

海绵共生木霉属真菌绿木霉中 1 个新的倍半萜类化合物

张璐^{1,2}, 刘辰鹏¹, 王瑞琪¹, 焦伟华², 张小坡^{1*}

1. 海南医学院药学院, 海南 海口 571199

2. 上海交通大学医学院附属仁济医院 药学部海洋药物研究中心 (癌基因及相关基因国家重点实验室), 上海 200127

摘要: **目的** 研究海绵共生真菌绿木霉 (*Trichoderma virens* CMB-TN16) 的次级代谢产物及其肿瘤细胞毒活性。**方法** 利用硅胶柱色谱、半制备液相色谱等现代色谱技术方法进行分离纯化, 结合核磁共振和质谱等现代谱学手段鉴定化合物结构, 同时通过体外 MTT 法测定化合物的肿瘤细胞毒活性。**结果** 从海绵共生真菌绿木霉醋酸乙酯提取物中分离得到 7 个倍半萜类化合物, 分别鉴定为二绿木霉烯醇 H (1)、二绿木霉烯醇 D (2)、二绿木霉烯醇 G (3)、黏埽霉酸 (4)、(+)-氢化萆烯七脂酸 (5)、(+)-3-*O*-乙酰萆烯七脂酸 A (6) 和木聚酸 D (7)。化合物 1 体外对人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞、人骨髓瘤 NCI-H929 细胞及人结肠癌 SW620 细胞的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 值分别为 11.8、7.7 和 13.5 μmol/L。**结论** 化合物 1 为新化合物, 对以上 3 株肿瘤细胞具有一定的细胞毒活性。

关键词: 海绵; 绿木霉; 倍半萜; 抗肿瘤; 细胞毒活性; 二绿木霉烯醇 H; (+)-3-*O*-乙酰萆烯七脂酸

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)18-5840-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.002

A new sesquiterpenoid from *Trichoderma virens*, a marine sponge symbiotic *Trichoderma* sp. fungus

ZHANG Lu^{1,2}, LIU Chen-peng¹, WANG Rui-qi¹, JIAO Wei-hua², ZHANG Xiao-po¹

1. School of Pharmaceutical Science, Hainan Medical University, Haikou 571199, China

2. State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Department of Pharmacy, Research Center for Marine Drugs, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of a marine sponge symbiotic fungus *Trichoderma virens* CMB-TN16 and their antitumor cytotoxic activity. **Methods** The compounds were isolated and purified from EtOAc extract of CMB-TN16 by modern chromatography techniques, such as silica gel column chromatography, and semi-preparative high performance liquid chromatography, and their chemical structures were identified by NMR and MS spectrometry. Meanwhile, the antitumor cytotoxic activity of these compounds was evaluated by MTT method *in vitro*. **Results** Seven sesquiterpenoids were isolated from the EtOAc extract of CMB-TN16, and identified as divirensol H (1), divirensol D (2), divirensol G (3), gliocladic acid (4), hydroheptelidic acid (5), 3-*O*-acetylheptelidic acid A (6) and xylaric acid D (7), respectively. The IC₅₀ values of compound 1 against NCI-H460, NCI-H929 and SW620 were 11.8, 7.7, and 13.5 μmol/L, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, and have exhibited moderate cytotoxic activities against three tumor cell lines.

Key words: marine sponge; *Trichoderma virens*; sesquiterpenoid; antitumor; cytotoxic activity; divirensol H; 3-*O*-acetylheptelidic acid A

由于海洋微生物生存环境的特殊性, 其生态系统的高压、高盐、低氧、低温、无光照等特点, 形成了有别于陆地微生物的独特的新陈代谢途径、生殖繁殖方式、适应机制, 造就了海洋微生物更为

丰富多样、结构新颖特殊且活性显著的天然代谢产物^[1-3]。近年来, 海洋微生物来源的天然产物得到研究人员的广泛关注, 为先导化合物的发现和结构优化、海洋创新药物及海洋中药的研究及开发等

收稿日期: 2023-05-14

基金项目: 海南省科技重大专项 (ZDKJ2021036)

作者简介: 张璐, 女, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究。Tel: (0898)66893826 E-mail: 714091691@qq.com

*通信作者: 张小坡, 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为天然药物化学。Tel: (0898)66893826 E-mail: z_xp1412@163.com

创造有利条件, 海洋微生物来源天然产物已成为新药研发先导化合物的重要宝库和主要来源^[4-6]。

海绵资源是研究共附生微生物的重要资源之一, 越来越多的证据揭示海绵共附生微生物是其宿主中很多次级代谢产物的真正生产者, 也成为当前国内外海洋新药开发的研究热点^[7-9]。课题组从中国南海的海绵 *Dysidea* sp. 中获得其 1 株木霉属共生微生物绿木霉 *Trichoderma virens*-CMB-TN16。文献研究表明, 海洋中的木霉属真菌含有丰富的萜类、聚酮、肽类等, 其中萜类是其特征性成分且具有细胞毒、抗病原菌、抗菌、杀虫等多种生物活性而受到广泛关注^[10-11]。课题组前期肿瘤细胞毒活性筛选发现 1 株中国南海海绵共生菌绿木霉

CMB-TN16 醋酸提取物外具有一定的肿瘤细胞毒活性, 为了更深入地研究绿木霉 CMB-TN16 的特征性次级代谢产物, 对其醋酸乙酯中潜在的抗肿瘤活性化学成分进行研究, 并分离得到 7 个倍半萜类化合物 (图 1), 分别鉴定为二绿木霉烯醇 H (divirensol H, **1**)、二绿木霉烯醇 D (divirensol D, **2**)、二绿木霉烯醇 G (divirensol G, **3**)、黏帚霉酸 (gliocladic acid, **4**)、(+)-氢化萜烯七脂酸 (hydroheptelidic acid, **5**)、(+)-3-*O*-乙酰萜烯七脂酸 (3-*O*-acetylheptelidic acid A, **6**) 和木聚酸 D (xylaric acid D, **7**)。同时, 对所得化合物进行了体外抗肿瘤细胞活性筛选, 以期发现具有抗肿瘤活性的化合物, 为其后期的进一步研究提供基础。

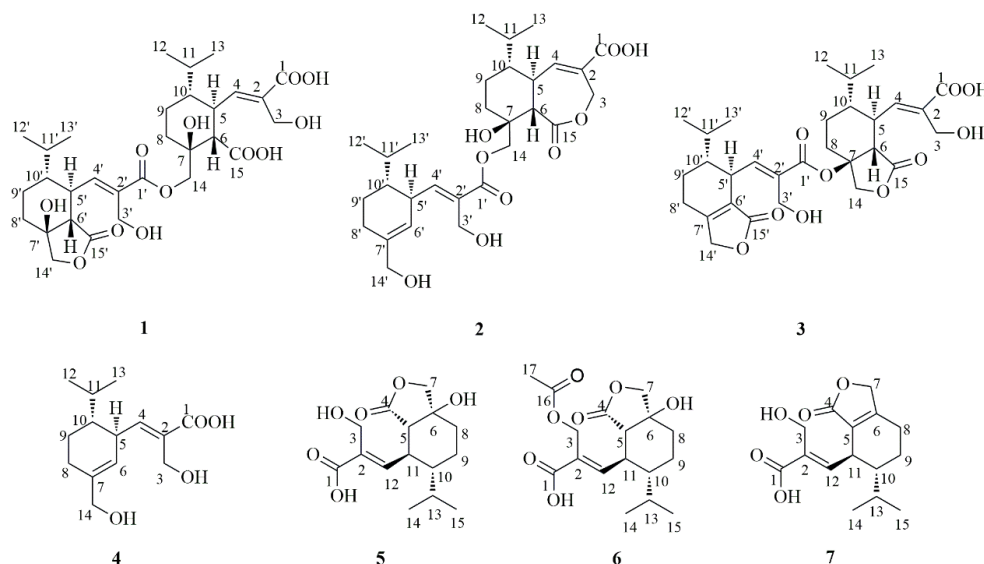


图 1 化合物 1~7 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—7

1 仪器与材料

1.1 仪器

Bruker-AVANCE600 NMR 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司), 赛默飞 LTQ 液质离子阱质谱仪液质联用仪 (赛默飞公司), Chirascan CD 圆二色谱仪 (英国应用光物理公司), 高效液相色谱用岛津液相色谱 LC-16 系统, 配置 SPD-16 检测器和 YMC 柱 (ODS, 250 mm×2.5 mm, 5 μm, 日本岛津公司), 薄层色谱硅胶板 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20 凝胶柱填料 (Healthcare 公司), 柱色谱硅胶粉 200~300 目 (青岛海洋化工厂), 所用试剂为分析纯 (西陇科学股份有限公司) 或色谱纯 (天津康科德科技有限公司), DMEM 和 RPMI Medium 1640 培养基、胎牛血清、胰酶溶液、PBS

均购自美国 Gibco 公司, 人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞、人骨髓瘤 NCI-H929 细胞及人结肠癌 SW620 细胞购自中国科学院细胞生物学研究所细胞库。棟酰胺 (批号 64166) 购自 Med-ChemExpress 公司。

1.2 真菌来源与发酵

从中国南海海域的海绵 *Dysidea* sp. 样品中分离得到的菌株 CMB-TN16, 经 ITS 测序鉴定为木霉属真菌绿木霉 *Trichoderma virens*。将菌株接种于 PDA 液体培养基中, 在 28 °C、180 r/min 的摇床上培养 7 d; 然后切成 1 cm×1 cm 的小块作为种子进行发酵, 接种于 10×1 L 的大米培养基中, 室温静置培养 30 d。

2 提取与分离

在室温下, 用醋酸乙酯提取所得培养物, 直到

醋酸乙酯相变为无色或浅色。有机相通过滤纸滤过, 蒸发干燥, 得到粗提取物。粗提取物 (7.2 g) 经正相硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇 (100:0~0:100) 为流动相梯度洗脱, 得 15 个流份 (Fr. A~O)。根据 UPLC-MS 分析所得流份中的化学成分, 对可能含有特征性倍半萜成分的流份 Fr. D 和 Fr. I 开展进一步深入的分离纯化。Fr. D (67.1 mg) 经半制备高效液相色谱, 以 57% 乙腈-水 (3.0 mL/min) 等度洗脱, 得到化合物 **1** (2.5 mg, t_R 16.0 min) 和 **3** (8.8 mg, t_R = 23.0 min)。对 Fr. I (1.78 g) 进行反相固相色谱 (GracePure C₁₈-Max, 从石油醚-醋酸乙酯-甲醇 4:5:1 开始梯度洗脱 (梯度变化: 甲醇含量为 10%、20%、40%、60%、80%、100%)) 洗脱, 得到 10 个亚组分 Fr. II~I10。Fr. I7 (88.7 mg) 经半制备高效液相色谱 46% 乙腈-水等度洗脱 (3.0 mL/min) 分离纯化得到化合物 **2** (9.8 mg, t_R = 13.0 min)。Fr. I8 (88.7 mg) 经半制备高效液相色谱 48% 乙腈-水等度洗脱 (3.0 mL/min) 分离纯化, 得到化合物 **4** (4.4 mg, t_R = 24.0 min)、**5** (8.2 mg, t_R = 28.0 min)、**6** (1.6 mg, t_R = 30.0 min) 和 **7** (1.1 mg, t_R = 33.0 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色胶状物, 易溶于甲醇、三氯甲烷等有机试剂, $[\alpha]_D^{25} + 19.3$ (c 0.15, MeOH);

UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 191 (1.17), 210 (0.93), 243 (0.26)。通过 HR-ESI-MS m/z 619.264 5 $[M+Na]^+$ (calcd for C₃₀H₄₄NaO₁₂, 619.264 5), 推测化合物 **1** 的分子式为 C₃₀H₄₄O₁₂, 计算其不饱和度为 9。化合物 **1** 的 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) (表 1) 谱中显示 4 个甲基氢信号 δ_H 0.93 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-12), 0.81 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-13), 0.77 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-12') 和 0.97 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-13'); 8 个亚甲基氢信号 δ_H 4.32 (2H, t, J = 8.4 Hz, H-3), 2.29 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-8 α), 1.43 (1H, m, H-8 β), 1.67 (1H, m, H-9 α), 1.27 (1H, m, H-9 β), 4.61 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-14 α), 4.41 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-14 β), 4.28 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-3' α), 4.15 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-3' β), 1.78 (1H, m, H-8' α), 2.02 (1H, d, J = 13.8 Hz, H-8' β), 1.64 (1H, m, H-9' α), 1.26 (1H, m, H-9' β), 4.47 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-14' α), 4.07 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-14' β); 以及 10 个次甲基氢信号 δ_H 6.51 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-4), 2.70 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-5), 2.58 (1H, d, J = 11.4 Hz, H-6), 1.36 (1H, m, H-10), 1.75 (1H, m, H-11), 6.71 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-4'), 2.92 (1H, m, H-5'), 2.14 (1H, d, J = 11.4 Hz, H-6'), 1.38 (1H, m, H-10'), 1.75 (1H, m, H-11')。结合 ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) (表 1) 和 HSQC 谱, 该化合物显示 30 个碳信号, 包括 4 个特征性甲基碳信号 δ_C 20.6

表 1 化合物 **1** 的 ¹H-和 ¹³C-NMR 数据 (600/150 MHz, CD₃OD)
Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data of compound **1** (600/150 MHz, CD₃OD)

碳位	δ_H	δ_C	碳位	δ_H	δ_C
1		167.3	1'		167.3
2		133.7	2'		133.7
3	4.32 (t, J = 8.4 Hz)	56.7	3'	4.28 (d, J = 12.0 Hz), 4.15 (d, J = 12.0 Hz)	56.7
4	6.51 (d, J = 10.8 Hz)	145.7	4'	6.71 (d, J = 10.8 Hz)	145.2
5	2.70 (d, J = 9.6 Hz)	40.7	5'	2.92 (m)	40.8
6	2.58 (d, J = 11.4 Hz)	58.6	6'	2.14 (d, J = 11.4 Hz)	52.8
7		72.3	7'		75.4
8	2.29 (d, J = 12.6 Hz), 1.43 (m)	35.0	8'	1.78 (m), 2.02 (d, J = 13.8 Hz)	31.9
9	1.67 (m), 1.27 (m)	20.9	9'	1.64 (m), 1.26 (m)	21.1
10	1.36 (m)	46.8	10'	1.38 (m)	46.8
11	1.75 (m)	28.6	11'	1.75 (m)	28.5
12	0.93 (d, J = 7.2 Hz)	20.6	12'	0.77 (d, J = 6.6 Hz)	15.0
13	0.81 (d, J = 6.6 Hz)	15.1	13'	0.97 (d, J = 6.6 Hz)	20.9
14	4.61 (d, J = 12.0 Hz), 4.41 (d, J = 12.0 Hz)	75.4	14'	4.47 (d, J = 9.6 Hz), 4.07 (d, J = 9.6 Hz)	75.4
15		173.9	15'		173.9

(C-12), 15.1 (C-13), 15.0 (C-12'), 20.9 (C-13'); 8个亚甲基碳信号 δ_c 56.7, 35.0, 20.9, 75.4, 56.7, 31.9, 21.2, 75.4; 10个次甲基碳信号 δ_c 145.7, 40.7, 58.6, 46.8, 28.6, 145.2, 40.8, 52.8, 46.8, 28.5; 以及8个季碳信号 δ_c 167.3, 133.7, 72.3, 173.9, 167.3, 133.7, 75.4, 173.9。1D NMR 数据推测化合物 **1** 为1个倍半萜二聚体类结构。在 ^1H - ^1H COSY 谱中(图2), H-5与H-4, H-6和H-10存在相关, H-9与H-8和H-10存在相关, H-11与H-10, H-12/H-13存在相关; H-5'与H-4', H-6'和H-10'存在相关, H-9'与H-8'和H-10'存在相关, H-11'与H-10', H-12'/H-13'存在相关。在HMBC谱中(图2), H-11'与C-5'、C-8'、C-10'、C-12'以及C-13'存在相关, H-13'与C-10'、C-11'和C-12'存在相关, H-11与C-5、C-8、C-10、C-12以及C-13存在相关, H-13与C-10、C-11和C-12存在相关, 表明2个异丙基分别连接在C-10'/C-10位。同时, H-14 α '与C-7'和C-8'存在HMBC相关, H $_{2\beta}$ -14'与C-7'和C-15'存在HMBC相关, H-6'与C-5'和C-7'存在HMBC相关, 表明在C-6'存在内酯环结构。综合比较1D NMR数据和2D NMR谱(图2), 化合物**1**与二绿木霉烯醇(divirensols) A~G具有相同的倍半萜二聚体类骨架^[12]。进一步分析2D NMR谱(图2), 化合物**1**与已知化合物二绿木霉烯醇A具有非常相似的结构, 唯一不同的是二绿木霉烯醇A中C-7'/C-6'烯碳信号在化合物**1**中缺失, 结合化合物的分子式和不饱和度, 判断化合物**1**中在C-7'/C-6'不存在双键。同时, 化合物**1**中C-7'位的化合位移较二绿木霉烯醇A中C-7'(δ_c 165.2)向高场显著迁移至 δ_c 75.4, 结合其相对分子质量, 判断化合物**1**中C-7'位有羟基取代。

化合物**1**的相对构型由偶合常数和NOESY谱判断。在NOESY谱中, H-5与H-11, H-5'与H-11'存在相关, 表明 *trans* H-5/H-10和 *trans* H-5'/H-10'

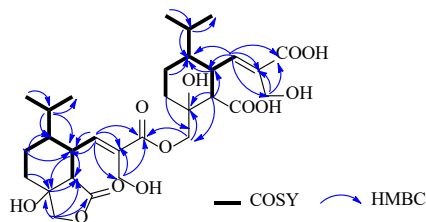


图2 化合物**1**的关键 ^1H - ^1H COSY和HMBC相关
Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound **1**

构型; H $_{2\beta}$ -14与H $_{2\beta}$ -9/H-5存在NOESY相关, H $_{2\alpha}$ -14'与H $_{2\beta}$ -9'/H-5'存在NOESY相关, 结合偶合常数 $J_{5,6} = 11.4$ Hz, $J_{5,6'} = 11.4$ Hz, 表明C-5/C-10、C-5'/C-10'为椅式构型与H-5/H-5'、H-6/H-6'、H-10/H-10'和H $_2$ -14/H $_2$ -14'轴向方向。考虑其生物合成途径, 化合物**1**与二绿木霉烯醇C具有一致的绝对构型。为了进一步确定其绝对构型, 参考该类化合物的生物合成途径以及在B3LYP/6-31 G (d) 基组水平的计算ECD图谱与化合物**1**的实验图谱一致(图3), 确定其绝对构型为5S,6S,7S,10R,5'S,6'S, 7'S,10'R-**1**。经文献检索, 确定该化合物为新化合物, 命名为二绿木霉烯醇H (divirensol H)。

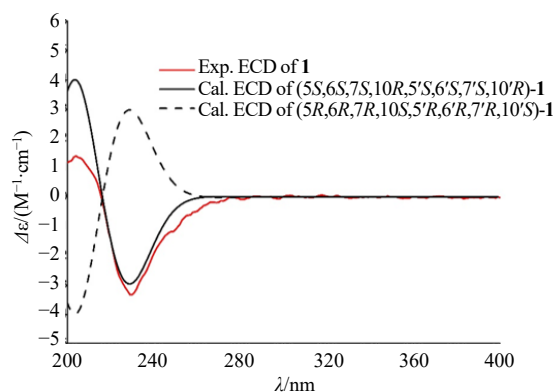


图3 化合物**1**的实测和计算ECD谱图

Fig. 3 Experimental and calculated ECD spectrum of compound **1**

化合物**2**: 无色胶状物; $[\alpha]_D^{25} + 85.8$ (c 0.10, MeOH); ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.27 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-3 α), 4.83 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-3 β), 7.06 (1H, s, H-4), 2.60 (1H, dd, $J = 12.6, 9.6$ Hz, H-5), 3.65 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-6), 2.18 (1H, dd, $J = 12.6, 3.0$ Hz, H-8 α), 1.34 (1H, m, H-8 β), 1.58 (1H, m, H-9 α), 1.16 (1H, m, H-9 β), 1.53 (1H, m, H-10), 1.96 (1H, m, H-11), 0.90 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-12), 0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13), 4.91 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-14 α), 4.40 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-14 β), 4.25 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3' α), 4.18 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3' β), 6.51 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-4'), 3.22 (1H, m, H-5'), 5.24 (1H, s, H-6'), 1.98 (1H, m, H-8' α), 1.92 (1H, m, H-8' β), 1.72 (1H, m, H-9' α), 1.25 (1H, m, H-9' β), 1.26 (1H, m, H-10'), 1.58 (1H, m, H-11'), 0.77 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12'), 0.90 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13'), 3.80 (2H, m, H-14'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ :

166.9 (C-1), 129.5 (C-2), 70.0 (C-3), 145.2 (C-4), 39.5 (C-5), 60.0 (C-6), 71.8 (C-7), 34.8 (C-8), 20.9 (C-9), 47.7 (C-10), 27.1 (C-11), 15.2 (C-12), 21.1 (C-13), 65.0 (C-14), 171.9 (C-15), 167.0 (C-1'), 132.1 (C-2'), 55.2 (C-3'), 149.1 (C-4'), 38.1 (C-5'), 121.4 (C-6'), 144.0 (C-7'), 25.3 (C-8'), 21.1 (C-9'), 49.9 (C-10'), 28.5 (C-11'), 17.1 (C-12'), 21.1 (C-13'), 64.6 (C-14')。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 2 为二绿木霉烯醇 D。

化合物 3: 无色胶状物; $[\alpha]_D^{25} + 74.5$ (c 0.10, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 4.32 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3 α), 4.29 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3 β), 6.80 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 2.73 (1H, dd, $J = 12.6, 9.6$ Hz, H-5), 2.76 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-6), 2.28 (1H, m, H-8 α), 2.14 (1H, m, H-8 β), 1.73 (1H, m, H-9 α), 1.26 (1H, m, H-9 β), 1.53 (1H, m, H-10), 1.68 (1H, m, H-11), 0.92 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12), 0.68 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13), 4.78 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-14 α), 4.49 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-14 β), 4.46 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3' α), 4.40 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3' β), 6.41 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-4'), 3.52 (1H, m, H-5'), 2.40 (2H, m, H-8'), 1.92 (1H, m, H-9' α), 1.52 (1H, m, H-9' β), 1.50 (1H, m, H-10'), 1.62 (1H, m, H-11'), 0.86 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12'), 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13'), 4.80 (1H, m, H-14' α), 4.72 (1H, m, H-14' β); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 169.9 (C-1), 132.9 (C-2), 57.0 (C-3), 145.2 (C-4), 38.5 (C-5), 49.3 (C-6), 84.3 (C-7), 27.1 (C-8), 19.0 (C-9), 43.2 (C-10), 28.1 (C-11), 15.5 (C-12), 21.2 (C-13), 72.5 (C-14), 176.0 (C-15), 165.7 (C-1'), 134.1 (C-2'), 56.5 (C-3'), 145.1 (C-4'), 34.5 (C-5'), 125.0 (C-6'), 164.8 (C-7'), 23.1 (C-8'), 20.4 (C-9'), 45.2 (C-10'), 28.0 (C-11'), 17.4 (C-12'), 21.5 (C-13'), 72.1 (C-14'), 174.3 (C-15')。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 3 为二绿木霉烯醇 G。

化合物 4: 无色胶状物; $[\alpha]_D^{25} + 82.3$ (c 0.10, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 4.18 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3 α), 4.14 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3 β), 6.40 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 3.20 (1H, dd, $J = 10.2, 7.2$ Hz, H-5), 5.22 (1H, s, H-6), 2.00 (1H, m, H-8 α), 1.90 (1H, m, H-8 β), 1.70 (1H, m, H-9 α), 1.23 (1H, m, H-9 β), 1.23 (1H, m, H-10), 1.58 (1H, m, H-11), 0.92 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12), 0.78 (3H, d, $J = 6.6$ Hz,

H-13), 3.78 (2H, s, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 168.5 (C-1), 132.7 (C-2), 55.0 (C-3), 148.2 (C-4), 38.1 (C-5), 121.3 (C-6), 139.9 (C-7), 25.3 (C-8), 21.2 (C-9), 44.8 (C-10), 28.3 (C-11), 16.8 (C-12), 21.0 (C-13), 64.6 (C-14)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 4 为黏帚霉酸。

化合物 5: 无色胶状物; $[\alpha]_D^{25} + 51.4$ (c 0.10, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 4.28 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-3 α), 4.14 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-3 β), 2.12 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-5), 4.49 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-7 α), 4.09 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-7 β), 2.03 (1H, m, H-8 α), 1.70 (1H, m, H-8 β), 1.79 (1H, m, H-9 α), 1.29 (1H, m, H-9 β), 1.35 (1H, m, H-10), 2.68 (1H, m, H-11), 6.64 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-12), 1.72 (1H, m, H-13), 0.78 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14), 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 170.1 (C-1), 124.9 (C-2), 57.5 (C-3), 179.4 (C-4), 53.9 (C-5), 76.5 (C-6), 76.2 (C-7), 32.9 (C-8), 22.1 (C-9), 46.7 (C-10), 41.6 (C-11), 145.5 (C-12), 29.5 (C-13), 15.8 (C-14), 21.9 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 5 为 (+)-氢化萆烯七脂酸。

化合物 6: 无色胶状物; $[\alpha]_D^{25} + 63.0$ (c 0.10, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 4.83 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-3 α), 4.60 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-3 β), 2.12 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-5), 4.46 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-7 α), 4.07 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-7 β), 2.03 (1H, m, H-8 α), 1.70 (1H, m, H-8 β), 1.79 (1H, m, H-9 α), 1.26 (1H, m, H-9 β), 1.35 (1H, m, H-10), 2.62 (1H, m, H-11), 6.80 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-12), 1.72 (1H, m, H-13), 0.77 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14), 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-15), 2.01 (3H, s, H-17); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 170.0 (C-1), 130.9 (C-2), 59.2 (C-3), 178.8 (C-4), 53.9 (C-5), 76.3 (C-6), 76.2 (C-7), 32.9 (C-8), 22.1 (C-9), 46.5 (C-10), 42.0 (C-11), 148.9 (C-12), 29.5 (C-13), 15.9 (C-14), 21.9 (C-15), 172.5 (C-16), 20.9 (C-17)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 6 为 (+)-3-*O*-乙酰萆烯七脂酸。

化合物 7: 无色胶状物; $[\alpha]_D^{25} + 92.4$ (c 0.10, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 4.45 (2H, s, H-3), 4.80 (2H, d, $J = 12.6$ Hz, H-7), 2.45 (2H, m, H-8), 1.94 (1H, m, H-9 α), 1.60 (1H, m, H-9 β), 1.52 (1H, m, H-10), 3.55 (1H, m, H-11), 6.51 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-12), 1.71 (1H, m, H-13), 1.00 (3H, d, $J =$

6.6 Hz, H-14), 0.90 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-15); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 170.0 (C-1), 125.9 (C-2), 57.4 (C-3), 176.0 (C-4), 135.3 (C-5), 167.3 (C-6), 73.2 (C-7), 23.9 (C-8), 22.1 (C-9), 46.7 (C-10), 35.7 (C-11), 146.0 (C-12), 29.0 (C-13), 17.9 (C-14), 21.5 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **7** 为木聚酸 D。

4 活性测试

采用 MTT 法^[14], 以槲酰胺为阳性对照药, 测定化合物 **1**~**7** 对 NCI-H460、NCI-H929 及 SW620 细胞的细胞毒活性。实验结果 (表 2) 表明, 化合物 **1** 对以上 3 株肿瘤细胞均具有一定的细胞毒活性, 其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值分别为 11.8、7.7、13.5 $\mu\text{mol/L}$; 化合物 **2**~**7** 对以上 3 株肿瘤细胞毒活性较弱。

表 2 化合物 **1**~**7** 对 3 株肿瘤细胞毒活性

Table 2 Cytotoxic activities of compounds **1**—**7** against three tumor cell lines

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		
	NCI-H460	NCI-H929	SW620
1	11.8±1.7	7.7±0.2	13.5±0.6
2	>32	20.2±0.9	>32
3	>32	>32	>32
4	20.9±0.1	18.2±0.6	>32
5	>32	>32	20.9±0.3
6	19.6±0.8	>32	22.2±0.3
7	>32	21.2±1.1	18.4±0.8
槲酰胺	3.9±0.6	1.2±0.2	2.8±0.3

5 讨论

海绵是已知生物中最复杂的生物共生体, 是研究共附生微生物的重要资源之一。海绵来源真菌因其代谢途径复杂, 能够产生结构新颖、活性强烈的代谢产物, 这为药物先导化合物提供了多种可能, 成为当前国内外研究的热点。本研究从我国南海海绵共生菌株绿木霉 CMB-TN16 的发酵物中分离得到 7 个倍半萜类化合物 (**1**~**7**), 其中化合物 **1** 为新颖结构的倍半萜, 且具有一定的肿瘤细胞毒活性, 进一步丰富了海洋真菌木霉次级代谢产物结构的多样性, 并为抗肿瘤先导化合物的研究提供了参考和基础数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 金嘉悦, 方淼森, 尹凯波, 等. OSMAC 策略探索海洋真菌次级代谢产物的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(5): 481-491.
- 扈东营, 邓宇晨, 方伟, 等. 海洋抗真菌药物及抗真菌活性物质研究进展 [J]. 世界临床药物, 2020, 41(10): 818-821.
- Chen Z H, Guo Y W, Li X W. Recent advances on marine mollusk-derived natural products: Chemistry, chemical ecology and therapeutical potential [J]. *Nat Prod Rep*, 2023, 40(3): 509-556.
- 马丽丽, 田新朋, 李桂菊, 等. 海洋微生物来源天然产物研究现状与态势 [J]. 热带海洋学报, 2021, 40(5): 134-146.
- Zhang S Y, Chen Y L, Zhu J, et al. Structural diversity, biosynthesis, and biological functions of lipopeptides from *Streptomyces* [J]. *Nat Prod Rep*, 2023, 40(3): 557-594.
- 杨曦亮, 任梦瑶, 刘倩, 等. 近十年海洋来源木霉属真菌次级代谢产物研究进展 [J]. 广西科学, 2021, 28(5): 440-450.
- 康永锋, 段松, 李立, 等. 海绵共附生真菌抗菌活性次级代谢产物研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2021, 40(5): 46-58.
- 杨君泽, 吴小凯, 何山. 海绵来源真菌天然产物的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(4): 695-704.
- 杜晓娜, 高渊皓, 张雁, 等. 一株南海指海绵共附生真菌多样性及其抗菌活性 [J]. 菌物学报, 2019, 38(1): 64-73.
- Su D Q, Ding L J, He S. Marine-derived *Trichoderma* species as a promising source of bioactive secondary metabolites [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2018, 18(20): 1702-1713.
- Guo R, Li G, Zhang Z, et al. Structures and biological activities of secondary metabolites from *Trichoderma harzianum* [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(11): 701.
- Jiao W H, Dewapriya P, Mohamed O, et al. Divirensols: Sesquiterpene dimers from the Australian termite nest-derived fungus *Trichoderma virens* CMB-TN₁₆ [J]. *J Nat Prod*, 2019, 82(1): 87-95.
- Liu L, Han J J, Xu T S, et al. Three new heptelidic acid derivatives from the culture of mushroom *Lentinellus ursinus* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2018, 8(5): 355-360.
- 晏骄阳, 孔凡栋, 马青云, 等. 海绵共生真菌 *Chaetomium globosum* HXL-1 次级代谢产物及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3790-3797.

[责任编辑 王文倩]