

## 蛇足石杉内生真菌 *Cercospora lagenariae* MT-45 的代谢产物研究

吴云<sup>1</sup>, 罗源<sup>1</sup>, 齐博文<sup>1</sup>, 贾放放<sup>1</sup>, 莫婷<sup>2</sup>, 江芳芳<sup>1</sup>, 杨洪芸<sup>1</sup>, 丁宁<sup>1</sup>, 张鑫<sup>1</sup>, 刘晓<sup>1</sup>, 屠鹏飞<sup>1</sup>, 史社坡<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029

2. 宁夏回族医药研究所, 宁夏 银川 750021

**摘要:** 目的 研究蛇足石杉内生真菌 *Cercospora lagenariae* MT-45 的代谢产物。方法 利用硅胶柱色谱及半制备液相色谱等方法进行化合物的分离纯化, 并根据化合物的理化性质及 MS、NMR 数据鉴定其结构; 利用体外模型进行抗炎活性筛选。结果 从内生真菌 *C. lagenariae* MT-45 的糙米发酵物中分离得到 9 个聚酮类化合物, 分别鉴定为尾孢菌酸 A (1)、格链孢酚 (2)、交链孢醇单甲醚 (3)、(+)-nigrosporaol A (4)、alternarienic acid B (5)、2-methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromone (6)、2,5-dimethyl-7-hydroxychromone (7)、1-deoxyrubralactone (8)、(-)-alternarilactam (9)。结论 其中化合物 1 为新化合物, 化合物 6 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 一氧化氮 (NO) 产生具有一定的抑制作用, IC<sub>50</sub> 为 (57.5 ± 1.2) μmol/L。

**关键词:** 蛇足石杉; 内生真菌; 尾孢菌属; 聚酮类化合物; 尾孢菌酸 A; 格链孢酚; 一氧化氮抑制活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0546-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.002

## Metabolites from *Cercospora lagenariae* MT-45, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*

WU Yun<sup>1</sup>, LUO Yuan<sup>1</sup>, QI Bo-wen<sup>1</sup>, JIA Fang-fang<sup>1</sup>, MO Ting<sup>2</sup>, JIANG Fang-fang<sup>1</sup>, YANG Hong-yun<sup>1</sup>, DING Ning<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>, LIU Xiao<sup>1</sup>, TU Peng-fei<sup>1</sup>, SHI She-po<sup>1</sup>

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

2. Ningxia Hui Medicine Research Institute, Yinchuan 750021, China

**Abstract: Objective** To investigate the chemical metabolites from *Cercospora lagenariae* MT-45, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. **Methods** The compounds were isolated and purified by using silica gel column chromatography and semi-preparative liquid chromatography. The structures were established using physicochemical properties and MS and NMR. The anti-inflammatory activities of all the isolates were also preliminarily investigated by using *in vitro* model. **Results** Nine polyketide derivatives including cercolagenic acid A (1), alternariol (2), alternariol 9-methyl ether (3), (+)-nigrosporaol A (4), alternarienic acid B (5), 2-methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromone (6), 2,5-dimethyl-7-hydroxychromone (7), 1-deoxy-rubralactone (8), and (-)-alternarilactam (9) were isolated from *C. lagenariae* MT-45 fermented on brown rice solids. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, and compound 6 can exhibit a certain inhibition on the nitric oxide production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophage cells with an IC<sub>50</sub> value of (57.5 ± 1.2) μmol/L.

**Key words:** *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev; endophytic fungi; *Cercospora*; polyketide; cercolagenic acid A; alternariol; inhibitory activity against nitric oxide production

植物内生菌是一类重要的微生物资源, 其种类和数量繁多, 自然界中几乎所有的植物中都有内生菌存在。为了适应环境或满足宿主自身生长、防御

等需要, 植物内生菌往往能够产生结构新颖多样并具有重要生理活性的天然产物。目前, 从植物内生菌中分离鉴定的化合物包括生物碱、萜类、蒽醌、吡

收稿日期: 2018-11-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573312)

作者简介: 吴云, 女, 硕士研究生在读, 主要从事中药活性成分发现及其合成生物学研究。E-mail: 20160931863@bucm.edu.cn

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

酮、甾醇、多肽等多种成分,发现了一系列具有活性的天然产物<sup>[1-3]</sup>,如具有动物神经毒性的麦角生物碱和吲哚生物碱,具有植物抗毒素样作用的细胞松弛素等<sup>[4-5]</sup>。因此,对植物内生真菌代谢产物进行系统研究有望发现更多结构新颖的活性天然产物。

蛇足石杉又名千层塔,为石杉科石杉属珍贵药用蕨类植物 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev 的全草,具有解毒止痛、散瘀消肿的功效。蛇足石杉各组织部位中存在大量内生真菌,国内外学者已从蛇足石杉内生真菌中发现了一系列结构新颖多样的活性天然产物,部分内生真菌还能够产生石杉碱甲<sup>[6-8]</sup>。在前期的研究中,本课题组成功从蛇足石杉中分离鉴定了一系列的内生真菌,对其发酵产物进行活性筛选发现多株内生真菌能够产生具有潜在的抗炎、抗乙酰胆碱酯酶活性的代谢产物,其中 *Cercospora*

*lagenariae* MT-45 糙米培养条件下的醋酸乙酯提取物对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 一氧化氮 (NO) 的产生具有一定抑制作用,半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值为 (44.3±2.6) μg/mL。因此,本实验对 *C. lagenariae* 的代谢产物进行了系统研究,从其中分离鉴定的 9 个聚酮类化合物 (图 1) 分别为尾孢菌酸 A (cercolagenic acid A, **1**)、格链孢酚 (alternariol, **2**)、交链孢醇单甲醚 (alternariol 9-methyl ether, **3**)、(+)-nigrosporaol A (**4**)、alternarienonic acid B (**5**)、2-methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxyl-chromone (**6**)、2,5-dimethyl-7-hydroxyl-chromone (**7**)、1-deoxyrubralactone (**8**)、(-)-alternarlactam (**9**)。其中化合物 **1** 为新化合物,化合物 **6** 对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 NO 产生具有一定的抑制作用,IC<sub>50</sub> 为 (57.5±1.2) μmol/L。

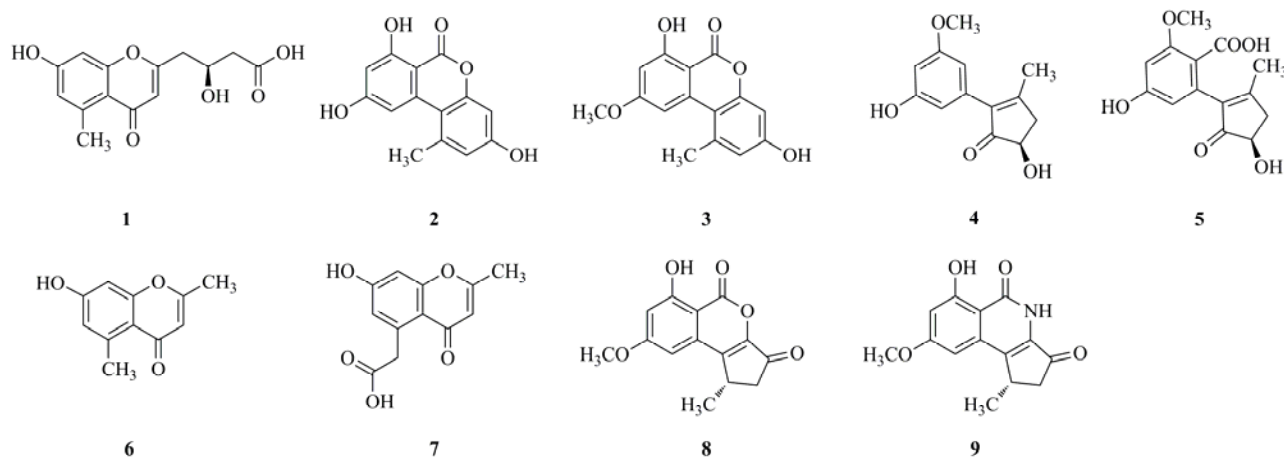


图 1 *C. lagenariae* MT-45 中分离鉴定的 9 个化合物

Fig. 1 Structure of nine compounds isolated from *C. lagenariae* MT-45

## 1 仪器与材料

Autopol IV 全自动旋光仪 (美国 Rudolf 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 兆核磁共振仪 (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 (SunFire™ C<sub>18</sub>, 150 mm×10 mm, 5 μm); ODS 柱色谱填料 (Li-Chroprep RP-C<sub>18</sub>, 40~63 μm, 德国 Merck 公司); 柱色谱用硅胶 (200~300 目) 及薄层色谱用 GF<sub>254</sub> 硅胶预制板均为青岛海洋化工厂产品。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);

M1000 多功能酶标仪 (美国 TECAN 公司)。

蛇足石杉于 2015 年 7 月采自福建省南平市 (标本编号 201507)。本研究所用菌株由课题组从蛇足石杉中分离纯化,经形态特征及 ITS rDNA 鉴定为尾孢菌属 *Cercospora lagenariae*, 菌种保存于北京中医药大学中药现代研究中心 (菌种编号 *C. lagenariae* MT-45)。

RAW 264.7 巨噬细胞由中国中医科学院细胞中心提供; DMEM 培养基 (美国 Hy-clone 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); NO 化学试剂盒 (南京建成生物公司)。

## 2 内生真菌的发酵培养及代谢产物的提取分离

*C. lagenariae* MT-45 于无菌环境下接种于 0.5 L×40 瓶糙米培养基中,室温培养 60 d 后,用醋酸乙酯

超声提取 3 次。提取液合并滤过，减压浓缩得浸膏 120 g。经正相硅胶柱色谱，石油醚-醋酸乙酯（1：0→0：1）、二氯甲烷-甲醇（4：1→0：1）梯度洗脱，合并得到 6 个流分 Fr. 1~6。Fr. 1 经反相硅胶柱色谱分离并结合半制备 HPLC 分离纯化得化合物 **1**（15 mg；流动相：乙腈-水 22：78）、**2**（4 mg；流动相：甲醇-水 66：34）、**3**（200 mg；流动相：甲醇-水 59：41）；Fr. 2 经反相硅胶柱色谱分离并结合半制备 HPLC 分离纯化得化合物 **4**（30 mg；流动相：乙腈-水 38：62）、**5**（25 mg；流动相：甲醇-水 59：41）、**6**（100 mg；流动相：甲醇-水 58：42）；Fr. 3 经反相硅胶柱色谱分离并结合半制备 HPLC 分离纯化得化合物 **7**（300 mg；流动相：甲醇-水 45：55）、**8**（3 mg；流动相：甲醇-水 58：42）、**9**（5 mg；流动相：甲醇-水 58：42）。

### 3 结构鉴定

化合物 **1**：白色粉末， $[\alpha]_D^{21} -10.0^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH)。UV  $\lambda_{max}^{MeOH}$  (nm): 228 (4.32), 291 (3.63), mp 232~240 °C，HR-ESI-MS 给出  $[M+H]^+$  峰  $m/z$  279.087 5（计

算值为 279.086 3），结合  $^1H$ -NMR 和  $^{13}C$ -NMR 数据（表 1）确定其分子式为  $C_{14}H_{14}O_6$ 。IR 图谱显示该化合物结构中含羟基（3 401  $cm^{-1}$ ）、羰基（1 648  $cm^{-1}$ ）、和苯环（1 615、1 498  $cm^{-1}$ ）。 $^1H$ -NMR 显示 2 个芳香氢信号  $\delta_H$  6.60 (1H, brs, H-6), 6.63 (1H, brs, H-8), 1 个烯烃信号  $\delta_H$  5.95 (1H, s, H-3), 1 个含氧次甲基信号  $\delta_H$  4.23 (1H, m, H-12), 2 个亚甲基信号  $\delta_H$  2.71 (1H, dd,  $J = 14.0, 3.0$  Hz, H-11a), 2.56 (1H, dd,  $J = 14.0, 7.5$  Hz, H-11b), 2.42 (1H, dd,  $J = 15.0, 4.0$  Hz, H-13a), 2.32 (1H, dd,  $J = 15.0, 8.0$  Hz, H-13b), 1 个甲基信号  $\delta_H$  2.65 (3H, s, 5-CH<sub>3</sub>)。化合物 **1** 与已知化合物 mycoleptione 的核磁数据非常相似<sup>[9]</sup>，提示两者可能具有相似的母核结构（mycoleptione 的结构见图 2）。与 mycoleptione 相比，化合物 **1** 的  $^1H$ -NMR 谱中少了 1 个甲基信号，不同的是在  $^{13}C$ -NMR 谱中 C-14 明显向低场位移至  $\delta_C$  172.9，提示甲基被氧化为羧基。结合  $^1H$ - $^1H$  COSY、HMBC、HSQC 对化合物 **1** 的碳氢数据进行了准确归属（表 1）。在 HMBC 谱中，位于  $\delta_H$  2.65 (3H, s) 的

表 1 化合物 **1** 的 NMR 数据 (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ )  
Table 1 NMR data of compound **1** (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ )

| 碳位 | $\delta_H$ | $\delta_C$ , type | 碳位                | $\delta_H$                    | $\delta_C$ , type     |
|----|------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 2  |            | 164.3, C          | 10                |                               | 114.8, C              |
| 3  | 5.95 (s)   | 111.8, CH         | 11-a              | 2.71 (dd, $J = 14.0, 3.0$ Hz) | 40.9, CH <sub>2</sub> |
| 4  |            | 178.2, C          | 11-b              | 2.56 (dd, $J = 14.0, 7.5$ Hz) |                       |
| 5  |            | 141.3, C          | 12                | 4.23 (m)                      | 65.2, CH              |
| 6  | 6.60 (brs) | 114.4, CH         | 13-a              | 2.42 (dd, $J = 15.0, 4.0$ Hz) | 42.3, CH <sub>2</sub> |
| 7  |            | 161.1, C          | 13-b              | 2.32 (dd, $J = 15.0, 8.0$ Hz) |                       |
| 8  | 6.63 (brs) | 100.6, CH         | 14                |                               | 172.9, C              |
| 9  |            | 159.2, C          | 5-CH <sub>3</sub> | 2.65 (s)                      | 22.4, CH <sub>3</sub> |

氢与 C-5、C-6、C-10 之间的远程相关说明甲基位于 C-5 位；H<sub>2</sub>-11 与 C-2、C-3，H<sub>2</sub>-13 与 C-11、C-12、C-14 之间的远程相关信号说明化合物 **1** 的 C-2 位连有 1 个 -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>COOH 侧链。综上，确定化合物 **1** 的平面结构如图 3 所示，为新化合物。化合物 **1** 的比旋光值为  $[\alpha]_D^{21} -10.0^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH)，与化合物 mycoleptione 旋光  $[\alpha]_D^{26} -26.0^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH) 方向一致<sup>[9]</sup>，因此确定化合物 **1** 中 C-12 位的绝对构型为 *S*，命名为尾孢菌酸 A。

化合物 **2**：黄色粉末，HR-ESI-MS  $m/z$ : 259.061 7  $[M+H]^+$ （计算值为 259.060 1），分子式为  $C_{14}H_{10}O_5$ 。

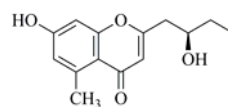


图 2 化合物 mycoleptione 的结构  
Fig. 2 Structure of mycoleptione

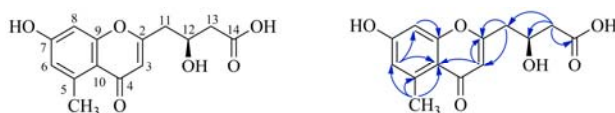


图 3 化合物 **1** 结构和化合物 **1** 的主要 HMBC 相关  
Fig. 3 Compound **1** and key HMBC correlations of compound **1**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6.28 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-4), 7.10 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-6), 6.53 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-3'), 6.62 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-5'), 2.60 (3H, s, 6'- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 138.1 (C-1), 97.4 (C-2), 164.1 (C-3), 100.9 (C-4), 165.3 (C-5), 104.3 (C-6), 164.7 (C-7), 109.0 (C-1'), 152.6 (C-2'), 101.6 (C-3'), 158.4 (C-4'), 117.5 (C-5'), 138.3 (C-6'), 25.3 (6'- $\text{CH}_3$ )。参考文献报道<sup>[10]</sup>, 鉴定化合物 **2** 为格链孢酚。

化合物 **3**: 黄色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$ : 273.074 6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 273.075 8), 分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6.71 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-2), 6.63 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-4), 6.59 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-8), 7.19 (1H, d,  $J = 2.6$  Hz, H-10), 11.34 (1H, s, 3-OH), 11.81 (1H, s, 7-OH), 2.70 (3H, s, 1- $\text{CH}_3$ ), 3.87 (3H, s, 9- $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 138.4 (C-1), 117.6 (C-2), 158.5 (C-3), 101.6 (C-4), 152.6 (C-4a), 164.6 (C-6), 98.4 (C-6a), 164.1 (C-7), 99.1 (C-8), 166.1 (C-9), 103.3 (C-10), 137.7 (C-10a), 108.8 (C-10b), 25.0 (1- $\text{CH}_3$ ), 55.8 (9- $\text{OCH}_3$ )。参考文献报道<sup>[11]</sup>, 鉴定化合物 **3** 为交链孢醇单甲醚。

化合物 **4**: 黄色粉末,  $[\alpha]_D^{21} +46.0^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH)。HR-ESI-MS  $m/z$ : 233.050 2  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (计算值为 233.051 7), 分子式为  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$ 。  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6.27 (1H, s, H-2), 6.30 (1H, s, H-4), 6.23 (1H, s, H-6), 4.14 (1H, dd,  $J = 7.0, 3.0$  Hz, H-11), 2.40 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-12a), 2.95 (1H, brd,  $J = 18.0$  Hz, H-12b), 2.11 (3H, s, 14- $\text{CH}_3$ ), 3.69 (3H, s, 5- $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 109.0 (C-2), 158.7 (C-3), 100.8 (C-4), 160.5 (C-5), 106.0 (C-6), 133.8 (C-7), 137.2 (C-8), 206.8 (C-10), 71.1 (C-11), 41.3 (C-12), 169.5 (C-13), 18.6 (14- $\text{CH}_3$ ), 55.4 (5- $\text{OCH}_3$ )。参考文献报道<sup>[12]</sup>, 鉴定化合物 **4** 为 nigrosporaol A。

化合物 **5**: 黄色粉末,  $[\alpha]_D^{21} +32.0^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH)。HR-ESI-MS  $m/z$ : 279.085 3  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 279.086 3), 分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_6$ 。  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6.12 (1H, s, H-4), 6.49 (1H, s, H-6), 2.91 (1H, dd,  $J = 17.0, 6.5$  Hz, H-3'a), 2.41 (1H, brd,  $J = 17.0$  Hz, H-3'b), 4.15 (1H, brs, H-4'), 1.95 (3H, s, 2'- $\text{CH}_3$ ), 3.77 (3H, s, 7- $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 172.6 (C-1), 110.1 (C-2), 136.8 (C-3),

106.5 (C-4), 163.6 (C-5), 100.9 (C-6), 164.1 (C-7), 140.2 (C-1'), 164.6 (C-2'), 40.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 206.4 (C-5'), 17.9 (2'- $\text{CH}_3$ ), 55.9 (7- $\text{OCH}_3$ )。参考文献报道<sup>[13]</sup>, 鉴定化合物 **5** 为 alternariononic acid B。

化合物 **6**: 黄色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$ : 191.070 4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 191.070 3), 分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 5.97 (1H, s, H-3), 6.62 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-6), 6.60 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-8), 2.27 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 2.64 (3H, s, 5- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 163.5 (C-2), 117.0 (C-3), 178.2 (C-4), 141.1 (C-5), 110.6 (C-6), 159.3 (C-7), 100.5 (C-8), 159.3 (C-9), 114.1 (C-10), 19.3 (2- $\text{CH}_3$ ), 22.4 (5- $\text{CH}_3$ )。参考文献报道<sup>[14]</sup>, 鉴定化合物 **6** 为 2-methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromone。

化合物 **7**: 黄色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$ : 233.046 5  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (计算值为 233.045 5), 分子式为  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5$ 。  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 5.96 (1H, s, H-3), 6.71 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-6), 6.64 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-8), 2.28 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 4.00 (2H, s, 1'- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 164.2 (C-2), 117.9 (C-3), 177.8 (C-4), 138.0 (C-5), 110.4 (C-6), 161.0 (C-7), 101.4 (C-8), 158.9 (C-9), 114.3 (C-10), 40.3 (C-1'), 172.1 (C-2'), 19.4 (2- $\text{CH}_3$ )。参考文献报道<sup>[12]</sup>, 鉴定化合物 **7** 为 2, 5-dimethyl-7-hydroxychromone。

化合物 **8**: 黄色粉末,  $[\alpha]_D^{21} -60.0^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH)。HR-ESI-MS  $m/z$ : 261.073 4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 261.075 8), 分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3.50 (1H, m, H-1), 2.94 (1H, dd,  $J = 19.0, 6.0$  Hz, H-2a), 2.23 (1H, brd,  $J = 19.0$  Hz, H-2b), 6.82 (1H, brs, H-7), 6.90 (1H, brs, H-9), 11.09 (1H, s, 6-OH), 1.35 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, 1- $\text{CH}_3$ ), 3.94 (3H, s, 8- $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 28.7 (C-1), 43.2 (C-2), 197.7 (C-3), 147.5 (C-3a), 163.3 (C-5), 99.4 (C-5a), 164.0 (C-6), 106.4 (C-7), 165.7 (C-8), 101.8 (C-9), 135.1 (C-9a), 142.6 (C-9b), 20.5 (10- $\text{CH}_3$ ), 55.3 (8- $\text{OCH}_3$ )。参考文献报道<sup>[15]</sup>, 鉴定化合物 **8** 为 1-deoxyrubralactone。

化合物 **9**: 黄色粉末,  $[\alpha]_D^{21} -30.0^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH)。HR-ESI-MS  $m/z$ : 260.090 2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 260.090 7), 分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3.54 (1H, m, H-1), 2.98 (1H, dd,  $J = 19.0, 7.0$  Hz, H-2a), 2.25 (1H, brd,  $J = 19.0$  Hz, H-2b), 13.5 (1H, s, 4-NH), 6.65 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz,

H-7), 6.82 (1H,  $J = 2.0$  Hz, H-9), 1.34 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, 1-CH<sub>3</sub>), 3.91 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 29.3 (C-1), 43.7 (C-2), 198.2 (C-3), 135.2 (C-3a), 166.3 (C-5), 107.0 (C-5a), 163.9 (C-6), 102.5 (C-7), 164.5 (C-8), 102.4 (C-9), 135.7 (C-9a), 143.2 (C-9b), 21.1 (10-CH<sub>3</sub>), 55.9 (8-OCH<sub>3</sub>)。

参考文献报道<sup>[16]</sup>, 鉴定化合物 **9** 为 (-)-alternarlactam。

#### 4 NO 抑制活性筛选

取对数期的 RAW 264.7 细胞, 0.25% 胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基终止消化, 低速离心, 重悬于新鲜培养基中。将细胞用 DMEM 培养基稀释至  $4 \times 10^5$  个/mL, 以每孔 40 000 个细胞接种于 96 孔板中, CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 孵育 24 h。用二甲基亚砜 (DMSO) 配制浓度为 20 mmol/L 单体化合物母液, 经培养基稀释后加入 96 孔培养板至终浓度分别为 100、50、25、5、0  $\mu$ mol/L, 孵育 1 h, 再加入终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL 的 LPS, 继续孵育 24 h。从 96 孔板各孔中吸取 100  $\mu$ L 上清至酶标板内, 每孔加入 50  $\mu$ L GriessR1, 室温避光放置 5 min, 再加入 50  $\mu$ 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 释放的抑制率, 并得出半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

结果表明, 化合物 **6** 对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 NO 释放具有一定的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 为 (57.5  $\pm$  1.2)  $\mu$ mol/L [阳性对照吡喹啉美辛 IC<sub>50</sub> 为 (33.6  $\pm$  1.4)  $\mu$ mol/L], 其他化合物对 NO 的产生不显示明显的抑制作用。

#### 参考文献

- [1] Zhang H, Song Y, Tan R. Biology and chemistry of endophytes [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23(5): 753-771.
- [2] Tan R, Zou X. Endophytes: A rich source of functional metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2001, 18(4): 448-459.
- [3] 贾 栗, 陈疏影, 翟永攻, 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.
- [4] 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.
- [5] Eyberger L, Dondapati R, Porter J. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(8): 1121-1124.
- [6] 张 鑫, 齐博文, 杨洪芸, 等. 蛇足石杉内生真菌 *Penicillium chrysogenum* MT-12 中 2 个新二苯醚类成分 [J]. *中草药*, 2018, 49(11): 2496-2501.
- [7] Ishiuchi K, Hirose D, Suzuki T, 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, 81(5): 1143-1147.
- [8] Ying Y, Zhan Z, Ding Z, et al. Bioactive metabolites from *Penicillium* sp. P-1, a fungal endophyte in *Huperzia serrata* [J]. *Chem Nat Compd*, 2011, 47(4): 541-544.
- [9] Siriwach R, Kinoshita H, Kitani S, et al. Mycoleptone, a new chromone derivative isolated from the endophytic fungus *Mycoleptodiscus* sp. MU41 [J]. *J Antibiot*, 2012, 65(12): 627-629.
- [10] Sun J, Awakawa T, Noguchi H, et al. Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L. [J]. *Bioogr Med Chem Lett*, 2012, 22(20): 6397-6400.
- [11] Zhou L, Peng Y, Zhong L, et al. Benzopyranones from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. ponipodef12 and their bioactivities [J]. *Molecules*, 2012, 17(10): 11303-11314.
- [12] He J, Wang C, Yang L, et al. A pair of new polyketide enantiomers from three endolichenic fungal strains *Nigrospora sphaerica*, *Alternaria alternata*, and *Phialophora* sp. [J]. *Nat Prod Commun*, 2016, 11(6): 829-831.
- [13] Ding H, Zhang D, Zhou B, et al. Inhibitors of BRD4 protein from a marine-derived fungus *Alternaria* sp. NH-F6 [J]. *Mar Drugs*, 2017, doi: 10.3390/md15030076.
- [14] Nonaka G, Minami M, Nishioka I, et al. Studies on rhubarb (*Rhei Rhizoma*). III. Stilbene glycosides [J]. *Chem Pharm Bull*, 1977, 25(9): 2300-2305.
- [15] Naganuma M, Nishida M, Kuramochi K, et al. 1-Deoxyrubralactone, a novel specific inhibitor of families X and Y of eukaryotic DNA polymerases from a fungal strain derived from sea algae [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(6): 2939-2944.
- [16] Zhang A, Jiang N, Gu W, et al. Characterization, synthesis and self-aggregation of (-)-alternarlactam: A new fungal cytotoxin with cyclopentenone and isoquinolinone scaffolds [J]. *Chem-Eur J*, 2010, 16(48): 14479-14485.