

# 内生真菌 *Chaetomium globosum* S108 次生代谢产物 分离及黑色素瘤抑制活性研究

张文慧<sup>1</sup>, 肖依文<sup>1,2</sup>, 梁伟中<sup>1</sup>, 汪 涯<sup>1</sup>, 高波良<sup>1</sup>, 朱 筠<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>江西科技师范大学生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室, 南昌 330013;

<sup>2</sup>江西师范大学 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 南昌 330022

**摘要:**利用多种现代色谱技术从东乡野生稻内生球毛壳菌 *Chaetomium globosum* S108 的乙酸乙酯萃取部位分离纯化得到 7 个化合物, 采用 ESI-MS、NMR 等波谱解析技术将其鉴定为邻苯二甲酸二辛酯 (**1**)、6-hydroxymellein (**2**)、chaetomugilin D (**3**)、chaetomugilin S (**4**)、chaetoviridin A (**5**)、球毛壳素 A (**6**)、6-*O*-demethyl-5-deoxyfusarubin (**7**), 其中化合物 **2**、**7** 为首次从球毛壳菌属中分离得到。采用 CCK-8 法对化合物单体进行了黑色素瘤 B16 细胞株抑制实验, 首次发现化合物 **2** 具有较强的抑制活性, IC<sub>50</sub> 为 2.24 μmol/L。

**关键词:**内生真菌; 球毛壳菌; 次生代谢产物; 结构鉴定; 黑色素瘤抑制

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)11-1854-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.11.006

## Isolation of secondary metabolites from endophytic fungus *Chaetomium globosum* S108 and its antimelanoma activity

ZHANG Wen-hui<sup>1</sup>, XIAO Yi-wen<sup>1,2</sup>, LIANG Wei-zhong<sup>1</sup>, WANG Ya<sup>1</sup>, GAO Bo-liang<sup>1</sup>, ZHU Du<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Bioprocess Engineering of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

**Abstract:** Seven compounds were isolated and purified from the ethyl acetate extract of endophytic fungus *Chaetomium globosum* S108 of Dongxiang wild rice by various chromatographic techniques. The compounds were identified as dioctyl phthalate (**1**), 6-hydroxymellein (**2**), chaetomugilin D (**3**), chaetomugilin S (**4**), chaetoviridin A (**5**), chaetoglobosin A (**6**), 6-*O*-demethyl-5-deoxyfusarubin (**7**) by ESI-MS, NMR and other spectroscopic analysis techniques. Compounds **2** and **7** were reported from genus *Chaetomium* for the first time. The antitumor activities of the isolated compounds were tested by CCK-8 assay. The results showed that compound **2** could seriously inhibit the proliferation of melanoma B16 cell line for the first time, with IC<sub>50</sub> value of 2.24 μmol/L.

**Key words:** endophytic fungus; *Chaetomium globosum*; secondary metabolites; structural identification; melanoma inhibition

植物内生菌 (edophytes) 是指一类生活在健康植物组织体内但不引起植物感染病害的微生物, 其不仅能促进植物的耐盐、耐旱、耐寒、抗虫等抗逆性, 而且蕴含丰富的次生代谢产物合成基因簇, 已成为结构多样性天然产物筛选的重要来源<sup>[1,2]</sup>。东乡野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 是仅残存于江西省东乡

县、世界分布最北的野生稻, 由于其长期处于野生状态, 经历了自然选择, 具有良好的抗逆性、抗病虫害、耐寒、耐旱、高产等优良性状<sup>[3,4]</sup>。本课题组前期对东乡野生稻内生真菌多样性进行了系统的研究, 发现其不仅蕴含丰富的植物内生真菌, 而且 PKS 基因检测和植物病原抑制活性筛选结果显示其中含有较丰富的活性次级代谢产物, 十分有必要进一步开展研究<sup>[5]</sup>。

本研究以前期从东乡野生稻中分离得到的一株内生球毛壳菌 S108 (*Chaetomium globosum* S108) 为

收稿日期: 2021-02-08 接受日期: 2021-09-29

基金项目: 国家自然科学基金 (81760649); 江西省自然科学基金 (20181BAB215044); 江西科技师范大学研究生创新基金 (YC2019-X03)

\* 通信作者 Tel: 86-791-83832166; E-mail: zhudu12@163.com

对象,对其进行发酵培养,初步发现其发酵液对肿瘤细胞具有一定的抑制活性。据文献报道,球毛壳菌素(chametoglobosin)是球毛壳菌抑制肿瘤细胞的主要物质<sup>[6]</sup>。为了进一步探究 S108 发酵液中具肿瘤抑制活性的化合物,我们对其次生代谢产物进行了分离纯化,对分离所得的化合物进行结构鉴定,并进行黑色素瘤抑制活性试验,以期发现具有潜在活性的化合物,这对于丰富球毛壳菌次生代谢产物及其功能多样性具有重要意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、仪器与试剂

#### 1.1.1 菌株材料

内生菌 S108 分离样品采集自江西省东乡县岗上积镇(N28°14', E116°36')野外健康的东乡野生稻的茎部,现保存于江西省生物加工过程重点实验室。ITS-rRNA 序列比对结果显示,该菌株与球毛壳菌 *C. globosum* 序列同源性高达 99% (accession number: KF558876),因而将其归属为 *C. globosum*。

#### 1.1.2 培养基

土豆葡萄糖琼脂(PDA)培养基(g/L):200 g 土豆、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g,121 °C 灭菌 25 min。土豆葡萄糖肉汤(PDB)培养基(g/L):200 g 土豆、葡萄糖 20 g,121 °C 灭菌 25 min。大米培养基:大米 80 g,蒸馏水 120 mL,121 °C 灭菌 25 min。

#### 1.1.3 主要仪器与试剂

Bruker AV-400 和 AV-600 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);AB5600 + QTOF 高分辨液质联用仪(美国 SCIEX 公司);PURIFLASH450 中压层析系统(法国 Interchim 公司);Waters 1525 型超高效液相(美国 Waters 公司);Waters 2489 型半制备液相(美国 Waters 公司);Spectramax M2 酶标仪(美国分子仪器公司);分析型色谱柱 ODS-C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm,日本 YMC 公司);制备型色谱柱 ODS-C<sub>18</sub>(250 mm × 10 mm,日本 YMC 公司);正相色谱硅胶(青岛海洋化工厂);葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(美国 Amersham 公司);色谱级纯甲醇、乙腈(德国 Merck 公司);分析纯甲醇、乙酸乙酯、乙腈、石油醚、二氯甲烷、无水乙醇、75%乙醇(天津市永大化学试剂开发中心);色谱纯甲醇、乙腈(德国 Merck 公司);小鼠黑色素瘤细胞 B16(武汉普诺赛生命科技有限公司);威罗菲尼(vemurafenib,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

## 1.2 真菌活化及培养

将菌株 S108 接种至 PDA 培养基中培养 4 天使其活化(28 °C),待菌落长满平板后,挑取一小块培养基接入到含有 100 mL 种子培养基(PDB)的 250 mL 三角瓶中培养 5 天后得到种子培养液(28 °C, 160 rpm),把种子培养液接种到 40 瓶大米发酵培养基中,每瓶接种量为 5 mL,静置培养 40 天(28 °C)。

## 1.3 提取与分离

菌株 S108 培养 40 天后,收集发酵产物加入 80% 乙醇超声波辅助提取 4 次,收集提取液将其减压浓缩至 3 L 便于下一步的提取,再用乙酸乙酯萃取 4 次后收集萃取液减压浓缩获得 5.2 g 乙酸乙酯相提取液浸膏。浸膏使用 200 ~ 300 正相硅胶进行分离,流动相为石油醚:乙酸乙酯(5:1 → 1:1),TLC 指示合并得到组分 A ~ E。B 组分(石油醚:乙酸乙酯 = 4:1)用正相硅胶柱(石油醚:乙酸乙酯 = 30:1 → 2:1)洗脱得到亚组份 B1 ~ B4,其中 B2 组分用制备液相(乙腈:水 = 95:5)纯化得到化合物 1(2 mg,  $t_R = 10$  min),B4 组分用制备液相(乙腈:水 = 8:2)纯化得到化合物 2(1.2 mg,  $t_R = 14$  min)。组分 C(石油醚:乙酸乙酯 = 3:1)经正相硅胶柱洗脱(石油醚:乙酸乙酯 = 10:1 → 6:1)得到亚组分 C1 ~ C3,C3 组分经制备液相(乙腈:水 = 6:1)纯化分别得到化合物 3(1.8 mg,  $t_R = 7$  min),化合物 4(1.2 mg,  $t_R = 18$  min)和化合物 5(2 mg,  $t_R = 22$  min)。组分 D(石油醚:乙酸乙酯 = 1:1)经正相硅胶柱洗脱(石油醚:乙酸乙酯 = 5:1 → 4:1)得到亚组分 D1 ~ D5,D2 组分用制备液相(乙腈:水 = 3:7)纯化得到化合物 6(1.8 mg,  $t_R = 8$  min),D5 组分用制备液相(乙腈:水 = 3:7)纯化得到化合物 7(2.2 mg,  $t_R = 13$  min)。

## 1.4 黑色素瘤 B16 细胞活力试验

黑色素瘤细胞抑制活性实验参考文献方法<sup>[7]</sup>。首先,将对数生长期的小鼠黑色素瘤 B16 细胞按照密度为  $4 \times 10^4$ /mL 的细胞悬液均匀地接种到 96 孔板中,100  $\mu$ L/孔,5% CO<sub>2</sub>,37 °C 孵育 24 h 使细胞稳定生长。待测化合物 1 ~ 7 用 DMSO 稀释至 1 mg/mL,后用含有 10% 胎牛血清(FBS)的培养基稀释成不同的浓度(2.5、5、10  $\mu$ M)后加入 96 孔板中,各浓度平行试验 6 次。阳性对照加入威罗菲尼,空白对照组加入培养基,同时再设置一组对照组加入 0.2% 的 DMSO,在培养 24 h 和 48 h 后,再分别加入 CCK-8 试剂(10  $\mu$ L/孔),于培养箱中孵育 4 h 后,用酶标仪于 450 nm 处测其 OD 值,根据公式:细胞抑制率 =

(对照组平均 OD 值-实验组平均 OD 值)/(对照组平均 OD 值-空白组平均 OD 值) × 100%, 计算细胞抑制率。

## 2 结果和分析

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 白色粉末, 溶于甲醇; 分子式为  $C_{24}H_{38}O_4$ ; HR-ESI-MS:  $m/z$  391. 271 8  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  413. 252 8  $[M + Na]^+$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7. 73 (2H, dd,  $J = 7. 4, 2. 4$  Hz, H-3, H-6''), 7. 64 (2H, m, H-4'', H-5''), 4. 23 (4H, d,  $J = 4. 2$  Hz,  $2 \times OCH_2$ ), 1. 73 ~ 1. 68 (1H, m, H-2, H-2'), 1. 45 (2H,

dd,  $J = 12. 7, 6. 6$  Hz, H-3), 1. 42 ~ 1. 38 (2H, m, H-4, H-4'), 1. 36 (4H, d,  $J = 3. 9$  Hz, H-5, H-5', H-7, H-7'), 0. 96 ~ 0. 97 (6H, m, H-6, H-6', H-8, H-8');  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 67. 7 (C-1, C-1'), 38. 8 (C-2, C-2'), 30. 2 (C-3, C-3'), 28. 8 (C-4, C-4'), 22. 7 (C-5, C-5'), 10. 0 (C-6, C-6'), 23. 6 (C-7, C-7'), 13. 0 (C-8, C-8'), 132. 2 (C-1'', C-2''), 128. 5 (C-3'', C-6''), 131. 0 (C-4'', C-5''), 168. 0 (C=O)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为 di-octyl phthalate (结构见图 1)。

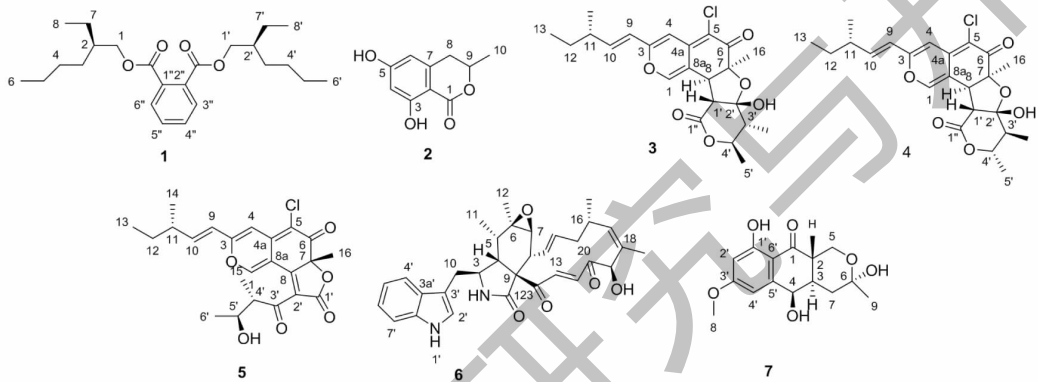


图 1 化合物 1~7 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-7

**化合物 2** 淡黄油状, 溶于氯仿; 分子式为  $C_{10}H_{10}O_4$ ; HR-ESI-MS:  $m/z$  195. 065 8  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  217. 046 6  $[M + Na]^+$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6. 25 (1H, d,  $J = 2. 2$  Hz, H-3), 6. 21 ~ 6. 16 (1H, m, H-9), 4. 65 (1H, ddd,  $J = 9. 5, 6. 2, 5. 4$  Hz, H-5), 2. 94 ~ 2. 68 (2H, m, H-8), 1. 48 (3H, d,  $J = 6. 3$  Hz, H-10);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 170. 3 (C-1), 164. 6 (C-3), 164. 0 (C-5), 141. 6 (C-2), 106. 9 (C-4), 101. 4 (C-6), 100. 4 (C-7), 75. 7 (C-9), 34. 6 (C-8), 20. 4 (C-10)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为 6-hydroxymellein。

**化合物 3** 黄色粉末, 溶于氯仿; 分子式为  $C_{23}H_{27}O_6Cl$ ; HR-ESI-MS:  $m/z$  435. 156 9  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  457. 138 7  $[M + Na]^+$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7. 28 (1H, s, H-1), 6. 55 (1H, s, H-4), 2. 98 (1H, d,  $J = 10. 0$  Hz, H-8), 6. 06 (1H, d,  $J = 15. 5$  Hz, H-9), 6. 52 (1H, dd,  $J = 15. 5, 6. 5$  Hz, H-10), 2. 26 (1H, m, H-11), 1. 43 (2H, m, H-12), 0. 91 (3H, t,  $J = 7. 5$  Hz, H-13), 1. 40 (3H, s, 7-Me), 1. 08 (3H, d,  $J = 6. 5$  Hz,

11-Me), 3. 08 (1H, d,  $J = 10. 0$  Hz, H-1'), 1. 90 (1H, dq,  $J = 10. 2, 6. 5$  Hz, H-3'), 4. 30 (1H, dq,  $J = 10. 2, 6. 2$  Hz, H-4'), 1. 41 (3H, d,  $J = 6. 2$  Hz, H-5'), 1. 13 (3H, d,  $J = 6. 5$  Hz, 3'-Me);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 145. 6 (C-1), 157. 7 (C-3), 105. 0 (C-4), 140. 5 (C-4a), 110. 1 (C-5), 189. 2 (C-6), 84. 0 (C-7), 50. 5 (C-8), 114. 3 (8a), 120. 2 (C-9), 146. 9 (C-10), 38. 9 (C-11), 29. 2 (C-12), 11. 7 (C-13), 23. 3 (C-7-Me), 19. 4 (C-11-Me), 58. 2 (C-1'), 104. 2 (C-2'), 44. 9 (C-3'), 76. 9 (C-4'), 18. 6 (C-5'), 8. 8 (C-3'-Me), 170. 5 (C-1'')。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为 chaetomugilin D。

**化合物 4** 黄色粉末, 溶于丙酮; 分子式为  $C_{23}H_{27}O_6Cl$ 。HR-ESI-MS:  $m/z$  435. 156 1  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  457. 138 2  $[M + Na]^+$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 7. 40 (1H, s, H-1), 6. 55 (1H, s, H-4), 2. 98 (1H, d,  $J = 10. 1$  Hz, H-8), 6. 03 (1H, d,  $J = 15. 8$  Hz, H-9), 6. 48 (1H, dd,  $J = 15. 8, 8. 2$  Hz, H-10), 2. 26 (1H, m, H-11), 1. 42 (2H, m, H-12), 0. 90 (3H,

t,  $J = 7.4$  Hz, H-13), 1.49 (3H, s, 7-Me), 1.08 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, 11-Me), 3.03 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz, H-1'), 1.90 (1H, dq,  $J = 10.0, 6.9$  Hz, H-3'), 4.21 (1H, dq,  $J = 10.0, 6.4$  Hz, H-4'), 1.38 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-5'), 1.07 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, 3'-Me);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 145.6 (C-1), 157.7 (C-3), 105.0 (C-4), 140.4 (C-4a), 110.1 (C-5), 189.2 (C-6), 84.0 (C-7), 50.6 (C-8), 114.3 (8a), 120.2 (C-9), 146.9 (C-10), 38.9 (C-11), 29.2 (C-12), 11.7 (C-13), 23.2 (C-7-Me), 19.4 (C-11-Me), 170.6 (C-1'), 58.3 (C-2'), 104.2 (C-3'), 44.9 (C-4'), 76.9 (C-5'), 18.7 (C-6'), 8.8 (4'-Me)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道一致,故鉴定该化合物为 chaetomugilin S。

**化合物 5** 黄色粉末,溶于丙酮;分子式为  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{Cl}$ 。HR-ESI-MS:  $m/z$  433.140 1 [M + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  455.122 3 [M + Na]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 7.27 (1H, s, H-1), 6.55 (1H, s, H-4), 2.98 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz, H-8), 6.06 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz, H-9), 6.52 (1H, dd,  $J = 15.8, 8.2$  Hz, H-10), 2.26 (1H, m, H-11), 1.42 (2H, m, H-12), 0.90 (3H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-13), 1.41 (3H, s, 7-Me), 1.08 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, 11-Me), 3.03 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz, H-1'), 1.90 (1H, dq,  $J = 10.0, 6.9$  Hz, H-3'), 4.30 (1H, dq,  $J = 10.0, 6.4$  Hz, H-4'), 1.41 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-5'), 1.13 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, 3'-Me);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 201.2 (C-3'), 183.4 (C-6), 167.9 (C-1'), 162.7 (C-8), 157.1 (C-3), 151.5 (C-1), 148.0 (C-10), 139.7 (C-4a), 125.1 (C-2'), 119.8 (C-9), 110.4 (C-8a), 108.9 (C-5), 105.4 (C-4), 87.6 (C-7), 70.9 (C-5'), 51.0 (C-4'), 39.0 (C-11), 29.1 (C-12), 26.2 (CH<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>'), 19.3 (CH<sub>3</sub>-C<sub>11</sub>), 13.5 (C-6'), 11.7 (C-13)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道一致,故鉴定该化合物为 chaetoviridin A。

**化合物 6** 黄色粉末,溶于丙酮;分子式为  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{N}_2$ 。HR-ESI-MS:  $m/z$  551.251 3 [M + Na]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 6.27 (1H, s, NH-2), 3.87 (1H, m, H-3), 3.13 (1H, dd,  $J = 8.6, 3.7$  Hz, H-4), 1.89 (1H, m, H-5), 2.83 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-7), 2.23 (1H, m, H-8), 2.86 (1H, dd,  $J = 8.0, 4.2$  Hz, H<sub>a</sub>-10), 2.54 (1H, dd,  $J = 15.0, 7.9$  Hz, H<sub>b</sub>-10), 1.15 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-11), 1.27 (3H, s, H-12),

6.17 (1H, dd,  $J = 10.0, 15.0$  Hz, H-13), 5.11 (1H, m, H-14), 2.20 (1H, m, H<sub>a</sub>-15), 1.80 (1H, m, H<sub>b</sub>-15), 2.41 (1H, m, H-16), 5.49 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-17), 5.09 (1H, s, H-19), 6.57 (1H, d,  $J = 16.7$  Hz, H-21), 7.62 (1H, d,  $J = 16.7$  Hz, H-22), 1.10 (3H, d,  $J = 5.6$  Hz, Me-16), 1.39 (3H, s, Me-18), 3.71 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, OH-19), 8.13 (1H, s, NH-1'), 6.85 (1H, s, H-2'), 7.39 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-4'), 7.14 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-5'), 7.19 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-6'), 7.29 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-7');  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 201.0 (C-20), 197.8 (C-23), 172.8 (C-1), 138.9 (C-17), 136.7 (C-1'a), 135.7 (C-21), 132.7 (C-22), 132.6 (C-14), 132.2 (C-18), 128.9 (C-13), 127.8 (C-3'a), 124.2 (C-5'), 121.2 (C-2'), 118.9 (C-6'), 118.5 (C-4'), 111.4 (C-7'), 109.7 (C-3'), 63.2 (C-9), 62.0 (C-7), 57.2 (C-6), 52.2 (C-3), 48.3 (C-8), 46.7 (C-4), 41.3 (C-15), 36.4 (C-5), 33.2 (C-10), 32.0 (C-16), 20.4 (CH<sub>3</sub>-C<sub>16</sub>), 12.3 (CH<sub>3</sub>-11), 9.8 (CH<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道一致,故鉴定该化合物为 chaetoglobosin A。

**化合物 7** 淡黄色粉末,溶于丙酮;分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 。HR-ESI-MS:  $m/z$  293.090 4 [M-H]<sup>-</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 12.20 (1H, s), 6.59 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-4'), 6.43 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-2'), 4.93 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, H-4), 4.02 (1H, dd,  $J = 11.6, 8.3$  Hz, H-5), 3.86 (3H, s, H-8), 3.79 (1H, dd,  $J = 11.6, 8.6$  Hz, H-5), 3.08 ~ 3.02 (1H, m, H-2), 3.00 (1H, d,  $J = 3.1$  Hz, H-3), 2.08 (1H, d,  $J = 11.8$  Hz, H-7), 1.97 (1H, dd,  $J = 11.9, 4.2$  Hz, H-7), 1.56 (3H, s, H-9);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 202.9 (C-1), 166.6 (C-1'), 165.2 (C-3'), 140.3 (C-6'), 110.0 (C-2'), 108.6 (C-4'), 106.4 (C-5'), 101.7 (C-6), 76.9 (C-4), 62.9 (C-5), 55.8 (C-8), 44.9 (C-3), 39.9 (C-2), 39.1 (C-7), 23.8 (C-9)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道一致,故鉴定该化合物为 6-O-demethyl-5-deoxyfusarubin。

## 2.2 黑色素瘤 B16 细胞活力试验

将分离纯化后获得的 7 个单体化合物进行黑色素瘤 B16 细胞活力影响试验,结果显示,当各化合物浓度均为 5  $\mu\text{mol/L}$  时,仅有化合物 2 对黑色素瘤 B16 细胞有一定的抑制活性,其余化合物未见明显抑制肿瘤细胞增殖作用。如表 1 所示,当化合物 2

的浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  时,与对照组相比黑色素瘤 B16 细胞存活率有明显下降,且随浓度的增加,对 B16 细胞杀伤能力随之增强,在药物浓度达到 10  $\mu\text{mol/L}$  时,细胞死亡最多,其  $\text{IC}_{50}$  值为 2.24  $\mu\text{mol/L}$ ,与

阳性对照威罗菲尼(vemurafenib)相比,化合物 **2** 显示出良好的抑制效果;在作用 48 h 后,仍有良好的抑制作用,且随浓度的增大 B16 细胞存活率有明显的降低,其  $\text{IC}_{50}$  值为 2.28  $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 化合物 **2** 对黑色素瘤 B16 细胞的抑制率 ( $n=6$ )

Table 1 Inhibition rate of compound **2** on melanoma B16 cells ( $n=6$ )

组别 Group	抑制率 Inhibition rate (%)		$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>2</b> (2.5 $\mu\text{mol/L}$ )	45.74 $\pm$ 7.03 *	45.09 $\pm$ 6.87 *	2.24	2.28
<b>2</b> (5.0 $\mu\text{mol/L}$ )	61.56 $\pm$ 3.35 **	48.72 $\pm$ 8.51 **	-	-
<b>2</b> (10.0 $\mu\text{mol/L}$ )	77.79 $\pm$ 1.86 **	77.22 $\pm$ 0.84 **	-	-
威罗菲尼 Vemurafenib (10.0 $\mu\text{mol/L}$ )	88.78 $\pm$ 4.54 **	86.39 $\pm$ 7.38 **	0.94	0.96
0.2% DMSO	4.13 $\pm$ 1.75	9.87 $\pm$ 5.17	-	-

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , 具有显著性差异; \*\*  $P < 0.01$ , 具有极显著性差异。

Note: Compared with blank control, \*  $P < 0.05$ , significant difference; \*\*  $P < 0.01$ , extremely significant difference.

### 3 讨论

*C. globosum* 为毛壳菌科、毛壳菌属真菌,自 1973 年 Sekita 从 *C. globosum* 中分离到球毛壳菌素 A 和 B 以来,已从球毛壳菌属中发现了 400 多个结构新颖的活性次级代谢产物,这些化合物主要包括球毛壳菌素类、嗜氮酮类、萜类、酯类、黄酮类、异香豆素类等<sup>[15]</sup>,其中球毛壳菌素类与嗜氮酮类化合物占绝大多数,而异香豆素类等其他化合物则较少被分离,仅 Yan 等<sup>[16]</sup>从银杏来源的球毛壳菌中分离到异香豆素类化合物 prochaetoviridin A。本研究从 S108 中分离得到 chaetomugilin D (**3**)、chaetomugilin S (**4**)、chaetoviridins A (**5**) 等 3 个嗜氮酮类化合物以及该菌中常见的生物碱类化合物球毛壳素 A (**6**),同时从中分离到异香豆素类化合物 6-hydroxymellein (**2**) 及萘醌类化合物 6-*O*-demethyl-5-deoxyfusarubin (**7**),化合物 **2** 和 **7** 均为首次从毛壳菌属真菌中分离得到。6-Hydroxymellein (**2**) 是一种常见的生物合成中间体,微生物以其为前体可以合成众多的结构类似物<sup>[17]</sup>,这表明 S108 基因组中可能含有相关的聚酮合成酶(PKS)基因簇,开展 S108 的次级代谢产物的进一步挖掘,有望从中分离出新结构、新活性的化合物。

本研究从球毛壳菌 *C. globosum* S108 中分离纯化得到的 7 个化合物,其生物活性已有较多报道,chaetomugilin D (**3**)、chaetomugilin S (**4**)、chaetoviridins A (**5**) 等嗜氮酮类化合物,其中化合物 **3**、**4** 可有效抑制幼苗的生长,如 Wang 等<sup>[18]</sup>从一株银杏来源

的球毛壳菌中分离得到的化合物 **3**、**4** 对幼苗生长有明显的抑制作用,与广谱除草剂草甘膦相比其  $\text{IC}_{50}$  更低,因此有待被开发为天然环保型除草剂。化合物 **5** 显示出良好的抗真菌活性,对核盘病菌有良好抑制作用,其防治效果与广谱杀菌剂多菌灵效果相当<sup>[16]</sup>。球毛壳素 A (**6**) 亦显示了较好的抗癌活性,如 Knudsen 等<sup>[19]</sup>研究发现从青霉菌中分离到的化合物 **6** 可作为治疗慢性淋巴白血病 (CLL) 的潜在药物,在模拟淋巴组织的培养条件下,也表现出显著的诱导 CLL 细胞凋亡作用。目前,有关 6-*O*-demethyl-5-deoxyfusarubin (**7**) 活性未有报道,但其类似物镰红菌素具有抑制血液肿瘤细胞系的增殖并增加细胞凋亡的作用<sup>[20]</sup>。本研究以黑色素瘤 B16 细胞为对象,开展化合物抑制肿瘤细胞的评价,结果表明,除化合物 **2** 外,其他 6 种化合物均对黑色素瘤 B16 细胞没有抑制作用。

迄今,6-hydroxymellein (**2**) 仅从红树的内生真菌褐瘤菌 (*Daldinia eschscholtzii*) 和土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 中分离得到,发现其对拟南芥花粉发育有抑制作用<sup>[9,21]</sup>。此外, Yang 等<sup>[22]</sup>发现化合物 **2** 对于人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和人胰腺癌细胞 PANC-1 无抑制作用,对非小细胞肺癌细胞 A549 和人肝癌细胞 BEL-7402 仅有微弱的抑制活性,其  $\text{IC}_{50}$  分别为 170.6 mg/L 和 315.0 mg/L。本研究首次发现 6-hydroxymellein (**2**) 对黑色素瘤 B16 细胞有良好的抑制活性,  $\text{IC}_{50}$  为 2.24  $\mu\text{mol/L}$ 。黑色素瘤作为临床上常见的皮肤恶性肿瘤,病恶性程度高、易转移,发病

率有逐年增加趋势<sup>[23]</sup>,因此 6-hydroxymellein(2)新活性的发现有助于黑色素瘤治疗药物的研发,同时为治疗黑色素瘤药物开发提供了新思路。

#### 参考文献

- Vasundhara M, Kumar A, Reddy MS, et al. Molecular approaches to screen bioactive compounds from endophytic fungi [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:1774.
- Yan L, Zhu J, Zhao X, et al. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2019, 103:3327-3340.
- Zuo J, Gao J, He RH, et al. Preliminary localization of cold resistance QTL in Dongxiang wild rice seedling stage [J]. *Hybrid Rice( 杂交水稻)*, 2012, 27(3):56-59.
- Mao D, Yu L, Chen D, et al. Multiple cold resistance loci confer the high cold tolerance adaptation of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) to its high-latitude habitat [J]. *Theor Appl Genet*, 2015, 128:1359-1371.
- Wang Y, Gao BL, Li XX, et al. Phylogenetic diversity of culturable endophytic fungi in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff), detection of polyketide synthase gene and their antagonistic activity analysis [J]. *Fungal Biol*, 2015, 119:1032-1045.
- Jiang C, Song J, Zhang J, et al. New productions process of the antifungal chaetoglobosin A using cornstalks [J]. *Braz J Microbiol*, 2017, 48:410-418.
- Nyawade EA, Sibuyi NRS, Meyer M, et al. Synthesis, characterization and anticancer activity of new 2-acetyl-5-methyl thiophene and cinnamaldehyde thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes [J]. *Inorganica Chim Acta*, 2021, 515:120036.
- Wohlfarth C. Refractive index of the mixture (1) diethyl ether; (2) 1-ethoxy-2-methylpropane [M]. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- Shimada A, Kusano M, Takeuchi S, et al. Asperterric acid and 6-hydroxymellein, inhibitors of pollen development in *Arabidopsis thaliana*, produced by *Aspergillus terreus* [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2002, 57(5-6):459-464.
- Piyasena KGNP, Wickramarachchi WART, Kumar NS, et al. Two phytotoxic azaphilone derivatives from *Chaetomium globosum*, a fungal endophyte isolated from *Amaranthus viridis* leaves [J]. *Mycology*, 2015, 6(3-4):158-160.
- Wang DC, Zhang Y, Li X, et al. Potential allelopathic azaphilones produced by the endophytic *Chaetomium globosum* TY1 inhabited in *Ginkgo biloba* using the one strain-many compounds method [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31:724-728.
- Xu GB, Liu J, Xiao YH, et al. Isolation and identification of secondary metabolites of CiB-160 from *Trichoderma cinerea* and their immune activity [J]. *Nat Prod Res Dev( 天然产物研究与开发)*, 2016, 28:1562-1567.
- Jiang T, Wang M, Li L, et al. Overexpression of the global regulator LaeA in *Chaetomium globosum* leads to the biosynthesis of chaetoglobosin Z [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79:2487-2494.
- Parisot D, Devys M, Barbier M. 6-O-Demethyl-5-deoxyfusarubin and its anhydro derivative produced by a mutant of the fungus *Nectria haematococca* blocked in fusarubin biosynthesis [J]. *J Antibiot*, 1991, 44(1):103-107.
- Liang HL, Tong ZW, Zhu D, et al. Secondary metabolites from *Chaetomium globosum* and their bioactivities [J]. *Nat Prod Res Dev( 天然产物研究与开发)* 2018, 30:702-707.
- Yan W, Cao LL, Zhang YY, et al. New metabolites from endophytic fungus *Chaetomium globosum* CDW7 [J]. *Molecules*, 2018, 23(11):2873.
- Ugai T, Minami A, Tanaka S, et al. Biosynthetic machinery of 6-hydroxymellein derivatives leading to cyclohelminthols and palmaenones [J]. *ChemBioChem*, 2020, 21:360-367.
- Wang D, Zhang Y, Li X, et al. Potential allelopathic azaphilones produced by the endophytic *Chaetomium globosum* TY1 inhabited in *Ginkgo biloba* using the one strain-many compounds method [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31:724-728.
- Knudsen PB, Hanna B, Ohl S, et al. Chaetoglobosin A preferentially induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by targeting the cytoskeleton [J]. *Leukemia*, 2013, 28:1289-1298.
- Adorisio S, Fierabracci A, Muscari I, et al. Fusarubin and anhydrofusarubin isolated from a *Cladosporium* species inhibit cell growth in human cancer cell lines [J]. *Toxins*, 2019, 11(9):503.
- Liao HX, Shao TM, Mei RQ, et al. Bioactive secondary metabolites from the culture of the mangrove-derived fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ004 [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12):710.
- Yang ZJ, Yin Y, Ge M. A novel chromene with anti-tumor activities from fungus *Phomopsis* sp [J]. *China J Chin Mater Med( 中国中药杂志)*, 2015, 40:667-671.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363:809-819.