

棒柄杯伞的化学成分研究

雷启军^{1,2}, 逯永满¹, 马国需^{2,3}, 孙照翠³, 许旭东³, 石磊岭^{2*}, 吕杰^{1*}

1. 新疆大学, 新疆 乌鲁木齐 830046

2. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

3. 中国医学科学院北京协和医院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 研究担子菌棒柄杯伞 *Clitocybe clavipes* 的化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备液相等色谱学技术进行分离纯化, 通过现代波谱学技术对化合物的结构进行表征和解析。同时采用 MTT 法测试化合物的体外细胞毒活性。结果 从棒柄杯伞 95% 乙醇提取物中分离鉴定了 10 个化合物, 分别为 (1aR,11R,11aR,Z)-9-(aminomethyl)-7,10-dihydroxy-5-methyl-3,6,11,11a-tetrahydro-2H-11,1a-(epoxymethano)benzo[4,5]cyclodeca[1,2-b]oxiren-13-one (1)、clavilactone C (2)、clavilactone D (3)、clavilactone F (4)、clavilactone G (5)、clavilactone J (6)、clavilactone K (7)、arnebinol A (8)、clavipyrine A (9)、cyclo (Trp-Ala) (10)。化合物 1~10 对人胃癌 HGC-27 细胞具有不同程度的增殖抑制作用, 其中化合物 1、3、8、9 的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 分别为 13.57、3.62、7.31、11.51 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为棒柄杯伞内酯 Q。化合物 10 为首次从担子菌棒柄杯伞中分离得到; 化合物 1、3、8、9 具有较为显著的细胞毒活性。

关键词: 棒柄杯伞; 混源菇; 棒柄杯伞内酯 Q; 细胞毒活性; clavilactone C; arnebinol A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)11-3602-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.004

Chemical constituents from *Clitocybe clavipes*

LEI Qijun^{1,2}, LU Yongman¹, MA Guoxu^{2,3}, SUN Zhaocui³, XU Xudong³, SHI Leiling², LYU Jie¹

1. Xinjiang University, Urumqi 830046, China

2. Xinjiang Institute of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, Urumqi 830002, China

3. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents of *Basidiomycete Clitocybe clavipes*. **Methods** Chromatographic techniques including silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography and semi-preparative liquid chromatography were employed to isolate and purify the compounds. Their structures were characterized and interpreted by modern wave spectroscopy techniques. The *in vitro* cytotoxic activity of compounds was determined by MTT assay. **Results** A total of ten compounds were isolated from the 95% EtOH extract of *C. clavipes*, which were identified as (1aR,11R,11aR,Z)-9-(aminomethyl)-7,10-dihydroxy-5-methyl-3,6,11,11a-tetrahydro-2H-11,1a-(epoxymethano)benzo[4,5]cyclodeca[1,2-b]oxiren-13-one (1), clavilactone C (2), clavilactone D (3), clavilactone F (4), clavilactone G (5), clavilactone J (6), clavilactone K (7), arnebinol A (8), clavipyrine A (9) and cyclo (Trp-Ala) (10). The results of cytotoxicity experiments showed that compounds 1—10 had different degrees of inhibitory effects on the proliferation of human gastric cancer cells HGC-27, and the median inhibition concentration (IC₅₀) values of compounds 1, 3, 8, and 9 were 13.57, 3.62, 7.31 and 11.51 $\mu\text{mol/L}$, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new compound named clavilactone Q, and compound 10 is isolated for the first time from *Basidiomycete C. clavipes*. Compounds 1, 3, 8, and 9 had significant cytotoxicity.

Key words: *Clitocybe clavipes* (Pers.) Fr.; meroterpenoid; clavilactone Q; cytotoxicity; clavilactone C; arnebinol A

收稿日期: 2024-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (8216130391)

作者简介: 雷启军 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: 1484395040@qq.com

*通信作者: 石磊岭 (1977—), 男, 硕士, 研究员, 从事中药学研究。E-mail: shileiling@sina.com

吕杰 (1978—), 男, 博士, 主要从事微生物基因工程制药、离子束生物技术和分子生物学相关领域研究。E-mail: lvjie@xju.edu.cn

棒柄杯伞 *Clitocybe clavipes* (Pers.) Fr. 为真菌门 (Eumycota) 层菌纲 (Hymenomycetes) 伞菌目 (Agaricales) 白蘑科 (Tricholomataceae) 杯伞属 *Clitocybe* (Fr.) Staude 大型真菌, 在中国主要分布于新疆、西藏、广东、四川等地区, 是一种健康无毒、药食两用类真菌。近年来, 由于真菌的次级代谢产物具有独特的化学结构和潜在的生物活性, 使得越来越多的化学家、生物学家和药理学家对于真菌次级代谢产物相关研究充满了浓厚的兴趣^[1-3]。混源萜是一类具有萜类片段和复杂分子支架结构的杂合类天然产物^[4], 被发现于植物、海洋生物和真菌中^[5-7]。此外, 相关研究报道了来自真菌的混源萜类化合物不仅具有较多新颖的结构, 而且还具有广泛的生物活性^[4]。Clavilactones 是一类骨架中由香叶基片段与芳环片段组合形成的具有苯并十元碳环结构单元的混源萜类化合物, 由 Arnone 等^[8]于 1994 年首次从担子菌棒柄杯伞中分离得到。目前研究报道了 clavilactones 类化合物具有显著的生物活性, 包括抗菌^[9]、抗真菌^[10]、抗肿瘤^[11-13]、心肌保护^[14]、抗炎^[15-16]、神经保护^[17]等, 值得关注的是, 其中具有代表性的化合物 clavilactone D 能够抑制表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶, 其 IC₅₀ 值为 5.5 μmol/L^[18], 鉴于一些酪氨酸激酶是原癌基因的产物^[11], 所以推测这些激酶的抑制剂极有可能是一种潜在的抗肿瘤策略。本课题组前期一直致力于发掘棒柄杯伞中苯并十元碳环活性成分, 至今已发现约 30 个相关混源萜, 且药理学研究表明多数苯并十元碳环混源萜为生物活性显著的先导化合物^[11,19-24], 具有潜在的开发价值。为进一步研究担子菌棒柄杯伞中苯并十元碳环活性成分, 本研究通过对棒柄杯伞 95% 乙醇提取物中的化学成分进行系统的分离纯化, 从中得到 10 个化合物, 分别鉴定为 (1aR,11R,11aR,Z)-9-(aminomethyl)-7,10-dihydroxy-5-methyl-3,6,11,11a-tetrahydro-2H-11,1a-(epoxymethano)benzo[4,5]cyclodeca [1,2-b]oxiren-13-one (**1**)、clavilactone C (**2**)、clavilactone D (**3**)、clavilactone F (**4**)、clavilactone G (**5**)、clavilactone J (**6**)、clavilactone K (**7**)、arnebinol A (**8**)、clavipyrine A (**9**)、cyclo (Trp-Ala) (**10**)。其中, 化合物 **1** 为 1 个新的苯并十元碳环混源萜类化合物, 命名为棒柄杯伞内酯 Q。化合物 **10** 为首次从担子菌棒柄杯伞中分离得到。体外细胞毒活性实验结果显示, 化合物 **1~10** 对人

胃癌 HGC-27 细胞具有不同程度的增殖抑制作用, 其中化合物 **1**、**3**、**8**、**9** 具有较为显著的细胞毒活性, 其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值分别为 13.57、3.62、7.31、11.51 μmol/L。

1 仪器与材料

R-1005 型旋转蒸发仪 (河南帕克实验室设备有限公司); Bruker Avance III 600 型 NMR (德国 Bruker 公司); 赛默飞世 LTQ-Orbitrap X 液质联用仪 (美国 Thermo Fisher 公司); KH-700DB 型超声波清洗器 (苏州安源仪器有限公司); ZF-7 型手提紫外分析仪 (河南博晨仪器设备有限公司); LumtchK-501 型半制备型液相色谱仪 (北京创新通恒科技有限公司); DLSB-5/10 型低温冷却液循环泵 (郑州长城科工贸有限公司); 柱色谱硅胶和薄层色谱硅胶 HF₂₅₄ (青岛海洋化工有限公司); 反相硅胶 Lichroprep Rp-18 (北京谱朋科技有限公司); HW-40C 凝胶 (北京英莱克科技发展有限公司); HGC-27 细胞 (中国科学院上海细胞研究所); 常规试剂均为分析纯; 顺铂 (德州德药制药有限公司, 批号 86903942000421)

本实验所用的药材采集于新疆维吾尔自治区和田地区, 经新疆维吾尔自治区中药民族药研究所石磊岭研究员鉴定为棒柄杯伞 *C. clavipes* (Pers.) Fr., 凭证药材标本 (20200842) 保存于新疆维吾尔自治区中药民族药研究所药材室。

2 方法

2.1 提取与分离

取 3.2 kg 的棒柄杯伞菌株发酵物干燥后粉碎, 经 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液并减压浓缩至浸膏状, 共得 550.2 g 总浸膏。将总浸膏加水混悬, 依次用石油醚、醋酸乙酯萃取, 分别得石油醚部位 92.9 g、醋酸乙酯部位 156.3 g。取醋酸乙酯部位浸膏首先经过常压硅胶柱色谱 (100~200 目) 分离, 分别以石油醚-醋酸乙酯系统 (20:1→10:1→5:1→2:1→1:1) 和二氯甲烷-甲醇系统 (15:1→10:1→5:1→1:1→0:1) 梯度洗脱, 通过硅胶薄层检测合并相似洗脱液, 共得到 8 个流分 (Fr. 1~8)。Fr. 1 (15.8 g) 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 分别以石油醚-醋酸乙酯 (50:1→20:1→10:1→5:1→2:1) 梯度洗脱, 合并相似洗脱液得到 3 个组分 (Fr. 1-1~1-3)。其中, Fr. 1-2 (5.8 g) 进一步通过半制备液相纯化得化合物 **3** (6.2 mg, t_R=32.3 min, 45% 乙腈, 2.0 mL/min)。Fr. 2 (25.0 g) 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以石油醚-醋

酸乙酯系统(10:1→5:1→1:1→0:1)梯度洗脱,经硅胶薄层检测合并相似洗脱液得到 3 个组分(Fr. 2-1~2-3)。其中, Fr. 2-1 (5.8 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)分离并进一步通过半制备液相纯化得到化合物 4 (3.5 mg, t_R =36.5 min, 40%乙腈, 2.0 mL/min)。Fr. 4 (15.3 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)分离,进一步通过半制备液相纯化得到化合物 5 (4.5 mg, t_R =26.6 min, 42%乙腈, 2.0 mL/min)、7 (4.3 mg, t_R =35.8 min, 2.0 mL/min)。Fr. 5 (24.5 g) 经硅胶柱色谱(200~300 目)分离,经硅胶薄层检测合并相似洗脱液得到 5 个组分 Fr. 5-1~5-5。其中, Fr. 5-1 (5.7 g) 进一步通过半制备液相纯化得到化合物 2 (5.5 mg, t_R =23.1 min, 40%乙腈, 2.0 mL/min)、6 (6.5 mg, t_R =33.2 min, 2.0 mL/min)。Fr.6 (15.8 g) 经硅胶柱色谱(200~300 目)以二氯甲烷-甲醇系统(10:1→5:1→2:1)梯度洗脱,合并相似洗脱液得到 3 个组分(Fr. 6-1~6-3)。Fr. 6-2 (3.8 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)分离,进一步通过半制备液相纯化得到化合物 1 (6.5 mg, t_R =25.2 min, 48%乙腈, 2.0 mL/min)、8 (2.5 mg, t_R =33.1 min, 2.0 mL/min)、9 (7.5 mg, t_R =43.5 min, 2.0 mL/min)。Fr. 8 (17.6 g) 经 ODS 柱色谱分离,以甲醇水(20%→100%)为流动相梯度洗脱,经硅胶薄层检测并合并相似洗脱液得到 2 个组分 Fr. 8-1 和 Fr. 8-2。Fr. 8-2 (5.8 g) 进一步通过半制备液相纯化得到化合物 10 (13.5 mg, t_R =30.2 min, 35%乙腈, 2.0 mL/min)。

2.2 体外细胞毒活性

采用 MTT 比色法检测分离得到的化合物 1~10 对人胃癌 HGC-27 细胞的增殖抑制作用。在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养 HGC-27 细胞至对数生长期, PBS 洗去培养液,用 0.25%胰酶消化离心后用培养基稀释,以 6×10^4 个/mL 在 96 孔微量滴定板中培养,每孔 100 μ L,置于恒温培养箱中培养 24 h 后,然后在每个孔中加入 5 种不同浓度经二甲基亚砜(DMSO)溶解的化合物和阳性药顺铂在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中孵育 48 h,然后向每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 10 μ L,继续孵育 4 h 后弃去培养液。最后每孔加入 150 μ L DMSO 裂解细胞,室温下避光低速振荡 15 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度(A)值,计算药物对细胞的抑制率,并用 Excel 软件计算 IC₅₀ 值。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{空白}}$$

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 黄色粉末,易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示分子离子峰 m/z 340.118 3 $[M+Na]^+$ (计算值 340.115 6, C₁₇H₁₉NO₅),提示该化合物分子式为 C₁₇H₁₉NO₅,计算不饱和度为 9。IR 谱图显示该化合物 1 存在氨基(3 270 cm⁻¹)和羰基(1 774 cm⁻¹)等特征吸收峰。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 谱(表 1)中显示 1 个芳香氢信号 δ_H 7.60 (1H, s, H-2)、1 个甲基氢信号 δ_H 1.52 (3H, s, H-15)、1 个烯氢信号 δ_H 5.25 (1H, t, J = 7.2 Hz, H-11)、2 个连氧氢信号 δ_H 6.80 (1H, s, H-6), 4.50 (1H, s, H-7)、4 个亚甲基氢信号 δ_H 4.82 (2H, m, H-17), 3.68 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-13a), 2.98 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-13b), 2.31 (1H, m, H-10a), 2.18 (1H, m, H-10b), 2.57 (1H, dd, J = 14.4, 2.4 Hz, H-9a), 1.28 (1H, dd, J = 13.2, 3.0 Hz, H-9b)。在 ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中显示存在 17 个碳信号,结合 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及 HSQC 谱图信息,这 17 个碳信号可以分为 6 个芳香碳信

表 1 化合物 1 的 ¹H-和 ¹³C-NMR 数据 (600 MHz/150 MHz, DMSO-*d*₆)

Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR spectral data of compound 1 (600 MHz/150 MHz, DMSO-*d*₆)

碳位	δ_H	δ_C (type)
1		154.4 (C)
2	7.60 (1H, s)	108.4 (CH)
3		125.7 (C)
4		147.1 (C)
5		126.3 (C)
6	6.80 (1H, s)	77.9 (CH)
7	4.50 (1H, s)	62.9 (CH)
8		61.2 (C)
9	2.57 (1H, dd, J = 14.4, 2.4 Hz) 1.28 (1H, dd, J = 13.2, 3.0 Hz)	24.5 (CH ₂)
10	2.31 (1H, m), 2.18 (1H, m)	22.1 (CH ₂)
11	5.25 (1H, t, J = 7.2 Hz)	121.7 (CH)
12		137.1 (C)
13	3.68 (1H, d, J = 16.8 Hz) 2.98 (1H, d, J = 15.6 Hz)	27.0 (CH ₂)
14		133.4 (C)
15	1.52 (3H, s)	21.1 (CH ₃)
16		172.1 (C)
17	4.82 (2H, m)	61.0 (C)

号 δ_c 154.4 (C-1), 108.4 (C-2), 125.7 (C-3), 147.1 (C-4), 126.3 (C-5), 133.4 (C-14), 1 个甲基碳信号 δ_c 21.1 (C-15), 4 个亚甲基碳信号 δ_c 61.0 (C-17), 24.5 (C-9), 22.1 (C-10), 27.0 (C-13), 2 个连氧次甲基碳信号 δ_c 77.9 (C-6), 62.9 (C-7), 1 个连氧季碳信号 δ_c 61.2 (C-8), 1 个羰基碳信号 δ_c 172.1 (C-16), 2 个烯碳信号 δ_c 121.7 (C-11), 137.1 (C-12)。初步提示该化合物为苯并十元碳环混源萜类化合物。

化合物 **1** 的波谱数据与已知化合物 clavilactone A 较为相似, 不同之处在于, C-3 位取代基为氨基甲基。化合物 **1** 红外光谱显示结构中含有氨基; 此外, 相较于 clavilactone A, 化合物 **1** 的 ^{13}C -NMR 数据显示 C-2 向低场位移了 δ 10.0, 且 C-3 向高场位移了 δ 10.4^[8]; 通过该化合物 1D、2D NMR 推测其结构中存在 1 个连氮亚甲基, 综合分析并根据 HR-ESI-MS 数据证实了氨基甲基的存在及其连接位置。通过 ^1H - ^1H COSY 谱 (图 1) 所提供的信息, 由 H-11 与 H-10 和 H-10 与 H-9 相关可以确认化合物 **1** 结构中存在烯烃片段 $[\text{=CH}-(\text{CH}_2)_2]$ 。此外, 根据 HMBC 谱 (图 1) 可以观察到 H-6 与 C-4/C-5/C-7/C-14/C-16, H-7 与 C-6/C-8/C-16, H-9 与 C-7, H-10 与 C-12, H-11 与 C-13 和 H-13 与 C-4 相关, 表明了化合物 **1** 的在 C-5 位形成五元 α,β -环氧- γ -内酯单元; 通过 H-2 与 C-1/C-4/C-5/C-3/C-14 相关表明化合物 **1** 结构中存在对苯二酚单元, 综合考虑 1D、2D 及 HR-ESI-MS 数据, 确定化合物 **1** 的平面结构, 见图 2。

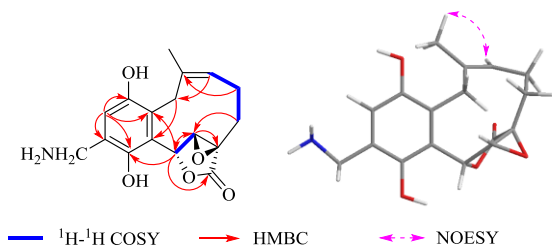


图 1 化合物 **1** 的主要 ^1H - ^1H COSY、HMBC 和 NOESY 相关
Fig. 1 Key ^1H - ^1H COSY, HMBC and NOESY correlations of compound **1**

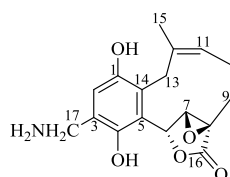


图 2 化合物 **1** 的结构

Fig. 2 Chemical structure of compound **1**

通过 NOESY 谱可以观察到 H-11 与 15- CH_3 之间存在远程相关信号, 说明 C-11 与 C-12 之间双键两侧碳原子所连接基团共面, 表明了 C-11/C-12 双键构型为 Z 式; 此外, 根据化合物 **1** 的旋光值 $[\alpha]_D^{25} +89.8$ (c 0.10, MeOH) 与已知相似结构中具有 α,β -环氧- γ -内酯结构单元的化合物 clavilactones A 化合物的旋光值相似^[24], 推测化合物 **1** 的 C-6, C-7, C-8 位立体绝对构型为 6R,7R,8R。为了进一步确定化合物 **1** 的绝对构型测定了其圆二色谱 (ECD), 采用 [B3LYP/6-311G (d, p), MeOH] 水平上的密度泛函理论 (DFT) 进行计算 CD, 通过模拟计算, 化合物 **1** 的理论计算 ECD 谱与实验 ECD 光谱一致 (图 3), 从而确定化合物 **1** 的 C-6, C-7, C-8 位立体绝对构型为 6R,7R,8R。综合以上分析, 确定化合物 **1** 为新化合物, 命名为棒柄杯伞内酯 Q。

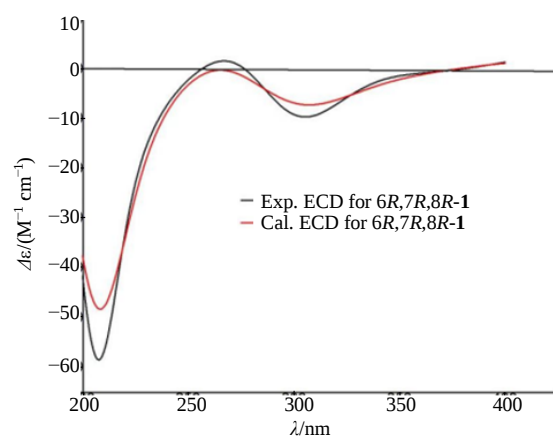


图 3 化合物 **1** 的实验和计算 ECD 图谱

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

化合物 **2**: 黄色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z : 305.102 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.86 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.75 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 6.38 (1H, s, H-6), 5.53 (1H, s, H-13), 5.45 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-11), 3.99 (1H, s, H-7), 2.72 (1H, m, H-9a), 2.47 (1H, m, H-10a), 2.38 (1H, m, H-10b), 1.72 (3H, s, H-15), 1.25 (1H, m, H-9b); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 172.4 (C-16), 151.9 (C-1), 148.3 (C-4), 140.3 (C-12), 127.3 (C-11), 126.4 (C-14), 120.3 (C-2), 117.8 (C-5), 117.2 (C-3), 74.6 (C-6), 69.5 (C-13), 64.2 (C-7), 61.7 (C-8), 24.5 (C-9), 23.3 (C-10), 18.7 (C-15)。以上数据与文献报道对照一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为 clavilactone C。

化合物 **3**: 红色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z : 302.102 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ :

6.05 (1H, s, H-6), 5.91 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-2), 5.31 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-11), 3.98 (1H, s, H-7), 3.75 (1H, d, $J = 14.5$ Hz, H-13a), 2.85 (1H, d, $J = 14.5$ Hz, H-13b), 2.71 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-9a), 2.38 (1H, m, H-10a), 2.25 (1H, m, H-10b), 1.50 (3H, s, H-15), 1.28 (1H, m, H-9b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 184.1 (C-1), 182.3 (C-4), 172.6 (C-16), 152.3 (C-5), 145.0 (C-3), 135.4 (C-12), 133.6 (C-14), 123.8 (C-11), 103.3 (C-2), 71.9 (C-6), 62.9 (C-7), 60.7 (C-8), 27.3 (C-13), 24.5 (C-9), 23.1 (C-15), 22.8 (C-10)。以上数据与文献报道对照一致^[11], 故鉴定化合物 **3** 为 clavilactone D。

化合物 **4**: 红色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z : 302.102 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.21 (1H, s, H-6), 5.85 (1H, s, H-3), 5.34 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 3.95 (1H, s, H-7), 3.59 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-13a), 2.94 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-13b), 2.70 (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H-9a), 2.38 (1H, m, H-10a), 2.25 (1H, m, H-10b), 1.51 (3H, s, H-15), 1.25 (1H, m, H-9b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 184.2 (C-1), 183.1 (C-4), 171.8 (C-16), 146.4 (C-2), 145.2 (C-5), 137.7 (C-14), 135.1 (C-12), 124.2 (C-11), 102.4 (C-3), 72.1 (C-6), 63.2 (C-7), 60.8 (C-8), 26.6 (C-13), 24.5 (C-9), 23.0 (C-15), 22.9 (C-10)。以上数据与文献报道对照一致^[19], 故鉴定化合物 **4** 为 clavilactone F。

化合物 **5**: 黄色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z : 327.084 3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.65 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 6.30 (1H, s, H-6), 5.28 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-11), 4.02 (1H, s, H-7), 3.70 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-13a), 3.47 (1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, H-9), 3.01 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-13b), 2.85 (1H, m, H-10a), 2.27 (1H, m, H-10b), 1.55 (3H, s, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 172.7 (C-16), 151.0 (C-1), 151.0 (C-4), 141.2 (C-12), 128.1 (C-14), 120.7 (C-5), 119.8 (C-11), 118.9 (C-2), 115.7 (C-3), 77.1 (C-6), 64.5 (C-7), 62.8 (C-8), 28.6 (C-13), 71.3 (C-9), 33.4 (C-10), 22.1 (C-15)。以上数据与文献报道对照一致^[20], 故鉴定化合物 **5** 为 clavilactone G。

化合物 **6**: 黄色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z : 305.102 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.84 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 6.18 (1H, s, H-6), 4.48 (1H, s, H-7), 3.25 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-13a), 2.68 (1H, dd, $J = 10.2, 5.4$ Hz,

H-11), 2.58 (1H, m, H-9a), 2.34 (1H, m, H-10a), 1.95 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-13b), 1.58 (1H, m, H-10b), 1.22 (1H, dd, $J = 10.3, 3.4$ Hz, H-9b), 1.05 (3H, s, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 172.5 (C-16), 149.6 (C-1), 149.4 (C-4), 124.8 (C-14), 119.3 (C-5), 118.2 (C-2), 115.2 (C-3), 75.1 (C-6), 64.1 (C-11), 63.1 (C-7), 61.5 (C-8), 60.8 (C-12), 26.4 (C-13), 24.5 (C-9), 21.9 (C-10), 21.8 (C-15)。以上数据与文献报道对照一致^[21], 故鉴定化合物 **6** 为 clavilactone J。

化合物 **7**: 黄色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z : 396.145 2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.14 (1H, s, H-2), 6.15 (1H, s, H-6), 5.25 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-11), 4.10 (1H, s, H-7), 3.77 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-13a), 3.25 (1H, m, H-18), 3.16 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-13b), 2.77 (1H, m, H-9a), 2.51 (1H, m, H-10a), 2.34 (1H, m, H-10b), 1.58 (3H, s, H-15), 1.46 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-19), 1.46 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-20), 1.33 (1H, m, H-9b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 172.4 (C-17), 171.5 (C-16), 152.1 (C-1), 146.0 (C-4), 139.7 (C-3), 137.6 (C-12), 123.8 (C-5), 122.2 (C-11), 115.4 (C-14), 106.5 (C-2), 75.3 (C-6), 62.8 (C-7), 61.2 (C-8), 29.0 (C-18), 25.4 (C-13), 24.9 (C-9), 22.6 (C-10), 21.4 (C-15), 20.4 (C-19), 20.3 (C-20)。以上数据与文献报道对照一致^[21], 故鉴定化合物 **7** 为 clavilactone K。

化合物 **8**: 黄色油状物 (甲醇); ESI-MS m/z : 295.094 8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.85 (1H, s, H-7), 6.74 (1H, s, H-6), 6.68 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.56 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 5.21 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-11), 2.72 (1H, m, H-9a), 2.43 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-13b), 2.30 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-13a), 2.21 (1H, m, H-10a), 1.95 (1H, m, H-10b, 9b), 1.22 (3H, s, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 178.2 (C-16), 152.8 (C-7), 151.0 (C-1), 151.0 (C-4), 142.1 (C-12), 129.8 (C-8), 128.0 (C-14), 121.8 (C-11), 118.6 (C-5), 118.4 (C-2), 115.4 (C-3), 27.6 (C-13), 26.3 (C-9), 24.9 (C-10), 22.4 (C-15)。以上数据与文献报道对照一致^[22], 故鉴定化合物 **8** 为 arnebinol A。

化合物 **9**: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z : 353.145 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.84 (1H, s, H-2), 6.76 (1H, s, H-6), 5.28 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-11), 4.08 (1H, s, H-7), 4.04 (2H, m, H-20), 3.70 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-13a), 3.21 (1H, d, $J = 15.6$

Hz, H-13b), 3.04 (2H, m, H-18), 2.75 (1H, m, H-9a), 2.71 (2H, m, H-19), 2.52 (1H, m, H-10a), 2.22 (1H, m, H-10b), 1.55 (3H, s, H-15), 1.29 (1H, m, H-9b); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 172.8 (C-16), 160.7 (C-17), 151.0 (C-1), 144.3 (C-4), 137.4 (C-12), 131.0 (C-3), 123.7 (C-5), 122.1 (C-11), 121.8 (C-14), 97.7 (C-2), 76.8 (C-6), 63.7 (C-7), 61.5 (C-8), 43.0 (C-20), 27.7 (C-13), 26.3 (C-19), 25.3 (C-9), 23.6 (C-18), 22.9 (C-10), 21.6 (C-15)。以上数据与文献报道对照一致^[23], 故鉴定化合物 **9** 为 clavipyrine A。

化合物 **10**: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z : 258.125 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.46 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-1), 7.32 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4), 7.07 (1H, m, H-3), 7.01 (1H, s, H-7), 6.98 (1H, m, H-2), 4.24 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-11), 4.10 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-14), 3.41 (1H, dd, $J = 14.4, 4.2$ Hz, H-10a), 3.09 (1H, dd, $J = 15.0, 4.2$ Hz, H-10b), 2.65 (3H, s, H-17); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 169.2 (C-15), 168.1 (C-12), 137.9 (C-5), 128.9 (C-9), 125.8 (C-7), 122.8 (C-3), 120.2 (C-2), 119.8 (C-1), 112.6 (C-4), 109.3 (C-8), 59.2 (C-11), 57.5 (C-14), 32.5 (C-17), 31.5 (C-10)。以上数据与文献报道对照一致^[25], 故鉴定化合物 **10** 为 cyclo (Trp-Ala)。

3.2 化合物构效关系分析

采用 MTT 法检测了从棒柄杯伞醋酸乙酯部位分离得到的化合物 **1~10** 对 HGC-27 的细胞毒活性, 结果显示化合物 **1~10** 对 HGC-27 细胞具有不同程度的增殖抑制作用 (表 2), 其中化合物 **1、3、8、9** 具有较为显著的肿瘤细胞增殖抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为 13.57、3.62、7.31、11.51 $\mu\text{mol/L}$, 且化合物 **3、8** 的活性优于阳性药。为了深入了解苯并十元碳环混源萜的结构-活性关系, 结果比较和分析了化合物 **1、3、4、7~9** 的细胞毒活性。

表 2 化合物 **1~10** 对 HGC-27 的细胞毒活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Cytotoxicity of compounds **1—10** against HGC-27 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol L}^{-1})$	化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol L}^{-1})$
1	13.57 ± 0.17	6	> 50
2	33.25 ± 1.35	7	35.16 ± 1.26
3	3.62 ± 0.04	8	7.31 ± 0.07
4	24.36 ± 0.15	9	11.51 ± 0.16
5	> 50	10	> 50
顺铂	8.90 ± 0.05		

首先, 这些活性较好的化合物都具有苯并十元碳环结构单元, 推测化合物结构中苯并十元碳环结构可能是此类结构化合物具有活性的基础; 根据化合物 **1、3、4、7、9** 结构中都具有含氮基团且化合物 **3、4** 之间唯一区别是氨基的取代位置不同, 而于 C-3 位发生氨基取代的化合物 **3** 具有较强的活性, 由此推测此类化合物结构中是否具有含氮基团及其取代位置可能对化合物活性产生重要影响; 此外, 化合物 **8** 不仅具有显著的活性, 而且其结构特别之处是 C-7/C-8 位丙醚环去氧还原为碳碳双键, 由此推断化合物的活性可能与 C-7/C-8 之间连接方式有关, 即当化合物在 C-7/C-8 形成碳碳双键时对该类化合物的活性具有增强的效果。

4 讨论

本研究通过对棒柄杯伞 95%乙醇提取物中的化学成分进行系统的分离, 得到 10 个化合物, 包括 9 个苯并十元碳环混源萜和 1 个环状肽类化合物。其中化合物 **1** 是 1 个新的苯并十元碳环混源萜, 化合物 **10** 为首次从担子菌棒柄杯伞中分离得到。研究表明, 苯并十元碳环混源萜类化合物具有抗菌、抗真菌、抗肿瘤、心肌保护、抗炎、神经保护等药理活性^[9-17], 其中在抗肿瘤方面的研究报道最多。因此, 测试了化合物的细胞毒活性, 并对化合物的结构-活性关系进行分析。结果显示化合物 **1~10** 对人胃癌细胞 HGC-27 具有不同程度的增殖抑制作用, 其中化合物 **1、3、8、9** 具有较为显著的细胞毒活性, 且化合物 **3、8** 的活性优于阳性药, 其 IC_{50} 值为 3.62、7.31 $\mu\text{mol/L}$; 化合物的结构-活性关系表明苯并十元碳环结构单元很可能是此类化合物具有活性的基础; 化合物活性强弱可能与含氮基团及其取代位置有关, 同时结构中 C-7/C-8 之间双键可能有增强该类化合物活性的作用, 值得深入研究。本研究为进一步开发和利用担子菌棒柄杯伞、丰富其化学成分提供了理论基础, 并探究了苯并十元碳环混源萜细胞毒活性及其构效关系, 为实现其药用价值提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Niu Z, Chen Y C, Guo H, et al. Cytotoxic polyketides from a deep-sea sediment derived fungus *Diaporthe phaseolorum* FS431 [J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3062.
- [2] Verma V C, Kharwar R N, Strobel G A. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi [J]. *Nat Prod Commun*, 2009,

- 4(11): 1511-1532.
- [3] Tang Y, Xue Y B, Du G, *et al.* Structural revisions of a class of natural products: Scaffolds of aglycon analogues of fusicoccins and cotylenins isolated from fungi [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(12): 4069-4073.
- [4] Matsuda Y, Abe I. Biosynthesis of fungal meroterpenoids [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(1): 26-53.
- [5] Geris R, Simpson T J. Meroterpenoids produced by fungi [J]. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(8): 1063-1094.
- [6] Elissawy A M, Ebada S S, Ashour M L, *et al.* Spiroarthrinols a and B, two novel meroterpenoids isolated from the sponge-derived fungus *Arthrimum* sp [J]. *Phytochem Lett*, 2017, 20: 246-251.
- [7] Matsuda Y, Awakawa T, Mori T, *et al.* Unusual chemistries in fungal meroterpenoid biosynthesis [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 31: 1-7.
- [8] Arnone A, Cardillo R, Meille S V, *et al.* Secondary mould metabolites. Part 47. Isolation and structure elucidation of clavilactones A–C, new metabolites from the fungus *Clitocybe clavipes* [J]. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 1994(15): 2165-2168.
- [9] Dettrakul S, Surerum S, Rajviroongit S, *et al.* Biomimetic transformation and biological activities of globiferin, a terpenoid benzoquinone from *Cordia globifera* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(5): 861-865.
- [10] Arai Y, Masuda T, Masaki Y. Recoverable chiral sulfoxide: Remote asymmetric induction in Lewis acid-promoted Diels-Alder reaction of chiral sulfinyl-substituted pyrrolyl α , β -unsaturated enones [J]. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 1999(15): 2165-2170.
- [11] Merlini L, Nasini G, Scaglioni L, *et al.* Structure elucidation of clavilactone D: An inhibitor of protein tyrosine kinases [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(8): 1039-1041.
- [12] Yin X, Feng T, Li Z H, *et al.* Highly oxygenated meroterpenoids from fruiting bodies of the mushroom *Tricholoma terreum* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(7): 1365-1368.
- [13] He Y, Zheng M Z, Li Q, *et al.* Asperspiropene A, a novel fungal metabolite as an inhibitor of cancer-associated mutant isocitrate dehydrogenase 1 [J]. *Org Chem Front*, 2017, 4(6): 1137-1144.
- [14] 李程伟. 一种新的杂萜化合物及其制备方法和医药用途: 中国, CN105152895A [P]. 2015-12-16.
- [15] Liu Z M, Liu H J, Chen Y, *et al.* A new anti-inflammatory meroterpenoid from the fungus *Aspergillus terreus* H010 [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(22): 2652-2656.
- [16] Chan S T, Pearce A N, Januario A H, *et al.* Anti-inflammatory and antimalarial meroterpenoids from the New Zealand ascidian *Aplidium scabellum* [J]. *J Org Chem*, 2011, 76(21): 9151-9156.
- [17] Sabry O M, Andrews S, McPhail K L, *et al.* Neurotoxic meroditerpenoids from the tropical marine brown alga *Stypopodium flabelliforme* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(7): 1022-1030.
- [18] Cassinelli G, Lanzi C, Pensa T, *et al.* Clavilactones, a novel class of tyrosine kinase inhibitors of fungal origin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(12): 1539-1547.
- [19] Takao K I, Mori K, Kasuga K, *et al.* Total synthesis of clavilactones [J]. *J Org Chem*, 2018, 83(13): 7060-7075.
- [20] Sun Z C, Xu X D, Liang H Q, *et al.* Five new meroterpenoids from the fruiting bodies of the basidiomycete *Clitocybe clavipes* with cytotoxic activity [J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4015.
- [21] Hou Y, Li Q L, Chen M Y, *et al.* Novel geranylhydroquinone derived meroterpenoids from the fungus *Clitocybe clavipes* and their cytotoxic activity [J]. *Fitoterapia*, 2022, 161: 105251.
- [22] Wang L, Li F, Liu X, *et al.* Meroterpenoids and a naphthoquinone from *Arnebia euchroma* and their cytotoxic activity [J]. *Planta Med*, 2015, 81(4): 320-326.
- [23] Sun Z C, Chen D L, Li L Y, *et al.* Clavipyrrine A, a unique polycyclic nitrogenous meroterpenoid with promising anti-glioma effects isolated from the fungus *Clitocybe clavipes* [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 117: 105468.
- [24] Sun Z C, Zhu N L, Zhou M, *et al.* Clavipines A–C, antiproliferative meroterpenoids with a fused azepine skeleton from the basidiomycete *Clitocybe clavipes* [J]. *Org Chem Front*, 2019, 6(22): 3759-3765.
- [25] Esmeralda C, Carmen A, J. Carlos M. *et al.* Stereochemical issues related to the synthesis and reactivity of pyrazino[2',1'-5,1]pyrrolo[2,3-b] indole-1,4-diones [J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 1998, doi: 10.1016/S0957-4166(98)00068-8.

[责任编辑 王文倩]