

文章编号:1673-0062(2008)04-0001-06

南海红树林内源真菌#2240 的四个格链孢酚类衍生物次级代谢产物研究

谭 倪^{1,2}, 刘 磊³, 佘志刚², 林永成²

(1. 南华大学 化学化工学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 中山大学 化学化工学院, 广东 广州 510275
3. 湖南交通工程职业技术学院, 湖南 衡阳 421001)

摘要:通过人工发酵培养, 利用层析技术, 首次从南海红树林内源真菌#2240的培养液中分离得到4个格链孢酚类衍生物次级代谢产物, 它们分别是: 4-甲氧基-10-乙酸格链孢酚酯(化合物1)、格链孢酚(化合物2)、4-甲氧基格链孢酚(化合物3)、4,10-二甲氧基格链孢酚(化合物4)。其结构通过谱图分析(包括¹H、¹³C NMR, DEPT, HMQC, HMBC, HREIMS, UV及IR等)和相关文献得以确定。初步药理实验表明, 化合物2和3对KB和KBv200癌细胞具有较强活性, IC₅₀值分别为3.17、3.12 μg/mL和4.82、4.94 μg/mL, 化合物1和4对上述两种癌细胞的抑制活性较弱, IC₅₀值均超过50 μg/mL。并且从生源途径角度也初步探索了上述四个化合物之间的相互关系。

关键词:红树林内源真菌; 格链孢酚类衍生物; 次级代谢产物; 抑制活性; 生源途径
中图分类号: O656.2 文献标识码: A

Research on Four Alternariol Derivatives Produced by the Mangrove Endophytic Fungus #2240 from the South China Sea

TAN Ni^{1,2}, LIU Lei³, SHE Zhi-gang², LIN Yong-cheng²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China; 3. Hunan Technical College of Communications & Engineering, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Four alternariol derivatives, alternariol 4-methoxy-10-acetoxy ester (compound 1), alternariol (compound 2), alternariol monomethyl ether (compound 3), and alternariol 4,10-dimethyl ether (compound 4), were isolated from the culture media of

收稿日期: 2008-04-02

基金项目: 国家“863”课题资助项目(2006AA09Z422); 国家自然科学基金资助项目(20072058); 南华大学博士启动基金。

作者简介: 谭 倪(1970-), 男, 湖南衡阳人, 南华大学化学化工学院副教授, 博士。主要研究方向: 主客体化学、天然药物化学。

mangrove endophytic fungus #2240 collected from a mangrove *Castaniopsis Fissa* at the South China Sea coast through chromatographic separation. Their structures were unambiguously elucidated by the related literatures and the spectral analysis including ^1H , ^{13}C NMR, DEPT, HMQC, HMBC, HREIMS, IR, and UV. The anticancer tests showed that compound 2 and 3 had strong activities against KB and KBv200 cells with IC_{50} values of 3.17, 3.12 and 4.82, 4.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while compound 1 and 4 exhibited weak activities against the two kinds of tumor lines with IC_{50} values of more than 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In addition, the plausible biogenetic path for compound 1, 2, 3 and 4 were also discussed.

Key words: mangrove endophytic fungus; alternariol derivatives; secondary metabolites; inhibition activity; biogenetic path

植物内源真菌是指部分或全部生命周期都生活在植物健康组织的细胞之间或细胞内部。内源真菌对寄主的关系可以是潜在的病原菌,也可以是两者互惠共生关系^[1]。红树林是指生活在浅海滩上具有适应海潮浸淹生理机制的一类微管植物,它是一种热带和亚热带海岸盐滩上潮间带特有的植物群落,在形态、生理、生态等方面都有其特殊性^[2]。近二十年来,红树林栖息地被证明是真菌新种属的丰富来源,这形成了海洋真菌第二大的生态学亚类。对红树林真菌代谢产物的研究,到目前为止,已有过一些报道^[3-5]。中山大学天然有机化学实验室在对中国南海海洋内源真菌活性代谢产物的研究过程中,得到了许多结构新颖、具有生理活性的化合物^[6-8]。

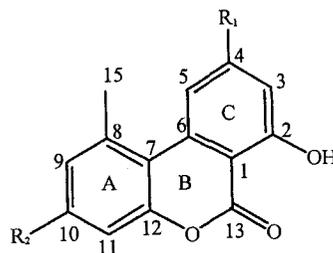
内源真菌#2240, 采自香港海域红树 *Castaniopsis Fissa* 树叶。使用 GYP 培养基室内静置发酵培养, 从培养液的乙酸乙酯萃取部分分离得到 4 个格链孢酚类衍生物, 通过波谱分析和理化常数对照, 鉴定了它们的化学结构分别为 4-甲氧基-10-乙酸格链孢酚酯(1)、格链孢酚(2)、4-甲氧基格链孢酚(3)和 4,10-二甲氧基格链孢酚(4), 如图 1 所示。体外活性实验初步表明化合物 2 和 3 对 KB 和 KBv200 癌细胞具有较强活性, IC_{50} 值分别为 3.17、3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4.82、4.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 化合物 1 和 4 对上述两种癌细胞的抑制活性较弱, IC_{50} 值均超过 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

北京 X4 型显微熔点仪, 温度计未校正; Varian INOVA 500NB (^1H NMR 谱 500 MHz, ^{13}C NMR 谱 125 MHz, TMS 内标) 核磁共振仪; Varian Mercury-Plus 300 (^1H NMR 谱 300 MHz, ^{13}C NMR 谱 75.5 MHz, TMS 内标) 核磁共振仪; Thermo

MAT95XP 高分辨质谱仪; Thermo DSQ 电子轰击电离质谱仪; EQUINOX55-A590/3F (Bruker) 红外仪; 日本岛津公司 UV-2501PC 紫外和可见吸收光谱仪; 石油醚、乙酸乙酯、甲醇、氯仿为工业纯试剂, 使用前重蒸; 葡萄糖 (CR); 蛋白胨 (BR); 酵母膏 (BR); 粗海盐 (微生物养殖用); 薄层层析硅胶 GF₂₅₄ 和柱层析硅胶 (200~300 目粗硅胶及硅胶 H) 为青岛海洋化工厂生产。



1. $\text{R}_1 = \text{MeO}, \text{R}_2 = \text{Ac}$ 2. $\text{R}_1 = \text{OH}, \text{R}_2 = \text{OH}$
3. $\text{R}_1 = \text{MeO}, \text{R}_2 = \text{OH}$ 4. $\text{R}_1 = \text{MeO}, \text{R}_2 = \text{MeO}$

图 1 化合物 1-4 的结构式

Fig. 1 The structures of compound 1-4

1.2 微生物培养

红树林内源真菌#2240, 采自香港, 由香港城市大学 E B G Jones 和 L L P Vrijmoed 提供, 由于没有孢子, 真菌种属尚未鉴定, 菌种保存在中山大学和香港城市大学内。菌种以 PDA 为培养基, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。发酵培养基为 GYP: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 酵母膏 1 g/L, 粗海盐 2 g/L, pH 7.0。500 mL 三角瓶内装培养液 300 mL, 经 121 $^{\circ}\text{C}$ (0.1 mPa) 高温灭菌 15 min 后接种 150 L, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 35 d。

1.3 提取与分离

150 L 发酵物过滤得发酵液和菌丝体, 发酵液由 150 L 加热浓缩至 3 L 后, 乙酸乙酯充分萃

提,菌体用甲醇在 60℃ 多次浸提.对发酵液提取浓缩物(约 10 g)以体积比 1:2 拌硅胶(0.074 ~ 0.049 mm)进行柱层析,以石油醚/乙酸乙酯/甲醇梯度洗脱,收集各组分再经反复柱层析,制备薄层层析,重结晶纯化得到化合物:1(8 mg),2(42 mg),3(18 mg),4(9 mg).

化合物 1:白色无定形粉末,mp 197 ~ 199 °C,得率为 0.08%;化合物 2:黄色无定形粉末,得率为 0.42%;化合物 3:淡紫色无定形粉末,mp 277 ~ 279 °C,得率为 0.18%;化合物 4:黄色无定形粉末,mp 183 ~ 185 °C,得率为 0.09%.

1.4 抗癌活性实验

KB 和 KBv200 为人类口腔癌细胞,KBv200 由 KB 克隆得到,通过增加大剂量长春新碱 VCR 和 EMS(ethylmethane sulfonate)而使其表现出高耐药性(high levels of P-gp).同 KB 细胞进行比较,KBv200 抵抗 VCR 能力要强 100 倍左右. KB 和 KBv200 癌细胞从中国药物科学研究所(北京)所得,通常保存在 RPMI 1640 溶液中(100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, and 10% FBS).细胞于 37°C,潮湿恒温箱(含 5% CO₂ 和 95% 空气)内培养生长.该实验由中山大学肿瘤防治中心实验研究部,华南肿瘤学国家重点实验室张建业博士帮助完成.

MTT 毒性试验:将对数增长期的 KB 和 KBv200 肿瘤细胞制备成靶细胞悬液.取 96 孔培养板,每孔加入 190 μL,3.0 × 10³ 靶细胞悬液,24 h 恒温培养后,加入 10 μL 含不同浓度受试物的培养基,对照组加等体积的含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液.置 37°C,5% CO₂ 条件下培养 68 h,弃上清液,直接于光学显微镜下观察细胞形态.然后加入 MTT 液 10 μL/孔,继续培养 4 h,弃上清.加入 DMSO 100 μL/孔,吹打,使结晶充分溶解,用酶标仪以试验波长为 570 nm,参比波长为 450 nm 测定光密度 OD 值.杀伤率 = (对照孔 OD 值 - 药物孔 OD 值)/对照孔 OD 值.绘制剂量反应回归曲线,计算半数杀伤浓度 IC₅₀(Bliss' software).

2 结果与讨论

2.1 化合物的波谱数据

化合物 1,¹H-及¹³C-NMR 数据见表 1;UV λ_{max}(MeOH) 254 nm(logε 2.85);FTIR(KBr) ν_{max} 3431, 3086, 2942, 1757, 1671, 1625, 1604, 1593, 1351, 1210, 1151, 1103, 980, 903, 854, 801,

707 cm⁻¹;HREIMS *m/z* 314.0781 [M]⁺(计算值 314.0785),EIMS *m/z* 314 M⁺.

化合物 2,¹H NMR(300 MHz,acetone-d₆):δ 2.77(s,3H),6.44(d,1H,2.1),6.69(d,1H,2.4),6.78(d,1H,2.4),7.33(d,1H,2.1),9.48(br,s,2H),11.91(s,1H);¹³C NMR(75 MHz,acetone-d₆):δ 26.70(Me),100.14 111.61(2 Ar-C),102.79 103.59 106.12 119.21(4 Ar-CH),140.39(2 Ar-C),154.92 160.08 166.72 166.80 166.81(4 Ar-C-OR,CO);IR(KBr):3448,3185,2974,1662,1615,1580,1515,1465,1421,1352,1265,1253,1203,1167,1128,1055,995,937,854,797,750,638 cm⁻¹;EIMS:258(M⁺),241([M-OH]⁺).

化合物 3,¹H NMR(500 MHz,DMSO-d₆):δ 2.72(s,3H),3.90(s,3H),6.59(d,1H,2.5),6.63(d,1H,2.0),6.71(d,1H,2.0),7.20(d,1H,2.5),10.28(s,1H),11.79(s,1H);¹³C NMR(125 MHz,DMSO-d₆):δ 24.95(Me),55.78(OMe),98.44(Ar-C),99.13(Ar-CH),101.58(Ar-CH),103.35(Ar-CH),117.55(Ar-CH),108.77(Ar-C),137.75(Ar-C),138.39(Ar-C),152.59 158.52 164.08 164.63 166.13(4 Ar-C-OR,CO);IR(KBr):3395,3325,2986,1650,1617,1589,1568,1464,1424,1356,1276,1231,1167,1036,982,846,778,739,641 cm⁻¹;EIMS 272(M⁺).

化合物 4,¹H NMR(300 MHz,CDCl₃):δ 2.75(s,3H),3.53(s,3H),3.97(s,3H),6.31(d,1H,2.1),6.35(d,1H,2.4),6.63(d,1H,2.4),6.70(d,1H,2.1),11.66(s,1H);¹³C NMR(75 MHz,CDCl₃):δ 24.65(Me),54.81 56.42(2 MeO),105.08 106.91 107.11 125.44(4 Ar-CH),101.27 111.29 137.45 138.99(4 Ar-C),152.67 159.32 159.92 164.18 167.84(4 Ar-C-OR,CO);IR(KBr):3117,2974,1639,1600,1573,1555,1451,1416,1354,1268,1228,1165,1033,843,734,639 cm⁻¹;EIMS 286(M⁺).

2.2 化合物的结构确认

化合物 1 为白色无定形粉末,熔点 197 ~ 199°C,HREIMS 显示其分子离子峰 [M]⁺ *m/z* 314.0781(计算值为 314.0785),结合¹H 和¹³C NMR 信息可确定该化合物分子式为 C₁₇H₁₄O₆(表 1),不饱和度 U = 11 提示分子中可能存在芳香

环. 红外光谱数据(3431, 1757, 1671, 1625, 1604, 1593 cm^{-1})暗示分子中有羟基、羰基和芳环存在. 化合物1的 ^1H NMR谱中有2个甲基信号(δ 2.34, 2.84, each, s), 1个甲氧基信号(δ 3.92, s), 两组间位芳香质子信号(δ 6.61, 6.95, each, d, $J=2.5$ 和7.05, 7.31, each, d, $J=2.0$)和1个螯合酚羟基信号(δ 11.89, s). $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY谱中无任何相关信息也证实了上述间位芳香质子的存在. ^{13}C NMR谱中有17个碳原子信号, 即10个不饱和碳(δ 99.79, 99.87, 105.70, 109.41, 115.62, 122.57, 137.05, 138.23, 150.61, 152.19), 2个甲基(δ 21.12, 25.66), 1个连氧甲基(δ 55.75)和4个低场碳原子(δ 164.96, 165.27, 166.42, 168.83), 这4个低场碳原子应该是羰基碳或者连氧不饱和碳. 化合物不饱和度值11暗示分子内存在三个环. HMBC的相关信息(图2)建立了整个分子的骨架, C-7与H-5、H-9、H-11、H-15的多重相关表明了环A与环B之间的连接部位为C-7, H-16和C-17相关说明了分子内存在一个乙酰基. 综合上述信息, 化合物1的结构可以确定为4-甲氧基-10-乙酸格链孢酚酯.

表1 化合物1的核磁数据表($\text{CDCl}_3-d_1, \delta, 10^{-6}$)
Table 1 NMR data of compound 1
($\text{CDCl}_3-d_1, \delta, 10^{-6}, \text{J/Hz}$)

No.	δ_c (DEPT)	δ_H	HMBC
1	99.79(C)		
2	165.27(C)		
3	99.87(CH)	6.61(d, 2.5 Hz)	C-1, 2, 5
4	166.42(C)		
5	105.70(CH)	7.31(d, 2.0 Hz)	C-1, 3, 4, 7
6	137.05(C)		
7	115.62(C)		
8	138.23(C)		
9	122.57(CH)	6.95 (d, 2.5 Hz)	C-7, 10, 11, 15
10	150.61(C)		
11	109.41(CH)	7.04 (d, 2.5 Hz)	C-7, 9, 10, 12
12	152.19(C)		
13	164.96(C)		
14	55.75(CH_3)	3.92(s)	C-4
15	25.66(CH_3)	2.84(s)	C-7, 9
16	21.12(CH_3)	2.34(s)	C-17
17	168.83(C)		
2-OH		11.89(s)	C-1, 2

化合物2为黄色无定形粉末, 受热易碳化, 室温下不稳定, 放置一段时间后, 颜色变为褐色, 表明分子中可能存在酚羟基. EIMS显示其分子离子峰 M^+ 258, 碎片峰 $[M-OH]^+$ 241. ^1H NMR中有3个活泼氢信息: δ 9.48(br, s, 2H) 11.91(s, 1H). 元素分析表明分子中无N元素, 这说明该3个活泼氢均为酚羟基氢, 其中低场(δ 11.91)的酚羟基(强尖峰)与邻近的羰基形成了分子内氢键. 除此之外, ^1H NMR中还存在两组间位芳香质子信号: δ 6.44 7.33(each, d, $J=2.1$)和6.69 6.78(each, d, $J=2.4$). ^{13}C NMR中有1个甲基碳 δ 26.70(Me), 8个不饱和碳 δ 100.14(C) 111.61(C) 102.79(CH) 103.59(CH) 106.12(CH) 119.21(CH) 140.39(C) 140.40(C), 5个连氧不饱和碳和羰基碳 δ 154.92(C) 160.08(C) 166.0(C) 166.72(C) 166.80(C). 结合文献[9]中的光谱数据, 化合物2可推断为格链孢酚. 格链孢酚为一种真菌毒素, 当大米、土豆、花生、水果等食物发霉变质时通常会产生这种毒素, 动物食用后, 能使机体突变致病.

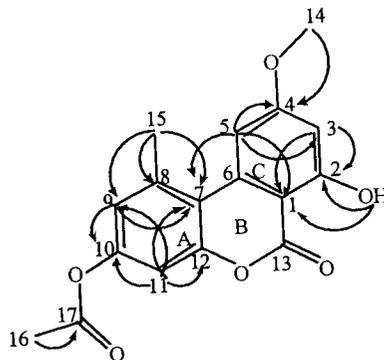


图2 化合物1的主要HMBC信息

Fig. 2 The selective correlations of HMBC for compound 1

化合物3为淡紫色无定形粉末, 熔点 $277 \sim 279$ $^{\circ}\text{C}$, 于空气中易发黄变暗. ^1H NMR显示分子中有1个甲基 δ 2.72(s, 3H), 1个甲氧基 δ 3.90(s, 3H), 两组间位芳香质子 δ 6.63(d, 1H, 2.0) 6.71(d, 1H, 2.0) 6.59(d, 1H, 2.5) 7.20(d, 1H, 2.5), 一个与邻近羰基之间形成了分子内氢键的酚羟基 δ 11.79(s, 1H)和1个没有与羰基螯合的酚羟基 δ 10.28(s, 1H). IR光谱也证实了分子中存在羟基(3395, 3325 cm^{-1}), 羰基(1650 cm^{-1})和芳香环结构(1617, 1589, 1568 cm^{-1}). DEPT谱中有2个伯碳 δ 24.95 55.78, 4个叔碳 δ 99.13 101.58 103.35 117.55, 9个季碳 δ 98.44 108.77 137.75 138.39 152.59 158.52 164.08 164.63

166. 13. EIMS 显示其分子离子峰 M^+ 258, 元素分析表明分子中无 N 元素存在. 根据上述信息及参照文献[10]光谱数据, 可推出化合物 3 为 4-甲氧基格链孢酚. 4-甲氧基格链孢酚也是一种真菌毒素, 有关它和格链孢酚的全合成已于 2005 年被德国 Podlech J 研究组^[9]完成.

化合物 4 为黄色无定形粉末, 熔点 183 ~ 185 °C, 它的¹H NMR 和¹³C NMR 与化合物 3 的谱图十分相似, 前者的氢谱少了 1 个未整合的羟基峰 δ 10.28 (s, 1H), 但却多了 1 个甲氧基 δ 3.53 (s, 3H), 这说明该羟基已被甲基化.¹³C NMR 中前者仅多

了 1 个甲氧基碳 δ 54.81 (OMe), 其余部分大致相同, 这进一步证实了该羟基被甲氧基所取代. 综合上述信息, 可以判断化合物 4 为 4,10-二甲氧基格链孢酚.

2.3 生物合成途径

化合物 1、3 和 4 为格链孢酚的衍生物, 而且它们均从同一株海洋内源真菌#2240 培养液的乙酸乙酯提取物中分离到, 这说明它们之间存在着一定的生源关系. 通过查阅相关文献[11], 可知格链孢酚由丙二酸途径合成, 这样, 我们可以推知化合物 1-4 存在着生源关系(图 3):

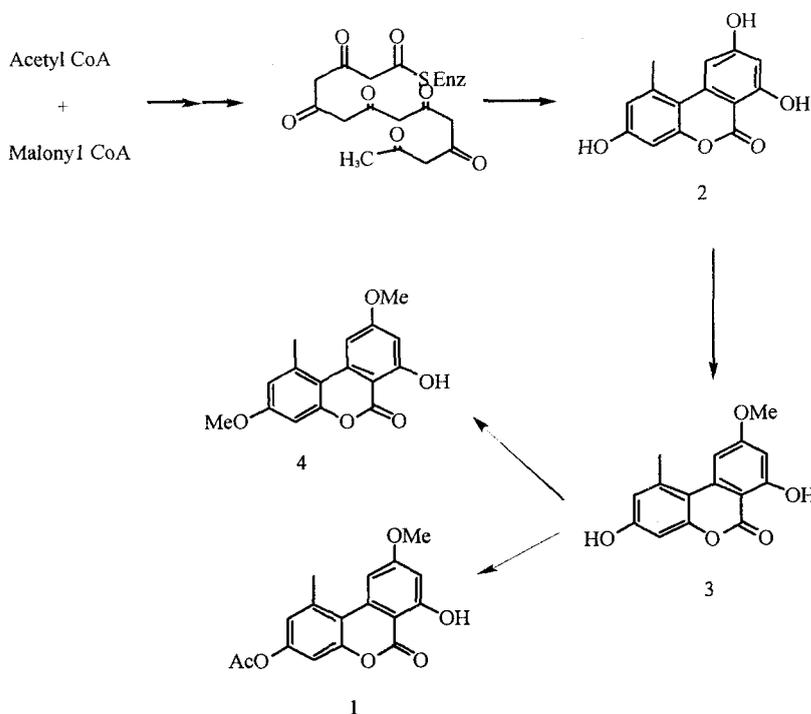


图 3 化合物 1-4 的生源合成图

Fig. 3 The biogenetic path of compound 1-4

2.4 药理活性

为进一步研究上述化合物的生物活性, 对之进行了体外抗癌实验, 初步药理活性显示, 化合物 2 和 3 对 KB 和 KBv200 癌细胞具有较强活性, IC_{50} 值分别为 3.17、3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4.82、4.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 化合物 1 和 4 对这两种癌细胞的抑制活性较弱, IC_{50} 值均超过 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2), 这说明了 10-OH 的存在对抗癌活性的贡献很大, 当它被甲基化和乙酰化后, 化合物对 KB 和 KBv200 的抑制活性便大大减弱.

化合物 1-4 对 DNA 拓扑异构酶(hTopo I)、白色假丝酵母菌、尖孢镰刀菌、金黄色葡萄球菌、大

肠埃希氏菌、肠炎沙门氏菌及枯草芽孢杆菌均不具备有意义的药理活性, IC_{50} 值均大于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

表 2 化合物 1-4 对 KB 和 KBv200 癌细胞抑制活性
Table 2 Effect of compound 1-4 on the growth of two human tumor lines

Compound	KB $IC_{50}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	KBv200 $IC_{50}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	> 50	> 50
2	3.17	3.12
3	4.82	4.94
4	> 50	> 50

参考文献:

- [1] Tan R X, Zou W X. Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites[J]. Nat. Prod. Rep, 2001, 18: 448 - 459.
- [2] 梁士楚. 广西的红树林资源及其可持续利用[J]. 海洋通报, 1999, 18(6): 77 - 83.
- [3] Isaka M, Suyarnsestakorn C, Tanticharoen M, et al. New Resorcylic Macrolides from the Marine Mangrove Fungus *Aigialus Parvus* [J]. J. Org. Chem, 2002, 67: 1561 - 1566.
- [4] Kupka J, Anke T, Steglich W, et al. The Biological Activity of Siccayne, Isolated from the Marine Fungus *Halocyphina Villosa* J. & E. Kohlmeier [J]. J. Antibiot, 1981, 34: 298 - 304.
- [5] Poch G K, Gloer J B. Auranticins A and B, Two New Depsidones from a Mangrove Isolate of the Fungus *Preussia aurantiaca* [J]. J. Nat. Prod, 1991, 54: 213 - 217.
- [6] Lin Y C, Wu X Y, Feng S, et al. Five Unique Compounds: Xyloketales from Mangrove Fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast [J]. J. Org. Chem, 2001, 66(19): 6252 - 6256.
- [7] Lin Y C, Wu X Y, Feng S, et al. A Novel N - Cinnamoyl-cyclopeptide Containing an Allenic Ether from the Fungus *Xylaria* sp. (Strain #2508) from the South China Sea [J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42(3): 449 - 451.
- [8] Chen G Y, Lin Y C, Wen L, et al. Two New Metabolites of a Marine Endophytic Fungus (No. 1893) from an Estuarine Mangrove on the South China Sea Coast [J]. Tetrahedron, 2003, 59(26): 4907 - 4909.
- [9] Koch K, Podlech J, Pfeiffer E, et al. Total Synthesis of Alternariol [J]. J. Org. Chem, 2005, 70: 3275 - 3276.
- [10] An Y H, Zhao T Z, Miao J, et al. Isolation, Identification, and Mutagenicity of Alternariol Monomethyl Ether [J]. J. Agric. Food Chem, 1989, 37: 1341 - 1343.
- [11] Tanahashi T, Takenaka Y, Nagakura N, et al. 6H - Dibenzo[b, d] - pyran - 6 - one Derivatives from the Cultured Lichen Mycobionts of *Graphis* spp. and Their Biosynthetic Origin [J]. Phytochemistry, 2003, 62: 71 - 75.