

夹竹桃叶内生真菌 *Colletotrichum* sp. HK-08 的次生代谢产物及其活性研究

郑浩^{1,2}, 梅文莉², 蔡彩虹², 盖翠娟², 戴好富², 谭志琼^{1*}, 陈惠琴^{2*}

¹海南大学生命科学与药学院,海口 570228;

²海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海口 571101

摘要:本研究运用多种色谱技术从夹竹桃叶内生真菌 *Colletotrichum* sp. HK-08 中分离得到 11 个化合物,利用波谱学方法鉴定其结构分别为 butyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**1**)、4-hydroxyphenethyl acetate (**2**)、phenethyl 2-phenylacetate (**3**)、phenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**4**)、4-hydroxyphenethyl 2-(2-hydroxyphenyl) acetate (**5**)、4-hydroxyphenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**6**)、对羟基苯甲醛(**7**)、2-羟基苯乙醇(**8**)、对羟基苯甲酸(**9**)、对羟基苯乙酮(**10**)和 3a-hydroxyindoline (**11**)。其中化合物 **4**、**5** 和 **11** 为新的天然产物,化合物 **1**~**6** 和 **11** 为首次从 *Colletotrichum* 属真菌中分离得到。活性测试结果显示,化合物 **4** 和 **6** 表现出一定的细胞毒活性。

关键词:夹竹桃;内生真菌;*Colletotrichum* sp.;次生代谢产物;细胞毒活性

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)1-0075-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.1.011

Study on the secondary metabolites and their bioactivities of the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. HK-08 from the leaves of *Nerium indicum*

ZHENG Hao^{1,2}, MEI Wen-li², CAI Cai-hong², GAI Cui-juan², DAI Hao-fu², TAN Zhi-qiong^{1*}, CHEN Hui-qin^{2*}

¹School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China;

²Hainan Key Laboratory for Research and Development of Natural Products from Li Folk

Medicine, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: Eleven compounds were isolated and purified from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. HK-08 from the leaves of *Nerium indicum* by various chromatographic techniques, and the structures were identified as butyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**1**), 4-hydroxyphenethyl acetate (**2**), phenethyl 2-phenylacetate (**3**), phenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**4**), 4-hydroxyphenethyl 2-(2-hydroxyphenyl) acetate (**5**), 4-hydroxyphenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**6**), 4-hydroxybenzaldehyde (**7**), 2-(2-hydroxyethyl) phenol (**8**), 4-hydroxybenzoic acid (**9**), 1-(4-hydroxyphenyl) ethenone (**10**) and 3a-hydroxyindoline (**11**). Among them, compounds **4**, **5** and **11** were new natural products, and **1**~**6** and **11** were isolated from *Colletotrichum* sp. for the first time. The bioactivity results showed that compounds **4** and **6** exhibited certain cytotoxic activities.

Key words: *Nerium indicum* Mill.; endophytic fungus; *Colletotrichum* sp.; secondary metabolite; cytotoxic activity

植物内生真菌是指其生活史的一定阶段或全部阶段定殖在植物体内,而对植物没有明显负面影响的一类真菌^[1]。有研究表明,大部分植物体内都含

有 1 种或多种内生真菌^[2],随着自然界长期的进化选择,真菌与宿主之间形成了动态平衡关系。在宿主的生长周期中,内生真菌在一定程度上具有促进植物生长^[3],提高宿主植物的抗病虫害^[4],以及抵御环境压力的作用^[5]。另外据报道,内生真菌与宿主植物次生代谢产物的累积也有着密不可分的关系^[6]。

夹竹桃 (*Nerium indicum* Mill.) 叶具有毒性但同

收稿日期:2019-09-18 接受日期:2019-12-31

基金项目:海南省重点研发计划(ZDYF2019217);中国热带农业科学院院级创新团队南药产业技术创新团队(17CXTD-15);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-21)

* 通信作者 E-mail: tanzhiqiong2002@163.com, chenhuiqin@itbb.org.cn

时在治疗心脏病、心力衰竭等方面也具有较好的作用^[7]。目前,关于夹竹桃叶内生真菌的研究鲜有报道,为了研究这一特殊植物体内的共生微生物,从其健康叶片中共分离鉴定了 16 株内生真菌,并对其次生代谢产物进行分析,其中发现菌株 *Colletotrichum* sp. HK-08 的大米发酵产物中次生代谢产物不仅化学结构丰富,而且具有较好的生物活性。通过各种色谱手段从中共分离鉴定了 11 个化合物,分别为 butyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**1**)、4-hydroxyphenethyl acetate (**2**)、phenethyl 2-phenylacetate (**3**)、phenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**4**)、4-hydroxyphenethyl 2-(2-hydroxyphenyl) acetate (**5**)、4-hydroxyphenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**6**)、对羟基苯甲醛 (**7**)、2-羟基苯乙醇 (**8**)、对羟基苯甲酸 (**9**)、对羟基苯乙酮 (**10**) 和 3a-hydroxyindoline (**11**)。在此基础上对分离得到的化合物进行了生物活性测试,在一定程度上丰富了 *Colletotrichum* 属真菌次生代谢产物化学结构类型和生物活性。

1 材料

1.1 菌株

真菌 HK-08 分离自海南省海口市海南大学校园内的健康夹竹桃叶片,现保藏于中国热带农业科学院热带生物技术研究所,标本编号为:20180809HK-08。

1.2 仪器和试剂

旋转蒸发器 (Heidolph Laborota),核磁共振波谱仪 (Brucker AV-500,以 TMS 为内标),质谱仪 (Micromass Autospec-Uitima TOF),安捷伦 1260 分析型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司),SUMMITP680A 半制备高效液相色谱仪 (戴安,美国),ELX-800 酶标仪 (Bio Tex 公司),超纯水装置 (厦门锐思捷水纯化技术有限公司),超净工作台 (上海博讯实业有限公司),Sephadex LH-20 (Merck 公司),C₁₈反相材料 (FU-JI 公司),柱色谱硅胶和薄层色谱硅胶板 (青岛海洋化工厂产品),氘代试剂 (CD₃OD 和 CDCl₃) 购自 Merck 公司,色谱乙腈购自天津康科德公司;其他试剂均为重蒸工业试剂。

1.3 培养基

(1) PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1000 mL,pH 自然。(2) 大米固体培养基:每 100 g 大米加入 100 mL 无菌水,置于 1 L 三角瓶中。

2 方法

2.1 内生真菌的分离

将叶片表面清洗干净,然后依次用 75% 乙醇浸泡 1 min,0.1% 的升汞浸泡 2 min,无菌水漂洗 3 次以进行表面灭菌。接着将叶片置于培养皿中,上下表面均与培养基相接触后取出,以此培养皿作为对照组。取出的叶片将其剪成 1 cm × 1 cm 的方块,贴于新的含 PDA 培养基的培养皿中,28 °C 恒温箱中培养 3 ~ 15 天。对照培养基中无真菌长出,证明表面灭菌彻底,分离得到的真菌是植物内生真菌。挑取叶片切口处长出的菌丝体,接种到新的 PDA 培养基上继续培养,并纯化得到单一菌株,得到的单菌落接种在 PDA 斜面上编号并 4 °C 保存。

2.2 菌株鉴定

将真菌 HK-08 接种于 PDA 培养基,28 °C 培养 7 天,观察菌落的形态特征。使用试剂盒 [OMEGA Fungal DNA Kit (50)] 提取 DNA,以 ITS1 (TCCG-TAGGTGAACCTGCGG) 和 ITS4 (TCCTCCGCTTATT-GATATGC) 作为引物 (上海生工生物工程股份有限公司),对该菌株 ITS 序列进行测定,将测序结果提交于 NCBI 基因库,并与 BLAST 数据库进行同源比对,并利用软件 MEGA X 构建系统发育树。

2.3 菌株发酵

真菌在 PDA 培养基中活化后,挑取单个菌落接种到装有 100 mL PDA 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,置于 28 °C,200 rpm 的摇床中振荡培养 2 天,得到种子液,在含有大米培养基的 1 L 三角瓶 (70 瓶) 中接入 10 mL 种子液,静置培养 30 天。

2.4 提取与分离

菌株发酵结束后,用乙酸乙酯萃取三遍,回收合并乙酸乙酯相,减压浓缩,获得乙酸乙酯提取物 (198.0 g)。将提取物用 95% 甲醇水溶解,以 1:1 用石油醚萃取,除去石油醚层,减压浓缩得到 88.0 g 膏状粗提物,经过减压硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯 (100:1 ~ 0:1) 梯度洗脱,得到 15 个流份 (Fr. 1 ~ Fr. 15)。Fr. 1 (2.1 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (氯仿:甲醇 = 1:1 为流动相) 分离得到 7 个流份 Fr. 1-1 ~ Fr. 1-7。Fr. 1-3 经反复硅胶柱色谱分离纯化得到化合物 **3** (22.0 mg)。Fr. 3 (7.0 g) 经 C₁₈ 反相硅胶柱色谱梯度洗脱得到 10 个流份 Fr. 3-1 ~ Fr. 3-10,其中 Fr. 3-5 与 Fr. 3-6 合并后经反复硅胶柱色谱分离纯化得到化合物 **1** (12.0 mg)、**2** (3.0 mg)、**4** (40.0 mg)。Fr. 8 (7.0 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱

(甲醇为流动相)分离得到 10 个流份 Fr. 8-1 ~ Fr. 8-10。Fr. 8-4 经反复硅胶柱色谱分离纯化得到化合物 **7**(2.0 mg)、**8**(3.0 mg)、**9**(6.0 mg)、**10**(1.5 mg)。Fr. 8-6(320.0 mg)经减压硅胶柱(石油醚:乙酸乙酯 = 50:1 为流动相)色谱,得到 8 个流份 Fr. 8-6-1 ~ Fr. 8-6-8,其中 Fr. 8-6-3 经反复硅胶柱色谱分离纯化得到化合物 **5**(2.6 mg)、**6**(5.0 mg);Fr. 8-6-5 经半制备高效液相色谱(C_{18} 柱,乙腈-水 V:V = 21:79 为流动相,流速 4 mL/min;检测波长 220、245 nm),得到化合物 **11**(0.9 mg, t_R 19.0 min)。

2.5 细胞毒活性测试

采用 MTT 法对化合物 **1** ~ **6**、**9** 和 **10** 进行细胞毒活性测试。供试肿瘤细胞包括:K562 人慢性髓原白血病细胞、BEL-7402 肝癌细胞、SGC-7901 胃癌细胞、A549 肺癌细胞、Hela 人宫颈癌细胞,供试细胞均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。以相同浓度的 DMSO 溶剂作为阴性对照组,顺铂作为阳性对照组。将待测样品分别设:1.0、0.5、0.25、0.125、0.063、0.032 mg/mL 6 个浓度梯度。选取对

数生长期的细胞接种在 96 孔板上。细胞 K562 直接加入 10 μ L 样品,其余肿瘤细胞株需在培养箱中培养 24 h 后,再加入 10 μ L 样品。培养 72 h 后,在显微镜下观察每孔细胞的形态。将 15 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液加入到每孔细胞中,置于 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h 后,弃去上清液,每孔中加入 150 μ L DM-SO,振荡混匀,用酶标仪测量每孔的 OD 值(490 nm 为测量波长)。计算其抑制率为 50% 的时候样品浓度即 IC_{50} 值。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 菌株鉴定

菌株初始长出的菌丝均为无色,后变为灰色,菌落背面为深灰色及少许褐色,其孢子呈两端钝圆的圆柱状。将扩增的序列在 GenBank 上进行 BLAST 比对,选取与其同源性较高的菌株,使用 MEGA X 构建系统发育树(图 1)

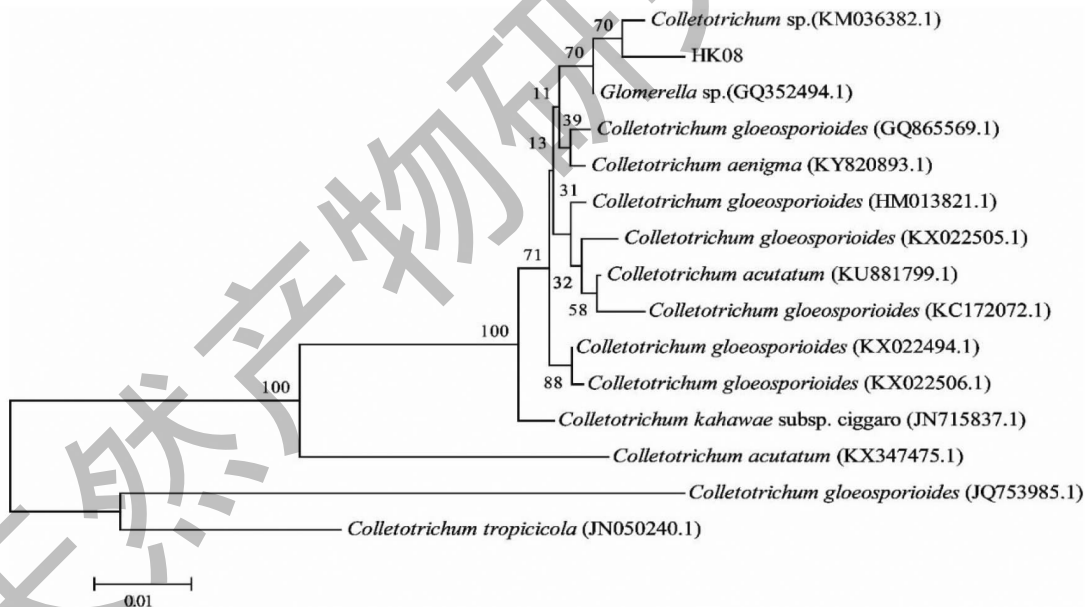


图 1 基于 ITS 序列同源性的真菌 HK-08 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on ITS sequences of strain HK-08

结果显示,菌株 HK-08 与 *Colletotrichum* sp. (KM036382.1) 在同一分支上,且与其 BLAST 同源比对相似度达 99%,因此,鉴定该菌株 HK-08 为真菌 *Colletotrichum* sp. HK-08。

3.2 结构鉴定

化合物 **1** 无色油状($CHCl_3$);分子式为 $C_{12}H_{16}$

O_3 ; ESI-MS: m/z 231.2 $[M + Na]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 7.13 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2, 6), 6.76 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3, 5), 3.54 (2H, s, H-7), 4.08 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-9), 1.60 (2H, m, H-10), 1.34 (2H, m, H-11), 0.91 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-12); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C : 126.3 (C-

1), 130.6(C-2,6), 115.6(C-3,5), 154.9(C-4), 40.7(C-7), 172.5(C-8), 65.0(C-9), 30.7(C-10), 19.2(C-11), 13.9(C-12)。以上数据与文献^[8]报道基本一致,确定化合物**1**为 butyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate。

化合物 2 无色油状(CHCl₃);分子式为 C₁₀H₁₂O₃;ESI-MS:*m/z* 181.2[M + H]⁺; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz)δ_H: 7.08(2H, d, *J* = 7.9 Hz, H-2,6), 6.77(2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-3,5), 5.17(1H, s, 4-OH), 4.23(2H, t, *J* = 7.1 Hz, H-8), 2.86(2H, t, *J* = 7.1 Hz, H-7), 2.04(3H, s, H-10); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz)δ_C: 129.9(C-1), 130.2(C-2,6), 115.5(C-3,5), 154.5(C-4), 34.3(C-7), 65.4(C-8), 171.5(C-9), 21.2(C-10)。以上数据与文献^[9]报道基本一致,确定化合物**2**为 4-hydroxyphenethyl acetate。

化合物 3 无色油状(CHCl₃),分子式为 C₁₆H₁₆O₂;ESI-MS:*m/z* 263.3[M + Na]⁺; ¹H NMR谱给出两个单取代苯环的 10 个质子信号:δ_H 7.23~7.36(8H, m, H-2,3,4,5,6,13,14,15), 7.18(2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-12,16); 3 个亚甲基信号:δ_H 4.34(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-9), 3.63(2H, s, H-7), 2.95(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10); ¹³C NMR谱显示该化合物共有 16 个碳原子,其中包括 12 个苯环碳,3 个亚甲基碳 δ_C 41.6(C-7), 65.5(C-9), 35.2(C-10)和 1 个羰基碳 δ_C 171.7(C-8)。¹H-¹H COSY谱中 H₂-9 与 H₂-10 有相关信号。HMBC谱中,亚甲基质子 H₂-7 与 C-1,2,6,8 有相关信号, H₂-9 与 C-8,10,11 有相关信号,亚甲基质子 H₂-10 与 C-9,11,12,16 有相关信号。¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz)δ_H: 7.23~7.36(8H, m, H-2,3,4,5,6,13,14,15), 7.18(2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-12,16), 4.34(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-9), 3.63(2H, s, H-7), 2.95(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz)δ_C: 133.9(C-1), 126.7~129.4(10C, Ar-C), 41.6(C-7), 171.7(C-8), 65.5(C-9), 35.2(C-10), 137.8(C-11)。综合以上信息,确定化合物**3**为 phenethyl 2-phenylacetate^[10],并且首次报道其核磁数据。

化合物 4 无色油状(CHCl₃);分子式为 C₁₆H₁₆O₃;ESI-MS:*m/z* 279.3[M + Na]⁺; ¹H NMR谱中呈现了一个单取代苯环的氢信号:δ_H: 7.24~7.33(3H, m, H-13,14,15), 7.19(2H, d, *J* = 7.4 Hz, H-12,16); 一个对位取代苯环的氢信号:7.10(2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-2,6), 6.76(2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3,

5); 3 个亚甲基信号:δ_H 4.33(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-9), 3.55(2H, s, H-7), 2.95(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10)。¹³C NMR谱中显示该化合物共有 16 个碳原子,其中包括 12 个苯环碳信号 δ_C 125.8(C-1), 130.6(C-2,6), 115.7(C-3,5), 155.0(C-4), 137.8(C-11), 128.6 - 129.1(C-12,13,15,16), 126.7(C-14); 3 个亚甲基碳 δ_C 40.6(C-7), 65.6(C-9), 35.1(C-10); 1 个羰基碳 δ_C 172.5(C-8)。¹H-¹H COSY谱中 H₂-9 与 H₂-10 有相关信号。HMBC谱中,亚甲基质子 H₂-7 与 C-1,2,6,8 有相关信号, H₂-9 与 C-8,10,11 有相关信号,亚甲基质子 H₂-10 与 C-9,11,12,16 有相关信号。¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz)δ_H: 7.24~7.33(3H, m, H-13,14,15), 7.19(2H, d, *J* = 7.4 Hz, H-12,16), 7.10(2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-2,6), 6.76(2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3,5), 4.33(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-9), 3.55(2H, s, H-7), 2.95(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz)δ_C: 125.8(C-1), 130.6(C-2,6), 115.7(C-3,5), 155.0(C-4), 40.6(C-7), 172.5(C-8), 65.6(C-9), 35.1(C-10), 137.8(C-11), 128.6 - 129.1(C-12,13,15,16), 126.7(C-14)。确定化合物**4**为 phenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate^[11],并且首次报道其核磁数据。

化合物 5 黄色油状(CH₃OH);分子式为: C₁₆H₁₆O₄;ESI-MS:*m/z* 273.3[M + H]⁺; ¹H NMR谱中呈现了一个邻位取代苯环的氢信号:7.09(2H, m, H-4,6), 6.78(2H, m, H-3,5); 一个对位取代苯环的氢信号:6.97(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-12,16), 6.69(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-13,15); 3 个亚甲基信号:4.20(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-9), 3.57(2H, s, H-7), 2.79(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10)。¹³C NMR谱中给出了 16 个碳信号,包括 12 个苯环碳信号,3 个亚甲基信号和 1 个羰基信号。¹H-¹H COSY谱中 H₂-9 与 H₂-10 有相关信号。HMBC谱中,亚甲基质子 H₂-7 与 C-1,2,6,8 有相关信号, H₂-9 与 C-8,10,11 有相关信号,亚甲基质子 H₂-10 与 C-9,11,12,16 有相关信号。¹H NMR(CD₃OD, 500 MHz)δ_H: 7.09(2H, m, H-4,6), 6.97(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-12,16), 6.78(2H, m, H-3,5), 6.69(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-13,15), 4.20(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-9), 3.57(2H, s, H-7), 2.79(2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10); ¹³C NMR(CD₃OD, 125 MHz)δ_C: 122.5(C-1), 156.7(C-2), 115.3(C-3), 129.3(C-4), 120.5(C-5), 132.1(C-6), 36.7(C-7), 174.2(C-8), 66.9(C-9), 35.3(C-

10), 130.2 (C-11), 130.9 (C-12, 16), 116.2 (C-13, 15), 156.9 (C-14)。以上数据与文献^[12]报道基本一致, 确定化合物 **5** 为 4-hydroxyphenethyl 2-(2-hydroxyphenyl) acetate。

化合物 6 无色油状 (CH₃OH); 分子式为 C₁₆H₁₆O₄; ESI-MS: m/z 273.3 [M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} : 7.01 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.96 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-12, 16), 6.66 ~ 6.73 (4H, m, H-3, 5, 13, 15), 4.20 (2H, t, J = 6.9 Hz, H-9), 3.47 (2H, s, H-7), 2.78 (2H, t, J = 6.9 Hz, H-10); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} : 126.3 (C-1), 130.1 (C-2, 6), 116.3 (C-3, 5), 156.9 (C-4), 41.3 (C-7), 174.0 (C-8), 66.9 (C-9), 35.1 (C-10), 129.9 (C-11), 131.3 (C-12, 16), 116.2 (C-13, 15), 157.5 (C-14)。以上数据与文献^[12]报道基本一致, 确定化合物 **6** 为 4-hydroxyphenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate。

化合物 7 浅黄色晶体 (CH₃OH); 分子式为 C₇H₆O₂; ESI-MS: m/z 123.1 [M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} : 9.72 (1H, s, H-7), 7.74 (2H, d, J = 8.2 Hz, H-2, 6), 6.88 (2H, d, J = 8.2 Hz, H-3, 5); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} : 130.1 (C-1), 133.4 (C-2, 6), 116.9 (C-3, 5), 165.5 (C-4), 192.6 (C-7)。以上数据与文献^[13]报道基本一致, 确定化合物 **7** 为对羟基苯甲醛。

化合物 8 淡黄色油状 (CH₃OH); 分子式为 C₈H₁₀O₂; ESI-MS: m/z 139.2 [M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} : 7.03 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-3), 6.98 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-5), 6.71 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-6), 6.70 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-4), 3.70 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-8), 2.79 (2H, t, J = 7.1 Hz, H-7); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} : 156.4 (C-1), 126.6 (C-2), 131.8 (C-3), 120.5 (C-4), 128.4 (C-5), 116.1 (C-6), 35.1 (C-7), 63.2 (C-8)。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 确定化合物 **8** 为 2-羟基苯乙醇。

化合物 9 白色晶体 (CH₃OH); 分子式为 C₇H₆O₃; ESI-MS: m/z 139.1 [M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} : 7.87 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3, 5), 6.81 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2, 6); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} : 163.7 (C-1), 115.8 (C-2, 6), 131.7 (C-3, 5), 122.8 (C-4), 169.3 (C-7)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 确定化合物 **9** 为对羟基苯甲酸。

化合物 10 白色粉末 (CH₃OH); 分子式为 C₈H₈O₂; ESI-MS: m/z 137.2 [M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} : 7.85 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 6.80 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 2.49 (3H, s, H-8); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} : 162.8 (C-1), 115.6 (C-2, 6), 130.0 (C-3, 5), 129.1 (C-4), 197.1 (C-7), 26.2 (C-8)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 确定化合物 **10** 为对羟基苯乙酮。

化合物 11 黄色油状 (CH₃OH); 分子式为: C₁₀H₁₁NO₂; ESI-MS: m/z 178.2 [M + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} : 7.26 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-4), 7.09 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-6), 6.74 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-5), 6.60 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-7), 5.35 (1H, s, H-8a), 4.00 (1H, ddd, J = 8.7, 8.0, 2.5 Hz, H-3 α), 3.61 (1H, ddd, J = 9.7, 9.2, 5.3 Hz, H-3 β), 2.37 (1H, ddd, J = 11.2, 10.8, 7.3 Hz, H-2 α), 2.27 (1H, ddd, J = 11.9, 5.3, 2.5 Hz, H-2 β); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} : 67.8 (C-2), 42.4 (C-3), 90.0 (C-3a), 132.1 (C-3b), 125.1 (C-4), 119.9 (C-5), 130.8 (C-6), 110.3 (C-7), 151.7 (C-7a), 101.4 (C-8a)。以上数据与文献^[17]报道基本一致, 确定化合物 **11** 为 3a-hydroxyindoline。

3.3 细胞毒活性测试

对化合物 **1** ~ **6**、**9** 和 **10** 进行细胞毒活性测试, 结果显示, 仅化合物 **4** 和 **6** 对肿瘤细胞有一定的细胞毒活性, 其他化合物并未表现出细胞毒活性, 活性结果见表 1。

表 1 化合物 **4** 和 **6** 的细胞毒活性测试结果

Table 1 The cytotoxic activities of compounds **4** and **6**

样品 Sample	IC ₅₀ (μM)				
	K562	BEL-7402	SGC-7901	A549	Hela
4	95.00 ± 0.04	106.88 ± 0.08	134.57 ± 0.44	161.91 ± 0.36	101.02 ± 0.36
6	38.93 ± 0.18	83.89 ± 0.48	56.69 ± 0.26	171.25 ± 0.81	136.14 ± 1.21
顺铂 Cisplatin ^a	3.08 ± 0.05	4.02 ± 0.06	4.11 ± 0.02	1.93 ± 0.02	11.29 ± 0.15

注: ^a 阳性对照。

Note: ^a Positive control.

4 讨论

本研究运用多种色谱技术从夹竹桃叶内生真菌 *Colletotrichum* sp. HK-08 中分离得到 11 个化合物, 均为聚酮类化合物, 其中包括 6 个含苯乙基或苯乙酰基结构的酯类化合物: butyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**1**)、4-hydroxyphenethyl acetate (**2**)、phenethyl 2-phenylacetate (**3**)、phenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**4**)、4-hydroxyphenethyl 2-(2-hydroxyphenyl) acetate (**5**)、4-hydroxyphenethyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate (**6**); 4 个简单的苯酚类化合物: 对羟基苯甲醛 (**7**)、2-羟基苯乙醇 (**8**)、对羟基苯甲酸 (**9**)、对羟基苯乙酮 (**10**); 以及 1 个生物碱类化合物: 3a-hydroxyindoline (**11**)。本文首次报道了化合物 **3** 和 **4** 的核磁数据, 化合物 **4**、**5** 和 **11** 为新的天然产物, 化合物 **1**~**6** 和 **11** 为首次从 *Colletotrichum* 属真菌中分离得到, 丰富了 *Colletotrichum* 属真菌的次生代谢产物。化合物 **4** 和 **6** 表现出一定的细胞毒活性, 比较化合物 **3**、**4**、**5** 和 **6** 的结构, 发现结构中 4 号位的酚羟基可能对活性起到了重要作用, 但还需更多的研究进一步验证, 此外, 化合物 **1**~**6**、**9** 和 **10** 在对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等人体病原菌的抗性实验中并未表现出抗菌活性。

参考文献

- 1 Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. Nat Prod Rep, 2001, 18:448-459.
- 2 Waqas M, Khan AL, Kamran M, et al. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promote host-plant growth during stress[J]. Molecules, 2012, 17: 10754-10773.
- 3 Wang Y, Xu L, Ren W, et al. Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*[J]. Pytoedicine, 2012, 19: 364-368.
- 4 Gomez-Vidal S, Salinas J, Tena M, et al. Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi[J]. Electrophoresis, 2009, 30:2996-3005.
- 5 Li X, Zhang L. Endophytic infection alleviates Pb²⁺ stress

effects on photosystem II functioning of *Oryza sativa* leaves [J]. J Hazard Mater, 2015, 295:79-85.

- 6 Jia M, Chen L, Xin H, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review [J]. Front Microbiol, 2016, 7:906-920.
- 7 Xing XJ. Pharmacological action and clinical application of *Nerium indicum* Mill. cv Paihua [J]. Mod Med Heal (现代医药卫生), 2007, 23:2466.
- 8 Jie L, Wei Z, Cao S, et al. Chemical constituents of *Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O. K. Mill [J]. Biochem Syst Ecol, 2015, 61:203-207.
- 9 Wu HH, Tian L, Chen G, et al. Six compounds from marine fungus Y26-02 [J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11: 748-751.
- 10 Jirovetz L, Buchbauer G, Schmidt E, et al. Purity, antimicrobial activities and olfactory evaluations of 2-phenylethanol and some derivatives [J]. J Essent Oil Res, 2008, 20:82-85.
- 11 Chorvat RJ, Black LA, Ranade VV, et al. Mono- and bis (aminomethyl) phenylacetic acid esters as short-acting antiarrhythmic agents. [J]. J Med Chem, 1993, 36:2494-2498.
- 12 Tadpetch K, Chukong C, Jeanmard L, et al. Cytotoxic naphthoquinone and a new succinate ester from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG227 [J]. Phytochem Lett, 2015, 11:106-110.
- 13 Zhuang XC, Yan YM, Luo Q, et al. Chemical constituents from *Tylosis bivittateinus* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29:723-730.
- 14 Capasso R, Evidente A, Schivo L, et al. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters [J]. J Appl Bacteriol, 2010, 79:393-398.
- 15 Hu L, Ding ZH, Liu KJ. The chemical constituents of Basidiomycetes *Boletopsis grisea* [J]. Plant Diver Resour (云南植物研究), 2002, 5:667-670.
- 16 Savard ME, Miller JD, Blais LA, et al. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50 [J]. Mycopathologia, 1994, 127:19-27.
- 17 Sunazuka T, Hirose T, Shirahata T, et al. Total synthesis of (+)-madindoline A and (-)-madindoline B, potent, selective inhibitors of interleukin 6. Determination of the relative and absolute configurations [J]. J Am Chem Soc, 2000, 122: 2122-2123.