

曹钰镁, 金梦莹, 谭璐, 罗禹, 胡靖文, 赵佳佳, 郭大乐, 邓赞. 川芎内生菌 *Fusarium tricinctum* 的化学成分[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26 (2): 294-298  
Cao YM, Jin MY, Tan L, Luo Y, Hu JW, Zhao JJ, Guo DL, Deng Y. Chemical constituents of the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* from *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2020, 26 (2): 294-298

# 川芎内生菌 *Fusarium tricinctum* 的化学成分

曹钰镁<sup>1</sup> 金梦莹<sup>1</sup> 谭璐<sup>1</sup> 罗禹<sup>2</sup> 胡靖文<sup>1</sup> 赵佳佳<sup>1</sup> 郭大乐<sup>1</sup>✉ 邓赞<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>成都中医药大学药学院中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 成都 611137

<sup>2</sup>西南医科大学药学院 泸州 646000

**摘要** 采用糙米培养基对川芎内生菌 *Fusarium tricinctum* 菌种进行扩大培养, 利用萃取、柱色谱、制备色谱等手段对其化学成分进行分离纯化, 并通过NMR、ESI-MS等波谱手段对所得化合物进行结构鉴定; 采用MTT法对部分化合物进行细胞毒活性测定. 共分离得到13个化合物, 分别鉴定为苯乙酸(1), 3,6-二异丙基-1-甲基哌嗪-2,5-二酮(2), fusarpyrone A(3), fusagerin B(4), *N*-苯乙基乙酰胺(5), fungerin(6), callyspongidiptide A(7), 环-(*S*-脯氨酸-*R*-亮氨酸)(8), vomifolilol(9), 环-(4-*S*-羟基-*R*-脯氨酸-*R*-异亮氨酸)(10), *N*-acetyl- $\beta$ -oxotryptamine(11), 烟酸(12), 邻羟基苯乙酸(13). 化合物6对OCI-LY10、HT29、MV4-11、Hela、SKOV3具有一定的抑制作用, IC<sub>50</sub>值分别为 23.98 ± 2.37、93.63 ± 1.42、90.64 ± 1.65、77.65 ± 1.35、52.52 ± 2.04  $\mu$ mol/L. 上述结果可为该菌种的肿瘤细胞毒活性开发提供一定的研究依据. (表1 参28)

**关键词** 川芎; 内生菌; *Fusarium tricinctum*; 结构鉴定; 细胞毒活性

## Chemical constituents of the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* from *Ligusticum chuanxiong* Hort.

CAO Yumei<sup>1</sup>, JIN Mengying<sup>1</sup>, TAN Lu<sup>1</sup>, LUO Yu<sup>2</sup>, HU Jingwen<sup>1</sup>, ZHAO Jiajia<sup>1</sup>, GUO Dale<sup>1</sup>✉ & DENG Yun<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Sichuan Provincial Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medical Resources: Ministry of State Key Laboratory Breeding Base, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

<sup>2</sup>School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

**Abstract** To investigate the compounds produced by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* from *Ligusticum chuanxiong* Hort. and their cytotoxicity against three tumor cell lines, *F. tricinctum* was cultured with brown rice and its secondary metabolites were purified by chromatographic procedures and identified based on NMR, ESI-MS, and other spectral evidence. The MTT method was applied to test the cytotoxicity of the isolated compounds. A total of 13 compounds were isolated and identified as phenylacetic acid (1), 3,6-diisopropyl-1-methylpiperazine-2,5-dione (2), fusarpyrone A (3), fusagerin B (4), *N*-phenethylacetamide (5), fungerin (6), callyspongidiptide A (7), cyclo-((*S*)-Pro-(*R*)-Leu) (8), vomifolilol (9), cyclo-(4-*S*-hydroxy-*R*-proline-*R*-isoleucine) (10), *N*-acetyl- $\beta$ -oxotryptamine (11), nicotinic acid (12), and 2-hydroxybenzeneacetic acid (13). Fungerin showed weak inhibitory activity against OCI-LY10, HT29, MV4-11, Hela, and SKOV3 cells, with IC<sub>50</sub> values of 23.98 ± 2.37, 93.63 ± 1.42, 90.64 ± 1.65, 77.65 ± 1.35, and 52.52 ± 2.04  $\mu$ mol/L, respectively.

**Keywords** *Ligusticum chuanxiong* Hort.; endophytic fungus; *Fusarium tricinctum*; structure identification; cytotoxicity

收稿日期 Received: 2019-06-04 接受日期 Accepted: 2019-07-08

国家自然科学基金面上项目(81373961)、四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项计划(2016TD0006)、中国博士后科学基金(2017M622985)、四川省教育厅科研项目(18ZA0191)和成都中医药大学青年教师创新基金(ZRQN1766)资助 Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (81373961), the Sichuan Provincial Science and Technology Department Provincial Youth Science and Technology Innovation Research Team Special Plan (2016TD0006), the China Postdoctoral Science Foundation (2017M622985), the Sichuan Provincial Department of Education Research Project (18ZA0191) and the Chengdu University of Traditional Chinese Medicine Young Teacher Innovation Fund (ZRQN1766)

✉通讯作者 Corresponding authors (E-mail: guodale@cducm.edu.cn; dengyun@cducm.edu.cn)

川芎为伞形科植物川芎*Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎。川芎味辛、微苦，性温。归肝、胆、心包经。具有活血行气、祛风止痛的功效<sup>[1]</sup>。根据目前的研究表明，川芎中含有多种内生菌，包括镰孢属、腐霉属、曲霉属等。川芎的内生真菌与药材品质有着非常密切的关系，不同群落结构是影响川芎品质的重要因素之一<sup>[2]</sup>。但是，关于川芎内生菌的化学成分研究相对较少，马川等发现川芎内生菌*Cladosporium* sp. IS384发酵产物的乙酸乙酯部位对粪链球菌ATCC29212的MIC值为3.91  $\mu\text{g/mL}$ ，分离得到4个化合物，其中cladospolide B与iso-cladospolide B对ATCC29212的MIC值分别为0.31  $\mu\text{g/mL}$ 、0.63  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[3]</sup>。李涛等人发现川芎内生菌可对部分病原真菌具有良好抑制作用。上述结果为川芎内生菌的进一步研究提供了线索<sup>[4]</sup>。

*Fusarium tricinctum*为瘤座孢科(Discellaceae)镰孢属(*Fusarium*)<sup>[5]</sup>，是一类在全世界广泛分布的真菌。通常以腐生或弱寄生的方式生存于温带地区，但通常*F. tricinctum*不被认为是植物的病原物<sup>[6]</sup>。*F. tricinctum*的次生代谢产物主要包括生物碱、甾体、挥发油、多肽、萜类等化合物<sup>[7-11]</sup>。*F. tricinctum*的次生代谢产物往往具有良好的生理活性，例如Hemphill等使用OSMAC(One strain many compounds)方法，对*F. tricinctum*进行培养，从中发现一个新天然产物fusarielin J在该培养条件下的积累增加高达80倍，且化合物fusarielin J显示出对人卵巢癌细胞系A2780的细胞毒活性， $\text{IC}_{50}$ 值为12.5  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[12]</sup>。Nenkep等从*F. tricinctum*的次级代谢产物中分离到2个新的卤化吡喃酮，溴甲基秋水仙酚A和溴甲基秋水仙酚B，以及2个已知化合物chlamydosporo和fusarielin A；溴甲基秋水仙酚A和B对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和多药耐药金黄色葡萄球菌的MIC为15.6  $\mu\text{g/mL}$ ，chlamydosporo和fusarielin A对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的MIC为31.5  $\mu\text{g/mL}$ ，多药耐药金黄色葡萄球菌的MIC为62.5  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[13]</sup>。Sun等从*F. tricinctum* SYPF 7082中分离得到2个新的生物碱rigidiusculamide E、[-(a-oxyisohexanoyl-N-methyl-leucyl)<sub>2</sub>-]，其中[-(a-oxyisohexanoyl-N-methyl-leucyl)<sub>2</sub>-]对小鼠巨噬细胞产生一氧化氮有显著的抑制作用， $\text{IC}_{50}$ 值为 $18.10 \pm 0.16 \mu\text{mol/L}$ <sup>[14]</sup>。Zhang等从*F. tricinctum*中分离得到了1个独特骨架的新的倍半萜类化合物fusartricin和2个已知化合物fusarielin B和enniatin B，其中fusartricin对*Enterobacter aerogenes*、*Micrococcus tetragenu*和*Candida albicans*具有显著的抗菌活性<sup>[15]</sup>。Ola等将枯草芽孢杆菌168 trpC2与*F. tricinctum*进行共培养，从中分离出9个化合物，其中enniatins B1和enniatins A1抑制了共培养的枯草芽孢杆菌菌株的生长，其MIC分别为16和8  $\mu\text{g/mL}$ ，这两个化合物对金黄色葡萄球菌\肺炎链球菌和粪肠球菌的MIC值在2-8  $\mu\text{g/mL}$ 范围内；此外化合物lateopyrone对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌和粪肠球菌也表现出良好的抗菌活性，MIC值范围为2-8  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[16]</sup>。

因此，为了从川芎内生菌中发现具有较好活性的化合物，本研究对从川芎中分离得到的内生菌*F. tricinctum*进行化学成分研究，从糙米发酵物中共分离得到13个化合物，fungerin(6)对弥漫大B细胞淋巴瘤细胞(OCI-LY10)、人结肠癌细胞(HT-29)、人急性单核细胞白血病细胞(MV4-11)、人宫颈癌细胞(Hela)和人卵巢癌细胞(SKOV3)具有细胞毒活性， $\text{IC}_{50}$ 值分别为 $23.98 \pm 2.37$ 、 $93.63 \pm 1.42$ 、 $90.64 \pm 1.65$ 、 $77.65 \pm 1.35$ 、 $52.52 \pm 2.04 \mu\text{mol/L}$ 。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

Finnigan-LCQ DECA质谱仪(美国赛默飞世尔公司)；NP7000型制备型高效液相色谱仪(江苏汉邦仪器有限公司)；柱层析硅胶(200-300目，青岛海洋化工厂)；薄层层析硅胶板(5 cm × 10 cm, G, 青岛海洋化工厂)；HPLC柱(Pack ODS-A, 250 mm × 10 mm, 日本YMC株式会社)；JASCO P-1020自动旋光仪(日本分光株式会社)；Multiskan MK3型酶标仪(赛默飞世尔(上海)仪器有限公司)；四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma公司, 批号1001822145)；OCI-LY10(弥漫大B细胞淋巴瘤细胞)、HT-29(人结肠癌细胞)、MV4-11(人急性单核细胞白血病细胞)、Hela(人宫颈癌细胞)和SKOV3(人卵巢癌细胞)(美国模式培养物收藏中心)；IMDM培养基(赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司, 批号: 8118412)；RPMI1640培养基(北京索莱宝科技有限公司, 批号20190124)；胰酶(美国SIGMA公司, SLBM5252V)；胎牛血清(草原绿野生物工程材料有限公司, 批号181108)；紫杉醇(国药集团化学试剂有限公司)；三氯甲烷、丙酮、石油醚、乙酸乙酯、甲醇(成都科龙化工试剂厂, 均为分析纯)。

### 1.2 菌种来源

川芎于2018年4月采集于四川省彭州市，由成都中医药大学龙飞副教授鉴定为川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)。从新鲜的川芎根茎中分离得到一株内生菌，对其进行测序，得到的16S rRNA基因序列提交到NCBI的GenBank基因库，经BLAST比对，与数据库中的已知序列进行同源性分析，鉴定该菌株为*F. tricinctum*。药材及菌种现保存于成都中医药大学药学院生化制药实验室。

### 1.3 培养基

燕麦固体培养基：燕麦20 g，硝酸钾0.2 g，硫酸镁0.2 g，磷酸氢二钾0.5 g，琼脂15-20 g，自来水1 L。

液体培养基：葡萄糖20 g，可溶性淀粉8 g，蛋白胨5 g，酵母膏2 g，氯化钠2 g，碳酸钙2 g，硫酸镁0.5 g，磷酸氢二钾0.5 g，自来水1 L，pH自然。

糙米固体培养基：糙米40 g，蛋白胨2 g，自来水25 mL。

## 2 试验方法

### 2.1 固体发酵

将在燕麦培养基上纯化得到的*F. tricinctum*菌株接种于液体培养基中，置于摇床内，于30 °C、120 r/min条件下，培养4 d得种子液，再将种子液接种到已灭菌完成的200瓶装糙米固体培养基的发酵瓶中，室温下静置培养40 d。

### 2.2 提取与分离

发酵40 d后，用甲醇超声提取发酵产物，重复3次，合并提取液，浓缩得到浸膏，浸膏用水分散后用等体积乙酸乙酯萃取4次，合并萃取液，经减压浓缩萃取液得到乙酸乙酯部位浸膏65.5 g。

将乙酸乙酯部位浸膏经正相硅胶柱层析，以石油醚-丙酮(100:0→50:50, V/V)梯度洗脱，收集洗脱液，TLC检识合并相同馏分，得到组分Fr. 1-Fr. 27。Fr. 12经HPLC反复制备，以甲醇-水(30:70, V/V, 流速3 mL/min)洗脱，得到化合物1(2.5 mg,  $t_R = 52 \text{ min}$ )；以甲醇-水(75:25, V/V, 流速3 mL/min)洗脱，得到化合物2(5.0 mg,  $t_R = 16 \text{ min}$ )。Fr. 15经凝胶柱层析，由氯仿-甲醇(1:1, V/V)洗脱，由TLC检识合并

相同馏分得到Fr. 15.1 (21.5 mg)、Fr. 15.2 (24.1 mg)、Fr. 15.3 (35.4 mg)、Fr. 15.4 (28.3 mg)、Fr. 15.5 (27.6 mg)、Fr. 15.6 (104.3 mg)、Fr. 15.7 (22.3 mg)、Fr. 15.8 (31.4 mg)、Fr. 15.9 (67.9 mg)。Fr. 15.6经HPLC反复制备,以甲醇-水(45:55, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**3**(2.0 mg,  $t_R = 32$  min);以甲醇-水(60:40, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**4**(2.8 mg,  $t_R = 18$  min)。Fr. 15.9经HPLC反复制备,以甲醇-水(45:55, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**5**(2.6 mg,  $t_R = 24$  min)。Fr. 17经HPLC反复制备,以甲醇-水(60:40, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**6**(5.9 mg,  $t_R = 24$  min);Fr. 19以甲醇-水(25:75, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**7**(4.1 mg,  $t_R = 42$  min)、化合物**8**(12.4 mg,  $t_R = 48$  min);以甲醇-水(30:70, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**9**(2.3 mg,  $t_R = 34$  min)。Fr. 25经HPLC反复制备,以甲醇-水(30:70, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**10**(1.1 mg,  $t_R = 16$  min);以甲醇-水(38:62, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**11**(3.1 mg,  $t_R = 30$  min)。Fr. 22经HPLC反复制备,以甲醇-水(8:92, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**12**(4.3 mg,  $t_R = 6$  min);以甲醇-水(25:75, V/V, 流速3 mL/min)洗脱,得到化合物**13**(5.7 mg,  $t_R = 18$  min)。

### 2.3 细胞毒性测定

分别测定化合物**2-12**对弥漫大B细胞淋巴瘤细胞(OCI-LY10)、人结肠癌细胞(HT-29)、人急性单核细胞白血病细胞(MV4-11)、人宫颈癌细胞(Hela)和人卵巢癌细胞(SKOV3)的细胞毒性,阳性对照药物为紫杉醇。

试验方法参考文献[17]。

## 3 结果与分析

### 3.1 结构鉴定

苯乙酸(**1**):黄色胶质状固体;ESI-MS  $m/z$ : 137 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.32-7.19 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 3.58 (2H, s, H-2); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 174.7 (C-1), 136.6 (C-1'), 130.3 (C-2', 6'), 129.5 (C-3', 5'), 127.7 (C-4'), 42.6 (C-2)。以上数据与苯乙酸的数据<sup>[18]</sup>基本一致。

3,6-二异丙基-1-甲基哌嗪-2,5-二酮(**2**):黄色胶质状固体;ESI-MS  $m/z$ : 213 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 4.73 (1H, d,  $J = 11.3$  Hz, H-3), 4.34 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-6), 3.02 (3H, s, 1-NCH<sub>3</sub>), 2.31 (1H, ddt,  $J = 13.5, 11.3, 6.7$  Hz, H-7), 2.20 (1H, ddd,  $J = 19.7, 12.3, 6.6$  Hz, H-10), 1.12 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-11), 1.05 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-9), 1.00 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-12), 0.97 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-8); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 171.9 (C-5), 171.3 (C-2), 84.9 (C-3), 66.0 (C-6), 31.4 (C-10), 30.3 (1-NCH<sub>3</sub>, C-7), 20.9 (C-11), 19.8 (C-8, 9), 18.5 (C-12)。以上数据与3,6-二异丙基-1-甲基哌嗪-2,5-二酮的数据<sup>[19]</sup>基本一致。

Fusarpyrone A (**3**):黄色胶质状固体;ESI-MS  $m/z$ : 181 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.53 (1H, d,  $J = 7.1, 1.3$  Hz, H-4), 6.60 (1H, q,  $J = 7.2, 6.1$  Hz, H-3'), 6.39 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-3), 4.39 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 1.91 (3H, s, H-1'), 1.86 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-4'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 163.8 (C-6), 161.7 (C-

2), 141.0 (C-4), 129.6 (C-3'), 128.5 (C-2'), 127.0 (C-5), 102.3 (C-3), 59.9 (C-5'), 14.2 (C-4'), 12.1 (C-1')。以上数据与fusarpyrone A的数据<sup>[20]</sup>基本一致。

(+)-Fusagerin B (**4**):橙黄色胶质状固体;  $[\alpha]_D^{20} = +14.3$  ( $c = 0.15$ , MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 267 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.95 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz, H-3), 6.08 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz, H-2), 5.00 (1H, dd,  $J = 10.7, 4.4$  Hz, H-10), 3.74 (3H, s, H-15), 2.92 (3H, s, H-14), 2.66 (1H, dd,  $J = 14.3, 7.9$  Hz, H-9b), 2.47 (1H, dd,  $J = 14.3, 7.3$  Hz, H-9a), 1.70 (3H, s, H-13), 1.64 (3H, s, H-12); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 174.9 (C-8), 167.4 (C-1), 158.2 (C-6), 145.8 (C-3), 139.3 (C-11), 122.8 (C-2), 116.3 (C-10), 67.5 (C-4), 52.3 (C-15), 36.5 (C-9), 26.0 (C-14), 24.7 (C-12), 18.2 (C-13)。以上数据与(+)-fusagerin B的数据<sup>[21]</sup>基本一致。

N-苯乙基乙酰胺(**5**):淡黄色粉末;ESI-MS  $m/z$ : 164 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.23 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.38 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-8), 2.78 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-7), 1.90 (3H, s, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 173.2 (C-1'), 140.5 (C-1), 129.8 (C-3, 5), 129.5 (C-2, 6), 127.3 (C-4), 42.1 (C-8), 36.5 (C-7), 22.5 (C-2')。以上数据与N-苯乙基乙酰胺的数据<sup>[22]</sup>基本一致。

Fungerin (**6**):淡黄色胶质状固体;ESI-MS  $m/z$ : 235 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.63 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-3), 7.61 (1H, s, H-6), 6.40 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-2), 5.08 (1H, dddd,  $J = 6.9, 5.5, 2.8, 1.4$  Hz, H-10), 3.75 (3H, s, 1-OCH<sub>3</sub>), 3.60 (3H, s, 7-CH<sub>3</sub>), 3.49 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-9), 1.80 (3H, s, H-12), 1.74 (3H, d,  $J = 1.1$  Hz, H-13); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 169.9 (C-1), 140.5 (C-6), 136.5 (C-3), 136.4 (C-11), 135.6 (C-8), 134.3 (C-4), 120.4 (C-10), 114.6 (C-2), 52.0 (1-OCH<sub>3</sub>), 32.1 (7-CH<sub>3</sub>), 25.7 (C-12), 23.0 (C-9), 18.0 (C-13)。以上数据与fungerin的数据<sup>[23]</sup>基本一致。

Callyspongidiptide A (**7**):白色粉末;ESI-MS  $m/z$ : 227 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 4.19 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-9), 4.07 (1H, s, H-6), 3.57 (1H, m, H-3), 3.50 (1H, m, H-3), 2.33 (1H, m, H-5), 2.16 (1H, m, H-10), 1.96 (3H, m, H-4, 5), 1.44 (1H, m, H-11), 1.31 (1H, m, H-11), 1.07 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-13), 0.93 (3H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-12); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 172.4 (C-1), 167.6 (C-7), 61.3 (C-6), 60.0 (C-9), 46.2 (C-3), 37.1 (C-11), 29.5 (C-5), 25.4 (C-10), 23.2 (C-4), 15.5 (C-13), 12.5 (C-12)。以上数据与callyspongidiptide A的数据<sup>[24]</sup>基本一致。

环-(S-脯氨酸-R-亮氨酸)(**8**):红色胶质状固体;ESI-MS  $m/z$ : 211 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 4.26 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-9), 4.13 (1H, s, H-6), 3.51 (2H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-3), 2.29 (1H, s, H-5a), 2.09-1.81 (5H, m, 4, 5b, 10, H-11), 1.52 (1H, m, H-10a), 0.96 (6H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-12, 13); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 172.8 (C-1), 168.9 (C-7), 60.3 (C-6), 54.7 (C-9), 46.4 (C-3), 39.4 (C-10), 29.1 (C-5), 25.8 (C-11), 23.6 (C-4), 23.3 (C-12), 22.2 (C-13)。以上数据与环-(S-脯氨酸-R-亮氨酸)的数据<sup>[24]</sup>基本一致。

Vomifolilol (**9**):淡黄色胶质状固体;ESI-MS  $m/z$ : 225

[M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 5.88 (1H, s, H-4), 5.82 (1H, dd, *J* = 15.7, 4.4 Hz, H-8), 5.77 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-7), 4.31 (1H, td, *J* = 6.4, 4.4 Hz, H-9), 2.48 (1H, d, *J* = 17.0 Hz, H-2a), 2.16 (1H, d, *J* = 16.7 Hz, H-2b), 1.91 (3H, d, *J* = 1.3 Hz, H-13), 1.24 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-10), 1.04 (3H, s, H-11), 1.02 (3H, s, H-12); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 201.2 (C-3), 167.4 (C-5), 137.0 (C-8), 130.0 (C-7), 127.1 (C-4), 80.0 (C-6), 68.6 (C-9), 50.8 (C-2), 42.4 (C-1), 24.5 (C-12), 23.8 (C-11), 23.5 (C-10), 19.5 (C-13). 以上数据与vomifolilol的数据<sup>[25]</sup>基本一致。

环-(4-*S*-羟基-*R*-脯氨酸-*R*-异亮氨酸) (10): 无色胶状固体; ESI-MS *m/z*: 227 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 4.47 (2H, m, H-6, 9), 4.11 (1H, m, H-4), 3.72 (1H, dd, *J* = 12.9, 4.6 Hz, H-3a), 3.41 (1H, d, *J* = 12.9 Hz, H-3b), 2.28 (1H, dd, *J* = 13.2, 6.1 Hz, H-5a), 2.16 (1H, m, H-10), 2.03 (1H, ddd, *J* = 13.2, 11.5, 4.3 Hz, H-5b), 1.45 (1H, m, H-11a), 1.33 (1H, m, H-11b), 1.07 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-12), 0.93 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-13); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 172.7 (C-7), 167.7 (C-1), 68.8 (C-4), 61.2 (C-9), 58.3 (C-6), 55.2 (C-3), 38.7 (C-5), 37.0 (C-10), 25.5 (C-11), 15.5 (C-13), 12.7 (C-12). 以上数据与环-(4-*S*-羟基-*R*-脯氨酸-*R*-异亮氨酸)的数据<sup>[26]</sup>基本一致。

*N*-acetyl-β-oxotryptamine (11): 白色粉末; ESI-MS *m/z*: 217 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.21 (2H, m, H-2, 4), 7.46 (1H, dd, *J* = 6.7, 1.7 Hz, H-7), 7.22 (2H, m, H-5, 6), 4.59 (2H, s, H-2'), 2.07 (3H, s, H-5'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 191.9 (C-1'), 173.7 (C-4'), 138.3 (C-7a), 134.2 (C-2), 126.9 (C-3a), 124.4 (C-6), 123.3 (C-5), 122.7 (C-4), 114.9 (C-3), 113.0 (C-7), 47.1 (C-2'), 22.5 (C-5'). 以上数据与*N*-acetyl-β-oxotryptamine的数据<sup>[27]</sup>基本一致。

烟酸 (12): 白色粉末; ESI-MS *m/z*: 124 [M+H]<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 9.12 (1H, s, H-2), 8.72 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H-6), 8.40 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, H-4), 7.56 (1H, dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 167.9 (COOH), 153.6 (C-2), 151.3 (C-6), 139.2 (C-4), 128.9 (C-3), 125.2 (C-5). 以上数据与烟酸的数据<sup>[28]</sup>基本一致。

邻羟基苯乙酸 (13): 白色粉末; ESI-MS *m/z*: 153 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.10 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-6'), 7.06 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-3'), 6.77 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-4'), 6.76 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-5'), 3.57 (2H, s, H-2); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 37.1 (C-2), 116.1 (C-3'), 120.5 (C-5'), 123.1 (C-1'), 129.2 (C-4'), 132.0 (C-6'), 156.8 (C-2'), 176.3 (C-1). 以上数据与邻羟基苯乙酸的数据<sup>[18]</sup>基本一致。

### 3.2 活性筛选结果

对化合物2-12进行药理活性测试, 结果显示化合物6对3种癌细胞株都有不同程度的抑制作用, 其中对OCI-LY10抑制作用较强, IC<sub>50</sub>值为23.98 ± 2.37 μmol/L, 对HT-29、MV4-11、Hela、SKOV3具有一定的抑制能力, 但抑制能力较弱, IC<sub>50</sub>值分别为93.63 ± 1.42、90.64 ± 1.65、77.65 ± 1.35、52.52 ± 2.04 μmol/L (表1)。

## 4 讨论与结论

本研究从川芎内生菌 *F. tricinctum* 中分离得到13个化合物。已有报道表明生物碱类具有广泛药理活性, 如抗肿瘤、抗菌、消炎镇痛等; α-吡喃酮类化合物具有调节植物生长、抗肿瘤、抑制HIV蛋白酶等活性; 环二肽类衍生物具有抗肿瘤、介导细胞间信号、钙拮抗等活性; 化合物6有抗真菌活性; 化合物11能选择性抑制克氏锥虫的生长。本研究显示化合物6对OCI-LY10、HT29、MV4-11、Hela和SKOV3细胞具有较弱的细胞毒活性, 推测是由于化合物6的结构中含有*N*-甲基咪唑基团。目前国内对外对川芎内生菌的次生代谢产物研究相对较少, 本研究在丰富了镰孢属真菌化学结构的多样性同时, 为从川芎内生菌中发现与寄主产生类似的药理活性的化合物提供科学依据。

表1 化合物对5种癌细胞株的IC<sub>50</sub>值 ( $\bar{x} \pm s$ , *N* = 3)

Table 1 IC<sub>50</sub> value of the compounds to five different cancer cell lines ( $\bar{x} \pm s$ , *N* = 3)

化合物 Compounds	癌细胞株 Cancer cell lines (IC <sub>50</sub> /μmol L <sup>-1</sup> )				
	OCI-LY10	HT-29	MV4-11	Hela	SKOV3
2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
3	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
4	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
5	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
6	23.98 ± 2.37	93.63 ± 1.42	90.64 ± 1.65	77.65 ± 1.35	52.52 ± 2.04
7	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
8	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
9	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
10	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
11	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
12	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
紫杉醇 Paclitaxel	0.019 ± 0.007	0.049 ± 0.018	0.069 ± 0.006	0.126 ± 0.027	0.061 ± 0.025

## 参考文献 [References]

1 国家药典委员会, 中华人民共和国药典: 1部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 40 [Chinese pharmacopoeia commission,

pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1 [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 40]

- 2 王海. 川芎内生菌对品质影响的初步研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012 [Wang H. The study on the effect of the endophytes to the quality of *Ligusticum chuanxiong* Hort. (Umbellales) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2012]
- 3 马川, 蒙春旺, 彭成, 熊亮, 周勤梅. 川芎内生菌 *Cladosporium* sp. 次级代谢产物及抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, **31** (1): 69-74+29 [Ma C, Meng CW, Peng C, Xiong L, Zhou QM. Isolation and identification of secondary metabolites of endophytic fungus *Cladosporium* sp. and study of antimicrobial activity [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2019, **31** (1): 69-74+29]
- 4 李涛, 张智慧, 邓倩, 马洪鑫, 丁海娥. 两面针、川芎、生首乌内生真菌的分离纯化及抑菌性研究[J]. 食品安全导刊, 2015 (36): 100-102 [Li T, Zhang ZH, Deng Q, Ma HX, Ding HE. Isolation, purification and antimicrobial activity of endophytic fungi from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC, *Ligusticum chuanxiong* Hort., *Fallopia multiflora* [J]. *Chin Food Saf Mag*, 2015 (36): 100-102]
- 5 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 609 [Wei JC. Handbook of fungal identification [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979: 609]
- 6 郭成, 李金花, 柴兆祥. 天祝高寒草地三线镰孢的分离鉴定及  $\beta$ -tubulin 基因序列分析[J]. 应用与环境生物学报, 2011, **17** (1): 51-56 [Guo C, Li JH, Chai ZX. Isolation, identification and analysis of  $\beta$ -tubulin gene sequence of *Fusarium tricinctum* at different altitudes in Tianzhu alpine grassland [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, **17** (1): 51-56]
- 7 Visconti A, Solfrizzo M. Visoltricin, a novel biologically active compound produced by *Fusarium tricinctum* [J]. *Food Addit Contam*, 1995, **12** (3): 515-519
- 8 Zhang Y, Zhao JL, Wang JH, Shan TJ, Mou Y, Zhou LG, Wang, JG. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil from *Fusarium tricinctum*, the endophytic fungus in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, **6** (11): 1759-1762
- 9 Cuomo V, Randazzo A, Meca G, Moretti A, Cascone A, Eriksson O, Novellino E, Ritieni A. Production of enniatins A, A(1), B, B-1, B-4, J(1) by *Fusarium tricinctum* in solid corn culture: structural analysis and effects on mitochondrial respiration [J]. *Food Chem*, 2013, **140** (4): 784-793
- 10 Bashyal BP, Gunatilaka AAL. Tricinonoic acid and tricindiol, two new irregular sesquiterpenes from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* [J]. *Nat Prod Res*, 2010, **24** (4): 349-356
- 11 Norppa H, Penttila M, Sorsa M, Hintikka EI, Illus T. Mycotoxin-t-2 of *Fusarium tricinctum* and chromosome changes in Chinese-hamster bone-marrow [J]. *Hereditas*, 1980, **93**(2): 328-332
- 12 Hemphill CFP, Sureechatchaiyan P, Kassack MU, Orfali RS, Lin WH, Daletos G, Proksch P. OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum* [J]. *J Antibiot*, 2017, **70** (6): 726-732
- 13 Nenkep V, Yun K, Zhang D, Choi HD, Kang JS, Son BW. Induced production of bromomethylchlamyosporols A and B from the marine-derived fungus *Fusarium tricinctum* [J]. *J Nat Prod*, 2010, **73** (12): 2061-2063
- 14 Sun WJ, Zhu HT, Zhang TY, Zhang MY, Wang D, Yang CR, Zhang CR, Zhang YX, Zhang YJ. Two new alkaloids from *Fusarium tricinctum* SYPF 7082, an endophyte from the root of *Panax notoginseng* [J]. *Nat Prod Biopros*, 2018, **8** (5): 391-396
- 15 Zhang JN, Liu D, Wang H, Liu TX, Xin ZH. Fusartricin, a sesquiterpenoid ether produced by an endophytic fungus *Fusarium tricinctum* Salicorn 19 [J]. *Eur Food Res Technol*, 2015, **240** (4): 805-814
- 16 Ola ARB, Thomy D, Lai D, Brotz-Oesterhelt H, Proksch P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis* [J]. *J Nat Prod*, 2013, **76** (11): 2094-2099
- 17 Li XH, Han XH, Qin LL, He JL, Cao ZX, Gu YC, Guo DL, Deng Y. Isochromanes from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus from *Cordyceps sinensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2019, **33** (13): 1870-1875
- 18 Gutierrez-Lugo MT, Woldemichael GM, Singh MP, Suarez PA, Maiese WM, Montenegro G, Timmermann BN. Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *Micromonospora* sp. P1068 [J]. *Nat Prod Res*, 2005, **19** (7): 645-652
- 19 Guo ZY, Li XS, Zhang L, Feng ZW, Deng ZS, He HB, Zou K. Cytotoxic tremulanes and 5,6-secotremulanes, four new sesquiterpenoids from a plant-associated fungus X1-2 [J]. *Nat Prod Res*, 2016, **30** (22): 2582-2589
- 20 Trisuwan K, Rukachaisirikul V, Borwornwiriyan K, Phongpaichit S, Sakayaroj J. Pyrone derivatives from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG37 [J]. *Phytochem Lett*, 2013, **6** (3): 495-497
- 21 Wen H, Li Y, Liu XZ, Ye WC, Yao XS, Che YS. Fusagerins A-F, new alkaloids from the fungus *Fusarium* sp. [J]. *Nat Prod Biopros*, 2015, **5** (4): 195-203
- 22 王航航, 李刚, 彭晓婷, 姜红祥. 狭叶十大功劳内生真菌 *Colletotrichum fioriniae* F18 的次级代谢产物研究[J]. 药学报, 2018, **53** (11): 1862-1867 [Wang HH, Li G, Peng XP, Lou HX. Secondary metabolites from *Colletotrichum fioriniae* F18, an endophytic fungus isolated from the medicinal plant *Mahonia fortunei* [J]. *Acta Pharm*, 2018, **53** (11): 1862-1867]
- 23 Uchida R, Imasato R, Yamaguchi Y, Masuma R, Shiomi K, Tomada H, Omura S. New insecticidal antibiotics, hydroxyfungerins A and B, produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079 [J]. *J Antibiot*, 2010, **37** (23): 804-809
- 24 Yang B, Dong JD, Zhou XF, Yang XW, Lee KJ, Wang LS, Zhang S, Liu YH. Proline-containing dipeptides from a marine sponge of a *Callyspongia* species [J]. *Helv Chim Acta*, 2009, **92** (6): 1112-1117
- 25 Jong TT, Jean MY. Constituents of *Houttuynia cordata* and the crystal structure of vomifolol [J]. *J Chin Chem Soc-Taipei*, 1993, **40** (4): 399-402
- 26 Ovenden SPB, Nielson JL, Liptrot CH, Willis RH, Tapiolas DM, Wright AD, Motti CA. A new diketopiperazine, *cyclo*-(4-S-hydroxy-R-proline-R-isoleucine), from an Australian specimen of the sponge *Stelletta* sp. [J]. *Mar Drugs*, 2011, **9** (11): 2469-2478
- 27 Martinez-Luis S, Gomez JF, Spadafora C, Guzman HM, Gutierrez M. Antitrypanosomal alkaloids from the marine bacterium *Bacillus pumilus* [J]. *Molecules*, 2012, **17** (9): 11146-11155
- 28 马宏宇, 孙奕, 吕阿丽, 陈刚, 吴红华, 裴月湖. 茵陈蒿化学成分分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2010, **20** (1): 61-63+69 [Ma HY, Sun Y, Lü AL, Chen G, Wu HH, Pei YH. Isolation and identification of chemical constituents from *Artemisia capillaries* Thunb. [J]. *J Med Chem*, 2010, **20** (1): 61-63+69]