

罗非鱼肠道真菌 *Alternaria tenuissima* SCSIO41701 中的抗菌化合物刘 瑶<sup>1,2</sup>, 张晓勇<sup>4</sup>, 程 霞<sup>1,2</sup>, 梁 潇<sup>1,3</sup>, 漆淑华<sup>1,3\*</sup><sup>1</sup>中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广州 510301;<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049; <sup>3</sup>南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广州 511458;<sup>4</sup>华南农业大学海洋学院, 广州 510642

**摘要:**对罗非鱼肠道来源真菌 *Alternaria tenuissima* SCSIO41701 大米培养基发酵产物中抑制罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌生长的活性化合物进行研究。结合抗菌活性追踪, 采用硅胶柱层析和 HPLC 等色谱技术对其抗菌活性组分进行分离纯化, 并通过<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 波谱技术, 以及与文献报道的 NMR 数据相比较鉴定化合物结构。共分离鉴定了 9 个化合物, 分别是 aternariol (**1**)、aternariol methyl ether (**2**)、3-hydroxyaternariol 5-*O*-methylether (**3**)、(-)-altenuene (**4**)、(+)-isoaltenuene (**5**)、altenusin derivative (**6**)、alternariphent (**7**)、talaroflavonene (**8**)、alternarienonic acid B (**9**)。其中含量最高的化合物 **1** 抗菌活性最强, 在 25 μg/disc 的浓度下对罗非鱼病原菌无乳链球菌和海豚链球菌均有显著抑制作用, 抑菌圈直径均为 10 mm, 且其 MIC 值均为 12.5 μg/mL。这是首次报道化合物 **1** 抗罗非鱼链球菌病原菌活性。

**关键词:**真菌; *Alternaria tenuissima*; 抗菌化合物; 无乳链球菌; 海豚链球菌

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)10-1713-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.011

## Antibacterial compounds from the tilapia intestine derived fungus *Alternaria tenuissima* SCSIO41701

LIU Yao<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-yong<sup>4</sup>, CHENG Xia<sup>1,2</sup>, LIANG Xiao<sup>1,3</sup>, QI Shu-hua<sup>1,3\*</sup><sup>1</sup>Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanography, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301, China; <sup>2</sup>Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;<sup>3</sup>Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, China;<sup>4</sup>South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** This study investigated antibacterial compounds from the rice medium of the tilapia intestinal derived fungus *Alternaria tenuissima* SCSIO41701. The compounds were separated by silica gel column chromatography, HPLC and other chromatographic techniques. The structures of the compounds were identified by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and comparison with the NMR data of literatures. Totally, nine compounds were isolated from the antibacterial fractions of the tilapia intestines derived fungus *Alternaria tenuissima*. These compounds were identified as aternariol (**1**), aternariol methyl ether (**2**), 3-hydroxyaternariol 5-*O*-methylether (**3**), (-)-altenuene (**4**), (+)-isoaltenuene (**5**), altenusin derivative (**6**), alternariphent (**7**), talaroflavonene (**8**), and alternarienonic acid B (**9**). Only compound **1** showed obvious inhibition activity against the growths of *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* at 25 μg/dics with inhibition zones of 10 mm, and its MIC values were 12.5 μg/mL.

**Key words:** fungus; *Alternaria tenuissima*; antibacterial compound; *Streptococcus iniae*; *S. agalactiae*由无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和海豚链球菌 (*S. iniae*) 引起的罗非鱼链球菌病给罗非鱼养殖业带来了严重经济损失<sup>[1,2]</sup>。目前罗非鱼养殖主要利用抗生素等化学药物对链球菌病进行防治, 但长时间地使用广谱抗生素会诱导出耐药菌株<sup>[1,2]</sup>。

收稿日期: 2021-01-06

接受日期: 2021-04-06

基金项目: 广东省海洋经济发展专项资金(编号粤自然资合[2020]032号); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0406); 广东省重点领域研发计划(2020B1111030005)

\* 通信作者 E-mail: shuhuaqi@scsio.ac.cn

链格孢菌属 (*Alternaria*) 真菌广泛存在于自然

界,已鉴定的有 300 余种腐生菌、内生菌和病原菌<sup>[3]</sup>。从链格孢菌属真菌中已发现许多结构新颖的活性化合物,化合物类型主要有吡喃酮类、萜类、甾醇类、芳香聚酮类、蒽醌类、生物碱类、肽类等<sup>[4,9]</sup>,部分化合物具有抑制酶、细胞毒、抗真菌、抗氧化、促进单双子叶植物根系生长等生物活性<sup>[4,9]</sup>,其中链格孢菌毒素比如 alternariol, alternariol methyl ether, ten-toxin 等具有显著毒性<sup>[4]</sup>。细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)是一种常见的环境真菌,有关 *A. tenuissima* 次级代谢产物研究较少<sup>[10,11]</sup>,本研究组 Pan 等<sup>[12,13]</sup>曾从深海沉积物来源的 *A. tenuissima* DFF-SCS013 中分离到结构新颖的螺环稠合氢化蒽醌和含氮蒽醌类化合物等。

为寻找新型抗生素,我们以罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌为指示菌,对一批从罗非鱼肠道分离鉴定的真菌进行了抗菌筛选,从中筛选到一株链格孢菌属真菌 *A. tenuissima* SCSIO41701 有显著抑制无乳链球菌和海豚链球菌生长活性。本研究采用活性追踪法对 *A. tenuissima* SCSIO41701 大米培养基发酵产物中抑制罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌生长的活性化合物进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器及试剂

超导核磁共振仪(Bruker AVANCE500 型,内标为 TMS);分析天平(SH 200E 型电子天平);中压制备液相色谱(CHEETAH MP200 system(Agela Technologies));高效液相色谱仪(Shimadzu LC-20AT pump with a Shimadzu SPD-M20A Photodiode Array Detector);高效液相色谱分析柱(YMC ODS-SP, 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4.6 mm);高效液相色谱半制备柱(YMC-Pack ODS, S-5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  10 mm);超声波清洗器(KQ-5000D 型,昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发器(SB-2000,上海艾朗仪器有限公司)。

试剂:甲醇、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮、三氟乙酸、浓硫酸、二甲基亚砜(DMSO)等均为分析纯,购买自广州试剂厂;色谱级甲醇、乙腈均为购自默克公司;怡宝纯净水购自于胜佳超市。

### 1.2 菌种

本实验所使用的真菌菌株 *A. tenuissima* SCSIO41701 是从罗非鱼肠道内容物中分离获得,并结合形态学观察,通过真菌 DNA 提取、ITS 序列扩增以及序列比后鉴定为 *A. tenuissima*。该菌株的 ITS 序列在 GeneBank 中注册编号为 MK281554,其与菌

株 *A. tenuissima* ZB11263537 的 ITS 序列(KX783377)相似度为 99%。该菌株保存在中国科学院南海海洋研究所海洋微生物中心。

### 1.3 培养基及发酵条件

大米培养基:大米 80 g,酵母浸膏 0.4 g,葡萄糖 0.4 g,水 120 mL。

配 3 kg 的大米培养基,用一升锥形瓶分装,每瓶大米约 80 g,共 40 瓶。将培养基灭菌,在无菌操作台中将菌株 SCSIO41701 的孢子用已灭菌的竹签刮下,转移到无菌水中,再用已灭菌的移液枪吸取 5 mL 菌液转移到培养基中,26  $^{\circ}\text{C}$  下静置培养 30 天后收瓶。

### 1.4 提取与分离

将 3 kg 大米的发酵产物用细胞破碎机进行破碎,用丙酮浸泡约 12 h,重复三次,合并提取液,减压浓缩,再用乙酸乙酯萃取,浓缩得到浸膏约 44.30 g。总浸膏经正相硅胶柱层析,用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0 $\rightarrow$ 1:1)溶剂系统洗脱,最后洗脱液通过 TLC 检测合并得到 12 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 12)。用甲醇溶解时发现组分 Fr. 6 ~ Fr. 10 中均有一部分甲醇不溶物,分别将 Fr. 6 ~ Fr. 10 中甲醇不溶物过滤出来,TLC 点板确定它们化学成分基本相同,均主要含 2 个化合物,只是不同组分中两者比例不同,合并共得到 10.26 g 甲醇不溶物,其中来自 Fr. 6 ~ Fr. 10 的重量分别为 1.86、1.43、0.41、1.74、4.78 g。

取 Fr. 6 中 54 mg 甲醇不溶物用甲醇和二氯甲烷(1:1)的混合溶剂溶解,经薄层制备板刮板得到化合物 **1**(32 mg)。滤液经中压 ODS 柱分离,以甲醇/水/TFA(三氟乙酸)(V/V 5:95:0.03 $\rightarrow$ 100:0:0.03)梯度洗脱,分离得到 11 个亚组分(Fr. 6.1 ~ Fr. 6.11)。Fr. 6.2 经中压 ODS 柱(冲洗系统 MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, V/V 5:95:0.03 $\rightarrow$ 100:0:0.03)分离得到 7 个亚组分(Fr. 6.2.1 ~ Fr. 6.2.3)。Fr. 6.2.1 经 HPLC(MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, V/V 55:45:0.03)分离纯化得到化合物 **8**(2 mg,  $t_{\text{R}}$  = 22.4 min)。Fr. 6.3 经中压 ODS 色谱柱(MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, V/V 5:95:0.03 $\rightarrow$ 100:0:0.03)分离得到 7 个亚组分(Fr. 6.3.1 ~ Fr. 6.3.7)。Fr. 6.3.2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  = 1:1)除去色素后,经 HPLC(MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, V/V 60:40:0.03)分离纯化得到化合物 **7**(11.8 mg,  $t_{\text{R}}$  = 25.0 min)。Fr. 6.3.5 经 Sephadex LH-20 凝胶柱( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  = 1:1)除去色素后,经 HPLC(MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, V/V 80:20:0.03)分离,得到化合物 **4**(10.1 mg,  $t_{\text{R}}$  =

37.2 min)。Fr. 6.4 经中压 ODS 色谱柱 (MeOH/H<sub>2</sub>O/TFA, V/V 5:95:0.03→100:0:0.03) 分离得到 10 个亚组分 (Fr. 6.4.1 ~ Fr. 6.4.10), Fr. 6.4.4 经 HPLC (MeOH/H<sub>2</sub>O/TFA, V/V 52:48:0.03) 分离纯化得到化合物 **5** (28.6 mg,  $t_R = 17.1$  min)。Fr. 6.8 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离 (MeOH 洗脱) 得到 3 个亚组分 (Fr. 6.8.1 ~ Fr. 6.8.3), Fr. 6.8.3 经 HPLC (MeOH/H<sub>2</sub>O/TFA, V/V 75:20:0.03) 分离, 得到化合物 **3** (8 mg,  $t_R = 40.0$  min)。将 Fr. 7 中甲醇不溶物过滤后的滤液经中压 ODS 柱分离, 以甲醇/水/TFA (V/V 5:95:0.03→100:0:0.03) 梯度洗脱, 得到 13 个亚组分 (Fr. 7.1 ~ Fr. 7.13)。Fr. 7.7 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, V/V 1:1) 得到 5 个亚组分 (Fr. 7.7.1 ~ Fr. 7.7.5)。Fr. 7.7.2 经 HPLC (MeOH/H<sub>2</sub>O/TFA, V/V 54:46:0.03) 分离, 得到化合物 **9** (41 mg,  $t_R = 12.5$  min)。Fr. 7.9 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 1:1) 除去杂质, 得到化合物 **2** (15 mg)。Fr. 7.13 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 1:1) 得到 3 个亚组分 (Fr. 7.13.1 ~ Fr. 7.13.3), Fr. 7.13.2 经 HPLC (MeOH/H<sub>2</sub>O/TFA, V/V 65:35:0.03) 分离, 得到化合物 **6** (14.8 mg,  $t_R = 12.8$  min)。

## 1.5 抗菌活性测定

### 1.5.1 纸片法抗菌初筛

采用纸片法, 以 DMSO 为溶剂, 将待测组分配制成 20 mg/mL, 待测单体化合物配制成 10 mg/mL,

阳性对照环丙沙星和青霉素分别配成 5 mg/mL。以无乳链球菌和海豚链球菌为指示菌。细菌先摇床培养 24 h (30 °C), 用无菌水稀释至酶标仪 OD 值 0.01 ~ 0.02, 取稀释后的细菌 150 μL, 涂布于细菌培养皿中。将灭菌的纸片 (直径 6 mm) 用灭菌的镊子取每 6 个均匀放入培养皿, 以环丙沙星和青霉素 (12.5 μg/disc) 为阳性对照, 阴性对照为 DMSO。取 2.5 μL 待测样品滴入纸片, 每个样品两个平行试验, 37 °C 培养箱内培养 1 天, 观察现象。

### 1.5.2 96 孔板法测 MIC 值

采用倍半稀释法, 对初筛有显著抗菌活性的化合物 **1** 进行 MIC 值测定。采用 96 孔板, 每孔加入 192 μL 的稀释好菌液 (OD 值 0.01 ~ 0.02) 和 8 μL 样品 (10 mg/mL), 样品最终浓度分别为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5 μg/mL。最后, 放入 37 °C 培养箱培养, 12 h 后用酶标仪测量, 查看结果。阳性对照每孔加入 192 μL 稀释的菌液和 8 μL 环丙沙星, 阴性对照每孔加入 192 μL 稀释的菌液和 8 μL DMSO。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物的结构鉴定

采用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、HPLC 等色谱技术从 *A. tenuissima* SCSIO41701 大米发酵产物中共分离纯化得到 9 个化合物 (见图 1), 通过 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、MS 等波谱技术鉴定了这些化合物的结构。

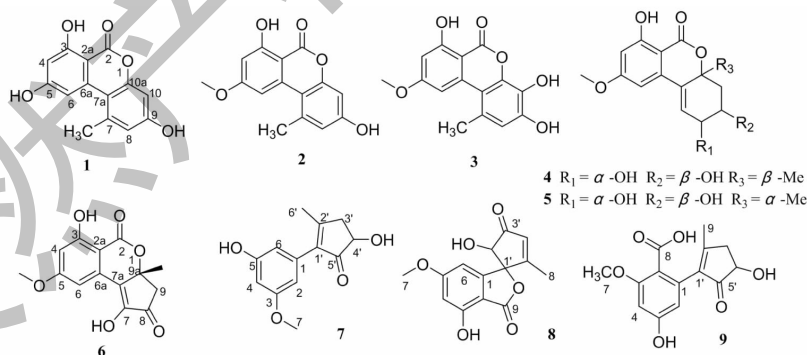


图 1 化合物 1~9 的化学结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-9

化合物 **1** 无色尖晶; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 11.76 (1H, s, OH-3), 10.96 (1H, s, OH-5), 10.37 (1H, s, OH-9), 7.26 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 6.72 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-8), 6.64 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-10), 6.37 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-4), 2.70 (3H,

s, H-11); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 138.3 (s, C-7), 117.6 (d, C-8), 158.5 (s, C-9), 101.6 (d, C-10), 152.6 (s, C-10a), 164.1 (s, C-2), 97.4 (s, C-2a), 164.7 (s, C-3), 100.9 (d, C-4), 165.5 (s, C-5), 104.3 (d, C-6), 138.1 (s, C-6a), 108.8 (s, C-7a),

25.3(q, C-11)。上述数据与文献报道<sup>[14]</sup>对比一致,故鉴定该化合物为 *aternariol*。

**化合物 2** 淡黄色固体; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.83(1H, s, OH-3), 10.38(1H, s, OH-9), 7.23(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 6.73(1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-8), 6.65(1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-10), 6.62(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-4), 2.73(3H, s, H-11), 3.91(3H, s, H-12); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 137.3(s, C-7), 117.4(d, C-8), 158.6(s, C-9), 101.3(d, C-10), 152.5(s, C-10a), 164.7(s, C-2), 98.5(s, C-2a), 164.1(s, C-3), 99.2(d, C-4), 166.2(s, C-5), 103.4(d, C-6), 137.5(s, C-6a), 108.8(s, C-7a), 25.0(q, C-11), 55.9(q, C-12)。上述数据与文献报道<sup>[15]</sup>对比一致,故鉴定该化合物为 *aternariol methyl ether*。

**化合物 3** 棕红色无定形粉末; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.91(1H, s, OH-3), 10.01(1H, s, OH-10), 9.15(1H, s, OH-9), 7.22(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 6.73(1H, s, H-8), 6.61(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-4), 3.91(3H, s, H-12), 2.65(3H, s, H-11); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 138.5(s, C-6a), 98.4(s, C-2a), 164.2(s, C-3), 99.3(d, C-4), 166.2(s, C-5), 103.5(d, C-6), 164.7(s, C-2), 109.2(s, C-7a), 141.6(s, C-10a), 131.2(s, C-10), 147.1(s, C-9), 116.9(d, C-8), 126.5(s, C-7), 55.9(q, C-12), 24.6(q, C-11)。上述数据与文献报道<sup>[16]</sup>对比一致,故鉴定该化合物为 *3-hydroxyaternariol 5-O-methylether*。

**化合物 4** 白色固体;  $[\alpha]_D^{25}$ -17.4 (*c* 0.10 CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.30(1H, s, OH-3), 6.75(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-6), 6.50(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-4), 6.30(1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-7), 5.32(1H, br s, 8-OH), 5.16(1H, br s, 9-OH), 3.95(1H, m, H-8), 3.86(3H, s, H-12), 3.69(1H, dt, *J* = 7.4, 3.5 Hz, H-9), 2.26(1H, dd, *J* = 14.0, 3.5 Hz, H-10a), 1.95(1H, dd, *J* = 14.0, 7.4 Hz, H-10b), 1.47(3H, s, H-11); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 168.3(s, C-2), 165.9(d, C-5), 163.1(s, C-3), 139.2(s, C-6a), 131.8(s, C-7a), 131.1(d, C-7), 102.4(d, C-6), 100.9(d, C-4), 100.1(s, C-2a), 81.2(d, C-10a), 69.5(d, C-8), 68.8(d, C-9), 55.9(q, C-12), 38.6(t, C-10), 27.5(q, C-11)。上述数据与文献报道<sup>[17]</sup>对比一致。文献<sup>[17]</sup>中化合物 *altenuene* 作为外消旋体分离自真菌 *Nigrospora sphaeri-*

*ca* 的发酵产物,经拆分后获得(-)-*altenuene* 和(+)-*altenuene*,且同时分离到与 *altenuene* 差异只在 C-10a 上甲基构型的外消旋体 *isoaltenuene*,经拆分后获得(+)-*isoaltenuene* 和(-)-*isoaltenuene*。比较化合物 4 和文献<sup>[17]</sup>中(-)-*altenuene* 和(+)-*altenuene* 的比旋光度值,故鉴定该化合物为(-)-*altenuene*。

**化合物 5** 白色固体;  $[\alpha]_D^{25}$ 13.1 (*c* 0.10 CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.33(1H, s, OH-3), 6.65(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-6), 6.48(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-4), 6.23(1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-7), 4.08(1H, dd, *J* = 7.9, 2.5 Hz, H-8), 3.84(3H, s, H-12), 3.61(1H, ddd, *J* = 11.9, 7.9, 3.6 Hz, H-9), 2.16(1H, *J* = 11.9, 3.6 Hz, H-10a), 2.03(1H, t, *J* = 11.9 Hz, H-10b), 1.48(3H, s, H-11); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 167.8(s, C-2), 165.9(d, C-5), 163.3(s, C-3), 137.7(s, C-6a), 131.3(d, C-7), 131.1(s, C-7a), 102.2(d, C-6), 101.2(d, C-4), 99.8(s, C-2a), 82.4(s, C-10a), 72.6(d, C-8), 70.3(d, C-9), 55.9(q, C-12), 43.5(t, C-10), 26.3(q, C-11)。上述数据与文献报道<sup>[17]</sup>对比一致。正如化合物 4 中所述,比较化合物 5 和文献<sup>[17]</sup>中(+)-*isoaltenuene* 和(-)-*isoaltenuene* 的比旋光度值,故鉴定该化合物为(+)-*isoaltenuene*。

**化合物 6** 黄色固体; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.35(1H, s, OH-3), 11.32(1H, s, OH-7), 6.92(1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.59(1H, m, H-4), 3.86(3H, s, H-5), 3.05(1H, d, *J* = 17.7 Hz, H-9), 2.80(1H, d, *J* = 17.7 Hz, H-9), 1.61(3H, s, H-10); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 196.6(s, C-8), 167.9(s, C-2), 165.7(s, C-5), 163.9(s, C-3), 149.6(s, C-7), 132.8(s, C-6a), 129.8(s, C-7a), 105.8(d, C-6), 101.7(d, C-4), 99.3(s, C-2a), 81.6(s, C-9a), 56.0(q, C-5), 46.8(t, C-9), 27.4(q, C-10)。上述数据与文献<sup>[18]</sup>报道的化合物 4 数据对比一致,由于文献<sup>[18]</sup>没给具体命名,在此系统命名此化合物为 1,6-dihydroxy-8-methoxy-3a-methyl-3,3a-dihydrocyclopenta[*c*]isochromene-2,5-dione。

**化合物 7** 黄色粉末;  $[\alpha]_D^{25}$  2.7 (*c* 0.10 CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.35(1H, dd, *J* = 2.3, 1.3 Hz, H-4), 6.32(1H, dd, *J* = 2.3, 2.2 Hz, H-6), 6.31(1H, dd, *J* = 2.2, 1.3 Hz, H-2), 4.29(1H, dd, *J* = 6.9, 3.1 Hz, H-4'), 3.75(3H, s, H-7),

3.05(1H, dd,  $J = 18.2, 6.9$  Hz, H-3'), 2.50(1H, dd,  $J = 18.2, 3.1$  Hz, H-3'), 2.17(3H, s, H-6');  $^{13}\text{C}$  NMR(175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ : 134.6(s, C-1), 109.7(d, C-2), 162.2(s, C-3), 101.8(d, C-4), 159.5(s, C-5), 107.2(d, C-6), 55.7(q, C-7), 139.1(s, C-1'), 171.8(s, C-2'), 41.9(t, C-3'), 72.6(d, C-4'), 208.8(s, C-5'), 18.5(q, C-6')。上述数据与文献报道<sup>[19]</sup>对比一致。化合物 7 的比旋光度值接近零, 手性柱分析表明该化合物是外消旋体, 故鉴定该化合物为 alternariphent。

**化合物 8** 棕色油状;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  11.4 ( $c$  0.10  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR(700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ : 11.10(1H, s, OH-3), 6.45(1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-6), 6.39(1H, s, H-4'), 6.12(1H, d,  $J = 6.5$  Hz, 2'-OH), 5.92(1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-4), 4.63(1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-2'), 3.74(3H, s, H-7), 1.75(3H, s, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR(175 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ : 200.3(s, C-3'), 168.9(s, C-9), 166.8(s, C-5), 165.8(s, C-5'), 158.4(s, C-3), 150.0(s, C-1), 130.5(d, C-4'), 105.1(s, C-2), 102.2(d, C-6), 99.4(d, C-4), 92.0(s, C-1'), 78.3(d, C-2'), 55.9(q, C-7), 13.2(q, C-8)。上述数据与文献报道<sup>[20]</sup>对比一致。文献<sup>[20]</sup>中化合物 talaroflavone 作为外消旋体分离自真菌 *Alternaria* sp. F49 的发酵产物, 经拆分后获得 (+)-talaroflavone 和 (-)-talaroflavone, 比旋光度值分别为  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  143.5 ( $c$  0.19  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) 和  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -144.0 ( $c$  0.05,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )。鉴于本研究中我们分离到的化合物比旋光度值远小于文献报道的数据, 进一步通过 HPLC 手性柱 Daicel CHIRALPAK IA column(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 分析发现 8 是 (+)-talaroflavone 和 (-)-talaroflavone 的混合物, 且由于两者含量比例稍有区别导致化合物 8 的比旋光度值不是零, 故鉴定该化合物为 talaroflavone。

**化合物 9** 无色晶体;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  11.6 ( $c$  0.10  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H}$  NMR(700 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ : 6.49(1H, s, H-4), 6.13(1H, s, H-2), 4.12(1H, s, H-4'), 3.78(3H, s, H-7), 2.93(1H, dd,  $J = 17.2, 6.7$  Hz, H-3'a), 2.42(1H, d,  $J = 17.2$  Hz, H-3'b), 1.96(3H, s, H-9');  $^{13}\text{C}$  NMR(175 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta$ : 206.1(C, C-5'), 172.2(C, C-8), 164.2(C, C-2'), 163.4(CH, C-5), 160.2(C, C-3), 139.8(C, C-1'), 136.4(C, C-1), 109.9(C, C-6), 106.0(CH, C-2), 100.6(CH, C-4), 71.3(CH, C-4'), 55.7(CH<sub>3</sub>, C-7), 40.7(CH<sub>2</sub>, C-

3'), 17.7(CH<sub>3</sub>, C-9)。上述数据与文献报道<sup>[21]</sup>对比一致。通过 HPLC 手性柱 Daicel CHIRALPAK IA column(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 分析发现 9 是 (+)-alternarienonic acid B 和 (-)-alternarienonic acid B 的混合物, 且由于两者含量比例稍有区别导致化合物 9 的比旋光度值不是零, 故鉴定该化合物为 alternarienonic acid B。

## 2.2 抗菌活性结果

采用纸片扩散法测试发酵产物的乙酸乙酯粗提物、各组分, 以及各化合物的抗菌活性结果见表 1。在 100  $\mu\text{g}/\text{disc}$  浓度下, 乙酸乙酯粗提物抑制无乳链球菌和海豚链球菌生长的抑菌圈大小均为 15 mm; 在 50  $\mu\text{g}/\text{disc}$  浓度下, 各组分对无乳链球菌和海豚链球菌的生长均有一定的抑制作用, 其中组分 Fr. 6 ~ Fr. 10 抗菌活性较强, 抑菌圈大小为 14 ~ 21 mm; 在 25  $\mu\text{g}/\text{disc}$  浓度下, 化合物 1 ~ 11 中只有 1 对无乳链球菌和海豚链球菌均显示较强抗菌活性, 抑菌圈大小为 10 mm, 而其他化合物则没有或只有弱抗

表 1 组分和化合物的抗菌活性

Table 1 Antibacterial activities of fractions and compounds

样品 Sample	抑菌圈大小 Inhibition zone diameter(mm)	
	无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	海豚链球菌 <i>Streptococcus iniae</i>
	Fr. 3	0
Fr. 4	0	8
Fr. 5	6	7
Fr. 6	14	17
Fr. 7	20	20
Fr. 8	20	21
Fr. 9	12	15
Fr. 10	18	20
Fr. 11	0	19
1	10	10
2	-	6
3	-	6.5
6	-	8
8	6	-
青霉素 Penicillin	10	35
环丙沙星 Ciprofloxacin	25	25

注: 青霉素 12.5  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ; 环丙沙星 12.5  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ; 各组分 50  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ; 单体化合物 25  $\mu\text{g}/\text{disc}$ 。

Note: Penicillin was 12.5  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ; ciprofloxacin was 12.5  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ; fraction was 50  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ; compound was 25  $\mu\text{g}/\text{disc}$ .

菌活性。对于活性化合物 **1** 进一步采用 96 孔板稀释法测试了其 MIC 值,抑制无乳链球菌和海豚链球菌的 MIC 值均为 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,阳性对照药环丙沙星抑制这两株病原菌的 MIC 值均为 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 3 讨论

在本研究中,我们通过抗菌活性追踪分离鉴定了真菌 *A. tenuissima* SCSIO41701 中抑制罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌生长的主要活性化合物是高含量的 alternariol(**1**),并通过 HPLC 分析和薄层点板分析,发现组分 Fr. 6 ~ Fr. 10 中都含有大量的化合物 **1** 和 **2**,其中化合物 **1** 是主峰,推测抗菌活性较好的组分 Fr. 6 ~ Fr. 10 都主要通过化合物 **1** 起抗菌作用。导致化合物 **1** 和 **2** 交叉分布在这些组分中的原因,是由于经正相硅胶柱分离粗提物时高含量的化合物 **1** 和 **2** 微溶于冲洗用的二氯甲烷-甲醇溶剂系统。化合物 **1** ~ **6** 都属于苯并吡喃内酯类化合物,比较它们的结构和抗罗非鱼链球菌活性,推测苯环 C-5 上羟基和 C7-C10a 间共轭体系的存在对其抗菌活性起重要作用。

化合物 **1** 和 **2** 是常见的链格孢菌毒素,常可于谷物、水果、油菜、葵花籽、橄榄等食品中检测到。化合物 **1** 和 **2** 均有细胞毒活性,可通过诱导基因突变,促使 DNA 链在体外产生遗传毒性断裂,并抑制拓扑异构酶 I 和 II $\alpha$ <sup>[14]</sup>,且 **2** 能诱导人结肠癌细胞的线粒体突变<sup>[15,22,23]</sup>。此外,化合物 **1** 有较好的抑制金色葡萄球菌、乳链球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌的活性, MIC 值均为 7.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,并有强抑制植物病原真菌苹果腐烂菌、西瓜枯萎病菌、番茄灰霉菌和辣椒疫霉菌的活性, MIC 值为 15.63、7.82、1.96、3.91  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[24]</sup>;化合物 **2** 对枯草芽孢杆菌、假单胞菌、拉尔斯顿氏菌、青枯菌、单胞菌也有抗菌作用, MIC50 值分别为 28.83、34.29、27.08、29.21、30.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[15]</sup>。在本研究中,我们首次发现化合物 **1** 有较强的杀死罗非鱼病原菌无乳链球菌和海豚链球菌的活性,且在菌株 *A. tenuissima* SCSIO41701 中产量高,但鉴于该化合物作为真菌毒素有较强的毒性,后续能否开发用于罗非鱼链球菌病的防治还有待深入研究。

### 参考文献

- 1 Su XX. Investigation and diagnosis of *Streptococcus* disease tilapia[J]. *Ocean Fish* (海洋与渔业), 2015, 5:50-51.
- 2 Lu ML. Review of research on *Streptococcus* in tilapia[J].

- South China Fish Sci(南方水产), 2010, 6:75-79.
- 3 Lee HB, Patriarca A, Magan N. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology[J]. *Mycobiology*, 2015, 43:93-106.
- 4 Lou JF, Fu LY, Peng YL, et al. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities[J]. *Molecules*, 2013, 18:5891-5935.
- 5 Yang CL, Wu HM, Liu LL, et al. Bialternacins A-F, aromatic polyketide dimers from an endophytic *Alternaria* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2018, 82:792-797.
- 6 Shi YN, Pusch S, Shi YM, et al. ( $\pm$ )-Alternarlactones A and B, two antiparasitic alternariol-like dimers from the fungus *Alternaria* P1210 isolated from the Halophyte *salicornia* sp[J]. *J Org Chem*. 2019, 84:11203-11209.
- 7 Tan XM, Zhang XY, Yu M, et al. Sesquiterpenoids and mycotoxin swainsonine from the locoweed endophytic fungus *Alternaria oxytropis* [J]. *Phytochemistry*. 2019, 164:154-161.
- 8 Wang WJ, Gong JJ, Liu XR, et al. Cytochalasans produced by the coculture of *Alternaria flavipes* and *Chaetomium globosum* [J]. *J Nat Prod*. 2018, 81:1578-1587.
- 9 Wu JC, Hou Y, Xu QH, et al. ( $\pm$ )-Alternamgin, a pair of enantiomeric polyketides, from the endophytic fungi *Alternaria* sp. MG1 [J]. *Org Lett*, 2019, 4:1-6.
- 10 Chatterjee S, Ghosh R, Mandal NC. Inhibition of biofilm and hyphal development, two virulent features of *Candida albicans* by secondary metabolites of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* having broad spectrum antifungal potential [J]. *Microbiol Res*, 2020, 232:126386.
- 11 Fernanda OC, Luís GD, Mônica TP. New perylenequinone derivatives from the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* SS77 [J]. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57:3185-3189.
- 12 Pan DY, Huang ZH, Liang X, et al. Tricycloalternarenes from the deep-sea derived fungus *Alternaria tenuissima* DFFSCS013 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30:1166-1169.
- 13 Pan DY, Zhang XX, Zheng HZ, et al. Novel anthraquinone derivatives as inhibitors of protein tyrosine phosphatases and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 from the deep-sea derived fungus *Alternaria tenuissima* DFFSCS013 [J]. *Org Chem Front*, 2019, 18:3252-3258.
- 14 Andreas AD, Beate NK, Erika P, et al. Conjugation of the mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in tobacco suspension cells [J]. *J Agr Food Chem*, 2015, 63:4728-4736.
- 15 Meng XJ, Mao ZL, Lou JF, et al. Benzopyranones from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. ponipodefl2 and their bioactivities [J]. *Molecules*, 2012, 17:1303-1314.

- 16 Li DB, Zhang XQ, Zhang XL, et al. Fermentation optimization for the gonian coral-derived fungus *curvularia launata* to produce cytochalasin b and the study of adding chemical epigenetic modification in fermentation [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2016, 35: 14-20.
- 17 He JW, Chen GD, Gao H, et al. Heptaketides with antiviral activity from three endolichenic fungal strains *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp. and *Phialophora* sp. [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 1087-1091.
- 18 Liu Y, Wu Y, Zhai R, et al. Altenusin derivatives from mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. SK6YW3L [J]. *Rsc Adv*, 2016, 6: 72127.
- 19 Pang XY, Lin XP, Wang P, et al. Perylenequinone derivatives with anticancer activities isolated from the marine sponge-derived fungus *Alternaria* sp. SCSIO41014 [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16: 280-293.
- 20 Tian YQ, Lin ST, Liu YH. A new polyketide from a sponge-derived fungus [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 1134-1138.
- 21 Ding H, Zhang D, Zhou B, et al. Inhibitors of BRD4 Protein from a marine-derived fungus *Alternaria* sp. NH-F6 [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15: 76.
- 22 Bensassi F, Gallerne C, Sharafeldin O, et al. Mechanism of alternariol monomethyl ether-induced mitochondrial apoptosis in human colon carcinoma cells [J]. *Toxicology*, 2011, 290: 230-240.
- 23 Pfeiffer E, Eschbach S, Metzler M. *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro* [J]. *Mycotoxin Res*, 2007, 23: 152-157.
- 24 Kong Y, Ma YM, Guang L, et al. Study on the secondary metabolites and antifungal activity from an endophytic fungi NR3 of *Nerium indicum* Mill. cv Paihua [J]. *J Shanxi Univer Sci Technol* (陕西科技大学学报), 2019, 37: 52-56.

## 海藻糖可减少易卒中自发性高血压大鼠的卒中发生

中风是高血压的主要后果之一,能够导致高死亡率或永久性残疾,是一个主要的公共卫生问题。目前,自噬激活正在成为中风的潜在治疗和预防途径。自噬是一种进化保守的细胞过程,负责将受损的细胞器、错误折叠的蛋白及其他大分子物质等运送至溶酶体降解并再利用。有证据表明,自噬减少与心脑血管疾病之间存在关联。近年来,来自食物或植物的不同天然自噬激活剂作为传统疗法的潜在佐剂或预防剂受到了越来越多的关注。海藻糖(trehalose, TRE)是一种天然的非还原性双糖,由低等生物(如酵母)合成,能够发挥抗氧化作用,减少蛋白质聚集,增强自噬。TRE已被证明可以减少神经退行性疾病的发生并缓解小鼠的动脉粥样硬化,并通过特异性激活心脏自噬改善心肌梗塞小鼠的心脏功能。然而,目前尚不清楚TRE对高血压相关卒中的潜在有益作用。

来自意大利波兹利 IRCCS Neuromed 研究所的 Maurizio Forte 及其团队研究了 TRE 对高盐中风饮食 (high-salt stroke permissive diet, JD) 喂养的卒中易感自发性高血压大鼠 (stroke-prone spontaneously hypertensive rat, SHRSP) 中中风发生、肾损伤和血管功能的影响,还分析了 TRE 在这些动物脑中诱导的细胞内分子效应。结果发现, TRE 减少了高盐喂养的 SHRSP 中风的发生和肾损伤,能够降低收缩压。通过离体实验研究,该团队评估了 TRE 对高盐喂养 SHRSP 血管功能的有益影响。在分子水平上, TRE 恢复了脑自噬并减少了线粒体质量,以及改善线粒体功能。TRE 的有益作用与 TFEB (一种自噬转录激活剂) 的核易位增加有关。该团队研究结果表明, TRE 可能是一种天然化合物,可有效预防与高血压相关的靶器官损伤,尤其是中风和肾损伤。相关研究发表在《Pharmacological Research》杂志上。

胡乃华编译自: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104366182100459X>

原文标题: Trehalose, a natural disaccharide, reduces stroke occurrence in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat