

绳生毛壳霉 CIB-604 次级代谢产物及生物活性研究

张霞^{1,2}, 钱雪情^{1,2}, 刘玲艳^{1,2}, 秦张一^{1,2}, 杨涛^{1*}, 李国友^{1*}¹中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 本论文对一株绳生毛壳霉 (*Chaetomium funicola* CIB-604) 的次级代谢产物进行了研究。采用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、半制备液相等色谱方法从其大米固体发酵物中分离得到了 8 个化合物, 通过 ¹H NMR、¹³C NMR 和 ESI-MS 波谱数据分析将其分别鉴定为 chaetoindicin A (**1**)、chaetoindicin B (**2**)、chaetoindicin C (**3**)、(22*E*, 24*R*)-3β, 5α, 9α-trihydroxy-ergosta-7, 22-dien-6-one (**4**)、(22*E*, 24*R*)-5α, 6α-epoxy-ergosta-8, 22-dien-3β, 7α-diol (**5**)、5α, 6α-epoxy-(22*E*, 24*R*)-ergosta-8 (**14**)、22-diene-3β, 7α-diol (**6**)、麦角甾醇 (**7**) 和过氧麦角甾醇 (**8**)。化合物 **1**~**8** 均首次从绳生毛壳霉中分离得到。活性研究表明, 化合物 **1**~**6** 在 100 μg/mL 浓度下对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌均没有明显抑制效果; 化合物 **4** 对人肿瘤细胞株 SK-Hep-1、A549、HCT-116 和 MCF-7 均具有显著的细胞毒活性, 而化合物 **2** 对这几株细胞具有中等强度的细胞毒活性。

关键词: 绳生毛壳霉; 生物碱; 甾醇; 抗菌活性; 细胞毒活性

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)11-1887-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.11.011

Secondary metabolites of fungus *Chaetomium funicola* CIB-604 and their bioactivities

ZHANG Xia^{1,2}, QIAN Xue-qing^{1,2}, LIU Ling-yan^{1,2}, QIN Zhang-yi^{1,2}, YANG Tao^{1*}, LI Guo-you^{1*}

¹ Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu Sichuan 610041, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The secondary metabolites of *Chaetomium funicola* CIB-604 were investigated in this paper. Eight compounds were isolated from the solid fermented rice culture by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and semi-preparative liquid chromatography. On the basis of ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-MS spectroscopic data, their structures were identified as chaetoindicin A (**1**), chaetoindicin B (**2**), chaetoindicin C (**3**), (22*E*, 24*R*)-3β, 5α, 9α-trihydroxy-ergosta-7, 22-dien-6-one (**4**), (22*E*, 24*R*)-5α, 6α-epoxy-ergosta-8, 22-dien-3β, 7α-diol (**5**), 5α, 6α-epoxy-(22*E*, 24*R*)-ergosta-8 (**14**), 22-diene-3β, 7α-diol (**6**), ergosterol (**7**), and ergosterol peroxide (**8**). Compounds **1**-**8** were isolated from *C. funicola* for the first time. Compounds **1**-**6** showed no obvious inhibitory effect on *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* at 100 μg/mL. Compound **4** exhibited significant cytotoxicities to SK-Hep-1, A549, HCT-116 and MCF-7 cells, while compound **2** showed moderate cytotoxicities against these cell lines.

Key words: *Chaetomium funicola*; alkaloid; sterol; antimicrobial activity; cytotoxicity

毛壳菌属真菌 (*Chaetomium*) 属于子囊菌纲 (Ascomycetes) 球壳菌目 (Sphaeriales) 毛壳菌科 (Chaetomiaceae), 广泛存在于空气、土壤及生物有机体中, 目前已有 400 多个种被报道^[1]。既往研究表明, 毛壳菌属真菌能够产生结构类型丰富的次级代

谢产物, 其中以细胞松弛素和 azaphilone 类化合物为主要类型^[2], 同时毛壳菌属真菌次级代谢产物具有广泛的生物活性, 如抗菌^[3-5]、抗炎^[1,6]、细胞毒^[7-11]等。本课题组长期致力于毛壳菌属真菌次级代谢产物发现及其生物活性研究, 先后从螺卷毛壳 (*C. cochliodes*)^[12,13]、反卷毛壳 (*C. convolutum*)^[14]、球毛壳 (*C. globosum* CIB-160)^[15]、细丽毛壳 (*C. gracile*)^[16]等毛壳霉次级代谢产物中分离到了多种不同结构类型的活性物质。绳生毛壳霉 (*C. funico-*

收稿日期: 2021-03-24 接受日期: 2021-04-29

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0400500); 国家自然科学基金 (21877109)

* 通信作者 Tel: 86-28-82890829; E-mail: yangtao@cib.ac.cn, liguoy@cib.ac.cn

la)是一株潜在病原菌,曾在被感染的皮肤组织中发现过^[17]。1969年报道了从绳生毛壳霉分到的1个大环二内酯化合物^[18],1987年,Itoh等^[19]从*C. funicola* JS 525分离到了泛醌类化合物。目前关于绳生毛壳次级代谢产物研究报道仅有上述两篇,同时缺乏相关生物活性研究报道。本文对一株绳生毛壳霉(*C. funicola* CIB-604)的次级代谢产物进行了系统研究,并对部分化合物进行了抑菌活性和细胞毒活性测试。在此,我们将对该菌次级代谢产物的结构及生物活性进行报道。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 实验仪器

AVANCE 400型、600型核磁共振仪(德国Bruker公司);MicrOTOF-QII高分辨质谱仪(德国Bruker公司);半制备色谱柱(250 mm × 21.2 mm, 10 μm,苏州纳微生物科技有限公司;250 mm × 10 mm, 5 μm,日本YMC公司);半制备液相色谱仪(伍丰LC-100);高效液相色谱仪(江苏汉邦科技有限公司);Varioskan Flash全波长扫描式多功能读数仪、Attune NxT流式细胞仪(美国Thermo Fisher Scientific)。

1.1.2 试剂与材料

乙腈、二氯乙烷、甲醇、石油醚、乙酸乙酯等有机溶剂(成都力信和化工),工业级,重蒸后使用;柱色谱硅胶(100~200、200~300目)及薄层色谱硅胶(GF254)(青岛海洋化工厂);反相C₁₈硅胶(苏州纳微生物科技有限公司);Sephadex LH-20(GE Healthcare Bio-Sciences AB);氘代试剂CDCl₃、CD₃OD、DMSO-*d*₆等(美国Sigma-Aldrich);TLC显色剂为5%硫酸-乙醇溶液;氨苄青霉素、氟康唑(上海麦克林生化科技有限公司);DEME培养基、双抗、胎牛血清、胰酶(Sigma公司);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(中国凯基生物公司)。

1.1.3 菌株及细胞株

真菌CIB-604由本实验室从土壤样本中分离得到,并从形态学及分子生物学角度进行了鉴定。在PDA平皿上,CIB-604的菌落具白色气生菌丝,日生长速率3~4 mm;第3天开始产褐色至黑色子囊果,椭圆形或近球形,凭借假根固着于培养基表面;子囊果附属丝多顶生,挺直、刚毛状,向顶部渐细,呈暗褐色,具隔;子囊孢子卵形或椭圆形,呈褐色,细小端具单个顶生芽孔。同时将CIB-604的ITS扩增序列结

果提交到NCBI进行同源比对,使用MEGA7.0构建系统发育树(邻接法),CIB-604与*Chaetomium funicola*聚为一支。结合形态学鉴定结果,将CIB-604鉴定为绳生毛壳霉(*C. funicola*)。

绳生毛壳霉(*C. funicola* CIB-604)以及用于抑菌实验的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)均保存于中科院成都生物研究所。人肿瘤细胞株SK-Hep-1、A549、HCT-116和MCF-7购买自美国ATCC公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵

液体培养基:改良后的PDB培养基,土豆200 g,葡萄糖20 g,酵母膏1.5 g,磷酸二氢钾3 g,硫酸镁1.5 g,水1 000 mL。121 °C灭菌30 min。

发酵培养基:大米加2倍体积的水浸泡过夜后,过滤并分装于500 mL三角瓶中,并加入0.3%的蛋白胨。121 °C灭菌30 min。

绳生毛壳霉CIB-604接种于PDA斜面,30 °C恒温培养5天进行活化,再转接于液体培养基中,30 °C、150 rpm条件下培养3天。将长好的种子液转接于大米固体培养基中,30 °C下静止培养30天。

1.2.2 提取与分离

绳生毛壳霉CIB-604大米固体发酵物共10 kg,用乙酸乙酯(20 L)浸提(60 °C)3次,每次24 h,合并滤液后减压浓缩得到浸膏78.1 g。总浸膏经硅胶柱层析,石油醚-乙酸乙酯体系梯度洗脱(30:1、20:1、10:1、5:1、3:1、2:1、1:1、0:1,V/V),经TLC分析合并为8个部分(A~H)。E段(4.95 g)再次经硅胶柱层析分离得到8个亚组分(E1~E8),化合物7(21.4 mg)、8(14.9 mg)分别从E4、E6段析出后重结晶得到。G段(3.79 g)进一步通过反相硅胶柱分离,以甲醇-水(20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、80:20、100:0,V/V)洗脱分离得到14个亚组分(G1~G14),G2段(51.3 mg)通过Sephadex LH-20柱(V_{EDC}:V_{MeOH}=1:1)分为G2-1~G2-4四个部分,G2-2(37.0 mg)进一步以20%乙腈水(V/V,含0.3%三氟乙酸)为洗脱剂,经半制备液相柱(10 mL/min)分离得到化合物1(5.7 mg, *t_R* = 15.5 min)和化合物3(4.7 mg, *t_R* = 9.8 min)。G5段(35.6 mg)经半制备HPLC(10 mL/min,27%乙腈水,V/V)分离得到化合物2(13.0 mg, *t_R* = 23.2 min)。G13(196.8 mg)再次经正相硅胶柱分离得到7个组分(G13-1~G13-

7), G13-2 段(47.7 mg)进一步通过半制备液相柱(10 mL/min, 86% 乙腈水, V/V)得到化合物 **4**(7.7 mg, $t_R = 52.9$ min)、**5**(12 mg, $t_R = 69.4$ min)、**6**(4.5 mg, $t_R = 73.6$ min)。

1.2.3 抑菌活性测试

采用双层琼脂扩散法^[20]考察化合物 **1**~**6** 对两株细菌(大肠杆菌、枯草芽孢杆菌)以及一株真菌(白色念珠菌)的抑制活性。细菌培养基为 LB 培养基,真菌培养基为 PDA 培养基。样品用 DMSO 溶解并配制成 0.1 mg/mL,在对应孔中加入 180 μ L。阴性对照为 DMSO;细菌阳性对照药物为氨基青霉素(50 μ g/mL),真菌阳性对照药物为氟康唑(50 μ g/mL)。

1.2.4 抗肿瘤活性

1.2.4.1 MTT 法检测化合物体外细胞毒活性

采用 MTT 法测试了部分化合物对人肿瘤细胞株 SK-Hep-1、A549、HCT-116 和 MCF-7 的细胞毒活性。细胞株用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素)在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

取对数期的细胞株,按大约 3 000 细胞/孔的量接种于 96 孔板,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 24 h。24 h 后,将不同浓度梯度的样品分别加入到培养中,并设置空白对照,置于细胞培养箱中继续培养 72 h。再向培养基中加入 20 μ L MTT 培养液(5 mg/mL)染色 4 h。移去 MTT 溶液,每孔加入 150 μ L DMSO,震荡 10 min 后,用酶标仪检测在 570 nm 波

长下各孔的吸光值,并计算抑制率及 IC₅₀。

1.2.4.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数期细胞株,调整细胞密度为 3 000/mL,每孔 1 mL 接种于 6 孔板中,置于培养箱中培养 24 h 后,加入样品(浓度为 10 μ M)处理,每组设置 3 个复孔。36 h 后,胰酶消化细胞,1 500 rpm 离心 5 min,去除上清液,再用 PBS 洗 2 次。检测方法根据试剂盒说明书操作:Binding buffer 重悬细胞,先后加入 Annexin V 和 PI,混匀后避光孵育 15 min,流式细胞仪测定细胞凋亡率。

2 结果

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 白色粉末;5% 硫酸乙醇不显色;ESI-MS: m/z 312.43 [M + Na]⁺; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.62(1H, s, H-3), 8.88(1H, s, H-6), 3.15(1H, dd, $J = 11.6, 5.0$ Hz, H-11), 1.98(1H, dd, $J = 12.6, 5.0$ Hz, H-12), 2.11(1H, t, $J = 12.4$ Hz, H-12), 2.60(3H, s, H-14), 1.20(3H, s, H-15), 0.76(3H, s, H-16), 0.94(3H, s, H-17); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 76.4(C-1), 153.5(C-2), 118.4(C-3), 165.2(C-4), 146.8(C-6), 124.1(C-7), 197.0(C-8), 68.1(C-9), 48.2(C-10), 69.4(C-11), 45.3(C-12), 207.0(C-13), 24.7(C-14), 11.0(C-15), 14.6(C-16), 21.2(C-17)。以上数据与文献^[21]报道基本一致,故鉴定为 chaetoinidicin A(结构见图 1)。

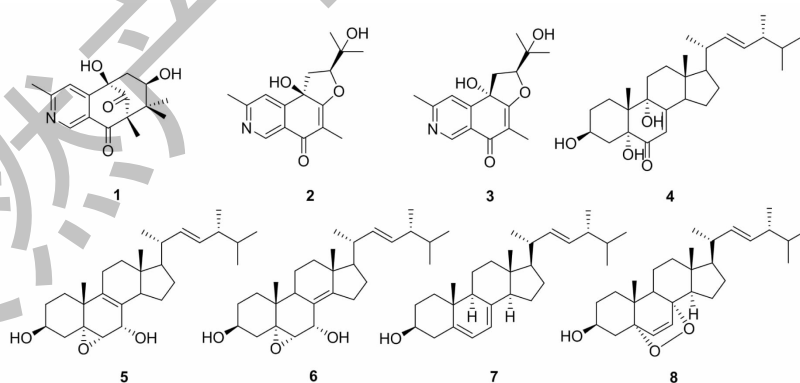


图 1 化合物 **1**~**8** 的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of compounds **1-8**

化合物 2 浅黄色粉末;5% 硫酸乙醇显色为蓝绿色;ESI-MS: m/z 290.35 [M + H]⁺; ¹H NMR(400 MHz, C₅D₅N) δ : 2.63(1H, dd, $J = 14.6, 9.9$ Hz, H-1), 3.18(1H, dd, $J = 14.9, 1.0$ Hz, H-1),

4.86(1H, dd, $J = 9.6, 1.0$ Hz, H-2), 9.52(1H, s, H-6), 7.54(1H, s, H-9), 1.49(3H, s, H-11), 1.71(3H, s, H-12), 2.08(3H, s, H-13), 2.61(3H, s, H-14); ¹³C NMR(100 MHz, C₅D₅N) δ : 36.1(C-1), 92.3

(C-2), 175.4 (C-3a), 107.9 (C-4), 185.9 (C-5), 124.6 (C-5a), 148.7 (C-6), 162.8 (C-8), 121.0 (C-9), 149.8 (C-9a), 72.2 (C-9b), 71.2 (C-10), 28.0 (C-11), 27.6 (C-12), 8.8 (C-13), 25.2 (C-14)。以上数据与文献^[21]报道基本一致,故鉴定为 chaetoindicin B。

化合物 3 浅黄色粉末;5% 硫酸乙醇显色为蓝绿色;ESI-MS: m/z 290.32 [M + H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 2.66 (1H, dd, J = 12.3, 10.1 Hz, H-1), 3.11 (1H, dd, J = 12.4, 4.7 Hz, H-1), 5.38 (1H, dd, J = 10.0, 4.6 Hz, H-2), 9.45 (1H, s, H-6), 7.62 (1H, s, H-9), 1.47 (3H, s, H-11), 1.66 (3H, s, H-12), 2.01 (3H, s, H-13), 2.63 (3H, s, H-14); ¹³C NMR (150 MHz, C₅D₅N) δ : 36.8 (C-1), 91.8 (C-2), 174.9 (C-3a), 107.2 (C-4), 185.1 (C-5), 122.2 (C-5a), 148.2 (C-6), 162.2 (C-8), 120.2 (C-9), 149.5 (C-9a), 74.2 (C-9b), 69.8 (C-10), 26.6 (C-11), 26.1 (C-12), 8.0 (C-13), 24.5 (C-14)。以上数据与文献^[21]报道基本一致,故鉴定为 chaetoindicin C。

化合物 4 白色粉末;5% 硫酸乙醇显色为黄色;ESI-MS: m/z 467.21 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 3.95 (1H, m, H-3), 5.58 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-7), 2.76 (1H, m, H-14), 0.67 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 5.21 (1H, dd, J = 15.2, 7.7 Hz, H-22), 5.27 (1H, dd, J = 15.2, 7.2 Hz, H-23), 0.85 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-26), 0.87 (3H, d, J = 7.3 Hz, H-27), 0.95 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 26.6 (C-1), 31.0 (C-2), 67.8 (C-3), 37.1 (C-4), 80.2 (C-5), 200.1 (C-6), 120.9 (C-7), 165.0 (C-8), 76.1 (C-9), 44.3 (C-10), 29.3 (C-11), 36.2 (C-12), 46.2 (C-13), 52.8 (C-14), 23.4 (C-15), 29.1 (C-16), 57.4 (C-17), 12.6 (C-18), 21.6 (C-19), 41.7 (C-20), 20.6 (C-21), 136.7 (C-22), 133.6 (C-23), 42.8 (C-24), 34.4 (C-25), 20.1 (C-26), 20.5 (C-27), 18.2 (C-28)。以上数据与文献^[22,23]报道基本一致,故鉴定为 (22*E*, 24*R*)-3 β , 5 α , 9 α -trihydroxy-ergosta-7, 22-dien-6-one。

化合物 5 无色针晶;5% 硫酸乙醇显色为紫红色;ESI-MS: m/z 451.24 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400

MHz, CDCl₃) δ : 3.93 (1H, m, H-3), 3.31 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-6), 4.22 (1H, br s, H-7), 0.58 (3H, s, H-18), 1.14 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 5.16 (1H, dd, J = 14.8, 7.4 Hz, H-22), 5.21 (1H, dd, J = 15.3, 7.1 Hz, H-23), 0.83 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-26), 0.81 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-27), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 31.0 (C-1), 30.3 (C-2), 68.7 (C-3), 39.3 (C-4), 65.8 (C-5), 62.7 (C-6), 67.3 (C-7), 134.6 (C-8), 127.1 (C-9), 38.1 (C-10), 23.5 (C-11), 35.8 (C-12), 42.2 (C-13), 49.7 (C-14), 24.0 (C-15), 29.1 (C-16), 53.8 (C-17), 11.4 (C-18), 23.0 (C-19), 40.6 (C-20), 21.1 (C-21), 135.7 (C-22), 132.1 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献^[23]报道基本一致,故鉴定为 (22*E*, 24*R*)-5 α , 6 α -epoxy-ergosta-8, 22-dien-3 β , 7 α -diol。

化合物 6 白色粉末;5% 硫酸乙醇显色为紫红色;ESI-MS: m/z 451.24 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.94 (1H, m, H-3), 3.16 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-6), 4.44 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 0.89 (6H, s, H-18, 19), 1.04 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-21), 5.20 (1H, dd, J = 15.2, 7.6 Hz, H-22), 5.25 (1H, dd, J = 15.2, 7.0 Hz, H-23), 0.84 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-26), 0.86 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-27), 0.93 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 32.3 (C-1), 31.2 (C-2), 68.8 (C-3), 39.7 (C-4), 67.9 (C-5), 61.5 (C-6), 65.2 (C-7), 125.3 (C-8), 38.7 (C-9), 36.0 (C-10), 19.1 (C-11), 36.7 (C-12), 43.1 (C-13), 152.8 (C-14), 25.1 (C-15), 27.3 (C-16), 57.0 (C-17), 18.2 (C-18), 16.7 (C-19), 39.4 (C-20), 21.4 (C-21), 135.4 (C-22), 132.4 (C-23), 43.0 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献^[24,25]报道基本一致,故鉴定为 5 α , 6 α -epoxy-(22*E*, 24*R*)-ergosta-8 (14), 22-diene-3 β , 7 α -diol。

化合物 7 无色针晶;5% 硫酸乙醇显色为紫红色;ESI-MS: m/z 397.12 [M + H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 3.64 (1H, m, H-3), 5.58 (1H, dd, J = 5.4, 2.4 Hz, H-6), 5.38 (1H, dd, J = 5.5, 2.8 Hz, H-7), 0.63 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-19),

1.03(3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 5.20(1H, dd, $J = 15.4, 7.6$ Hz, H-22), 5.15(1H, dd, $J = 15.4, 7.6$ Hz, H-23), 0.84(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.82(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.92(3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28); ^{13}C NMR(150 MHz, CDCl_3) δ : 38.5(C-1), 32.0(C-2), 70.6(C-3), 41.0(C-4), 139.9(C-5), 119.7(C-6), 116.5(C-7), 141.5(C-8), 46.4(C-9), 37.1(C-10), 21.2(C-11), 39.3(C-12), 43.0(C-13), 54.7(C-14), 23.1(C-15), 28.4(C-16), 55.9(C-17), 12.2(C-18), 16.4(C-19), 40.5(C-20), 21.2(C-21), 135.7(C-22), 132.2(C-23), 42.9(C-24), 33.1(C-25), 20.1(C-26), 19.8(C-27), 17.6(C-28)。以上数据与文献^[26]报道基本一致,故鉴定为麦角甾醇。

化合物 8 无色针晶;5% 硫酸乙醇显色为绿色;ESI-MS: m/z 429.23 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR(600 MHz, CDCl_3) δ : 3.97(1H, m, H-3), 6.52(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 6.26(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 0.85(3H, s, H-18), 0.92(3H, s, H-19), 1.01(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 5.23(1H, dd, $J = 15.2, 7.4$ Hz, H-22), 5.17(1H, dd, $J = 15.2, 7.4$ Hz, H-23), 0.86(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.82(3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.94(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28); ^{13}C NMR(150 MHz, CDCl_3) δ : 34.9(C-1), 30.3(C-2),

66.7(C-3), 37.1(C-4), 82.3(C-5), 135.6(C-6), 129.9(C-7), 79.6(C-8), 51.2(C-9), 37.2(C-10), 23.6(C-11), 39.5(C-12), 44.7(C-13), 51.8(C-14), 28.9(C-15), 20.8(C-16), 56.4(C-17), 12.2(C-18), 18.4(C-19), 40.0(C-20), 21.0(C-21), 135.4(C-22), 132.5(C-23), 43.0(C-24), 33.3(C-25), 19.9(C-26), 20.2(C-27), 13.1(C-28)。以上数据与文献^[27]报道基本一致,故鉴定为过氧麦角甾醇。

2.2 抗菌活性

抗菌活性实验结果表明,化合物 **1**~**6** 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时,对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌均没有生长抑制活性。

2.3 抗肿瘤活性

2.3.1 MTT 法检测化合物的体外细胞毒活性

采用 MTT 法考察了化合物 **1**~**6** 对人肿瘤细胞株 SK-Hep-1、A549、HCT-116 和 MCF-7 的体外细胞毒活性测试。结果表明,化合物 **2** 和 **4** 对所有测试的肿瘤细胞株均表现出细胞毒活性(见表 1),其中,化合物 **4** 对 SK-Hep-1、A549、HCT-116 和 MCF-7 这四个细胞株的 IC_{50} 分别为 3.10 ± 0.80 、 4.81 ± 1.01 、 8.25 ± 2.28 、 5.36 ± 1.29 μM ,细胞毒活性均强于化合物 **2**。

表 1 化合物 **2** 和 **4** 对 SK-Hep-1、A549、HCT-116 和 MCF-7 细胞株的细胞毒活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Cytotoxicity of compounds **2** and **4** against SK-Hep-1, A549, HCT-116 and MCF-7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物 Compound	IC_{50} (μM)			
	SK-Hep-1	A549	HCT-116	MCF-7
2	24.27 ± 6.91	18.84 ± 5.74	20.91 ± 6.80	18.57 ± 6.39
4	3.10 ± 0.80	4.81 ± 1.01	8.25 ± 2.28	5.36 ± 1.29

2.3.2 流式细胞仪检测对细胞凋亡的影响

为进一步考察和比较化合物 **2** 和 **4** 对肿瘤细胞凋亡的影响,我们选取其中两株细胞株 SK-Hep-1 和 A549 进行了深入研究。结果如图 2 所示,化合物 **2** 在 10 μM 的浓度下对 SK-Hep-1 和 A549 细胞的凋亡率分别为 22.77%、11.50%,被化合物 **2** 处理过的 SK-Hep-1 细胞主要集中于 Q3 区域,说明其主要是引起该细胞的早期凋亡;而在相同浓度处理下,化合物 **4** 相比于 **2** 具有更强的诱导凋亡作用,对 SK-Hep-1 和 A549 细胞的凋亡率分别为 32.54%、

17.83%,其中,对 SK-Hep-1 主要是引起细胞早期凋亡(25.6%),诱导 A549 凋亡主要为晚期凋亡(10.3%)。

3 讨论与结论

本文从一株绳生毛壳霉(*C. funicola* CIB-604)的大米固态发酵物中分离得到了 8 个次级代谢产物,其结构类型包括 3 个异喹啉生物碱(**1**~**3**)和 5 个甾醇类化合物(**4**~**8**),均首次从绳生毛壳霉中分离得到。化合物 **1**~**3** 是最早由本课题组从印度毛壳霉(*C. indicum* 3.202)的次级代谢产物中发现的

结构新颖的异喹啉生物碱^[21],迄今为止,绳生毛壳霉是第二种能够产生该类新颖异喹啉生物碱的真菌,推测绳生毛壳霉可能含有和印度毛壳霉相同的异喹啉生物碱生物合成途径。本论文对化合物 1 ~

6 进行了抗菌活性和细胞毒活性测试,其抗菌活性结果表明在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度时,化合物 1 ~ 6 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌均没有表现出抑

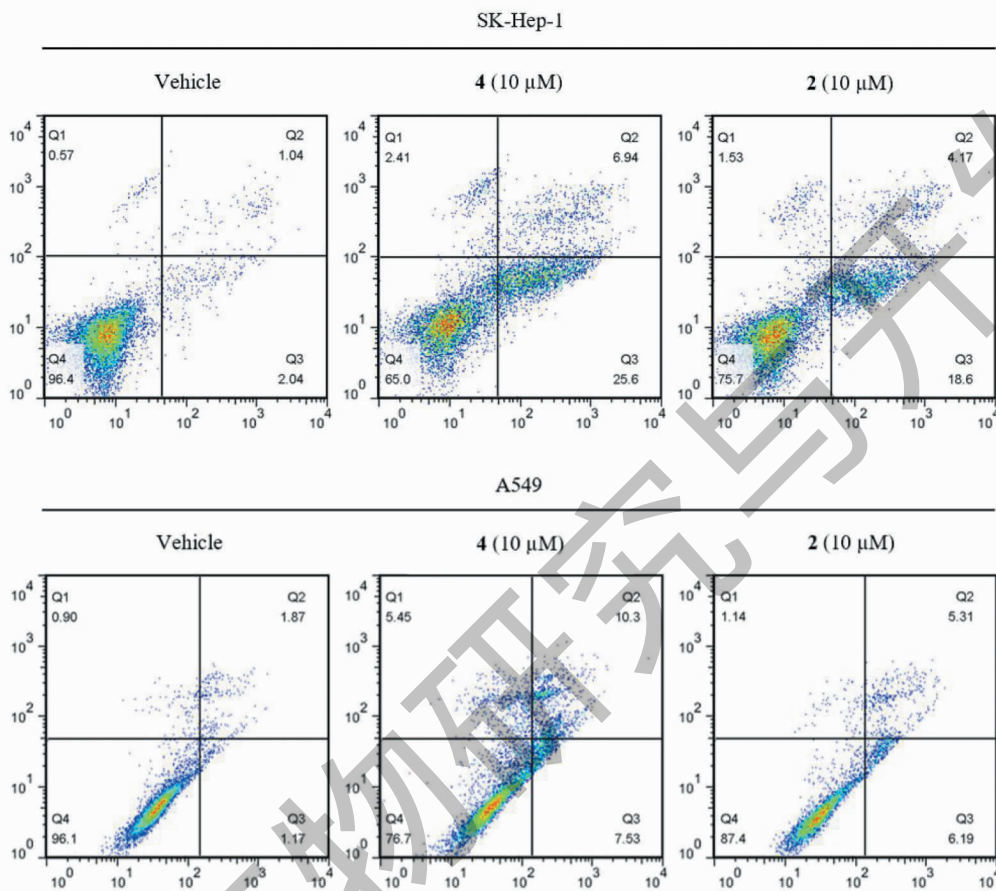


图 2 化合物 2 和 4 对 SK-Hep-1 和 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of compounds 2 and 4 on apoptosis of SK-Hep-1 and A549 cells

制效果;细胞毒活性结果表明化合物 2 和 4 对人肿瘤细胞 SK-Hep-1、A549、HCT-116 和 MCF-7 均显示出细胞毒活性,且化合物 4 对肿瘤细胞的抑制效果强于化合物 2;流式细胞仪检测结果表明化合物 2 和 4 主要诱导 SK-Hep-1 细胞早期凋亡,而化合物 2 对 A549 细胞早期和晚期凋亡的影响差别不大,化合物 4 诱导 A549 细胞凋亡主要是晚期凋亡。本论文首次报道了化合物 2 对肿瘤细胞的细胞毒活性,分析结果可以发现,化合物 3 是 2 的差向异构体,但其细胞毒活性明显低于化合物 2,说明羟基与异丙基之间的相对构型对其细胞毒活性有显著影响。与化合物 5、6 相比,4 具有显著细胞毒活性,分析结构特征可以发现,化合物 4 的分子结构中有一个典型的活性中心—— α,β -不饱和羰基结构单元,其能够

与细胞中蛋白质的巯基发生烷基化反应,从而与肿瘤细胞结合并将其杀死^[28]。综上所述,本论文对绳生毛壳霉 CIB-604 次级代谢产物及生物活性的研究结果为科学认识、合理开发利用该菌奠定了科学基础。

参考文献

- Kim MJ, Kim DC, Kwon J, et al. Anti-inflammatory metabolites from *Chaetomium nigricolor* [J]. J Nat Prod, 2020, 83: 881-887.
- Xu GB, Zhang QY, Zhou M. Review on the secondary metabolites and its biological activities from *Chaetomium* fungi [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 515-525.
- Gao WX, He Y, Li FL, et al. Antibacterial activity against

- drug-resistant microbial pathogens of cytochalasan alkaloids from the arthropod-associated fungus *Chaetomium globosum* TW1-1 [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 83:98-104.
- 4 Wang HH, Li G, Qiao YN, et al. Chamiside A, a cytochalasan with a tricyclic core skeleton from the endophytic fungus *Chaetomium nigricolor* F5 [J]. *Org Lett*, 2019, 21: 3319-3322.
- 5 Yan W, Cao LL, Zhang YY, et al. New metabolites from endophytic fungus *Chaetomium globosum* CDW7 [J]. *Molecules*, 2018, 23:2873.
- 6 Gao WX, Chai CW, Li XN, et al. Two anti-inflammatory chlorinated azaphilones from *Chaetomium globosum* TW1-1 cultured with 1-methyl-L-tryptophan and structure revision of chaephilone C [J]. *Tetrahedron Lett*, 2020, 61(8):151516.
- 7 Panthama N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, et al. Cytotoxic and antimalarial azaphilones from *Chaetomium longirostre* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74:2395-2399.
- 8 Li X, Tian Y, Yang SX, et al. Cytotoxic azaphilone alkaloids from *Chaetomium globosum* TY1 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23:2945-2947.
- 9 Wang W, Yang J, Liao YY, et al. Cytotoxic nitrogenated azaphilones from the deep-sea-derived fungus *Chaetomium globosum* MP4-S01-7 [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83:1157-1166.
- 10 Chen C, Wang J, Liu J, et al. Armochaetoglobins A-J: cytochalasan alkaloids from *Chaetomium globosum* TW1-1, a fungus derived from the terrestrial arthropod *Armadillidium vulgare* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78:1193-1201.
- 11 Guo QM, Yin ZH, Zhang JJ, et al. Chaetomadrasins A and B, two new cytotoxic cytochalasans from desert soil-derived fungus *Chaetomium madrasense* 375 [J]. *Molecules*, 2019, 24: 3240.
- 12 Li GY, Li BG, Yang T, et al. Chaetocochins A-C, epipolythiodioxopiperazines from *Chaetomium cochliodes* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69:1374-1376.
- 13 Yang EC, Yang T, Li ZZ, et al. Antimicrobial activity of the epipolythiodioxopiperazines from *Chaetomium cochliodes* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20:953-955.
- 14 Xu GB, Li LM, Yang T, et al. Chaetoconvosins A and B, alkaloids with new skeleton from fungus *Chaetomium convolutum* [J]. *Org Lett*, 2012, 14:6052-6055.
- 15 Xu GB, Liu J, Xiao YH, et al. Isolation and identification of secondary metabolites from *Chaetomium globosum* CIB-160 and their immunological activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1562-1567.
- 16 Bai HH, Wu LW, Yang T, et al. Isolation and identification of secondary metabolites from fungus *Chaetomium gracile* and their antimicrobial activities [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2015, 21:274-278.
- 17 Piepenbring M, Cáceres Mendez OA, Espino Espinoza AA, et al. Chromoblastomycosis caused by *Chaetomium funicola*: a case report from Western Panama [J]. *Br J Dermatol*, 2007, 157:1025-1029.
- 18 Powell JW, Whalley WB. Chemistry of fungi. Part LVIII. structure of colletodiol, a metabolite of *Chaetomium funicola* [J]. *J Chem Soc Perk T 1*, 1969, 6:911-912.
- 19 Itoh M, Katayama Y, Sugiyama J, et al. Isolation and structure elucidation of a tetrahydrogenated isoprenoid side-chain ubiquinone with ten isoprene units isolated from *Chaetomium funicola* JS 525 [J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52:1195-1201.
- 20 Wang YY, Wang KM, Zhou FL, et al. Isolation and structural identification of a new sesquiterpene from *Vernonia cumingiana* Benth [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33:216-221.
- 21 Li GY, Li BG, Yang T, et al. Chaetoincicins A-C, three isoquinoline alkaloids from the fungus *Chaetomium indicum* [J]. *Org Lett*, 2006, 8:3613-3615.
- 22 Han XL, Lin ZJ, Tao HW, et al. Cytotoxic metabolites from symbiotic fungus *Penicillium* sp. HK13-8 with *Rhizophora stylosa* [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 2009, 28(5):11-16.
- 23 Li F, Li K, Li XM, et al. Chemical constituents of marine algal-derived endophytic fungus *Exophiala oligosperma* EN-21 [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2011, 29(1):63-67.
- 24 Xiong HY, Fei DQ, Zhou JS, et al. Steroids and other constituents from the mushroom *Armillaria lueo-virens* [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45:759-761.
- 25 Liao YW, Chen CR, Hsu JL, et al. Sterols from the stems of *Momordica charantia* [J]. *J Chin Chem Soc*, 2011, 58:893-898.
- 26 Liang LF, Li YF, Zhen TT, et al. Chemical constituents from South China Sea soft coral *Sinularia* sp. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48:868-873.
- 27 Lu YD, Guo HY, Liu JK, et al. Chemical constituents of the fermentation broth of *Tyromyces chioneus* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:1510-1514.
- 28 Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J, et al. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19:209-225.