

越前水母共附生真菌 *Aspergillus fumigatus* sp. 次级代谢产物研究李基兴^{1,2}, 杨斌², 刘永宏^{2,3*}, 李云秋^{1*}¹桂林医学院药学院, 桂林 541004; ²中国科学院南海海洋研究所广东省海洋药物重点实验室, 广州 510301;³南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广州 510275

摘要:采用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、中压反相柱层析以及半制备高效液相色谱等方法对韩国南部海岸来源的越前水母共附生真菌 *A. fumigatus* 的大米发酵产物进行分离纯化, 并利用核磁共振、质谱等波谱学方法结合其理化性质及文献数据鉴定了 7 个单体化合物的结构: sinulariapeptide C (1)、simplicilliumtide A (2)、simplicilliumtide B (3)、sinulariapeptide D (4)、4-羟基-17R-甲基降甾醇 (5)、3-羟基苯乙酸甲酯 (6)、邻苯二甲酸二丁酯 (7)。化合物 1~7 均为首次从越前水母来源的菌属中分离得到。

关键词:越前水母; 共附生真菌; *Aspergillus fumigatus*; 次级代谢产物

中图分类号: R931.77

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)1-0081-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.1.012

Secondary metabolites from a jellyfish-derived fungus *Aspergillus fumigatus* sp.LI Ji-xing^{1,2}, YANG Bin², LIU Yong-hong^{2,3*}, LI Yun-qiu^{1*}¹School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;²Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;³South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510275, China

Abstract: The secondary metabolites of *A. fumigatus* sp., a fungus isolated from the jellyfish *Nemopilema nomurai* collected off the southern coast of Korea, were studied. Seven compounds were obtained from the rice static fermentation products, which were purified by the methods of silica gel, Sephadex LH-20 gel, reversed-phase and semi-preparative HPLC column chromatography. The structures of these compounds were identified as sinulariapeptide C (1), simplicilliumtide A (2), simplicilliumtide B (3), sinulariapeptide D (4), 4-hydroxy-17R-methylcisterol (5), methyl 3-hydroxyphenyl acetate (6) and dibutyl phthalate (7) by physical and chemical properties, spectroscopic analysis, and comparison with the reported literatures. Compounds 1-7 were isolated from the jellyfish-derived fungus *A. fumigatus* for the first time.

Key words: *Nemopilema nomurai*; jellyfish-derived fungus; *Aspergillus fumigatus*; secondary metabolites

海洋广阔而独特的水体环境,孕育出了丰富且代谢成分特殊的生物资源及微生物资源^[1]。海洋微生物具有物种多样性、遗传多样性、代谢产物化学多样性等特点,海洋真菌是海洋微生物重要的组成部分,是新颖活性次级代谢产物的重要来源之一^[2,3]。近年来,海洋微生物来源的化合物中已经有 13 个被美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市,有 60 余个临床候选海洋药物,这一数据说明海

洋微生物次级代谢产物在治疗人类疾病和新药发现方面有着巨大的潜力^[4]。据文献报道,海洋真菌来源的聚酮、萜类、生物碱和肽类化合物等都有很好的生物活性^[5],其中肽类化合物具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎等重要的生理活性,是创新药物和药物先导化合物的重要来源之一^[6-10]。到目前为止,越前水母来源真菌研究甚少,更多的活性次级代谢产物还有待挖掘,也说明真菌次级代谢产物在新药研发领域还有较为广阔的发展前景。

本课题组一直致力于海洋来源真菌活性次级代谢产物的研究^[11-14],本论文对来自于韩国南部海岸的越前水母中分离到的一株烟曲霉属的菌株进行次

收稿日期: 2019-10-25 接受日期: 2019-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(52102708); 地区科学基金(81860626)

* 通信作者 Tel: 86-773-2833606; E-mail: leeyq88@126.com

级代谢产物的研究工作,从大米发酵产物中分离并鉴定了7个化合物,即 *simulariapeptide C* (**1**)、*simpli-cilliumtide A* (**2**)、*simpli-cilliumtide B* (**3**)、*simulari-peptide D* (**4**)、4-羟基-17*R*-甲基降甾醇(**5**)、3-羟基苯乙酸甲酯(**6**)、邻苯二甲酸二丁酯(**7**)。其中化合物**1**~**4**为肽类化合物,化合物**1**~**7**均为首次从越南水母来源的烟曲霉属中分离得到。

1 材料与方法

1.1 实验样品

供试菌株分离自于2007年6月采集于韩国南部海岸的越南水母的组织中,将保藏于4℃的菌株接种到MB琼脂固体平面培养基上,置于28℃培养箱中活化7天。然后接种到MB种子培养液(麦芽提取物1.5%,海盐1.5%,水10 mL)中于28℃、180 rpm条件下摇床活化3天,最后再接种至大米培养基(大米200 g,海盐1.5%,水220 mL)中,室温下静置发酵45天,共发酵40瓶。

1.2 菌株鉴定

通过提取菌株的总DNA,并对DNA中的Inter-tek Testing Services(ITS)序列进行PCR扩增,及18S rRNA对比(18S rRNA基因序列由上海美吉生物医药科技有限公司测定),将测出来的18S rRNA基因序列进行BLAST分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。鉴定为*Aspergillus fumigatus*,菌种保存于中国科学院南海海洋研究所热带海洋生物资源与生态重点实验室。

1.3 主要仪器与试剂

主要仪器有:AV-700超导核磁共振仪(德国Bruker公司)、中压制备色谱仪(Buchi公司)、Hitachi Primade高效液相色谱仪(日本日立公司)、ZYJ-

S型超净工作台(苏州净化设备公司)、旋转蒸发仪(日本东京理化株式会社,EYELAN-1100V-W型)等;主要试剂有:葡聚糖凝胶Sephadex LH-20(Pharmacia公司)、薄层色谱及柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂)、分析纯化学试剂(广州化学试剂厂和天津富宇精细化工有限公司)等。

1.4 提取与分离

菌株发酵结束后将大米培养基捣碎,加入与捣碎物等体积的丙酮,超声15 min。后用8层纱布减压过滤,滤液经减压蒸馏至无有机溶剂,再用乙酸乙酯萃取3遍,减压蒸干乙酸乙酯相得粗浸膏;残渣用乙酸乙酯提取3遍至乙酸乙酯浸提液颜色接近无色,再经浓缩得粗浸膏,合并二者得总浸膏共165 g。粗浸膏用100~200目的硅胶拌样,经中压柱色谱(200~300目硅胶)分离(二氯甲烷/甲醇100:0~1:1)梯度洗脱,再经TLC检识合并得7个流份。Fr. 1经ODS中压反相柱色谱(MeOH/H₂O 5:95~:0)分离得3个子流份,其中Fr. 1-1再用半制备液相(CH₃CN/H₂O 6:94)得到化合物**6**(1.8 mg);Fr. 2经ODS中压反相柱色谱(MeOH/H₂O 5:95~:0)分离得9个子流份,其中Fr. 2-9用半制备液相(CH₃CN/H₂O 67:33)得到化合物**5**(15 mg),Fr. 2-5用半制备液相(CH₃CN/H₂O 56:44)得到化合物**7**(6.4 mg);Fr. 7经ODS中压反相柱色谱(MeOH/H₂O 5:95~:0)分离得8个子流份,其中Fr. 7-6用半制备液相(CH₃CN/H₂O 28:72)得到化合物**1**(2 mg),Fr. 7-7用半制备液相(CH₃CN/H₂O 26:74)得到化合物**4**(7.2 mg),Fr. 7-8用半制备液相(CH₃CN/H₂O 31:69)得到化合物**2**(3.5 mg)和化合物**3**(0.7 mg)。化合物结构如图1。

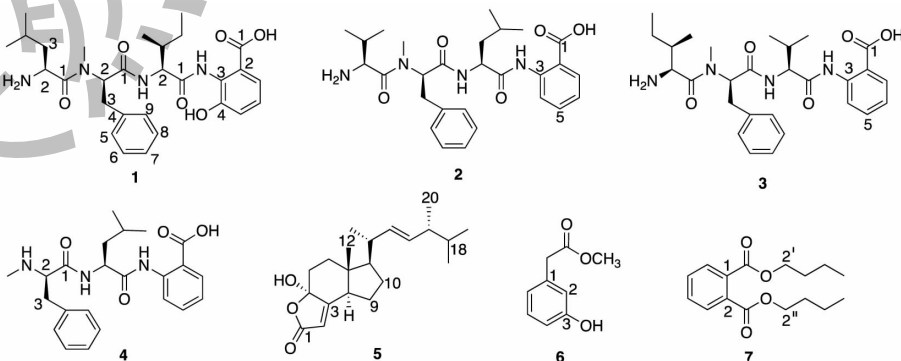


图1 化合物**1**~**7**的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds **1**-**7**

2 结构鉴定

化合物 1 白色固体;LR-ESI-MS m/z 541.4 [M + H]⁺, 推断其分子式为 C₂₉H₄₀N₄O₆, 分子量为 540, 不饱和度为 12, 旋光度 [α]_D²⁵ = -9.7 (c 0.115, 甲醇)。化合物 1 的核磁数据与文献^[8]对照基本一致, 故鉴定该化合物为 sinulariapeptide C, 具体核磁数据见表 1。

化合物 2 白色固体;LR-ESI-MS m/z 511.5 [M + H]⁺, 推断其分子式为 C₂₈H₃₈N₄O₅, 分子量为 510, 不饱和度为 12, 旋光度 [α]_D²⁵ = +79.6 (c 0.119, 甲醇)。化合物 2 的核磁数据与文献^[7]对照基本一致, 故鉴定该化合物为 simplicilliumtide A, 具体核磁数据见表 1。

表 1 化合物 1 和 2 的核磁数据 (700 和 175 MHz, CD₃OD, TMS, δ in ppm)

Table 1 ¹H and ¹³C NMR data of compounds 1 and 2 (700 and 175 MHz, CD₃OD, TMS, δ in ppm)

Position	1		Position	2	
	δ _C	δ _H (J in Hz)		δ _C	δ _H (J in Hz)
HABA			ABA		
1	174.7		1	173.4	
2	124.6		2	124.6	
3	140.9		3	140.9	
4	150.4		4	120.5	8.54, d(8.4)
5	130.4	7.32, d(7.0)	5	130.4	7.35, td(8.4, 1.2)
6	126.6	7.06, t(7.7)	6	123.8	7.05, t(7.7)
7	123.4	7.96, d(7.0)	7	132.1	7.97, dd(7.7, 1.4)
L-Leu			L-Leu		
1	171.1		1	171.1	
2	55.3	4.52, dd(9.8, 3.5)	2	55.3	4.37, dd(10.5, 3.5)
3	41.9	1.69, m	3	41.9	1.71, m
		1.52, m			1.59, m
4	25.9	1.52, m	4	25.9	1.49, m
5	23.6	0.84, d(7.0)	5	21.6	0.91, d(7.0)
5'	21.6	0.82, d(7.0)	5'	23.6	0.84, d(6.3)
N-Me-D-Phe			N-Me-D-Phe		
2	57.9	5.85, s	2	57.9	5.64, t(7.7)
3	35.9	3.20, dd(14.7, 6.3)	3	35.5	2.98, m
		3.06, m			3.16, dd(14.0, 7.0)
4	138.1		4	137.9	
5,9	130.4	7.32, d(7.0)	5,9	130.4	7.28, (overlapped)
6,8	129.6	7.27, t(7.0)	6,8	129.6	7.28, (overlapped)
7	127.9	7.22, t(7.0)	7	127.9	7.19, m
N-CH ₃	31.6	3.00, s	N-CH ₃	31.3	3.02, s
L-allo-Ile			L-Val		
2	55.6	4.00, s	2	55.3	4.12, d(4.9)
3	37.7	1.36, m	3	30.9	1.71, m
4	26.9	1.02 ~ 1.14, m	4	19.0	0.82, d(7.0)
5	12.1	0.82, t(7.0)	5	17.2	0.74, d(7.0)
6	13.7	0.63, d(6.3)			

化合物 3 浅黄色固体; LR-ESI-MS; m/z 511.4 $[M+H]^+$, 推断其分子式为 $C_{28}H_{38}N_4O_5$, 分子量为 510, 不饱和度为 12, 旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +64.2$ (c 0.053, 甲醇)。化合物 **3** 的核磁数据与文献^[7] 对照基本一致, 故鉴定该化合物为 simplicilliumtide B, 具体核磁数据见表 2。

化合物 **1~3** 的核磁数据存在部分季碳缺失的

情况, 经查阅文献分析可能是由于氮原子的弛豫时间延长, 使得氮原子附近部分碳信号消失。结合三者的核磁数据、质谱等信息并与文献^[7,8] 数据进行对照, 因此确定了它们的结构。

化合物 4 白色固体; 化合物 **4** 的核磁数据与文献^[8] 对照基本一致, 故鉴定该化合物为 sinularia-peptide D, 具体核磁数据见表 2。

表 2 化合物 **3** 和 **4** 的核磁数据 (700 和 175 MHz, CD_3OD , TMS, δ ppm)

Table 2 1H and ^{13}C NMR data of compounds **3** and **4** (700, 175 MHz, CD_3OD , TMS, δ ppm)

Position	3		Position	4	
	δ_C	δ_H (J in Hz)		δ_C	δ_H (J in Hz)
ABA			ABA		
1	172.1		1	174.3	
2	124.5		2	124.7	
3	140.8		3	140.6	
4	120.5	8.54, d(8.4)	4	132.5	8.02, dd(7.7, 1.4)
5	132.2	7.38, td(8.4, 1.4)	5	124.0	7.07, td(7.7, 1.4)
6	123.8	7.06, t(7.7)	6	132.5	7.37, m
7	132.4	7.98, d(7.7)	7	120.6	8.38, dd(7.7, 1.4)
L-allo-Ile			L-Leu		
1	171.8		1	170.5	
2	55.5	4.29, d(4.9)	2	54.4	4.18, dd(11.9, 3.5)
3	37.2	1.29, m	3	41.0	1.62, m
4	13.8	0.63, d(6.3)			1.38, dd(11.9, 2.8)
5	26.8	1.24, m	4	25.0	0.65, m
6	12.1	0.83, t(7.0)	5	23.7	0.74, d(6.3)
N-Me-D-Phe			5'	21.4	0.67, d(4.2)
2	58.0	5.73, s	N-Me-D-Phe		
3	35.1	3.09, m	1	170.3	
		3.19, dd(14.0, 5.6)	2	64.1	3.97, dd(11.9, 4.2)
4	138.0		3	35.9	3.02, t(4.9)
5,9	130.3	7.28, (overlapped)			3.13, dd(14.0, 7.0)
6,8	129.6	7.28, (overlapped)	4	136.0	
7	127.9	7.21, m	5,9	130.5	7.34, m
N-CH ₃	31.3	2.97, s	6,8	130.0	7.27, m
L-Val			7	128.5	7.29, m
2	62.4	4.05, s	N-CH ₃	31.7	2.86, s
3	31.3	1.49, m			
4	18.0	1.05, m			
		0.96, t(7.0)			
5	19.8	0.96, t(7.0)			

化合物 5 白色固体; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 700 MHz) δ : 5.67 (1H, d, $J = 0.7$ Hz, H-2), 5.28 (1H, dd, $J = 16.4, 7.7$ Hz, H-16), 5.22 (1H, dd, $J = 16.4, 8.4$ Hz, H-15), 2.67 (1H, dd, $J = 11.9, 7.0$ Hz, H-8), 2.23 (1H, dt, $J = 14.0, 3.5$ Hz, H-5a), 2.09 (1H, m, H-13), 1.98 (1H, ddd, $J = 14.0, 4.2, 2.1$ Hz, H-6a), 1.93 (1H, m, H-10a), 1.87 (1H, m, H-17), 1.81 (1H, td, $J = 14.0, 4.2$ Hz, H-5b), 1.71 (1H, m, H-9a), 1.61 (1H, m, H-9b), 1.61 (1H, m, H-6b), 1.52 (1H, m, H-18), 1.50 (1H, m, H-11), 1.48 (1H, m, H-10b), 1.07 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-14), 0.96 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 0.88 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-20), 0.86 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-19), 0.65 (3H, s, H-12); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 175 MHz) δ : 173.6 (C-1), 136.4 (C-15), 133.8 (C-16), 36.5 (C-5), 36.2 (C-6), 56.7 (C-11), 51.7 (C-8), 49.9 (C-7), 44.3 (C-17), 41.6 (C-13), 34.4 (C-18), 30.1 (C-10), 22.3 (C-9), 21.6 (C-14), 20.5 (C-20), 20.1 (C-19), 18.2 (C-21), 12.1 (C-12)。以上核磁数据与文献^[15]对照基本一致,故鉴定该化合物为 4-羟基-17R-甲基降甾醇。

化合物 6 浅黄色固体; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 700 MHz) δ : 7.42 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-4), 7.39 (1H, m, H-2), 7.24 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.98 (1H, dd, $J = 7.7, 2.1$ Hz, H-6), 3.86 (3H, s, OCH_3), 2.66 (2H, s, H-7); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 175 MHz) δ : 168.8 (C-8), 160.1 (C-3), 132.4 (C-1), 130.5 (C-6), 121.8 (C-5), 120.8 (C-4), 117.5 (C-2), 52.5 (OCH_3), 40.4 (C-7)。以上核磁数据与文献^[17]对照后鉴定该化合物为 3-羟基苯乙酸甲酯。

化合物 7 透明油状物; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.71 (2H, dd, $J = 5.6, 3.5$ Hz, H-3, 6), 7.60 (2H, dd, $J = 5.6, 3.5$ Hz, H-4, 5), 4.29 (4H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2', 2''), 1.72 (4H, m, H-3', 3''), 1.45 (4H, m, H-4', 4''), 0.98 (6H, t, $J = 7.0$ Hz, H-5', 5''), 以上核磁数据与文献^[18]进行对照,鉴定该化合物为邻苯二甲酸二丁酯。

3 讨论与结论

本论文对分离自越前水母组织的真菌 *Aspergillus fumigatus* 的次级代谢产物进行了分离和鉴定,从中共获得 7 个化合物,其中化合物 1~7 均为首次从越前水母来源的烟曲霉属中分离得到。据文献报道化合物 1 对五种植物病原真菌(薯蓣炭疽病菌、芒

果炭疽病菌、橡胶炭疽病菌、水稻稻瘟菌及香蕉枯萎病菌)有较好的抑制活性^[8]。化合物 2 对人白血病 HL-60 或 K562 细胞系有细胞毒性^[7]。化合物 3 具有 MptpB 非竞争性抑制活性,其 IC_{50} 值为 $35.0 \mu\text{M}$ ^[8]。化合物 5 对人体肿瘤细胞有很好的细胞毒性^[15]。目前为止,对越前水母来源真菌的研究甚少,本论文丰富了越前水母来源真菌活性次级代谢产物的多样性,也为后续药物先导化合物的发现和 研究提供了参考。

参考文献

- Horiguchi K, Suzuki Y, Sassa T. Biosynthetic study of chloromonilicin, a growth self-inhibitor having a novel lactone ring, from *Monilinia fructicola* [J]. J Agr Food Chem, 1989, 53: 2141-2145.
- Xu ZY, Feng Z, Xu J. Research advances on antimicrobial activities of microbes derived from mangrove [J]. J Antibiot, 2017, 42: 241-254.
- Zeng Q, Zhong WM, Wang FZ. Secondary metabolites isolated from deep-sea-derived fungi [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 501-514.
- Zhang SW, Huang HB, Gui C, et al. Progress on the research and development of marine drugs [J]. Chin J Mar Drug (中国海洋药物), 2018, 37(3): 77-92.
- Jin LM, Quan CS, Hou XY, et al. Potential pharmacological resources: natural bioactive compounds from marine-derived fungi [J]. Mar Drugs, 2016, 14(4): 76.
- Tomoo H, Kazutaka F, Kayoko T, et al. Three pyrrolooctatetraenyl- α -pyrones from *Auxarthron conjugatum* [J]. Phytochemistry, 1999, 52: 459-463.
- Liang X, Zhang XY, Nong XH, et al. Eight linear peptides from the deep-sea-derived fungus *Simplicillium obclavatum* EIODSF 020 [J]. Tetrahedron, 2016, 72: 3092-3097.
- Dai Y, Lin Y, Pang XY, et al. Peptides from the soft coral-associated fungus *Simplicillium* sp. SCSIO41209 [J]. Phytochemistry, 2018, 154: 56-62.
- Iwasaki A, Shiota I, Sumimoto S, et al. Kohamamides A, B, and C, cyclic depsipeptides from an *Okeania* sp. marine cyanobacterium [J]. J Nat Prod, 2017, 80: 1948-1952.
- Tareq FS, Shin HJ. Bacilotetrins A and B, anti-staphylococcal cyclic-lipotetrapeptides from a marine-derived *Bacillus subtilis* [J]. J Nat Prod, 2017, 80: 2889-2892.
- Yang B, Tao HM, Lin XP, et al. Prenylated indole alkaloids and chromone derivatives from the fungus *Penicillium* sp. SC-SIO041218 [J]. Tetrahedron, 2018, 74(1): 77-82.
- Luo XW, Chen CM, Tao HM, et al. Structurally diverse dike-

- topiperazine alkaloids from the marine-derived fungus; *Aspergillus versicolor* SCSIO 41016 [J]. *Org Chem Front*, 2019, 6: 736-740.
- 13 Guo C, Wang P, Lin XP, et al. Phloroglucinol heterodimers and bis-indolyl alkaloids from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO 41018 [J]. *Org Chem Front*, 2019, 6: 3053-3059.
- 14 Wang JF, Cong ZW, Huang XL, et al. Soliseptide A, a cyclic hexapeptide possessing piperazic acid groups from *Streptomyces solisilvae* HNM30702 [J]. *Org Lett*, 2018, 20: 1371-1374.
- 15 Mansoor TA, Hong J, Lee CO, et al. Cytotoxic sterol derivatives from a marine sponge *Homaxinella* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68: 331-336.
- 16 Falck JR, Reddy LM, Byun K, et al. Epoxygenase eicosanoids: synthesis of tetrahydrofuran-diol metabolites and their vasoactivity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 2634-2638.
- 17 Wang JT, Ma ZH, Wang GK, et al. Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Alternaria alternata* from *Paeonia lactiflora* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2019, 50: 1061-1065.
- 18 Chen A, Tian JK, Cheng YY. Studies on the chemical constituents from radix ranunculi ternate [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2005, 40: 1373-1375.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	陈益华	林昌俊	欧阳杰	易华西
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi
罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚	高慧敏
LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin
唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武	蓝蔚青
TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu	LAN Weiqing
廖晨钟	薛永波				
LIAO Chenzhong	XUE Yongbo				