

一株红树内生真菌 *Nigrospora* sp. 中次级代谢产物及其细胞毒活性研究*

魏美燕¹, 李尚德¹, 袁宁宁², 梁丽萍¹, 佘志刚³, 林永成³

(1. 广东医学院药学院, 广东 东莞 523808; 2. 广州工程技术职业学院, 广东 广州 510075;
3. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 对采自湛江红树林内生真菌 *Nigrospora* sp. 的次级代谢产物进行了首次研究。利用硅胶柱层析、制备薄层层析和重结晶等方法, 从该菌培养液的乙酸乙酯相中分离得到 3 个聚酮类次级代谢产物, 运用现代波谱技术鉴定其结构分别为 Griseofulvin (**1**), Vermixocin B (**2**) 和 Tenellic acid A (**1**)。化合物 **1** 的立体结构还通过 X 射线单晶衍射进一步得以确定。体外细胞毒活性测试表明, 化合物 **1** 对人口腔表皮样癌(鳞癌)细胞 KB, 人口腔鳞癌多药耐药细胞 KBV200, 和人肺腺癌细胞 A549 的细胞毒活性 IC₅₀ 分别为 8.23, 9.10 和 14.26 μmol/L。

关键词: 红树林内生真菌; 次级代谢产物; 细胞毒活性; 单晶 X-ray

中图分类号: O629 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2012)02-0059-04

Research on the Secondary Metabolites and Their Cytotoxic Activity of Mangrove Endophytic Fungus *Nigrospora* sp. from the South China Sea

WEI Meiyang¹, LI Shangde¹, YUAN Ningning², LIANG Liping¹, SHE Zhigang³, LIN Yongcheng³

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;

2. Guangzhou Institute of Technology, Guangzhou 510075, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Research on the secondary metabolites of the mangrove endophytic fungus *Nigrospora* sp. from the South China Sea was reported. Three secondary metabolites were isolated from the ethyl acetate extract of the fermentation by silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography and recrystallography. Their structures were identified by comprehensive spectroscopic methods as Griseofulvin (**1**), Vermixocin B (**2**), Tenellic acid A (**3**). The absolute configuration of compound **1** was further confirmed by single-crystal X-ray analysis. The cytotoxic activity of compound **1** *in vitro* was also evaluated, and compound **1** showed medium activity against KB, KBV200, and A549 cell lines with IC₅₀ of 8.23, 9.10 and 14.26 μmol/L, respectively.

Key words: mangrove endophytic fungus; secondary metabolites; cytotoxic activity; X-ray diffraction

红树林为分布于热带亚热带潮间带的木本植物群落, 是海洋环境中特有的高等植物。由于红树林具有独特的生理生态, 使其具有独特的代谢过程, 代谢产物和独特的共生菌, 这些共生菌同样能产生极其丰富的新的活性次级代谢产物, 红树林内生真

菌已经被证明是活性海洋天然产物的重要来源^[1]。本研究小组在开展红树林内生真菌活性物质研究的近十几年来, 已经对中国南海红树林内生真菌进行了系统的研究, 从中分离获得了一系列结构新颖的或药理活性良好的海洋天然化合物^[2-8]。

* 收稿日期: 2011-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20972197); 广东医学院面上基金资助项目(M2010002); 海洋药物教育部重点实验室开放基金资助项目(KLMD(OUC)2008-1)

作者简介: 魏美燕(1977年生), 女, 讲师; 通讯作者: 李尚德; E-mail: lishangde@gdmc.edu.cn

海洋黑孢属 *Nigrospora* sp. 真菌是产生活性次级代谢产物的重要来源之一, 目前已经从中分离获得了一系列活性化合物。如, 从 *Nigrospora* sp. PSU-F5 发现的 Epoxydons and Pyrone 类化合物^[9], 从 *Nigrospora* sp. (strain No. 1403) 中获得的 griseofulvin 类衍生物^[10], 从 *Nigrospora* sp. YB-141 中发现的抗真菌活性化合物 solanapyrones^[11], 以及从 *Nigrospora oryzae* 中分离获得的抗细菌活性化合物 Nigrosporins A and B^[12]。

在研究红树内生真菌次级代谢产物中, 对一株湛江红树内生真菌 *Nigrospora* sp. 在实验室进行人工培养发酵 150 L。本文首次研究了该菌的次级代谢产物, 从培养液的乙酸乙酯提取物中分离得到 3 个单体化合物, 通过波谱解析以及文献对照, 分别鉴定为 Griseofulvin (**1**), Vermixocin B (**2**), Tenelic acid A (**3**), 见图 1。化合物 **1** 的结构还通过 X 射线单晶衍射进一步确定其绝对构型, 见图 2。体外细胞毒活性测试表明, 化合物 **1** 具有中等的细胞毒活性, 对人口腔表皮样癌 (鳞癌) 细胞 KB, 人口腔鳞癌多药耐药细胞 KBV200, 和人肺腺癌细胞 A549 的细胞毒活性 IC₅₀ 分别为 8.23, 9.10, 和 14.26 $\mu\text{mol/L}$ 。

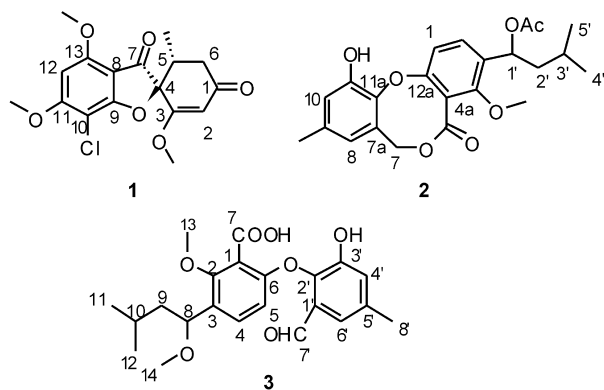


图 1 化合物 **1**, **2**, **3** 的结构式

Fig. 1 The structure of compounds **1**, **2**, **3**

1 实验部分

1.1 试剂与实验仪器

美国 Varian 公司 INOVA 300NB 超导核磁共振仪; 英国 VG 公司 ZAB-HS 质谱仪; 美国 Thermo 公司 LCQ DECA XP 质谱仪; 北京泰克仪器公司的 X-4 数字显示显微熔点测试仪; 德国 Bruker 公司 SMART 1000 CCD X-单晶衍射仪测定。所用试剂均为广州化学试剂厂生产, 化学纯溶剂经重蒸后使

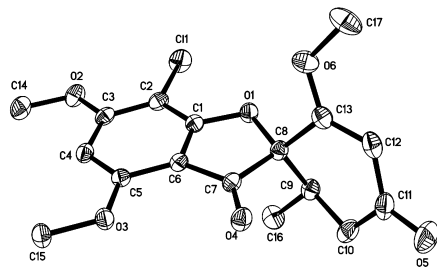


图 2 化合物 **1** 的单晶衍射结构图

Fig. 2 The single-crystal X-ray diffraction structure of compounds **1**

用。柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 200 ~ 300 目硅胶, 硅胶 H, 薄层硅胶 GF₂₅₄。

1.2 菌种及其保存条件

海洋真菌 *Nigrospora* sp. 从湛江红树林植物中分离得到, 菌种由中山大学化学与化学工程学院提供, 保存在 4℃ 下的玉米海水琼脂培养基中。

1.3 菌种发酵培养

采用悬浮培养方式: 发酵培养基 (*w*) 为葡萄糖 1.0%, 蛋白胨 0.2%, 酵母膏 0.1%, 粗海盐 0.25%, pH 7.0。500 mL 三角瓶, 内装培养液 300 mL, 经 121℃ (0.1 MPa) 高温灭菌 25 min 后在超净工作台上接种, 共接种 150 L, 28℃ 静置培养 30 d。

1.4 提取分离

发酵液用纱布过滤, 菌体和培养液分别收集, 培养液由 150 L 浓缩至 3 L 后, 用相同体积的乙酸乙酯提取。乙酸乙酯提取液浓缩后所得浸膏进行硅胶柱层析, 以石油醚—乙酸乙酯—甲醇梯度淋洗。收集各组份再经反复柱层析, 制备薄层层析和重结晶纯化后得到化合物 **1** (62.5 mg), **2** (30.6 mg), **3** (5.3 mg)。

1.5 细胞毒活性测定

化合物的细胞毒活性测定按照 MTT 法进行测定^[13]。

1.6 化合物的 X-射线单晶衍射测定

晶体的 X 射线衍射数据采用德国 Bruker 公司 SMART 1000 CCD X-单晶衍射仪测定, 以石墨单色化的 Mo-K α 辐射 ($\lambda = 0.071\ 073\ \text{nm}$) 在 294 (2) K 收集数据。在 $3.17^\circ < \theta < 27.54^\circ$ 范围内收集衍射点, 衍射强度数据应用经验吸收校正。结构用 Siemens SHELXTL97 程序计算, 以直接法解析, 以差值傅立叶合成法定出非氢原子坐标, 并以各向异性热参数用全矩阵最小二乘法对其进行修正。氢原子坐标由理论方法获得, 并参与结构因子计算。

2 化合物的实验数据

2.1 化合物的物理和波谱数据

化合物 (1): 白色固体, θ_{mp} 224 °C。FABMS m/z 353 $[M + 1]^+$, 355 $[M + 2 + 1]^+$ 。 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ_H : 6.11 (1H, s), 5.51 (1H, s), 4.02 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.01 (1H, dd, 16.2, 4.5), 2.44 (1H, m), 2.40 (1H, dd, 16.2, 4.5), 0.96 (3H, d, 6.6); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ_C : 196.9 (C), 192.4 (C), 170.7 (C), 169.5 (C), 164.6 (C), 157.7 (C), 105.5 (CH), 104.8 (C), 97.2 (C), 90.7 (C), 89.4 (CH), 57.0 (CH₃), 56.6 (CH₃), 56.3 (CH₃), 40.0 (CH₂), 36.5 (CH), 14.2 (CH₃)。单晶结构为四方晶系, 空间群为 P4(1), $a = 0.897\ 56(4)$ nm, $b = 0.897\ 56(4)$ nm, $c = 1.989\ 70(17)$ nm, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $C_{17}H_{16}ClO_6$, $Mr = 351.75$, $V = 1.602\ 93(17)$ nm³, $Z = 4$, $D_c = 1.458$ Mg/m³, $F(000) = 732$, $\mu = 0.269$ mm⁻¹, $R1 = 0.0353$, $wR2 = 0.0928$, 5360 个可观察衍射点 ($I > 2\sigma(I)$)。以上数据与文献 [14] 数据基本吻合, 确定化合物 (1) 为 Griseofulvin。

Vermixocin B (2): 无色油状, ESI-MS m/z : $[M - H]^-$ 413.2。 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ_H : 6.87 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-1), 7.44 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2), 5.10 (1H, brd, H-7), 5.01 (1H, d, $J = 14.2$ Hz, H-7), 6.37 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-8), 6.84 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-10), 4.02 (3H, s, 4-OCH₃), 2.23 (3H, s, 9-CH₃), 2.06 (3H, s, -OCOCH₃), 6.11 (1H, dd, $J = 9.6, 4.6$ Hz, H-1'), 1.76 (1H, ddd, $J = 14.2, 9.6, 5.5$ Hz, H-2'), 1.49 (1H, ddd, $J = 13.3, 8.2, 4.1$ Hz, H-2'), 1.63 (1H, m, H-3'), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-4'), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-5'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ_C : 117.8 (CH, C-1), 130.9 (CH, C-2), 134.4 (-C, C-3), 154.8 (-C, C-4), 69.2 (CH₂, C-7), 121.0 (CH, C-8), 135.3 (-C, C-9), 117.9 (CH, C-10), 147.5 (-C, C-11), 167.4 (-C, C-4a), 126.0 (-C, C-7a), 141.4 (-C, C-11a), 151.7 (-C, C-12a), 121.0 (-C, C-4a), 68.9 (CH, C-1'), 170.5 (-C, C-6'), 62.9 (CH₃, C-4-OCH₃), 45.5 (CH₂, C-2'), 25.1 (CH, C-3'), 23.3 (CH₃, C-4'), 22.1 (CH₃, C-5'), 21.4 (CH₃, 9-

CH₃), 21.0 (CH₃, C-7')。以上数据与文献 [15] 数据基本吻合, 确定化合物 (2) 为 Vermixocin B。

Tenellic acid A (3): 无色晶体, ESI-MS m/z : $[M - H]^-$ 401.3。 1H NMR (Acetone-d₆, 300 MHz) δ_H : 7.33 (d, 8.6, H-4), 6.49 (d, 8.6, H-5), 4.56 (dd, 9.1, 3.9, H-8), 1.61 (ddd, 14, 9.1, 5.2, H-9), 1.32 (ddd, 14, 8.6, 3.9, H-9), 1.78 (m, H-10), 0.94 (d, 6.6, H-11), 0.90 (d, 6.6, H-12), 3.93 (s, H-13), 3.14 (s, H-14), 7.17 (m, H-4'), 7.21 (m, H-6'), 10.2 (s, H-7'), 2.36 (s, H-8')。 ^{13}C NMR (Acetone-d₆, 75 MHz) δ_C : 119.5 (C-1), 156.8 (C-2), 131.8 (C-3), 129.8 (C-4), 111.5 (C-5), 156.1 (C-6), 167.6 (C-7), 76.0 (C-8), 47.8 (C-9), 25.6 (C-10), 23.7 (C-11), 22.2 (C-12), 63.2 (C-13), 56.7 (C-14), 130.8 (C-1'), 143.0 (C-2'), 151.2 (C-3'), 124.8 (C-4'), 137.8 (C-5'), 120.2 (C-6'), 189.8 (C-7'), 20.9 (C-8')。以上数据与文献 [16] 数据基本吻合, 确定化合物 (3) 为 Tenellic acid A

2.2 化合物的细胞毒活性

对化合物进行了细胞毒活性测试。结果表明, 化合物 1 具有中等的细胞毒活性, 对人口腔表皮样癌 (鳞癌) 细胞 KB, 人口腔鳞癌多药耐药细胞 KBV200 和人肺腺癌细胞 A549 的细胞毒活性 IC₅₀ 分别为 8.23, 9.10 和 14.26 μ mol/L。

3 结论

本文首次研究了一株红树内生真菌 *Nigrospora* sp. 的次级代谢产物。从该菌培养液的乙酸乙酯相中分离获得 3 个聚酮类化合物: Griseofulvin (1), Vermixocin B (2), 和 Tenellic acid A (3)。细胞毒活性测试发现化合物 1 具有中等强度的细胞毒活性。化合物 Griseofulvin 曾作为多种真菌的代谢产物报道过, 最近也有报道从 *Nigrospora* sp. 中发现。化合物 2 有报道从真菌 *Guignardia* sp. 和 *Penicillium simplicissimum* 中发现过, 化合物 3 曾作为真菌 *Dendrospora tenella* 的代谢产物报道过, 这两个化合物均为首次从真菌 *Nigrospora* sp. 中发现。红树林区具有丰富的内生微生物, 对红树内生微生物次级代谢产物进行研究, 从中筛选结构新颖的活性化合物, 可成为海洋药物开发以及药物先导化合物发现的基础和源泉。

参考文献:

- [1] BLUNT J W, COPP B R, MUNRO M H. G, et al. Marine natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(2): 196–268.
- [2] LI, H X, HUANG H B, SHAO C L, et al. Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala* [J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(5): 1230–1235.
- [3] SHAO C L, WANG C Y, WEI M Y, et al. Aspergilonones A and B, two benzylazaphilones with an unprecedented carbon skeleton from the gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21(2): 690–693.
- [4] WEI M Y, WANG C Y, LIU Q A, et al. Five sesquiterpenoids from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. isolated from a gorgonian *Dichotella gemmacea* [J]. *Mar. Drugs* 2010, 8: 941–949.
- [5] 魏美燕, 邵长伦, 谭倪, 等. 南海海洋真菌 *Penicillium* sp. (386#) 次级代谢产物再研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2010, 49(4): 77–80.
- [6] WEN L, CAI X L, XU F, et al. Three metabolites from the mangrove endophytic fungus *Sporothrix* sp. (#4335) from the South China Sea [J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2009, 74(3): 1093–1098.
- [7] SHAO C L, WANG C Y, WEI M Y, et al. Structure elucidation of two new xanthone derivatives from the marine fungus *Penicillium* sp. (ZZF 32#) from the South China Sea [J]. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2008, 46(11): 1066–1069.
- [8] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. Five unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea coast [J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2001, 66(19): 6252–6256.
- [9] KONGKIAT T, VATCHARIN R, YAO WAPA S, et al. Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5 [J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(8): 1323–1326.
- [10] XIA X K, LI Q, LI J, et al. Two new derivatives of griseofulvin from the mangrove endophytic fungus *Nigrospora* sp. (strain No. 1403) from *Kandelia candel* (L.) druce [J]. *Planta Medica*, 2011, 77(15): 1735–1738.
- [11] WU S H, CHEN Y W, SHAO S C, et al. Two new solanapyrone analogs from the endophytic fungus *Nigrospora* sp. YB-141 of *Azadirachta indica* [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2009, 6(1): 79–85.
- [12] TANAKA M, FUKUSHIMA T, TSUJINO Y, et al. Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61(11): 1848–1852.
- [13] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Meth*, 1983, 65: 55–63.
- [14] 姜广策, 林永成, 周世宁, 等. 中国南海红树林内生真菌 No. 1403 次级代谢物的研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2000, 39(6): 68–72.
- [15] XIA X K, LIU F, SHE Z G, et al. ^1H and ^{13}C NMR assignments for 6-demethylvermistatin and two penicillide derivatives from the mangrove fungus *Guignardia* sp. (No. 4382) from the South China Sea [J]. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2008, 46(7): 693–696.
- [16] OH H, KWON T O, GLOER J B, et al. Tenellic acids A-D: new bioactive diphenyl ether derivatives from the aquatic fungus *Dendrospora tenella* [J]. *Journal of Natural Products*, 1999, 62(4): 580–583.