

• 化学成分 •

紫玉盘内生真菌节菱孢中 1 个新的异香豆素类化合物

李浩华¹, 周燕燕^{1,2}, 陈玉婵¹, 孙章华¹, 严寒静², 郭晓玲², 章卫民^{1*}

1. 广东省微生物研究所 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070

2. 广东药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究紫玉盘内生真菌节菱孢 *Arthrinium* sp. A092 发酵菌丝体的化学成分。方法 采用硅胶柱、凝胶柱、HPLC 等色谱技术进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据进行化合物结构鉴定; 以肝癌细胞 HepG-2、乳腺癌细胞 MCF-7、大细胞肺癌细胞 NCI-H460 和神经胶质瘤细胞 SF-268 为供试细胞株, 采用 SRB 法对化合物进行细胞毒活性测试。结果 从节菱孢菌丝体中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为 3,4,5-trimethyl-6-methoxy-8-hydroxyisocoumarin (1)、decarboxycitrinone (2)、4-hydroxy-17R-methylcisterol (3)、3-甲氧基-4-羟基苯甲酸 (4)、邻苯二甲酸二丁酯 (5)、flemingipanic acid (6)、吲哚-3-羧酸 (7)、过氧化麦角甾醇 (8)、对羟基苯甲酸 (9)、4-羟基苯甲醛 (10); 化合物 3 对 SF-268 和 MCF-7 的 IC₅₀ 值分别为 63.8 和 57.2 μmol/L, 化合物 8 对 SF-268、MCF-7 和 NCI-H460 的 IC₅₀ 值分别为 50.6、32.3、39.0 μmol/L。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为节菱孢异香豆素 A, 化合物 3~5、7~10 均为首次从该属真菌中分离得到; 化合物 3 和 8 具有一定的细胞毒活性。

关键词: 紫玉盘; 内生真菌; 节菱孢; 节菱孢异香豆素 A; 邻苯二甲酸二丁酯; 过氧化麦角甾醇; 4-羟基苯甲醛; 细胞毒活性
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)03-0369-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.002

A new isocoumarin isolated from endophytic fungus *Arthrinium* sp. A092 derived from medicinal plant *Uvaria microcarpa*LI Hao-hua¹, ZHOU Yan-yan^{1,2}, CHEN Yu-chan¹, SUN Zhang-hua¹, YAN Han-jing², GUO Xiao-ling², ZHANG Wei-min¹

1. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in fermented mycelium of endophytic fungus *Arthrinium* sp. A092 from *Uvaria microcarpa*. **Methods** The compounds were isolated and purified by chromatography on silica gel, Sephadex-LH20 columns, HPLC, and so on. Their structures were identified on the basis of physicochemical properties and spectroscopic data. All compounds were tested for their cytotoxic activities against four tumor cell lines HepG-2, MCF-7, NCI-H460, and SF-268. **Results** Ten compounds were isolated from the mycelial extract and identified as 3,4,5-trimethyl-6-methoxy-8-hydroxyisocoumarin (1), decarboxycitrinone (2), 4-hydroxy-17R-methylcisterol (3), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (4), dibutyl phthalate (5), flemingipanic acid (6), indole-3-carboxy acid (7), ergosterol peroxide (8), *p*-hydroxybenzoic acid (9), and 4-hydroxybenzal-dehyde (10). Compounds 3 exhibited the inhibitory activity against SF-268 and MCF-7 with IC₅₀ values of 63.8 and 57.2 μmol/L, respectively. Compounds 8 exhibited the inhibitory activity against SF-268, MCF-7, and NCI-H460 with IC₅₀ values of 50.6, 32.3, and 39.0 μmol/L, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new compound named arthrinisocoumarin A. Compounds 3—5 and 7—10 are isolated from the fungus of *Arthrinium* sp.

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 国家“973”前期专项(2014CB460613); 广东省自然科学基金项目(S2012010009773)

作者简介: 李浩华, 助理研究员, 从事药用微生物资源及其活性物质研究。Tel: (020)87137599 E-mail: hhli100@126.com

*通信作者 章卫民 Tel: (020)87688309 E-mail: wmzhang58@qq.com

for the first time. Compounds **3** and **8** show the moderated cytotoxic activities against SF-268, MCF-7, and NCI-H460.

Key words: *Uvaria microcarpa* Champ. ex Benth.; endophytic fungus; *Arthrinium* sp.; arthrinisocoumarin A; dibutyl phthalate; ergosterol peroxide; 4-hydroxybenzal-dehyde; cytotoxic activities

植物内生真菌能够产生结构丰富多样的次生代谢产物, 已从中分离出多种生物活性物质, 包括抗菌、抗肿瘤、抗氧化等天然化合物^[1-2]。因此, 植物内生真菌是发现新天然活性物质的重要资源。紫玉盘 *Uvaria microcarpa* Champ. ex Benth. 为番荔枝科 (Annonaceae) 紫玉盘属 *Uvaria* Linn. 植物, 具有祛风除湿、行气健胃、止痛、止咳化痰之功效, 其内生真菌具有较大的研究价值。目前对紫玉盘的研究主要集中在紫玉盘番荔枝内酯的提取分离和抗肿瘤活性方面, 关于紫玉盘内生真菌代谢产物方面的报道较少。本课题组前期对采集自广东省鼎湖山自然保护区药用植物紫玉盘的内生真菌进行了活性筛选, 发现菌株节菱孢 *Arthrinium* sp. A092 发酵液的醋酸乙酯萃取物对人乳腺癌细胞 MCF-7 具有明显的细胞毒活性, 因此, 本课题组对该菌株进行发酵培养和分离纯化, 从发酵液粗提物中分离得到 10 个化合物, 但经活性测试均无细胞毒活性^[3]。为了发掘该菌株的活性代谢产物, 本实验进一步对其发酵菌丝体提取物进行分离纯化, 从中分离获得 10 个化合物, 分别鉴定为 3,4,5-trimethyl-6-methoxy-8-hydroxyisocoumarin (**1**)、decarboxycitrinone (**2**)、4-hydroxy-17R-methylincisterol (**3**)、3-甲氧基-4-羟基苯甲酸 (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, **4**)、邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate, **5**)、flemingipanic acid (**6**)、吲哚-3-羧酸 (indole-3-carboxy acid, **7**)、过氧化麦角甾醇 (ergosterol peroxide, **8**)、对羟基苯甲酸 (p-hydroxybenzoic acid, **9**)、4-羟基苯甲醛 (4-hydroxy-benzaldehyde, **10**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 命名为节菱孢异香豆素 A。化合物 **3**~**5**、**7**~**10** 均为首次从该属真菌中发现。

1 仪器与材料

AVANCE III 型 500 MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司; API 2000 LC/MS 质谱仪, MDS SCIEX 公司; LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; ZF-6 型三用紫外线分析仪, 上海嘉鹏科技有限公司; Hangping FA2004N 型电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; PZ1000B 旋转式大容量普通摇床, 武汉瑞华仪器设备有限公司; RE-2000 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 超净工作台, 上海恒益

科技有限公司; 柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目), 青岛海洋化工厂; GF₂₅₄ 高效薄层硅胶板, Merck 公司; C₁₈ 反相硅胶 (40~75 μm), Fuji Silysia Chemical Ltd.; 凝胶 Sephadex LH-20 (18~110 μm), Amersham Biosciences Ltd.; 有机溶剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

2 菌种与发酵培养

菌株 A092 从采自鼎湖山自然保护区的紫玉盘叶中分离得到, 菌株 A092 由本课题组经形态学分析和 ITS 序列测定鉴定为节菱孢 *Arthrinium* sp. (GenBank 登陆号为 KJ767257)^[3]。紫玉盘由广东药学院中药学院严寒静副教授鉴定为紫玉盘 *Uvaria microcarpa* Champ. ex Benth.; 菌株保存于广东省微生物研究所。发酵培养基为马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、KH₂PO₄ 3 g/L、MgSO₄ 1.5 g/L、维生素 B₁ 10 mg/L, pH 自然。将活化后的菌株 A092 挑取适量菌丝体接种至含 250 mL 培养液的 500 mL 三角瓶中, 28 °C、120 r/min 摇床培养 4 d, 获得种子液, 将种子液按 10% 转接到装有 250 mL 培养液的 500 mL 锥形瓶中, 培养条件与种子液相同, 培养 7 d, 共发酵 170 L。

3 提取与分离

发酵产物经滤过得菌丝体, 菌丝体用适量甲醇浸提, 浸提液减压浓缩, 得菌丝体甲醇粗提物。甲醇粗提物加适量水溶解, 用适量醋酸乙酯萃取至萃取液无色, 减压浓缩得提取物浸膏 27.9 g。浸膏过硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (50:1→1:2) 和二氯甲烷-甲醇 (5:1→1:2) 梯度洗脱, 分段收集, 用薄层色谱检测, 合并相似组分, 得 20 个组分 (J1~J20)。J4 经 Sephadex LH-20, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱得到组分 J4-1~J4-5, J4-1 分别经正相硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 7:1)、反相硅胶柱色谱 (甲醇-水 40:60) 得到化合物 **4** (23.2 mg); J4-3 经反相硅胶柱色谱 (甲醇-水 80:20) 得到化合物 **1** (1.0 mg); J4-5 经反相硅胶柱色谱 (甲醇-水 70:30→90:10) 得到化合物 **5** (1.3 mg)。J5 经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱得到 J5-1~J5-4, J5-2 经反相硅胶柱色谱 (甲醇-水 30:70) 得到化合物 **6** (17.4 mg); J5-4 经制备薄层色谱得化合物 **3** (20.6 mg)。经 TLC 检测, 合并 J10、

J11 后,先后经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)、反相硅胶色谱柱(20:80→60:40)得到化合物 2 (7.5 mg)。J12 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1)、反相硅胶柱色谱(20:80→60:40)得到化合物 10 (3.0 mg)。J14 经 Sephadex LH-20,以二氯甲烷-甲醇(1:1)、反相硅胶柱色谱(甲醇-水 20:80)、Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱得化合物 8 (16.1 mg)。J15 经 Sephadex LH-20 以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱得化合物 9 (13.0 mg)。J16 经 Sephadex LH-20,以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱,合并相似组分得到 J16-3, J16-3 过反相硅胶柱色谱(甲醇-水 20:80→70:30)得到化合物 7 (2.1 mg)。

4 结构鉴定

化合物 1: 白色固体(氯仿), 254 nm 紫外光下显蓝色斑点, 碘蒸气显黄色。高分辨质谱 HR-ESI-MS m/z : 235.097 8 $[M+H]^+$ (理论值为 235.097 0), 结合核磁共振谱数据(表 1)推测该化合物分子式为 $C_{13}H_{14}O_4$, 不饱和度为 7。 1H -NMR 数据显示该化合物在低场区有 1 个活泼氢 δ_H 11.97 (1H, s)、1 个不饱和氢 δ_H 6.52 (1H, s) 和 1 个甲氧基 δ_H 3.89 (s, 3H), 在高场区有明显的 3 个甲基信号 δ_H 2.36 (3H, s), 2.30 (3H, d, $J=0.9$ Hz) 和 2.27 (3H, d, $J=0.9$ Hz)。 ^{13}C -NMR 结合 HSQC 图谱显示 13 个碳信号: 1 个羰基碳 (δ_C 167.0)、8 个不饱和双键碳 (δ_C 165.4, 162.7, 149.3, 138.5, 112.6, 110.1, 100.3, 97.6)、1 个甲氧基碳 (δ_C 55.9) 和 3 个甲基碳 (δ_C

17.9, 17.7, 13.7)。上述官能团总共不饱和度为 5 (1 个羰基和 4 个双键), 表明化合物 1 必须是双环结构。以上波谱数据与已知的异香豆素类化合物 acremonone $H^{[4]}$ 比较相似, 不同的地方是化合物 1 在 C-3 位置的糖单元被 1 个甲基取代。HMBC 谱图(图 1)进一步验证了上述推断: 从 δ_H 2.27 (H_3 -11) 和 2.30 (H_3 -12) 都有到 δ_C 149.3 (C-3) 与 110.1 (C-4) 的强相关信号, 确定了 2 个烯甲基在异香豆素母核的位置; 从 δ_H 11.97 (OH) 到 δ_C 97.6 (C-8) 和 162.7 (C-9) 的相关, δ_C 3.89 (-OCH₃) 到 C-7 的相关, δ_H 2.36 (H_3 -13) 到 δ_C 138.5 (C-5), 112.6 (C-6) 和 165.4 (C-7) 的相关确定了羟基、甲氧基和最后 1 个甲基的取代位置分别在 C-9、C-7 和 C-6, 再根据从 δ_H 6.52 (H-8) 到 112.6 (C-6) 和 100.3 (C-10) 的相关, 最终确定了 C-9、C-7 和 C-6 的相对位置。因此化合物 1 的化学结构得到确定, 为 3,4,6-trimethyl-7-methoxy-9-hydroxyisocoumarin。经 Scifinder 数据库检索为 1 个新化合物, 命名为节菱孢异香豆素 A。

化合物 2: 白色固体(甲醇), ESI-MS m/z : 221 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{12}H_{12}O_4$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.39 (1H, s, H-7), 2.37 (3H, s, H-13), 2.32 (3H, s, H-12), 2.26 (3H, s, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 167.6 (C-1), 165.5 (C-6), 162.8 (C-8), 145.0 (C-3), 140.1 (C-10), 112.2 (C-5), 111.2 (C-4), 101.5 (C-7), 100.1 (C-9), 17.3 (C-12), 17.3 (C-11), 13.4 (C-13)。以上数据与文献报道基本一致^[5-6], 故鉴

表 1 化合物 1 的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 的波谱数据 (500/125 MHz, $CDCl_3$)

Table 1 1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 1 (500/125 MHz, $CDCl_3$)

碳位	δ_H	δ_C	碳位	δ_H	δ_C
1		167.0	9		162.7
3		149.3	10		100.3
4		110.1	11	2.27 (d, $J=0.9$ Hz)	17.9
5		138.5	12	2.30 (d, $J=0.9$ Hz)	17.7
6		112.6	13	2.36 (s)	13.7
7		165.4	14	3.89 (s)	55.9
8	6.52 (s)	97.6	OH	11.97 (s)	

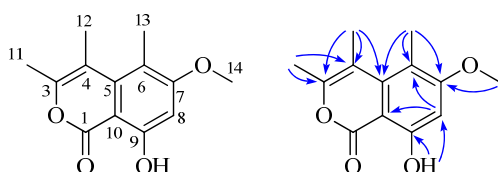


图 1 化合物 1 的结构和主要 HMBC 相关

Fig. 1 Structure and key HMBC correlations of compound 1

定化合物 2 为 decarboxycitrinone。

化合物 3: 白色固体(甲醇), ESI-MS m/z : 333 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{21}H_{32}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 5.88 (1H, m, H-2), 5.29 (1H, m, H-16), 5.23 (1H, m, H-15), 1.06 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-14), 0.96 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-21), 0.88 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-20), 0.86 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-19), 0.67 (3H, s,

H-20); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 172.2 (C-1), 170.6 (C-3), 135.9 (C-15), 133.4 (C-16), 114.7 (C-2), 109.0 (C-4), 56.2 (C-11), 51.5 (C-8), 50.0 (C-7), 43.8 (C-17), 41.1 (C-13), 35.8 (C-5), 35.2 (C-6), 33.8 (C-18), 29.6 (C-10), 21.6 (C-9), 21.0 (C-14), 20.0 (C-20), 19.6 (C-19), 17.7 (C-21), 11.7 (C-12)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **3** 为 4-hydroxy-17R-methylincisterol。

化合物 **4**: 无色透明液体 (甲醇), 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.55 (1H, m, H-6), 7.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.84 (1H, m, H-5), 3.89 (3H, s, CH_3O -); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.2 (COOH-), 152.3 (C-4), 148.3 (C-3), 124.5 (C-6), 122.0 (C-1), 115.4 (C-5), 113.0 (C-2), 55.9 (CH_3O -)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **4** 为 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸。

化合物 **5**: 无色油状物 (甲醇), 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.73 (2H, m, H-3, 6), 7.62 (2H, m, H-4, 5), 4.3 (4H, t, $J = 6.6$ Hz, H-1, 1'), 1.73 (4H, m, H-2, 2'), 1.46 (4H, m, H-3, 3'), 0.99 (6H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4, 4'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.8 (C-7, 8), 133.1 (C-1, 2), 131.8 (C-3, 6), 129.4 (C-4, 5), 66.2 (C-1, 1'), 31.2 (C-2, 2'), 19.8 (C-3, 3'), 13.5 (C-4, 4')。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **5** 为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 **6**: 白色固体 (氯仿)。ESI-MS m/z : 179 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 10.97 (1H, s, -COOH), 7.33 (1H, m, H-4), 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.63 (1H, dd, $J = 7.4, 0.8$ Hz, H-3), 4.64 (1H, m, H-2'), 2.85 (2H, m, H-1'), 1.45 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-3'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 170.9 (-COOH), 162.9 (C-2), 140.4 (C-6), 137.0 (C-4), 118.9 (C-5), 116.9 (C-3), 109.1 (C-1), 77.0 (C-2'), 35.3 (C-1'), 21.6 (C-3')。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **6** 为 flemingipanic acid。

化合物 **7**: 白色固体 (甲醇), ESI-MS m/z : 162 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.23 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 7.82 (1H, s, H-2), 7.37 (1H, m, H-8), 7.13 (1H, m, H-6), 7.09 (1H, m, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 137.7 (C-9), 130.8 (C-4), 127.7 (C-2), 122.2 (C-6), 122.2 (C-5), 120.8 (C-7), 113.8 (C-3), 111.9 (C-8)。以上数据与文献

报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **7** 为吡啶-3-羧酸。

化合物 **8**: 白色结晶 (氯仿), ESI-MS m/z : 429 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.52 (1H, m, H-7), 6.25 (1H, m, H-6), 5.23 (1H, m, H-23), 5.15 (1H, m, H-22), 3.98 (1H, m, H-3), 1.58 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 0.91 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-28), 0.89 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26), 0.83 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-27); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 136.3 (C-6), 136.1 (C-22), 133.2 (C-23), 131.7 (C-7), 83.1 (C-5), 80.3 (C-8), 67.4 (C-3), 57.1 (C-17), 52.6 (C-14), 52.0 (C-9), 45.5 (C-13), 43.7 (C-24), 40.7 (C-20), 40.3 (C-12), 37.9 (C-4), 37.8 (C-10), 35.6 (C-1), 34.0 (C-25), 31.0 (C-2), 29.6 (C-16), 24.3 (C-11), 21.8 (C-21), 21.5 (C-15), 20.9 (C-26), 20.6 (C-27), 19.1 (C-19), 18.5 (C-28), 13.8 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[12-14], 故鉴定化合物 **8** 为过氧化麦角甾醇。

化合物 **9**: 黄色油状物 (甲醇), ESI-MS m/z : 137 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.88 (2H, m, H-2, 6), 6.83 (2H, m, H-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 169.8 (C-7), 162.8 (C-4), 132.6 (C-2), 132.6 (C-6), 122.2 (C-1), 115.6 (C-3), 115.6 (C-5)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **9** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **10**: 白色固体 (甲醇), ESI-MS m/z : 123 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 9.77 (1H, s, CHO-), 7.78 (2H, m, H-2, 6), 6.92 (2H, m, H-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 192.3 (C-7), 165.0 (C-4), 133.0 (C-6), 133.0 (C-2), 129.8 (C-1), 116.5 (C-5), 116.5 (C-3)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **10** 为 4-羟基苯甲醛。

5 细胞毒活性测试

以顺铂为阳性对照, 采用SRB法^[17]测定所有化合物对4种肿瘤细胞株SF-268、MCF-7、NCI-H460和HepG-2的细胞毒活性, 结果表明, 除了**3**和**8**, 其他化合物在100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对上述肿瘤细胞的抑制率均小于50%。通过进一步测试化合物**3**和**8**对4种肿瘤细胞的 IC_{50} , 结果化合物**8**对SF-268、MCF-7、NCI-H460的 IC_{50} 值分别为50.6、32.3和39.0 $\mu\text{mol/L}$, 化合物**3**对SF-268、MCF-7细胞株的 IC_{50} 值分别为63.8、57.2 $\mu\text{mol/L}$ (表2)。

表 2 化合物 3 和 8 对 4 种肿瘤细胞株的 IC₅₀ 值 (n = 3)
Table 2 IC₅₀ values of compounds 3 and 8 against four tumor cell lines (n = 3)

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)			
	SF-268	MCF-7	NCI-H460	HepG-2
3	63.8	57.2	>100	92.3
8	50.6	32.3	39.0	87.7
顺铂	4.1	2.9	2.9	2.5

6 讨论

本研究从紫玉盘内生真菌节菱孢 *Arthrinium* sp. A092 发酵菌丝体中共分离得到 10 个单体化合物, 其中化合物 1 为异香豆素类化合物。研究表明, 异香豆素类化合物具有抗癌、抗菌及消炎等生物活性^[5-6], Kongsaree 等^[18]从野茼蒿内生真菌 *Geotrichum* sp. 中分离得到 3 个新的异香豆素类化合物都具有抗癌、抗结核和抗真菌活性。化合物 8 为甾醇类化合物, 此类化合物对真菌有着重要的生理功能, 同时还具有多种生物学活性^[19]。宋珊珊等^[13]从海洋真菌 96F197 中分离得到的 2 个甾醇类化合物 22E-5α,6α-环氧麦角甾-8(14) 和 22-二烯-3β,7α 二醇和 22E-5α,8α-桥二氧麦角甾-6,22-二烯-3β-醇, 其在 50 μg/mL 的质量浓度下可以明显抑制 HepG2、MCF-7、NCI-H460 肿瘤细胞的生长, 本研究结果也显示化合物 8 对 MCF-7、NCI-H460 肿瘤细胞有一定的抑制作用。

参考文献

[1] Strobel G, Daisy B, Castill U, *et al.* Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 257-268.

[2] 王永中, 肖亚中. 植物内生菌及其活性代谢产物 [J]. *生物学杂志*, 2004, 21(4): 1-5.

[3] 周燕燕, 李浩华, 谭国慧, 等. 紫玉盘内生真菌 *Arthrinium* sp. A092 的次级代谢产物研究 [J]. *中药材*, 2014, 37(11): 2008-2011.

[4] Rukachaisirikul V, Rodglin A, Sukpondma Y, *et al.* Phthalide and isocoumarin derivatives produced by an *Acremonium* sp. isolated from a mangrove *Rhizophora apiculata* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(5): 853-858.

[5] Ebada S S, Schulz B, Wray V, *et al.* Arthrinins A-D: novel diterpenoids and further constituents from the sponge derived fungus *Arthrinium* sp. [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(15): 4644-4651.

[6] Whyte A C, Gloer J B, Scott J A, *et al.* Cercophorins A-C: novel antifungal and cytotoxic metabolites from the coprophilous fungus *Cercophora areolata* [J]. *J Nat Prod*,

1996, 59(8): 765-769.

[7] 周静, 陈敏, 李筠, 等. 一株枝网刺柳珊瑚共附生真菌 *Peniophora* sp. 次级代谢产物研究 [J]. *中国海洋药物杂志*, 2012, 4(31): 8-13.

[8] Harrison L J, Sia G L, Sim K Y, *et al.* A ferulic acid ester of sucrose and other constituents of *Bhesa paniculata* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(6): 1497-1500.

[9] 毕淑峰, 乌仁格格, 汤苏, 等. 螳螂共生真菌 TG-3 次生代谢产物的研究 [J]. *中成药*, 2013, 35(4): 742-744.

[10] Ali M S, Ahmed Z, Ali M I, *et al.* Two new aromatic acids from *Clerodendrum formicarum* Gurke (Lamiaceae) of Cameroon [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(10): 894-898.

[11] 严小红, 侯惠欣, 郭跃伟. 中国南海海绵化学成分的研究 [J]. *中国天然药物*, 2004, 2(2): 88-90.

[12] 干玉娟, 曾艳波, 梅文莉, 等. 大杯香菇化学成分的分离与鉴定 [J]. *中国药物化学杂志*, 2007, 17(2): 104-107.

[13] 宋珊珊, 王乃利, 高昊, 等. 海洋真菌 96F197 抗癌活性成分研究 [J]. *中国药物化学杂志*, 2006, 16(2): 93-97.

[14] 马伟光, 李兴从, 王德祖, 等. 松橄榄中的麦角甾醇类过氧化物 [J]. *云南植物研究*, 1994, 16(2): 196-200.

[15] 孟令杰, 刘百联, 张英, 等. 地骨皮化学成分研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(15): 2139-2142.

[16] Bao K, Fan A, Dai Y, *et al.* Selective demethylation and debenzoylation of aryl ethers by magnesium iodide under solvent-free conditions and its application to the total synthesis of natural products [J]. *Org Biomol Chem*, 2009, 7(24): 5084-5090.

[17] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. *J Nat Cancer Inst*, 1990, 82(12): 1107-1112.

[18] Kongsaree P, Prabpai S, Sriubolmas N, *et al.* Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(5): 709-711.

[19] Volkman J K. Sterols in microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 60(5): 495-506.