

文章编号:1001-6880(2016)11-1732-05

牡蒿内生真菌 *Pestalotiopsis uvicola* GMH31 固体发酵产物的分离鉴定

钱一鑫¹, 康冀川^{1,2*}, 何 瑞¹, 王 鲁¹, 雷帮星¹¹贵州大学 西南药用生物资源教育部工程研究中心; ²贵州大学药学院, 贵阳 550025

摘要:采用硅胶柱、凝胶柱等色谱技术及重结晶从牡蒿内生真菌 *Pestalotiopsis uvicola* GMH31 的固体发酵产物中分离纯化了 10 个化学成分, 通过化合物波谱数据及理化性质鉴定它们的结构分别为胸腺嘧啶(1)、尿嘧啶(2)、木犀草素(3)、芦丁(4)、槲皮素(5)、香草酸(6)、原儿茶酸(7)、山奈酚(8)、染料木素(9)、柚皮素(10)。其中化合物 1~10 均为首次从 *P. uvicola* 中分离获得, 化合物 3~5, 8~10 为黄酮类化合物, 化合物 8 对 A2780/Taxol 细胞耐药性的逆转作用相对较强。

关键词:*Pestalotiopsis uvicola*; 内生真菌; 次级代谢产物; 牡蒿

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.008

Isolation and Identification of Secondary Metabolites from the Solid Culture of Endophytic Fungal Strain *Pestalotiopsis uvicola* GMH31 from *Artemisia japonica*

QIAN Yi-xin¹, KANG Ji-chuan^{1,2*}, HE Jun¹, WANG Lu¹, LEI Bang-xing¹

¹Engineering and Research Center for Southwest Bio-Pharmaceutical Resources of National Education Ministry of China, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²College of Agronomy, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Ten chemical constituents were isolated and purified from the solid culture of endophytic fungal strain *Pestalotiopsis uvicola* GMH31 isolated from *Artemisia japonica* by silica gel column chromatography, Sephadex-LH20 column chromatography and recrystallization. On the basis of spectral data and physicochemical properties, their structures were identified as thymine (1), uracil (2), luteolin (3), rutin (4), quercetin (5), vanillic acid (6), protocatechuic acid (7), kaempferol (8), genistein (9) and 4',5,7-trihydroxyflavanone (10). All the compounds were isolated from *P. uvicola* for the first time, and compound 3~5 and 8~10 belong to flavonoids. Compound 8 showed better reversal effect on the ovarian cancer cell line A2780/Taxol.

Key words:*Pestalotiopsis uvicola*; endophytic fungus; secondary metabolite; *Artemisia japonica*

内生真菌(endophytic fungus)是一大类未被充分认识的真菌, 是指在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内, 对健康植物组织不引起任何病害症状的所有真菌^[1]。近年来研究表明, 植物内生真菌能够产生多种结构类型的活性代谢产物^[2]。来源于药用植物的内生真菌能够产生和宿主植株相同或者相似的生物活性物质, 因此药用植物内生真菌是发现天然活性物质的重要资源。

收稿日期:2016-07-08 接受日期:2016-08-09

基金项目:贵州省科技厅联合资金项目(黔科合 LH 字[2014]7657 号);贵州省科技厅农业攻关项目(黔科合 NY[2013]3042 号、黔科合 NY[2013]3044 号);贵州大学引进人才科研项目(贵大人基合字[2014]59 号);国家自然科学基金(31670027)

* 通讯作者 Tel:86-851-88298675; E-mail:jckang@gzu.edu.cn

拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 真菌能产生结构新颖和活性多样的次生代谢产物^[3]。本研究在前期对系列蒿属植物内生真菌的研究中^[4-8], 发现一株来源于药用植物牡蒿的内生真菌 *Pestalotiopsis uvicola* GMH31 具有抗菌、抗氧化和抗肿瘤活性。为了系统、深入地研究该株内生真菌的活性次生代谢产物, 本研究以大米为培养基质对菌株 GMH31 进行固体发酵培养, 并对其发酵产物进行分离纯化和结构鉴定, 从中分离获得 10 个化合物, 分别鉴定为: 胸腺嘧啶(1)、尿嘧啶(2)、木犀草素(3)、芦丁(4)、槲皮素(5)、香草酸(6)、原儿茶酸(7)、山奈酚(8)、染料木素(9)、柚皮素(10)。所有化合物均为首次从 *P. uvicola* 中分离得到。

1 材料与方法

1.1 仪器

YXQ-LS-75S 蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司)、HRCJ-1S 超净工作台(青岛海尔)、SPX-150C 恒温恒湿培养箱(上海博讯实业有限公司)、SB-5200DTS 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)、JA2003 电子天平(上海天平仪器厂)、RE-520A 旋转蒸发仪(上海亚荣)、UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津)、HP-5973 型质谱仪(美国惠普公司)、NOVA-400/500 核磁共振谱仪(TMS 内标, 美国 Varian 公司)。

1.2 试剂

柱色谱硅胶(100~200 目、200~300 目, 青岛海洋化工厂), GF₂₅₄ 高效薄层硅胶板(青岛海洋化工厂), 凝胶 Sephadex LH-20(18~110 μm, Amersham Biosciences Ltd.), 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA, 青岛海博生物技术有限公司), 其余试剂均为分析纯, 购自贵州赛兰博科技有限公司。

1.3 菌株

内生真菌 *Pestalotiopsis uvicola* GMH31 分离自贵州省贵阳市郊区药用植物牡蒿的叶片, 经本课题组康冀川教授鉴定为 *Pestalotiopsis uvicola*, 该菌株现保存于贵州大学西南药用生物资源教育部工程研究中心药用真菌实验室。

1.4 菌株发酵

称取大米约 20 g, 置于瓶内, 加水刚好浸没大米, 聚乙烯膜封口, 共 500 瓶, 121 °C 灭菌 30 min。将 *Pestalotiopsis uvicola* GMH31 菌株接种于 PDA 固体培养基平板内, 28 °C 培养 7 d。活化好的菌株平板用 9 mm 打孔器沿同心圆打孔, 将直径 9 mm 的菌饼接种于大米培养基瓶内, 每瓶接种一个, 静置 28 °C 培养 60 d。大米培养基需要用灭菌的筷子无菌操作下搅拌, 以保证透气性。

1.5 发酵产物的提取与分离

将固体发酵产物用 95% 乙醇浸提 3 次, 浓缩得发酵物提取物, 加入适量水悬浮, 用乙酸乙酯萃取 5 次, 至上层液澄清, 40 °C 下减压浓缩, 得浸膏 36.8 g。浸膏过硅胶柱, 以石油醚-氯仿-甲醇梯度洗脱, 用薄层色谱(TLC)检测(254 nm 和 365 nm 下观察), 合并相似组分, 共得到 10 个组分(E1~E10)。E2 组分经正相硅胶柱(石油醚-氯仿 2:1~1:2)洗脱, 分别得化合物 1(11.4 mg)和 2(9.7 mg)。E5 组

分经正相硅胶柱, 以石油醚-氯仿 200:1~10:1 洗脱得到亚组份 E5-2 和 E5-6; E5-2 组分经 Sephadex LH-20(甲醇-水 1:1)洗脱和重结晶分别得化合物 3(12.6 mg)和 4(20.7 mg); E5-6 用甲醇反复重结晶得化合物 5(23.5 mg)。E7 组分经正相硅胶柱层析(氯仿-甲醇 2:1~1:2)分别得化合物 6(15.7 mg)和 7(9.5 mg)。E8 组分经正相硅胶柱层析(氯仿-甲醇 1:1)洗脱, 用甲醇反复重结晶得化合物 8(23.0 mg)。E10 组分经 Sephadex LH-20(甲醇-水 1:1)洗脱, 正相硅胶柱层析(环己烷-丙酮 100:1~10:1)分别得化合物 9(16.1 mg)和亚组份 E10-11, 亚组份 E10-11 用甲醇反复重结晶得化合物 10(18.6 mg)。

1.6 黄酮类化合物对 A2780/Taxol 耐药性的逆转作用

采用 MTT 法测定化合物 3~5、8~10 的细胞毒活性。取对数期生长的人卵巢癌细胞 A2780 细胞, 调整细胞密度, 按每孔 8×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔加 180 μL 细胞悬液, 培养 24 h 后, 加入终浓度为 40 μM 的黄酮类化合物, 及不同浓度的 Taxol, 其终浓度分别为 0、1、5、25、125、250 μg/mL, 每孔总体积 200 μL; 设对照孔为不加药物的; 调零孔为不加细胞的培养液, 每组设 3 个复孔。置于饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h, 各孔加入 MTT(5 mg/mL)10 μL, 继续培养 4 h, 弃去培养上清, 每孔加入 DMSO 150 μL 摆床上摇 10 min, 测定各孔 OD₅₇₀ 值, 计算紫杉醇对 A2780/Taxol 细胞增殖的抑制率及 IC₅₀ 值、耐药指数。其计算公式为: 细胞生长抑制率(%) = [1-(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)] × 100%; 采用 SigmaPlot 10.0 软件计算 IC₅₀ 值; 耐药逆转倍数(RI) = 黄酮化合物作用前细胞 IC₅₀/作用后细胞 IC₅₀。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色粉末; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.25 (1H, s, H-6), 1.87 (3H, s, H-5); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 163.7 (C-4), 151.0 (C-2), 140.2 (C-6), 107.1 (C-5), 18.1 (5-CH₃)。以上数据与文献报道^[9]一致, 由此鉴定该化合物为胸腺嘧啶。

化合物 2 白色粉末; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.42 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-6), 5.72 (1H,

$d, J = 7.5 \text{ Hz}, \text{H-5})$; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 166.4 (C-4), 153.5 (C-2), 141.2 (C-6), 101.6 (C-5)。以上数据与文献报道^[9]一致,由此鉴定该化合物为尿嘧啶。

化合物3 黄色结晶粉末; ESI-MS m/z : 309 [M + Na]⁺, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 6.44 (1H, s, H-3), 6.10 (1H, brs, H-6), 6.31 (1H, s, H-8); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 165.77 (C-2), 103.48 (C-3), 183.15 (C-4), 162.81 (C-5), 102.06 (C-6), 172.16 (C-7), 96.49 (C-8), 159.80 (C-9), 102.96 (C-10), 120.12 (C-1'), 103.47 (C-2'), 123.09 (C-4'), 147.45 (C-3'), 113.62 (C-5'), 116.86 (C-6')。以上数据与文献报道^[10]一致,由此鉴定该化合物为木犀草素。

化合物4 黄色粉末; ESI-MS m/z : 611 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.62 (1H, d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, H-6'), 7.61 (1H, d, $J = 2.1 \text{ Hz}$, H-2'), 6.87 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-5'), 6.38 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, H-6), 5.10 (1H, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, Gle-1), 4.51 (1H, brs, Rha-1), 1.11 (3H, d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, Rha-6); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 158.42 (C-2), 135.62 (C-3), 179.33 (C-4), 162.88 (C-5), 99.91 (C-6), 165.96 (C-7), 94.85 (C-8), 159.28 (C-9), 104.74 (C-10), 123.55 (C-1'), 116.02 (C-2'), 145.77 (C-3'), 149.76 (C-4'), 117.68 (C-5'), 123.07 (C-6'), 102.38 (C-1''), 69.67 (C-2''), 71.34 (C-3''), 72.06 (C-4''), 68.52 (C-5''), 17.87 (C-6'')。以上数据与文献报道^[11]一致,由此鉴定该化合物为芦丁。

化合物5 黄色粉末; ESI-MS m/z : 303 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 12.46 (1H, s, 5-OH), 7.72 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-2'), 7.63 (H, dd, $J = 2.0, 8.5 \text{ Hz}$, H-6'), 6.88 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-5'), 6.37 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-6); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 148.01 (C-2), 137.21 (C-3), 177.32 (C-4), 158.22 (C-5), 99.24 (C-6), 165.55 (C-7), 94.42 (C-8), 162.49 (C-9), 104.52 (C-10), 124.15 (C-1'), 116.00 (C-2'), 146.21 (C-3'), 148.76 (C-4'), 116.23 (C-5'), 121.68 (C-6')。以上数据与文献报道^[12]一致,由此鉴定该化合物为槲皮素。

化合物6 无色结晶粉末; ESI-MS m/z : 169 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.54 (1H, brs, H-2), 6.83 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-5), 7.55 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-6), 3.88 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 170.03 (C-1), 122.99 (C-2), 113.69 (C-3), 152.64 (C-4), 148.62 (C-5), 115.80 (C-6), 125.25 (C-7), 56.33 (-OCH₃)。以上数据与文献报道^[13]一致,由此鉴定该化合物为香草酸。

化合物7 无色结晶粉末; ^1H NMR (Acetone-d_6 , 500 MHz) δ : 12.32 (1H, brs, -COOH), 9.27 (1H, brs, 3-OH), 9.68 (1H, brs, 4-OH), 7.54 (1H, d, $J = 1.6 \text{ Hz}$, H-2), 7.49 (1H, dd, $J = 1.6, 8.2 \text{ Hz}$, H-5), 6.91 (1H, d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, H-6); ^{13}C NMR (Acetone-d_6 , 125 MHz) δ : 167.82 (-COOH), 123.58 (C-1), 177.33 (C-2), 145.39 (C-3), 150.59 (C-4), 115.59 (C-5), 122.92 (C-6)。以上数据与文献报道^[14]一致,由此鉴定该化合物为原儿茶酸。

化合物8 黄色粉末; ESI-MS m/z : 325 [M + K]⁺, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_{10}$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 12.49 (1H, s, 5-OH), 10.79 (1H, s, 7-OH), 10.32 (1H, s, 4'-OH), 8.05 (2H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-3', 5'), 6.38 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-6); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 147.96 (C-2), 137.12 (C-3), 177.32 (C-4), 158.20 (C-5), 99.22 (C-6), 165.53 (C-7), 94.43 (C-8), 162.48 (C-9), 104.51 (C-10), 123.70 (C-1'), 130.66 (C-2'), 116.27 (C-3'), 160.51 (C-4'), 116.27 (C-5'), 130.66 (C-6')。以上数据与文献报道^[12]一致,由此鉴定该化合物为山奈酚。

化合物9 无色结晶粉末; ESI-MS m/z : 271 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ 。 ^1H NMR (Acetone-d_6 , 500 MHz) δ : 13.00 (1H, s, 5-OH), 10.99 (1H, s, 7-OH), 9.65 (1H, s, 4'-OH), 8.16 (1H, s, H-2), 7.45 (2H, dd, $J = 2.0, 8.4 \text{ Hz}$, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, H-8), 6.29 (1H, d, $J = 2.1 \text{ Hz}$, H-6); ^{13}C NMR (Acetone-d_6 , 125 MHz) δ : 154.16 (C-2), 122.93 (C-3), 181.47 (C-4), 163.48 (C-5), 99.67 (C-6), 164.95 (C-7), 94.43 (C-8), 158.33 (C-9), 105.98 (C-10), 123.97 (C-1'), 131.08 (C-2'), 115.85 (C-3'), 158.96 (C-4'), 115.85 (C-5'), 131.08 (C-6')。

以上数据与文献报道^[15]一致,由此鉴定该化合物为染料木素。

化合物 10 黄色结晶粉末; ESI-MS m/z : 271 [M-H]⁻, 分子式为 $C_{15}H_{12}O_5$ 。¹H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.30 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-2', 6'), 6.80 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', 5'), 5.87 (2H, brs, H-6, 8), 5.32 (1H, dd, J = 2.8, 13.0 Hz, H-2), 3.11 (1H, dd, J = 13.0, 17.0 Hz, H-3-trans), 2.69 (1H, dd, J = 2.8, 17.0 Hz, H-3-cis); ¹³C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 80.46 (C-2), 44.00 (C-3), 197.81 (C-4), 165.43 (C-5), 97.04 (C-6), 168.33 (C-7), 96.17 (C-8), 164.86 (C-9), 103.33 (C-10), 131.06 (C-1'),

表 1 黄酮类化合物对卵巢癌细胞 A2780/Taxol 耐药性的逆转作用

Table 1 Reversal effect of flavonoids on multidrug resistance of ovarian cancer cell line A2780/Taxol

化合物 Compound	半抑制浓度 IC_{50} ($\mu g/mL$)	耐药逆转倍数 Reversal fold
紫杉醇 Taxol	33.75	-
3	63.63	0.53
4	20.82	1.62
5	27.00	1.25
8	6.69	5.04
9	24.64	1.37
10	27.89	1.21

3 结论

从药用植物牡蒿内生真菌尤韦可拟盘多毛孢菌 (*P. uvicola*) 的大米发酵物中共提取分离获得 10 个化合物(1~10), 均为首次从 *P. uvicola* 中分离获得。化合物 3~5、8~10 为黄酮类化合物, 具有不同程度地增强 Taxol 对 A2780/Taxol 细胞的增殖抑制作用, 其中化合物 8 对 A2780/Taxol 细胞耐药性的逆转作用相对最强。

参考文献

- Petrini O, Sieber TN, Toti L, et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat Toxins*, 1992, 1:185-196.
- Sun JQ (孙剑秋), Guo LD (郭良栋), et al. Research advances in the diversities of endophytic fungi in medicinal plants and their bioactive ingredients. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2006, 26:1505-1519.
- Bai ZQ (白志强), Lin XP (林秀萍), Liu YH (刘永宏).

129.05 (C-2', 6'), 116.32 (C-3', 5'), 158.99 (C-4')。以上数据与文献报道^[15]一致,由此鉴定该化合物为柚皮素。

2.2 黄酮类化合物对 A2780/Taxol 耐药性的逆转作用

不同的黄酮类化合物能不同程度地增强 Taxol 对 A2780/Taxol 细胞的增殖抑制作用, 提高细胞对 Taxol 的敏感性, 其中以山奈酚(8)对 A2780/Taxol 细胞耐药性的逆转作用为最强, RI 为 5.04; 芦丁(4)、槲皮素(5)、山奈酚(8)、染料木素(9)和柚皮素(10)作用后较作用前 IC_{50} 下降, 说明黄酮类化合物能降低 A2780/Taxol 细胞对 Taxol 的抗性(表 1)。

表 1 黄酮类化合物对卵巢癌细胞 A2780/Taxol 耐药性的逆转作用

Table 1 Reversal effect of flavonoids on multidrug resistance of ovarian cancer cell line A2780/Taxol

Research progress on the chemical constituents from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* spp. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:706-715.

- Qian YX, Kang JC, Wang L, et al. In vitro antioxidant and antitumor activities of an endophytic fungus *Phomopsis liquidae* QH4 from *Artemisia annua*. *Chiang Mai J Sci*, 2014, 41:992-1006.
- Qian YX, Kang JC, Geng K, et al. Endophytic fungi from *Artemisia argyi* Lev. et Vant. and their bioactivity. *Chiang Mai J Sci*, 2014, 41:910-921.
- Qian YX (钱一鑫), Kang JC (康冀川), Lei BX (雷帮星), et al. Screening and taxonomic identification of endophytic fungi with antitumor and antioxidant activities from *Artemisia lactiflora*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 39:438-441.
- Qian YX (钱一鑫), Kang JC (康冀川), Lei BX (雷帮星), et al. Cytotoxic and antioxidant activities of extracts of endophytic fungus *Alternaria* sp. (PQH12) from *Artemisia annua*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:1458-1462.

(下转第 1757 页)