

· 论著 ·

## 药物体外干预改善盐敏感性高血压小鼠内皮祖细胞功能研究

尚刘文心<sup>1</sup>, 孙 昕<sup>2</sup>, 彭 程<sup>2</sup>, 谢和辉<sup>2</sup>, 陈丰原<sup>2</sup>, 张 川<sup>1</sup> (1. 海军军医大学药学院中药鉴定教研室, 上海 200433; 2. 上海交通大学医学院, 上海 200025)

**[摘要]** 目的 探索改善去氧皮质酮/盐(DOCA-salt)高血压小鼠内皮祖细胞(EPC)功能的药物干预手段。方法 健康的成年 C57BL/6 小鼠, 随机分为模型组和假手术对照组, 模型组制备 DOCA-salt 高血压小鼠模型, 用尾动脉测压法测定小鼠血压, 提取其 EPC 并分别用流式细胞仪和荧光显微镜进行鉴定, 模型组小鼠 EPC 分别用四氢生物蝶呤(BH<sub>4</sub>)、超氧化物歧化酶-聚乙二醇(PEG-SOD)、N(G)-硝基-L-精氨酸(L-NNA)孵育 24 h, 检测其功能。结果 与对照组比较, DOCA-salt 高血压小鼠的收缩压明显升高( $P<0.01$ ), 其 EPC 的黏附功能和小管形成功能明显受损( $P<0.01$ ), 而经 BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA 孵育 24 h 后, EPC 的黏附功能( $P<0.01$ )和小管形成功能( $P<0.05$ )均显著改善。结论 BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA 可有效改善 DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 受损的功能。

**[关键词]** 内皮祖细胞; 高血压; 四氢生物蝶呤; 超氧化物歧化酶; N(G)-硝基-L-精氨酸

**[中图分类号]** R544.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)03-0221-06

**[DOI]** 10.12206/j.issn.1006-0111.201912074

## Improvement of impaired endothelial progenitor cell functions by *in vitro* drug interference in DOCA-salt hypertensive mice

SHANG Liuwenxin<sup>1</sup>, SUN Xin<sup>2</sup>, PENG Cheng<sup>2</sup>, XIE Hehui<sup>2</sup>, CHEN Fengyuan<sup>2</sup>, ZHANG Chuan<sup>1</sup> (1. Department of Authentication of Chinese Medicines, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), superoxide dismutase-polyethylene glycol (PEG-SOD) and N(G)-nitro-L-arginine (L-NNA) on impaired endothelial progenitor cell (EPC) functions in DOCA-salt hypertensive mice. **Methods** DOCA-salt hypertension was created and systolic blood pressure was measured by tail-cuff methods. EPC was isolated from bone marrow of mice and characterized by flow cytometry and fluorescence microscopy. EPC of DOCA-salt mice was incubated with BH<sub>4</sub>, PEG-SOD, and L-NNA for 24 h, then *in vitro* EPC function assays were performed. **Results** Compared with control group, systolic blood pressure was significantly increased in DOCA-salt mice. Both EPC adhesion and angiogenesis functions were impaired in DOCA-salt mice compared to control animals, which were reversed by incubation with BH<sub>4</sub>, PEG-SOD and L-NNA. **Conclusion** BH<sub>4</sub>, PEG-SOD and L-NNA rescued the impairments from EPC functions in DOCA-salt hypertensive mice.

**[Key words]** endothelial progenitor cells; hypertension; tetrahydrobiopterin; superoxide dismutase; N(G)-nitro-L-arginine

保护血管内皮对维护心血管系统健康有着重要意义<sup>[1]</sup>。近年的研究证实, 血管内皮完整性的维持不仅依赖于现有的内皮细胞, 而且与骨髓来源的具有向成熟内皮细胞分化能力的未成熟细胞——内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 的募集有关<sup>[2-3]</sup>。临床研究证实, 外周血中循环 EPC 的数量与冠心病常见的危险因素 (如高血压、糖尿病

等)呈负相关关系, EPC 可作为治疗缺血、肺动脉高压等血管疾病状态的新靶点<sup>[2-3]</sup>。本课题组和他人的研究均证实<sup>[2, 4-5]</sup>, 高血压动物和患者的 EPC 均出现显著的功能受损。因此, 如果能够通过药物干预手段逆转其受损的 EPC 功能, 无疑对减轻高血压患者与内皮功能相关的靶器官损伤, 以及改善高血压 EPC 移植治疗效果等具有重要意义。

去氧皮质酮/盐 (Deoxycorticosterone acetate-salt, DOCA-salt) 高血压模型是一种盐敏感性高血压动物模型, 盐敏感性高血压在美国高血压患者中占 1/3 的比例, 是一种重要的高血压类型<sup>[4-6]</sup>。课题

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170115, 81370253)

**[作者简介]** 尚刘文心, 硕士研究生, Email: shirleyheart@163.com

**[通讯作者]** 张 川, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药活性成分研究, Email: zc843016@shu.edu.cn

组既往的研究证实, DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 功能受损与其内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 的脱偶联 (uncoupling) 有关<sup>[5]</sup>。在研究中我们也找到了一些对 eNOS 脱偶联相关的信号通路/分子有一定改善作用的药物, 如四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH<sub>4</sub>), 超氧化物歧化酶-聚乙二醇 (superoxide dismutase-polyethylene glycol, PEG-SOD), N(G)-硝基-L-精氨酸 (N(G)-nitro-L-arginine, L-NNA) 等<sup>[5-6]</sup>。但目前尚不知道这些药物是否可有效逆转 DOCA-salt 小鼠受损的 EPC 功能。本研究拟在以往研究的基础上, 寻找改善盐敏感性高血压小鼠 EPC 功能失常的有效药物干预手段, 为进一步的 EPC 移植治疗研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

野生型 (C57BL/6) 雄性小鼠, 10~12 周龄, 体重 20~25 g (上海斯莱克实验动物中心)。

### 1.2 药品及主要试剂

BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA (美国 Sigma 公司), EGM-2 培养基 (Lonza 公司), 胎牛血清 (美国 GIBCO 公司), Matrigel 胶 (美国 BD 公司)。

### 1.3 小鼠模型的制备与实验方法

#### 1.3.1 DOCA-salt 高血压小鼠模型制备<sup>[5-6]</sup>

选用 10~12 周龄, 体重 20~25 g 野生型 (C57BL/6) 雄性小鼠进行模型制作。小鼠麻醉, 侧卧位固定, 腹部纵行切口, 暴露左肾, 小心结扎肾动脉和肾静脉后, 进行左肾切除, 缝合切口。然后在小鼠两前臂中间的位置开一个大约 1 cm 的纵行切口, 皮下埋置 150 mg/kg 的 DOCA 缓释片。DOCA 组小鼠给予含 1.0% NaCl 和 0.2% KCl 的盐水。假手术组小鼠也进行左肾切除, 但不给 DOCA 缓释片, 而且饮用常规自来水。手术后, 所有动物被单独饲养于一个干净的塑料笼内。术后第 21 天用尾动脉测压法测定动物的收缩压水平。

#### 1.3.2 EPC 的分离与培养<sup>[4-5, 7]</sup>

将玻璃粘连蛋白 (vitronectin) 加入 6 孔板预处理后备用。小鼠麻醉后处死。使用无菌器械剥离小鼠双侧后肢股骨、胫骨并剔除肌肉组织, 于超净台内用 EGM-2 培养基冲出骨髓。将骨髓细胞浓度调定至  $2.5 \times 10^5$  /cm<sup>2</sup> 后, 加入预处理的 6 孔板内培养 (37 °C、5% CO<sub>2</sub>)。第 4 天弃去原培养基, 更换新鲜培养基, 第 7 天使用。

#### 1.3.3 EPC 的鉴定<sup>[5, 7]</sup>

本研究采用了以下两种鉴定方法。

(1) 流式细胞仪法: EPC 培养至第 7 天后, 用 0.125% 胰酶-0.02% EDTA 消化, 洗涤后调整细胞密度为  $2 \times 10^6$  /ml, 将细胞与 Sca-1 的抗体 (1 μg/ml) 和 Flk-1 的抗体 (1 μg/ml) 在冰上共孵育 1 h, 注意避光。之后用 5% BSA/PBS 洗涤, 再用 2% 的多聚甲醛固定 10 min, 用流式细胞仪检测 Sca-1、Flk-1 双标阳性的细胞, 即为 EPC。

(2) 荧光显微镜法: EPC 培养至第 7 天后, 用 PBS 洗细胞, 加入 1 mg/ml Dil-acLDL (1:200), 于 37 °C 避光孵育 4 h, 用 PBS 洗细胞, 加 2% 多聚甲醛固定 10 min。加 10 μg/ml 的 Lectin, 室温避光孵育 1 h, 再用 PBS 洗细胞。加 Hoechst 33258 (10 μg/ml), 室温避光孵育 30 min, 用 PBS 洗细胞, 加 2% 多聚甲醛固定 10 min 后, 在荧光显微镜下观察 Dil-acLDL (红色荧光)、Lectin (绿色荧光)、Hoechst 33258 (蓝色荧光) 3 种染料染色阳性的细胞, 即为 EPC。

#### 1.3.4 EPC 的药物干预<sup>[5]</sup>

小鼠骨髓来源 EPC 培养至第 6 天后换液, 分别用 BH<sub>4</sub> (10 μmol/L), PEG-SOD (100 U/L) 和 L-NNA (0.8 mmol/L) 3 种药物孵育 24 h 后, 测定其小管形成功能和黏附功能。

#### 1.3.5 EPC 黏附功能的测定<sup>[4-5, 7]</sup>

培养 7 d 的 EPC 用 0.125% 胰酶-0.02% EDTA 消化, 将  $1 \times 10^4$  细胞接种于 vitronectin 包被好的 96 孔板中, 每个样本设 4 复孔。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h 后, 去除培养基, PBS 洗涤 3 次, 然后用 Hoechst 33258 (5 μg/ml) 染细胞核, 再用 PBS 洗涤 3 次。在荧光显微镜下, 随机选取 3 个视野 (100×) 计算黏附细胞数并取平均值。

#### 1.3.6 EPC 小管形成功能的测定<sup>[4-5, 7]</sup>

在冰上预冷的 96 孔板中加入 60 μl 的 matrigel, 于 37 °C 孵育 30 min。培养 7 d 的 EPC 用 0.125% 胰酶-0.02% EDTA 消化, 将  $5 \times 10^4$  细胞接种于 matrigel 上, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中孵育 6 h 后, 于显微镜下随机选取 4 个视野 (40×) 计算形成小管的数目并取平均值。

### 1.4 统计学分析

所得实验数据均通过 Prism 统计软件进行分析, 分别选取配对 *t*-检验和单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 作为 2 组数据和 3 组以上数据之间比较的统计学分析方法; 选用 Newman Keuls 法进行均数之间的多重比较。数据书写格式为 (均数±标准误)。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DOCA-salt 高血压小鼠的血压水平

手术后分别测量高血压模型组和假手术组动物的血压水平,发现与假手术组相比,高血压模型组动物的收缩压水平显著上升( $P<0.01$ ,图1)。

### 2.2 小鼠内皮祖细胞的鉴定

将培养至第7天的骨髓来源的EPC通过荧光显微镜法鉴定,显示Dil-acLDL/Lectin/Hoechst 33258三染阳性的细胞的比例为87.18%;通过流式细胞仪法鉴定,显示Sca-1和Flk-1双标阳性的细胞比例为 $(11.2\pm 1.5):1$ ,见图2。以上结果与文献报

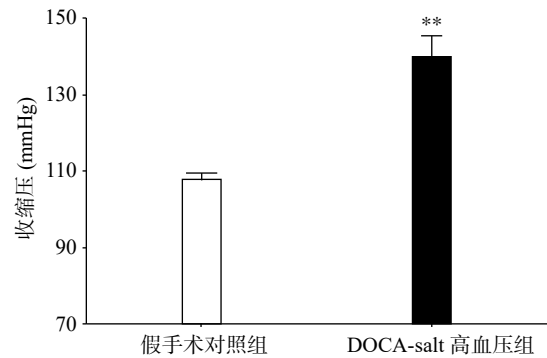


图1 假手术小鼠与DOCA-salt高血压小鼠收缩压水平的比较( $n=5$ )

\*\* $P<0.01$ ,与假手术对照组比较。

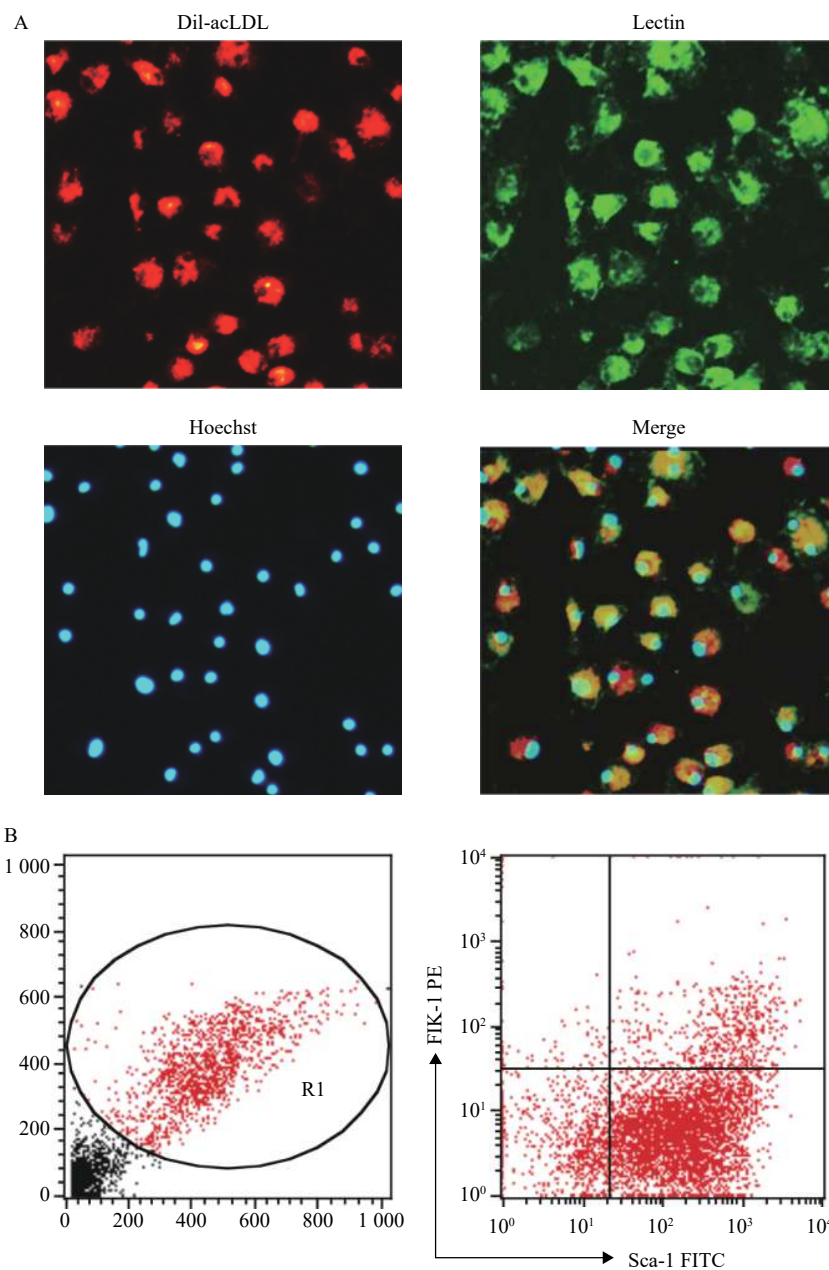


图2 小鼠内皮祖细胞的鉴定

A. 荧光显微镜法: Dil-acLDL/Lectin/Hoechst 33258 三染阳性的细胞即为EPC, Merge, Dil-acLDL/Lectin/Hoechst 33258 三种荧光叠加; B. 流式细胞仪法: 用 Sca-1、Flk-1 两种抗体标记, 双标阳性的细胞即为EPC( $n=5$ )

道中使用同类鉴定方法的结果相近<sup>[7-10]</sup>。

### 2.3 BH<sub>4</sub>, PEG-SOD, L-NNA 孵育可显著改善 DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 的黏附功能

与对照组相比, DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 的黏附功能受损, 而分别用 BH<sub>4</sub> (10 μmol/L), PEG-SOD (100 U/L), L-NNA (0.8 mmol/L) 3 种药物孵育 24 h 后, 其黏附功能得到显著改善(图 3)。

### 2.4 BH<sub>4</sub>, PEG-SOD, L-NNA 孵育可显著改善 DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 的小管形成功能

与对照组相比, DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 的小管形成功能受损, 而分别用 BH<sub>4</sub> (10 μmol/L), PEG-SOD (100 U/L), L-NNA (0.8 mmol/L) 3 种药物孵育 24 h 后, 其小管形成功能得到显著改善(图 4)。

## 3 讨论

本研究发现, BH<sub>4</sub>、PEG-SOD 和 L-NNA 均可有效改善 DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 受损的功能。但此 3 种药物改善 DOCA-salt 小鼠 EPC 功能

的具体机制尚有待进一步探究。

近年来研究发现, eNOS 除了合成一氧化氮(nitric oxide, NO)外, 在某些病理情况下, 还是超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的重要来源。BH<sub>4</sub> 是 eNOS 的必要辅助因子, 影响 NO 和 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的生成。BH<sub>4</sub> 充足时 eNOS 催化底物 L-精氨酸和 O<sub>2</sub> 生成 L-胍氨酸和 NO; BH<sub>4</sub> 缺乏时, eNOS 则发生脱偶联, 主要催化 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生<sup>[5-6, 11]</sup>。BH<sub>4</sub> 缺乏是高血压、糖尿病等疾病中内皮功能异常的重要原因<sup>[11]</sup>。

本课题组和他人曾利用 DOCA-salt 高血压动物进行过大量血管生物学研究<sup>[4-6, 12]</sup>, 发现该动物血管功能异常与血管组织 eNOS 脱偶联有关。另外首次发现, DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 中 BH<sub>4</sub> 水平显著下降, 出现 eNOS 脱偶联, 而且 eNOS 脱偶联所引起的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 水平升高是导致 EPC 功能异常的重要机制之一<sup>[5]</sup>。接着, 我们还尝试采用一些药物手段对 eNOS 脱偶联相关的信号通路/分子进行了干预: ①通过外源性补充 BH<sub>4</sub> 促进 EPC 的 eNOS

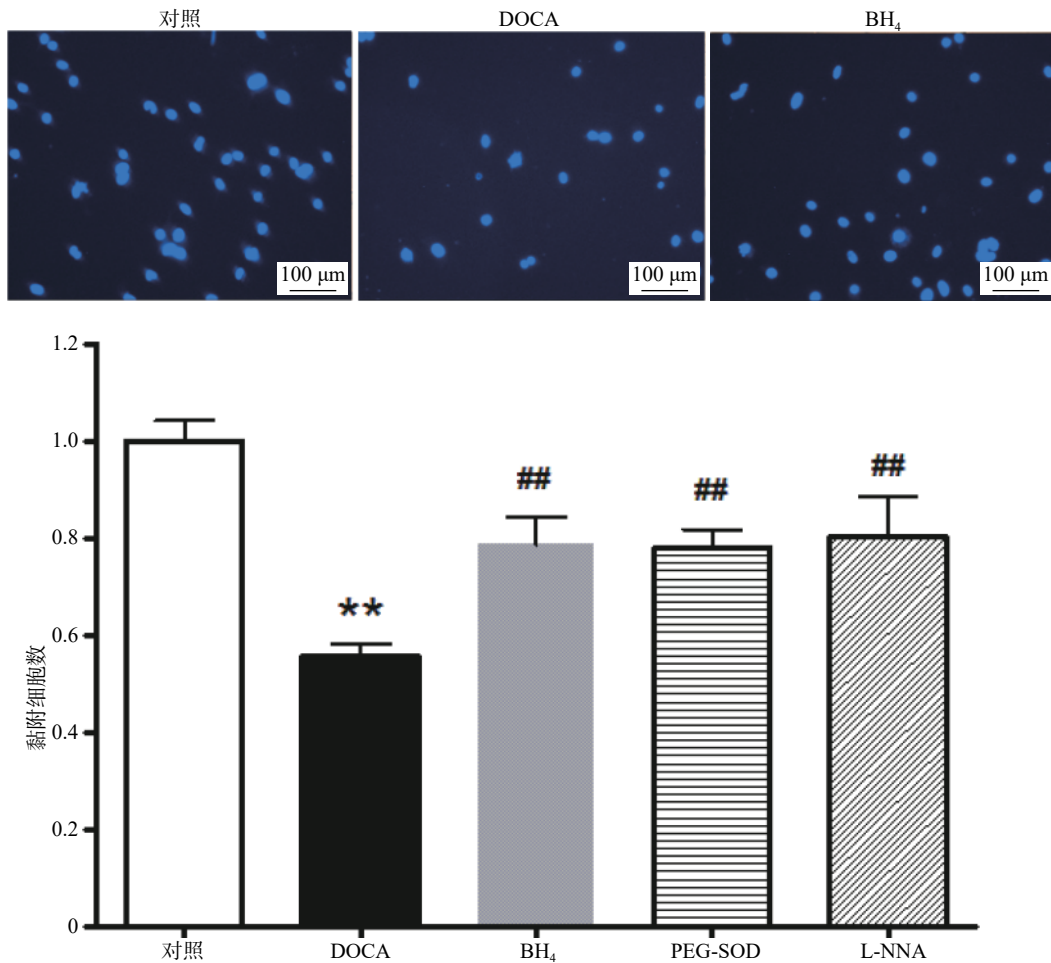


图 3 BH<sub>4</sub>, PEG-SOD, L-NNA 孵育改善 DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 的黏附功能

对照: 假手术对照组小鼠 EPC; DOCA: DOCA-salt 小鼠 EPC; BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA: 分别用 BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA 体外孵育的 DOCA-salt 小鼠 EPC (n=8~15) \*\*P<0.01, 与对照组比较; ##P<0.01, 与 DOCA 组比较。

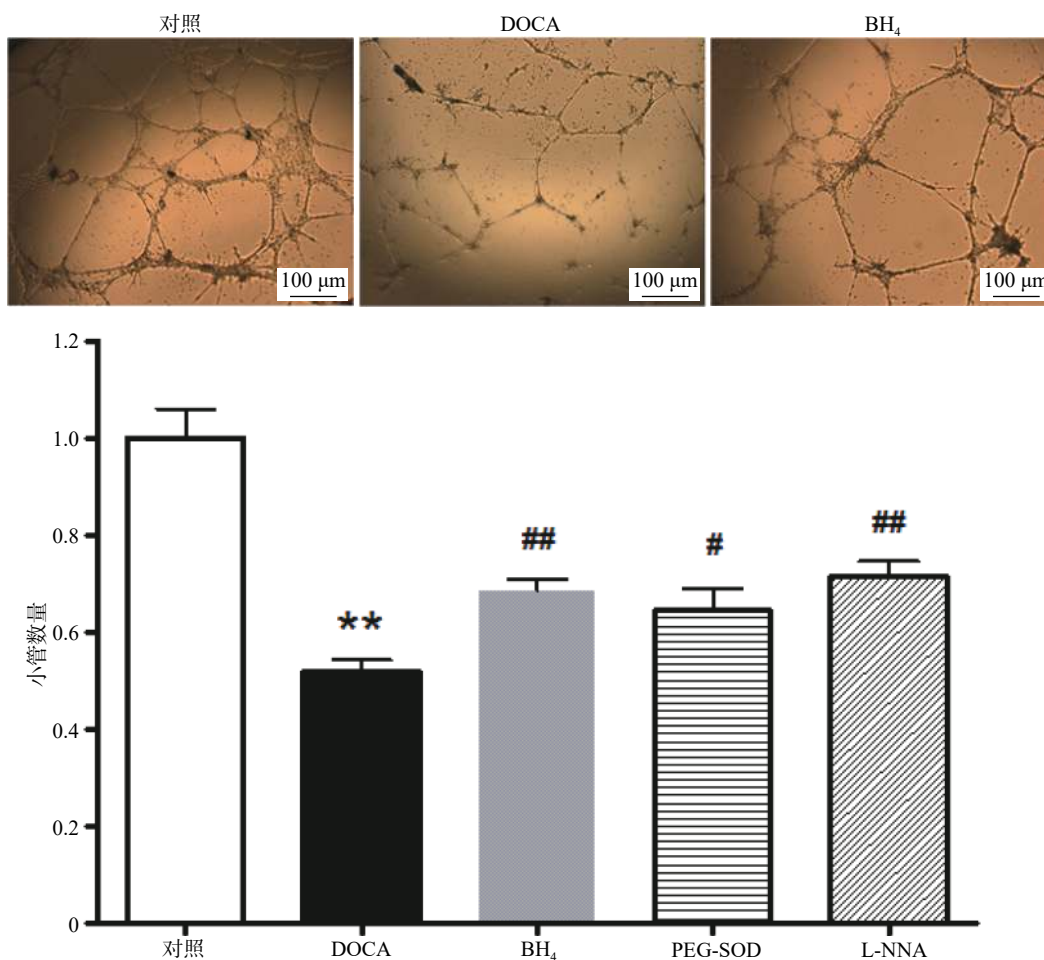


图4 BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA 孵育改善 DOCA-salt 小鼠 EPC 的小管形成功能

对照:假手术对照组小鼠 EPC; DOCA: DOCA-salt 小鼠 EPC; BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA: 分别用 BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA 体外孵育的 DOCA-salt 小鼠 EPC( $n=8 \sim 15$ ) \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , 与 DOCA 组比较。

复偶联;②用 L-NNA 抑制脱偶联的 eNOS 活性,使其产生的 O<sub>2</sub>水平降低;③补充 PEG-SOD 直接清除 EPC 中升高的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>[5]。我们发现,这些药物干预手段都能显著降低 DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 的 O<sub>2</sub>水平[5]。本研究在这些发现的基础上进一步证实,这 3 种药物干预手段也能显著改善 DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 的黏附功能和小管形成功能。这些结果也反过来验证了 DOCA-salt 小鼠 EPC 功能异常与 eNOS 脱偶联的关系。

通过本研究证实, BH<sub>4</sub>、PEG-SOD、L-NNA 均可有效改善 DOCA-salt 高血压小鼠 EPC 受损的功能。这些研究结果可为高血压血管并发症的治疗提供参考,也可为改善高血压 EPC 移植治疗效果提供实验基础。

#### 【参考文献】

- [1] SIMIONESCU M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(2): 266-274.
- [2] SHANTSILA E, WATSON T, LIP G Y. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(7): 741-752.
- [3] KAWAMOTO A, LOSORDO D W. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18(1): 33-37.
- [4] CHEN D D, DONG Y G, YUAN H, et al. Endothelin 1 activation of endothelin A receptor/NADPH oxidase pathway and diminished antioxidants critically contribute to endothelial progenitor cell reduction and dysfunction in salt-sensitive hypertension[J]. *Hypertension*, 2012, 59(5): 1037-1043.
- [5] XIE H H, ZHOU S, CHEN D D, et al. GTP cyclohydrolase I/BH<sub>4</sub> pathway protects EPCs via suppressing oxidative stress and thrombospondin-1 in salt-sensitive hypertension[J]. *Hypertension*, 2010, 56(6): 1137-1144.
- [6] DU Y H, GUAN Y Y, ALP N J, et al. Endothelium-specific GTP cyclohydrolase I overexpression attenuates blood pressure progression in salt-sensitive low-renin hypertension[J]. *Circulation*, 2008, 117(8): 1045-1054.
- [7] MARROTTE E J, CHEN D D, HAKIM J S, et al. Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells

- accelerates wound healing in diabetic mice[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(12): 4207-4219.
- [8] HAGIWARA H, HIGASHIBATA A, OGAWA S, et al. Effectiveness of endothelial progenitor cell culture under microgravity for improved angiogenic potential[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14239.
- [9] 杨栋, 辛世杰, 李凤贺, 等. 小鼠骨髓源性内皮祖细胞的培养和表面标志物鉴定[J]. *中国医科大学学报*, 2011, 40(12): 1063-1066.
- [10] 杨兆华. 内皮祖细胞(EPCs)对移植性动脉硬化的作用及其机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [11] MOENS A L, KASS D A. Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(11): 2439-2444.
- [12] ZHENG J S, YANG X Q, LOOKINGLAND K J, et al. Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension[J]. *Circulation*, 2003, 108(10): 1238-1245.
- [收稿日期] 2019-12-16 [修回日期] 2020-03-05  
[本文编辑] 李睿旻

## (上接第 215 页)

- [6] DIAS L C, JARDIM L S A, FERREIRA A A, et al. Towards the total synthesis of Stawamycin. Synthesis of C11-C21 fragment[J]. *J Braz Chem Soc*, 2001, 12(4): 463-466.
- [7] IZUMIKAWA M, KOMAKI H, HASHIMOTO J, et al. Stawamycin analog, JBIR-11 from *Streptomyces viridochromogenes* subsp. sulfomycini NBRC 13830[J]. *J Antibiot*, 2008, 61(5): 326-329.
- [8] FAYE D, MBAYE M D, COUFOURIER S, et al. Zinc mediated straightforward access to diacylpyrroles[J]. *Comptes Rendus Chimie*, 2017, 20(5): 492-499.
- [9] GUMILA C, ANCELIN M L, JEMINET G, et al. Differential *in vitro* activities of ionophore compounds against *Plasmodium falciparum* and mammalian cells[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(3): 602-608.
- [10] ZHANG D, NAIR M G, MURRY M, et al. Insecticidal activity of indanomycin[J]. *J Antibiot*, 1997, 50(7): 617-620.
- [11] 张鑫, 姜南, 沈雪莉, 等. 土壤链霉菌HS-HY-197抗肿瘤代谢产物的研究[C]//2010年中国药学会暨第十届中国药师周论文集. 天津, 2010: 4394-4398.
- [12] AZZI N, GRIFFEN E, LIGHT M, et al. An enantioselective desymmetrisation approach to C9-substituted trans-hydrindene rings based on a diastereotopic group-selective intramolecular Diels-Alder reaction[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2006(47): 4909-4911.
- [13] WHITNEY R A. Cyclic hydroboration of geraniol derivatives: a synthesis of the left-hand portion of X-14547A[J]. *Can J Chem*, 1986, 64(4): 803-807.
- [14] CLARKE S L, MCSWEENEY C M, MCGLACKEN G P. Investigation of a novel diamine based chiral auxiliary in the asymmetric alkylation of ketones[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2014, 25(4): 356-361.
- [15] ROUSH W R, MYERS A G. Antibiotic X-14547A: total synthesis of the right-hand half[J]. *J Org Chem*, 1981, 46(7): 1509-1511.
- [16] BOECKMAN R K, ENHOLM E J, DEMKO D M, et al. An efficient enantioselective total synthesis of (-)-X-14547A (indanomycin)[J]. *J Org Chem*, 1986, 51(24): 4743-4745.
- [17] ROEGE K E, KELLY W L. Biosynthetic origins of the ionophore antibiotic indanomycin[J]. *Org Lett*, 2009, 11(2): 297-300.
- [18] RAVINDRAN A, SUNDERRAJAN S, PENNATHUR G. Phylogenetic studies on the prodigiosin biosynthetic operon[J]. *Curr Microbiol*, 2019, 76(5): 597-606.
- [19] LI C X, ROEGE K E, KELLY W L. Analysis of the indanomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167[J]. *ChemBioChem*, 2009, 10(6): 1064-1072.
- [20] NIEHS S P, DOSE B, SCHERLACH K, et al. Genome mining reveals endopyrroles from a nonribosomal peptide assembly line triggered in fungal-bacterial symbiosis[J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(8): 1811-1818.
- [21] MIYANAGA A. Michael additions in polyketide biosynthesis[J]. *Nat Prod Rep*, 2019, 36(3): 531-547.
- [22] LUHAVAYA H, DIAS M V B, WILLIAMS S R, et al. Enzymology of pyran Ring A formation in salinomycin biosynthesis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54(46): 13622-13625.
- [23] KNIRSCHOVÁ R, NOVÁKOVÁ R, FECKOVÁ L, et al. Multiple regulatory genes in the salinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces albus* CCM 4719[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2007, 52(4): 359-365.
- [24] SULTANA A, KALLIO P, JANSSON A, et al. Structure of the polyketide cyclase SnoaL reveals a novel mechanism for enzymatic aldol condensation[J]. *EMBO J*, 2004, 23(9): 1911-1921.
- [25] KLYMYSHIN D A, STEFANYSHYN O N, FEDORENKO V A. Role of genes snoaM, snoaL, and snoaE in the biosynthesis of nogalamycin in *Streptomyces nogalater* Lv<sub>65</sub>[J]. *Cytol Genet*, 2015, 49(3): 152-157.
- [26] ROMMEL K R, LI C X, KELLY W L. Identification of a tetraene-containing product of the indanomycin biosynthetic pathway[J]. *Org Lett*, 2011, 13(10): 2536-2539.
- [收稿日期] 2019-10-14 [修回日期] 2020-03-11  
[本文编辑] 陈盛新