

葡萄穗霉属真菌 *Stachybotrys* sp. CPCC 401591 中 phenylspirodrimane 类化合物抗肿瘤活性研究

荣小婷^{1,2†}, 何文妮^{1†}, 郭哲¹,
李鑫鑫¹, 王璐¹, 高坤², 余利岩^{1*}, 张涛^{1*}

¹中国医学科学院 & 北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050; ²江苏科技大学生物技术学院, 镇江 212100

摘要: 本论文以葡萄穗霉属真菌 *Stachybotrys* sp. CPCC 401591 为研究对象, 对其 phenylspirodrimane (PSM) 类化合物进行化学分离并评价单体化合物抗肿瘤活性。采用 OSMAC (one strain many compounds) 技术对菌株 CPCC 401591 发酵培养基优化, 并结合 LC-MS/MS 质谱分子网络分析、正相硅胶柱、反相硅胶柱以及半制备高效液相色谱等分离技术, 对目标菌株 CPCC 401591 发酵产物的乙酸乙酯提取相, 进行化合物分离纯化。结合质谱、核磁共振数据、钼试剂诱导圆二色谱 (CD) 以及文献检索比对, 共分离获得 8 个 PSM 类单体化合物。同时, 采用 CCK-8 比色法对化合物 1~8 的抗肿瘤活性进行评价。结果表明: 化合物 1~8 均为聚酮来源杂萜分子, 分别为 chartarlactam H (1)、chartarlactam F (2)、stachybotrin (3)、chartarlactam K (4)、stachybotrylactam (5)、F1839-A (6)、Mer-VGF724B (7)、3 α -hydroxyl-*N*-isopropyl carboxyl-phenylspirodrimane (8)。化合物对人肝癌细胞株 HepG2、人宫颈癌细胞株 HeLa 和人结肠癌细胞株 HCT116 具有较好的抑瘤活性。本研究丰富了该菌次级代谢产物的结构多样性, 也为从葡萄穗霉属类真菌中发现更多的抗肿瘤活性分子提供科学依据。

关键词: 葡萄穗霉属; 天然产物分子网络分析; phenylspirodrimane; 抗肿瘤活性; 结构鉴定

中图分类号: R284; R978.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)8-1348-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.8.007

Isolation and antitumor activity of phenylspirodrimane derivatives from the fungus *Stachybotrys* sp. CPCC 401591

RONG Xiao-ting^{1,2†}, HE Wen-ni^{1†}, GUO Zhe¹,
LI Xin-xin¹, WANG Lu¹, GAO Kun², YU Li-yan^{1*}, ZHANG Tao^{1*}

¹Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

²College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212100, China

Abstract: The phenylspirodrimane derivatives exhibiting antitumor bioactivities were isolated from the fermentation crude extract of the fungal strain *Stachybotrys* sp. CPCC 401591. In the study, OSMAC (one strain many compounds) approach was conducted to optimize the fermentation medium. LC-MS/MS-based molecular network analysis was performed for guiding isolation process of secondary metabolites. The routine separation approaches for purification included ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography and preparative HPLC. Eight compounds were obtained and their structures were elucidated as chartarlactam H (1), chartarlactam F (2), stachybotrin (3), chartarlactam K (4), stachybotrylactam (5), F1839-A (6), Mer-VGF724B (7), and 3 α -hydroxy-*N*-isopropyl-carboxyl-phenylspirodrimane (8) by analysis of spectroscopic data including nuclear magnetic resonance, mass spectrometry analysis, and Mo₂(OAc)₄-induced circular dichroism (CD) spectra. The cytotoxic activity of the compounds 1-8 were evaluated by CCK-8 assay *in vitro*. The results showed that compounds 1-8 displayed moderate inhibition activities on human hepatoma carcinoma cells HepG2, human cervical cancer cells HeLa, and hu-

收稿日期: 2023-01-17 接受日期: 2023-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(31872617); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-055, 2019-I2M-1-005); 北京协和医学院基本科研业务费(3332018097)

† 共同第一作者

* 通信作者 Tel: 86-10-63017304; E-mail: zhangt218@hotmail.com, yly@cpcc.ac.cn

man colon cancer cells HCT116. The result could provide scientific basis for mining more new antitumor compounds from *Stachybotrys* genus.

Key words: *Stachybotrys*; global natural products social molecular networking; phenylspirodrimanes; antitumor activity; structural identification

葡萄穗霉属真菌 (*Stachybotrys*) 隶属于葡萄穗霉科 (*Stachybotryaceae*), 多营腐生或弱寄生生活, 广泛存在于土壤、植物和潮湿的室内环境^[1]。该属真菌产生的次级代谢产物结构类型丰富, 包括单端孢霉烯类 (trichothecenes)、二萜类、phenylspirodrimanes (PSM) 类、聚酮类、氧杂蒽酮类、环肽类和细胞松弛素类 (alachalasin) 等^[2,3]。这些化合物在抗肿瘤、抗菌、抗疟疾、抗病毒、抑制胆固醇酯酶和抗炎等方面具有显著的生物学活性^[3-6]。近年来, 葡萄穗霉属来源的结构新颖的活性化合物分子仍然不断被分离报道。Li 等^[7]从海绵中分离的纸葡萄穗霉 (*S. chartarum*) WGC-25C-6 中分离鉴定到单端孢霉烯类化合物。其中, mytoxin A 和 satratoxin G 等化合物对 HCT-116、HepG2、BGC-823 等细胞株具有显著的抗肿瘤活性, 其 $IC_{50} < 0.01 \mu\text{mol/L}$ 。Yang 等^[8]从海洋来源的纸葡萄穗霉菌 J403-SS6 中鉴定 6 个二萜化合物, atranone Q 对致病菌包括白色念珠菌和粪肠球菌具有显著的抑制作用, MIC 值分别为 8 和 16 $\mu\text{g/mL}$ 。

PSM 类化合物家族庞大, 自 1980 年 Miyazaki 等^[9]在葡萄穗霉菌 *S. complementi* 中分离得到补体抑制剂 K-76, 已有近 120 余个 PSM 类化合物分子被分离鉴定。Ma 等^[4]从 *S. chartarum* MXH-X73 中分离获得 11 个 PSM 类单体化合物, 研究表明 stachybotrin D 能够抑制野生型 HIV-1 和非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs) 耐受型 HIV (如 HIV-1_{RT-K103N} 等), EC_{50} 值为 6.2 ~ 23.8 $\mu\text{mol/L}$ 。Liu 等^[10]从 *S. chartarum* CGMCC 3.5365 中分离获得 11 个 PSM 类二聚体分子 (bistachybotrysin L ~ V), 其中, 化合物 bistachybotrysin L 对 HepG2、HCT-116 和 NCI-H460 等细胞株具有显著的抑瘤活性, IC_{50} 为 1.8 ~ 3.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

本研究选取内生真菌 *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 进行深入研究。结合 OSMAC 技术、LC-MS/MS 质谱分子网络分析和 PSM 类化合物紫外吸收特征对菌株 CCCC 401591 的大米固体发酵产物的乙酸乙酯相分离纯化。同时, 结合人肝癌细胞株 HepG2 等肿瘤细胞筛选模型, 以期从该菌株中挖掘

分离抗肿瘤活性分子。研究表明, 葡萄穗霉真菌 CCCC 401591 能够产生 PSM 类化合物, 是一株值得深入研究的资源菌。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器与试剂

安捷伦 1290 高效液相色谱分析仪器 (美国 Agilent 公司); 600M NMR Spectrometer (TMS 为内标, 德国 Bruker 公司); Thermo Scientific LTQ XL ESI 质谱仪 (美国 Thermo 公司); SepaFlashTM 硅胶快速分离柱购自常州三泰科技有限公司; C₁₈ spherical 反相分离柱购自美国 Agela 公司。甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯等均为分析纯 (北京通广精细化工公司); 色谱纯乙腈和甲醇购自德国 Merck 公司; 三氟乙酸、氘代甲醇等购自北京百灵科技有限公司。

1.1.2 菌株来源

菌株 *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 为葡萄穗霉属真菌, 现保存于中国药学微生物菌种保藏管理中心。人肝癌细胞株 HepG2、人宫颈癌细胞株 HeLa 以及人结肠癌细胞株 HCT116 均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心, 现保存于中国药学微生物菌种保藏管理中心。

1.1.3 试剂与配制

麦芽提取物肉汤琼脂培养基 (MEPA): 麦芽提取物肉汤 15 g, 1.5 g 黄豆粉, 20 g 琼脂粉, 1 L 蒸馏水, MEB 培养基购自美国 BD 公司。F2 培养基: 葡萄糖 2 g, 甘油 1 mL, 黄豆粉 0.2 g, 蔗糖 1 g, 蛋白胨 1 g, 聚乙二醇 0.25 g, K₂HPO₄ 0.03 g, NaNO₃ 0.3 g, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, 100 mL 蒸馏水。BY 培养基: 马铃薯葡萄糖水培养基 3 g, 甘露醇 1 g, 麦芽糖 1 g, 酵母提取物 1 g, K₂HPO₄ 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.03 g, 海盐 1 g, 100 mL 蒸馏水。PDB: 马铃薯葡萄糖水培养基 (BD 公司) 3 g, 100 mL 蒸馏水。大米发酵培养基 (RICE): 大米 100 g, 去离子水 100 mL, 121 °C 灭菌 25 min。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的发酵

将菌株 CCCC 401591 从甘油管中接种于 MEPA

平板培养基,于28℃恒温培养7d,用无菌接种环挑取适量菌体接种于种子培养基(200 mL PDB 培养基/500 mL 三角瓶)中,28℃震荡培养96h得到种子液(180 r/min)。将种子液5 mL 接种至灭菌后的大米发酵培养基中,28℃静置培养30d,共发酵100瓶。

1.2.2 色谱及质谱条件

Agilent-ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 nm × 250 mm, 5 μm); 体积流量 1 mL/min; PDA 全波长扫描; 柱温 30℃; 进样量 10 μL。以为流动相乙腈(A)和1.5%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~20 min, 10%→100% A; 20.01~25.00 min, 100% A; 25.01~30.00 min, 10% A。

采用电喷雾离子化源(ESI), 正离子扫描模式, MS 条件: 离子喷雾电压: 4 500 V; 离子源温度: 550℃; 碰撞能量: 45 eV; 扩散碰撞能量: 15 eV; 去簇电压: 100 V; 雾化器压力: 379 kPa; 辅助气压力: 379 kPa; 气帘气压力: 241 kPa; 扫描范围 m/z 150~2 000。

1.2.3 菌株 CICC 401591 天然产物分子网络的建立

按照色谱及质谱条件进样, 质谱仪采集样品的二级质谱, 获得正离子模式下葡萄穗霉菌 *Stachybotrys* sp. CICC 401591 乙酸乙酯粗提物的 Q-TOF-MS/MS 二级质谱文件。将原始数据通过 ProteoWizard 软件转化为 mzXML 格式并上传至 GNPS 平台(<https://gnps.ucsd.edu>), 进行分子网络聚类分析, 结合开放数据库对生成的分子网络中的化合物进行推测与分析。

1.2.4 化合物的提取和分离

发酵产物用等体积乙酸乙酯萃取3次, 减压浓缩得到浸膏(80 g)。将80 g 浸膏以1:1的比例用200-300目硅胶填充至样品柱, 以二氯甲烷-甲醇体系进行梯度洗脱(洗脱条件 100:0→95:5→90:10→85:15→80:20→75:25→70:30→65:35→60:40→55:45→50:50→45:55→40:60→0:100), 流速为 50 mL/min。每个梯度 250 mL 收集 1 瓶, 对所有收集的流分经 TLC 薄层色谱分析后合并, 共收集 10 个流分(A1~A10)。根据 HPLC-DAD 指纹图谱和 PSM 类化合物紫外吸收特征, 选取流分 A13, A12 和 A14 进行分离纯化。流分 A13(0.62 g) 经半制备高效液相色谱(pHPLC), 流动相为乙腈-水(45:55+0.01% TFA; 3 mL/min), 分离得到化合物 1(8.3

mg, $t_R = 6.2$ min), 化合物 2(21.5 mg, $t_R = 6.7$ min) 和化合物 3(9.1 mg, $t_R = 7.7$ min)。流分 A12(0.5 g) 继续采用 pHPLC 制备, 流动相为乙腈-水(40:60+0.01% TFA; 3 mL/min), 纯化得到化合物 4(2.4 mg, $t_R = 21.3$ min), 化合物 5(21.0 mg, $t_R = 31.7$ min)。流分 A14(1.0 g) 利用中压快速液相色谱, 流动相为乙腈-水梯度洗脱(0~15 min, 15:85; 15:85→40:60, 40 min; 40:60→90:10, 30 min; 90:10→100:0, 10 min; 100:0, 15 min; 流速为 20 mL/min), 共收集洗脱液 16 瓶(B1~B16)。流分 B6 采用半制备型 HPLC 制备, 流动相乙腈-水(37:63+0.01% TFA; 3 mL/min), 分离得到化合物 6(4.2 mg, $t_R = 11.8$ min); 化合物 7(3.6 mg, $t_R = 14.6$ min)。流分 B9 继续采用半制备型 HPLC 制备, 流动相为乙腈-水(45:55+0.01% TFA; 3 mL/min), 纯化得到化合物 8(11.2 mg, $t_R = 14.6$ min)。

1.2.5 CCK-8 检测化合物的细胞毒活性

将储存于-80℃的细胞复苏, 体外培养于含10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 5% CO₂, 37℃、饱和湿度条件下培养。HepG2, HCT116 和 HeLa 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔体积 100 μL, 同时 96 孔细胞培养板的边缘孔以无菌 PBS 缓冲液填充, 尽量避免边缘效应。待 24 h 后加药(待测样品通过 DMSO 溶解稀释分别为 5 个浓度梯度)。不同梯度的待测样品加入 96 孔板, 各个浓度均做 3 个复孔, 并设置等量 DMSO 的对照组和无细胞仅含培养基的空白组, 顺铂处理组为阳性对照组。将培养板置于 5% CO₂, 37℃ 培养箱培养 48 h, 每孔加入 20 μL CCK-8 溶液, 于细胞培养箱 37℃ 继续孵育 2 h。经酶联免疫检测 OD₄₅₀ 测量各孔的吸光值, 按下式计算抑制率。

细胞抑制率 =

$$(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{实验组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

对照组: 具有细胞、CCK-8 溶液但不加药物; 实验组: 具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液; 空白组: 含 CCK-8 溶液, 不含细胞和药物。

2 实验结果

2.1 OSMAC 策略优化菌株 *Stachybotrys* sp. CICC 401591 发酵培养基

OSMAC 策略广泛应用于微生物次级代谢产物挖掘和发现, 也是应用最为广泛且成熟的方法^[11,12]。葡萄穗霉菌 *Stachybotrys* sp. CICC 401591 在 4 种不同发酵培养基中次级代谢产物化学多样性

分析结果如图 1 所示。HPLC 分析 280 nm 检测条件下,三种液体发酵培养基(PDB、BY 和 F2)化合物出峰时间多集中于 5~13 min,大米发酵培养基主要集中在 10~18 min。同时,菌株 CCCC 401591 大米固体发酵物代谢谱更为丰富,且代谢物产量更大

(图 1A、1B)。进一步分析大米发酵提取物中一类化合物的紫外吸收特征(230、285、330 nm)(见图 1A)。为此,选取大米发酵培养基作为菌株 CCCC 401591 大规模发酵的培养基开展后续化合物分离纯化工作。

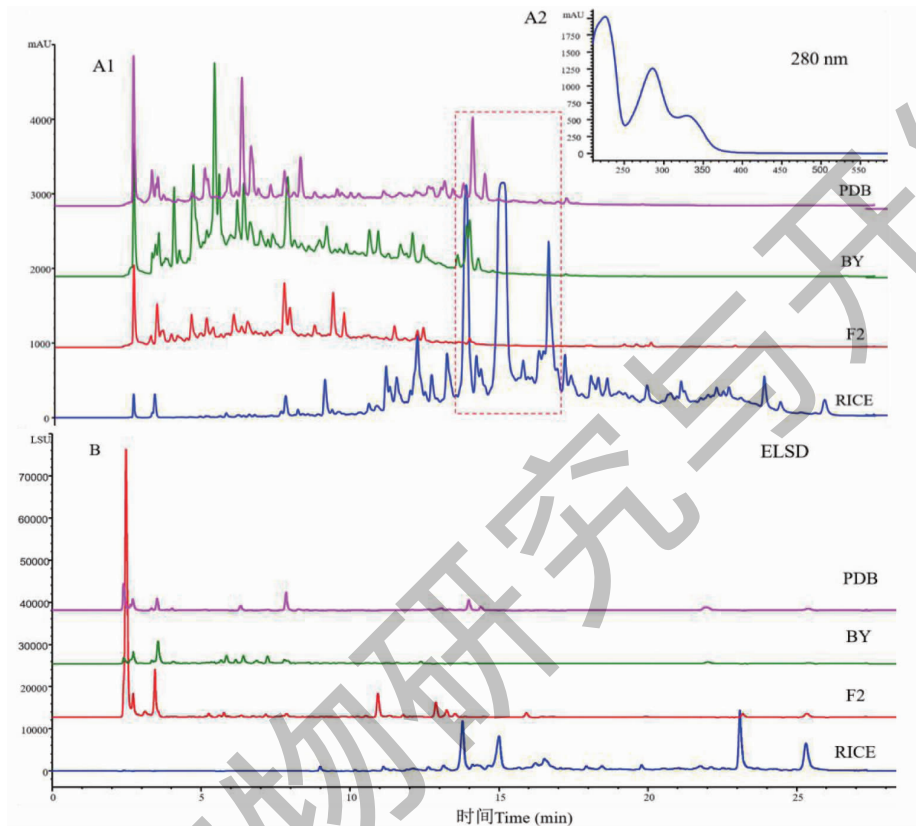


图 1 *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 在四种不同发酵培养基中的代谢谱分析

Fig. 1 Metabolic spectrum analysis of *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 on four different fermentation media

注:A1:280 nm 波长下检测的色谱图差异;B:ELSD 检测差异;A2:A1 图中红框内化合物紫外吸收图谱。Note:A1:The differences of detection by measuring UV absorbance spectra at 280 nm;B:The differences of detection by measuring ELSD;A2:UV absorption spectra of the compounds shown in red box of Fig. A1.

2.2 菌株 *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 大米发酵提取物的 GNPS 分析

为分析菌株 CCCC 401591 的次级代谢产物并挖掘其潜在的新成分,采用高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)结合分子网络 GNPS 策略,对粗提物的成分进行快速表征。基于 MS/MS 光谱的相似性,菌株大米发酵粗提物的可视化分子网络聚簇被建立。其中,1 个明显的分子簇中,在正离子模式下,该簇内共包含了 13 个节点。其相对分子质量范围在 m/z 209.108~540.520 之间,结构涉及 PSM 类化合物分子(见图 2)。特别地,通过文献报道和数据库分析,节点 m/z 386.962 和 430.857 分别被鉴定

为 chartarlactam F 和 stachybotrin 或其同分异构体^[13]。同时,PSM 类分子簇中还有一些分子量(520.56 和 524.68 等)未见报道^[3],提示我们这些化合物可能是新的 PSM 类化合物。

2.3 结构鉴定

化合物 1 橘色粉末;ESI-MS: m/z 430.4 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₅H₃₅NO₅;¹H NMR(600 MHz, CD₃OD)δ: 6.40(1H, s, H-3'), 4.47(2H, s, H-7'), 3.79(2H, t, J = 5.6 Hz, H-2''), 3.66(2H, t, J = 5.6 Hz, H-1''), 3.28(1H, m, H-3), 3.18(1H, d, J = 16.2 Hz, H-11b), 2.76(1H, d, J = 16.2 Hz, H-11a), 2.23(1H, dd, J = 12.4, 2.7 Hz, H-5), 2.02

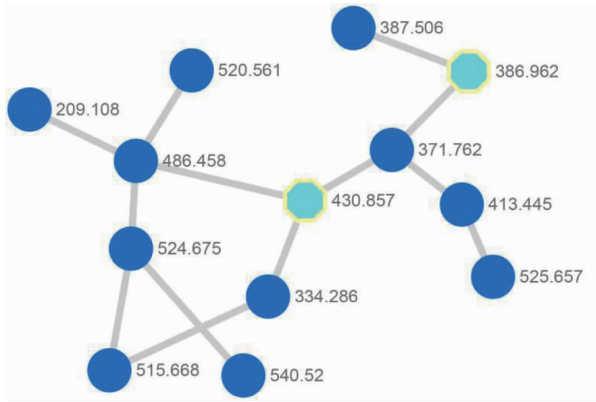


图2 PSM 类化合物分子网络聚簇分析

Fig. 2 GNPS-based cluster of the PSM derivatives

(1H, m, H-2b), 1.85 (1H, m, H-8), 1.76 (1H, m, H-1b), 1.68 (1H, m, H-7b), 1.65 (1H, m, H-6b), 1.61 (1H, m, H-6a), 1.58 (1H, m, H-7a), 1.55 (1H, m, H-2a), 1.14 (1H, m, H-1a), 1.09 (3H, s, H-15), 1.04 (3H, s, H-14), 0.95 (3H, s, H-13), 0.72 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 25.3 (C-1), 26.3 (C-2), 77.3 (C-3), 38.8 (C-4), 41.2 (C-5), 22.3 (C-6), 32.0 (C-7), 38.8 (C-8), 100.8 (C-9), 43.3 (C-10), 32.2 (C-11), 15.9 (C-12), 23.5 (C-13), 28.7 (C-14), 16.6 (C-15), 114.4 (C-1'), 158.6 (C-2'), 102.6 (C-3'), 146.2 (C-4'), 107.1 (C-5'), 159.9 (C-6'), 52.8 (C-7'), 170.3 (C-8'), 45.9 (C-1''), 61.4 (C-2''). 以上数据与文献^[14]中报道一致, 因此鉴定化合物 **1** 为 chartaractam H。

化合物 2 黄色粉末; ESI-MS: m/z 386.4 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_4$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.35 (1H, s, H-3'), 4.27 (2H, s, H-7'), 3.25 (1H, m, H-3), 3.18 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11b), 2.76 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11a), 2.20 (1H, dd, $J = 3.0, 12.4$ Hz, H-5), 1.96 (1H, m, H-2b), 1.83 (1H, m, H-8), 1.81 (1H, m, H-1b), 1.68 (1H, m, H-7b), 1.65 (1H, m, H-6b), 1.60 (1H, m, H-7a), 1.59 (1H, m, H-6a), 1.55 (1H, m, H-2a), 1.13 (1H, m, H-1a), 1.05 (3H, s, H-15), 1.00 (3H, s, H-14), 0.90 (3H, s, H-13), 0.68 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 25.3 (C-1), 26.2 (C-2), 77.2 (C-3), 38.9 (C-4), 41.2 (C-5), 22.2 (C-6), 32.0 (C-7), 38.8 (C-8), 100.8 (C-9), 43.3 (C-10), 32.2 (C-11), 15.9 (C-12), 23.5 (C-13), 28.7 (C-14), 16.7 (C-15), 114.4 (C-1'), 159.0

(C-2'), 102.8 (C-3'), 148.6 (C-4'), 106.7 (C-5'), 160.3 (C-6'), 46.9 (C-7'), 173.2 (C-8')。以上数据与文献中^[14]报道一致, 因此鉴定化合物 **2** 为 chartaractam F。

化合物 3 黄色粉末; ESI-MS: m/z 430.5 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_5$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.67 (1H, s, H-3'), 4.57 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8b'), 4.42 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8a'), 3.79 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H-2''), 3.69 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H-1''), 3.33 (1H, m, H-3), 3.23 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11b), 2.84 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11a), 2.14 (1H, m, H-5), 2.03 (1H, m, H-2b), 1.85 (1H, m, H-1b), 1.84 (1H, m, H-8), 1.58 (2H, m, H-7), 1.56 (2H, m, H-6), 1.55 (1H, m, H-2a), 1.06 (1H, m, H-1a), 1.05 (3H, s, H-15), 0.98 (3H, s, H-14), 0.90 (3H, s, H-13), 0.73 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 25.4 (C-1), 26.0 (C-2), 76.5 (C-3), 38.6 (C-4), 41.4 (C-5), 22.1 (C-6), 32.3 (C-7), 38.4 (C-8), 99.7 (C-9), 43.5 (C-10), 33.0 (C-11), 15.9 (C-12), 23.0 (C-13), 29.0 (C-14), 16.5 (C-15), 118.8 (C-1'), 155.2 (C-2'), 102.1 (C-3'), 134.6 (C-4'), 114.2 (C-5'), 7.69 (C-6'), 171.4 (C-7'), 48.3 (C-8'), 46.3 (C-1''), 61.3 (C-2'')。以上数据与文献^[15]中报道一致, 因此鉴定化合物 **3** 为 stachybotrin。

化合物 4 白色粉末; ESI-MS: m/z 444.4 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NO}_6$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.65 (1H, s, H-3'), 4.82 (1H, m, H-3), 4.47 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8b'), 4.31 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8a'), 4.07 (1H, m, H-2), 3.30 (1H, d, $J =$

= 16.2 Hz, H-11b), 2.94 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11a), 2.09 (3H, s, H-2''), 1.92 (1H, H-5), 1.87 (1H, m, H-8), 1.76 (1H, m, H-1b), 1.59 (1H, m, H-6b), 1.55 (1H, m, H-7b), 1.50 (1H, m, H-6a), 1.49 (1H, m, H-7a), 1.41 (1H, dd, $J = 4.6, 12.5$ Hz, H-1a), 1.14 (3H, s, H-15), 1.01 (3H, s, H-14), 0.93 (3H, s, H-13), 0.80 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 34.7 (C-1), 65.8 (C-2), 81.5 (C-3), 39.2 (C-4), 41.7 (C-5), 21.1 (C-6), 32.2 (C-7), 37.7 (C-8), 99.3 (C-9), 44.8 (C-10), 32.1 (C-11), 15.8 (C-12), 22.1 (C-13), 28.4 (C-14), 17.3 (C-15), 116.3 (C-1'), 155.5 (C-2'), 102.3 (C-3'), 134.9 (C-4'), 116.3 (C-5'), 157.5 (C-6'), 173.9 (C-7'), 44.8 (C-8'), 172.9 (C-1''), 21.6 (C-2''). 以上数据与文献^[14]中报道一致,因此鉴定化合物 **4** 为 chartarlactam K。

化合物 5 白色粉末;ESI-MS: m/z 386.5 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_4$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.73 (1H, s, H-3'), 4.46 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8b'), 4.30 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8a'), 3.33 (1H, m, H-3), 3.27 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11b), 2.87 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11a), 2.17 (1H, dd, $J = 3.0, 12.4$ Hz, H-5), 1.95 (1H, m, H-2b), 1.86 (1H, m, H-8), 1.85 (1H, m, H-1b), 1.66 (1H, m, H-7b), 1.65 (1H, m, H-6b), 1.60 (1H, m, H-7a), 1.59 (1H, m, H-6a), 1.57 (1H, m, H-2a), 1.12 (1H, m, H-1a), 1.09 (3H, s, H-15), 1.01 (3H, s, H-14), 0.91 (3H, s, H-13), 0.77 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 25.4 (C-1), 26.0 (C-2), 76.5 (C-3), 38.6 (C-4), 41.3 (C-5), 43.5 (C-6), 32.3 (C-7), 38.4 (C-8), 99.7 (C-9), 22.1 (C-10), 33.0 (C-11), 16.0 (C-12), 29.0 (C-13), 23.0 (C-14), 16.5 (C-15), 119.0 (C-1'), 157.8 (C-2'), 116.7 (C-3'), 134.7 (C-4'), 102.1 (C-5'), 155.2 (C-6'), 174.1 (C-7'), 43.9 (C-8')。以上数据与文献^[16]中报道一致,因此鉴定化合物 **5** 为 stachybotrylactam。

化合物 6 白色粉末;ESI-MS: m/z 402.4 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_5$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.70 (1H, s, H-3'), 4.42 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8b'), 4.29 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8a'), 3.99 (1H, m, H-2), 3.29 (1H, m, H-3), 3.29 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11b), 2.92 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11a), 1.90 (1H, H-5), 1.87 (1H, m, H-8), 1.78 (1H,

m, H-1b), 1.59 (1H, m, H-7a), 1.59 (1H, m, H-6b), 1.55 (1H, m, H-7b), 1.52 (1H, m, H-6a), 1.32 (1H, dd, $J = 12.5, 4.6$ Hz, H-1a), 1.10 (3H, s, H-15), 1.05 (3H, s, H-14), 0.89 (3H, s, H-13), 0.76 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 33.1 (C-1), 67.2 (C-2), 79.7 (C-3), 39.5 (C-4), 40.6 (C-5), 21.8 (C-6), 32.2 (C-7), 38.0 (C-8), 99.4 (C-9), 44.7 (C-10), 34.0 (C-11), 15.9 (C-12), 29.3 (C-13), 22.5 (C-14), 17.4 (C-15), 118.8 (C-1'), 155.3 (C-2'), 102.2 (C-3'), 134.8 (C-4'), 116.7 (C-5'), 157.6 (C-6'), 174.0 (C-7'), 43.9 (C-8')。以上数据与文献中^[2]报道一致,因此鉴定化合物 **6** 为 chartarlactam J。

化合物 7 白色粉末;ESI-MS: m/z 488.5 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{NO}_7$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.65 (1H, s, H-3'), 4.47 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8b'), 4.31 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8a'), 3.95 (1H, m, H-2), 3.67 (1H, m, H-1b''), 3.59 (1H, m, H-1a''), 3.32 (1H, m, H-3), 3.25 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11b), 2.87 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11a), 2.05 (1H, H-5), 1.98 (2H, m, H-2''), 1.86 (1H, m, H-8), 0.75 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12), 1.75 (1H, m, H-1b), 1.60 (1H, m, H-7b), 1.60 (1H, m, H-3b''), 1.55 (1H, m, H-6b), 1.52 (1H, m, H-7a), 1.52 (1H, m, H-3b''), 1.48 (1H, m, H-6a), 1.31 (1H, dd, $J = 4.6, 12.5$ Hz, H-1a), 1.09 (3H, s, H-15), 1.04 (3H, s, H-14), 0.91 (3H, s, H-13); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 34.0 (C-1), 67.2 (C-2), 79.7 (C-3), 39.5 (C-4), 40.7 (C-5), 21.8 (C-6), 32.2 (C-7), 38.0 (C-8), 99.4 (C-9), 44.7 (C-10), 33.1 (C-11), 15.9 (C-12), 22.6 (C-13), 29.3 (C-14), 17.4 (C-15), 118.6 (C-1'), 155.3 (C-2'), 102.2 (C-3'), 135.0 (C-4'), 114.3 (C-5'), 157.4 (C-6'), 171.2 (C-7'), 48.5 (C-8'), 43.1 (C-1''), 24.8 (C-2''), 32.2 (C-3''), 176.6 (C-4'')。为进一步确定 2,3 位的构型,通过钼试剂诱导 CD (Snatzke 法)^[17]进行验证,如图 3 所示,在 310 nm 附近为负 Cotton 效应,2 位和 3 位羟基均为 S 构型。以上数据与文献^[18]中报道一致,因此鉴定化合物 **7** 为 Mer-VGF724B。

化合物 8 浅黄色粉末;ESI-MS: m/z 458.5 [M + H]⁺, 分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{NO}_6$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.68 (1H, s, H-3'), 4.95 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-1''), 4.56 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8b'), 4.37

(1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-8a'), 3.35 (1H, br, s, H-3), 3.23 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11b), 2.83 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-11a), 2.13 (1H, H-5), 1.97 (1H, m, H-2b), 1.86 (1H, m, H-1b), 1.86 (1H, m, H-8), 1.60 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-3''), 1.53 (1H, m, H-2a), 1.53 (2H, m, H-6), 1.52 (2H, m, H-7), 1.09 (1H, m, H-1a), 1.06 (3H, s, H-15), 0.97 (3H, s, H-14), 0.88 (3H, s, H-13), 0.73 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 25.4 (C-1), 26.0 (C-2), 76.4 (C-3), 38.6 (C-4), 41.4 (C-5), 22.1 (C-6),

32.2 (C-7), 38.5 (C-8), 99.8 (C-9), 43.5 (C-10), 33.0 (C-11), 15.9 (C-12), 23.0 (C-13), 29.0 (C-14), 16.6 (C-15), 119.1 (C-1'), 155.2 (C-2'), 102.1 (C-3'), 134.6 (C-4'), 114.7 (C-5'), 157.6 (C-6'), 171.4 (C-7'), 45.7 (C-8'), 51.1 (C-1''), 15.9 (C-2''), 174.8 (C-3''). 以上数据与文献中^[19]报道的化合物 **4** 一致, 因此, 将化合物 **8** 命名为 3 α -hydroxyl-*N*-isopropyl carboxyl-phenylspirodrimane。

化合物 **1** ~ **8** 的结构见图 4。

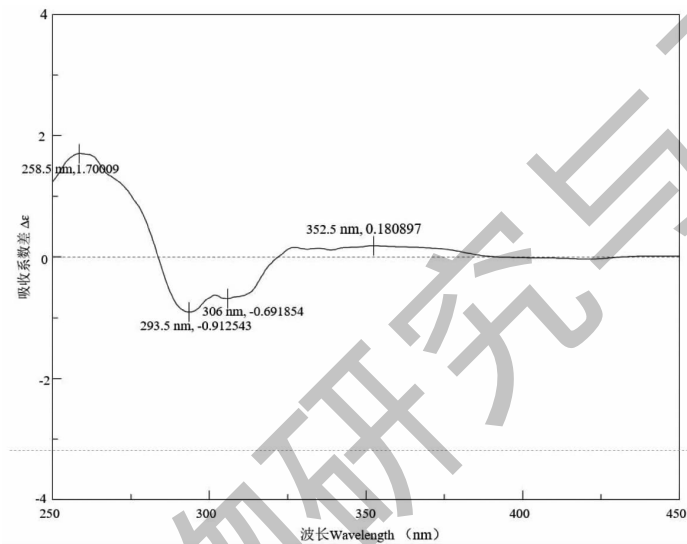


图 3 化合物 **7** 的 CD 图谱

Fig. 3 The CD spectrum of compound **7**

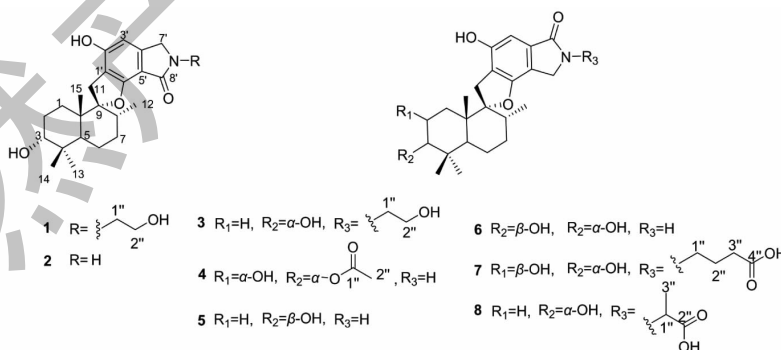


图 4 化合物 **1** ~ **8** 的化学结构

Fig. 4 The structures of compound **1-8**

2.4 体外细胞毒活性检测

采用 CCK-8 法对化合物 **1** ~ **8** 进行细胞毒活性检测。测试细胞包括人肝癌细胞株 (HepG2)、人宫颈癌细胞株 (HeLa) 以及人结肠癌细胞株 (HCT116), 以顺铂作为阳性对照药进行活性评价

(见表 1)。活性测试结果显示, PSM 类化合物对 HepG2、HeLa 和 HCT116 细胞株有较好的抑瘤活性, 但低于阳性对照药。其中, 化合物 **2** 对 3 株肿瘤细胞的抑制活性相对较高, 化合物 **3** 和 **7** 对 HeLa 细胞株的抑瘤活性显著降低。对比化合物 **2** 和 **7** 的化学

结构,化合物 7 中 C2 位羟基化和 N 位的丁酸基团 取代可能降低了抗肿瘤细胞活性(见表 1)。

表 1 化合物 1~8 的细胞毒活性

Table 1 The cytotoxic activities of compounds 1-8

| 化合物 Compound | 抑制率 Inhibition rate(%) | | |
|-----------------|------------------------|--------------|--------------|
| | HepG2 | HCT116 | HeLa |
| 1 | 47.76 ± 1.62 | 60.86 ± 1.76 | 56.82 ± 1.32 |
| 2 | 85.67 ± 1.59 | 70.37 ± 1.62 | 65.75 ± 1.47 |
| 3 | 30.25 ± 0.74 | 57.34 ± 1.42 | 9.83 ± 0.62 |
| 4 | 45.01 ± 1.42 | 53.57 ± 1.37 | 54.41 ± 1.42 |
| 5 | 31.03 ± 0.79 | 59.43 ± 1.45 | 38.72 ± 0.73 |
| 6 | 38.51 ± 1.72 | 57.02 ± 1.35 | 55.88 ± 1.62 |
| 7 | 32.16 ± 1.34 | 29.86 ± 0.97 | 2.45 ± 0.42 |
| 8 | 67.31 ± 1.42 | 55.78 ± 1.32 | 57.98 ± 1.46 |
| 顺铂 Cisplatin | 97.50 ± 1.84 | 97.50 ± 1.74 | 97.50 ± 1.71 |

注:化合物浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

Note: Concentration of the compounds was 100 $\mu\text{mol/L}$.

3 讨论与结论

本研究利用 OSMAC 技术、LC-MS/MS 质谱分子网络分析策略,结合多种色谱及现代波谱手段从葡萄穗霉菌 *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 中分离得到 8 个 PSM 类化合物。近年来,对丝状真菌基因组数据的挖掘分析发现大多数真菌通常含有 40~60 个与天然产物生物合成有关的生物合成基因簇(BGCs),但目前分离鉴定的代谢产物仍然是“冰山一角”。丝状真菌基因组中大多数 BGCs 是沉默或隐蔽的,可能编码的“暗物质”仍未得到鉴定。OSMAC 技术不针对特定的沉默基因簇的激活,而是针对容易操作的培养参数的系统改变(包括培养基成分、pH 值和培养温度等),从而获得结构新颖的生物活性分子^[14]。这使得 OSMAC 技术成为用于激活微生物次级代谢的一种廉价高效、可用通用且相对简单易行的研究方法。本研究针对菌株 CCCC 401591,采用 OSMAC 策略研究 PDB、BY、F2 和 大米发酵培养基对真菌次级代谢产物的影响。综合菌株次级代谢产物的丰度和产量,确定了大米培养基是最佳发酵培养基,表明 OSMAC 技术对该菌株挖掘次级代谢产物的效率有显著提高。同时,本研究将 GNPS 分子网络分析策略运用到对菌株 CCCC 401591 发酵提取物乙酸乙酯相分析,将待分析物的二级质谱数据与数据库中的化合物质谱数据进行比对,快速指出待分析样品中所包含的化合物类别,并进一步助力生物活性分子的高效发现。

PSM 类化合物目前只在葡萄穗霉属和刺黑乌

梅属真菌中分离得到,因此该类化合物为这两类真菌的标志性分子^[20]。化合物 stachybotrin D 具有显著的抗 HIV 活性,对 HIV-1_{wt}、HIV-1_{RT-K103N} 等突变株的 EC₅₀ 值介于 6.2~23.8 μM ^[4]。Jia 等^[5] 研究发现 bistachybotrysin K 对 HCT116 和 NCI-H460 等肿瘤细胞株的 IC₅₀ 值介于 1.1~4.7 μM 。本研究对菌株 *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 中的次级代谢产物开展研究,结合化合物特征性紫外吸收(230、285、330 nm),利用多种色谱技术以及现代波谱技术,分离并确定了 8 个 PSM 类化合物的结构。进一步结合 GNPS 分析,发现该菌株的发酵提取物中仍含有多个单体和 PSM 类二聚体化合物分子,但因为含量少未能得到单体化合物。因此,可通过进一步提高发酵量、优化发酵条件并结合 HPLC-UV-MS 技术寻找更多的 PSM 类分子。目前,我们已经完成菌株 *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 的全基因组测序,通过基因组挖掘手段定位到 2 个可能的 PSM 类化合物的生物合成基因簇 *psd1* 和 *psd2*。两个基因簇均含有聚酮合酶和倍半萜合酶编码基因,同时该基因簇编码丰富的后修饰酶(包括氧化酶 P450s、短链脱氢酶和乙酰转移酶等)。这为我们后续借助基因敲除策略,从而为解析 PSM 类化合物生物合成途径和鉴定关键生物酶功能的研究奠定基础。因此,本研究表明葡萄穗霉真菌 *Stachybotrys* sp. CCCC 401591 能够产生 PSM 化合物,丰富了该菌次级代谢产物的结构多样性,是一株值得深入研究的重要资源菌。

参考文献

- 1 Kuhn DM, Ghannoum MA. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective [J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16:144-172.
- 2 Sakai K, Watanabe K, Masuda K, et al. Isolation, characterization and biological activities of novel triprenyl phenols as pancreatic cholesterol esterase inhibitors produced by *Stachybotrys* sp. F-1839 [J]. J Antibiot, 1995, 48:447-456.
- 3 Ibrahim SRM, Choudhry H, Asseri AH, et al. *Stachybotrys chartarum*—a hidden treasure; secondary metabolites, bioactivities, and biotechnological relevance [J]. J Fungi (Basel), 2022, 8:504.
- 4 Ma XH, Li LT, Zhu TJ, et al. Phenylspirodrimanes with anti-HIV activity from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum* MXH-X73 [J]. J Nat Prod, 2013, 76:2298-2306.
- 5 Jia XN, Zhao JL, Feng JM, et al. Bistachybotrysin K, one new phenylspirodrimane dimer from *Stachybotrys chartarum* with potent cytotoxic activity [J]. J Asian Nat Prod Res, 2020, 22:496-502.
- 6 Zhao JL, Feng JM, Tan Z, et al. Bistachybotrysin A-C, three phenylspirodrimane dimers with cytotoxicity from *Stachybotrys chartarum* [J]. Bioorganic Med Chem Lett, 2018, 28:355-359.
- 7 Li Y, Liu D, Cheng ZG, et al. Cytotoxic trichothecene-type sesquiterpenes from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum* with tyrosine kinase inhibition [J]. RSC Adv, 2017, 7:7259-7267.
- 8 Yang BY, He Y, Lin S, et al. Antimicrobial dolabellanes and atranones from a marine-derived strain of the toxigenic fungus *Stachybotrys chartarum* [J]. J Nat Prod, 2019, 82:1923-1929.
- 9 Miyazaki W, Tamaoka H, Shinohara M, et al. A complement inhibitor produced by *Stachybotrys complementi*, nov. sp. K-76, a new species of fungi imperfecti [J]. Microbiol Immunol, 1980, 24:1091-1108.
- 10 Liu J, Jia XN, Zhao JJ, et al. Bistachybotrysin L-V, bioactive phenylspirodrimane dimers from the fungus *Stachybotrys chartarum* [J]. Org Chem Front, 2020, 7:531-542.
- 11 Pinedo-Rivilla C, Aleu J, Durán-Patrón R, et al. Cryptic metabolites from marine-derived microorganisms using OSMAC and epigenetic approaches [J]. Mar Drugs, 2022, 20:84.
- 12 Zhang T, Cai GW, Rong XT, et al. A Combination of genome mining with an OSMAC approach facilitates the discovery of and contributions to the biosynthesis of melleolides from the basidiomycete *Armillaria tabescens* [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70:12430-12441.
- 13 Pinedo-Rivilla C, Aleu J, Durán-Patrón R, et al. Cryptic metabolites from marine-derived microorganisms using OSMAC and epigenetic approaches [J]. Mar Drugs, 2022, 20:84.
- 14 Li Y, Wu C, Liu D, et al. Chartarlactams A-P, phenylspirodrimanes from the sponge-associated fungus *Stachybotrys chartarum* with antihyperlipidemic activities [J]. J Nat Prod, 2014, 77:138-147.
- 15 Jarvis BB, Salemme J, Morales A, et al. *Stachybotrys* toxins. 1. [J]. Nat Toxins, 1995, 3:10-16.
- 16 Roggo BE, Petersen F, Silis M, et al. Novel spirodihydrobenzofuranlactams as antagonists of endothelin and as inhibitors of HIV-1 protease produced by *Stachybotrys* sp. I. Fermentation, isolation and biological activity [J]. J Antibiot, 1996, 49:13-19.
- 17 Liu J, Du D, Si YK, et al. Application of dimolybdenum reagent $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$ for determination of the absolute configurations of vic-diols [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2010, 30:1270-1278.
- 18 Sakai YY, Yomiko T, Watanabe Y, et al. Compounds that provide inhibition of protease derived from human immunodeficiency virus (HIV): JP10-251262 [P]. 1998-09-22.
- 19 Ma X, Zheng W, Sun K, et al. Two new phenylspirodrimanes from the deep-sea derived fungus *Stachybotrys* sp. MCCC 3A00409 [J]. Nat Prod Res, 2019, 33:386-392.
- 20 Zhang H, Yang MH, Zhuo FF, et al. Seven new cytotoxic phenylspirodrimane derivatives from the endophytic fungus *Stachybotrys chartarum* [J]. RSC Adv, 2019, 9:3520-3531.