

杯叶海绵的化学成分研究

吴高玲¹, 吕凤翊¹, 范晓婷¹, 林厚文¹, 成 熙^{2*}, 杨 帆^{1,3*}

1. 上海交通大学医学院附属仁济医院 药学部, 上海 200127

2. 同济大学附属上海天佑医院, 上海 200331

3. 临港新片区海洋生物医药科技创新平台, 上海 201306

摘要: **目的** 对采自西沙永乐群岛海域的杯叶海绵 *Phyllospongia foliascens* 进行系统的化学成分研究。**方法** 综合运用硅胶柱色谱、十八烷基硅烷键合硅胶填料 (ODS) 柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备高效液相色谱等技术进行分离纯化得到单体化合物。采用高分辨电喷雾电离质谱、核磁共振波谱、圆二色谱结合文献比对等方法鉴定其结构。对分离得到的化合物进行细胞毒活性评价。**结果** 从杯叶海绵的石油醚萃取物中分离鉴定了 7 个单体化合物, 包括 1 个新 scalarane 型二倍半萜: 杯叶海绵萜 **1**; 以及已知的 4 个 scalarane 型二倍半萜: phyllofolactone **Q** (**2**)、phyllofolactone **R** (**3**)、carteriofenone **I** (**4**)、carteriofenone **G** (**5**); 2 个甾醇: 5 α ,8 α -epidioxycholest-6-en-3 β -ol (**6**) 和 (22*E*)-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol (**7**)。化合物 **1** 对 Daudi 细胞和 Raji 细胞增殖有抑制作用, 半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 值分别为 2.23、15.24 μ mol/L。**结论** 化合物 **1** 为新化合物, 具有细胞毒活性, 化合物 **4**~**6** 为杯叶海绵中首次分离得到的化合物。

关键词: *Phyllospongia foliascens*; 海绵; scalarane 型二倍半萜; 海洋天然产物; 抗肿瘤活性; phyllofolactone U

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)18-6115-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.002

Chemical constituents of *Phyllospongia foliascens*

WU Gaoling¹, LYU Fengyi¹, FAN Xiaoting¹, LIN Houwen¹, CHENG Xi², YANG Fan^{1,3}

1. Department of Pharmacy, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

2. Shanghai Tianyou Hospital, Tongji University, Shanghai 200331, China

3. Marine Biomedical Science and Technology Innovation Platform of Lingang Special Area, Shanghai 201306, China

Abstract: **Objective** To systematically study the chemical constituents of *Phyllospongia foliascens* from Yongle Island, Xisha. **Methods** The monomers were separated and purified by silica gel column chromatography, octadecylsilyl silica gel (ODS) column chromatography, Sephadex LH-20 gel chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC). Then they were identified by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and electrostatic circular dichroism (ECD), combined with literature data comparison. The cytotoxic activity of these compounds was evaluated. **Results** A total of seven compounds were isolated and identified from the petroleum ether extract of *P. foliascens*, including one new scalarane sesterterpenoid: phyllofolactone **U** (**1**), along with four scalarane sesterterpenoids: phyllofolactone **Q** (**2**), phyllofolactone **R** (**3**), carteriofenone **I** (**4**), carteriofenone **G** (**5**) and two sterols: 5 α ,8 α -epidioxycholest-6-en-3 β -ol (**6**), (22*E*)-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol (**7**). Compound **1** exhibited the inhibitory effects on Daudi and Raji cells with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of 2.23 and 15.24 μ mol·L⁻¹, respectively. **Conclusion** Compound **1** is a new compound with cytotoxic activity, and compounds **4**—**6** was isolated from *P. foliascens* for the first time.

Key words: *Phyllospongia foliascens*; marine sponge; scalarane sesterterpenoid; marine natural product; antitumor activity; phyllofolactone U

收稿日期: 2024-06-12

基金项目: 国家重点研发计划-青年科学家项目 (2022YFC2804300); 国家自然科学基金面上项目 (82073758); 临港新片区海洋生物医药科技创新平台科创基金

作者简介: 吴高玲, 硕士研究生, 从事海洋天然产物研究。E-mail: wugaoling0803@126.com

***通信作者:** 杨 帆, 研究员, 从事海洋天然产物研究。E-mail: yang-fan@sjtu.edu.cn

成 熙, 副主任药师, 从事天然药物研究。E-mail: 2280182@tongji.edu.cn

海洋作为地球最大的生态系统,是蕴藏丰富药用资源的巨大蓝色宝库。迄今为止,已有多种海洋来源的药物在国内外批准上市,如抗菌药物头孢噻吩(cephalothin)、抗癌药物阿糖胞苷(cytarabine)、抗病毒药阿糖腺苷(vidarabine)、镇痛药物齐考诺肽(ziconotide)、抗癌药物艾瑞布林(eribulin)、抗癌药物本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、抗癌药物曲贝替定(trabectedin)等^[1]。其中,海绵来源药物艾瑞布林,因其强大的抗肿瘤活性和特殊的作用机制,于 2010 年被美国 FDA 批准用于治疗转移性乳腺癌,至今已在大约 70 个国家上市^[2]。根据统计分析,2018—2022 年报道的新海洋天然产物(Marine Natural Products, MNPs)总数基本持平,但从海绵中报道的新 MNPs 数量呈现上升趋势^[3],可见海绵在海洋药物研发中的巨大潜力。

杯叶海绵归类为寻常纲(Demospongiae)、网角海绵目(Dictyoceratida)、角骨海绵科(Spongiidae),该属海绵分布广泛,次级代谢产物丰富多样,主要包括萜类、甾体、溴二苯醚、神经酰胺、大环内酯等类型化合物,其中最具代表性的是 scalarane 型二倍半萜^[4]。自 1972 年 Fattorusso 在地中海海绵 *Cacospongia scalaris* 中发现第 1 个 scalarane 型二倍半萜,至今大约有 500 个被报道^[5-6]。Scalarane 型二倍半萜具有特殊的 6/6/6/6 四环骨架,根据 C-20 和 C-24 上单碳取代基的存在,可分为 homoscalaranes(当 C-20 或 C-24 的被烷基化时)和 bishomoscalaranes(C-20 和 C-24 同时被烷基化时)2 类^[5-6]。这类化合物被认为是角骨海绵科海绵在化学分类学上的标志,并表现出广泛且显著的生物学活性,如抗炎、细胞毒活性、抗结核、酶抑制活性等^[7-10]。在过去的十几年间,本课题组已从杯叶海绵中已分离得到 15 个 scalarane 型二倍半萜,其中有 12 个 bishomoscalaranes^[11-13]。另外,2021 年本课题组又从南海海绵 *Dysidea granulosa* 中分离鉴定了 7 个 scalarane 型二倍半萜,其中有 4 个 bishomoscalaranes^[8]。本研究选取的杯叶海绵采自西沙永乐群岛,此岛是三沙市西沙群岛西部岛群,位于永兴岛西南约 40 海里处,此海域生态环境独特,珊瑚-珊瑚礁生物多样性极高,还有极其罕见的复合环礁。目前,南海仅西沙群岛永乐环礁呈典型环状。该海绵主要生长于珊瑚礁群中,其适应于特殊的生长环境,拥有多样且独特的代谢途径,同时又与高丰度的共附生微生物相互作用,因此可能产生更

多有别于其他海域的结构新颖、活性独特的次级代谢产物,具有广阔的基础研究和应用开发价值。

本研究对杯叶海绵的次级代谢产物进行了化学成分及生物活性研究。对其石油醚萃取物通过多种色谱学方法进行了系统的分离纯化,鉴定得到 7 个单体化合物(图 1),包括 1 个新 scalarane 型二倍半萜:杯叶海绵萜 U(phyllfolactone U, **1**);以及 4 个已知的 scalarane 型二倍半萜:phyllfolactone Q(**2**)、phyllfolactone R(**3**)、carteriofenone I(**4**)、carteriofenone G(**5**);和 2 个甾醇:5 α ,8 α -epidioxycholest-6-en-3 β -ol(**6**)和(22*E*)-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol(**7**)。化合物 **4**~**6** 为首次从 *P. foliascens* 中分离得到。此外,对新化合物 **1** 进行了生物活性评价,其对 Burkitt 淋巴瘤 Daudi 细胞和 Raji 细胞增殖有抑制作用,半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值分别为 2.23、15.24 μ mol/L,对人慢性髓性白血病 K562 细胞无明显的抑制细胞增殖作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

BS124S 型分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司,德国);101BS 型鼓风干燥箱(上海邦西仪器科技有限公司);SB-35 型旋转蒸发仪(上海爱朗有限公司);Waters 1525/2996 型半制备高效液相色谱(Waters 公司,美国);Bruker AVANCE-600MHz 核磁共振仪;Interchim puriflash 450 instruments 中压色谱仪(Interchim 公司,法国);Rudolph autopol VI 型旋光仪(鲁道夫公司,美国);Hitachi U-3010 型紫外光谱仪(Hitachi Limited 公司,日本);半制备色谱柱为 XBridge BEH C₈ OBD Prep Column(250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, Waters 公司,美国),CHIRALCEL OJ-RH 手性柱(250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, DAICEL 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);Waters Xevo G2-XS Q-ToF、Waters Q-ToF micro YA019 液质联用仪(Waters 公司,美国);分析级甲醇、乙腈、二氯甲烷(上海凌峰化学试剂有限公司);分析级醋酸乙酯(江苏强盛功能化学股份有限公司);分析级石油醚(无锡市佳妮化工有限公司);色谱级甲醇和乙腈(Merck 公司,德国);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(Pharmacia 公司,瑞士);Spherical C₁₈ ODS 柱色谱填料(常州三泰科技有限公司);GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司)。

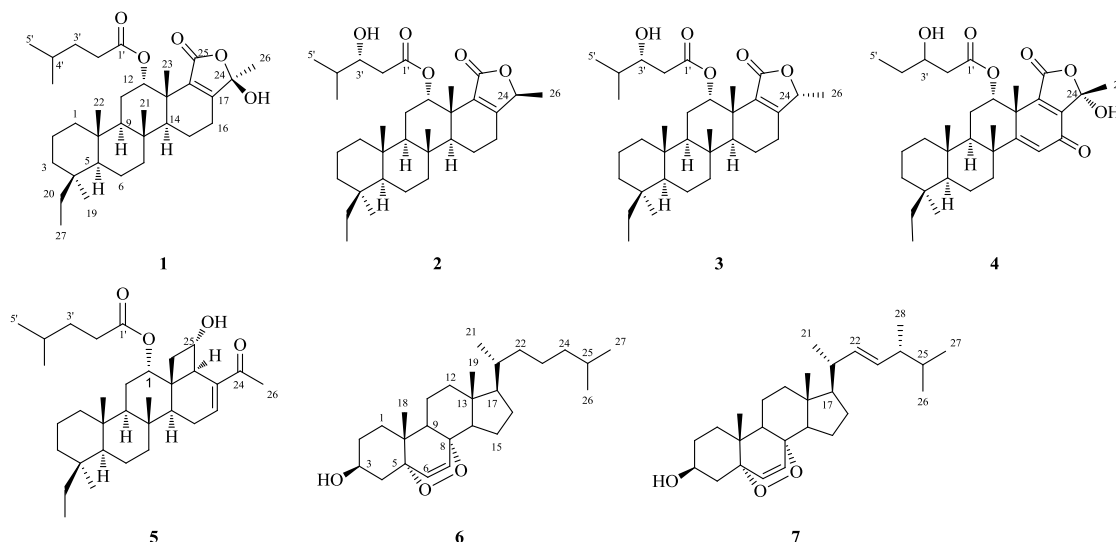


图 1 化合物 1~7 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—7

1.2 海绵来源

杯叶海绵样品于 2019 年 4 月从中国南海西沙群岛永乐岛采集,由上海交通大学医学院附属仁济医院药学部颜益珍高级技术员鉴定并确认为 *Phyllospongia foliascens*。样本凭证(DS-PF01)保存于中国上海市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。

1.3 细胞

人 Burkitt 淋巴瘤细胞 Raji、人慢性髓性白血病细胞 K562 购买于中国科学院细胞库,人 Burkitt 淋巴瘤细胞 Daudi 由上海科技大学阴倩倩助理教授提供,3 株细胞的生长方式均为悬浮生长。

2 方法

2.1 海绵的提取分离

在室温下,将湿质量约为 500 g 的杯叶海绵切碎,用二氯甲烷-甲醇(1:1)超声提取 2 h,共 6 次,合并提取液,减压浓缩得总萃取物约 40 g,再用 90%甲醇-石油醚(1:1)超声萃取 3 次,浓缩萃取液得到石油醚萃取物 5 g。

2.2 海绵的次级代谢产物的提取分离

石油醚萃取物经正相硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(100:0~0:100)进行梯度洗脱,洗脱部分用薄层色谱(TLC)跟踪监测,相同部分合并浓缩,得到 10 个组分(Fr. 1~10)。组分 Fr. 7 (830 mg)经过正相硅胶柱色谱(石油醚-醋酸乙酯 100:0~0:100)和 HPLC(乙腈-水 84:16,半制备 C₈ 柱)纯化,得到化合物 1 (1 mg, t_R =63 min);组

分 Fr.6 (620 mg)经过 Sephadex LH-20 凝胶色谱(二氯甲烷-甲醇 1:1)和 HPLC(乙腈-水 60:40,半制备 CHIRALCELOJ-RH 手性柱)纯化,得到化合物 2 (1.5 mg, t_R =60 min)、3 (1.6 mg, t_R =63 min);组分 Fr.3 (860 mg)经过正向硅胶柱色谱(石油醚-醋酸乙酯 100:0~0:100)和 HPLC(乙腈-水 80:20,半制备 C₈ 柱)纯化,得到化合物 4 (1.2 mg, t_R =58 min)、5 (1.8 mg, t_R =50 min);组分 Fr. 4 (600 mg)经过正相硅胶柱色谱(二氯甲烷-醋酸乙酯 100:0~0:100)和 HPLC(乙腈-水 70:30,半制备 C₈ 柱)纯化,得到化合物 6 (2.3 mg, t_R =40 min)、7 (1.8 mg, t_R =43 min)。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末,易溶于乙腈、二氯甲烷; $[\alpha]_D^{25} + 36$ (c 0.100, CH₃CN)。HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 m/z 527.373 3 [M-H]⁻ (计算值 527.373 6, C₃₃H₅₁O₅),结合 ¹³C-NMR 谱,确定其分子式为 C₃₃H₅₂O₅,提示含 8 个不饱和度。

¹H-NMR 谱显示有 8 个甲基信号 δ_H 0.73 (3H, t, J =7.5 Hz, H₃-27), 1.59 (3H, s, H₃-26), 0.82 (3H, s, H₃-22), 0.88 (3H, s, H₃-21), 1.19 (3H, s, H₃-23), 0.79 (3H, s, H₃-19) 和 0.87 (6H, m, H₃-5', 6') 以及 1 个连氧次甲基氢信号 δ_H 5.51 (1H, t, J =1.8 Hz, H-12)。¹³C-NMR 和 DEPT 谱显示该化合物有 33 个碳信号,包括 8 个 CH₃ (CH₃-19, 21, 22, 23, 26, 27, 5', 6')、11 个 CH₂ (CH₂-1, 2, 3, 6, 7, 11, 15, 16, 20, 2', 3')、5 个 CH

(CH-5, 9, 12, 14, 4') 和 9 个季碳信号 (C-4, 8, 10, 13, 17, 18, 24, 25, 1'); 其中含有 2 个烯碳信号 (δ_{C} 161.7, 134.7, C-17/18), 2 个酯羰基碳信号 (δ_{C} 168.3, 172.6, C-25/1'); 在化合物 **1** 的 E 环上 C-24 (δ_{C} 103.6) 的化学位移显示此处连了 1 个羟基。除去 1 个双键和 2 个酯羰基所占用的 3 个不饱和度, 尚余 5 个不饱和度, 推测该化合物具有 5 个环状结构。¹H-NMR、¹³C-NMR 和 DEPT 谱 (表 1) 提示该化合物可能为 scalarane 二倍半萜类化合物。

从 5 个甲基 (CH₃-19, 21, 22, 23, 27) 出发, 在 HMBC 谱中, 显示 H₃-19 (δ_{H} 0.79) 和 C-20 (δ_{C} 24.5) 相关, H₃-21 (δ_{H} 0.88) 和 C-14 (δ_{C} 51.2) 相关, H₃-22 (δ_{H} 0.82) 和 C-9 (δ_{C} 53.5) 相关, H₃-23 (δ_{H} 1.19) 和 C-12 (δ_{C} 73.8)、C-13 (δ_{C} 38.6)、C-14 (δ_{C} 51.2) 以及 C-18 (δ_{C} 134.7) 相关, ¹H-¹H COSY 谱中显示 H₃-27 (δ_{H} 0.73) 与 H-20a (δ_{H} 1.15) 相关。形成了 1 个典型的萜类碳链骨架片段 (C-27→C-18)。

¹H-¹H COSY 谱中显示 H-2a (δ_{H} 1.33) 与 H-1a (δ_{H} 0.57) 和 H-3a (δ_{H} 0.81) 相关, 且 HMBC 谱中 H-3a 与 C-5 (δ_{C} 59.0) 相关、H-3b (δ_{H} 1.64) 与 C-1 (δ_{C} 40.2) 相关, 证实了 A 环的结构。¹H-¹H COSY 相关信号 H-6b (δ_{H} 1.45) 与 H-7b (δ_{H} 1.84) 相关, H-11a (δ_{H} 1.63) 与 H-9 (δ_{H} 1.17) 和 H-12 (δ_{H} 5.51) 相关, 且 HMBC 谱中 H-12 与 C-9 (δ_{C} 53.5)、C-11 (δ_{C} 21.0)、C-13 (δ_{C} 38.6) 以及 C-14 (δ_{C} 51.2) 相关。证实了 B、C 环的结构。¹H-¹H COSY 相关信号 H-15b (δ_{H} 1.92) 与 H-14 (δ_{H} 1.52) 相关, H-15a (δ_{H} 1.53) 与 H-16b (δ_{H} 2.48) 相关, HMBC 谱中 H-16b 与 C-14 (δ_{C} 51.2)、C-15 (δ_{C} 16.7)、C-17 (δ_{C} 161.7) 以及 C-18 (δ_{C} 134.7) 相关, 证实了 D 环的结构, 从而证实了典型的萜类碳链骨架片段环 A~D 的存在。在 HMBC 谱中显示 H₃-26 与 C-24 和 C-17 相关, H₃-23 与 C-13、C-14 和 C-18 相关, H-14 与 C-15 相关, H-15b 与 C-13、C-14 和 C-17 的 HMBC 相关信号, 证实了环 E 的存在以及环 E 和环 D 的骈合, 综上判断出该化合物属于具有 6/6/6/6/5 scalarane 二倍半萜的骨架 (图 2)。

H-20b 与 C-19 和 C-27 的 HMBC 相关, H₃-26 与 C-17 和 C-24 的 HMBC 相关, 说明化合物存在 20,24-bishomoscalarane 结构。在 ¹H-¹H COSY 中的相关信号 H₂-2' 和 H₂-3', 以及 HMBC 谱中 H₂-2' 与 C-1'、C-3' 和 C-4' 相关, H₂-3' 与 C-1'、C-2' 和 C-6' 相关, H-4' 与 C-5' 相关, H₃-5' 与 C-3'、C-4' 和 C-6' 相关, 证实

了化合物 **1** 含有 1 个 4'-甲基戊酸酯, 结合 H-12 与 C-1' 的相关性, 表明 4'-甲基戊酸酯连接在 C-12 上。根据 ¹H-¹H COSY、HMQC、HMBC 等二维谱信号 (表 1), 确定了化合物 **1** 的平面结构 (图 3)。

化合物 **1** 的相对构型是根据偶合常数及 NOESY 相关确定的 (图 4)。H-12 的偶合常数 $J = 1.8$ Hz, 说明该位置 H 为 e 键, 为 β 取向^[8]。H-12 与 H₃-23 和 H-11a (a 键) 的 NOESY 相关进一步证实了该取向。在 NOESY 图谱中显示以下相关: H-11a 与 H₃-21 和 H₃-22 相关, H-20b 与 H₃-22 相关, 说明 H-20b、H₃-21、H₃-22、H₃-23 是 β 取向; H-9 与 H-14 和 H₃-19 相关, H-7a 与 H₃-19、H-14 和 H-5 相关, H-5、H-9、H-14、H₃-19 为 α 取向, 说明了 A/B/C/D 四环为反式骈合。H-16a 与 H₃-26 和 H-14 存在 NOESY 相关, 说明 26 位甲基为 α 取向。通过比对发现化合物 **1** 和 phyllofolactone T^[13] 的 ECD 谱图和旋光极为相似, 最终确定了化合物 **1** 的结构。根据 SciFinder 检索结果, 确定化合物 **1** 是 1 个新的 scalarane 型二倍半萜, 命名为 phyllofolactone U。

化合物 **2**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 551.65 [$M + Na$]⁺; 确定相对分子质量为 528, 分子式 C₃₃H₅₂O₅。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.73 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H₃-27), 0.79 (3H, s, H₃-19), 0.83 (3H, s, H₃-22), 0.89 (3H, s, H₃-21), 0.90 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H₃-5'), 0.93 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-6'), 1.17 (3H, s, H₃-23), 1.36 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-26), 3.65 (1H, m, H-3'), 4.76 (1H, m, H-24), 5.59 (1H, t, $J = 2.4$ Hz, H-12); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 40.1 (CH₂, C-1), 18.7 (CH₂, C-2), 36.7 (CH₂, C-3), 36.2 (C, C-4), 58.9 (CH, C-5), 17.9 (CH₂, C-6), 41.9 (CH₂, C-7), 37.6 (C, C-8), 53.5 (CH, C-9), 37.1 (C, C-10), 21.1 (CH₂, C-11), 74.7 (CH, C-12), 38.5 (C, C-13), 51.2 (CH, C-14), 16.9 (CH₂, C-15), 24.2 (CH₂, C-16), 164.3 (C, C-17), 132.8 (C, C-18), 28.6 (CH₃, C-19), 24.6 (CH₂, C-20), 16.9 (CH₃, C-21), 17.1 (CH₃, C-22), 21.5 (CH₃, C-23), 78.0 (CH, C-24), 171.5 (C, C-25), 18.9 (CH₃, C-26), 8.8 (CH₃, C-27), 172.3 (C, C-1'), 39.3 (CH₂, C-2'), 73.0 (CH, C-3'), 33.1 (CH, C-4'), 18.2 (CH₃, C-5'), 18.3 (CH₃, C-6')。通过比对发现与文献报道中一致^[13], 确定化合物 **2** 为 phyllofolactone Q。

化合物 **3**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 551.65 [$M + Na$]⁺; 确定相对分子质量为 528, 分子式 C₃₃H₅₂O₅。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.74 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H₃-27), 0.79 (3H, s, H₃-19), 0.83 (3H, s, H₃-22), 0.89

表 1 化合物 1 的一维和二维 NMR 数据 (600/150 MHz, CDCl₃)
Table 1 1D and 2D NMR data for compound 1 (600/150 MHz, CDCl₃)

碳位	δ_{H}	δ_{C} , type	COSY (H→H)	HMBC (H→C)	NOESY (H→H)
1a	0.57 (m)	40.2, CH ₂	2a	22	
1b	1.58 (m)			10	
2a	1.33 (m)	18.1, CH ₂	1a, 3a		
2b	1.55 (m)				
3a	0.81 (m)	36.7, CH ₂	2a	5	
3b	1.64 (m)			1	
4		36.2, C			
5	0.86 (m)	59.0, CH		7	7a
6a	1.33 (m)	18.3, CH ₂			
6b	1.45 (m)		7b		
7a	1.01 (m)	41.9, CH ₂			5, 14, 19
7b	1.84 (m)		6b	5, 9	
8		37.6, C			
9	1.17 (m)	53.5, CH	11a	22	14, 19
10		37.1, C			
11a	1.63 (m)	21.0, CH ₂	9, 12	9	12, 21, 22
11b	2.00 (m)		12	12, 13	
12	5.51 (t, $J = 1.8$ Hz)	73.8, CH	11a, 11b	1', 9, 11, 13, 14	11a, 23
13		38.6, C			
14	1.52 (m)	51.2, CH	15b	15	7a, 9, 16a
15a	1.53 (m)	16.7, CH ₂	16b		
15b	1.92 (m)		14	13, 14, 17	
16a	2.19 (m)	23.0, CH ₂		15, 17, 18	14, 26
16b	2.48 (m)		15a	14, 15, 17, 18	
17		161.7, C			
18		134.7, C			
19	0.79 (s)	28.7, CH ₃		20	7a, 9
20a	1.15 (m)	24.5, CH ₂	27	27	
20b	1.51 (m)			19, 27	22
21	0.88 (s)	17.2, CH ₃		14	11a
22	0.82 (s)	16.9, CH ₃		9	11a, 20b
23	1.19 (s)	21.3, CH ₃		12, 13, 14, 18	12
24		103.6, C			
25		168.3, C			
26	1.59 (s)	24.3, CH ₃		17, 24	16a
27	0.73 (t, $J = 7.5$ Hz)	8.8, CH ₃	20a		
1'		172.6, C			
2'	2.18 (m)	32.9, CH ₂	3'	1', 3', 4'	
3'	1.44 (m)	34.1, CH ₂	2'	1', 2', 6'	
4'	1.57 (m)	27.7, CH		5'	
5'	0.87 (m)	22.5, CH ₃		3', 4', 6'	
6'	0.87 (m)	22.4, CH ₃			

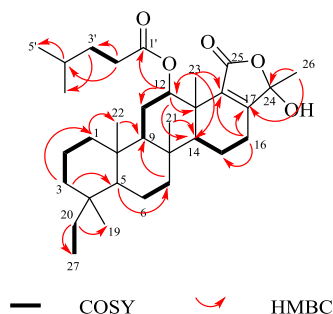
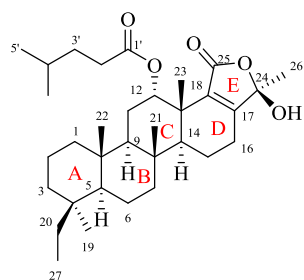
图 2 化合物 1 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关信号Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 1

图 3 化合物 1 的结构

Fig. 3 Structure of compound 1

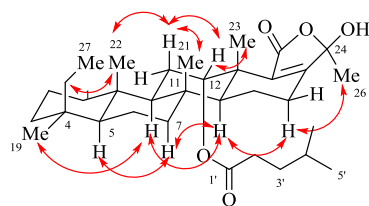


图 4 化合物 1 的关键 NOESY 相关信号

Fig. 4 Key NOESY correlations of compound 1

(3H, s, H₃-21), 0.90 (3H, d, J = 6.5 Hz, H₃-5'), 0.93 (3H, d, J = 6.8 Hz, H₃-6'), 1.18 (3H, s, H₃-23), 1.35 (3H, d, J = 6.7 Hz, H₃-26), 3.65 (1H, m, H-3'), 4.76 (1H, q, J = 6.7 Hz, H-24), 5.58 (1H, t, J = 2.7 Hz, H-12); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 40.2 (CH_2 , C-1), 18.7 (CH_2 , C-2), 36.7 (CH_2 , C-3), 36.2 (C, C-4), 58.9 (CH, C-5), 18.0 (CH_2 , C-6), 41.8 (CH_2 , C-7), 37.6 (C, C-8), 53.6 (CH, C-9), 37.1 (C, C-10), 21.1 (CH_2 , C-11), 74.8 (CH, C-12), 38.6 (C, C-13), 51.6 (CH, C-14), 16.7 (CH_2 , C-15), 24.5 (CH_2 , C-16), 164.4 (C, C-17), 132.8 (C, C-18), 28.7 (CH_3 , C-19), 24.6 (CH_2 , C-20), 16.9 (CH_3 , C-21), 17.1 (CH_3 , C-22), 21.3 (CH_3 , C-23), 78.2 (CH, C-24), 171.5 (C, C-25), 18.8 (CH_3 , C-26), 8.8 (CH_3 , C-27), 172.2 (C, C-1'), 39.3 (CH_2 , C-2'), 72.9 (CH, C-3'), 33.2 (CH, C-4'), 18.2 (CH_3 , C-5'), 18.3 (CH_3 , C-6'). 化合物 2 和 3 的 NMR 数据高度相似, 且化合物 2 和 3 是

同一组分在 HPLC 制备中保留时间非常相近的 2 个化合物。有文献对此类 phyllofolactone 化合物相似结构总结出规律, CH_3 -26 为 β 构型时, C-24 的化学位移偏向高场, CH_3 -26 为 α 构型时, C-24 的化学位移偏向低场, 差值大多在 δ 0.2~0.3^[14-15]。化合物 2 和 3 的 C-24 的化学位移分别为 78.0 和 78.2, 说明在化合物 3 中 CH_3 -26 为 α 构型, 此结论也可以通过 H-16b (δ_{H} 2.35) 与 H-14 (δ_{H} 1.52) 和 H₃-26 (δ_{H} 1.35) 之间的 NOESY 相关被验证。通过比对发现与文献报道中一致^[13], 确定化合物 3 为 phyllofolactone R。

化合物 4: 白色粉末, ESI-MS m/z : 543.33 [$\text{M} + \text{H}$]⁺; 确定相对分子质量为 542, 分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_7$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 0.77 (3H, t, J = 7.5 Hz, H₃-27), 0.84 (3H, s, H₃-19), 0.91 (3H, t, J = 7.2 Hz, H₃-5'), 0.96 (3H, s, H₃-22), 1.30 (3H, s, H₃-21), 1.65 (3H, s, H₃-23), 1.83 (3H, s, H₃-26), 3.67 (1H, s, H-3'), 5.93 (1H, t, J = 2.7 Hz, H-12), 6.34 (1H, s, H-15); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 40.6 (CH_2 , C-1), 18.6 (CH_2 , C-2), 36.6 (CH_2 , C-3), 36.3 (C, C-4), 58.5 (CH, C-5), 18.3 (CH_2 , C-6), 41.1 (CH_2 , C-7), 42.2 (C, C-8), 51.5 (CH, C-9), 38.3 (C, C-10), 21.7 (CH_2 , C-11), 75.9 (CH, C-12), 44.4 (C, C-13), 175.0 (C, C-14), 125.7 (CH, C-15), 182.1 (C, C-16), 150.9 (C, C-17), 148.3 (C, C-18), 28.6 (CH_3 , C-19), 24.8 (CH_2 , C-20), 23.0 (CH_3 , C-21), 17.2 (CH_3 , C-22), 24.4 (CH_3 , C-23), 104.7 (C, C-24), 167.3 (C, C-25), 23.6 (CH_3 , C-26), 8.8 (CH_3 , C-27), 168.5 (C, C-1'), 42.8 (CH_2 , C-2'), 70.8 (CH, C-3'), 29.9 (CH_2 , C-4'), 9.9 (CH_3 , C-5')。通过比对发现与文献报道一致^[16], 确定化合物 4 为 carteriofenone I。

化合物 5: 白色粉末, ESI-MS m/z : 513.39 [$\text{M} + \text{H}$]⁺; 确定相对分子质量为 512, 分子式 $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 0.74 (3H, t, J = 7.2 Hz, H₃-27), 0.76 (3H, s, H₃-21), 0.79 (3H, s, H₃-19), 0.82 (3H, s, H₃-22), 0.87 (3H, d, J = 7.2 Hz, H₃-6'), 0.88 (3H, d, J = 7.2 Hz, H₃-5'), 2.28 (3H, s, H₃-26), 3.60 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-25), 5.56 (1H, t, J = 2.4 Hz, H-12); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 40.4 (CH_2 , C-1), 18.4 (CH_2 , C-2), 36.9 (CH_2 , C-3), 36.3 (C, C-4), 58.9 (CH, C-5), 18.2 (CH_2 , C-6), 40.9 (CH_2 , C-7), 38.0 (C, C-8), 53.2 (CH, C-9), 37.1 (C, C-10), 21.4 (CH_2 , C-11), 76.7 (CH, C-12), 40.4 (C, C-13), 44.3 (CH, C-14), 22.6 (CH_2 , C-15), 140.8 (CH, C-16), 139.2 (C, C-17), 45.8

(CH, C-18), 28.7 (CH₃, C-19), 24.7 (CH₂, C-20), 15.4 (CH₃, C-21), 17.2 (CH₃, C-22), 34.1 (CH₂, C-23), 198.5 (C, C-24), 73.4 (CH, C-25), 25.4 (CH₃, C-26), 8.8 (CH₃, C-27), 173.7 (C, C-1'), 33.0 (CH₂, C-2'), 34.3 (CH₂, C-3'), 27.7 (CH, C-4'), 22.4 (CH₃, C-5'), 22.4 (CH₃, C-6')。通过比对发现与文献报道一致^[16], 确定化合物 **5** 为 carteriofenone G。

化合物 **6**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 439.44 [M+Na]⁺; 确定相对分子质量为 416, 分子式 C₂₇H₄₄O₃。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.79 (3H, s, H₃-18), 0.85 (3H, d, J =2.8 Hz, H₃-26), 0.86 (3H, d, J =2.8 Hz, H₃-27), 0.88 (3H, s, H₃-19), 0.90 (3H, d, J =6.4 Hz, H₃-21), 1.17 (1H, m, H-17), 1.21 (1H, m, H-12a), 1.43 (1H, m, H-25), 1.49 (1H, m, H-9), 1.51 (1H, m, H-2a), 1.54 (1H, m, H-14), 1.69 (1H, m, H-1a), 1.83 (1H, m, H-2b), 1.91 (1H, m, H-4a), 1.94 (1H, m, H-1b), 1.97 (1H, m, H-12b), 2.10 (1H, m, H-4b), 3.96 (1H, tt, J =11.0, 4.9 Hz, H-3), 6.24 (1H, d, J =8.5 Hz, H-6), 6.50 (1H, d, J =8.5 Hz, H-7); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 34.8 (CH₂, C-1), 30.3 (CH₂, C-2), 66.6 (CH, C-3), 37.1 (CH₂, C-4), 82.3 (C, C-5), 135.5 (CH, C-6), 130.9 (CH, C-7), 79.6 (C, C-8), 51.2 (CH, C-9), 37.1 (C, C-10), 23.6 (CH₂, C-11), 39.6 (CH₂, C-12), 44.9 (C, C-13), 51.7 (CH, C-14), 20.8 (CH₂, C-15), 28.4 (CH₂, C-16), 56.6 (CH, C-17), 12.8 (CH₃, C-18), 18.3 (CH₃, C-19), 35.4 (CH, C-20), 18.7 (CH₃, C-21), 36.1 (CH₂, C-22), 23.9 (CH₂, C-23), 39.6 (CH₂, C-24), 28.1 (CH, C-25), 22.7 (CH₃, C-26), 22.9 (CH₃, C-27)。通过比对发现与文献报道中一致^[17], 确定化合物 **6** 为 5 α ,8 α -epidioxycholest-6-en-3 β -ol。

化合物 **7**: 无色针状结晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 429.58 [M+H]⁺; 确定相对分子质量为 428, 分子式 C₂₈H₄₄O₃。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.81 (3H, d, J =6.5 Hz, H₃-26), 0.83 (3H, d, J =6.5 Hz, H₃-27), 0.84 (3H, s, H₃-18), 0.88 (3H, s, H₃-19), 0.91 (3H, d, J =6.7 Hz, H₃-28), 0.99 (3H, d, J =6.1 Hz, H₃-21), 3.97 (1H, m, H-3), 5.14 (1H, dd, J =15.2, 8.2 Hz, H-23), 5.19 (1H, dd, J =15.7, 7.8 Hz, H-22), 6.24 (1H, d, J =8.5 Hz, H-6), 6.50 (1H, d, J =8.5 Hz, H-7); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 34.8 (CH₂, C-1), 30.3 (CH₂, C-2), 66.6 (CH, C-3), 37.1 (CH₂, C-4), 82.3 (C, C-5), 135.5 (CH, C-6), 130.9 (CH, C-7), 79.6 (C, C-8), 51.2 (CH, C-9), 37.1 (C, C-10), 20.8 (CH₂, C-11), 39.5 (CH₂, C-12),

44.7 (C, C-13), 51.8 (CH, C-14), 23.6 (CH₂, C-15), 29.1 (CH₂, C-16), 56.3 (CH, C-17), 13.0 (CH₃, C-18), 18.3 (CH₃, C-19), 40.0 (CH, C-20), 21.1 (CH₃, C-21), 135.6 (CH, C-22), 132.6 (CH, C-23), 43.2 (CH, C-24), 33.3 (CH, C-25), 19.8 (CH₃, C-26), 20.3 (CH₃, C-27), 18.2 (CH₃, C-28)。通过比对发现与文献报道中一致^[18], 确定化合物 **7** 为 (22*E*)-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol。

3.2 细胞毒活性筛选及结果

采用 CCK8 法^[19]检测化合物 **1** 对 Daudi 细胞、Raji 细胞和 K562 细胞的肿瘤增殖抑制活性。取出培养箱中的细胞, 显微镜下观察细胞形态是否正常、细胞培养基是否干净、细胞数量是否足够接种。在 96 孔板中接种 100 μ L 的细胞悬液, 每孔细胞数为 1×10^4 个。用 DMSO 溶解待测化合物, 每孔加入 10 μ L 不同浓度的药物溶液, 设置浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25、0.65、0.325 μ mol/L 的待测化合物组, 同时设置 5 μ mol/L 紫杉醇阳性药物组, 每个浓度设置复孔 2 个, 另设置空白组、对照组 (空白培养基加细胞)。将培养板放入 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 培养箱内培养 72 h。每孔加入 10 μ L 的 CCK8 试剂, 避光孵育 30 min, 在酶标仪 450 nm 波长进行检测, 检测过程中使得对照组吸光度 (A) 值在 0.8~1.2。按照公式计算抑制率, 用 Graphpad 模拟非线性曲线回归进行曲线拟合, 计算化合物 **1** 的 IC₅₀ 值。结果显示化合物 **1** 对 Daudi 细胞和 Raji 细胞有细胞毒活性, IC₅₀ 值分别为 2.23、15.24 μ mol/L, 而对 K562 细胞无明显的抑制细胞增殖作用。

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

$A_{\text{给药}}$ 为具有细胞、CCK8 溶液和药物溶液的孔的 A ; $A_{\text{空白}}$ 为具有培养基和 CCK8 溶液而没有细胞的孔的 A ; $A_{\text{对照}}$ 为具有细胞、CCK8 溶液而没有药物溶液的孔的 A

4 讨论

本课题对永乐群岛杯叶海绵 *P. foliascens* 的化学成分进行了系统的研究, scalarane 型二倍半萜是此海绵的特征化合物。这是一类较为罕见的、拥有多样且显著生物活性的天然产物, 海绵是其主要来源之一。本研究报道的 7 个化合物, 其中 5 个为 scalarane 型二倍半萜, 2 个甾醇。有趣的是, 从本研究的海绵中分离得到的 scalarane 型二倍半萜的 C-20 位均被甲基化, 这可能与采集的时间和海域有关, 其共附生微生物可能影响了次生代谢产物的生成。化合物 **1** 是新化合物, 命名为 phyllofolactone

U。化合物 4~6 为首次从该种海绵中分离得到。化合物 1 有细胞毒活性, 有研究结果显示 C-12 连接 4-甲基戊酸酯基团, 能提高化合物的生物活性^[20]。另有研究显示化合物 2 和 3 中 CH₃-26 的不同构型对肿瘤细胞毒活性有一定的影响^[13]。目前, 关于这类化合物的构效关系的研究较少, 有待科学家们深入探究。本研究从我国永乐群岛杯叶海绵中发现了一系列具有特征结构的药源分子, 为高内涵发掘和开发利用我国稀缺海洋生物资源提供了科学依据和决策参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 朱伟明. 海洋天然产物的高效发现与成药性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5645-5652.
- [2] Cheng-Sánchez I, Moya-Utrera F, Porras-Alcalá C, *et al.* Antibody-drug conjugates containing payloads from marine origin [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(8): 494.
- [3] Blunt J W, Carroll A R, Copp B R, *et al.* Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2018, 35(1): 8-53.
- [4] Zhang H W, Dong M L, Wang H, *et al.* Secondary metabolites from the marine sponge genus *Phyllospongia* [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(1): 12.
- [5] Gonzalez M A. Sclarane sesterterpenoids [J]. *Curr Bioact Compd*, 2010, 6(3): 178-206.
- [6] Yu H B, Chen H Y, Duan S, *et al.* Bioactive sclarane-type sesterterpenoids from marine sources [J]. *Chem Biodivers*, 2022, 19(5): e202200049.
- [7] Zhou M, Peng B R, Tian W J, *et al.* 12-deacetyl-12-epi-scleradiol, a sclarane sesterterpenoid from a marine sponge *Hippospongia* sp., induces HeLa cells apoptosis via MAPK/ERK pathway and modulates nuclear receptor Nur77 [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(7): 375.
- [8] Sun J B, Hong L L, Shang R Y, *et al.* Dysclerones A-E, sclarane sesterterpenoids with nitric oxide production inhibitory activity from marine sponge *Dysidea granulosa* [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 111: 104791.
- [9] Alahdal A M, Asfour H Z, Ahmed S A, *et al.* Anti-*Helicobacter*, antitubercular and cytotoxic activities of scleranes from the red sea sponge *Hyrtios erectus* [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 978.
- [10] Williams D E, Hollander I, Feldberg L, *et al.* Sclarane-based sesterterpenoid RCE-protease inhibitors isolated from the Indonesian marine sponge *Carteriospongia foliascens* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(6): 1106-1109.
- [11] Zhang H J, Tang H F, Yi Y H, *et al.* Sclarane sesterterpenes from the Chinese sponge *Phyllospongia foliascens* [J]. *Helv Chim Acta*, 2009, 92(4): 762-767.
- [12] Zhang H J, Yi Y H, Yang F, *et al.* Sesterterpenes and a new sterol from the marine sponge *Phyllospongia foliascens* [J]. *Molecules*, 2010, 15(2): 834-841.
- [13] Lu D, Luo X C, Liu J, *et al.* Phyllofolactones N-T, bioactive bishomosclerane sesterterpenoids from the marine sponge *Phyllospongia foliascens* [J]. *Tetrahedron*, 2023, 137: 133382.
- [14] Jiménez J I, Yoshida W Y, Scheuer P J, *et al.* Sclarane-based sesterterpenes from an Indonesian sponge *Strepsichordaia aliena* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(10): 1388-1392.
- [15] Jiménez J I, Yoshida W Y, Scheuer P J, *et al.* Honulactones: New bishomosclerane sesterterpenes from the Indonesian sponge *Strepsichordaia aliena* [J]. *J Org Chem*, 2000, 65(21): 6837-6840.
- [16] Cao F, Wu Z H, Shao C L, *et al.* Cytotoxic sclarane sesterterpenoids from the South China Sea sponge *Carteriospongia foliascens* [J]. *Org Biomol Chem*, 2015, 13(13): 4016-4024.
- [17] Liu Y H, Yan H, Wen K W, *et al.* Identification of epidioxysterol from South China Sea urchin tripneustes gratilla Linnaeus and its cytotoxic activity [J]. *J Food Biochem*, 2011, 35(3): 932-938.
- [18] Hybelbauerová S, Sejbál J, Dracínský M, *et al.* Chemical constituents of *Stereum subtomentosum* and two other birch-associated basidiomycetes: An interspecies comparative study [J]. *Chem Biodivers*, 2008, 5(5): 743-750.
- [19] 陈瑞强, 罗祥超, 林厚文, 等. 海绵共附生链霉菌 *Streptomyces parvulus* 162432 次级代谢产物研究 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4104-4110.
- [20] Yu B H, Hu B, Ning Z, *et al.* Phyllofenones F-M, Sclarane sesterterpenes from the marine sponge *Phyllospongia foliascens* [J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(10): 507.

[责任编辑 王文倩]