

蛇足石杉内生真菌 *Cladosporium tenuissimum* MT-35 的代谢产物研究

石潘钰¹, 杨洪芸¹, 莫婷², 齐博文¹, 王雯静¹, 张蓓蓓¹, 刘晓¹, 史社坡^{1*}

¹北京中医药大学中药学院中药现代研究中心, 北京 100029; ²宁夏回族医药研究所, 银川 750021

摘要:为研究蛇足石杉内生真菌极细枝孢菌(*Cladosporium tenuissimum* MT-35)的代谢产物, 本实验采用硅胶柱色谱及半制备液相色谱等方法从蛇足石杉极细枝孢菌 *C. tenuissimum* MT-35 的糙米发酵物中分离出 10 个化合物, 根据化合物的理化性质及 MS、NMR 数据分别鉴定为 4-hydroxy-3-methoxy-2(1*H*)-quinolinone (**1**)、acropyrone (**2**)、lumichrome (**3**)、(1*H*-indol-3-yl) oxoacetamide (**4**)、1,6-dihydro-1-methyl-6-oxo-3-pyridinecarboxylic acid (**5**)、尿嘧啶 (**6**)、过氧化麦角甾醇(**7**)、麦角固醇(**8**)、9(*Z*),12(*Z*)-十八碳二烯酰胺(**9**)、8-*O*-4-dehydrodiferulic acid(**10**)。除化合物**7**和**8**外, 其他化合物均为首次从 *C. tenuissimum* 中分离得到。对分离鉴定的化合物进行体外抗炎和抗乙酰胆碱酯酶活性筛选, 结果表明化合物**3**、**7**、**8**、**9**对脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞释放一氧化氮具有抑制活性, IC₅₀值分别为 36.8 ± 1.0、13.9 ± 0.2、36.6 ± 0.0、53.2 ± 1.4 μmol/L, 其余化合物在浓度为 100 μmol/L 时, 对 RAW 264.7 细胞 NO 释放无明显抑制活性; 化合物**3**对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制活性, IC₅₀为 77.9 ± 11.1 μmol/L, 其余化合物在浓度为 100 μmol/L 时, 对乙酰胆碱酯酶无明显抑制活性。

关键词:蛇足石杉; 内生真菌; 极细枝孢菌; 结构鉴定; 抗炎活性; 抗乙酰胆碱酯酶活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)6-0981-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.6.010

Metabolites of endophytic fungus *Cladosporium tenuissimum* MT-35 from *Huperia serrata*

SHI Fan-yu¹, YANG Hong-yun¹, MO Ting², QI Bo-wen¹,
WANG Wen-jing¹, ZHANG Bei-bei¹, LIU Xiao¹, SHI She-po^{1*}

¹Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

²Ningxia Hui Medicine Research Institute, Yinchuan 750021, China

Abstract: To study the metabolites of *Cladosporium tenuissimum* MT-35, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*. The compounds were separated and purified by silica gel column chromatography and semi-preparative HPLC. Ten compounds were isolated from the brown rice fermentation of the endophytic fungus *C. tenuissimum* MT-35, including 4-hydroxy-3-methoxy-2(1*H*)-quinolinone (**1**), acropyrone (**2**), lumichrome (**3**), (1*H*-indol-3-yl) oxoacetamide (**4**), 1,6-dihydro-1-methyl-6-oxo-3-pyridinecarboxylic acid (**5**), uracil (**6**), ergosterol peroxide (**7**), ergosterol (**8**), 9(*Z*), 12(*Z*)-octadecadienamide (**9**), 8-*O*-4-dehydrodiferulic acid (**10**). Except for compounds **7** and **8**, other compounds were obtained from *C. tenuissimum* for the first time. Compounds **3**, **7**, **8** and **9** showed inhibitory activity against NO release from RAW 264.7 cells with IC₅₀ values of 36.8 ± 1.0, 13.9 ± 0.2, 36.6 ± 0.0, 53.2 ± 1.4 μmol/L, respectively. Compound **3** showed inhibitory activity against acetylcholinesterase with an IC₅₀ value of 77.9 ± 11.1 μmol/L.

Key words: *Huperzia serrata*; endophytic fungi; *Cladosporium tenuissimum*; structural identification; anti-inflammatory activities; inhibitory activity against acetylcholinesterase

收稿日期: 2021-11-22 接受日期: 2022-03-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81573312)

* 通信作者 E-mail: shishepo@163.com

蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.)是石杉科石杉属植物, 又名千层塔, 以全草入药, 具有清热解毒、生肌止血、散瘀消肿的功效, 可用

于治疗跌打损伤、毒蛇咬伤、瘀血肿痛等^[1]。据文献报道,蛇足石杉的根、茎、叶中均存在丰富的内生菌,这些内生菌在体外培养时,可以产生结构丰富多样的代谢产物^[2,3];部分内生真菌在体外发酵培养时还可以产生石杉碱甲^[4,5]。课题组前期研究发现,从蛇足石杉中分离鉴定出多株内生真菌,进一步对其发酵产物进行研究,分离鉴定了一系列结构新颖的杂萜、聚酮类代谢产物,部分化合物在体外具有显著的抗炎和乙酰胆碱酯酶抑制活性^[6-9]。*C. tenuissimum* MT-35 是课题组前期从蛇足石杉中分离纯化的一株内生真菌,其发酵产物具有一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性。因此,课题组对该株内生真菌的代谢产物进行分离纯化,结合体外活性筛选,期望能够获得具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的代谢产物。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Autopol IV 全自动旋光仪(美国 Rudolf); 高效液相离子阱飞行时间质谱分析系统: UFLC SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, SPD M20A 紫外检测器, LC-20ADXR 泵, IT-TOF-MS 配备 ESI 离子源(日本 Shimadzu); Varian 500 核磁共振仪(美国 Varian); Waters 2998 半制备型高效液相色谱仪(美国 Waters); ODS 半制备柱(SunFire™ C₁₈, 10 × 150 mm, 5 μm); ODS 柱色谱填料(Li-Chroprep RP-C₁₈, 40 ~ 63 μm, 德国 Merck); 柱色谱用硅胶(200 ~ 300 目)及薄层色谱用 GF₂₅₄ 硅胶预制板均为青岛海洋化工厂生产; MCO-18AIC (UV) CO₂ 培养箱(日本 Sanyo); MCO-18AIC 细胞培养箱(日本 Sanyo); AE2000 倒置荧光显微镜(中国 Motic); M1000 多功能酶标仪(瑞士 Tecan); 脂多糖(LPS)(美国 Sigma); 胎牛血清(美国 Hyclone); DMEM 培养基(购自日本 Corning 公司, 批号: 8121625, 详细组成可见参考说明书)。

蛇足石杉(*Huperia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.) 于 2015 年 7 月采自福建省南平市(标本编号: 201507)。本研究所用菌株由课题组自蛇足石杉中分离纯化, 经形态特征及 ITS-rDNA 鉴定基因组测序(GenBank 中序列号为 OM131669)为枝孢菌属极细枝孢菌 *Cladosporium tenuissimum*, 菌种保存于北京中医药大学中药现代研究中心(菌种编号: *Cladosporium tenuissimum* MT-35)。

1.2 实验方法

1.2.1 提取与分离

C. tenuissimum MT-35 于无菌环境下接种于 0.5 L × 40 瓶糙米培养基中, 25 °C 室温培养 40 天后, 用醋酸乙酯超声提取 3 次。提取液合并滤过, 减压浓缩得浸膏 120 g。经正相硅胶柱色谱, 石油醚-乙酸乙酯(20:1→1:1)、二氯甲烷-甲醇(20:1→0:1) 梯度洗脱, 合并得到 8 个流分 Fr. 1~8。Fr. 2 经反相硅胶柱色谱分离, 甲醇-水(3:7→1:0), 并结合半制备 HPLC(流动相: 乙腈-水 38:62, $t_R = 13$ min) 分离纯化得化合物 8(30 mg); Fr. 4 经反相硅胶柱色谱, 甲醇-水(3:7→1:0) 梯度洗脱, 结合半制备 HPLC(流动相: 乙腈-水 22:78, $t_R = 18$ min) 分离纯化得化合物 7(15 mg); Fr. 6 经反相硅胶柱色谱, 甲醇-水(3:7→1:0) 梯度洗脱, 结合半制备 HPLC 分离纯化得化合物 1(2.5 mg; 流动相: 乙腈-水 20:80, $t_R = 18$ min)、2(5.2 mg; 流动相: 乙腈-水 20:80, $t_R = 38$ min)、3(3.3 mg; 流动相: 乙腈-水 23:77, $t_R = 9$ min)、4(4.2 mg; 流动相: 乙腈-水 30:70, $t_R = 12$ min)、9(4.2 mg; 流动相: 乙腈-水 85:15, $t_R = 18$ min); Fr. 8 经反相硅胶柱色谱, 甲醇-水(3:7→1:0) 梯度洗脱, 结合半制备 HPLC 分离纯化得化合物 5(5.1 mg; 流动相: 甲醇-水 20:80, $t_R = 17$ min)、10(4.5 mg; 流动相: 甲醇-水 50:50, $t_R = 25$ min)、6(2.4 mg; 流动相: 甲醇-水 30:70, $t_R = 20$ min)。

1.2.2 抗乙酰胆碱酯酶活性筛选

采用改良的 Ellman 法测定各单体化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性^[2,10]。在 96 孔板中每孔加入 100 μL 的 PBS 缓冲液(pH 8.0), 20 μL 乙酰胆碱酯酶(50 U/L, 溶于 PBS 中), 20 μL 样品溶液(终浓度为 100、20、4 mg/L, 溶于含 2% 的 DMSO 的 PBS 溶液中), 20 μL 浓度为 1.2 mmol/L 的碘代硫代乙酰胆碱作为酶反应底物。在 37 °C 条件下恒温孵化 30 min 后加入 20 μL 4% 的十二烷基硫酸钠(SDS) 终止反应, 并加入 20 μL 0.6 mmol/L 的 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸, DTNB), 立即测定反应体系在 405 nm 波长下的吸光度。单体化合物的百分抑制率通过公式 $I = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$ 计算获得, 其中 $A_{\text{样品}}$ 为加药组, $A_{\text{背景}}$ 为没有加入酶的对照组, $A_{\text{空白}}$ 为未加样品。通过计算不同样品浓度对乙酰胆碱酯酶的抑制率来计算不同单体化合物的 IC₅₀ 值。以上每组实验均重复 3 次, 石杉碱甲作为阳性对照。

1.2.3 抗炎活性筛选

比较不同化合物抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 RAW 264.7 细胞释放 NO 能力, 对其抗炎活性进行评价^[7,11]。取对数期的 RAW 264.7 细胞, 0.25% 胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基终止消化, 低速离心, 重悬于新鲜培养基中。将细胞用 DMEM 培养基稀释至 4×10^5 个/mL, 以每孔 40 000 个细胞接种于 96 孔板中, CO₂ 培养箱 37 °C 孵育 24 h。用二甲基亚砜 (DMSO) 配制浓度为 25 mmol/L 单体化合物母液, 经培养基稀释后加入 96 孔培养板至终浓度分别为 100、20、4 $\mu\text{mol/L}$, 孵育 1 h, 再加入终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS, 继续孵育 24 h。从 96 孔板各孔中吸取 100 μL 上清至酶标板内, 每孔加入 50 μL Griess R1, 室温避光放置 5 min, 再加入 50 μL Griess R2, 室温避光放置 5 min。在 540 nm 条件下测定吸光度。计算各化合物对 NO 释放的抑制率, 并得出半数抑制浓度 (IC₅₀)。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色无定型粉末; ESI-MS: m/z 192 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₀H₉NO₃。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.93 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.48 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 7.31 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-8), 7.24 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 3.84 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 163.1 (C-2), 131.8 (C-3), 154.7 (C-4), 124.0 (C-5), 123.3 (C-6), 130.9 (C-7), 116.3 (C-8), 136.7 (C-9), 117.4 (C-10), 60.6 (3-OCH₃)。化合物 1 结构已有文献^[12]报道, 但其完整的 NMR 数据在文献中没有报道。因此, 在对化合物的二维 NMR 图谱 (HMBC 和 HSQC 图谱) 进行分析的基础, 本文中对化合物 1 的 NMR 数据进行了详细归属, 鉴定其结构为 4-hydroxy-3-methoxy-2-(1H)-quinolinone。

化合物 2 淡黄色粉末; ESI-MS: m/z 225 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₁H₁₂O₅。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.62 (1H, br s, 9-COOH), 6.89 (1H, s, H-5), 6.50 (1H, s, H-8), 4.01 (3H, s, H-12), 2.36 (3H, s, H-11), 1.83 (3H, s, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 162.8 (C-2), 103.2 (C-3), 165.2 (C-4), 97.5 (C-5), 156.8 (C-6), 141.9 (C-7), 120.0 (C-8), 166.9 (C-9), 8.7 (C-10), 13.1 (C-11), 57.0 (C-12)。以上数据与文献^[13]报道基本一致, 故鉴定化

合物 2 为 acropyrone。

化合物 3 淡黄色粉末; ESI-MS: m/z 243 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₂H₁₀N₄O₂。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.70 (1H, s, NH), 7.91 (1H, s, H-6), 7.71 (1H, s, H-9), 2.49 (3H, s, H-11), 2.46 (3H, s, H-12); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 150.1 (C-2), 160.6 (C-4), 128.6 (C-6), 144.5 (C-7), 138.7 (C-8), 125.8 (C-9), 19.5 (C-11), 20.1 (C-12), 130.1 (C-4a), 138.3 (C-5a), 141.6 (C-9a), 146.5 (C-10a)。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 故鉴定化合物 3 为 lumichrome。

化合物 4 白色粉末; ESI-MS: m/z 189 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₀H₈N₂O₂。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8.73 (1H, s, H-2), 8.30 (1H, dd, $J = 7.0$, 2.0 Hz, H-4), 7.48 (1H, dd, $J = 6.5$, 1.5 Hz, H-7), 7.26 (2H, m, H-5, 6); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 139.5 (C-2), 113.1 (C-3), 122.9 (C-4), 123.9 (C-5), 124.7 (C-6), 114.0 (C-7), 183.1 (C-8), 168.2 (C-9), 127.9 (C-3a), 138.0 (C-7a)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 故鉴定化合物 4 为 (1H-indol-3-yl) oxoacetamide。

化合物 5 淡黄色粉末; ESI-MS: m/z 154 [M + H]⁺, 分子式为 C₇H₇NO₃。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8.45 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-5), 7.96 (1H, dd, $J = 9.5$, 2.5 Hz, H-3), 6.53 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-2), 3.61 (3H, s, *N*-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 167.2 (C-1), 119.3 (C-2), 141.1 (C-3), 112.5 (C-4), 145.7 (C-5), 165.3 (4-COOH), 38.6 (*N*-CH₃)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 故鉴定化合物 5 为 1,6-dihydro-1-methyl-6-oxo-3-pyridine-carboxylic acid。

化合物 6 白色粉末; ESI-MS: m/z 113 [M + H]⁺, 分子式为 C₄H₄N₂O₂。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.39 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5), 5.44 (1H, dd, $J = 7.5$, 1.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 151.5 (C-2), 164.3 (C-4), 100.2 (C-5), 142.2 (C-6)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 6 为尿嘧啶。

化合物 7 白色针状结晶; ESI-MS: m/z 429 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₈H₄₄O₃; [α]_D²² - 8.6 (c 0.1, CHCl₃)。 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.49 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.23 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 5.21 (1H, dd, $J = 15.0$, 8.0 Hz, H-23), 5.14 (1H, dd, $J =$

15.0, 8.0 Hz, H-22), 3.96 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-26), 0.81 (3H, s, H-27); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 34.9 (C-1), 30.3 (C-2), 66.6 (C-3), 37.1 (C-4), 82.3 (C-5), 135.6 (C-6), 135.3 (C-7), 79.6 (C-8), 51.3 (C-9), 23.6 (C-11), 39.5 (C-12), 44.7 (C-13), 51.9 (C-14), 20.8 (C-15), 28.8 (C-16), 56.4 (C-17), 13.0 (C-18), 18.3 (C-19), 39.8 (C-20), 21.0 (C-21), 130.9 (C-22), 132.5 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.7 (C-28)。以上数据与文献^[18]报道基本一致,故鉴定化合物**7**为过氧化麦角甾醇。

化合物 8 白色无定型粉末;ESI-MS: m/z 397 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{22} - 79.6$ (c 0.1, CHCl_3)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.57 (1H, dd, $J = 5.5, 2.5$ Hz, H-6), 5.38 (1H, m, H-7), 5.23 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, 7.0, H-23), 5.17 (1H, dd, $J = 15.5, 7.5$ Hz, H-22), 3.64 (1H, m, H-3), 1.04 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-28), 0.84 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.82 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.63 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 38.6 (C-1), 32.2 (C-2), 70.6 (C-3), 41.0 (C-4), 140.0 (C-5), 119.8 (C-6), 116.5 (C-7), 141.5 (C-8), 46.5 (C-9), 37.2 (C-10), 21.3 (C-11), 39.3 (C-12), 43.0 (C-13), 54.7 (C-14), 23.2 (C-15), 28.4 (C-16), 56.0 (C-17), 12.2 (C-18), 16.5 (C-19), 40.5 (C-20), 21.3 (C-21), 135.7 (C-22), 132.2 (C-23), 43.0 (C-24), 33.3 (C-25), 19.8 (C-26), 20.1 (C-27), 17.8 (C-28)。以上数据与文献^[20]报道基本一致,故鉴定化合物**8**为麦

角固醇。

化合物 9 黄色油状物;ESI-MS: m/z 280 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 5.34 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 2.78 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 2.20 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 2.06 (2H, q, $J = 6.5$ Hz, H-14), 0.91 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 179.3 (C-1), 36.5 (C-2), 26.5 (C-3), 30.2, 30.3, 30.4 (C-4 ~ C-6), 28.2 (C-7), 26.9 (C-8), 129.1 (C-9), 130.9 (C-10), 30.7 (C-11), 129.1 (C-12), 130.9 (C-13), 30.5 (C-14), 28.2 (C-15), 32.6 (C-16), 23.6 (C-17), 14.4 (C-18)。以上数据与文献^[19]报道基本一致,故鉴定化合物**9**为9(Z),12(Z)-十八碳二烯酰胺。

化合物 10 棕色无定型粉末;ESI-MS: m/z 387 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_8$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.58 (1H, s, H-7'), 7.44 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 7.30 (1H, s, H-2'), 7.28 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-7), 7.07 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.05 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.38 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-8), 3.97 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.70 (3H, s, 3-OCH₃); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 125.9 (C-1), 113.6 (C-2), 148.8 (C-3), 149.6 (C-4), 116.1 (C-5), 126.4 (C-6), 128.4 (C-7), 145.8 (C-8), 164.5 (C-9), 130.2 (C-1'), 112.4 (C-2'), 150.5 (C-3'), 149.1 (C-4'), 114.8 (C-5'), 123.2 (C-6'), 145.8 (C-7'), 118.0 (C-8'), 167.3 (C-9'), 56.0 (3-OCH₃), 56.6 (3'-OCH₃)。以上数据与文献^[20]报道基本一致,故鉴定化合物**10**为8-O-4-dehydrodiferulic acid。

化合物**1**~**10**结构见图1。

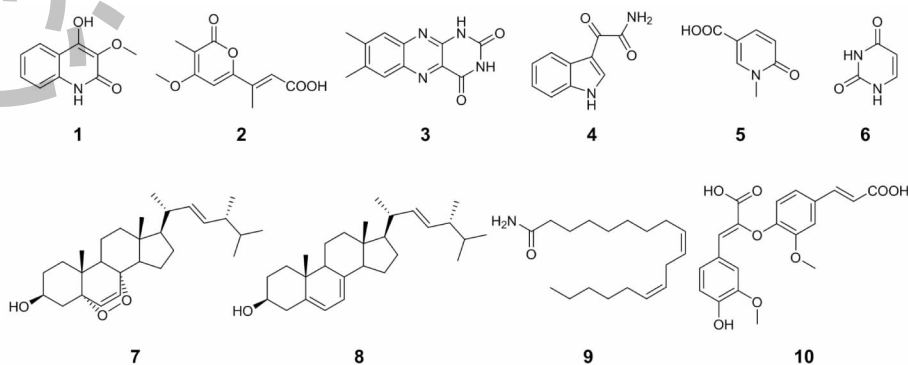


图1 化合物**1**~**10**的化学结构式

Fig. 1 The chemical structures of compounds **1-10**

2.2 抗乙酰胆碱酯酶活性筛选

所述单体的抗乙酰胆碱酯酶活性筛选结果显示,化合物 3 对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制活性,IC₅₀ 为 77.9 ± 11.1 μmol/L (阳性对照石杉碱甲 IC₅₀ 为 0.6 ± 0.1 μmol/L) 其余化合物在浓度为 100 μmol/L 时,对乙酰胆碱酯酶无明显抑制活性。

2.3 抗炎活性筛选

所述单体的抗炎活性筛选结果显示,化合物 3、7、8、9 对脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞释放一氧化氮具有抑制活性,IC₅₀ 值分别为 36.8 ± 1.0、3.9 ± 0.2、36.6 ± 0.0、53.2 ± 1.4 μmol/L (阳性对照吲哚美辛 IC₅₀ 为 39.0 ± 13.8 μmol/L), 其余化合物在浓度为 100 μmol/L 时,对 RAW 264.7 细胞 NO 释放无明显抑制活性。

3 讨论与结论

微生物在体外发酵培养时可以产生结构新颖多样的代谢产物^[6],通过对微生物代谢产物的分离鉴定并结合活性筛选,有望发现具有开发潜力的活性分子。*C. tenuissimum* 是课题组前期从蛇足石杉中分离得到的一株内生真菌,文献报道该菌在乔松 (*Pinus wallichiana*)、美登木 (*Maytenus hookeri*) 等植物中也曾分离报道,Naseer, Dai 等^[21,22] 对其在马铃薯-葡萄糖琼脂培养基中发酵的代谢产物进行研究,分离得到多个大环内酯类聚酮,其中部分化合物具有抗菌活性。在本研究中,从 *C. tenuissimum* 的糙米发酵产物中共分离鉴定了 10 个代谢产物,包括 6 个含氮类化合物,2 个甾体类化合物,2 个聚酮类化合物,部分化合物具有抗乙酰胆碱酯酶和抗炎的生物活性。其中化合物 1 的结构虽已有报道^[11],但其核磁数据尚无文献参考,本文利用二维核磁共振(2D NMR)等方法,对其碳氢数据进行了准确归属。上述研究结果对进一步了解极细枝孢菌 *C. tenuissimum* 代谢产物的结构类型和活性天然产物的发现有一定的参考意义。但是,在对该菌株的系统分离研究中,发现该株内生真菌在本文报道的条件下进行发酵培养,其代谢产物非常有限,没有分离到文献中报道的大环内酯类成分,可能是由于培养条件不同或者内生菌的植物宿主不同,导致其代谢产物不同。在后续研究中,可以尝试改变发酵培养条件或者尝试不同真菌共培养的方法,结合液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析导向,筛选出合适的培养条件后,再开展 LC-MS 导向性分离,尽量避免低层次的重复性分离。另一方面,随着目前基因组测序技术的快

速发展,基于基因挖掘技术进行新颖结构活性天然产物的发现策略,成为研究的前沿热点^[23]。通过激活特定基因簇的表达,或者将相关的基因簇在其他异源体系中进行表达,有望发现大量常规条件下无法获得的新颖产物。

参考文献

- Pan CM. Primary Color Atlas of Chinese Folk Herbal Medicine(中国民间生草药原色图谱)[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2014: 11.
- Qi BW, Mo T, ZHANG X, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *Huperzia huperzia* and their inhibitory activities against acetylcholinesterase and anti-inflammatory activities[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44: 3213-3220.
- Wang Y, Zeng QG, Zhang ZB, et al. Isolation and inhibition of acetylcholinesterase activity of endophytic fungus from *Huperzia huperzia*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36: 734-740.
- Sang X, Yang MH, Su JQ. Research on endophytic fungi for producing huperzine A on a large-scale[J]. Crit Rev Microbiol, 2020, 46: 654-664.
- Ishiuchi K, Hirose D, Suzuki T, et al. Identification of *Lycopodium* alkaloids produced by an ultraviolet irradiated strain of *Paraboeremia*, an endophytic fungus from *Lycopodium serratum* var. *longipetiolatum* [J]. J Nat Prod, 2018, 81: 1143-1147.
- Qi BW, Liu X, Mo T, et al. Nitric oxide inhibitory polyketides from *Penicillium chrysogenum* MT-12, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata* [J]. J Nat Prod, 2017, 123: 35-43.
- Wu Y, Luo Y, Qi BW, et al. Metabolites from *Cercospora lagenariae* MT-45, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50: 546-550.
- Zhang X, Qi BW, Yang HY, et al. Two new diphenyl ether derivatives from *Penicillium chrysogenum* MT-12, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49: 2496-2501.
- Yang HY, Qi BW, Ding N, et al. Polyketides from *Alternaria alternata* MT-47, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata* [J]. Fitoterapia, 2019, 137: 104282.
- Jiang FF, Qi BW, Ding N, et al. *Lycopodium* alkaloids from *Huperzia serrata* [J]. Fitoterapia, 2019, 137: 104277.
- Jiang MY, Rao KR, Liao CC, et al. Study on the anti-inflammatory activity of iridoids from *Valeriana jatamansi* on mac-

- rophages [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:913-920.
- 12 Pongratz E, Kappe T. Ylides of heterocycles. VIII. Reactions of iodonium ylides with acids [J]. Monatsh Chem, 1984, 115: 231-242.
- 13 Hammerschmidt L, Debbab A, Ngoc T, et al. Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Acremonium strictum* [J]. Tetrahedron Lett, 2014, 55:3463-3468.
- 14 Ding Z, Zhao J, Yang P, et al. ¹H and ¹³C NMR assignments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia alba* sp [J]. Magn Reson Chem, 2009, 47:366-370.
- 15 Bao B, Zhang P, Lee Y, et al. Monoindole alkaloids from a marine sponge *Spongosorites* sp [J]. Mar Drugs, 2007, 5:31-39.
- 16 Li J, Chen Q, Zeng Y, et al. A new phenol compound from endophytic *Phomopsis* sp. DC01 [J]. Nat Prod Res, 2012, 26: 2008-2012.
- 17 Liu R, Luo H, Li Y, et al. N-containing compounds from the traditional Chinese medicine Chansu [J]. Chem Nat Compd, 2009, 45:599-600.
- 18 Niu X, Li S, Peng L, et al. Constituents from *Limonia crenulata* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2001, 3:299-311.
- 19 Bao B, Zhang P, Lee Y, et al. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitory activities of fatty acid amides isolated from *Mylabris phalerate* Pallas [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14:4277-4280.
- 20 Bunzel M, Ralph J, Funk C, et al. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber [J]. Eur Food Res Technol, 2003, 217: 128-133.
- 21 Naseer S, Bhat KA, Qadri M, et al. Bioactivity-guided isolation, antimicrobial and cytotoxic evaluation of secondary metabolites from *Cladosporium tenuissimum* associated with *Pinus wallichiana* [J]. ChemistrySelect, 2017, 2:1311-1314.
- 22 Dai HQ, Kang QJ, Li GH, et al. Three new polyketide metabolites from the endophytic fungal strain *Cladosporium tenuissimum* LR463 of *Maytenus hookeri* [J]. Helv Chim Acta, 2006, 89:527-531.
- 23 Ziemert N, Alanjary M, Weber T. The evolution of genome mining in microbes—a review [J]. Nat Prod Rep, 2016, 33: 988-1005.

8-羟基喹啉衍生的曼尼希碱靶向多药耐药癌症的构效关系研究

癌症化疗失败的一个常见原因是耐药性的发展。多重耐药性(MDR)是一个多因素过程,一种常见的机制是与ATP结合盒(ABC)转运蛋白家族的能量依赖性外排泵介导的外源性物质的细胞聚集减少有关。曼尼希反应是药物化学中的一种强大工具,可用于开发抗癌、抗菌、抗疟药和抗病毒候选药物。曼尼希反应的潜在底物是8-羟基喹啉(8-OHQ),由8-OHQ配体形成的曼尼希碱金属配合物通过调节细胞的金属和氧化还原稳态而具有较强的抗癌活性。

来自匈牙利自然科学研究中心酶学研究所的Veronika F S Pape及其团队发现了一组8-羟基喹啉衍生的曼尼希碱对多药耐药细胞具有独特的抗癌活性。在曼尼希碱的MDR选择性抑制活性的研究上,该团队设计了一个包含120种具有不同取代基的曼尼希碱化合物库,以探索具有强大MDR选择性毒性的8-羟基喹啉衍生的曼尼希碱分子的化学空间。为了评估不同取代对曼尼希碱MDR选择性毒性的影响,该团队在一组亲代细胞和MDR细胞上进行了细胞毒性实验。最终结果表明质子化和金属螯合作用是调节曼尼希碱MDR选择性抗癌活性的重要因素。该团队研究结果确定了提高MDR选择性抗癌活性的结构要求,为开发更有效的针对MDR癌症的抗癌螯合剂提供了指导。相关研究发表在《Journal of Medicinal Chemistry》杂志上。

胡乃华编译自: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jmedchem.2c00076#>

原文标题: Structure-activity relationships of 8-hydroxyquinoline-derived manich bases with tertiary amines targeting multidrug-resistant cancer