

海洋真菌 *Aspergillus jensenii* SS5 中化学成分研究胡靖瑶^{1,2},袁瑞瑛^{1,2*},王广明²,
蔡诗琪²,周明琦²,王富乾^{3*},蔡由生²¹西藏大学医学院,拉萨 850012;²武汉大学药学院,武汉 430071;³武汉市第一医院药学部,武汉 430022

摘要:利用多种柱色谱分离技术从海洋真菌 *Aspergillus jensenii* SS5 的液体发酵产物中分离获得 4 个已知化合物,并通过 NMR、HR-ESI-MS、X 单晶衍射等技术鉴定了它们的结构,分别是 epigriseofulvin (**1**)、sterigmatocystin (**2**)、brevianamide M (**3**)、meleagrins (**4**),其中化合物 **1**~**3** 是首次从曲霉属真菌 *A. jensenii* 中分离获得。采用 SRB 法对分离获得的天然产物进行体外细胞毒性测试,结果表明化合物 **4** 对人肺癌 A549 细胞和人肝癌 Bel-7402 细胞均有较好抑制作用,化合物 **2** 对 A549 人肺癌细胞株有较好抑制作用。本研究作为海洋真菌 *A. jensenii* SS5 的化学成分的补充研究,发现了 2 个具有较好细胞毒活性的化合物,为曲霉属海洋真菌活性天然产物的开发提供了理论依据。

关键词:海洋真菌 *Aspergillus jensenii* SS5; 化学成分; 细胞毒活性

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)11-1902-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.11.008

Chemical constituents of marine fungus *Aspergillus jensenii* SS5HU Jing-yao^{1,2}, YUAN Rui-ying^{1,2*}, WANG Guang-ming²,
CAI Shi-qi², ZHOU Ming-qi², WANG Fu-qian^{3*}, CAI You-sheng²¹Medical College, Tibet University, Lhasa 850012, China;²School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China;³Department of Pharmacy, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China

Abstract: Four natural products were isolated from the fermentation extract of the marine fungus *Aspergillus jensenii* SS5 using various column chromatographic separation techniques, and their structures were identified as epigriseofulvin (**1**), sterigmatocystin (**2**), brevianamide M (**3**), and meleagrins (**4**) by NMR, HR-ESI-MS and X single-crystal diffraction. Compounds **1-3** were obtained for the first time, and all the compound were tested for *in vitro* cytotoxicity by SRB assay. The results of cytotoxic activity test showed that compound **4** had inhibitory effect on human lung cancer A549 and human liver cancer Bel-7402, and compound **2** had inhibitory effect on A549. The study of the chemical composition of the marine fungus *A. jensenii* SS5 has some guiding significance, and two compounds were found to have good cytotoxic activity, which provides some theoretical basis for the development of active natural products of marine fungi of the genus *Aspergillus*.

Key words: marine fungus *Aspergillus jensenii* SS5; chemical constituents; cytotoxicity

海洋是地球上最大的表面资源,其中存在着巨大的生物多样性,是天然产物的重要来源之一。尤其是其中多种多样的海洋微生物,在很大程度上还未被开发。海洋真菌在极端的生存环境下,有着独特的代谢方式与途径,生存繁殖方式、适应机制,从

而产生结构新颖、具有多种生物活性的次级代谢产物,引起国内外科学家的密切关注^[1,2],成为当前最具开发前景的海洋天然产物新药源,也是研发新型先导化合物的热点之一^[3]。

曲霉属广泛分布于陆地和海洋环境中,海洋曲霉已证实具有产生大量结构多样次级代谢物的能力。1992年 Numata 等^[4]报道了首个海洋曲霉来源的天然产物,揭开了海洋曲霉次级代谢产物研究的篇章。截至 2018 年,研究报道的海洋曲霉来源的新天然产物数量已经超过了 979 个,包括聚酮类、生物

收稿日期:2023-03-28 接受日期:2023-07-05

基金项目:科技部重点研发项目(2018YFC0311000);湖北省自然科学基金面上项目(2020CFB726,2021CFB347);武汉市卫健委医学科研项目(WX20A14)

*通信作者 Tel:86-018986136008; E-mail: wangfuqian. c@163.com, 2017103060019@whu.edu.cn

碱类、萜类、大环内酯、酰胺类、甾体类、卤代物类、肽类等多种类型,这一系列海洋真菌次级代谢产物具有抗肿瘤、抗病毒、清除自由基、抗氧化、神经保护、抗炎、抗心脑血管等疾病、抑菌和抗虫等多种生物活性^[5,6]。例如,从海洋真菌 *Aspergillus niger* 发酵产物中提取得到了化合物 aurasperone H, 对人急性早幼粒白血病细胞 HL-60 具有显著的细胞毒性^[7]。海洋真菌 *Aspergillus jensenii* LW128 发酵粗提取物中获得的二苯醚类化合物 diorcinol D 具有良好的抗菌活性^[8]。有必要进一步对罕见的海洋曲霉属真菌进行深入研究,充分发掘其生物合成潜力,以获得更多可以开发为前体药物的天然产物。因此本实验以一种从中国南海海洋沉积物中分离获得海洋真菌 *Aspergillus jensenii* SS5 为研究对象,对其发酵产物进行化学成分鉴定,以期获得具有显著细胞毒活性的次级代谢产物,为小分子癌症治疗药物设计提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 仪器与材料

Bruker AVANCE400 和 600 超导核磁共振仪; LC3000 高效液相色谱仪(瑞亿斯公司); SB-2000 旋转蒸发器(上海艾朗仪器有限公司)。提取分离所用分析纯试剂丙酮、醋酸乙酯、甲醇、石油醚等(湖北申试化工科技有限公司); 色谱级甲醇(湖北弗顿科学技术有限公司)。人肺癌 A549 和人肝癌 Bel-7402 均购自美国模式培养物集存库(ATCC); 5-氟尿嘧啶(5-FU)(纯度 $\geq 99\%$, 批号 F6627, Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司)。

1.2 菌种来源

本实验所使用的真菌菌株是从中国南海海洋沉积物中分离获得,编号 SS5, 菌株由武汉大学药学院洪葵教授课题组鉴定。根据测序结果构建系统发育树,菌株 SS5 与 *Aspergillus jensenii* NRRL 58600 亲缘关系最近, 比对结果中其序列相似度为 99.28%, 结合形态学分析, 初步判断菌株 SS5 为曲霉属真菌 *A. jensenii*。

1.3 菌种的发酵与分离提取

将 26℃ 下静置培养 30 d 后的液体发酵的菌丝体破碎, 丙酮超声提取 3 次, 每次 20 min, 浓缩提取液, 和培养液混合, 浓缩后用醋酸乙酯萃取 3 次, 浓缩得到浸膏(32.0 g)。浸膏经正相硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯(20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:2) 梯度洗脱, 得到 9 个部分 A~I。组分 B(1.5 g) 用正相

硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯(5:1, 2:1, 1:2) 梯度洗脱后, 得到 4 组分 B1~B4。B3(298 mg) 组分进一步采用 Sephadex LH-20 柱色谱(二氯甲烷-甲醇 1:1) 分离, 得到 7 个组分 B3a~B3g。B3d(34 mg) 通过半制备 HPLC 分离纯化(60% 甲醇, 体积流量 3 mL/min, 254 nm), 得到化合物 1(6 mg, $t_R = 15.6$ min)、2(8 mg, $t_R = 26.1$ min)。组分 E(3.1 g) 经正相硅胶柱色谱分离, 用二氯甲烷-甲醇(50:1→1:1) 梯度洗脱后, 得到 6 个组分, 即 E1~E6。E2(184 mg) 经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇) 分离得到 E2a(31 mg)、E2b(22 mg)、E2c(39 mg)、E2d(19 mg)、E2e(61 mg)。E2b 经半制备 HPLC 分离(40%~80% 甲醇, 体积流量 3 mL/min, 254 nm) 得到化合物 3(6 mg, $t_R = 15.3$ min)。G 部分(8.3 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱(二氯甲烷-甲醇 1:1) 分离, 得到 7 个组分 G1~G7。G1(135 mg) 经正相硅胶柱色谱分离, 用石油醚-醋酸乙酯(10:1, 5:1, 2:1, 1:1) 梯度洗脱后, 得到 6 个组分 G1a~G1f。G1c(15 mg) 经半制备型 HPLC 分离(55% 甲醇, 体积流量 3 mL/min, 254 nm) 得到化合物 4(2 mg, $t_R = 25.6$ min)。

1.4 化合物活性测试

采用 SRB 法^[9], 测试了化合物 1~4 化合物对人肺癌 A549 和人肝癌 Bel-7402 两种细胞的生长抑制作用, 5-氟尿嘧啶(5-FU) 为阳性对照, 选用对数生长期细胞, 胰酶消化后用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度至 2×10^4 个细胞/mL, 按照每孔 190 μ L 细胞悬液接种在 96 孔培养板中, 37℃、5% CO₂ 培养 24 h。药物处理孔加入 10 μ L 样品溶液(终质量浓度化合物为 5 μ g/mL, 混合物为 50 μ g/mL), 阳性药物孔加入终质量浓度为 5 μ g/mL 的 5-FU 进行处理; 对照孔加入含等体积溶媒的培养基, 37℃、5% CO₂ 培养 3 d。弃去培养基, 加入 100 μ L 4℃ 预冷的 50% 三氯乙酸(TCA) 固定细胞。先静置 5 min, 然后再移至 4℃ 放置 1 h。倒掉固定液, 蒸馏水洗涤 5 次去除 TCA, 空气干燥 1 h。每孔加入 0.4% SRB 溶液 80 μ L, 室温染色 30 min。弃染液, 1% 醋酸洗涤 5 次充分去除未结合的 SRB, 空气干燥。加入 150 μ L 10 mmol/L Tris-base(pH 10.5) 溶解, 微型振荡器上振荡 5 min。M5 酶标仪测定 OD_{510 nm} 值。根据公式: 肿瘤细胞生长抑制率 = $(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{药物}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 计算各化合物的细胞抑制率。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色结晶(甲醇); $[\alpha]_D^{25} + 80$ (c 0.11, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 353.0781 [$M + H$] $^+$, 分子式为 $C_{17}H_{17}ClO_6$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.13 (1H, s, H-5), 5.55 (1H, s, H-3'), 4.03 (3H, s, 4-OMe), 3.98 (3H, s, 6-OMe), 3.62 (3H, s, 2'-OMe), 2.84 (1H, ddd, $J = 13.4, 4.7, 6.7$ Hz, H-6'), 3.03 (1H, dd, $J = 16.7, 13.4$ Hz, H-5'), 2.43 (1H, dd, $J = 16.7, 4.7$ Hz, H-5'), 0.96 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 6'-Me); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 197.1 (C-4'), 192.5 (C-3), 170.8 (C-2'), 169.5 (C-6), 164.6 (C-7a), 157.8 (C-4), 105.0 (C-3'), 104.9

(C-3a), 97.2 (C-7), 90.8 (C-1'), 89.5 (C-5), 57.0 (4-OMe), 56.7 (2'-OMe), 56.4 (6-OMe), 40.0 (C-5'), 36.4 (C-6'), 14.2 (6'-Me)。以上数据与文献^[10,11]报道一致,故鉴定化合物 **1** 为 epigriseofulvin。对获得的化合物 **1** 单晶进行了 X 射线衍射实验(见图 1),进一步确证了化合物结构。单晶数据如下:四方晶系,晶系空间群 $P4_1$, $a = 0.89546(5)$ Å, $b = 0.89546(5)$ Å, $c = 1.98171(11)$ Å, $V = 1.5890(2)$ Å³, $Z = 4$, $T = 170$ K, μ (Mo $K\alpha$) = 0.272 mm⁻¹, $\rho_{calc} = 1.475$ g/cm³, 反射收集 $18\ 538$ ($4.548^\circ \leq 2\theta \leq 52.818^\circ$), 独立衍射点 3173 ($R_{int} = 0.0495$, $R_{sigma} = 0.0337$), 最终计算得到 $R_1 = 0.0353$ ($I > 2\sigma(I)$) 和 $wR_2 = 0.0828$, Flack 参数 = 0.03(3)。

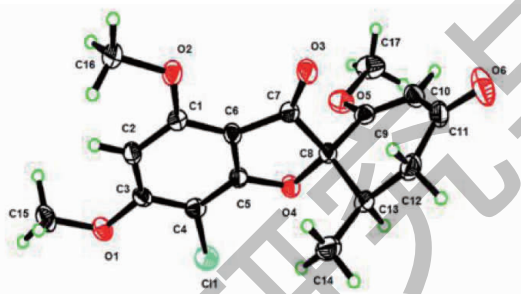


图 1 化合物 1 的 X 射线晶体结构

Fig. 1 X-ray crystal structure of compound 1

化合物 2 浅黄色无定形固体; $[\alpha]_D^{25} - 331$ (c 0.11, $(CH_3)_2CO$); HR-ESI-MS: m/z 325.0701 [$M + H$] $^+$, 分子式为 $C_{18}H_{12}O_6$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.23 (1H, s, OH-3), 7.50 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.83 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6), 6.81 (1H, m, H-14), 6.74 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, H-4), 6.51 (1H, t, $J = 2.4$ Hz, H-17), 6.44 (1H, s, H-11), 5.45 (1H, t, $J = 2.4$ Hz, H-16), 4.81 (1H, dt, $J = 7.2, 2.0$ Hz, H-15), 4.00 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 181.5 (C-1), 109.1 (C-2), 162.4 (C-3), 111.4 (C-4), 135.8 (C-5), 106.6 (C-6), 155.1 (C-7), 154.2 (C-8), 106.6 (C-9), 164.7 (C-10), 90.6 (C-11), 163.4 (C-12), 106.0 (C-13), 113.3 (C-14), 48.2 (C-15), 102.6 (C-16), 145.5 (C-17), 56.9 (C-18)。以上数据与文献^[12,13]报道一致,故鉴定化合物 **2** 为 sterigmatocystin。

化合物 3 无色块状结晶(甲醇); $[\alpha]_D^{25} - 142$ (c 0.13, $(CH_3)_2CO$); HR-ESI-MS: m/z 322.1182 [$M + H$] $^+$, 分子式为 $C_{18}H_{15}N_3O_3$; 1H NMR (400

MHz, $CDCl_3$) δ : 8.40 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-9), 7.88 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 7.75 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.61 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-17), 7.61 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-21), 7.45 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-8), 7.26 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-18), 7.26 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-20), 7.20 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-19), 6.40 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-2), 5.93 (1H, dd, $J = 9.1, 6.2$ Hz, H-13), 4.09 (1H, dd, $J = 13.3, 9.1$ Hz, H-15), 3.83 (1H, dd, $J = 13.3, 6.2$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 75.5 (C-2), 149.2 (C-3), 146.3 (C-5), 127.5 (C-6), 134.7 (C-7), 126.8 (C-8), 126.5 (C-9), 120.1 (C-10), 160.0 (C-11), 57.0 (C-13), 169.6 (C-14), 129.3 (C-17), 128.1 (C-18), 126.6 (C-19), 128.1 (C-20), 129.3 (C-21)。以上数据与文献^[14]报道一致,故鉴定化合物 **3** 为 brevianamide M。

化合物 4 黄色无定形粉末; $[\alpha]_D^{25} - 99$ (c 0.05, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 434.1816 [$M + H$] $^+$, 分子式为 $C_{23}H_{23}N_5O_4$; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.32 (1H, s, H-15), 7.82 (1H, s, H-18),

7.62(1H,d, $J = 7.7$ Hz,H-4),7.38(1H,s,H-20),7.29(1H,t, $J = 7.7$ Hz,H-6),7.09(1H,t, $J = 7.7$ Hz,H-5),7.02(1H,d, $J = 7.7$ Hz,H-7),5.41(1H,s,H-8),5.06(2H,m,H-23),3.77(3H,s,1-OMe),1.32(3H,s,H-24),1.32(3H,s,H-25); 13 C NMR(100 MHz,CD₃OD) δ :101.7(C-2),52.6(C-3),127.0(C-3a),124.6(C-4),123.1(C-5),128.0(C-

6),111.5(C-7),146.7(C-7a),109.2(C-8),142.9(C-9),159.4(C-10),124.5(C-12),165.6(C-13),107.7(C-15),125.9(C-16),136.5(C-18),42.1(C-21),112.3(C-23),64.2(*N*-OMe)。以上数据与文献^[15,16]报道一致,故鉴定化合物**4**为 meleagrins。

化合物**1**~**4**的化学结构如图2。

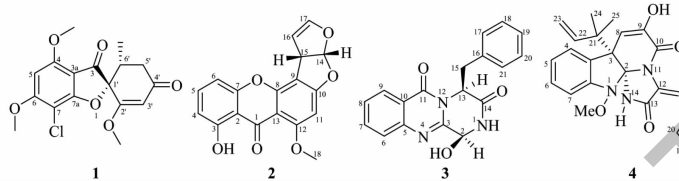


图2 化合物**1**~**4**的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of compounds **1-4**

2.2 肿瘤细胞毒性

活性测试结果表明(见表1),海洋真菌 *A. jensenii* SS5 中的化合物**4**对 A549 人肺癌细胞株和 Bel-7402 人肝癌细胞株均有较好的抑制作用,在 5 μ g/mL 浓度下,初筛抑制率分别为 41.23%、42.23%(阳性对照 5-氟尿嘧啶对两株肿瘤细胞抑制率分别为 47.45%、72.99%);化合物**2**对 A549 人肺癌细胞株的初筛抑制率为 47.34%。化合物**1**和**3**在初筛浓度下对这两种细胞无明显细胞毒性。

表1 化合物**1**~**4**的癌细胞生长抑制活性

Table 1 Inhibitory activity of compound **1-4** on cancer cell growth

化合物 Compound	肿瘤细胞生长抑制率 Inhibition rate on tumor cell growth	
	A549	Bel-7402
1	-	-
2	47.34%	-
3	-	-
4	41.23%	42.23%
5-FU	47.45%	72.99%

注:“-”表示无明显生长抑制活性。

Note:“-”indicates no significant growth inhibitory activity.

3 讨论与结论

从海洋真菌 *A. jensenii* SS5 的粗提取物中分离得到四个化合物:epigriseofulvin(**1**)、sterigmatocystin(**2**)、brevianamide M(**3**)、meleagrins(**4**),其中化合物**1**~**3**是首次从海洋 *A. jensenii* 中分离得到,极大地丰富了曲霉属真菌 *A. jensenii* 次生代谢产物结构的多样性。大量的研究结果已经证明,海洋曲霉属真

菌是多种具有丰富生物活性的次级代谢产物的重要来源,许多海洋曲霉来源的新天然产物具有较好的抗肿瘤、抗病毒等多种生物活性,因此本文对 4 种化合物的细胞毒性进行了测试,结果表明化合物**4**可以有效抑制人肺癌 A549 细胞和人肝癌 Bel-7402 细胞,化合物**2**对 A549 人肺癌细胞株有较好抑制作用,这两种化合物有望作为抗癌前体药物进行深入研究,本研究也为天然活性化合物的开发提供了一定的理论依据。

参考文献

- Huang RH, Han XB, Liu J, et al. Research progress on secondary metabolites with anti-phytopathogenic activities of marine-derived *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp. [J]. Jiangsu Agric Sci(江苏农业学报), 2020, 36:1332-1341.
- Zhao CY, Zhu TH, Zhu WM. New marine natural products of microbial origin from 2010 to 2013[J]. Chin J Org Chem(有机化学), 2013, 33:1195-1234.
- Fu YQ, Yu YM, Ma RY, et al. Advances in research on marine fungi bioactive substances[J]. Shandong Chem Ind(山东化工), 2019, 48:63-65.
- Numata A, Takahashi C, Matsushita T, et al. Fumiquinazolines, novel metabolites of a fungus isolated from a saltfish [J]. Tetrahedron Lett, 1992, 33:1621-1624.
- Jin LM, Xu X, Bao YC. New research progress on antitumor natural products from marine-derived fungi[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:152-158.
- Guo L, Wang C, Guo JC, et al. Identification of marine-derived *Aspergillus tubingensis* LWG-42 and isolation of its antioxidant active compounds [J]. J Microbiol(微生物学杂

- 志), 2017, 37:30-35.
- 7 Li DH, Han T, Guan LP, et al. New naphthopyrones from marine-derived fungus *Aspergillus niger* 2HL-M-8 and their *in vitro* antiproliferative activity [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30: 1116-1122.
- 8 Zhang JX, Duan YY, Bi HK, et al. Secondary metabolites of the marine-derived *Aspergillus jensenii* LW128 and the antibacterial activity [J]. *Acta Microbiol Sin (微生物学报)*, 2023, 63:419-429.
- 9 Jiang N, Song CW, Wei LK, et al. Inhibition effect of ethanol extract from *Eupatorium fortunei* Turcz on human colon cancer RKO cells proliferation *in vitro* [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药)*, 2018, 27:32-35.
- 10 Wu HH, Tian L, Sha Y, et al. Griseofulvin constituents from marine fungus Y26-02 [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2010, 27:282-285.
- 11 Brossi A, Baumann M, Burkhardt F. Griseofulvin. V. Syntheseversuche in der griseofulvinreihe [J]. *Helv Chim Acta*, 1962, 45:1292-1297.
- 12 Liu XB, Zheng N, Liang LQ, et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium equiseti* and their antibacterial activities [J]. *Chem Nat Compd*, 2019, 55: 1141-1144.
- 13 Zhu F, Lin Y. Three xanthenes from a marine-derived mangrove endophytic fungus [J]. *Chem Nat Compd*, 2007, 43: 132-135.
- 14 Li GY, Yang T, Luo YG, et al. Brevianamide J, a new indole alkaloid dimer from fungus *Aspergillus versicolor* [J]. *Org Lett*, 2009, 11:3714-3717.
- 15 Shang Z, Li XM, Meng L, et al. Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus *Penicillium commune* SD-118 [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2012, 30:305-314.
- 16 Zheng CJ, Sohn M, Lee S, et al. Meleagrins, a new fabI inhibitor from *Penicillium chrysogenum* with at least one additional mode of action [J]. *PLoS One*, 2013, 8:e78922.