**文章编号**:1001-6880(2014)4-0517-04

# 中华剑角蝗共生真菌 Penicillium oxalicum 中苯并吡喃酮二聚体类化合物的研究

徐　帮,邹　坤,郭玲芝,刘呈雄,程　凡*

三峡大学 天然产物研究与利用湖北省重点实验室,宜昌 443002

**摘　要**:从中华剑角蝗肠道共生真菌 *Penicillium oxalicum* 的发酵产物中分离得到 6 个苯并吡喃酮二聚体类化合物,经波谱数据及理化性质分别鉴定为 secalonic acid A(**1**)、asperpyrones A(**2**)、asperpyrones B(**3**)、asperpyrones C(**4**)、asperpyrones D(**5**)和 aurasperone A(**6**)。所有化合物均为首次从该属菌种中分离得到,其中化合物 **1** 对人肝癌细胞 Hep G2 具有显著的细胞毒活性,其 $IC_{50}$ 值为 1.1 μM。

**关键词**:中华剑角蝗;昆虫肠道真菌;*Penicillium oxalicum*;细胞毒活性

**中图分类号**:R931.77　　**文献标识码**:A

# Dimeric Naphthopyrones from *Penicillium oxalicum*, a Fungus Residing in *Acrida cinerea*

XU Bang, ZOU Kun, GUO Lin-zhi, LIU Cheng-xiong, CHENG Fan*

*Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, China Three Gorges University, Yichang 443002, China*

**Abstract**: Six dimeric naphthopyrones were isolated from the fermentation broth extract of *Penicillium oxalicum*, a fungus residing in *Acrida cinerea*. On the basis of spectral data and physicochemical properties, they were identified as secalonic acid A (**1**), asperpyrones A (**2**), asperpyrones B (**3**), asperpyrones C (**4**), asperpyrones D (**5**) and aurasperone A (**6**). All the compounds were isolated from the endophytic fungus of *Penicillium oxalicum* for the first time. Compounds **1** showed significant cytotoxic activity against Hep G2 with $IC_{50}$ values of 1.1 μM.

**Key words**: *Acrida cinerea*; inset gut fungus; *Penicillium oxalicum*; cytotoxic activity

昆虫是生物界种类数量最多的类群,约占全球生物多样性的一半。昆虫与微生物的共生是一种普遍的现象,其种类之多、数量之大及分布之广则意味着昆虫共生菌有丰富的多样性,源自其中的共生真菌可能会产生结构新颖,类型丰富的活性次级代谢产物,因而昆虫共生真菌已成为寻找新生物活性物质的新的重要来源[1]。但目前,人们对昆虫共生菌研究的很少,对其代谢产物研究更少。

本文作者从中华剑角蝗的肠道中分离得到一株草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)菌株,对其发酵产物进行了化学研究,从中分离得到 6 个化合物,通过波谱数据分析及理化性质鉴定了它们的结构,确定为苯并吡喃酮二聚体类化合物,所有化合物均为首次从该属菌种中分离得到。采用 MTT 法进行了细胞毒活性的测试,结果发现化合物 1 对人体肝癌细胞 Hep G2 具有显著的细胞毒活性,其 $IC_{50}$ 值为 1.1 μM。

## 1　材料与方法

### 1.1　仪器与试剂

Bruker AV 400 核磁共振波谱仪,瑞士布鲁克公司;AmozonSL + 1200 液相色谱-双重漏斗传输离子阱质谱仪,德国布鲁克·道尔顿公司;Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪,美国戴安公司;Cosmosil MS-II RP-$C_{18}$ 色谱柱(5 μm,250 × 10 mm 半制备型;5 μm,250 × 4.6 mm 分析型);低温冷冻干燥机,美国 Labconco 公司;WZZ-2S 数字式自动旋光仪,上海精科;薄层色谱硅胶 $GF_{254}$,青岛海洋化工有限公司;正相色谱硅胶,烟台化学工业研究所;反相色谱硅胶,日本 YMC 公司;Sephadex LH-20,美国 Pharmacia 公司;除了分析和制备用的色谱纯乙腈外,其它试剂均为分析纯。

收稿日期:2013-03-18　　接受日期:2013-05-20

基金项目:国家自然科学基金项目(21272136);三峡大学硕士论文培优基金项目(2013PY079)

* 通讯作者 Tel:86-717-6397478;E-mail:fancy1351@163.com

### 1.2 菌株和细胞株

实验菌株分离自中华剑角蝗肠道,昆虫样品于2011年7月采集于湖北省神农架大九湖国家湿地公园,菌株由三峡大学涂璇博士鉴定为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*),保存于三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室;人肝癌细胞 Hep G2 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,由三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室传代保藏。

### 1.3 培养基

培养基:SDA 培养基(葡萄糖40 g,蛋白胨10 g,琼脂20 g,水1000 mL,pH 值自然);SD 培养基(葡萄糖40 g,蛋白胨10 g,水1000 mL,pH 值自然),$1.25\times10^5$ Pa 灭菌20 min。

### 1.4 菌株 *Penicillium oxalicum* 的发酵

菌株经 SDA 培养基斜面活化后,接种于 SD 种子培养基中,于28 ℃、125 rpm 振荡培养3 d;将培养好的种子以5%的接种量接种于 SD 发酵培养基中,于28 ℃、125 rpm 振荡培养16 d,共发酵40 L。

### 1.5 细胞毒活性的测试——MTT 法[2]

培养细胞按 $1\times10^5$ 个/mL 的密度种植于96孔培养板中,37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中培养12 h,将待测药物配制成6个浓度梯度,加入到96孔培养板中,每个浓度梯度设6个复孔,并设置空白孔(含细胞的培养液 + MTT + DMSO)、阳性药物孔(含细胞的培养液 + 25 μg/mL 丝裂霉素 + MTT + DMSO)及调零孔(培养液 + MTT + DMSO)。继续培养24 h、48 h、72 h 后,于每孔中加入20 μL 的 MTT 试剂(5 mg/mL)显色,继续培养4 h,吸出孔内的培养液,于每孔中加入150 μL 的 DMSO,震荡摇匀10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪490 nm 波长下测其 OD 值,按公式计算抑制率。计算公式:生长抑制率(%) = (1-药物孔 OD/空白孔 OD) × 100%。采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计算半数抑制浓度($IC_{50}$)值。

## 2 提取与分离

发酵液40 L 过滤,用乙酸乙脂萃取滤液,减压浓缩得12.2 g 粗提物;菌丝体经37 ℃烘干处理后,用氯仿-甲醇(1∶1)浸提烘干的菌丝体,过滤,上清液减压浓缩得10.6 g 粗提物。将上述粗提物合并,经正相硅胶柱色谱(800 g 正相硅胶,200 ~ 300 目)分离,氯仿-甲醇(100∶0 ~ 50∶50%,v/v)梯度洗脱,得5个洗脱部分(Ⅰ ~ Ⅴ)。Ⅰ部分中的流分 Fr. 2 析出黄色晶体化合物**1**(36.6 mg)。取Ⅱ部分6.3 g,经加压反相硅胶柱色谱分离,以乙腈-水(30∶70 ~ 100∶0,v/v)梯度洗脱,合并流分 Fr. 23-25,经反相 HPLC 制备,乙腈-水(48∶52,v/v)洗脱,得到化合物**2**(15.3 mg),化合物**4**(5.2 mg),化合物**5**(9.4 mg)。合并流分 Fr. 26-29,经反相 HPLC 制备,乙腈-水(68∶32,v/v)洗脱,得到化合物**3**(4.2 mg),化合物**6**(8.6 mg)。

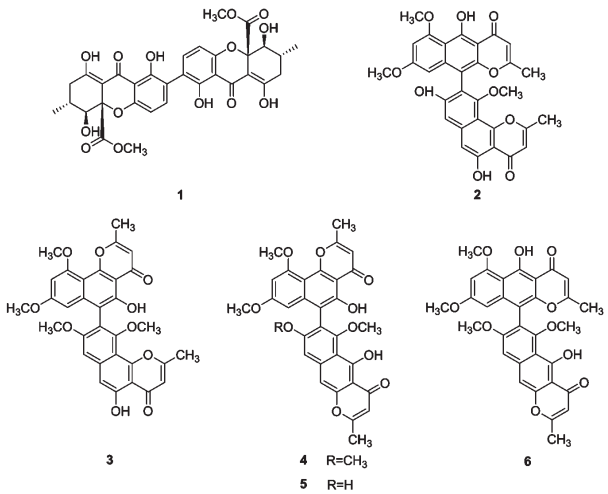


**图1 化合物1~6的化学结构**

Fig. 1 Structures of Compound **1-6**

## 3 结构鉴定

**化合物1** 黄色针晶;ESI-MS *m/z*:639 [M + 1]$^+$;$^1$H NMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:13.78(2H,s,8,8′-OH),11.74(2H,s,1,1′-OH),7.45(2H,d,*J* = 8.5Hz,H-3,3′),6.63(2H,d,*J* = 8.5 Hz,H-4,4′),3.93(2H,d,*J* = 11 Hz,H-5,5′),3.72(6H,s,13,13′-$OCH_3$),2.73(2H,dd,*J* = 6.0,19.1 Hz,H-7a,7a′),2.41(2H,m,H-6,6′),2.31(2H,dd,*J* = 10.5,19.2 Hz,H-7b,7b′),1.17(6H,d,*J* = 6.6 Hz,H-11,11′);$^{13}$C NMR(100 MHz,$CDCl_3$)δ:187.2(C-9,9′),177.5(C-8,8′),170.3(C-12,12′),159.4(C-1,1′),158.3(C-4a,4a′),140.2(C-3,3′),117.3(C-2,2′),107.5(C-4,4′),106.3(C-9a,9a′),101.7(C-8a,8a′),84.7(C-10a,10a′),77.0(C-5,5′),53.2(13,13′-$OCH_3$),36.3(C-7,7′),29.3(C-6,6′),18.0(C-11,11′)。结合文献报道[3-5]的波谱数据,化合物**1**可能是 secalonic acid A(SAA)或 secalonic acid D(SAD),两者不同之处在于5、6、10a 和5′、6′、10a′

位羟基构型不同。通过测定比旋光度与文献值相比较,化合物 **1** 的比旋光度$[\alpha]_D^{20}$-73.3°($c$ = 0.10,氯仿),文献中,SAD 的比旋光度$[\alpha]_D^{20}$ + 88°($c$ = 0.10,氯仿)[3,5],SAA 的比旋光度[α]20*D* -75°($c$ = 0.10,氯仿)[4]。最终鉴定化合物 **1** 为 secalonic acid A。

**化合物 2**　黄色无定形粉末;ESI-MS $m/z$:557 [M + 1]$^+$;$^1$H NMR(400 MHz,DMSO-$d_6$),$\delta$:15.34(1H,s,5′-OH),12.76(1H,s,5-OH),10.14(1H,s,OH-8),7.14(1H,s,H-7),7.01(1H,s,H-6),6.42(1H,d,$J$ = 2.3 Hz,H-7′),6.34(1H,s,H-3),6.24(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-9′),6.02(1H,s,H-3′),4.00(3H,s,6′-$OCH_3$),3.65(3H,s,8′-$OCH_3$),3.44(3H,s,10-$OCH_3$),2.48(3H,s,2-$CH_3$),2.16(3H,s,2′-$CH_3$);$^{13}$C NMR(100 MHz,DMSO-$d_6$),$\delta$:184.2(C-4′),182.8(C-4),167.7(C-2′),166.6(C-2),165.9(C-5′),164.0(C-8′),162.5(C-6′),161.5(C-8),157.2(C-10),156.5(C-5),156.2(C-10b),152.0(C-10a′),140.9(C-6a),140.7(C-9a′),116.0(C-9),110.8(C-3),109.4(C-4a),108.0(C-5a′),107.6(C-3′),105.9(C-10a),105.6(C-7),104.6(C-10′),104.3(C-6),101.6(C-4a′),97.5(C-9′),95.7(C-7′),61.3(10-$OCH_3$),56.2(6′-$OCH_3$),55.3(8′-$OCH_3$),20.7(2′-$CH_3$),20.5(2-$CH_3$)。以上数据与文献[6]报道一致,故鉴定化合物 **2** 为 asperpyrones A。

**化合物 3**　黄色无定形粉末;ESI-MS $m/z$:571 [M + 1]$^+$;$^1$H NMR(400 MHz,DMSO-$d_6$),$\delta$:13.21(1H,s,5′-OH),12.95(1H,s,5-OH),7.29(1H,s,H-6),7.12(1H,s,H-7),6.63(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-9′),6.56(1H,s,H-3′),6.54(1H,s,H-3),6.10(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-7′),4.01(3H,s,10′-$OCH_3$),3.74(3H,s,8-$OCH_3$),3.59(3H,s,8′-$OCH_3$),3.46(3H,s,10-$OCH_3$),2.56(3H,s,2′-$CH_3$),2.48(3H,s,2-$CH_3$);$^{13}$C NMR(100 MHz,DMSO-$d_6$),$\delta$:182.4(C-4′),182.3(C-4),168.2(C-2),167.8(C-2′),161.1(C-8′),159.6(C-8),159.3(C-10′),156.2(C-10),156.1(C-5),155.6(C-10b′),155.0(C-10b),153.6(C-5′),140.2(C-6a′),139.9(C-6a),117.4(C-9),109.9(C-3),109.8(C-3′),109.1(C-6′),108.4(C-4a),107.5(C-4a′),107.3(C-10a),105.4(C-6),104.0(C-10a′),101.9(C-7),96.9(C-9′),96.3(C-7′),60.9(8′-$OCH_3$),56.3(8-$OCH_3$),55.9(10′-$OCH_3$),55.1(10-$OCH_3$),19.9($CH_3$-2′),19.8($CH_3$-2)。以上数据与文献[6]报道一致,故鉴定化合物 **3** 为 asperpyrones B。

**化合物 4**　黄色无定形粉末;ESI-MS $m/z$:569 [M + 1]$^+$;$^1$H NMR(400 MHz,$CDCl_3$),$\delta$:15.24(1H,s,5-OH),12.83(1H,s,5′-OH),7.26(1H,s,H-10),7.05(1H,s,H-9),6.43(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-9′),6.33(1H,s,H-3′),6.19(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-7′),6.00(1H,s,H-3),4.03(3H,s,10′-$OCH_3$),3.78(3H,s,8-$OCH_3$),3.61(3H,s,6-$OCH_3$),3.42(3H,s,8′-$OCH_3$)2.48(3H,s,2′-$CH_3$),2.12(3H,s,2-$CH_3$);$^{13}$C NMR(100 MHz,$CDCl_3$)$\delta$:184.5(C-4),182.9(C-4′),167.4(C-2),166.8(C-2′),162.8(C-5),161.7(C-8′),161.6(C-10′),160.0(C-6),156.9(C-5′),156.7(C-8),155.1(C-10b′),150.8(C-10a),140.8(C-6a′),140.6(C-9a),117.1(C-7),110.6(C-5a),109.4(C-3′),108.6(C-4a′),108.0(C-3),107.3(C-6′),106.0(C-9),105.0(C-10a′),104.2(C-4a),101.5(C-10),97.0(C-9′),96.3(C-7′),61.2(6-$OCH_3$),56.1(10′-$OCH_3$),56.0(8-$OCH_3$),55.2(8′-$OCH_3$),20.7(2-$CH_3$),20.6(2′-$CH_3$)。以上数据与文献[6]报道一致,故鉴定化合物 **4** 为 asperpyrone C。

**化合物 5**　黄色无定形粉末;ESI-MS $m/z$:557 [M + 1]$^+$;$^1$H NMR(400 MHz,$CDCl_3$)$\delta$:14.86(1H,s,5-OH),13.48(1H,s,5′-OH),7.30(1H,s,H-9),7.19(1H,s,H-10),7.11(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-9′),6.50(1H,s,H-3′),6.19(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-7′),6.00(1H,s,H-3),4.03(3H,s,10′-$OCH_3$),3.78(3H,s,6-$OCH_3$),3.61(3H,s,8′-$OCH_3$),2.48(3H,s,2′-$CH_3$),2.12(3H,s,2-$CH_3$);$^{13}$C NMR(100 MHz,$CDCl_3$)$\delta$:184.5(C-4),182.7(C-4′),167.6(C-2),166.9(C-2′),162.3(C-5),161.7(C-8′),161.6(C-10′),160.0(C-6),156.9(C-5′),156.7(C-8),155.1(C-10b′),150.8(C-10a),140.8(C-6a′),140.6(C-9a),117.1(C-7),110.6(C-5a),109.4(C-3′),108.6(C-4a′),108.0(C-3),107.3(C-6′),106.0(C-9),105.0(C-10a′),104.2(C-4a),101.5(C-10),97.0(C-9′),96.3(C-7′),61.2(6-$OCH_3$),56.0(10′-$OCH_3$),55.1(8′-$OCH_3$),20.8(2-$CH_3$),20.5(2′-$CH_3$)。化合物 **5** 与化合物 **4** 的 NMR 数据相比较,除了少一个甲氧基以外,其他数据几乎完全

相同。以上数据与文献[7]报道一致,故鉴定化合物 **5** 为 asperpyrone D。

**化合物 6** 黄色无定形粉末;ESI-MS *m/z*:571 [M + 1]$^+$;$^1$H NMR(400 MHz, $CDCl_3$), $\delta$: 15.25 (1H,s,5′-OH),14.83(1H,s,5-OH),7.15(1H,s,H-10),6.97(1H,s,H-9),6.42(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-7′),6.21(1H,d,$J$ = 2.2 Hz,H-9′),6.05(1H,s,H-3),5.98(1H,s,H-3′),4.02(3H,s,6′-$OCH_3$),3.79(3H,s,8-$OCH_3$),3.62(3H,s,8′-$OCH_3$),3.46(3H,s,6-$OCH_3$),2.42(3H,s,2-$CH_3$),2.12(3H,s,2′-$CH_3$);$^{13}$C NMR(100 MHz, $CDCl_3$) $\delta$: 184.6(C-4′),184.4(C-4),167.6(C-2),167.5(C-2′),162.7(C-5′),162.0(C-5),161.4(C-8′),161.1(C-6′),160.2(C-8),158.6(C-6),153.4(C-10a),150.8(C-10a′),140.7(C-9a),140.5(C-9a′),117.1(C-7),111.4(C-5a),108.6(C-5a′),107.4(C-3),107.2(C-3′),105.2(C-10′),104.7(C-4a),104.3(C-4a′),101.3(C-9),101.2(C-10),96.9(C-7′),96.5(C-9′),62.0(6-$OCH_3$),56.2(6′-$OCH_3$),55.9(8-$OCH_3$),55.1(8′-$OCH_3$),20.8(2-$CH_3$),20.5(2′-$CH_3$)。以上数据与文献[8]报道一致,故鉴定化合物 **6** 为 aurasperone A。

## 4 活性分析

采用 MTT 法测定化合物对人体肝癌细胞 Hep G2 的生长抑制作用。实验结果显示,化合物 **1** 具有显著的细胞毒活性,其 $IC_{50}$值为 1.1 μM。

## 5 结语

苯并吡喃酮类化合物的单体及二聚体类广泛分布于黑曲霉和镰刀属真菌的次级代谢产物中[9-12]。根据文献报道,这类化合物对大鼠和小鼠的中枢神经系统表现出急性毒性作用[13],并且对 Taq DNA 聚合酶具有抑制作用[5]。最近研究表明很多来源于真菌次级代谢产物的苯并吡喃酮类化合物都具有一定的抗肿瘤活性,具有十分重要的研究与开发价值,其作用机制更是有待于进一步研究。

**参考文献**


1 Zhang YL(张应烙). Microbes associated with Insect - an extensive source of new drug molecules. 2011Chinese Medicinal Chemistry Symposium(2011 年全国药物化学学术会议),2011.

2 Daniel HR, Pradip KB. Isolation and conformational analysis of two conformers of D-Methylalanine-tentoxin. *Am Chem Soc*,1978,100:2218-2224.

3 Steyn PS. The isolation, structure and configuration of secalonic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium Oxalicum*. *Tetrahedon*,1970,26:51-57.

4 Steffens JC, Robeson DJ. Secalonic acid A, a vivotoxin in pink root-infected onion. *Phytochem*. 1987,26:1599-1602.

5 Chen L(陈立), Gu QQ(顾谦群). Studyonthe antitumor metabolites of a sponge-derived fungus, *Aspergillus repens*. *Periodi Ocean Univer China* (中国海洋大学学报),2010,40(5):69-71.

6 Akiyama K, Teraguchi S, Hamasaki Y, *et al*. New dimeric naphthopyrones from *Aspergillus niger*. *J Nat Prod*,2003,66:136-139.

7 Zhan J, Gunaherath GM, Wijeratne EM, *et al*. Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*. *Phytochem*,2007,68:368-372.

8 Campos FR, Barison A, Daolio C, *et al*. Complete $^1$H and $^{13}$C NMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A, two bis-naphthopyrones produced by *Aspergillus aculeatus*. *Magn Reson Chem*,2005,43:962-965.

9 Tanaka H, Wang PL, Yamada O. Yellow pigments of *Aspergillus niger* and *Asp. awamori*. I. Isolation of aurasperone A and related pigments. *Agric Biol Chem*,1966,30:107-113.

10 Wang PL, Tanaka H. Yellow pigments of *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. II. Chemical structure of aurasperone A. *Agric Biol Chem*,1966,30:683-687.

11 Tanaka H, Wang PL, Namiki M. Structure of aurasperone C. *Agric Biol Chem*,1972,36:2511-2517.

12 Priestap HA. New naphthopyrones from *Aspergillus fonsecaeus*. *Tetrahedron*,1984,40:3617-3624.

13 Ghosal S, Biswas K, Chakrabarti DK. Toxic naphtho-gamma-pyrones from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*,1979,27:1347-1351.