

## 黄芦木内生真菌 *Talaromyces tiftonensis* SN34 的次生代谢产物研究

谷荆洲<sup>1,4</sup>, 任文静<sup>2,3</sup>, 鲍梦雨<sup>2,3</sup>, 李 想<sup>4</sup>, 陈志武<sup>1\*</sup>, 姜 荣<sup>2\*</sup>

1. 安徽医科大学基础医学院, 安徽 合肥 230022

2. 澳门科技大学 中医药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078

3. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

4. 安徽医科大学第一附属医院, 安徽 合肥 230022

**摘 要:** 目的 研究黄芦木叶片内生真菌 *Talaromyces tiftonensis* SN34 的次生代谢产物及生物活性。方法 采用正相硅胶、Sephadex LH-20 凝胶、ODS 等柱色谱和反相高效液相色谱对 *T. tiftonensis* SN34 的次生代谢物进行分离纯化, 利用 HRESIMS、NMR 等谱学技术对化合物进行结构鉴定, 并通过体外实验评价化合物抗菌、抗神经炎、细胞毒活性。结果 从 *T. tiftonensis* SN34 的大米发酵物中分离得到 7 个化合物, 分别鉴定为(2*R*)-4-甲氧基-2-羟基丙烷-6-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-5-硫代甲酸酯 (1)、(2*R*)-4-羟基-2-羟基丙烷-6-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-5-甲酸甲酯 (2)、赤散囊菌素 A (eurothiocin A, 3)、2,3-二氢-2-(1-甲基乙烯基)-5-苯并呋喃甲醇 (4)、意大利鼠李素 (alatarnin, 5)、1,3,6-三羟基-7-(1-羟乙基)-9,10-蒽二酮 (6) 和 BK223-B (7)。其中, 化合物 5 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 菌株的最小抑菌浓度为 31.25  $\mu\text{g/mL}$ 。20  $\mu\text{mol/L}$  的化合物 3 和 5 对脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的 BV2 细胞产生一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的抑制率分别为 (69.90 $\pm$ 1.34)% 和 (54.50 $\pm$ 4.15)%。此外, 化合物 5 和 7 可以抑制胰腺癌细胞 PANC-1 和 BxPC 的细胞增殖。结论 化合物 1 为新型含硫苯并呋喃衍生物, 命名为赤散囊菌素 C; 化合物 2~7 为首次从 *T. tiftonensis* SN34 中分离得到。化合物 5 对 MRSA 菌株具有一定的抑制作用。化合物 3 和 5 可以抑制 LPS 诱导的小鼠小胶质细胞系 BV2 细胞中 NO 的产生, 具有一定的抗神经炎活性。此外, 化合物 5 和 7 对 PANC-1 和 BxPC 细胞增殖具有抑制作用。

**关键词:** 黄芦木; 植物内生菌; *Talaromyces tiftonensis* SN34; 生物活性; 赤散囊菌素 C; 赤散囊菌素 A; 意大利鼠李素  
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)21-6946-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.003

## Secondary metabolites of endophytes *Talaromyces tiftonensis* SN34 from *Berberis amurensis*

GU Jing-zhou<sup>1,4</sup>, REN Wen-jing<sup>2,3</sup>, BAO Meng-yu<sup>2,3</sup>, LI Xiang<sup>4</sup>, CHEN Zhi-wu<sup>1</sup>, JIANG Rong<sup>2</sup>

1. School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230022, China

2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China

3. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

4. First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

**Abstract: Objective** To study the secondary metabolites and biological activities of the endophytes *Talaromyces tiftonensis* SN34 derived from the leaves of *Berberis amurensis*. **Methods** The secondary metabolites of *T. tiftonensis* SN34 were isolated and purified by normal-phase silica gel, Sephadex LH-20 gel, ODS column chromatography and reversed-phase high performance liquid column chromatography. The structures of isolated compounds were identified by HRESIMS and NMR. The antibacterial, antineuritis and cytotoxic activities of the compounds were evaluated by *in vitro* experiments. **Results** A total of seven compounds were isolated from the rice fermentation of *T. tiftonensis* SN34 and identified as *S*-methyl (2*R*)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-6-methyl-2,3-

收稿日期: 2023-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973510)

作者简介: 谷荆洲, 男, 硕士研究生在读, 研究方向为天然药物化学。E-mail: gujingzhou2022@163.com

\*通信作者: 陈志武, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为心脑血管药理学和神经药理学。

姜 荣, 女, 博士, 研究方向为天然药物化学成分与活性研究。E-mail: jrong8727@163.com

dihydrobenzofuran-5-carbothioate (1), methyl(R)-4-hydroxy-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxylate (2), eurothiocin A (3), 2,3-dihydro-2-(1-methylethenyl)-5-benzofuranmethanol (4), alaternin (5), 1,3,6-trihydroxy-7-(1-hydroxyethyl)-9,10-anthracenedione (6), and BK223-B (7). Among them, compound 5 exhibited inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacterial strain, with a minimal inhibitory concentration (MIC) value of 31.25  $\mu\text{g/mL}$ . At a concentration of 20  $\mu\text{mol/L}$ , the inhibitory rates of compounds 3 and 5 on the production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharides (LPS)-induced mouse microglial cell line BV2 cells were  $(69.90 \pm 1.34)\%$  and  $(54.50 \pm 4.15)\%$ , respectively. In addition, compounds 5 and 7 could inhibit the proliferation of pancreatic cancer cell lines PANC-1 and BxPC. **Conclusion** Compound 1 is a novel sulfur-containing benzofuran derivative, which is named eurothiocin C. Compounds 2–7 are isolated from *T. tiftonensis* SN34 for the first time. Compound 5 has inhibitory effect on MRSA strains. Compounds 3 and 5 could inhibit NO production in the LPS-induced BV2 cells, suggesting that above compounds have antineuritis activity. In addition, compounds 5 and 7 exhibited inhibitory effects on the proliferation of PANC-1 and BxPC cells.

**Key words:** *Berberis amurensis* Rupr.; endophytes; *Talaromyces tiftonensis* SN34; bioactivities; eurothiocin C; eurothiocin A; alaternin

植物内生菌几乎普遍存在于植物的各个组织中，它们是植物防御共同体，由内生菌代谢的生物活性化合物又是内生菌进化的关键<sup>[1-2]</sup>。植物能够产生多样性生物活性次生产物，但需要大量的植物原料才能获取少量的目标产物<sup>[3]</sup>。随着对天然产物研究的不断增加，作为具有结构多样性的生物活性代谢物的重要来源，内生菌越来越广泛的被探索<sup>[4]</sup>。内生菌及其次生代谢产物极大地丰富了天然产物的化学和生物多样性<sup>[5]</sup>。黄芦木 *Berberis amurensis* Rupr. 属于小檗科 (Berberidaceae) 的落叶灌木，具有清热燥湿、泻火解毒的功效，其根和茎用于治疗高血压、炎症、痢疾、肠炎、黄疸等疾病<sup>[6]</sup>，有广泛的药理作用和药用价值。然而，对该植物内生菌代谢产物的研究却鲜有报道。*Talaromyces* 属菌株颇为丰富，其次生代谢产物物类型具有多样性，包括苯并二氢吡喃酮类、异香豆素类、苯并呋喃衍生物、蒽酮类及类萜类成分。其中苯并呋喃衍生物及蒽酮类曾多次被分离得到，其具有细胞毒、抗神经炎、抗菌、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制等活性，而关于菌株 *T. tiftonensis* SN34 次生代谢产物尚未报道<sup>[7]</sup>。因此本研究以内生菌 *T. tiftonensis* SN34 的大米发酵物为研究对象，旨在获得更多具有生物活性的苯并呋喃衍生物及蒽酮类化合物。最终分离得到 7 个化合物，分别鉴定为 (2R)-4-甲氧基-2-羟基丙烷-6-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-5-硫代甲酸酯赤散囊菌素 C [*S*-methyl (R)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-carbothioate, 1]、(R)-4-羟基-2-羟基丙烷-6-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-5-甲酸甲酯 [methyl(R)-4-hydroxy-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxylate, 2]、赤散囊菌素 A (eurothiocin A, 3)、2,3-二氢-2-

(1-甲基乙烯基)-5-苯并呋喃甲醇 [2,3-dihydro-2-(1-methylethenyl)-5-benzofuranmethanol, 4]、意大利鼠李素 (alaternin, 5)、1,3,6-三羟基-7-(1-羟乙基)-9,10-蒽二酮 [1,3,6-trihydroxy-7-(1-hydroxyethyl)-9,10-anthracenedione, 6] 和 BK223-B (7)。其中，化合物 1 为新的含硫苯并呋喃衍生物，命名为赤散囊菌素 C；化合物 2~7 均为首次从内生菌 *T. tiftonensis* SN34 获得；以上化合物的抗菌、抗神经炎和细胞毒活性实验表明，化合物 5 对 MRSA 菌株具有一定的抑制作用。化合物 3 和 5 可以抑制 LPS 诱导的小鼠小胶质细胞系 BV2 细胞中 NO 的产生，具有一定的抗神经炎活性。此外，化合物 5 和 7 对胰腺癌细胞系 PANC-1 和 BxPC 细胞增殖具有抑制作用。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

Autopol III 旋光仪 (美国鲁道夫公司)，Evolution 300 紫外光谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司)，Bruker Tensor 27 红外光谱仪 (德国布鲁克公司)，Bruker Avance III 500 MHz 型核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司)，安捷伦 Agilent 6210 TOF LC-MS 液质联用 (美国安捷伦公司)，安捷伦 Aligent 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司)，SPH 3332 型大型双层敞开式摇床 (上海世平实验设备有限公司)，Biotek ELx800 酶标仪 (美国 Biotek 公司)。柱色谱硅胶 (300~400 目) 和 GF<sub>254</sub> 薄层色谱硅胶板 (青岛海洋化工有限公司)，反相 RP-18 (日本富士化学株式会社)，Sephadex LH-20 (美国通用电气公司)，Aligent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×9.4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; 美国安捷伦公司)，色谱级甲醇和乙腈 (美国 TEDIA 公司)，其他试剂为成都科隆试剂有限公司。DMEM 培养基、特级胎牛血清 (FBS) 和

青霉素-链霉素溶液( $\times 100$ , 美国 Gibco 公司), 美罗培南(美国 MedChemExpress 公司, 批号 274875), 阿霉素(美国 MedChemExpress 公司, 批号 251055), 槲皮素、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)和噻唑蓝(Thiazolyl Blue, MTT, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 一氧化氮试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

## 1.2 菌株来源

菌株 *T. tiftonensis* SN34 分离自新鲜黄芦木叶片(2021 年 7 月采自中国陕西省安康市), 植物经西北农林科技大学吴振海高级实验师鉴定为黄芦木 *Berberis amurensis* Rupr., 菌株经北京麦克罗科技有限公司鉴定为 *T. tiftonensis* SN34, 现存放于安徽医科大学基础医学院。

## 1.3 细胞株

小鼠小胶质细胞 BV-2 细胞系和胰腺癌细胞株 PANC-1、BxPC 均购买自北京协和医学院细胞资源中心。

## 2 方法

### 2.1 发酵培养

**2.1.1 菌株培养基制备** 土豆液体/固体培养基: 将 200 g 的土豆去皮切成  $1\text{ cm}^3$  小块, 开水煮 20 min, 加入 20 g 葡萄糖, 最后定容至 1 L。固体培养基则加入 20 g 琼脂粉。大米固体培养基: 将 40 g 大米置于 500 mL 锥形瓶中, 加入 60 mL 去离子水, 置于高压蒸汽灭菌锅中在  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 30 min, 备用。

**2.1.2 菌株发酵** 将菌株 *T. tiftonensis* SN34 接种于马铃薯葡萄糖琼脂平板(potato glucose agar plates, PDA)上, 置于培养箱中培养 7 d。观察到菌丝长满且菌落正常后, 再将菌块接种于多个 PDA 平板上, 继续孵育 7 d。将约十几块菌块(约  $0.5\text{ cm}^2$ )接种于马铃薯葡萄糖(potato glucose, PD)液体培养基中, 在 120 r/min 摇床上培养 7 d 后, 将 200  $\mu\text{L}$  种子液接种于大米固体培养基中, 室温培养 28 d。

### 2.2 次生代谢产物的提取与分离

将内生真菌 *T. tiftonensis* SN34 的发酵物用甲醇浸提 3 次, 粗提液用醋酸乙酯萃取后得到醋酸乙酯部位浸膏约 26.7 g, 将该浸膏经硅胶柱色谱(石油醚-醋酸乙酯 10:1、5:1、2:1; 二氯甲烷-甲醇 100:1、50:1、25:1)进行梯度洗脱, 经薄层色谱(TLC)检识后合并得到分成 8 个组分(Fr. A~H); Fr. A 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)得到 7 个组分 Fr. A1~A7。Fr. A5 经过反相 ODS 柱色谱(30% $\rightarrow$ 80%甲醇-水)梯度洗脱, 又通过制备 HPLC(50%乙腈-水, 2 mL/min)进一步纯化, 得到化合物

1( $t_{\text{R}}=27.2\text{ min}$ , 7.3 mg)、2( $t_{\text{R}}=29.5\text{ min}$ , 5.2 mg)和 3( $t_{\text{R}}=22\text{ min}$ , 64.8 mg)。Fr. B 经过 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)及制备 HPLC(50% 甲醇-水, 2 mL/min)得到化合物 4( $t_{\text{R}}=31.5\text{ min}$ , 4.5 mg)。Fr. C 经过 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇-二氯甲烷 3:1)分离后得到 Fr. C1~C4。Fr. C3 经过反相 ODS 柱色谱(30% $\rightarrow$ 80%甲醇-水)梯度洗脱及反复重结晶(甲醇)得到化合物 5(28.1 mg)和 6(35.3 mg)。Fr. D 经过反相 ODS 柱色谱(50% $\rightarrow$ 90%甲醇)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇-二氯甲烷 3:1)分离后得到 Fr. D4.1~D4.4。其中 Fr. D4.2 经过反相 ODS 柱色谱(30% $\rightarrow$ 80%甲醇-水)梯度洗脱及制备 HPLC(60%乙腈-水, 2 mL/min)得到化合物 7( $t_{\text{R}}=21.5\text{ min}$ , 16.2 mg)。

### 2.3 抗菌活性测试

将在 Luria-Bertani(LB)固体平板上活化好的 MRSA ATCC43300 接种到 Mueller-Hinton 液体培养基上, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下培养过夜, 在 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将收集的菌体重新悬浮于 Mueller-Hinton 培养基中, 并稀释至 600 nm 下吸光度( $A$ )值为 0.5。用 Mueller-Hinton 培养基将菌体进一步稀释至约  $1\times 10^5\text{ CFU/mL}$ , 并接种至 96 孔板(100  $\mu\text{L}$ /孔)。配制化合物终质量浓度为 0~125  $\mu\text{g/mL}$ 。不含化合物的作为阴性对照; 美罗培南作为阳性对照药。在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h 后观察没有菌生长的最小浓度即为最小抑制浓度(minimal inhibit concentration, MIC)<sup>[8]</sup>。

### 2.4 抗神经炎活性测试

采用 Griess 试剂法测定化合物对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO 产生的影响。将 BV-2 细胞培养于 DMEM(10%FBS 和 1%青霉素/链霉素双抗)培养基中, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养至对数生长期, 以  $2\times 10^4$ /孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h; 加入 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 和不同浓度的待测化合物同时处理 24 h, 槲皮素作为阳性对照; NO 的生成量采用 NO 检测试剂盒测定, 最后用酶标仪测定 550 nm 处的  $A$  值<sup>[9]</sup>。

### 2.5 细胞毒活性测试

采用 MTT 法测定化合物对 2 种胰腺癌细胞系(PANC-1 和 BxPC)的细胞毒活性。将 2 种胰腺癌细胞 PANC-1 和 BxPC 细胞培养于 DMEM(10% FBS 和 1%青霉素/链霉素双抗)培养基中, 培养至对数生长期, 以  $2\times 10^4$ /孔的密度接种于 96 孔板中,

继续培养 24 h。再加入待测化合物 (50  $\mu\text{mL/L}$ ) 处理 48 h, 阿霉素作为阳性对照。每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 静置 4 h, 弃上清, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶液, 最后用酶标仪测定 570 nm 处的  $A$  值<sup>[10]</sup>。

## 2.6 统计学处理

实验数据均采用统计软件 SPSS 20.0 进行分析, 并以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间差异采用  $t$  检验进行分析, 以  $P < 0.05$  认为统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状物;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 93.7$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2964、1669、1596、1467、1375、1291、1256、1075; UV ( $\text{MeCN}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ): 210 (3.07) nm; ECD ( $\text{MeOH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) 240 (-0.41)、340 (-0.12)、395 (+0.28) nm; HR-ESI-MS  $m/z$ : 319.098 0  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 计算值 319.097 5,  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{NaS}$ , 推测其分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{S}$ , 不饱和度为 6; IR 光谱数据表明化合物 **1** 中存在羟基 (2964  $\text{cm}^{-1}$ ) 和羰基 (1669  $\text{cm}^{-1}$ ); UV 光谱中在 210 nm 处最大紫外吸收值提示结构中存在共轭二烯体系。 $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 中给出 1 个芳香质子信号  $\delta_{\text{H}}$  6.37 (1H, s, H-7); 1 个甲氧基质子信号  $\delta_{\text{H}}$  3.86 (3H, s, H-14); 4 个单峰甲基质子信号  $\delta_{\text{H}}$  2.47 (3H, s, H-12), 2.23 (3H, s, H-13), 1.34 (3H, s, H-9), 1.23 (3H, s, H-10); 1 个连氧次甲基质子信号  $\delta_{\text{H}}$  4.61 (1H, t,  $J = 10.8$  Hz, H-2); 1 个亚甲基质子信号  $\delta_{\text{H}}$  3.22 (2H, d,  $J = 10.8$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 和

HSQC 谱图给出 15 个碳信号, 包括 1 个羰基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  195.6 (C-11); 1 组苯环碳信号  $\delta_{\text{C}}$  162.3 (C-7a), 153.3 (C-4), 136.8 (C-6), 125.7 (C-5), 113.8 (C-3a), 106.0 (C-7); 2 个连氧  $\text{sp}^3$  杂化碳信号  $\delta_{\text{C}}$  89.9 (C-2), 71.7 (C-8); 1 个甲氧基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  60.0 (C-14); 1 个亚甲基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  29.2 (C-3); 4 个甲基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  26.1 (C-9), 24.1 (C-10), 19.2 (C-13), 12.7 (C-12)。化合物 **1** 的  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱与化合物 **3** 非常相似<sup>[11]</sup>, 结合以上数据可以推测化合物 **1** 为含硫苯并呋喃衍生物 (表 1)。

与化合物 **3** 不同之处在于, 化合物 **1** 中含有 1 个甲氧基, 根据 HMBC 谱图中 H-14 (3.86, 3H, s) 与 C-4 相关确定了甲氧基位于 C-4 位。HMBC 谱中显示, H-7 (6.37, 1H, s) 与 C-3a 和 C-5 相关, H-12 (2.47, 3H, s) 与 C-11 相关, 以及 H-13 (2.23, 3H, s) 与 C-5 和 C-7 相关, 因此确证结构中苯并硫酸甲酯片段 (图 1)。通过实测和计算的 ECD 光谱分析, 推断出化合物 **1** 的绝对构型为  $R$  (图 2)。综上所述, 化合物 **1** 鉴定为 (2*R*)-4-甲氧基-2-羟基丙烷-6-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-5-硫代甲酸酯, 经检索, 该化合物为新化合物, 命名为赤散囊菌素 C (eurothiocin C)。

化合物 **2**: 无色油状物;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 83.9$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ ); HR-ESI-MS  $m/z$  289.104 6  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 推测其分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.8 (1H, s, 4-OH), 6.25 (1H, s, H-7), 4.71 (1H, dd,  $J = 9.6, 8.2$  Hz, H-2), 3.92 (3H, s, H-12), 3.14 (1H, dd,  $J = 15.6, 9.6$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 3.05 (1H, dd,  $J = 15.6, 8.3$  Hz,

表 1 化合物 **1** 的核磁共振波谱数据 (500/125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Table 1  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for compound **1** (500/125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

| 碳位 | $\delta_{\text{H}}$         | $\delta_{\text{C}}$ | COSY | HMBC              |
|----|-----------------------------|---------------------|------|-------------------|
| 2  | 4.61 (1H, t, $J = 10.8$ Hz) | 89.9                | H-3  |                   |
| 3  | 3.22 (2H, d, $J = 10.8$ Hz) | 29.2                |      | C-2, 3a, 4, 7a, 8 |
| 3a |                             | 113.8               |      |                   |
| 4  |                             | 153.3               |      |                   |
| 5  |                             | 125.7               |      |                   |
| 6  |                             | 136.8               |      |                   |
| 7  | 6.37 (1H, s)                | 106.0               |      | C-3a, 5, 7a, 13   |
| 7a |                             | 162.3               |      |                   |
| 8  |                             | 71.7                |      |                   |
| 9  | 1.34 (3H, s)                | 26.1                |      | C-2, 8, 10        |
| 10 | 1.23 (3H, s)                | 24.1                |      | C-2, 8, 9         |
| 11 |                             | 195.6               |      |                   |
| 12 | 2.47 (3H, s)                | 12.7                |      | C-11              |
| 13 | 2.23 (3H, s)                | 19.2                |      | C5, 6, 7          |
| 14 | 3.86 (3H, s)                | 60.0                |      | C-4               |

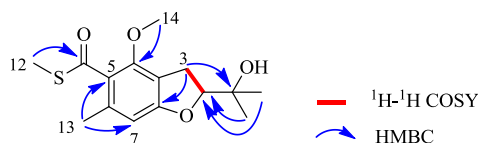
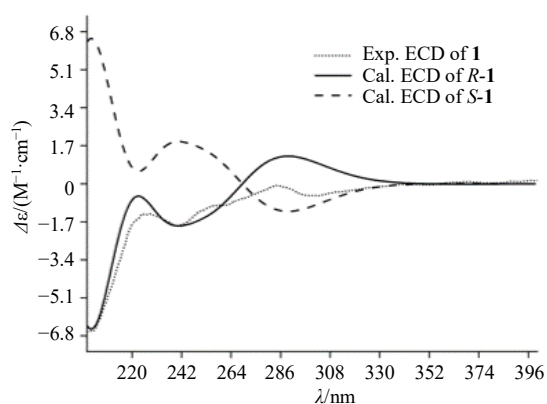
图 1 化合物 1 的主要  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 和 HMBC 相关Fig. 1 Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of compound 1

图 2 化合物 1 的实测和计算 ECD 谱图

Fig. 2 Experimental and calculated ECD spectra of compound 1

H-3 $\beta$ ), 2.50 (3H, s, H-13), 1.33 (3H, s, H-9), 1.21 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.3 (C-11), 164.6 (C-4), 160.2 (C-7a), 143.8 (C-6), 111.0 (H-3a), 105.7 (C-5), 105.3 (C-7), 91.2 (C-2), 72.0 (C-8), 51.8 (C-12), 27.7 (C-3), 25.9 (H-9), 24.7 (H-13), 23.7 (H-10)。上述数据与文献报道一致<sup>[12]</sup>, 推测该化合物为 (*R*)-4-羟基-2-羟基丙烷-6-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-5-甲酸甲酯。

化合物 3: 无色油状物;  $[\alpha]_D^{25} -148.7$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ ); HR-ESI-MS  $m/z$ : 305.081 6  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 推测其分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{S}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.9 (1H, brs, 4-OH), 6.24 (1H, s, H-7), 4.70 (1H, t,  $J = 8.9$  Hz, H-2), 3.12 (1H, dd,  $J = 15.6, 9.6$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 3.04 (1H, dd,  $J = 15.6, 8.3$  Hz, H-3 $\beta$ ), 2.66 (3H, s, H-13), 2.45 (3H, s, H-12), 1.30 (3H, s, H-9), 1.20 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 197.8 (C-11), 164.3 (C-7a), 157.9 (C-4), 141.7 (C-6), 116.2 (C-5), 111.5 (C-3a), 105.7 (C-7), 91.3 (C-2), 71.9 (C-8), 27.7 (C-3), 25.5 (C-9), 24.9 (C-13), 24.0 (C-10), 13.0 (C-12)。上述数据与文献报道一致<sup>[11]</sup>, 推测该化合物为赤散囊菌素 A。

化合物 4: 无色油状物; HR-ESI-MS  $m/z$ : 213.089 3

$[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 推测其分子式为  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.17 (1H, s, H-4), 7.08 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6), 6.69 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-7), 5.18 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-2), 5.06 (1H, s, H-9 $\alpha$ ), 4.87 (1H, s, H-9 $\beta$ ), 4.51 (2H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-11), 3.36 (1H, dd,  $J = 15.7, 9.6$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 3.00 (1H, dd,  $J = 15.7, 8.0$  Hz, H-3 $\beta$ ), 1.75 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 159.0 (C-7a), 144.7 (C-8), 134.6 (C-5), 126.7 (C-4), 126.7 (C-6), 123.8 (C-3a), 110.8 (C-9), 108.2 (C-7), 85.4 (C-2), 63.8 (C-11), 34.4 (C-3), 16.5 (C-10)。上述数据与文献报道一致<sup>[13]</sup>, 推测该化合物为 2,3-二氢-2-(1-甲基乙烯基)-5-苯并呋喃甲醇。

化合物 5: 橘黄色粉末; HR-ESI-MS  $m/z$ : 309.036 4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 推测其分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.28 (1H, brs, H-4), 7.01 (1H, brs, H-5), 6.75 (1H, s, H-7), 2.32 (3H, s, H-15);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 190.6 (C-9), 182.5 (C-10), 165.6 (C-3), 165.4 (C-1), 161.9 (C-8), 148.4 (C-6), 134.2 (C-14), 132.2 (C-11), 123.4 (C-7), 120.6 (C-5), 113.7 (C-12), 109.6 (C-13), 107.5 (C-4), 107.5 (C-2), 21.4 (C-15)。上述数据与文献报道一致<sup>[14]</sup>, 推测该化合物为意大利鼠李素。

化合物 6: 黄色粉末; HR-ESI-MS  $m/z$ : 323.052 5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 推测其分子式为  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.23 (1H, s, H-5), 7.40 (1H, s, H-8), 7.03 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-1), 6.45 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-3), 5.18 (1H, q,  $J = 6.5$  Hz, H-15), 1.46 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-16);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 187.3 (C-10), 183.7 (C-9), 166.3 (C-2), 166.0 (C-4), 160.9 (C-7), 140.9 (C-6), 136.6 (C-11), 135.3 (C-13), 126.9 (C-14), 126.4 (C-5), 113.4 (C-8), 110.8 (C-12), 109.2 (C-1), 108.9 (C-3), 65.8 (C-15), 23.6 (C-16)。上述数据与文献报道一致<sup>[15]</sup>, 推测该化合物为 1,3,6-三羟基-7-(1-羟乙基)-9,10-蒽二酮。

化合物 7: 无色油状物;  $[\alpha]_D^{25} -23.1$  ( $c$  0.5, MeOH); HR-ESI-MS  $m/z$ : 685.210 9  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 推测其分子式为  $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{15}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.35 (1H, t,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 6.34 (1H, t,  $J = 2.1$  Hz, H-24), 6.27 (1H, dd,  $J = 2.5, 1.5$  Hz, H-4), 6.26 (1H, dd,  $J = 2.5, 1.5$  Hz, H-22), 5.58 (1H, m, H-17), 5.50 (1H, m, H-31), 5.11 (1H, m, H-27), 5.02 (1H, m, H-9), 4.21 (1H, m, H-13), 4.16 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz, H-14 $\alpha$ ), 4.04 (1H, dd,  $J = 10.8, 5.3$  Hz, H-14 $\beta$ ),

3.57 (1H, dd,  $J=13.3$ , 7.0 Hz, H-8 $\alpha$ ), 3.40 (1H, dd,  $J=13.7$ , 6.4 Hz, H-26 $\alpha$ ), 3.08 (1H, d,  $J=7.7$  Hz, H-26 $\beta$ ), 2.96 (1H, m, H-16 $\alpha$ ), 2.92 (1H, m, H-30 $\alpha$ ), 2.86 (1H, m, H-8 $\beta$ ), 2.78 (2H, m, H-16 $\beta$ , 30 $\beta$ ), 2.54 (1H, dd,  $J=15.4$ , 5.4 Hz, H-12 $\alpha$ ), 2.45 (1H, dd,  $J=15.4$ , 7.4 Hz, H-12 $\beta$ ), 1.46 (3H, d,  $J=6.3$  Hz, H-18), 1.43 (3H, d,  $J=6.3$  Hz, H-32), 1.22 (3H, d,  $J=6.2$  Hz, H-28), 1.17 (3H, d,  $J=6.2$  Hz, H-10);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 171.0 (C-1), 171.0 (C-19), 170.7 (C-15), 170.4 (C-29), 170.2 (C-11), 165.6 (C-23), 165.0 (C-5), 163.0 (C-3), 162.8 (C-21), 143.0 (C-7), 143.0 (C-25), 112.4 (C-6), 111.9 (C-24), 105.9 (C-2), 105.4 (C-20), 102.2 (C-22), 102.1 (C-4), 72.5 (C-27), 72.3 (C-9), 69.8 (C-17), 69.6 (C-31), 67.9 (C-14), 66.3 (C-13), 41.3 (C-8), 41.0 (C-26), 40.6 (C-30), 40.3 (C-16), 39.6 (C-12), 19.7 (C-18), 19.7 (C-10), 19.5 (C-32), 19.3 (C-28)。上述数据与文献报道一致<sup>[16]</sup>, 推测该化合物为 BK223-B。

### 3.2 活性测试结果

分别对化合物 1~7 进行抗菌活性、抗神经炎活性、细胞毒活性筛选。其中抗菌活性试验发现化合物 5 具有明显抑制 MRSA 的活性, MIC 值为 31.25  $\mu\text{g/mL}$ , 阳性对照美罗培南的为 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 。以 NO 为指标进一步测定了化合物 1~7 的抗炎活性, 发现在 20  $\mu\text{mol/L}$  的浓度下, 化合物 3 和 5 可以抑制由 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞中 NO 的产生, 抑制率分别为 (69.90 $\pm$ 1.34)% 和 (54.50 $\pm$ 4.15)%; 阳性对照槲皮素的为 (85.30 $\pm$ 0.89)%。然而与化合物 3 相比, 化合物 1 没有表现出抗神经炎活性, 提示赤散囊菌素 C 中 C-4 处的甲氧基的存在可能降低了抗炎活性。此外, 评估了化合物 1~7 对 2 种胰腺癌细胞系 PANC-1 和 BxPC 的细胞毒活性, 发现化合物 5 和 7 具有一定的细胞毒性。在 50  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, 化合物 5 对 PANC-1 和 BxPC 细胞增殖的抑制率分别为 (85.0 $\pm$ 2.9)% 和 (74.20 $\pm$ 6.11)%; 化合物 7 对 PANC-1 细胞株的增殖抑制率为 (77.90 $\pm$ 5.34)%, 稍弱于阳性药阿霉素 [PANC-1 为 (99.20 $\pm$ 1.56)%, BxPC 为 (97.60 $\pm$ 3.97)%]。

### 4 讨论

植物内生菌种类丰富且广泛分布在植物组织中, 内生菌在与宿主协同进化的过程中具备了产生结构多样性的次生代谢产物的能力, 这些次生代谢产物被发现具有抑菌、抗肿瘤和神经细胞保护等多

种生物活性, 在医药应用和人类健康问题上展示出巨大的潜力和用途, 也因此备受关注。目前, 关于黄芦木内生菌的次生代谢产物报道仍较少, 有进一步研究的必要性。鉴于此, 本研究以内生菌 *T. tiftonensis* SN34 大米发酵物为研究对象, 分离得到 1 个新的苯并呋喃衍生物 (1) 及 6 个已知化合物 (2~7), 并测定了它们的抗菌、抗神经炎和细胞毒活性。植物内生菌通过产生具有抗菌活性的物质从而抑制植物病原菌生长, 是植物抗病原菌的重要机制, 从植物内生菌次生代谢产物中发现具有抗菌活性的某些化合物, 具有开发成为抗菌药物的可能性。MRSA 是一种具有广谱耐药性的耐药菌, 是引起社区健康人群和医疗服务机构患者感染的重要原因, 不仅对甲氧西林耐药, 对其他与甲氧西林具有相同母核的  $\beta$ -内酰胺类和头孢类抗生素均耐药, 对氨基糖苷类、大环内酯类、磺胺类、利福平均产生不同程度的耐药, 本研究分离筛选出的化合物 5 对 MRSA 有抑制作用, 为后期进行其抗菌机制提供理论依据, 为进一步开发抗耐药菌先导化合物提供了模板分子。通常, 在中枢神经损伤、感染、毒素刺激下或自身免疫的作用下会出现神经炎症。LPS 是革兰阴性细菌细胞壁的主要成分, 通过与膜受体 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR 4) 相互作用来触发一系列小胶质细胞反应, 从而导致促炎性介质的产生, 长期激活的小胶质细胞会在中枢神经系统中引起过度的炎症反应, 从而导致并发症, 如认知功能障碍、抑郁症行为等, 化合物 3 和 5 可以抑制由 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞 NO 的产生, 具有良好的抗神经炎活性, 为相关药物的研究提供了先导化合物和理论依据。胰腺癌是消化系统常见恶性肿瘤之一, 由于临床症状隐匿且不典型, 对放射治疗不敏感, 诊断和治疗都具有很高的挑战性, 据统计其五年生存率不足 10%, 化合物 5 和 7 对胰腺癌细胞 PANC-1 和 BxPC 细胞株增殖有一定的细胞毒活性, 为抗癌药物研发提供了备选的先导化合物, 具有开发成为抗胰腺癌治疗药物的潜力。综上所述, 体外活性筛选中发现化合物 5 具有一定的抑制 MRSA 生长, BV2 细胞 NO 的产生及胰腺癌细胞株 PANC-1 和 BxPC 增殖的作用, 提示化合物 5 可能是潜在的具有良好活性的药源分子, 后期可对其活性作用机制进行深入研究, 以期为新药研发提供坚实基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Liu X, Zhou Z Y, Cui J L, *et al.* Biotransformation ability of endophytic fungi: From species evolution to industrial applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(19): 7095-7113.
- [2] Bastías D A, Balestrini R, Pollmann S, *et al.* Environmental interference of plant-microbe interactions [J]. *Plant Cell Environ*, 2022, 45(12): 3387-3398.
- [3] Gómez O C, Luiz J H H. Endophytic fungi isolated from medicinal plants: Future prospects of bioactive natural products from *Tabebuia/Handroanthus* endophytes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(21): 9105-9119.
- [4] Tiwari P, Bae. Endophytic fungi: Key insights, emerging prospects, and challenges in natural product drug discovery [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 360.
- [5] Ben S H, Chenari B A, Alenezi F N, *et al.* Potentials of endophytic fungi in the biosynthesis of versatile secondary metabolites and enzymes [J]. *Forests*, 2021, 12(12): 1784.
- [6] Radziejewska-Kubzdela E, Szwengiel A, Ratajkiewicz H, *et al.* Effect of ultrasound, heating and enzymatic pre-treatment on bioactive compounds in juice from *Berberis amurensis* Rupr [J]. *Ultrason Sonochem*, 2020, 63: 104971.
- [7] Nicoletti R, Andolfi A, Salvatore M M. Endophytic fungi of the genus *Talaromyces* and plant health [A] // *Microbial Endophytes and Plant Growth* [M]. Amsterdam: Elsevier, 2023: 183-213.
- [8] Nigussie D, Davey G, Legesse B A, *et al.* Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of three medicinal plants against selected bacteria isolated from wounds of lymphoedema patients [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 2.
- [9] Grottelli S, Amoroso R, Macchioni L, *et al.* Acetamidine-based iNOS inhibitors as molecular tools to counteract inflammation in BV2 microglial cells [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2646.
- [10] Ren W J, Bao M Y, Zhang J, *et al.* Phelliribsin B: A new styrylpyrone derivative from the medicinal fungus *Phellinus ribis* [J]. *Chem Biodivers*, 2022, 19(11): e202200682.
- [11] Liu Z M, Xia G P, Chen S H, *et al.* Eurothiocin A and B, sulfur-containing benzofurans from a soft coral-derived fungus *Eurotium rubrum* SH-823 [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(6): 3669-3680.
- [12] Zhang G Y, Pan X, Yang B B, *et al.* The asymmetric total synthesis of (-)-eurothiocin A and its enantiomer [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(4): 997-1005.
- [13] Li G H, Yu Z F, Li X, *et al.* Nematicidal metabolites produced by the endophytic fungus *Geotrichum* sp. AL4 [J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(7): 1520-1524.
- [14] 温露, 杜敦帅, 刘凡, 等. 红树林共生真菌 *Paecilomyces* sp. tree 1-7 代谢产物的研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(3): 125-127.
- [15] 王军, 马文哲, 汪夕芳, 等. 来自海南红树林内生真菌 ZSU-H85 (L.K) 的新蒽醌 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2010, 49(4): 150-152.
- [16] Breinholt J, Jensen G W, Nielsen R I, *et al.* Antifungal macrocyclic polylactones from *Penicillium Verruculosum* [J]. *J Antibiot*, 1993, 46(7): 1101-1108.

[责任编辑 王文倩]