

山麻黄内生菌 *Myrothecium roridum* LLY 的化学成分及其体外细胞毒活性研究

申 丽¹, 王 晶¹, 李玲玉¹, 张小君¹, 杨长水¹, 宋勇春²

1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001

2. 南京大学功能生物分子研究所, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 研究山麻黄 *Ephedra equisetina* 内生真菌 *Myrothecium roridum* LLY 固体发酵产物的化学成分, 并进行体外细胞毒活性研究。方法 采用硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和高效液相色谱法进行分离纯化, 利用高分辨质谱、核磁共振谱等方法鉴定化合物的结构。MTT 法进行化合物体外细胞毒活性筛选, 并采用流式细胞术和 Western blotting 法进行化合物细胞毒活性机制初步研究。结果 从 *M. roridum* LLY 固体发酵产物中分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为吩嗪-1-羧酸(1)、1-甲氧基吩嗪(2)、*N*-methyl-1*H*-indole-2-carboxamide (3)、甲基硫赭曲菌素(4)、ditryptophenaline (5)、7,8-二甲基异咯嗪(6)、deoxyleporin B (7)、尿嘧啶(8)和胸腺嘧啶(9)。MTT 测定发现, 化合物 3 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖具有一定的抑制活性, 其 IC₅₀ 值为 38.0 μg/mL, 阳性对照顺铂的 IC₅₀ 值为 11.5 μg/mL。细胞周期分析发现, 化合物 3 可导致 SMMC-7721 细胞 S 期阻滞; Western blotting 分析发现, 化合物 3 可使 SMMC-7721 细胞中细胞周期负调控蛋白 p27 的表达上调, 并且 Cleaved-PARP 蛋白被明显活化。结论 化合物 7 为 1 个新的天然产物。化合物 3 能诱导 SMMC-7721 细胞凋亡; 其对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用与 S 期细胞周期阻滞相关, 并受到 p27 蛋白的调控。

关键词: 山麻黄; 内生真菌; 细胞毒活性; *N*-methyl-1*H*-indole-2-carboxamide; deoxyleporin B

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)21-3155-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.005

Chemical constituents of endophyte *Myrothecium roridum* LLY from *Ephedra equisetina* and their *in vitro* cytotoxicity

SHEN Li¹, WANG Jing¹, LI Ling-yu¹, ZHANG Xiao-jun¹, YANG Chang-shui¹, SONG Yong-chun²

1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

2. Institute of Functional Biomolecules, Nanjing University, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of solid fermentation product of endophyte *Myrothecium roridum* LLY from *Ephedra equisetina* and their *in vitro* cytotoxic activity against cancer cells. **Methods** Isolation and purification were performed through silica gel and Sephadex LH-20 gel filtration column chromatography as well as HPLC method, and structures of obtained compounds were elucidated by HR-MS and NMR compared with the data of literatures. *In vitro* cytotoxicity was evaluated through MTT method and preliminary cytotoxicity mechanism was studied using flow cytometry and Western blotting. **Results** Nine compounds were isolated from the solid fermentation product of endophyte *M. roridum*, which were identified as 1-phenazinecarboxylic acid (1), 1-methoxyphenazine (2), *N*-methyl-1*H*-indole-2-carboxamide (3), monomethylsulochrin (4), ditryptophenaline (5), lumichrome (6), deoxyleporin B (7), uracil (8), and thymine (9), respectively. *In vitro* cytotoxicity assay showed that compound 3 was cytotoxic to the human hepatoma cell line SMMC-7721 with an IC₅₀ value of 38.0 μg/mL, while positive control cisplatin had an IC₅₀ value of 11.5 μg/mL. Cell cycle analysis indicated that compound 3 could delay SMMC-7721 cells in S phase and Western blotting showed that compound 3 could up-regulate the expression of cell cycle negative regulation protein p27 and induce the cleavage of PARP. **Conclusion** Compound 7 is a new natural product. Compound 3 could induce the apoptosis of SMMC-7721 cells and the anti-proliferation activity of compound 3 to SMMC-7721 cells is related to S phase arrested and regulated by protein p27.

Key words: *Ephedra equisetina* Bge.; endophyte; cytotoxicity; *N*-methyl-1*H*-indole-2-carboxamide; deoxyleporin B

收稿日期: 2015-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21372191); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK2013429)

作者简介: 申 丽, 副教授, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0514)87992233 E-mail: shenli@yzu.edu.cn

从天然产物中筛选生物活性成分或先导化合物是研究创新药物的有效途径之一。因微生物资源的可再生性,越来越多的科研人员将目光转向微生物次生代谢物,尤其是特境微生物,如海洋微生物、植物内生菌和昆虫共生菌等的次生代谢物^[1]。植物内生菌是一种种类繁多而研究甚少的微生物,通过共生方式,它们能在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于正常植物组织内。植物内生菌既能产生和宿主植物相同或相似的活性成分^[2],也能产生与宿主植物不同的生物活性成分^[3]。植物内生菌广泛存在于植物体内,目前研究较多的是来源于特殊生境植物和药用植物的内生菌。

南京大学功能生物分子研究所从药用植物山麻黄 *Ephedra equisetina* Bge. 中分离获得 1 株内生真菌 *Myrothecium roridum* (菌株编号 LLY), 本实验

对该菌株固体发酵产物粗浸膏的化学成分进行研究,以期发现新颖、强抗肿瘤活性的化合物。通过研究,分离纯化获得 9 个化合物,分别鉴定为吩嗪-1-羧酸 (1-phenazinecarboxylic acid, **1**)、1-甲氧基吩嗪 (1-methoxyphenazine, **2**)、*N*-methyl-1*H*-indole-2-carboxamide (**3**)、甲基硫赭曲菌素 (monomethylsulochrin, **4**)、ditryptophenaline (**5**)、7,8-二甲基异咯嗪 (lumichrome, **6**)、deoxyleporin B (**7**)、尿嘧啶 (uracil, **8**) 和胸腺嘧啶 (thymine, **9**), 结构见图 1。其中化合物 **7** 为新的天然产物。体外细胞毒性测定表明,化合物 **3** 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖具有一定的抑制活性。对化合物 **3** 进行了初步的作用机制研究,结果发现,化合物 **3** 能诱导 SMMC-7721 细胞凋亡,其增殖抑制作用与 S 期细胞周期阻滞相关,并受到 p27 蛋白的调控。

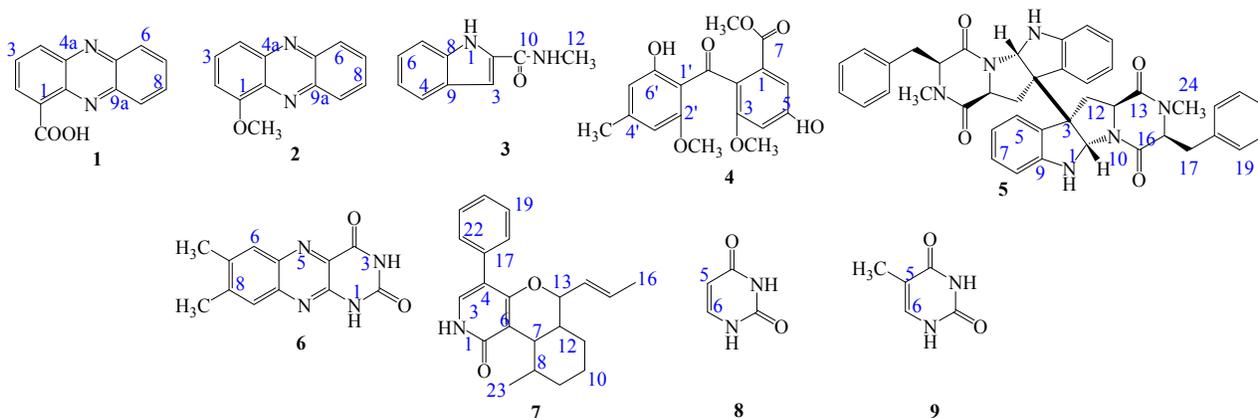


图 1 化合物 1~9 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—9

1 仪器与材料

AVANCE 600 型核磁共振仪; maXis 超高分辨飞行时间质谱仪; Hitachi U-3900 紫外分光光度计; Eppendorf 722 型紫外分光光度计; Agilent 1260 高效液相色谱仪; P200 II 高效液相色谱仪; Sinochrom ODS-AP 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Thermo Series IICO₂ 细胞培养箱; Eppendorf 5475R 超速低温离心机; SW-CJ-1F 超净工作台; Bio-Tek ELX800 多功能酶标仪; QILINBEIER 摇床; Eppendorf centrifuge 5415D 离心机; BD FACSCalibur 流式细胞仪; Bio-Rad JY-ZY5 Western blot 电泳仪等。

人肝癌细胞株 SMMC-7721, 由本实验室保存; 柱色谱硅胶 (200~300 目), 青岛海洋化工厂分厂; 薄层色谱硅胶 (GF₂₅₄), 青岛海浪硅胶干燥厂; Sephadex LH-20, 瑞典 Pharmacia Biotech; 色谱纯

甲醇, TEDIA 公司; 氘代三氯甲烷和二甲基亚砜 (DMSO), Aldrich 公司; 氘代甲醇, Cambridge Isotope Laboratories; RPMI 1640 培养基, GIBCO 公司; 胰蛋白酶, Solarbio 公司; 新生牛血清, 上海洛神生物技术有限公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 和 DMSO, Amresco 公司; 顺铂, 江苏豪森药业股份有限公司; 碘化丙锭 (PI), 上海江莱生物有限公司; 兔抗人 p27、Cleaved-PARP 单克隆抗体, Cell Signaling 公司; 羊抗人-actin 单克隆抗体, Santa Cruz 公司; 山羊抗兔 IgG 抗体, 北京博士德公司; 脱脂奶粉, 北京普利莱公司; 蛋白质 Marker, Ferments 公司; Kodak X-感光片, 柯达公司; ECL 化学发光试剂, 北京普利莱公司; 显影粉、定影粉, 天津市世纪奥博商贸有限公司; 其余试剂均为分析纯。

菌株 LLY 是从海南山麻黄茎中分离得到的一

株内生真菌, 南京大学宋勇春博士根据其形态特征鉴定为 *Myrothecium roridum*, 该菌株现保存在南京大学功能生物分子研究所。

2 方法

2.1 固体发酵产物的提取与分离

M. roridum LLY 采用固体发酵法^[4]进行发酵。固体发酵产物粉碎、晒干后, 采用三氯甲烷-甲醇混合溶剂浸提3次(3×10 L), 减压去除溶剂得粗浸膏52 g。粗浸膏经硅胶柱色谱进行粗分, 三氯甲烷-甲醇(100:0、100:1、100:2、100:4、100:8、100:16、0:100)梯度洗脱得到7个组分Fr. 1~7。

Fr. 1 (2.0 g) 经硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮梯度洗脱, 得到组分Fr. 1-3和Fr. 1-4。Fr. 1-3经Sephadex LH-20凝胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇1:1)及HPLC进一步纯化得到0.6 mg化合物1(甲醇-水42:58; 1.0 mL/min)和0.6 mg化合物2(甲醇-水5:5, 1.0 mL/min)。Fr. 1-4经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮梯度洗脱)分离、再经Sephadex LH-20凝胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇1:1)分离得到Fr. 1-4-2-2; Fr. 1-4-2-2经HPLC(甲醇-水72:28, 0.8 mL/min)进一步纯化得到化合物7(0.7 mg)。Fr. 2 (6.8 g) 经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮梯度)得到的组分Fr. 2-3, 经2次Sephadex LH-20凝胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇1:1)分离得到Fr. 2-3-3-1和Fr. 2-3-3-2。Fr. 2-3-3-1经硅胶(三氯甲烷-甲醇梯度洗脱)、Sephadex LH-20凝胶(三氯甲烷-甲醇1:1)等柱色谱及HPLC进一步分离纯化得到化合物4(甲醇-水7:3, 1.0 mL/min, 7.9 mg)和5(甲醇-水6:4, 0.8 mL/min, 2.7 mg)。Fr. 2-3-3-2经HPLC纯化得到13 mg化合物3(甲醇-水5:5, 0.8 mL/min)。Fr. 3 (2.0 g) 经硅胶柱色谱得到组分Fr. 3-3, 经HPLC分离纯化(甲醇-水3:7, 1.0 mL/min)得到化合物6(2.3 mg)。Fr. 4 (2.3 g) 经硅胶柱色谱, 三氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 得到的组分Fr. 4-4, 再经HPLC分离纯化(甲醇-水2:8, 1.0 mL/min)得到化合物8(11.8 mg)和9(16.8 mg)。

2.2 MTT 法检测化合物体外细胞毒活性

SMMC-7721 细胞株在含10%新生牛血清的RPMI 1640培养液中, 于37℃、5% CO₂的CO₂培养箱内培养至对数生长期。收集对数生长期的SMMC-7721细胞, 以1×10⁴个细胞/孔接种于96孔板, 常规贴壁培养24 h后, 实验组分别加入2 μL待测化合物(少量DMSO助溶, DMSO终浓度

0.2%), 阴性对照组和空白组分别加入等体积DMSO和培养液。培养48 h后, 每孔加入20 μL MTT, 继续培育4 h。然后弃去培养液, 每孔滴加150 μL DMSO, 37℃振荡10 min, 使结晶充分溶解, 酶标仪在波长490 nm处测定各孔吸光度值。计算IC₅₀值。

2.3 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期肿瘤细胞接种在6孔板中, 在37℃、5% CO₂培养箱内培养12 h。然后每孔分别加入等量的不同质量浓度(0.01、0.1、1、2、10 μg/mL)化合物, 干预24 h。收集细胞, 用预冷的70%乙醇固定细胞, 4℃保存过夜, 至少固定18 h。上机测试前, 2400 r/min离心10 min除去乙醇, 将细胞重悬于0.4 mL碘化丙啶染液中(其中含RNaseA), 37℃保温30 min(碘化丙啶染液终浓度为50 μg/mL, RNaseA终质量浓度为20 μg/mL), 然后用400目网筛滤过。最后, 进行流式分析, 应用ModFit LT3.0软件分析细胞周期中各期细胞所占总细胞的百分率。

2.4 Western blotting 法检测蛋白表达

分组与给药同“2.3”项。取加药处理后的细胞, 弃去培养液, 以预冷的PBS洗涤2次, 加入相应体积的1×SDS蛋白裂解液, 冰上放置30 min。以刮棒刮下细胞, 沸水浴10 min, 然后4℃, 12000 r/min离心10 min。取上清, 用改良Lowry法进行蛋白定量。调整样品蛋白质浓度使其相等, 保证每个样品孔蛋白上样量一致。蛋白质经SDS-PAGE后, 转移至PVDF膜上。PVDF膜以5%脱脂奶粉封闭4 h后, 加入一抗过夜。经洗涤后, 再加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温下反应3~4 h。每步反应结束均用PBST洗涤3次, 每次10 min。最后用ECL化学发光, 经曝光、显影、定影后, 胶片晾干保存, 扫描后用Image J软件进行图像定量分析。

2.5 统计分析方法

应用SPSS17.0进行单因素方差分析, 组间差异用SNK法比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物1: 淡黄色针状结晶(三氯甲烷-甲醇), 分子式C₁₃H₈N₂O₂, HR-ESI-MS: m/z 225.065 5 [M+H]⁺, 247.047 5 [M+Na]⁺ (C₁₃H₈N₂O₂Na, 计算值247.048 3), 471.106 [2M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.21 (2H, m, H-6, 9), 7.99 (1H, dd, $J =$

8.4, 1.2 Hz, H-2), 7.92 (2H, m, H-7, 8), 7.81 (1H, dd, $J = 9.0$, 6.6 Hz, H-3), 7.55 (1H, dd, $J = 6.6$, 1.2 Hz, H-4)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 故鉴定化合物 **1** 为吩嗪-1-羧酸。

化合物 **2**: 淡黄色针状结晶 (三氯甲烷-甲醇), 分子式 $C_{13}H_{10}N_2O$, HR-ESI-MS m/z : 211.086 1 $[M+H]^+$ ($C_{13}H_{11}N_2O$, 计算值 211.087 1), 233.068 1 $[M+Na]^+$, 443.148 3 $[2M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.42 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-9), 8.25 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.85 (3H, m, H-4, 7, 8), 7.77 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-3), 7.10 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2), 4.20 (3H, s, 1-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 155.3 (C-1), 144.4 (C-4a), 143.6 (C-5a), 142.3 (C-9a), 137.0 (C-10a), 130.9 (C-7), 130.6 (C-3), 130.3 (C-8), 130.2 (C-9), 129.4 (C-6), 121.6 (C-4), 106.5 (C-2), 56.6 (1-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[6-7], 故鉴定化合物 **2** 为 1-甲氧基吩嗪。

化合物 **3**: 白色针状结晶 (甲醇), 分子式 $C_{10}H_{10}N_2O$ 。HR-ESI-MS m/z : 175.086 8 $[M+H]^+$ ($C_{10}H_{11}N_2O$, 计算值 175.087 1), 197.068 6 $[M+Na]^+$, 371.148 7 $[2M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.55 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4), 7.40 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7), 7.17 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-6), 7.02 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5), 6.97 (1H, s, H-3), 2.90 (3H, s, H-12); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 164.1 (C-10), 137.5 (C-8), 131.5 (C-2), 128.3 (C-9), 124.2 (C-6), 121.9 (C-4), 120.4 (C-5), 112.3 (C-7), 103.8 (C-3), 25.7 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为 *N*-methyl-1*H*-indole-2-carboxamide。

化合物 **4**: 白色粉末, 分子式 $C_{18}H_{18}O_7$ 。HR-ESI-MS m/z : 369.094 9 $[M+Na]^+$ ($C_{18}H_{18}O_7Na$, 计算值 369.090 5), 715.199 1 $[2M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.99 (1H, s, 2'-OH), 7.03 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.62 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4), 6.46 (1H, s, H-3'), 6.06 (1H, s, H-5'), 3.71 (3H, s, 3-OCH₃), 3.69 (3H, s, 7-OCH₃), 3.37 (3H, s, 6'-OCH₃), 2.29 (3H, s, 4'-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **4** 为甲基硫赭曲菌素。

化合物 **5**: 淡黄色粉末, 分子式 $C_{42}H_{40}N_6O_4$ 。HR-ESI-MS m/z : 693.317 8 $[M+H]^+$, 715.299 9 $[M+Na]^+$ ($C_{42}H_{40}N_6O_4Na$, 计算值 715.300 9), 731.273 9 $[M+K]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.61 (4H, t, $J = 7.2$ Hz, H-20, 20', 22, 22'), 7.54 (2H, t, $J = 7.2$

Hz, H-21, 21'), 7.22 (4H, d, $J = 7.8$ Hz, H-19, 19', 23, 23'), 7.09 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-7, 7'), 7.02 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5, 5'), 6.71 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6, 6'), 6.62 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8, 8'), 5.07 (2H, s, H-2, 2'), 4.45 (2H, brs, H-15, 15'), 3.70 (2H, dd, $J = 10.8$, 4.8 Hz, H-11, 11'), 3.55 (2H, d, $J = 13.8$ Hz, H-17a, 17'a), 3.36 (2H, overlapped, H-17b, 17'b), 3.09 (6H, s, H-24, 24'), 1.95 (2H, dd, $J = 12.0$, 4.8 Hz, H-12a, 12'a), 1.53 (2H, t, $J = 12.0$ Hz, H-12b, 12'b); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.7 (C-13, 13'), 165.6 (C-16, 16'), 152.7 (C-9, 9'), 136.1 (C-18, 18'), 130.7 (C-7, 7'), 130.51 (C-20, 20', 22, 22'), 130.49 (C-19, 19', 23, 23'), 129.2 (C-21, 21'), 127.8 (C-4, 4'), 126.5 (C-5, 5'), 119.2 (C-6, 6'), 110.3 (C-8, 8'), 79.9 (C-2, 2'), 64.4 (C-15, 15'), 60.5 (C-3, 3'), 59.7 (C-11, 11'), 37.5 (C-12, 12'), 37.0 (C-17, 17'), 33.2 (C-24, 24')。以上数据与文献报道基本一致^[10-12], 故鉴定化合物 **5** 为 ditryptophenaline。

化合物 **6**: 淡黄色粉末, 分子式 $C_{12}H_{10}N_4O_2$ 。HR-ESI-MS m/z : 265.069 $[M+Na]^+$ ($C_{12}H_{10}N_4O_2Na$, 计算值 265.070 1) 和 507.150 1 $[2M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.84 (1H, s, 3-NH), 11.67 (1H, s, 1-NH), 7.92 (1H, s, H-9), 7.71 (1H, s, H-6), 2.49 (3H, s, 7-CH₃), 2.47 (3H, s, 8-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **6** 为 7,8-二甲基异咯嗪。

化合物 **7**: 白色粉末, 分子式为 $C_{22}H_{25}NO_2$ 。HR-ESI-MS: m/z 336.195 6 $[M+H]^+$ ($C_{22}H_{26}NO_2$, 计算值 336.196 4), 358.177 5 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.22 (H, s, 2-NH), 7.41 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-18, 22), 7.36 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-19, 21), 7.31 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-20), 7.16 (1H, s, H-3), 5.74 (1H, m, H-15), 5.38 (1H, m, H-14), 4.85 (1H, dd, $J = 11.4$, 8.4 Hz, H-13), 2.78 (1H, dd, $J = 10.8$, 3.6 Hz, H-7), 1.79~1.76 (3H, m, H-12, 11, 9), 1.73 (3H, dd, $J = 6.0$, 0.6 Hz, H-16), 1.61 (2H, m, H-8, 11), 1.54 (1H, m, H-10), 1.42 (1H, m, H-10), 1.29 (1H, m, H-9), 1.01 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-23); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 164.4 (C-1), 160.3 (C-5), 134.4 (C-17), 131.0 (C-3), 130.8 (C-15), 129.5 (C-14), 129.1 (C-18, 22), 128.1 (C-19, 21), 127.0 (C-20), 115.2 (C-6), 111.6 (C-4), 78.1 (C-13), 37.1 (C-7), 36.0 (C-12), 35.9 (C-8), 35.2 (C-9), 26.5 (C-11), 20.9 (C-10), 20.5 (C-23),

17.8 (C-16)。以上数据与文献报道基本一致^[14-15]，故鉴定化合物 **7** 为 deoxyleporin B。

化合物 **8**：白色粉末，分子式为 C₄H₄N₂O₂。HR-ESI-MS *m/z*: 113.036 8 [M+H]⁺, 135.018 0 [M+Na]⁺ (C₄H₄N₂O₂Na, 计算值 135.017 0) 和 247.042 2 [2M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.39 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-6), 5.62 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-5)。以上数据与文献报道基本一致^[16]，故鉴定化合物 **8** 为尿嘧啶。

化合物 **9**：白色粉末，分子式为 C₅H₆N₂O₂。HR-ESI-MS *m/z*: 127.050 6 [M+H]⁺, 149.032 [M+Na]⁺ (C₅H₆N₂O₂Na, 计算值 149.032 7) 和 275.074 8 [2M+Na]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.0 (1H, s, H-3), 10.6 (1H, s, H-1), 7.25 (1H, s, H-6), 1.72 (3H, s, 5-CH₃)；¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 167.5 (C-4), 153.8 (C-2), 139.2 (C-6), 110.5 (C-5), 12.2 (5-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[16]，故鉴定化合物 **9** 为胸腺嘧啶。

3.2 化合物的体外细胞毒活性

采用 MTT 法对化合物进行体外细胞毒活性测定，结果发现，化合物 **3** 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 具有较强的细胞毒活性，其 IC₅₀ 值为 38.0 μg/mL，阳性对照顺铂的 IC₅₀ 值为 11.5 μg/mL。

3.3 化合物 **3** 对 SMMC-7721 细胞的细胞周期的影响

细胞增殖受细胞周期的精密调控，为探讨化合物 **3** 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用是否与细胞周期阻滞相关，采用一定质量浓度 (0.01、0.1、1、2 和 10 μg/mL) 的化合物 **3** 处理 SMMC-7721 细胞 24 h，然后收集细胞，经乙醇固定、PI 染色，然后进行细胞周期分析。结果发现，化合物 **3** 干预后，SMMC-7721 细胞的 S 期细胞比例由阴性对照 (NC) 的 24.33% 分别增加至 27.35%、25.33%、25.88%、26.77% 和 28.93%。这表明化合物 **3** 可导致 SMMC-7721 细胞的 S 期细胞增多，即 S 期细胞周期阻滞，但该阻滞作用较弱 (图 2)。

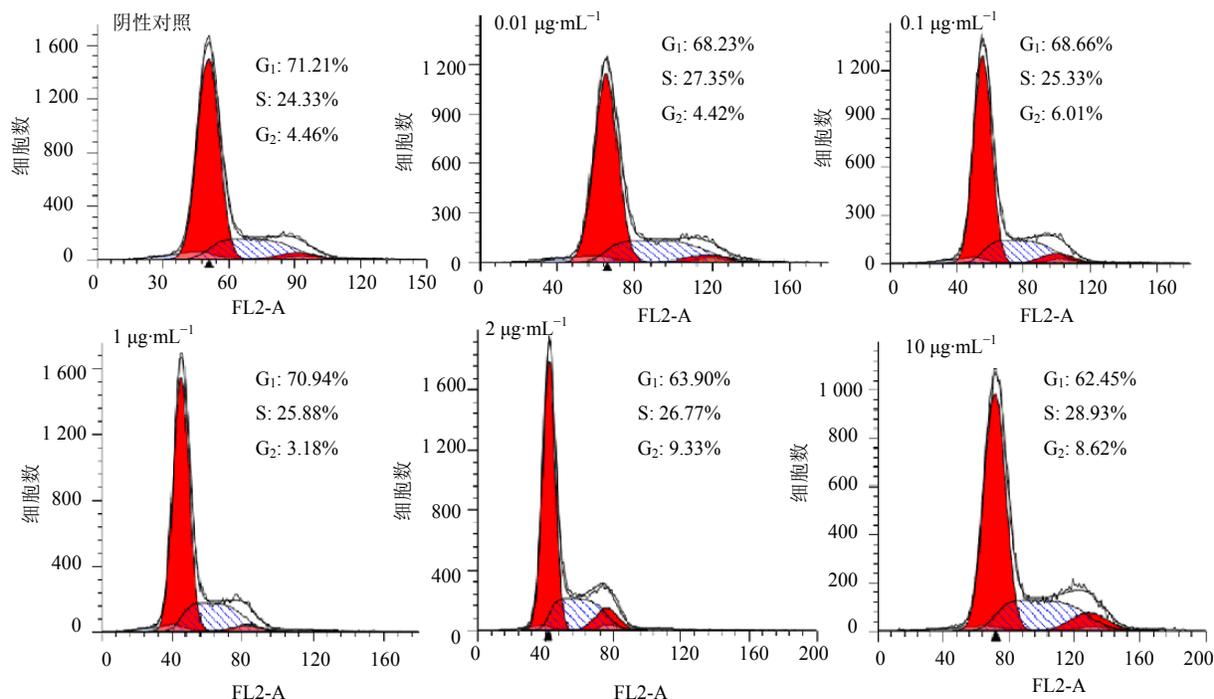


图 2 化合物 **3** 对 SMMC-7721 细胞周期的影响

Fig. 2 Effect of compound **3** on cell cycle of SMMC-7721 cells

3.4 化合物 **3** 对 SMMC-7721 细胞的细胞周期负调控蛋白 p27 的影响

细胞增殖受细胞周期的精密调控，而 p27 是一种重要的细胞周期负调控蛋白^[17]。为探讨化合物 **3** 诱导 SMMC-7721 细胞周期阻滞机制，本实验采用一定浓度 (0.01、0.1、1、2 和 10 μg/mL) 的化合物

3 处理 SMMC-7721 细胞，24 h 后收集细胞蛋白，采用 Western blotting 分析 p27 蛋白的量，以未加药孔蛋白作阴性对照，β-actin 为内参。结果发现，化合物 **3** 处理后，SMMC-7721 细胞中 p27 蛋白表达均明显增加，分别为阴性对照的 1.10、1.16、1.27、1.22 和 1.24 倍 (图 3)，这提示化合物 **3** 可能通过

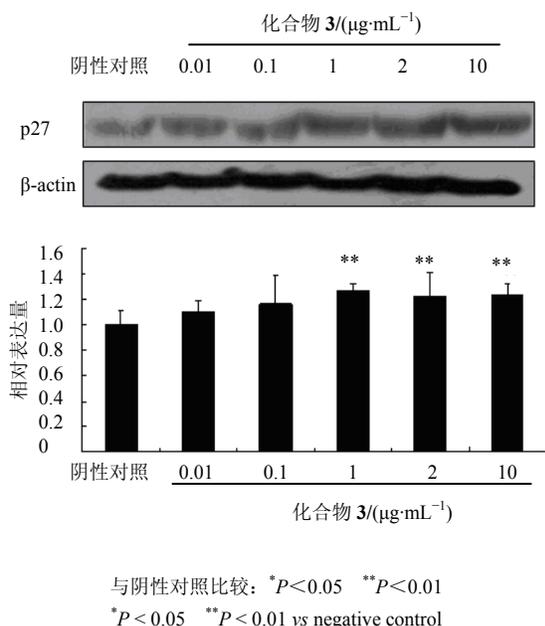


图 3 化合物 3 对 SMMC-7721 细胞中 p27 蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of compound 3 on expression of protein p27 in SMMC-7721 cells

上调 p27 蛋白的表达而诱导 SMMC-7721 细胞的 S 期阻滞。

3.5 化合物 3 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

研究表明, 细胞凋亡对细胞的增殖有负调控作用。裂解的 PARP 通常作为凋亡的标志, 因此, 通过检测裂解的 PARP 蛋白是否被活化, 可以确定化合物是否具有诱导肿瘤细胞凋亡作用。采用一定浓度 (0.01、0.1、1、2 和 10 µg/mL) 的化合物 3 处理 SMMC-7721 细胞, 24 h 后收集细胞蛋白, 用 Western blotting 分析 Cleaved-PARP 蛋白的表达。结果发现, 化合物 3 作用后 SMMC-7721 细胞的 Cleaved-PARP 蛋白被明显活化, 说明化合物 3 可以诱导 SMMC-7721 细胞凋亡 (图 4)。

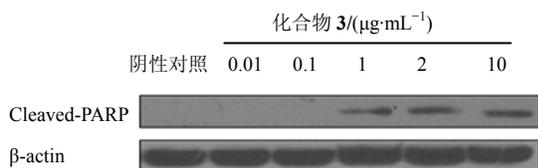


图 4 化合物 3 对 SMMC-7721 细胞中 Cleaved-PARP 的影响
Fig. 4 Effect of compound 3 on Cleaved-PARP in SMMC-7721 cells

4 结论

植物内生菌广泛存在于植物体内, 与宿主植物互惠共生、协同进化, 其次生代谢产物具有结构多

样性和生物学功能多样性的特点^[1], 能够成为新药先导化合物的重要来源。本研究从山麻黄内生真菌 *M. roridum* LLY 固体发酵产物中分离获得 8 个生物碱和 1 个二苯酮化合物, 其中化合物 7 为新的天然产物。文献表明, 化合物 1 具有较强的抗蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 活性 (MICs < 0.5 µg/mL)^[5]; 化合物 4 具有较强的抗幽门螺旋杆菌 *Helicobacter pylori* 的活性 (MICs = 10 µg/mL)^[9]; 化合物 5 是一种神经递质抑制剂^[18]。本实验采用 MTT 法测定了化合物的体外细胞毒活性, 结果表明, 化合物 3 对 SMMC-7721 细胞具有较强的细胞毒活性 (IC₅₀ 值为 38.0 µg/mL)。进一步细胞周期分析发现, 化合物 3 可导致 SMMC-7721 细胞 S 期阻滞; Western blotting 分析发现, 化合物 3 作用后, SMMC-7721 细胞中 p27 蛋白的表达上调, 并且 Cleaved-PARP 蛋白被明显活化。这说明, 化合物 3 能诱导 SMMC-7721 细胞凋亡; 其对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用与 S 期细胞周期阻滞相关, 并受到 p27 蛋白的调控, 其作用机制有待进一步深入研究。上述研究表明, 山麻黄内生真菌 *M. roridum* LLY 固体发酵代谢产物具有丰富的结构多样性和药理活性多样性, 能够为进一步药理活性研究提供化合物来源。

参考文献

- [1] 戈惠明, 谭仁祥. 共生菌——新活性天然产物的重要来源 [J]. 化学进展, 2009, 21(1): 30-46.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [3] 张玲琪, 王海昆, 邵华, 等. 美登木内生真菌产抗癌物质球毛壳甲素的分离及鉴定 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(3): 172-175.
- [4] Shen L, Jiao R H, Ye Y H, et al. Absolute configuration of new cytotoxic and other bioactive trichothecene macrolides [J]. *Chem Eur J*, 2006, 12(21): 5596-5602.
- [5] Jayatilake G S, Thornton M P, Leonard A C, et al. Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas Aeruginosa* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(3): 293-296.
- [6] Conda-Sheridan M, Marler L, Park E J, et al. Potential chemopreventive agents based on the structure of the lead compound 2-bromo-1-hydroxyphenazine, isolated from *Streptomyces* species, strain CNS284 [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(24): 8688-8699.
- [7] Breitmaier E, Hollstein U. Carbon-13 nuclear magnetic

- resonance chemical shifts of substituted phenazines [J]. *J Org Chem*, 1976, 41(12): 2014-2018.
- [8] Manriquez V, Galdamez A, Vellz B, *et al.* *N*-methyl-1*H*-indole-2-carboxamine from the marine fungus *Cladosporium cladosporioides* [J]. *J Chilean Chem Soc*, 2009, 54(3): 314-316.
- [9] Ma Y M, Li Y, Liu J Y, *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(5): 451-456.
- [10] Movassaghi M, Schmidt M A, Ashenhurst J A. Concise total synthesis of (+)-WIN 64821 and (-)-ditryptophenaline [J]. *Angew Chemie*, 2008, 47(8): 1485-1487.
- [11] Lin A Q, Du L, Fang Y C, *et al.* *Iso- α* -cyclopiazonic acid, a new natural product isolated from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus* C-F-3 [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45(5): 677-680.
- [12] Maes C M, Potgieter M, Steyn P S. NMR assignments, conformation, and absolute configuration of ditryptophenaline and model dioxopiperazines [J]. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1986: 861-866.
- [13] 杨立宏, 金向群, 张 薇. 中华大蟾蜍皮化学成分研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(4): 292-295.
- [14] Snider B B, Lu Q. Total synthesis of (\pm)-leporin A [J]. *J Org Chem*, 1996, 61(8): 2839-2844.
- [15] Zhang C W, Jin L, Mondie B, *et al.* Leporin B: A novel hexokinase II gene inducing agent from an unidentified fungus [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(8): 1433-1435.
- [16] Pretsch E, Buhlmann P, Affolter C. 波谱数据表——有机化合物的结构解析 [M]. 荣国斌译. 上海: 华东理工大学出版社, 2002.
- [17] Hartwell L H, Weinert T A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events [J]. *Science*, 1989, 246(4930): 629-634.
- [18] Barrow C J, Sedlock D M. 1'-(2-Phenyl-ethylene)-ditryptophenaline, a new dimeric diketopiperazine from *Aspergillus flavus* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(9): 1239-1244.