

深海真菌 *Neorousoella* sp. 固体发酵物中 次生代谢产物及其生物活性研究

钟晋谦^{1,2}, 陈玉婵², 陈闪冲², 刘昭明², 刘洪新², 章卫民^{2*}, 严寒静^{1*}

¹广东药科大学中药学院, 广州 510006; ²广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070

摘要: 研究深海真菌 *Neorousoella* sp. FS526 的次生代谢产物及生物活性。采用硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱和高效液相等多种色谱技术对菌株 FS526 的固体发酵物中的次生代谢产物进行分离纯化, 并通过 NMR 等波谱方法鉴定化合物结构。从菌株 FS526 中共分离鉴定了 15 个化合物, 分别为 amestolkolide B (**1**)、thailandolide B (**2**)、aspergillumarins A 和 B (**3** 和 **4**)、de-*O*-methyldiaporthin (**5**)、4-(2-acetoxyethyl)phenol (**6**)、5,6,8-三羟基-4-(1'-羟乙基)异香豆素 (**7**)、sescandelin (**8**)、penicifuran A (**9**)、7-羟基-5-甲氧基-4,6-邻苯二甲酯 (**10**)、pestalotiolactone A (**11**)、2',4'-二羟基-6'-甲氧基-3'-甲基苯乙酮 (**12**)、1-(2,4-二羟基-6-甲氧基-3-甲基苯基)乙酮 (**13**)、2,5-二甲基间苯二酚 (**14**)、3,5-二羟基甲苯 (**15**)。所有化合物均为首次从该属真菌中分离得到。细胞毒和抗氧化活性测试表明化合物 **1** 具有较强的细胞毒活性, 其 IC₅₀ 值为 41.44 ~ 77.89 μM; 化合物 **7** 具有较强的抗氧化活性, 其 IC₅₀ 值为 13.93 μM。

关键词: 深海真菌; *Neorousoella* sp.; 次生代谢产物; 细胞毒活性; 抗氧化活性

中图分类号: R914.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)7-1165-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.7.011

Study on the secondary metabolites from the deep-sea-derived fungus *Neorousoella* sp. and their biological activities

ZHONG Jin-qian^{1,2}, CHEN Yu-chan², CHEN Shan-chong²,

LIU Zhao-ming², LIU Hong-xin², ZHANG Wei-min^{2*}, YAN Han-jing^{1*}

¹School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

²Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key

Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China

Abstract: The secondary metabolites of a deep-sea-derived fungus *Neorousoella* sp. FS526 and their biological activities were investigated. The solid fermentation extraction of strain FS526 was isolated and purified by silica gel column, Sephadex LH-20 gel column, and high performance liquid chromatography, which led to the isolation of fifteen known compounds. The chemical structures of the isolates were identified by spectrum analysis as amestolkolide B (**1**), thailandolide B (**2**), aspergillumarins A-B (**3** and **4**), de-*O*-methyldiaporthin (**5**), 4-(2-acetoxyethyl)phenol (**6**), 5,6,8-trihydroxy-4-(1'-hydroxyethyl)isocoumarin (**7**), sescandelin (**8**), penicifuran A (**9**), 7-hydroxy-5-methoxy-4,6-dimethylphthalide (**10**), pestalotiolactone A (**11**), 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3'-methylacetophenone (**12**), 1-(2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylphenyl)ethanone (**13**), 2,5-dimethylresorcinol (**14**), and 3,5-dihydroxytoluene (**15**). All the isolated compounds were firstly reported from the genus *Neorousoella*. Compound **1** showed weak cytotoxic activity with the IC₅₀ values of 41.44-77.89 μM, and compound **7** showed strong antioxidant activity with the IC₅₀ value of 13.93 μM.

Key words: deep-sea-derived fungus; *Neorousoella* sp.; secondary metabolites; cytotoxic activity; antioxidant activity

收稿日期: 2020-12-31 接受日期: 2021-03-19

基金项目: 广东省海洋经济发展专项([2020]042); 广东省自然科学基金团队项目(2016A030312014); 国家自然科学基金(41906106); 广东省特支计划(2019TQ05Y375)

* 通信作者 E-mail: wmzhang@gdim.cn

海洋微生物长期处于高盐、高压、低温、低光照及寡营养等极端环境下, 进化出了与陆生生物不同的代谢系统及防御机制, 因而产生的次生代谢产物具有高度的复杂性和多样性。海洋微生物源天然产

物种类极其丰富,几乎涵盖了所有天然产物的结构类型,并具有广泛的生物活性,是新型天然药物先导化合物的重要来源。对海洋微生物次生代谢产物进行研究,将能够发现化学结构新颖、生物活性显著的先导化合物,为新药研究与开发提供重要的模式结构和药物前体^[1-4]。

本课题组前期对我国南海(114°34'52"E,13°57'27"N)4 314 m 深处沉积物中的真菌进行了分离鉴定,获得了一株新型的海洋真菌 *Neorousoella* sp.。查阅文献发现,目前国内外尚未有关于其次生代谢产物研究的报道。通过对小量液体发酵获得的粗提取物进行 HPLC-MS 分析,发现其代谢产物十分丰富。基于此,我们利用正相硅胶柱、凝胶柱和高效液相色谱等多种色谱技术对该真菌进行了系统的化学成分研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

核磁共振波谱仪(AVANCE III 型 500 MHz 和 AVANCE III 型 600 MHz,瑞士 Bruker 公司);高效液相色谱仪(1220 Infinity II 制备型,美国 Agilent Technologies 公司);高效液相色谱仪(LC-20A 半制备型,日本岛津公司);YMC-pack ODS-AQ 制备柱(250 mm × 10 mm,5 μm);Phenomenex ACE 5 C₁₈-PFP 制备柱(250 mm × 10 mm,5 μm);Phenomenex MD(2)-RH 制备柱(250 mm × 10 mm,5 μm);Phenomenex Chiral MJ(2)制备柱(250 mm × 10 mm,5 μm);S-chiral A 制备柱(250 mm × 10 mm,5 μm);

Chiralpak IC 制备柱(250 mm × 10 mm,5 μm);旋转蒸发仪(OSB-2100 型,日本东京理化器械株式会社);大容量普通摇床(PZ1000B 旋转式,武汉瑞华仪器设备有限公司);柱色谱硅胶(200 ~ 300 目,山东青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20(18 ~ 110 μm,瑞典 Amersham Bioscience 公司);薄层层析硅胶板(HSGF254,烟台江友硅胶开发有限公司);石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇(分析纯,广州化学试剂厂);甲醇、乙腈、正己烷、异丙醇(色谱纯,美国 BCR 公司)。

1.2 菌株鉴定

菌株 FS526 分离自我国南海(114°34'52"E,13°57'27"N)4 314 m 深处的沉积物,通过液氮冻融法提取菌株的基因组 DNA,采用引物 ITS1 扩增其 rDNA ITS 区,并对产物进行测序;测序结果提交 GenBank,登录号为 MW255342。序列 blast 结果显示,菌株 FS526 与 *Neorousoella* sp. AP-2019(登录号为 MN556318.1)的相似度为 96.93%。下载相关种属 ITS 区序列,连同 FS526 序列,以 *Neoconiothyrium viticola*(登录号为 MN556318.1)为外群,运用 MEGA5.0 通过邻近法构建系统发育树(图 1)。在发育树中,菌株 FS526 与若干 *Neorousoella* 属的种类型聚为一个分支,彼此间遗传距离很小。通过系统学分析确定 FS526 为 *Neorousoella* sp.,菌种保藏于广东省微生物研究所。将该菌株接种于装有 PDA 培养基(含 3% 海盐)斜面上 27 °C 培养好后,置于 4 °C 冰箱保藏。

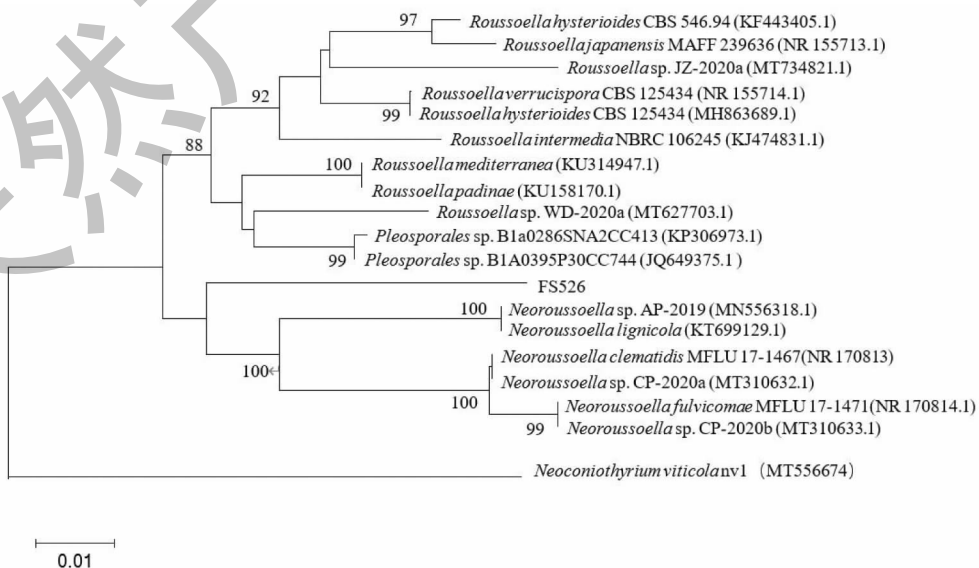


图 1 基于 *Neorousoella* sp. ITS rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Neorousoella* sp. based on ITS rDNA

1.3 发酵培养

在无菌条件下,将活化后的 *Neorousoella* sp. 菌体接种至装有马铃薯葡萄糖培养液(PDB)的锥形瓶中,在 28 ℃、120 rpm 的条件下振荡培养 5 天,获得种子液。将适量种子液转接到装有 9 g 海盐、250 g 大米、300 mL 水的 3 L 锥形瓶中,制作成大米固体培养基。室温下静置培养 30 天,共发酵大米 5 kg。

1.4 分离纯化

发酵结束后,培养基用乙酸乙酯提取 3 次,合并全部提取液,经旋蒸浓缩后得到棕红色提取物。浸膏进行硅胶柱层析(200 ~ 300 目),以石油醚-乙酸乙酯(体积比 10:1→1:1)和二氯甲烷-甲醇(体积比 10:1→0:1)溶剂系统进行梯度洗脱,并用薄层色谱(TLC)检测;合并相似组分,得到 12 个组分 Fr. 1 ~ 12。

Fr. 5 经 Sephadex LH-20 凝胶(二氯甲烷-甲醇体系,体积比为 50:50)得到 3 个亚组分 Fr. 5.1 ~ Fr. 5.3。Fr. 5.3 经硅胶柱(200 ~ 300 目,石油醚-乙酸乙酯体系,体积比为 10:1→1:1,梯度洗脱)得到 5 个组分 Fr. 5.3.1 ~ Fr. 5.3.5;其中 Fr. 5.3.1 为化合物 **10**(4.1 mg)。Fr. 5.3.3 经 Phenomenex Chiral MJ(2) 制备柱(正己烷-异丙醇体系,体积比为 80:20,2 mL/min)得到 Fr. 5.3.3.1 ~ Fr. 5.3.3.4。Fr. 5.3.3.4 经硅胶柱(200 ~ 300 目,石油醚-乙酸乙酯体系,体积比为 5:1,等度洗脱)得到化合物 **13**(14.4 mg)。Fr. 5.3.3.1 经 Phenomenex Chiral MJ(2) 制备柱(正己烷-异丙醇体系,体积比为 50:50,2 mL/min)得到化合物 **6**(0.7 mg)。

Fr. 6 经 Sephadex LH-20 凝胶(二氯甲烷-甲醇体系,体积比为 50:50)得到 4 个亚组分 Fr. 6.1 ~ Fr. 6.4。Fr. 6.2 经 Chiralpak IC 制备柱(正己烷-异丙醇体系,体积比 50:50,2 mL/min)得到 6 个组分 Fr. 6.2.1 ~ Fr. 6.2.6。Fr. 6.2.3 经 Chiralpak IC 制备柱(乙腈-水体系,体积比 50:50,2 mL/min)纯化得到化合物 **3**(11.1 mg),Fr. 6.2.6 经 Chiralpak IC 制备柱(乙腈-水体系,体积比 50:50,2 mL/min)纯化得到化合物 **1**(9.0 mg)。Fr. 6.3 经 Chiralpak IC 制备柱(正己烷-异丙醇体系,体积比 50:50,2 mL/min)得到 8 个组分 Fr. 6.3.1 ~ Fr. 6.3.8。Fr. 6.3.1 经两次 Sephadex LH-20 凝胶(二氯甲烷-甲醇体系,体积比为 50:50)后,再经 Chiralpak IC 制备柱(正己烷-异丙醇体系,体积比 80:20,2 mL/min)纯化得到化合物 **4**(6.9 mg),Fr. 6.3.3 经 Sephadex LH-20 凝

胶(二氯甲烷-甲醇体系,体积比为 50:50)与 YMC-pack ODS-AQ 制备柱(乙腈-水体系,体积比 70:30,2 mL/min),得到化合物 **11**(4.4 mg)。Fr. 6.3.6 经 Chiralpak IC 制备柱(乙腈-水体系,体积比 50:50,2 mL/min)纯化,得到化合物 **2**(4.9 mg)。Fr. 6.4 经硅胶柱(200 ~ 300 目,石油醚-乙酸乙酯体系,体积比为 8:1→1:1,梯度洗脱)分离,得到 6 个组分 Fr. 6.4.1 ~ Fr. 6.4.6。Fr. 6.4.1 经硅胶柱(200 ~ 300 目,石油醚-乙酸乙酯体系,体积比为 8:1→7:1,梯度洗脱)与 YMC-pack ODS-AQ 制备柱(甲醇-水体系,体积比 50:50,2 mL/min)纯化,得到化合物 **14**(1.9 mg)和组分 Fr. 6.4.1.1 与 Fr. 6.4.1.2。Fr. 6.4.1.1 通过 Phenomenex Chiral MJ(2) 制备柱(正己烷-异丙醇体系,体积比为 60:40,2 mL/min)纯化得到化合物 **15**(0.6 mg)。Fr. 6.4.1.2 通过 Phenomenex Chiral MJ(2) 制备柱(正己烷-异丙醇体系,体积比为 75:25,2 mL/min)与 Phenomenex MD(2)-RH 制备柱(乙腈-水体系,体积比为 40:60,2 mL/min)纯化,得到化合物 **12**(1.1 mg)。Fr. 6.4.2 经硅胶柱(200 ~ 300 目,石油醚-乙酸乙酯体系,体积比为 7:1→5:1,梯度洗脱)与 MC-pack ODS-AQ 制备柱(甲醇-水体系,体积比 75:25,2 mL/min)纯化,得到化合物 **7**(10.5 mg)。

Fr. 8 经正相硅胶柱(200 ~ 300 目)层析,溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯,体积比为 20:1→2:1,梯度洗脱,得到 3 个亚组分 Fr. 8.1 ~ 8.3。Fr. 8.3 经 Chiralpak IC 制备柱(正己烷-异丙醇体系,体积比 60:40,2 mL/min)得到化合物 **9**(25.1 mg)与粗组分 Fr. 8.3.1 ~ Fr. 8.3.6,Fr. 8.3.3 经 Chiralpak IC 制备柱(甲醇-水体系,体积比 50:50,2 mL/min)纯化,得到化合物 **8**(21.5 mg)和 **5**(9.8 mg)。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 **1** 白色固体;分子式 $C_{24}H_{26}O_8$ 。 1H NMR(600 MHz, CD_3OD) δ :6.38(1H, t, $J = 1.2$ Hz, H-14), 6.30(1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-22), 6.15(1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 4.20(1H, q, $J = 7.1$ Hz, H-9), 3.73(1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-11), 3.39(1H, dd, $J = 9.9, 5.4$ Hz, H-21), 3.26(1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-24 β), 2.91(1H, ddd, $J = 13.0, 4.7, 2.7$ Hz, H-5), 2.83(1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-24 α), 2.07(1H, dd, $J = 14.6, 4.6$ Hz, H-6 β), 1.66(3H, s, H-17), 1.66(3H, s, H-18), 1.58(1H, dd, $J = 14.6, 13.1$ Hz, H-

6 α), 1.35 (3H, s, H-23), 1.30 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-20), 1.22 (3H, d, $J = 1.5$ Hz, H-19); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 214.0 (C-10), 206.2 (C-13), 178.5 (C-8), 164.6 (C-1), 153.9 (C-3), 143.4 (C-15), 131.2 (C-14), 118.7 (C-2), 100.7 (C-22), 84.5 (C-16), 75.4 (C-9), 60.9 (C-4), 55.3 (C-24), 50.9 (C-12), 49.5 (C-11), 47.1 (C-21), 44.9 (C-7), 34.2 (C-5), 29.3 (C-6), 27.0 (C-18), 26.9 (C-17), 26.4 (C-23), 18.2 (C-20), 17.5 (C-19)。上述数据与文献报道^[5]基本一致,故鉴定化合物 1 为 amestolkolide B。

化合物 2 无色油状;分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 11.06 (1H, s, 4'-OH), 7.15 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-1), 6.51 (1H, s, H-5'), 6.16 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-7'), 5.99 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-2), 4.72 (1H, m, H-8'), 4.17 (1H, dd, $J = 8.9, 2.9$ Hz, H-7), 2.96 (1H, dd, $J = 15.5, 5.0$ Hz, H-11 β), 2.61 (1H, m, H-11 α), 2.26 (2H, overlapped, H-6 α , H-9), 2.18 (1H, overlapped, H-5), 2.17 (3H, s, 7'-Ac), 1.85 (1H, ddd, $J = 14.4, 14.0, 3.0$ Hz, H-6 β), 1.49 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-9'), 1.36 (3H, s, H-15), 1.27 (3H, s, H-12), 1.17 (3H, s, H-14), 1.15 (3H, s, H-13); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 203.9 (C-3), 170.8 (7'-Ac), 168.9 (C-10'), 162.5 (C-4'), 159.8 (C-6'), 156.2 (C-1), 136.0 (C-2'), 127.7 (C-2), 112.4 (C-3'), 106.5 (C-5'), 102.5 (C-1'), 79.9 (C-8), 76.2 (C-8'), 72.1 (C-7), 64.3 (C-7'), 44.9 (C-4), 42.6 (C-5), 42.1 (C-9), 38.6 (C-10), 27.8 (C-14), 27.6 (C-15), 26.8 (C-6), 21.7 (C-11), 21.6 (C-12), 21.5 (C-13), 20.9 (7'-Ac), 16.6 (C-9')。上述数据与文献报道^[6]基本一致,故鉴定化合物 2 为 thailandolide B。

化合物 3 红棕色固体;分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -28.4$ (c 0.1, MeOH)。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.46 (1H, dd, $J = 8.4, 7.4$ Hz, H-6), 6.85 (1H, dt, $J = 8.4, 0.9$ Hz, H-7), 6.80 (1H, dq, $J = 7.4, 1.0$ Hz, H-5), 4.63 (1H, m, H-3), 3.02 (1H, m, H-4 β), 2.96 (1H, m, H-4 α), 2.61 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-3'), 2.17 (3H, s, H-5'), 1.84 (2H, m, H-1'), 1.75 (2H, m, H-2'); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 211.3 (C-4'), 171.4 (C-1), 163.2 (C-8), 141.6 (C-10), 137.4 (C-6), 119.4 (C-5), 116.7 (C-7), 109.5 (C-9), 81.2 (C-3), 43.6 (C-3'), 35.1 (C-1'), 33.6

(C-4), 29.8 (C-5'), 20.2 (C-2')。上述数据与文献报道^[7]基本一致,故鉴定化合物 3 为 aspergillumarins A。

化合物 4 淡黄色固体;分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -15.6$ (c 0.1, MeOH)。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.46 (1H, dd, $J = 8.4, 7.4$ Hz, H-6), 6.85 (1H, dt, $J = 8.5, 1.0$ Hz, H-7), 6.80 (1H, dq, $J = 7.5, 1.0$ Hz, H-5), 4.63 (1H, m, H-3), 3.77 (1H, m, H-4'), 3.03 (1H, m, H-4 β), 2.97 (1H, m, H-4 α), 1.89 (1H, m, H-2' β), 1.77 (1H, m, H-2' α), 1.62 (2H, dq, $J = 8.9, 7.5$ Hz, H-1'), 1.51 (2H, m, H-3'), 1.19 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-5'); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 171.5 (C-1), 163.2 (C-8), 141.6 (C-10), 137.4 (C-6), 119.3 (C-5), 116.7 (C-7), 109.5 (C-9), 81.4 (C-3), 68.3 (C-4'), 39.8 (C-3'), 35.8 (C-2'), 33.7 (C-4), 23.5 (C-5'), 22.3 (C-1')。上述数据与文献报道^[7]基本一致,故鉴定化合物 4 为 aspergillumarins B。

化合物 5 红棕色晶体;分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.37 (1H, s, H-4), 6.31 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 6.30 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5), 4.15 (1H, m, H-2'), 2.58 (2H, m, H-1'), 1.26 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-3'); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.8 (C-1), 167.5 (C-8), 164.9 (C-6), 156.1 (C-3), 141.2 (C-10), 107.0 (C-4), 103.7 (C-7), 102.7 (C-5), 99.8 (C-9), 66.2 (C-2'), 43.8 (C-1'), 23.3 (C-3')。上述数据与文献报道^[8]基本一致,故鉴定化合物 5 为 de-O-methyldiaporthin。

化合物 6 红棕色固体;分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.08 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.77 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 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-2'); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 171.2 (C-1'), 154.4 (C-4), 130.2 (C-1), 130.1 (C-2, 6), 115.5 (C-3, 5), 65.3 (C-8), 34.4 (C-7), 21.1 (C-2')。上述数据与文献报道^[9]基本一致,故鉴定化合物 6 为 4-(2-乙氧基乙基)苯酚。

化合物 7 绿色晶体;分子式 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_6$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.26 (1H, s, H-3), 6.52 (1H, s, H-7), 4.99 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-9), 1.50 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 166.7 (C-1), 158.2 (C-8), 155.9 (C-6), 139.4 (C-3), 132.5 (C-5), 120.7 (C-4a), 119.8 (C-

4), 102.4 (C-7), 97.4 (C-8a), 66.5 (C-9), 22.0 (C-10)。上述数据与文献报道^[10]基本一致,故鉴定化合物**7**为5,6,8-三羟基-4-(1'-羟乙基)异香豆素。

化合物 8 无色晶体;分子式 $C_{11}H_{10}O_5$ 。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.36 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-3), 6.60 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 6.36 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-7), 4.88 (1H, m, H-9), 1.50 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.5 (C-1), 167.2 (C-6), 165.5 (C-8), 142.7 (C-3), 130.0 (C-4a), 123.4 (C-4), 103.1 (C-7), 102.4 (C-5), 100.4 (C-8a), 65.2 (C-9), 23.2 (C-10)。上述数据与文献报道^[11]基本一致,故鉴定化合物**8**为 *sescandelin*。

化合物 9 红棕色固体;分子式 $C_{11}H_{12}O_4$ 。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.56 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-4), 6.34 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 4.61 (2H, s, H-9), 3.92 (3H, s, H-10), 2.41 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 155.0 (C-5), 154.4 (C-2), 146.3 (C-7), 139.1 (C-7a), 132.0 (C-3a), 115.9 (C-3), 97.4 (C-4), 97.2 (C-6), 56.6 (C-10), 55.3 (C-9), 12.0 (C-8)。上述数据与文献报道^[12]基本一致,故鉴定化合物**9**为 *penicifuran A*。

化合物 10 红棕色固体;分子式 $C_{11}H_{12}O_4$ 。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.70 (1H, m, 7-OH), 5.20 (2H, s, H-3), 3.76 (3H, s, H-9), 2.20 (3H, s, H-8), 2.14 (3H, s, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.2 (C-1), 164.0 (C-5), 154.0 (C-7), 143.6 (C-3a), 118.7 (C-6), 116.6 (C-4), 106.3 (C-7a), 70.2 (C-3), 60.4 (C-9), 11.5 (C-8), 8.7 (C-10)。上述数据与文献报道^[13]基本一致,故鉴定化合物**10**为7-羟基-5-甲氧基-4,6-二甲基邻苯二甲酯。

化合物 11 黄色油状;分子式 $C_{10}H_{16}O_3$ 。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.96 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 2.98 (1H, qd, $J = 7.7, 5.1$ Hz, H-2), 2.62 (1H, td, $J = 8.2, 5.1$ Hz, H-3), 2.14 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-6 β), 1.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6 α), 1.87 (1H, m, H-4), 1.27 (3H, d, $J = 7.4$ Hz, H-8), 1.25 (3H, s, H-10), 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-9); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 186.2 (C-1), 81.4 (C-7), 79.7 (C-5), 51.4 (C-3), 58.0 (C-6), 45.3 (C-4), 36.3 (C-2), 25.8 (C-10), 19.0 (C-8), 8.5 (C-9)。上述数据与文献报道^[14]基本一致,故鉴定化合物**11**为 *pestalotioluteone A*。

化合物 12 黄色固体;分子式 $C_{10}H_{12}O_4$ 。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.96 (1H, s, H-3), 3.83 (3H, s, H-8), 2.68 (3H, s, H-10), 2.01 (3H, s, H-7); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 203.4 (C-9), 163.6 (C-2), 163.4 (C-6), 163.4 (C-4), 106.2 (C-5), 104.9 (C-1), 91.4 (C-3), 55.7 (C-8), 32.9 (C-10), 7.1 (C-7)。上述数据与文献报道^[15]基本一致,故鉴定化合物**12**为2',4'-二羟基-6'-甲氧基-3'-甲基苯乙酮。

化合物 13 黄色晶体;分子式 $C_{10}H_{12}O_4$ 。 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.03 (1H, s, H-5), 3.84 (3H, s, H-7), 2.65 (3H, s, H-10), 1.93 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 205.1 (C-9), 165.3 (C-4), 163.60 (C-6), 162.3 (C-2), 106.0 (C-3), 104.6 (C-1), 90.9 (C-5), 55.9 (C-10), 33.0 (C-7), 7.2 (C-8)。上述数据与文献报道^[16]基本一致,故鉴定化合物**13**为1-(2,4-二羟基-6-甲氧基-3-甲基苯基)乙酮。

化合物 14 白色固体;分子式 $C_8H_{10}O_2$ 。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.14 (2H, s, H-4, 6), 2.15 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, H-8), 1.99 (3H, s, H-7); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 157.1 (C-1, 3), 136.8 (C-5), 109.0 (C-2), 108.3 (C-4, 6), 21.3 (C-8), 8.2 (C-7)。上述数据与文献报道^[17]基本一致,故鉴定化合物**14**为2,5-二甲基间苯二酚。

化合物 15 白色固体;分子式 $C_7H_8O_2$ 。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.12 (2H, d, $J = 2.3$ Hz, H-4, 6), 6.07 (1H, t, $J = 2.3$ Hz, H-2), 2.18 (3H, d, $J = 0.7$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 158.9 (C-1, 3), 140.7 (C-5), 108.1 (C-4, 6), 100.2 (C-2), 21.1 (C-7)。上述数据与文献报道^[18]基本一致,故鉴定化合物**15**为1,3-二羟基甲苯。

2.2 生物活性测试

采用SRB法^[19]以人神经癌细胞(SF-268)、人乳腺癌细胞(MCF-7)、人肝癌细胞(HepG-2)为供试细胞株、阿霉素作为阳性对照分离得到的化合物进行细胞毒活性评价(表1),结果显示化合物**1**表现出一定的细胞毒活性,对三株细胞株的 IC_{50} 值为41.44~77.89 μM ,而其余化合物无明显的细胞毒活性。

此外,采用DPPH法^[20]以DPPH自由基清除率为指标、Vc作为阳性对照,对分离得到的化合物进行抗氧化活性评价。实验结果显示化合物**7**有较强

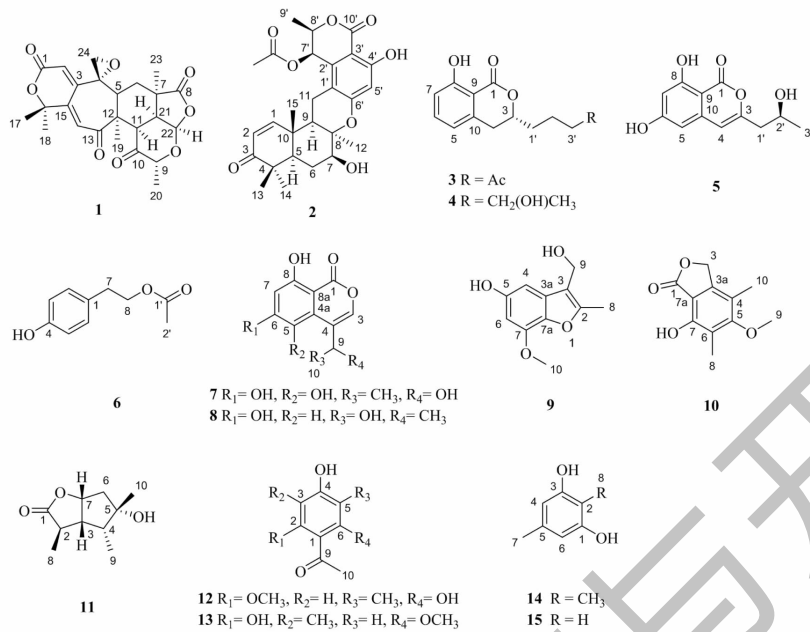


图2 化合物1~15的结构式

Fig. 2 Structures of compounds 1-15

的抗氧化活性,其 IC₅₀ 值为 14.95 μM,接近阳性对照 Vc 的 IC₅₀ 值 13.93 μM,其余化合物则无明显抗

表1 化合物1和7的细胞毒活性与抗氧化活性评价($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Evaluation of cytotoxic and antioxidant activities of compounds 1 and 7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品 Sample	细胞毒活性 IC ₅₀ Cytotoxic activity IC ₅₀ (μM)			抗氧化活性 IC ₅₀ Antioxidant activity IC ₅₀ (μM)
	SF-268	MCF-7	HepG-2	
1	42.57 ± 0.99	72.83 ± 4.51	61.46 ± 4.83	-
阿霉素 Adriamycin	1.58 ± 0.11	1.64 ± 0.12	2.18 ± 0.04	-
7	-	-	-	14.95 ± 0.72
Vc	-	-	-	13.93 ± 0.27

注:“-”表示无活性。

Note:“-” means inactivity.

3 讨论

Neorousoella 是 Liu 等^[21] 在 2014 年首次发现并描述的一个真菌新属。目前分离鉴定的 *Neorousoella* 属真菌主要来源于植物,存在于竹子、草本植物以及棕榈树中,而海洋来源的报道较少,集中在地中海流域,且来源均为海底植物^[22-24]。本研究使用的 FS526 菌株为南海深海沉积物中分离得到。经文献调研表明,该属真菌未见次生代谢产物的研究报道。

本研究首次从深海真菌 *Neorousoella* sp. FS526 的固体发酵产物中分离鉴定了 15 个单体化合物,其结构类型多样,包括杂萜 2 个、异香豆素 5 个、苯并呋喃 2 个、单萜 1 个、苯酚衍生物 5 个,所有化合物均为首次从 *Neorousoella* 属真菌中分离得到。从这

些化合物的结构类型上推测,苯酚及其衍生物是该真菌主要的特征性次生代谢产物,该类型化合物主要由聚酮生源合成途径产生。化合物 1 有 C-9 位构型不同的结构类似物,该结构类型的 S 构型被 Stierle 等^[25] 从 *Penicillium* 属真菌中首次发现,并命名为 berkeleyacetal C,该化合物对非小细胞肺癌细胞系有抑制作用。之后 Sun 等^[26] 从 *Penicillium purpurogenum* MHZ 111 中也发现了 berkeleyacetal C。随后,Chen 等^[5] 从 *Talaromyces amestolkiae* YX1 中分离纯化到 C-9 位 R 构型的新结构类似物,并命名为 amestolkolide B。对 berkeleyacetal C 和 amestolkolide B 两种不同构型的单体化合物进行活性测试,结果均显示有较强的 NO 产生抑制活性,但未发现明显

的细胞毒活性^[5,26]。而本研究的生物活性测试结果显示化合物 **1** 具有较弱的细胞毒活性。此外,异香豆素化合物 **7** 具有较强的抗氧化活性,其 IC₅₀ 值接近阳性对照 Vc,值得进一步研究。本研究结果丰富了 *Neorousoella* 属真菌的化学成分,为今后进一步开展其他生物活性研究提供了物质基础。

参考文献

- Wilson MC, Mori T, Ruckert C, et al. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire [J]. *Nature*, 2014, 506:58-62.
- 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.
- Wang X, Wu WH, Chen ZH, et al. Research progress on bioactive metabolites from marine microorganism and their structures [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2010, 8:309-320.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, et al. Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2013, 30:237-323.
- Chen S, Ding M, Liu W, et al. Anti-inflammatory meroterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* YX1 [J]. *Phytochemistry*, 2018, 146:8-15.
- Dethoup T, Manoch L, Kijjoa A, et al. Merodrimanes and other constituents from *Talaromyces thailandiasis* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70:1200-1202.
- Li S, Wei M, Chen G, et al. Two new dihydroisocoumarins from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. collected from the South China Sea [J]. *Chem Nat Compd*, 2012, 48:371-373.
- Hallock YF, Clardy J, Kenfield DS, et al. De-O-methyl-diaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccans* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27:3123-3125.
- Allevi P, Ciuffreda P, Longo A, et al. Lipase-catalysed chemo-selective monoacetylation of hydroxyalkylphenols and chemo-selective removal of a single acetyl group from their diacetates [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 9:2915-2924.
- Findlay JA, Li G, Miller JD, et al. Insect toxins from spruce endophytes [J]. *Can J Chem*, 2003, 81:284-292.
- Kimura Y, Nakajima H, Hamasaki T. Sescandelin, a new root promoting substance produced by the fungus, *Sesquicillium candelabrum* [J]. *Agr Biol Chem*, 1990, 54:2477-2479.
- Qi J, Shao CL, Li ZY, et al. Isocoumarin derivatives and benzofurans from a sponge-derived *Penicillium* sp. fungus [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76:571-579.
- Schneider G, Anke H, Sterner O. New secondary metabolites from a mycophilic *Hansfordia* species [J]. *Nat Prod Lett*, 1997, 10:133-138.
- Liu S, Dai H, Heering C, et al. Inducing new secondary metabolites through co-cultivation of the fungus *Pestalotiopsis* sp. with the bacterium *Bacillus subtilis* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2017, 58:257-261.
- Elix J, Engkaninan U, Jones A, et al. Chemistry and crystal structure of leprolomin, a novel diphenyl ether from the lichen *Psoroma leprolomum* [J]. *Aust J Chem*, 1978, 31(9):2057.
- Wang YX, Zhang JX, Chen ZY. Chemical constituents of *Euphorbia fischeriana* Steud. [J]. *J Xinxiang Med Univ* (新乡医学院学报), 2009, 26:551-553.
- Yu XL, Yang XY, Gao XL, et al. Phenolic constituents from lichen *Usnea longissima* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41:1864-1869.
- Li L, Tan NH, Zhou J. A new lignan glycoside from *Curculigo capitulata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2003:711-716.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82:1107-1112.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 1995, 28(1):25-30.
- Liu JK, Phookamsak R, Dai DQ, et al. Rousoellaceae, a new pleosporalean family to accommodate the genera *Neorousoella* gen. nov., *Rousoella* and *Rousoellopsis* [J]. *Phytotaxa*, 2014, 181(1):1-33.
- Karunarathna A, Phookamsak R, Jayawardena RS, et al. The holomorph of *Neorousoella alishanense* sp. nov. (Rousoellaceae, Pleosporales) on *Pennisetum purpureum* (Poaceae) [J]. *Phytotaxa*, 2019, 406:218-236.
- Gnavi G, Garzoli L, Poli A, et al. The culturable mycobiota of *Flabellia petiolata*: first survey of marine fungi associated to a mediterranean green alga [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4):e0175941.
- Poli A, Bovio E, Ranieri L, et al. News from the sea: a new genus and seven new species in the Pleosporalean families Rousoellaceae and Thyridariaceae [J]. *Diversity*, 2020, 12(4):144.
- Stierle DB, Stierle AA, Patacini B. The berkeleyacetals, three meroterpenes from a deep water acid mine waste *Penicillium* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70:1820-1823.
- Sun J, Zhu ZX, Song YL, et al. Nitric oxide inhibitory meroterpenoids from the fungus *Penicillium purpurogenum* MHZ 111 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79:1415-1422.