

冬虫夏草定殖菌 *Aspergillus fumigatus* 中一个新的聚酮类化合物

李莎, 李小华, 邱玲, 旷歧轩, 文新, 于思, 郭大乐*, 邓赞*

成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室
省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137

摘要: 从冬虫夏草中分离得到一株定殖菌烟曲霉, 对其发酵液的乙酸乙酯萃取部位进行化学成分研究, 借助正反相硅胶柱色谱及 HPLC 等方法进行分离纯化, 分离得到一个聚酮类新化合物 **1**, 利用多种波谱手段 (HR-ESI-MS, 1D NMR, 2D NMR) 确定其结构为 6-methoxy-3-methyl-1H-isochromen-8-ol。化合物 **1** 对 H1299 (人肺癌细胞)、H460 (大细胞肺癌细胞)、HGC-27 (人胃癌细胞)、A549 (人非小细胞肺癌细胞) 和 mnk-43 (人胃癌高分化细胞) 五种细胞株均有弱的细胞毒活性。

关键词: 烟曲霉; 冬虫夏草; 6-methoxy-3-methyl-1H-isochromen-8-ol; 结构鉴定; 细胞毒活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.009

New Polyketide Isolated from *Aspergillus fumigatus*, A *Cordyceps*-colonizing Fungus

LI Sha, LI Xiao-hua, QIU Ling, KUANG Qi-xuan, WEN Xin, YU Si, GUO Da-le*, DENG Yun*

Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, State

Key Laboratory Breeding of Systematic Research Development and Utilization

of Chinese Medical Resources, Co-founded by Sichuan Province and MOST, Pharmacy Department,

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: *Aspergillus fumigatus*, a *Cordyceps*-colonizing fungus has been isolated from *Cordyceps sinensis* and its chemical constituents were investigated. A new compound **1** had been isolated from EtOAc extract of the fermentation broth by silica gel, RP C₁₈ column chromatography and preparative HPLC and its structure was elucidated as 6-methoxy-3-methyl-1H-isochromen-8-ol by various spectroscopic data (HR-ESI-MS, 1D NMR, 2D NMR). Compound **1** was shown to have weak cytotoxic activity against the H1299, H460, HGC-27, A549 and mnk-43.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; *Cordyceps sinensis*; 6-methoxy-3-methyl-1H-isochromen-8-ol; structural elucidation; cytotoxic activity

定殖真菌与宿主处于同一环境中, 共享营养, 共对危机, 在长期的协同进化过程中可能产生与宿主具有相同或类似的环境适应机制。从易于获取的定殖真菌着手, 发现有药理活性的化合物有助于探索解析一些濒危宿主的药效物质基础^[1]。冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 是麦角科线形虫草属真菌 (*Ophiocordyceps*) 寄生于蛾蛾属 (*Hepialus* spp.) 的幼

虫体内形成的复合体, 是青藏高原高海拔地区的特有物种, 具有免疫调节、抗肿瘤、降血压、抗病毒等作用^[2]。国内外的学者对冬虫夏草的定殖菌开展了大量的研究并分离得到大量的具有抑菌、抗癌、抗病毒活性的聚酮类、哌嗪类、内酰胺类、肽类成分^[3-6]。本文报道了从冬虫夏草中分到了一株定殖菌, 经鉴定为烟曲霉, 并从其发酵产物中分离得到一个新的聚酮类成分。通过活性测定, 对 H1299 (人肺癌细胞)、H460 (大细胞肺癌细胞)、HGC-27 (人胃癌细胞)、A549 (人非小细胞肺癌细胞) 和 mnk-43 (人胃癌高分化细胞) 五种细胞株均有弱的细胞毒活性。

收稿日期: 2017-06-05 接受日期: 2017-11-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81373961); 国家自然科学基金国家基础科学人才培养项目 (J13100340); 四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项 (2014TD0007)

* 通信作者 Tel: 86-28-61800232; E-mail: guodale2008@163.com; dengyun2000@hotmail.com

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Finnigan-LCQDECA 质谱仪(美国赛默飞世尔公司);Bruker Ascend 400 核磁共振仪(TMS 为内标,德国布鲁克公司);中压层析柱(上海厦美生化科技发展有限公司);Sartorius BP211D 型电子天平(德国赛托利斯公司);RE52CS 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHB-IIIS 循环水式多用真空泵(上海跃进医疗器械厂);MCV13161FT 型超净台(日本 Sanyo 公司);Multiskan MK3 型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];RO-185 净水器(浙江沁园集团股份有限公司);NP7000 型制备型高效液相色谱仪(江苏汉邦仪器有限公司);倒置显微镜(美国 Leica 公司)。

MTT(美国 SIGMA 公司,批号:#MKBR6576V);H1299(人肺癌细胞)、H460(大细胞肺癌细胞)、HGC-27(人胃癌细胞)、A549(人非小细胞肺癌细胞)和 mnk-43(人胃癌高分化细胞),美国模式培养物收藏中心(ATCC);胰酶(美国 SIGMA 公司,SLBM5252V);胎牛血清(草原绿野生物工程材料有限公司,批号:151201);柱层析硅胶(300~400 目)、薄层层析硅胶板(5×10 cm,GF₂₅₄,青岛海洋化工厂);C₁₈ 反相填料(日本 YMC 株式会社);二氯甲烷、丙酮、石油醚、乙酸乙酯、甲醇(成都科龙化工试剂厂,均为分析纯)。

冬虫夏草于 2016 年 5 月采集于甘肃省夏河县,由成都中医药大学蒋桂华教授鉴定为冬虫夏草。样品保存在成都中医药大学药学院生化制药实验室(编号 DCXC-20160503-GSSXHX)。

1.2 培养基

固体培养基(孟加拉红培养基):35 g 孟加拉红培养基,水 1L,煮沸溶解。发酵培养基:葡萄糖 20 g/L,可溶性淀粉 8 g/L,蛋白胨 5 g/L,酵母膏 2 g/L,氯化钠 2 g/L,碳酸钙 2 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,磷酸氢二钾 0.5 g/L,pH 自然。细胞培养基:RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司,批号:AAK208935)。

2 实验方法

2.1 菌株的分离及鉴定

将采集的冬虫夏草的表面清洗干净,进行表面消毒,在无菌操作室的无菌操作台中用 75% 的乙醇消毒 1 min,然后用无菌水冲洗 3 次,最后用无菌滤纸片吸干表面的水分,消毒完毕后在无菌条件下,用

灭菌剪刀将根和茎剪成 2 mm 长的小段,接种于孟加拉红培养基上,待生长出菌落时挑出,在新的平板上培养纯化。

将纯化得到的菌株交于生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将获得的 18S rRNA 基因序列提交到 NCBI 的 GenBank 基因库,经 BLAST 比对,与数据库中的已知序列进行同源性分析,该菌株鉴定为烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*。菌种保存于成都中医药大学药学院生化制药实验室(编号 DCXC-20160503-GSSXHX-20160512-3)。

2.2 发酵培养

将活化后的该菌株用接种针挑取适量菌丝体接种至含 80 mL 培养液的 250 mL 三角瓶中在 37 ℃,120 rpm 摇床培养 7 d,共发酵 80 L。

2.3 提取与分离纯化

发酵产物滤过得发酵液 80 L,用等量乙酸乙酯萃取三次,减压浓缩得提取物浸膏 20 g,浸膏过硅胶(200~300 目)柱层析,以石油醚-丙酮(100:0→1:1)梯度洗脱,用薄层色谱检测,合并相似组分,得 16 个组分(Fr1~Fr16),将 Fr6(约石油醚-丙酮 15:1 时,洗脱下来),经制备型高效液相色谱进行粗分(洗脱条件为:RP-18:20×250 mm,10 μm;甲醇-水:40:60→100:0,0~20 min,100:0→100:0,20~28 min,100:0→40:60,28~31 min,10 mL/min),得 6 个片段(Fr6a~Fr6e),将 Fr6f(保留时间约 16-20 min)经半制备高效液相色谱等度洗脱(RP-18:10×250 mm,5 μm;甲醇-水:55:45,3 mL/min)纯化的化合物 1(3.2 mg,保留时间:30~31 min)(图 1)。

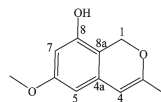


图 1 化合物 1 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of compound 1

2.4 细胞毒活性测定

在 96 孔板上,加 4×10^4 /mL 浓度的细胞悬液,每孔 0.1 mL。培养过夜待细胞完全贴壁后,分别加入含药物梯度浓度(50、25、12.5、6.25、3.125、1.625 μg/mL)的 RPMI 1640 培养基,同时设置不含药物和细胞的空白组和仅含溶剂的溶剂组,每个浓度 3 个复孔。培养 72 h 后加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL。培养箱内孵化 4 h 后,弃各孔内上清,加入 150 μL DMSO 终止反应,振荡 10 min,待各孔结晶完全溶解后,用酶标仪在 490 nm 测定各孔吸光度值 A。

细胞增殖抑制率 = $\{ [1 - (A \text{ 给药组} - A \text{ 空白组})] / (A \text{ 溶剂组} - A \text{ 空白组}) \} \times 100\%$

3 实验结果

3.1 结构鉴定

化合物 1 淡黄色胶状固体, IR (KBr) 3410.9, 2921.1, 2870.7, 1608.6, 1122.6, 994.2 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} 227.29 (3.29), 280.98 (1.30); HRESIMS m/z : 193.0863 $[M + H]^+$ (calcd for 193.0859); 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱确定该化合物的分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_3$ (表 1), 不饱和度为 6。根据 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 及 HSQC 可观察到该化合物含有 2 个甲基 ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 1.85/19.6, 3.74/55.7)、1 个亚甲基 ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 4.98/64.7)、3 个次甲基 ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 5.47/102.1, 5.96/103.0, 6.20/97.7) 及 5 个季碳 (δ_{C} : 107.2, 135.2, 156.4, 156.8, 159.2); 根据芳香区的碳数目结合不饱和度推测该化合物应该含有 2 个环。在 HMBC 谱中(图 2), 我们可以观察到 3-Me (δ 1.85) 与 C_3 (δ 156.4) 及 C_4 (δ 102.1) 的相关信号, 推测该化合物含有一个 1,2 二取代丙烯基信号, H_7

(δ 6.20), H_5 (δ 5.96), H_4 (δ 5.47), H_1 (δ 4.98) 与 $\text{C}_{8\text{a}}$ (δ 107.2) 的相关信号及 H_4 与 $\text{C}_{4\text{a}}$ (δ 135.2) 的相关信号, 推测该化合物存在一个苯环, H_5 与 C_4 有相关推测丙烯基通过 4 号位连接于苯环上, H_1 与 C_3 的相关被观察到, 结合化学位移可推测 1 号碳原子通过氧原子与 3 号碳原子相连从而构成了另一个环; H_5 和 H_7 的耦合常数说明二者为间位耦合, 结合其化学位移处于高场, 推断其两侧碳原子应与氧原子相连, 我们通过 NOESY 谱观察到, H_4 与 H_5 的相关, 可确定苯环上含氧的取代基应位于 6, 8 号碳原子上。在 HMBC 谱中我们可以观察到 H_1 与 C_8 的相关信号, 结合甲氧基与 C_6 号的相关, 可确定 8 号位连接羟基, 6 号位连接甲氧基。这样化合物 1 的结构可确定为: 6-methoxy-3-methyl-1H-isochromen-8-ol。经 SciFinder 检索为新化合物。



图 2 化合物 1 的 HMBC 和 NOESY 关键相关
Fig. 2 Key HMBC and NOESY correlations of 1

表 1 化合物 1 的氢谱 (400 MHz) 和碳谱 (100 MHz) 数据 (CD_3OD δ in ppm, J in Hz)
Table 1 ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data of 1 (CD_3OD , δ in ppm, J in Hz)

Position	^1H	^{13}C	Position	^1H	^{13}C
1	4.98 (s, 2H)	64.7	7	6.20 (d, 1H, $J=2.1$)	97.7
3	-	156.4	8	-	159.2
4	5.47 (m, 1H)	102.1	8a	-	107.2
4a	-	135.2	3-CH ₃	1.85 (s, 3H)	19.6
5	5.96 (d, 1H, $J=2.1$)	103.0	6-OCH ₃	3.74 (s, 3H)	55.7
6	-	156.8	-	-	-

3.2 细胞毒活性结果

用 MTT 法测定化合物 1 对五种 H1299、H460、HGC-27、A549、mnk-43 肿瘤细胞的生长抑制作用。结果显示化合物 1 对五种细胞株具有弱的细胞毒活性, 其 IC_{50} 值分别为 27.7、88.5、17.6、25.8、34.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

参考文献

- Che YS (车永胜). Discovery of new bioactive natural products from fungi of unique ecological niches [J]. *J Int Pharm Res* (国际药学研究杂志), 2011, 38(1): 12-27.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi [J].

Stud Mycol, 2007, 57(1): 5-59.

- Chen Y, Guo H, Du C, et al. Ecology-based screen identifies new metabolites from a *Cordyceps*-colonizing fungus as cancer cell proliferation inhibitors and apoptosis inducers [J]. *Cell Prolif*, 2009, 42: 838-847.
- Guo H, Hu H, Liu S, et al. Bioactive p-terphenyl derivatives from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Gliocladium* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70: 1519-1521.
- Zhang Y, Liu S, Che Y, et al. Epicoccins A-D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70: 1522-1525.
- Zhang Y, Liu S, Liu H, et al. Cycloaspeptides F and G, cyclic pentapeptides from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Isaria farinosa* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72: 1364-1367.