

桐花树土壤内生真菌 *Aspergillus fumigatus* 06T03 次生代谢产物及其生物活性研究

代子腾¹, 韦霞^{1,2,3}, 刘妍颖^{1,2,3}, 游证晓¹, 吴承华¹, 王娟¹, 沈张扬¹, 幸尚平^{1,2,3}, 黄倩婵¹, 朱丹^{1,2,3}

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西生物活性分子研究与评价重点实验室, 南宁 530021; 3. 广西药物精准检测与筛选重点实验室, 南宁 530021)

摘要 目的: 研究红树植物桐花树土壤内生真菌 *Aspergillus fumigatus* 06T03 的次生代谢产物的分离纯化及其潜在的生物活性。方法: 菌株采用大米培养基经规模发酵, 乙酸乙酯浸泡提取后经减压浓缩得到乙酸乙酯粗提物。采用多种现代色谱技术如硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相色谱等对粗提物进行化学成分分离。通过高分辨质谱、核磁共振波谱等综合谱学技术确定单体化合物结构。采用 CCK-8 法和 Griess 法初步评估单体化合物的抗肿瘤活性和抗炎活性。结果: 从 *Aspergillus fumigatus* 06T03 大米发酵产物中分离鉴定出 9 个化合物, 分别为: Monomethylsulochrin (1); Questin (2); Demethylsulochrin (3); Fumiquinazoline C (4); Fumiquinazoline J (5); Azaspirofurans A (6); Pseurotin A (7); N-[2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl] formamide (8); Pyripyropene A (9)。其中, 化合物 1~3 属于蒽醌类化合物, 4~9 属于生物碱类化合物。活性结果显示, 化合物 1~9 对肝癌细胞 (Huh7)、卵巢癌细胞 (A2780)、乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 未发现有明显抗肿瘤活性, 化合物 1、3、6、7、8 和 9 具有一定抗炎活性。结论: 从桐花树土壤内生真菌 *Aspergillus fumigatus* 06T03 中分离得到 9 个单体化合物, 除化合物 2, 其余化合物均为首次从桐花树内生真菌中分离得到, 化合物 1、3、6、7、8 和 9 具有一定的抗炎活性。本研究丰富了桐花树土壤内生真菌次生代谢产物的化学多样性, 为后续深入开发提供了基础数据。

关键词 桐花树; 内生真菌; 烟曲霉; 次生代谢产物; 生物活性

中图分类号: Q936

Secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* 06T03 from the soil of *Aegiceras corniculatum* and studies on their biological activity

DAI Ziteng¹, WEI Xia^{1,2,3}, LIU Yanying^{1,2,3}, YOU Zhengliang¹, WU Chenghua¹, WANG Juan¹, SHEN Zhangyang¹, XING Shangping^{1,2,3}, HUANG Qianchan¹, ZHU Dan^{1,2,3}. (1. Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Bioactive Molecules Research and Evaluation, Nanning 530021, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Precise Drug Detection and Screening, Nanning 530021, China)

Abstract **Objective:** To investigate the isolation and purification of the secondary metabolites and their potential biological activity in the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* 06T03 from the soil of *Aegiceras corniculatum*. **Methods:** The strain was fermented on a large scale using rice medium, and then extracted by soaking ethyl acetate and concentrated under reduced pressure to obtain a crude extract of ethyl acetate. A variety of modern chromatographic techniques such as silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, high-performance liquid chromatography were used to separate the chemical components of the crude extract. Their structures were determined by using comprehensive spectral techniques such as high-resolution mass spectra (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The antineoplastic and anti-inflammatory activities of the monomers were evaluated using cell counting kit-8 (CCK-8) assay and Griess assays. **Results:** Nine compounds were isolated from the rice fermentation products of *Aspergillus fumigatus* 06T03 and identified as Monomethylsulochrin (1), Questin (2), Demethylsulochrin (3), Fumiquinazoline C (4), Fumiquinazoline J (5),

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 82160734); 广西科技重大专项 (No. 桂科 AA22362); 中央引导地方科技发展资金 (No. 桂科 ZY24212031); 广西中医药多学科交叉创新团队 (No. GZKJ2305); 广西医科大学青年基金项目 (No. GXMUYSF202315); 大学生创新创业训练项目 (No. 202410598031)

[通信作者] 朱丹, E-mail: zhudan@stu.gxmu.edu.cn

[收稿日期] 2024-11-25

Azaspirofurans A (6), Pseurotin A (7), N-[2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl]formamide (8), and Pyripyropene A (9). Among them, compounds 1-3 belonged to anthraquinones, and 4-9 belonged to alkaloids. The results showed that compounds 1-9 failed to exhibit obvious antineoplastic activity against hepatoma carcinoma cells (Huh7), ovarian carcinoma cells (A2780), and breast cancer cells (MDA-MB-231), while compounds 1, 3, 6, 7, 8, and 9 had certain anti-inflammatory activities. **Conclusion:** Nine monomeric compounds, except compound 2 which has been isolated before, have been isolated for the first time from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* 06T03 from the soil of *Aegiceras corniculatum*. Compounds 1, 3, 6, 7, 8, and 9 have certain anti-inflammatory activities. This study enriches the chemical diversity of the secondary metabolites of endophytic fungus from the soil of *Aegiceras corniculatum*, and provides basic data for subsequent further development.

Keywords *Aegiceras corniculatum*; endophytic fungus; *Aspergillus fumigatus*; secondary metabolites; biological activity

红树植物是陆地和海洋环境之间动态过渡的重要生态系统,其生存环境独特,具有高温、高盐、高紫外线辐射和潮汐等特点^[1]。红树植物内生真菌与植物在长期共生过程中可能通过产生结构独特,具有特殊生物活性的化合物来应对生存环境的压力,目前已经从红树植物内生真菌中挖掘出许多结构新颖的功能分子^[2]。桐花树是组成红树林的重要树种之一,主要分布在我国广东、广西、福建等沿海地区,且具有较高的药用价值,民间主要用于治疗哮喘、糖尿病和风湿疾病^[3-4]。目前,关于桐花树的研究主要集中在植物化学成分以及活性等方面^[5-6],而对其内生真菌的研究相对较少,不利于对桐花树进行进一步开发利用。因此本研究对桐花树内生真菌的次生代谢产物进行挖掘,旨在分离得到有药用价值的天然产物。

本研究对分离得到的红树植物桐花树土壤内

生真菌 *Aspergillus fumigatus* 06T03 进行化学成分和生物活性的研究,从该菌株的大米培养基发酵提取物中分离得到了9个次生代谢产物(图1),结合高分辨质谱、核磁共振波谱等技术对分离得到的次生代谢产物进行结构鉴定,确定其结构分别为 Monomethylsulochrin (1)、Questin (2)、Demethylsulochrin (3)、Fumiquinazoline C (4)、Fumiquinazoline J (5)、Azaspirofurans A (6)、Pseurotin A (7)、N-[2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl]formamide (8)、Pyripyropene A (9)。除化合物2,其余化合物均为首次从桐花树土壤内生真菌中分离得到,抗肿瘤活性实验结果显示,化合物1~9对肝癌细胞(Huh7)、卵巢癌细胞(A2780)、乳腺癌细胞(MDA-MB-231)无明显活性,抗炎活性实验结果显示,化合物1、3、6、7、8和9具有一定的抗炎活性。

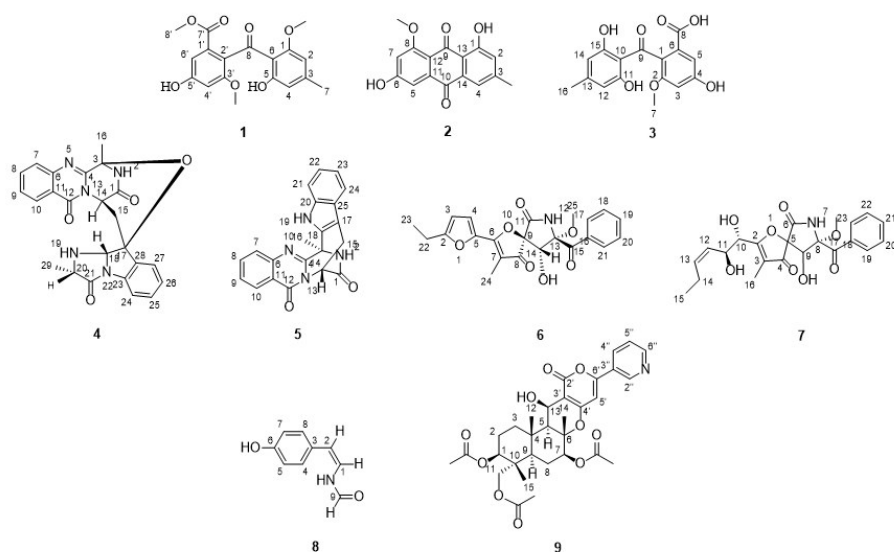


图1 桐花树土壤内生真菌 *Aspergillus fumigatus* 分离得到化合物1~9的化学结构

1 材料与方法

1.1 仪器 AVANCE NEO 600 MHz(Bruker,美国), Xevo G3 QToF 高分辨质谱仪(Waters,美国), Agilent 1260 高效液相色谱仪(Agilent,美国),分析型 ODS C18 色谱柱(EC-C18, 4.6 mm×150 mm, 4 μm), C18 半制备色谱柱(Eclipse XDB-C18, 9.4 mm×250 mm, 5 μm)均购自美国 Agilent 公司,酶标仪(Tecan, 瑞士)。

1.2 材料 葡萄糖凝胶 Sephadex LH-20(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),硅胶(100~200目, 200~300目, 青岛海洋化工有限公司),C18 反向硅胶 ODS 填料(北京绿百草科技发展有限公司),一氧化氮(NO)检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司),细胞增殖试剂盒(苏州优逸兰迪生物科技有限公司),氘代试剂(上海泰坦科技股份有限公司),PDB 培养基(上海源叶生物科技有限公司)。大米培养基:80 g 大米,65 mL 蒸馏水,高压灭菌锅 121 °C 灭菌 30 min,冷却至室温。色谱级甲醇(赛默飞世尔科技公司),其他化学试剂均为分析纯。

桐花树样品采自广西北海山口镇红树林保护区,由广西医科大学药学院朱丹教授鉴定为报春花科蜡油果属桐花树(*Aegiceras corniculatum*)。实验菌株分离于新鲜的桐花树土壤,采用形态学和分子生物学实验鉴定为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*),编号为 06T03。植物样品及相关实验菌种、细胞均保存于广西医科大学药学院天然药物化学实验室。

1.3 菌株发酵 用接种环挑取少量菌株 *Aspergillus fumigatus* 06T03 的菌丝转移至 PDB 液体培养基中,在 180 r/min、28 °C 的恒温摇床上培养 3 d,获得种子液,在超净工作台内,用无菌巴氏吸管吸取种子液接种于灭菌过的大米培养基中,在 28 °C 的条件下避光静置发酵 21 d。

1.4 提取分离 菌株发酵结束后,每瓶培养基中的物质用 400 mL 乙酸乙酯超声提取 3 次,真空抽滤除去残渣,并在 40 °C 条件下真空旋转蒸发有机溶剂,得到棕色的乙酸乙酯相粗提物,将粗提物重悬于蒸馏水中,依次采用石油醚和乙酸乙酯等比例萃取 3 次。减压浓缩后得到除脂后的褐色乙酸乙酯残留物(88.92 g)。

粗提物采用正向硅胶柱色谱(200~300目),以

石油醚/乙酸乙酯体系为流动相,由(90:10~10:90)石油醚/乙酸乙酯进行梯度洗脱,然后采用 100% 甲醇进行洗脱得到 16 个次级馏分(Fr.1~Fr.16)。将 Fr.9 采用正向硅胶柱色谱,以石油醚/乙酸乙酯体系为流动相,由(90:10~10:90)石油醚/乙酸乙酯进行梯度洗脱,得到 9 个次级馏分(Fr.9.1~Fr.9.9)。Fr.9.3 采用 ODS 反向柱色谱,以甲醇/水作为流动相,由 20%~100% 甲醇—水进行梯度洗脱,得到 11 个三级馏分(Fr.9.3.1~Fr.9.3.11),Fr.9.3.1 重结晶得到化合物 1(541 mg)。Fr.9.3.5 通过高效液相色谱进行分离(甲醇:水=60:40,流速 2 mL/min)得到化合物 6(t_r =43 min, 67 mg)。Fr.9.3.7 通过高效液相色谱进行分离(甲醇:水=80:20,流速=2 mL/min)得到化合物 2(t_r =18 min, 84 mg)。Fr.9.5 采用正向硅胶柱色谱,以石油醚/乙酸乙酯体系为流动相,由(90:10~10:90)石油醚/乙酸乙酯进行梯度洗脱,得到化合物 4(13 mg)和 8 个 3 级馏分(Fr.9.5.1~Fr.9.5.8)。Fr.9.5.6 通过高效液相色谱进行分离(甲醇:水=70:30,流速=2 mL/min),得到化合物 8(t_r =18 min, 56 mg)。Fr.10 采用葡萄糖凝胶柱色谱,以二氯甲烷:甲醇=7:3 为流动相进行洗脱,得到 5 个次级馏分(Fr.10.1~Fr.10.5),Fr.10.3 通过高效液相色谱进行分离(甲醇:水=65:35,流速=2 mL/min),得到化合物 5(t_r =34 min, 14 mg)。Fr.11 采用葡萄糖凝胶柱色谱,以二氯甲烷:甲醇=3:7 为流动相进行洗脱,得到 6 个次级馏分(Fr.11.1~Fr.11.6),Fr.11.4 通过高效液相色谱进行分离(甲醇:水=55:45,流速=2 mL/min),得到化合物 7(t_r =21 min, 73 mg)。Fr.5 采用高效液相色谱进行分离(甲醇:水=85:15,流速=2 mL/min),得到化合物 9(t_r =16 min, 24 mg)。Fr.13 采用正向硅胶柱层析,以石油醚/乙酸乙酯体系为流动相,由(90:10~10:90)石油醚/乙酸乙酯进行梯度洗脱,得到 8 个次级馏分(Fr.13.1~Fr.13.8),Fr.13.8 通过高效液相色谱进行分离(甲醇:水=50:50,流速=2 mL/min),得到化合物 3(t_r =15 min, 56 mg)。

1.5 CCK-8 法检测肿瘤细胞增殖活力 采用 CCK-8 实验评价 9 个次生代谢产物对不同细胞系的抗增殖作用,包括肝癌细胞(Huh7)、卵巢癌细胞(A2780)、乳腺癌细胞(MDA-MB-231),采用顺铂(DDP)作为阳性药。将药物用二甲基亚砜(DMSO)配制成 50 mmol/L 浓度的母液,在使用时,用培养基稀释至指定浓度。按照之前报道的方法^[7-8],在 96 孔

板中每孔加入 100 μL 细胞悬液 (5×10^4 个/mL), 培养箱培养 24 h 后去除培养基, 分为 3 组, 即对照组、DDP 组和实验组, 对照组每孔加入含有 0.2% DMSO 的 DMEM 完全培养基, DDP 组每孔加入 100 μL DDP 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 完全培养基, 实验组每孔加入 100 μL 药物浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 完全培养基, 培养箱培养 24 h, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 培养箱孵育 1 h, 用酶标仪测量 450 nm 处吸光度值 (OD), 计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.6 Griess 法检测小鼠巨噬细胞 NO 含量 采用 Griess 法^[9]评价 9 个次生代谢产物对脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生 NO 的抑制作用, 以地塞米松 (DXMS) 作为阳性对照药。采用 CCK-8 法检测 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下次生代谢产物对 RAW264.7 细胞的细胞毒活性, 细胞存活率高于 80% 即认为次生代谢产物无明显细胞毒活性。根据选定的药物浓度, 采用 Griess 法评估次生代谢产物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 的抑制作用。

将 RAW264.7 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 完全培养基中培养。取对数生长期的 RAW264.7 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 24 h 后去除培养基, 分为 4 组, 即对照组、LPS 组、DXMS 组和实验组, 对照组中加入 DMEM 完全培养基, LPS 组加入含有 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的 DMEM 完全培养基, DXMS 组加入含有 40 $\mu\text{mol/L}$ DXMS 和含有 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的 DMEM 完全培养基, 实验组中加入含有 40 $\mu\text{mol/L}$ 次生代谢产物和含有 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的 DMEM 完全培养基。处理 24 h, 根据 NO 检测试剂盒说明书检测 NO 含量。

1.7 统计学方法 实验数据采用 Graphpad Prism 8 软件对实验结果进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间两两比较采用双因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 化合物结构鉴定 化合物 1, 黄绿色晶体, HR-ESI-MS m/z : 369.093 9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 715.209 5 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$, 分子中含有 10 个不饱和

度。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} 6.95 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6'), 6.67 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-4'), 6.38 (1H, dd, $J=1.5, 0.8$ Hz, H-4), 6.20 (1H, s, H-2), 3.68 (3H, s, H-10), 3.65 (3H, s, H-8'), 3.37 (3H, s, H-9), 2.28 (3H, s, H-7)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} 201.61 (C, C-8), 167.96 (C, C-7'), 165.29 (C, C-5), 162.63 (C, C-1), 159.72 (C, C-5'), 158.48 (C, C-3'), 149.56 (C, C-3), 129.84 (C, C-1'), 128.05 (CH, C-2'), 111.75 (C, C-6), 111.38 (CH, C-4), 108.69 (CH, C-6'), 104.08 (CH, C-2), 104.06 (CH, C-4'), 56.52 (CH_3 , C-10), 56.25 (CH_3 , C-9), 52.54 (CH_3 , C-8'), 22.38 (CH_3 , C-7)。核磁波谱数据与文献[10]对比一致, 故鉴定化合物 1 为 Monomethylsulochrin。

化合物 2, 橙黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 307.056 1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$, 分子中含有 11 个不饱和度。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} 13.28 (1H, brs, OH-1), 7.42 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-4), 7.19 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-5), 7.12 (1H, brs, H-2), 6.82 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-7), 3.90 (3H, s, OCH_3 -8)。 ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 186.24 (C, C-9), δ_{C} 182.37 (C, C-10), 164.88 (C, C-6), 163.48 (C, C-8), 161.71 (C, C-1), 146.55 (C, C-3), 136.78 (C, C-11), 132.04 (C, C-14), 124.16 (CH, C-2), 119.08 (CH, C-4), 114.40 (C, C-13), 112.41 (C, C-12), 107.18 (CH, C-5), 105.01 (CH, C-7), 56.30 (CH_3 , OCH_3 -8), 21.38 (CH_3 , CH_3 -3)。核磁波谱数据与文献[11]对比一致, 故鉴定化合物 2 为 Questin。

化合物 3, 淡黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 341.083 1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 659.146 0 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_7$, 分子中含有 10 个不饱和度。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} 6.98 (1H, d, $J=1.84$ Hz, H-5), 6.62 (1H, d, $J=2.15$ Hz, H-3), 6.09 (1H, s, H-12), 6.09 (1H, s, H-14), 3.68 (3H, s, H-7), 2.17 (3H, s, H-16)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} 202.56 (C, C-9), 169.13 (C, C-8), 163.36 (C, C-15), 163.36 (C, C-11), 159.48 (C, C-4), 158.51 (C, C-2), 149.04 (CH, C-13), 130.63 (C, C-1), 128.32 (C, C-6), 110.92 (C, C-10), 109.24 (CH, C-5), 108.75 (CH, C-12), 108.75 (CH, C-14), 104.07 (CH, C-3), 56.53 (CH_3 , C-7), 22.02 (CH_3 , C-16)。核磁波谱数据与文献[12]对比一致, 故鉴定化合物 3 为 Demethylsulochrin。

化合物 4, 为淡黄色粉末, HR-ESI-MS m/z :

466.150 7[M+Na]⁺, 909.316 0[2M+Na]⁺, 分子式 C₂₄H₂₁N₅O₄, 分子中含有 17 个不饱和度。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H 8.36(1H, dd, *J*=8.1, 1.5 Hz, H-10), 7.86(1H, td, *J*=7.6, 6.9, 1.5 Hz, H-8), 7.81(1H, m, H-7), 7.61(1H, td, *J*=7.6, 1.3 Hz, H-9), 7.46(1H, d, *J*=7.8 Hz, H-24), 7.41(1H, brs, H-2), 7.37(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-27), 7.32(1H, t, *J*=7.7 Hz, H-25), 7.20(1H, t, *J*=7.6 Hz, H-26), 5.73(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-14), 5.34(1H, d, *J*=7.2 Hz, H-18), 3.72(1H, m, *J*=7.0 Hz, H-20), 2.99(1H, dd, *J*=15.2, 7.5 Hz, Ha-15), 2.15(1H, d, *J*=15.1 Hz, Hb-15), 2.06(3H, s, H-16), 1.07(3H, d, *J*=6.08 Hz, H-29), 1.04(1H, t, *J*=7.7 Hz, H-19)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C 171.01(C, C-1), 170.70(C, C-21), 159.64(C, C-12), 150.46(C, C-4), 146.41(C, C-6), 138.48(C, C-28), 135.86(CH, C-23), 135.09(CH, C-8), 130.40(CH, C-25), 128.76(CH, C-9), 128.59(CH, C-7), 127.14(CH, C-10), 126.34(CH, C-26), 125.00(CH, C-27), 121.50(C, C-11), 115.61(CH, C-24), 87.27(CH, C-18), 87.18(C, C-17), 84.29(C, C-3), 58.73(CH, C-20), 51.54(CH, C-14), 31.52(CH, C-15), 24.70(CH₃, C-16), 18.87(CH₃, C-29)。核磁波谱数据与文献[13]对比一致, 故鉴定化合物 4 为 Fumiquinazoline C。

化合物 5 为淡黄色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 379.116 5 [M+Na]⁺, 735.248 1 [2M+Na]⁺ 分子式 C₂₁H₁₆N₄O₂, 分子中含有 16 个不饱和度。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ_H 8.15(1H, brd, H-10), 7.72(1H, brs, *J*=7.4 Hz, H-8), 7.62(1H, d, *J*=8.3 Hz, H-7), 7.45(1H, brs, *J*=7.2 Hz, H-9), 7.37(1H, d, *J*=8.1 Hz, H-24), 7.34(1H, dd, *J*=14.3, 8.2 Hz, H-21), 7.10(1H, d, *J*=7.7 Hz, H-22), 6.98(1H, d, *J*=7.7 Hz, H-23), 5.90(1H, d, *J*=3.2 Hz, H-14), 3.47(1H, brs, H-15b), 3.34(1H, m, H-15a), 2.21(3H, s, H-16)。¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ_C 172.34(C, C-1), 161.85(C, C-12), 155.56(C, C-4), 148.66(C, C-6), 136.77(CH, C-8), 135.92(C, C-20), 134.47(C, C-18), 129.07(C, C-25), 128.72(CH, C-7), 128.41(CH, C-9), 127.57(CH, C-10), 123.71(CH, C-22), 121.55(C, C-11), 120.81(C, C-23), 118.87(CH, C-24), 112.62(CH, C-21), 106.99(C, C-17), 56.33(C, C-3), 56.17(CH, C-14), 26.94(CH, C-15), 18.58(CH₃, C-16)。核磁波谱数据与文献[14]对比一致, 故鉴定化

合物 5 为 Fumiquinazoline J。

化合物 6, 为淡黄色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 434.122 8[M+Na]⁺, 分子式为 C₂₂H₂₁NO₇, 分子中含有 13 个不饱和度。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H 8.31(1H, d, H-17), 8.31(1H, d, H-21), 7.63(1H, m, H-19), 7.49(1H, m, H-18), 7.49(1H, m, H-20), 7.03(1H, d, *J*=3.6 Hz, H-4), 6.22(1H, d, *J*=3.5 Hz, H-3), 4.69(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-14), 4.14(1H, d, *J*=12.5 Hz, HO-14), 3.40(3H, s, H-25), 2.75(2H, q, *J*=7.65 Hz, H-22), 2.01(3H, s, H-24), 1.28(3H, t, *J*=7.6 Hz, H-23)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C 195.79(C, C-8), 194.79(C, C-15), 172.69(C, C-6), 166.37(C, C-11), 163.89(C, C-2), 143.50(C, C-5), 134.68(CH, C-19), 132.58(C, C-16), 130.73(CH, C-17), 130.73(CH, C-21), 128.83(CH, C-18), 128.83(CH, C-20), 118.41(CH, C-4), 107.94(C, C-3), 107.94(C, C-7), 91.69(C, C-9), 89.84(C, C-13), 74.36(CH, C-14), 51.80(CH₃, C-25), 21.90(CH₂, C-22), 11.90(CH₃, C-23), 6.34(CH₃, C-24)。核磁波谱数据与文献[15]对比一致, 故鉴定化合物 6 为 Azaspirofurans A。

化合物 7, 白色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 454.147 7 [M+Na]⁺, 885.310 8[2M+Na]⁺, 分子式为 C₂₂H₂₅NO₈, 分子中含有 11 个不饱和度。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H 8.32(1H, m, H-19), 8.31(1H, m, H-23), 7.64(1H, m, H-21), 7.49(1H, m, *J*=8.4, 7.4 Hz, H-20), 7.49(1H, m, *J*=8.4, 7.4 Hz, H-22), 5.58(1H, m, H-13), 5.25(1H, m, H-12), 4.75(1H, m, H-11), 4.70(1H, s, H-9), 4.59(1H, d, *J*=4.5 Hz, H-10), 3.45(3H, s, H-8-OMe), 2.17(2H, m, H-14), 1.67(3H, s, H-16), 0.98(3H, t, *J*=7.5 Hz, H-15)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C 196.47(C, C-4), 195.49(C, C-17), 186.07(C, C-2), 166.80(C, C-6), 136.79(CH, C-13), 134.96(CH, C-21), 132.51(C, C-18), 130.93(CH, C-19), 130.93(CH, C-23), 128.86(CH, C-20), 128.86(CH, C-22), 126.65(CH, C-12), 113.37(C, C-3), 93.02(C, C-5), 90.51(C, C-8), 73.12(CH, C-9), 71.25(CH, C-11), 70.78(CH, C-10), 51.88(CH₃, C-8-OCH₃), 21.54(CH₂, C-14), 14.24(CH₃, C-15), 6.28(CH₃, C-16)。核磁波谱数据与文献[16]对比一致, 故鉴定化合物 7 为 Pseurotin A。

化合物 8, 为白色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 186.053 1[M+Na]⁺, 分子式 C₉H₉NO₂, 分子中含有 6

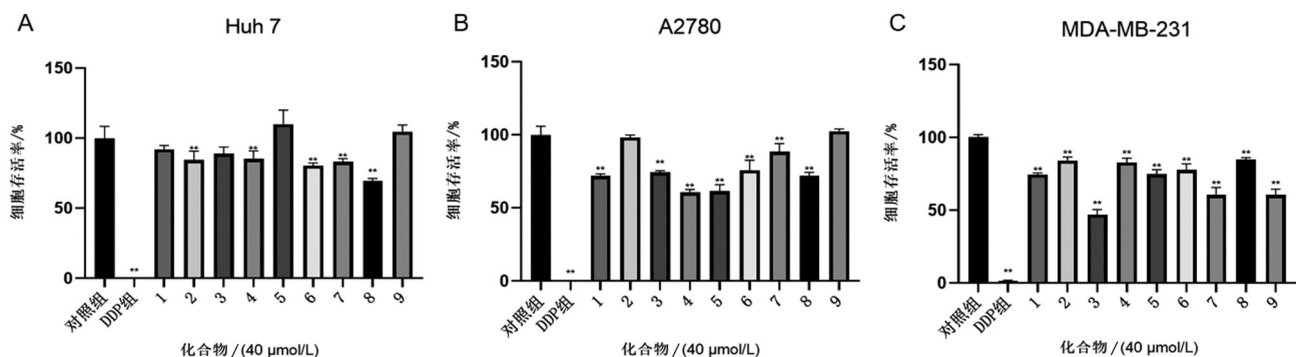
个不饱和度。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} 8.07 (1H, s, H-9), 7.19 (1H, dd, $J=8.5, 2.1$ Hz, H-1), 7.18 (1H, dd, $J=8.5, 2.1$ Hz, H-4), 7.18 (1H, dd, $J=8.5, 2.1$ Hz, H-8), 6.78 (1H, dd, $J=8.6, 2.1$ Hz, H-5), 6.72 (1H, d, $J=9.7$ Hz, H-7), 5.73 (1H, d, $J=9.7$ Hz, H-2)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} 161.79 (C, C-9), 157.70 (C, C-6), 130.66 (CH, C-4), 130.66 (CH, C-8), 127.80 (C, C-3), 118.58 (CH, C-1), 116.55 (CH, C-5), 116.55 (CH, C-7), 113.85 (CH, C-2)。核磁波谱数据与文献[17]对比一致,故鉴定化合物8为N-[2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl]formamide。

化合物9,为黄色粉末,HR-ESI-MS m/z : 584.262 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$,分子式 $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{NO}_{10}$,分子中含有14个不饱和度。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} 8.97 (1H, brs, H-2'), 8.66 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-6'), 8.09 (1H, brs, H-4'), 7.40 (1H, dd, $J=8.0, 4.8$ Hz, H-5'), 6.45 (1H, s, H-5'), 5.01 (1H, m, H-7), 4.99 (1H, s, H-13), 4.79 (1H, dd, $J=11.8, 4.6$ Hz, H-1), 3.78 (1H, d, $J=11.9$ Hz, H-11_a), 3.69 (1H, d, $J=12$ Hz, H-11_b), 2.16 (1H, m, H-3_a), 2.15 (3H, s, 7-O-CO-CH₃), 2.07 (3H, s, 11-O-CO-CH₃), 2.03 (3H, s, 1-O-CO-CH₃), 1.89 (1H, m, H-2_a), 1.82 (1H, m, H-2_b), 1.77 (1H, m, H-8_b), 1.68 (3H, s, H-14), 1.63 (1H, m, H-8_a), 1.58 (1H, m, H-9), 1.52 (1H, m, H-5), 1.43 (3H, s, H-12), 1.36 (1H, m, H-3_b), 0.87 (3H, s, H-

15)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} 171.13 (C, C-11-O-CO-CH₃), 170.71 (C, C-1-O-CO-CH₃), 170.26 (C, C-7-O-CO-CH₃), 164.13 (C, C-2'), 162.37 (C, C-4'), 157.40 (C, C-6'), 151.55 (CH, C-6''), 146.82 (CH, C-2''), 133.20 (CH, C-4''), 127.31 (C, C-3''), 123.83 (CH, C-5''), 103.12 (C, C-3'), 99.58 (CH, C-5'), 83.38 (C, C-6), 77.87 (CH, C-7), 73.72 (CH, C-1), 64.98 (CH₂, C-11), 60.23 (CH, C-13), 54.81 (CH, C-5), 45.48 (CH, C-9), 40.43 (C, C-10), 37.99 (C, C-4), 36.29 (CH₂, C-3), 25.32 (CH₂, C-8), 22.83 (CH₂, C-2), 21.37 (CH₃, C-7-O-CO-CH₃), 21.27 (CH₃, C-1-O-CO-CH₃), 20.92 (CH₃, C-11-O-CO-CH₃), 17.58 (CH₃, C-12), 16.41 (CH₃, C-14), 13.36 (CH₃, C-15)。核磁波谱数据与文献[18]对比一致,故鉴定化合物9为Pyripyropene A。

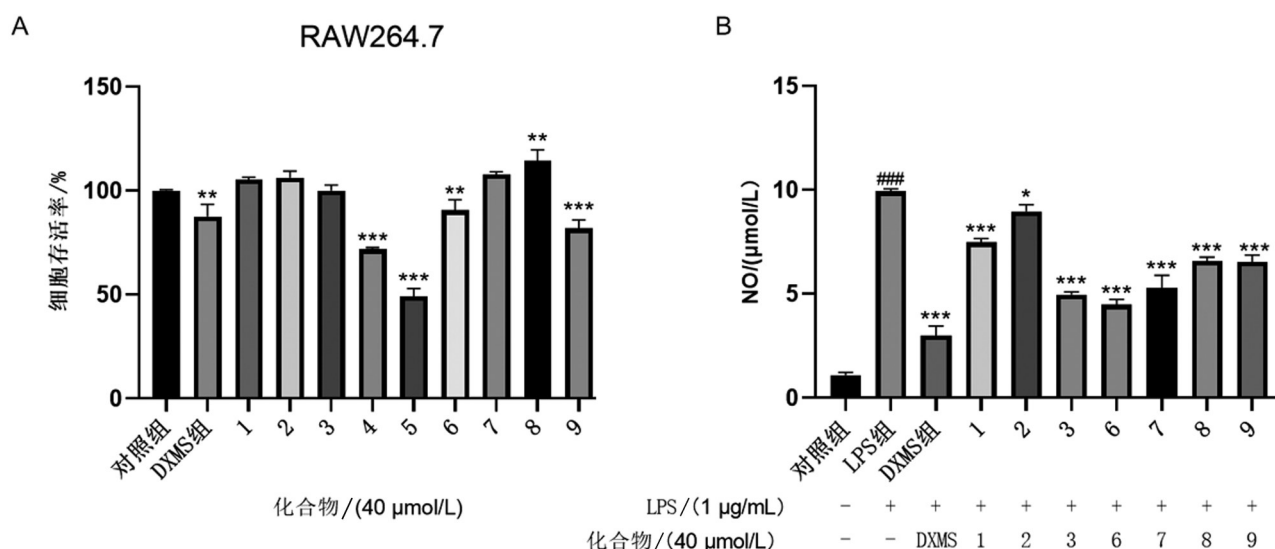
2.2 化合物体外抗肿瘤活性结果 化合物1~9在40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下,无明显的抗肿瘤细胞(Huh7、A2780、MDA-MB-231)增殖作用,见图2。

2.3 化合物体外抗炎结果 除化合物4、5,其余化合物在40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,RAW264.7细胞的细胞存活率均大于80%,选定该药物浓度进行后续的抗炎实验;体外抗炎实验结果表明,化合物1、3、6、7、8和9均能抑制LPS诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7产生NO,见图3。



A: 化合物1~9(40 $\mu\text{mol/L}$)对肝癌细胞Huh7的细胞存活率影响;B: 化合物1~9(40 $\mu\text{mol/L}$)对卵巢癌细胞A2780的细胞存活率影响;C: 化合物1~9(40 $\mu\text{mol/L}$)对乳腺癌细胞MDA-MB-231的细胞存活率影响;1~9: 化合物1~9实验组; $n=3$;与对照组比较,** $P<0.05$ 。

图2 化合物1~9对3株肿瘤细胞的抗增殖作用



A: 化合物1~9(40 μmol/L)对小鼠巨噬细胞RAW264.7的细胞存活率影响;1~9:化合物1~9实验组; $n=3$;与对照组比较, ** $P<0.05$, *** $P<0.001$;B: 化合物1~3,6~9对LPS诱导的RAW264.7细胞生成的NO含量的影响;1~3、6~9:化合物1~3、6~9实验组; $n=3$;与对照组比较, ### $P<0.001$;与LPS组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图3 化合物1~9对RAW264.7细胞的毒活性和对LPS诱导细胞产生NO含量的影响

3 讨论

植物内生真菌是一类生活在植物组织内部,对植物组织没有引起明显病害症状的微生物,它们与宿主植物之间存在着密切的共生关系^[19]。由于植物内生真菌具有易分离,生长速度快,培育要求低,次生代谢产物丰富等特点,近年来内生真菌作为新型生物活性物质的来源,已经受到了科研工作者的广泛关注。特别是它们在抗肿瘤,抗炎等活性方面的潜力,已经成为药物研发的新热点^[20]。然而,内生真菌中活性成分的发掘和研究仍面临挑战。由于内生真菌的种群多样性以及它们产生的代谢产物复杂性,需要通过高通量筛选技术和精密的生物检测方法来识别具有抗肿瘤,抗炎等活性的化合物。此外,这些化合物的作用机制、药理学特性以及安全性和有效性都需要进一步的体内外实验来验证。总体而言,内生真菌作为抗肿瘤,抗炎等活性物质的潜在来源,具有很好的研究意义和应用前景。未来的研究需要集中在活性成分的深入发掘、作用机制的阐明以及临床前和临床研究的推进上。

桐花树是红树林生态系统的重要组成部分,也是民间具有重要药用价值的植物之一,目前已经从桐花树的内生真菌中分离得到一些具有药用价值的次生代谢产物^[21-23],这些次级代谢产物具有较为

广泛的生物活性,包括抗肿瘤,抗疟原虫等等。由此可见,桐花树内生真菌是具有良好生物活性次生代谢产物的重要来源,具有良好的开发前景。

本研究从红树林植物桐花树土壤内生真菌 *Aspergillus fumigatus* 06T03 大米培养基发酵的粗提物中分离纯化得到9个化合物,包括萜醌类和生物碱类化合物,通过¹H NMR,以及HR-ESI-MS确定了这些化合物的结构。除化合物2,其余化合物均为首次从桐花树内生真菌中分离得到。使用CCK-8法和Griess法对化合物进行了体外抗肿瘤活性和抗炎活性筛选,结果表明化合物1~9对肝癌细胞(Huh7)、卵巢癌细胞(A2780)、乳腺癌细胞(MDA-MB-231)未有明显抗肿瘤活性,化合物1、3、6、7、8和9有一定的抗炎活性。研究结果表明,桐花树土壤内生真菌有开发出具有药用价值化合物的潜力,值得进一步研究。本研究丰富了桐花树土壤内生真菌的研究,为后续深入开发提供了基础数据。

参考文献:

- [1] WU M J, XU B F, GUO Y W. Unusual secondary metabolites from the mangrove ecosystems: structures, bioactivities, chemical, and bio-syntheses[J]. Marine drugs, 2022, 20(8): 535.
- [2] CADAMURO R D, DA SILVEIRA BASTOS I M A, SILVA I T, et al. Bioactive compounds from mangrove en-

- dophytic fungus and their uses for microorganism control [J]. *Journal of fungi*, 2021, 7(6): 455.
- [3] DING L, DAHSE H M, HERTWECK C. Cytotoxic alkaloids from *Fusarium incarnatum* associated with the mangrove tree *Aegiceras corniculatum*[J]. *Journal of natural products*, 2012, 75(4): 617-621.
- [4] 田晓萌, 蔡晓婧, 郭庆梅, 等. 桐花树药用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(11):114-117.
- [5] NUGRAHA A P, SIBERO M T, NUGRAHA A P, et al. Anti-periodontopathogenic ability of mangrove leaves (*Aegiceras corniculatum*) ethanol extract: in silico and in vitro study[J]. *European journal of dentistry*, 2023, 17(1): 46-56.
- [6] RAHMAN M A, PAUL R R, BISWAS C, et al. Pesticidal activity of sundarban mangrove plant extracts against *Sitophilus* pests and identification of active constituents using LC-MS[J]. *Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences*, 2021, 2021: 1540336.
- [7] HUANG X K, LIU Y H, QIAN C Y, et al. CHSY3 promotes proliferation and migration in gastric cancer and is associated with immune infiltration[J]. *Journal of translational medicine*, 2023, 21(1): 474.
- [8] OUYANG P, LI K, XU W, et al. METTL3 recruiting M2-type immunosuppressed macrophages by targeting m6A-SNAIL-CXCL2 axis to promote colorectal cancer pulmonary metastasis[J]. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 2024, 43(1): 111.
- [9] UNTERHOLZNER A, KUCK K, WEINZIERL A, et al. An unprecedented 4,8-cycloeuodesmane, further new sesquiterpenoids, a triterpene, steroids, and a lignan from the resin of *Commiphora myrrha* and their anti-inflammatory activity in vitro[J]. *Molecules*, 2024, 29(18): 4315.
- [10] 丛梦静, 胡怡伟, 赵凯, 等. 深海冷泉来源真菌 *Talaromyces helicus* SCSIO41311 中聚酮类化学成分研究[J]. *热带海洋学报*, 2022, 41(5):117-120.
- [11] FUJIMOTO H, FUJIMAKI T, OKUYAMA E, et al. Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*[J]. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 1999, 47(10): 1426-1432.
- [12] HUANG R F, MA S Q, WU J L, et al. A new tetrahydroxy-benzophenone from a marine-associated fungus of *Penicillium* sp. and its potential antibacterial activity[J]. *Natural product research*, 2024: 1-8.
- [13] 周彦伶, 许言超, 龚倩玉, 等. 贵州洞穴真菌 *Aspergillus fumigatus* GZWMJZ-152 的抗菌活性产物[J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(6):675-682.
- [14] 韩小贤, 许晓妍, 崔承彬, 等. 海洋真菌烟曲霉 H1-04 产生的生物碱类化合物及其抗肿瘤活性[J]. *中国药物化学杂志*, 2007, 17(4):232-237.
- [15] REN H, LIU R, CHEN L, et al. Two new hetero-spirocyclic gamma-lactam derivatives from marine sediment-derived fungus *Aspergillus sydowi* D2-6[J]. *Archives of pharmaceutical research*, 2010, 33(4): 499-502.
- [16] 易文娟, 陈波, 殷颖, 等. 绿僵菌破坏素合成缺失株中分离鉴定 pseurotin A[J]. *菌物学报*, 2019, 38(7):1082-1089.
- [17] KHAN I, ZHANG H B, LIU W, et al. Identification and bioactivity evaluation of secondary metabolites from Antarctic-derived *Penicillium chrysogenum* CCTCC M 2020019[J]. *RSC advances*, 2020, 10(35): 20738-20744.
- [18] LIANG W L, LE X, LI H J, et al. Exploring the chemodiversity and biological activities of the secondary metabolites from the marine fungus *Neosartorya pseudofischeri* [J]. *Marine drugs*, 2014, 12(11): 5657-5676.
- [19] 王诗怡, 王玉妃, 刘江晔, 等. 北部湾植物内生真菌的分离及次级代谢产物鉴定[J]. *中国抗生素杂志*, 2024, 49(5):510-518.
- [20] 殷娜, 宋娜丽, 普晓佳, 等. 民族药马利筋内生真菌生物活性研究[J]. *广西植物*, 2022, 42(5):781-789.
- [21] GUPTA V K, MUKHERJEE K, ROY A. Two novel antifungals, acornine 1 and acornine 2, from the bark of mangrove plant *Aegiceras corniculatum* (Linn.) Blanco from Sundarban Estuary[J]. *Pharmacognosy magazine*, 2014, 10(Suppl 2): S342-S349.
- [22] LIN Z J, LU Z Y, ZHU T J, et al. Penicillenols from *Penicillium* sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*[J]. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 2008, 56(2): 217-221.
- [23] SUNDARAM R, GANESAN R, MURUGESAN G. In vitro antiplasmodial activity of spiro benzofuran compound from mangrove plant of Southern India[J]. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 2012, 5(5): 358-361.