

川芎内生真菌次级代谢产物中 1 个新的内酯化合物

李馨蕊^{1,2}, 马川^{1,2}, 郭力^{1,2}, 刘娟^{1,2}, 熊亮^{1,2*}, 周勤梅^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学, 西南特色药材创新药物成分研究所, 四川 成都 611137

摘要: 目的 研究川芎内生真菌 *Alternaria* sp. IS275 代谢产物的化学成分。方法 采用硅胶和葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱、反相中压液相色谱、制备薄层色谱以及半制备高效液相色谱等分离技术, 对川芎内生真菌发酵液的醋酸乙酯提取部位进行分离纯化, 利用现代波谱学手段对分离的化学成分进行结构鉴定。结果 从川芎内生真菌 *Alternaria* sp. IS275 代谢产物的醋酸乙酯提取部位分离得到 1 个新的内酯类化合物, 鉴定为 (+)-4,11-二羟基-2-十二烯-5-内酯。结论 化合物 1 为首次从川芎内生真菌中分离得到的新内酯化合物, 命名为芎孢内酯 A。

关键词: 川芎; 内生真菌; 次级代谢产物; 新内酯化合物; 芎孢内酯 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-4859-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.002

A new lactone from *Alternaria* sp. IS275, an endophytic fungus of *Ligusticum chuanxiong*

LI Xin-rui^{1,2}, MA Chuan^{1,2}, GUO Li^{1,2}, LIU Juan^{1,2}, XIONG Liang^{1,2}, ZHOU Qin-mei^{1,2}

1. State Key Laboratory of Characteristic Chinese Medicine Resources in Southwest China, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of metabolites of *Alternaria* sp. IS275, an endophytic fungus isolated from *Ligusticum chuanxiong*. **Methods** The extraction fraction of ethyl acetate from endophytic fungi fermentation broth of *L. chuanxiong* were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, reversed phase medium pressure chromatography, preparative TLC, and semi-preparative RP-HPLC. The structure of the separated chemical constituent was elucidated by modern spectroscopy technology. **Results** A new lactone compound (+)-4,11-dihydroxy-2-dodecene-5-lactone was isolated from the ethyl acetate fraction of the metabolite of *Alternaria* sp. IS275, an endophytic fungus of *L. chuanxiong*. **Conclusion** Compound 1 is a new lactone compound, named ligualterlide A.

Key words: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; endophytic fungi; secondary metabolites; new lactone compound; ligualterlide A

植物内生菌 (Endophyte) 包括细菌、真菌、放线菌等, 是植物共生体系中的定殖微生物, 存活于健康植物组织和器官内部, 但不会引起直接、明显的致病症状^[1]。研究发现, 内生菌的次级代谢产物具有多种生物活性, 包括抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗过敏等, 具有潜在的药用价值^[2]。目前, 研究最

多的内生微生物是细菌和真菌, 其中植物内生真菌次级代谢产物研究已成为活性化合物筛选的 1 条新途径, 也是天然药物化学研究的热点^[3]。因此, 植物内生真菌次级代谢产物已成为新化合物和新药物不可或缺的来源。

川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 是伞形科草

收稿日期: 2019-05-25

基金项目: 四川省川产道地药材综合开发与区域发展项目 (2017ZY002); 四川省科技创新苗子工程培育项目 (2018086, 2019046); 四川省青年科技创新研究团队专项计划项目 (2017TD0001, 2016TD0006)

作者简介: 李馨蕊, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: x2987253407@163.com

*通信作者 熊亮, 研究员。Tel: (028)61800231 E-mail: xiling0505@126.com

周勤梅, 博士。Tel: 13541241483 E-mail: zhqmyx@sina.cn

本多年生植物，为著名川产道地药材，具有活血行气、祛风止痛的功效，被广泛用于偏头痛、冠心病、动脉粥样硬化等心血管疾病的治疗^[4-5]。近年来，关于川芎化学成分和药理作用的研究较多，而关于川芎内生真菌及其次级代谢产物的研究报道较少，研究主要体现在不同产地川芎内生真菌种群的差异^[6]、川芎内生真菌的抑菌活性等方面^[7]。课题组前期运用组织块法和分子生物学手段分离鉴定出川芎内生真菌 *Cladosporium* sp. IS384，并采用现代色谱分离纯化技术从其次级代谢产物中分离获得了内酯类、甾体类、生物碱类化合物，发现 cladospolide B、iso-cladospolide B 抗菌作用明显^[8]。为进一步研究川芎内生真菌次级代谢产物中的化学成分，本实验利用多种分离纯化手段，对川芎内生真菌 *Alternaria* sp. IS275 的次级代谢产物进行研究，得到 1 个新的内酯化合物，鉴定为 (+)-4,11-二羟基-2-十二烯-5-内酯 [(+)-4,11-dihydroxy-2-dodecene-5-lactone, **1**]，命名为芎孢内酯 A。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Büchi Gradient Former B-687 中压液相色谱仪 (瑞士 Welch 公司, Rp C₁₈, 40~60 μm); C₁₈ 色谱柱 (美国 Agilent 公司, 250 mm×9.4 mm, 5 μm, 半制备型); 半制备型 Agilent Technologies 1100 Series 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Bruker AVIII HD-600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Waters Synapt G2 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); Anton Paar MCP 200 旋光测定仪 (美国 Anton Paar 公司); Agilent Cary 600 FT-IR (美国 Agilent 公司); 303 型电热恒温培养箱 (上海浦东荣丰科学仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Milli-pore 公司); 节能净化工作台 (成都新光非兰特净化工程有限公司); SANYOMLS-3780 型实验用高压灭菌锅 (日本 SANYO 公司); ZWY-2112B 型恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.2 材料

柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂, H 硅胶, 200~300 目); 薄层色谱硅胶 (GF₂₅₄ 硅胶, 青岛海洋化工厂); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (瑞典 Amershan Pharmacia 公司); 色谱甲醇 (美国 Sigma 公司); 其他常规试剂均为成都市科隆化学品的分析纯试剂。

培养基: PDA 固体培养基 (马铃薯、葡萄糖、

琼脂, 用于分离, 自制); PDA 液体培养基 (马铃薯、葡萄糖、青霉素和硫酸链霉素 100 U/mL, 用于发酵, 自制)。

川芎枝条于 2018 年 6 月采集于四川省成都市成都中医药大学温江校区药用植物园, 由成都中医药大学药学院高继海副教授鉴定为川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的枝条。

2 内生真菌提取与分离

2.1 内生真菌的分离

本实验采用课题组前期分离内生真菌 *Cladosporium* sp. IS384 的方法^[8], 再次从成都中医药大学温江校区药用植物园采集 2 枝新鲜川芎枝条, 先用纯水将表面洗净, 其次用 0.1% 次氯酸钠溶液浸泡 15 min, 用纯水反复清洗后, 晾干并切成适宜大小的块状茎。然后于超净工作台内将块状茎放入 75% 乙醇中处理 1~2 min, 用蒸馏水冲洗 5~6 次, 再用无菌滤纸吸干后将表皮削去, 将其切成 10 mm×10 mm×2 mm 的小块, 用无菌镊子将其置于 PDA 固体培养基内, 共 2 个培养皿, 每皿 3~4 个。封装后将培养皿置于恒温箱中培养 3~15 d, 于 28 °C 下培养并观察记录。与课题组前期分离鉴定出的川芎内生真菌 *Cladosporium* sp. IS384 形态类似^[8], 菌落在 PDA 固体培养基上培养 3 d 后, 菌落直径可达 2 cm, 表面呈墨绿色毛绒状, 背面呈现深绿色, 边缘全缘, 中间凸起呈半球状, 并在周围形成 1 个同心环。在观察到培养基上川芎组织块内部向周围长出菌丝并渐渐形成菌落时, 采用尖端菌丝挑取法将单纯菌丝转移至新的培养皿, 该过程重复 6 次, 直至菌落呈现单菌落形态, 即得内生真菌。

2.2 内生真菌的鉴别

使用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽取试剂盒进行菌株 DNA 提取, 取 1 μL 作为模板, 进行 18 S rDNA 基因扩增。18 S rDNA 的通用引物: NS1 序列 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3', NS6 序列 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增反应参数: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 扩增产物用回收试剂盒纯化后, 进行测序。将所测序列 NCBI 的 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析。根据基因测序结果, 通过 18 S rDNA、ITS、26 S 在 NCBI 数据库中进行比对, 菌株的 rRNA 序列和 *Alternaria* sp. 的相应序列同源性达到 100%, 经鉴定从川芎中分

离得到的内生真菌为 *Alternaria* sp. IS275。

2.3 内生真菌的发酵

将内生真菌 *Alternaria* sp. IS275 菌种接种到 100 个锥形瓶中 (160 mL PDA 培养基/500 mL 锥形瓶), 在 28 °C、250 r/min 振荡培养 6 d 得到发酵液。

2.4 发酵液的提取分离

将发酵液 (15 L) 离心, 得到上清液和菌丝体。将上清液用等体积醋酸乙酯萃取, 重复 3 次, 合并萃取液, 减压蒸干浓缩得到醋酸乙酯部位 4 g。将菌丝体 (50 g) 加入 10 倍量的甲醇进行超声提取 0.5 h, 重复提取 3 次, 离心得到上清液, 减压蒸干溶剂, 得到黄色浸膏, 加入足量醋酸乙酯溶解, 离心得到上清液, 减压浓缩, 即得到醋酸乙酯部位 3 g。将 2 次得到的醋酸乙酯部位合并, 共得浸膏 7 g。

3 单体成分的分离和鉴定

3.1 提取分离流程

对醋酸乙酯萃取部位 7 g 进行化学成分分离。首先使用反相 C₁₈ 硅胶柱色谱法, 以甲醇-水 (30 : 70→100 : 0) 梯度洗脱, 根据 TLC 薄层检识结果, 合并相同的组分, 得到 10 个流分 (Fr. A~J)。Fr. E (1.5 g) 加入 1~1.5 倍量的柱色谱硅胶 (200~300 目) 拌样后, 经硅胶 (200~300 目) 柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (100 : 1→5 : 1) 梯度洗脱, 得到 7 个组分 Fr. E₁~E₇。Fr. E₄ (500 mg, 石油醚-醋酸乙酯 30 : 1 洗脱部分) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (石油醚-二氯甲烷-甲醇 5 : 5 : 1 洗脱)、制备薄层色谱 (二氯甲烷-丙酮 8 : 1) 分离后, 最后经半制备高效液相色谱分离, 甲醇-水 (50 : 50, 1 mL/min) 为流动相, 检测波长 205 nm, 分离得到化合物 **1** (4 mg, *t_R* = 100 min)。

3.2 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状液体。[α]_D²⁵ +38.76° (c 0.096, CH₃OH)。根据 HR-ESI-MS *m/z*: 251.126 6 [M+Na]⁺ (计算值 C₁₂H₂₀O₄Na, 251.125 9) 确定化合物 **1** 的分子式为 C₁₂H₂₀O₄, 不饱和度为 3。IR 光谱图显示该化合物含有羰基 (1 740 cm⁻¹)、羟基 (3 343 cm⁻¹) 以及双键 (1 587 cm⁻¹) 等特征信号。UV 光谱显示该化合物的最大吸收波长在 192 nm 处。

化合物 **1** 的 ¹H-NMR 谱显示 2 个烯烃质子信号 δ 7.08 (1H, dd, *J* = 11.4, 7.2 Hz, H-3), 6.09 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-2), 结合 ¹³C-NMR 中的羰基碳信号 δ 166.5 (C-1), 123.0 (C-2), 147.0 (C-3) 提示该化合物含有 1 个 α, β-不饱和内酯结构片段。同时, ¹H-NMR

谱显示 3 个连氧次甲基质子信号 δ 4.39 (1H, m, H-5), 4.09 (1H, dd, *J* = 7.2, 3.6 Hz, H-4), 3.74 (1H, m, H-11)。此外, δ 1.35~1.45 显示部分重叠的多个多重峰亚甲基信号, 以及 1 个甲基信号 δ 1.17 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-12)。化合物 **1** 的 ¹³C-NMR 谱给出 12 个碳信号, 包括 1 个羰基、2 个烯碳、3 个连氧碳信号、5 个亚甲基和 1 个甲基信号, 根据文献比对, 发现化合物 **1** 的核磁数据与 (4*R*,5*R*)-4-hydroxy-5-methyl-2-hexen-5-olide^[9]的数据类似, 初步推断化合物 **1** 为脂肪族六元不饱和内酯类化合物。

为了准确确定其结构, 进行了 2D NMR 实验。通过 HSQC 和 ¹H-¹H COSY 实验, 对 ¹H 以及相应的 ¹³C 信号进行了准确归属 (表 1)。化合物 **1** 的 ¹H-¹H COSY 谱显示 H-2 (δ_H 6.09), H-3 (δ_H 7.08), H-4 (δ_H 4.09), H-5 (δ_H 4.39), H-6 (δ_H 1.40), H-7 (δ_H 1.38), H-8 (δ_H 1.35), H-9 (δ_H 1.37), H-10 (δ_H 1.45), H-11 (δ_H 3.74), H-12 (δ_H 1.17) 依次相关, 由此确定化合物 **1** 结构中存在质子之间相互偶合的结构片段 (图 1)。在 HMBC 谱中, H-2 与 C-1、C-4 相关, H-3 与 C-1、C-5 相关, H-4 与 C-6 相关, H-5 与 C-7 相关, H-6 与 C-8 相关, H-7 与 C-9 相关, H-8 与 C-10 相关, H-9 与 C-11 相关, H-10 与 C-12 相关。综上, 鉴定化合物 **1** 的结构为 (+)-4,11-二羟基-十二烯-5-内酯。经 Scifinder 数据库检索, 确定化合物 **1** 为新化合物, 命名为芎孢内酯 A。

表 1 化合物 **1** 的 ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C-NMR 数据 (150 MHz, CD₃OD)

Table 1 ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) and ¹³C-NMR data (150 MHz, CD₃OD) of compound **1**

碳位	δ _C	δ _H
1	166.5	—
2	123.0	6.09 (1H, d, <i>J</i> = 11.4 Hz)
3	147.0	7.08 (1H, dd, <i>J</i> = 11.4, 7.2 Hz)
4	62.4	4.09 (1H, dd, <i>J</i> = 7.2, 3.6 Hz)
5	82.5	4.39 (1H, m)
6	31.1	1.40 (2H, m)
7	26.8	1.38 (2H, m)
8	26.1	1.35 (2H, m)
9	26.7	1.37 (2H, m)
10	40.1	1.45 (2H, m)
11	68.5	3.74 (1H, m)
12	23.5	1.17 (3H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz)

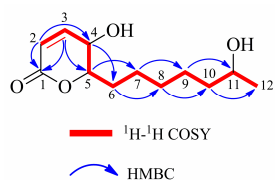


图 1 化合物 1 的主要 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关
Fig. 1 Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compound 1

4 讨论

众所周知, 细菌和真菌产生的次生代谢产物是抗菌药物和其他活性药物的重要来源^[10], 自然界许多内生真菌存在于不同植物中, 且与宿主长期进化中产生与宿主相同或类似的活性化合物^[11]。数百种具有新颖结构的活性次级代谢产物已被报道, 如生物碱、萜类、黄酮类、类固醇、内酯等^[12-13]。其中, 内酯类化合物具有显著的生物活性, 如内生真菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 的代谢产物 allantopyrone A 和 *Penicillium islandicum* Sopp. 的代谢产物岛状酸-II 甲酯对人早幼粒白血病 HL-60 细胞具有良好的细胞毒作用^[14]。红树内生真菌 *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA69 的发酵产物 pestalolide 和 seiridin 对白念珠菌和新生念珠菌有抗真菌活性^[15]。因此, 对罕见的具有合成天然内酯化合物的微生物及其次级代谢产物进行鉴定和探索, 将有助于微生物生产的长期可持续性发展。

本实验以川芎内生真菌 *Alternaria* sp. IS275 为目标菌株, 开展了其发酵液醋酸乙酯提取部位化学成分研究, 从中分离得到 1 个新颖的内酯化合物, 该化合物是由羟基脂肪酸成环形成的六元内酯, 为后续川芎内生真菌的研究提供了参考依据。

参考文献

- [1] Ek-Ramos M J, Gomez-Flores R, Orozco-Flores A A, *et al.* Bioactive products from plant-endophytic gram-positive bacteria [J]. *Front Microbiol*, 2019, doi:10.3389/fmicb.2019.00463.
- [2] Liu J, Wang X, Pu H, *et al.* Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 157: 1113-1124.
- [3] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(4): 491-502.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] Yin D D, Yang M, Wang Y L, *et al.* High tetramethylpyrazine production by the endophytic bacterial *Bacillus subtilis* isolated from the traditional medicinal plant *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. *AMB Express*, 2018, 8: 193.
- [6] 汪杨丽. 川芎内生菌与品质相关性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.
- [7] 李涛, 张智慧, 邓倩, 等. 两面针、川芎、生首乌内生真菌的分离纯化及抑菌性研究 [J]. *食品安全导刊*, 2015, 36: 100-102.
- [8] 马川, 蒙春旺, 彭成, 等. 川芎内生真菌 *Cladosporium* sp. 次级代谢产物及抗菌活性研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(1): 69-74.
- [9] Matsushima Y, Kino J. Synthesis of *N*-Bz-protected *D*-daunosamine and *D*-ristosamine by silica gel promoted intramolecular conjugate addition of trichloroacetimidates obtained from osmundalactone and its epimer [J]. *Eur J Org Chem*, 2010(11): 2206-2211.
- [10] Blin K, Shaw S, Steinke K, *et al.* AntiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, doi: 10.1093/nar/gkz310.
- [11] 郭龙妹, 高林怡, 孙文静, 等. 药用植物内生真菌研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(9): 11-13.
- [12] Guo B Y, Wang Y, Sun X, *et al.* Bioactive natural products from endophytes: A review [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2008, 44(2): 153-158.
- [13] Silva R, Aguiar T Q, Coelho E, *et al.* Metabolic engineering of *Ashbya gossypii* for deciphering the de novo biosynthesis of γ -lactones [J]. *Microb Cell Fact*, 2019, doi: 10.1186/s12934-019-1113-1.
- [14] Shiono Y, Yokoi M, Koseki T, *et al.* Allantopyrone A, a new α -pyrone metabolite with potent cytotoxicity from an endophytic fungus, *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 [J]. *J Antibiotics*, 2010, 63(5): 251-253.
- [15] Klaiklay S, Rukachaisirikul V, Tadpetch K, *et al.* Chlorinated chromone and diphenyl ether derivatives from the mangrove-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA69 [J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(10): 2299-2305.