

• 化学成分 •

玄参内生真菌 *Nigrospora oryzae* D7 次生代谢产物研究沈湛云¹, 崔明超¹, 王娟¹, 朱波^{2*}, 秦路平^{2*}

1. 浙江药科职业大学, 浙江 宁波 315100

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要:目的 研究玄参内生真菌 *Nigrospora oryzae* D7 的次生代谢产物及生物活性。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱及 HPLC 进行分离纯化, 利用核磁共振谱和质谱等谱学技术对化合物进行结构鉴定。结果 从 *N. oryzae* D7 培养物的醋酸乙酯萃取物中共分离得到 11 个化合物, 分别鉴定 4,5,8-三羟基-6-甲氧基-2-甲基-3-(2-丙酰-3,4-二氢萘-1(2H)-酮) (1)、(S)-2-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-4-羧酸 (2)、3-羟基-2-甲氧基-5,6-二甲基苯甲酸 (3)、2-乙氧基-3-羟基-5,6-二甲基苯甲酸 (4)、2,4-二羟基-3,6-二甲基苯甲醛 (5)、2,5-二甲苯间苯二酚 (6)、2-(4-羟苯基)乙酸乙酯 (7)、酪醇 (8)、 α -acetylorscinol (9)、(20S,22E,24R)-5 α ,8 α -桥二氧-麦角甾烷-6,22-二烯-3 β -醇 (10)、(3 β ,5 α ,6 β ,22E)-麦角甾烷-7,22-二烯-3,5,6-三醇 (11)。化合物 1 为新化合物, 活性测试结果表明化合物 1 对人肺癌 A549 细胞和人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞具有较强的生长抑制活性, IC₅₀ 分别为 (9.25±1.60)、(11.37±2.10) μ mol/L; 化合物 10 和 11 对 A549 细胞的增殖有一定的抑制活性, IC₅₀ 分别为 (25.23±2.50)、(27.48±1.90) μ mol/L。结论 化合物 1 为萘醌类新化合物, 命名为稻黑孢醌 A; 化合物 1 对 A549 细胞和 MDA-MB-435 细胞的增殖有显著的抑制活性。化合物 10 和 11 对 A549 细胞增殖有一定的抑制作用。

关键词: 玄参; 内生真菌; 次生代谢产物; *Nigrospora oryzae*; 稻黑孢醌 A; (20S,22E,24R)-5 α ,8 α -桥二氧-麦角甾烷-6,22-二烯-3 β -醇

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)13-4299-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.002

Secondary metabolites of endophytic fungus *Nigrospora oryzae* D7 from *Scrophularia ningpoensis*SHEN Zhanyun¹, CUI Mingchao¹, WANG Juan¹, ZHU Bo², QIN Luping²

1. Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315100, China

2. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites and its biological activities of the endophytes *Nigrospora oryzae* D7 derived from the roots of *Scrophularia ningpoensis*. **Methods** The secondary metabolites of *N. oryzae* D7 were separated and purified by using the chromatographic methods (silica gel, Sephadex LH-20 and HPLC). The structures of all compounds were determined by chemical and spectroscopic methods (NMR, mass spectrometry, etc.). **Results** A total of 11 compounds were isolated from *N. oryzae* D7 and identified as 4,5,8-trihydroxy-6-methoxy-2-methyl-3-(2-oxopropyl)-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (1), (S)-2-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-4-carboxylic acid (2), 3-hydroxy-2-methoxy-5,6-dimethylbenzoic acid (3), 2-ethoxy-3-hydroxy-5,6-dimethylbenzoic acid (4), 2,4-dihydroxy-3,6-dimethyl benzaldehyde (5), 2,5-dimethyl resorcinol (6), 2-(4-hydroxyphenyl) ethyl acetate (7), tyrosol (8), α -acetylorscinol (9), 5 α ,8 α -epidioxy-(20S,22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol (10), (3 β ,5 α ,6 β ,22E)-ergosta-7,22-diene-3,5,6-triol (11), respectively. The results showed that compound 1 had strong anti-tumor activity against A549 and MDA-MB-435 cell lines with the IC₅₀ values of (9.25±1.60) μ mol/L and (11.37±2.10) μ mol/L, respectively; Compounds 10 and 11 exhibited moderate antitumor activity with the IC₅₀ values of (25.23±2.50) μ mol/L and (27.48±1.90) μ mol/L, respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new naphthoquinone compound, which is named naphthospora A. Compound 1

收稿日期: 2024-04-23

基金项目: 浙江省重点研发项目 (2021C04029); 宁波市自然科学基金项目 (202003N4334); 浙江省教育厅一般科研项目 (Y202147795)

作者简介: 沈湛云 (1984—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源品质评价与中药鉴定。Tel: 13486656710 E-mail: 274418843@qq.com

*通信作者: 秦路平, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源评价与质量控制。E-mail: qinluping@126.com

朱波, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药资源。E-mail: zhubo@zcmu.edu.cn

has strong cytotoxicity on the proliferation of lung cancer cell line A549 and breast cancer cell line MDA-MB-435 cell. Compound **10** and **11** have moderate inhibitory effect on lung cancer cell line A549.

Key words: *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.; endophytic fungi; secondary metabolites; *Nigrospora oryzae*; naphthospora A; 5 α ,8 α -epidioxy-(20S,22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol

内生真菌几乎无处不在地存在于植物体内的各种组织中,是多种生物活性化合物的重要储存宝库^[1]。植物内生真菌作为一个巨大的资源库,与宿主共同进化,不仅能产生与宿主植物相似或相同的活性物质,还可以从中发现大量骨架新颖具有药用价值的次生代谢产物,是天然活性先导化合物的重要源泉之一^[2-5]。

黑孢属 *Nigrospora* 菌株广泛分布于自然界,虽然是常见的植物病原菌^[6],但也是重要的药用动植物内生菌,能够产生多种次级代谢产物,主要有聚酮、萜醌、萜、甾体和生物碱等,而且大部分化合物具有明显的抗菌、抗氧化、细胞毒、抗病毒和抗肿瘤等药理作用^[7-8]。有作为先导药物和环保的农用化学品的潜力,在农业植物保护和人类疾病治疗领域均显示出较大的应用前景。

内生真菌 *Nigrospora oryzae* D7 为首次从玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 根中分离得到。本实验将对玄参内生真菌 *N. oryzae* 进行次生代谢产物的研究,期望发掘结构新颖的活性先导化合物。最终分离得到 11 个化合物,分别鉴定 4,5,8-三羟基-6-甲氧基-2-甲基-3-丙酰-3,4-二氢萘-1(2H)-酮 [4,5,8-trihydroxy-6-methoxy-2-methyl-3-(2-oxopropyl)-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one, **1**]、(S)-2-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-4-羧酸 [(S)-2-methyl-2,3-dihydro-benzofuran-4-carboxylic acid, **2**]、3-羟基-2-甲氧基-5,6-二甲基苯甲酸 (3-hydroxy-2-methoxy-5,6-dimethylbenzoic acid, **3**)、2-乙氧基-3-羟基-5,6-二甲基苯甲酸 (2-ethoxy-3-hydroxy-5,6-dimethylbenzoic acid, **4**)、2,4-二羟基-3,6-二甲基苯甲醛 (2,4-dihydroxy-3,6-dimethyl benzaldehyde, **5**)、2,5-二甲基间苯二酚 (2,5-dimethyl resorcinol, **6**)、2-(4-羟基苯基)乙酸乙酯 [2-(4-hydroxyphenyl) ethyl acetate, **7**]、酪醇 (tyrosol, **8**)、 α -乙酰萘酚 (**9**)、(20S,22E,24R)-5 α ,8 α -桥二氧-麦角甾烷-6,22-二烯-3 β -醇 [5 α ,8 α -epidioxy-(20S,22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol, **10**]、(3 β ,5 α ,6 β ,22E)-麦角甾-7,22-二烯-3,5,6-三醇 [(3 β ,5 α ,6 β ,22E)-ergosta-7,22-diene-3,5,6-triol, **11**]、其中化合物 **1** 为新的萘醌类化合物,命

名为稻黑孢醌 A; 活性测试结果表明化合物 **1** 对人肺癌细胞 A549 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 细胞株具有较强的生长抑制活性,半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 分别为 (9.25 \pm 1.60)、(11.37 \pm 2.10) μ mol/L; 化合物 **10** 和 **11** 对 A549 细胞的增殖有一定的抑制活性, IC₅₀ 分别为 (25.23 \pm 2.50)、(27.48 \pm 1.90) μ mol/L。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Bruker Avance III 500 MHz 型核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司); MJ-150-I 型霉菌培养箱 (上海精密仪器仪表有限公司); BSD-YX (F) 3400 立式摇床 (上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); RE-52C 旋转蒸发仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司); YXQ-LS-75SII 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博讯); Nicolet IS50 型光谱仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司); JASCO J-810 型圆二色光谱仪 (日本分光株式会社); 岛津 LC-MS 8050 型质谱仪 (日本岛津株式会社); CYTATION 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

柱色谱硅胶 (200~300、400~500 目); 反相柱 (YMC Pack ODS-A (250 mm \times 10 mm, 5 μ m), 日本 YMC 公司); TLC (HSGF₂₅₄ 硅胶预制板, 烟台黄务硅胶开发实验厂)。二氯甲烷、石油醚、乙醇、甲醇、醋酸乙酯等 (分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司), 甲醇 (高效液相色谱级, 中国医药集团上海化学试剂公司); 阿霉素 (批号 S17092, 上海源叶生物科技有限公司)。PDA 培养基 (马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)。PDB 培养液 (马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、水 1 000 mL); 二甲基亚砜 (DMSO, 上海生工生物工程有限公司); CCK-8 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); DMEM 培养基和特级胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司)。

1.2 菌株来源

本研究所用菌株分离自新鲜玄参 (2017 年 11 月采自浙江磐安大盘镇), 植物经浙江中医药大学秦路平教授鉴定为玄参 *S. ningpoensis* Hemsl., 菌株经

上海生工生物工程有限公司鉴定为 *Nigrospora oryzae* (Genbank 序列号 MH782625)。样本储存于浙江中医药大学药学院。

1.3 细胞株

A549 细胞和 MDA-MB-435 细胞购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 菌株发酵

将内生真菌 D7 接入 250 mL 锥形瓶中 (含 100 mL PDB 培养基), 26 °C, 180 r/min 旋转摇床培养 7 d 后, 转接入 5 L 锥形瓶 (含 3 L 的 PDB 培养基), 培养 10 瓶, 静置于恒温培养箱中, 于 28 °C, 培养 10 d, 得到 30 L 左右的发酵液。

2.2 次生代谢产物的提取与分离

将内生真菌 *N. oryzae* D7 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 14.5 g, 将该浸膏经硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯系统 (40 : 1、30 : 1、20 : 1、10 : 1、8 : 1、5 : 1、3 : 1、1 : 1、1 : 2) 梯度洗脱, 经 TLC 检测合并分成 10 个组分 (Fr. A1~A10)。对 A1-1 组分进行硅胶柱色谱、HPLC 纯化 (甲醇-水 62 : 38, 1 mL/min), 得到化合物 **1** ($t_R=35.1$ min, 2.4 mg); 对 A2-1 组分进行硅胶柱色谱、HPLC 纯化 (甲醇-水 58 : 42, 1 mL/min), 得到化合物 **9** ($t_R=19.0$ min, 2.2 mg)、**10** ($t_R=24.1$ min, 2.9 mg)、**11** ($t_R=32.4$ min, 2.4 mg)、**12** ($t_R=45.3$ min, 2.7 mg); 对 A2-3 组分进行硅胶柱色谱、HPLC 纯化 (甲醇-水 70 : 30, 1 mL/min), 得到化合物 **2** ($t_R=40.0$ min, 3.1 mg)、**3** ($t_R=34.3$ min, 2.1 mg)、**4** ($t_R=38.3$ min, 2.3 mg)、**5** ($t_R=45.3$ min, 2.6 mg)。

将 A4-3-1 组分进行凝胶柱色谱、反相硅胶柱色谱、HPLC 纯化 (甲醇-水 52 : 48, 1 mL/min), 得到化合物 **6** ($t_R=32.5$ min, 2.7 mg)、**7** ($t_R=22.5$ min, 2.4 mg)、**8** ($t_R=46.2$ min, 2.4 mg); 对 A7-1 组分进行硅胶柱色谱、HPLC 纯化 (甲醇-水 56 : 44, 1 mL/min), 得到化合物 **13** ($t_R=21.0$ min, 3.2 mg)、**14** ($t_R=25.1$ min, 3.4 mg)、**15** ($t_R=32.6$ min, 3.4 mg)。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色粉末, 溶于甲醇, 丙酮。10% 硫酸乙醇显色剂显棕色。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 293.102 5 $[M-H]^-$, 结合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR, 知其分子式为 $C_{15}H_{18}O_6$; 1H -NMR 谱中

可观察到 1 个双峰甲基 1.16 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)、1 个单峰甲基 2.08 (3H, s) 以及 1 个甲氧基 3.92 (3H, s), 在低场有 1 个单峰苯环质子信号 6.47 (1H, s)。在碳谱中显示共有 15 个碳信号, 其中 1 个为连氧碳信号 55.3 (CH_3)、1 个甲氧基碳、2 个羰基碳信号 208.3 (C), 204.5 (C), 1 个甲基碳信号 10.7 (CH_3)。在高场有 5 个碳, 低场有 6 个双键或苯环碳, 结合以上信号可以推测化合物 **1** 为 1 个萘醌类化合物, 且结构与已知化合物 fusarnaphthoquinone A^[9]极为相似, 但该结构有 1 个明显的甲基质子信号 1.16 (3H, d)。

在二维谱 1H - 1H COSY 中观察到 H-7 和 H-12, H-6 和 H-7 相关信号, 确定了 H-5/H-6/H-7/H-12 的连接顺序 (图 1)。HMBC 谱显示, H-2 与 C-1、C-3、C-4 和 C-4a 相关, 甲氧基 CH_3 -13 与 C-3 相关, 说明苯环的存在以及甲氧基在取代在苯环 3 位; H-5 与 C-4a 相关, CH_3 -12 与 C-8、C-7、C-11 相关, 证明了母核右侧还原醌环的存在, 以及位于 7 位的甲基 CH_3 -12 取代; 另外, H-5、H-7 和 CH_3 -12 都与 C-9 相关, CH_3 -11 与 C-9 和 C-10 相关, 又结合其碳谱和氢谱数据, 确定 9 位有甲酰基取代。至此, 该化合物的平面结构得以确定, 鉴定为 4,5,8-trihydroxy-6-methoxy-2-methyl-3-(2-oxopropyl)-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one, 为 1 个新化合物, 命名为稻黑孢醌 A。该化合物的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据归属见表 1。

化合物 **2**: 透明无定型粉末; HR-ESI-MS m/z : 179.070 4 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.03 (1H, s, -COOH), 7.41 (1H, td, $J = 7.9, 2.4$ Hz, H-6), 6.89 (1H, dd, $J =$

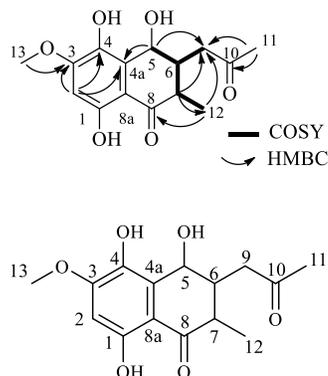


图 1 化合物 **1** 的 1H - 1H COSY 和 HMBC 主要相关信息
Fig. 1 Key 1H - 1H COSY (bold) and HMBC (arrows) correlations of compound **1**

表1 化合物1的NMR数据
Table 1 NMR data of compound 1

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1		157.9 (C)
2	6.47 (1H, s)	98.9 (CH)
3		155.7 (C)
4		137.8 (C)
4a		107.8 (C)
5	5.06 (1H, d, $J = 3.5$ Hz)	64.1 (CH)
6	2.83 (1H, m)	29.3 (CH)
7	3.42 (1H, m)	41.7 (CH)
8		204.5 (C)
8a		105.6 (C)
9	2.48 (1H, dd, $J = 17.8, 4.4$ Hz) 2.16 (1H, dd, $J = 17.8, 8.8$ Hz)	40.3 (CH ₂)
10		208.3 (C)
11	2.08 (3H, s)	28.9 (CH ₃)
12	1.16 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	10.7 (CH ₃)
13	3.92 (3H, s)	55.3 (CH ₃)

8.4, 2.5 Hz, H-7), 4.73 (1H, dq, $J = 6.8, 4.4$ Hz, H-2), 2.93 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-3), 1.53 (3H, dd, $J = 6.4, 2.4$ Hz, 2-Me); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 170.1 (COOH), 162.3 (C-7a), 139.5 (C-4), 136.3 (C-6), 118.0 (C-7), 116.4 (C-5), 108.4 (C-3a), 34.8 (C-3), 20.9 (2-Me)。与参考文献对比^[10], 数据一致, 鉴定化合物2为(S)-2-甲基-2,3-二氢苯并呋喃-4-羧酸。

化合物3: 透明无定型粉末; HR-ESI-MS m/z : 197.081 0 [M+H]⁺, 推测其分子式为C₁₀H₁₂O₄; ¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ : 6.22 (1H, s, H-4), 3.89 (3H, s, 2-OCH₃), 2.42 (3H, s, 5-CH₃), 2.00 (s, 3H, 6-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, MeOD) δ : 174.0 (COOH), 164.2 (C-1), 161.5 (C-2), 140.9 (C-3), 111.5 (C-4), 109.9 (C-6), 105.0 (C-5), 52.0 (OCH₃), 24.3 (5-CH₃), 8.0 (6-CH₃)。与参考文献对比^[11], 数据一致, 鉴定化合物3为3-羟基-2-甲氧基-5,6-二甲基苯甲酸。

化合物4: 透明无定型粉末; HR-ESI-MS m/z : 211.097 1 [M+H]⁺, 推测其分子式为C₁₁H₁₄O₄; ¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ : 6.21 (1H, s, H-4), 4.38 (2H, qd, $J = 7.1, 1.4$ Hz, 2-OCH₂CH₃), 2.45 (3H, s, 5-CH₃), 2.00 (3H, s, 6-CH₃), 1.40 (3H, td, $J = 7.1, 1.3$ Hz, 2-OCH₂CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, MeOD) δ : 173.6 (COOH), 164.3 (C-1), 161.5 (C-2), 140.9 (C-3),

111.6 (C-4), 109.9 (C-6), 105.1 (C-5), 62.1 (2-OCH₂CH₃), 24.5 (5-CH₃), 14.6 (2-OCH₂CH₃), 7.9 (6-CH₃)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物4为2-乙氧基-3-羟基-5,6-二甲基苯甲酸。

化合物5: 透明无定型粉末; HR-ESI-MS m/z : 167.070 9 [M+H]⁺, 推测其分子式为C₉H₁₀O₃; ¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ : 10.03 (1H, s, H-7), 6.22 (1H, s, H-5), 2.47 (3H, s, H-9), 1.98 (3H, s, H-8); ¹³C-NMR (150 MHz, MeOD) δ : 194.4 (C-7), 165.2 (C-4), 165.1 (C-2), 142.9 (C-1), 113.7 (C-6), 110.9 (C-3), 110.1 (C-5), 18.0 (C-9), 7.1 (C-8)。与参考文献对比^[12], 数据一致, 鉴定化合物5为2,4-二羟基-3,6-二甲基苯甲醛。

化合物6: 透明无定型粉末; HR-ESI-MS m/z : 139.076 1 [M+H]⁺, 推测其分子式为C₈H₁₀O₂; ¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ : 6.14 (2H, s, H-3, 5), 2.13 (3H, s, H-8), 1.99 (3H, s, H-7); ¹³C-NMR (150 MHz, MeOD) δ : 157.0 (C-1, 3), 136.9 (C-5), 109.0 (C-2), 108.3 (C-4, 6), 21.3 (C-8), 8.2 (C-7)。与参考文献对比^[12], 数据一致, 鉴定化合物6为2,5-二甲基间苯二酚。

化合物7: 透明无定型粉末; HR-ESI-MS m/z : 181.086 3 [M+H]⁺, 推测其分子式为C₁₀H₁₂O₃; ¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.04 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4, 8), 6.71 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5, 7), 4.19 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-1), 2.82 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2), 2.00 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, MeOD) δ : 172.9 (COOCH₂), 157.1 (C-6), 130.9 (C-4, 8), 130.0 (C-3), 116.2 (C-5, 7), 66.6 (C-1), 35.2 (C-2), 20.8 (CH₃)。与参考文献对比^[13], 数据一致, 鉴定化合物7为2-(4-羟苯基)乙酸乙酯。

化合物8: 透明无定型粉末; HR-ESI-MS m/z : 139.076 0 [M+H]⁺, 推测其分子式为C₈H₁₀O₂; ¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ : 7.03 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4, 8), 6.71 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5, 7), 3.68 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-1), 2.71 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2); ¹³C-NMR (150 MHz, MeOD) δ : 156.7 (C-6), 130.9 (C-3, 4, 8), 116.1 (C-5, 7), 64.6 (C-1), 39.4 (C-2)。以上数据与文献报道一致^[14], 鉴定化合物8为酪醇。

化合物9: 透明无定型粉末; HR-ESI-MS m/z : 154.086 1 [M+H]⁺, 推测其分子式为C₈H₁₁NO₂; ¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ : 6.41~5.86 (3H, m, H-2, 4, 6), 3.54 (2H, s, H-7), 2.12 (3H, s, 9-CH₃); ¹³C-NMR

(150 MHz, MeOD) δ : 209.5 (C-8), 159.9 (C-3, 5), 137.8 (C-1), 108.9 (C-2, 6), 102.3 (C-4), 51.7 (C-7), 28.9 (C-9)。和参考文献一致^[15], 鉴定化合物 **9** 为 α -acetylornicinol。

化合物 **10**: 无色油状物; HR-ESI-MS m/z : 443.352 1 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{29}H_{46}O_3$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.50 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 6.24 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 5.22 (1H, dd, $J = 15.3$ Hz, H-23), 5.17 (1H, m, H-22), 3.97 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-26), 0.82 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, m, H-27); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 135.6 (C-6), 135.6 (C-22), 132.6 (C-23), 130.9 (C-7), 82.3 (C-5), 79.6 (C-8), 66.6 (C-3), 56.3 (C-17), 51.9 (C-14), 51.3 (C-9), 44.7 (C-13), 43.2 (C-24), 39.9 (C-20), 39.5 (C-12), 37.1 (C-4), 37.1 (C-10), 34.9 (C-1), 33.3 (C-25), 30.3 (C-2), 29.0 (C-16), 23.6 (C-11), 21.1 (C-21), 20.8 (C-15), 20.3 (C-26), 19.8 (C-27), 18.3 (C-19), 18.2 (C-28), 13.0 (C-18)。与文献对照一致^[16], 确定化合物 **10** 为 $5\alpha,8\alpha$ -epidioxy-(20*S*,22*E*,24*R*)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol。

化合物 **11**: 无色固体; HR-ESI-MS m/z : 431.352 3 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{28}H_{46}O_3$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.39 (1H, s, H-7), 5.18 (2H, m, H-22, 23), 4.09 (1H, m, H-3), 3.63 (1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 33.1 (t, C-1), 31.0 (t, C-2), 67.9 (d, C-3), 39.7 (t, C-4), 76.1 (s, C-5), 73.9 (d, C-6), 117.7 (d, C-7), 144.2 (s, C-8), 43.6 (d, C-9), 37.3 (s, C-10), 22.2 (t, C-11), 39.4 (t, C-12), 43.9 (s, C-13), 54.9 (d, C-14), 23.1 (t, C-15), 28.3 (t, C-16), 56.1 (d, C-17), 12.4 (q, C-18), 19.0 (q, C-19), 40.6 (d, C-20), 21.3 (q, C-21), 135.8 (d, C-22), 132.4 (d, C-23), 43.2 (d, C-24), 33.4 (d, C-25), 20.3 (q, C-26), 19.8 (q, C-27), 18.2 (q, C-28)。与文献报道对照^[17], 鉴定化合物 **11** 为 (3 β ,5 α ,6 β ,22*E*)-ergosta-7,22-diene-3,5,6-triol。

3.2 肿瘤抑制活性测试

采用 CCK-8 法测定化合物对 MDA-MB-435 细胞和 A549 细胞的细胞毒性。首先, 细胞在高糖 DMEM (含有 10% FBS + 0.5% 双抗) 培养基中培养。培养 48 h 后, 取对数生长期的细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化, 取浓度在 $4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$

个/mL 的细胞接种到 96 孔板中, 放置 37 °C、5% CO_2 培养箱中过夜。24 h 后将 11 个化合物, 阳性对照阿霉素及空白对照加入 96 孔板中, 设 5 个复孔, 加药后放置于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培育 48 h。吸去上清, 每孔加入 90 μ L 新鲜培养液和 CCK-8 (10 μ L), 同样条件下继续培养 4 h 后, 用酶标仪在 450 nm 处读取 A 值, 计算细胞生长抑制率。筛选出的抗肿瘤抑制率大于 50% 的内生真菌, 设置 6 个浓度梯度 (3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL), 运用 Logit 法计算 IC_{50} 。

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

活性测试结果表明, 化合物 **1** 对 A549 细胞和 MDA-MB-435 细胞具有较强的生长抑制活性, IC_{50} 分别为 (9.25 \pm 1.60)、(11.37 \pm 2.10) μ mol/L; 化合物 **10** 和 **11** 对 A549 细胞的增殖有一定的抑制活性, IC_{50} 分别为 (25.23 \pm 2.50)、(27.48 \pm 1.90) μ mol/L。其余化合物对 A549 和 MDA-MB-435 细胞增殖的抑制活性较弱, 在初筛 50 μ mol/L 下, 抑制率低于 50%。

4 讨论

本实验综合利用多种色谱分离技术对药用植物玄参内生真菌 *N. oryzae* D7 的次级代谢产物进行了化学研究, 并运用谱学技术鉴定了化学结构, 发现了 1 个新的萘醌类化合物, 以及 10 个已知化合物。化合物 **2** 曾在松叶内生真菌的次生代谢产物中分离得到并有一定的抑菌效果^[10]。化合物 **3** 和 **4** 曾在石斛属里分离得到^[11]。化合物 **6** 是 1 个酚类化合物, 该化合物曾在长松萝 *Usnea diffracta* Vain 中分离得到^[12]。化合物 **7** 曾在见血封喉内生真菌 *Acremonium* sp. J1 次生代谢产物中分离得到^[13]。玄参内生真菌是一个丰富的资源库, 薄层色谱显示 *N. oryzae* 醋酸乙酯部位的成分比较多且容易分离, 所以首先分析醋酸乙酯部分并再继续分离其余部分。

内生真菌 *N. oryzae* 的分离只是其中很小的一部分, 还有大量内生真菌的代谢产物还有待于进一步研究利用。药用植物内生真菌因其极其丰富的多样性以及蕴含丰富新颖的次生代谢产物, 能为天然药物研发等工作开辟新的途径, 具有极为广阔的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Helaly S E, Thongbai B, Stadler M. Diversity of biologically active secondary metabolites from endophytic and saprotrophic fungi of the ascomycete

- order Xylariales [J]. *Nat Prod Rep*, 2018, 35(9): 992-1014.
- [2] 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*, 2024, 16(2): 204-213.
- [3] Ancheeva E, Daletos G, Proksch P. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi [J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(11): 1836-1854.
- [4] Chen G D, Zhao B X, Huang M J, *et al.* Tripodalsporormielones A-C, unprecedented cage-like polyketides with complex polydent bridged and fused ring systems [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3648-3654.
- [5] Chowdhury N S, Sohrab M H, Rana M S, *et al.* Cytotoxic naphthoquinone and azaanthraquinone derivatives from an endophytic *Fusarium solani* [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(4): 1173-1177.
- [6] Han S, Yu S T, Zhu T H, *et al.* *Nigrospora oryzae* causing black leaf spot disease of *Hibiscus mutabilis* in China [J]. *Plant Dis*, 2021, 105(8): 2255.
- [7] Luo H Y, Zhou Q Y, Deng Y C, *et al.* Antifungal activity of the extract and the active substances of endophytic *Nigrospora* sp. from the traditional Chinese medicinal plant *Stephania kwangsiensis* [J]. *Nat Prod Commun*, 2017, 12(12): 1934578X1701201.
- [8] Zhu X W, Chen J Q, Zhu S R, *et al.* Two new compounds from *Nigrospora sphaerica* ZMT05, a fungus derived from *Oxya chinensis* Thunber [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(20): 2375-2381.
- [9] 肖文杰, 王佩, 李薇, 等. 奇楠内生真菌 *Fusarium* sp. HP-2 次生代谢产物研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(4): 241-246.
- [10] Wang L, Zhang C F, Wang Z T, *et al.* Five new compounds from *Dendrobium crystallinum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(11): 903-911.
- [11] Jiao Y, Yoshihara T, Akimoto M, *et al.* Two phenolic compounds from *Valsa ambiens* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(4): 784-785.
- [12] 于学龙, 杨鑫瑶, 高小力, 等. 长松萝中酚类化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(10): 1864-1869.
- [13] 阙东枚, 戴好富, 曾艳波, 等. 见血封喉内生真菌 *Acremonium* sp. J1 化学成分研究 [J]. *中国药物化学杂志*, 2009, 19(3): 200-205.
- [14] 周凌云, 张祥华, 陈昌祥. 丽江产红景天的化学成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(5): 410-414.
- [15] Leyte-Lugo M, Richomme P, Poupard P, *et al.* Identification and quantification of a phytotoxic metabolite from *Alternaria dauci* [J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 4003-4015.
- [16] Zhang H C, Liu R, Li H, *et al.* Sterols from endophytic *Aspergillus niger* associated with *Astragalus membranaceus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2021, 57(4): 788-791.
- [17] Gao H, Hong K, Zhang X, *et al.* New steryl esters of fatty acids from the mangrove fungus *Aspergillus awamori* [J]. *Helv Chim Acta*, 2007, 90(6): 1165-1178.

[责任编辑 王文倩]