

## 忍冬木层孔菌液体培养物的化学成分研究

张宏岐<sup>1,2,3</sup>, 邓改改<sup>1,2,3</sup>, 汪鋈植<sup>2,3\*</sup>, 胡 昆<sup>2</sup>, 陈滢滢<sup>1</sup>, 李堂丽<sup>1</sup><sup>1</sup>三峡大学医学院; <sup>2</sup>天然产物研究与利用湖北省重点实验室(三峡大学);<sup>3</sup>湖北省生物酵素工程技术研究中心(三峡大学), 宜昌 443002

**摘要:**忍冬木层孔菌(*Phellinus lonicerinus*(Bond.) Bond. et Sing)为湖北等地习用的桑黄品种,也是土家族常用药。对忍冬木层孔菌液体培养物的化学成分及其体外抗肿瘤活性进行研究。通过硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱及半制备型 HPLC 等色谱分离技术从忍冬木层孔菌发酵液及菌丝体中分离得到 10 个化合物,经核磁共振,质谱等现代波谱学技术将它们的结构分别鉴定为环(*L*-缬-*L*-脯)二肽(**1**)、环(*L*-亮-*L*-脯)二肽(**2**)、环(*L*-异亮-*L*-脯)二肽(**3**)、环(*L*-丙-*L*-脯)二肽(**4**)、麦角甾醇(**5**)、麦角甾-7,22-二烯-3,6-二酮(**6**)、过氧麦角甾醇(**7**)、苯乙酸(**8**)、对羟基苯甲醛(**9**)和 4-羟基苯乙酸(**10**)。除化合物 **5**, **6** 和 **7** 外,其余 7 个化合物均为首次从该真菌中分离得到。体外细胞毒活性显示化合物 **1**~**4** 对胃癌细胞株 HGC-27 和子宫内膜癌细胞株 RL95-2 有不同程度的抑制活性,其中化合物 **3** 抑制活性最强,对 HGC-27 和 RL95-2 的 IC<sub>50</sub> 分别为 6.69 μM 和 12.81 μM。

**关键词:**忍冬木层孔菌;化学成分;细胞毒活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)11-1866-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.11.008

Study on constituents from cultures of fungus *Phellinus lonicerinus*ZHANG Hong-qi<sup>1,2,3</sup>, DENG Gai-gai<sup>1,2,3</sup>,WANG Jun-zhi<sup>2,3\*</sup>, HU Kun<sup>2</sup>, CHEN Ying-lu<sup>1</sup>, LI Tang-li<sup>1</sup><sup>1</sup>Medical College of China Three Gorges University;<sup>2</sup>Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development (China Three Gorges University);<sup>3</sup>Hubei Engineering Research Center for Biological Jiaosu(China Three Gorges University), Yichang 443002, China

**Abstract:** *Phellinus lonicerinus* is a mushroom that belongs to the genus *Sanghuangporus* and it is commonly used in Hubei and other places, which is also commonly used by Tujia ethnic minority. To investigate the chemical constituents of the culture of *P. lonicerinus* and their cytotoxicity, the constituents of the fermentation liquid and mycelium from *P. lonicerinus* were separated and purified by chromatographic techniques, including column chromatography of silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC. Their structures were mainly elucidated by NMR and MS spectroscopic techniques. Ten compounds were isolated and purified. They were identified as cyclo (*L*-Val-*L*-Pro) (**1**), cyclo (*L*-Leu-*L*-Pro) (**2**), cyclo (*L*-Ile-*L*-Pro) (**3**), cyclo (*L*-Ala-*L*-Pro) (**4**), ergosterol (**5**), ergosterol-7,22-diene-3,6-diketone (**6**), ergosterol peroxide (**7**), phenylacetic acid (**8**), P-hydroxy benzaldehyde (**9**) and 4-hydroxyphenylacetic acid (**10**). Except compounds **5**, **6** and **7**, the other seven compounds were isolated from this fungus for the first time. Compounds **1-10** were tested for their cytotoxicities against human tumor cell lines HGC-27, HeLa, MCF-7, RL95-2, and compounds **1-4** exhibited inhibitory effects on HGC-27 and RL95-2 cell lines. Especially, the most promising compound **3** inhibited the proliferation of HGC-27 and RL95-2 cell lines with IC<sub>50</sub> values of 6.69 μM and 12.81 μM, respectively.

**Key words:** *Phellinus lonicerinus* (Bond.) Bond. et Sing; chemical constituents; cytotoxicity忍冬木层孔菌(*Phellinus lonicerinus* (Bond.))Bond. et Sing)为木层孔菌属的一种多孔真菌,其干燥子实体是药用真菌桑黄的品种之一,也是土家族常用药材,收载于《湖北省中药材质量标准》2009年版<sup>[1]</sup>。桑黄是目前国际公认的抗癌效果最好的药

收稿日期:2021-03-24

接受日期:2021-06-11

基金项目:湖北省自然科学基金(2016CFB332);湖北省生物酵素工程技术研究中心开放基金(JS2020-03)

\*通信作者 Tel:86-717-6397478; E-mail:wangjunzhi@ctgu.edu.cn

用真菌之一,作为桑黄使用的裂蹄针层孔菌 *P. linteus*, 鲍氏木层孔菌 *P. baumii* 等忍冬木层孔菌近缘品种的抗癌活性均有报道<sup>[2]</sup>。课题组前期对忍冬木层孔菌子实体化学成分<sup>[3]</sup>、抗肿瘤活性<sup>[4,5]</sup>、质量控制<sup>[6]</sup>进行了研究。但由于受气候条件、地理分布及寄主植物的影响,野生桑黄资源珍稀濒危,桑黄的人工发酵可以较容易地对各种生长影响因素进行控制和优化,获得稳定高产的培养物。为获得桑黄基源菌种培养物替代野生桑黄子实体的潜在价值,探究发酵培养物和子实体之间的共同之处并加以利用,本文对忍冬木层孔菌培养液及其菌丝体中的化学成分进行了研究并对单体化合物的体外抗肿瘤活性进行了测试,以期桑黄培养物替代子实体来获得相关的活性化合物提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 仪器

Bruker 400 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker 公司,瑞士); Finnigin 电喷雾质谱仪(Finnigin 公司,美国); Waters1525EF(Waters 公司,美国)和 Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪(戴安公司,美国);制备柱为 Cosmosil Packed Column 5C-MS-II 10ID × 250 nm;分析柱为 Cosmosil Packed Column 5C-MS-II 4.6ID × 250 nm(Nacalai 公司,日本);WZZ-2S 数字式自动旋光仪(上海精科实业有限公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司,瑞士);U-3010 紫外-可见分光光度计(日立仪器(上海)有限公司,日本);N21001 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)等;柱色谱和薄层色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂产品,其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 菌种及细胞株

实验用忍冬木层孔菌采自湖北宜昌,经中国科学院微生物研究所卯晓岚教授鉴定为忍冬木层孔菌(*Phellinus lonicerinus* (Bond.) Bond. et Sing),标本及菌种现保存于三峡大学生物与制药学院天然产物研究利用湖北省重点实验室。

胃癌细胞株 HGC-27、宫颈癌细胞株 HeLa、乳腺癌细胞株 MCF-7 及子宫内膜癌细胞株 RL95-2 均购买于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌种发酵培养

将菌种从 4 °C 冰箱中取出于 25 °C 恒温培养箱中培养 1 天后转接至 PDA 固体平板上,25 °C 恒温培

养 7 天。活化后的菌种长满平板后,用灭菌的打孔器打孔,取菌龄一致的 5 块菌块接种至液体培养基中(250 mL/500 mL 三角瓶),25 °C、150 rpm 恒温震荡培养。培养 6 天后用匀浆机在超净工作台中匀浆,作为种子培养液以 10% 接种量接种至新的液体培养基内,28 °C、150 rpm 恒温震荡培养 14 天。新培养基配方:葡萄糖 30 g/L,酵母膏 5 g/L,蛋白胨 4 g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L,MgSO<sub>4</sub>·0.75 g/L,VB<sub>1</sub> 0.024 475 μg/L。

### 1.2.2 提取分离

菌株发酵 14 天后,发酵液经 3~4 层纱布过滤后除菌丝体,滤液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相,45 °C 真空浓缩后得乙酸乙酯萃取物 2.5 g。过滤得到的菌丝体经烘箱 45 °C 干燥后,用适量 95% 乙醇冷凝回流提取 3 次,合并乙醇相,真空浓缩后乙酸乙酯萃取,回收溶剂得乙酸乙酯萃取物 1.6 g。

发酵液乙酸乙酯萃取物 2.5 g,甲醇溶解后,经 200~300 目正相硅胶柱层析分离,以石油醚-丙酮(100:0,90:10,80:20,75:25,70:30,65:35,60:40,55:45,1:1)梯度洗脱,甲醇冲柱得 10 个组分(Fr. 1~Fr. 10),Fr. 3(200 mg)经 Sephadex LH-20(氯仿:甲醇=1:1)凝胶色谱,继而经反相 HPLC 半制备色谱(30% 乙腈-水为流动相),反复纯化得化合物 **1**(22.8 mg)、**2**(16.3 mg)、**3**(10.2 mg)、**4**(5.6 mg)。Fr. 4(100 mg)经 Sephadex LH-20(氯仿:甲醇=1:1)凝胶色谱,继而经硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(100:0,90:10,80:20,70:30,60:40,1:1)梯度反复纯化得化合物 **8**(10.6 mg)、**9**(7.8 mg)、**10**(9.6 mg)。

菌丝体提取物乙酸乙酯萃取物 1.6 g,丙酮溶解后,经 200~300 目正相硅胶柱层析分离,以石油醚-丙酮(100:0,90:10,80:20,70:30,60:40,1:1)梯度洗脱,甲醇冲柱得 7 个组分(Fr. 1~Fr. 7),Fr. 3(300 mg)经 Sephadex LH-20(氯仿:甲醇=1:1)凝胶色谱,继而经硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(100:0,90:10,80:20,70:30,60:40,1:1)梯度反复纯化得化合物 **5**(30.2 mg)、**6**(11.6 mg)、**7**(22.3 mg)。

### 1.2.3 细胞毒活性筛选

用 MTT 法检测 10 个化合物对 HGC-27、HeLa、MCF-7、RL95-2 细胞株的细胞毒活性。从母液开始,依次 4 倍稀释,共 5 个梯度,对数生长期的 HGC-27、HeLa、MCF-7 及 RL95-2 细胞分别接种于 96 孔板,

每孔 100  $\mu\text{L}$  (约  $1 \times 10^4$  个细胞/孔), 6 h 后加入不同浓度药物 100  $\mu\text{L}$ , 每一浓度 3 个重复孔, 培养 24 h 后加入 MTT 10  $\mu\text{L}$  (质量浓度为 5 mg/mL), 继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入二甲亚砜 100  $\mu\text{L}$  后用酶联免疫检测仪测定 492 nm 处吸光度 OD 值, 计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率 = [(对照组平均 OD 值 - 实验组平均 OD 值) / 对照组平均 OD 值]  $\times 100\%$ 。以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法计算化合物的  $\text{IC}_{50}$  值。

## 2 实验结果

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 白色针晶 ( $\text{CHCl}_3$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 105.2$  ( $c$  0.5, MeOH); 茛三酮显色阴性, 薄层原位酸水解后茛三酮显色阳性, 提示为环肽类成分。ESI-MS:

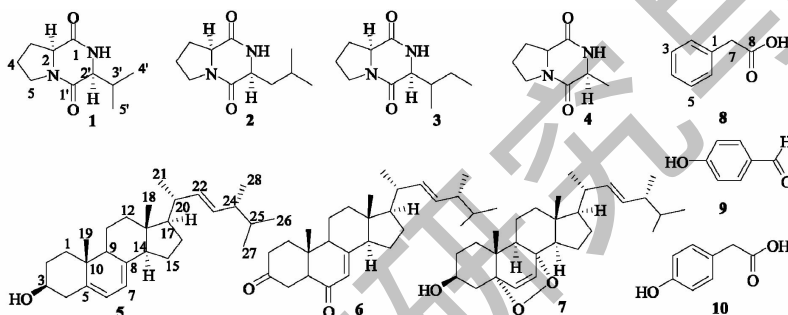


图 1 化合物 1~10 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-10

**化合物 2** 白色粉末 ( $\text{CHCl}_3$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 44.6$  ( $c$  0.5, MeOH); ESI-MS:  $m/z$  233  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.12 (1H, s, N-H), 4.12 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-2), 4.02 (1H, dd,  $J = 12.0, 4.0$  Hz, H-2'), 3.56 (2H, m, H-5), 2.34 (1H, m, H-3a), 2.06 (3H, m, H-3b, H-4), 1.78 (2H, m, H-3'), 1.53 (1H, m, H-4'), 1.00 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 0.95 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-6');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.5 (C-1), 166.4 (C-1'), 59.2 (C-2), 53.6 (C-2'), 45.7 (C-5), 38.8 (C-3'), 28.3 (C-3), 24.8 (C-4'), 23.5 (C-5'), 22.9 (C-4), 21.4 (C-6'). 以上数据与文献<sup>[7]</sup>对照基本一致, 结合 Adamczeski 等经验规则, 故确定化合物 2 为环 (*L*-亮-*L*-脯) 二肽。

**化合物 3** 白色粉末 ( $\text{CHCl}_3$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 9.6$  ( $c$  0.5, MeOH); ESI-MS:  $m/z$  233  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.77 (1H, s, N-H), 4.08 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-2), 3.98 (1H, s, H-2'), 3.59 (2H, m,

$m/z$  219  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 415  $[\text{2M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.08 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-2), 3.94 (1H, s, H-2'), 3.54 (2H, m, H-5), 2.37 (2H, m, H-3), 2.04 (2H, m, H-4), 1.89 (1H, m, H-3'), 1.06 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-4'), 0.91 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.4 (C-1), 164.9 (C-1'), 60.5 (C-2), 58.9 (C-2'), 45.2 (C-5), 28.8 (C-3), 28.5 (C-3'), 22.4 (C-4), 19.4 (C-4'), 16.6 (C-5'). 以上数据与文献<sup>[7,8]</sup>对照基本一致, 根据 Adamczeski 等经验规则, 含脯氨酸的环二肽的旋光方向取仅决于脯氨酸的绝对构型, 当脯氨酸为 *L* 构型时, 环二肽的旋光方向为 (-), 故确定化合物 1 为环 (*L*-缬-*L*-脯) 二肽 (见图 1)。

H-5), 2.35 (2H, m, H-3), 2.05 (2H, m, H-4), 1.64 (1H, m, H-3'), 1.26 (2H, m, H-4'), 1.06 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-6'), 0.82 (3H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-5');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 169.9 (C-1), 165.1 (C-1'), 60.6 (C-2), 59.1 (C-2'), 45.5 (C-5), 35.6 (C-3'), 29.1 (C-3), 28.8 (C-4'), 22.5 (C-4), 16.3 (C-6'), 12.4 (C-5'). 以上数据与文献<sup>[7]</sup>对照基本一致, 结合 Adamczeski 等经验规则, 故确定化合物 3 为环 (*L*-异亮-*L*-脯) 二肽。

**化合物 4** 白色针晶 ( $\text{CHCl}_3$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 23.6$  ( $c$  0.5, MeOH); ESI-MS:  $m/z$  191  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.12 (1H, m, H-2), 4.02 (1H, m, H-2'), 3.56 (2H, m, H-5), 2.34 (1H, m, H-3a), 2.06 (3H, m, H-3b, H-4), 1.32 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-3');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171.2 (C-1), 164.1 (C-1'), 61.3 (C-2), 53.2 (C-2'), 47.4 (C-5), 28.7 (C-3), 23.8 (C-4), 19.6 (C-3'). 以上数据与文献<sup>[7]</sup>对照基本一致, 结合 Adamczeski 等经验规

则,故确定化合物 **4** 为环(*L*-丙-*L*-脯)二肽。

**化合物 5** 白色针晶( $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  - 118.6 ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); ESI-MS:  $m/z$  397  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.56 (1H, dd,  $J = 6.0, 2.4$  Hz, H-6), 5.35 (1H, m, H-7), 5.23 (2H, m, H-22, 23), 3.66 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-21), 0.94 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 0.84 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-26), 0.82 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-27), 0.62 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 141.4 (C-8), 139.8 (C-5), 135.6 (C-22), 131.9 (C-23), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 70.5 (C-3), 55.7 (C-17), 54.6 (C-14), 46.3 (C-9), 42.9 (C-13, 24), 40.8 (C-4), 40.5 (C-20), 39.1 (C-12), 38.4 (C-1), 37.1 (C-10), 33.1 (C-25), 32.0 (C-2), 28.3 (C-16), 23.0 (C-15), 21.1 (C-11, 21), 20.0 (C-27), 19.7 (C-26), 17.6 (C-19), 16.3 (C-28), 12.1 (C-18)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>对照基本一致,故确定化合物 **5** 为麦角甾醇。

**化合物 6** 白色针晶( $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  - 36.2 ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); ESI-MS:  $m/z$  411  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.78 (1H, s, H-7), 5.25 (1H, dd,  $J = 7.8, 15.3$  Hz, H-22), 5.17 (1H, dd,  $J = 15.3, 7.8$  Hz, H-23), 1.08 (3H, s, H-19), 1.05 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-21), 0.92 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 0.84 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-27), 0.83 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-26), 0.65 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 210.9 (C-3), 198.2 (C-6), 163.7 (C-8), 134.9 (C-22), 132.6 (C-23), 122.9 (C-7), 56.1 (C-17), 55.7 (C-14), 54.6 (C-5), 49.7 (C-9), 44.5 (C-13), 42.8 (C-24), 40.2 (C-20), 38.7 (C-10), 38.4 (C-1), 38.2 (C-12), 37.3 (C-4), 37.0 (C-2), 33.1 (C-25), 27.9 (C-16), 22.6 (C-15), 22.0 (C-11), 21.1 (C-21), 20.0 (C-27), 19.6 (C-26), 17.6 (C-28), 12.8 (C-19), 12.7 (C-18)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>对照基本一致,故确定化合物 **6** 为麦角甾-7,22-二烯-3,6-二酮。

**化合物 7** 无色针晶( $\text{CHCl}_3$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  - 29.2 ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); ESI-MS:  $m/z$  428  $[\text{M}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6.43 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-7), 6.22 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6), 5.23 (1H, dd,  $J = 15.6, 7.6$  Hz, H-22), 5.16 (1H, dd,  $J = 15.6, 7.2$  Hz, H-23), 4.63 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-21), 0.92 (3H, m, H-

28), 0.84 (3H, m, H-18), 0.83 (3H, m, H-25), 0.80 (3H, m, H-27);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 135.6 (C-6), 135.2 (C-22), 131.5 (C-23), 130.1 (C-7), 81.4 (C-5), 78.4 (C-8), 64.6 (C-3), 55.4 (C-17), 51.2 (C-14), 50.9 (C-9), 44.0 (C-13), 42.0 (C-24), 39.7 (C-20), 39.4 (C-12), 36.9 (C-4), 36.5 (C-10), 34.5 (C-1), 32.5 (C-25), 29.9 (C-2), 28.3 (C-16), 22.8 (C-11), 20.7 (C-21), 20.2 (C-15), 19.8 (C-26), 19.5 (C-27), 18.1 (C-19), 17.9 (C-28), 12.8 (C-18)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>对照基本一致,故确定化合物 **7** 为麦角甾醇过氧化物。

**化合物 8** 无色晶体( $\text{EtOAc}$ ); ESI-MS:  $m/z$  137  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.52 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.65 (2H, s, H-7);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 178.4 (C-8), 133.8 (C-1), 129.9 (C-5), 129.2 (C-6), 129.2 (C-3), 127.9 (C-4), 127.9 (C-5), 41.6 (C-7)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>对照基本一致,故确定化合物 **8** 为苯乙酸。

**化合物 9** 白色结晶( $\text{EtOAc}$ ); ESI-MS:  $m/z$  267  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.88 (1H, s, CHO), 7.83 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2, 6), 6.96 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3, 5);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 191.1 (CHO), 167.8 (C-4), 132.5 (C-2), 132.5 (C-6), 130.2 (C-1), 115.9 (C-5), 115.6 (C-3)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>对照基本一致,故确定化合物 **9** 为对羟基苯甲醛。

**化合物 10** 无色晶体( $\text{EtOAc}$ ); ESI-MS:  $m/z$  151  $[\text{M-H}]^-$ ;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 7.52 (2H, m, H-2, 6), 6.78 (2H, s, H-3, 5), 3.48 (2H, s, H-7);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 172.0 (C-8), 153.4 (C-4), 136.5 (C-1), 129.2 (C-2), 128.2 (C-6), 126.4 (C-3), 126.4 (C-5), 42.5 (C-7)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>对照基本一致,故确定化合物 **10** 为4-羟基苯乙酸。

## 2.2 体外细胞毒性筛选

对忍冬木层孔菌液体培养物中分离得到化合物 **1** ~ **10** 进行了肿瘤细胞 HGC-27、HeLa、MCF-7、RL95-2 的体外细胞毒性测试。结果显示化合物 **1** ~ **4** 对 HGC-27 和 RL95-2 细胞株有不同程度的抑制活性(见表1),其余化合物浓度为 100  $\mu\text{M}$  时对以上四种肿瘤细胞无明显的细胞毒性,表中未列出。其中化合物 **3** 抑制活性最强,进一步复筛结果显示,阳性药顺铂对肿瘤细胞 HGC-27、HeLa、MCF-7、

RL95-2 的  $IC_{50}$  分别为 15.36、38.36、36.16 和 1.53  $\mu\text{M}$ ; 化合物 **3** 对 HGC-27 和 RL95-2 的  $IC_{50}$  分别为

6.69、12.81  $\mu\text{M}$ , 该化合物对 HGC-27 的抑制活性优于阳性药。

表 1 化合物 **1~4** 对 HGC-27、Hela、MCF-7 及 RL95-2 的细胞毒性 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Cytotoxicity of compounds **1-4** on HGC-27, Hela, MCF-7 and RL95-2 cell lines ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品 Sample	浓度 Concentration ( $\mu\text{M}$ )	初筛抑制率 Preliminary screening inhibition rate (%)			
		HGC-27	HeLa	MCF-7	RL95-2
<b>1</b>	100	20.92 $\pm$ 0.26	10.93 $\pm$ 0.14	0.36 $\pm$ 0.36	41.25 $\pm$ 0.54
<b>2</b>	100	14.96 $\pm$ 0.54	3.48 $\pm$ 0.57	5.38 $\pm$ 0.79	32.01 $\pm$ 1.29
<b>3</b>	100	84.55 $\pm$ 1.38	14.48 $\pm$ 0.39	10.25 $\pm$ 1.12	63.16 $\pm$ 2.15
<b>4</b>	100	12.07 $\pm$ 0.56	2.03 $\pm$ 0.51	0.08 $\pm$ 0.23	25.17 $\pm$ 1.16

### 3 结论

本研究从忍冬木层孔菌液体培养物中分离得到 10 个化合物, 除化合物 **5**、**6** 和 **7** 外, 其余 7 个化合物均为首次从该种真菌中分离得到。化合物 **5~7** 为麦角甾醇类化合物, 忍冬木层孔菌子实体中也存在大量的麦角甾醇类化合物<sup>[15]</sup>, 说明桑黄类真菌菌丝体在甾醇类化合物方面具有代替子实体的可能。化合物 **1~4** 为环二肽类成分, 有研究报道在桑黄类真菌火木层孔菌的发酵液和菌丝体中分离鉴定了 14 个该类化合物<sup>[16]</sup>, 但在忍冬木层孔菌子实体中只报道过环(亮-缬)二肽成分<sup>[15]</sup>, 提示环二肽类成分同时存在于忍冬木层孔菌子实体及发酵培养物中。同时, 体外细胞毒活性显示化合物 **1~4** 对 HGC-27 和 RL95-2 细胞株有不同程度的抑制活性, 其中化合物 **3** 抑制活性最强, 对 HGC-27 和 RL95-2 细胞株的  $IC_{50}$  分别为 6.69  $\mu\text{M}$  和 12.81  $\mu\text{M}$ 。上述研究说明桑黄基源真菌培养物中代谢产物与子实体具有一些共同的化学成分和药理作用, 因此, 加大对桑黄基源真菌培养物中有效成分和药理活性的研究, 可为桑黄类真菌活性成分的工业化生产及可持续利用提供一个新的解决途径。

### 参考文献

- Hubei Provincial Food and Drug Administration. Quality standard of traditional Chinese medicine of Hubei province (湖北省中药材质量标准)[S]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2009: 113-114.
- Chen WC, Yang Y, Zhang JS, et al. Recent and advances in bioactive metabolites from 'Sang huang' mushrooms [J]. Acta Edulis Fungi (食用菌学报), 2020, 27(4): 188-201.
- Wang XM, Luo YC, Guo ZY, et al. Study on the chemical constituents of *Phellinus lonicerinus* [J]. J Chin Med Mater

- (中药材), 2011, 34: 891-893.
- Luo YC, Wang JZ, Cao D, et al. Studies in the protective effect of alcohol extracts from *Phellinus lonicerinus* (Bond.) Bond. et Sing on breast precancerous lesions in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2013, 29(1): 93-97.
- Ly HF, Ye WY, Wang JZ, et al. Antitumor effect of methyl-Hispolon on cervical cancer U14 tumor-bearing mouse [J]. Bachu Med J (巴楚医学), 2018, 1(4): 15-21.
- Zhou J, Sun WJ, Zhang L, et al. The HPLC separation and structural analysis of index composition for total Phenols in *phellinus lonicerinus* [J]. J China Three Gorges Univ: Nat Sci (三峡大学学报: 自科版), 2014, 36(4): 109-112.
- Li Y, Tang JS, Gao H, et al. Study of anti-MRSA bioactive constituents from a marine actinomycetes *Micromonospora* sp. (No. 69) [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物杂志), 2010, 29(5): 16-21.
- Wang SM, Tan NH, Yang YB, et al. Cyclodipeptides from the roots of *Panax notoginseng* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2004, 16: 383-386.
- Yuan C, Li G, Wu CS, et al. Study on the metabolites of endolichenic fungus *Myxotrichum* sp. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2014, 26: 513-516.
- Kawahara N, Sekita S, Satake M. Two steroids from *Calvatia cyathiformis* [J]. Phytochemistry, 1994, 37: 213-215.
- Xu MF, Shen LQ, Wang KW. Chemical constituents of *Omphalia lapidescens* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 251-254.
- Antonio E, Anna A, Lucia M, et al. Biscopyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak [J]. J Nat Prod, 2005, 68: 568-571.