

中国南海深海真菌 *Exophiala* sp. SCSIO 05791 次级代谢产物研究罗小卫^{1,2}, 林秀萍¹, Limbadri Salendra^{1,2}, 庞小艳^{1,2}, 戴 昱^{1,2}, 刘永宏^{1,3*}¹中国科学院南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室, 广州 510301;²中国科学院大学, 北京 100049; ³南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广州 510275

摘要:对中国南海 500 m 深海水来源真菌 *Exophiala* sp. SCSIO 05791 进行了次级代谢产物研究; 综合运用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、中压反相柱层析以及半制备高效液相等色谱学方法对其大米发酵产物进行分离纯化, 从中分离到 8 个单体化合物, 利用核磁共振、质谱等波谱学手段并结合其理化性质及文献数据鉴定了其化学结构: stephacidin A (1)、吲哚-3-乙酸 (2)、环(D)-脯氨酸-(D)-苯丙氨酸 (3)、反式阿魏酸 (4)、顺式阿魏酸 (5)、2-(乙酰氨基)-苯酚 (6)、氨基苯甲酸 (7)、4-羟基苯酐 (8)。化合物 1~8 均为首次从该属中分离得到。

关键词: 中国南海; 海洋真菌; 次级代谢产物; 外瓶霉属

中图分类号: R931.77

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.010

Secondary Metabolites from South China Sea Deep-water-derived Fungus *Exophiala* sp. SCSIO 05791

LUO Xiao-wei^{1,2}, LIN Xiu-ping¹, SALENDRA Limbadri^{1,2}, PANG Xiao-yan^{1,2}, DAI Yu^{1,2}, LIU Yong-hong^{1,3*}¹GuangdongKey Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology,Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; ²University of ChineseAcademy of Sciences, Beijing 100049, China; ³South China Sea Bio-Resource

Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510275, China

Abstract: The secondary metabolites of *Exophiala* sp. SCSIO 05791, a fungus isolated from South China Sea 500 m depth water, were investigated. Eight compounds were obtained from the rice static fermentation products, which were purified by comprehensive chromatography methods of silica gel column, Sephadex LH-20, Ostade-cylsilane (ODS), and semi-preparative HPLC and their structures were elucidated by means of physical and chemical properties, spectroscopic analysis, and comparison with the reported literatures, which were stephacidin A (1), indole-3-acetic acid (2), cyclo(D)-Pro-(D)-Phe (3), *trans*-ferulic acid (4), *cis*-ferulic acid (5), 2-(acetylamino)-phenol (6), anthranilic acid (7) and 4-hydroxyphthalide (8). Compounds 1-8 were all obtained from genus *Exophiala* for the first time.

Key words: South China Sea; marine fungi; secondary metabolites; *Exophiala* sp.

海洋占地球表面积的 70%, 而大于 1000 m 深海区域占整个海洋空间的 95%, 广阔的海洋生活环境造就了海洋生物物种的多样性。此外, 深海具有高压、高盐、低温(部分热液口为高温)、低氧、光照缺乏等极端生态环境, 而这种特殊环境导致了其生物特殊的代谢途径和生理机制, 从而产生结构新颖、活性显著的次级代谢产物^[1]。

微生物作为海洋生物王国中最为丰富的类群之一, 在海洋生态系统中扮演着重要的角色。海洋真

菌作为海洋微生物家族中重要的一员, 是活性次级代谢产物主要来源之一^[2]。近年来, 已从海洋真菌中分离到聚酮、生物碱、多肽、内酯、萜类以及甾体类化合物, 它们具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化等重要生理活性^[3]。然而已有文献表明, 海洋真菌次级代谢产物研究主要集中在青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、镰刀霉属 (*Fusarium*) 及枝孢菌属 (*Cladosporium*) 等几个有限的种属中, 而真菌的系统发育树和物种多样性研究表明, 还有大量的物种亟待开展化学成分等方面研究^[4], 因此海洋真菌在小分子药物发现中仍具有良好的发掘前景。

本课题组多年来聚焦于海洋特境来源微生物中次级代谢产物的发现研究。本论文对从中国南海

收稿日期: 2016-12-23 修订日期: 2017-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(41476135)

* 通信作者 Tel: 86-20-89023244; E-mail: yonghongliu@scsio.ac.cn

500 m 深层海水中分离到的一株外瓶霉属真菌 *Exophiala* sp. SCSIO 05791 开展化学成分研究,从其大米发酵产物中分离并鉴定了 8 个化合物,即 stephacidin A(1)、吡啶-3-乙酸(2)、环(D)-脯氨酸-(D)-苯丙氨酸(3)、反式阿魏酸(4)、顺式阿魏酸(5)、2-(乙酰氨基)-苯酚(6)、氨基苯甲酸(7)、4-羟基苯酚(8),所有化合物均为首次从该属 *Exophiala* 中分离得到。

1 材料与方法

1.1 实验样品

供试菌株分离自于 2013 年 8 月采集于中国南海(110°58.712E,19°21.167N)500 m 深层海水中。将保藏于 4 °C 的菌株接种到 MB 琼脂固体平面培养基上,置于 28 °C 培养箱中活化 7 d。然后接种到 MB 种子培养液(麦芽提取物 1.5%,海盐 1.5%,水 10mL)中于 28 °C、180 rpm 条件下摇床活化 3 d,最后再接种至大米培养基(大米 200 g,海盐 1.5%,水 220 mL)中,室温下静置发酵 2 个月,共发酵 48 瓶。

1.2 菌株鉴定

首先将其总 DNA 按照文献^[5]提取出来,分别用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对总 DNA 中的 ITS 序列进行 PCR 扩增,回收纯化 PCR 产物,在连接到 PCR2.1 载体(Invitrogen)中,18S rRNA 基因序列由上海美吉生物医药科技有限公司测定,将测出来的 18S rRNA 基因序列进行 BLAST 分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。其中,该菌株(accession no. KY364370)与 *Exophiala* sp. NPfl (accession no. LC017736.1) 的相似度为 99%,故鉴定为 *Exophiala* sp. SCSIO 05791,菌种保存于中国科学院南海海洋研究所热带海洋生物资源与生态重点实验室。其 ITS 序列如下:

```
CGGTAGGTCTGGCTCGTCCTACCGGAGGACCG
TAAAACGTCTCTGGAGAGTGCCTACCGATAGCCC
AAACCAAAAACCTTTGAACAAAACATGTCTTGTCTG
AGTAAACAAAAAAATTAAGCAAAACTTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCCATAAGTAATGCCAATTGC
AGAATTCCAGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATG
CCTGTTCCGAGCGTCATTTTACCCCTCAAGC
CCCCGGCTTGGTGTGGACGGTTTGGTTAG
```

```
GTACCCCTAGATCCCTCCTAAAGACAATGA
CGGCGGCTGTTGAACCCCGGTACTACTGA
GCTTCTTAACTGAGCACGTATCGGATCTAG
GGTTTGGCGGCACCCCGGTCTCTACCTTTT
TTGCTTACAAGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
```

1.3 主要仪器与试剂

主要仪器有:AV-500 和 AV-700 超导核磁共振仪(德国 Bruker 公司)、中压制备色谱仪(Buchi 公司)、Hitachi Primade 高效液相色谱仪(日本日立公司)、ZYJ-S 型超净工作台(苏州净化设备公司)、旋转蒸发仪(日本东京理化株式会社, EYELAN-1100V-W 型)等;主要试剂有葡聚糖凝胶 sphadex LH-20 (Pharmacia 公司)、薄层色谱及柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂)、分析纯化学试剂(广州化学试剂厂和天津富宇精细化工有限公司)等。

1.4 提取与分离

发酵结束后将大米捣碎,加入等体积丙酮,超声 20 min。然后用 8 层纱布减压过滤,滤液经减压蒸馏至无有机溶剂,用乙酸乙酯萃取 3 遍,蒸干乙酸乙酯相得浸膏;滤渣用乙酸乙酯提取 3 遍至溶液颜色变浅,再经减压蒸馏得粗浸膏,合并两者得总浸膏 120 g。然后用 100 ~ 200 目硅胶拌样,经中压柱色谱(200 ~ 300 目硅胶)分离(CH₂Cl₂/MeOH 100:0 ~ 1:1)梯度洗脱后经 TLC 检识合并得 6 个流份。Fr. 3 经 ODS 中压反相柱色谱(MeOH/H₂O 5%:95% ~ 100%:0)分离得 4 个子流份,其中 Fr. 3-2 再用半制备液相(MeOH/H₂O 26%:74%)得到化合物 3(5 mg)、6(2 mg)、7(3 mg)和 8(5 mg)。Fr. 4 经 ODS 中压反相柱色谱(MeOH/H₂O 5%:95% ~ 100%:0)分离得 5 个子流份,其中 Fr. 4-1 重结晶得到化合物 1(20 mg),Fr. 4-5 用半制备液相(CH₃CN/H₂O 18%:82%)得到化合物 2(12 mg)、4(10 mg)和 5(8 mg)。化合物结构如图 1。

2 结构鉴定

化合物 1 白色粉末;254 nm 下有暗斑。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ: 5.71 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-26), 6.92 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-25), 7.08 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4), 6.46 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 3.32 (1H, m, H-21), 3.25 (1H, m, H-14a), 3.36 (1H, m, H-14b), 2.10 (2H, m, H-20), 1.82 (1H, m, H-16a), 2.52 (1H, m, H-16b), 1.00 (3H, s, H-23),

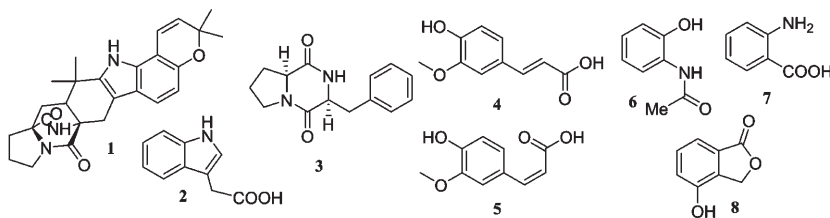


图1 化合物1~8的化学结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-8

1. 36(3H, s, H-29), 1. 37(3H, s, H-28), 1. 28(3H, s, H-24), 2. 42(2H, m, H-10), 1. 82(1H, m, H-15a), 1. 97(1H, m, H-15b), 10. 4(1H, br s, 1-NH), 8. 68(1H, br s, 19-NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ : 173. 0(s, C-18), 168. 4(s, C-12), 147. 4(s, C-6), 139. 5(s, C-2), 132. 7(s, C-8), 128. 9(d, C-26), 121. 5(s, C-9), 118. 1(d, C-25), 117. 5(d, C-4), 108. 6(d, C-5), 104. 8(s, C-7), 103. 8(s, C-3), 75. 0(s, C-27), 65. 9(s, C-17), 59. 6(s, C-11), 49. 2(d, C-21), 43. 5(t, C-14), 34. 6(s, C-22), 30. 1(t, C-20), 28. 7(t, C-16), 27. 9(q, C-23), 27. 1(q, C-29), 27. 0(q, C-28), 24. 0(t, C-10), 23. 8(t, C-15), 21. 5(q, C-24). 以上数据与文献^[6]报道基本一致,故鉴定该化合物为 stephacidin A。

化合物 2 棕褐色固体; 254 nm 下有暗斑。 ^1H NMR(CD₃OD, 500 MHz), δ : 7. 16(1H, s, H-2), 7. 10(1H, td, $J = 1. 8, 8. 0$ Hz, H-6), 7. 02(1H, td, $J = 1. 8, 8. 0$ Hz, H-5), 7. 54(1H, td, $J = 1. 8, 8. 0$ Hz, H-4), 7. 34(1H, td, $J = 1. 8, 8. 0$ Hz, H-7), 3. 72(2H, s, H-8); ^{13}C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ : 176. 4(s, C-9), 137. 9(s, C-7a), 128. 6(s, C-3a), 124. 6(d, C-2), 122. 4(d, C-6), 119. 7(d, C-5), 119. 3(d, C-4), 112. 2(d, C-7), 108. 8(s, C-3), 31. 8(t, C-8)。以上数据与文献^[7]对照基本一致,故鉴定该化合物为吲哚-3-乙酸。

化合物 3 黄棕色固体; ^1H NMR(CD₃OD, 700 MHz), δ : 7. 28(1H, m, H-2'), 7. 25(1H, m, H-3'), 7. 24(1H, m, H-4'), 4. 08(1H, m, H-6), 4. 45(1H, m, H-9), 3. 54(1H, m, H-3a), 3. 38(1H, m, H-3b), 3. 17(2H, m, H-10), 2. 09(1H, m, H-5a), 1. 79(1H, m, H-5b), 1. 78(1H, m, H-4a), 1. 23(1H, m, H-4b); ^{13}C NMR (CD₃OD, 175 MHz), δ : 169. 5(s, C-1), 165. 4(s, C-7), 135. 9(s, C-1'), 129. 6(d, C-2'), 128. 0(d, C-3'), 126. 6(d, C-4'), 58. 6(d, C-6), 56. 2

(d, C-9), 44. 6(t, C-3), 36. 8(t, C-10), 27. 9(t, C-5), 21. 3(t, C-4)。以上数据与文献^[8]对照基本一致,故鉴定该化合物为环(D)-脯氨酸-(D)-苯丙氨酸。

化合物 4 棕色固体; ^1H NMR(DMSO- d_6 , 500 MHz), δ : 7. 46(1H, d, $J = 16$ Hz, H-7), 6. 77(1H, d, $J = 8. 5$ Hz, H-6), 7. 06(1H, d, $J = 8. 5$ Hz, H-5), 6. 34(1H, d, $J = 16$ Hz, H-8), 7. 26(1H, s, H-2), 3. 80(3H, s, H-10), 12. 10(1H, br s, H-9), 9. 59(1H, br s, H-4); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ : 168. 0(s, C-9), 149. 1(s, C-3), 147. 9(s, C-4), 144. 4(d, C-7), 125. 7(s, C-1), 122. 8(d, C-6), 115. 5(d, C-8), 115. 6(d, C-5), 111. 1(d, C-2), 55. 7(q, C-10)。以上数据与文献^[9]对照基本一致,故鉴定该化合物为反式阿魏酸。

化合物 5 棕褐色油状物; ^1H NMR(CD₃OD, 500 MHz), δ : 6. 79(1H, d, $J = 12. 5$ Hz, H-7), 7. 09(1H, dd, $J = 2. 0, 8. 0$ Hz, H-6), 6. 74(1H, d, $J = 8. 0$ Hz, H-5), 5. 76(1H, d, $J = 12. 5$ Hz, H-8), 7. 71(1H, d, $J = 2. 0$ Hz, H-2), 3. 85(3H, s, H-10); ^{13}C NMR (CD₃OD, 125 MHz), δ : 170. 3(s, C-9), 149. 2(s, C-3), 148. 3(s, C-4), 144. 3(d, C-7), 128. 2(s, C-1), 126. 3(d, C-6), 117. 3(d, C-5), 115. 8(d, C-8), 114. 8(d, C-2), 56. 3(q, C-10)。以上数据与文献^[9]对照基本一致,故鉴定该化合物为顺式阿魏酸。

化合物 6 棕色固体; ^1H NMR(DMSO- d_6 , 700 MHz), δ : 6. 92(1H, dt, $J = 1. 4, 8. 4$ Hz, H-4), 7. 66(1H, dd, $J = 1. 4, 8. 4$ Hz, H-6), 6. 74(1H, dt, $J = 1. 4, 8. 4$ Hz, H-5), 6. 85(1H, dd, $J = 1. 4, 8. 4$ Hz, H-3), 2. 08(3H, s, H-8), 9. 75(1H, br s, 2-OH), 9. 29(1H, br s, 1-NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 175 MHz), δ : 168. 9(s, C-7), 147. 8(s, C-2), 126. 3(s, C-1), 124. 6(d, C-4), 122. 3(d, C-6), 118. 9(d, C-5), 115. 8(d, C-3), 23. 6(q, C-8)。以上数据与文献^[10]

对照基本一致,故鉴定化合物为 2-(乙酰氨基)-苯酚。

化合物 7 黄棕色油状物; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 700 MHz), δ : 7.26 (1H, dt, $J = 2.1, 8.4$ Hz, H-5), 7.84 (1H, dd, $J = 2.1, 8.4$ Hz, H-3), 6.63 (1H, dt, $J = 2.1, 8.4$ Hz, H-4), 6.78 (1H, dd, $J = 2.1, 8.4$ Hz, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 175 MHz), δ : 170.1 (s, C-7), 150.8 (s, C-1), 133.6 (d, C-5), 131.2 (d, C-3), 116.5 (d, C-4), 115.5 (d, C-6), 110.7 (s, C-2)。以上数据与文献^[11]对照基本一致,故鉴定该化合物为氨基苯甲酸。

化合物 8 白色固体; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz), δ : 7.40 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 7.27 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-7), 7.12 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-5), 5.30 (2H, s, H-3), 10.46 (1H, br s, 4-OH); $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz), δ : 170.7 (s, C-1), 152.2 (s, C-4), 133.2 (s, C-3a), 130.5 (d, C-6), 126.6 (s, C-7a), 120.0 (d, C-7), 115.2 (d, C-5), 68.0 (t, C-3)。以上数据与文献^[12]对照基本一致,故鉴定该化合物为 4-羟基苯酚。

3 讨论与结论

本文对分离自中国南海 500 m 深层海水来源真菌 *Exophiala* sp. SCSIO 05791 进行了次级代谢产物研究,共分离得到 8 个化合物,所有化合物均为首次从该属中分离得到。文献报道显示 stephacidin A (**1**)对 PC3、LNCaP、A2780、HCT116、MCF-7、SKBR3、LX-1 等肿瘤细胞株具有显著的细胞毒性, IC_{50} 为 $1.00 \sim 13.1 \mu\text{M}$ ^[6]。反式阿魏酸(**4**)具有中度的抗氧化活性(DPPH 自由基清除能力), IC_{50} 为 $13.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[9]。氨基苯甲酸(**7**)具有良好的抗植物病原菌 *Pythiummultimum* 作用, MIC 为 $1.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[11]。随着样品采集技术的发展,丰富的海洋微生物资源宝库亟待深入开发研究。据我们所知,国内外对外瓶霉属 *Exophiala* sp. 次级代谢产物研究较少,本次研究为后续开展该属次级代谢产物等相关研究提供参考,也丰富了海洋真菌化学成分多样性。

参考文献

1 Skropeta D, Wei L. Recent advances in deep-sea natural

products. *Nat Prod Rep*, 2014, 31: 999-1025.

- 2 Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 382-431.
- 3 Jin L, Quan C, Hou X, et al. Potential pharmacological resources: natural bioactive compounds from marine-derived fungi. *Mar Drugs*, 2016, 14(4): 76.
- 4 Imhoff J. Natural products from marine fungi—still an under-represented resource. *Mar Drugs*, 2016, 14: 19.
- 5 Lai X, Cao L, Tan H, et al. Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea. *Isme J*, 2007, 1: 756-762.
- 6 Qian-Cutrone JF, Huang S, Shu YZ, et al. Stephacidin A and B: two structurally novel, selective inhibitors of the testosterone-dependent prostate LNCaP cells. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 14556-14557.
- 7 Guo SJ (郭书举), Su H (苏华), Li XC (李宪瑾), et al. Isolation and identification of secondary metabolites produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. L211. *Mar Sci* (海洋科学), 2014, 38(9): 75-78.
- 8 Fdhila F, Vazquez V, Sanchez JL, et al. DD-diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pectenmaximus*. *J Nat Prod*, 2003, 66: 1299-1301.
- 9 Chung HS, Shin JC. Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo). *Food Chem*, 2007, 104: 1670-1677.
- 10 Moreno-Corral R, Hoepfl H, Machi-Lara L, et al. Synthesis, structural characterization and metal inclusion properties of 18-, 20- and 22-membered oxazacyclophanes and oxazacalix 4 arene analogues: macrocyclic amine and schiff base receptors with variable N_xO_y donor Sets. *Eur J Org Chem*, 2011, 11: 2148-2162.
- 11 Park SY, Shim SH. Characterization of metabolites from cultures of *cellulosimicrobiumcellulans*. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2014, 57: 481-484.
- 12 Peng Y (彭燕), Cao WH (曹文浩), Lin XP (林秀萍), et al. Chemical constituents of seaweed *Sargassumnaozhouense*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2014, 37: 2210-2212.