

文章编号:1001-6880(2016)6-0864-04

白三叶草植物内生真菌烟曲霉蒽醌化合物的研究

杨勇勋*

西昌学院轻化工程学院,西昌 615000

摘要:从白三叶草(*Trifolium repens* L.)叶中分离得一株真菌,鉴定为烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*,采用大米固体培养基发酵,其乙酸乙酯提取物具有抑制白菜种子发芽的能力。继续从此活性部位分离得5个蒽醌化合物,通过波谱及理化性质鉴定为:大黄素-1-甲醚(1)、大黄素-8-甲醚(2)、asperfumin(3)、monomethylsulochrin(4)和trypacidin(5)。化合物1~5采用钙流模型测定其生物活性。结果显示1具有促进钙离子细胞内流的活性。

关键词:白三叶草;植物内生真菌;烟曲霉;大黄素-1-甲醚;钙流

中图分类号:R914.4

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.009

Anthraquinone Derivatives in Endophytic *Aspergillus fumigatus* from *Trifolium repens* and their Bioactivity

YANG Yong-xun*

School of Applied and Chemical Engineering of Xichang College, Xichang 615000, China

Abstract: A strain of endophytic fungus was isolated from the leaves of *Trifolium repens* L., and identified as *Aspergillus fumigatus*. The fungus was cultured on rice media and its ETOAC extract showed inhibitory activity against the germination of cabbage seeds. Five anthraquinone derivatives were isolated from this active portion, and were elucidated as 1-O-methyl emodin (1), 8-O-methyl emodin (2), asperfumin (3), monomethylsulochrin (4), and trypacidin (5) on the basis of spectroscopic methods. The bioactivity of 1~5 was evaluated by using calcium current model. The results showed that 1 cause a persistent increase in cytoplasmic calcium levels in A549 cells.

Key words: *Trifolium repens* L.; endophytic fungi; *Aspergillus fumigatus*; 1-O-methyl emodin; calcium influx

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是由糖尿病引起的肾小球毛细血管病变,发病率与死亡率高,危害极大,且现无有效的治疗药物^[1,2]。近年来,不断的研究证实蒽醌类化合物如大黄酸、大黄素等具有调节细胞糖代谢异常,拮抗TGF-β效应,纠正脂质代谢紊乱、保护内皮细胞功能、抑制IL-6与细胞基质产生等的作用,使它们有可能成为糖尿病及DN综合治疗中极具潜能的药物^[2-5]。

我们前期为寻找一条生物防治生物入侵物种紫茎泽兰 *Eupatorium adenophorum* 的方法,对白三叶草 *Trifolium repens* L. 的植物内生真菌进行了研究。从白三叶草新鲜植物叶片中分离并鉴定了一株内生真菌烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*。随后的研究发现此株内生真菌的发酵乙酸乙酯提取部位具有抑制白菜

种子发芽的能力,并从中分离得四个结构新颖的生物碱类成分^[6]。本研究又从此活性部位分离得5个蒽醌类化合物,并通过理化性质与波谱方法鉴定了其结构,分别为大黄素-1-甲醚(1)、大黄素-8-甲醚(2)、asperfumin(3)、monomethylsulochrin(4)和trypacidin(5)。由于当前的研究揭示部分蒽醌化合物具有钙流活性及相关的生理、病理作用,如蒽醌化合物大黄素对豚鼠离体肠管的双向调节作用与钙离子的参与密切相关^[7,8],以及蒽类化合物阿霉素的心脏毒副作用与钙失调相关^[9],因此,本文对这5个蒽醌进行了钙流活性测试。结果显示化合物1具有促进钙离子细胞内流的活性。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Bruker AV600 及 Bruker AV 500 MHz 核磁共振仪(TMS作为内标,δ为ppm,J为Hz)。Xevo TQ-S 超高压三重四极杆质谱仪;柱层析用硅胶(200~

收稿日期:2016-01-07 接受日期:2016-04-06

基金项目:四川省教育厅理工科重点项目(14ZA0215);西昌学院博士启动项目(15BZ02)

* 通讯作者 Tel:86-834-2580190;E-mail:yyx7110@qq.com

300 目)和薄层层析用硅胶($10\sim40\mu\text{m}$),青岛海洋化工厂生产;Rp-C₁₈ 硅胶为 $40\sim60\mu\text{m}$,由 Daiso 公司生产;MCI gel CHP 20P,日本三菱公司产品;Sephadex LH-20 为 GE 公司产品; 10% H₂SO₄ 乙醇溶液为显色剂。

白三叶草叶片于 2010 年 12 月采集于西昌学院校园,原植物由作者鉴定,分离的白三叶草植物内生真菌烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 由云南大学微生物所李文均教授鉴定。

1.2 植物内生菌的分离与鉴定

白三叶草健康新鲜叶片于自来水冲洗洗净,甩干水,于 75% 乙醇液中浸泡 5 min,取出,再于 2% 氯酸钠溶液中浸泡 20 min,取出,无菌水冲洗 3~4 次,无菌刀将其切成约 $0.5\times0.5\text{ cm}$ 的小片,贴附于 PDA 培养基上,37 °C 培养至切片边缘长出菌丝,划线分离至 PDA 培养基上的菌落为单一菌落,插片法观察菌落形态,18s RNA 基因测序鉴定本菌种为烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。

1.3 发酵、提取与分离

采用大米(5 kg)固体发酵培养基发酵,种子培养基为不加琼脂的 PDA 培养基,按 10%~20% 的接种量接种于大米培养基,待菌丝长满,乙酸乙酯提取三次,提取液减压回收溶剂,得浸膏 15 g。浸膏用硅

胶拌样上硅胶柱,切柱,分 I~IV 个部位,取部位 II 上凝胶柱,氯仿:甲醇(3:2)洗脱,共分七个部位,部位 3(0.45 g)依次用 Sephadex LH-20 柱色谱[氯仿:甲醇(3:2)洗脱剂],硅胶柱层析[洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯(2:1)]分离,最后用半制备 HPLC[甲醇:水(80:20)为流动相]纯化得化合物 5(1.7 mg);部位 5(3.7 g)依次用 C₁₈ 反相中压柱色谱(40% 甲醇水为流动相),Sephadex LH-20 柱色谱[氯仿:甲醇(3:2)洗脱剂]分离,最终用半制备 HPLC[甲醇:水(70:30)为流动相]纯化得化合物 3(4.2 mg);部位 6(0.38 g)用 C₁₈ 反相中压柱色谱(50% 甲醇水为流动相)纯化得化合物 2(11.5 mg);部位 7(3.5 g)用 C₁₈ 反相中压柱色谱[甲醇水(50%~100%)为流动相]分离,分成 4 个亚流分(7A~7D),其中亚组分 7C 依次用 C₁₈ 反相中压柱色谱(40% 甲醇水为流动相),Sephadex LH-20 柱色谱[氯仿:甲醇(3:2)为洗脱剂]分离,最后用制备 TLC[展开剂为石油醚(60~90 °C):丙酮(2:1)]纯化得化合物 1(9.6 mg);亚组分 7D 用 C₁₈ 反相中压柱色谱(40% 甲醇水为流动相)分离,最后用 Sephadex LH-20 柱色谱[氯仿:甲醇(3:2)洗脱剂]纯化得化合物 4(44.8 mg),结构见图 1。

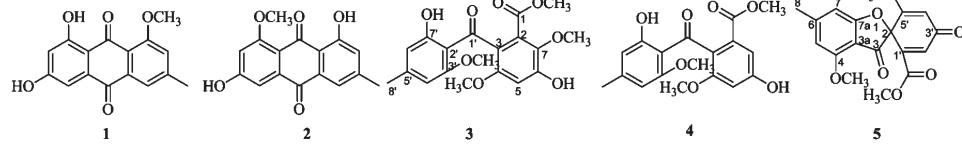


图 1 化合物 1~5 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of compounds 1~5

1.4 钙离子细胞内流(钙流)活性测试^[10,11]

人肺癌上皮细胞 A549 接种于 96 孔板,每孔 2×10^4 个细胞,覆盖多聚-L-赖氨酸后培养 12 h,然后用 HBSS 缓冲液(1.26 mM CaCl₂,0.493 mM MgCl₂,0.407 mM MgSO₄,5.33 mM KCl,0.441 mM KH₂PO₄,4.17 mM NaHCO₃,137.93 mM NaCl,0.338 mM NaHPO₄,5.56 mM D-Glucose,pH 7.2~7.4)洗涤三次,加入 2 μM 钙荧光探针 Fluo-4 AM(DOJINDO)在 37 °C 浸染 30 min,再用 HBSS 缓冲液洗三次,最后用 Thermo Scientific 高内涵系统平台[ArrayScan VTI HCS Reader 仪(Cellosomics, Thermo Scientific, USA)]测定荧光强度。在加入化合物之前,预先检测基线约 1 min,检测频率 5 s,获得荧光强度的基

线后暂停检测;随后往加样孔中加入 10 μL 测试样品(10 μM)工作液,立即进行检测。连续监测 5 min,检测频率 5 s;激发光波长为 488 nm,发射光波长为 543 nm。对照工作液为 5 μL 的 Calcium ionophore(10 μM)。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 黄色粉末(CHCl₃-CH₃OH)¹H NMR(400 MHz, DMSO) δ_H: 13.21 (1H, s, H₈-OH), 7.43 (1H, s, H-4), 7.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5), 7.11 (1H, s, H-2), 6.84 (1H, d, J = 1.8 Hz, H₇-H),

3.91 (3H, s, H₁-OCH₃) , 2.39 (3H, s, H₃-CH₃) ; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ_{C} : 186.1 (C-9), 182.4 (C-10), 164.3 (C-8), 163.3 (C-6), 161.5 (C-1), 146.4 (C-3), 136.9 (C-4a), 131.6 (C-10a), 123.9 (C-4), 119.0 (C-2), 114.1 (C-9a), 112.2 (C-8a), 106.7 (C-7), 104.9 (C-5), 56.2 (C₁-OCH₃) , 21.1 (C₃-CH₃)。以上波谱数据与文献^[12]一致,因此鉴定化合物**1**为大黄素-1-甲醚。

化合物2 红棕色粉末(CHCl₃-CH₃OH)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ_{H} : 13.94 (1H, s, H₁-OH), 12.87 (1H, s, H₆-OH), 7.27 (1H, s, H-4), 6.95 (1H, s, H-5), 6.84 (1H, s, H-2), 6.33 (1H, s, H-7), 3.71 (3H, s, H₈-OCH₃) , 2.26 (3H, s, H₃-CH₃)。以上波谱数据与文献^[13]一致,因此鉴定化合物**2**为大黄素-8-甲醚。

化合物3 白色粉末(CHCl₃-CH₃OH)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 12.67 (1H, s, 7'-OH), 6.69 (1H, s, H-5), 6.43 (1H, s, H-6'), 6.08 (1H, s, H-4'), 3.85 (3H, s, 7-OCH₃) , 3.69 (3H, s, 4-OCH₃) , 3.61 (3H, s, 1-COOCH₃) , 3.44 (3H, s, 3'-OCH₃) , 2.29 (3H, s, 8'-CH₃) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 197.6 (C-1'), 165.6 (C-1), 164.1 (C-7'), 160.9 (C-3'), 153.0 (C-4), 150.4 (C-6), 148.5 (C-5'), 138.7 (C-7), 125.5 (C-3), 123.7 (C-2), 110.9 (C-6'), 103.1 (C-4'), 102.0 (C-5), 63.1 (7-OCH₃) , 56.6 (4-OCH₃) , 55.9 (3'-OCH₃) , 52.4 (1-COOCH₃) , 22.7 (C-8')。以上波谱数据与文献^[14]一致,因此鉴定化合物**3**为asperfumin。

化合物4 白色粉末(CHCl₃-CH₃OH)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.96 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-7), 6.68 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 6.39 (1H, s, H-6'), 6.21 (1H, s, H-4'), 3.69 (3H, s, 4-OCH₃) , 3.66 (3H, s, 1-COOCH₃) , 3.38 (3H, s, 3'-OCH₃) , 2.29 (3H, s, 8'-CH₃) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 201.6 (C-1'), 168.0 (C-1), 165.3 (C-7'), 162.6 (C-3'), 159.7 (C-4), 158.4 (C-6), 149.6 (C-5'), 141.2 (C-3), 132.5 (C-2), 129.9 (C-2'), 111.1 (C-7), 108.7 (C-6'), 104.0 (C-4'), 104.0 (C-5), 56.5 (4-OCH₃) , 56.2 (3'-OCH₃) , 52.5 (1-COOCH₃) , 22.4 (C-8')。以上波谱数据与文献^[15]一致,因此鉴定化合物**4**为monomethylsulochrin。

化合物5 白色粉末(CHCl₃-CH₃OH), $[\alpha]_D =$

-141.7°(甲醇)。ESI-MS m/z : [M + K]⁺ 399, [2M + Na]⁺ 743, 显示分子量为360。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7.11 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 6.55 (1H, s, H-5), 6.37 (1H, s, H-7), 5.77 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-4'), 3.95 (3H, s, 4-OCH₃) , 3.69 (3H, s, 1'-COOCH₃) , 3.66 (3H, s, 5'-OCH₃) , 2.44 (3H, s, 8-CH₃) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 190.7 (C-3), 185.9 (C-3'), 174.5 (C-7a), 169.6 (C-5), 163.6 (1'-COOCH₃) , 158.4 (C-4), 152.4 (C-6), 138.3 (C-1'), 137.3 (C-2'), 108.4 (C-3a), 105.7 (C-7), 105.5 (C-5), 104.1 (C-4'), 84.1 (C-2), 56.9 (5'-OCH₃) , 56.2 (4-OCH₃) , 53.0 (1'-COOCH₃) , 23.3 (8-CH₃)。其C-2的相对构型通过比旋光度与文献^[16]比较确定,即本品的比旋度 $[\alpha]_D = -141.7^\circ$ (*c* 0.17, CH₃OH),与文献报道的-160°(CH₃OH)基本一致。以上波谱数据与文献^[16]一致,因此鉴定化合物**5**为trypacidin。

2.2 钙流活性测试结果

对化合物**1~5**及前期分离的3个生物碱成分pyripyropene A(**6**)、verruculogen(**7**)、9-deacetylumigaeclavine C(**8**)进行钙流活性测试。测试结果显示:0~50 s各样品测值基线总体基本稳定,59 s加入对照工作液后,测值立即上升,测值约为520,是基线的近6倍,以后测值基本稳定、未下降;影像中在加入对照工作液后,细胞出现明显荧光增强现象,背景变黑,荧光增强后基本稳定、未减弱。从图表和影像都说明10 μM对照品Calcium ionophore可以促进钙离子细胞内流。加入化合物**1**样品工作液后,测值先上升后下降;影像中细胞荧光在加入样品后先增强后减弱,说明10 μM化合物**1**(大黄素-1-甲醚)具有促进钙离子细胞内流的活性。加入化合物**2~8**样品工作液后,测值变化不大;影像中细胞无明显变化,说明它们对细胞钙流无影响。试验结果见图2。

3 讨论

从白三叶草植物新鲜叶片中分离得一株高产蒽醌化合物的真菌烟曲霉*Aspergillus fumigatus*。通过钙流模型的生物活性测试,筛选到化合物**1**(大黄素-1-甲醚)具有较明显的活性,因此,化合物**1**在生物防治紫茎泽兰上的作用值得进一步深入研究。同时,此研究也提示我们在关注蒽醌化合物的肾保护作用的同时,也应注意它们的钙流活性及由此而带来的生理、病理作用。

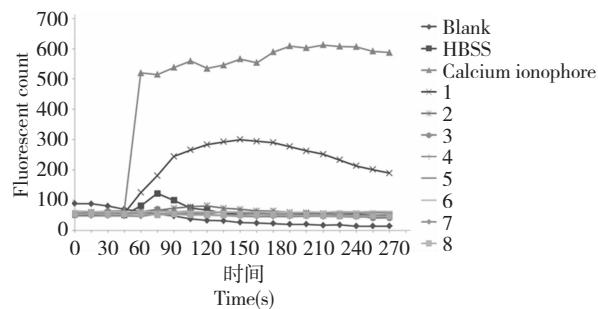


图2 化合物1~8的钙荧光强度信号曲线

Fig. 2 Stimulation of calcium signaling in A549cells by 1~8 (10 μ M)

参考文献

- 1 Sun YH (孙毅宏), Fu LP (富丽萍). The treatment of diabetic nephropathy. *Med Recapitul* (医学综述), 2015, 21: 3191-3193.
- 2 Liu ZH (刘志红), Li LS (黎磊石).探索糖尿病肾病防治的新途径. *J Nephro Dialy Transplant* (肾脏病与透析肾移植杂志), 2002, 11:1-2.
- 3 Yang Y, Yan YM, Wei W, et al. Anthraquinone derivatives from *Rumex* plants and endophytic *Aspergillus fumigatus* and their effects on diabetic nephropathy. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23:3905-3909.
- 4 Gu LB (顾刘宝), Wan YG (万毅刚), Wan M (万铭). 大黄治疗糖尿病肾病的分子细胞机制研究进展. *J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28:703-705.
- 5 Cao H (曹贺), Du J (杜娟), Sun WX (孙伟新), et al. Study on preparation and anti-diabetic nephropathy activities of rhein derivatives. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2011, 21:189-194.
- 6 Yang YX (杨勇勋), Dong XP (董小萍), Yan YM (晏永明), et al. Studies on secondary metabolites produced by endophytic *Aspergillus fumigatus* from *Trifolium repens*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:64-67.

- 7 Jin ZH (靳珠华), Ma DL (马德录), Lin XZ (林秀珍), et al. Effects of emodin on the isolated intestinal smooth muscle of guinea-pigs. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 1994, 14:429-431.
- 8 Yang WX (杨文修), Wang J (王津), Li JY (李俊英), et al. Characteristic of emodin evoked $[Ca^{2+}]_i$ and inhibition of GDP in guinea pig Taenia Coli cells. *Acta Biophys Sin* (生物物理学报), 2001, 17:65-69.
- 9 Gu JF (顾觉奋). The research progress on cardiac toxic mechanism of anthracyclines and prevention treatment measures. *World Notes Antibiotics* (国外医药抗生素分册), 2015, 36:241-255.
- 10 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, 260:3440-3450.
- 11 Schlag BD, Lou Z, Fennell M, et al. Ligand dependency of 5-hydroxytryptamine 2C receptor internalization. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310:865-870.
- 12 Jia ZB (贾振宝), Chen WW (陈文伟), Jiang JX (蒋家新), et al. Study on anthraquinone constituents in the seed of *Cassia tora* L. *Chem Ind Forest Prod* (林产化学与工业) 2009, 29:100-103.
- 13 Hua Y (华燕), Zhou JY (周建于), Ni W (倪伟), et al. Studies on the constituents of *Reynoutria japonica* Houtf. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2001, 13:16-18.
- 14 Liu JY, Song YC, Zhang Z, et al. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *J Biotechnol*, 2004, 114:279-287.
- 15 Zhang ZJ (张志杰), Qu LB (屈凌波), Zhou YM (周雨朦), et al. Identification of endophytic SIPI3. 0550 and Its metabolites. *Chin J New Drugs* (中国新药与临床杂志), 2010, 19:1402-1406.
- 16 Balan J, Kjaer A, Kovac S, et al. The structure of trypacidin. *Acta Chem Scand*, 1965, 19:528-530.