

• 化学成分 •

蛇足石杉内生真菌 *Penicillium chrysogenum* MT-12 中 2 个新二苯醚类成分

张鑫, 齐博文, 杨洪芸, 江芳芳, 丁宁, 吴云, 刘晓, 屠鹏飞, 史社坡*

北京中医药大学中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029

摘要: 目的 研究蛇足石杉内生真菌 *Penicillium chrysogenum* MT-12 经固体发酵培养后的代谢产物。方法 利用硅胶、Sephadex LH-20 及半制备液相色谱等方法进行分离纯化, 根据化合物的理化性质及 IR、MS、NMR 等光谱数据鉴定化合物的结构; 利用体外模型进行抗炎、乙酰胆碱酯酶抑制活性筛选。结果 从 *P. chrysogenum* MT-12 固体发酵培养后的代谢产物中共分离鉴定 8 个二苯醚类化合物, 分别为黄青霉内酯 A (1)、黄青霉内酯 B (2)、talaromyone A (3)、isopenicillide (4)、penicillide (5)、hydroxypenicillide (6)、purpactin A (7)、黄青霉内酯 C (8)。结论 化合物 1、2 为新化合物, 化合物 3 为首次从青霉属中分离得到, 化合物 4~8 为首次从产黄青霉菌中分离得到; 化合物 1、2 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 产生有一定抑制活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 (72.6±2.3)、(41.2±1.4) μmol/L, 而所有化合物在 100 μmol/L 时对乙酰胆碱酯酶不显示抑制活性。

关键词: 蛇足石杉; 内生真菌; 产黄青霉菌; 二苯醚类成分; 一氧化氮抑制活性; 黄青霉内酯 A; 黄青霉内酯 B

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)11-2496-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.002

Two new diphenyl ether derivatives from *Penicillium chrysogenum* MT-12, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*

ZHANG Xin, QI Bo-wen, YANG Hong-yun, JIANG Fang-fang, DING Ning, WU Yun, LIU Xiao, TU Peng-fei, SHI She-po

Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from *Penicillium chrysogenum* MT-12, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*. **Methods** The compounds were isolated and purified by using various column chromatographies including silica gel, Sephadex LH-20, and semi-preparative HPLC. The structures were established using extensive spectroscopic techniques such as IR, MS, and NMR. The anti-inflammatory and AChE inhibitory activities of all the isolates were also preliminarily investigated by using *in vitro* models. **Results** Eight diphenyl ether derivatives including penicichrysogenillide A (1), penicichrysogenillide B (2), talaromyone A (3), isopenicillide (4), penicillide (5), hydroxypenicillide (6), purpactin A (7), and penicichrysogenillide C (8) were isolated from the solid fermentation cultures of *P. chrysogenum* MT-12. **Conclusion** Compounds 1 and 2 are new compounds, and this is the first report for the isolation of compound 3 from *Penicillium* species and compounds 4—8 from *P. chrysogenum*. Compounds 1 and 2 exhibited inhibitory activities against the nitric oxide production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophage cells with IC₅₀ value of (72.6±2.3) μmol/L and (41.2±1.4) μmol/L, respectively. In contrast, all the compounds didn't exhibit inhibitory activities on AChE at the concentration of 100 μmol/L.

Key words: *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.; endophytic fungi; *Penicillium chrysogenum* MT-12; diphenyl ether derivatives; inhibitory activity against nitric oxide production; penicichrysogenillide A; penicichrysogenillide B

植物内生菌是发现活性天然产物的重要资源, 的天然产物, 如具有动物神经毒性的麦角生物碱和
目前已从内生菌中分离鉴定了一系列具有显著活性 吲哚生物碱, 具有植物抗毒素样作用的细胞松弛素

收稿日期: 2018-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573312)

作者简介: 张鑫, 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物化学成分研究。E-mail: goldenbow@126.com

*通信作者 史社坡 Tel/Fax: (010)64286350 E-mail: shishepo@163.com

等^[1-2]。另一方面,内生真菌在和宿主长期共生的过程中,可能产生与宿主相同或相似的代谢产物,如发现了能够产生喜树碱、鬼臼毒素、紫杉醇等活性天然产物的内生菌^[3-4]。因此,从内生菌中寻找活性天然产物或筛选能够产生特定活性成分的菌株成为当前研究的热点。

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. 为石杉科石杉属多年生草本蕨类植物,全草具有散瘀消肿、清热解毒的功效。从蛇足石杉中分离得到的石杉碱甲是一个高效、可逆、高选择性的乙酰胆碱酯酶抑制剂,用于治疗老年痴呆等神经退行性疾病^[5]。研究表明,蛇足石杉各组织中存在丰富的内生菌,部分内生真菌可以产生石杉碱甲^[6-7]。为了从内生菌中筛选活性天然产物,并寻找能够产生石杉碱甲的内生真菌,本课题组对蛇足石杉中的内生真菌及其代谢产物进行了系统研究,发现了一系列结构新颖的化合物^[8-9]。本实验报道从蛇足石杉内生真菌 *Penicillium chrysogenum* MT-12 中分离得到的 8 个二苯醚类化合物,分别为黄青霉内酯 A (penicichrysogenillide A, **1**)、黄青霉内酯 B (penicichrysogenillide B, **2**)、talaromyone A (**3**)、isopenicillide (**4**)、penicillide (**5**)、hydroxyphenicillide (**6**)、purpactin A (**7**)、黄青霉内酯 C (penicichrysogenillide C, **8**)。其中化合物 **1**、**2** 为新化合物,化合物 **3** 为首次从青霉属中分离得到,化合物 **4**~**8** 为首次从产黄青霉菌中分离得到。化合物 **1**、**2** 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 产生具有一定抑制活性,而所有化合物在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时对乙酰胆碱酯酶不显示抑制活性。

1 仪器与材料

Autopol IV 全自动旋光仪 (美国 Rudolf 公司); UV-2401PC 紫外分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); 470 FT-IR 红外光谱仪 (美国 Thermo 公司); JASCOJ-810 圆二色光谱仪 (日本 JASCO 公司); 高效液相离子阱飞行时间质谱分析系统: UFLC SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, SPD M20A 紫外检测器, LC-20ADXR 泵, IT-TOF-MS 配备 ESI 离子源 (日本 Shimadzu 公司); Varian 500 核磁共振仪 (美国 Varian 公司); Waters 2998 半制备型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); ODS 半制备柱 (SunFireTM C₁₈, 150 mm $\times$ 10 mm, 5 μm); Sephadex LH-20 填料 (瑞典 Amerasham Biosciences

公司); ODS 柱色谱填料 (Li-Chroprep RP-C₁₈, 40~63 μm , 德国 Merck 公司); D101 大孔树脂、柱色谱用硅胶 (200~300 目) 及薄层色谱用 GF₂₅₄ 硅胶预制板均为青岛海洋化工厂生产。MCO-18AIC 细胞培养箱 (日本 SANYO 公司); AE2000 倒置荧光显微镜 (中国 Motic 公司); OptiMair 超净台 (新加坡 ESCO 公司); M1000 型多功能酶标仪 (美国 TECAN 公司); DMEM 培养基 (美国 Hy-clone 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); NO 化学法试剂盒 (南京建成生物公司); 吡啶美辛、碘化硫代乙酰胆碱、5,5-二硫代二硝基苯甲酸、二甲基亚砷、十二烷基硫酸钠均由 Sigma 公司提供。石杉碱甲、电鳗乙酰胆碱酯酶由上海源叶生物公司提供。

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb ex Murray) Trev. 采自福建省南平市 (标本编号 201507)。本研究所用菌株由课题组自蛇足石杉中分离,根据其形态特征及 ITS rDNA 序列 (GeneBank MF765611) 鉴定为产黄青霉菌 *Penicillium chrysogenum* MT-12, 菌种存于北京中医药大学中药现代研究中心。

RAW264.7 巨噬细胞由中国中医科学院细胞中心提供。

2 内生菌的发酵培养及代谢产物的提取分离

P. chrysogenum MT-12 于无菌环境下接种至 0.5 L $\times$ 40 瓶糙米培养基中,室温培养 40 d 后,用醋酸乙酯浸提 3 次,减压回收得提取物 60 g。经硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇 (1:0 $\rightarrow$ 1:1) 梯度洗脱,合并得 8 个流分 (Fr. A~H)。Fr. D 经反相硅胶柱色谱,甲醇-水 (2:8 $\rightarrow$ 10:0) 洗脱得到 8 个部位 (SFr. DA1~DA8)。SFr. DA7 经 Sephadex LH-20 柱色谱,甲醇-二氯甲烷 (1:1) 等度洗脱得到 3 个流分 (SFr. DA7S1~DA7S3)。SFr. DA7S2 经半制备高效液相色谱,乙腈-水 (9:11) 等度洗脱得到化合物 **1** (8.0 mg)、**2** (3.5 mg)、**3** (7.2 mg)、**4** (8.8 mg)。SFr. DA6 经半制备高效液相色谱,乙腈-水 (11:9) 等度洗脱得到化合物 **5** (6.5 mg)、**6** (12.4 mg)、**7** (5.5 mg)、**8** (4.6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色粉末, $[\alpha]_D^{21} +28.0^\circ$ (c 0.1, MeOH)。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 215 (4.10), 280 (3.75)。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 387.147 5 [$\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值 387.149 9), 结合其 ¹³C-NMR 数据确定其分子式为 C₂₁H₂₄O₇。IR 图谱显示该化合物结构中含有羟基 (3 399 cm^{-1})、羰基 (1 650 cm^{-1}) 和苯

环 ($1\ 619$ 、 $1\ 508\ \text{cm}^{-1}$)。 ^1H -NMR 显示 4 个芳香氢信号 $\delta_{\text{H}}\ 7.50$ (1H, d, $J = 8.5\ \text{Hz}$, H-2), 6.79 (1H, d, $J = 8.5\ \text{Hz}$, H-1), 6.81 (1H, d, $J = 2.0\ \text{Hz}$, H-10), 6.31 (1H, d, $J = 2.0\ \text{Hz}$, H-8); 2 个含氧亚甲基信号 $\delta_{\text{H}}\ 5.08$ (1H, d, $J = 14.5\ \text{Hz}$, H-7a), 4.98 (1H, d, $J = 14.5\ \text{Hz}$, H-7b), 3.56 (1H, dd, $J = 10.5, 4.0\ \text{Hz}$, H-4'a), 3.49 (1H, dd, $J = 10.5, 4.0\ \text{Hz}$, H-4'b); 1 个亚甲基信号 $\delta_{\text{H}}\ 1.73$ (2H, t, $J = 6.0\ \text{Hz}$, H-2'); 1 个含氧次甲基信号 $\delta_{\text{H}}\ 5.12$ (1H, t, $J = 6.0\ \text{Hz}$, H-1'); 1 个次甲基信号 $\delta_{\text{H}}\ 1.79$ (1H, m, H-3'); 2 个甲基信号 $\delta_{\text{H}}\ 2.20$ (3H, s, 1'-CH₃), 0.91 (3H, d, $J = 6.8\ \text{Hz}$, 5'-CH₃); 1 个甲氧基信号 $\delta_{\text{H}}\ 3.91$ (3H, s, 4-OCH₃)。化合物 **1** 与已知化合物 penicillide 的 NMR 数据非常相似^[10], 提示两者具有相同的结构骨架。然而, 化合物 **1** 的 ^1H -NMR 数据与

penicillide (**5**) 相比少了 1 个甲基信号, 而多出 1 个含氧亚甲基信号 $\delta_{\text{H}}\ 3.56$ (1H, dd, $J = 10.5, 4.0\ \text{Hz}$, H-4'a), 3.49 (1H, dd, $J = 10.5, 7.0\ \text{Hz}$, H-4'b)。 ^{13}C -NMR 谱中, 化合物 **1** 的 C-4' 化学位移明显向低场位移 ($\delta_{\text{C}}\ 67.7$; $\Delta\delta_{\text{C}} +45.9$), 提示化合物 **1** 中 C-4' 被氧化为羟甲基。此外, H₁-1'/H₂-2'、H₂-2'/H₁-3'、H₁-3'/H₂-4'、H₁-3'/H₃-5' 之间的 ^1H - ^1H COSY 相关以及 H₂-7/C-5、H₂-7/C-8、H₂-7/C-12、H-1'/C-2、H-1'/C-4、H-1''/C-8、H-1''/C-9 之间的 HMBC 相关 (图 1), 进一步证明上述推断。结合 2D NMR 图谱如 HSQC、 ^1H - ^1H COSY 及 HMBC, 对化合物 **1** 的所有氢碳信号进行归属 (表 1), 确定化合物 **1** 的平面结构如图 1 所示, 为新化合物, 命名为黄青霉内酯 A。

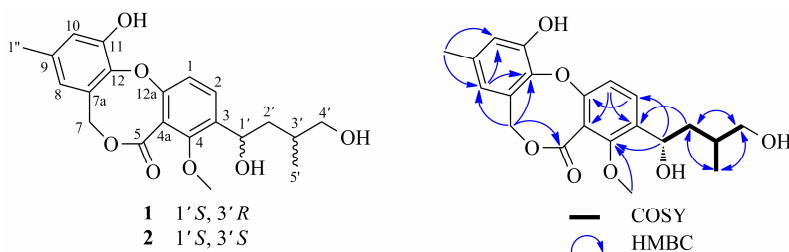


图 1 化合物 **1**~**2** 的结构和化合物 **1** 的主要 ^1H - ^1H COSY、HMBC 相关

Fig. 1 Structures of compounds **1** and **2** and key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound **1**

化合物 **2**: 淡黄色粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{21} -4.0^\circ$ ($c\ 0.1$, MeOH), HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 $m/z\ 387.148\ 1$ [$\text{M}-\text{H}$]⁻ (计算值 $387.149\ 9$), 结合其 ^{13}C -NMR 数据确定其分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$ 。化合物 **2** 的 ^1H -NMR 及 ^{13}C -NMR 与化合物 **1** 非常相似 (表 1), 仅是 C-3 位的取代基 (3-甲基-1,4-丁二醇基) 上的碳氢信号略有差别, 提示化合物 **1** 和 **2** 可能为一对立体异构体。利用 2D NMR (^1H - ^1H COSY、HMBC 及 HSQC) 对化合物 **2** 的氢碳信号进行归属, 确定其平面结构与化合物 **1** 完全相同 (图 1)。

化合物 **1** 和 **2** 的 CD 谱中, 在 $214\ \text{nm}$ ($\Delta\epsilon_{\text{max}} -8.0$) 出现负的 Cotton 效应, 在 $232\ \text{nm}$ ($\Delta\epsilon_{\text{max}} +3.0$) 出现正的 Cotton 效应, 在 $278\ \text{nm}$ ($\Delta\epsilon_{\text{max}} -0.5$) 出现负的 Cotton 效应, 这与文献报道的化合物 hydroxyphenicillide^[11] 的 CD 图谱完全一致, 因此确定化合物 **1** 和 **2** 中 C-1' 的绝对构型均为 *S* 构型。C-3' 的绝对构型主要根据文献报道进行确定^[12], 当 C-1' 为 *S* 构型时, 如果 C-3' 为 *R* 构型, H-3' 和 3'-CH₃ 的化学位移相对于 C-3' 为 *S* 构型处于相对高场, H-1'

的化学位移对于 C-3' 为 *S* 构型处于相对低场。据此, 确定化合物 **1** 的绝对构型为 1'S, 3'R。化合物 **2** 的绝对构型为 1'S, 3'S, 命名为黄青霉内酯 B。

化合物 **3**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 371 [$\text{M}-\text{H}$]⁻, 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.03 (1H, d, $J = 8.5\ \text{Hz}$, H-1), 7.58 (1H, d, $J = 8.5\ \text{Hz}$, H-2), 7.02 (1H, brs, H-7), 7.06 (1H, brs, H-9), 4.89 (2H, s, H-13), 5.07 (1H, dd, $J = 9.5, 4.0\ \text{Hz}$, H-1'), 1.65 (1H, m, H-2'a), 1.45 (1H, m, H-2'b), 1.77 (1H, m, H-3'), 0.98 (3H, d, $J = 6.5\ \text{Hz}$, 4'-CH₃), 0.95 (3H, d, $J = 6.5\ \text{Hz}$, 5'-CH₃), 3.90 (3H, s, 4-OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 114.9 (C-1), 132.1 (C-2), 136.0 (C-3), 159.3 (C-4), 114.5 (C-4a), 161.8 (C-5), 143.8 (C-6a), 120.8 (C-7), 136.5 (C-8), 126.1 (C-9), 133.5 (C-10), 146.5 (C-10a), 161.1 (C-11a), 21.0 (C-12), 60.3 (C-13), 67.0 (C-1'), 47.6 (C-2'), 25.1 (C-3'), 22.0 (C-4'), 23.5 (C-5'), 63.0 (4-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **3** 为 talaromyone A。

表 1 化合物 1 和 2 的 NMR 数据 (500/125 MHz, CDCl₃)Table 1 NMR data (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, in CDCl₃) of compounds 1 and 2

碳位	1		2		5	
	δ_{H} , (J/Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} , (J/Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J/Hz)	δ_{C} , type
1	6.79, d, (8.5)	117.8, CH	6.85, d, (8.5)	117.8, CH	6.86, d, (8.5)	117.7, CH
2	7.50, d, (8.5)	131.2, CH	7.56, d, (8.5)	130.9, CH	7.55, d, (8.5)	131.1, CH
3		136.5, C		137.2, C		137.1, C
4		154.0, C		154.2, C		154.6, C
5		168.4, C		168.0, C		167.6, C
7	5.08, d, (14.5)	69.4, CH ₂	5.08, m	69.3, CH ₂	5.02, m	69.2, CH ₂
	4.98, d, (14.5)					
8	6.31, d, (2.0)	120.7, CH	6.35, d, (2.0)	120.8, CH	6.37, br s	120.9, CH
9		135.1, C		135.2, C		135.2, C
10	6.81, d, (2.0)	118.1, CH	6.85, d, (2.0)	117.9, CH	6.85, br s	117.7, CH
11		147.8, C		147.7, C		147.5, C
12		141.6, C		141.5, C		141.4, C
4a		119.2, C		119.6, C		119.7, C
7a		125.9, C		125.9, C		125.9, C
12a		151.4, C		151.5, C		151.4, C
1'	5.12, t, (6.0)	65.7, CH	5.08, m	67.5, CH	5.07, dd, (9.0, 4.0)	66.7, CH
2'	1.73, t, (6.0)	42.8, CH ₂	1.70, m	44.8, CH ₂	1.67, m	47.8, CH ₂
			1.62, m		1.47, m	
3'	1.79, m	32.4, CH	1.98, m	35.0, CH	1.79, m	25.1, CH
4'	3.56, dd, (10.5, 4.0)	67.7, CH ₂	3.67, dd, (10.5, 4.0)	68.8, CH ₂	0.96, d, (6.5)	22.0, CH ₃
	3.49, dd, (10.5, 7.0)		3.42, dd, (10.5, 8.5)			
5'	0.91, d, (6.6)	17.2, CH ₃	0.96, d, (6.8)	18.0, CH ₃	0.98, d, (6.5)	23.6, CH ₃
1''	2.20, s	20.9, CH ₃	2.24, s	21.0, CH ₃	2.24, s	21.0, CH ₃
4-OCH ₃	3.91, s	62.4, -OCH ₃	3.97, s	62.7, -OCH ₃	3.97, s	62.9, -OCH ₃

化合物 4: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 387 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₁H₂₄O₇。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.90 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1), 7.72 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-2), 5.08 (2H, m, H-7), 6.38 (1H, brs, H-8), 6.86 (1H, brs, H-10), 5.40 (1H, dd, J = 9.5, 2.0 Hz, H-1'), 1.79 (2H, m, H-2'), 1.48 (3H, s, 4'-CH₃), 1.31 (3H, s, 5'-CH₃), 3.97 (3H, s, 4-OCH₃), 2.24 (3H, s, 1''-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 117.7 (C-1), 131.2 (C-2), 136.8 (C-3), 154.1 (C-4), 121.0 (C-4a), 167.5 (C-5), 69.2 (C-7), 125.9 (C-7a), 120.7 (C-8), 135.2 (C-9), 117.7 (C-10), 147.4 (C-11), 141.5 (C-12), 151.4 (C-12a), 66.3 (C-1'), 49.5 (C-2'), 72.5 (C-3'), 27.7 (C-4'), 32.4 (C-5'), 62.6 (4-OCH₃), 21.0 (C-1'')。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 4 为

isopenicillide。

化合物 5: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 371 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₁H₂₄O₆。NMR 数据见表 1, 故鉴定化合物 5 为 penicillide^[10]。

化合物 6: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 387 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₁H₂₄O₇。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.88 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1), 7.58 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-2), 5.11 (2H, s, H-7), 6.60 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 7.04 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-10), 5.09 (1H, dd, J = 9.5, 4.0 Hz, H-1'), 1.68 (1H, m, H-2'a), 1.48 (H, m, H-2'b), 1.80 (H, m, H-3'), 0.99 (3H, d, J = 6.5 Hz, 4'-CH₃), 0.97 (3H, d, J = 6.5 Hz, 5'-CH₃), 3.98 (3H, s, 4-OCH₃), 4.59 (2H, s, H-1''); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 118.6 (C-1), 131.2 (C-2), 138.2 (C-3), 154.8

(C-4), 118.9 (C-4a), 167.4 (C-5), 69.1 (C-7), 126.4 (C-7a), 115.6 (C-8), 141.9 (C-9), 117.7 (C-10), 147.9 (C-11), 142.9 (C-12), 151.2 (C-12a), 66.9 (C-1'), 47.8 (C-2'), 25.2 (C-3'), 23.6 (C-4'), 22.0 (C-5'), 62.9 (4-OCH₃), 64.6 (C-1''). 以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **6** 为 hydroxypenicillide。

化合物 **7**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 399 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₂H₂₄O₇。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.87 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1), 7.44 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-2), 5.12 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7a), 5.01 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7b), 6.38 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.85 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-10), 6.12 (1H, dd, J = 9.5, 4.5 Hz, H-1'), 1.77 (1H, m, H-2'a), 1.49 (1H, m, H-2'b), 1.65 (1H, m, H-3'), 0.95 (3H, d, J = 6.5 Hz, 4'-CH₃), 0.95 (3H, d, J = 6.5 Hz, 5'-CH₃), 4.03 (3H, s, 4-OCH₃), 2.06 (3H, s, 1'-OAc), 2.24 (3H, s, 1''-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 117.8 (C-1), 130.8 (C-2), 134.4 (C-3), 154.8 (C-4), 121.0 (C-4a), 167.2 (C-5), 69.1 (C-7), 126.0 (C-7a), 121.0 (C-8), 135.3 (C-9), 117.7 (C-10), 147.4 (C-11), 141.4 (C-12), 151.7 (C-12a), 68.8 (C-1'), 45.5 (C-2'), 25.1 (C-3'), 22.0 (C-4'), 23.2 (C-5'), 62.8 (4-OCH₃), 170.4 (1'-OCOCH₃), 21.3 (1'-OCOCH₃), 21.0 (C-1'')。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **7** 为 purpactin A。

化合物 **8**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 369 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₁H₂₂O₆。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.94 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1), 7.68 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-2), 5.12 (2H, m, H-7), 6.40 (1H, brs, H-8), 6.87 (1H, brs, H-10), 2.84 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2'), 2.21 (1H, m, H-3'), 0.96 (3H, d, J = 6.5 Hz, 4'-CH₃), 0.96 (3H, d, J = 6.5 Hz, 5'-CH₃), 3.97 (3H, s, 4-OCH₃), 2.25 (3H, s, 1''-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 117.9 (C-1), 132.8 (C-2), 135.7 (C-3), 154.5 (C-4), 119.5 (C-4a), 167.8 (C-5), 69.1 (C-7), 125.9 (C-7a), 121.1 (C-8), 135.7 (C-9), 117.9 (C-10), 147.4 (C-11), 140.9 (C-11a), 152.0 (C-12a), 201.6 (C-1'), 52.0 (C-2'), 29.9 (C-3'), 22.8 (C-4'), 25.1 (C-5'), 63.9 (4-OCH₃), 21.0 (C-1'')。故鉴定化合物 **8** 为 penicichrysogenillide C^[14]。

4 NO 抑制活性筛选

将处于对数期的 RAW264.7 细胞用胰酶消化, 然后用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基终

止消化, 并将细胞稀释到 4×10^5 个/mL, 接种到 96 孔板中, 40 000 细胞/孔, CO₂ 培养箱孵育 24 h。用二甲基亚砜 (DMSO) 将单体化合物配制为 20 mmol/L 浓度母液, 然后用培养基稀释后加入 96 孔培养板至终浓度为 100、20、4 μ mol/L, 孵育 1 h, 再加入 LPS 至终质量浓度为 1 μ g/mL, 继续孵育 24 h。从 96 孔板各孔中吸取 100 μ L 上清至酶标板内, 每孔加入 50 μ L Griess R1, 室温避光放置 5 min, 再加入 50 μ L Griess R2, 室温避光放置 5 min。540 nm 测定吸光度, 计算各化合物对 NO 分泌的抑制率, 抑制率 > 50% 的浓度为半数抑制浓度 (IC₅₀)。在上述 96 孔板中加入 25 μ L 的 MTT 至终质量浓度为 0.5 mg/mL, CO₂ 培养箱内孵育 4 h。各孔加入 150 μ L 三联液 (10 g 十二烷基磺酸钠、5 mL 异丁醇、0.1 mL 浓盐酸, 用蒸馏水定容到 100 mL), 待甲瓚充分溶解后测定 570 nm 吸光度, 并计算化合物对 RAW274.7 细胞生长的抑制率^[15]。

化合物 **1** 和 **2** 对 NO 产生具有一定抑制作用, IC₅₀ 分别为 (72.6 $\pm$ 2.3)、(41.2 $\pm$ 1.4) μ mol/L, 阳性对照吲哚美辛 IC₅₀ 为 (33.6 $\pm$ 1.4) μ mol/L。此外, 对化合物 **1**~**8** 进行乙酰胆碱酯酶抑制活性筛选^[16-17], 所有化合物在浓度为 100 μ mol/L 时对乙酰胆碱酯酶不显示抑制活性。

参考文献

- [1] 贾 栗, 陈疏影, 翟永功, 等. 近年国内外植物内生菌产生物活性物质的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1750-1754.
- [2] Tan R, Zou W. Endophytes: A rich source of functional metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2001, 18(4): 448-459.
- [3] Kusari S, Zühlke S, Spiteller M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(1): 2-7.
- [4] Eyberger A, Dondapati R, Porter J. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(8): 1121-1124.
- [5] 袁经权, 周小雷, 王 硕, 等. 蛇足石杉化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 399-407.
- [6] Zhu D, Wang J, Zeng Q, et al. A novel endophytic huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata* [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(4): 1469-1478.
- [7] Kan'ichiro I, Dai H, Takuma S, et al. Identification of *lycopodium* alkaloids produced by an ultraviolet-irradiated strain of *Paraboeremia*, an endophytic fungus from *Lycopodium serratum* var.

- longipetiolatum* [J]. *J Nat Prod*, 2018, doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00627.
- [8] Qi B, Liu X, Mo T, *et al.* 3,5-dimethylorsellinic acid derived meroterpenoids from *Penicillium chrysogenum* MT-12, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata* [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(10): 2699-2707.
- [9] Qi B, Liu X, Mo T, *et al.* Nitric oxide inhibitory polyketides from *Penicillium chrysogenum* MT-12, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata* [J]. *Fitoterapia*, 2017, 123: 35-43.
- [10] Komai S, Hosoe T, Itabashi T, *et al.* New penicillide derivatives isolated from *Penicillium simplicissimum* [J]. *J Nat Med*, 2006, 60(3): 185-190.
- [11] Zhao D, Shao C, Zhang Q, *et al.* Azaphilone and diphenyl ether derivatives from a gorgonian-derived strain of the fungus *Penicillium pinophilum* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(9): 2310-2314.
- [12] Brenna E, Fuganti C, Ronzani S, *et al.* Biocatalyzed preparation of the optically enriched stereoisomers of 4-methyl-2-phenyl-tetrahydro-2H-pyran [J]. *Can J Chem*, 2002, 80(6): 714-723.
- [13] Cai R, Chen S, Long Y, *et al.* Depsidones from *Talaromyces stipitatus* SK-4, an endophytic fungus of the mangrove plant *Acanthus ilicifolius* [J]. *Phytochemistry Lett*, 2017, 20: 196-199.
- [14] Salituro G, Pettibone D, Clineschmidt B, *et al.* Potent, non-peptidic oxytocin receptor antagonists from a natural source [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1993, 3(2): 337-340.
- [15] 王海强, 刘一宁, 陆晓燕, 等. 甘草中抑制脂多糖诱导小鼠 RAW264.7 产生 NO 的活性成分研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(23): 4155-4159.
- [16] Ying Y, Shan W, Zhan Z. Biotransformation of huperzine A by a fungal endophyte of *Huperzia serrata* furnished sesquiterpenoid-alkaloid hybrids [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(9): 2054-2059.
- [17] Zhang J, Zhang Q, Tu P, *et al.* Mucroniferanines A-G, isoquinoline alkaloids from *Corydalis mucronifera* [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(2): 364-370.