

## • 化学成分 •

一株海绵共附生青霉 *Penicillium* sp. 的次级代谢产物研究

谢冬冬<sup>1</sup>, 李嘉欣<sup>1</sup>, 李培海<sup>2</sup>, 尚如意<sup>1</sup>, 刘可春<sup>2</sup>, 林厚文<sup>1</sup>, 焦伟华<sup>1\*</sup>

1. 癌基因与相关基因国家重点实验室海洋药物研究中心, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127

2. 山东省斑马鱼人类疾病模型与药物筛选工程技术研究中心, 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

**摘要:** 目的 研究海绵共附生青霉 *Penicillium* sp. LHW5975 的化学成分。方法 采用减压硅胶柱色谱、十八烷基硅烷键合硅胶填料(ODS)中压柱色谱和半制备高效液相色谱等技术进行分离纯化, 得到的单体化合物通过高分辨-电喷雾-质谱(HR-ESI-MS)、核磁共振波谱(NMR)以及与文献比对等方法进行鉴定。对分离得到的化合物进行斑马鱼促血管生成活性评价。结果 从 *Penicillium* sp. LHW5975 中分离纯化出 9 个生物碱类化合物, 包括 1 个新的化合物, 命名为青霉吡啶碱甲(1); 以及 8 个已知化合物, 分别为 17-羟基短密青霉酰胺 N(2)、苯并玛尔维碱 A(3)、苯并玛尔维碱 B(4)、苯并玛尔维碱 C(5)、苯并玛尔维碱 D(6)、苯并玛尔维碱 E(7)、(-)-苯并玛尔维碱 E(8) 和 N-甲基诺啉苯并玛尔维碱 A(9)。化合物 2 和 7 在 50  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度下对斑马鱼节间血管的生长有促进作用。结论 化合物 1 为新化合物, 化合物 2 和 9 为青霉属内首分化化合物, 化合物 2 和 7 具有一定的促血管生成活性。

**关键词:** 青霉; 生物碱; 青霉吡啶碱甲; 海洋天然产物; 促血管生成活性; 17-羟基短密青霉酰胺 N; 苯并玛尔维碱 E

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3223-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.001

Secondary metabolites of a marine sponge associated *Penicillium* sp.

XIE Dongdong<sup>1</sup>, LI Jiaxin<sup>1</sup>, LI Peihai<sup>2</sup>, SHANG Ruyi<sup>1</sup>, LIU Kechun<sup>2</sup>, LIN Houwen<sup>1</sup>, JIAO Weihua<sup>1</sup>

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

2. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

**Abstract: Objective** To reveal the secondary metabolites of the fermentation of marine sponge associated *Penicillium* sp. LHW5975.

**Methods** The organic extract and fractions were separated and purified by silica vacuum liquid chromatography (VLC), octadecylsilyl silica (ODS) medium-pressure column chromatography (MPLC) and semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). The obtained purified compounds were identified by high-resolution-electrospray-mass spectrometry (HR-ESI-MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and literature data comparison. **Results** Nine compounds were isolated from *Penicillium* sp. LHW5975, including one new compound penicindoline A (1) and eight known compounds, which are 17-hydroxybrevianamide N (2), benzomalvin A (3), benzomalvin B (4), benzomalvin C (5), benzomalvin D (6), benzomalvin E (7), (-)-benzomalvin E (8), and N-methylnovobenzomalvin A (9). Proangiogenesis activity evaluation of the isolated compounds using zebrafish model showed that benzodiazepines 2 and 7 promoted the angiogenesis at the concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusion** Compound 1 is a new compound, and compound 2 and 9 are isolated from *Penicillium* sp. for the first time. Compound 2 and 7 have proangiogenesis activity.

**Key words:** *Penicillium* sp.; alkaloid; penicindoline A; marine natural product; proangiogenesis activity; 17-hydroxybrevianamide; benzomalvin E

收稿日期: 2024-03-22

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC2804100); 国家自然科学基金项目(82022068); 国家自然科学基金项目(22137006)

作者简介: 谢冬冬, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 18653756239@163.com

\*通信作者: 焦伟华, 研究员, 博士生导师, 研究方向为海洋药源分子的结构与功能。E-mail: weihujiao@hotmail.com Tel: (021)68383339

海洋环境具有特殊性,比如高盐、高压、低氧、低温、弱光、寡营养等,导致海洋中的生物可以产生较为独特的代谢产物<sup>[1]</sup>。海洋天然产物的数量众多,目前发现的海洋天然产物的数量已经超过 35 000 个,据统计,仅 2022 年 1 年,发表的海洋天然产物(marine natural products, MNPs)中新化合物就有 1 417 个<sup>[2]</sup>,其来源涉及海洋中的微生物、浮游植物、海绵、蓝藻等。目前,已有多种海洋药物在国内外获得批准上市,如抗病毒药物阿糖腺苷(Vidarabine)<sup>[3]</sup>、抗代谢药物阿糖胞苷(Cytarabine)<sup>[4]</sup>、抗菌药物头孢菌素 C(Cephalosporin C)<sup>[5]</sup>、抗结核药物利福霉素(Rifamycin)<sup>[6]</sup>、镇痛药物齐考诺肽(Ziconotide)<sup>[7-8]</sup>、抗癌药物艾日布林(Halaven)<sup>[9-10]</sup>、抗癌药物曲贝替定(Yondelis)<sup>[11-13]</sup>、靶向治疗药物布雷替尼(Adcetris)<sup>[14-15]</sup>、多发性骨髓瘤治疗药物奥比西酯(Plitidepsin)<sup>[16-17]</sup>等,这些药物对于人类健康事业具有十分重要的价值。根据 2010—2013 年的 1 项海洋微生物天然产物调查<sup>[18]</sup>,海洋真菌来源的天然产物中有 22%是从青霉属真菌中发现的,青霉属真菌在海洋真菌活性天然产物发现中占有重要地位。青霉属真菌产生的活性次级代谢产物种类众多,主要有生物碱类<sup>[19-20]</sup>、萜类<sup>[21-22]</sup>、聚

酮类<sup>[23-24]</sup>、肽类<sup>[25-26]</sup>等类型,所具有的活性也十分丰富<sup>[27]</sup>。

青霉 *Penicillium* sp. LHW5975 是一株从采自西沙群岛海域海绵 *Dysidea* sp. 样本中分离获得的共附生真菌,本研究对 *Penicillium* sp. LHW5975 的次级代谢产物进行了化学成分和生物活性研究。*Penicillium* sp. LHW5975 的大米发酵产物经过甲醇提取、醋酸乙酯萃取后得到醋酸乙酯层,通过减压硅胶柱色谱对其进行分离,所获得流分经过 ODS 中压柱色谱以及高效液相色谱(HPLC)等多种色谱学方法进行进一步分离纯化,获得 9 个化合物(图 1),包括 1 个新的化合物,命名为青霉吡啶碱甲(1),以及 8 个已知化合物,分别为 17-羟基短密青霉酰胺 N(17-hydroxybrevianamide N, 2)、苯并玛尔维碱 A(benzomalvin A, 3)、苯并玛尔维碱 B(benzomalvin B, 4)、苯并玛尔维碱 C(benzomalvin C, 5)、苯并玛尔维碱 D(benzomalvin D, 6)、苯并玛尔维碱 E(benzomalvin E, 7)、(-)-苯并玛尔维碱 E[(-)-benzomalvin E, 8] 和 *N*-甲基诺啉苯并玛尔维碱 A(*N*-methylnovobenzomalvin A, 9)。此外,评价了分离所得化合物对斑马鱼的促血管生成活性,化合物 2 和 7 具有一定的促血管生成活性。

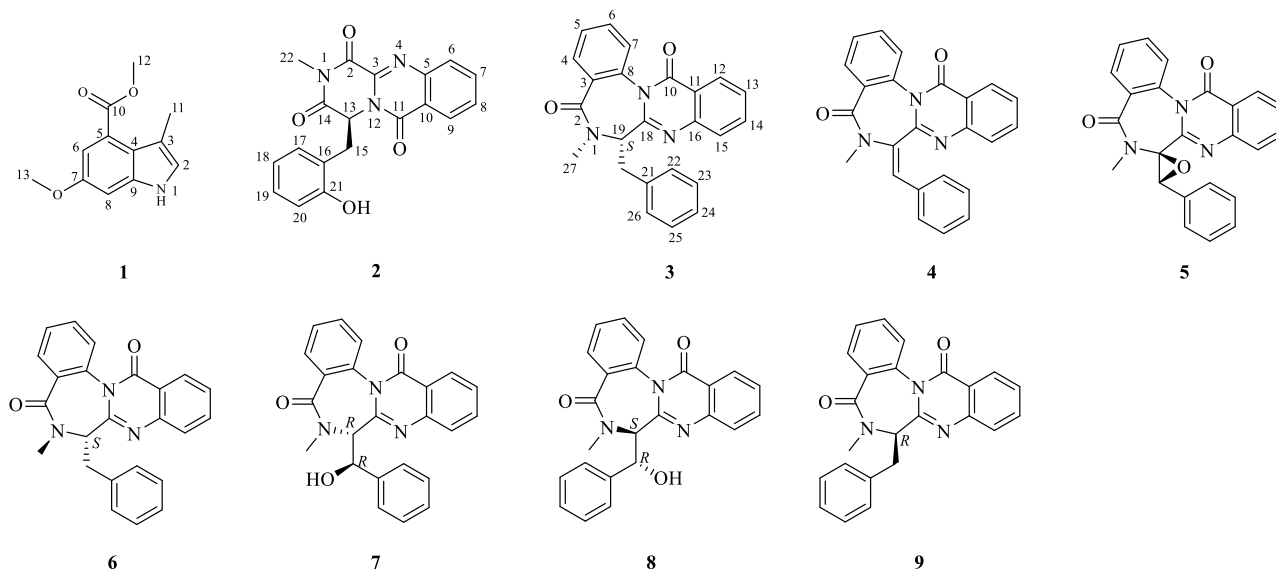


图 1 化合物 1~9 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—9

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

Waters 1525/2996 半制备高效液相色谱(Waters 公司,美国),半制备色谱柱 YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> RS (250 mm×10 mm, 5 μm, YMC 公司,日本),Waters

Xevo G2-XS Q-ToF、Waters Q-ToF micro YA019 液质联用仪(Waters 公司,美国),Bruker AVANCE-600 MHz 核磁共振仪(Bruker 公司,德国),Interchim puriflash 450 instruments 中压色谱仪(Interchim 公司,法国),JASCO FT/IR-4100 分光光度计(JASCO

公司,日本),柱色谱硅胶(200~300、300~400目,山东青岛海洋化工有限公司),分析级甲醇和乙腈、二氯甲烷(上海凌峰化学试剂有限公司),色谱级甲醇和乙腈(Merck公司,德国),丹红注射液(批号22111047,山东丹红制药有限公司)。

## 1.2 菌株来源

青霉 *Penicillium* sp. LHW5975 从采自西沙群岛海域的海绵 *Dysidea* sp. 样本中分离获得,通过观察形态学特征并结合分子生物学技术(18S rRNA)鉴定其为 *Penicillium* sp.。目前该菌株冻存于上海交通大学附属仁济医院海洋药物研究中心。

## 2 方法

### 2.1 发酵培养

**2.1.1 菌株培养基** PDA 培养基:葡萄糖马铃薯肉汤(PDB) 17.5 g、海盐 0.5 g、去离子水 500 mL。

大米发酵培养基:蛋白胨 0.6 g、麦芽提取物 0.6 g、味精 0.2 g、海盐 3.4 g、大米 107 g、去离子水 225 mL。

**2.1.2 菌株发酵** 从-80 °C冰箱中取出 *Penicillium* sp. LHW5975 甘油冻存管,用小烧杯取适量碎冰,将冻存管插到冰中缓慢解冻。将真菌接种至 PDA 平板上,使其复苏活化。做好标记后放入 28 °C 培养箱,培养 3~5 d。在活化好的平板上挑选形态良好的 *Penicillium* sp. LHW5975 单菌落,接种至 PDA 平板上,于 28 °C 培养箱中培养 3~5 d。将纯化好的 *Penicillium* sp. LHW5975 琼脂板切成小块,接种于大米培养基(2 L 锥形瓶,50 瓶)上,室温 25 °C 静置培养 35 d。

### 2.2 提取与分离

将大米发酵物用甲醇超声提取,得到粗浸膏 97 g。将粗浸膏用醋酸乙酯-水(1:1)进行萃取,得到醋酸乙酯提取物 40 g。过真空液相色谱(VLC),石油醚-醋酸乙酯(100:0、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、0:100)和醋酸乙酯-甲醇(50:1、20:1、10:1、5:1、1:1、0:100)梯度洗脱,得到 83 个初始流分,通过 TLC 与 HPLC 分析,将其合并成 6 个流分 G1~G6, G3(638.1 mg)经 ODS 中压柱色谱,乙腈-水(10%→100%, 490 min)梯度洗脱获得 11 个流分(Fr. 1~11)。流分 Fr. 3(124.5 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-0.1%甲酸水 50:50)纯化,得到化合物 1(3.8 mg,  $t_R=16$  min)、6(4.1 mg,  $t_R=8$  min)和 9(7.2 mg,  $t_R=21$  min);流分 Fr. 4(70.4 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-0.1%

甲酸水 40:60)纯化,得到化合物 2(5.6 mg,  $t_R=17$  min)、3(6.6 mg,  $t_R=25$  min);流分 Fr. 6(88.5 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-0.1%甲酸水 60:40)纯化,得到化合物 4(4.8 mg,  $t_R=13.5$  min)、5(5.2 mg,  $t_R=15.5$  min);流分 Fr. 7(158.4 mg)为化合物 7;流分 Fr. 9(18.2 mg)经过半制备 HPLC(乙腈-0.1%甲酸水 50:50)纯化,得到化合物 8(2.9 mg,  $t_R=13$  min)。

## 3 结构鉴定

化合物 1:黄色粉末,易溶于甲醇和二氯甲烷。HRESI(-)准分子离子峰  $m/z$  218.0806 [M-H]<sup>-</sup>(计算值 218.0817, C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>)给出分子式为 C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>,提示含 7 个不饱和度。UV(MeOH)光谱在 224、319 nm 处有吸收峰,IR(KBr)光谱在 1600、1440、1302、1243、1191 cm<sup>-1</sup> 等波数处有强吸收峰,提示结构中含有共轭羰基和苯环等结构片段。

<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) (表 1) 显示出 13 个质子信号:1 个活泼氢信号( $\delta_H$  9.51, 1H, s);3 个芳香质子信号 H-2( $\delta_H$  6.48, 1H, s)、H-6( $\delta_H$  6.62, 1H, d,  $J=3.0$  Hz)和 H-8( $\delta_H$  6.56, 1H, d,  $J=3.0$  Hz);2 个甲氧基氢信号 H<sub>3</sub>-12( $\delta_H$  3.58, 3H, s)和 H<sub>3</sub>-13( $\delta_H$  3.51, 3H, s)以及 1 个与双键相连的单峰甲基氢信号 H<sub>3</sub>-11( $\delta_H$  2.23, 3H, s)。根据偶合常数推测 H-6 和 H-8 是 1 个苯环上处于间位的 2 个芳香氢信号。<sup>13</sup>C-NMR(150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)和 DEPT135 谱显示该化合物含有 12 个碳:1 个羰基碳信号 C-10( $\delta_C$  165.5);8 个烯烃碳信号 C-2( $\delta_C$  112.2)、C-3( $\delta_C$

表 1 化合物 1 的 NMR 数据(600/150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Table 1 NMR data for compound 1 (600/150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

碳位	$\delta_C$ , type	$\delta_H$	HMBC(H→C)
2	112.2, CH	6.48 (s)	C-3, 5, 11
3	113.8, C		
4	137.9, C		
5	111.5, C		
6	107.4, CH	6.62 (d, $J=3.0$ Hz)	C-4, 8, 10
7	151.9, C		
8	104.9, CH	6.56 (d, $J=3.0$ Hz)	C-4, 6, 7, 9
9	152.8, C		
10	165.5, C		
11	20.2, CH <sub>3</sub>	2.23 (s)	C-2, 3, 4
12	51.6, CH <sub>3</sub>	3.58 (s)	C-10
13	56.3, CH <sub>3</sub>	3.51 (s)	C-7, 9
1-NH		9.51 (s)	

113.8)、C-4 ( $\delta_c$  137.9)、C-5 ( $\delta_c$  111.5)、C-6 ( $\delta_c$  107.4)、C-7 ( $\delta_c$  151.9)、C-8 ( $\delta_c$  104.9) 和 C-9 ( $\delta_c$  152.8); 2个甲氧基碳信号 C-12 ( $\delta_c$  51.6) 和 C-13 ( $\delta_c$  56.3) 以及 1个甲基碳信号 C-11 ( $\delta_c$  20.2)。

在 HMBC 谱 (图 2) 中, H-6 显示与 C-4 和 C-8 有远程相关, H-8 和 C-4、C-6、C-7 以及 C-9 之间有远程相关, 可以确定 1 个苯环结构片的存在 (图 2)。H-6/C-10 和 H-13/C-7 之间的 HMBC 相关提示了该苯环是 1 个 1,3,4,5-四取代苯环。H<sub>3</sub>-11/C-2、C-3、C-4 和 H-2/C-3、C-5 之间的 HMBC 相关, 结合 C-9 化学位移值向低场偏移 ( $\delta_c$  152.8), 提示结构中含有吲哚骨架, 同时确定了 CH<sub>3</sub>-11 位于吲哚环的 C-3 位。H-6/C-10 之间的 HMBC 相关确定了羰基 C-10 位于吲哚环 C-5 位。甲氧基氢信号 H<sub>3</sub>-12 和 H<sub>3</sub>-13 分别与 C-10 和 C-7 存在 HMBC 相关, 确定了这 2 个甲氧基分别连接在 C-10 和 C-7 位。根据以上一维和二维核磁谱数据, 确定了化合物 1 的结构。经过 SciFinder 检索发现, 该化合物是未有文献报道的新化合物, 命名为青霉吲哚碱甲 (penicindoline A)。

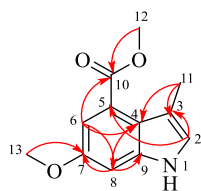


图 2 化合物 1 的 HMBC 相关

Fig. 2 Key HMBC correlations of compound 1

化合物 2: 白色固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.96 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-6), 7.86 (1H, t,  $J$  = 7.8 Hz, H-7), 7.65 (1H, t,  $J$  = 7.8 Hz, H-8), 8.39 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-9), 5.96 (1H, dd,  $J$  = 4.8, 3.6 Hz, H-13), 3.31 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 3.0 Hz, H-15a), 3.79 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 4.8 Hz, H-15b), 6.75 (2H, d,  $J$  = 5.4 Hz, H-17, 18), 7.10 (1H, m, H-19), 6.59 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-20), 3.18 (3H, s, H<sub>3</sub>-22); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 156.9 (C, C-2), 134.7 (C, C-3), 146.6 (C, C-5), 129.5 (CH, C-6, C-8), 135.2 (CH, C-7), 127.1 (CH, C-9), 121.8 (C, C-10), 160.1 (C, C-11), 56.9 (CH, C-13), 167.8 (C, C-14), 33.1 (CH<sub>2</sub>, C-15), 119.4 (C, C-16), 131.7 (CH, C-17), 121.4 (CH, C-18), 130.2 (CH, C-19), 116.0 (CH, C-20), 154.6 (C, H-21), 27.5 (CH<sub>3</sub>, C-22)。以上 NMR 数据与文献中报道一致<sup>[28]</sup>, 确定化合物 2 为 17-hydroxybrevianamide N。

化合物 3: 无色无定型固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.83 (2H, m, H-4, 15), 7.63 (2H, m, H-5, 13), 7.69 (1H, m, H-6), 7.71 (1H, m, H-7), 8.35 (1H, t,  $J$  = 8.4 Hz, H-12), 7.93 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-14), 4.90 (1H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-19), 3.82 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 7.8 Hz, H-20a), 3.44 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 7.2 Hz, H-20b), 7.56 (3H, m, H-22, 24, 26), 7.28 (2H, m, H-23, 25), 3.11 (3H, s, H<sub>3</sub>-27); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 167.5 (C, C-2), 133.1 (C, C-3, 8), 130.0 (CH, C-4), 129.1 (CH, C-5, 22, 26), 131.1 (CH, C-6), 128.8 (CH, C-7, 23, 25), 161.4 (C, C-10), 121.8 (C, C-11), 127.8 (CH, C-12, 15), 127.6 (CH, C-13), 135.0 (CH, C-14), 146.1 (C, C-16), 152.0 (C, C-18), 58.4 (CH, C-19), 33.3 (CH<sub>2</sub>, C-20), 136.8 (C, C-21), 127.0 (CH, C-24), 28.4 (CH<sub>3</sub>, C-27)。以上 NMR 数据与文献中报道一致<sup>[29]</sup>, 确定化合物 3 为 benzomalvin A。

化合物 4: 黄色固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.86 (2H, m, H-4, 14), 7.63 (3H, m, H-5~7), 8.25 (1H, dd,  $J$  = 7.9, 1.6 Hz, H-12), 7.54 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-13), 7.78 (1H, dd,  $J$  = 7.2, 1.7 Hz, H-15), 7.05 (1H, s, H-20), 7.26 (5H, m, H-22~26), 3.33 (3H, s, H<sub>3</sub>-27); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 164.8 (C, C-2), 133.0 (C, C-3), 130.8 (CH, C-4), 131.6 (CH, C-5), 128.8 (CH, C-6), 126.9 (CH, C-7), 132.2 (C, C-8), 160.7 (C, C-10), 121.8 (C, C-11, C-21), 127.6 (CH, C-12), 128.2 (CH, C-13), 135.0 (CH, C-14), 127.9 (CH, C-15), 146.6 (C, C-16), 151.5 (C, C-18), 129.1 (C, C-19), 132.4 (CH, C-20), 128.6 (CH, C-22, C-26), 128.9 (CH, C-23, 25), 129.3 (CH, C-24), 35.6 (CH<sub>3</sub>, C-27)。以上 NMR 数据与文献中报道一致<sup>[30]</sup>, 确定化合物 4 为 benzomalvin B。

化合物 5: 白色固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.95 (1H, dd,  $J$  = 7.8, 1.5 Hz, H-4), 7.56 (1H, brdd,  $J$  = 7.8, 7.8 Hz, H-5), 7.43 (1H, m, H-6), 6.87 (1H, m, H-7), 8.09 (1H, dd,  $J$  = 7.6, 2.0 Hz, H-12), 7.54 (1H, dd,  $J$  = 7.6, 7.0 Hz, H-13), 7.86 (1H, m, H-14), 7.89 (1H, m, H-15), 3.42 (1H, s, H-20), 6.59 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-22), 7.09 (2H, m, H-23, 25), 7.17 (1H, m, H-24), 6.60 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-26), 3.17 (3H, s, H-27); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 164.9 (C, C-2), 131.4 (C, C-3), 129.5 (CH, C-4), 129.0 (CH, C-5), 130.9 (CH, C-6), 126.8 (CH, C-7), 131.5 (C, C-8), 160.0 (C, C-10), 121.6 (C, C-11), 127.8 (CH, C-12), 128.3 (CH, C-13), 135.3 (CH, C-14), 128.2 (CH, C-15),

145.5 (C, C-16), 147.7 (C, C-18), 72.1 (C, C-19), 66.7 (CH, C-20), 130.6 (C, C-21), 125.6 (CH, C-22, 26), 128.1 (CH, C-23, 25), 129.1 (CH, C-24), 28.7 (CH<sub>3</sub>, C-27)。以上 NMR 数据与文献中报道一致<sup>[30]</sup>, 确定化合物 **5** 为 benzomalvin C。

化合物 **6**: 无色固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.28 (4H, m, H-4, 14, 22, 26), 7.84 (1H, m, H-5), 7.63 (1H, m, H-6), 7.83 (1H, m, H-7), 7.69 (1H, m, H-8), 8.06 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-13), 7.63 (1H, m, H-15), 4.80 (1H, dd,  $J = 10.8, 6.0$  Hz, H-19), 2.80 (1H, dd,  $J = 13.8, 5.4$  Hz, H-20a), 2.39 (1H, dd,  $J = 13.8, 10.8$  Hz, H-20b), 7.96 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-23, 25), 7.56 (1H, m, H-24), 2.97 (3H, s, H<sub>3</sub>-27); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 165.6 (C, C-2), 133.2 (C, C-3), 130.8 (CH, C-4), 131.3 (CH, C-5), 129.1 (CH, C-6), 128.3 (CH, C-7), 136.0 (C, C-8), 161.7 (C, C-10), 121.6 (C, C-11), 127.9 (CH, C-12), 127.5 (CH, C-13), 129.0 (CH, C-14, C-22, 26), 135.2 (CH, C-15), 146.5 (C, C-16), 153.9 (C, C-18), 70.5 (CH, C-19), 36.0 (CH<sub>2</sub>, C-20), 132.3 (C, C-21), 127.8 (CH, C-23, 25), 129.2 (CH, C-24), 38.4 (CH<sub>3</sub>, C-27)。以上 NMR 数据与文献中报道一致<sup>[29]</sup>, 确定化合物 **6** 为 benzomalvin D。

化合物 **7**: 白色固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.97 (1H, td,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-4), 7.70 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-5), 7.80 (1H, td,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-6), 7.64 (1H, td,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-7), 8.32 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, H-12), 7.75 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-13), 7.33 (3H, m, H-14, 15, 24), 4.63 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-19), 4.07 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz, H-20), 7.15 (2H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-22, 26), 7.54 (2H, td,  $J = 7.8$  Hz, 2.4 Hz, H-23, 25), 2.71 (3H, s, CH<sub>3</sub>-27); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 165.6 (C, C-2), 132.1 (C, C-3), 130.7 (CH, C-4), 129.2 (CH, C-5), 131.4 (CH, C-6), 128.7 (CH, C-7), 132.9 (C, C-8), 161.7 (C, C-10), 121.5 (C, C-11), 127.6 (CH, C-12), 127.9 (CH, C-13), 135.1 (CH, C-14), 127.8 (CH, C-15), 146.6 (C, C-16), 153.0 (C, C-18), 74.9 (CH, C-19), 71.6 (CH, C-20), 140.4 (C, C-21), 126.3 (CH, C-22, 26), 129.1 (CH, C-23, 25), 129.3 (CH, C-24), 38.1 (CH<sub>3</sub>, C-27)。以上 NMR 数据与文献中报道一致<sup>[31]</sup>, 确定化合物 **7** 为 benzomalvin E。

化合物 **8**: 白色固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.97 (1H, td,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-4), 7.70 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-5), 7.80 (1H, td,  $J = 8.4, 1.2$

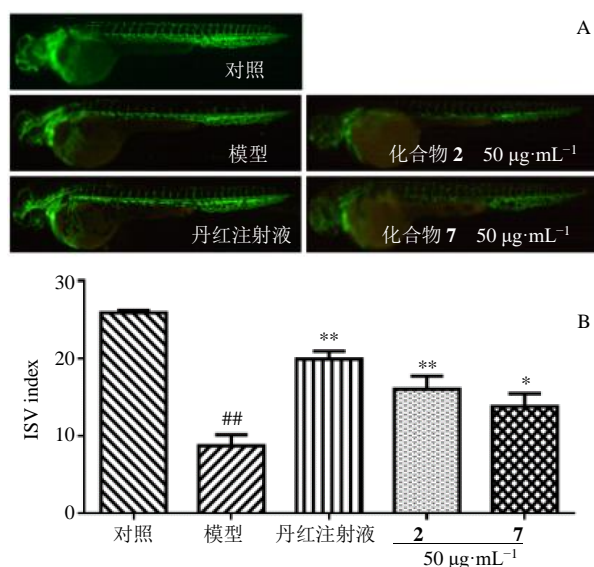
Hz, H-6), 7.64 (1H, td,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-7), 8.32 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, H-12), 7.75 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-13), 7.33 (3H, m, H-14, 15, 24), 4.63 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-19), 4.07 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz, H-20), 7.15 (2H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-22, 26), 7.54 (2H, td,  $J = 7.8, 2.4$  Hz, H-23, 25), 2.91 (3H, s, H<sub>3</sub>-27); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 166.6 (C, C-2), 131.1 (C, C-3), 132.7 (CH, C-4), 127.2 (CH, C-5), 130.4 (CH, C-6), 128.7 (CH, C-7), 132.9 (C, C-8), 161.7 (C, C-10), 121.5 (C, C-11), 127.6 (CH, C-12), 127.9 (CH, C-13), 135.1 (CH, C-14), 127.8 (CH, C-15), 146.6 (C, C-16), 153.0 (C, C-18), 60.9 (CH, C-19), 71.6 (CH, C-20), 140.4 (C, C-21), 126.3 (CH, C-22, 26), 129.1 (CH, C-23, 25), 129.3 (CH, C-24), 31.1 (CH<sub>3</sub>, C-27)。以上 NMR 数据与文献中报道一致<sup>[32]</sup>, 确定化合物 **8** 为 (-)-benzomalvin E。

化合物 **9**: 黄色固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.84 (1H, m, H-4), 7.63 (1H, m, H-5), 7.68 (2H, m, H-6, 7), 8.33 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-12), 7.54 (1H, m, H-13), 7.86 (1H, m, H-14), 7.78 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.6$  Hz, H-15), 4.94 (1H, dd,  $J = 8.4, 6.6$  Hz, H-19), 3.48 (1H, dd,  $J = 15.0, 8.4$  Hz, H-20a), 3.58 (1H, dd,  $J = 15.0, 6.6$  Hz, H-20b), 7.30 (2H, m, H-22, 26), 7.62 (2H, m, H-23, 25), 7.25 (1H, m, H-24), 2.90 (3H, s, H<sub>3</sub>-27); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 166.7 (C, C-2), 131.3 (C, C-3), 129.1 (CH, C-4), 128.9 (CH, C-5, 22, 26), 132.8 (CH, C-6), 128.6 (CH, C-7), 132.9 (C, C-8), 160.8 (C, C-10), 121.3 (C, C-11), 128.2 (CH, C-12), 127.7 (CH, C-13), 135.2 (CH, C-14), 127.7 (CH, C-15), 145.6 (C, C-16), 152.7 (C, C-18), 58.0 (CH, C-19), 32.3 (CH<sub>2</sub>, C-20), 137.2 (C, C-21), 128.5 (CH, C-23, 25), 127.5 (CH, C-24), 27.6 (CH<sub>3</sub>, C-27)。以上 NMR 数据与文献中报道一致<sup>[33]</sup>, 确定化合物 **9** 为 *N*-methylnovobenzomalvin A。

#### 4 促血管生成活性筛选及结果

雌雄斑马鱼分开喂养, 照明 14 h 与黑暗 10 h 交替进行, 定时饲喂人工颗粒状饵料以及刚孵出的卤虫无节幼体。取健康性成熟的斑马鱼按照雌雄比例 1 : 1 放入交配缸内, 次日 9:00~10:00 获得受精卵。对受精卵进行消毒洗涤之后移入斑马鱼胚胎培养用水 (含 0.17 mmol/L KCl、5.0 mmol/L NaCl、0.16 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、0.4 mmol/L CaCl<sub>2</sub>) 中, 于 28 °C 下控光培养。取受精 24 h 的斑马鱼胚胎 Tg (vegfr2:

GFP), 使用 1 mg/mL 链酶蛋白酶 E 溶液脱去卵膜, 随机分组, 即对照组、模型组(造模试剂 PTK787)、阳性对照组(丹红注射液)及样品组, 每组 10 条, 2 个平行重复。模型组、阳性对照组、样品组给予 PTK787 (0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 阳性对照组给予丹红注射液 (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), 样品组给予化合物样品 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 在光照培养箱中 28  $^{\circ}\text{C}$  培养。给药 24 h 后于荧光显微镜下观察斑马鱼节间血管生长情况并拍照, 计数血管条数。结果显示(图 3), 用化合物 2 和 7 处理的斑马鱼节间血管生长数目在质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时显著增多, 说明在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度下化合物 2 和 7 对斑马鱼的血管生长有促进作用。



A-斑马鱼节间血管荧光显微图像; B-节间血管条数 (ISV index); 与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。A-fluorescence microscopy of intersegmental vessels in zebrafish; B-number of intersegmental vessels (ISV index); ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图 3 斑马鱼促血管生成活性结果

Fig. 3 Results of proangiogenesis activity in zebrafish

## 5 讨论

本研究从海绵 *Dysidea* sp. 的共附生青霉 *Penicillium* sp. LHW5975 的发酵产物中分离得到 9 个生物碱类化合物, 其中化合物 1 为新化合物, 命名为青霉吡啶碱甲 (penicindoline A)。化合物 2 和 7 对斑马鱼显示出促血管生成活性, 在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度时使斑马鱼血管数目增多。该研究提示海洋来源的青霉是活性天然产物发现的重要来源, 极具开发价值和前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 张诗, 张颖, 宁耀东, 等. 海洋微生物次级代谢产物抗炎作用研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2023, 42(5): 81-90.
- [2] Carroll A R, Copp B R, Davis R A, *et al.* Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37(2): 175-223.
- [3] Li H N, Deng J X, Yu P M, *et al.* Gaining insight into irrational off-label use of vidarabine through analysis of a spontaneous reporting system in China [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2020, 45(6): 1301-1311.
- [4] Im A, Quann K, Agha M, *et al.* Phase 2 study of epigenetic priming with decitabine followed by cytarabine for acute myeloid leukemia in older patients [J]. *Am J Hematol*, 2024, 99(3): 380-386.
- [5] Lin X M, Kück U. Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(24): 8007-8020.
- [6] Gill S K, Garcia G A. Rifamycin inhibition of WT and Rif-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli* RNA polymerases *in vitro* [J]. *Tuberculosis*, 2011, 91(5): 361-369.
- [7] Sanford M. Intrathecal ziconotide: A review of its use in patients with chronic pain refractory to other systemic or intrathecal analgesics [J]. *CNS Drugs*, 2013, 27(11): 989-1002.
- [8] Van Zundert J, Rauck R. Intrathecal drug delivery in the management of chronic pain [J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2023, 37(2): 157-169.
- [9] Su M X, Lin H W, Nguyen H T H, *et al.* Monitoring trends in the absolute lymphocyte count and the neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with breast cancer receiving eribulin [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 195.
- [10] Goyal R K, Zhang J C, Davis K L, *et al.* Real-world treatment patterns and clinical outcomes in patients treated with eribulin after prior phosphoinositide 3-kinase inhibitor treatment for metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2024, 205(1): 201-210.
- [11] Galera M, Álvarez R, Arregui M, *et al.* A clear cell sarcoma case: A diagnostic and treatment challenge, with a promising response to trabectedin [J]. *Case Rep Oncol*, 2023, 16(1): 1542-1550.
- [12] Miolo G, Buonadonna A, Scalone S, *et al.* Metabolic clues to bile acid patterns and prolonged survival in patients with metastatic soft-tissue sarcoma treated with trabectedin [J]. *Metabolites*, 2023, 13(10): 1035.
- [13] Reichinger A. Long-time progression-free survival with

- trabectedin in chemorefractory metastatic leiomyosarcoma of the retroperitoneum: A case report [J]. *Case Rep Oncol*, 2023, 16(1): 1013-1019.
- [14] Kaimi Y, Takahashi Y, Taniguchi H, *et al.* Loss of or decrease in CD30 expression in four patients with anaplastic large cell lymphoma after brentuximab vedotin-containing therapy [J]. *Virchows Arch*, 2024, 484(3): 465-473.
- [15] Tonozuka Y, Tanaka H, Nomura K, *et al.* The combination of brentuximab vedotin and chidamide synergistically suppresses the proliferation of T-cell lymphoma cells through the enhancement of apoptosis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2024, 93(2): 137-149.
- [16] Mateos M V, Prosper F, Martín Sánchez J, *et al.* Phase I study of plitidepsin in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(4): 3999-4009.
- [17] Gomes N G M, Valentão P, Andrade P B, *et al.* Plitidepsin to treat multiple myeloma [J]. *Drugs Today*, 2020, 56(5): 337-347.
- [18] Zhao C Y, Zhu T H, Zhu W M. New marine natural products of microbial origin from 2010 to 2013 [J]. *Chin J Org Chem*, 2013, 33(6): 1195.
- [19] Yao F H, Liang X, Lu X H, *et al.* Pyrrospirones K-Q, decahydrofluorene-class alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. SCSIO 41512 [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(8): 2071-2081.
- [20] Zhang Y H, Du H F, Liu Y F, *et al.* Novel anti-inflammatory diketopiperazine alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium brasilianum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2024, 108(1): 194.
- [21] Zou J B, Wu J L, Ding L J, *et al.* Guignardones Y-Z, antiviral meroterpenes from *Penicillium* sp. NBUF154 associated with a *Crella* sponge from the marine mesophotic zone [J]. *Chem Biodivers*, 2022, 19(8): e202200475.
- [22] Meng L H, Li X M, Li H L, *et al.* Chermebilaenes A and B, new bioactive meroterpenoids from co-cultures of marine-derived isolates of *Penicillium bilaiae* MA-267 and *Penicillium chermesinum* EN-480 [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(7): 339.
- [23] Wei X, Feng C, Li X H, *et al.* Enantiomeric polyketides from the starfish-derived symbiotic fungus *Penicillium* sp. GGF16-1-2 [J]. *Chem Biodivers*, 2019, 16(6): e1900052.
- [24] Pang X Y, Wang P, Liao S R, *et al.* Three unusual hybrid sorbicillinoids with anti-inflammatory activities from the deep-sea derived fungus *Penicillium* sp. SCSIO06868 [J]. *Phytochemistry*, 2022, 202: 113311.
- [25] Yu X D, Li L, Sun S W, *et al.* A cyclic dipeptide from marine fungus *Penicillium chrysogenum* DXY-1 exhibits anti-quorum sensing activity [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(11): 7693-7700.
- [26] Hou X M, Li Y Y, Shi Y W, *et al.* Integrating molecular networking and <sup>1</sup>H NMR to target the isolation of chrysoeamides from a library of marine-derived *Penicillium* fungi [J]. *J Org Chem*, 2019, 84(3): 1228-1237.
- [27] Yang X L, Liu J P, Mei J H, *et al.* Origins, structures, and bioactivities of secondary metabolites from marine-derived *Penicillium* fungi [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2021, 21(15): 2000-2019.
- [28] Xu W F, Chao R, Hai Y, *et al.* 17-Hydroxybrevianamide N and its N1-methyl derivative, quinazolinones from a soft-coral-derived *Aspergillus* sp. fungus: 13S enantiomers as the true natural products [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(4): 1353-1358.
- [29] Sun H H, Barrow C J, Cooper R. Benzomalvin D, a new 1, 4-benzodiazepine atropisomer [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(10): 1575-1580.
- [30] Sun H H, Barrow C J, Sedlock D M, *et al.* Benzomalvins, new substance P inhibitors from a *Penicillium* sp [J]. *J Antibiot*, 1994, 47(5): 515-522.
- [31] 徐启航, 安法梁, 李蕾, 等. 1 株蓝藻来源真菌 *Aspergillus* sp. 的次生代谢产物研究 [J]. *中国海洋药物*, 2019, 38(1): 28-32.
- [32] Feng Q M, Feng Y, Zhang T Y, *et al.* (±) Benzomalvins E isolated from *Penicillium* sp. SYPF 8411 in the rhizosphere soil of *Codonopsis clematidea* [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(13): 1884-1890.
- [33] Ishikawa K. Quinazolinobenzodiazepine derivatives, novobenzomalvins A-C: fibronectin expression regulators from *Aspergillus novofumigatus* [J]. *Sci Pharm*, 2011, 79(4): 937-950.

[责任编辑 王文倩]