29天,几乎是未治疗小鼠的两倍。对3,7-二羟基环庚三烯酚酮的进一步研究更是发现了其生物活性的主要来源是7-羟基环庚三烯酚酮(7-hydroxytropolone,7-HT)基团,这为7-HT及其衍生物的生物活性研究打下了基础^[9]。

然而,截至目前,尚未有该类化合物发展成为候选药物,表明此类化合物还有待发掘。此前,7-羟基环庚三烯酚酮(7-HT)被报道为一种新型铁载体^[10-11],虽有很多其他生物活性,如抗肿瘤、抗疟、金属酶抑制剂等,但其在自然界产量过低,导致其功能没有被充分开发与应用。

本研究希望通过改变本实验室中具有高产铁载体能力的东湖假单胞菌株HYS的培养环境^[12-14],以提高7-HT的产量,通过生物合成7-HT,为其生物活性研究提供原材料。同时,利用前期工作中生物合成的7-HT,探究其对乳腺癌细胞MDA-MB-231的抑制作用及机理,以期对相关药物的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究菌株为东湖假单胞菌(*Pseudomonas*

donghuensis)HYS前株;人乳腺癌细胞系为MDA-MB-231。所用仪器有超净工作台、分光光度计、恒温摇床、恒温培养箱、UV-2550型紫外可见分光光度计、全自动高压灭菌锅、pH计、分析电子天平、细胞培养箱、生物安全柜、倒置显微镜、酶标仪、流式细胞仪、实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪、液相色谱质谱联用仪;所用试剂有甲醇、青霉素混合液(双抗)、胰蛋白酶、DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)培养基、甲醇、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)溶液、细胞计数试剂(cell counting kit-8, CCK-8)溶液、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒、反转录试剂盒、qPCR试剂盒等。

培养基有如下两种:

1)改良的LB(Luria-Bertani)培养基(1 L):10 g 蛋白胨,5 g 酵母浸出物,5 g 氯化钠溶于自来水,定容至1 L;固体LB培养基则按照1.5%的终浓度添加琼脂;1×10⁵ Pa灭菌30 min。

2)MKB培养基(pH 7.2, 450 mL):准确量取7.5 mL甘油,称取1.25 g K₂HPO₄,去离子水溶解,用HCl将pH调至7.2后定容至450 mL,1×10⁵ Pa灭菌30 min。灭菌后每90 mL MKB溶液加无菌5% MgSO₄溶液和10% 酸水解酪素(casein acids hydrolysate, CAA)溶液各5 mL混匀。

培养基成分均用去离子水配制,所用器皿均用重铬酸浸后经去离子水冲洗。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养

取得冷冻保存的东湖假单胞菌,在固体LB培养基上平板划线活化菌株,平板倒置在生物安全柜中30℃培养一天,在划线末尾得到活化的单个菌落。挑取平板上活化后的单菌落接种在5 mL液体LB培养基试管中,30℃摇床200 r/min培养过夜。将培养过夜后的东湖假单胞菌培养物按1%转接于液体MKB培养基三角瓶中,30℃摇床200 r/min培养12~14 h。

1.2.2 7-HT的提取

1)7-HT的分离提取。先将提取所用的玻璃器皿,如分液漏斗、烧杯、圆底烧瓶等,用甲醇润洗1~2遍,置于通风橱挥发干。将MKB液体培养基转移至50 mL离心管中配平,4℃,7 500 r/min离心30 min,收集上清液。用0.22 μm millipore微孔过滤器过滤上清液,倒入分液漏斗中,加入0.5倍上清液体积的乙酸乙酯,萃取,保留下层水相,重复两次。用浓盐

酸将收集的水相的pH调至2.0后,再用0.5倍水相体积的乙酸乙酯萃取两次,每次均保留上层有机相。将有机相转入圆底烧瓶中,安装至旋转蒸发器,在40℃、60~80 r/min条件下,减压旋转蒸发,至肉眼不可见乙酸乙酯液体,此时瓶内壁附着淡黄色针状晶体。取下烧瓶,滴加适量的甲醇将产物全部溶解,再于瓶口包裹保鲜膜,4℃保存。以上所用器皿均泡酸过夜后经去离子水冲洗后使用。

2)全波段扫描法检验7-HT纯度。取少量溶于甲醇的产物,制成稀释500倍后的检验样品。使用日本岛津生产的全波段扫描仪,提前开机,使其充分预热并完成自检。向两个专用石英比色皿中加入80 μL双蒸水,放入扫描仪,扫描波长范围设置为200~500 nm,点击“基线”选项,设定基线。将其中一个比色皿取出,用80 μL样品润洗1遍后,将其吸出,重新加入80 μL样品,将比色皿放回扫描仪进行扫描,测量全波段峰值,得到相应数据用于后期作图。

1.2.3 CCK-8法检测细胞活力

根据实验需要,先用血细胞计数板计算出细胞悬液中的细胞浓度,按照每孔2 000个MDA-MB-231细胞,将细胞悬液接种到96孔板中,确保细胞分布均匀,使每孔80 μL细胞液,在96孔板周围一圈加PBS。再将接种好的96孔板放入细胞培养箱,设置培养条件为37℃、5% CO₂。培养过夜,到细胞贴壁50%~80%的状态时,按照梯度终浓度(0 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L和150 μmol/L)加入20 μL检验的药品,设置用药时长梯度为12 h、24 h、36 h、48 h,继续培养。

在设定的时间点,避光条件下取出96孔板,向每孔中加入10 μL CCK-8试剂。注意避免产生气泡,以免影响实验结果。将96孔板放回细胞培养箱中,继续孵育2 h。孵育结束后,取出96孔板,使用酶标仪在450 nm波长处测定每孔的光吸收值。记录数据并作图分析。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

细胞传代后计数,计算细胞密度,6孔板每孔种70 000个细胞,按每孔种1 mL的体积,补新鲜培养基制成细胞悬液,混匀后每孔加1 mL细胞悬液到6孔板中,后每孔补加1 mL新鲜培养基。在37℃、5% CO₂培养箱中过夜至细胞贴壁;吸去1 mL培养基后,根据药物处理的浓度加药处理48 h。收集上清液和贴壁细胞,2 000 r/min离心5 min,弃上清液,用1 mL预冷PBS重悬细胞,再2 000 r/min离心5 min,弃掉PBS;加入Binding Buffer重悬细胞,

每管加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI,轻柔涡旋混匀后,室温避光孵育5 min。最后在流式细胞仪上,通过检测通道检测相关染料。

1.2.5 RT-qPCR检测

1)细胞传代后计数,计算细胞密度,6孔板每孔种70 000个细胞,按每孔种1 mL的体积,补新鲜培养基制成细胞悬液,混匀后每孔加1 mL细胞悬液到6孔板中,后每孔补加1 mL新鲜培养基;

2)在37℃、5% CO₂培养箱中过夜至细胞贴壁;

3)弃去1 mL培养基,根据药物处理的浓度加药处理48 h;

4)收集上清液和贴壁细胞,2 000 r/min离心5 min,弃上清液,用1 mL预冷PBS重悬细胞,再2 000 r/min离心5 min,弃掉PBS;

5)用Trizol法提取细胞总mRNA;

6)用反转录试剂盒将mRNA反转录为cDNA;

7)使用qPCR试剂盒在RT-qPCR仪上检测目的基因的表达水平,引物合成序列见表1。

表1 qPCR引物
Table 1 Primer sequences for qPCR

引物	序列
Caspase 8-F	AGAAGAGGGTTCATCCTGGGAGA
Caspase 8-R	TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC
Bcl-2-F	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT
Bcl-2-R	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
Bid-F	TGGGACACTGTGAACCAGGAGT
Bid-R	GAGGAAGCCAAACACCAGTAGG

2 结果

2.1 提高7-HT生物合成产量

为探究氮源对东湖假单胞菌HYS生产7-HT的影响,本研究使用其他多种有机、无机氮源替换原培养基氮源,并在接种HYS后,利用细菌培养上清液全波段扫描法检测7-HT的单位产量,同时测定OD₆₀₀值,以了解各氮源的特性并确定最佳氮源。7-HT在330 nm和392 nm处有特征吸收峰,但在392 nm处的吸收峰受荧光铁载体405 nm处吸收峰的干扰,故以330 nm处的峰值指示7-HT单位产量,以392 nm处的峰值为参考。

HYS菌株单一氮源培养液的上清液吸收光谱见图1;HYS菌株在单一氮源中的生长情况见图2(以OD₆₀₀值指示其生长情况)。综合图1和图2,得出CAA为HYS菌株生产7-HT的最佳氮源,CAA中7-HT产量是其他氮源培养液中7-HT产量最大值的4~5倍。而鸟氨酸、蛋白胨为氮源时,OD₆₀₀值

分别是原氮源(CAA)的1.3倍、1.5倍,更适于菌株的生长。但鸟氨酸会抑制非荧光铁载体7-HT的生产,蛋白胨则抑制荧光铁载体的生产,两者促进菌株生长的策略可能有所不同。无机氮源整体不适用于HYS菌株的生长,其中 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 作为氮源时几乎不产铁载体,可能是因为无机氮源对pH的影响较大,需进一步测定培养基pH进行验证。

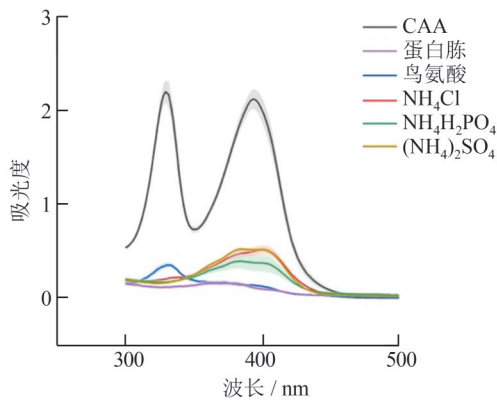
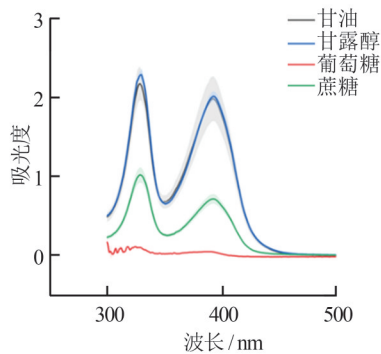


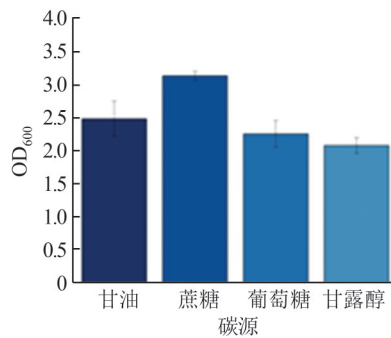
图1 东湖假单胞菌株HYS在单一氮源培养液的上清液吸收光谱

Figure 1 Absorption spectrum of the supernatant from *P. donghuensis* HYS cultured under single nitrogen source conditions

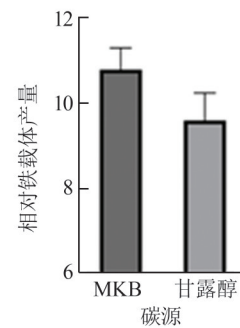
为探究碳源对东湖假单胞菌HYS生产7-HT的影响,选取了几种常见碳源替换原培养基碳源,并在接种HYS后,利用细菌培养上清液全波段扫描法检测7-HT的单位产量,同时测定 OD_{600} 值,计算7-HT总产量,通过比较7-HT总产量来确定最佳碳源。实验结果如图3所示,MKB培养基中的7-HT相对产量高于以甘露醇为单一碳源的改良培养基,证明甘油是HYS生产7-HT的最佳碳源。而以葡萄糖为单一碳源时菌株几乎不产生铁载体;以蔗糖为单一碳源会导致铁载体单位产量下降一半,但能



(a) HYS在单一碳源培养液中的上清液吸收光谱



(b) HYS在单一碳源中的生长情况(24h)



(c) HYS在单一碳源中的相对铁载体产量

图3 单一碳源对东湖假单胞菌株HYS 7-HT产量的影响

Figure 3 Effect of single carbon source on 7-HT production of *P. donghuensis* HYS

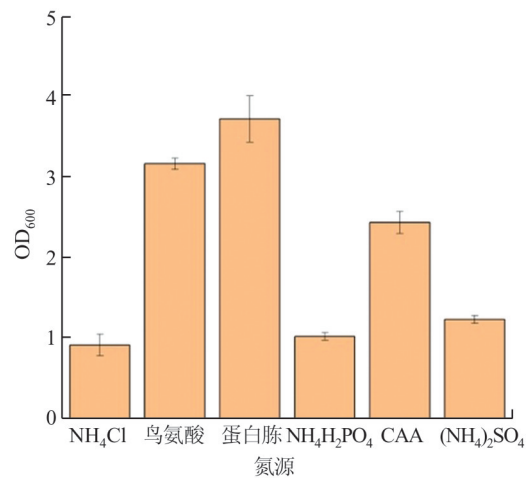


图2 东湖假单胞菌株HYS在单一氮源中的生长情况(24h)

Figure 2 Growth of *P. donghuensis* HYS cultured under single nitrogen source conditions (24h)

提升一定的 OD_{600} 值;甘露醇会使7-HT产量小幅上升至MKB(甘油)的1.1倍, OD_{600} 值却下降至MKB(甘油)的83%,导致以上述3种碳源为单一碳源时总产量均减少。

通过单一碳源筛选实验发现,蔗糖可增加菌株的增殖,但不利于产生铁载体;而甘油、甘露醇虽利于7-HT生产,但不能使菌株数达到最大。故为发挥各种碳氮源的优势,将原有碳、氮源替换为等质量的组合碳、氮源:(1)组合碳源MG为质量比为2:1的甘油与甘露醇;(2)组合碳源GS为2:1的甘油与蔗糖;(3)组合碳源MS为2:1的甘露醇和蔗糖;(4)组合氮源MN为7:3的CAA与蛋白胨。实验结果如图4所示,GS的相对铁载体总产量最高,为对照(MKB组)的1.1倍。对于GS与MS,虽然其7-HT产量略低于MKB组,但其 OD_{600} 值比MKB组略有增加。而与对照组相比,MG与MN会导致7-HT单位产量大幅下降。

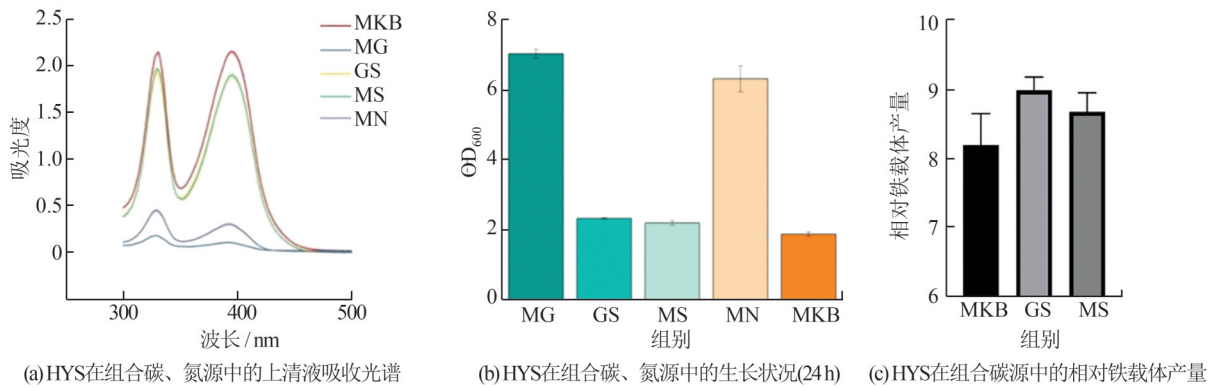


图4 组合碳、氮源对东湖假单胞菌株 HYS 7-HT 产量的影响

Figure 4 Effects of combined carbon and nitrogen sources on 7-HT production of *P. donghuensis* HYS

在筛选出最佳组合碳源后,为进一步确定组合碳源中各组分最佳比例,调整了GS组中甘油和蔗糖的比例,设置甘油和蔗糖质量比例分别为4:1、2:1、1:1、1:2的比例梯度后(将其组别分别记为4:1、2:1、1:1、1:2),检测7-HT含量,实验结果如图5所示。甘油与蔗糖比例为4:1时,HYS相对铁载体产量最高,为对照的1.16倍。OD₆₀₀值随蔗糖比例的上升呈先下降后上升的趋势,可能是因为甘油和蔗糖对OD₆₀₀值的影响差异较小;而单位产量随甘油比例的下降呈下降趋势,说明甘油在此碳源组合中主导了7-HT的单位产量。

苯乙酸在此前被报道能够促进7-HT的生产,但对HYS野生型菌株7-HT产量的促进作用是否显著未被明确报道。实验中,将苯乙酸溶解于乙醇中配置成高浓度苯乙酸的乙醇溶液,加入培养基,并设置了一系列终浓度梯度。同时,运用细菌培养上清液全波段扫描法检测7-HT单位产量,以显示外源苯乙酸对HYS菌株7-HT产量的影响。结果如图6所示,添加苯乙酸能提高MKB培养物上清液中7-HT的产量,当苯乙酸终浓度在0.2 g/L时,7-HT产量达到最大,为空白组的1.41倍,后续随着

苯乙酸浓度的增加,7-HT的单位产量反而有所下降。

2.2 7-HT 抗乳腺癌生物活性的探究

7-HT 被报道具有抗疟、抗肿瘤等生物活性。为探究7-HT是否具有抗乳腺癌的生物活性,开展了CCK-8实验检测7-HT对乳腺癌细胞活力的影响,结果如图7所示。7-HT对乳腺癌细胞活力具有抑制作用,在处理24 h以上的组别中,相较于对照组,几乎各浓度7-HT处理组的细胞活性都显著下降。同时,7-HT作用时间短时,对乳腺癌细胞的活力抑制效果差,各浓度间差别也不大;而当作用36 h后,抑制效果逐渐明显,到48 h抑制能力最强,且随着7-HT浓度的升高,乳腺癌细胞活性降低。说明7-HT对乳腺癌细胞活力的抑制作用具有时间和剂量的依赖性。

大多数化疗药物依靠诱导细胞发生程序性死亡来达到抗肿瘤效果。细胞凋亡是程序性死亡的主要途径之一。在CCK-8实验中观察到,7-HT作用后的乳腺癌细胞出现明显凋亡现象,故推测7-HT通过细胞凋亡途径诱导乳腺癌细胞死亡。本研究选取CCK-8实验中抑制效果好的40 μmol/L和80 μmol/L

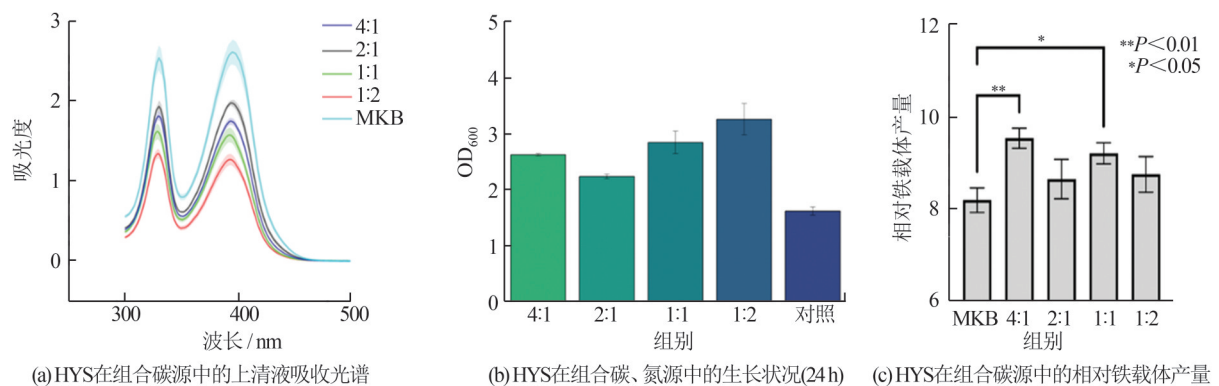
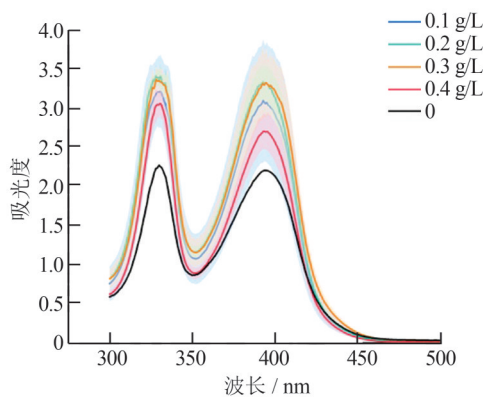
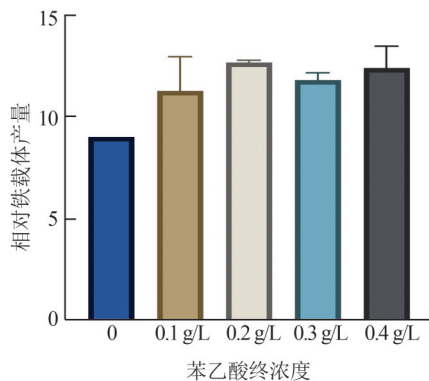


图5 组合碳源组分比例对东湖假单胞菌株 HYS 7-HT 产量的影响

Figure 5 Effects of component ratios of combined carbon sources on 7-HT production of *P. donghuensis* HYS



(a) 添加苯乙酸后的上清液吸收光谱



(b) 添加苯乙酸后的铁载体相对产量

图6 苯乙酸对7-HT产量的影响

Figure 6 Effects of phenylacetic acid on 7-HT production of *P. donghuensis* HYS

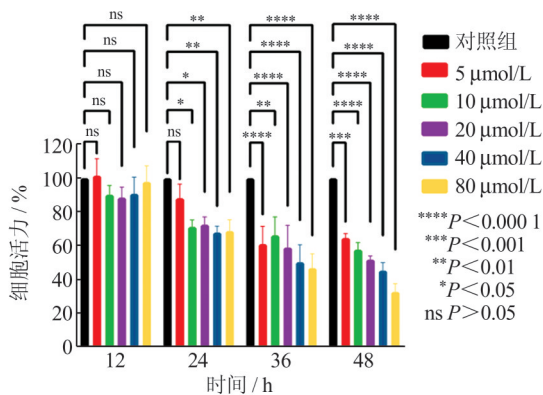


图7 7-HT对乳腺癌细胞活力的影响

Figure 7 Effects of 7-HT on viability of breast cancer cell

7-HT的48 h处理组,开展流式细胞术实验,进行凋亡的验证和凋亡率的检测,实验结果如图8所示。

40 μmol/L和80 μmol/L的7-HT在作用48 h后,对癌细胞的促凋亡效应具有一定显著性,其促凋亡作用随药物浓度的升高而加强。80 μmol/L 7-HT在作用48 h后,癌细胞凋亡率达到61.08%,显著高于40 μmol/L 7-HT处理组,且80 μmol/L 7-

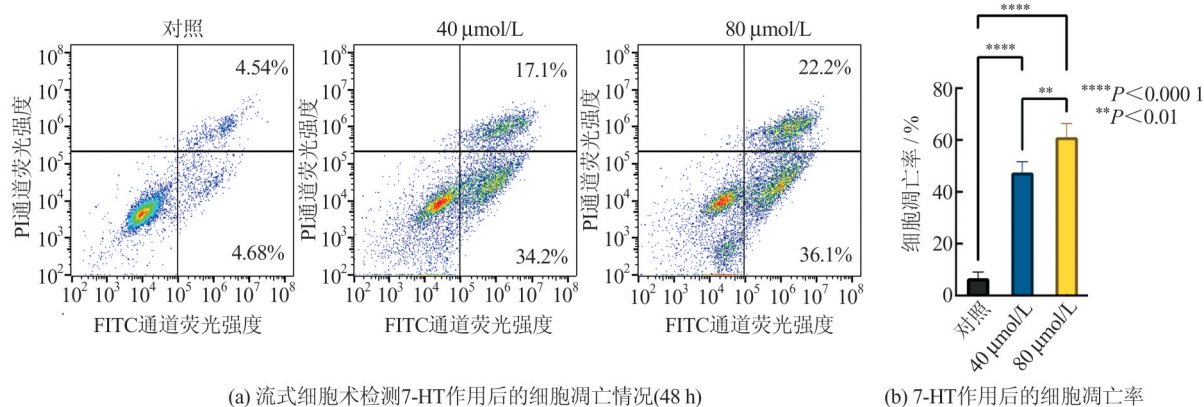
HT处理组中晚期凋亡细胞较40 μmol/L 7-HT处理组多,验证了7-HT对乳腺癌细胞的促凋亡效应具有剂量的依赖性,且高浓度的7-HT能更好地促使乳腺癌细胞进入凋亡晚期。

为进一步探究7-HT诱导乳腺癌细胞凋亡的机制,开展了RT-qPCR实验,检测了3个与凋亡相关的关键基因*Bid*、*Bcl-2*、*Caspase 8*的表达,以了解7-HT是通过哪些通路诱导乳腺癌细胞凋亡。结果如图9所示,在40 μmol/L和80 μmol/L的7-HT作用48 h后,乳腺癌细胞中检测的凋亡相关基因的表达都呈显著上调趋势,说明7-HT同时从内源和外源两个途径促进细胞凋亡。同时,80 μmol/L的7-HT作用48 h后*Caspase 8*的表达明显多于40 μmol/L的7-HT,而40 μmol/L的7-HT作用48 h后癌细胞中*Bcl-2*的表达多于80 μmol/L的7-HT。由此推测80 μmol/L的7-HT主要通过外源途径促进癌细胞凋亡,而40 μmol/L的7-HT主要通过内源途径促进癌细胞凋亡。实验组细胞中*Bid*表达量高于对照组,表明内源途径受到外源途径的一定影响,同时也作为阳性对照验证了凋亡的发生。

3 讨论

提高7-HT的生物合成产量,突破自然界7-HT产量低的瓶颈和探究7-HT的生物活性,了解其对乳腺癌细胞的杀伤作用,是微生物代谢产物7-HT能被有效利用、乳腺癌新药得以开发的关键。本研究聚焦于7-HT绿色合成产量的提升,并探究其潜在的抗肿瘤生物活性,阐明其作用机制。通过更换原培养基的碳氮源,得到的培养基最佳碳源为甘油:蔗糖4:1的组合碳源,最佳氮源为CAA,将7-HT的生物合成产量提高至原产量的1.16倍;通过外加7-HT合成相关物质苯乙酸,发现外加苯乙酸的最佳终浓度为0.2 g/L,能使7-HT的生物合成产量提升至原产量的1.41倍。此外,验证了7-HT具有通过从内外源通路诱导细胞凋亡,从而抑制乳腺癌细胞活力的生物活性。这些结果为7-HT被开发为新的治疗乳腺癌的药物提供了实验依据和理论基础。

本研究在以下方面还有待改进:(1)首先,在提高7-HT产量方面,并未同时更换7-HT生产培养基的碳源和添加苯乙酸,这两种方法能否同时提高7-HT的产量,之间是否有交互效应还未可知。对于这种互作效应,大部分研究通过正交实验予以阐明,故后续可开展正交实验探究以上问题^[15-16]。其次,本文主要通过筛选培养基碳氮源来提高7-HT的产量,后续可通过添加诱导因子、筛选其他影响因子,



(a) 流式细胞术检测7-HT作用后的细胞凋亡情况(48 h)

(b) 7-HT作用后的细胞凋亡率

图8 流式细胞仪检测7-HT诱导乳腺癌细胞凋亡

Figure 8 Detection of 7-HT-induced apoptosis in breast cancer cells by flow cytometry

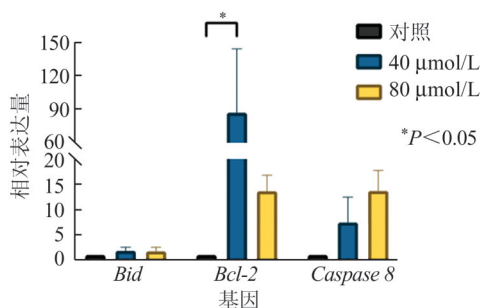


图9 凋亡相关基因表达量检测结果

Figure 9 Expression levels of apoptosis-related genes

如无机盐等,进一步提高7-HT产量。最后,提高东湖假单胞菌HYS菌株7-HT产量最重要的是了解东湖假单胞菌中7-HT合成的完整代谢通路^[17-20],这还有待更多研究。(2)在7-HT抗乳腺癌的生物活性方面,本研究主要通过RT-qPCR实验检测相关基因的表达情况,暂不清楚相关蛋白的表达水平,后续应开展WB实验,在蛋白水平上对其作用机制进行进一步验证^[21-22]。且由于观察到7-HT作用后的乳腺癌细胞出现明显凋亡现象,实验主要聚焦在7-HT促凋亡效应的验证和探究方面,7-HT能否通过其他方式达到抗肿瘤效果有待进一步研究。

参考文献

- [1] Birkinshaw J H, Chambers A R, Raistrick H. Studies in the biochemistry of micro-organisms: stipitatic acid, C(8)H(6)O(5), a metabolic product of *Penicillium stipitatum* Thom[J]. *Biochemical Journal*, 1942, 36(1/2): 242-251.
- [2] Didierjean J, Isel C, Querré F, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, RNase H, and integrase activities by hydroxytyropolones[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(12): 4884-4894.
- [3] Tu D G, Yu Y, Lee C H, et al. Hinokitiol inhibits vas-

culogenic mimicry activity of breast cancer stem/progenitor cells through proteasome-mediated degradation of epidermal growth factor receptor [J]. *Oncology Letters*, 2016, 11(4): 2934-2940.

- [4] Duffy B K, Défago G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2429-2438.
- [5] Ma Q, Sun Q W, Tan M, et al. Highly efficient production of N-acetyl-glucosamine in *Escherichia coli* by appropriate catabolic division of labor in the utilization of mixed glycerol/glucose carbon sources [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(21): 5966-5975.
- [6] Oleksy-Sobczak M, Klewicka E. Optimization of media composition to maximize the yield of exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2020, 12(2): 774-783.
- [7] Matuszewska M, Maciąg T, Rajewska M, et al. The carbon source-dependent pattern of antimicrobial activity and gene expression in *Pseudomonas donghuensis* P482[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 10994.
- [8] Kravchenko L V, Azarova T S, Leonova-Erko E I, et al. Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains[J]. *Microbiology*, 2003, 72(1): 37-41.
- [9] Meck C, d'Erasmus M P, Hirsch D R, et al. The biology and synthesis of α -hydroxytyropolones[J]. *Medchemcomm*, 2014, 5(7): 842-852.
- [10] Jones J B. Fluorescence on single-carbon sources for separation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *P. viridiflavaon* tomato transplants[J]. *Plant Disease*, 1986, 70(2): 151.
- [11] 陈铭浩, 刘志豪, 王永红. 凝结芽孢杆菌混合碳源乳

- 酸发酵研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 155-161.
- Chen M H, Liu Z H, Wang Y H. Lactic acid fermentation by *Bacillus coagulans* with mixed carbon sources [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 155-161.
- [12] Yu M, Liu T, Chen Y C, et al. Combination therapy with protein kinase inhibitor H89 and Tetrandrine elicits enhanced synergistic antitumor efficacy [J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018, 37(1): 114.
- [13] 姜桢. 东湖假单胞菌产非荧光螯铁物质的相关研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2016.
- Jiang Z. The study on the non-fluorescent iron-Chelator produced by *Pseudomonas donghuensis* [D]. Wuhan: Wuhan University, 2016.
- [14] 罗珍. 东湖假单胞菌 HYS 中苯乙酸代谢与 7-HT 合成相关性研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2019.
- Luo Z. The study of correlation between phenylacetic acid metabolism and 7-HT synthesis in *Pseudomonas donghuensis* HYS [D]. Wuhan: Wuhan University, 2019.
- [15] 张骏, 要辉, 张崇, 等. 板桥党参多糖提取工艺优化及对肝癌细胞 HepG 2 的抑制[J]. 生物资源, 2018, 40(3): 246-251.
- Zhang J, Yao H, Zhang C, et al. Polysaccharide extraction process optimization of Banqiao *Codonopsis* and its inhibition effect on human hepatoma cell HepG2 [J]. Biotic Resources, 2018, 40(3): 246-251.
- [16] Wiegmann K, Hensler M, Wöhlbrand L, et al. Carbohydrate catabolism in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, a member of the marine *Roseobacter clade* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15): 4725-4737.
- [17] Muzio F M, Hamilton C D, Stincone P, et al. Comparative multi-omics survey reveals novel specialized metabolites and biosynthetic gene clusters under GacS control in *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6 [J]. Molecular Microbiology, 2024, 122(6): 896-913.
- [18] Moffat A D, Höing L, Santos-Aberturas J, et al. Understanding the biosynthesis, metabolic regulation, and anti-phytopathogen activity of 3, 7-dihydroxytropolone in *Pseudomonas* spp [J]. mBio, 2024, 15(10): e0102224.
- [19] Xiao Y Q, Xiang W, Ma X R, et al. HemN2 regulates the virulence of *Pseudomonas donghuensis* HYS through 7-hydroxytropolone synthesis and oxidative stress [J]. Biology, 2024, 13(6): 373.
- [20] Jafra S, Jabłońska M, Maciąg T, et al. An iron fist in a velvet glove: The cooperation of a novel pyoverdine from *Pseudomonas donghuensis* P482 with 7-hydroxytropolone is pivotal for its antibacterial activity [J]. Environmental Microbiology, 2024, 26(1): e16559.
- [21] 李俊, 熊峰. 澳洲茄边碱通过 Caspase3 蛋白诱导人肺腺癌 A549 细胞的凋亡作用 [J]. 生物资源, 2016, 38(3): 21-24.
- Li J, Xiong F. Apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells induced by solamangine through activation of Caspase3 protein [J]. Biotic resources, 2016, 38(3): 21-24.
- [22] 卢月月, 易宏锋. 原花青素诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制的研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2016, 38(2): 28-31.
- Lu Y Y, Yi H F. Procyanidin induces gastric cancer cell line SGC-7901 apoptosis and its mechanism [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2016, 38(2): 28-31.