

# 华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 次级代谢产物及其生物活性研究

张梦娇\*, 邝天浩, 赵金诺, 朱 婷, 彭娟娟

三峡大学生物与制药学院 天然产物研究与利用湖北省重点实验室(中国轻工业功能酵母重点实验室), 宜昌 443002

**摘 要:** 为研究华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 的化学成分及其生物活性, 运用硅胶柱色谱、半制备高效液相色谱等方法对其进行分离提纯, 结合现代波谱技术鉴定化合物结构, 从 *Septoriella phragmitis* 提取液中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为腺苷(1)、cyclo-(S-Pro-S-Ile)(2)、5-羟基-2-羟甲基-4H-吡喃-4-酮(3)、3 $\alpha$ -hydroxyartemisinic acid(4)、leptosphaerone C(5)、1-氨基四氢化萘(6)、泽兰素(7)、 $\beta$ -吡啶基丙氨酸(8)、环(丙氨酸-酪氨酸)二肽(9)、 $\beta$ -D-fructopyranocy-(2 $\rightarrow$ 6)-D-glucopyranose(10), 所有化合物均为首次从华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 中分离。对所得化合物采用对硝基苯基- $\beta$ -吡喃半乳糖苷法测定 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, 对硝基苯磷酸盐法测定 PTP1B 抑制活性, MTT 法测定胃癌细胞 HGC-27 抑制活性, 标准精度对接法进行分子对接。化合物 6 和 7 有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 8.1、8.6  $\mu$ g/mL; 化合物 6、7 和 9 有 PTP1B 抑制活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 6.5、8.2、0.5  $\mu$ g/mL; 化合物 5 和 6 有胃癌细胞 HGC-27 抑制活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 12.2、16.8  $\mu$ g/mL。分子对接显示化合物 6 和 7 与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 PTP1B 蛋白有较强关联性, 可作抗糖尿病先导化合物进行后续研究。

**关键词:** 华泽兰; *Septoriella phragmitis*; 次级代谢产物; 生物活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

## Secondary metabolites of endophytic fungus *Septoriella phragmitis* from *Eupatorium chinense* and its bioactivities

ZHANG Meng-jiao\*, KUANG tian-hao, ZHAO Jin-nuo, ZHU Ting, PENG Juan-juan  
Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biological and Pharmaceutical Sciences(China Key Laboratory of Light Industry Functional Yeast), China Three Gorges University, Yichang 443002, China

**Abstract:** To study the chemical constituents and biological activities of the endophytic fungus *Septoriella phragmitis*, Silica gel column chromatography, semi-preparative high performance liquid chromatography and other methods were used to isolated and purified compounds. Modern spectrum technologies were applied to identify the structures of those isolated compounds. As a result, 10 compounds were isolated from the extract of

*Septoriella phragmitis* for the first time, named  $\beta$ -adenosine (1), cyclo-(S-Pro-S-Ile) (2), 5-hydroxy-2-methylol-4H-pyran-4-ketone (3), 3 $\alpha$ -hydroxyartemisinic acid (4), leptosphaerone C (5), 5, 6, 7, 8-tetrahydronaphthalen-1-amine (6), euparin (7), tryptophan (8), cyclo-(Ala-Tyr) (9),  $\beta$ -D-fructopyranoc-(2 $\rightarrow$ 6)-D-glucopyranose (10). The  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of the obtained compounds was determined by p-nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside method, the PTP1B inhibitory activity was determined by p-nitrophenyl phosphate method, the inhibitory activity of gastric cancer cell HGC-27 was determined by MTT method, and the molecular docking was performed by standard precision docking method. Compounds 6 and 7 showed  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity with IC<sub>50</sub> values of 8.1 and 8.6  $\mu$ g / mL, respectively. Compounds 6, 7 and 9 showed PTP1B inhibitory activity with IC<sub>50</sub> values of 6.5, 8.2 and 0.5  $\mu$ g / mL, respectively. Compounds 5 and 6 showed inhibitory activity against gastric cancer cell HGC-27 with IC<sub>50</sub> values of 12.2 and 16.8  $\mu$ g / mL, respectively. Molecular docking showed that compounds 6 and 7 had a strong correlation with  $\alpha$ -glucosidase and PTP1B protein, which could be used as anti-diabetic lead compounds for subsequent research.

**Key words:** *Eupatorium chinense*; *Septoriella phragmitis*; secondary metabolites; bioactivities

植物内生真菌种类丰富,其代谢产物多种,这些代谢产物可能产生多种与宿主类似的活性物质<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 提取物有抗抑郁<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>、免疫调节<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>等活性。张建芬等<sup>[6]</sup>从华泽兰中分离了 8 株内生真菌,将其发酵液的乙酸乙酯提取物进行了体外抗肿瘤试验,但缺乏单体化合物研究。课题组从华泽兰根部分离到一株内生真菌,菌种鉴定后确定与张建芬等分离的内生真菌不同,为 *Septoriella phragmitis*。目前未有文献报道其次级代谢产物的信息。为了进一步研究华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 的物质基础,本研究对其化学成分进行分离和鉴定,并检测抗糖尿病和抗肿瘤活性,为寻找高效低毒的抗糖尿病先导化合物,开发利用这一药用真菌资源提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

Bruker AVANCE 400 MHz 核磁共振波谱仪(美国 Bruker 公司); Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司); YMC-Pack ODS-A 液相色谱分析柱( $\Phi$ 4.6\*150mm, 粒径 5 $\mu$ m)(日本 YMC 公司); LABCONCO 低温冷冻干燥仪(成都金凤液氮容器有限公司); 酶标仪 ELX-800(美国 BIOTEK 公司)。

正相色谱硅胶(200~300 目,烟台化学工业研究所); PDA、PDB 培养基(杭州百思生物科技有限公司); 葡聚糖凝胶(200~300 目,批号: 131118,上海蓝季科技有限公司); 胃癌细胞株(中国科学院上海生物科学研究所细胞库); MTT 粉末(纯度 $\geq$ 98%,批号: 530R0511, Solarbio 公司); 蛋白酪氨酸磷酸酶(纯度 $\geq$ 90%,批号: SLCG8506, Sigma-Aldrich

公司)； $\alpha$ -葡萄糖苷酶(纯度 $\geq 99\%$ ，编号：G5003，Sigma-Aldrich 公司)，对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷( $p$ -NPG)(纯度 $\geq 98\%$ ，编号：N1627，Sigma-Aldrich 公司)；对硝基苯基磷酸酯( $p$ -NPP)(纯度 $\geq 98\%$ ，编号：20106，Sigma-Aldrich 公司)；紫杉醇(纯度 $\geq 99\%$ ，编号：33069624，Merck 公司)；阿卡波糖(纯度 $\geq 98\%$ ，批号 A129816，Aladdin 公司)；正钒酸钠(分析纯，批号：960702，北京天安联合制药有限公司)；乙腈(色谱纯，美国天地有限公司)；二氯甲烷、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 等其他试剂(分析纯，天力化学试剂有限公司)。

## 1.2 菌株的来源

华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 由本实验室于 2016 年 10 月从湖北长阳的中药华泽兰根部中分离获得。将华泽兰根去除表层土壤，用自来水冲洗干净，75%酒精消毒后用无菌水冲洗 3 次，研磨静置得到菌悬液。对菌悬液进行梯度稀释，分别吸取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液涂布于 PDA 培养基上，28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养，观察，待长出菌丝后，用菌丝顶端纯化法，挑取菌丝顶端于新 PDA 培养基纯化，当不同颜色或形态的菌落生长出来后，继续以此法纯化至菌落为单一纯培养，接入 PDA 斜面，于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 48 h，无菌液体石蜡封口，于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保藏，完成菌株分离。经形态学鉴定和菌株 ITS 序列分析，将菌株鉴定为 *Septoriella phragmitis*，已申请专利<sup>[7]</sup>，并于 2022 年 9 月 13 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCCNO: M20221413，分类命名：*Septoriella phragmitis* LH-1，保藏地址为武汉大学。

## 1.3 菌株的发酵、提取与分离

菌种用 PDA 培养基活化，培养 5 d，接入 PDB 培养基，在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 下培养 14 d，分离发酵液和菌丝体。菌丝体 45  $^{\circ}\text{C}$  烘干后用二氯甲烷：甲醇(1：1)浸泡，反复提取 3 次。提取液经减压浓缩得浸膏 10 g，与 8 g 正相硅胶(200~300 目)进行拌样。取 300 g 正相硅胶加二氯甲烷浸泡 2 h 后湿法装柱，柱体积为 2 L。干法上样，二氯甲烷-甲醇(100：0 $\rightarrow$ 0：100，V/V)梯度洗脱得 30 个流分。将所得流分经半制备液相色谱(乙腈-水=100：0 $\rightarrow$ 90：10)分析，相同流分合并，得 11 个组分 Fr.A~Fr.K。Fr.C 经半制备液相色谱(甲醇/水=10：90 $\rightarrow$ 100：0，8 mL/min)分离得到 5 个组分 Fr.C.1~Fr.C.5，Fr.C.3 经半制备液相色谱(甲醇/水=10：90 $\rightarrow$ 70：30，2.0 mL/min)得化合物 **1**(0.7 mg， $t_{\text{R}}$ =9.5 min)、**5**(2.5 mg， $t_{\text{R}}$ =14 min)、**9**(0.8 mg， $t_{\text{R}}$ =15.5 min)。Fr.D 经半制备液相色谱(甲醇/水=45：55 $\rightarrow$ 50：50，2 mL/min)进行分离得到 4 个组分 Fr.D.1~Fr.D.4，Fr.D.2 经半制备液相色谱(甲醇/水=10：90 $\rightarrow$ 60：40，2.0 mL/min)分离得化合物 **10**(0.5 mg， $t_{\text{R}}$ =7 min)，Fr.D.4 经半制备液相色谱(甲醇/水=10：90 $\rightarrow$ 100：0，2.0 mL/min)分离得化合物 **8**(0.6 mg， $t_{\text{R}}$ =17 min)。Fr.E 经半制备液相色谱(甲醇/水=10：90 $\rightarrow$ 70：30，2.0 mL/min)分离得化合物 **2**(0.9 mg， $t_{\text{R}}$ =9.5 min)。Fr.F 经半制备液相色谱(乙腈/水=20：80 $\rightarrow$ 70：30，2.0 mL/min)分离得 6 个组分 Fr.F.1~Fr.F.6，从 Fr.F.3 中得化合物 **6**(1.2 mg， $t_{\text{R}}$ =13 min)，取 Fr.H 分离得化合物 **3**(0.9 mg， $t_{\text{R}}$ =38 min)和 **4**(1.6 mg， $t_{\text{R}}$ =40 min)。Fr.G 经半制备液相色谱(甲醇/水=20：80 $\rightarrow$ 70：30，

2.0 mL/min) 分离得化合物 7 (0.7 mg,  $t_R=19.5$  min)。

#### 1.4 生物活性筛选

##### 1.4.1 化合物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性筛选

采用对硝基苯基- $\beta$ -吡喃半乳糖苷法, 以阿卡波糖溶液为阳性对照, 对化合物 1~10 进行 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性筛选: 样品组加 80  $\mu$ L 样品溶液、20  $\mu$ L 酶溶液, 混匀, 在 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加 20  $\mu$ L 5 mmol/L *p*-NPG 反应, 孵育 15 min, 加 80  $\mu$ L 1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应。样品空白组加 20  $\mu$ L 1% PBS 代替酶溶液。酶活性组加 20  $\mu$ L 酶溶液, 混匀, 在 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加 20  $\mu$ L 5 mmol/L *p*-NPG 和 80  $\mu$ L 1% PBS 反应, 孵育 15 min, 加 80  $\mu$ L 1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应。酶空白组加 100  $\mu$ L 5 mmol/L *p*-NPG 和 20  $\mu$ L 5 mmol/L *p*-NPG 反应, 孵育 15 min, 加 80  $\mu$ L 1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应。以 405 nm 处吸光度定量 *p*-NPG 释放量, 按式 (1) 计算抑制率。

$$I=1-(A_1-A_2)/(A_3-A_4)\times 100\% \quad (1)$$

式中,  $A_1$ : 样品组吸光度;  $A_2$ : 样品空白组吸光度;  $A_3$ : 酶活性组吸光度;  $A_4$ : 酶空白组吸光度。

##### 1.4.2 化合物对 PTP1B 抑制活性测定结果

采用对硝基苯磷酸盐法, 以正钒酸钠水溶液为阳性对照, 对化合物 1~10 进行 PTP1B 抑制活性筛选: 样品组加 170  $\mu$ L 样品溶液、20  $\mu$ L 酶溶液, 混匀, 在 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加 10  $\mu$ L 5 mmol/L *p*-NPP 反应, 孵育 15 min, 加 80  $\mu$ L 1mol/L NaOH 终止反应。样品空白组 20  $\mu$ L 1% PBS 代替酶溶液。酶活性组加 20  $\mu$ L 酶溶液, 混匀, 在 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加 10  $\mu$ L 5 mmol/L *p*-NPP 和 170  $\mu$ L 1% PBS 反应, 孵育 15 min, 加 80  $\mu$ L 1mol/L NaOH 终止反应。酶空白组加 10  $\mu$ L 5 mmol/L *p*-NPP 和 190  $\mu$ L 5 mmol/L *p*-NPP 反应, 孵育 15 min, 加 80  $\mu$ L 1mol/L NaOH 终止反应。以 405 nm 处吸光度定量 *p*-NPP 释放量, 按式 (2) 计算抑制率。

$$I=1-(A_1-A_2)/(A_3-A_4)\times 100\% \quad (2)$$

式中,  $A_1$ : 样品组吸光度;  $A_2$ : 样品空白组吸光度;  $A_3$ : 酶活性组吸光度;  $A_4$ : 酶空白组吸光度。

##### 1.4.3 化合物对胃癌细胞 HGC-27 抑制活性测定结果

采用 MTT 法, 以紫杉醇为阳性对照, 测定 5 个量大化合物。实验组取对数生长期细胞 100  $\mu$ L 铺于 96 孔板中, 过夜贴壁, 加含化合物的培养基, 使化合物终浓度为 0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100  $\mu$ mol/L。培养 72 h, 加 5 mg/mL MTT 试剂孵育 4 h。弃培养基, 加 150  $\mu$ L DMSO 并震匀, 并设对照组 (以相同浓度紫杉醇代替化合物) 和空白组 (不含化合物和紫杉醇)。于酶标仪 490 nm 处测吸光度, 按式 (3) 计算抑制率。

$$I=1-(A_1-A_2)/(A_1-A_3)\times 100\% \quad (3)$$

式中,  $A_1$ : 对照组吸光度;  $A_2$ : 实验组吸光度;  $A_3$ : 空白组吸光度。

## 1.5 分子对接

化合物 **6** 和 **7** 的结构用 Chem Draw 构建,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 PTP1B 蛋白结构来自 RCSB 数据库, 在 Maestro 11.9 平台处理, 由 Schrödinger Maestro 软件中 Glide 模块处理优化。由 Protein Preparation Wizard 模块处理蛋白质, 由 Lig Prep 模块默认设置制备化合物结构。Glide 模块中, 盒子大小为 15Åx15Åx15Å, 由标准精度对接方法将化合物 **6** 和 **7** 与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶靶点蛋白和 PTP1B 靶点蛋白进行分子对接。

## 2 实验结果

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 黄色固体; EI-MS:  $m/z$  267.2[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.36 (1H, s, H-8), 8.14 (1H, s, H-2), 5.88 (1H, d,  $J=6.1$  Hz, H-1'), 5.52 (1H, s, 5'-OH), 5.46 (1H, s, 2'-OH), 5.28 (1H, s, 3'-OH), 4.61 (1H, t,  $J=5.6$  Hz, H-2'), 4.15 (1H, dd,  $J=5.0, 2.9$  Hz, H-3'), 3.97 (1H, q,  $J=3.4$  Hz, H-4'), 3.64 (2H, m, H-5'), 3.39 (2H, s, -NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 152.7 (C-2), 150.0 (C-4), 120.0 (C-5), 157.9 (C-6), 139.7 (C-8), 88.4 (C-1'), 73.4 (C-2'), 71.1 (C-3'), 87.0 (C-4'), 61.8 (C-5')。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为腺苷。

**化合物 2** 无色固体; EI-MS:  $m/z$  210.1[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.98 (1H, s, -NH-), 4.11 (1H, t,  $J=7.4$  Hz, H-5), 3.96 (1H, s, H-2), 3.61 (2H, s, H-7), 3.18 (1H, m, H-9a), 2.14 (1H, m, H-9b), 2.03 (2H, m, H-8), 1.81 (1H, m, H-10), 1.24 (2H, m, H-11), 0.98 (3H, d,  $J=7.1$  Hz, H-13), 0.83 (3H, t,  $J=7.4$  Hz, H-12); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 169.9 (C-1), 58.9 (C-2), 165.1 (C-4), 60.6 (C-5), 45.2 (C-7), 22.4 (C-8), 28.6 (C-9), 35.3 (C-10), 24.1 (C-11), 12.2 (C-12), 16.0 (C-13)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为 cyclo-(S-Pro-S-Ile)。

**化合物 3** 无色晶体(二氯甲烷:甲醇=1:1); EI-MS:  $m/z$  142.3[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.07 (1H, s, OH-5), 8.02 (1H, s, H-6), 6.35 (1H, s, H-3), 4.29 (2H, d,  $J=5.7$  Hz, H-1); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 168.6 (C-2), 110.3 (C-3), 174.4 (C-4), 146.1 (C-5), 139.7 (C-6), 59.9 (C-1')。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为 5-羟基-2-羟甲基-4H-咪唑-4-酮。

**化合物 4** 黄色粉末; EI-MS:  $m/z$  250.6[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.31 (1H, s, H-13b), 5.49 (1H, s, H-13a), 5.10 (1H, s, H-5), 4.05 (1H, m, H-3b), 1.68 (3H, s, H-15), 0.95 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-14); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 137.7 (C-1), 38.1 (C-2), 121.8 (C-3), 123.6 (C-4), 68.1 (C-5), 37.0 (C-6), 43.0 (C-7), 34.3 (C-8), 28.5 (C-9), 24.6 (C-10), 41.0 (C-11),

143.4 (C-12), 125.3 (C-13), 18.3 (C-14), 17.7 (C-15)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为 3 $\alpha$ -hydroxyartemisinic acid。

**化合物 5** 黄色固体; EI-MS:  $m/z$  156.8[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 5.74 (1H, s, H-6), 5.05 (1H, d,  $J$  = 4.2 Hz, 3-OH), 3.74 (1H, dd,  $J$  = 8.8, 4.6 Hz, H-3), 2.26 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-4a), 2.21 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-4b), 1.91 (3H, s, H-8), 1.08 (3H, s, H-7); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 201.4 (C-1), 76.0 (C-2), 72.3 (C-3), 38.3 (C-4), 159.9 (C-5), 123.9 (C-6), 24.2 (C-7), 18.7 (C-8)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为 leptosphaerone C。

**化合物 6** 白色固体; EI-MS:  $m/z$  147.1[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.98 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-7), 6.85 (1H, m, H-6), 3.51 (1H, s, -NH<sub>2</sub>), 2.68 (2H, m, H-1), 2.33 (2H, m, H-4), 1.55 (4H, m, H-2, 3); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 30.0 (C-1), 24.1 (C-2, 3, 4), 144.1 (C-5), 112.1 (C-6), 125.8 (C-7), 119.5 (C-8), 121.7 (C-4a), 138.0 (C-8a)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为 1-氨基四氢化萘。

**化合物 7** 淡黄色针状晶体 (二氯甲烷: 甲醇=1:1); EI-MS:  $m/z$  216.8[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 12.49 (1H, s, OH-6), 7.80 (1H, s, H-4), 6.90 (1H, s, H-3), 6.46 (1H, s, H-7), 5.71 (1H, s, H-13a), 5.15 (1H, s, H-13b), 2.61 (3H, s, H-14), 2.06 (3H, s, H-11); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 157.7 (C-2), 99.2 (C-3), 123.4 (C-4), 121.7 (C-5), 159.4 (C-6), 102.3 (C-7), 161.4 (C-8), 116.6 (C-9), 203.8 (C-10), 26.6 (C-11), 131.9 (C-12), 113.5 (C-13), 19.0 (C-14)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道一致, 故鉴定该化合物为泽兰素。

**化合物 8** 白色固体; EI-MS:  $m/z$  204.0[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.72 (1H, d,  $J$  = 7.9 Hz, H-4), 7.52 (1H, d,  $J$  = 8.1 Hz, H-7), 7.29 (1H, s, H-3), 7.26 (1H, d,  $J$  = 9.4 Hz, H-5), 7.18 (2H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-6), 4.00 (1H, m, H-11), 3.45 (2H, d,  $J$  = 4.9 Hz, H-10); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 126.7 (C-2), 107.7 (C-3), 119.4 (C-4), 118.4 (C-5), 112.0 (C-6), 122.1 (C-7), 124.9 (C-8), 55.2 (C-9), 26.7 (C-10), 136.3 (C-11), 175.1 (C-12)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道一致, 鉴定为 $\beta$ -吡啶基丙氨酸。

**化合物 9** 白色固体; EI-MS:  $m/z$  234.1[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 8.01 (1H, d,  $J$  = 3.6 Hz, -NH-), 6.93 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, -NH-), 6.66 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-9, 13), 3.01 (1H, dd,  $J$  = 13.6, 3.8 Hz, H-7b), 2.73 (1H, dd,  $J$  = 13.7 Hz, H-7a), 0.54 (3H, d,  $J$  = 7.0 Hz, H-14); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 165.9 (C-1), 50.3 (C-3), 167.8 (C-4), 56.1 (C-6), 38.4 (C-7), 126.5 (C-8), 156.7 (C-9, 13), 115.3 (C-10, 12), 132.1 (C-11), 19.7 (C-14)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>

报道一致，故鉴定该化合物为环(丙氨酸-酪氨酸)二肽。

**化合物 10** 白色粉末; EI-MS:  $m/z$  504.1[M]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>16</sub>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 5.06 (1H, d,  $J$  = 3.5 Hz, H-1'), 4.35 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, H-1''), 4.00 (1H, m, H-3), 3.75 (1H, m, H-4), 3.66 (2H, m, H-6''), 3.64 (2H, m, H-5', 5), 3.62 (2H, m, H-4', 6'a), 3.59 (1H, m, H-3'), 3.57 (1H, m, H-6'b), 3.26 (2H, dd, m, H-2'', 5''), 3.20 (1H, m, H-2), 3.01 (1H, m, H-3''); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 64.3 (C-1), 81.5 (C-2), 75.2 (C-3), 73.4 (C-4), 71.9 (C-5), 67.7 (C-6), 92.6 (C-1'), 70.9 (C-2'), (C-3'), 70.6 (C-4'), 72.4 (C-5'), 63.4 (C-6'), 97.3 (C-2, 1''), 77.2 (C-5, 2''), 72.7 (C-3''), 70.0 (C-4''), 77.1 (C-5''), 61.5 (C-6'')。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道一致，故鉴定该化合物为 $\beta$ -D-fructopyranocy-(2 $\rightarrow$ 6)-D-glucopyranose。

化合物 1~10 的结构见图 1。

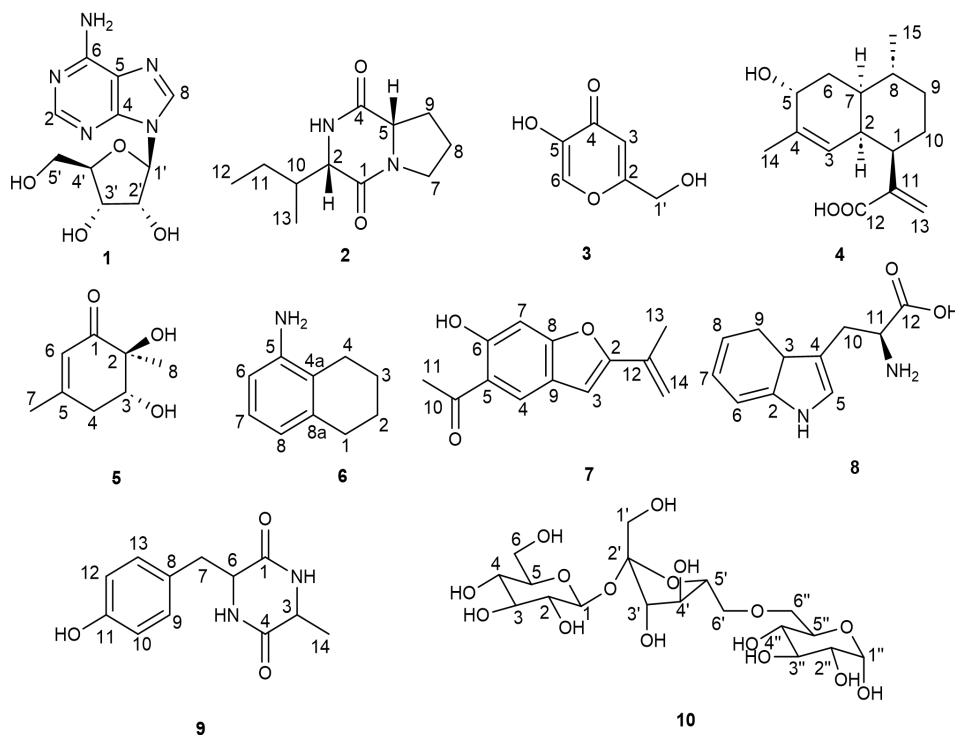


图 1 化合物 1~10 的化学结构

Fig.1 Chemical structures of compounds 1-10

## 2.2 活性测定结果

### 2.2.1 化合物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定结果

对华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 提取分离所得化合物进行 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定，结果（见表 1）显示化合物 6、7 有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性 ( $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ )， $IC_{50}$  值分别为 8.1、8.6  $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 化合物 1~10 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Inhibitory activity of compounds 1-10 on  $\alpha$ -glucosidase ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品 Sample	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	样品 Sample	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
阳性药 Positive drug	4.6±0.998	<b>6</b>	8.1±0.867
<b>1</b>	>50	<b>7</b>	8.6±0.889
<b>2</b>	>50	<b>8</b>	>50
<b>3</b>	>50	<b>9</b>	>50
<b>4</b>	39.3±1.055	<b>10</b>	21.1±1.053
<b>5</b>	>50		

### 2.2.2 化合物对 PTP1B 抑制活性测定结果

对华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 提取分离所得化合物进行 PTP1B 抑制活性测定, 结果 (见表 2) 显示化合物 **6**、**7**、**9** 有较强 PTP1B 活性 ( $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ ),  $IC_{50}$  值分别为 6.5、8.2、0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 活性优于阳性药正钒酸钠 (7.5  $\mu\text{g/mL}$ )。

表 2 化合物 1~10 对 PTP1B 的抑制活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Inhibitory activity of compounds 1-10 on PTP1B ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品 Sample	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	样品 Sample	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
阳性药 Positive drug	7.5±0.998	<b>6</b>	6.5±0.934
<b>1</b>	48.3±1.132	<b>7</b>	8.2±0.956
<b>2</b>	>50	<b>8</b>	>50
<b>3</b>	>50	<b>9</b>	0.5±1.257
<b>4</b>	>50	<b>10</b>	20.2±1.345
<b>5</b>	38.5±1.224		

### 2.2.3 5 个化合物对胃癌细胞 HGC-27 抑制活性测定结果

对华泽兰内生真菌 *Septoriella phragmitis* 提取分离所得 5 个量大的化合物进行胃癌细胞 HGC-27 抑制活性测定, 结果 (见表 3) 显示化合物 **5** 和 **6** 对胃癌细胞 HGC-27 有抑制活性,  $IC_{50}$  值分别为 12.2、16.8  $\mu\text{g/mL}$ 。

表 3 化合物对肿瘤细胞 HGC-27 的抑制活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Inhibitory activity of compounds on tumor cell HGC-27 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品 Sample	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
阳性药 Positive drug	0.004±0.02



2	>100
3	>100
4	>100
5	12.2±0.93
6	16.8±1.02

### 2.3 分子对接

选取对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 PTP1B 有双酶抑制活性的化合物 **6** 和 **7** 进行分子对接 (图 2、图 3), 结果显示结合能均小于 -6 kcal/mol (见表 4)。由 Pymol2.1 软件得化合物与蛋白的结合模式, 可看到化合物 **6** 和 **7** 与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶靶点蛋白口袋相结合的氨基酸残基, 与 His203 氨基酸形成氢键, 与 Ala200、Ile143、Phe144 形成疏水作用, 其苯环部分与 Phe164 氨基酸成 pi-pi 共轭作用。化合物 **7** 与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶靶点蛋白能形成有效相互作用, 与 Asn-258, His203 氨基酸形成氢键, 与 Asp199 形成 Anion-pi 共轭, 与 Ala200、Tyr63、His103 形成疏水作用。化合物 **6** 与 PTP1B 靶点蛋白的 Asn193 氨基酸形成氢键, 与 Leu192, Ile281 形成疏水作用, 其苯环部分与 Phe196、Phe280 氨基酸成 pi-pi 共轭作用。化合物 **7** 与 PTP1B 能形成有效相互作用, 与 Glu200 氨基酸形成氢键, 与 Phe196、Phe280 成 pi-pi 共轭, 与 Leu192 形成疏水作用。

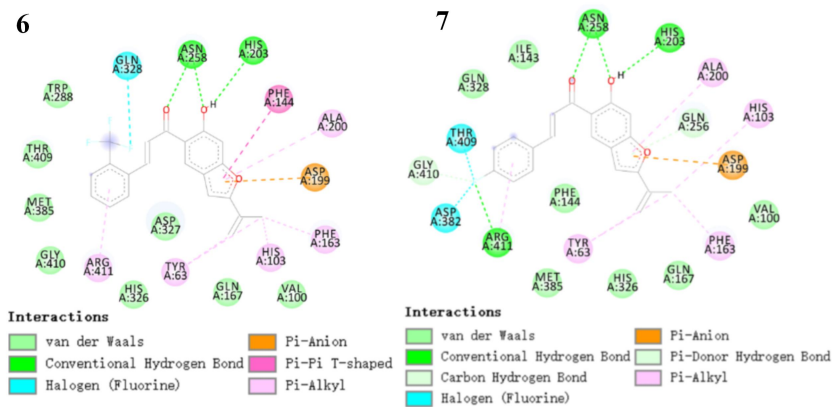


图 2  $\alpha$ -葡萄糖苷酶蛋白的氨基酸残基与化合物 **6** 和 **7** 的结合模式

Fig.2 The binding mode of amino acid residues of  $\alpha$ -glucosidase protein to compounds **6** and **7**

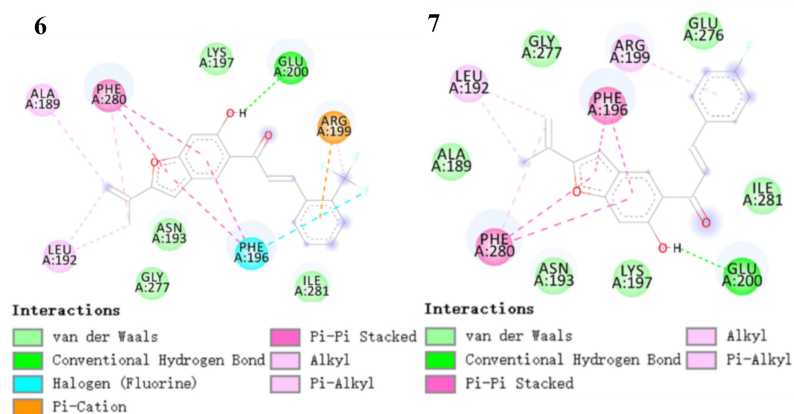


图 3 PTP1B 蛋白的氨基酸残基与化合物 6 和 7 的结合模式

Fig.3 The binding mode of amino acid residues of PTP1B protein to compounds 6 and 7

表 4 2 个化合物与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 PTP1B 靶标的对接结果

Table 4 Docking results of two compounds with  $\alpha$ -glucosidase and PTP1B targets

化合物 Compound	结合能 Binding energy (kcal/mol)	
	$\alpha$ -葡萄糖苷酶 $\alpha$ -Glucosidase	PTP1B
	6	-7.01
7	-7.01	-7.28

### 3 讨论与结论

本研究对该菌株的化学成分进行了探索，从中获得了 10 个化合物，其中包括 5 个生物碱类、4 个酚类、1 个苯并呋喃类，均为首次从该菌株中分离得到，且首次发现微生物可产植物华泽兰的活性成分——泽兰素。药理活性测定结果表明，化合物 6 和 7 分别对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有较好的抑制活性；化合物 6、7 和 9，分别具有较好的 PTP1B 抑制活性，且化合物 6 和 9 的活性优于阳性药正钒酸钠；化合物 5 和 6 与其他化合物相比，对胃癌细胞 HGC-27 具有一定的抑制活性。进一步通过分子对接实验，化合物 6 和 7 均能与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶或 PTP1B 靶点蛋白的氨基酸残基存在氢键、疏水、共轭等多种相互作用。目前尚未有文献报道真菌 *Septoriella phragmitis* 的次级代谢产物，该研究首次报道了该菌株的次级代谢产物，所发现的部分化合物具有糖尿病双靶点抑制活性。

#### 参考文献

- Zeng QT, Yuan T. Study on the chemical constituents of endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. YLHJ01 from *Artemisia selengensis*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2023, 35: 781-786.
- Zhao ZH, Wang XY, Zhan HQ. The application of eupatorin in the preparation of depression drugs(泽兰素在制备治疗抑郁症药物中的应用): CN105919991A[P]. 2016-09-07.
- Han XM, Huang F, Jiao mL, et al. Antidepressant activity of euparin: involvement of monoaminergic

- neurotransmitters and SAT1/NMDAR2B/BDNF signal pathway[J].Biol Pharm Bull,2020,43:1490-1500.
- 4 Khaleghi F,Jantan I,Din LB,et al.Immunomodulatory effects of 1-(6-hydroxy-2-isopropenyl-1-benzofuran-(5-yl)-1-ethanone from *Petasites hybridus* and its synthesized benzoxazepine derivatives[J].J Nat Med,2014,68:351-357.
  - 5 Mohammadi M,Yousefi M,Habibi Z,et al.Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of aerial parts of *Petasites albus* from Iran:a good natural source of euparin[J].Nat Prod Res,2012,26:291-297.
  - 6 Zhang JF,Lin J,Xu HY,et al.Isolation of endophytic fungi from *Eupatorium adenophorum* and their antibacterial,anti-tumor activities[J].Chin Tradit Pat Med(中成药),2020,42:133-138.
  - 7 Liu CX,Li H,Yang HS,et al.A plant endophytic fungus producing eupatorin and its application(一种产泽兰素的植物内生真菌及其应用):CN202211434646.1[P].2022-11-16.
  - 8 Casella TM,Eparvier V,Mandavid H,et al.Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes:Isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402[J].Phytochemistry,2013,96:370-377.
  - 9 Zhuang LW,Zhou WJ,Mao YL,et al.Isolation and purification of cyclodipeptide antialgae compounds from Macroalgae[J].Bull Mar Sci(海洋通报),2022,41:703-712.
  - 10 Gong J,Tang H,Geng WL,et al.Cyclic dipeptides in actinomycete *Brevibacterium* sp. associated with sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka:isolation and identification[J].Acad J Sec Mil Med Univ(第二军医大学学报),2013,32:1284-1287.
  - 11 Liu F,Zhang DJ,Li YG,et al.A new antifungal cyclic lipopeptide from *Bacillus marinus* B-9987[J].Helv Chim Acta,2010,12:251-256.
  - 12 Yin F,Lou JF.Study on the chemical constituents of *bergamot*[J].Chin J Nat Med(中国天然药物),2004,40:20-21.
  - 13 Chen JH,Lan XP,Liu Y,et al.The effects of diketopiperazines from *Callyspongia* sp. on release of cytokines and chemokines in cultured J774A.1 macrophages[J].Bioorganic Med Chem Lett,2012,22:3177-3180.
  - 14 Zhang QQ,Chen JW,Ma YT,et al.Study on chemical constituents of roots of *Eupatorium adenophorum*[J].Chin Tradit Pat Med(中成药),2018,49:4798-4802.
  - 15 Zhu JH.Novel biotransformation processes of dihydroartemisinic acid and artemisinic acid to their hydroxylated derivatives by two plant cell culture systems[J].Process Biochem,2010,6:241-246.
  - 16 Xu XY,Zhang XY,He F,et al.Two new compounds from gorgonian-associated fungus *Aspergillus* sp.[J].Nat Prod Commun,2013,8:1069-1070.
  - 17 He WW,Xu YC,Fu PZ,et al.Cytotoxic indolyl diketopiperazines from the *Aspergillus* sp.GZWMJZ-258,endophytic with the medicinal and edible plant *Garcinia multiflora*[J].J Agric Food Chem,2019,67:381-384.

收稿日期: 2023-11-20                      接受日期:

基金项目: 天然产物研究与利用湖北省重点实验室(三峡大学)开放基金项目(2022NPRD03); 国家级大学生创新创业训练计划项目(20231075023)

\*通信作者 Tel: 0717-6397478; E-mail: 17371593221@163.com