

水母雪莲内生真菌 *Alterraria* sp. 的次级代谢产物鉴定

佟永春^{1,2}, 刘雅茹², 何蕾¹, 樊佳佳¹, 姜春丽³, 孙奕^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 中国医科大学 公共基础学院, 沈阳 110000;

3. 淮北师范大学 生命科学学院, 安徽 淮北 235000)

[摘要] **目的:**研究藏族药水母雪莲内生真菌 *Alterraria* sp. 的次级代谢产物。**方法:**从植物水母雪莲中分离得到内生菌 *Alterraria* sp., 在考察培养条件后, 对该菌种进行了扩大培养。运用反复硅胶柱色谱, LH-20 凝胶柱色谱、开放 ODS 柱色谱、高效液相色谱等方法, 并结合液质联用分析技术, 对菌液的总萃取物进行分离纯化; 并根据化合物的理化常数测定及光谱学(1D 和 2D NMR, MS 等)数据分析鉴定所得化合物结构。**结果:**对水母雪莲中分离得到的内生真菌交链孢菌属 *Alterraria* sp. 进行次级代谢产物的研究, 共得到 9 个化合物, 分别鉴定为 spirotryprostatin A (**1**), 对羟基苯甲醛 (**2**), 4-羟基苯基-2'-羟基丙酯 (**3**), 二氢对甲氧基肉桂酸 (**4**), 4-甲氧基苯甲酸 (**5**), 对羟基苯乙酸甲酯 (**6**), 4-羟基苯乙醇 (**7**), 对羟基苯甲酸 (**8**), 3-苯基丙酸 (**9**)。细胞毒测试结果表明, 从 TPXa 中分离得到的化合物 **1** 对肺癌细胞株 A549 具有较强的增殖抑制活性, 其 IC_{50} 为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论:**以上化合物均为首次从交链孢菌属真菌中分离得到。

[关键词] 水母雪莲; 内生真菌; 交链孢菌属; 次级代谢产物; 化合物结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0064-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070064

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1403.066.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 14:03

Secondary Metabolites of An Endophytic Fungus *Alterraria* sp. Isolated from *Saussurea medusa*

TONG Yong-chun^{1,2}, LIU Ya-ru², HE Lei¹, FAN Jia-jia¹, JIANG Chun-li³, SUN Yi^{1*}

(1. Institute of Chinese Meteria Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. School of Public Foundation, China Medical University, Shenyang 110000, China;

3. College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China.)

[Abstract] **Objective:** To study the secondary metabolites of an endophytic fungus *Alterraria* sp. isolated from *Saussurea medusa*. **Method:** *Alterraria* sp. was isolated from the medical plant *S. medusa*. The strain was cultured in a large-scale after the culture conditions had been optimized. The secondary metabolites were isolated by chromatography methods such as silica gel, Sephadex LH-20 columns, ODS flash column and HPLC, and the analysis of LC-MS. The structures of these compounds were identified by their physico-chemical constants and the NMR and MS data. **Result:** Nine compounds were isolated and identified as spirotryprostatin A (**1**), 4-hydroxybenzoic aldehyde (**2**), 4-hydroxyphenyl-2'-hydroxypropanoate (**3**), dihydro-*p*-methoxycinnamic acid (**4**), 4-methoxybenzoic acid (**5**), *p*-hydroxymethylphenylacetate (**6**), 4-hydroxyphenyl ethanol (**7**), 4-hydroxybenzoic acid (**8**), 3-phenylpropanoic acid (**9**). All compounds were tested for their inhibitory activities

[收稿日期] 20160412(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81502968)

[第一作者] 佟永春, 在读硕士, 从事天然药物化学研究, Tel:010-64021051, E-mail:763253939@qq.com

[通讯作者] * 孙奕, 博士, 副研究员, 从事天然产物活性成分的研究, Tel:010-64021051, E-mail:ysun@icmm.ac.cn

against human lung adenocarcinoma strain A-549. Compound **1** exhibited strong cytotoxic activity against A549 with IC_{50} value of $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** All the compounds were isolated from *Alterraria* for the first time.

[**Key words**] *Saussurea medusa*; endophytic fungus; *Alterraria* sp.; secondary metabolites; structure identification

藏族药水母雪莲为菊科风毛菊属的草本植物, 始见于藏族药文献《月王药珍》, 是西藏、新疆、云南、四川等高寒地区常使用的民族药^[1]。近年来, 对珍稀药用植物内生菌的研究受到越来越多的关注。药用植物的内生真菌作为天然产物的研究热点之一, 具有次级代谢产物结构新颖、生物活性好等优势。这些内生真菌的次级代谢产物具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗氧化等药理作用, 具有潜在的开发价值。本课题在前期的研究中, 从藏族药水母雪莲中分离得到几十种内生真菌, 其中包括一株交链孢菌 *Alterraria* sp.。已有文献报道, 该属真菌从灯盏细辛、银杏叶、东北红豆杉等多株植物中获得^[2-4]。因交链孢菌不属于植物中内生真菌的优势菌群, 故其次级代谢产物的研究较少。本研究采用液质联用的分析方法, 比较了不同培养条件对水母雪莲内生真菌 *Aspergillus* sp. 次级代谢产物的影响, 并利用优化的培养条件进行放大培养 *Alterraria* sp., 获得培养液 20 L。采用各种色谱方法从水母雪莲内生真菌 *Alterraria* sp. 培养液提取物中分离得到了 9 个次级代谢产物, 分别鉴定为 spirotryprostatin A (**1**), 对羟基苯甲醛 (**2**), 4-羟基苯基-2'-羟基丙酯 (**3**), 二氢对甲氧基肉桂酸 (**4**), 4-甲氧基苯甲酸 (**5**), 对羟基苯乙酸甲酯 (**6**), 4-羟基苯乙醇 (**7**), 对羟基苯甲酸 (**8**), 3-苯基丙酸 (**9**); 这些化合物均为首次从该属真菌中分离得到。细胞毒性测试结果表明, 从 *Alterraria* sp. 中分离得到的化合物 **1** 对肺癌细胞株 A549 具有较强的增殖抑制活性, 为水母莲内生真菌的研究提供依据。

1 材料

ZQLY-300 型震荡培养箱 (上海知楚仪器公司出品)。LTQ Orbitrapvelos pro 型质谱仪 (高分辨静电场轨道阱质谱, ESI 源)。Xcalibur 3.0, Networks 1.3 和 Mass Frontier 7.0 软件用于数据采集和数据分析 (美国 Thermo Fisher 公司)。ARX-600 型核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司)。1260 Infinity 系列分析及半制备型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工有限公司)。LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 瑞士 Pharmacia 公司)。甲醇色谱

级 (天津康科德科技有限公司), 其他乙酸乙酯, 甲醇等试剂均为分析级 (北京化工厂)。

2 提取与分离

水母雪莲采集时间为 2013 年 9 月, 经中国中医科学院中药研究所助理研究员孙伟鉴定为菊科风草本植物水母雪莲 *Saussurea medusa* 带花全株。其茎部位的内生真菌经 16S RNA 测序分析鉴定为交链孢属真菌 *Alterraria* sp.。该菌种目前保存于中国中医科学院中药研究所。培养基为马铃薯葡萄糖肉汤 (PDB): 马铃薯浸粉 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钠 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 购于北京奥博星生物技术有限责任公司。

将水母雪莲内生真菌 *Alterraria* sp. 首先接种于 PDA 培养基上, 于 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3 d, 取约 1 cm 的方形真菌菌饼, 分别接种于装有 PDB 培养液 100 mL 的 10 个 500 mL 锥形瓶中, $27 \text{ }^\circ\text{C}$, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上振荡培养 4 d; 再以 4% 的接种量接种于 100 个含有培养液 200 mL 的 500 mL 锥形瓶中 (培养液共 20 L), 以上述相同的条件培养 9 d 后, 将培养液离心得到菌丝体和菌液 2 部分。菌液经乙酸乙酯萃取 3 次, 共得到浸膏 2 g。干燥后的菌丝体经丙酮提取 3 次 (3 L), 得到浸膏 1.5 g。将菌液粗提浸膏经正相硅胶柱色谱 (200 ~ 300 目), 以二氯甲烷-甲醇 (100:1 ~ 0:100) 梯度洗脱, 共得到 11 个组分 (Fr. 1 ~ Fr. 11)。经薄层色谱分析, 其中对样品 Fr. 5-8 进行正相硅胶柱色谱分离, 得到 5 个组分 (Fr. 5-8-1 ~ Fr. 5-8-5); 各组分再经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离 (甲醇-二氯甲烷 1:1), 后经半制备高效液相色谱 (20% ~ 60% 甲醇梯度洗脱), 得到化合物 **1** ~ **9**。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色无定形粉末 (甲醇), $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$, ESI-MS (m/z) 396.19 [$\text{M} + \text{H}$]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.5 (1H, br s, NH), 7.02 (1H, d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, H-4), 6.46 (1H, dd, $J = 8.3, 2.3 \text{ Hz}$, H-5), 6.38 (1H, d, $J = 2.3 \text{ Hz}$, H-7), 5.09 (1H, br d, $J = 9.3 \text{ Hz}$, H-19), 4.85 (1H, dd, $J = 9.9, 7.1 \text{ Hz}$, H-9), 4.51 (1H, br d, $J = 9.3 \text{ Hz}$, H-18), 4.37 (1H, dd, $J = 8.0, 7.9 \text{ Hz}$, H-12), 3.71 (3H, s, OCH₃), 3.51 (1H,

m, H-15b), 3.45 (1H, m, H-15a), 2.46 (1H, dd, $J=13.2, 10.3$ Hz, H-8b), 2.24 (1H, dd, $J=13.2, 7.1$ Hz, H-8a), 2.15 (1H, m, H-13a), 2.13 (1H, m, H-13b), 1.96 (1H, m, H-14b), 1.87 (1H, m, H-14a), 1.56 (3H, s, H-21), 1.12 (3H, s, H-22); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.5 (C-2), 166.7 (C-11), 166.2 (C-17), 159.7 (C-6), 143.3 (C-7a), 135.3 (C-20), 127.0 (C-4), 122.3 (C-19), 119.1 (C-3a), 106.1 (C-5), 95.9 (C-7), 60.2 (C-12), 59.6 (C-18), 57.9 (C-3), 55.2 (OCH₃), 55.0 (C-9), 44.6 (C-15), 33.9 (C-8), 27.1 (C-13), 25.1 (C-21), 23.1 (C-14), 17.7 (C-22)。以上波谱数据与文献[5]一致, 鉴定该化合物为 spirotryprostatin A。

化合物 2 浅黄色结晶(甲醇), C₇H₆O₂, ESI-MS(m/z) 123.04 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, Pyridine- d_6) δ : 10.01 (1H, br s, CHO), 7.50 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-2, 6); 7.15 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Pyridine- d_6) δ : 190.2 (C-7), 164.5 (C-4), 132.1 (C-2, 6), 116.6 (C-3, 5)。以上波谱数据与文献[6]一致, 鉴定该化合物为对羟基苯甲醛。

化合物 3 无色油状(甲醇), C₁₁H₁₄O₄, ESI-MS(m/z) 211.09 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.26 (1H, s, 4-OH), 7.02 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2, 6), 6.67 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3, 5), 5.35 (1H, br s, OH-2'), 4.16 (2H, ddd, $J=10.8, 7.2, 6.6$ Hz, H-8), 4.10 (1H, q, $J=6.6$ Hz, H-2'), 2.76 (2H, t, $J=6.6$ Hz, H-7), 1.18 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-3'); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.5 (C-1'), 155.9 (C-4), 129.8 (C-2, 6), 127.7 (C-1), 115.1 (C-3, 5), 65.9 (C-2'), 64.8 (C-8), 33.6 (C-7), 20.4 (C-3')。以上波谱数据与文献[7]一致, 鉴定该化合物为 4-羟基苯基-2'-羟基丙酯。

化合物 4 白色针状结晶(甲醇), C₁₀H₁₂O₃, ESI-MS(m/z) 181.09 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.99 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, 6), 6.65 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, 5), 3.56 (3H, s, 4-OCH₃), 2.71 (2H, t, $J=7.8$ Hz, H-7), 2.53 (2H, t, $J=7.8$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.9 (C-9), 157.8 (C-4), 132.1 (C-1), 128.2 (C-2, 6), 112.8 (C-3, 5), 51.0 (4-OCH₃), 33.9 (C-8), 28.7 (C-7)。以上波谱数据与文献[8]一致,

鉴定该化合物为二氢对-甲氧基肉桂酸。

化合物 5 无色固体(甲醇), C₈H₈O₃, ESI-MS(m/z) 153.07 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.76 (2H, d, $J=6.5$ Hz, H-2, 6), 6.75 (2H, d, $J=6.5$ Hz, H-3, 5), 3.16 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.3 (C-7), 160.6 (C-4), 131.4 (C-2, 6), 125.0 (C-1), 114.8 (C-3, 5), 55.2 (4-OCH₃)。以上波谱数据与文献[9]一致, 鉴定该化合物为 4-甲氧基苯甲酸。

化合物 6 黄色油状(甲醇), C₉H₁₀O₃, ESI-MS(m/z) 167.06 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.03 (2H, d, $J=7.8$ Hz, H-2, 6), 6.70 (2H, d, $J=7.8$ Hz, H-3, 5), 3.52 (3H, s, H-9), 2.59 (2H, s, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.0 (C-8), 156.3 (C-4), 130.2 (C-2, 6), 124.3 (C-1), 115.1 (C-3, 5), 51.5 (C-9), 40.0 (C-7)。以上波谱数据与文献[10]一致, 鉴定该化合物为对羟基苯乙酸甲酯。

化合物 7 无色油状(甲醇), C₈H₁₀O₂, ESI-MS(m/z) 139.07 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.98 (2H, d, $J=8.1$ Hz, H-2, 6), 6.65 (2H, d, $J=8.1$ Hz, H-3, 5), 3.51 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-8), 2.59 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 155.5 (C-4), 129.6 (C-2, 6), 129.4 (C-1), 114.9 (C-3, 5), 62.63 (C-8), 38.26 (C-7)。以上波谱数据与文献[11]一致, 鉴定该化合物为 4-羟基苯乙醇。

化合物 8 白色无定形粉末(甲醇), C₇H₆O₃, ESI-MS(m/z) 139.03 [M + H]⁺, 三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性, 提示有酚羟基存在。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.52 (1H, s, OH), 7.03 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2, 6), 6.69 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.3 (C-7), 163.4 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 122.8 (C-1), 116.0 (C-3, 5)。上述数据与文献[12]报道一致, 故鉴定化合物为对羟基苯甲酸。

化合物 9 白色结晶(甲醇), C₉H₁₀O₂, ESI-MS(m/z) 151.17 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.19 ~ 7.39 (5H, m), 2.95 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2), 2.67 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.1 (C-9), 141.1 (C-1), 128.3 (C-3, 5), 128.1 (C-2, 6), 125.9 (C-4), 35.6 (C-8), 30.6 (C-7) 以上谱数据与文献[13]一致, 鉴定该化合物为 3-苯基丙酸。

4 细胞毒性

4.1 仪器与试剂 肿瘤细胞株:非小细胞肺癌 A549 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所(协和细胞库)。

4.2 方法 将 A549 肺癌细胞株在 37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度环境下培养于 10% 胎牛血清的完全培养基中,待细胞呈对数增长时铺板,调整细胞悬液密度至 1 × 10⁴ 个/mL,在 96 孔培养板中每孔加入细胞悬液 200 μL。待细胞贴壁生长 24 h 后,加入检测样品及阿霉素(ADM),阴性组及空白组,同时加入等体积含 1% DMSO 的生理盐水,与细胞共同孵育 72 h 后,加入终质量浓度 0.5 g · mL⁻¹ MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h。吸弃上清,每孔加入 DMSO 150 μL,置摇床上振荡 10 min,待其充分溶解后于酶标仪下检测 570 nm 各孔的吸光度 A,计算各化合物的细胞抑制率及 IC₅₀,计算细胞抑制率:

$$\text{细胞抑制率} = \frac{(A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}})} \times 100\%$$

化合物 1~9 对 A549 细胞株进行了细胞毒性实验,其中化合物 1 对 A549 细胞株的细胞毒性较为显著,其 IC₅₀ 为 2.0 mg · L⁻¹;而化合物 2~9 并未对 A549 细胞株表现出较强的细胞毒性。

5 讨论

本文从藏族药水母雪莲内生真菌 *Alterraria* sp. 中分离鉴定了 9 个化合物,均为 *Alterraria* 的首次分离。细胞活性结果表明,化合物 1 对肺癌细胞株 A549 具有较强的细胞毒性,其 IC₅₀ 为 2.0 mg · L⁻¹。目前国内外对藏族药水母雪莲内生菌研究较少,本研究将为进一步研究水母雪莲中内生真菌的次级代谢产物及其药用价值提供参考依据。

[参考文献]

[1] 李咏华,葛发欢,苏薇薇. 水母雪莲花研究进展[J]. 中药材,2007,27(4):297-299.
[2] 李治滢,杨丽源,周斌,等. 灯盏细辛内生真菌的研究 I:菌种分离及其分类鉴定[J]. 云南大学学报:自然

科学版,2003,5(1):65-68.

[3] 王利娟,杨小生,贺新生,等. 银杏叶内生真菌抑菌菌株筛选[J]. 四川食品与培养,2007,43(4):34-36.
[4] 项勇,崔京霞,吕安国,等. 东北红豆杉内生真菌的分离和筛选[J]. 东北林业大学学报,2002,30(2):30-34.
[5] CUI C B, Kakeya H, Osada H. Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G₂/M phase I [J]. Tetrahedron, 1996, 52(39): 12651-12666.
[6] Kim H, Ralph J, LU F, et al. NMR analysis of lignins in CAD-deficient plants. Part 1. Incorporation of hydroxycinnamaldehydes and hydroxybenzaldehydes into lignins [J]. Org Biomol Chem, 2003, 1(2):268-281.
[7] LU X, CHEN G, HUA H, DAI H, et al. Aromatic compounds from endophytic fungus *Colletotrichum* sp. L10 of *Cephalotaxus hainanensis* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(4):737-741.
[8] Takahashi T, Miyazawa M. Tyrosinase inhibitory activities of cinnamic acid analogues [J]. Pharmazie, 2010, 65(2): 913-918.
[9] Gouda Y G, Afaf M abdel-baky, Mdarwish F, et al. Phytochemical study of *Jacaranda ovalifolia* RBR family bignoniaceae cultivated in Egypt [J]. Bull Pharm Sci Assiut Univer, 2002, 25:165-174.
[10] 李浩华,潘清灵,陈玉婵,等. 深海真菌 *Penicillium herque* FS83 次生代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(3):327-330.
[11] Akaya Y, Furukawa T, Miura S, et al. Antioxidant constituents in distillation residue of awamori spirits [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(1): 75-79.
[12] 李云秋,柴兴云,孙见凡,等. 紫稍花化学成分研究 [J]. 中药材,2010,33(1):60-61.
[13] Devi P, Wahidullah S, Rodrigues C, et al. The sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds [J]. Mar Drugs, 2010, 8(4): 1203-1212.

[责任编辑 顾雪竹]