

老鼠簕来源内生真菌*Diaporthe pseudomagiferae* 的聚酮类化合物分离鉴定及体外抗氧化、抗炎活性研究

潘钰莹¹, 韦 霞¹, 刘妍颖¹, 幸尚平¹, 潘 波², 覃其云², 麻晓琳¹, 代子腾¹, 郭宏伟^{1,3}, 朱 丹^{1,3}

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西壮族自治区林业科学研究院, 南宁 530002; 3. 广西生物活性分子研究与评价重点实验室, 南宁 530021)

摘要 目的: 研究老鼠簕来源的内生真菌*Diaporthe pseudomagiferae* 中聚酮类化合物分离纯化及其抗氧化、抗炎活性。方法: 利用正相硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相色谱等色谱技术进行分离纯化, 结合高分辨质谱、核磁共振波谱技术等综合谱学技术对化合物进行结构解析, 对部分化合物进行抗炎活性评价和抗氧化活性筛选。结果: 从*Diaporthe pseudomagiferae* 大米发酵产物中分离鉴定得到 7 个聚酮类化合物, 分别为: [(8-methyl-9-oxabicyclo [4.2.1] nona-2,4-dien-7-yl)-(5-oxo-2H-furan-2-yl)methyl] acetate(1)、2,3-Dihydromycoepoxydiene(2)、Dothiorelone A(3)、Dothiorelone B(4)、Cytosporone B(5)、5,6-dihydroxy-2,3,6-trimethylcyclohex-2-enone(6)、3-(4-Methylphenoxy)propanoic acid(7)。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除实验结果显示, 化合物 1~5 均未表现出抗氧化活性。酶联免疫吸附试验(ELISA)结果显示, 化合物 1~5 对脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 细胞释放的炎症因子白细胞介素-6(IL-6)有一定的抑制作用。结论: 化合物 1、3、4 和 6 首次从老鼠簕内生真菌*Diaporthe pseudomagiferae* 中分离得到, 化合物 1~5 具有一定的抗炎活性, 为进一步探索相关活性物质的抗炎机制奠定基础。

关键词 老鼠簕; 内生真菌; 化学成分; 抗氧化活性; 抗炎活性

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)07-1035-07

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.07.013

Isolation and identification of polyketides from the endophytic fungus *Diaporthe pseudomagiferae* derived from *Acanthus ilicifolius* L. and studies on their anti-oxidant and anti-inflammatory activities *in vitro*

PAN Yuying¹, WEI Xia¹, LIU Yanying¹, XING Shangping¹, PAN Bo², QIN Qiyun², MA Xiaolin¹, DAI Ziteng¹, GUO Hongwei^{1,3}, ZHU Dan^{1,3}. (1. Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Research Institute of Forestry Science, Nanning 530002, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Bioactive Molecules Research and Evaluation, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To investigate the isolation and purification of the polyketide compounds and their anti-oxidant and anti-inflammatory activities in the endophytic fungus *Diaporthe pseudomagiferae* from *Acanthus ilicifolius* L. **Methods:** The compounds were separated and purified by column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, and high-performance liquid chromatography, and the structures of compounds were analyzed by combining with comprehensive spectral techniques such as high resolution mass spectra (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The anti- inflammatory and anti- oxidant activities of some pure compounds were evaluated. **Results:** A total of seven polyketides were isolated from rice fermentation products of *Diaporthe pseudomagiferae* and identified as [(8-Methyl-9-oxabicyclo [4.2.1] nona-2,4-dien-7-yl) - (5-oxo-2H-furan-2-yl) meth-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 82160734); 广西重点研发计划项目(No. 桂科 AB21196048); 中央财政林草科技推广示范项目(No. (2023)TG17 号); 广西中药材品质创新研究团队(No. GZKJ2305); 广西医科大学高水平创新团队及杏湖学者计划

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

[收稿日期] 2024-06-18

yl] acetate (1), 2,3-Dihydromycoepoxydiene (2), Dothiorelone A (3), Dothiorelone B (4), Cytosporone B (5), 5,6-dihydroxy-2,3,6-trimethylcyclohex-2-enone (6), 3-(4-Methylphenoxy) propanoic acid (7). The free radical scavenging experiment of 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) showed that compounds 1-5 did not exhibit anti-oxidant activity. The results of enzymed-linked immunosorbent assay (ELISA) showed that compounds 1-5 had inhibitory effects on interleukin-6 (IL-6) release from RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS). **Conclusion:** Compounds 1, 3, 4, and 6 have been isolated from the endophytic fungus *Diaporthe pseudomagiferae* from *Acanthus ilicifolius* L. for the first time. Compounds 1-5 exhibit certain anti-inflammatory activity, which lays the foundation for further exploring the anti-inflammatory mechanisms of relevant active substances.

Keywords *Acanthus ilicifolius* L.; endophytic fungus; chemical composition; anti-oxidant activity; anti-inflammatory activity

红树林生态系统是海洋中一种独特的生态系统,为各种生物提供了丰富的营养资源。其中,与红树林密切相关的内生真菌构成了一个庞大的生态群体,其次级代谢产物种类繁多,主要包括聚酮类、萜类和生物碱类等。这些内生真菌逐渐成为天然活性产物的重要来源^[1-2]。老鼠簕(*Acanthus ilicifolius* L.)是爵床科海洋红树植物,广泛分布于热带和亚热带地区。研究表明,老鼠簕具有抗炎抑菌、护肝镇痛等药理作用,常被用治疗急慢性肝炎、哮喘咳嗽、恶性肿瘤等疾病,在乙肝治疗中尤为有效^[3-4]。内生真菌与其宿主之间密切相关,通常会产生结构类型丰富、药理活性强的天然产物。这些活性产物对于新药研发具有重要意义,值得进一步研究和深入挖掘。

本课题组长期从事海洋天然产物的研究,对多种微生物的次生代谢产物进行挖掘,从中分离并鉴

定了70多个化合物,包括20个吲哚生物碱及其杂合类化合物^[5-7]。本研究对分离得到的红树植物老鼠簕内生真菌 *Diaporthe pseudomagiferae* 进行化学成分研究,从该菌的大米培养基发酵提取物的乙酸乙酯部分中共分离得到7个聚酮类化合物(图1),综合采用高分辨质谱、核磁共振波谱技术等方法对分离得到的聚酮类化合物进行结构鉴定,确定其结构分别为[(8-methyl-9-oxabicyclo [4.2.1] nona-2,4-dien-7-yl)-(5-oxo-2H-furan-2-yl)methyl] acetate(1)、2,3-Dihydromycoepoxydiene (2)、Dothiorelone A (3)、Dothiorelone B (4)、Cytosporone B (5)、5,6-dihydroxy-2,3,6-trimethylcyclohex-2-enone (6)、3-(4-Methylphenoxy)propanoic acid(7);体外抗炎和抗氧化活性实验结果显示,化合物1~5具有一定的抗炎活性,未显示出抗氧化活性。

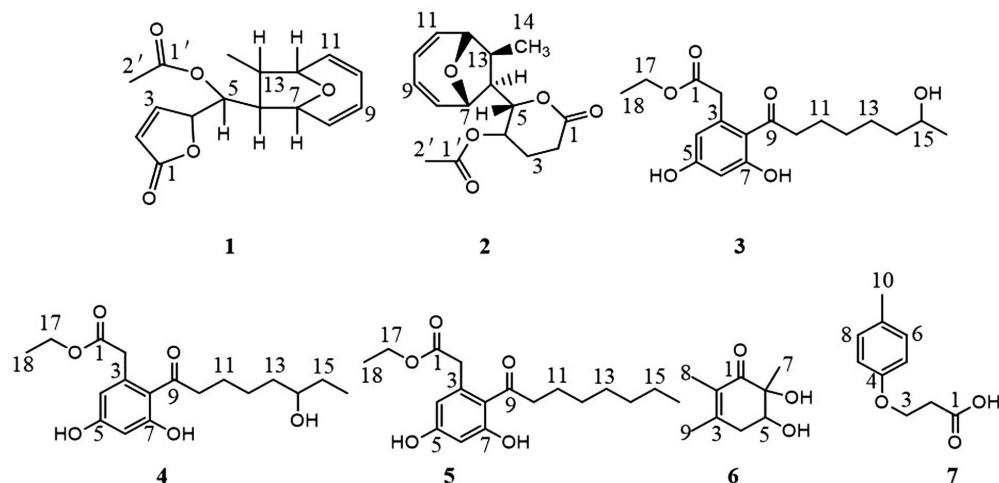


图1 老鼠簕内生真菌 *Diaporthe pseudomagiferae* 分离得到的化合物1~7结构

1 材料与方法

1.1 仪器 AVANCE NEO 600 MHz 核磁共振波谱仪购自美国 Bruker 公司;高分辨质谱仪购自美国 Waters 公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪、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;酶标仪购自瑞士 TECAN 公司;超净工作台购自新加坡 ESCO 科技有限公司;葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 材料 硅胶柱色谱(100~200 目、200~300 目,青岛海洋化工厂)、薄层层析硅胶板(GF₂₅₄ 型,青岛海洋化工厂)、细胞计数试剂盒(CCK-8)(大连美伦生物技术有限公司)、白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(上海泛柯实业有限公司)、脂多糖(LPS)(北京兰杰柯科技有限公司)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)粉末(上海博美生物科技有限公司)、氘代试剂(上海泰坦科技股份有限公司)。高效液相色谱所用甲醇及乙腈(赛默飞世尔科技公司)均为色谱级,高效液相色谱所用水为娃哈哈纯净水,其他化学试剂均为分析纯。

植物样品采自于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爵床科老鼠簕属植物老鼠簕 *Acanthus ilicifolius* L.,实验菌株分离于新鲜老鼠簕植物叶片组织,经形态学和分子生物学鉴定为间座壳属真菌 *Diaporthe pseudomagiferae*, Genbank 号 MW547406.1。RAW264.7 细胞来源于广西医科大学药学院,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。

PDB 培养基:200 g 土豆洗净去皮,切条,加入 1 000 mL 蒸馏水煮沸直至可用玻璃棒轻松夹断,用 6 层纱布过滤,取滤液加热,加入 20 g 葡萄糖,然后加入适量蒸馏水至 1 000 mL。大米固体培养基:100 g 大米,150 mL 蒸馏水浸泡 6 h,无菌封口膜封口,放入高压灭菌锅在 121 ℃ 灭菌 30 min,放凉备用,共计发酵 220 瓶,共配置大米培养基 22 kg。

1.3 菌株发酵 取少量内生真菌 *Diaporthe pseudomagiferae* 菌丝转移至新鲜配好的 PDB 液体培养基,于 180 r/min 恒温振荡培养摇床中、28 ℃ 条件下振摇培养 7 d,获得种子液。在超净工作台中用移液枪吸取 5 mL 种子液转移到已灭菌完成放凉的大米培养

基(每 250 mL 大米培养基中接种 5 mL 种子液),28 ℃ 室温条件下静置发酵培养 49 d。

1.4 提取与分离 菌株发酵完成后,使用等体积乙酸乙酯浸提 3 次发酵产物,收集完毕后进行分液萃取,减压浓缩挥干后获得 13.27 g 乙酸乙酯粗提物。粗提物用正相硅胶柱(200~300 目)以石油醚—甲醇为洗脱剂进行分离,得到两个粗流分—甲醇相流分(10.05 g)和石油醚相流分(0.84 g)。取甲醇相流分经正相硅胶柱色谱(200~300 目)以二氯甲烷:甲醇(90:10~10:90)进行梯度洗脱,通过薄层色谱结合高效液相色谱进行合并分析,最终得到 5 个组分(Fr.1~Fr.5)。

取 Fr.1 组分(2 369 mg)使用小一级的正相硅胶柱(100~200 目)进行细分,以环己烷:乙酸乙酯(90:10~0:1)进行梯度洗脱,采用薄层色谱分析,合并相同流份,最终获得 6 个组分(Fr.1.1~Fr.1.6)。取 Fr.1.2 组分(67.5 mg)经半制备高效液相色谱(乙腈:水=35:65,流速为 2 mL/min)进行纯化得到化合物 7(λ =222 nm、276 nm, t_r =15 min, 9.21 mg)。

Fr.1.4 组分(1 400 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(洗脱剂为环己烷:二氯甲烷:甲醇=2:2:1)进行分离,得到 8 个组分(Fr.1.4.1~Fr.1.4.8)。取 Fr.1.4.4 组分经半制备高效液相色谱(流动相:甲醇—水,体积比 30:70→100:0)进行梯度洗脱,最终得到 11 个亚组分(Fr.1.4.4.1~Fr.1.4.4.11)。Fr.1.4.4.6 组分经半制备高效液相色谱(甲醇:水=40:60,流速为 2 mL/min)进一步纯化,制备得到化合物 1(λ =254 nm、280 nm, t_r =38 min, 2.50 mg),化合物 2(λ =254 nm、280 nm, t_r =30 min, 1.71 mg);Fr.1.4.4.4 组分经半制备高效液相色谱(甲醇:水=15:85,流速为 2 mL/min)纯化,制备得到化合物 6(λ =210 nm、280 nm, t_r =48 min, 4.09 mg);Fr.1.4.4.8 组分经半制备高效液相色谱(甲醇:水=45:55,流速为 2 mL/min)进行纯化,制备得到化合物 3(λ =254 nm, t_r =25 min, 7.24 mg),化合物 4(λ =254 nm, t_r =27 min, 7.02 mg);Fr.1.4.4.11 组分经半制备高效液相色谱(流动相:甲醇—水,体积比 40:60→100:0)进行分离,纯化得到化合物 5(λ =220 nm、270 nm、300 nm, t_r =21 min, 4.22 mg)。

1.5 体外抗氧化活性测试 采用 DPPH 法考察化合物清除 DPPH 自由基的能力,从而评价化合物的抗氧化活性。根据文献[8-9]中的实验方法,适量无水乙醇配制成相应浓度 DPPH 溶液,维生素 C(VC)

作为阳性对照组,无水乙醇为阴性对照组,样品无水乙醇溶液(不另加DPPH溶液)为样品背景组。用酶标仪测定517 nm波长下各孔的吸光度(OD)值,所有实验均重复3次。按照公式计算出各组的DPPH自由基清除率:DPPH自由基清除率=[1-(OD_{药物}-OD_{空白孔})/OD_{阴性对照孔}]×100。

1.6 体外抗炎活性测试 将化合物用适量二甲基亚砜(DMSO)溶解成化合物母液,样品使用为0.22 μm微孔滤膜进行过滤。实验时用细胞培养基进行逐步稀释成所需的药物浓度(保证最终DMSO在培养液中的含量低于0.1%)。CCK-8法检测化合物对RAW264.7细胞的细胞毒活性^[10-11]。细胞存活率>80%即认为药物无明显细胞毒作用,选定化合物对RAW264.7最大的无毒药物浓度。LPS是细菌细胞膜的组成成分之一,作为内毒素常用于激活巨噬细胞分泌多种炎性介质,因此体外抗炎实验使用LPS作为巨噬细胞产生炎症因子及相关炎症介质的诱导激活剂^[12-13]。

根据选定的药物浓度,采用ELISA法测定化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症细胞因子IL-6含量的影响^[14]。将RAW264.7细胞在含有10%胎牛血清、1%双抗的DMEM完全培养基下进行培养,取对数生长期的RAW264.7细胞按照1×10⁴个/孔的细胞密度均匀接种于96孔板中,于37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养。培养24 h后去除原培养基,空白对照组仅用细胞培养基孵育RAW264.7细胞,药物组、LPS组加入含有1 μg/mL LPS的细胞培养基,药物组再加入相应浓度化合物,处理24 h,根据ELISA检测试剂盒说明书步骤测定IL-6含量。用酶标仪检测450 nm波长下各孔的OD值。

1.7 统计学方法 实验数据采用Graphpad Prism 8软件进行结果分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。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:淡黄色晶体,HRESIMS *m/z*:313.1077[M+Na]⁺,分子式为C₁₆H₁₈O₅,分子中含有8个不饱和度。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ_H 7.10 (1H, dd, *J*=7.0, 6.0 Hz, H-2), 6.20 (1H, dd, *J*=7.0, 6.8 Hz, H-3), 6.12 (1H, dd, *J*=11.4, 4.6 Hz, H-9), 6.05 (1H, dd, *J*=7.0, 6.8 Hz, H-11), 5.99

(1H, d, *J*=11.4 Hz, H-8), 5.89 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-10), 5.22 (1H, m, H-4), 4.68 (1H, dd, *J*=11.4, 4.6 Hz, H-7), 4.41 (1H, t, *J*=6.2 Hz, H-5), 4.30 (1H, m, H-12), 2.98 (1H, m, H-6), 2.93 (1H, m, H-13), 2.00 (3H, s, H-2'), 1.12 (3H, d, *J*=7.4 Hz, H-14); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ_C 171.37 (C, C-1'), 164.62 (C, C-1), 142.56 (C, C-2), 138.50 (CH, C-9), 138.46 (CH, C-11), 127.38 (CH, C-10), 125.54 (CH, C-8), 125.20 (CH, C-3), 87.86 (CH, C-12), 79.00 (CH, C-7), 77.15 (CH, C-5), 64.65 (CH, C-4), 54.19 (CH, C-6), 51.31 (CH, C-13), 20.63 (CH₃, C-2'), 14.35 (CH₃, C-14)。核磁波谱数据与文献[15]对比一致,故鉴定化合物1为[(8-methyl-9-oxabicyclo [4.2.1] nona-2,4-dien-7-yl)-(5-oxo-2H-furan-2-yl)methyl] acetate。

化合物2:淡黄色针晶,根据HRESIMS *m/z*:315.1165 [M+Na]⁺,分子式为C₁₆H₂₀O₅,分子中含有7个不饱和度。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ_H 6.27 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-8), 6.07 (2H, m, H-11), 5.91 (1H, t, *J*=8.0 Hz, H-9), 5.89 (1H, t, *J*=8.0 Hz, H-10), 5.18 (1H, d, *J*=10.6 Hz, H-5), 4.71 (1H, d, *J*=7.2 Hz, H-4), 4.49 (1H, d, *J*=6.2 Hz, H-7), 4.22 (1H, d, *J*=3.4 Hz, H-12), 2.95 (1H, m, H-13), 2.82 (1H, m, H-6), 2.72 (1H, m, H-2b), 2.54 (1H, m, H-2a), 2.43 (1H, m, H-3b), 2.31 (1H, m, H-3a), 2.11 (3H, s, H-2'), 0.97 (3H, d, *J*=7.2 Hz, H-14); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ_C 179.30 (C, C-1), 172.22 (C, C-1'), 139.09 (CH, C-8), 138.05 (CH₂, C-11), 127.12 (CH, C-9), 125.89 (CH, C-10), 87.83 (CH, C-12), 82.38 (CH, C-4), 78.13 (CH, C-7), 73.85 (CH, C-5), 53.90 (CH, C-13), 52.77 (CH, C-6), 29.00 (CH₂, C-2), 24.90 (CH₂, C-3), 20.90 (CH₃, C-2'), 14.75 (CH₃, C-14)。结合碳谱、氢谱及文献检索,确认化合物2为2,3-Dihydro-mycoepoxydiene,以上数据与文献[16]报道基本一致。

化合物3:淡黄色针晶,HRESIMS 显示准分子离子峰为339.1807[M+H]⁺,可知分子式为C₁₈H₂₆O₆,不饱和度为6。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ_H 6.23 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-6), 6.17 (1H, d, *J*=2.3 Hz, H-4), 4.09 (2H, q, *J*=7.1 Hz, H-17), 3.68 (1H, h, *J*=6.1 Hz, H-15), 3.55 (2H, s), 2.89 (1H, t, *J*=7.5 Hz, H-10), 1.60 (3H, p, *J*=7.5 Hz, H-11), 1.25~1.46 (6H, m, H-12,13,14), 1.22 (3H, t, *J*=7.1 Hz, H-18), 1.12 (3H, d, *J*=6.2 Hz, H-16); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ_C

208.95(C, C-9), 161.58(C, C-5), 159.94(C, C-7), 137.05(C, C-3), 121.12(C, C-8), 111.85(CH, C-4), 102.79(CH, C-6), 68.54(CH, C-15), 61.84(CH₂, C-17), 45.14(CH₂, C-10), 40.56(CH₂, C-2), 40.09(CH₂, C-14), 30.57(CH₂, C-13), 26.75(CH₂, C-12), 25.55(CH₂, C-11), 23.47(CH₃, C-16), 14.51(CH₃, C-18)。结合碳谱、氢谱及文献数据比对,确认化合物3为Dothiorelone A,以上数据与文献[17]报道基本一致。

化合物4:淡黄色针晶;HRESIMS *m/z*: 339.1808 [M + H]⁺,其分子式为C₁₈H₂₆O₆。¹H NMR(600 MHz, CD₃OD) δ _H 6.26(1H, d, *J*=2.3 Hz, H-6), 6.19(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-4), 4.11(2H, q, *J*=7.1 Hz, H-17), 3.58(2H, s, H-2), 3.44(1H, tt, *J*=7.6, 4.2 Hz, H-14), 2.84~2.95(2H, m, H-10), 1.57~1.68(2H, m, H-11), 1.33~1.49(6H, m, H-12,13,14), 1.24(3H, t, *J*=7.1 Hz, H-18), 0.93(2H, t, *J*=7.4 Hz, H-16);¹³C NMR(150 MHz, CD₃OD) δ _C 208.87(C, C-9), 173.59(C, C-1), 161.52(C, C-5), 159.94(C, C-7), 137.06(C, C-3), 121.16(C, C-8), 111.83(CH, C-4), 102.76(CH, C-6), 73.77(CH, C-14), 61.84(CH₂, C-17), 45.19(CH₂, C-10), 40.56(CH₂, C-2), 37.77(CH₂, C-13), 30.99(CH₂, C-12), 26.61(CH₂, C-15), 25.66(CH₂, C-11), 14.51(CH₃, C-18), 10.35(CH₃, C-16)。以上核磁波谱数据与文献[17]报道对比基本一致,故鉴定化合物4为Dothiorelone B。

化合物5:淡黄色晶体;根据其高分辨质谱HRESIMS *m/z*: 345.1711[M + Na]⁺,其分子式为C₁₈H₂₆O₅,其不饱和度为6。¹H NMR(600 MHz, CD₃OD) δ _H 6.21(1H, d, *J*=2.3 Hz, H-4), 6.14(1H, d, *J*=2.3 Hz, H-6), 4.06(2H, q, *J*=7.1 Hz, H-18), 3.53(2H, s, H-2), 2.85(2H, t, *J*=7.5 Hz, H-10), 1.56(3H, p, *J*=7.1 Hz, H-11), 1.23~1.28(12H, m, H-12,13,14,15), 1.20(3H, t, *J*=7.1 Hz, H-18), 0.85(4H, t, *J*=6.9 Hz, H-16);¹³C NMR(150 MHz, CD₃OD) δ _C 209.05(C, C-9), 173.58(C, C-1), 161.35(C, C-5), 159.83(C, C-7), 137.02(C, C-3), 121.24(C, C-8), 111.72(CH, C-6), 102.70(CH, C-4), 61.84(CH₂, C-17), 45.20(CH₂, C-10), 40.52(CH₂, C-2), 32.94(CH₂, C-14), 30.50(CH₂, C-12), 30.31(CH₂, C-13), 25.57(CH₂, C-11), 23.71(CH₂, C-15), 14.51(CH₃, C-18), 14.44(CH₃, C-16)。结合碳谱、氢谱及文献检索,确认化合物5为Cytosporone B,以上数据与文献[18]

报道基本一致。

化合物6:无色油状;HRESIMS *m/z*: 209.0601 [M + K]⁺,推测其分子式为C₉H₁₄O₃,不饱和度为3。¹H NMR(600 MHz, CD₃OD) δ _H 3.82(1H, dd, H-5), 2.60(1H, dd, H-4a), 2.39(1H, dd, H-4b), 1.95(3H, s, H-9), 1.75(3H, s, H-8), 1.15(3H, s, H-7);¹³C NMR(150 MHz, CD₃OD) δ _C 202.75(C, C-1), 153.85(C, C-3), 129.12(C, C-2), 77.80(C, C-6), 73.44(CH, C-5), 39.64(CH₂, C-4), 20.84(CH₃, C-9), 17.47(CH₃, C-7), 11.02(CH₃, C-8)。结合碳谱、氢谱及文献检索,确认化合物6为5,6-dihydroxy-2,3,6-trimethyl cyclohex-2-enone,以上数据与文献[19]报道基本一致。

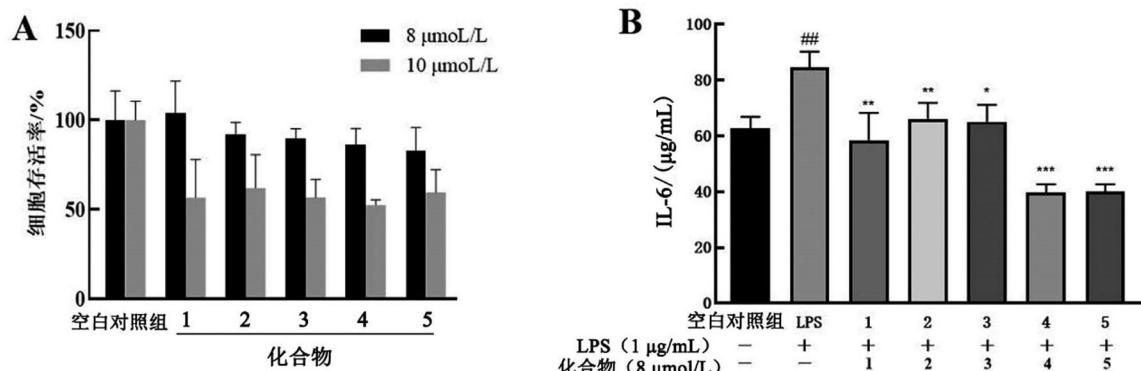
化合物7:浅黄色油状,HRESIMS 显示其准分子离子峰为179.0661[M-H]⁻,结合NMR数据,可知其分子式为C₁₀H₁₂O₃,不饱和度为5。¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) δ _H 7.07(2H, d, *J*=8.4 Hz, H-6,8), 6.77(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-5,9), 4.23(2H, t, *J*=7.1 Hz, H-3), 2.86(2H, t, *J*=7.1 Hz, H-2), 2.04(3H, s, H-10);¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃) δ _C 171.45(C, C-1), 154.51(C, C-4), 130.16(C, C-7), 129.91(CH, C-6), 115.49(CH, C-5), 65.40(CH₂, C-3), 34.32(CH₂, C-2), 21.15(CH₃, C-10)。结合碳谱、氢谱及文献检索,确认化合物7为3-(4-Methylphenoxy)propanoic acid,以上数据与文献[20]报道基本一致。

2.2 化合物体外抗氧化活性测试结果 DPPH自由基清除法测定结果如表1所示,化合物1~5在50 μmoL/L的药物浓度下未显示出显著的抗氧化活性。

表1 化合物1~5的抗氧化活性

化合物序号	DPPH自由基清除率/%	$\bar{x} \pm s$
化合物1	46.54±3.49	
化合物2	40.82±1.01	
化合物3	35.07±4.65	
化合物4	36.08±9.79	
化合物5	31.86±7.19	
VC	95.52±1.26	

2.3 化合物体外抗炎活性结果 CCK-8实验结果显示:化合物1~5在8 μmoL/L浓度下,RAW264.7细胞存活率均>80%,选定该药物浓度进行后续抗炎活性实验,见图2A。与LPS组比较,8 μmoL/L化合物1~5均可抑制RAW264.7细胞分泌IL-6(均P<0.05),见图2B。



A: 化合物1~5($8 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$)对RAW264.7细胞存活率的影响; B: 化合物1~5对LPS诱导的RAW264.7细胞分泌的炎症因子IL-6含量的影响; 1~5: 化合物1~5实验组; $n=3$; 与空白对照组比较, $^{**}P<0.001$; 与LPS组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图2 化合物1~5对RAW264.7细胞毒性及其对LPS诱导的细胞分泌炎症因子含量的影响

3 讨 论

过量的自由基可引起机体产生氧化应激状态,是造成人体脏器损伤和病变的一个重要原因。抗氧化剂主要是通过清除体内多余的活性氧自由基而起到抗氧化作用的药物,从而有效减少氧化作用和自由基大量积聚带来的相关不良反应。但随着时间的推移,人工制备形成的抗氧化剂对人体健康的危害也逐渐显现出来^[21-22],而天然抗氧化剂因其良好的药理活性和较少的副作用逐渐成为当前的研究热点。目前体外筛选抗氧化活性物质以化学分析测定的方法为主,如DPPH自由基清除率法。本研究运用DPPH法对分离得到的化合物1~5进行抗氧化活性分析,结果显示,均未表现出显著的抗氧化活性。

炎症是机体在应激状态下发生的一种非特异性免疫应答。炎症状态下,各种免疫细胞及炎性因子共同参与了炎症反应的启动与消退等多个生理活动环节,巨噬细胞是最重要的免疫细胞,当受到外部刺激的情况下,巨噬细胞优良的可塑性及功能极化作用可使其在多种表型中灵活转化,被活化后释放出各种炎症相关介质,从而分泌出多种与炎症发生、消退等进程相关的细胞因子^[23],如IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、环氧合酶-2(COX-2)等。本课题组对老鼠簕来源的内生真菌*Diaporthe pseudomagiferae*中分离得到的化合物进行抗炎活性研究,结果显示,化合物1~5可在细胞水平上降低相关炎症因子的数量而起到一定的抗炎的作用,这可能与化合物能降低炎症因子的浓度从而一定程度上降低了炎症反应的发生率有关。

红树林来源微生物是活性天然产物的重要来源,也是药物先导化合物发现的巨大宝库。天然来源的聚酮类化合物是天然产物中的一大种类,主要是由植物、微生物产生的次级代谢产物,基于其广泛的生物学活性,独特的结构及良好的可塑性,部分活性优良的聚酮类化合物已被临床广泛运用,如红霉素,洛伐他汀等^[24-25]。本研究从老鼠簕来源的内生真菌*Diaporthe pseudomagiferae*发酵产物中分离鉴定出7个聚酮类化合物,包括2个具有9-oxabiacyclo[4.2.1]nona-2,4-diene结构的环氧二烯类化合物(1~2),5个聚酮其他来源化合物(3~7)。据文献调研,化合物6对SF-268、MCF-7和HepG-2等肿瘤细胞株未表现出明显的细胞毒活性^[19];化合物7对乙酰胆碱酯酶活性表现出较强的抑制活性,具有新的抗阿尔茨海默病药物的开发潜力^[26],且对MCF-7具有微弱的细胞毒活性^[27]。本课题的研究不仅丰富了老鼠簕内生真菌来源的天然产物的多样性,也为从老鼠簕内生真菌中寻找得到结构丰富、药理活性更强的天然产物奠定物质基础。

参 考 文 献:

- CHEN S H, CAI R L, LIU Z M, et al. Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: source, chemistry and bioactivities[J]. Natural product reports, 2022, 39(3): 560-595.
- LIU Z, ZHAO J Y, SUN S F, et al. Fungi: outstanding source of novel chemical scaffolds[J]. Journal of asian natural products research, 2020, 22(2): 99-120.
- 李元跃, 刘韶松, 高苏蕊, 等. 红树植物老鼠簕的化学成分和药理活性研究进展[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2021, 26(6): 489-500.

- [4] 吴军,李庆欣,黄建设,等.药用红树植物老鼠簕的化学成分研究进展[J].中草药,2003,34(2):104-105.
- [5] WEI X, SU J C, HU J C, et al. Probing indole diketopiperazine-based hybrids as environmental-induced products from *Aspergillus* sp. EGF 15-0-3[J]. Organic letters, 2022, 24(1): 158-163.
- [6] WEI X, WANG F T, FAN H, et al. Pyranodipyran derivatives with tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 inhibitory activities and fluorescent properties from *Aspergillus* sp. EGF 15-0-3[J]. Mar drugs, 2022, 20(3): 211.
- [7] WEI X, FENG C, WANG S Y, et al. New indole diketopiperazine alkaloids from soft coral-associated epiphytic fungus *Aspergillus* sp. EGF 15-0-3[J]. Chemistry & biodiversity, 2020, 17(5): e2000106.
- [8] HAMZAH T N T, LEE S Y, HIDAYAT A, et al. Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9(1): 1707.
- [9] JING L L, MA H P, FAN P C, et al. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells[J]. BMC Complementary and alternative medicine, 2015, 15(1): 287.
- [10] 熊建文,肖化,张镇西. MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较[J].激光生物学报,2007,16(5):559-562.
- [11] 魏婕. 荨蕘内生真菌代谢产物生物活性研究及代谢组学分析[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2020.
- [12] WU J N, LIU Z Y, SU J, et al. Anti-inflammatory activity of 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one isolated from *Hippocampus trimaculatus* leach via inhibiting iNOS, TNF- α , and IL-1 β of LPS induced RAW 264.7 macrophage cells [J]. Food & function, 2017, 8(2): 788-795.
- [13] HUANG G J, DENG J S, LIAO J C, et al. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2012, 60(7): 1673-1681.
- [14] KARINCHAI J, BUDLUANG P, TEMVIRIYANUKUL P, et al. Bioassay-guided study of the anti-inflammatory effect of *Anoectochilus burmannicus* ethanolic extract in RAW 264.7 cells[J]. Journal of ethnopharmacology, 2021, 280(1): 114452.
- [15] CHEN G, LIN Y, VRIJMOED L L P, et al. A new isochroman from the marine endophytic fungus 1893#[J]. Chemistry of natural compounds, 2006, 42(2): 138-141.
- [16] SOMMART U, RUKACHAISIRIKUL V, SUKPONDMA Y, et al. A cyclohexenone derivative from Diaporthaceous fungus PSU-H2[J]. Archives of pharmacal research, 2009, 32(9): 1227-1231.
- [17] QING W T, PEI H F, JIAN C N, et al. Metabolites produced by an endophytic *Phomopsis* sp. and anti-TMV activity [J]. Molecules, 2017, 22(1):2073.
- [18] BRADY S F, WAGENAAR M M, SINGH M P, et al. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus[J]. Organic letters, 2000, 2(25): 4043-4046.
- [19] 陈闪冲,陈玉婵,李赛妮,等.深海真菌*Phomopsis tersa*的次级代谢产物及其细胞毒活性研究[J].中国海洋药物,2019,38(6): 8-14.
- [20] 秦玲玲,胡瀚文,冯丹,等.美花筋骨草化学成分研究[J].中药材,2018,41(9): 2101-2104.
- [21] TANG J, XIONG L D, SHU X H, et al. Antioxidant effects of bioactive compounds isolated from cordyceps and their protective effects against UVB-irradiated HaCaT cells[J]. Journal of cosmetic dermatology, 2019, 18(6): 1899-1906.
- [22] GULCIN İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview[J]. Archives of toxicology, 2020, 94(3): 651-715.
- [23] 罗福龙,李文举,吴小会,等.连翘提取物通过调节巨噬细胞凋亡和极化抑制LPS诱导的炎症作用[J].中国比较医学杂志,2022,32(7): 18-26.
- [24] 汪淑文.聚酮类化合物红霉素及抗霉素的碳骨架改造研究[D].武汉:武汉大学,2017.
- [25] 庞子萱,吴季恒.聚酮类化合物研究进展[J].食品与发酵工业,2022,48(6): 316-326.
- [26] ZOU M J, WANG R K, YIN Q M, et al. Bioassay-guided isolation and identification of anti-Alzheimer's active compounds from *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames[J]. Medicinal chemistry research, 2021, 30: 1849-1855.
- [27] 梁法亮,李冬利,陈玉婵,等.土茯苓内生芒果球座菌的次级代谢产物及其抗肿瘤活性研究[J].中草药,2012,43(5): 856-860.

本文引用格式:

潘钰莹,韦霞,刘妍颖,等.老鼠簕来源内生真菌*Diaporthe pseudomagiferae*的聚酮类化合物分离鉴定及体外抗氧化、抗炎活性研究[J].广西医科大学学报,2024,41(7): 1035-1041. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.07.013

PAN Y Y, WEI X, LIU Y Y, et al. Isolation and identification of polyketides from the endophytic fungus *Diaporthe pseudomagiferae* derived from *Acanthus ilicifolius* L. and studies on their anti-oxidant and anti-inflammatory activities *in vitro*[J]. Journal of Guangxi medical university, 2024, 41(7): 1035-1041. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r. 2024.07.013