

铁皮石斛内生真菌次生代谢产物研究

徐迪¹, 金日升², 王海翔^{3*}

(1. 芜湖职业技术学院, 安徽 芜湖 241003; 2. 合肥工业大学农产品生物化工教育部工程研究中心, 合肥 230009; 3. 中国药科大学工学院, 南京 211198)

摘要: 为了解铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)内生真菌 *Phyllosticta aristolochiicola* 的次生代谢产物, 从该真菌中分离得到 15 个化合物, 经波谱分析分别鉴定为 *N*-methyl-2-pyrrolidinone (**1**)、环-(甘氨酸-L-脯氨酸) (**2**)、环-(D-丙氨酸-L-脯氨酸) (**3**)、环-(L-缬氨酸-L-脯氨酸) (**4**)、环-(L-亮氨酸-L-脯氨酸) (**5**)、cyclo-(L-Leu-D-4-hydroxyprolinyl) (**6**)、环-(L-苯丙氨酸-L-脯氨酸) (**7**)、环-(L-苯丙氨酸-L-4-羟基脯氨酸) (**8**)、环-(L-酪氨酸-L-脯氨酸) (**9**)、环-(L-苯丙氨酸-L-亮氨酸) (**10**)、啤酒甾醇 (**11**)、对羟基苯乙醇 (**12**)、对羟基苯乙酸 (**13**)、(2*S*,3*R*)-1-(4-羟基苯基)丁烷-2,3-二醇 (**14**)和(2*R*,3*S*)-1-苯基丁烷-2,3-二醇 (**15**)。采用 MTS 法检测抗肿瘤活性表明, 化合物 **2**、**10** 和 **14** 对 HL-60、A-549、SMMC-7721、MCF-7 和 SW-480 细胞株具有一定的抑制活性。

关键词: 铁皮石斛; 内生真菌; 化学成分; 抗肿瘤活性

doi: 10.11926/jtsb.3928

Study on Secondary Metabolites of Endophytic Fungus *Phyllosticta aristolochiicola* from *Dendrobium officinale*

XU Di¹, JIN Ri-sheng², WANG Hai-xiang^{3*}

(1. Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241000, Anhui, China; 2. Engineering Research Center of Bioprocess Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 3. School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: In order to understand the chemical constituents of endophytic fungus *Phyllosticta aristolochiicola* from *Dendrobium officinale*, fifteen compounds were isolated. On the basis of spectral data, their structures were identified as *N*-methyl-2-pyrrolidinone (**1**), cyclo-(glycine-L-proline) (**2**), cyclo-(D-alanine-L-proline) (**3**), cyclo-(L-valine-L-proline) (**4**), cyclo-(L-leucine-L-proline) (**5**), cyclo-(L-leucine-D-4-hydroxyprolinyl) (**6**), cyclo-(L-phenylalanine-L-proline) (**7**), cyclo-(L-4-hydroxyproline-L-phenylalanine) (**8**), cyclo-(L-tyrosine-L-proline) (**9**), cyclo-(L-phenylalanine-L-leucine) (**10**), beer sterol (**11**), *p*-hydroxyphenylethanol (**12**), *p*-hydroxyphenylacetic acid (**13**), (2*S*,3*R*)-1-(4-hydroxyphenyl)butane-2,3-diol (**14**), and (2*R*,3*S*)-1-phenylbutane-2,3-diol (**15**). The MTS assay showed that compounds **2**, **10** and **14** had weak inhibitory activities against five human tumor cell lines, such as HL-60, A-549, SMMC-7721, MCF-7, and SW-480.

Key words: *Dendrobium officinale*; *Phyllosticta aristolochiicola*; Chemical constituent; Antitumour activity

内生真菌是一类在某一阶段或完全生存于健康植物组织内, 而不引起植物组织明显病变的微生物^[1]。近年来, 内生真菌的次生代谢产物研究备受

关注, 其结构、生物活性的多样性, 尤其是在农业和医药业中具有重要的潜力。目前从内生真菌中发现的次生代谢产物种类涵盖了萜类、醌类、生物碱、

收稿日期: 2018-04-16

接受日期: 2018-07-04

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2016A762); 高校优秀青年骨干人才国内访问研修项目(gxgnfx2018100)资助

This work was supported by the Key Project for Natural Science of Department of Education in Anhui Province (Grant No. KJ2016A762), and the Project for Domestic Excellent Training of Outstanding Young Talents in Colleges and Universities (Grant No. gxgnfx2018100).

作者简介: 徐迪(1983~), 男, 讲师, 从事微生物发酵工程与技术。E-mail: 89717860@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wangsky111@yeah.net

异香豆素类、苯并呋喃类、甾体和多肽化合物、酚类等, 而利用植物内生真菌生产抗癌药物、杀虫剂、抑菌剂、植物激素、抗病毒剂、抗氧化剂、免疫抑制剂等均有研究报道^[2-4]。

本文对铁皮石斛中的内生真菌 *Phyllosticta aristolochiicola* 的发酵液乙酸乙酯萃取部位进行了系统的化学成分研究, 利用现代色谱和波谱技术分离鉴定了 15 个化合物(图 1)。

1 材料和方法

1.1 材料

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)植株于 2016 年 7 月采自安徽霍山, 菌株分离自新鲜铁皮石斛叶中, 经基因测序比对鉴定为 *Phyllosticta aristolochiicola* (GenBank 登录号: JX486129.1), 菌种保存于芜湖职业技术学院生物工程学院。

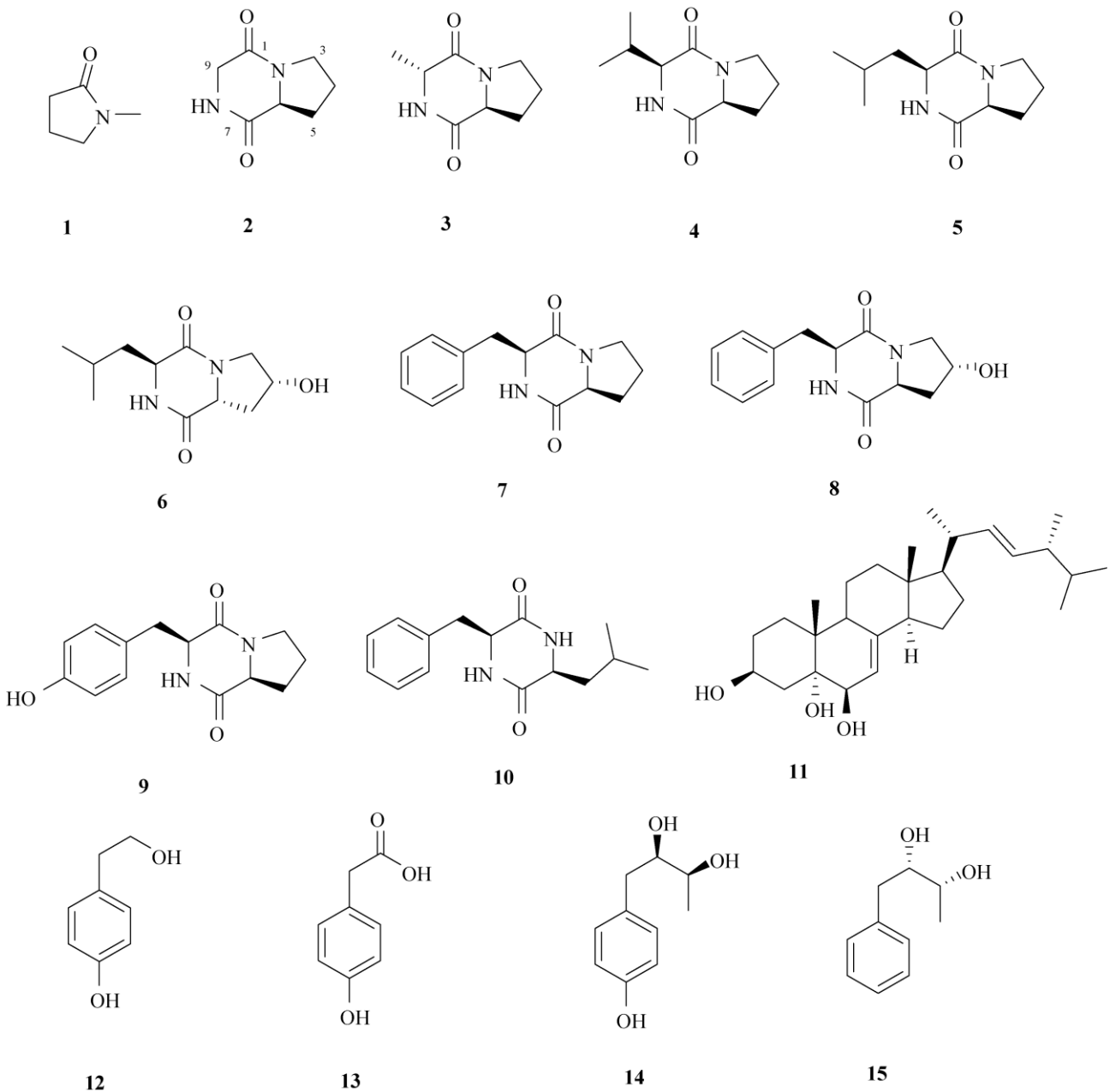


图 1 化合物 1~15 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-15

HL-60、A-549、SMMC-7721、MCF-7 和 SW480 肿瘤细胞株来自中国药科大学工学院。

1.2 仪器

质谱由 Agilent UPLC/Q-TOF 质谱仪测定; 核磁共振由 Bruker AM-400、DRX 500 和 AVANCE III-600 核磁仪测定; 制备型 MPLC 仪器为 Büchi 公司生产(RP-18, 15 mm×230 mm & 26 mm×460 mm); 半制备型 HPLC 为 Waters 1525, 色谱柱为 Waters Xbridge (4.6 mm×150 mm, 5 μm), Waters Sunfire (19 mm×250 mm, 5 μm); 多功能酶标仪(MULTISKAN FC); 正相柱层析硅胶(200~300 目)由青岛海洋化工厂生产; 反相柱层析硅胶为日本富士化工有限公司的 RP-18 (45~70 μm); Sephadex LH-20 为瑞士 Amersham Biosciences 公司生产; 所用试剂均为分析纯或色谱纯。

1.3 提取分离

将纯化的内生真菌 *Phyllosticta aristolochiicola* 菌株接种到经高压灭菌的 PDA 平板培养基上, 于 28℃ 培养箱活化培养 7 d。用灭菌后的 6 mm 打孔器取菌饼, 置于装有 400 mL PDB 培养基的 1 L 锥形瓶中, 共 120 瓶, 放入振荡培养箱中, 于 28℃ 下 135 r min⁻¹ 振荡培养 15 d, 总发酵体积 48 L。

将发酵液(48 L)用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液减压浓缩得到固体浸膏 28.5 g。总浸膏经反相中压色谱柱, 甲醇-水[5:95~100:0, V/V(下同)]梯度洗脱, 得 A~F 共 6 个组分。组分 A 经正相硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(12:1~2:1)梯度洗脱, 再经高效液相色谱(甲醇-水 35:75~60:40, 40 min)制备得到化合物 **14** (7.8 mg, 17 min)、**13** (2.3 mg, 23 min) 和 **15** (6.2 mg, 32 min)。组分 B 经正相硅胶柱色谱石油醚-丙酮(5:1~1:1)梯度洗脱, 得到 B1~B3 共 3 个亚组分; B3 反复经 Sephadex LH-20 柱丙酮洗脱纯化得化合物 **12** (8.1 mg); B2 经高效液相色谱(甲醇-水 42:58~75:25, 35 min)制备得到化合物 **6** (5.2 mg, 21 min)和 **5** (6.5 mg, 24 min)。组分 C 经反相硅胶柱(40%, 60%, 80%, 100% 甲醇)梯度洗脱, 得到 C1~C3 共 3 个亚组分; C1 经正相硅胶色谱石油醚-丙酮(10:1~2:1)梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 柱(氯仿-甲醇 1:1)纯化后, 析出结晶, 得到化合物 **11** (10.8 mg); C2 经 Sephadex LH-20 柱(氯仿-甲醇 1:1)层析后, 经高效液相色谱(甲醇-水 45:55~75:25, 42 min)制备得化合物 **9** (4.8 mg,

20 min)、**10** (5.7 mg, 23 min)和 **4** (4.1 mg, 31 min); C3 经高效液相色谱(甲醇-水 43:57~72:28, 36 min)制备得化合物 **2** (3.2 mg, 28 min)。组分 D 经正相硅胶色谱石油醚-丙酮(10:1~2:1)梯度洗脱, 再经高效液相色谱(甲醇-水 48:52~75:25, 45 min)制备得化合物 **1** (2.4 mg, 19 min)和 **3** (1.8 mg, 25 min); 组分 E 经正相硅胶色谱石油醚-丙酮(15:1~3:1)梯度洗脱, 再经高效液相色谱(甲醇-水 56:44~68:32, 40 min)制备得化合物 **8** (2.1 mg, 26 min)和 **7** (1.5 mg, 32 min)。

1.4 结构鉴定

化合物 1 白色粉末; ESI-MS m/z : 122 [M + Na]⁺。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 3.37 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-5), 2.80 (3H, s, N-CH₃), 2.34 (2H, t, J = 7.8 Hz, H-3), 2.01 (2H, m, H-4); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ 175.8 (C-2), 31.2 (C-3), 17.8 (C-4), 49.6 (C-5), 29.7 (CH₃)。以上数据与文献[5]报道一致, 确定该化合物为 *N*-methyl-2-pyrrolidinone。

化合物 2 白色粉末; ESI-MS m/z : 177 [M + Na]⁺。¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ 4.22 (1H, t, J = 8.8 Hz, H-6), 4.08 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-9a), 3.75 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-9b), 3.60 (2H, m, H-3), 2.37 (1H, m, H-5a), 2.06 (1H, m, H-5b), 1.94 (2H, m, H-4); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ 166.4 (C-1), 46.8 (C-3), 23.4 (C-4), 29.5 (C-5), 59.8 (C-6), 171.9 (C-7), 47.5 (C-9)。以上数据与文献[6]报道一致, 确定该化合物为环-甘氨酸-(L)-脯氨酸。

化合物 3 白色针状结晶; ESI-MS m/z : 169 [M + H]⁺。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 4.18 (2H, m, H-6, 9), 3.62 (2H, m, H-3), 2.38 (1H, m, H-4a), 2.10 (3H, m, H-4b, 5), 1.50 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-11); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ 166.8 (C-1), 45.9 (C-3), 23.0 (C-4), 28.9 (C-5), 59.5 (C-6), 170.5 (C-7), 51.5 (C-9), 16.0 (C-11)。以上数据与文献[7]报道一致, 确定该化合物为环-(D)-丙氨酸-(L)-脯氨酸。

化合物 4 白色粉末; ESI-MS m/z : 219 [M + Na]⁺。¹H NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz): δ 4.12 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-6), 3.89 (1H, s, H-9), 3.63 (1H, m, H-3a), 3.52 (1H, m, H-3b), 2.58 (1H, m, H-4a), 2.39 (1H, m, H-4b), 1.90 (1H, m, H-10), 1.12 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-12), 0.94 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-11); ¹³C NMR (CD₃COCD₃, 125 MHz): δ 168.5 (C-1), 30.2 (C-3),

24.1 (C-4), 46.8 (C-5), 60.9 (C-6), 172.1 (C-7), 61.7 (C-9), 29.9 (C-10), 19.7 (C-11), 16.5 (C-12)。以上数据与文献[8]报道一致, 确定该化合物为环(L)-缬氨酸-(L)-脯氨酸。

化合物 5 白色粉末; ESI-MS m/z : 233 [M + Na]⁺。¹H NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz): δ 4.11 (1H, dd, $J = 8.2, 8.2$ Hz, H-6), 3.97 (1H, dd, $J = 3.1, 9.4$ Hz, H-9), 3.50 (2H, m, H-3), 2.20 (2H, m, H-5), 1.98 (2H, m, H-4), 1.83 (1H, m, H-11), 1.57 (1H, m, H-10), 0.96 (6H, d, $J = 6.5$ Hz, H-12, 13); ¹³C NMR (CD₃COCD₃, 125 MHz): δ 171.0 (C-1), 46.0 (C-3), 23.1 (C-4), 28.9 (C-5), 59.4 (C-6), 167.1 (C-7), 53.6 (C-9), 38.8 (C-10), 24.3 (C-11), 23.6 (C-12), 21.7 (C-13)。以上数据与文献[9]报道一致, 确定该化合物为环(L)-亮氨酸-(L)-脯氨酸。

化合物 6 白色粉末; ESI-MS m/z : 249 [M + Na]⁺。¹H NMR (CD₃COCD₃, 400 MHz): δ 4.48 (1H, m, H-8), 4.00 (1H, dd, $J = 5.8, 9.1$ Hz, H-6), 3.86 (2H, m, H-3, 9a), 3.54 (1H, dd, $J = 4.6$ Hz, 12.5 Hz, H-9b), 2.43 (2H, m, H-7), 1.78 (1H, m, H-11), 1.62 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-10), 1.04 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-12), 0.96 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-13); ¹³C NMR (CD₃COCD₃, 125 MHz): δ 166.9 (C-1), 54.5 (C-3), 68.0 (C-4), 38.3 (C-5), 56.7 (C-6), 170.1 (C-7), 56.6 (C-9), 42.3 (C-10), 24.5 (C-11), 23.1 (C-12), 21.3 (C-13)。以上数据与文献[10]报道一致, 确定该化合物为 Cyclo-(L)-leucine-[D-(4-hydroxyprolinyl)]。

化合物 7 白色粉末; ESI-MS m/z : 245 [M + H]⁺。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 7.20~7.34 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 4.38 (1H, dd, $J = 3.6, 10.0$ Hz, H-9), 4.05 (1H, ddd, $J = 1.7, 6.3, 10.8$ Hz, H-6), 3.54 (1H, m, H-3a), 3.40 (1H, m, H-3b), 3.26 (1H, dd, $J = 4.8, 15.0$ Hz, H-10b), 3.07 (1H, dd, $J = 5.0, 14.4$ Hz, H-10a), 1.78 (2H, m, H-4), 1.65 (1H, m, H-5a), 2.14 (1H, m, H-5b); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ 165.1 (C-1), 45.6 (C-3), 22.8 (C-4), 29.0 (C-5), 59.7 (C-6), 169.5 (C-7), 56.3 (C-9), 37.0 (C-10), 136.0 (C-1'), 129.5 (C-2', 6'), 129.2 (C-3', 5'), 127.4 (C-4')。以上数据与文献[11]报道一致, 确定该化合物为环(L)-苯丙氨酸-(L)-脯氨酸。

化合物 8 白色粉末; ESI-MS m/z : 261 [M + H]⁺。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 7.12~7.20 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 4.54 (1H, brs, H-8), 4.45 (1H,

ddd, $J = 2.0, 4.8, 5.3$ Hz, H-9), 4.29 (1H, ddd, $J = 1.8, 4.8, 10.8$ Hz, H-6), 4.26 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-4), 3.72 (1H, dd, $J = 4.8, 13.2$ Hz, H-3b), 3.28 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-3a), 3.21 (1H, dd, $J = 4.8, 15$ Hz, H-10b), 3.18 (1H, dd, $J = 5.4, 14.4$ Hz, H-10a), 2.03 (1H, ddd, $J = 1.0, 5.4, 12.6$ Hz, H-5a), 1.35 (1H, ddd, $J = 4.8, 10.8, 12$ Hz, H-5b); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ 166.3 (C-1), 55.0 (C-3), 68.2 (C-4), 38.8 (C-5), 58.6 (C-6), 171.1 (C-7), 56.1 (C-9), 38.5 (C-10), 136.5 (C-1'), 130.2 (C-2', 6'), 129.1 (C-3', 5'), 127.7 (C-4')。以上数据与文献[12]报道一致, 确定该化合物为环(L)-苯丙氨酸-(L)-4-羟基-脯氨酸。

化合物 9 白色粉末; ESI-MS m/z : 261 [M + H]⁺。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.02 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.78 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.13 (1H, s, H-8), 4.25 (1H, dd, $J = 2.9, 9.6$ Hz, H-9), 4.08 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-6), 3.59 (2H, m, H-3), 3.41 (1H, dd, $J = 11.0, 14.0$ Hz, H-10), 2.75 (1H, dd, $J = 9.6, 14.4$ Hz, H-10), 2.34 (1H, m, H-5a), 1.96 (1H, m, H-5b), 1.86 (2H, m, H-4); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 165.5 (C-1), 45.6 (C-3), 22.8 (C-4), 28.4 (C-5), 59.4 (C-6), 170.0 (C-7), 56.7 (C-9), 36.1 (C-10), 126.8 (C-1'), 130.5 (C-2', 6'), 116.3 (C-3', 5'), 156.2 (C-4')。以上数据与文献[13]报道一致, 确定该化合物为环(L)-酪氨酸-(L)-脯氨酸。

化合物 10 白色粉末; ESI-MS m/z : 243 [M + H]⁺。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.16~7.32 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 4.28 (1H, m, H-2), 3.82 (1H, m, H-5), 3.25 (2H, m, H-7), 1.54 (2H, m, H-14), 1.23 (1H, m, H-15), 0.82 (6H, t, $J = 6.4$ Hz, H-16, 17); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 56.9 (C-2), 171.5 (C-3), 54.0 (C-5), 168.3 (C-6), 43.1 (C-7), 135.5 (C-8), 130.0 (C-9), 129.2 (C-10), 116.2 (C-11), 128.2 (C-12), 130.9 (C-13), 40.9 (C-14), 24.3 (C-15), 23.3 (C-16), 21.2 (C-17)。以上数据与文献[14]报道一致, 确定该化合物为环(L)-苯丙氨酸-(L)-亮氨酸。

化合物 11 白色针状结晶; ESI-MS m/z : 453 [M + Na]⁺。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 5.68 (1H, brs, H-7), 5.25 (1H, dd, $J = 14.9, 7.5$ Hz, H-23), 5.15 (1H, dd, $J = 14.9, 7.5$ Hz, H-24), 4.75 (1H, m, H-3), 4.30 (1H, brs, H-6), 1.46 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.82 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.80 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-

26), 0.65 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ 31.2 (C-1), 32.5 (C-2), 66.0 (C-3), 40.8 (C-4), 74.9 (C-5), 72.5 (C-6), 119.2 (C-7), 139.9 (C-8), 42.2 (C-9), 36.6 (C-10), 21.6 (C-11), 38.3 (C-12), 42.5 (C-13), 54.0 (C-14), 22.3 (C-15), 27.1 (C-16), 55.1 (C-17), 11.7 (C-18), 17.7 (C-19), 39.4 (C-14), 20.6 (C-21), 135.2 (C-22), 130.7 (C-23), 42.0 (C-24), 32.1 (C-25), 18.9 (C-26), 18.7 (C-27), 17.0 (C-28)。以上数据与文献[15]报道一致, 确定该化合物为啤酒甾醇。

化合物 12 白色粉末; ESI-MS m/z : 161 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, H-6), 6.69 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, H-5), 3.69 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 2.69 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7)。以上数据与文献[16]报道一致, 确定该化合物为对羟基苯乙醇。

化合物 13 白色针状结晶; ESI-MS m/z : 151 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ 7.12 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, H-6), 6.73 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, H-5), 3.45 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ 128.3 (C-1), 131.0 (C-2, C-6), 116.2 (C-3, C-5), 157.5 (C-4), 42.5 (C-7), 176.1 (C-8)。以上数据与文献[17]报道一致, 确定该化合物为对羟基苯乙酸。

化合物 14 淡黄色油状物; $[\alpha]_D^{20}$: -41.94 ($c = 1.130$, CHCl_3); ESI-MS m/z : 189 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 9.01 (1H, s, OH-4'), 7.02 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 6.71 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 3.41 (1H, m, H-3), 3.35 (1H, m, H-2), 2.76 (1H, dd, $J = 13.6, 4.4$ Hz, H-1a), 2.42 (1H, dd, $J = 13.6, 8.4$ Hz, H-1b), 1.05 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ 38.7 (C-1), 76.8 (C-2), 69.8 (C-3), 19.1 (C-4), 130.8 (C-1'), 130.6 (C-2', 6'), 115.1 (C-3', 5') 156.0 (C-4')。以上数据与文献[18]报道一致, 确定该化合物为(2*S*,3*R*)-1-(4-hydroxyphenyl)-butane-2,3-diol。

化合物 15 淡黄色油状物; $[\alpha]_D^{20}$: +41.99 ($c = 1.124$, CHCl_3); ESI-MS m/z : 189 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.25 (5H, m, C-1', 2', 3', 4', 5', 6'), 3.54 (1H, m, H-1a), 2.93 (1H, m, H-1b), 2.62 (1H, m, H-2), 2.16 (1H, m, H-3), 1.23 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 40.6 (C-1), 78.4 (C-2), 71.9 (C-3), 18.2 (C-4), 141.5 (C-1'), 130.9 (C-2', 6'), 129.6 (C-3', 5'), 127.2 (C-4')。以上数据与文献[19]报道一致, 确定该化合物为(2*R*,3*S*)-1-phenylbutane-

2,3-diol。

1.5 抗肿瘤活性试验

参照 Wen 等^[20]的方法, 取化合物 2、4、5、6、9~12、14、15 适量, 用 DMSO 溶解, 进行体外抗肿瘤实验。肿瘤细胞 HL-6、A-549、SMMC-7721、MCF-7 和 SW-480 用含 10% 胎牛血清的培养液 (DMEM 或 RPMI1640) 配成单细胞悬液, 以每孔 3000~15000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL , 贴壁细胞提前 12~24 h 接种培养。化合物以 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 浓度初筛, 每孔终体积 200 μL , 每化合物每种处理均设 3 个复孔。37 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h 后, 贴壁细胞弃孔内培养液, 每孔加 MTS 溶液 20 μL 和培养液 100 μL ; 悬浮细胞弃 100 μL 培养上清液, 每孔加 20 μL 的 MTS 溶液; 设 3 个空白复孔, 继续孵育 2~4 h, 反应充分后用多功能酶标仪 (MULTISKAN FC) 检测 492 nm 波长下的光吸收值, 数据处理后, 以化合物编号为横坐标, 细胞抑制率为纵坐标绘制 5 株细胞的抑制率图。试验均以顺铂 (DDP) 为阳性化合物, 以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法 (Reed and Muench 法) 计算化合物的 IC_{50} 值。

从表 1 可见, 化合物 2、10、14 对 5 种肿瘤细胞具有较弱的抑制活性。化合物 2 对 HL-6、A-549 和 SW-480 细胞的 IC_{50} 分别为 69.49、68.68 和 75.64 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 化合物 10 对 HL-6、A-549、SMMC-7721、MCF-7 和 SW-480 细胞的 IC_{50} 分别为 67.82、84.98、91.08、89.88 和 64.93 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 化合物 14 对 HL-6、A-549、SMMC-7721 和 MCF-7 细胞的 IC_{50} 分别为 88.93、72.98、68.22 和 78.68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 。

2 结果和讨论

本研究利用正相硅胶色谱、Sephadex LH-20、制备型高效液相等色谱手段, 从内生真菌发酵液的乙酸乙酯萃取物中分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为 *N*-methyl-2-pyrrolidinone (1)、环-甘氨酸-(L)-脯氨酸 (2)、环-(D)-丙氨酸-(L)-脯氨酸 (3)、环(L)-缬氨酸-(L)-脯氨酸 (4)、环(L)-亮氨酸-(L)-脯氨酸 (5)、cyclo-(L)-leucine-[D-(4-hydroxyprolinyl)] (6)、环(L)-苯丙氨酸-(L)-脯氨酸 (7)、环(L)-苯丙氨酸-(L)-4-羟基-脯氨酸 (8)、环(L)-酪氨酸-(L)-脯氨酸 (9)、(L)-苯丙氨酸-(L)-亮氨酸 (10)、啤酒甾醇 (11)、对羟基苯乙醇 (12),

表1 化合物的抗肿瘤活性[IC₅₀ (μmol L⁻¹)]Table 1 Antitumour activities [IC₅₀ (μmol L⁻¹)] of compounds

| 化合物 Compound | HL-6 | A-549 | SMMC-7721 | MCF-7 | SW-480 |
|--------------|-------|-------|-----------|-------|--------|
| 2 | 69.49 | 68.68 | > 100 | > 100 | 75.64 |
| 4 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 5 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 6 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 9 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 10 | 67.82 | 84.98 | 91.08 | 89.88 | 64.93 |
| 11 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 12 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 14 | 88.93 | 72.98 | 68.22 | 78.68 | > 100 |
| 15 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| DDP | 3.63 | 13.56 | 7.32 | 11.79 | 6.89 |

对羟基苯乙酸 (**13**), (2*S*,3*R*)-1-(4-hydroxyphenyl)butane-2,3-diol (**14**), (2*R*,3*S*)-1-phenylbutane-2,3-diol (**15**)。体外抗肿瘤活性测试表明, 化合物 **2**、**10**、**14** 具有一定的肿瘤抑制活性。

本次从内生真菌发酵液中分离得到的天然产物多为环肽和苯环衍生物, 推测为微生物发酵产物, 并未发现与内生菌宿主体内相同或相似的化学成分, 对此还需进一步研究探索; 但活性研究表明, 小分子环肽也具有一定的抗肿瘤活性。微生物发酵产物或许存在潜在的生物活性, 值得引起进一步关注。

参考文献

- PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves [M]// ANDREWS J H, HIRANO S S. Microbial Ecology of Leaves. New York: Spring, 1991: 179–197. doi: 10.1007/978-1-4612-3168-4_9.
- LIU L, CHEN X Y, LI D, et al. Bisabolane sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense* [J]. J Nat Prod, 2015, 78(4): 746–53. doi: 10.1021/np5009569.
- ZHU M L, ZHANG X M, FENG H M, et al. Campyridones A–D, pyridone alkaloids from a mangrove endophytic fungus *Campylocarpon* sp. HDN13-307 [J]. Tetrahedron, 2016, 72(37): 5679–5683. doi: 10.1016/j.tet.2016.07.080.
- LIU H X, TAN H B, LIU Y, et al. Three new highly-oxygenated metabolites from the endophytic fungus *Cytospora rhizophorae* A761 [J]. Fitoterapia, 2017, 117: 1–5. doi: 10.1016/j.fitote.2016.12.005.
- LATIPA J, HARTLEYB T G, WATERMANA P G. Lignans and coumarins metabolites from *Melicope hayesii* [J]. Phytochemistry, 1999, 51(1): 107–110. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00720-1.
- CHEN J H, LAN X P, LIU Y H, et al. The effects of diketopiperazines from *Callispongia* sp. on release of cytokines and chemokines in cultured J774A.1 macrophages [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(9): 3177–3180. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.03.045.
- PENG W W, HUANG M B, SONG W W, et al. Cyclopeptides from immature fruits of *Citrus aurantium* [J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26(9): 1416–1420. doi: 10.16333/j.1001-6880.2014.09.001.
- 彭文文, 黄茂波, 宋卫武, 等. 中药枳壳中环肽成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(9): 1416–1420. doi: 10.16333/j.1001-6880.2014.09.001.
- CAMPBELL J, LIN Q, GESKE G D, et al. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type Quorum sensing by cyclic dipeptides [J]. ACS Chem Biol, 2009, 4(12): 1051–1059. doi: 10.1021/cb900165y.
- PEDRAS M S, YU Y, LIU J, et al. Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*: Isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity [J]. Z Naturforsch C, 2005, 60(9/10): 717–722.
- SHIGEMORI H, TENMA M, SHIMAZAKI K, et al. Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* [J]. J Nat Prod, 1998, 61(5): 696–698. doi: 10.1021/np980011u.
- WANG G H, DAI S K, CHEN M J, et al. Two diketopiperazine cyclo(Pro-Phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2 [J]. Chem Nat Compd, 2010, 46(4): 583–585. doi: 10.1007/s10600-010-9680-8.
- FURTADOA N A J C, PUPOA M T, CARVALHO I, et al. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain [J]. J Braz Chem Soc, 2005, 16(6B): 1448–1453. doi: 10.1590/S0103-50532005000800026.
- JAYATILAKE G S, THORNTON M P, LEONARD A C, et al. Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Nat Prod, 1996, 59(3): 293–296. doi: 10.1021/np960

- 095b.
- [14] TULLBERG M, GRØTLI M, LUTHMAN K. Efficient synthesis of 2, 5-diketopiperazines using microwave assisted heating [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(31): 7484–7491. doi: 10.1016/j.tet.2006.05.010.
- [15] WU S H, CHEN Y W, YANG L Y, et al. Chemical constituents from *Tuber indicum* [J]. *Chin Trad Herb Drug*, 2009, 40(8): 1211–1214. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2009.08.011.
吴少华, 陈有为, 杨丽源, 等. 印度块菌的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(8): 1211–1214. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2009.08.011.
- [16] LI Y R, LI C, WANG Z M, et al. Chemical constituents from whole plants of *Aconitum tanguticum* (III) [J]. *China J Chin Mat Med*, 2014, 39(7): 1163–1167.
李艳茸, 李春, 王智民, 等. 藏药甘青乌头化学成分研究(III) [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(7): 1163–1167.
- [17] WU B, WU L J, ZHANG L, et al. Studies on the antibacterial chemical constituents of *Senecio cannabifolius* Less. (I) [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2004, 21(5): 341–345.
吴斌, 吴立军, 张磊, 等. 麻叶千里光抗菌化学成分的研究(I) [J]. *沈阳药科大学学报*, 2004, 21(5): 341–345.
- [18] PENG X P, WANG Y, LIU P P, et al. Aromatic compounds from the halotolerant fungal strain of *Wallemia sebi* PXP-89 in a hypersaline medium [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(6): 907–912. doi: 10.1007/s12272-011-0607-0.
- [19] AWANO K I, YANAI T, WATANABE I, et al. Synthesis of all four possible stereoisomers of 1-phenyl-2,3-butanediol and both enantiomers of 3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone to determine the absolute configuration of the natural constituents [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(7): 1251–1254. doi: 10.1271/bbb.59.1251.
- [20] WEN C N, HU D B, BAI X, et al. Chemical constituents from fruiting bodies of basidiomycete *Perenniporia subacida* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 109: 179–184. doi: 10.1016/j.fitote.2016.01.006