

# 白木香内生真菌 *Fimetariella rabenhorstii* 的甾体类代谢产物

陶美华<sup>1,2,3</sup>, 颜健<sup>1</sup>, 魏孝义<sup>1</sup>, 李冬利<sup>2</sup>, 章卫民<sup>2</sup>, 谭建文<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 从白木香(*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg)内生真菌 *Fimetariella rabenhorstii* A20 的发酵菌丝体中分离得到 4 个甾体类化合物。通过波谱分析, 分别鉴定为 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -桥氧-(22*E*,24*R*)-麦角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇(**1**)、3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -三羟基-(24*R*)-麦角甾-8(14),22-二烯(**2**)、3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -三羟基-(22*E*,24*R*)-麦角甾-7,22-二烯-6-酮(**3**)和 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -三羟基-(22*E*,24*R*)-麦角甾-7,22-二烯(**4**)。这些化合物均为首次从 *Fimetariella* 属真菌中分离获得。

**关键词:** 白木香; 内生真菌; *Fimetariella rabenhorstii*; 化学成分

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)01-0075-04

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.01.011

## Steroidal Metabolites of *Fimetariella rabenhorstii*, Endophytic Fungus from *Aquilaria sinensis*

TAO Mei-hua<sup>1,2,3</sup>, YAN Jian<sup>1</sup>, WEI Xiao-yi<sup>1</sup>, LI Dong-li<sup>2</sup>, ZHANG Wei-min<sup>2</sup>, TAN Jian-wen<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Four steroids were isolated from the fermented mycelia of *F. rabenhorstii* A20, an endophytic fungus from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. On the basis of spectral data, they were identified as 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy-(22*E*,24*R*)-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (**1**), 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihydroxy-(24*R*)-ergosta-8(14),22-diene (**2**), 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -trihydroxy-(22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-dien-6-one (**3**), and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -trihydroxy-(22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-diene (**4**). All compounds were isolated from the genus *Fimetariella* for the first time.

**Key words:** *Aquilaria sinensis*; Endophytic fungus; *Fimetariella rabenhorstii*; Chemical constituent

植物内生真菌是存在于植物组织内与植物具有一定共生关系的真菌类群。1993 年 Stierle 等从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)韧皮部分离获得内生真菌 *Taxomyces andreanae*, 它能产生抗癌物质紫杉醇<sup>[1]</sup>。从植物内生真菌中分离寻找具新结构和活性的化合物成为天然产物研究中的一大热点, 近年已从植物内生真菌中分离获得了大量结构丰富多

样的化学成分, 其中不乏具新结构和(或)在抗肿瘤、抑菌、降血糖等方面具显著活性的化合物<sup>[2-3]</sup>, 这表明植物内生真菌在天然活性物质挖掘方面具有良好潜质。近期我们从药用植物白木香(*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg)中分离获得具有潜在抗肿瘤活性的内生真菌 *Fimetariella rabenhorstii* A20, 初步抗肿瘤活性筛选显示, 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  该真

收稿日期: 2010-05-17 接受日期: 2010-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(20902014); 广东省自然科学基金项目(9451007002003074); 广州市科技计划项目(09B34061446)资助

作者简介: 陶美华, 博士研究生, 研究方向为天然产物化学, email: taomeihua@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Corresponding author, email: jwntan@scbg.ac.cn

菌粗提物对肺癌细胞 SF-268r 的抑制率达 98.9%。我们对该真菌液体发酵菌丝体进行了化学成分研究,从中首次分离获得了 4 个化合物。本文报道了这些化合物的分离和结构鉴定,并简要探讨它们潜在的生物活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

有机溶剂为分析纯试剂,柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产,柱层析凝胶 Sephadex LH-20 为瑞典 Amersham Bioscience 公司生产,反相硅胶 RP-18 为日本 Nomura Chemical Co. Ltd. 生产,正相薄层层析板为烟台黄务硅胶开发试验厂生产。

核磁共振谱用 Bruker DRX-400 核磁共振仪测定,以四甲基硅烷(TMS)为内标。电喷雾质谱(ESIMS)用 MDS SCIEX API 2000 LC/MS/MS 仪,样品溶解后直接进样测定。熔点用 MD-S2 微量熔点测定仪测定,未校正。培养箱用隔水式 303S-2 电热培养箱,摇床用 THZ-C-1 台式冷冻恒温振荡器。

### 1.2 菌株和发酵培养

**菌株** 内生真菌从广东省信宜市采集的白木香(*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg)中分离得到,经章卫民研究员等采用 ITS 序列分析比对鉴定为 *Fimetariella rabenhorstii* (GenBank 登录号: EU781677)<sup>[4-5]</sup>,菌种保藏于广东省微生物研究所菌种保藏中心,编号为 A20。

**培养基** 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15%, 维生素  $\text{B}_1$  0.002%, 琼脂 1.8%。马铃薯葡萄糖培养基(PD): 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15%, 维生素  $\text{B}_1$  0.002%。

**液体培养** 挑取少量菌种接种到经高压灭菌的 PDA 平板培养基上,28℃ 培养 3 d 进行菌种活化。挑取适量菌丝体接种到装有 250 mL PD 培养基的 500 mL 三角瓶中,在 28℃,120  $\text{r min}^{-1}$  下摇床培养 5 d 获得种子液。然后再将种子液接种到装有 500 mL PD 培养基的 1000 mL 三角瓶(发酵 110 L)中,在 28℃,120  $\text{r min}^{-1}$  下摇床培养 7 d。纱布过滤获得菌丝体(鲜重 730 g)和发酵液。

### 1.3 提取和分离

菌丝体用 95% 乙醇浸提 3 次,每次 24 h。提取

液减压浓缩后得浸膏 99 g,加入适量水混悬后,用石油醚萃取,浓缩得石油醚萃取物 23.2 g,正丁醇萃取物 12.2 g。石油醚萃取物经硅胶柱层析,氯仿-甲醇(100:0~1:1)梯度洗脱,得到 S1~S14 组分。组分 S3 经硅胶柱层析,石油醚-丙酮(100:1~2:1)梯度洗脱,得到 S3A~S3K 组分,组分 S3G 乙酸乙酯中结晶得到化合物 1 (27 mg); 组分 S7 经硅胶柱层析,氯仿-甲醇(70:1~10:1)梯度洗脱得到 S7A~S7G 组分,组分 S7D 经反向硅胶柱层析,甲醇-水(60:40~80:20)梯度洗脱得到 S7D1~S7D8 组分,组分 S7D4 经 Sephadex LH-20 柱层析得到化合物 2 (7.4 mg); 组分 S8 经反相硅胶柱层析,甲醇-水(60:40~90:10)梯度洗脱得到 S8A~S8I 组分,组分 S8G 经 Sephadex LH-20 柱层析得到化合物 3 (24.37 mg); 组分 S9 经硅胶柱层析,氯仿-甲醇(100:0~5:1)梯度洗脱得到 S9A~S9F 组分,S9D 组分经 Sephadex LH-20 柱层析得到 S9D1~S9D3 组分,组分 S9D3 乙酸乙酯中结晶得到化合物 4 (40 mg)。

### 1.4 结构鉴定

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -桥氧-(22E,24R)-麦角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇 (5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol, 1)** 白色针状结晶(乙酸乙酯); mp 177~179℃; 分子量为 428, 正离子 ESIMS  $m/z$  451  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 467  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 879  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ , 负离子 ESIMS  $m/z$  463  $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6.47 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-7), 6.21 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6), 5.19 (1H, dd,  $J = 7.6, 15.2$  Hz, H-23), 5.11 (1H, dd,  $J = 8.0, 15.2$  Hz, H-22), 3.93 (1H, m, H-3), 1.20 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-21), 0.88 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 0.85 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-26), 0.78 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-27);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta_{\text{C}}$  34.6 (C-1), 30.0 (C-2), 66.3 (C-3), 36.8 (C-4), 82.1 (C-5), 135.4 (C-6), 130.7 (C-7), 79.4 (C-8), 51.0 (C-9), 36.8 (C-10), 23.3 (C-11), 39.3 (C-12), 44.5 (C-13), 51.6 (C-14), 20.6 (C-15), 28.6 (C-16), 56.1 (C-17), 12.8 (C-18), 18.1 (C-19), 39.7 (C-20), 20.8 (C-21), 135.1 (C-22), 132.2 (C-23), 42.7 (C-24), 33.0 (C-25), 19.9 (C-26), 19.6 (C-27), 17.5 (C-28)。以上数据与文献[6]基本一致,鉴定该化合物为 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -桥氧-(22E,24R)-麦角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇。

**3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -三羟基-(24R)麦角甾-8(14),22-二**

烯 (**3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -trihydroxy (24*R*) ergosta-8 (14), 22-diene, 2**) 白色粉末; 分子量为 430, 正离子 ESIMS  $m/z$  453  $[M + Na]^+$ , 负离子 ESIMS  $m/z$  465  $[M + Cl]^-$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta_H$  5.22 (1H, dd,  $J = 6.2, 14.5$  Hz, H-22), 5.18 (1H, dd,  $J = 7.5, 14.2$  Hz, H-23), 4.40 (1H, m, H-6), 3.92 (1H, m, H-3), 3.14 (1H, d,  $J = 3.5$  Hz, H-7), 1.01 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-21), 0.91 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-28), 0.86 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 0.84 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-27), 0.82 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-26);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta_C$  39.6 (C-1), 31.1 (C-2), 68.7 (C-3), 36.6 (C-4), 33.1 (C-5), 65.1 (C-6), 61.3 (C-7), 125.2 (C-8), 33.1 (C-9), 35.8 (C-10), 19.0 (C-11), 36.6 (C-12), 43.0 (C-13), 152.6 (C-14), 25.0 (C-15), 27.2 (C-16), 56.8 (C-17), 18.1 (C-18), 16.5 (C-19), 39.2 (C-20), 21.2 (C-21), 135.2 (C-22), 132.2 (C-23), 42.8 (C-24), 33.1 (C-25), 19.7 (C-26), 20.0 (C-27), 17.6 (C-28)。以上数据与文献[7]基本一致, 鉴定该化合物为 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -三羟基-(24*R*)麦角甾-8(14),22-二烯。

**3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -三羟基-(22*E*,24*R*)-麦角甾-7,22-二烯-6-酮 (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -trihydroxy-(22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-dien-6-one, 3**) 褐色粉末; mp 195 ~ 197 $^{\circ}C$ ; 分子量为 444, 正离子 ESIMS  $m/z$  467  $[M + Na]^+$ , 483  $[M + K]^+$ , 负离子 ESIMS  $m/z$  479  $[M + Cl]^-$ ;  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ , 400 MHz):  $\delta_H$  5.48 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-7), 5.17 (1H, dd,  $J = 7.1, 15.2$  Hz, H-23), 5.11 (1H, dd,  $J = 7.7, 15.2$  Hz, H-22), 3.83 (1H, m, H-3), 0.95 (3H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-21), 0.90 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-28), 0.77 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-27), 0.75 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-26), 0.57 (3H, s, H-18);  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ , 100 MHz):  $\delta_C$  26.6 (C-1), 31.0 (C-2), 67.8 (C-3), 37.1

(C-4), 80.2 (C-5), 200.2 (C-6), 120.9 (C-7), 165.0 (C-8), 76.2 (C-9), 42.8 (C-10), 29.3 (C-11), 36.2 (C-12), 46.2 (C-13), 52.8 (C-14), 23.4 (C-15), 29.1 (C-16), 57.4 (C-17), 12.6 (C-18), 20.6 (C-19), 41.7 (C-20), 21.6 (C-21), 136.7 (C-22), 133.6 (C-23), 44.3 (C-24), 34.4 (C-25), 20.1 (C-26), 20.5 (C-27), 18.2 (C-28)。以上数据与文献[8]基本一致, 鉴定该化合物 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -三羟基-(22*E*,24*R*)-麦角甾-7,22-二烯-6-酮。

**3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -三羟基-(22*E*,24*R*)-麦角甾-7,22-二烯 (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -trihydroxy-(22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-diene, 4**) 白色针状结晶(乙酸乙酯); mp 251 ~ 253 $^{\circ}C$ ; 分子量为 430, 负离子 ESIMS  $m/z$  466  $[M + Cl]^-$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta_H$  5.36 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-7), 5.23 (1H, dd,  $J = 7.2, 15.2$  Hz, H-23), 5.16 (1H, dd,  $J = 7.9, 15.2$  Hz, H-22), 4.08 (1H, m, H-3), 3.63 (1H, m, H-6), 1.09 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-21), 0.92 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 0.84 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-27), 0.82 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-26), 0.60 (3H, s, H-18);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta_C$  33.1 (C-1), 30.8 (C-2), 67.7 (C-3), 40.4 (C-4), 76.0 (C-5), 74.0 (C-6), 117.5 (C-7), 144.0 (C-8), 43.5 (C-9), 37.1 (C-10), 22.0 (C-11), 39.2 (C-12), 43.8 (C-13), 54.7 (C-14), 22.9 (C-15), 27.9 (C-16), 56.0 (C-17), 12.3 (C-18), 18.8 (C-19), 39.4 (C-20), 19.6 (C-21), 132.2 (C-22), 135.4 (C-23), 42.8 (C-24), 33.0 (C-25), 19.9 (C-26), 21.1 (C-27), 17.6 (C-28)。以上数据与文献[8]基本一致, 鉴定该化合物为 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -三羟基-(22*E*,24*R*)-麦角甾-7,22-二烯。

## 2 结果和讨论

本研究从白木香内生真菌 *F. rabenhorstii* 菌丝体中分离得到 4 个甾体化合物, 通过光谱分析, 分

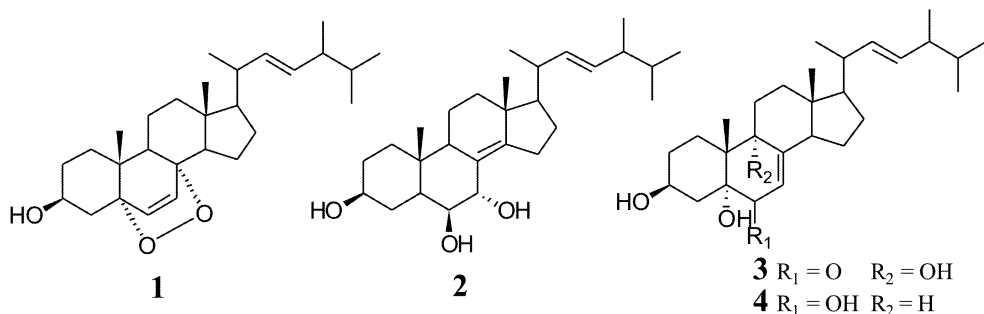


图1 化合物1~4的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1~4

别被鉴定为 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -桥氧-(22*E*,24*R*)-麦角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇(**1**)、3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -三羟基-(24*R*)麦角甾-8(14),22-二烯(**2**)、3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -三羟基-(22*E*,24*R*)-麦角甾-7,22-二烯-6-酮(**3**)和 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -三羟基-(22*E*,24*R*)-麦角甾-7,22-二烯(**4**),均为首次从 *Fimnetariella* 属真菌中分离获得。

据文献报道,甾醇类化合物是一类具有潜在抗肿瘤活性的化合物。Takei 等报道化合物 **1** 能诱导细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞生长,25  $\mu\text{mol/L}$  的浓度能完全抑制肿瘤细胞 HL 60 的生长<sup>[9]</sup>; Sun 等报道 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  的化合物 **3**,能完全抑制 Hela 肿瘤细胞的生长<sup>[10]</sup>; Mansoor 等报道化合物 **4** 对 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15 肿瘤细胞的 ED<sub>50</sub> 分别为 3.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 6.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  和 3.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ <sup>[11]</sup>。此外化合物 **1** 还有抑制免疫反应、抗病毒、抗炎、抗疟疾等作用<sup>[12-13]</sup>, 化合物 **4** 能抑制核因子 kappa B, 调节免疫和炎症反应<sup>[14]</sup>。本研究鉴定了该内生真菌中具潜在抗肿瘤等生物活性的化学成分,为揭示该真菌抗肿瘤等潜在的药用价值提供基础。

## 参考文献

- [1] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, and endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [2] Tan R X, Zou W X. Endophytes: A rich source of functional metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2001, 18: 448-459.
- [3] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67: 257-268.
- [4] Sanchez M S, Bills G F, Zabalgoeazcoa I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses [J]. *Fung Diver*, 2008, 30: 87-100.
- [5] Wang L(王磊), Zhang W M(章卫民), Pan Q L(潘清灵), et al. Isolation and molecular identification of endophytic fungi from *Aquilaria sinensis* [J]. *J Fung Res(菌物研究)*, 2009, 7(1): 37-42. (in Chinese)
- [6] Gao J M(高锦明), Dong Z J(董泽军), Liu J K(刘吉开). The constituents of the basidiomycetes *Russula cyanoxantha* [J]. *Acta Bot Yunnan(云南植物研究)*, 2000, 22(1): 85-89. (in Chinese)
- [7] Dellagrecia M, Fiorentino A, Monaco P, et al. Two new polyhydroxylated sterols from *Rupplia maritima* [J]. *Nat Prod Lett*, 2001, 15(2): 111-118.
- [8] Kawagishi H, Katsumi R, Sazawa T, et al. Cytotoxic sterols from the mushroom *Agaricus blazei* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(9): 2777-2779.
- [9] Takei T, Yashida M, Kameyama O K, et al. Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito [J]. *Biosci Biotechn Biochem*, 2005, 69(1): 212-215.
- [10] Sun Y, Tian L, Huang J, et al. Cytotoxic sterols from marine-derived fungus *Penicillium* sp. [J]. *Nat Prod Res*, 2006, 20(4): 381-384.
- [11] Mansoor T A, Lee Y M, Hong J K, et al. 5,6:8,9-diepoxy and other cytotoxic sterols from the marine sponge *Homaxinella* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 131-134.
- [12] Lu Y(陆易), Weng X C(翁新楚). Liposoluble compounds isolated from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxic activity against tumor cells *in vitro* [J]. *Fine Chem(精细化工)*, 2007, 24(8): 772-777. (in Chinese)
- [13] Phonkerd N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, et al. Bis-spiro-azaphilones and azaphilones from the fungi *Chaetomium cochliodes* VTh01 and *C. cochliodes* CTh05 [J]. *Tetrahedron*, 2008, 64: 9636-9645.
- [14] Kim J A, Tay D, Blanco E C D. NF- $\kappa$ B inhibitory activity of compounds isolated from *Cantharellus cibarius* [J]. *Phytother Res*, 2008, 22: 1104-1106.