

文章编号:1001-6880(2014)1-0056-04

# 北极真菌 *Eutypella* sp. D-1 中海松烷二萜类化合物的研究

刘靖堂<sup>1,2</sup>, 卢小玲<sup>2\*</sup>, 郑 玣<sup>1\*</sup>, 刘小宇<sup>2</sup>, 焦炳华<sup>2</sup><sup>1</sup>中国药科大学生命科学与技术学院,南京 210009; <sup>2</sup>第二军医大学生物化学与分子生物学教研室,上海 200433

**摘要:**采用硅胶柱、反相硅胶柱和凝胶柱等色谱技术,从北极真菌 *Eutypella* sp. 的菌体发酵液提取物中分离纯化得到 2 个化合物,通过<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C NMR,2D NMR 等分析方法,并比较相关文献,鉴定这两个化合物为 libertellenone C(1) 和 libertellenone A(2)。测试了化合物 1 和 2 对各种癌细胞株的细胞毒活性,其中化合物 1 对胰腺癌 SW1990 和胶质瘤 U251 有一定的细胞毒活性,此外化合物 2 对稻瘟霉有抑制活性。

**关键词:**北极真菌;弯孢聚壳属;次级代谢产物;海松烷二萜类

中图分类号:Q939.5;R931.7

文献标识码:A

## Pimarane Diterpenes from Arctic-derived Fungus *Eutypella* sp. D-1

LIU Jing-tang<sup>1,2</sup>, LU Xiao-ling<sup>2\*</sup>, ZHENG Heng<sup>1\*</sup>, LIU Xiao-yu<sup>2</sup>, JIAO Bing-hua<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**Abstract:** Two pimarane diterpenes were isolated from the fermentation broth of the Arctic-derived fungus *Eutypella* sp. D-1 by various chromatographic methods. On the basis of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and 2D NMR spectral data, compounds 1 and 2 were identified as libertellenone C (1) and libertellenone A (2). The potential anticancer activity and antifungal activity against conidia of *Pyricularia oryzae* of compounds 1 and 2 were evaluated. Compound 1 showed weak cytotoxicities against two tumor cell lines SW-1990 and U-251, compound 2 exhibited antifungal activity against conidia of *Pyricularia oryzae* with the MIC of 18.8 μg/mL.

**Key words:** Arctic-derived fungus; *Eutypella* sp.; secondary metabolites; pimarane diterpenes

北极是气候环境非常特殊的地区之一,由于其低温、高辐射、强风和反复冻融等严酷的生态环境,使得那里很少有高等动物和植物生存。因此,极地生物主要是由能够适应这种极端环境的微生物和一些海洋低等生物组成。然而,正是由于这种特殊的环境,使北极真菌进化出特殊的生长代谢机制,而被认为是能够产生结构新颖,生物活性多样的代谢产物的宝贵资源。

弯孢聚壳属 *Eutypella* sp. 是一种分布广泛的真菌,从寒带到热带均有发现。该真菌隶属于子囊菌门 Ascomycetes、炭角菌目 Xylariales、胶孢壳科 Diatrypaceae、弯孢聚壳属 *Eutypella*<sup>[1]</sup>。目前,从该属真菌中分离到的次级代谢产物主要有海松烷型二

萜、细胞松弛素类、γ-内酯类、苯并吡喃类和环二肽类化合物等<sup>[2-3]</sup>。

海烷松二萜类化合物是一类结构独特的次生代谢产物,具有抗肿瘤、抗菌和抗增殖等多种生物活性<sup>[4,5]</sup>。自 1839 年,Laurent<sup>[6]</sup>从松科松属植物欧洲赤松中分离到海松酸,人们就已经开始了对海松烷二萜类化合物的研究。该类型化合物在自然界中分布广泛,据统计<sup>[7]</sup>在 2000 年到 2010 年间,从高等植物、真菌和海洋生物中共分离得到的新海松烷二萜化合物 87 个,其中又以本文中所研究的两个化合物所属的异海松烷型 (Isopimarane) 居多。

笔者在研究一株分离自北极高纬度 (78°55'N) 仙女木根基土壤的弯孢聚壳属真菌 *Eutypella* sp. 时发现,其发酵产物对多种肿瘤细胞株具有抑制活性,进而对其发酵产物的有效成分进行了研究,从其乙酸乙酯萃取物中分离到两个异海松烷型二萜类化合物,Libertellenone C(1) 和 Libertellenone A(2) (图 1),具有细胞毒活性。

收稿日期:2013-01-15 接受日期:2012-04-16

基金项目:国家 863 项目子课题 (SS2012AA09160703);广东省公益性项目 (GD2012-D01-001);国家自然科学基金项目 (41306197)

\* 通讯作者 Tel: 86-21-81870970-8004; E-mail: luxiaoling80@126.com; zhengh18@hotmail.com

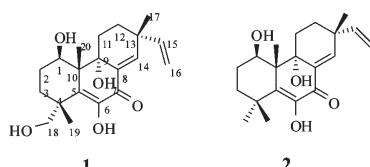


图 1 化合物 1 和 2 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

600MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent G1315B DAD 检测器, 安捷伦公司; Agilent 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, 安捷伦公司; 薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶均为烟台江友硅胶开发有限公司产品; ODS 反相硅胶层析填料, Merck 公司; 凝胶层析填料 Sephadex LH-20, Amersham Biosciences。

北极真菌 *Eutypella* sp. 由中国极地中心提供, 菌种保存于第二军医大学生物化学与分子生物学教研室; 土豆葡萄糖 PDB 培养基, 由杭州微生物试剂有限公司生产。其它化学试剂皆为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌株的培养与发酵

真菌菌株 D-1 分离于北极高纬度 ( $78^{\circ}55'N$ ) 仙女木的根基土壤样品。经过 18S 序列测定及 Blast 分析后鉴定为弯孢聚壳属真菌。

**种子培养:** 挑取菌株 D-1 菌丝体接种于装有 70 mL PDB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 在  $20^{\circ}C$ , 180 rpm 振荡培养 5 d。

**大批发酵:** 种子液按 2% 的接种量, 接种于装有 500 mL PDB 培养基的 2 L 摆瓶中, 在  $24^{\circ}C$  下, 180 r/min 振荡培养 9 d。

#### 1.2.2 提取与分离

经大批发酵, 获得真菌 *Eutypella* sp. D-1 发酵液共 60 L。发酵液离心后, 在  $50^{\circ}C$  下减压浓缩至 20 L, 加入等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯相  $40^{\circ}C$  减压浓缩, 获得浸膏 6.336 g。

发酵液浸膏首先经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 100% 甲醇洗脱, 每 50 mL 洗脱液为一收集单位, TLC 检测洗脱进程, 共分得 6 个组分 (Fr. A ~ Fr. F)。Fr. A 通过 ODS 硅胶柱层析, 水-甲醇梯度洗脱, 洗脱液每 50 mL 为一收集单位, TLC 检测, 根据斑点情况合并各组分, ①收集 50% 甲醇-水段, 继续

过反相柱层析, 合并 70% 甲醇-水段, 再一次 ODS 反相柱层析, 收集 70% 甲醇-水段后, 样品通过制备型薄层硅胶板纯化得到化合物 1 (14.6 mg); ②收集 60% 甲醇-水段与 Fr. B 组分过反相柱收集 65% 的甲醇-水段合并, 再经过 ODS 反相柱层析, 收集 60% 甲醇-水段后, 通过制备型薄层硅胶板得到化合物 2 (7.2 mg)。

## 2 实验结果

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 白色粉末 (甲醇), 通过 HR-ESI-MS 确定其分子式为  $C_{20}H_{28}O_5$ , 分子量为 348.1955 ( $m/z$  371.1815, [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>), 不饱和度为 7。根据<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 并结合 DEPT 谱可知分子中含有 3 个  $CH_3$ , 6 个  $CH_2$ , 3 个  $CH$ , 8 个季碳。因为一个羰基碳和六个烯烃碳占 4 个不饱和度, 所以分子中含有 3 个环。在<sup>13</sup>C NMR 核磁谱中, C-18 位的  $\delta_c$  为 69.9, 说明该位甲基被羟基取代。结合 COSY 谱, C-15 ( $\delta_c$  145.4, CH) 与 C-16 ( $\delta_c$  112.6,  $CH_2$ ) 形成末端双键。除羰基碳信号外, 化合物 1 的<sup>13</sup>C NMR 显示 3 个连氧碳信号 ( $\delta_c$  69.5, 69.9, 75.6), 又从 HMBC 谱远程相关显示 6-OH 与 C-5、C-6 和 C-7 相关, 所以可以判断在 C-6 位置有一个烯醇结构。综合二维核磁谱分析, 判断化合物 1 为海松烷二萜类化合物, 其波谱数据与文献报道<sup>[8]</sup> 的 Libertellenone C 一致。

通过在  $CDCl_3$  中培养得到了该化合物的单晶, 利用单晶 X-衍射证实了该化合物的结构 (图 2), 因此化合物 1 鉴定为 Libertellenone C。化合物 1 的单晶数据:  $C_{20}H_{24}O_5$ , space group P4(1)2(1)2,  $a = 12.4679(4)\text{ \AA}$ ,  $b = 12.4679(4)\text{ \AA}$ ,  $c = 25.0145(9)\text{ \AA}$ ,  $V = 3888.5(2)\text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ ,  $D_{\text{calc}} = 1.283\text{ mg/m}^3$ ,  $R = 0.0732$ ,  $wR2 = 0.1727$ 。

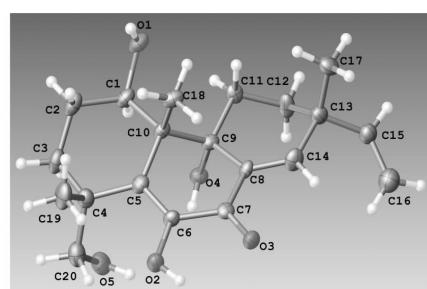


图 2 化合物 1 的单晶衍射结构图

Fig. 2 The X-ray structure of compound 1

**化合物 2** 白色粉末 (甲醇), 通过 HR-ESI-MS 确定其分子式为  $C_{20}H_{28}O_4$  ( $m/z$  355.1885, [ $M +$



## 2.3 稻瘟霉活性测试<sup>[10]</sup>

以稻瘟霉分生孢子以及菌丝形态变化为指标,对化合物**1**和**2**进行活性测试。能使菌丝体生长情况发生变化的最小抑菌浓度记为MIC。结果显示,化合物**2**对稻瘟霉具有较强的抑制活性,化合物**1**和**2**的MIC值分别为62.5和18.8 μg/mL。

## 3 结论

本研究所分离得到的两个化合物属于海松烷二萜类,该类化合物是真菌 *Eutypella* sp. 主要的次级代谢产物之一。目前,从高等植物、真菌和海洋生物中共分离得到的新海松烷二萜化合物达80多个,因其具有广泛的生物学活性而受到生物学及化学领域的关注。

比较这两个化合物的结构发现,结构骨架基本一致,但是化合物**1**的18-C为羟基取代。在抗肿瘤活性方面,化合物**1**具有抗胰腺癌SW-1990的中等活性,而化合物**2**却几乎没有活性,说明18-C的羟基对抗该类肿瘤细胞株有一定影响。化合物**2**显示出较强的抗稻瘟霉活性,故此化合物具有抗真菌活性的研究价值和应用前景。

## 参考文献

- 1 Sun L(孙利), Li DL(李冬利), Chen YC(陈玉婵), et al. Purification, identification and antitumor activities of secondary metabolites from marine fungus *Eutypella scoparia* FS26. *Mycosistema*(菌物学报), 2011, 30:268-274.

(上接第46页)

- 14 Sui CX(隋成霞). Studies on chemical constituents from *A. anomala* Lallem. *Heilongjiang Med J*(黑龙江医药), 2010, 23:263.
- 15 Chen C(陈超), Pan WD(潘卫东), Xiao JH(肖建辉), et al. Investigations on chemical constituents of methanolic extract from *Penicillium jiangxiense*. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17:97-101.
- 16 Zhang LX(张立新), Fan X(范晓), Han LJ(韩丽君), et al. Studies on the chemical constituents of the marine starfish *Asterias rollestoni*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2005, 17:35-37.
- 17 Jia L(贾陆), Li HF(李焕芬), Jing LL(敬林林), et al. Chemical constituents in n-butanol extract of *Abelmoschus esculentus*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, 41:1171-1173.
- 2 Sun L, Li DL, Tao MH, et al. Scopararanes C-G: New oxygenated pimarane diterpenes from the marine sediment-derived fungus *Eutypella scoparia* FS26. *Mar Drugs*, 2012, 10:539-550.
- 3 Isaka M, Palasarn S, Lapanun S, et al. γ-Lactones and ent-eudesmane sesquiterpenes from the endophytic fungus *Eutypella* sp. BCC 13199. *J Nat Prod*, 2009, 72:1720-1722.
- 4 Isaka M, Palasarn S, Prathumpai W, et al. Pimarane diterpenes from the endophytic fungus *Eutypella* sp. BCC 13199. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59:1157-1159.
- 5 Pongcharoen W, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, et al. Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. *J Nat Prod*, 2006, 69:856-858.
- 6 Palkin S. The acids of pine oleoresin and rosin. *J Chem Educ*, 1935, 12:35.
- 7 Sun HD(孙汉董). Natural products chemistry-diterpenes(天然产物化学丛书-二萜化学). Beijing: Chemical Industry Press, 2012. 168-169.
- 8 Oh DC, Jensen PR, Kauffman CA, et al. Libertellenones A-D: Induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. *Bioorgan Med Chem*, 2005, 13:5267-5273.
- 9 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65:55-63.
- 10 Kobayashi H, Namikoshi M, Yoshimoto T. A screening method for antimitotic and antifungal substances using conidia of *Pyricularia oryzae*, modification and application to tropical marine fungi. *J Antibiot*, 1996, 49:873-879.
- 18 Zheng GM(郑公铭), Wei XY(魏孝义), Xu LX(徐良雄), et al. Chemical constituents from fruits of *Dimocarpus longan*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2011, 42:1053-1056.
- 19 Guo WJ(郭文娟), Guo SX(郭顺星). Studies on the chemical constituents of potential anti-HIV active endogenous fungus *Epulorhiza* sp. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, 41:1773-1775.
- 20 Li LY(李莉娅), Deng ZW(邓志威), Li J(李军), et al. Chemical constituents from chinese marine sponge *Cinachyrella australiensis*. *J Beijing Pharm Univ Med Edit*(北京大学学报医学版), 2004, 36:12-17.
- 21 Wu XJ(吴小军), Song JX(宋建晓), Zhao AH(赵爱华), et al. Phenolic acid constituents from *Dracocephalum moldavica*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23:446-448.