

【生命与健康 / Life and Health】

两株海南红树植物内生真菌的生物活性成分

陈必婷^{1,2}, 吴炜城², 周董董¹, 邓小林¹, 张世清², 袁靖喆²,
徐静¹, 郭志凯^{2,3}

1) 海南大学化学工程与技术学院, 海南海口 570228; 2) 海南省热带微生物资源重点实验室,
中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 3) 海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室,
中国热带农业科学院海南热带农业资源研究院, 海南海口 571101

摘要: 红树植物内生真菌是新型天然产物先导药物的重要来源之一。为获得具有新颖结构的化合物, 对两株红树内生真菌 *Phomopsis* sp. DHS11 和 *Aspergillus fumigatus* JRJ111048 的代谢产物进行研究。综合利用正/反相硅胶柱、Sephadex LH20 凝胶柱和 HPLC 高效液相色谱法, 从发酵提取物中分离得到 9 种化合物, 分别记为化合物 1~9。利用高分辨电喷雾质谱 (high resolution electrospray ionization mass spectroscopy, HRESIMS)、核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)、旋光、紫外和红外光谱等技术, 鉴定化合物 1~9 依次为 norpestaphthalide C (1)、norpestaphthalide A (2-a)、norpestaphthalide B (2-b)、7-hydroxy-3-(2-hydroxy-propyl)-5-methyl-isochromen-1-one (3)、alternaroside B (4)、细胞松弛素 B (5)、啤酒甾醇 (6)、5-羟甲基糠醛 (7)、N-(4-羟基苯乙基)-乙酰胺 (8) 和 3, 5-dihydroxybenzoic acid (9)。其中, 化合物 1 为首次发现的新型苯并呋喃酮类化合物, 化合物 4 是首次从 *Phomopsis* sp. 属真菌中分离得到的脑苷脂类化合物。对化合物 1~9 进行体外免疫抑制、抗肿瘤和抗老年痴呆活性评价, 结果表明, 细胞松弛素类化合物 5 具有良好的免疫抑制活性。研究结果为深入挖掘红树植物内生真菌新型生物活性物质提供了参考。

关键词: 海洋化学; 天然产物; 红树植物; 内生真菌; 次级代谢产物; 苯并呋喃酮; 脑苷脂类; 免疫抑制活性

中图分类号: Q939.92; R978.1 文献标志码: A doi: 10.3724/SP.J.1249.2022.03245

Bioactive components of endophytic fungi from two Hainan mangrove plants

CHEN Biting^{1,2}, WU Weicheng², ZHOU Dongdong¹, DENG Xiaolin¹,
ZHANG Shiqing², YUAN Jingzhe², XU Jing¹, and GUO Zhikai^{2,3}

1) School of Chemical Engineering and Technology, Hainan University, Haikou 570228, Hainan Province, P. R. China

2) Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan Province, P. R. China

3) Hainan Key Laboratory of Conservation and Utilization of Tropical Agricultural Bioresources, Hainan Institute of Tropical Agricultural Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan Province, P. R. China

Abstract: Mangrove endophytic fungi are one of the important sources for discovering natural drug leads. In order to

Received: 2021-10-05; **Accepted:** 2021-10-26; **Online (CNKI):** 2022-04-06

Foundation: The Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund for CATAS-ITBB (1630052019011); Key Research Program of Hainan Province (ZDYF2021108); Key Science and Technology Project of Hainan Province (ZDKJ202008, ZDKJ202018); National Natural Science Foundation of China (81973229, 82160675).

Corresponding author: Associate professor GUO Zhikai. E-mail: guozhikai@itbb.org.cn
Professor XU Jing. E-mail: happyjing3@163.com

Citation: CHEN Biting, WU Weicheng, ZHOU Dongdong, et al. Bioactive components of endophytic fungi from two Hainan mangrove plants [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2022, 39(3): 245-252. (in Chinese)



obtain natural compounds with novel structures, the metabolites of two mangrove endophytic fungi *Phomopsis* sp. DHS11 and *Aspergillus fumigatus* JRJ111048 were studied. As a result, nine compounds (1-9) were isolated from their fermentation extract by comprehensive silica gel, reverse phase silica gel, Sephadex LH20 column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). The structures of these compounds were identified as norpestaphthalide C (1), norpestaphthalide A (2-a), norpestaphthalide B (2-b), 7-hydroxy-3-(2-hydroxypropyl)-5-methyl-isochromen-1-one (3), alternaroside B (4), cytochalasin B (5), cerevisterol (6), 5-hydroxymethyl-furaldehyde (7), N-(4-hydroxyphenethyl) acetamide (8), 3,5-dihydroxybenzoic acid (9) by using high resolution electrospray mass spectrometry (HRESIMS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), optical rotation, ultraviolet, infrared spectroscopy techniques and comparing with reported data. Among them, compound 1 was a new benzofuranone-type natural compound discovered for the first time, and the compound 4 was a cerebroside-type natural product reported for the first time from *Phomopsis* sp. The immunosuppressive activity, antitumor activity and anti-Alzheimer's activity of compounds 1-9 were evaluated. The result showed that compound 5 displayed good immunosuppressive activity. The research results provide new clues for the in-depth exploration of new bioactive substances in mangrove endophytes.

Key words: marine chemistry; natural products; mangrove; endophytic fungus; secondary metabolites; benzofuranone-type natural compound; cerebroside-type natural product; immunosuppressive activity

红树林是生长在热带、亚热带入海口潮间带的木本植物群落,具有耐盐、耐高温、耐强紫外线和厌氧等特性^[1].为适应严酷的生存环境,红树植物的内生真菌能够产生结构新颖及生物活性多样的代谢物协助红树抵御外来威胁,因而红树植物被称为天然药物研发的宝库^[2].已有研究表明,*Phomopsis*属和*Aspergillus*属的内生真菌能够产生具有抗菌、抗炎和免疫等活性的结构新颖的化合物,主要包括生物碱、黄酮、蒽醌、环二肽、聚酮和香豆素类等^[1,3].为从红树植物内生真菌中寻找具有重要价值的新型(药用)先导天然产物,本研究对两株红树植物内生拟茎点霉真菌*Phomopsis* sp. DHS11和烟曲霉真菌*Aspergillus fumigatus* JRJ111048的发酵产物进行分离,获得9种单体化合物.通过高分辨质谱、一维和二维核磁共振波谱、旋光以及文献数据比对等方法,对9种化合物进行化学结构鉴定和生物活性评价.

1 材料与方法

1.1 实验材料和设备

一维核磁共振谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)包括氢核磁共振谱(¹H-NMR)和核磁共振碳谱(¹³C-NMR);二维谱包括异核单量子相关(heteronuclear single quantum correlation, HSQC)、异核多键相关(heteronuclear multiple bond correlation, HMBC)和氢氢质子同核相关谱(¹H-¹H

correlated spectroscopy, ¹H-¹H COSY)和旋转坐标系二维差谱(rotating frame overhauser effect spectroscopy, ROSEY)数据在Bruker AV-500型超导核磁仪(德国Bruker公司)测定;高分辨电喷雾质谱(high resolution electrospray ionization mass spectroscopy, HRESIMS)数据由布鲁克质谱仪(Bruker amazon SL)测定;紫外数据由紫外光谱仪(Shimadzu UV-2550)测定;红外数据由红外光谱仪(Nicolet 380,美国Thermo Fisher公司)测定;旋光数据由旋光仪(MCP 5100,奥地利Anton Paar有限公司)测定;以四甲基硅烷(tetramethylsilane, TMS)为内标;旋转蒸发器购自日本东京理化器械株式会社;色谱硅胶板G和柱层析硅胶(硅胶颗粒粒径分别为200~300 μm和60~80 μm)购于青岛海洋化工厂;Sephadex LH-20和十八烷基硅烷键合硅胶填料(octadecylsilyl, ODS)反相硅胶分别购自瑞典PharmaciaBiotec公司和日本京都Nacalai Tesque;半制备高效液相色谱仪配备C₁₈反相柱(250.0 mm×10.0 mm,填料颗粒粒径为5 μm);实验所用的试剂为分析纯或色谱纯.

1.2 实验方法

1.2.1 菌株发酵

红树植物内生真菌*Phomopsis* sp. DHS11和*Aspergillus fumigatus* JRJ111048分别经过马铃薯葡萄糖培养基平板(马铃薯浸出粉200 g/L、葡萄糖20 g/L、琼脂15 g/L和氯霉素0.1 g/L)活化,于28℃培养6 d后,直接将菌块接种于大米培养基中,置于

28 °C的菌株发酵室中发酵35 d.

1.2.2 化合物的分离和纯化

真菌 *Phomopsis* sp. DHS11 发酵完成后,用等体积乙酸乙酯浸泡提取3次,每次间隔24~48 h,提取液经旋转蒸发仪减压浓缩得到100 g浸膏.将浸膏经减压硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇溶液梯度洗脱(体积比依次为100:0、100:1、100:2、100:4、100:8、100:16、100:32、100:64和0:100),得到11个组份,依次记作组份1~11(Fr. 1—Fr. 11).经正相硅胶柱梯度洗脱(二氯甲烷和甲醇的体积比为100:0~100:8),Fr. 5(二氯甲烷和甲醇的体积比为100:2)可得到8个组分(Fr. 5. 1—Fr. 5. 8).对Fr. 5. 4进行Sephadex LH-20凝胶柱层析(流动相为纯甲醇)和重结晶法,得到化合物1(质量为11 mg).Fr. 5. 2经反相硅胶柱色谱(甲醇水溶液体积分数为20%~80%)、Sephadex LH-20凝胶柱层析(流动相为纯甲醇)和半制备高效液相色谱处理,可得到化合物3(质量为6 mg,保留时间 t_R = 16 min).对Fr. 7(二氯甲烷和甲醇体积比为100:4)进行正相硅胶柱(二氯甲烷和甲醇体积比为100:0~100:16)梯度洗脱,共得到10个组分Fr. 7. 1—Fr. 7. 10,再经反相硅胶柱色谱(甲醇水溶液体积分数为30%~80%)和Sephadex LH-20凝胶柱层析(流动相二氯甲烷和甲醇的体积比为1:1)处理,可从Fr. 7. 3得到化合物2(质量为15 mg)和化合物6(质量为20 mg).对Fr. 8(二氯甲烷和甲醇的体积比为100:4~100:8)进行正相硅胶柱(二氯甲烷和甲醇体积比为100:2~100:32)梯度洗脱处理,可得到8个组分(Fr. 8. 1—Fr. 8. 8),再经Sephadex LH-20凝胶柱层析(流动相为纯甲醇),可从Fr. 8. 3和Fr. 8. 4分别得到化合物9(质量为3 mg)及化合物4(质量为10 mg).

真菌 *Aspergillus fumigatus* JRJ111048 发酵完成后,经等体积乙酸乙酯提取得到约10 g浸膏,进一步通过正相硅胶柱层析(梯度洗脱,二氯甲烷和甲醇体积比分别为100:0、100:1、100:2、100:4、100:8、100:16、100:32、100:64和0:100),可得到11个组份(Fr. A—Fr. K).经正相硅胶柱和Sephadex LH-20凝胶柱层析,可从Fr. D(二氯甲烷和甲醇体积比为100:4)得到化合物5(质量为10 mg).经正相硅胶柱、反相硅胶柱色谱和Sephadex LH-20凝胶柱层析,可从Fr. C(二氯甲烷和甲醇的体积比为100:2)得到化合物7(质量为2 mg)和化合物8(质量为2 mg).

1.2.3 生物活性测试

对分离获得的所有化合物进行活性筛选,通过CCK-8法^[4]测试脾细胞毒性,Con A诱导的脾细胞增殖实验和抗肿瘤活性测定方法分别参考文献[5-6].

2 结果与讨论

本研究从两株红树植物内生真菌 *Phomopsis* sp. DHS11 和 *Aspergillus fumigatus* JRJ111048 的大米固体发酵产物中分离纯化得到9种化合物,经鉴定分别为 norpestaphthalides C (1)、norpestaphthalide A (2-a)、norpestaphthalide B (2-b)、7-hydroxy-3-(2-hydroxy-propyl)-5-methyl-isochromen-1-one (3)、alternaroside B (4)、cytochalasin B (5)、cervisterol (6)、5-hydroxymethyl-furaldehyde (7)、N-(4-hydroxyphenethyl) acetamide (8) 和 3, 5-dihydroxybenzoic acid (9), 对应结构如图1.

化合物1为首次发现的新苯并呋喃酮类化合物,化合物4是首次从 *Phomopsis* sp. 属真菌中分离得到的脑苷脂类化合物.体外生物活性评价发现细胞松弛素类化合物5具有良好的免疫抑制活性.

2.1 结构鉴定

化合物1为白色晶体,用MeOH将化合物1溶解,测得旋光值($[\alpha]$)为+40.0,浓度 c = 0.10 mol/L,紫外最大吸收波长 λ_{max} 分别为228、261和293 nm,摩尔吸收系数lg ϵ 分别为2.82、2.95和2.64;红外(溶剂为KBr)最大吸收波数 ν_{max} 分别为3 422、1 706、1 606、1 359、1 491、1 304、1 160和1 066 cm^{-1} ;圆二色谱(circular dichroism, CD, c = 0.05 mol/L,溶剂为MeOH) λ_{max} (吸收率差值 $\Delta\epsilon$)分别为204(+0.39), 212(-4.50)、227(-0.70)、261(+0.39)和289(-0.46) nm.负源HRESIMS测得化合物的准分子离子峰质荷比 m/z = 223.061 3[M-H]⁻.推出化合物1的分子式为 $C_{11}H_{12}O_5$ ($C_{11}H_{11}O_5$ 的分子量理论值为223.061 2),不饱和度为6.化合物1与文献[7]中化合物2的结构相似,差别为化合物1上的C-7连接甲氧基.由¹³C-NMR(表1)和DEPT135谱可知,化合物1含有5个季碳(碳的化学位移 δ_c 分别为167.5、164.8、159.1、152.7和105.1)、2个甲基(δ_c 为55.5和18.5)和4个次甲基(δ_c 为101.3、99.1、81.8和66.3);从化合物1的¹H-NMR谱推测该化合物含有1个甲基质子,氢

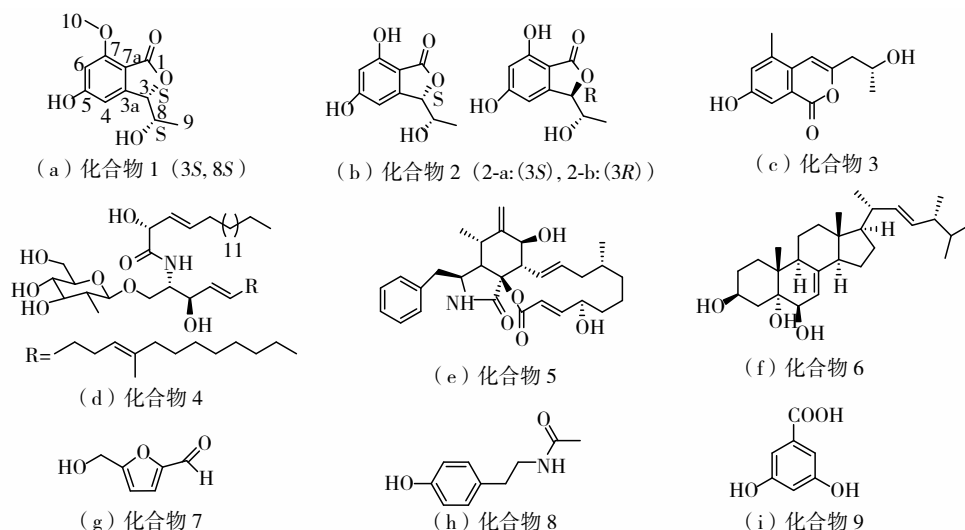
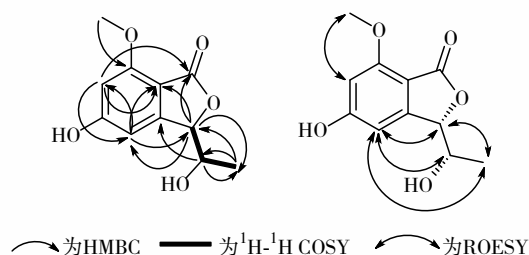


图 1 化合物 1~9 的结构

Fig. 1 Structures of 9 compounds

的化学位移 $\delta_{\text{H}} = 1.04$ (多重峰 d, 耦合常数 $J = 6.4$ Hz, 3H), 1 个甲氧基质子 $\delta_{\text{H}} = 3.81$ (s, 3H), 两个苯环上的间位质子信号 δ_{H} 分别为 6.51 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H) 和 6.41 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 两个羟基质子 (δ_{H} 为 4.96 和 10.61) 和两个次甲基质子 δ_{H} 为 4.04 (qd, $J = 6.4, 2.9$ Hz, 1H) 和 5.19 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H). 根据上述核磁数据推出的氢、碳数量与质谱数据推出的一致. 根据化合物的 ^1H - ^1H COSY 谱(图 2)可知, H-9 和 H-8 相关, H-8 和 H-3 相关. 综合分析化合物 1 的 HSQC 和 HMBC 谱可知, H-9 与 C-3、C-8 相关, H-8 与 C-3 相关, H-3 与 C-4、C-1、C-7a 相关, H-4 与 C-5、C-6、C-7、C-7a、C-3 相关, H-6 与 C-4、C-5、C-7、C-7a、C-1 相关, H-11 与 C-7 相关; 同时, 根据 HMBC 和 ROSEY(图 2)相关信号可确定甲氧基和羟基的位置. 上述结构片段连接整理后即可推出化合物的平面结构. 通过比较文献[8-9]中类似化合物的相关碳谱数据、电子圆二色谱(electrostatic circular dichroism, ECD)数据和比旋光度, 与已知化合物 norpestaphthalide A(化合物 2-a)的相关数据是一致的, 由此推出, 化合物 1 中 C-3 和 C-8 的绝对构型为 3*S* 和 8*S*. 因此, 确定化合物 1 为新苯并呋喃酮类化合物, 命名为 norpestaphthalide C(图 1). 根据化合物 1 的二维核磁谱图(HSQC、HMBC 和 ^1H - ^1H COSY), 可得该化合物的核磁数据如表 1.

化合物 2-a 为淡粉色固体, 正源 HRESIMS 测得其准分子离子峰 $m/z = 233.0451$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 推导其分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}$ 的分子量理论计算值为

图 2 化合物 1 的 ^1H - ^1H COSY (粗线)、HMBC (单箭头) 和 ROESY (双箭头) 相关Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY (bold lines), HMBC (single arrows) and ROESY (double arrows) correlations of compound 1表 1 化合物 1 的 ^1H -NMR (500 MHz) 和 ^{13}C -NMR (125 MHz) 数据 ($\text{DMSO}-d_6$)Table 1 ^1H -NMR (500 MHz) and ^{13}C -NMR (125 MHz) spectral data for compound 1 in $\text{DMSO}-d_6$

序号	δ_{C} 和 C 的类型	δ_{H} (多重峰, J 和 H 的数量)
1	167.5, C	
3	81.8, CH	5.19 (d, 2.9 Hz, 1H)
3a	152.7, C	
4	101.3, CH	6.51 (d, 1.5 Hz, 1H)
5	164.8, C	
6	99.1, CH	6.41 (d, 1.6 Hz, 1H)
7	159.1, C	
7a	105.1, C	
8	66.3, CH	4.04 (qd, 6.4, 2.9 Hz, 1H)
9	18.5, CH_3	1.04 (d, 6.4 Hz, 3H)
10	55.5, CH_3	3.81 (s, 3H)
8-OH		4.96 (s, 1H)
5-OH		10.61 (br, 1H)

233.042 0)。化合物2-a的 ^1H -NMR数据(DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 分别为10.39(s, 1H)、10.39(s, 1H)、6.37(s, 1H)、6.28(s, 1H)、5.14(d, $J = 3.0$ Hz, 1H)、4.94(d, $J = 5.2$ Hz, 1H)、4.02(td, $J = 6.0$ 、3.3 Hz, 1H)和1.04(d, $J = 6.4$ Hz, 3H)。 ^{13}C -NMR数据(DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 分别为168.1(C, C-1)、81.8(CH, C-3)、152.2(C, C-3a)、102.4(CH, C-4)、157.9(C, C-5)、100.9(CH, C-6)、164.2(C, C-7)、104.3(C, C-7a)、66.4(CH, C-1')和18.5(CH₃, C-2')。综合分析化合物2-a的氢谱和碳谱数据,并与文献[8]数据进行对比,确定一致,故鉴定化合物2-a为norpestaphthalide A。

化合物2-b为淡粉色固体,正源HRESIMS测得其准分子离子峰 $m/z = 233.045 1$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$,推出分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}$ 的分子量理论值为233.042 0)。化合物2-b的 ^1H -NMR数据(DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 分别为10.39(s, 1H)、10.39(s, 1H)、6.40(s, 1H)、6.30(s, 1H)、5.20(d, $J = 5.5$ Hz, 1H)、5.09(d, $J = 4.7$ Hz, 1H)、3.81(m, 1H)和1.01(d, $J = 6.3$ Hz, 3H)。 ^{13}C -NMR数据(DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 分别为168.0(C, C-1)、82.5(CH, C-3)、152.0(C, C-3a)、102.5(CH, C-4)、158.0(C, C-5)、101.3(CH, C-6)、164.3(C, C-7)、103.6(C, C-7a)、67.8(CH, C-1')和18.1(CH₃, C-2')。综合分析化合物2-b的氢谱和碳谱数据,并与文献[8]的数据进行对比,确定一致,故鉴定化合物2-b为norpestaphthalide B。

化合物3为棕色油状,负源HRESIMS测得其准分子离子峰 $m/z = 233.081 9$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$,推出分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ($\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4$ 的分子量理论值为233.081 1)。根据核磁图谱可知该化合物 ^1H -NMR数据(DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 分别为:6.60(d, $J = 2.4$ Hz, 1H)、6.58(d, $J = 2.3$ Hz, 1H)、5.95(s, 1H)、4.84(s, 1H)、4.02(m, 1H)、2.64(s, 3H)、2.56(m, 2H)和1.14(d, $J = 6.2$ Hz, 3H)。 ^{13}C -NMR数据(DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 分别为:178.3(C, C-1)、164.7(C, C-3)、111.5(CH, C-4)、114.2(C, C-4a)、141.3(C, C-5)、116.7(CH, C-6)、161.0(C, C-7)、100.6(CH, C-8)、159.3(C, C-8a)、42.9(CH₂, C-9)、64.1(CH, C-10)、23.4(CH₃, C-11)和22.4(CH₃, C-5)。综合分析化合物3的氢谱和碳谱数据,并与文献[10]的数据进行对比,确定一致,故鉴定化合物3为7-hydroxy-3-(2-hydroxy-propyl)-5-

methyl- isochromen-1-one。

化合物4为白色粉状,根据测试得到的核磁图谱可知该化合物的 ^1H -NMR数据(DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 分别为7.38(d, $J = 9.4$ Hz, 1H)、5.77(d, $J = 4.9$ Hz, 1H)、5.67(dt, J 分别为14.3 Hz和6.7 Hz, 1H)、5.56(dt, J 分别为15.6 Hz和6.2 Hz, 1H)、5.43(dd, J 分别为15.4 Hz和5.5 Hz, 1H)、5.36(dd, J 分别为15.4 Hz和6.8 Hz, 1H)、5.08(m, 1H)、4.97(d, $J = 4.2$ Hz, 1H)、4.92(m, 3H)、4.52(t, $J = 5.8$ Hz, 1H)、4.29(t, $J = 5.3$ Hz, 1H)、4.11(d, $J = 7.8$ Hz, 1H)、3.97(d, $J = 6.8$ Hz, 1H)、3.95(s, OH)、3.78(tt, J 分别为9.1 Hz和4.9 Hz, 1H)、3.66(ddd, J 分别为11.8、6.0和1.9 Hz, 1H)、3.51(m, 1H)、3.43(dt, J 分别为11.5 Hz和5.8 Hz, 1H)、3.13(td, J 分别为8.7 Hz和4.8 Hz, 1H)、3.08(ddd, J 分别为7.8、5.7和1.7 Hz, 1H)、3.03(td, J 分别为8.9 Hz和5.0 Hz, 1H)、2.95(td, J 分别为8.3 Hz和4.2 Hz, 1H)、1.93(dt, J 分别为19.4 Hz和7.4 Hz, 8H)、1.54(s, 3H)、1.23(s, 36H)和0.85(t, $J = 6.6$ Hz, 6H)。 ^{13}C -NMR数据(DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} 分别为68.6(CH₂, C-1)、52.9(CH, C-2)、70.5(CH, C-3)、131.0(CH, C-4)、130.9(CH, C-5)、27.4(CH₂, C-6)、32.2(CH₂, C-7)、123.5(CH, C-8)、134.9(qC, C-9)、39.1(CH₂, C-10)、27.3(CH₂, C-11)、29.1(CH₂, C-12、C-13和C-14)、28.7(CH₂, C-15)、22.1(CH₂, C-16)、13.9(CH₃, C-17)、15.7(CH₃, C-18)、172.1(qC, C-1')、71.9(CH, C-2')、129.1(CH, C-3')、130.9(CH, C-4')、31.7(CH₂, C-5')、29.0(CH₂, C-6'至C-15')、31.3(CH₂, C-16')、22.1(CH₂, C-17')、13.9(CH₃, C-18')、103.5(CH, C-1'')、73.4(CH, C-2'')、76.6(CH, C-3'')、70.0(CH, C-4'')、76.9(CH, C-5'')和61.1(CH, C-6'')。综合分析化合物4的氢谱和碳谱数据,并与文献[11]的数据进行对比,确定一致,故鉴定化合物4为alternaroside B。

化合物5为白色晶体,正源HRESIMS测得其准分子离子峰 $m/z = 502.260 6$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$,推出分子式 $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_5$ ($\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_5\text{Na}$ 的分子量理论值为502.256 4)。根据核磁图谱可知,该化合物的 ^1H -NMR数据(DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 分别为:8.29(s, 1H)、7.27(t, $J = 7.5$ Hz, 2H)、7.19(m, 1H)、7.11(2H, m)、6.77(dd, J 分别为15.6 Hz和4.3 Hz, 1H)、

5.82 (ddd, J 分别为 15.1、9.7 和 1.7 Hz, 1H)、5.71 (dd, J 分别为 15.6 Hz 和 1.8 Hz, 1H)、5.12 (d, J = 1.6 Hz, 1H)、5.03 (ddd, J 分别为 14.8、10.8 和 3.6 Hz, 1H)、4.88 (m, 2H)、4.38 (dp, J 分别为 5.0 Hz 和 2.3 Hz, 1H)、3.61 (d, J = 10.7 Hz, 1H)、3.23 (d, J = 10.3 Hz, 1H)、3.20 (d, J = 3.4 Hz, 1H)、3.01 (t, J = 6.5 Hz, 1H)、2.77 (dd, J 分别为 13.2 Hz 和 5.0 Hz, 1H)、2.68 (dd, J 分别为 5.4 Hz 和 2.3 Hz, 1H)、2.62 (dd, J 分别为 13.2 Hz 和 7.4 Hz, 1H)、2.01 (dp, J 分别为 11.4、3.4 和 2.9 Hz, 1H)、1.80 (ddd, J 分别为 13.9、8.7 和 6.0 Hz, 1H)、1.61 (ddd, J 分别为 15.0、10.1 和 4.0 Hz, 1H)、1.54 (m, 1H)、1.43 (ddd, J 分别为 13.7、10.2 和 3.1 Hz, 1H)、1.35 (ddd, J 分别为 13.2、8.8 和 5.3 Hz, 1H)、1.24 (s, 1H)、1.15 (m, 1H)、0.87 (dd, J 分别为 6.6 Hz 和 4.5 Hz, 1H)、0.84 (d, J = 6.6 Hz, 3H)、0.62 (d, J = 6.7 Hz, 3H) 和 0.49 (dtd, J 分别为 13.0、10.8 和 5.1 Hz, 1H). ^{13}C -NMR 数据 (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_c 分别为: 170.8 (CH, C-1)、52.4 (CH, C-3)、46.5 (CH, C-4)、31.1 (CH, C-5)、151.0 (C, C-6)、68.6 (CH, C-7)、47.5 (CH, C-8)、83.4 (C, C-9)、42.9 (CH₂, C-10)、13.3 (CH₃, C-11)、112.4 (CH₂, C-12)、128.3 (CH, C-13)、41.8 (CH, C-14)、41.8 (CH₂, C-15)、33.0 (CH, C-16)、34.4 (CH₂, C-17)、20.1 (CH₂, C-18)、35.0 (CH₂, C-19)、68.6 (CH, C-20)、153.4 (CH, C-21)、118.1 (CH, C-22)、164.2 (C, C-23)、20.4 (CH₃, C-24)、137.1 (C, C-1')、129.8 (CH, C-2' 和 C-6')、128.6 (CH, C-3' 和 C-5') 和 126.5 (CH, C-4'). 综合分析化合物 5 的氢谱和碳谱数据, 并与文献[12-13]数据进行对比, 确定一致, 故鉴定化合物 5 为细胞松弛素 B.

化合物 6 为白色粉状, 根据测试得到的核磁图谱可知, 该化合物的 ^1H -NMR 数据 (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 分别为: 5.23 (dd, J 分别为 15.3 Hz 和 7.2 Hz, 1H)、5.17 (dd, J 分别为 15.3 Hz 和 8.1 Hz, 1H)、5.08 (m, 1H)、4.51 (d, J = 5.5 Hz, 1H)、4.24 (d, J = 5.6 Hz, 1H)、3.76 (m, 1H)、3.60 (s, 1H)、0.99 (d, J = 6.6 Hz, 3H)、0.90 (s, 3H)、0.88 (d, J = 6.8 Hz, 3H)、0.81 (d, J = 6.3 Hz, 3H)、0.79 (s, 3H) 和 0.55 (d, J = 10.9 Hz, 3H). ^{13}C -NMR 数据 (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_c 分别为: 31.2 (CH₂, C-1)、32.5 (CH₂, C-2)、66.0 (CH, C-

3)、40.2 (CH₂, C-4)、74.5 (C, C-5)、72.1 (CH, C-6)、119.5 (CH, C-7)、139.7 (C, C-8)、42.3 (CH, C-9)、36.7 (C, C-10)、21.4 (CH₂, C-11)、39.0 (CH₂, C-12)、43.0 (C, C-13)、54.2 (CH, C-14)、22.6 (CH₂, C-15)、27.8 (CH₂, C-16)、55.3 (CH, C-17)、12.1 (CH₃, C-18)、17.7 (CH₃, C-19)、40.1 (CH, C-20)、21.0 (CH₃, C-21)、135.4 (CH, C-22)、131.4 (CH, C-23)、42.0 (CH, C-24)、32.5 (CH, C-25)、19.8 (CH₃, C-26)、19.5 (CH₃, C-27) 和 17.3 (CH₃, C-28). 综合分析化合物 6 的氢谱和碳谱数据, 并与文献[14]的数据进行对比, 确定一致, 故鉴定化合物 6 为啤酒甾醇.

化合物 7 为不定型粉状, 根据测试得到的核磁数据可知其 ^1H -NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} 分别为: 9.52 (s, 1H)、7.37 (d, J = 3.5 Hz, 1H)、6.57 (d, J = 3.5 Hz, 1H) 和 4.60 (s, 2H). ^{13}C -NMR 数据 (CD₃OD, 125 MHz) δ_c 分别为: 179.6 (CH, C-1)、163.4 (CH, C-2)、125.2 (CH, C-3)、111.0 (CH, C-4)、154.1 (C, C-5) 和 57.8 (CH₂, C-6). 综合分析化合物 7 的氢谱和碳谱数据, 并与文献[15]的数据进行对比, 确定一致, 故鉴定化合物 7 为 5-羟甲基糠醛.

化合物 8 为浅棕色油状, 正源 HRESIMS 测得其准分子离子峰 m/z = 202.086 1 [M+Na]⁺, 推出分子式为 C₁₀H₁₃NO₂ (C₁₀H₁₃NO₂Na 的分子量理论值为 202.083 8). 根据核磁可知该化合物的 ^1H -NMR 数据 (acetone- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 分别为: 7.03 (d, J = 8.3 Hz, 2H)、6.75 (d, J = 8.3 Hz, 2H)、3.34 (m, 2H)、2.67 (t, J = 7.4 Hz, 2H) 和 1.86 (s, 3H). ^{13}C -NMR 数据 (acetone- d_6 , 125 MHz) δ_c 分别为: 130.52 (C, C-1)、130.9 (CH, C-2 和 C-6)、116.2 (CH, C-3 和 C-5)、157.0 (C, C-4)、35.4 (CH₂, C-7)、42.8 (CH₂, C-8)、173.8 (C, C-9) 和 22.0 (CH₃, C-10). 综合分析化合物 8 的氢谱和碳谱数据, 并与文献[16]的数据进行对比, 确定一致, 故鉴定化合物为 N-(4-羟基苯乙基)-乙酰胺.

化合物 9 为浅棕色油状, 正源 HRESIMS 测得其准分子离子峰 m/z = 155.034 0 [M+H]⁺, 推出分子式为 C₇H₆O₄ (C₇H₆O₄ 的分子量理论值为 155.033 9). 根据核磁可知该化合物的 ^1H -NMR 数据 (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_{H} 分别为: 12.33 (s, 1H)、9.56 (s, 2H)、6.79 (d, J = 2.1 Hz, 2H) 和 6.40 (s, 1H). ^{13}C -NMR 数据 (CD₃OD, 125 MHz) δ_c 分别为: 170.3 (COOH)、

159.6 (C, C-1)、109.1 (CH, C-2 和 C-6)、159.6 (C, C-3 和 C-5)、108.1 (CH, C-4) 和 151.0 (C, C-6)。综合分析化合物9的氢谱和碳谱数据,并与文献[17]的数据进行对比,确定一致,故鉴定化合物9为3,5-二羟基苯甲酸。

2.2 化合物的体外生物活性评价

利用 Con A 诱导脾淋巴细胞增殖,对化合物1~9进行体外免疫抑制活性评价,结果发现,只有化合物5的平均抑制率达到50.9%,其半抑制浓度(IC₅₀)为35.3 μmol/L,表明化合物5对小鼠脾细胞具有免疫抑制活性,其余化合物在免疫抑制、抗肿瘤和抗老年痴呆活性测试中均显示无活性。

3 结 论

拟茎点霉属(*Phomopsis*)和曲霉属(*Aspergillus*)真菌是红树植物内生真菌中常见的种属^[18],为结构新颖的活性化合物的重要来源^[19-20]。本研究从两株红树植物内生真菌 *Phomopsis* sp. DHS11 和 *Aspergillus fumigatus* JRJ111048 的乙酸乙酯提取物中分离纯化得到9种化合物。其中,化合物1~2为苯并呋喃酮类化合物,化合物1为首次发现的新型苯并呋喃酮类化合物,命名为 norpestaphthalide C, 其骨架结构与文献[8]报道的化合物2(norpestaphthalide A)的结构相似。化合物 norpestaphthalide A 于1996年在海洋沉积物真菌中被发现,它对小鼠 tsF210 细胞生长具有较好的抑制活性^[21]。化合物3为7-hydroxy-3-(2-hydroxy-propyl)-5-methyl-isochromen-1-one,于1977年从植物病原菌 *Drechslera siccas* 中首次分离得到^[22],同时也在地衣内生真菌 *Ulocladium* sp. 中发现^[10]。化合物4为脑苷脂类化合物 alternaroside B, 从一株海洋耐盐真菌 *Alternaria raphani* 中分离得到,它对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌具有一定程度的抑菌活性^[11]。本研究首次从拟茎点霉属真菌 *Phomopsis* sp. 中报道该类化合物,进一步丰富了该化合物的来源。化合物5为细胞松弛素 B, 于1967年首次从 *Helminthosporium dematioides* 中分离鉴定^[23],该化合物对肺癌和腺癌(M109、Lewis lung 和 LA4)及 B16F10 黑色素瘤具有较好抑制活性,低浓度的细胞松弛素 B 还能抑制 GlcNAcase 分泌^[24]。化合物6为啤酒甾醇,1985年首次从自然界中的地中海苔藓虫分离得到^[25]。化合物7为5-羟甲基糠醛,于2005年首次从毛茛属 *Ran-*

nunculus ternatus. 中分离得到^[26]。化合物8为N-(4-羟基苯乙基)-乙酰胺,于1959年从分枝杆菌和肠道细菌的代谢产物中被发现,并于1995年首次从真菌发酵液中发现,且发现其具有抑制胆固醇合成活性^[27]。本研究对化合物1~9进行了体外抗肿瘤、阿尔兹海默症和免疫抑制活性筛选,结果发现,化合物5具有较好的免疫抑制活性,其半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC₅₀)值为35.3 μmol/L,阳性对照药物环孢菌素 A 的 IC₅₀ 值为4.2 μmol/L。其余化合物均未筛选到抗肿瘤、抗老年痴呆和免疫抑制活性。

基金项目: 中央公益性科研院所基本科研业务资助项目(1630052019011) 海南省重点研发计划资助项目(ZDYF2021108); 海南省重大科技计划资助项目(ZDKJ202008, ZDKJ202018); 国家自然科学基金资助项目(81973229, 82160675)

作者简介: 陈必婷(1995—), 海南大学硕士研究生。研究方向: 微生物天然产物化学。E-mail: cbt688228@163.com

引 文: 陈必婷, 吴炜城, 周董董, 等. 两株海南红树植物内生真菌的生物活性成分[J]. 深圳大学学报理工版, 2022, 39(3): 245-252.

参考文献 / References:

- [1] XU Jing. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes [J]. RSC Advances, 2015, 5 (2): 841-892.
- [2] 徐静. 红树林微生物天然产物化学研究[M]. 北京: 科学出版社. 2015.
XU Jing. Study on the chemistry of microbial natural products in mangroves [M]. Beijing: Science Press. 2015. (in Chinese)
- [3] XU Jing, SONG Yongchun, GUO Ye, et al. Fumigaclavines D-H, new ergot alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus* [J]. Planta Medica, 2014, 80(13): 1131-1137.
- [4] ZHANG Xuexia, LI Gang, DENG Qin, et al. Vomifoliol isolated from mangrove plant *Ceriops tagal* inhibits the NFAT signaling pathway with CN as the target enzyme *in vitro* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2021, 48: 128235.
- [5] GUANG Shuang, FANG Baochen, SONG Bocui, et al. Immunosuppressive activity of alpinetin on activation and cytokines secretion of murine T lymphocytes [J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2014, 36 (4): 290-296.
- [6] WEI Chengwen, DENG Qin, SUN Mengyu, et al. Cytospyrone and cytosporin: two new polyketides isolated from mangrove endophytic fungus, *Cytospora* sp. [J]. Molecules, 2020, 25(18): 4224-4233.
- [7] DING Gang, LIU Shuchun, GUO Liangdong, et al. Anti-fungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestal-*

- lotiopsis foedan* [J]. Journal of Natural Products, 2008, 71(4): 615-618.
- [8] 陈玲玲, 朱统汉, 朱国良, 等. 海洋来源真菌 *Penicillium brevicompactum* OUCMDZ-4920 的活性产物研究[J]. 有机化学, 2017, 37(10): 2752-2762.
- CHEN Lingling, ZHU Tonghan, ZHU Guoliang, et al. Bioactive natural products from the marine-derived *Penicillium brevicompactum* OUCMDZ-4920 [J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2017, 37(10): 2752-2762. (in Chinese)
- [9] HEMPHILL C P, DALETORS G, LIU Zhen, et al. Polyketides from the mangrove-derived fungal endophyte *Pestalotiopsis clavispora* [J]. Tetrahedron Letters, 2016, 57(19): 2078-2083.
- [10] WANG Quanxin, LI Bao, YANG Xiaoli, et al. Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. [J]. Fitoterapia, 2012, 83(1): 209-214.
- [11] WANG Wenliang, WANG Yi, TAO Hongwen, et al. Cerebrosides of the halotolerant fungus *Alternaria raphani* isolated from a sea salt field [J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(9): 1695-1698.
- [12] SILVA P, SILVA F, KOOLEN H, et al. Cytochalasins from *Xylaria* sp., an endophytic fungus from *Turnera ulmifolia* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2019, 55(3): 592-593.
- [13] STEYN P S, BREYTENBACH J C, BOTHA J H, et al. Synthesis, complete ¹H and ¹³C NMR assignment and crystal structure of novel epoxide derivatives of cytochalasin B [J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2008, 46(7): 650-659.
- [14] MUNKHGEREL L, 罗国勇, 周敏, 等. 食用林地菇的化学成分[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(4): 629-632.
- MUNKHGEREL L, LUO Guoyong, ZHOU Min, et al. Chemical components from an edible mushroom *Agaricus silvaticus* [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(4): 629-632. (in Chinese)
- [15] ZHANG Zhen, WANG Dong, ZHAO Yun, et al. Fructose-derived carbohydrates from *Alisma orientalis* [J]. Natural Product Research, 2009, 23(11): 1013-1020.
- [16] HONG Ren, QIANQUN G, CHENGBIN C, et al. The cytotoxic constituents from marine-derived streptomyces 3320 [J]. Journal of Ocean University of China, 2006, 5(1): 75-81.
- [17] 高云佳, 赵庆春, 闵鹏, 等. 脱皮马勃化学成分的研究[J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(1): 47-49.
- GAO Yunjia, ZHAO Qingchun, MIN Peng, et al. Chemical constituents of *Lasiosphaera fenzlii* Reich [J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 20(1): 47-49. (in Chinese)
- [18] 周婧, 杨琦, 李钢, 等. 红树属植物内生真菌多样性及其代谢产物研究进展[J]. 林业科学, 2019, 55(1): 89-102.
- ZHOU Jing, YANG Qi, LI Gang, et al. Advances in endophytic fungi diversity and secondary metabolites in rhizophora plants [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2019, 55(1): 89-102. (in Chinese)
- [19] GUO Zhikai, ZHOU Yiqin, HAN Hao, et al. New antibacterial phenone derivatives asperphenone A-C from mangrove-derived fungus *Aspergillus* sp. YHZ-1 [J]. Marine Drugs, 2018, 16(2): 45.
- [20] GUO Zhikai, GAI Cuijuan, CAI Caihong, et al. Metabolites with insecticidal activity from *Aspergillus fumigatus* JRJ111048 isolated from mangrove plant *Acrostichum speciosum* endemic to Hainan island [J]. Marine Drugs, 2017, 15(12): 381.
- [21] CUI Chengbin, UBUKATA M, KAKAYA H, et al. Acetophthalidin, a novel inhibitor of mammalian cell cycle, produced by a fungus isolated from a sea sediment [J]. The Journal of Antibiotics, 1996, 49(2): 216-219.
- [22] ELLIS G P. Chromenes, chromanones, and chromones-introduction [M]. London, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1977: 1-3.
- [23] BINDER M, KIECHEL J R, TAMM C. Zur biogenese des antibioticus phomin [J]. Helvetica Chimica Acta, 1970, 53(7): 1797-1812.
- [24] TRENDOWSKI M, ZOINO J N, CHRISTEN T D, et al. Preparation, *in vivo* administration, dose-limiting toxicities, and antineoplastic activity of cytochalasin B [J]. Translational Oncology, 2015, 8(4): 308-317.
- [25] CAFIERI F, FATTORUSSO E, GAVAGNIN M, et al. 3 β , 5 α , 6 β -Trihydroxysterols from the mediterranean bryozoan *Myriapora truncate* [J]. Journal of Natural Products, 1985, 48(5): 944-947.
- [26] 陈赞, 田景奎, 程翼宇. 猫爪草化学成分的研究(II) [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(18): 1373-1375.
- CHEN Yun, TIAN Jingkui, CHENG Yiyu. Studies on chemical constituents of *Ranunculus ternatus* (II) [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(18): 1373-1375. (in Chinese)
- [27] 胡海峰, 朱宝泉, 龚炳永. 微生物来源的胆固醇生物合成抑制剂研究: 抗生素 SIPI-8926-III 的研究[J]. 中国医药工业杂志, 1995, 26(11): 484-486.
- HU Haifeng, ZHU Baoquan, GONG Bingyong. Inhibitor of cholesterol biosynthetic enzyme from microorganisms: studies on antibiotic SIPI-8926-III [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 1995, 26(11): 484-486. (in Chinese)

【中文责编: 晨兮; 英文责编: 艾琳】