

恒山黄芪内生真菌 *Aspergillus* sp. 中环二肽的分离和鉴定

张弘弛, 李慧, 安志鹏, 周凤, 刘瑞*

(大同大学 生命科学学院, 应用生物技术研究, 山西 大同 037009)

[摘要] 目的:研究黄芪内生真菌 AR-15-1 的环二肽类次生代谢产物的成分。方法:内生真菌 AR-15-1 是采用组织学方法分离自恒山黄芪的根部,真菌的鉴定采用形态学结合分子生物学法,内生真菌大量发酵采用固体培养的方法,环二肽成分的分离使用柱色谱法,HPLC 法结合 LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶色谱进行分离纯化,化合物结构鉴定采用波谱表征分析。结果:从黄芪根部分离到的内生真菌 AR-15-1 被鉴定为曲霉属 *Aspergillus* sp.,从 AR-15-1 的固体发酵物中分离到 8 个环二肽化合物,分别为环(脯-甘)二肽(1),环(脯-亮)二肽(2),环(脯-异亮)二肽(3),环(脯-缬)二肽(4),环(苯丙-甘)二肽(5),环(苯丙-丙)二肽(6),环(苯丙-缬)二肽(7)和环(苯丙-脯)二肽(8)。结论:环二肽类化合物 1~8 均为首次从黄芪内生真菌中分离得到,其中大部分环二肽化合物已被发现是具有很好的生物活性。

[关键词] 内生真菌; 曲霉属; 恒山黄芪; 环二肽

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0052-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120052

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1442.072.html>

[网络出版时间] 2017-03-24 14:42

Isolation and Identification of Cyclic Dipeptides from Endophytic *Aspergillus* sp. in Astragali Radix

ZHANG Hong-chi, LI Hui, AN Zhi-peng, ZHOU Feng, LIU Rui*

(College of Life Science, Applied Biotechnology Institute, Datong University, Datong 037009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the cyclic dipeptides secondary metabolites from endophytic AR-15-1 in Astragali Radix. **Method:** AR-15-1 was isolated from the roots of Astragali Radix by the method of histology. The fungus was identified by morphological method combined with molecular biology method, and solid culture method was used for large-scale fermentation of endophytic fungi. Cyclic dipeptides were isolated by column chromatography, Sephadex LH-20, and HPLC, and their chemical structures were elucidated by the spectral analysis. **Result:** Endophytic fungi AR-15-1 isolated from roots of Astragali Radix were identified as *Aspergillus* sp. Eight cyclic dipeptides were obtained and elucidated as cyclo-(Pro-Gly) (1), cyclo-(Pro-Leu) (2), cyclo-(Pro-Ile) (3), cyclo-(Pro-Val) (4), cyclo-(Phe-Gly) (5), cyclo-(Phe-Ala) (6), cyclo-(Phe-Tyr) (7) and cyclo-(Phe-Pro) (8). **Conclusion:** All cyclic dipeptides were isolated from the endophytic fungi of Astragali Radix for the first time, and most of the cyclic dipeptides of *Aspergillus* sp. showed good biological activity.

[Key words] endophytic fungus; *Aspergillus* sp.; Hengshan Astragali Radix; cyclic dipeptides

[收稿日期] 20161219(001)

[基金项目] 山西省科技攻关项目(20130311011-6);大同市科技攻关项目(201468-1)

[第一作者] 张弘弛,博士,讲师,从事天然产物化学的研究,Tel:0352-7158938,E-mail:zhanghclw@163.com

[通讯作者] *刘瑞,博士,副教授,从事天然药物生物合成研究,Tel:0352-7158938,E-mail:liurlw@163.com

环二肽(cyclic dipeptides)是 2 个氨基酸经肽键缩合成的哌嗪类天然产物,也称 2,5-二酮哌嗪(diketopiperazines, DKPs),这类化合物的空间构像是稳定的六元环结构,分子结构中有 2 个氢键受体和 2 个氢键供体,因而可以作为携带药效的基团,在药物化学的研发中有着重要的意义。生物活性研究发现,环二肽类化合物具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗疟疾、免疫抑制等作用^[1]。目前,天然药物化学研究发现环二肽类化合物广泛存在于自然界中,在多种动、植物中都发现了具有强生物活性的环二肽,特别是在海洋真菌和放线菌中。近年来,研究者又相继发现了环二肽化合物的新来源——植物内生真菌^[2]。目前的研究已经证实内生真菌在与植物共生的阶段内,能产生多种活性物质,如具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化,杀虫等活性的物质,因而内生真菌被认为是筛选活性物质的潜在资源。寄生于药用植物组织内的内生真菌,与寄主植物的长期和谐发展,共同提高共生体系的抗逆性,因此被认为药用植物的内生真菌代谢体系中蕴含着更多的活性物质。

本课题组一直致力于大同恒山地区药用植物黄芪的内生真菌研究,已经发现了多株恒山黄芪内生真菌的生物活性和其代谢产物^[3-5]。本研究又发现了一株可以产生多种环二肽类化合物的内生真菌,并从其固体发酵物中分离出 8 个环二肽类成分,为黄芪内生真菌的深入研究提供了备选菌株,同时也为植物内生真菌作为环二肽类化合物新的来源提供依据。

1 材料

薄层色谱硅胶 G,柱色谱硅胶(200 ~ 300 目)(青岛海洋化工厂分厂);LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20,上海汉博生物科技有限公司)。HPLC 用试剂色谱纯(天津市康科德科技有限公司),其他试剂均为分析纯。

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Welch material XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),JEOL SX102A 型 ESI-MS 质谱仪(日本电子株式会社),ADVANCE 400 MHz 型核磁共振仪(德国布鲁克公司,TMS 作为内标),XT5 型熔点测定仪(上海精密仪器仪表有限公司)。

2 内生真菌 AR-15-1 的分离和鉴定

恒山黄芪于 2015 年秋季采自山西省浑源县恒山地区,为多年生野生种(由大同大学生命科学学院周凤教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus*

membranaceus)的根,从该样品的根部分离到一株内生真菌 AR-15-1,菌株保存于山西大同大学应用生物技术研究所微生物学研究室。

形态鉴定:AR-15-1 接种于查氏固体平板上,培养温度 28 ℃,培养时间 2 d,观测菌落生长形态和菌丝外观,同时制作装片,观测分生孢子梗、孢子和菌丝微观形态。分子鉴定:AR-15-1 接种于查氏固体平板上,培养时间 12 d,无菌低温(液氮)研磨菌丝至粉末,参照 CTAB 法提取真菌 DNA,以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增该菌株 DNA 序列。PCR 扩增产物送三联兄弟生物医药研究(北京)有限公司测序,序列结果通过 Blast 比对分析,构建聚类分析。见图 1,2。

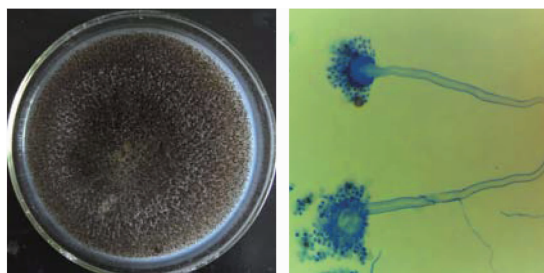


图 1 菌株 AR-15-1 生长形态

Fig. 1 Colonial morphology of strain AR-15-1

内生真菌 AR-15-1 的菌落在生长初期呈现出白色,随着生长周期的延伸,菌落颜色逐步呈现灰色最后呈现褐色,在生长中期(5 d)菌丝周围出现颗粒状孢子,培养基沉积色素而呈现褐色。显微观察,其菌丝多有隔膜并且菌丝附着黑色物;分生孢子梗呈现直立型球状;分生孢子呈现串生球形且显示黑色(图 1)。PCR 扩增后的 ITS 序列长 604 bp,聚类分析图(图 2)分析该菌株与多株 *Aspergillus* sp. 聚合在一起,因而 AR-15-1 与 *Aspergillus* sp. 具有同源性,综合形态鉴定(宏观菌落观赏和微观显微观察)和分子鉴定分析,AR-15-1 被鉴定为 *Aspergillus* sp.。

3 内生真菌 AR-15-1 的固体发酵和产物分离

黄芪内生真菌 AR-15-1 经斜面活化、种子培养(培养温度 28 ℃,振荡培养转速 150 r · min⁻¹,接种量 5%,种子培养周期 5 d),按 8% 接种量转接至大米固体培养基^[6](80 瓶),培养温度 28 ℃,培养周期 40 d。发酵周期结束,将固体培养物在 80 ℃ 下烘干,分别使用乙酸乙酯和甲醇提取 3 次(9 L),旋转薄膜蒸发后得提取物 271 g。提取物经硅胶柱色谱,乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱(体积比分别为 1:0, 100:1,50:1,20:1,10:1,5:1,2:1,0:1)得到 8 个组分 Fr. A ~ Fr. H。

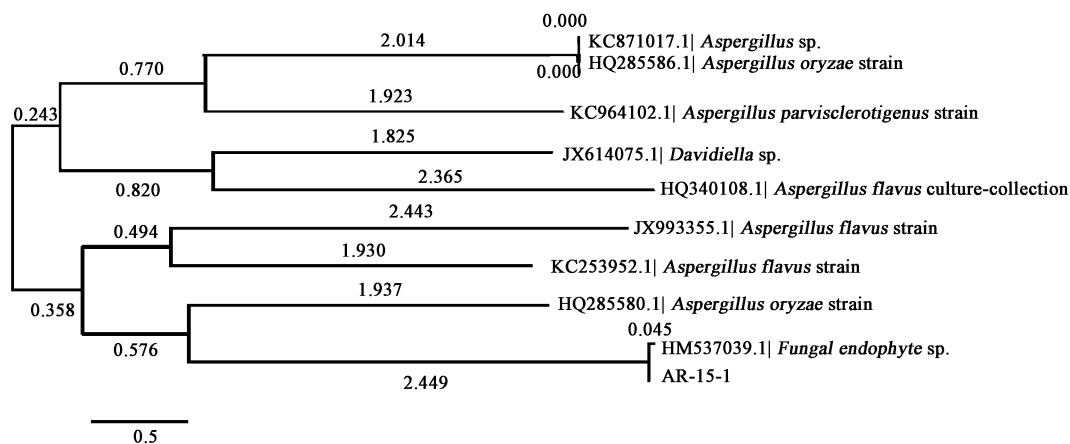


图 2 菌株 AR-15-1 聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of strain AR-15-1

Fr. B 以乙酸乙酯和石油醚梯度洗脱,得 sFr. B (1~10), sFr. B2 经半制备 HPLC,以乙腈-水为流动相(1:4,流速 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$),得化合物 **1**(126 mg)和化合物 **2**(108 mg); sFr. B3 经 Sephadex LH-20,以甲醇为流动相,得化合物 **3**(225 mg)和化合物 **4**(339 mg); Fr. C 经乙酸乙酯-石油醚梯度洗脱,得 sFr. C(1~8), sFr. C1 经 Sephadex LH-20,以甲醇为流动相,得化合物 **5**(1 023 mg), sFr. C2 再经多次乙酸乙酯-石油醚梯度洗脱得化合物 **6**(78 mg), sFr. C3 经乙酸乙酯-石油醚梯度洗脱, sFr. C3-2 再经 HPLC,以甲醇-水为流动相(1:3,流速 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$),得化合

物 **7**(360 mg)和化合物 **8**(65 mg)。

4 内生真菌 AR-15-1 代谢产物的结构鉴定

菌株 AR-15-1 中分离到的 8 个环二肽化合物经过表征,与文献对比,被鉴定为环(脯-甘)二肽 cyclo-(Pro-Gly) (**1**),环(脯-亮)二肽 cyclo-(Pro-Leu) (**2**),环(脯-异亮)二肽 cyclo-(Pro-Ile) (**3**),环(脯-缬)二肽 cyclo-(Pro-Val) (**4**),环(苯丙-甘)二肽 cyclo-(Phe-Gly) (**5**),环(苯丙-丙)二肽 cyclo-(Phe-Ala) (**6**),环(苯丙-酪)二肽 cyclo-(Phe-Tyr) (**7**)和环(苯丙-脯)二肽 cyclo-(Phe-Pro) (**8**)。结构见图 3。

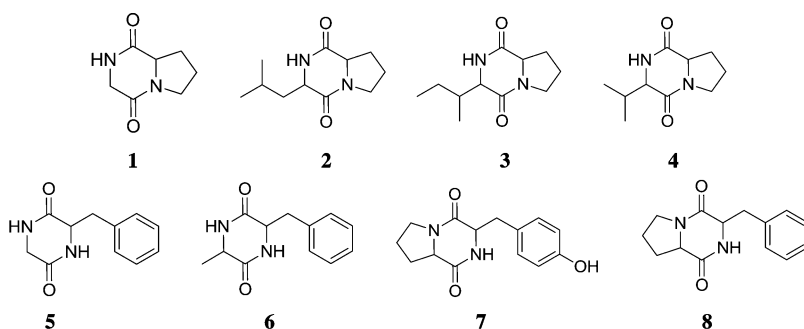


图 3 黄芪内生真菌 AR-15-1 的环二肽

Fig. 3 Cyclic dipeptides isolated from strain AR-15-1 of Astragali Radix

化合物 **1** 透明长方型晶体,熔点 $205 \sim 208 \text{ }^\circ\text{C}$,ESI-MS m/z 155.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $^1\text{H-NMR}$ 分析,可以看到 1 个酰胺中的 H 信号 δ : 8.02 (1H, s); 2 个相连 N 的 CH 和 CH_2 的 H 信号 4.06 (1H, d, $J = 8.2 \text{ Hz}$), 4.13 (1H, d, $J = 15.0 \text{ Hz}$), 3.58 (1H, d, $J = 15.0 \text{ Hz}$);同时结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 低场区的 2 个酰胺羰基 C 信号 δ : 170.5, 165.2;推测其为环二肽。对 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT-135 分析,其化学结构中有 2 个羰基 C 信号 δ : 170.5 (C-1), 165.2 (C-4); 1 个 CH 的 C

信号 δ : 59.3 (C-9); 4 个 CH_2 的 C 信号 δ : 45.4 (C-3), 46.1 (C-6), 22.2 (C-7), 28.0 (C-8)。对比氨基酸残基信号数据, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6)的 δ_{H} : 4.13 (1H, d, $J = 15.0 \text{ Hz}$), 3.58 (1H, d, $J = 15.0 \text{ Hz}$) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6)中 δ_{C} : 165.2, 45.4 推测为甘氨酸残基信号; δ_{H} : 4.06 (1H, d, $J = 8.2 \text{ Hz}$), 3.36 (2H, m), 1.96 (2H, m), 2.19 (1H, m), 2.00 (1H, m) 和 δ_{C} : 170.5, 59.4, 46.1, 22.1, 28.0, 22.3 为脯氨酸残基信号。对比文献[7]数据,结合 NMR 特征

分析,化合物 **1** 被鉴定为环(脯-甘)二肽 cyclo-(Pro-Gly)。

化合物 **2** 白色块状固体,熔点 201 ~ 203 °C, ESI-MS m/z 211.1 [M + H]⁺, ¹H-NMR 分析,可以看到 1 个酰胺中的 H 信号(δ) 6.74 (1H, s), 2 个相连 N 的 H 信号 4.10 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 4.02 (1H, d, $J = 8.8$ Hz); 同时结合 ¹³C-NMR 低场区的 2 个酰胺羰基 C 信号 167.2, 170.6, 推测其为环二肽。¹³C-NMR 和 DEPT-135 分析,其结构中有 2 个羰基 C 信号 167.2 (C-1), 170.6 (C-7); 3 个 CH 的 C 信号 59.6 (C-6), 52.8 (C-9) 和 26.7 (C-11); 4 个 CH₂ 的 C 信号 45.4 (C-3), 22.7 (C-4), 28.9 (C-5) 和 38.3 (C-10); 2 个 CH₃ 的 C 信号 22.8 (C-12) 和 21.3 (C-13)。对比氨基酸残基信号数据,¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 中 2 个双重峰的甲基 H 信号 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz); CH 的 H 信号 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 4.02 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 1.61 (1H, m); CH₂ 的 H 信号 1.98 (2H, m), 推测含有异丁基; 结合 ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 中信号 167.2, 52.8, 38.4, 26.7, 22.8, 21.3 推测为亮氨酸残基; CH₂ 的 H 信号 3.60 (2H, m), 1.95 (1H, m), 1.81 (1H, m), 2.40 (1H, m), 2.04 (1H, m); CH 的 H 信号 4.10 (1H, t, $J = 8.0$ Hz) 和 C 信号 170.6, 59.5, 28.9, 22.7, 45.4 推测为脯氨酸残基。对比文献[8]数据,结合 NMR 特征分析,化合物 **2** 被鉴定为环(脯-亮)二肽 cyclo-(Pro-Leu)。

化合物 **3** 白色粉末状固体,熔点 > 300 °C, ESI-MS m/z 211.1 [M + H]⁺, ¹H-NMR 分析,可以看到 1 个酰胺 H 信号 6.41 (1H, s), 2 个与 N 相连的 CH 的 H 信号 4.09 (1H, dd, $J = 10.0, 7.0$ Hz), 3.80 (1H, dd, $J = 8.0, 7.8$ Hz); 结合 ¹³C-NMR 低场区的 2 个酰胺羰基 165.3 和 169.4, 推测其为环二肽。¹³C-NMR 和 DEPT-135 分析,其结构中有 2 个酰胺羰基 165.3 (C-1), 170.9 (C-7); 3 个 CH 的 C 信号 59.7 (C-6), 58.5 (C-9) 和 39.5 (C-10); 4 个 CH₂ 的 C 信号 45.8 (C-3), 23.9 (C-4), 29.4 (C-5) 和 21.8 (C-11); 2 个 CH₃ 的 C 信号 15.3 (C-12) 和 11.4 (C-13)。对比氨基酸残基信号数据,¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 中 0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz) 和 1.06 (3H, d, $J = 6.8$ Hz) 的 2 个甲基 H 信号; 3.80 (1H, dd, $J = 8.0, 7.8$ Hz), 2.06 (1H, m) CH 的 H 信号; 1.59 (1H, m), 1.49 (1H, m) CH₂ 的 H 信号; 结合 ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 中 165.3, 58.5, 39.5, 21.8, 15.2, 11.4 推测为异亮氨酸残基; 3.77 (2H, m),

1.95 (1H, m), 1.85 (1H, m), 2.41 (1H, m), 1.99 (1H, m), 4.09 (1H, dd, $J = 10.0, 7.0$ Hz) 和 C 信号 169.4, 60.0, 29.3, 23.9, 45.8 推测为脯氨酸残基。对比文献[9]数据,结合 NMR 特征分析,化合物 **3** 被鉴定为环(脯-异亮)二肽 cyclo-(Pro-Ile)。

化合物 **4** 白色粉末状固体,熔点 198 ~ 201 °C, ESI-MS m/z 197.2 [M + H]⁺, ¹H-NMR 分析,可以看到 1 个酰胺 H 信号 7.20 (1H, s), 2 个与 N 相连的 CH 的 H 信号 4.16 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 3.94 (1H, m); 结合 ¹³C-NMR 低场区的酰胺羰基 172.4, 168.2, 推测其为环二肽。¹³C-NMR 和 DEPT-135 分析,其结构中有 2 个羰基 172.4 (C-1), 168.2 (C-7), 3 个 CH 的 C 信号 60.8 (C-6), 59.6 (C-9) 和 29.0 (C-10), 3 个 CH₂ 的 C 信号 46.2 (C-3), 23.4 (C-4) 和 29.6 (C-5), 2 个 CH₃ 的 C 信号 18.3 (C-11) 和 15.5 (C-12)。对比氨基酸残基信号数据,¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ_{H} : 1.02 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) 和 0.90 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) 2 个双重峰甲基; 3.94 (1H, m), 1.07 (1H, m) CH, 结合 ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 中 172.4, 59.6, 29.0, 18.3, 15.5 推测为缬氨酸残基; 3.56 (2H, m), 1.98 (1H, m), 1.91 (1H, m), 2.44 (1H, m), 2.25 (1H, m), 4.16 (1H, t, $J = 7.8$ Hz) 和 C 信号 168.2, 60.8, 29.6, 23.4, 46.2 推测为脯氨酸残基。对比文献[10]数据,结合 NMR 特征分析,化合物 **4** 被鉴定为环(脯-缬)二肽 cyclo-(Pro-Val)。

化合物 **5** 白色颗粒状固体,熔点 > 300 °C, ESI-MS m/z 205.1 [M + H]⁺, ¹H-NMR 分析,可以看到 2 个酰胺 H 信号 7.83 (1H, s) 和 7.52 (1H, s), 3 个与 N 相连的 CH₂ 和 CH 的 H 信号 3.48 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 2.60 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 4.52 (1H, d, $J = 6.0$ Hz); 结合 ¹³C-NMR 低场区的酰胺羰基信号 169.2, 168.3, 推测其为环二肽。¹³C-NMR 和 DEPT-135 分析,其结构中有 2 个羰基信号 169.2 (C-1), 168.3 (C-4), 1 个 sp² 杂化的季碳的 C 信号 135.9 (C-8), 1 个 sp³ 杂化的 CH 的 C 信号 56.5 (C-6), 5 个 sp² 杂化的 CH 的 C 信号 131.5 (C-9), 128.7 (C-10), 127.2 (C-11), 128.7 (C-12), 131.5 (C-13), 2 个 sp³ 杂化的 CH₂ 的 C 信号 45.2 (C-3), 39.3 (C-7)。对比氨基酸残基信号数据,¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 低场区出现了 1 个单取代苯环 H 信号 7.22 (2H, m), 7.31 (1H, m), 7.30 (2H, m), CH₂ 的 H 信号 3.12 (1H, dd, $J = 12.8, 5.4$ Hz), 3.02 (1H, dd, $J = 12.8, 5.4$ Hz) 和 CH 的

H 信号 4.52 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 推测结构中有 1 个苜 CH_2 ; 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) 中 169.2, 135.9, 131.5, 128.7, 127.2, 39.3, 56.5 推测为苯丙氨酸的残基; CH_2 的 H 信号 3.48 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 2.60 (1H, d, $J = 16.8$ Hz) 以及 168.3, 45.2 推测为甘氨酸残基。对比文献[11]数据, 结合 NMR 特征分析, 化合物 **5** 被鉴定为环(苯丙-甘)二肽 cyclo-(Phe-Gly)。

化合物 **6** 白色粉末状固体, 熔点 > 300 °C, ESI-MS m/z 219.3 [M + H]⁺, $^1\text{H-NMR}$ 分析, 可以看到 2 个酰胺 H 信号 8.00 (1H, s) 和 8.08 (1H, s), 2 个与 N 相连的 CH 的 H 信号 3.58 (1H, m), 4.24 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 低场区的 2 个酰胺羰基 C 信号 167.4, 166.1, 推测其为环二肽。 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT-135 分析, 其结构中有 2 个羰基 167.4 (C-1), 166.1 (C-4), 1 个 sp^2 杂化的季碳的 C 信号 136.1 (C-9), 2 个 sp^3 杂化的 CH 的 C 信号 56.0 (C-6), 50.1 (C-3), 5 个 sp^2 杂化的 CH 的 C 信号 128.6 (C-10), 129.3 (C-11), 126.8 (C-12), 129.3 (C-13), 128.6 (C-14), 1 个 sp^3 杂化的 CH_2 的 C 信号 38.4 (C-8), 1 个 sp^3 杂化的 CH_3 的 C 信号 20.0 (C-7)。对比氨基酸残基信号数据, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) 低场区出现了 1 个单取代苯环 7.10 (2H, m), 7.24 (1H, m), 7.22 (2H, m), CH_2 的 H 信号 3.14 (1H, dd, $J = 13.0, 4.0$ Hz), 2.93 (1H, dd, $J = 13.0, 4.0$ Hz) 和 CH 的 H 信号 4.24 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 推测结构中有 1 个苜 CH_2 , 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) 中 167.4, 136.1, 129.3, 128.6, 126.8, 38.4, 56.0 推测为苯丙氨酸的残基; CH_2 的 H 信号 3.58 (1H, m) 和 CH_3 的 H 信号 0.51 (3H, d, $J = 6.8$ Hz) 以及 168.1, 45.0 推测为丙氨酸残基。对比文献[12]数据, 结合 NMR 特征分析, 化合物 **6** 被鉴定为环(苯丙-丙)二肽 cyclo-(Phe-Ala)。

化合物 **7** 白色粉末, 熔点 > 300 °C, ESI-MS m/z 261.2 [M + H]⁺, $^1\text{H-NMR}$ 分析, 可以看到 1 个酰胺 H 信号 δ : 7.38 (1H, s), 2 个与 N 相连的 CH 的 H 信号 4.02 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 4.36 (1H, dd, $J = 8.0, 7.0$ Hz), 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 低场区的 2 个酰胺羰基 167.4, 171.0, 推测其为环二肽。 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT-135 分析, 其结构中有 2 个羰基 167.4 (C-1), 171.0 (C-7), 2 个 sp^2 杂化的季碳的 C 信号 131.9 (C-11), 158.4 (C-14), 2 个 sp^3 杂化的 CH 的 C 信号 60.2 (C-6), 58.0 (C-9), 4 个 sp^2 杂化的 CH 的 C 信号 131.9 (C-12), 117.5 (C-13), 117.5 (C-

15), 131.9 (C-16), 4 个 sp^3 杂化的 CH_2 信号 46.2 (C-3), 23.0 (C-4), 28.9 (C-5), 38.1 (C-10)。对比氨基酸残基信号数据, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) 低场区有对羟基取代的苯环酚羟基 H 信号 4.74 (1H, s), 7.02 (2H, m), 6.74 (2H, m), CH_2 的 H 信号 3.05 (2H, m) 和 CH 的 H 信号 4.36 (1H, dd, $J = 8.0, 7.0$ Hz); 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) 中 167.4, 158.4, 131.9, 129.6, 117.5, 38.1, 58.0 推测为酪氨酸的残基; CH_2 的 H 信号 3.42 (1H, m), 3.53 (1H, m), 1.82 (2H, m), 2.10 (1H, m), 1.19 (1H, m) 和 CH 的 H 信号 4.02 (1H, d, $J = 7.0$ Hz) 以及 C 信号 171.0, 60.1, 28.9, 23.0, 46.2 推测为脯氨酸残基。对比文献[13]数据, 结合 NMR 特征分析, 化合物 **7** 被鉴定为环(苯丙-络)二肽 cyclo-(Pro-Tyr)。

化合物 **8** 无色粉末状固体, 熔点 > 300 °C, ESI-MS m/z 245.1 [M + H]⁺, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT-135 分析, 其结构中有 2 个羰基 166.7 (C-1), 171.4 (C-7), 1 个 sp^2 杂化的季碳的 C 信号 131.6 (C-11), 2 个 sp^3 杂化的 CH 的 C 信号 59.8 (C-6), 57.3 (C-9), 5 个 sp^2 杂化的 CH 的 C 信号 130.9 (C-12), 129.3 (C-13), 127.6 (C-14), 129.4 (C-15), 130.9 (C-16), 4 个 sp^3 杂化的 CH_2 的 C 信号 46.1 (C-3), 23.0 (C-4), 28.6 (C-5), 37.3 (C-10)。对比氨基酸残基信号数据, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) 低场区有单取代苯环 H 信号 7.21 (2H, m), 7.22 (1H, m), 7.25 (2H, m), CH_2 的 H 信号 3.15 (2H, m) 和 CH 的 H 信号 4.50 (1H, m), 推测有苜 CH_2 ; 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) 中 166.7, 131.7, 130.9, 129.4, 127.6, 37.3, 57.4 推测为苯丙氨酸的残基; CH_2 的 H 信号 3.35 (1H, m), 3.47 (1H, m), 1.71 (2H, m), 2.13 (1H, m), 1.37 (1H, m) 和 CH 的 H 信号 4.06 (1H, m) 以及 171.4, 59.7, 28.6, 23.0, 46.1 推测为脯氨酸残基。对比文献[10]数据, 结合 NMR 特征分析, 化合物 **8** 被鉴定为环(苯丙-脯)二肽 cyclo-(Pro-Phe)。

已有的环二肽生物活性研究发现, 含脯氨酸残基结构单元的环二肽具有普遍的拮抗肿瘤细胞的生物活性, 如 cyclo-(Pro-Gly) (**1**) 在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对前列腺癌细胞的抑制率 34%, 对肝癌细胞的抑制率 16%^[14]。cyclo-(Pro-Leu) (**2**) 对宫颈癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞有一定的抑制作用。cyclo-(Pro-Vla) (**4**) 在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对前列腺癌细胞的抑制率 53%, 对肝癌细胞的抑制率 17%^[15]。cyclo-(Phe-Pro) (**8**) 在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对宫颈癌细胞、乳腺癌细

胞、结肠癌细胞也有抑制能力^[16]。但是也有含脯氨酸的环二肽的没有显著生物活性,如 cyclo-(Pro-Ile) (3)。同时有研究者发现 cyclo-(Phe-Ala) (6) 对前列腺癌细胞有较好的抑制作用^[17]。环二肽类化合物作为一类具有特殊生物活性的天然产物,因其结构的稳定性和生物活性的特殊性,在天然药物及其相关研究领域中有广阔的应用前景,其可作为活性先导化合物,在寻找药物靶点和蛋白作用受点有着十分重要的意义。随着新的环二肽类从自然界中不断涌现,同时伴随着对环二肽类化合物的结构、功能更深入的研究,天然药物研究领域将掀起新的环二肽的研究热点。笔者从传统中药植物的内生真菌中寻找新的生物活性物质的新来源,发现的这株内生真菌 AR-15-1 可以代谢产生多种类别的环二肽化合物,为进一步环二肽的深入研究提供了有力的来源保障。

[参考文献]

[1] Borthwick A D. 2, 5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products [J]. Chem Rev, 2012, 112(7): 3641-3716.

[2] LI S M. Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis [J]. Nat Prod Rep, 2010, 27(1): 57-78.

[3] ZHOU F, ZHANG H C, LIU R, et al. Isolation and biological evaluation of secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from *Astragalus membranaceus* [J]. Chem Nat Compd, 2013, 49(3): 568-570.

[4] LIU X C, LI H, ZHOU F, et al. Secondary metabolites of *Fusarium* sp., an endophytic fungus in *Astragalus membranaceus* [J]. Chem Nat Compd, 2015, 51(6): 1199-1201.

[5] 刘瑞,张弘弛,李慧,等.一株恒山产蒙古黄芪内生真菌 *Penicillium griseofulvum* 次生代谢产物的分离和菌种鉴定[J].中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16): 25-29.

[6] 王维,马养民,张弘弛,等.黑果枸杞内生真菌 E21 菌株次生代谢产物的研究[J].中国新药杂志, 2013, 22(4): 460-464.

[7] 高义,李虎强,张志军,等.紫苏内生真菌 *Aspergillus* sp. 12Y03 化学成分研究[J].西北植物学报, 2013, 33(7): 1473-1477.

[8] Adamczeski M, Reed A R, Crews P. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge [J]. J Nat Prod, 1995, 58(2): 201-208.

[9] 康洁,陈若芸.构菌发酵菌丝体化学成分的研究[J].中国中药杂志, 2005, 28(3): 1038-1040.

[10] 汪有初,周俊,谭宁华.五味子的环二肽及其合成[J].药学学报, 1999, 34(1): 19-22.

[11] 李厚金,林永成,刘晓红.红树林内生真菌 2524 号的肽类成分(I)[J].中山大学学报:自然科学版, 2002, 41(1): 110-113.

[12] Izumiya N, Lee S, Kanmera T, et al. Asymmetric hydrogenation of alpha, beta-dehydroamino acid residue in cyclic dipeptides [J]. America Chem Soc, 1977, 99(25): 8346-8348.

[13] 熊江,周俊,戴好富,等.多蕊商陆的化学成分[J].云南植物研究, 2002, 24(3): 401-405.

[14] Schuller J M, Zocher G, Liebhold M, et al. Structure and catalytic mechanism of a cyclic dipeptide prenyltransferase with broad substrate promiscuity [J]. J Mol Biol, 2012, 422(1): 87-99.

[15] 丁中涛,保志娟,杨雪琼,等.金铁锁根中的 3 个环二肽[J].中国中药杂志, 2003, 28(4): 337-339.

[16] Wollinsky B, Ludwig L, Hamacher A, et al. Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(12): 3866-3869.

[17] 李春艳,郭顺星,王春兰.抑制肿瘤细胞活性的红树林植物内生真菌代谢产物研究进展[J].安徽农业科学, 2012, 40(2): 702-705.

[责任编辑 顾雪竹]