

草莓番石榴内生真菌 *Nigrospora* sp. 次生代谢产物研究张 琴¹, 罗志强², 贾海燕^{1,3},
何云清¹, 刘佳宝¹, 许自攀¹, 高原^{1,4*}, 杨 健^{2,3*}¹宜宾学院 过程分析与控制四川省高校重点实验室, 宜宾 644000;²中国中医科学院 中药资源中心道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700;³江西省道地药材质量评价研究中心, 南昌 330000;⁴宜宾学院 香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室, 宜宾 644000

摘要: 本文对草莓番石榴内生真菌 *Nigrospora* sp. 的次生代谢产物进行研究。采用正相硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、中压液相色谱等方法对该真菌固态发酵物的甲醇提取物进行分离, 运用波谱技术及 NMR 和 ECD 量子化学计算手段鉴定化合物结构, 并通过 CCK-8 法和二倍稀释法分别对化合物的抗肿瘤和抗菌活性进行评价。共分离鉴定出 11 个化合物, 分别为黑孢内酰胺 A (1)、ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (2)、ganodermaside B (3)、9 α ,11 α -dihydroxyergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (4)、(22E,24R)-24-methyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β ,5,6 β -triol (5)、3 β ,5 α ,9 α -trihydroxy-(22E,24R)-ergosta-7,22-dien-6-one (6)、吡啶-3-甲酸 (7)、(1H-indol-3-yl) oxoacetamide (8)、吡啶-3-甲醛 (9)、pestalotiopyrone A (10)、nigrosporapyrone D (11)。其中, 化合物 1 是新的甾体生物碱。活性评价结果显示, 所有化合物均无抑菌活性, 化合物 1 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有细胞毒活性, 其 IC₅₀ 值为 20.46 μ mol/L。

关键词: 草莓番石榴; *Nigrospora* sp.; 次生代谢产物; 黑孢内酰胺 A; 抗三阴性乳腺癌活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)8-1698-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.8.008

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.8.008

Secondary metabolites of endophytic fungus *Nigrospora* sp.
from *Psidium cattleianum*ZHANG Qin¹, LUO Zhi-qiang², JIA Hai-yan^{1,3},
HE Yun-qing¹, LIU Jia-bao¹, XU Zi-pan¹, GAO Yuan^{1,4*}, YANG Jian^{2,3*}¹Key Lab of Process Analysis and Control of SichuanUniversities, Yibin University, Yibin 644000, China; ²State Key Laboratory for

Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, National Resource Center

for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

³Evaluation and Research Center of Daodi Herbs of Jiangxi Province, Nanchang 330000, China; ⁴Key Lab of

Aromatic Plant Resources Exploitation and Utilization in Sichuan Higher Education, Yibin University, Yibin 644000, China

Abstract: This study aims to investigate the secondary metabolites produced by *Nigrospora* sp., an endophytic fungus derived from *Psidium cattleianum* Afzel. ex Sabine. All metabolites were separated from the methanolic extract of the solid-state fermentation culture of this fungus using positive-phase silica gel column, Sephadex LH-20 column, and medium pressure liquid chromatographies. Spectroscopic methods and quantum chemical calculations of NMR and ECD data were employed for structure determination. CCK-8 assay and two-fold dilution method were adopted to test the antitumor and antimicrobial properties, respectively. Eleven compounds were isolated and identified as nigrolactam A (1), ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one

收稿日期: 2025-05-16

接受日期: 2025-09-24

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2024C007YN); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-21); 过程分析与控制四川省高校重点实验室开放基金(GCFX2022004); 香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室开放基金(22XLZ02)

* 通信作者 E-mail: gy@mail999@126.com, yangchem2012@163.com

(2), ganodermaside B (3), 9 α , 11 α -dihydroxyergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (4), (22E, 24R)-24-methyl-5 α -cholesta-7, 22-dien-3 β , 5, 6 β -triol (5), 3 β , 5 α , 9 α -trihydroxy-(22E, 24R)-ergosta-7, 22-dien-6-one (6), indole-3-carboxylic acid (7), (1H-indol-3-yl) oxoacetamide (8), 3-indolecarbaldehyde (9), pestalotiopyrone A (10), nigrosporapyrone D (11). Among them, none of the compounds exhibited antimicrobial activity, and compound 1 was a new steroidal alkaloid and exhibited cytotoxic activity against triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells, with an IC₅₀ value of 20.46 μ mol/L.

Key words: *Psidium cattleianum*; *Nigrospora* sp.; secondary metabolite; nigrolactam A; anti-triple negative breast cancer activity

植物内生真菌属于有丝孢子和减数孢子子囊菌,它们无症状地存在于植物表皮细胞层以下的组织中,通过静止感染在健康和活组织中寄生。通过长期共存进化,内生真菌与寄主植物建立了共生关系。内生真菌可通过积累次生代谢物促进寄主植物生长,增强寄主植物对生物和非生物胁迫的抗性^[1]。同时,这些代谢物也是药物先导物的重要来源。例如从北美桃儿七(*Podophyllum peltatum*)的内生真菌 *Phialocephala fortinii* 代谢产物中分离出的鬼臼毒素^[2],是3种抗癌药物依托泊苷、替尼泊苷和磷酸依托泊苷的前体。

番石榴属(*Psidium*)植物为桃金娘科乔木,其中草莓番石榴(*P. cattleianum*)为该科传统药用植物,又名鸡矢果、樱桃番石榴,其叶中含有杂萜、倍半萜、三萜、黄酮、木脂素等化学成分^[3],具有止血、镇痛、护肝等功效^[4],其在越南作为传统药物用于治疗糖尿病亦具有悠久历史^[5]。本研究前期从草莓番石榴中分离并鉴定出黑孢属内生真菌 *Nigrospora* sp.,该真菌隶属于子囊菌门粪壳菌纲炭角菌目梨孢假壳科^[6],其次生代谢产物主要包括聚酮、萜类、生物碱、甾体等^[7],多具有抗菌、抗氧化、抗病毒或抗肿瘤等药理作用^[8]。目前,尚无关于草莓番石榴内生真菌化学成分和生物活性的报道。本文对草莓番石榴叶内生真菌 *Nigrospora* sp. 进行化学成分及活性研究,丰富了内生真菌 *Nigrospora* sp. 次生代谢产物的种类,为进一步开发和利用该生物资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与细胞

内生真菌菌株分离自福建漳州产草莓番石榴(*Psidium cattleianum* Afzel. ex Sabine)叶,并利用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)纯化获得。PCR扩增产物由泰百奥生物科技有限公司(重庆)测序,经ITS测序后利用NCBI-BLAST局部基因序列比对工具进行检索,鉴定为黑孢菌属真菌(*Nigrospora* sp.)。分离纯化后的菌种保存于

宜宾学院材料与化学工程学院。

植物病原真菌(苹果轮纹菌 *Physalospora piricola* Nose、草莓黑斑菌 *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Subinetii、棉花枯萎菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder et Hansen、花生叶斑菌 *Cladosporium personatum*)和人类致病细菌(金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、铜绿假单胞菌 *Alternaria longipes*、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*、溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus*、伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhi*)均由安徽中医药大学药学院杨小龙教授惠赠,保存于宜宾学院材料与化学工程学院。

三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞(资源编号:1101HUM-PUMC000014)购于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.2 仪器与试剂

AV-500型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司);Sephacolumn U200型中压制备液相色谱仪(C₁₈色谱柱,15 mm×150 mm,40~63 μ m,常州三泰科技有限公司)。

200~300目正相硅胶(青岛海浪硅胶干燥剂有限公司);Sephadex LH-20(瑞典Amersham Biosciences公司);甲醇、乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷、石油醚(分析纯,成都市科隆化学品有限公司)。

1.3 菌株的分离

将草莓番石榴叶片用无菌水洗净,放入75%乙醇中浸泡3 min,无菌水冲洗3次,10%次氯酸钠浸泡消毒3 min后,再用无菌水冲洗3次,随后将植物组织切成约0.5 cm³小片,插入PDA培养基中,于恒温箱中28℃培养。待切块周围长出肉眼可见菌落时,将新生菌株反复纯化后接种于PDA培养基培养。

1.4 真菌发酵培养

将分离纯化得到的菌株活化培养至最佳状态,挑取菌块5~6块于马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)培养液中完成接种,于摇床28℃,培养3 d,获得种子液。分别取20 mL种子液接种于

含有 100 mL PDB 培养液和 100 g 大米的 500 mL 锥形瓶中,室温培养 60 d。

1.5 提取分离

用甲醇对 *Nigrospora* sp. 菌株的发酵物(200 瓶)进行冷浸提取 3 次,合并滤液,经过滤和减压浓缩,得到 160 g 粗提物。粗提物经硅胶柱色谱分离,分别以石油醚-乙酸乙酯(100:0→98:2→95:5→90:10→80:20→70:30→60:40→50:50→100:0)和乙酸乙酯-甲醇(90:10→80:20→100:0)的混合溶剂进行梯度洗脱,洗脱组分由 TLC 检测合并相同部分,共得 10 个部分 A~J。组分 D 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-乙酸乙酯,100:0→10:1),得到组分 D1~D4,D2 经中压制备液相色谱仪(MPLC)(甲醇-水,95:5)分离得化合物 **2**(15 mg, t_R = 14.5 min),D3 经 Sephadex LH-20 柱色谱(氯仿-甲醇,1:1)分离得到化合物 **11**(2 mg);组分 E 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,99:1→50:50)分离得到 E1~E5,E2 经 Sephadex LH-20 柱色谱(二氯甲烷-甲醇,1:1)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)洗脱得到化合物 **1**(7 mg)、**9**(8 mg)、**10**(22 mg),E4 经 MPLC(甲醇-水,80:20)分离得到化合物 **3**(3 mg, t_R = 12.4 min);组分 F 经硅胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇,60:1→0:100)分离,得到组分 F1 和 F2,F1 经 Sephadex LH-20 柱色谱(二氯甲烷-甲醇,1:1)和 MPLC(甲醇-水,60:40→100:0)分离得到化合物 **4**(2 mg, t_R = 16.9 min)、**5**(2 mg, t_R = 13.8 min)、**6**(18 mg, t_R = 15.1 min),F2 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)分离纯化得到 **7**(5 mg)和 **8**(2 mg)。

1.6 ECD 和 NMR 计算

利用 PC Model 10 软件以 MMFF94 分子力场水平对结构进行分子动力学构象搜索,其最佳能量上限为 10 kcal/mol;利用 Gaussian 16 软件,以含时密度泛函理论方法在 B3LYP/6-31G(d)水平下对构象进一步优化^[9]。分布百分比大于 1% 的构象(甲醇中)在 mPW1PW91/6-311+G(d,p)水平下采用 GIAO 方法进行¹³C NMR 计算;优化构象在 B3LYP/6-311+G(d,p)水平下进行 ECD 计算,应用 SpecDis 1.71 软件根据玻尔兹曼分布加权拟合得出 ECD 谱图^[9]。

1.7 抗菌活性测试

采用二倍稀释法^[10]测定化合物 **1**~**11** 的抗菌活性。将真菌接种于 PDB 培养基,振荡培养 3 d(28 °C,160 r/min);细菌接种于 Luria-Bertani(LB)培养

基,振荡培养 12 h(37 °C,160 r/min)。稀释菌液浓度后备用。在 96 孔板的第 1 排加入 198 μL 稀释后的菌液,第 2~8 排中加入 100 μL 稀释后的菌液。第 1 排孔中分别加入样品、阴性对照、阳性对照各 2 μL,移液枪抽吸混合均匀后吸取 100 μL 混合液至第 2 排,将其混合均匀后吸取 100 μL 混合液至第 3 排,后几排操作同上,最后一排吸出的混合液弃去。将处理好的抗真菌活性测试 96 孔板置于 28 °C 的恒温培养箱中培养 72 h 后观察活性,抗细菌活性测试 96 孔板置于 37 °C 的恒温培养箱中培养 12 h 后观察活性,未见菌落生长的最小化合物浓度为该化合物的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。抗真菌活性测试阳性对照为酮康唑;抗细菌活性测试阳性对照为环丙沙星。

1.8 抗癌活性测试

采用 CCK-8 法^[11]体外评价化合物 **1**、**2**、**6**、**10** 对 MDA-MB-231 细胞的细胞毒性。将 MDA-MB-231 细胞以每孔 5 000 细胞接种于 96 孔板中,于 37 °C 下培养 24 h 后,用不同浓度的试验化合物处理细胞。于 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 2 h。然后使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度值。与未处理的对照细胞归一化后计算相对细胞活力,并使用 GraphPad Prism 9.0.0 计算 IC₅₀ 值。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色粉末(CHCl_3); $[\alpha]_D^{20}$ +265.1 (c 0.24, CHCl_3)。UV 光谱(MeOH)显示在 242 和 293 nm 处有最大吸收峰。HR-ESI-MS: m/z 446.303 3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{NO}_2\text{Na}$, 446.303 0),推断其分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{NO}_2$, 不饱和度为 9。IR(KBr) $\nu_{\max}$: 3 440、2 958、2 929、1 728、1 654、1 456、1 371、1 333、1 247、1 171、972 cm^{-1} ; IR 谱图显示出氨基(3 440 cm^{-1})、羰基(1 728 cm^{-1})和双键(1 654 cm^{-1})的特征吸收信号。¹H NMR 谱显示有 2 个单峰甲基信号: δ_H 0.64(s, H_3 -18)、1.27(s, H_3 -19), 4 个双峰甲基信号: δ_H 0.82(d, J = 6.8 Hz, H_3 -26)、0.84(d, J = 6.8 Hz, H_3 -27)、0.92(d, J = 6.8 Hz, H_3 -28)、1.02(d, J = 6.6 Hz, H_3 -21), 2 个反式双键烯烃质子信号: δ_H 5.15(dd, J = 15.2, 8.4 Hz, H-22)、5.24(dd, J = 15.2, 7.8 Hz, H-23), 以及 2 个单峰烯烃质子信号: δ_H 5.73(s, H-7)、5.55(s, H-4)。¹³C NMR 和 HSQC 谱显示 28 个碳信号(见表 1),分别为 6 个甲基、6 个亚甲基、10 个次甲基、6 个季碳。其中,低场

区可观察到 2 个羰基碳信号[δ_{C} 198.0 (C-3), 166.6 (C-6)]和 3 组双键碳信号[δ_{C} 115.1 (C-4)、161.6 (C-5)、119.0 (C-7)、156.4 (C-8)、134.8 (C-22)、132.7 (C-23)]。综合 NMR 和 MS 谱,推测化合物 **1**

具有麦角甾烷型骨架。其 NMR 数据和专利化合物马勃内酰胺^[12]基本一致,但专利文献中并未通过 2D NMR 对马勃内酰胺的核磁信号进行归属,也未对其立体化学进行讨论。

表 1 化合物 **1** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据 (500、125 MHz, CDCl_3)
Table 1 ^1H NMR and ^{13}C NMR data for compound **1** (500 and 125 MHz, CDCl_3 ,)

No.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	No.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1 α	2.27 (dt, J = 14.2, 3.5 Hz)	35.2	15 α	1.57 (m)	23.4
1 β	1.96 (td, J = 14.4, 4.5 Hz)		15 β	1.51 (m)	
2 α	2.44 (m)	33.0	16 α	1.77 (m)	27.6
2 β	2.35 (dd, J = 17.5, 3.7 Hz)		16 β	1.35 (m)	
3	—	198.0	17	1.37 (m)	56.4
4	5.55 (s)	115.1	18	0.64 (s)	12.4
5	—	161.6	19	1.27 (s)	22.2
6	—	166.6	20	2.04 (ddq, J = 10.1, 8.4, 6.6 Hz)	40.4
7	5.73 (s)	119.0	21	1.02 (d, J = 6.6 Hz)	21.0
8	—	156.4	22	5.15 (dd, J = 15.2, 8.4 Hz)	134.8
9	2.60 (ddd, J = 12.3, 5.4, 2.2 Hz)	46.2	23	5.24 (dd, J = 15.2, 7.8 Hz)	132.7
10	—	40.4	24	1.86 (m)	42.8
11 α	1.86 (m)	25.8	25	1.47 (m)	33.0
11 β	1.72 (m)		26	0.82 (d, J = 6.8 Hz)	19.9
12 β	2.10 (m)	39.3	27	0.84 (d, J = 6.8 Hz)	19.6
12 α	1.45 (m)		28	0.92 (d, J = 6.8 Hz)	17.6
13	—	45.9	NH	7.40 (br s)	
14	2.14 (dd, J = 12.1, 5.5 Hz)	58.2			

由 HMBC 谱(见图 1)可知, H-4 与 C-3、C-5、C-10 相关, H-7 与 C-8、C-9、C-14 相关, H₃-19 与 C-1、C-5、C-9、C-10 相关, H₃-18 与 C-12、C-13、C-14、C-17 相关, H₃-21 与 C-17、C-20、C-22 相关, H₃-28 与 C-

22、C-23、C-24 相关, H₃-27 与 C-24、C-25、C-26 相关, 上述信号进一步确证了麦角甾烷型骨架的存在, 并确定了甲基和烯烃的取代位置。

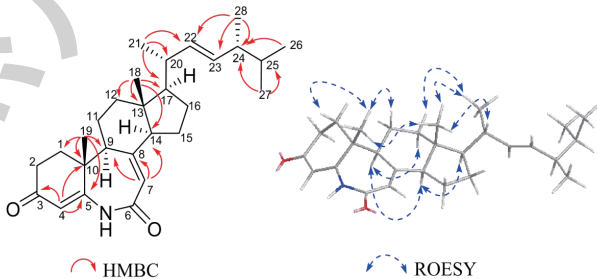


图 1 化合物 **1** 的关键 2D NMR 相关
Fig. 1 Key 2D NMR correlations of compound **1**

值得注意的是,在 HMBC 谱(见图 1)中,酰胺的质子和羰基碳原子均未出现 2D 相关信号,因此不能提供直接证据确定酰胺基团的连接方式,即存在 N 原子位于 C-5/C-6 之间 (**1a**) 或 C-6/C-7 之间

(**1b**) 两种可能结构。采用 PCM-mPW1PW91/6-311 + G(d,p) 水平下的密度泛函理论^[9], 计算异构体 **1a** 和 **1b** 的 ^{13}C NMR 化学位移值,结果显示化合物 **1a** 的理论计算值与实验值吻合 ($R^2 = 0.9966$),明

显优于 **1b** ($R^2 = 0.985$)。进一步对 **1a** 和 **1b** 碳信号的计算值与实验值进行 sDP4 + 、uDP4 + 、DP4 + 概率分析^[13], 在这 3 种水平下的分析结果均显示化合物 **1** 的可能结构为 **1a**。

在 ROESY 谱中(见图 1), H_3-19 与 $H-1\beta/H-11\beta$ 相关, H_3-18 与 H_3-19 相关, 表明 H_3-19 和 H_3-18 的相对构型为 β ; H_3-21 与 $H-12\beta$ 相关, $H-12\alpha$ 与 $H-9$ 相关, $H-9$ 与 $H-14$ 相关, $H-14$ 与 $H-17$ 相关, 表明 $H-9$ 、 $H-14$ 、 $H-17$ 从处于同侧, 构型为 α 。分析侧链优势构象可知, $H-17$ 和 $H-20$ 必须为反式, 以确保 C17-C20 上连接的大基团 (C-13/CH₂-16 与 CH₃-21/CH-22) 互为反式。在 ROESY 谱中(见图 1), H_3-18 与 $H-20/H-21$ 、 $H-12\beta$ 与 H_3-21 均显示出强相关信号, 同时, H_3-21 和 $H-16\alpha$ 无相关信号, 揭示 H_3-18 与 $H-$

20/ H_3-21 处于同侧, $H-22$ 所在侧链处于另一侧。由此可推断 C-20 的相对构型为 R^* , 排除了化合物 **1** 与马勃内酰胺为同一化合物的可能。考虑到化合物 **1** 与 **2~6** 在生物合成上的同源性, 可推测 C-24 的相对构型为 R^* 。

为了进一步确定化合物 **1** 的绝对构型, 通过密度泛函理论方法进行 ECD 模拟计算, 得出当化合物 **1** 的绝对构型为 9*S*, 10*R*, 13*R*, 14*R*, 17*R*, 20*R*, 24*R* 时, ECD 计算曲线和实测曲线具有较好拟合(见图 2), 由此确定化合物 **1** 的绝对构型为 9*S*, 10*R*, 13*R*, 14*R*, 17*R*, 20*R*, 24*R*, 命名为黑孢内酰胺 A (nigrolactam A)。化合物 **1** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 (www.tcrew.ac.cn)。

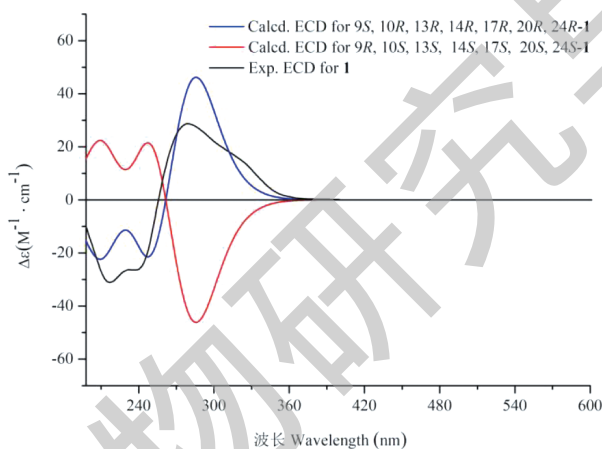


图2 化合物 **1** 的 ECD 计算图谱和实验图谱

Fig. 2 Experimental and calculated ECD spectra of compound **1**

化合物 2 白色固体; 1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.60 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-7), 6.03 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-6), 5.73 (1H, s, H-4), 5.28 ~ 5.18 (2H, m, H-22, H-23), 1.05 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H₃-21), 0.99 (3H, s, H₃-19), 0.96 (3H, s, H₃-18), 0.93 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-28), 0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-27), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-26)。以上数据与文献^[14]报道数据基本一致, 故化合物 **2** 鉴定为 ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one。

化合物 3 白色固体; 1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.81 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-7), 6.15 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-6), 5.78 (1H, s, H-4), 5.27 (1H, dd, $J = 15.2, 7.9$ Hz, H-23), 5.16 (1H, dd, $J = 15.2, 8.7$ Hz, H-22), 4.82 ~ 4.75 (1H, m, H-15), 1.14 (3H, s, H₃-18), 1.05 (3H, s, H₃-19), 1.04 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H₃-21), 0.92 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-28),

0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-27), 0.82 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-26); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 34.1 (C-1), 34.1 (C-2), 199.5 (C-3), 124.0 (C-4), 163.4 (C-5), 126.8 (C-6), 132.2 (C-7), 129.1 (C-8), 44.3 (C-9), 36.8 (C-10), 19.0 (C-11), 35.9 (C-12), 43.0 (C-13), 155.4 (C-14), 69.2 (C-15), 39.0 (C-16), 53.7 (C-17), 20.3 (C-18), 16.7 (C-19), 39.4 (C-20), 21.2 (C-21), 134.6 (C-22), 133.0 (C-23), 42.9 (C-24), 33.1 (C-25), 19.7 (C-26), 20.0 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献^[15]报道数据基本一致, 故化合物 **3** 鉴定为 ganodermaside B。

化合物 4 白色固体; 1H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.59 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-7), 6.14 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-6), 5.79 (1H, s, H-4), 5.30 (1H, dd, $J = 15.2, 7.4$ Hz, H-23), 5.24 (1H, dd, $J = 15.3, 8.1$ Hz, H-22), 4.19 (1H, dd, $J = 12.2, 4.1$ Hz, H-

11), 2.06 (1H, dd, $J = 12.2, 4.2$ Hz, H-12), 1.16 (3H, s, H₃-19), 1.11 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H₃-21), 1.03 (3H, s, H₃-18), 0.95 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H₃-28), 0.87 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H₃-26), 0.85 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-27); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 31.0 (C-1), 34.9 (C-2), 202.5 (C-3), 125.8 (C-4), 166.4 (C-5), 126.0 (C-6), 133.2 (C-7), 127.6 (C-8), 74.3 (C-9), 44.5 (C-10), 66.5 (C-11), 43.6 (C-12), 46.5 (C-13), 158.6 (C-14), 26.5 (C-15), 28.7 (C-16), 56.8 (C-17), 19.0 (C-18), 21.1 (C-19), 40.5 (C-20), 21.6 (C-21), 136.3 (C-22), 133.9 (C-23), 44.4 (C-24), 34.4 (C-25), 20.5 (C-26), 20.1 (C-27), 18.2 (C-28)。以上数据与文献^[16]报道数据基本一致,故化合物 **4** 鉴定为 9 α ,11 α -dihydroxy-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one。

化合物 5 白色固体; ¹H NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 5.24 (1H, dd, $J = 15.2, 7.3$ Hz, H-23), 5.17 (1H, dd, $J = 15.2, 8.3$ Hz, H-22), 4.80 (1H, m, H-3), 4.32 (1H, s, H-6), 3.00 (1H, dd, $J = 13.2, 11.3$ Hz, H-4), 1.49 (3H, s, H₃-19), 1.05 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H₃-21), 0.95 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H₃-28), 0.85 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, H₃-26, H₃-27), 0.65 (3H, s, H₃-18); ¹³C NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 32.7 (C-1), 33.8 (C-2), 67.6 (C-3), 42.0 (C-4), 76.1 (C-5), 74.3 (C-6), 120.5 (C-7), 141.6 (C-8), 43.8 (C-9), 38.1 (C-10), 22.4 (C-11), 40.0 (C-12), 43.8 (C-13), 55.5 (C-14), 23.5 (C-15), 28.5 (C-16), 56.1 (C-17), 12.5 (C-18), 18.8 (C-19), 40.9 (C-20), 21.5 (C-21), 136.2 (C-22), 132.1 (C-23), 43.1 (C-24), 33.3 (C-25), 20.3 (C-26), 19.8 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献^[17]报道数据基本一致,故化合物 **5** 鉴定为 (22*E*,24*R*)-24-methyl-5 α -cholesta-7,22-dien-3 β ,5,6 β -triol。

化合物 6 白色固体; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.66 (1H, br s, H-7), 5.23 (1H, dd, $J = 15.2, 7.5$ Hz, H-23), 5.16 (1H, dd, $J = 15.3, 7.8$ Hz, H-22), 4.06 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-21), 1.01 (3H, s, H₃-19), 0.92 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-28), 0.84 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H₃-27), 0.82 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H₃-26), 0.62 (3H, s, H₃-18); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 25.4 (C-1), 30.2 (C-2), 67.2 (C-3), 37.2 (C-4), 79.7 (C-5), 197.6 (C-6), 119.9 (C-7), 164.3 (C-8), 74.7 (C-9), 41.8 (C-10), 29.7 (C-11), 34.9 (C-12), 45.3 (C-13),

51.8 (C-14), 22.4 (C-15), 28.8 (C-16), 56.0 (C-17), 12.2 (C-18), 20.5 (C-19), 40.3 (C-20), 21.1 (C-21), 135.0 (C-22), 132.5 (C-23), 42.8 (C-24), 33.1 (C-25), 20.0 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28)。以上数据与文献^[18]报道数据基本一致,故化合物 **6** 鉴定为 3 β ,5 α ,9 α -trihydroxy-(22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-dien-6-one。

化合物 7 黄色固体; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8.06 (1H, dd, $J = 6.8, 1.7$ Hz, H-7), 7.93 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, dd, $J = 7.2, 1.7$ Hz, H-4), 7.17 (2H, m, H-5, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 133.3 (C-2), 109.0 (C-3), 127.6 (C-3a), 122.1 (C-4), 122.3 (C-5), 123.5 (C-6), 112.8 (C-7), 138.3 (C-7a), 169.5 (C-8)。以上数据与文献^[19]报道数据基本一致,故化合物 **7** 鉴定为吡啶-3-甲酸。

化合物 8 黄色固体; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8.72 (1H, s, H-2), 8.30 (1H, m, H-4), 7.47 (1H, m, H-7), 7.26 (1H, m, H-6), 7.24 (1H, m, H-5); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ : 139.4 (C-2), 113.1 (C-3), 127.9 (C-3a), 122.9 (C-4), 123.8 (C-5), 124.8 (C-6), 114.0 (C-7), 138.0 (C-7a), 183.1 (C-8), 168.2 (C-9)。以上数据与文献^[20]报道数据基本一致,故化合物 **8** 鉴定为 (1*H*-indol-3-yl) oxoacetamide。

化合物 9 白色固体; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 10.1 (1H, s, H-8), 8.33 (1H, m, H-4), 7.85 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-2), 7.44 (1H, m, H-7), 7.35 ~ 7.30 (2H, m, H-6, H-5); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 135.2 (C-2), 124.4 (C-3), 119.8 (C-3a), 122.0 (C-4), 123.1 (C-5), 124.5 (C-6), 111.5 (C-7), 136.6 (C-7a), 185.1 (C-8)。以上数据与文献^[21]报道数据基本一致,故化合物 **9** 鉴定为吡啶-3-甲醛。

化合物 10 无色液体; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.19 (1H, s, H-5), 5.55 (1H, s, H-3), 4.48 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 3.86 (3H, s, H₃-9), 1.41 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H₃-2'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 67.1 (C-1'), 167.1 (C-2), 21.5 (C-2'), 88.6 (C-3), 173.9 (C-4), 99.0 (C-5), 169.6 (C-6), 57.0 (4-OCH₃)。以上数据与文献^[22]报道数据基本一致,故化合物 **10** 鉴定为 pestalotiopyrone A。

化合物 11 白色固体; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.76 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-5), 5.72 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 3.86 (3H, s, H₃-9), 2.53 (3H, s,

H₃-8); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 191.4 (C-1'), 26.0 (C-2'), 162.3 (C-2), 93.6 (C-3), 169.8 (C-4), 103.9 (C-5), 154.6 (C-6), 56.4 (4-OCH₃)。以上数

据与文献^[23]报道数据基本一致,故化合物 **11** 鉴定为 nigrosporapyrone D。

化合物 **1** ~ **11** 的结构见图 3。

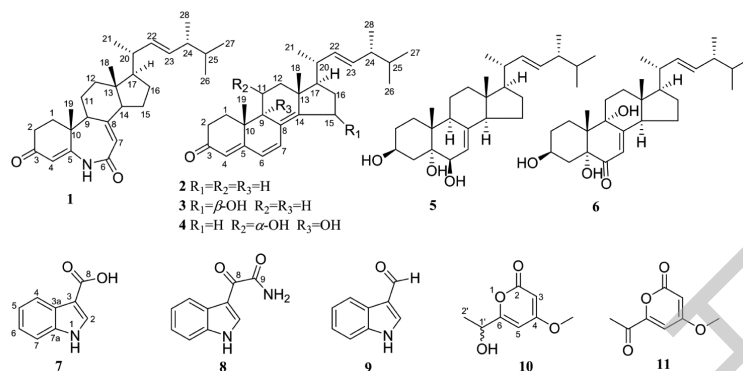


图 3 化合物 **1** ~ **11** 的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of compounds **1**-**11**

2.2 生物活性测试

对化合物 **1** ~ **11** 进行抗真菌和抗菌活性测试。结果显示,所有化合物对 4 种真菌(苹果轮纹菌、草莓黑斑菌、棉花枯萎菌、花生叶斑菌)均无抑制活性(MIC > 100 μg/mL),阳性对照为酮康唑(MIC 分别为 3.12、0.78、1.56、1.56 μg/mL);所有化合物对 5 种细菌(金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、藤黄微球菌、溶壁微球菌、伤寒沙门氏菌)均无抑制活性(MIC > 100 μg/mL),阳性对照为环丙沙星(MIC 均为 0.78 μg/mL)。

研究选取化合物 **1**、**2**、**6**、**10**, 对其在体外对 MDA-MB-231 细胞的毒性活性进行了评估。结果显示,化合物 **1** 对乳腺癌细胞有抑制活性,其 IC₅₀ 值为 20.46 μmol/L,化合物 **2**、**6**、**10** 无抑制活性(IC₅₀ > 40 μmol/L),阳性对照为紫杉醇(IC₅₀ = 0.48 μmol/L)。

3 讨论

首次从草莓番石榴中分离得到内生真菌 *Nigrospora* sp., 并综合运用色谱技术、波谱学和量子化学计算方法,从该内生真菌固态发酵产物中分离鉴定出 11 个单体化合物,结构类型包括麦角甾烷(**1** ~ **6**)、吲哚生物碱(**7** ~ **9**)和吡喃酮类(**10** 和 **11**),所有化合物均为首次从草莓番石榴内生真菌中分离得到。其中,化合物 **1** 是一个由 B 环扩环形成的新甾体生物碱,结合波谱数据和含时密度泛函理论计算,确定了该化合物的平面结构和绝对构型。采用二倍稀释法对所有化合物的抗菌活性进行评价,同时选取化合物 **1**、**2**、**6**、**10** 进行抗三阴性乳腺癌活性评价。结果表明,化合物 **1** 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有抑制活性,IC₅₀ 值为 20.46 μmol/L。以上研

究丰富了草莓番石榴内生真菌 *Nigrospora* sp. 次生代谢产物结构的多样性,为综合开发该生物资源提供了理论基础。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00368>) 中访问获取。

参考文献

- Hai P, Gao Y, Yang L, et al. Two new compounds from the endophytic fungi of *Dryopteris crassirhizoma* and their antimicrobial activities[J]. *Molecules*, 2023, 28: 8043.
- Eyberger AL, Dondapati R, Porter JR. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 1121-1124.
- Chen Y. Studies on chemical constituents of *Cinnamomum tenuipilum* and *Psidium littorale* and their bioactivities[D]. Chongqing: Chongqing University (重庆大学), 2022.
- Ho R, Violette A, Cressend D, et al. Antioxidant potential and radical-scavenging effects of flavonoids from the leaves of *Psidium cattleianum* grown in French Polynesia[J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26: 274-277.
- Nguyen QV, Wang SL, Nguyen AD. *In vitro* α-glucosidase and α-amylase inhibition, and *in vivo* anti-hyperglycemic effects of *Psidium littorale* raddi leaf extract[J]. *Res Chem Intermediat*, 2018, 44: 1745-1753.
- Wang M, Liu F, Crous PW, et al. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: ubiquitous endophytes, plant and human pathogens[J]. *Persoonia*, 17, 39: 118-142.
- Tong JY, Zhang X, Li J, et al. Advances in chemical constituents and bioactivities of *Nigrospora* sp. fungi[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 1618-1631.

- 8 Yu HY. Separation and purification of secondary metabolites of filamentous fungi *Nigrospora* sp. and the activity against *Fusarium graminearum* [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳农业大学), 2023.
- 9 Hai P, Jia HY, Luo ZQ, et al. Meroterpenoids with anti-triple negative breast cancer and antimicrobial activities from *Arnebia euchroma* [J]. *Fitoterapia*, 2024, 179: 106234.
- 10 Espinel-Ingroff A, Kish CW Jr, Kerkering TM, et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 3138.
- 11 Cai L, Qin XJ, Xu ZH, et al. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method [J]. *ACS Omega*, 2019, 4: 12036-12042.
- 12 Chen DF, Fan MS, Huang CG. A steroidal lactam compound, mabonolactam, and its use in the preparation of anti-complement drugs (一种甾醇内酰胺化合物马勃内酰胺及其在制备抗补体药物中的用途): CN201510052295. 1 [P]. 2016-10-05.
- 13 Grimblat N, Zanardi MM, Sarotti AM. Beyond DP4: an improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts [J]. *J Organomet Chem*, 2015, 80: 12526-12534.
- 14 Chen H, Chen DQ, Li QF, et al. Research progress on pharmacology, pharmacokinetics and determination of ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 3905-3909.
- 15 Weng YF, Xiang L, Matsuura A, et al. Ganodermasides A and B, two novel anti-aging ergosterols from spores of a medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* on yeast via UTH1 gene [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2010, 18: 999-1002.
- 16 Gawas D, Garcia R, Huch V, et al. A highly conjugated dihydroxylated C₂₈ steroid from a myxobacterium [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74: 1281-1283.
- 17 Piccinali V, Sica D. Four new trihydroxylated sterols from the sponge *Spongionella gracilis* [J]. *J Nat Prod*, 1987, 50: 915-920.
- 18 Wang JH, Zhang ZL, Wang YQ, et al. Chemical constituents from mycelia and spores of fungus *Cordyceps cicadae* [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9: 188-192.
- 19 Zhou L. Studies on the secondary metabolites of endophytic fungus *Aspergillus oryzae* [D]. Kunming: Yunnan Minzu University (云南民族大学), 2018.
- 20 Wang MX, Xiao YF, Lei Y, et al. Studies on chemical constituents of the sponge *Haliclona baeri* from the South China Sea [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2022, 41: 79-83.
- 21 Le HMT, Do QT, Doan MHT, et al. Chemical composition and biological activities of metabolites from the marine fungi *Penicillium* sp. isolated from sediments of Co To island, Vietnam [J]. *Molecules*, 2019, 24: 3830.
- 22 Xu J, Aly AH, Wray V, et al. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2011, 52: 21-25.
- 23 Trisuwan K, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, et al. Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18 [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70: 554-557.

(上接第 1686 页)

- 15 Zhang Y, Zhu XY, Guo SY, et al. Zebrafish thrombosis model induced by phenyl hydrazine [J]. *Lab Anim Comp Med* (实验动物与比较医学), 2015, 35: 27-31.
- 16 Chen R, Xie ML, Zhou J. Experimental study of osthole on inhibition of thrombosis and platelet aggregation [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2005, 21: 440-443.
- 17 Colling ME, Tourdot BE, Kanthi Y. Inflammation, infection and venous thromboembolism [J]. *Circ Res*, 2021, 128: 2017-2036.
- 18 Campos J, Ponomaryov T, De Prendergast A, et al. Neutrophil extracellular traps and inflammasomes cooperatively promote venous thrombosis in mice [J]. *Blood Adv*, 2021, 5: 2319-2324.
- 19 Yazdanpanah B, Wiegmann K, Tchikov V, et al. Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase [J]. *Nature*, 2009, 460: 1159-1163.
- 20 Klop J, Brostjan C, Eilenberg W, et al. Neutrophil extracellular traps and their implications in cardiovascular and inflammatory disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 559.
- 21 He CY, Chen YF, Xie J, et al. Dihydromyricetin: an emerging compound with comprehensive effects on multiple systems [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 15: 1488003.
- 22 Shi JN, Peng XF, Huang JY, et al. Dihydromyricetin alleviated acetaminophen-induced acute kidney injury via Nrf2-dependent anti-oxidative and anti-inflammatory effects [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26: 2365.
- 23 Zhang Q, Wang J, Zhang HL, et al. Dihydromyricetin inhibits oxidative stress and apoptosis in oxygen and glucose deprivation/reoxygenation-induced HT22 cells by activating the Nrf2/HO1 pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23: 397.