

文章编号:1001-6880(2018)5-0783-06

霍山石斛 *Stagonosporopsis oculihominis* 内生真菌次生代谢产物分离鉴定

梁益敏, 郁 阳, 孙云鹏, 刘劲松, 马宗慧, 刘海涛, 王 刚*

安徽中医药大学药学院 现代中药安徽省重点实验室 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012

摘要:利用硅胶、Sephadex LH-20、反相、中压、高效液相制备等多种色谱法从霍山石斛 *Stagonosporopsis oculihominis* 内生真菌中分离得到 17 个化合物, 分别为 acetyl-L-isoleucine (1), N-(4-戊氧基)乙酰胺 (2), N_b-乙酰基色胺 (3), 尿嘧啶 (4), 1H-indole-3-carboxylic acid (5), 2-(1H-indol-3-yl) acetic acid (6), 腺嘌呤核苷 (7), 环(L)-脯氨酸-(D)-亮氨酸 (8), 环(L)-脯氨酸-(L)-亮氨酸 (9), 环(L)-苯丙氨酸-(L)-亮氨酸 (10), 油酸 (11), α-亚油酸脂油酸 (12), 8(E)-十六烯酸 (13), 亚麻酸 (14), α-亚油酸脂 (15), 22E-7αmethoxy-5α, 6α-epoxyergosta-8 (14), 22-dien-3β-ol (16), demethylincisterol (17)。所有化合物均首次从 *Stagonosporopsis oculihominis* 内生真菌中分离得到, 其中化合物 1 为新天然产物。化合物 2、16 和 17 表现出一定的抗肿瘤活性, 其中化合物 17 具有中等抗肿瘤活性, IC₅₀ 值为 39.2~53.2 μM。

关键词:霍山石斛; *Stagonosporopsis oculihominis*; 内生真菌; 次生代谢产物

中图分类号: R284.2; Q946.8

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.5.010

Secondary Metabolites of Endophytic Fungus *Stagonosporopsis oculihominis* from *Dendrobium huoshanense*

LIANG Yin-min, YU Yang, SUN Yun-peng, LIU Jin-song, MA Zong-hui, LIU Hai-tao, WANG Gang*

School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine & Anhui Key Laboratory for modern Chinese Materia Medica&Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei 230012, China

Abstract: Seventeen compounds were isolated from the EtOAc extract of endophytic fungus *Stagoosporopsis oculihominis* in *Dendrobium huoshanense* by chromatography technology and their structures were identified as acetyl-L-isoleucine (1), N-(4-oxopentyl) acetamide (2), N_b-(2-(1H-indol-3-yl) ethyl) acetamide (3), uracil (4), 1H-indole-3-carboxylic acid (5), 2-(1H-indol-3-yl) acetic acid (6), adenine nucleoside (7), Cyclo-(L)-proline-(D)-leucine (8), Cyclo-(L)-proline-(L)-leucine (9), Cyclo-(L)-phenylalanine-(L)-leucine (10), oleic acid (11), α-linoleic acid (12), 8(E)-hexadecenoic acid (13), linolenic acid (14), α-linoleate (15), 22E-7αmethoxy-5α, 6α - epoxyergosta-8 (14), 22-dien-3β-ol (16), demethylincisterol (17) on the basis of comprehensive spectroscopic analysis. All these compounds are isolated from *Stagonosporopsis oculihominis* for the first time, including that compound 1 was a new natural product. Compounds 2, 16 and 17 exhibited cytotoxic activities, especially, compound 17 showed moderate cytotoxic activities with IC₅₀ values of 39.2~53.2 μM.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; *Stagonosporopsis oculihominis*; endophytic fungi; secondary metabolites

植物内生真菌(endophytic fungi)是指那些在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内, 对植物组织没有引起明显病害症状的真菌^[1]。植物内生真菌和宿主有着互利互生的关系, 即所谓的“内共生理论”, 这是其与宿主植物相互选择的结果, 与宿

主共同进化的内生真菌可能从宿主获得相关基因的直接传递, 具有与宿主相同的次生代谢产物合成途径^[2], 可能会产生与宿主植物相似或相同活性的次生代谢产物, 且由于内生真菌的生物多样性, 不同种的内生真菌次生代谢产物必然存在着化学多样性^[3,4], 这对今后从自然界中寻找更加丰富多样的生物活性母体先导化合物开辟新的途径。

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense*)又称米斛, 是药用石斛中的珍品, 享有中华仙草的美誉, 是安徽

收稿日期:2017-11-29 接受日期:2018-03-02

基金项目:国家中医药管理局“中药化学”重点学科建设项目; 安徽省高校自然科学基金重点项目(KJ2016A856; KJ2016A853)

*通信作者 Tel:86-551-68129167; E-mail:kunhong_8@163.com

道地药材，“十大皖药”之首，具有益胃生津、抗肿瘤、抗癌、抗白内障、抗氧化、保肝等功效^[5]。

霍山石斛野生资源匮乏，而其人工栽培产量不稳定，故当前没有足够的资源系统地研究其确切的活性成分物质基础。近年来，部分学者以内生真菌为媒介来研究开发稀有药用植物的高效活性成分，保护珍稀濒危药用植物种质资源，如紫杉和红豆杉中的紫杉醇^[6,7]。

本实验在前期研究霍山石斛内生真菌多样性的基础上选取其中其中的一株优势菌株——*Stagonosporopsis oculihominis* 进行次生代谢产物研究，旨在探索发现其与宿主植物相同或相似活性的化学成分，甚至得到结构新颖，生物活性更高的先导母体化合物，也为进一步从内生真菌中寻找新颖生物活性高的先导母体化合物，扩大天然产物探索途径奠定基础。本研究采用经典次生代谢产物分离法，从该菌株发酵物的乙酸乙酯萃取物中分离得到 17 个化合物，分别为 acetyl-L-isoleucine (1), N-(4-戊氧基)乙酰胺 (2), N_b-乙酰基色胺 (3), 尿嘧啶 (4), 1H-indole-3-carboxylic acid (5), 2-(1H-indol-3-yl) acetic acid (6), 腺嘌呤核苷 (7), 环(L)-脯氨酸-(D)-亮氨酸 (8), 环(L)-脯氨酸-(L)-亮氨酸 (9), 环(L)-苯丙氨酸-(L)-亮氨酸 (10), 油酸 (11), α-亚油酸脂油酸 (12), 8(E)-十六烯酸 (13), 亚麻酸 (14), α-亚油酸脂 (15), 22E-7αmethoxy-5α, 6α-epoxyergosta-8(14), 22-dien-3β-ol (16), demethylcisterol (17)。所有化合物均首次从 *Stagonosporopsis oculihominis* 内生真菌中分离得到。

1 仪器与材料

霍山石斛采自于安徽省六安市霍山县黑石渡镇圣农石斛开发股份有限公司基地(北 31°22'11.57、东 116°13'41.45)，经亳州技术学院方成武教授鉴定为霍山石斛 *Dendrobium huoshanense*。内生真菌分子鉴定由上海生工生物工程有限公司完成。*Stagonosporopsis oculihominis* 菌株从新鲜霍山石斛茎中分离得到，利用 PCR 技术扩增其 18 S DNA，经过基因测序比对后鉴定 *Stagonosporopsis oculihominis* (Genbank: GU237901)，活化好后放入 4 °C 冰箱，菌种保存于安徽中医药大学天然药物化学研究室。

质谱由 Waters Auto Premier P776 质谱仪、Agilent G6230AA TOF LC/MS 质谱仪或者 Agilent UPLC/Q-TOF 质谱质谱仪测定；分析型 HPLC 为 Agi-

lent 1100 型(Extend-C₁₈, 5 μm, 4.6 × 150 mm); 制备型 HPLC 为 Agilent 1260 型(Zorbax SB-C₁₈, 5 μm, 9.4 × 150 mm, 流速 8 mL/min; 21.2 × 150 mm, 流速 16 mL/min); MPLC 为瑞士 BüCHI 实验室技术服务有限公司 Sepacore System(配备泵控制系统 C-615, 泵模块 C-605, 自动接收器 C-600, 填料 RP-18, 45-70 μm, 4.5 ~ 50 cm); 正相柱层析硅胶(200 ~ 300 目)由青岛海洋化工厂生产；反相柱层析硅胶使用日本富士化工有限公司的 RP-18(45 ~ 70 μm); Sephadex LH-20 由瑞典 Amersham Biosciences 公司生产；核磁共振由 Bruker AM-400、DRX 500 测定和 AVANCE III-600、AVANCE800 核磁仪测定；所用试剂均为分析纯或色谱纯。

HL-60、A-549、SMMC-7721、MCF-7、SW480 肿瘤细胞株来自中国科学院昆明植物研究所活性筛选中心。

2 提取分离与活性

将冰箱保存的菌株 *Stagonosporopsis oculihominis* 接种到经高压灭菌的 PDA 平板培养基上，于 28 °C 培养箱活化培养 7 天。用灭菌后的 6 mm 打孔器打孔取其菌饼置装有 400 mL PDB 培养基的 1000 mL 锥形瓶中，共 100 瓶，放入振荡培养箱中，于 28 °C、135 rpm 振荡培养 15 天，总发酵体积 40 L。将发酵液(40 L)用乙酸乙酯萃取 3 次，合并萃取液减压浓缩得到黄色油状浸膏 12.7 g，经中压色谱以甲醇-水(0:100 ~ 100:0, v/v)梯度洗脱得到 9 个组分(A-I)。组分 A 硅胶柱层析，以氯仿-甲醇 5:1 洗脱，再经高效液相色谱法(CH₃CN/H₂O, 3:97 → 13:87, 20 min)制备得化合物 7(24.3 mg)。组分 B 经硅胶柱层析，以石油醚-丙酮 2:1 洗脱，再经 Sephadex LH-20 柱甲醇洗脱得亚组分 B1 和 B2，对 B1 组分利用高效液相色谱(CH₃CN/H₂O, 15:85 → 35:65, 25 min)制备得化合物 1(1.9 mg)、化合物 2(3.6 mg)；组分 C 经硅胶柱层析，以石油醚-丙酮(3:1)洗脱得到一个亚组分 C1 和 C2，对 C1 组分经高效液相色谱法(CH₃CN/H₂O, 17:83 → 37:62, 25 min)制备的得化合物 3(1.4 mg)和化合物 4(1.0 mg)；对 C2 组分进高效液相色谱法(CH₃CN/H₂O, 15:85 → 35:65, 20 min)制备得化合物 5(1.6 mg)和化合物 6(1.4 mg)；组分 D 经硅胶柱层析，以石油醚-丙酮(4:1)洗脱得组分 D1、D2 和 D3，对 D1 组分高效液相色谱(CH₃CN/H₂O, 20:80 → 40:60, 20 min)制备得再经

Sephadex LH-20 柱丙酮洗脱得化合物化合物 **10** (1.6 mg);组分 E 经硅胶柱层析,以石油醚-丙酮 5:1洗脱得组分 E1 和 E2,对组分 E1 经高效液相色谱法($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}, 20:80 \rightarrow 40:80, 25 \text{ min}$)制备的得化合物化合物 **8** (2.9 mg)和化合物 **9** (11.5 mg);组分 G 经硅胶柱层析,以石油醚-丙酮 8:1洗脱得组分 G1,对组分 G1 经高效液相色谱法($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}, 55:45 \rightarrow 80:20, 25 \text{ min}$)制备的得化合物 **16** (6.2 mg)和化合物 **17** (3.1 mg)。组分 H 经硅胶柱层析,以石油醚-丙酮 12:1洗脱得组分 H1 和 H2,对组分 H1 经 Sephadex LH-20 柱丙酮洗脱,再经高效液相色谱($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}, 75:25 \rightarrow 90:10, 20 \text{ min}$)制备得化合物 **11** (2.3 mg)、化合物 **13** (2.6 mg)和化合物 **14** (12.4 mg)。对组分 H2 经高效液相色谱($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}, 70:30 \rightarrow 80:10, 20 \text{ min}$)制备得化合物 **12** (11.4 mg)和化合物 **15** (6.2 mg)。

采用 MTT 法^[8],以 DDP 为阳性对照,测试化合物 **2**、**8**、**9**、**16**、**17** 对五种肿瘤细胞株(HL-60、A-549、SMMC-7721、MCF-7、SW480)的细胞毒活性。

3 结构鉴定

化合物 1 淡黄色油状物;ESI-MS: 174 [M^+]⁺ (3), 128 (50), 117 (45), 99 (100), 86 (55), 74 (20), 60 (19), 57 (28);¹H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 600 \text{ MHz}$) δ : 4.31 (1H, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, H-2), 2.01 (3H, s, CH_3CO), 1.52 (1H, m, H-4b), 1.15 (1H, m, H-4a), 0.95 (6H, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, H-6, H-7);¹³C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 125 \text{ MHz}$) δ : 176.7 (C-1), 59.5 (C-2), 38.7 (C-3), 26.2 (C-4), 22.6 (CO- CH_3), 12.1 (C-6), 16.3 (C-7), 173.3 (CO)。合以上数据该化合物含有 3 个甲基,2 个羰基,1 个次甲基,1 个亚甲基,再根据氢谱偶合裂分推测该化合物是一个链状结构,最后根据 2D NMR:由 HMBC 和 HSQC 谱上可知 H-7(CH_3)与 C-2,C-3,C-4 相关,H-6(CH_3)与 C-3,C-4 相关以及 H-2 与 C-1,C-3,C-4,C-7 相关得出母核为 3-methylpentanoic acid,结合分子量是奇数,含有一个氮原子,HMBC 谱上 H-2 与酰胺 C 相关,即得出甲酰胺位于分子 C-2 位,即也符合 C-2 为化学位移值达到 60 ppm 左右(2D NMR 相关见图 1)。以上数据与文献报道一致^[9],故确定为 acetyl-L-isoleucine。

化合物 2 黄色针状结晶;ESI-MS: 166 [$\text{M} + \text{Na}]^+$;¹H NMR [(CD_3)₂CO, 600 MHz] δ : 3.10 (2H,

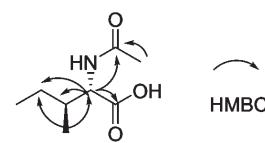


图 1 化合物 1 HMBC 关键相关

Fig. 1 Key HMBC correlations of compound 1

$q, J = 6.3 \text{ Hz}$, H-5'), 2.45 (2H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, H-4'), 1.64 (2H, m, H-3'), 2.06 (3H, s, CH_3), 1.81 (3H, s, CH_3);¹³C NMR [(CD_3)₂CO, 125 MHz] δ : 22.9 (C-1), 170.1 (CO-2), 29.6 (C-1'), 207.9 (CO-2'), 40.9 (C-3'), 24.6 (C-4'), 39.1 (C-5')。以上数据与文献报道一致^[10],故确定为 *N*-(4-戊氧基)乙酰胺。

化合物 3 淡黄色油状物;ESI-MS: 225 [$\text{M} + \text{Na}]^+$;¹H NMR [$\text{CD}_3\text{OD}, 400 \text{ MHz}$] δ : 7.57 (1H, d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, H-4), 7.37 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-7), 7.15 (1H, s, H-2), 7.10 (1H, t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-6), 7.02 (1H, t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, H-5), 3.46 (2H, t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, H-10), 2.92 (1H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, H-11), 1.84 (3H, s, CH_3)。以上数据与文献报道一致^[11],故确定为 *N*-乙酰基色胺。

化合物 4 白色粉末;ESI-MS: 135 [$\text{M} + \text{Na}]^+$;¹H NMR ($\text{DMSO}-d_6, 600 \text{ MHz}$) δ : 11.02 (1H, brs, NH), 10.82 (1H, brs, NH), 7.39 (1H, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, H-5), 5.44 (1H, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, H-6);¹³C NMR ($\text{DMSO}-d_6, 150 \text{ MHz}$) δ : 151.5 (C-2), 164.4 (C-4), 100.2 (C-5), 142.3 (C-6)。以上数据与文献报道一致^[12],故确定为尿嘧啶。

化合物 5 淡黄色针状结晶;ESI-MS: 184 [$\text{M} + \text{Na}]^+$;¹H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 400 \text{ MHz}$) δ : 8.08 (1H, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, H-4), 7.93 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, H-7), 7.15 ~ 7.21 (2H, m, H-5, 6);¹³C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 125 \text{ MHz}$) δ : 133.2 (C-2), 108.4 (C-3), 122.3 (C-4), 123.5 (C-5), 122.0 (C-6), 112.8 (C-7), 127.5 (C-8), 138.1 (C-9), 169.4 (COOH)。以上数据与文献报道一致^[13,14],故确定为 1H-indole-3-carboxylic acid。

化合物 6 淡黄色针状结晶;ESI-MS: 198 [$\text{M} + \text{Na}]^+$;¹H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 400 \text{ MHz}$) δ : 7.54 (1H, d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, H-4), 7.34 (1H, d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, H-7), 7.15 (1H, s, H-2), 6.98 ~ 7.11 (2H, m, H-5, 6);¹³C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 125 \text{ MHz}$) δ : 132.7 (C-2), 109.3

(C-3), 122.3 (C-4), 124.5 (C-5), 119.7 (C-6), 112.1 (C-7), 128.7 (C-8), 138.0 (C-9), 32.4 (C-10), 173.1 (COOH)。以上数据与文献报道一致^[15,16],故确定为2-(1H-indol-3-yl)acetic acid。

化合物 7 白色粉末; ESI-MS: 291 [M + Na]⁺; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ: 8.33 (1H, s, H-2), 8.11 (1H, s, H-8), 7.33 (2H, s, NH₂), 5.86 (1H, d, *J* = 6.25 Hz, H-1'), 5.44 (2H, m, 2', 5'-OH), 5.18 (1H, m, 3'-OH), 4.60 (1H, q, *J* = 5.9 Hz, H-2'), 4.12 (1H, q, *J* = 3.1 Hz, H-3'), 3.95 (1H, q, *J* = 3.2 Hz, H-4'), 3.65 (1H, m, H-5'a), 3.55 (1H, m, H-5'b); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ: 152.40 (C-2), 149.0 (C-4), 119.3 (C-5), 156.1 (C-6), 139.9 (C-8), 87.9 (C-1'), 73.4 (C-2'), 70.6 (C-3'), 85.9 (C-4'), 61.7 (C-5')。以上数据与文献报道一致^[17],故确定为腺嘌呤核苷。

化合物 8 白色粉末; ESI-MS: 233 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 4.08 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-6), 3.95-3.85 (1H, m, H-9), 3.69-3.58 (1H, m, H-3b), 3.52 (1H, t d, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H-3a), 2.42-2.35 (1H, m, H-5a), 2.08-1.60 (6H, m, H-10, 11, 4, 5a), 0.99 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-12), 0.96 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-13); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 169.9 (C-1), 45.5 (C-3), 22.2 (C-4), 28.9 (C-5), 58.0 (C-6), 166.6 (C-7), 56.1 (C-9), 42.5 (C-10), 24.4 (C-11), 23.0 (C-12), 21.3 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[18],故确定为环(L)-脯氨酸-(D)-亮氨酸。

化合物 9 白色粉末; ESI-MS: 233 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 4.12 (1H, dd, *J* = 8.2, 3.2 Hz, H-6), 3.99 (1H, dd, *J* = 8.2, 3.2 Hz, H-9), 3.52-3.58 (2H, m, H-3), 2.14-2.35 (2H, m, H-5), 1.93-2.10 (2H, m, H-4), 1.76 (1H, m, H-11), 1.53 (1H, m, H-10), 0.93-0.99 (6H, d, *J* = 6.5 Hz, H-12, 13); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 170.3 (C-1), 45.5 (C-3), 22.7 (C-4), 28.1 (C-5), 58.9 (C-6), 166.2 (C-7), 53.4 (C-9), 38.5 (C-10), 24.6 (C-11), 23.3 (C-12), 21.2 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[19],故确定为环(L)-脯氨酸-(L)-亮氨酸。

化合物 10 白色粉末; ESI-MS: 283 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.18 ~ 7.32 (5H, m, Ar-H), 4.30 (1H, m, H-2), 3.66 (1H, m, H-

5), 3.26/2.96 (2H, m, H-7), 1.54 (2H, m, H-14), 1.24 (1H, m, H-15), 0.67-0.73 (6H, t, *J* = 6.4 Hz, H-16, 17); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 57.4 (C-2), 170.5 (C-3), 54.0 (C-5), 168.9 (C-6), 45.2 (C-7), 136.7 (C-8), 131.8 (C-9), 129.6 (C-10), 116.2 (C-11), 128.4 (C-12), 131.4 (C-13), 40.2 (C-14), 24.6 (C-15), 23.3 (C-16), 23.3 (C-17)。以上数据与文献报道一致^[20],故确定为环(L)-苯丙氨酸-(L)-亮氨酸。

化合物 11 浅黄色固体; ESI-MS: 283 [M + H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 5.34 (2H, m, H-9, 10), 2.35 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-2), 2.01 (4H, m, H-8, 11), 1.64 (2H, m, H-3), 1.29 (20H, m, H-4-7, 12-17), 0.87 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-18)。以上数据与文献报道一致^[21],故确定为油酸。

化合物 12 浅黄色固体; ESI-MS: 379 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 5.36 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 4.16 (2H, m, H-1'), 3.93 (1H, m, H-2'), 3.70 (1H, dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, H-3'a), 3.60 (1H, dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, H-3'b), 2.34 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-2), 2.02 (4H, m, H-8, 11), 1.62 (2H, m, H-3), 1.29 (20H, m, H-4-7, 12-17), 0.87 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, H-18)。以上数据与文献报道一致^[21],故确定为α-亚油酸脂油酸。

化合物 13 白色蜡状固体; ESI-MS: 255 [M + H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 5.37 (2H, m, H-9, 10), 2.22 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-2), 2.05 (4H, m, H-8, 11), 1.63 (2H, m, H-3), 1.30 (16H, m, H-4-7, 12-15), 0.88 (3H, t, *J* = 7.8 Hz, H-16)。以上数据与文献报道一致^[22],故确定为8(E)-十六烯酸。

化合物 14 浅黄色固体; ESI-MS: 279 [M + H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 5.35 (6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 2.78 (4H, t, *J* = 7.2 Hz, H-11, 14), 2.34 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-2), 2.05 (4H, m, H-8, 17), 1.62 (2H, m, H-3), 1.33 (8H, m, H-4-7), 0.87 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-18)。以上数据与文献报道一致^[23],故确定为亚麻酸。

化合物 15 浅黄色固体; ESI-MS: 377 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 5.36 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 4.16 (2H, m, H-1'), 3.93 (1H, m, H-2'), 3.70 (1H, dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, H-3'a), 3.60 (1H, dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, H-3'b), 2.78 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-11), 2.34 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-2),

2.05 (4H, m, H-8, 14), 1.62 (2H, m, H-3), 1.33 (14H, m, H-4-7, 15-17), 0.87 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, H-18)。以上数据与文献报道一致^[21],故确定为 α -亚油酸脂。

化合物 16 白色粉末; ESI-MS: 465 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 5.21 (1H, dd, $J = 15.2, 7.2$ Hz, H-23), 5.18 (1H, dd, $J = 15.2, 7.8$ Hz, H-22), 4.16 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 3.93 (1H, m, H-3), 3.41 (3H, s, OCH₃), 1.02 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.92 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 0.84 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-26), 0.82 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-27); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 32.3 (C-1), 31.3 (C-2), 68.9 (C-3), 39.7 (C-4), 65.4 (C-5), 58.6 (C-6), 72.8 (C-7), 122.5 (C-8), 40.4 (C-9), 36.1 (C-10), 19.4 (C-11), 36.6 (C-12), 43.3 (C-13), 153.5 (C-14), 25.0 (C-15), 27.4 (C-16), 56.9 (C-17), 18.3 (C-18), 16.7 (C-19), 39.5 (C-20), 21.4 (C-21), 135.5 (C-22), 132.3 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.8 (C-28), 54.8 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[24],故确定为 22E-7 α -methoxy-5 α ,6 α -ep-

oxyergosta-8 (14),22-dien-3 β -ol。

化合物 17 无色油状物; ESI-MS: 355 [M + Na]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 5.62 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 5.27 (1H, dd, $J = 15.6, 7.8$ Hz, H-16), 5.18 (1H, dd, $J = 15.6, 7.8$ Hz, H-15), 1.04 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14), 0.92 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 0.84 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-20), 0.83 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-19), 0.60 (3H, s, H-12); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 171.4 (C-1), 112.3 (C-2), 171.0 (C-3), 105.2 (C-4), 35.4 (C-5), 35.2 (C-6), 49.0 (C-7), 50.5 (C-8), 21.5 (C-9), 29.0 (C-10), 55.5 (C-11), 11.9 (C-12), 40.3 (C-13), 21.2 (C-14), 134.8 (C-15), 133.0 (C-16), 43.0 (C-17), 33.2 (C-18), 19.8 (C-19), 20.1 (C-20), 17.8 (C-21)。以上数据与文献报道一致^[25],故确定为 Demethylcisterol。

4 细胞毒活性

实验表明,化合物 2、16、17 对肿瘤细胞表现出一定的细胞毒性,其中化合物 17 对五种肿瘤细胞株均表现出中等的肿瘤抑制活性,结果见表 1。

表 1 化合物细胞毒性
Table 1 Cytotoxicity of compounds

化合物 Compound	HL-60	A-549	IC ₅₀ (μM)		
			SMMC-7721	MCF-7	SW480
2	78.35	84.23	>100	>100	89.67
8	>100	>100	>100	>100	>100
9	>100	>100	>100	>100	>100
16	69.43	78.85	63.65	81.77	73.63
17	39.21	43.24	48.33	53.22	45.34
DDP	2.83	11.71	6.72	12.65	7.61

参考文献

- Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. Andrews J H, Hirano S S. Microbial ecology of leaves [M]. New York: Spring-Verlag, 1991:179-197.
- Liang ZQ(梁宗琦). The diversity of fungal secondary metabolites and their potential applications/LIANG Zong-Qi [J]. Chin Bio(生物多样性), 1999, 7:145-150.
- Zhu SS(朱双双), Tang YF(汤逸飞), Ruan CF(阮川芬), et al. Identification and secondary metabolites of an endo-
- phytic fungus SPS-02 from *Artemisia annua* L. [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28:519-524.
- Xu YC(许言超), Rao Q(饶青), Zhou YL(周彦伶), et al. Secondary metabolites of endophytic *Penicillium cavernicola* GZWMJZ-39 from *Lycoris aurea* Herb[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:235-239.
- Si HY(司华阳), Chen ND(陈乃东), Chen NF(陈乃富). Review on isolation and pharmacological activities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),

- 2016, 28:467-470, 445.
- 6 Jiang PC(蒋彭成), Tang L(唐亮). Taxol market situation and prospect analysis[J]. *For all Health(大家健康)*, 2012, 6:110-111.
- 7 Kang JC(康冀川), Ji R(靳瑞), Wen TC(文庭池), et al. Recent research advances on endophytic fungi producing taxol[J]. *Mycosistema(菌物学报)*, 2011, 30:168-179.
- 8 Wen CN, Hu DB, Bai X, et al. Chemical constituents from fruiting bodies of Basidiomycete *Perenniporia subacida*[J]. *Fitoterapia*, 2016, 109:179-184.
- 9 Kato S, Oba Y, Ojika M, et al. Stereoselective incorporation of isoleucine into cypridina luciferin in *Cypridina hilgendorfii* (*Vargulahilgendorfii*) [J]. *Biosci Biote Bio chem*, 2006, 70: 1528-1532.
- 10 Huo PY(霍培元), Chen HH(陈华红), Jiang Y(姜怡), et al. Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Bacillus pumilus* from *Breynia fruticosa* [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2012, 22:38-43.
- 11 Wang XL(王晓龙), Li ST(李守婷), Wen CN(文春南), et al. Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium chlamydosporum* from *Dioscorea opposita* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2015, 46:966-969.
- 12 Zheng D(郑丹), Jiang Y(姜怡), Han L(韩力), et al. Chemical constituents from the mycelium of a new streptomycete[J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2010, 20:204-205.
- 13 Liu Q(刘泉), Lin WH(林文翰). Study on chemical constituents of acanthus ilicifolius linn of mangrove plant from south sea China[J]. *J Har Univ E of Comm Nat Sci(哈尔滨商业大学学报)*, 2008, 24:648-651.
- 14 Wang Y, Hamalainen A, Tois J, et al. Preparation of indole-phosphine oxazoline (IndPHOX) ligands and their application in allylic alkylation[J]. *Tetra:Asy*, 2010, 21:2376-2384.
- 15 Chimatarad SA, Basavaraj T, Nandibewoor ST. A study of the kinetics and mechanism of oxidation of L-Tryptophan by di-periodatonickelate (IV) in aqueous alkaline medium[J]. *Rus J Phy Chem A*, 2007, 81:1046-1052.
- 16 Sun DD, Dong WW, Li X, et al. Indole Alkaloids from the roots of *Isatis indigotica* and their antiherpes simplex virus type 2 (HSV-2) activity *in vitro*[J]. *Chem Nat Comp*, 2010, 46:763-766.
- 17 Du WP(杜文鹏), Xu P(徐彭), Liu B(刘波), et al. Chemical constituents from shoots of *Phyllostachys edulis* (I) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2015, 46:334-338.
- 18 Campbell J, Lin Q, Geske GD, et al. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides[J]. *Acs Chem Bio*, 2009, 4:1051-1059.
- 19 Pedras MSC, Yu Y, Liu J, et al. Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*; isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity[J]. *Z Fur Nat C*, 2005, 60:717-722.
- 20 Tullberg M, Grftli M, Luthman K. Efficient synthesis of 2,5-diketopiperazines using microwave assisted heating[J]. *Tetrahedron*, 2006, 37(37):7484-7491.
- 21 Wang S(王双). Chemical constituents of eleven higher fungi such as *Porphyra yezoensis* [D]. Kunming: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (中国科学院昆明植物研究所), 2014.
- 22 Liang HY(梁红艳), Rong X(戎谓), Chen PT(陈丕庭), et al. Anti-TMV activity and isolation of active ingredients in fruit from *Chaenomeles sinensis* [J]. *Sci Agri Sini(中国农业科学)*, 2013, 46:3571-3579.
- 23 Zhou SS(周姗姗). Preliminary study on chemical composition and the activity of *Dracocephalum* [D]. Lanzhou: Lanzhou University (兰州大学), 2013.
- 24 Gao H, Hong K, Chen GD, et al. New oxidized sterols from *Aspergillus awamori* and the endo-boat conformation adopted by the cyclohexene oxide system[J]. *Magn Reson Chem*, 2010, 48, 38-43.
- 25 Zhou J(周静), Chen M(陈敏), Li Y(李筠), et al. Secondary metabolites from a fungus *Peniophora* sp. isolated from a gorgonian *Echinogorgia* sp. [J]. *Chin J Mar Drugs(中国海洋药物杂志)*, 2012, 31:8-13.