

• 化学成分 •

落花生根内生真菌 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 中恩镰孢菌素类化合物及生物活性研究

周丽曼, 孙建, 潘柳婷, 郭梦菲, 唐运文, 王聪, 许海棠*, 孔凡栋*

广西民族大学化学化工学院, 林产化学与工程国家民委重点实验室, 广西林产化学与工程重点实验室, 广西林产化学与工程协同创新中心, 广西高校少数民族医药古方挖掘与开发重点实验室, 广西南宁 530006

摘要: 目的 研究落花生根内生真菌 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 的次级代谢产物及其生物活性。方法 使用硅胶色谱柱、高效液相色谱等对代谢粗提物进行分离纯化, 采用质谱、核磁共振等方法测定化合物的结构, 采用 CCK-8 法测试化合物的抗肿瘤细胞活性, 使用表面等离子共振实验 (surface plasmon resonance, SPR) 研究化合物与胆固醇转运蛋白 1 (niemann-pick c1-like 1, NPC1L1) 相互作用关系。结果 从落花生根内生真菌 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 分离得到 6 个化合物, 包括 1 个新化合物 (1) 与 5 个已知化合物: 白僵菌素 (2)、恩镰孢菌素 I (3)、恩镰孢菌素 MK1688 (4)、恩镰孢菌素 H (5) 及恩镰孢菌素 B (6)。化合物 1~4 对 HepG2 细胞和 HeLa 细胞的 IC₅₀ 均小于 10 μmol/L, 化合物 2~4 则对 HCT116 细胞的 IC₅₀ 小于 10 μmol/L, SPR 研究表明化合物 2、4 在 20 μmol/L 浓度下, 可与 NPC1L1 蛋白相互作用。结论 化合物 1 为新的恩镰孢菌素类化合物, 命名为恩镰孢菌素 W。化合物 1~5 具有抗肿瘤活性, 化合物 2、4 与 NPC1L1 蛋白存在相互作用, 可能是 NPC1L1 蛋白的潜在抑制剂。

关键词: 落花生; 尖刀镰孢菌 LHS-P1-3; 恩镰孢菌素; 白僵菌素; 细胞毒活性; NPC1L1 蛋白**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)17-5473-08**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.001Enniatins of endophytic fungus *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 from *Arachis hypogaea* and their bioactivities

ZHOU Li-man, SUN Jian, PAN Liu-ting, GUO Meng-fei, TANG Yun-wen, WANG Cong, XU Hai-tang, KONG Fan-dong

Key Laboratory of universities in Guangxi for Excavation and Development of ancient ethnomedicinal recipes, Guangxi Collaborative Innovation Center for Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, State Ethnic Affairs Commission, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites and biological activities of the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 from *Arachis hypogaea* roots. **Methods** The crude metabolite was separated and purified by silica gel chromatography and high performance liquid chromatography. The structure of the compounds was determined by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The inhibitory activity of the compounds on the proliferation of several tumor cells was tested by cell technology kit-8 (CCK-8). The interaction between compounds and niemann-pick c1-like 1 (NPC1L1) protein was investigated by surface plasmon resonance (SPR) experiment. **Results** A total of six compounds were isolated from the endophytic fungus

收稿日期: 2023-03-10**基金项目:** 广西自然科学基金项目 (2021GXNSFBA220040); 广西自然科学基金项目 (2021GXNSFBA075036); 国家自然科学基金青年项目 (82104034); 广西民族大学校级引进人才科研启动项目 (2020KJQD09, 2021KJQD09); 广西民族大学相思湖青年创新团队 (2021RSCXSHQN01); 广西民族大学研究生创新计划 (gxun-chxs2022086)**作者简介:** 周丽曼, 女, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向为天然产物化学。E-mail: zhouliman88@126.com***通信作者:** 许海棠, 硕士, 高级实验员, 研究方向为天然药物提取及开发。Tel: 15078888280 E-mail: xhthellen@163.com

孔凡栋, 男, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向为天然产物化学。E-mail: kongfandong0127@126.com

Fusarium oxysporum LHS-P1-3. There was one new compound enniatin W (1), and five known compounds beauverine (2), enniatin I (3), enniatin MK1688 (4), enniatin H (5) and enniatin B (6). Compounds 1—4 exhibited IC₅₀ values of less than 10 μmol/L on HepG2 and Hela cells, and compounds 2—4 also inhibited HCT116 activity with IC₅₀ values less than 10 μmol/L. SPR study demonstrated that compounds 2 and 4 could interact with NPC1L1 protein at a concentration of 20 μmol/L. **Conclusion** Compound 1 was a new enniatin benzaldehyde named enniatin W. Compounds 1—5 exhibited strong antitumor activity. Compounds 2 and 4 can interact with NPC1L1 protein and may be potential inhibitors of NPC1L1 protein.

Key words: *Arachis hypogaea* L.; *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3; enniatin; beauverine; cytotoxic activity; NPC1L1 protein

植物内生菌是分布于植物各组织和器官且与植物共生的一类微生物,其中包括内生真菌、放线菌以及细菌等。其中,一些内生菌在长期进化过程中已经和宿主植物形成互惠互利的关系,并且能产生多种次级代谢产物^[1-4]。研究发现,内生菌产生的一些次级代谢产物不仅具有与宿主植物相同或相似的生物活性,甚至有些代谢产物还具有原宿主植物所不具备的新的药理活性^[3]。

豆科 (Leguminosae) 是植物界的第 3 大科,约有 600 属、7000 种,在世界各地广泛分布;我国存在的豆科植物有 131 属、1000 余种,分布于各省区^[6]。豆科植物包括大豆、红豆、绿豆以及落花生等可食用的农作物,还包括甘草、儿茶、鸡血藤以及黄芪等药用植物类。研究发现,药用豆科植物具有一定的降糖、降血压以及抗肿瘤等活性^[7-9]。落花生 *Arachis hypogaea* L., 通称花生,豆科花生属植物,在我国分布十分广泛,是一种较为常见的经济作物。药食同源的落花生不仅可以作为油料作物使用,还可以入药,其内所含的物质具有降血压、降胆固醇、

抗菌以及抗氧化的功效^[10-11]。

植物内生真菌的次级代谢产物研究是药用植物的热点研究方向。目前对药用植物内生真菌的研究较多,然对于根部内生真菌的研究较少。本研究采用梯度稀释法,将从落花生的根部样品中分离得到的一株尖刀镰孢真菌 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 进行发酵培养,采用反相硅胶柱、半制备 HPLC 分离得到 1 个新的化合物恩镰孢菌素 W (enniatiin W, 1) 与 5 个已知化合物白僵菌素 (beauverine, 2)、恩镰孢菌素 I (enniatiin I, 3)、恩镰孢菌素 MK1688 (enniatiin MK1688, 4)、恩镰孢菌素 H (enniatiin H, 5)、恩镰孢菌素 B (enniatiin B, 6), 结构见图 1。细胞毒活性结果显示环状三羧酸肽类结构化合物 1~5 对多株肿瘤细胞显示出抑制活性,而表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 实验结果表明化合物 2 (白僵菌素) 与化合物 4 (恩镰孢菌素 MK1688) 与在肠道胆固醇吸收中起核心作用的胆固醇转运蛋白 1 (niemann-pick c1-like 1, NPC1L1) 具有相互作用,

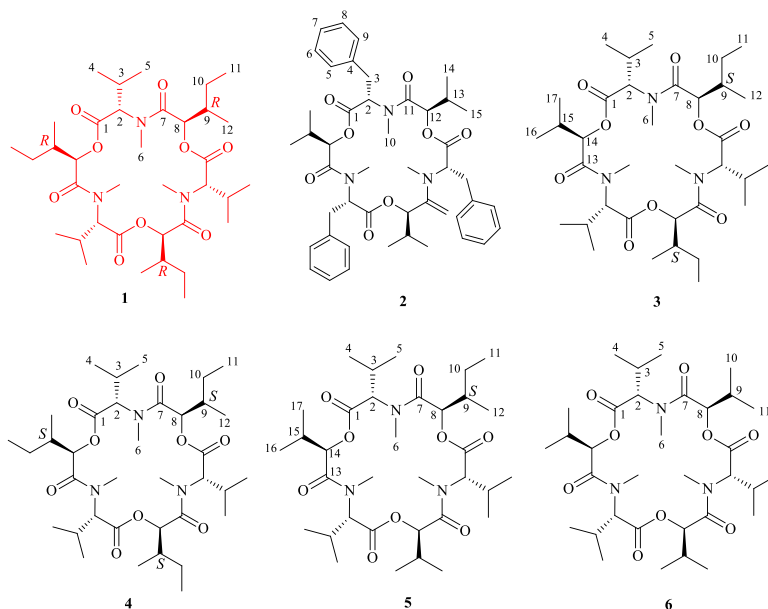


图 1 化合物 1~6 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—6

可能是潜在的胆固醇吸收抑制剂,这是首次报道该类化合物与 NPC1L1 蛋白的相互作用关系。

1 仪器与材料

HCB-1300V 型洁净工作台(青岛海尔特种电器有限公司)、YXQ-LS-75SII 型高压灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、Agilent 1260 HPLC(美国 Agilent 公司)、布鲁克 400MHz 核磁共振仪(Bruker Biospin 有限公司)、AL104 型分析天平(瑞士梅特勒公司)、CO₂ 培养箱(赛默飞 3111)、酶标仪(上海飞世尔实验器材有限公司)、Nacalai tesque COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 型(250 mm×10 mm, 5 μm) 半制备柱。提取分离所用醋酸乙酯、甲醇等溶剂均为工业用化学纯,HPLC 所用甲醇为色谱纯。人肝癌 HepG2 细胞、人肺癌 A549 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞、人结肠癌 HCT116 细胞及人正常肝细胞 L02 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。细胞毒活性测试中阳性对照苏尼替尼(批号 S126061)及盐酸阿霉素(批号 D1515)分别采购自 Aladdin 试剂公司、Sigma-Aldrich 试剂公司。

植物样品采自广西民族大学思源湖校区(N22°50'20", E108°11'29"),由广西民族大学讲师周丽曼鉴定为落花生 *A. hypogaea* L.。本研究大发酵用落花生根内生真菌 LHS-P1-3 综合菌株的生长形态与序列比对(GenBank accession No. MN013975),此菌株鉴定为 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3。

2 方法

2.1 菌株的分离纯化与发酵

选取其中 1 株分离自落花生根部的真菌尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 进行培养。将选定菌株分别接种于装有大米培养基(大米 80 g、自来水 120 mL)、真菌 2 号培养基(甘露醇 6 g、葡萄糖 3 g、酵母膏 0.9 g、味精 3 g、KH₂PO₄ 0.015 g,自来水 300 mL)的锥形瓶中,室温静置培养 30 d,使用大米培养基、真菌 2 号培养基分别发酵了 8 kg、30 L。

2.2 菌株鉴定

对落花生根内生真菌 LHS-P1-3 进行菌株鉴定,进行了菌株基因组 DNA 的提取、扩增、纯化与测序等,该工作由上海生工生物工程股份有限公司完成。使用 NCBI 数据库,比对真菌 ITS 序列,并使用软件 MEGA (Version 7.0) 绘制菌株的系统进化树。

2.3 次级代谢产物的提取分离

发酵完成后,使用醋酸乙酯分别对两种培养基得到的发酵产物进行萃取,减压浓缩萃取液后,大

米培养基得到浸膏共 77.43 g,真菌 2 号培养基得到浸膏共 42.82 g。使用 90%甲醇-石油醚(1:1)分别对浸膏进行分离,其中大米培养基所得浸膏分离的甲醇层粗提物(43.85 g)经正相硅胶柱梯度洗脱,洗脱体系:石油醚-醋酸乙酯(10:1→1:2),共分得 21 个组分 Fr. 1~21。Fr. 6 经半制备 HPLC(乙腈-水 45:55)分离得到化合物 1(6.1 mg, *t_R*=8.2 min)。真菌 2 号培养基得到的浸膏,其甲醇层粗提物(16.97 g)经 C₁₈ 反相硅胶柱梯度洗脱,洗脱体系:甲醇-水(10%→100%),共分得 15 个组分 Jr. 1~15。Jr. 13 经半制备 HPLC,甲醇-水(80:20)分离得到化合物 2(36.2 mg, *t_R*=8 min)、3(15.2 mg, *t_R*=10.5 min)、4(26.3 mg, *t_R*=13 min)。Jr. 12 经半制备 HPLC(甲醇-水 85:15)分离得到化合物 5(33 mg, *t_R*=20 min)和 6(7.8 mg, *t_R*=16 min)。

2.4 电子圆二色谱(electronic circular dichroism, ECD)计算

在 Gaussian 09 软件中使用密度泛函理论(density functional theory, DFT)进行计算^[12]。具体步骤为:使用 hyperchem 软件进行初步构象搜索,在 B3LYP/6-31G(d)水平上进行进一步的几何优化,用 SCRF/PCM 方法在相同的 DFT 水平上评价了甲醇溶液的溶剂效应,用 B3LYP/6-31G(d)下的 TDDFT 计算了化合物甲醇中的电子激发能和旋转强度。

2.5 化合物抗肿瘤和 SPR 分子互作测试

2.5.1 CCK-8 法抗肿瘤活性测试^[13] 取对数生长期的肿瘤细胞,稀释成 8×10³ 个/mL 的细胞悬液,96 孔板中每孔接种 100 μL,于 CO₂ 培养箱中培养 24 h,去除原有培养基并加入 100 μL 含有待测化合物的新鲜培养基,培养箱中培养 48 h,再次去除培养基,加入含有 10% CCK-8 增强型溶液的培养基,继续培养 4 h 后,在 450 nm 处检测其吸光度并计算其抑制率。使用 SPSS 软件计算得出该化合物的半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC₅₀)值。实验过程中,每个测量浓度均设 3 个平行。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5.2 SPR 分子互作测试^[14-15] 使用 Cytia T200 生物分子互作仪进行 SPR 实验。用氨基偶联试剂盒将 NPC1L1 蛋白偶联到 CM5 芯片表面,将 CM5 芯片按照标准仪器程序进行安装和启动后,将 *N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(1-ethyl-3-[3-dimethyl-

aminopropyl] carbodimide hydrochloride, EDC) 以 1:1 的比例混合并运行混合物, 总体积为 200 μL , 体积流量为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 时间为 600 s。然后将 NPC1L1 蛋白在 pH 值为 4.6 的醋酸钠溶液中稀释至 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 蛋白溶液总体积 800 μL , 体积流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 时间为 3000 s。最后, 乙醇胺溶液总体积 200 μL , 体积流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 时间为 420 s。然后, 使用含 1%DMSO 的 PBS-P 缓冲溶液对 CM5 芯片进行预处理。用含 DMSO 的 PBS-P 缓冲液将化合物稀释至 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 确保 DMSO 终浓度为 1%, 体积流量 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, 结合时间 60 s, 解离时间 120 s。

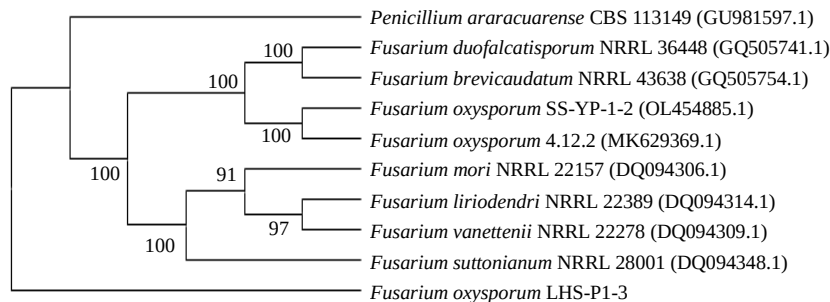


图 2 菌株 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3

3.2 化合物结构鉴定

化合物 **1**: 无色固体 (甲醇), $[\alpha]_D^{25} +164.5$ (c 0.1, CH_3OH), 其正离子高分辨质谱 HR-ESI-MS 在 m/z 704.444 2 (计算值 704.446 2) 给出准分子离子峰 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 提示分子式为 $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_9$ 。化合物 **1** 的 ^{13}C -NMR 和 HSQC 谱图只显示出 12 个碳信号 (表 1), 包括 2 个酯或酰胺羰基 (δ_{C} 167.6, 167.7), 4 个 sp^3 杂化的次甲基其中 2 个含氧或氮 ($\delta_{\text{C}/\text{H}}$ 68.1/4.05, 81.3/4.96), 1 个 sp^3 杂化的亚甲基 ($\delta_{\text{C}/\text{H}}$ 26.8/1.54, 1.45) 和 5 个甲基包括 1 个含氮甲基 ($\delta_{\text{C}/\text{H}}$ 34.5/3.01)。以上数据提示化合物 **1** 具有高度对称的化学结构。仔细对比化合物 **1** 及与其共同分离的已知化合物 **4** 的 ^{13}C -NMR 数据, 发现它们的核磁数据非常相似, 较大区别仅是化合物 **4** 中的含氮次甲基和含氧次甲基信号 (δ 63.8 和 75.2) 在化合物 **1** 中 (δ 68.1 和 81.3) 分别向低场位移 4.3 和 4.9。这说明化合物 **1** 也是 1 个恩镰孢菌素类化合物, 且与 **4** 可能具有相同的平面结构。化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 谱图 (图 3) 给出 H-8/H-9/H-10/H-11/H-12 及 H-2/H-3/H-4 (5) 的相关信号, HMBC 谱图 (图 3) 给出含氮甲基 H_3 -6 与羰基 C-7 及含氮次甲基 C-2、H-2 与羰基 C-1 和 H-8 与羰基 C-2 的相关信号。这

最终结果采用 Biacore T200 进行分析。

3 结果与分析

3.1 菌株的鉴定

菌株 LHS-P1-3 ITS 序列的 PCR 扩增序列的长度为 523 bp, 与 NCBI 数据库中的镰刀菌属中的尖刀镰孢菌在系统发育树上处于同一分支 (图 2)。故将菌株 LHS-P1-3 (GenBank 登录号 OQ391230) 初步鉴定为尖刀镰孢菌。观察其形态特征, 与尖刀镰孢菌的形态特征相一致。故广西民族大学孔凡栋副教授鉴定菌株 LHS-P1-3 为尖刀镰孢菌, 并命名为 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3。

表 1 化合物 **1** 的 NMR 数据 (400/100 MHz, CD_3OD)

Table 1 NMR data of compound **1** (400/100 MHz, CD_3OD)

片段	碳位	δ_{C}	δ_{H}
N-MeVal (3 unit)	1	167.8 $\times$ 3	
	2	68.1 $\times$ 3	4.05 (1H, d, J = 6.0 Hz)
	3	32.8 $\times$ 3	2.35 (1H, m)
	4	20.0 $\times$ 3	1.12 (3H, d, J = 7.2 Hz)
	5	18.3 $\times$ 3	0.95~1.02 (3H, overlapped)
Hmp (3 unit)	6	34.5 $\times$ 3	3.01 (3H, s)
	7	167.6 $\times$ 3	
	8	81.3 $\times$ 3	4.96 (1H, d, J = 2.1 Hz)
	9	38.3 $\times$ 3	2.26 (1H, m)
	10	26.8 $\times$ 3	1.54 (1H, m), 1.45 (1H, m)
	11	12.1 $\times$ 3	0.95~1.02 (3H, overlapped)
	12	13.4 $\times$ 3	0.86 (3H, d, J = 6.7 Hz)

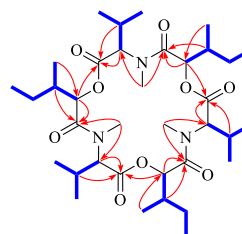


图 3 化合物 **1** 的关键 ^1H - ^1H COSY (→) 和 HMBC (→) 信号

Fig. 3 Key ^1H - ^1H COSY (→) and HMBC (→) signals of **1**

些数据结合分子式证明化合物 **1** 和 **4** 具有相同的平面结构, 均是由 *N*-甲基缬氨酸(*N*-methyl-*DL*-valine, *N*-MeVal) 和 2-羟基-3-甲基戊酸(2-hydroxy-3-methylvaleric acid, Hmp) 组成的。目前文献报道的恩镰孢菌素类化合物均是由镰刀菌属 *Fusarium* sp. 真菌产生的^[16-18], 且这类化合物中 *N*-甲基缬氨酸片段均是 *L* 构型, 而 2-羟基-3-甲基戊酸片段的 C-2 均是 *D* 构型, 故推断化合物 **1** 中的 C-2 和 C-8 位分别为 *S* 和 *R* 构型, 与化合物 **4** 相同。因此, 化合物 **1** 和 **4** 的结构差别很可能是 C-9 位置构型不同。分析对比化合物 **1** 和 **4** 的氢谱发现化合物 **4** 中 H-8 和 H-9 的耦合常数 *J* 为 6.7 Hz, 而化合物 **1** 中 *J*_{H-8/H-9} 为 2.1 Hz。这些差别^[19]进一步确证化合物 **1** 中的 C-9 位构型与化合物 **4** 中不同, 即为 *R* 构型。此外, 化合物 **1** 和 **4** 实测 ECD 曲线差别较大(图 4), 也证明它们具有不同的立体构型。在以上基础上, 使用 Gaussian 09 软件对上述推断的 **1** 的构型进行了 ECD 计算, 计算结果和实测 ECD 数据具有较好拟合, 进一步确证化合物 **1** 的 C-9 位绝对构型为 *R* 型, 经结构检索确认为新化合物, 命名为恩镰孢菌素 W (enniatin W)。

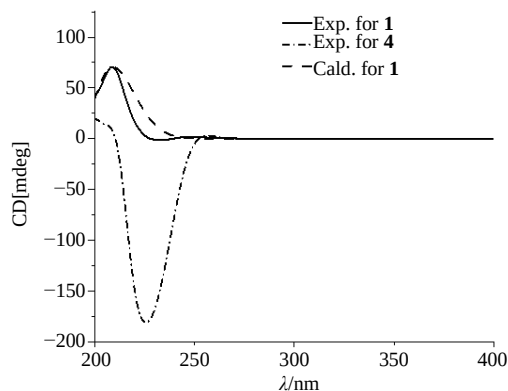


图 4 化合物 **1** 实测及计算 ECD 曲线及化合物 **4** 的实测 ECD 曲线

Fig. 4 Experimental and calculated ECD curves of **1** and experimental ECD curve of **4**

化合物 **2**: 棕色油状物(甲醇), ESI-MS *m/z* 806.5 [*M*+*Na*]⁺, 分子式 C₄₅H₅₇N₃O₉, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.15~7.21 (1H, overlapped, H-5×3, H-6×3, H-7×3, H-8×3, H-9×3), 5.80 (1H, dd, *J* = 12.1, 4.0 Hz, H-2×3), 4.84 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-12×3), 3.39 (1H, dd, *J* = 14.3, 12.1 Hz, H-3×3), 3.14 (3H, s, 10-NCH₃×3), 1.81, (1H, m, H-13×3), 0.85 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-15×3), 0.25 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-14×3); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 173.0

(C=O, C-11×3), 170.9 (C=O, C-1×3), 137.9 (C, C-4×3), 129.8 (CH, C-5×3, C-9×3), 129.7 (CH, C-6×3, C-8×3), 128.0 (CH, C-7×3), 77.2 (CH, C-12×3), 57.8 (CH, C-2×3), 35.4 (CH₂, C-3×3), 32.2 (NCH₃, C-10×3), 31.2 (CH, C-13×3), 19.1 (CH₃, C-14×3), 17.2 (CH₃, C-15×3)。这些数据结合相对分子质量推断化合物 **2** 结构中共有 3 个 *N*-MeVal 和 3-甲基丁酸(3-methyl-butanoic acid, Hiv) 片段。最终通过和文献数据^[20]比对鉴定化合物 **2** 为白僵菌素。

化合物 **3**: 无色油状物(甲醇), ESI-MS *m/z* 690.5 [*M*+*Na*]⁺, 分子式 C₃₅H₆₁N₃O₉, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.41 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-8), 5.35 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-8), 5.24 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-14), 4.75 (1H, m, H-2×3), 3.20 (3H, s, 6-NCH₃), 3.18 (3H, s, 6-NCH₃), 3.17 (3H, s, 6-NCH₃), 2.28 (1H, overlapped, H-3×3, H-15), 2.20 (1H, m, H-9), 1.47 (1H, m, H-10a), 1.25 (1H, m, H-10b), 1.08 (3H, m, H-4×3), 0.91-1.05 (3H, overlapped, H-5×3, H-11×2, H-12×2, H-16, H-17); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 172.1 (C=O, C-1×3), 172.0 (C=O, C-7×2), 171.8 (C=O, C-13), 76.7 (CH, C-14), 75.3 (CH, C-8), 75.1 (CH, C-8), 63.8 (CH, C-2), 63.7 (CH, C-2×2), 37.8 (CH, C-9), 37.7 (CH, C-9), 33.1 (NCH₃, C-6), 32.8 (NCH₃, C-6), 32.7 (NCH₃, C-6), 31.4 (CH, C-15), 29.4 (CH, C-3), 29.3 (CH, C-3), 29.2 (CH, C-3), 26.5 (CH₂, C-10×2), 20.6 (CH₃, C-4×2), 20.5 (CH₃, C-4), 20.3 (CH₃, C-5×2), 20.2, (CH₃, C-5), 18.9 (CH₃, C-17), 18.7 (CH₃, C-16), 15.1 (CH₃, C-12×2), 11.8 (CH₃, C-11×2)。经过分析, 此化合物由 3 个 *N*-MeVal、2 个 Hmp、1 个 Hiv 组成, 以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **3** 为恩镰孢菌素 I。

化合物 **4**: 黄色油状物(甲醇), ESI-MS *m/z* 704.5 [*M*+*Na*]⁺, 分子式 C₃₆H₆₃N₃O₉, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.42 (1H, d, *J* = 6.7 Hz, H-8×3), 4.77 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2×3), 3.19 (3H, s, 6-NCH₃×3), 2.31 (1H, m, H-3×3), 1.98 (1H, m, H-9×3), 1.49 (2H, m, H-10×2), 1.28 (3H, m, H-10), 1.10 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-4×3), 0.94~1.04 (3H, overlapped, H-5×3, H-11×3, H-12×3); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 171.9 (C=O, C-1×3), 171.7 (C=O, C-7×3), 75.2 (CH, C-8×3), 63.8 (CH, C-2×3), 37.7 (CH, C-9×3), 32.8 (NCH₃, C-6×3), 29.2 (CH, C-3×3),

26.5 (CH₂, C-10×3), 20.5 (CH₃, C-4×3), 20.2 (CH₃, C-5×3), 15.1 (CH₃, C-12×3), 11.8 (CH₃, C-11×3)。经过分析, 此化合物由 3 个 *N*-MeVal, 3 个 Hmp 组成, 以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 4 为恩镰孢菌素 MK1688。

化合物 5: 白色固体 (甲醇), ESI-MS *m/z* 676.5 [M+Na]⁺, 分子式 C₃₄H₅₉N₃O₉, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 5.38 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H-8), 5.27 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-14), 5.22 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-14), 4.70 (1H, overlapped, H-2×3), 3.22 (3H, s, 6-*N*CH₃), 3.20 (3H, s, 6-*N*CH₃), 3.18 (3H, s, 6-*N*CH₃), 2.29 (1H, overlapped, H-3×3, H-15×2), 2.21 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-10), 1.26 (1H, m, H-10), 1.09 (3H, m, H-4×3), 0.91~1.05 (3H, overlapped, H-4×3, H-5×3, H-11, H-12, H-16×2, H-17×2); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 172.3 (C=O, C-1×3), 172.2 (C=O, C-7), 172.0 (C=O, C-13×2), 76.8 (CH, C-14), 76.6 (CH, C-14), 75.1 (CH, C-8), 63.9 (CH, C-2), 63.8, (CH, C-2), 63.7 (CH, C-2), 37.7 (CH, C-9), 33.2 (NCH₃, C-6), 33.0 (NCH₃, C-6), 32.8 (NCH₃, C-6), 31.5 (CH, C-15), 31.4 (CH, C-15), 29.4 (CH, C-3), 29.3 (CH, C-3), 29.2 (CH, C-3), 26.6 (CH₂, C-10), 20.7 (CH₃, C-4), 20.6 (CH₃, C-4), 20.5 (CH₃, C-4), 20.4 (CH₃, C-5), 20.3 (CH₃, C-5×2), 19.0 (CH₃, C-16), 18.9 (CH₃, C-16), 18.8 (CH₃, C-17×2), 15.1 (CH₃, C-12), 11.8 (CH₃, C-11)。经过分析, 此化合物由 3 个 *N*-MeVal、1 个 Hmp、2 个 Hiv 组成, 以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 5 为恩镰孢菌素 H。

化合物 6: 白色晶体 (甲醇), ESI-MS *m/z* 662.5 [M+Na]⁺, 分子式 C₃₃H₅₇N₃O₉, ¹H-NMR (400 MHz,

CD₃OD) δ: 5.22 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8×3), 4.70 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-2×3), 3.21 (3H, s, 6-*N*CH₃×3), 2.25~2.34 (1H, overlapped, H-3×3), 2.16-2.25 (3H, overlapped, H-9×3), 1.09 (3H, d, *J* = 7.9 Hz, H-4×3), 1.03 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, H-11×3), 0.98 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, H-10×3), 0.95 (3H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5×3); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 172.1 (C=O, C-1×3), 171.7 (C=O, C-7×3), 76.7 (CH, C-8×3), 63.8 (CH, C-2×3), 33.2 (NCH₃, C-6×3), 31.4 (CH, C-15×3), 29.4 (CH, C-3×3), 20.7 (CH₃, C-4×3), 20.4 (CH₃, C-5×3), 19.0 (CH₃, C-10×3), 18.8 (CH₃, C-11×3)。经过分析, 此化合物由 3 个 *N*-MeVal, 3 个 Hiv 组成。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 6 为恩镰孢菌素 B。

3.3 细胞毒活性测试

测试化合物 1~6 对 HepG2 细胞、A549 细胞、Hela 细胞、HCT116 细胞共 4 种肿瘤细胞及人正常肝细胞 L02 的细胞毒活性。结果表明, 化合物 1~4 均对 HepG2 细胞和 HeLa 细胞显现出一定的抑制活性 (IC₅₀<10 μmol/L), 且对于 HepG2 细胞的活性均优于阳性药苏尼替尼; 化合物 2~4 于 HCT116 细胞有一定的抑制活性, 且活性均优于苏尼替尼; 化合物 2 对于 HeLa 细胞的抑制活性也优于苏尼替尼 (表 2)。

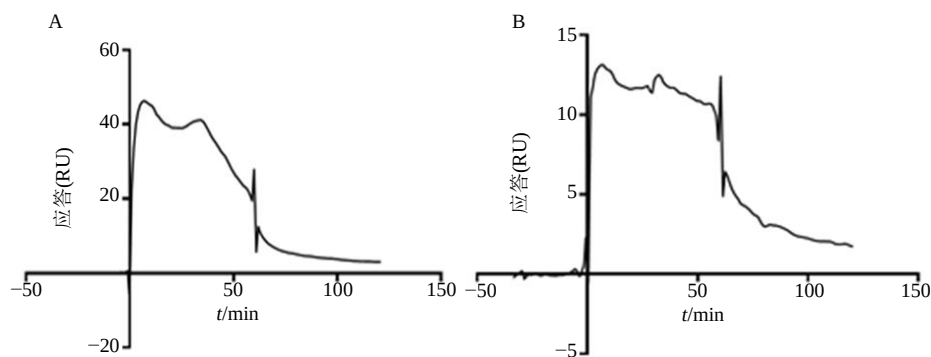
3.4 NPC1L1 蛋白活性测试

使用 SPR 技术测试 6 种化合物进行与固定化 NPC1L1 蛋白的相互作用, 结果显示化合物 2 (白僵菌素) 与化合物 4 (恩镰孢菌素 MK1688) 在 20 μmol/L 浓度下与 NPC1L1 蛋白能够相互结合并存在分子互作 (图 5), 因此白僵菌素和恩镰孢菌素 MK1688

表 2 化合物 1~6 对 4 种肿瘤细胞及 L02 细胞半数抑制浓度

Table 2 IC₅₀ values of compounds 1—6 on four tumor cells and L02 cells

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)				
	HepG2细胞	A549细胞	HeLa细胞	HCT116细胞	L02细胞
1	5.87±0.22	11.62±1.06	9.21±0.18	20.93±1.83	8.78±0.15
2	6.20±0.18	10.29±0.58	3.95±0.04	4.93±0.14	5.43±0.14
3	7.41±0.54	12.25±1.60	7.11±1.39	5.20±0.32	4.38±0.34
4	7.24±0.35	13.51±0.61	7.02±0.22	8.03±0.52	6.47±0.25
5	20.62±0.42	32.12±1.94	13.68±0.34	13.67±0.19	9.07±1.08
6	49.39±6.28	>50	>50	24.87±5.29	>50
苏尼替尼	8.24±0.34	8.95±0.82	4.12±0.46	9.99±0.25	12.91±0.02
阿霉素	0.34±0.04	2.52±0.24	0.07±0.01	1.67±0.34	1.19±0.12



A-化合物 2 与固定化 NPC1L1 蛋白的相互作用 B-化合物 4 与固定化 NPC1L1 蛋白的相互作用
A-interaction of compound 2 with immobilized NPC1L1 protein B-interaction of compound 4 with immobilized NPC1L1 protein

图 5 化合物与 NPC1L1 蛋白的结合传感曲线

Fig. 5 Binding sensing curve of compounds and NPC1L1 protein

可能为具有开发为胆固醇吸收抑制剂的潜力。

4 讨论

植物内生真菌是中草药研究的一个重要研究方向。本研究从落花生根内生真菌 *Fusarium oxysporum* LHS-P1-3 中分离得到 6 种化合物，均为环状三羧酸肽类结构化合物，其中化合物 1 为新结构化合物。化合物 1~5 均表现出一定的抗肿瘤活性。化合物 2 即白僵菌素曾被发现具有多种生物活性，如对人类、动物和植物的多种致病细菌、病毒有抑制作用，且其抗肿瘤活性也曾多次被报道，而其抗肿瘤活性可能与其破坏细胞超微结构有关^[23]，本研究发现白僵菌素对于 HepG2、HeLa 和 HCT116 细胞的体外抑制活性优于苏尼替尼。恩镰孢菌素 I (3)、恩镰孢菌素 MK1688 (4) 及恩镰孢菌素 H (5) 也曾被报道有抗菌、抗体外 HIV-1 病毒及抗肿瘤作用^[24]，本研究发现化合物 3 和 4 对于 HepG2 及 HCT116 细胞的体外抑制活性也优于苏尼替尼。恩镰孢菌素 B (6) 针对本研究中的 4 种肿瘤细胞来说，抗肿瘤活性明显弱于化合物 1~5，这可能与其取代基中的结构改变而影响与作用靶点的相互作用进而影响了细胞毒活性有关。

NPC1L1 蛋白在肠道胆固醇吸收中起核心作用，抑制 NPC1L1 蛋白可减少人体对胆固醇的吸收，从而降低罹患心脑血管疾病风险。本研究首次发现环状三羧酸肽类结构白僵菌素 (2) 与恩镰孢菌素 MK1688 (4) 能与 NPC1L1 蛋白结合并存在相互作用，可能为 NPC1L1 蛋白的潜在抑制剂，具有开发为胆固醇吸收抑制剂的潜力。

本研究拓展了对于植物内生真菌次级代谢研究

的丰富度，对药用植物落花生根内生真菌的次生代谢进行研究，也为环状三羧酸肽类结构化合物的生物活性探索研究提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 方珍娟, 张晓霞, 马立安. 植物内生菌研究进展 [J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2018, 15(10): 41-45.
- [2] Zhang J, Zhu Y H, Si J P, et al. Metabolites of medicine food homology-derived endophytic fungi and their activities [J]. *Curr Res Food Sci*, 2022, 5: 1882-1896.
- [3] Zhang J H, Lu J M, Zhu Y C, et al. Roles of endophytic fungi in medicinal plant abiotic stress response and TCM quality development [J]. *Chin Herb Med*, 2023, doi: 10.1016/j.chmed.2023.02.006.
- [4] Ouyang Y, Cheng Q Q, Cheng C S, et al. Effects of plants-associated microbiota on cultivation and quality of Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2023, doi:10.1016/j.chmed.2022.12.004.
- [5] 张国荣, 翟丽霞, 王燕萍, 等. 药用植物内生菌次级代谢产物药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2021, 32(7): 880-884.
- [6] 黎春花, 刘国道. 豆科植物应用价值综述 [J]. 热带农业科学, 2008, 28(4): 75-80.
- [7] 孙士红, 孟丹, 陈艳. 豆科植物降糖作用研究进展 [J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(17): 222-223.
- [8] 邹忠梅, 陈林, 丁刚, 等. 豆科药用植物中的抗肿瘤活性成分 [J]. 河南大学学报: 医学版, 2012, 31(2): 77-82.
- [9] Zhou Z Y, Liu X, Cui J L, et al. Endophytic fungi and their bioactive secondary metabolites in medicinal Leguminosae plants: Nearly untapped medical resources [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2022, 369(1): fnac052.
- [10] 张慧清, 冯锋, 谢宁, 等. 落花生化学成分及药理作用

- 研究 [J]. 中南药学, 2010, 8(1): 45-48.
- [11] Makau J N, Watanabe K, Mohammed M M D, *et al.* Antiviral activity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin extract against human influenza viruses [J]. *J Med Food*, 2018, 21(8): 777-784.
- [12] Sai C M, Li D H, Xue C M, *et al.* Two pairs of enantiomeric alkaloid dimers from *Macleaya cordata* [J]. *Org Lett*, 2015, 17(16): 4102-4105.
- [13] 王聪, 王立平, 范杰, 等. 深海链霉菌 *Streptomyces malaysiensis* OUCMDZ-2167 来源的细胞毒性产物 [J]. 有机化学, 2017, 37(3): 658-666.
- [14] Zhang R S, Song Z M, Wang X T, *et al.* One-step modification to identify dual-inhibitors targeting both pancreatic triglyceride lipase and Niemann-Pick C1-like 1 [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 216: 113358.
- [15] Zhang R, Liu W, Zeng J, *et al.* Niemann-Pick C1-like 1 inhibitors for reducing cholesterol absorption [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 230: 114111.
- [16] Krause M, Lindemann A, Glinski M, *et al.* Directed biosynthesis of new enniatins [J]. *J Antibiot*, 2001, 54(10): 797-804.
- [17] Bunyapaiboonsri T, Vongvilai P, Auncharoen P, *et al.* Cyclohexadepsipeptides from the filamentous fungus *Acremonium* sp. BCC 2629 [J]. *Helv Chim Acta*, 2012, 95(6): 963-972.
- [18] Tian J, Han J J, Zhang X, *et al.* New cyclohexadepsipeptides from an entomogenous fungus *Fusarium proliferatum* and their cytotoxicity and autophagy-inducing activity [J]. *Chem Biodivers*, 2016, 13(7): 852-860.
- [19] Snowden R L, Grenno R, Vial C. Synthesis and organoleptic properties of various 3-methyl-2-oxopentanoates, 2-hydroxy-3-methylpentanoates, and 2-acyloxy-3-methylpentanoates [J]. *Flavour Fragr J*, 2005, 20(4): 372-380.
- [20] Hyuk-Hwan S, Joong-Hoon A, Yoong-ho L, *et al.* Analysis of beauvericin and unusual enniatins co-produced by *Fusarium oxysporum* FB1501 (KFCC 11363P) [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, 16: 1111-1119.
- [21] Nilanonta C, Isaka M, Chanphen R, *et al.* Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum*: Isolation and studies on precursor-directed biosynthesis [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(7): 1015-1020.
- [22] Hasan A, Lu C F, Nijat D, *et al.* Chemical constituents of *Euphorbia glomerulans* [J]. *Chem Nat Compd*, 2021, 57(2): 353-354.
- [23] Mallebrera B, Prosperini A, Font G, *et al.* *In vitro* mechanisms of Beauvericin toxicity: A review [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 111: 537-545.
- [24] Shin C G, An D G, Song H H, *et al.* Beauvericin and enniatins H, I and MK1688 are new potent inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase [J]. *J Antibiotics*, 2009, 62(12): 687.

[责任编辑 王文倩]