

内生真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 代谢产物 β -咔啉生物碱及其黄嘌呤氧化酶抑制活性研究

周继慧¹, 闫鑫磊¹, 田梦¹, 李慧¹, 刘朝霞¹, 刘呈雄^{1,2*}, 邹坤^{1*}

¹三峡大学生物与制药学院, 天然产物研究与利用湖北省重点实验室;

²三峡大学生物与制药学院, 中国轻工业功能酵母重点实验室, 宜昌 443002

摘要:本研究通过前体介导调控一株内生真菌的次级代谢产物, 采用正相硅胶柱色谱和制备型 HPLC 等方法分离纯化, 利用 NMR、MS 等波谱学方法鉴定化合物结构, 从中分离鉴定了 10 个生物碱类化合物, 鉴定结果为: 川芎唞(1)、1-(1', 2'-二脱氧- α -D-核吡喃糖基)- β -咔啉(2)、flazin(3)、tangutorid E(4)、1-乙酰基- β -咔啉(5)、4-(9H- β -carbolin-1-yl)-4-oxobutyric acid(6)、1-(furan-2-yl)-9H-pyrindo[3, 4-b] indole(7)、indole-3-ethanol(8)、indole-3-acetic acid(9) 和 indole-3-carboxaldehyde(10)。化合物 1~10 均为首次从该属菌株中分离得到, 其中 7 个 β -咔啉生物碱; 对 10 个生物碱进行了黄嘌呤氧化酶抑制活性测试, 结果显示 7 个化合物具有明显的抑制活性, IC₅₀ 值的范围在 0.68~9.30 mM 之间, 且化合物 2、3 和 6 的抑制活性优于阳性药。

关键词:内生真菌; 前体介导; 结构鉴定; β -咔啉生物碱; 黄嘌呤氧化酶

中图分类号: R914.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)1-0041-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.1.006

Study on β -carboline alkaloids produced by endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense* and their xanthine oxidase inhibitory activity

ZHOU Ji-hui¹, YAN Xin-lei¹, TIAN Meng¹, LI Hui¹, LIU Zhao-xia¹, LIU Cheng-xiong^{1,2*}, ZOU Kun^{1*}

¹Hubei Provincial Key Laboratory of Natural Products Research and Utilization, College of Biology and Pharmaceuticals, China Three Gorges University;

²College of Biology and Pharmaceuticals, China Three Gorges University, Key Laboratory of Functional Yeast for Light Industry of China, Yichang 443002, China

Abstract: In this study, the secondary metabolites of an endophytic fungus were regulated by precursor mediated regulation. To study the secondary metabolites, various chromatographic techniques, including normal phase silica gel column chromatography and preparative HPLC were used. Their structures were determined by various spectroscopic data, such as NMR and MS. Finally, 10 alkaloids were isolated from *P. brasiliense* and their structures were identified as perlolyrine (1), 1-(1', 2'-dideoxy- α -D-nucleopyranosyl)- β -carbamate porphyrin (2), flazin (3), tangutorid E (4), 1-acetyl- β -carboline (5), 4-(9H- β -carbolin-1-yl)-4-oxobutyric acid (6), 1-(furan-2-yl)-9H-pyrindo[3, 4-b] indole (7), indole-3-ethanol (8), indole-3-acetic acid (9), and indole-3-carboxaldehyde (10). All the 10 alkaloids were isolated from this genus of *Paraconiothyrium* sp. for the first time. Among them, 7 compounds were β -carboline alkaloids. In addition, the xanthine oxidase inhibitory activity was tested for compounds 1-10. The results showed that 7 compounds had significant inhibitory activity, and the IC₅₀ value ranged from 0.68 to 9.30 mM. It was worth noting that the inhibitory activities of compounds 2, 3 and 6 were better than that of positive drug.

Key words: endophytic fungi; precursor mediated; structural identification; β -carboline alkaloids; xanthine oxidase

川芎唞(川芎Ⅲ号碱, perlolyrine)是中药川芎的有效活性 β -咔啉生物碱之一, 具有很强的药理活

收稿日期: 2020-06-22

接受日期: 2020-11-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81803383); 三峡大学研究生学位论文培优基金(2020SSPY145)

* 通信作者 Tel: 86-717-6397478; E-mail: liuchengxiong666@126.com, kzou@ctgu.edu.cn

性,对冠心病和脑血管病有一定的疗效,但在体内代谢迅速、排泄较快、生物利用度低及药效维持时间较短,经化学改造后的川芎嗪类似物在抗血小板聚集和体外抗血栓形成作用明显强于川芎嗪和川芎嗪,且作用时间明显延长^[1-4],然而植物来源的川芎嗪含量较少且其类似物种类较少,且目前为止,微生物来源的川芎嗪,非常罕见,只有 *Jishengella endophytica*^[5] 和真菌 *Fusarium equiseti*^[6]、*Trametes troglitii*^[7] 能产川芎嗪。因此,有必要通过各种有效途径获取川芎嗪类似物,研究其构效关系和作用机制,从中筛选出高效、低毒、作用时间长的治疗心血管疾病的新型药物。

本课题组前期从中华剑角蝗肠道中分得一株类壳小圆孢真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* (*P. brasiliense*),经发酵后分离,首次发现该真菌可生产天然川芎嗪^[8,9],但其产量很低,本课题通过前体添加介导该株真菌的次级代谢产物调节,结果使得川芎嗪的产量得到明显提高,且生成了 10 个 β -咪啉生物碱,文献报道化合物 3 具有较强的黄嘌呤氧化酶抑制活性^[10],近年来,从动物实验到人体研究都证实了黄嘌呤氧化酶与心血管疾病密切相关,黄嘌呤氧化酶抑制剂可应用于多种心血管疾病的治疗^[11]。本研究通过测定 10 个所分离的生物碱对黄嘌呤氧化酶的抑制活性,以别嘌呤醇作为阳性药,选择出抑制活性较好的化合物,研究其构效关系,对于川芎嗪及其类似物的产量和种类提供了思路,并为开发出具有优良利用价值的黄嘌呤氧化酶抑制剂提供了参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Bruker AV 400 MHz 核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司);Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司);Waters 1525EF 高效液相色谱(美国 Waters 公司);Venusil XBP C₁₈ 色谱柱(250 mm × 10 mm, 10 μ m, 半制备型;250 mm × 4.6 mm, 5 μ m, 分析型,天津博纳艾杰尔科技有限公司);低温冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);正相色谱硅胶(烟台化学工业研究所);电子天平(上海民桥精密仪器有限公司);紫外分光光度计(上海谱元仪器有限公司);黄嘌呤氧化酶(signa);别嘌呤醇(Ruibio);黄嘌呤氧化酶试剂盒(南京建成生物工程研究所);高效液相用乙腈、甲醇均为色谱纯(美国 Tedia 公司),水为三蒸水;其他试剂均为分析纯(国药集团化学

试剂有限公司)。

1.2 菌种与材料

本实验室前期从中华剑角蝗肠道中分得一株类壳小圆孢真菌 *Paraconiothyrium brasiliense* (*P. brasiliense*, Genbank Accession No. KM880019),经发酵后分离,首次发现该真菌可生产天然川芎嗪(已授权中国发明专利,专利号:ZL201610408151.X)。

PDA 培养基(g/L):新鲜的去皮马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 20.0 g,自然 pH,0.1 MPa,灭菌 20 min。

PDB 培养基(g/L):新鲜的去皮马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,自然 pH,0.1 MPa,灭菌 20 min。

2 实验方法

2.1 发酵、提取和分离

将采用 PDA 培养基活化好的菌种接种于 PDB 培养基,在 28 $^{\circ}$ C, 180 rpm 条件下分批次加入终浓度为 1.0 mM 的前体 L-色氨酸,继续培养 20 天后收集发酵液和菌丝体,采用乙酸乙酯萃取发酵液 3 次,菌丝体在 45 $^{\circ}$ C 条件下烘干,加入丙酮浸泡过夜,超声(45 $^{\circ}$ C, 60 W)提取 30 min,反复提取 3 次,合并所有浸提物总重量为 15 g。总提取物进行正相硅胶(200~300 目)柱层析分离,采用氯仿-甲醇=20:1(体积比)横梯度洗脱,共得到 50 个流份。进行 TLC 检测,展开体系为:氯仿-甲醇=15:1(体积比),在 365 nm 紫外灯下观察荧光,再用改良碘化必钾喷雾显色,观察有无橙色斑点,经 TLC 检测发现第 25 个到第 30 个流份,共 6 个流份中具有紫外 365 nm 荧光显色和改良碘化必钾喷雾显橙色的斑点,合并这 6 个流份。合并后经制备型和半制备型高效液相(HPLC)反复精制纯化。最终分离得到化合物 1(200 mg)、2(3.0 mg)、3(2.5 mg)、4(3.1 mg)、5(3.4 mg)、6(3.6 mg)、7(3.3 mg)、8(3.4 mg)、9(2.0 mg)、10(2.3 mg)。化合物结构均采用质谱(MS)、核磁共振(NMR)波谱方法鉴定,并与文献对照确定化合物 1~10 的结构。

2.2 黄嘌呤氧化酶抑制活性

为了评价化合物 1~10 对黄嘌呤氧化酶的抑制作用,采用黄嘌呤氧化酶试剂盒筛选出对黄嘌呤氧化酶具有良好抑制作用的化合物。黄嘌呤氧化酶试剂盒法:测定黄嘌呤氧化酶的全酶活性,配制相同浓度梯度的别嘌呤醇和化合物溶液,实验设置实验组和空白组,实验组加入 25 μ L 样品溶液及 25 μ L 黄嘌呤氧化酶溶液,空白组以等体积的 PBS 代替黄嘌呤

呤氧化酶,加入 25 μ L 样品溶液及 25 μ L PBS,按照试剂盒操作依次加入试剂一至试剂四,混匀,37 $^{\circ}$ C 避光反应 20 min,加入 1 mL 终止反应液,混匀,530 nm 处测定吸光度(OD 值),平行操作三次,以平均值作为最后结果。抑制率的计算公式为:抑制率 = $(1 - \frac{OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{空白组}}}) \times 100\%$,采用 SPSS19.0 计算半数抑制浓度 IC_{50} 。

3 实验结果

3.1 化合物的结构鉴定

采用前体介导调控技术,以 *L*-色氨酸作为前体添加后,川芎喹的含量显著提高,且通过 TLC 365 nm 显色和生物碱显色反应以及 HPLC DAD 紫外扫描,发现一系列与川芎喹紫外吸收类似的峰如图 1 所示,最终分离得到 10 个化合物如图 1 所示。

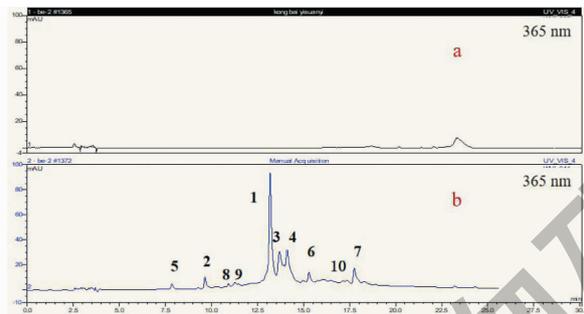


图 1 添加 *L*-色氨酸后菌株发酵液 HPLC 分析

Fig. 1 The HPLC analysis of fermentation broth of *L*-tryptophan added into the strain

注:a:未添加 *L*-色氨酸;b:添加 *L*-色氨酸。Note:a:No *L*-tryptophan added,b:*L*-tryptophan added.

化合物 1 淡黄色针状晶体;mp. 185 ~ 187 $^{\circ}$ C; UV $\lambda_{\text{max}} = 237, 252, 275, 292, 364, 378$ nm; EI-MS: m/z 264 $[M]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.30(1H, s, H-9), 8.36(1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-3), 8.26(1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 8.07(1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-4), 7.79(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 7.59(1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7), 7.28(1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-6), 7.20(1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-3'), 6.58(1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-4'), 4.65(2H, s, H-6'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 156.7(C-2'), 152.1(C-5'), 140.9(C-1), 138.2(C-3), 133.1(C-8a), 130.5(C-4b), 129.4(C-6), 128.4(C-9a), 121.6(C-5), 120.6(C-4a), 119.7(C-7), 113.6(C-4), 112.5(C-3'), 109.6(C-4'), 109.0(C-8), 55.9(C-6')。该化合物

由苯环、吡啶环和咪唑环构成,经查阅文献,该化合物的碳谱和氢谱数据与文献^[13]报道数据一致,故鉴定该化合物为川芎喹。

化合物 2 淡黄色粉末;mp. 190 ~ 191 $^{\circ}$ C; UV $\lambda_{\text{max}} = 237, 252, 275, 292, 364, 378$ nm; EI-MS: m/z 284 $[M]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.51(1H, s, H-9), 8.24(1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-3), 8.20(1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 8.00(1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-4), 7.70(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 7.52(1H, ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.0$ Hz, H-7), 7.22(1H, ddd, $J = 7.8, 7.2, 0.5$ Hz, H-6), 5.32(1H, br t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 3.56(1H, ddd, $J = 9.2, 5.6, 2.8$ Hz, H-3'), 3.51(1H, m, H-5a'), 3.33(1H, m, H-4'), 3.33(1H, m, H-5b'), 2.30(1H, ddd, $J = 14.0, 6.3, 2.8$ Hz, H-2a'), 1.98(1H, ddd, $J = 14.0, 9.2, 7.5$ Hz, H-2b'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 148.0(C-1), 140.6(C-8a), 136.5(C-3), 132.8(C-9a), 128.2(C-4a), 127.8(C-7), 121.4(C-5), 120.5(C-4b), 119.0(C-6), 113.5(C-4), 112.4(C-8), 75.0(C-4'), 72.0(C-1'), 70.2(C-3'), 63.1(C-5'), 39.4(C-2')。该化合物由苯环、吡啶环和 1',2'-二去氧吡喃核糖构成,经查阅文献,该化合物的碳谱和氢谱数据与文献^[14]报道数据一致,故鉴定该化合物为 1-(1',2'-dideoxy- α -*D*-ribofuranosyl)- β -carboline。

化合物 3 淡黄色粉末;mp. 231 ~ 233 $^{\circ}$ C; UV $\lambda_{\text{max}} = 217, 275, 364, 378$ nm; EI-MS: m/z 308 $[M]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.68(1H, s, H-9), 8.85(1H, s, H-4), 8.43(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.83(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 7.67(1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-7), 7.44(1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-4'), 7.37(1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 6.64(1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-3'), 4.67(2H, s, H-6'); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 167.3(C-7'), 158.6(C-2'), 151.5(C-5'), 141.9(C-8a), 132.9(C-1), 132.3(C-9a), 130.3(C-3), 129.4(C-7), 122.4(C-5), 121.4(C-4b), 121.0(C-4a), 119.3(C-6), 116.1(C-4), 113.3(C-8), 111.5(C-4'), 109.7(C-3'), 56.4(C-6')。该化合物的碳谱和氢谱数据与文献^[15]报道数据一致,故鉴定该化合物为 flazin。

化合物 4 淡黄色粉末;mp. 225 ~ 227 $^{\circ}$ C; UV $\lambda_{\text{max}} = 238, 254, 272, 295, 366, 375$ nm; EI-MS: m/z 302 $[M]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.45(1H, s, H-9), 8.24(1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-3), 8.21

(1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 8.00 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-4), 7.71 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-8), 7.52 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7), 7.22 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-6), 5.30 (1H, m, H-1'), 3.51 (1H, m, H-3'), 3.48 (1H, overlapped, H-5'a), 3.34 (1H, overlapped, H-5'b), 3.33 (1H, m, H-4'), 3.31 (1H, m, H-2'a), 1.97 (1H, m, H-2'b); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 148.4 (C-1), 141.0 (C-8a), 137.0 (C-3), 133.1 (C-9a), 128.7 (C-4a), 128.2 (C-7), 121.8 (C-5), 120.9 (C-4b), 119.4 (C-6), 114.0 (C-4), 113.0 (C-8), 75.5 (C-4'), 72.6 (C-1'), 70.6 (C-3'), 63.9 (C-5'), 40.9 (C-2'). 该化合物的碳谱和氢谱数据与文献^[16,17]报道数据一致,故鉴定该化合物为 tangutorid E。

化合物 5 淡黄色粉末; mp. 202 ~ 204 °C; UV $\lambda_{\text{max}} = 260, 282, 305, 380$ nm; EI-MS: m/z 210 $[\text{M}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.90 (1H, s, H-9), 8.50 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-3), 8.42 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-4), 8.30 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.60 (1H, ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.0$ Hz, H-7), 7.30 (1H, ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.0$ Hz, H-6), 2.80 (3H, s, H-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 201.9 (C-1'), 142.3 (C-1), 137.8 (C-3), 136.2 (C-8a), 134.3 (C-9a), 131.3 (C-4b), 129.3 (C-6), 122.2 (C-5), 120.7 (C-4a), 120.3 (C-7), 120.0 (C-4), 113.5 (C-8), 26.4 (C-2'). 该化合物的碳谱和氢谱数据与文献^[18,19]报道数据一致,故鉴定该化合物为 1-acetyl- β -carboline。

化合物 6 淡黄色粉末; mp. 234 ~ 236 °C; UV $\lambda_{\text{max}} = 220, 282, 308, 380$ nm; EI-MS: m/z 268 $[\text{M}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.97 (1H, s, H-9), 8.52 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-3), 8.46 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-4), 8.32 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 7.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 7.61 (1H, m, H-7), 7.32 (1H, m, H-6), 3.53 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3'), 2.70 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H = 2'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 201.8 (C-4'), 173.8 (C-1'), 141.8 (C-1), 137.8 (C-3), 135.7 (C-8a), 133.9 (C-9a), 131.2 (C-4b), 129.3 (C-6), 122.2 (C-5), 120.6 (C-4a), 120.3 (C-7), 119.8 (C-4), 113.5 (C-8), 31.0 (C-3'), 29.4 (C-2'). 该化合物的碳谱和氢谱数据与文献^[20]报道数据一致,故鉴定该化合物为 4-(9H- β -carbolin-1-yl)-4-oxobutyric acid。

化合物 7 淡黄色粉末; mp. 127 ~ 129 °C; UV

$\lambda_{\text{max}} = 236, 253, 274, 292, 365, 378$ nm; EI-MS: m/z 234 $[\text{M}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.38 (1H, s, H-9), 8.46 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-3), 7.89 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-4), 8.15 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.58 (1H, m, H-6), 7.35 (1H, m, H-7), 7.33 (1H, overlapped, H-8), 6.71 (1H, dd, $J = 3.4, 1.7$ Hz, H-3'), 7.64 (1H, m, H-4'), 7.74 (1H, m, H-5'); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 154.6 (C-2'), 142.8 (C-5'), 140.4 (C-1), 138.9 (C-3), 133.3 (C-8a), 131.4 (C-4b), 130.3 (C-9a), 128.6 (C-6), 121.7 (C-5), 121.2 (C-4a), 120.1 (C-7), 113.7 (C-4), 112.4 (C-3'), 111.5 (C-4'), 108.7 (C-8)。经查阅文献^[21,22], 鉴定该化合物 7 为 1-(furan-2-yl)-9H-pyrido[3,4-b]indole。

化合物 8 淡黄色粉末; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.80 (1H, s, -NH), 7.52 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-4), 7.33 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.14 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.06 (1H, m, H-6), 6.97 (1H, m, H-5), 3.65 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2'), 2.85 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-1'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 136.6 (C-7a), 127.7 (C-3a), 123.2 (C-2), 121.2 (C-6), 118.8 (C-5), 118.6 (C-4), 112.0 (C-7), 111.7 (C-3), 62.2 (C-2'), 29.3 (C-1')。通过分析化合物 8 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱, 该化合物为一个吲哚类生物碱, 经查阅文献^[23], 鉴定该化合物为 indole-3-ethanol。

化合物 9 淡黄色粉末; 分子式: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$, mp. 163 ~ 165 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.90 (1H, s, -NH), 7.51 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-4), 7.35 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.23 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.09 (1H, m, H-6), 6.99 (1H, m, H-5), 3.64 (2H, s, H-1'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.8 (C-2'), 136.6 (C-7a), 127.9 (C-3a), 123.2 (C-2), 121.2 (C-6), 118.8 (C-5), 118.6 (C-4), 112.0 (C-7), 108.3 (C-3), 31.6 (C-1')。通过分析化合物 9 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱, 该化合物为一个吲哚类生物碱, 经查阅文献^[24], 鉴定该化合物为 indole-3-acetic acid。

化合物 10 淡黄色粉末; 分子式: $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$, EI-MS: m/z 145 $[\text{M}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.94 (1H, s, -NH), 8.29 (1H, s, H-2), 8.10 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-4), 7.53 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7), 7.27 (1H, td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, H-6), 7.23 (1H, td, $J =$

7.5, 1.3 Hz, H-5); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 185.4 (C-1'), 139.0 (C-7a), 137.7 (C-2), 124.7 (C-3a), 121.3 (C-4), 118.6 (C-3), 123.9 (C-6), 122.5 (C-5), 112.9 (C-7)。通过分析化合物 **10** 的 ^1H

NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱, 该化合物为一个吲哚类生物碱, 经查阅文献^[25], 鉴定该化合物为 indole-3-carboxaldehyde。

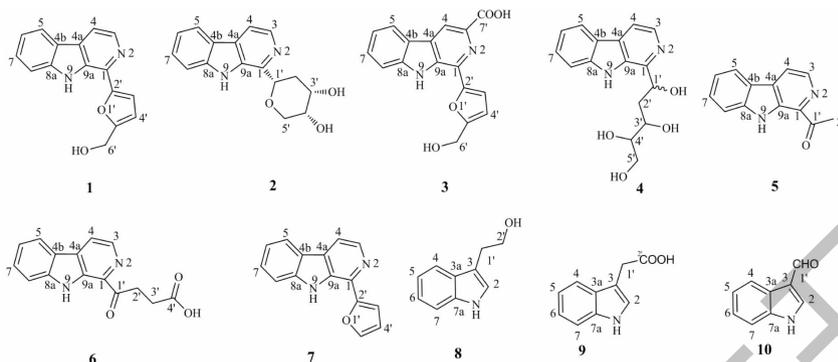


图2 化合物 1~10 的结构

Fig. 2 The chemical structures of compounds 1-10

3.2 黄嘌呤氧化酶抑制实验结果

对化合物 **1**~**10** 进行抑酶活性筛选, 通过测试酶反应后与显色剂生成的紫色化合物吸光度的大小可间接反应黄嘌呤氧化酶的活性, 紫色化合物吸光度越大, 酶活性越强。不同浓度的别嘌呤醇作为阳性药对黄嘌呤氧化酶抑制作用的测试结果如表 1 所示, 其半数抑制浓度为 1.61 mM, 与文献^[12,26]报道

数据较一致, 具有一定重复性和参考价值。10 个化合物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的测定结果如表 2 所示, 其中 7 个化合物具有不同程度的抑制作用, 化合物 **2, 3** 和 **6** 对黄嘌呤氧化酶的半数抑制浓度最小, 分别为 0.90、0.98 和 0.68 mM, 且明显好于别嘌呤醇。与川芎啉(化合物 **1**) ($\text{IC}_{50} = 2.84$ mM) 的活性相比, 4 个川芎啉类似物(化合物 **2~4, 6**) 的抑制作用更佳。

表 1 别嘌呤醇对黄嘌呤氧化酶的抑制作用结果 ($n = 3$)

Table 1 The inhibitory of allopurinol effect on xanthine oxidase ($n = 3$)

别嘌呤醇浓度 Allopurinol concentration (mg/mL)	OD 值 OD value	抑制率 Inhibition rate (%)	IC_{50} (mM)
0	1.872 ± 0.02 **	-	-
0.4	0.704 ± 0.02 **	62.39	
0.2	0.976 ± 0.04 **	47.86	
0.1	1.184 ± 0.03 **	36.75	1.61
0.05	1.542 ± 0.08 **	17.63	
0.025	1.665 ± 0.06 **	10.96	

注: 与空白对照组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

4 讨论与结论

微生物来源的天然产物与植物来源相比具有明显的优势, 具有生长周期短、可代谢调控、可规模化生产等特点。本课题菌株虽然可产生川芎啉, 但在发酵产物中含量很低。关于川芎啉的生物合成途径研究也未见报道, 如何通过菌株的代谢调控, 提高川芎啉或其类似物的产量, 是本课题继续开展的关键所在。查阅文献发现, 川芎啉化学合成中最重要的

一步是 *L*-色氨酸和 5-乙酰氧甲基糠醛通过 Pictet-Spengler (P-S) 反应的环化, 且 P-S 反应酶 (Pictet-Spenglerase) 是 β -咔啉类生物碱合成的关键酶^[27]。所以, 本课题通过对真菌进行前体介导从而完成次级代谢产物调控, 对提取物浸膏进行 LC-MS 分析, 发现其中含有大量生物碱, 分子量在 m/z 200 ~ 400 之间, 符合川芎啉类似物的分子量推测, 因此, 可以推测, *L*-色氨酸前体的加入, 激活了 β -咔啉类似物的

表2 不同浓度化合物1~10对黄嘌呤氧化酶的抑制率($n=3$)Table 2 Inhibition rate of compound 1~10 at different concentrations on xanthine oxidase ($n=3$)

化合物 Compound	抑制率 Inhibition rate (%)					IC ₅₀ (mM)
	0.025 mg/mL	0.05 mg/mL	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	
1	3.77	1.59	0.79	1.79	1.19	2.84
2	5.49	10.98	11.93	44.87	70.17	0.90
3	4.35	13.04	17.39	47.83	52.17	0.98
4	3.84	11.54	11.54	15.38	23.08	2.55
5	32.35	34.45	34.73	35.50	36.13	>10
6	0.78	2.08	4.17	22.40	26.04	0.68
7	3.85	6.92	7.69	12.31	15.38	9.30
8	2.67	4.15	4.75	6.53	7.12	>10
9	8.89	15.56	16.67	22.22	23.61	>10
10	1.53	4.59	11.01	27.83	30.09	4.01

沉默基因簇的表达,合成了大量的生物碱。本课题通过研究从中获得了10个生物碱类化合物,以上化合物均为首次从该属菌株中分离得到,其中7个 β -咔啉生物碱,6个川芎啉类似物,有针对性的提高了目的产物的产量和种类;对10个生物碱进行了黄嘌呤氧化酶抑制活性测试,结果显示7个化合物具有明显的抑制活性,IC₅₀值的范围在0.68~9.30 mM之间,化合物2、3和6的抑制作用效果明显,且优于阳性药。4个川芎啉类似物(化合物2~4、6)与川芎啉(化合物1)的活性相比,抑制作用更佳。Li等^[10]从酱油中也分离得到化合物3,生物活性筛选结果表明,化合物3具有较强的黄嘌呤氧化酶抑制活性(IC₅₀ = 0.51 ± 0.05 mM),与本文实验数据较一致,他们根据荧光猝灭和分子对接实验,发现化合物3能通过疏水作用力和氢键进入黄嘌呤氧化酶催化中心与氨基酸 Lys1045、Gln1194 和 Arg912 相互作用产生抑制活性;而且该化合物的ADME(吸收、分布、代谢、排泄)药物体内过程结果表明,其在体内具有良好的口服生物利用度;此外,该课题组^[28]还发现化合物3有较强的抗HIV活性(EC₅₀ = 2.36 μ M, TI = 12.1),经过结构修饰得到flazinamide后,发现其显示出很强的抗HIV-1活性(EC₅₀ = 0.38 μ M, TI = 312.0),现已进入临床前各项研究工作。另外有研究表明^[29],在四氢- β -咔啉的3位引入羧酸侧链,可提高其生物溶解度,使其具有更高的抗血栓活性及抗血小板聚集活性,而化合物3即为川芎啉

的3位羧酸化产物。结合以上文献报道,对化合物1~10的初步构效关系分析,可以看出, β -咔啉生物碱的3位羧酸化(化合物3),及1位侧链的羟基化(化合物2)或羧基化(化合物6),均能够有效提高黄嘌呤氧化酶抑制活性。近年来,从动物实验到人体研究都证实了黄嘌呤氧化酶与心血管疾病密切相关,黄嘌呤氧化酶抑制剂可应用于多种心血管疾病的治疗。本文的研究结果对于川芎啉及其类似物的产量和种类提供了思路,并为开发出具有优良利用价值的黄嘌呤氧化酶抑制剂提供了参考依据。

参考文献

- 1 Tang GH, Jiang GH, Zheng LF. Pharmacokinetics of perlolyrine in rats by stable isotope dilution in conjunction with GC-MS[J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 660-662.
- 2 Tang GH, Jiang GH, Zheng LF. Study on the pharmacokinetics of ligustrazine by stable isotope method[J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2001, 36(1): 45-47.
- 3 Tang GH, Tang XL, Jiang GH. The effect of ligustrazine and its analogues on platelet aggregation and experimental thrombosis[J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2001, 17: 333-336.
- 4 Tang GH, Jiang GH, Wang SZ, et al. Antiplatelet and antithrombotic effects of ligustrazine and its analogues[J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2001, 15: 317-319.
- 5 Pei W, Fandong K, Jingjing W, et al. Alkaloids from the mangrove-derived actinomycete *Jishengella endophytica* 161111

- [J]. Mar Drugs, 2014, 12(1):477-490.
- 6 Hawas UW, Al-Farawati R, Abou El-Kassem LT, et al. Different culture metabolites of the red sea fungus *Fusarium equiseti* optimize the inhibition of hepatitis C virus NS3/4A protease(HCV PR) [J]. Mar Drugs, 2016, 14(10):190.
- 7 Bian XQ, Bai J, Sun K, et al. Trametramide A, a new pyridone alkaloid from the fungus *Trametes trogii* TGC-P-3 [J]. Magn Reson Chem, 2016, 54:773-776.
- 8 Liu CX, Wang L, Chen JF, et al. Paraconifuranones A-H, eight new furanone analogs from the insect-associated fungus *Paraconiothyrium brasiliense* MZ-1 [J]. Magn Reson Chem, 2015, 53:317-322.
- 9 Liu CX, Yu XQ, Guo ZY, et al. Structural elucidation and NMR spectral assignments of paraconifuranones I-M from the insect-associated fungus *Paraconiothyrium brasiliense* [J]. Magn Reson Chem, 2016, 54:916-921.
- 10 Li HP, Zhao MM, Su GW, et al. Effect of soy sauce on serum uric acid levels in hyperuricemic rats and identification of flazin as a potent xanthine oxidase inhibitor [J]. Agr Food Chem, 2016, 64:4725-4734.
- 11 Xiao J, She Q. Xanthine oxidase inhibitors and cardiovascular diseases [J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2008, 29:622-624.
- 12 Zhang X, Zhou Y, Guan J, et al. Inhibition of xanthine oxidase by extracts of 5 Chinese herbal medicines [J]. J Mount Agr Boil(山地农业生物学报), 2015, 34(4):51-54.
- 13 Wu TS, Shi LS, Kuo SC. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris* [J]. Phytochemistry, 1999, 50:1411-1415.
- 14 Dang PH, Nguyen NT, Nguyen HX, et al. α -Glucosidase inhibitors from the leaves of *Embelia ribes* [J]. Fitoterapia, 2015, 100(11):201-207.
- 15 Zhou H, Jian R, Kang J, et al. Anti-inflammatory effects of caper(*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals [J]. J Agr Food Chem, 2010, 58:12717-12721.
- 16 Zhao JQ, Wang YM, Yang YL, et al. Isolation and identification of antioxidant and α -glucosidase inhibitory compounds from fruit juice of *Nitraria tangutorum* [J]. Food Chem, 2017, 227:93-101.
- 17 Li FH, Wang HQ, Su XM, et al. Study on the chemical composition of n-butanol in *Moringa oleifera* leaves [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(1):114-118.
- 18 Zhao XJ, Wang HF, Zhao DQ, et al. Separation and identification of angelica chemical components [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2013, 30:182-185.
- 19 Zhou TS, Ye WC, Wang ZT, et al. β -Carboline alkaloids from *Hypodematium squamulosopilosum* [J]. Phytochemistry, 1998, 49:1807-1809.
- 20 Zou ZJ, Dong YS, Yang JS. A new β -Carboline alkaloid and a new derivate of isoferulic acid from *Anemone altaica* [J]. Chin Chem Lett, 2005, 16:1484-1486.
- 21 Knoch E, Baltus W. Model reactions of roast aroma formation: X. Amino acid-specific products after roasting of tryptophan with reducing sugars and sugar degradation products [J]. Food Chem, 1992, 44:243-250.
- 22 Dai JK, Dan WJ, Ren SY, et al. Design, synthesis and biological evaluations of quaternization harman analogues as potential antibacterial agents [J]. Eur J Med Chem, 2018, 160:23-36.
- 23 Liu YH, Jee H, Jung, Si Zhang. Indole alkaloids from a sponge *Sarcotragus* species [J]. Biochem Syst Ecol, 2006, 34:453-456.
- 24 Huang ZJ, Guo ZY, Yang RY, et al. Studies on alkaloid metabolites in endophytic fungus ZZ42 in the mangroves of the South China Sea [J]. Chin Med Mater(中药材), 2007, 30:939-941.
- 25 Gutierrez-Lugo MT, Woldemichael GM, Singh MP, et al. Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *Micromonospora* sp. P1068 [J]. Nat Prod Res, 2005, 19:645-652.
- 26 Zhang L, Wang YZ, Yu HL, et al. Effects of dentate acid on the activity of xanthine oxidase in hyperuricemia [J]. Biotic Res(生物资源) 2017, 39(2):102-107.
- 27 Stöckigt J, Antonchick A P, Wu F R, et al. The Pictet-Spengler reaction in nature and in organic chemistry [J]. Angew Chem Int Ed, 2011, 50:8538-8564.
- 28 Wang YH, Tang JG, Wang RR, et al. Flazinamide, a novel beta-carboline compound with anti-HIV actions [J]. Biochem Bioph Res Co, 2007, 355:1091-1095.
- 29 Tang JG, Wang YH, Wang RR, et al. Synthesis of analogues of flazin, in particular, flazinamide, as promising anti-HIV agents [J]. Chem Biodivers, 2008, 5:447-460.