

青灰叶下珠内生菌 *Phomopsis* sp. TJ507A 的化学成分及生物活性研究

解双双¹, 吴野^{1,2}, 张娜¹, 郭翼¹, 汪建平¹, 薛永波^{1*}, 张勇慧^{1*}

¹华中科技大学同济医学院药学院天然药物化学与资源评价重点实验室;

²华中科技大学同济医学院附属同济医院, 武汉 430030

摘要:为探究药用植物青灰叶下珠 (*Phyllanthus glaucus*) 来源内生真菌拟茎点霉 (*Phomopsis* sp. TJ507A) 的化学成分, 本实验联合运用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、凝胶柱色谱 (Sephadex LH-20)、半制备型高效液相色谱 (HPLC) 等分离技术, 从该菌株大米固体发酵产物的乙酸乙酯提取物中分离得到 4 个倍半萜化合物 phomophyllin O (**1**)、phomophyllin P (**2**)、7-hydroxy-10-methoxydehydrodihydrobotrydial (**3**)、plorantinone D (**4**) 和 8 个甾体化合物 fortisterol (**5**)、dankasterone B (**6**)、(14 α , 22E)-14-hydroxy-ergosta-7, 22-diene-3, 6-dione (**7**)、(14 α , 22E)-14-hydroxyergosta-4, 7, 22-triene-3, 6-dione (**8**)、calvasterol B (**9**)、isocyathisterol (**10**)、ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (**11**) 和 ganodermaside D (**12**)。化合物 **1** 和 **2** 为新化合物, 运用现代波谱分析技术、[Rh₂(OCOFCF₃)₄] 络合诱导 ECD 法及与文献对比等方法, 鉴定了化合物 **1** 和 **2** 的结构和绝对构型。化合物 **1**~**5**, **7**, **8** 和 **10** 均为首次从该属真菌中分离得到。通过体外生物活性评价, 发现化合物 **9** 具有较强的 NO 生成抑制活性 (IC₅₀ 8.7 μ M)。

关键词:植物内生菌; 拟茎点霉; 倍半萜; 甾体; 生物活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)1-0061-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.1.010

The bioactive secondary metabolites from *Phyllanthus glaucus*-associated fungus *Phomopsis* sp. TJ507A

XIE Shuang-shuang¹, WU Ye^{1,2}, ZHANG Na¹,
GUO Yi¹, WANG Jian-ping¹, XUE Yong-bo^{1*}, ZHANG Yong-hui^{1*}

¹Hubei Key Laboratory of Natural Medicinal Chemistry and Resource Evaluation and Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology;

²Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, People's Republic of China

Abstract: Four sesquiterpenoids, named phomophyllin O (**1**), phomophyllin P (**2**), 7-hydroxy-10-methoxydehydrodihydrobotrydial (**3**), and plorantinone D (**4**), and eight steroids, named fortisterol (**5**), dankasterone B (**6**), (14 α , 22E)-14-hydroxy-ergosta-7, 22-diene-3, 6-dione (**7**), (14 α , 22E)-14-hydroxyergosta-4, 7, 22-triene-3, 6-dione (**8**), calvasterol B (**9**), isocyathisterol (**10**), ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (**11**), and ganodermaside D (**12**), were isolated from the ethyl acetate extract of the solid-state fermentation of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. TJ507A, a strain isolated from the medicinal plant *Phyllanthus glaucus*. These compounds were purified by comprehensive chromatography on silica gel column, Sephadex LH-20, octadecyl silane (ODS), and semi-preparative HPLC. Two new sesquiterpenoids **1** and **2** were identified and their structures were determined by detailed analyses of the NMR spectra, [Rh₂(OCOFCF₃)₄]-induced ECD spectra, and comparison with literatures. Compounds **1**-**5**, **7**, **8** and **10** were isolated from the genus *Phomopsis* for the first time. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of the isolates showed that compound

收稿日期: 2018-07-16 接受日期: 2018-11-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31200258, 31370372); 华中科技大学自主创新基金一般项目 (2012QN012)

* 通信作者 E-mail: yongboxue@mail.hust.edu.cn, zhangyh@mails.tjmu.edu.cn

9 exhibited significant NO inhibitory activity with the IC_{50} value at 8.7 μ M.

Key words: endophytic fungus; *Phomopsis* sp.; sesquiterpenoids; steroids; biological activity

药用植物青灰叶下珠 (*Phyllanthus glaucus*) 广泛分布于我国南方地区,该植物的根通常被当地人用以治疗风湿性关节炎和婴儿营养不良等症。本课题组之前对该植物进行了较为系统的化学成分研究,发现了8对具有一定抗氧化活性的新木脂素和倍半木脂素对映体^[1],并从其药用部位根中分离得到具有抗炎活性的二萜类化合物^[2]。

植物内生菌几乎存在于所有的植物中,但是与其他来源真菌相比,研究较少^[3]。植物内生菌次生代谢产物不仅能为宿主提供保护,在农业、工业、医疗中也有广泛应用,是结构多样性和具有良好生物活性次生代谢产物的重要来源。据文献报道,拟茎点霉属真菌能产生具有显著免疫抑制作用的二萜类化合物^[4]和较强细胞毒作用的细胞松弛素类化合物^[5],以及氧杂蒽酮类^[6]、甾体类^[7]和倍半萜类^[8]等多种类型的活性物质。本研究中,植物内生菌 *Phomopsis* sp. TJ507A 分离于青灰叶下珠新鲜叶片。在2017年,本课题组对该真菌固体发酵产物进行了化学成分研究,得到两个骨架新颖、抗炎活性显著的麦角甾类化合物,phomopsterones A和B,后者在C-23位具罕见的甲基取代,表现出显著的抗炎活性^[9]。通过改变真菌培养条件,我们又从该菌的液体发酵物中分离得到了一系列具有BACE1酶抑制作用的倍半萜类化合物 phomophyllins A-N,骨架类型涉及2,3-*seco*-protoilludane型, protoilludane型, il-ludalane型和 botryane型等^[10]。

为进一步从 *Phomopsis* sp. TJ507A 中发现更多的次级代谢产物,寻找具有良好生物活性的天然产物,本课题组又从该菌的固体培养物中分离鉴定了12个具有多种骨架类型的倍半萜和甾体类化合物,包括3个 botryane型倍半萜(1~3)、1个 protoilludane型倍半萜(4)、1个5,6-*seco*-ergostane型甾体(5)、1个13(14 \rightarrow 8)-*abeo*-8-ergostane型甾体(6)和6个麦角甾烷(7~12)。经体外生物活性评价发现,化合物9有较强的NO生成抑制活性,其 IC_{50} 为8.7 μ M。本研究加深了人们对拟茎点霉属植物内生真菌次生代谢产物的认识,为该微生物资源的开发利用提供了一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 主要仪器与材料

Sephadex LH-20(北京绿百草科技发展有限公司);中压色谱仪(北京慧德易科技有限公司);高效液相 Ultimate 3000(德国赛默飞世尔科技有限公司);核磁共振仪 Bruker AM-400(德国布鲁克科学仪器公司);循环水式真空泵,低温冷却液循环泵(OLSB5/25)(巩义市予华仪器有限责任公司);十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);80~120目、200~300目、硅胶H,柱层析硅胶(青岛海洋化工厂分厂);ODS填料(50 μ m,默克,德国);分析纯溶剂(上海国药集团化学试剂有限公司);薄层硅胶板(烟台化工研究院)等。

1.1.2 菌株

供试菌株 *Phomopsis* sp. TJ507A 分离自植物 *Phyllanthus glaucus* (2014年9月采自江西省庐山)的新鲜叶片,由华中科技大学同济医学院药学院汪建平副教授鉴定。真菌标本存放于武汉大学中国典型培养物保藏中心(保藏编号M2016651),菌种DNA序列已提交到GenBank,序列号KY039149。

1.2 提取与分离

菌种用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基在28 $^{\circ}$ C条件下,培养5天,作为种子培养基。然后接种到121 $^{\circ}$ C高压灭菌30 min的大米固体培养基中(1 L锥形瓶中加入200 g大米,200 mL水,1 g蛋白胨),在28 $^{\circ}$ C恒温条件下发酵30天。在室温下,将 *Phomopsis* sp. TJ507A 的发酵产物(60 kg)用乙醇浸泡,浸液减压浓缩,反复提取五次后得到总浸膏。在总浸膏中加入水混悬,用乙酸乙酯萃取五次,得到浸膏250.1 g。留样(1.0 g)后,以质量比1:1.5与80~120目硅胶拌样,用石油醚-乙酸乙酯体系为洗脱液(50:1~0:1)进行梯度洗脱,得到九个组分(A-I)。组分C(12.5 g)经过 Sephadex LH-20 凝胶(MeOH-CH₂Cl₂, 1:1)和中压色谱(MeOH-H₂O, 50%~100%)分离,用HPLC纯化后得到化合物10(15.0 mg)和11(11.0 mg)。组分D(20.5 g)用 Sephadex LH-20 凝胶(MeOH-CH₂Cl₂, 1:1)和中压色谱(MeOH-H₂O, 50%~100%)分离得到4个流分(EA-EC),EB经过半制备HPLC得到化合物3(10.0 mg)

和 **4** (5.8 mg)。组分 E (10.3 g) 用 Sephadex LH-20 凝胶 (MeOH) 柱色谱分离后得到三个流分 (EA-EC), 其中 EA 经中压反相柱色谱 (MeOH-H₂O, 50% ~ 100%) 分离得到 EA1, 再经 HPLC 纯化后得到化合物 **1** (7.5 mg) 和 **8** (3.5 mg)。组分 F (16.6 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶 (MeOH), ODS 中压反相柱色谱梯度洗脱 (MeOH-H₂O, 50% ~ 100%), HPLC 纯化后得到化合物 **2** (3.3 mg)、**6** (1.5 mg)、**9** (6.2 mg) 和 **12** (6.0 mg)。最后, 用 Sephadex LH-20 凝胶 (MeOH), ODS 中压反相柱色谱从组分 G (19.0 g) 分离分别得到化合物 **5** (17.1 mg) 和 **7** (10.6 mg)。

1.3 NO 抑制活性评价

试验方法: 将 RAW264.7 细胞接种至 96 孔板, 用 1 μg/mL LPS 进行诱导刺激, 同时加入待测化合物处理, 从 25 μM 开始 2 倍稀释设 5 个浓度梯度, 设置不含药物组和 MG132 阳性药物组作为对照组。细胞过夜培养后取培养基检测 NO 生成, 在 570 nm 处测定吸光值。在剩余培养基中加入 MTS 进行细胞存活率检测, 排除化合物对细胞的毒性影响。NO 生成抑制率 (%) = (非药物处理组 OD_{570 nm} - 样品组 OD_{570 nm}) / 非药物处理组 OD_{570 nm} × 100%。IC₅₀ (50% concentration of inhibition) 按 Reed & Muench 法进行计算。

实验中用到的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自中科院上海细胞库, DMEM 培养基和胎牛血清

购自 BI 公司。Griess 试剂、LPS 及对照药物 MG132 购自 Sigma 公司。

1.4 肿瘤细胞毒活性筛选

实验方法: 用含 10% 胎牛血清的培养液 (DMEM 或者 RPMI1640) 配成单个细胞悬液接种到 96 孔板。化合物用 DMSO 溶解, 梯度复筛, 每种处理均设 3 个复孔。37 摄氏度培养 48 小时后, 每孔加 MTS 溶液 20 μL 和培养液 100 μL, 设 3 个空白复孔 (MTS 溶液 20 μL 和培养液 100 μL 的混合液), 继续孵育 2 ~ 4 小时, 使反应充分进行后测定光吸收值。选择 492 nm 波长, 多功能酶标仪 (MULTISKAN FC) 读取各孔光吸收值, 记录结果, 数据处理后以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法 (Reed & Muench 法) 计算化合物的 IC₅₀ 值。每次实验均设顺铂 (DDP) 和紫杉醇 (Taxol) 两个阳性化合物。

2 实验结果

2.1 化合物分离与鉴定

通过各种分离手段, 从该真菌中分离得到 3 个 botryane 型倍半萜 (**1** ~ **3**)、1 个 protoilludane 型倍半萜 (**4**)、1 个 5,6-*seco*-ergostane 型甾体 (**5**)、1 个 13 (14→8)-*abeo*-8-ergostane 型甾体 (**6**) 和 6 个麦角甾烷 (**7** ~ **12**), 根据核磁共振波谱数据、Rh 盐络合反应和文献比对等方法, 确定了化合物 **1** ~ **12** 的结构 (图 1)。

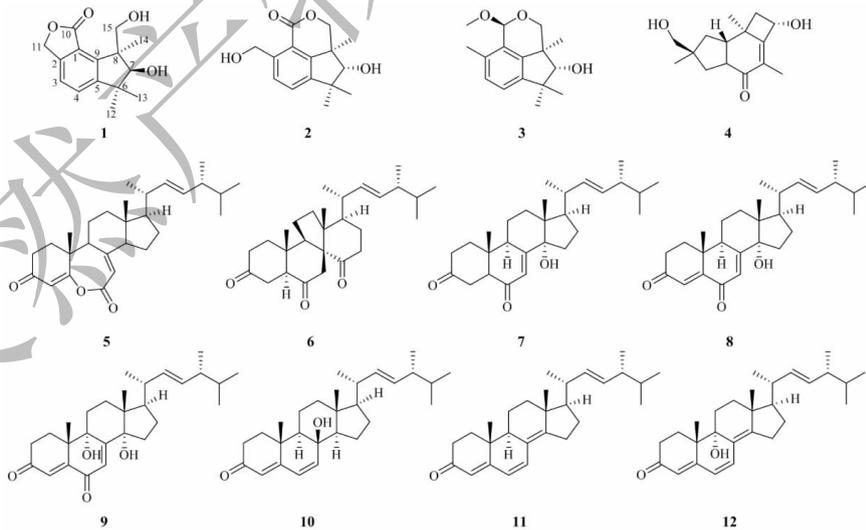


图 1 化合物 **1** ~ **12** 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds **1-12**

化合物 **1** 无色油状; $[\alpha]_D^{28}$ -32 (*c* 0.4, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 235 (3.81), 289

(3.45) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3447, 3373, 1740, 1451, 1386, 1365, 1100, 1081, 1037, 1018, 621 cm^{-1} ; HR-EL-

MS: m/z 285. 110 3 (calcd for $C_{15}H_{18}O_4Na$, 285. 110 3)。

化合物 **1**, 其 HR-EI-MS 显示分子离子峰为 285. 1103 ($[M + Na]^+$), 结合 1D NMR 数据推测化合物分子式为 $C_{15}H_{18}O_4$ 。IR 光谱特征吸收信号 3 447、3 373 和 1 740 cm^{-1} 提示有羟基和酯羰基存在。 1H 谱和 ^{13}C 谱(表 1) 显示其有 3 个甲基信号, 2 个亚甲基信号, 3 个次甲基信号和 7 个季碳信号。通过详细分析化合物的 NMR 数据, 发现 **1** 与已知化合物 7-hydroxy-10-oxodehydrodihydrobotrydial^[11] 的 NMR 数据相似, 推测化合物 **1** 是 botryane 型倍半萜

衍生物。通过分析 **1** 的 1H - 1H COSY、HMBC 和 HSQC 数据, 确定了其平面结构。根据 NOESY 谱中 H-7(δ_H 4.33, s) 与 H₃-12(δ_H 1.41, s) 和 H₃-14(δ_H 1.25, s) 相关, 确定了化合物 **1** 的相对构型(图 2)。为确定 7 位手性碳的构型, 将化合物 **1** 与 $Rh_2(OCOFC_3)_4$ 络合, 并根据 Bulkiness 规则^[12], 通过 $Rh_2(OCOFC_3)_4$ 诱导的 ECD 谱图在 361 nm 处有正的 Cotton 效应, 确定该化合物的 C-7 位为 *S* 构型(图 3)。至此, 化合物 **1** 的结构和绝对构型被确定为 7*S*, 8*S*(图 1), 经 Scifinder 数据库检索为新化合物, 定名为 phomophyllin O。

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的核磁共振 1H (400 MHz) 和 ^{13}C NMR (100 MHz) 数据(溶剂为 methanol- d_4)

Table 1 The 1H (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data of compounds **1** and **2** (recorded in methanol- d_4)

Position	1		2	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1		148.9 s		144.0 s
2		123.0 s		119.6 s
3	7.43 (d, $J = 7.9$ Hz)	122.4 d	7.60 (d, $J = 7.9$ Hz)	128.9 d
4	7.54 (d, $J = 7.9$ Hz)	130.2 d	7.49 (d, $J = 7.9$ Hz)	129.7 d
5		153.4 s		147.6 s
6		46.5 s		48.5 s
7	4.33 (s)	82.6 d	3.86 (s)	85.5 d
8		53.2 s		44.8 s
9		145.8 s		150.3 s
10		172.9 s		166.1 s
11a	5.33 (s)	71.3 t	5.01 (d, $J = 15.1$ Hz)	62.8 t
11b			4.86 (d, $J = 15.1$ Hz)	
12	1.41 (s)	28.5 q	1.31 (s)	24.5 q
13	1.17 (s)	26.2 q	1.35 (s)	28.6 q
14	1.25 (s)	17.8 q	1.40 (s)	18.0 q
15a	4.53 (d, $J = 10.8$ Hz)	66.9 t	4.48 (d, $J = 10.2$ Hz)	80.8 t
15b	3.68 (d, $J = 10.8$ Hz)		4.19 (d, $J = 10.2$ Hz)	

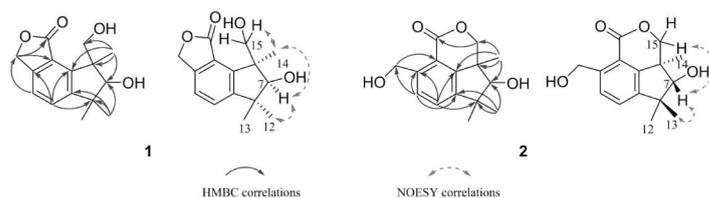


图 2 化合物 **1** 和 **2** 的主要 HMBC 和 NOESY 相关

Fig. 2 Key HMBC and NOESY correlations of compounds **1** and **2**

化合物 **2** 无色油状; $[\alpha]_D^{28}$ -73 (c 0.3, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 239 (3.70), 295

(3.34) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3446, 3392, 1730, 1384, 1365, 1080, 1064, 842, 621 cm^{-1} ; HR-EI-MS: m/z 285.1120 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{Na}$, 285.1103)。

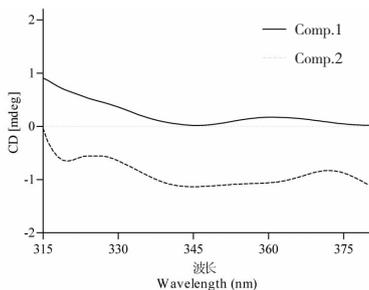


图3 化合物1和2与 $[\text{Rh}_2(\text{OCOCF}_3)_4]$ 络合物扣除背景后的ECD谱图

Fig. 3 ECD spectra of the $[\text{Rh}_2(\text{OCOCF}_3)_4]$ complexes of 1 and 2 with the intrinsic ECD spectrum subtracted

化合物2, 其HR-EI-MS显示分子离子峰为285.1120, 结合其1D NMR数据推测化合物分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ 。化合物2的NMR数据与1类似(表1), 推测2也为botryane型倍半萜衍生物。通过详细分析2的2D NMR数据, 确定了其平面结构。根据NOESY谱中H-7(δ_{H} 3.86, s)与H₃-13(δ_{H} 1.35, s)和H₂-15相关, 确定了该化合物2的相对构型(图2)。相似地, 通过化合物2与 $\text{Rh}_2(\text{OCOCF}_3)_4$ 络合物的ECD谱图在345 nm处有负的Cotton效应, 确定了其C-7位为R构型(图3)。因此, 化合物2的结构被确定为7R, 8S(图1), 经Scifinder数据库检索为新化合物, 定名为phomophyllin P。

化合物3 无色油状; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.06 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-3), 7.01 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-4), 5.53 (1H, s, H-10), 3.80 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-15b), 3.75 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-7), 3.67 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-15a), 3.54 (3H, s, OCH_3), 2.27 (3H, s, H-11), 1.35 (3H, s, H-14), 1.31 (3H, s, H-12), 1.25 (3H, s, H-13); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 144.4 (s, C-5), 141.6 (s, C-9), 134.3 (s, C-1), 130.4 (d, C-3), 129.9 (s, C-2), 123.1 (d, C-4), 95.8 (d, C-10), 85.6 (d, C-7), 69.1 (t, C-15), 55.7 (q, OCH_3), 45.8 (s, C-6), 43.8 (s, C-8), 29.1 (q, C-13), 23.9 (q, C-12), 18.8 (q, C-11), 18.1 (q, C-14)。经过与文献^[8]数据对照, 确定该化合物为7-hydroxy-10-methoxydehydrodihydrobotrydial。

化合物4 无色油状; ^1H NMR (CDCl_3 , 400

MHz) δ : 5.05 (1H, td, $J = 7.7, 8.9$ Hz, H-5), 3.38 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-14a), 3.31 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-14a), 2.92 (1H, ddd, $J = 13.0, 10.4, 8.0$ Hz, H-9), 2.66 (1H, ddd, $J = 10.4, 9.7, 5.4$ Hz, H-2), 2.20 (1H, dd, $J = 12.3, 6.4$ Hz, H-4a), 2.11 (1H, dd, $J = 13.2, 8.0$ Hz, H-10a), 1.91 (1H, dd, $J = 12.3, 1.9$ Hz, H-4a), 1.49 (1H, dd, $J = 13.2, 13.0$ Hz, H-10b), 1.75 (3H, s, H-13), 1.42 (3H, s, H-12), 1.12 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 202.6 (s, C-8), 164.6 (s, C-6), 129.4 (s, C-7), 70.6 (t, C-14), 70.2 (d, C-5), 52.5 (d, C-9), 46.8 (d, C-2), 45.3 (t, C-1), 44.7 (s, C-3), 44.0 (s, C-11), 38.9 (t, C-10), 35.4 (t, C-4), 25.4 (q, C-12), 24.5 (q, C-15), 10.5 (q, C-13)。经过与文献^[13]数据对照, 确定该化合物为plorantinone D。

化合物5 白色无定型结晶; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} : 5.73 (1H, s, H-4), 5.71 (1H, s, H-7), 5.24 (1H, dd, $J = 15.3, 7.6$ Hz, H-22), 5.13 (1H, dd, $J = 15.3, 8.4$ Hz, H-23), 1.23 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.62 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} : 198.7 (C-3), 174.0 (C-5), 162.6 (C-6), 159.6 (C-8), 134.8 (C-22), 132.9 (C-23), 114.8 (C-4), 113.4 (C-7), 58.2 (C-14), 56.4 (C-17), 47.3 (C-9), 47.1 (C-13), 42.9 (C-24), 40.5 (C-10), 40.4 (C-20), 39.2 (C-12), 34.0 (C-1), 33.3 (C-2), 33.2 (C-25), 27.8 (C-16), 25.5 (C-15), 22.7 (C-11), 21.2 (C-21), 20.1 (C-19), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.7 (C-28), 12.6 (C-18)。经过与文献^[14]数据对照, 确定该化合物为fortisterol。

化合物6 白色粉末; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} : 5.22 (1H, m, H-22), 5.22 (1H, m, H-23), 3.05 (1H, t, $J = 9.7$ Hz, H-9), 1.26 (3H, s, H-19), 1.13 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-21), 0.87 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-28), 0.80 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-27), 0.78 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-26), 0.74 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} : 215.0 (C-14), 208.8 (C-6), 207.9 (C-3), 135.3 (C-23), 132.1 (C-22), 65.7 (C-8), 60.2 (C-13), 53.3 (C-9), 50.1 (C-5), 45.5 (C-17), 43.3 (C-24), 40.6

(C-10), 40.1 (C-7), 38.6 (C-15), 37.0 (C-20), 36.9 (C-2), 35.9 (C-4), 34.2 (C-12), 33.2 (C-25), 32.8 (C-1), 27.4 (C-16), 25.6 (C-11), 24.2 (C-21), 23.5 (C-19), 20.2 (C-27), 19.8 (C-26), 17.7 (C-28), 15.3 (C-18)。经过与文献^[15]数据对照,确定该化合物为 dankasterone B。

化合物 7 黄色无定型晶体; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 5.94 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-5), 5.27 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.4 Hz, H-23), 5.18 (1H, d, *J* = 15.3, 8.1 Hz, H-22), 2.81 (1H, m, H-9), 1.06 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-21), 0.92 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.83 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.83 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-27), 0.72 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_C: 210.9 (C-3), 199.1 (C-6), 163.5 (C-8), 135.3 (C-22), 132.7 (C-23), 122.6 (C-7), 85.2 (C-14), 54.8 (C-5), 50.4 (C-17), 46.5 (C-13), 45.8 (C-9), 42.9 (C-24), 40.1 (C-20), 38.8 (C-10), 38.2 (C-1), 37.4 (C-4), 37.0 (C-2), 33.2 (C-25), 32.1 (C-15), 30.6 (C-12), 26.7 (C-16), 21.4 (C-21), 20.8 (C-11), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.7 (C-28), 16.3 (C-18), 12.7 (C-19)。经过与文献^[16]数据对照,确定该化合物为 (14α, 22E)-14-hydroxyergosta-7, 22-diene-3, 6-dione。

化合物 8 黄色无定型晶体; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 6.42 (1H, s, H-7), 6.11 (1H, s, H-4), 5.25 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.4 Hz, H-22), 5.17 (1H, dd, *J* = 15.3, 8.1 Hz, H-23), 2.93 (1H, t, *J* = 8.8, 7.4 Hz, H-9), 1.27 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-21), 0.90 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.82 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.81 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.73 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_C: 199.7 (C-3), 188.3 (C-6), 168.1 (C-8), 158.1 (C-5), 135.3 (C-22), 132.7 (C-23), 126.2 (C-7), 123.3 (C-4), 85.0 (C-14), 50.3 (C-17), 46.4 (C-13), 43.4 (C-9), 42.9 (C-24), 40.0 (C-20), 39.2 (C-10), 35.3 (C-1), 34.3 (C-2), 33.1 (C-25), 31.8 (C-15), 30.4 (C-12), 26.5 (C-16), 21.3 (C-21), 20.7 (C-11), 20.0 (C-26), 19.7 (C-19), 19.3 (C-27), 17.6 (C-28), 16.2 (C-18)。经过与文献^[17]数据对照,确定该化合物为 (14α, 22E)-14-hydroxyergosta-4, 7, 22-triene-3, 6-dione。

化合物 9 淡黄色粉末; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 6.60 (1H, s, H-4), 6.19 (1H, s, H-7), 5.29 (1H, dd, *J* = 15.5, 7.7 Hz, H-23), 5.20 (1H, dd, *J* = 15.5, 8.1 Hz, H-22), 1.38 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-21), 0.93 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.85 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.84 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.77 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_C: 199.6 (C-3), 187.7 (C-6), 163.1 (C-8), 155.1 (C-5), 135.2 (C-22), 133.1 (C-23), 128.8 (C-7), 125.2 (C-4), 86.8 (C-14), 74.3 (C-9), 50.3 (C-17), 46.4 (C-13), 44.1 (C-10), 43.0 (C-24), 40.1 (C-20), 34.4 (C-2), 33.3 (C-25), 31.9 (C-15), 27.8 (C-1), 27.7 (C-12), 27.7 (C-11), 26.5 (C-16), 23.0 (C-19), 21.5 (C-21), 20.2 (C-26), 19.9 (C-27), 17.8 (C-28), 16.5 (C-18)。经过与文献^[7]数据对照,确定该化合物为 calvasterol B。

化合物 10 白色无定型结晶; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 6.16 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-7), 6.09 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-6), 5.72 (1H, s, H-4), 5.20 (1H, dd, *J* = 15.3, 8.4 Hz, H-23), 5.10 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.7 Hz, H-22), 1.30 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 0.89 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.81 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-27), 0.79 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-26); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_C: 199.8 (C-3), 163.3 (C-5), 139.3 (C-7), 135.3 (C-22), 132.2 (C-23), 128.0 (C-6), 125.2 (C-4), 71.8 (C-8), 57.0 (C-14), 56.5 (C-17), 53.1 (C-9), 44.1 (C-13), 42.8 (C-24), 40.8 (C-12), 39.7 (C-20), 36.2 (C-10), 35.1 (C-1), 33.7 (C-2), 33.1 (C-25), 28.1 (C-16), 20.6 (C-21), 20.0 (C-27), 19.6 (C-26), 18.9 (C-19), 18.9 (C-15), 17.8 (C-11), 17.6 (C-28), 14.4 (C-18)。经过与文献^[18]数据对照,确定该化合物为 isocyathisterol。

化合物 11 黄色无定型结晶; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 6.60 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-7), 6.03 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-6), 5.73 (1H, s, H-4), 5.26 (1H, dd, *J* = 15.1, 7.0 Hz, H-22), 5.23 (1H, dd, *J* = 15.2, 7.7 Hz, H-23), 1.06 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-21), 1.00 (3H, s, C-19), 0.96 (3H, s, C-18), 0.93 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.85 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-27), 0.82 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-

26); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} : 199.1 (C-3), 164.1 (C-5), 155.9 (C-14), 134.9 (C-22), 133.9 (C-7), 132.4 (C-23), 124.4 (C-8), 124.3 (C-6), 122.9 (C-4), 55.6 (C-17), 44.2 (C-9), 43.9 (C-13), 42.8 (C-24), 39.2 (C-20), 36.6 (C-10), 35.5 (C-15), 34.1 (C-2), 34.0 (C-1), 33.0 (C-25), 27.7 (C-16), 25.3 (C-12), 21.2 (C-21), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 18.9 (C-11), 18.9 (C-18), 17.6 (C-28), 16.6 (C-19)。经过与文献^[19]数据对照,确定该化合物为 ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one。

化合物 12 淡黄色粉末; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} : 6.48 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-7), 6.15 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-6), 5.88 (1H, s, H-4), 5.28 (1H, dd, $J = 15.2, 7.2$ Hz, H-23), 5.21 (1H, dd, $J = 15.2, 8.1$ Hz, H-22), 1.12 (3H, s, H-19), 1.08 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.96 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-28), 0.85 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-27), 0.83 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} : 199.3 (C-3), 161.3 (C-5), 158.1 (C-14), 134.8 (C-22), 132.8 (C-

23), 130.7 (C-7), 126.6 (C-8), 126.3 (C-4), 124.6 (C-6), 72.5 (C-9), 55.5 (C-17), 44.4 (C-13), 42.9 (C-24), 42.3 (C-10), 39.2 (C-20), 33.8 (C-2), 33.1 (C-25), 31.9 (C-12), 27.6 (C-16), 27.4 (C-1), 25.5 (C-15), 25.4 (C-11), 21.2 (C-21), 20.8 (C-19), 20.0 (C-27), 19.6 (C-26), 17.7 (C-18), 17.6 (C-28)。经过与文献^[20]数据对照,确定该化合物为 canodermaside D。

2.2 NO 抑制活性结果

采用 MTS 法^[16]测定了部分化合物对 NO 生成的抑制作用,结果显示,化合物 **9** 对 NO 产生有较强的抑制作用,其 IC_{50} 值为 $8.7 \mu\text{M}$ 。其余化合物无明显的 NO 抑制活性。

2.3 肿瘤细胞毒活性结果

筛选了部分化合物对 5 种肿瘤细胞株,白血病 HL-60,肺癌 A-549,肝癌 SMMC-7721,乳腺癌 MCF-7,和结肠癌 SW480,以及对人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 的细胞毒作用。结果(表 2)显示,化合物 **9** 和 **10** 对 HL-60 和 MCF-7 肿瘤细胞均有一定抑制活性,其 IC_{50} 值在 $14.96 \sim 23.57 \mu\text{M}$ 之间。

表 2 化合物 **9** 和 **10** 的细胞毒活性结果 ($\text{IC}_{50} \mu\text{M}$)
Table 2 Cytotoxic activities of compounds **9** and **10** ($\text{IC}_{50} \mu\text{M}$)

化合物 Comp.	白血病 HL-60	肺癌 A-549	肝癌 SMMC-7721	乳腺癌 MCF-7	结肠癌 SW480	人正常肺上皮细胞 BEAS-2B
9	20.77	-	-	23.57	-	21.89
10	14.96	-	24.75	21.73	-	26.15
DDP	1.00	3.02	7.07	10.94	5.08	6.06
Taxol	<0.008	<0.008	<0.008	<0.008	<0.008	1.02

注:“-”表示活性大于 $40 \mu\text{M}$ 。

Note:“-” means the cytotoxic activities more than $40 \mu\text{M}$.

3 结论

本文对青灰叶下珠内生真菌 *Phomopsis* sp. TJ507A 进行了次级代谢产物研究,分离得到了 12 个结构类型多样的倍半萜类和甾体类化合物,包括 botryane 型倍半萜、protoilludane 型倍半萜、5,6-*seco*-ergostane 型甾体、13(14 \rightarrow 8)-*abeo*-8-ergostane 型甾体和麦角甾烷。其中化合物 **1**~**5**、**7**、**8** 和 **10** 均为首次从该属真菌中分离得到。对化合物进行 NO 抑制活性和细胞毒活性评价,结果显示,化合物 **9** 表现出较强的 NO 抑制活性, IC_{50} 为 $8.7 \mu\text{M}$ 。目前,国内外对植物内生菌次级代谢产物研究相对较少,本研究丰富了拟茎点霉属植物内生真菌化学结构的多样性,也为从该属真菌资源中发现生物活性的新颖结

构化合物提供了更多的科学依据。

参考文献

- 1 Wu ZD, Lai YJ, Zhou L, et al. Enantiomeric lignans and neolignans from *Phyllanthus glaucus*: enantioseparation and their absolute configurations[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24809.
- 2 Wu ZD, Lai YJ, Zhang Q, et al. Phenylacetylene-bearing 3,4-*seco*-cleistanthane diterpenoids from the roots of *Phyllanthus glaucus*[J]. Fitoterapia, 2018, 128: 79-85.
- 3 Dong M, Yang FX, Luo JY, et al. Secondary metabolites from an endophytic *Streptomyces* sp. KIB-271 and their anti-fungus activity[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28, 331-334.
- 4 Wei W, Gao J, Shen Y, et al. Immunosuppressive diterpenes

- from *Phomopsis* sp. S12 [J]. Eur J Org Chem, 2014, 26: 5728-5734.
- 5 Yan BC, Wang WG, Hu DB, et al. Phomopchalasins A and B, Two cytochalasans with polycyclic-fused skeletons from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. shj2 [J]. Org Lett, 2016, 18:1108-1111.
- 6 Ding B, Yuan J, Huang X, et al. New dimeric members of the phomoxanthone family: phomolactonexanthones A, B and deacetylphomoxanthone C isolated from the fungus *Phomopsis* sp. [J]. Mar Drugs, 2013, 11:4961-4972.
- 7 Kawahara N, Sekita S, Satake M. Two steroids from *Calvatia cyathiformis* [J]. Phytochemistry, 1995, 38:947-950.
- 8 Krohn K, Dai JQ, Flörke U, et al. Botryane metabolites from the fungus *Geniculosporium* sp. isolated from the marine Red Alga *Polysiphonia* [J]. J Nat Prod, 2005, 68:400-405.
- 9 Hu ZX, Wu Y, Xie SS, et al. Phomosterones A and B, two functionalized ergostane-type steroids from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. TJ507A [J]. Org Lett, 2017, 19:258-261.
- 10 Xie SS, Wu Y, Qiao YB, et al. Protoilludane, illudalane, and botryane sesquiterpenoids from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. TJ507A [J]. J Nat Prod, 2008, 81:1311-1320.
- 11 Krohn K, Dai JQ, Flörke U, et al. Botryane Metabolites from the Fungus *Geniculosporium* sp. Isolated from the Marine Red Alga *Polysiphonia* [J]. J Nat Prod, 2005, 68:400-405.
- 12 Frelek J, Szczepek WJ. [Rh₂ (OCOF₃)₄] as an auxiliary chromophore in chiroptical studies on steroidal alcohols [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1999, 10:1507-1520.
- 13 Clericuzio M, Han FG, Pan FS, et al. The sesquiterpenoid constituents of fruit bodies of *Russula delica* [J]. Acta Chem Scand, 1998, 52:1333-1337.
- 14 Huang XC, Guo YW, Song GQ. Fortisterol, a novel steroid with an unusual seven-membered lactone ring B from the Chinese marine sponge *Biemna fortis* Topsent [J]. J Asian Nat Prod Res, 2006, 8:485-489.
- 15 Taro A, Makoto T, Takeshi Y, et al. Variation in cytostatic constituents of a sponge-derived *Gymnascella dankaliensis* by manipulating the carbon source [J]. J Nat Prod, 2007, 70:1731-1740.
- 16 Huang HC, Liaw CC, Yang HL, et al. Lanostane triterpenoids and sterols from *Antrodia camphorate* [J]. Phytochemistry, 2012, 84:177-183.
- 17 Kovganko NV, Sokolov SN. Synthesis of (22*E*, 24*R*)-ergosta-4,7-22-triene-3,6-dione and its 14 α -hydroxy- and 9 α ,14 α -dihydroxy derivatives [J]. Chem Nat Comp, 1999, 35:320-323.
- 18 Liu XH, Miao FP, Liang XR, et al. Ergosteroid derivatives from an algicolous strain of *Aspergillus ustus* [J]. Nat Prod Res, 2014, 28:1182-1186.
- 19 Fangkrathok N, Sripanidkulchai B, Umehara K, et al. Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells [J]. Nat Prod Res, 2013, 27:1611-1619.
- 20 Weng YF, Lu J, Xiang L, et al. Ganodermasides C and D, two new anti-aging ergosterols from spores of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75:800-803.
-
- (上接第 146 页)
- 18 Ghosh HS, Spencer JV, Ng B, et al. Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription [J]. Biochem J, 2007, 408:105-111.
- 19 Singh P, Hanson PS, Morris CM. SIRT1 ameliorates oxidative stress induced neural cell death and is down-regulated in Parkinson's disease [J]. BMC Neuroscience, 2017, 18(1):46-58.
- 20 Siegrist S, Kettiger H, Fasler-Kan E, et al. Selective stimulation of the JAK/STAT signaling pathway by silica nanoparticles in human endothelial cells [J]. Toxicol in Vitro, 2017, 42:308-318.