

嗜低温真菌 *Pseudogymnoascus pannorum* 次级代谢产物研究郭永智¹, 魏 茜², 高 洁², 刘冰语², 张 涛², 华会明¹, 胡友财^{2*}¹ 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; ² 中国医学科学院 & 北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

摘要: 本文采用现代色谱分离手段从嗜低温真菌 *Pseudogymnoascus pannorum* 的大米发酵产物中分离得到 8 个化合物, 采用现代波谱技术鉴定其结构, 分别为: *L*-pyroglutamyl-*L*-phenylalanine (**1**)、(*R*)-*N*-acetylphenylalanine (**2**)、(*R*)-*N*-acetyltryptophan (**3**)、methyl 2-hydroxy-4-(3-hydroxy-5-methylphenoxy)-6-methylbenzoate (**4**)、2-hydroxy-4-(2-hydroxy-3-methoxy-5-methylphenoxy)-6-methylbenzoate (**5**)、vanillic acid (**6**)、1,3,5-三甲氧基苯 (**7**) 和亚油酸 (**8**)。其中化合物 **1** 和 **2** 为首次从天然界分离得到, 化合物 **3**~**8** 为首次从假裸囊菌属真菌中分离得到。化合物 **1**~**8** 对人肝癌细胞 HepG-2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 未显示细胞毒作用。

关键词: 嗜低温真菌; 假裸囊菌属; *Pseudogymnoascus pannorum*; 次级代谢产物

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)3-0446-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.3.012

Metabolites of the psychrophilic fungus *Pseudogymnoascus pannorum*GUO Yong-zhi¹, WEI Qian², GAO Jie², LIU Bing-yu², ZHANG Tao², HUA Hui-ming¹, HU You-cai^{2*}¹ School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;² Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Eight compounds were isolated from the rice fermentation of a psychrophilic fungus *Pseudogymnoascus pannorum*. Their structures were identified as *L*-pyroglutamyl-*L*-phenylalanine (**1**), (*R*)-*N*-acetylphenylalanine (**2**), (*R*)-*N*-acetyltryptophan (**3**), methyl 2-hydroxy-4-(3-hydroxy-5-methylphenoxy)-6-methylbenzoate (**4**), 2-hydroxy-4-(2-hydroxy-3-methoxy-5-methylphenoxy)-6-methylbenzoate (**5**), vanillic acid (**6**), 1,3,5-trimethoxybenzene (**7**), and linoleic acid (**8**). Among them, compounds **1** and **2** were first isolated from natural resources, while others were isolated from the genus of *Pseudogymnoascus* for the first time. Compounds **1-8** did not show cytotoxicity against human hepatoma HepG-2 or human breast cancer MCF-7 cells.

Key words: psychrophilic fungus; genus *Pseudogymnoascus*; *Pseudogymnoascus pannorum*; secondary metabolites

嗜低温真菌(psychrophilic fungi)分布于地球的两极地区、高山多年冻土、冰川、海洋深处等生态系统中,它们长期面临低温、强紫外辐照、频繁的冻融循环、营养物质匮乏、高压等其中一种或多种极端条件的考验^[1]。为了适应极端的生存环境,这些真菌形成了特殊的生理代谢特征和化学防御机制,包括冷适应酶的存在、酶活性和代谢速率的改变、胞外多糖及特殊次级代谢产物的生成等^[1-4]。近年来,关于极端环境真菌次生代谢产物的研究愈发引起人们的

关注,越来越多的具有独特结构的天然产物被从低温真菌中分离得到,许多化合物表现出显著的细胞毒、抗菌、抗病毒和抗氧化等活性^[5-7]。

假裸囊菌属真菌(*Pseudogymnoascus* spp.)是低温环境中常见的真菌类群。*Pseudogymnoascus pannorum*是假裸囊菌属丝状真菌,主要分布在南极或高山多年冻土中,在-5℃的环境中可以生长,最适生长温度为15~18℃^[8,9]。目前从假裸囊菌属真菌中发现的天然产物非常少^[10],而*P. pannorum*中的次级代谢产物尚无文献报道。本文首次对嗜低温真菌*P. pannorum*中的次级代谢产物进行分离研究,从其大米发酵产物中分离得到8个化合物,分别为:

收稿日期:2018-04-12 接受日期:2018-07-02

基金项目:国家自然科学基金(81522043)

* 通信作者 Tel:86-10-61271883; E-mail:huyoucai@imm.ac.cn

L-pyroglutamyl-*L*-phenylalanine (1), (*R*)-*N*-acetylphenylalanine(2), (*R*)-*N*-acetyltryptophan(3), methyl 2-hydroxy-4-(3-hydroxy-5-methylphenoxy)-6-methylbenzoate (4), 2-hydroxy-4-(2-hydroxy-3-methoxy-5-

methylphenoxy)-6-methylbenzoate (5), vanillic acid (6), 1,3,5-三甲氧基苯(7)和亚油酸(8)。其中化合物1和2为首次从自然界分离得到,化合物3~8为首次从假裸囊菌属真菌中分离得到。

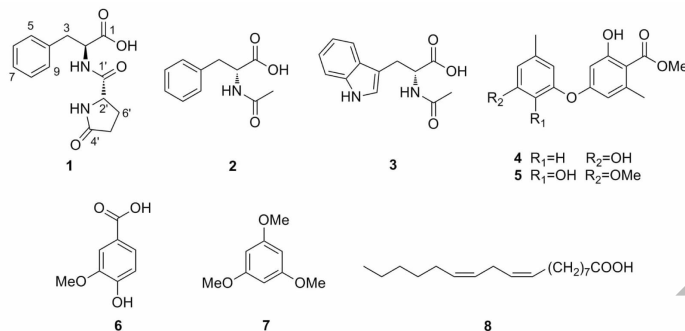


图1 化合物1~8的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-8

1 材料

1.1 仪器与试剂

Jasco P-2000 型旋光仪 (Jasco 公司, 日本); Bruker AV-III-500 和 Bruker AV-III-600 HD 型核磁共振谱仪 (布鲁克公司, 德国); Agilent Technologies 6520 Accurate Mass Q-TOF LC/MS 型质谱仪 (安捷伦公司, 美国); Waters ACQUITY H-Class QDA 超高效液相质谱联用仪 (沃特世公司, 美国); ACQUITY UPLC BEH 色谱柱: 1.7 μm , 50 mm \times 2.1 mm, 沃特世公司, 美国; SSI Series III 半制备高效液相色谱仪 (科学系统公司, 美国); SSI Series 1500 Photo Diode Array Detector 检测器; YMC Pack ODS-A 色谱柱: C_{18} , 5 μm , 250 mm \times 10 mm, YMC 公司, 日本; Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl New Column 色谱柱: 5 μm , 250 mm \times 10 mm, 菲罗门公司, 美国); Combi-Flash Rf + 型中压制备色谱仪 (Teledyne Isco 公司, 美国); MCI CHP 20P/P120 填料 (三菱化学株式会社, 日本); 分析纯试剂 (乙酸乙酯、丙酮、乙腈、甲醇) 购自北京化工厂; 色谱纯试剂 (甲醇、乙腈) 和质谱纯试剂 (乙腈、水) 购自美国 Fisher 公司。

1.2 菌种

实验用菌种 *P. pannorum* 保藏于中国医学科学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室。

2 提取与分离

菌株 *P. pannorum* 经大米培养基 (5 kg) 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养发酵 30 天后, 将大米发酵物捣碎, 加入 2 倍体积的乙酸乙酯超声提取 3 次 (每次超声 2 h), 合并提

取液, 减压浓缩得到乙酸乙酯粗提物 56.5 g。

取 48.0 g 乙酸乙酯提取物采用 MCI 柱层析分离, 以甲醇-水 (90:10, 100:0, v/v) 和丙酮进行梯度洗脱, 得到组分 F1~F3; 对组分 F1 (10.0 g) 进行中压快速制备分离 (C_{18} 柱, 25~40 μm , 甲醇-水梯度洗脱, 5%~100%), 得到 F1-1~F1-11 流份; 其中流份 F1-2 (377.5 mg) 经反相制备柱分离 (YMC Pack ODS-A 柱, 乙腈-水等度洗脱, 21:79, 0.02% HCOOH, v/v) 得到化合物 6 (5.1 mg) 和 7 (4.6 mg); 流份 F1-5 (211.7 mg) 经反相制备柱 (YMC Pack ODS-A 柱) 分离, 以乙腈-水 (20:80, 0.02% HCOOH, v/v) 等度洗脱, 得到化合物 1 (9.3 mg)、2 (1.7 mg) 和 3 (2.2 mg); 流份 F1-8 (94.6 mg) 采用反相制备柱 (YMC Pack ODS-A 柱, 乙腈-水等度洗脱, 59:41, 0.02% HCOOH, v/v) 分离, 得到化合物 4 (9.1 mg) 和 5 (6.4 mg)。

另取 8.0 g 乙酸乙酯提取物进行 MCI 柱层析分离, 以甲醇-水 (10%~100%) 和丙酮为溶剂系统梯度洗脱, 得到 11 个流份 (A~K); 对流份 I (3.2 g) 采用中压快速制备 (C_{18} 柱, 25~40 μm) 分离, 以甲醇-水溶液 (5%~100%) 为流动相梯度洗脱, 得到化合物 8 (817.1 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 白色无定型粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 13.4$ (c 0.1, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ : 4.70 (1H, dd, $J = 9.5, 5.0$ Hz, H-2), 3.28 (1H, dd, $J = 14.5, 5.0$ Hz, H-3a), 2.99 (1H, dd, $J = 14.0, 9.5$ Hz, H-3b), 7.23 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5, H-9), 7.28

(2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6, H-8), 7.21 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7), 4.12 (1H, dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, H-2'), 2.21 (2H, m, H-5'), 2.37 (1H, m, H-6a'), 1.91 (1H, m, H-6b'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 174.8 (s, C-1), 55.1 (d, C-2), 38.3 (t, C-3), 138.7 (s, C-4), 130.4 (d, C-5, C-9), 129.6 (d, C-6, C-8), 128.0 (d, C-7), 175.0 (s, C-1'), 58.1 (d, C-2'), 181.7 (s, C-4'), 30.4 (t, C-5'), 26.8 (t, C-6'); HR-ESI-MS m/z 277.1182 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$, 277.1188)。将上述 1D NMR、旋光数据与文献对比^[11], 并结合 2D NMR 数据, 鉴定化合物 **1** 为 *L*-pyroglutamyl-*L*-phenylalanine, 该化合物为首次从天然界分离得到。

化合物 2 白色无定型粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -89.1 (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 4.54 (1H, dd, $J = 8.4, 4.8$ Hz, H-2), 3.21 (1H, dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, H-3a), 2.93 (1H, dd, $J = 13.8, 8.4$ Hz, H-3b), 7.27 ~ 7.16 (5H, m, H-5, 6, 7, 8, 9), 1.89 (3H, s, H-11); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 177.9 (s, C-1), 56.7 (d, C-2), 38.8 (t, C-3), 139.2 (s, C-4), 129.3 (d, C-5, C-9), 130.3 (d, C-6, C-8), 127.5 (d, C-7), 172.9 (s, C-10), 22.5 (q, C-11)。将上述 1D NMR 数据与文献对比^[12], 鉴定化合物 **2** 为 *N*-acetylphenylalanine, 根据其旋光值与文献^[13,14]对比, 确定其手性碳的构型为 *2R*, 该化合物为首次从天然界分离得到。

化合物 3 淡黄色油状; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -66.7 (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.08 (1H, s, H-2), 7.56 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.08 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-6), 7.00 (1H, td, $J = 7.8, 0.6$ Hz, H-7), 7.32 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8), 3.34 (1H, dd, $J = 14.4, 5.4$ Hz, H-10a), 3.15 (1H, dd, $J = 14.4, 7.8$ Hz, H-10b), 4.71 (1H, dd, $J = 7.8, 5.4$ Hz, H-11), 1.90 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 124.3 (d, C-2), 111.2 (s, C-3), 128.9 (s, C-4), 119.2 (d, C-5), 119.7 (d, C-6), 122.3 (d, C-7), 112.2 (d, C-8), 138.0 (s, C-9), 28.5 (t, C-10), 55.0 (d, C-11), 175.6 (s, C-12), 173.1 (s, C-14), 22.4 (q, C-15)。将上述 1D NMR 数据与文献^[15]对比, 鉴定化合物 **3** 为 *N*-acetyltryptophan, 根据其旋光值与文献对比^[13,16], 确定其手性碳的构型为 *11R*。

化合物 4 无色油状; ^1H NMR (CD_3OD , 500

MHz) δ : 6.30 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-4), 6.24 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-6), 2.47 (3H, s, H-8), 6.36 (1H, brs, H-10), 6.50 (1H, brs, H-12), 6.36 (1H, brs, H-14), 2.28 (3H, s, H-15), 3.94 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-1$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 172.8 (s, C-1), 109.3 (s, C-2), 144.2 (s, C-3), 113.3 (d, C-4), 163.6 (s, C-5), 103.7 (d, C-6), 164.9 (s, C-7), 23.8 (q, C-8), 157.3 (s, C-9), 105.7 (d, C-10), 159.9 (s, C-11), 113.1 (d, C-12), 142.2 (s, C-13), 113.6 (d, C-14), 21.5 (q, C-15), 52.4 (q, 1-O CH_3)。将以上数据与文献对比^[17], 鉴定化合物 **4** 为 methyl 2-hydroxy-4-(3-hydroxy-5-methylphenoxy)-6-methylbenzoate。

化合物 5 无色油状; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 6.32 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-4), 6.13 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-6), 2.47 (3H, s, H-8), 6.69 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-12), 6.44 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-14), 2.26 (3H, s, H-15), 3.91 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-1$), 3.87 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-11$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 173.0 (s, C-1), 108.4 (s, C-2), 144.1 (s, C-3), 112.4 (d, C-4), 164.0 (s, C-5), 102.4 (d, C-6), 165.2 (s, C-7), 23.9 (q, C-8), 142.7 (s, C-9), 137.7 (s, C-10), 150.5 (s, C-11), 110.7 (d, C-12), 130.3 (s, C-13), 115.9 (d, C-14), 21.1 (q, C-15), 52.3 (q, 1-O CH_3), 56.7 (q, 11-O CH_3)。将以上数据与文献对比^[17], 鉴定化合物 **5** 为 2-hydroxy-4-(2-hydroxy-3-methoxy-5-methylphenoxy)-6-methylbenzoate。

化合物 6 白色无定型粉末; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.56 (1H, brs, H-2), 6.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.54 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6), 3.89 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-3$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 124.7 (s, C-1), 115.8 (d, C-2), 148.7 (s, C-3), 152.3 (s, C-4), 114.0 (d, C-5), 125.2 (d, C-6), 171.4 (s, C-7), 56.2 (q, 3-O CH_3)。将以上数据与文献对比^[18], 鉴定化合物 **6** 为 vanillic acid。

化合物 7 无色油状; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.33 (3H, s, H-2, 4, 6), 3.88 (9H, s, $\text{CH}_3\text{O}-1, 3, 5$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 148.9 (s, C-1, 3, 5), 108.4 (d, C-2, 4, 6), 56.9 (q, $\text{CH}_3\text{O}-1, 3, 5$)。将以上数据与文献对比^[19], 鉴定化合物 **7** 为 1,3,5-三甲氧基苯(1,3,5-trimethoxybenzene)。

化合物 8 无色油状; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 5.34 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 2.78 (2H, t,

$J = 6.5$ Hz, H-11), 2.27 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2), 2.07 (4H, dd, $J = 13.0, 6.5$ Hz, H-8, 14), 1.60 (2H, m, H-3), 1.34 (14H, m, $7 \times \text{CH}_2$), 0.91 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 178.5 (s, C-1), 35.5 (t, C-2), 32.8 (t, C-3), 30.4 (t, C-4), 30.5 (t, C-5, 6), 30.6 (t, C-7), 28.3 (t, C-8, 14), 129.2 (d, C-9), 131.0 (d, C-10, 12), 26.7 (t, C-11), 129.2 (d, C-13), 30.9 (t, C-15), 26.4 (t, C-16), 23.8 (t, C-17), 14.6 (q, C-18)。将以上数据与文献对比^[20], 鉴定化合物 **8** 为亚油酸 (linoleic acid)。

以上化合物的核磁及其它相关详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 (www.trcw.ac.cn)。

4 体外细胞毒性筛选

采用 CTG 发光法将分离得到的化合物 (**1** ~ **8**) 进行人肝癌 HepG-2 细胞和人乳腺癌 MCF-7 细胞的细胞毒性筛选。

将 HepG-2 和 MCF-7 细胞置于 75 cm^2 组织培养瓶中加入含 1.5 g/L 碳酸氢钠, 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素 RPMI 1640 培养基, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 的温箱中培养 4 天。弃去培养液并用 PBS 洗涤细胞。加 1 mL Trysin-EDTA 消化细胞使其达到 80% 融合。加 3 mL DMEM 或含 FBS 的 RPMI 1640 停止细胞消化。将细胞收集到 15 mL 离心管中, 1000 rpm 离心 3 min 。弃上清, 用 3 mL 新培养基悬浮成单细胞悬液。于 96 孔板内接种, 每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ (含 3000 个细胞), 加筛选的化合物 (**1** ~ **8**) 和阳性对照药紫杉醇。化合物处理后的细胞在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 72 h 。72 h 后, 每 $100\text{ }\mu\text{L}$ 培养基加入 Cell Titer Glo 试剂 $30\text{ }\mu\text{L}$ 。最后, 对每块细胞板进行发光检测, 结果显示活细胞的 ATP 水平。

结果表明, 化合物 **1** ~ **8** 对人肝癌细胞 HepG-2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 未显示细胞毒作用 ($\text{IC}_{50} > 50\text{ }\mu\text{M}$)。

5 讨论

嗜低温真菌长期生存在低温环境中, 为了适应极端的生存条件, 它们可能形成特殊的生理代谢特征和特殊的次级代谢产物。 *P. pannorum* 为假裸囊菌属嗜低温真菌, 本文对其次级代谢产物进行了化学成分分离研究, 共分离得到 8 个化合物, 包括 1 个非核糖体肽类化合物 (化合物 **1**)、2 个氨基酸衍生物 (化合物 **2** 和 **3**)、4 个酚酸类化合物 (化合物 **4** ~ **7**) 和 1 个不饱和脂肪酸 (化合物 **8**)。其中, 亚油

酸 (化合物 **8**) 为该真菌次级代谢产物的主成分, 大量不饱和脂肪酸的形成是否与嗜低温真菌为适应其生存环境而产生的特殊化学防御机制有关有待进一步研究。

参考文献

- Hassan N, Rafiq M, Hayat M, et al. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review [J]. Rev Environ Sci Bio, 2016, 15: 147-172.
- Maggi O, Tosi S, Angelova M, et al. Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments [J]. Plant Biosyst, 2013, 147: 247-258.
- Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation [J]. Nat Rev Microbiol, 2003, 1: 200-208.
- Marsh AG, Maxson RE, Manahan DT. High macromolecular synthesis with low metabolic cost in Antarctic sea urchin embryos [J]. Science, 2001, 291: 1950-1952.
- Wilson ZE, Brimble MA. Molecules derived from the extremes of life [J]. Nat Prod Rep, 2009, 26: 44-71.
- Soldatouab S, Baker BJ. Cold-water marine natural products, 2006 to 2016 [J]. Nat Prod Rep, 2017, 34: 585-626.
- Lebar MD, Heimbegner JL, Baker BJ. Cold-water marine natural products [J]. Nat Prod Rep, 2007, 24: 774-797.
- Huo LQ. Sequencing and analyses of mitochondrial genome of cold-adapted fungi [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), 2015.
- Cai WJ. Classification of psychrotrophic *Geomyces* and population genetics of *Geomyces pannorum* [D]. Nanning: Guangxi University (广西大学), 2014.
- Figueroa L, Jiménez C, Rodríguez J, et al. 3-Nitroosteric acid derivatives from an Antarctic sponge-derived *Pseudogymnoascus* sp. fungus [J]. J Nat Prod, 2015, 78(4): 919-923.
- Nagasawa HT, Kwon CH. Acylated cyanamide composition for treating ethanol ingestion; US4726941 [P]. 1988-02-23.
- Koshti N, Naik S, Parab B. Polymer-bound cationic Rh (I) phosphine catalyst for homogeneous asymmetric hydrogenation [J]. Indian J Chem B, 2005, 44B: 2555-2559.
- Kato T, Tsuchiya Y. Resolution of N-acyl amino acids with optically active neutral amino acid amides [J]. Agr Biol Chem, 1962, 26: 467-472.
- Mohler P, Rippert AJ, Hansen HJ. Synthesis of (P)- and (M)-6, 7-bis [(diphenylphosphanyl) methyl]-8, 12-diphenylbenzo [a] heptalenes-potential ligands for homogeneous asymmetric catalysis [J]. Helv Chim Acta, 2000, 83: 258-277.