

冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌混合发酵次级代谢产物及细胞毒活性

杨娟娟^{1,2}, 邹先伟², 黄昀², 李倩², 陈本科², 唐劲天²

1. 塔里木大学生命科学学院, 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 阿拉尔 843300
2. 清华大学工程物理系, 粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084

摘要 为研究冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌混合发酵次级代谢产物及细胞毒活性, 采用硅胶柱、凝胶柱和高效液相色谱等方法进行分离纯化, 并通过各种波谱技术进行结构鉴定, 以 4 种肿瘤细胞 A549、MCF-7、Bel-7402、Colo205 为供试细胞株, 采用 MTT 法对化合物进行细胞毒活性研究。从冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌固体混合发酵提取物中分离鉴定了 7 个化合物, 其中 4 个吲哚二酮哌嗪生物碱为 echinulin (1)、crisatumin F (2)、neoechinulin A (3)、preechinulin (4), 2 个聚酮类化合物为 flvoglucic (5)、tetrahydroauroglucine (6), 1 个 nonadride 类化合物为 epiheveadride (7)。活性结果表明, 化合物对 4 种肿瘤细胞株均具有不同程度的细胞毒活性, 化合物 3、5 和 7 对肝癌 Bel-7402 细胞毒活性较强。

关键词 冠突散囊菌; 混合发酵; 次级代谢产物; 细胞毒活性

1961 年, Bu'Lock 第一次明确了微生物次级代谢产物具有较好的生物活性, 如抗菌、作为离子载体或种间信号化合物^[1-4], 在微生物发酵过程中通过刺激和改变基因表达, 上调或下调表达途径, 即可变化合物合成, 这为活性天然产物的发现和研究提供了新的研究契机和方向^[5]。Bérdy^[6]报道源于微生物发酵的天然产物中 1% 对人类疾病和农作物有一定作用, 但有生物活性的次级代谢产物来自相对受限的细菌和真菌, 虽然它们的属间和种间及种内有着极高的多样性, 但在微生物代谢产物挖掘以及新型次级代谢来源也比较受限。

近年来, 科研人员发现细菌之间、真菌之间以及细菌与真菌之间的混合发酵成为开发新型次级代谢产物的新途径, 如 Pachapur 等^[7]通过产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 和丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 的共培养混合发酵研究氢气能源的产生, Xiong 等^[8]采用明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 的纯种发酵和混合培养发酵来研究中国泡菜的过程, 以及利用 RNA-Seq 方法揭示枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*) 的混合发酵转录组间的相互作用^[9], 从分子生物学角度探讨混合发酵中基因过表达或上调或下调的改变对于到整个发酵过程中糖类代谢, 活性氨基酸代谢, 新生霉素生物合成和降解氨基苯甲酸代谢等代谢途径的改变。这

些从不同研究目标和切入点着手的结果, 表明混合发酵是挖掘和拓宽活性次级代谢产物的又一条途径。

冠突散囊菌 (*Eurotium cristatum*) 是茯砖茶在加工过程中“发花”工艺的优势菌。目前, 对于冠突散囊菌的研究已由命名鉴定和生理特质逐渐转向其安全性及代谢产物的功能研究, 如提取酶类、多糖、色素等^[10-15], 且主要集中于液体培养和纯种发酵提取物的功能研究, 而有关冠突散囊菌与细菌混合发酵次级代谢产物的细胞毒活性未见报道。

本实验采用冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌固体混合发酵培养, 对其乙酸乙酯提取物进行次级代谢产物的分离鉴定, 获得的单体化合物采用 MTT 法进行细胞毒活性评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与细胞株

菌株: 冠突散囊菌、金黄色葡萄球菌由清华大学工程物理系粒子技术与辐射成像教育部重点实验室提供。

细胞株: 人肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人肝癌 Bel-7402 细胞和人结肠癌 Colo205 细胞, 来源美国 ATCC。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基: 取 38 g·L⁻¹ 马铃薯葡萄糖琼

收稿日期: 2016-01-14; 修回日期: 2016-02-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (21402104); 中国博士后科学基金项目 (2014T70068)

作者简介: 杨娟娟, 硕士研究生, 研究方向为微生物次级代谢产物与活性, 电子信箱: yangmoge@126.com; 唐劲天 (通信作者), 研究员, 研究方向为健康产品与肿瘤磁感应治疗, 电子信箱: tangjt@mail.tsinghua.edu.cn; 邹先伟 (通信作者), 助理研究员, 研究方向为天然活性成分与功能应用, 电子信箱: zouxw000@126.com

引用格式: 杨娟娟, 邹先伟, 黄昀, 等. 冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌混合发酵次级代谢产物及细胞毒活性[J]. 科技导报, 2016, 34(9): 96-101; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.09.012

脂(不含抗生素),分装, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 取适当体积到无菌平皿中冷却备用。

LB 固体培养基(g/L): 1 L 去离子水中加入胰蛋白胍(Tryptone) 10 g, 酵母提取物(Yeast extract) 5 g, 氯化钠(NaCl) 10 g, 琼脂(Agar) 15 g, 分装, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 取适当体积至无菌平皿中冷却备用。

米饭培养基: 每个 500 mL 三角瓶中加入 80 g 大米及 120 mL 去离子水, 封口, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 冷却备用。

马铃薯葡萄糖琼脂(不含抗生素); RPMI1640 完全培养基(Gibco); D-MEM/F-12 培养基(Caisson)。

1.2 菌种活化

1.2.1 真菌活化

无菌操作下将保存的冠突散囊菌接种于灭菌的马铃薯葡萄糖琼脂培养基上, 28°C 培养 48 h, 活化两次备用。

1.2.2 细菌活化

无菌操作下将保存的金黄色葡萄球菌接种于已制好灭菌的 LB 固体培养基上, 37°C 培养 24 h, 活化两次备用。

1.3 冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌混合发酵培养

1) 真菌菌悬液配制: 挑取活化的冠突散囊菌, 用无菌水配成 1×10^6 个/mL 孢子菌悬液, 记作 JH 菌悬液。

2) 细菌菌悬液配制: 分别挑取 LB 培养基上活化的金黄色葡萄球菌 1~2 个单菌落, 用无菌水配成 1×10^6 个/mL 的菌悬液, 记作 JP 菌悬液。

3) 两种菌混合发酵: 先取 JH 菌悬液 2 mL 接种于米饭培养基中, 28°C 培养 3 d 后, 再接入 JP 菌悬液 2 mL, 28°C 继续培养 27 d, 平行接种 6 瓶。

1.4 发酵粗提物制备

发酵结束后, 将米饭和菌体机械粉碎, 乙酸乙酯浸提, 超声提取 5 次, 合并提取液后浓缩烘干备用, 得到冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌混合发酵粗提物浸膏 17.2 g。

1.5 化合物分离

用 GF₂₅₄ 硅胶装柱, 将粗提物用 300 目硅胶拌样上柱, 用石油醚-乙酸乙酯体系减压洗脱。对 3% 乙酸乙酯/石油醚洗脱的馏分(1.07 g)用常压硅胶柱层析(石油醚-丙酮梯度洗脱), 对 30% 丙酮/石油醚洗脱馏分(165 mg)再用 Sephadex LH-20 柱层析分离(MeOH 洗脱), 然后用半制备液相色谱(85~95% MeOH/H₂O 梯度洗脱 30 min, 2 mL/min)纯化得到化合物 2(2.7 mg, t_R 19.5 min)。对 10% 乙酸乙酯/石油醚洗脱的馏分(7.2 g)用常压硅胶柱层析(石油醚-丙酮梯度洗脱), 对 5% 丙酮/石油醚洗脱馏分(71 mg)再用 Sephadex LH-20 柱层析分离(CH₂Cl₂-MeOH = 1:1 体积洗脱), 然后用半制备液相色谱(75~95% MeCN/H₂O 梯度洗脱 30 min)纯化得到化合物 5(4.3 mg, t_R 28.5 min)和 6(2.5 mg, t_R 27.5 min)。对 60% 乙酸乙酯/石油醚洗脱的馏分(2.32 g)用常压硅胶柱层析(CH₂Cl₂-MeOH 梯度洗脱), 对 1% MeOH/CH₂Cl₂ 洗脱馏分(343 mg)再用 Sephadex LH-20 柱层析分离(CH₂Cl₂-MeOH =

1:1 体积洗脱), 然后用半制备液相色谱(60~80% MeCN/H₂O 梯度洗脱 30 min)纯化得到化合物 7(3.6 mg, t_R 15.0 min); 对 2% MeOH/CH₂Cl₂ 洗脱馏分(675 mg)再用 Sephadex LH-20 柱层析分离(CH₂Cl₂-MeOH = 1:1 体积洗脱), 然后用半制备液相色谱(40~60% MeCN/H₂O 梯度洗脱 30 min)纯化得到化合物 3(5.0 mg, t_R 16.0 min)。对 100% 乙酸乙酯洗脱的馏分(1.16 g)用常压硅胶柱层析(CH₂Cl₂-MeOH 梯度洗脱), 对 1% MeOH/CH₂Cl₂ 洗脱馏分(180 mg)再用 Sephadex LH-20 柱层析分离(MeOH 洗脱), 然后用半制备液相色谱(40~70% MeOH/H₂O 梯度洗脱 35 min, 2 mL/min)纯化得到化合物 4(5.5 mg, t_R 30.0 min)。对 100% 乙酸乙酯洗脱的馏分(5.54 g)用高速逆流色谱(石油醚-乙酸乙酯-正丁醇-水 = 4:1:5:5 体积洗脱, 上相为固定相, 下相为流动相), 对 t_R 为 127 min(38 mg)的馏分过 Sephadex LH-20 柱层析纯化分离(CH₂Cl₂-MeOH = 1:1 体积洗脱), 然后用半制备液相色谱(75~95% MeCN/H₂O 梯度洗脱 30 min, 2 mL/min)纯化得到化合物 1(2.5 mg, t_R 16.5 min)。

1.6 细胞毒活性测定

采用 MTT 法对化合物 1~7 进行细胞毒活性评价, 对人肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞、人肝癌 Bel-7402 细胞均培养于含 10% 的胎牛血清(FBS)及 2 mmol/L 谷氨酰胺(L-glutamine)的 RPMI1640 完全培养基中, 人结肠癌 Colo205 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养基中。取对数生长期的细胞, 分别用培养基稀释为细胞悬液, 将浓度均调整为 5.0×10^3 个/mL, 分别接种于 96 孔细胞培养板内, 每孔加细胞悬液 100 μ L, 将培养板置于 37°C, 5% CO₂, 95% 相对湿度的细胞培养箱中培养 24 h 后待用^[6]。

将供试样品用 RPMI1640 完全培养基稀释成 150 μ g/mL, 96 孔板中每孔加入供试样品 100 μ L, 阴性对照组加等体积的 RPMI1640 完全培养基, 每组设 3 个复孔, 持续培养 48 h 后, 再加入 10 μ L MTT 溶液继续培养 4 h。弃去上清, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO), 置微量振荡器上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 置于酶标仪 570 nm 处测量各孔的吸光度(OD 值), 计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 = $[1 - (\text{供试样品 OD 平均值} / \text{阴性对照组 OD 平均值})] \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, ESI-MS m/z : 462[M+H]⁺, 分子式为 C₂₉H₃₉N₃O₂。¹H-NMR(500MHz, CDCl₃) δ : 8.05(1H, s, H-1), 7.13(1H, s, H-4), 6.80(1H, s, H-6), 6.10(1H, dd, $J = 17, 11$ Hz, H-16), 5.96(1H, s, H-11), 5.65(1H, s, H-14), 5.42(1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-27), 5.35(1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-22), 5.16(1H, d, $J = 17$ Hz, Ha-17), 5.14(1H, d, $J = 11$ Hz, Hb-17), 4.42(1H, dd, $J = 12, 3.3$ Hz, H-9), 4.10(1H, q, $J = 7.0$

Hz, H-12), 3.65 (1H, dd, $J = 15, 3.3$ Hz, Ha-8), 3.53 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H₂-26), 3.39 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H₂-21), 3.19 (1H, d, $J = 15, 12$ Hz, Hb-8), 1.87 (3H, s, H₃-29), 1.81 (3H, s, H₃-24), 1.74 (3H, s, H₃-25), 1.73 (3H, s, H₃-30), 1.53 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H₃-20), 1.51 (3H, s, H₃-18), 1.51 (3H, s, H₃-19); ¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) δ : 168.4 (C-10), 167.8 (C-13), 145.9 (C-16), 141.5 (C-2), 134.0 (C-5), 133.1 (C-28), 132.4 (C-7a), 131.7 (C-23), 129.1 (C-3a), 124.6 (C-22), 123.6 (C-7), 123.1 (C-6), 123.0 (C-27), 115.2 (C-4), 112.5 (C-17), 104.1 (C-3), 54.7 (C-9), 50.9 (C-12), 39.1 (C-15), 34.8 (C-21), 31.5 (C-26), 29.8 (C-8), 28.1 (C-18), 27.9 (C-19), 26.0 (C-25), 25.9 (C-30), 20.0 (C-20), 18.1 (C-24), 18.0 (C-29)。以上数据与文献[17]报道一致,故鉴定化合物1为 echinulin。

化合物2: 无色粉末, ESI-MS m/z : 490[M+H]⁺, 分子式为 C₃₁H₄₃N₃O₂。 ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 8.09 (1H, s, H-1), 7.17 (1H, s, H-4), 6.83 (1H, s, H-6), 6.11 (1H, dd, $J = 17, 11$ Hz, H-16), 6.00 (1H, s, H-11), 5.72 (1H, s, H-14), 5.45 (1H, t, $J = 7.0, 7.0$ Hz, H-29), 5.37 (1H, t, $J = 7.2, 7.2$ Hz, H-24), 5.19 (1H, d, $J = 17$ Hz, Ha-17), 5.17 (1H, d, $J = 11$ Hz, Hb-17), 4.42 (1H, dd, $J = 12, 3.6$ Hz, H-9), 3.87 (1H, s, H-12), 3.67 (1H, dd, $J = 15, 3.6$ Hz, Ha-8), 3.55 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H₂-26), 3.41 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H₂-23), 3.20 (1H, d, $J = 15, 12$ Hz, Hb-8), 2.39 (1H, m, H-20), 1.89 (3H, s, H₃-31), 1.83 (3H, s, H₃-26), 1.74 (3H, s, H₃-27), 1.74 (3H, s, H₃-32), 1.53 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H₃-18), 1.53 (3H, s, H₃-19), 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H₃-21), 0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H₃-22); ¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) δ : 168.6 (C-10), 166.5 (C-13), 145.8 (C-16), 141.5 (C-2), 133.9 (C-5), 132.9 (C-30), 132.2 (C-7a), 131.6 (C-25), 128.9 (C-3a), 124.5 (C-22), 123.4 (C-7), 122.9 (C-6), 122.9 (C-29), 115.1 (C-4), 112.2 (C-17), 103.8 (C-3), 60.8 (C-12), 53.6 (C-9), 39.0 (C-15), 34.6 (C-23), 32.4 (C-20), 31.4 (C-28), 29.7 (C-8), 27.8 (C-18), 27.7 (C-19), 25.8 (C-27), 25.7 (C-32), 18.7 (C-21), 17.9 (C-26), 17.9 (C-31), 16.1 (C-22)。以上数据与文献[11]报道一致,故鉴定化合物2为 cristatumin F。

化合物3: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 324[M+H]⁺, 分子式为 C₁₉H₂₁N₃O₂。 ¹H-NMR (500MHz, Acetone-d₆) δ : 10.33 (1H, s, H-1), 7.91 (1H, s, H-11), 7.42 (1H, br d, $J = 8.0$ Hz, H-4), 7.32 (1H, br d, $J = 7.9$ Hz, H-7), 7.12 (1H, dt, $J = 8.0, 7.5, 1.0$ Hz, H-5), 7.08 (1H, dd, $J = 7.9, 7.5$ Hz, H-6), 7.07 (1H, s, H-8), 6.16 (1H, dd, $J = 17, 12$ Hz, H-16), 5.11 (1H, d, $J = 17$ Hz, Ha-17), 5.11 (1H, d, $J = 12$ Hz, Hb-17), 4.30 (1H, dq, $J = 7.4, 2.2$ Hz, H-12), 1.58 (3H, s, H₃-18), 1.58 (3H, s, H₃-19), 1.53 (3H, d, $J = 7.4$ Hz, H₃-20); ¹³C-NMR (125MHz, Acetone-d₆) δ : 166.3 (C-13), 160.2 (C-10), 145.9

(C-16), 144.7 (C-2), 136.2 (C-7a), 127.3 (C-3a), 126.6 (C-9), 122.2 (C-6), 120.7 (C-5), 119.7 (C-4), 112.4 (C-7), 112.3 (C-17), 110.6 (C-8), 104.4 (C-3), 52.2 (C-12), 40.0 (C-15), 27.9 (C-18), 27.9 (C-19), 20.7 (C-20)。以上数据与文献[18]、[19]报道一致,故鉴定化合物3为 neoechinulin A。

化合物4: 白色粉末, ESI-MS m/z : 326[M+H]⁺, 分子式为 C₁₉H₂₃N₃O₂。 ¹H-NMR (500MHz, Acetone-d₆) δ : 9.87 (1H, br s, H-1), 7.50 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-4), 7.31 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-7), 7.26 (1H, br s, H-11), 7.06 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5), 6.99 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 6.48 (1H, br s, H-14), 6.24 (1H, dd, $J = 17, 11$ Hz, H-16), 5.13 (1H, d, $J = 17$ Hz, Ha-17), 5.11 (1H, d, $J = 11$ Hz, Hb-17), 4.26 (1H, dq, $J = 7.0, 2.2$ Hz, H-12), 4.00 (1H, dd, $J = 11, 3.6$ Hz, H-9), 3.58 (1H, dd, $J = 14, 3.6$ Hz, Ha-8), 3.19 (1H, dd, $J = 14, 11$ Hz, Hb-8), 1.60 (3H, s, H₃-18), 1.58 (3H, s, H₃-19), 1.43 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H₃-20); ¹³C-NMR (125MHz, Acetone-d₆) δ : 168.3 (C-13), 164.2 (C-10), 147.5 (C-16), 146.6 (C-2), 136.1 (C-7a), 128.1 (C-3a), 126.5 (C-9), 121.8 (C-6), 119.8 (C-5), 118.9 (C-4), 111.8 (C-17), 111.7 (C-7), 105.9 (C-3), 56.6 (C-9), 51.5 (C-12), 40.6 (C-15), 31.3 (C-8), 28.5 (C-18), 28.5 (C-19), 20.8 (C-20)。以上数据与文献[20]报道一致,故鉴定化合物4为 preechinulin。

化合物5: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 305[M+H]⁺, 分子式为 C₁₉H₂₈O₃。 ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 11.92 (1H, s, OH-2), 10.25 (1H, s, CHO-1), 6.89 (1H, s, H-4), 5.28 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2''), 4.51 (1H, s, OH-5), 3.28 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H₂-1''), 2.88 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H₂-1'), 1.76 (3H, s, H₃-5''), 1.69 (3H, s, H₃-4''), 1.58 (2H, m, H₂-2'), 1.41 (2H, m, H₂-3'), 1.25-1.35 (6H, m, H₂-4'/5'/6'), 0.87 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H₃-7'); ¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) δ : 195.6 (CHO-1), 155.8 (C-2), 145.0 (C-5), 133.9 (C-3''), 128.6 (C-6), 128.5 (C-3), 125.7 (C-4), 121.2 (C-2''), 117.3 (C-1), 32.0 (C-2'), 31.8 (C-5'), 29.6 (C-3'), 29.2 (C-4'), 27.0 (C-1''), 25.8 (C-5''), 24.0 (C-1'), 22.6 (C-6'), 17.8 (C-4''), 14.1 (C-7')。以上数据与文献[21]报道完全一致,故鉴定化合物5为 flavoglau-cin。

化合物6: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 303[M+H]⁺, 分子式为 C₁₉H₂₆O₃。 ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 11.73 (1H, s, OH-2), 10.10 (1H, s, CHO-1), 7.02 (1H, s, H-4), 6.48 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-1'), 5.98 (1H, dt, $J = 16, 7.3$ Hz, H-2'), 5.29 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2''), 4.97 (1H, s, OH-5), 3.32 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H₂-1''), 2.32 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, H₂-3'), 1.76 (3H, s, H₃-5''), 1.70 (3H, s, H₃-4''), 1.52 (2H, m, H₂-4'), 1.35 (4H, m, H₂-5'/6'), 0.92 (3H, t, $J = 6.8, 6.8$ Hz, H₃-7')。以上数据与文献[21]报道完全一致,故鉴定化合物6为 tetrahydroauro-glau-cine。

化合物7:白色粉末,ESI-MS m/z : 333[M+H]⁺,分子式为C₁₈H₂₀O₆。¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 3.16(1H, m, Ha-3), 3.16(1H, m, Ha-4), 2.89(1H, dd, $J = 13, 2.0$ Hz, Ha-7), 2.45(1H, m, H-9), 2.24(2H, m, Hb-3/4), 2.16(1H, m, Ha-3'), 2.10(2H, m, Ha-8/2''), 1.76(1H, t, $J = 12, 12$ Hz, Hb-7), 1.53(1H, m, Hb-3'), 1.16(2H, m, H₂-2'), 1.08(3H, t, $J = 7.3$ Hz, H₃-1'), 1.00(1H, m, Hb-2''), 0.86(3H, t, $J = 7.3$ Hz, H₃-1'); ¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) δ : 165.4(C-11), 165.3(C-12), 164.9(C-13), 164.2(C-10), 146.3(C-2), 146.1(C-1), 145.1(C-6), 144.3(C-5), 48.0(C-8), 41.0(C-9), 31.7(C-3'), 28.1(C-7), 23.5(C-2''), 22.2(C-4), 21.9(C-2'), 21.5(C-3), 14.0(C-1'), 13.0(C-1'')。以上数据与文献[22]报道一致,故鉴定化合物7为epiheveadride。

2.2 细胞毒活性

采用MTT法对化合物1~7进行细胞毒活性评价,结果显示,在化合物浓度为150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对A549细胞,化合物7具有弱的增殖抑制作用,抑制率为51.8%,其余化合物对该细胞株几乎无肿瘤增殖抑制作用;对细胞株MCF-7,只有化合物1和5抑制率大于59%,其余化合物活性无明显抑制作用;对Bel-7402细胞株,除化合物4外,其它化合物均具有较强的抑制作用,其中3、5和7化合物抑制率超过70%;对Colo205细胞株,化合物1、2和7抑制率均在55%以上(表1)。

化合物1~7对4种肿瘤细胞有不同程度的抑制作用和

表1 化合物1~7对4种肿瘤细胞株抑制率($x \pm s, n = 3$)
Table 1 Inhibitory rates of compounds 1~7 against four tumor cell lines ($x \pm s, n = 3$)

化合物	ρ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率/%			
		A549	MCF-7	Bel-7402	Colo205
1	150	30.7 \pm 1.59	66.0 \pm 5.30	59.0 \pm 2.52	64.0 \pm 1.38
2	150	34.0 \pm 3.65	—	56.4 \pm 0.17	62.4 \pm 1.66
3	150	33.9 \pm 2.21	20.1 \pm 2.00	72.0 \pm 0.64	48.4 \pm 1.57
4	150	17.8 \pm 2.28	20.5 \pm 2.80	35.9 \pm 0.64	45.1 \pm 1.14
5	150	30.5 \pm 4.95	59.3 \pm 0.78	73.8 \pm 0.71	25.3 \pm 11.3
6	150	—	—	65.6 \pm 0.92	38.8 \pm 5.03
7	150	51.8 \pm 1.73	—	72.7 \pm 2.85	58.7 \pm 2.04

注:—表示无活性。

靶标选择性。化合物3和6仅对肝癌Bel-7402细胞有中等抑制作用,而对其余3株细胞抑制活性弱。化合物5对乳腺癌MCF-7和肝癌Bel-7402细胞具有一定的抑制作用,而对肺癌A549和结肠癌Colo205细胞无明显抑制作用。化合物7对A549细胞, Bel-7402细胞及Colo205细胞抑制率均大于50%,而对MCF-7细胞无活性。

3 讨论

冠突散囊菌纯培养中,Zou等^[11]首次发现了新化合物2,文献中同样分离到化合物1、3,彭晓赞等^[15]分离到化合物5,且具有抗氧化剂作用^[23],并与维生素E有协同作用,Du等^[24]分离到化合物1和4。此外,Slack等^[25]从同属的加拿大散囊菌中分离到化合物7,且也是作者GJ Slack作为天然产物的首次报道,Nazar等^[26]于谢瓦曲霉NM-16中分离到化合物6,陈立等^[27]从海棉真菌中分离到化合物4,可见化合物分离来源丰富,真菌是作为代谢产物资源库之一,但随着组合化学的兴起,科研人员想在短时间内获取大量活性代谢物,以传统纯培养微生物作为获取化合物来源已不能满足新型药物开发的需求,在本论文中,化合物6、7到目前为止并未有文献报道于纯培养冠突散囊菌中分离获得,而本实验采用冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌共培养,使其两种菌株形成竞争性生态压力和激活沉默基因簇等非传统方法分离获取到化合物6、7。而且有文献显示,Fenical研究小组从海洋真菌Libertella sp.和细菌CNJ-28共培养提取物中发现的新结构二萜,具有显著抗人结肠癌HCT-116活性,同样在真菌纯培养中也没有发现该类化合物^[28]。

由此,共培养两种或两种以上细菌/真菌和真菌,形成压力诱导,激活真菌复杂的调节机制和沉默的基因簇而生物合成结构类型丰富、活性多样的次生代谢产物,是发现药理活性分子的又一条途径,可以拓宽活性产物的来源。

4 结论

从冠突散囊菌与金黄色葡萄球菌固体混合发酵中分离鉴定获7个化合物,其中化合物1~4为吡啶二酮哌嗪生物碱化合物,分别鉴定为echinulin(1)、crystalamin F(2)、neoechinulin A(3)、preechinulin(4),是发酵物的主要代谢产物,且具有抗细菌^[29]、抗真菌^[30]、抗病毒^[31]、抗肿瘤^[32]、抗疟疾^[33]等作用,2个聚酮类化合物为flvoglaucin(5)、tetrahydroauroglaucone(6),1个nonadride类化合物为epiheveadride(7),并通过细胞毒活性得出化合物3、5和7对肝癌Bel-7402细胞毒活性较强。

参考文献(References)

- [1] Bu'Lock J D. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis[J]. Advances in Applied Microbiology, 1961(3): 293-342.
- [2] Demain A L, Adrio J L. Contributions of microorganisms to industrial biology[J]. Molecular Biotechnology, 2008, 38(1): 41-55.
- [3] Fajardo A, Martinez J L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(2): 161-167.
- [4] Challis G L, Hopwood D A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiply secondary metabolite production by *Streptomyces* species[J]. Colloquium, 2003, 100(2): 14555-14561.
- [5] Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, et al. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(2): 187-190.
- [6] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. Journal of Antibiotics (To-

- kyo), 2005, 58(1): 1-26.
- [7] Pachapur V L, Sarma S J, Brar S K, et al. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*[J]. Biore-source Technology, 2015, 193: 297-306.
- [8] Xiong T, Peng F, Liu Y Y, et al. Fermentation of Chinese sauerkraut in pure culture and binary co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59: 713-717.
- [9] Wang H K, Ng Y K, Koh E, et al. RNA-Seq reveals transcriptomic interactions of *Bacillus subtilis natto* and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis in whole soybean solid-state co-fermentation[J]. Food Microbiology, 2015, 51: 5-32.
- [10] 齐祖同, 孙曾美. 茯砖茶中优势菌群的鉴定[J]. 真菌学报, 1990, 9(3): 176-179.
Qi Zutong, Sun Zengmei. Identification of fu brick dominant flora[J]. Mycosystema, 1990, 9(3): 176-179.
- [11] Zou X W, Li Y, Zhang X N, et al. A new prenylated indole diketopiperazine alkaloid from *Eurotium cristatum*[J]. Molecules, 2014, 19(11): 17839-17847.
- [12] 李玉婷, 吕嘉彬. 金花菌黄色素的稳定性及其抗氧化活性研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 2030-2036.
Li Yuting, Lü Jialin. Study on stability and antioxidant activity of the yellow pigments from *Eurotium cristatum*[J]. Microbiology China, 2013, 40(11): 2030-2036.
- [13] 黄群, 陈林杰, 李彦坡, 等. 冠突散囊菌黑茶发酵液对消化酶活性影响的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 917-920.
Huang Qun, Chen Linjie, Li Yanpo, et al. Study of *Eurotium cristatum* black tea broth to digestive enzyme activity[J]. Microbiology China, 2007, 34(5): 917-920.
- [14] 李莹, 邹先伟, 张小娜, 等. 突散囊菌不同溶剂提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 143-146.
Li Ying, Zou Xianwei, Zhang Xiaona, et al. Antioxidant activity of different extracts from *Eurotium cristatum* in vitro[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(7): 143-146.
- [15] 彭晓赞, 梁法亮, 李冬利, 等. 茯砖茶中冠突散囊菌的次级代谢产物及其生物活性研究[J]. 中草药, 2013, 44(14): 1881-1886.
Peng Xiaozan, Liang Falang, Li Dongli, et al. Secondary metabolites of *Eurotium cristatum* from fu brick tea and their biological activities [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(14): 1881-1886.
- [16] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity[J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [17] Chen X, Si L, Liu D, et al. Neoechinulin B and its analogues as potential entry inhibitors of influenza viruses, targeting viral hemagglutinin [J]. European journal of Medicinal Chemistry, 2015, 93: 182-195.
- [18] 郭志勇, 黄忠京, 温露, 等. 三种红树林内生真菌的环肽类次级代谢产物的研究[J]. 中药材, 2007, 30(12): 1526-1529.
Guo Zhiyong, Huang Zhongjing, Wen Lu, et al. The metabolites of cyclic peptides from three endophytic mangrove fungi[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007, 30(12): 1526-1529.
- [19] Kim K S, Cui X, Lee D S, et al. Anti-inflammatory effect of neoechinulin A from the marine fungus *Eurotium* sp. SF-5989 through the suppression of NF- κ B and p38 MAPK pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 macrophages[J]. Molecules, 2013, 18(11): 13245-13259.
- [20] Chen X, Si L, Liu D, et al. Neoechinulin B and its analogues as potential entry inhibitors of influenza viruses, targeting viral hemagglutinin [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 93: 182-195.
- [21] Miyake Y, Ito C, Itoigawa M, et al. Antioxidants produced by *Eurotium herbariorum* of filamentous fungi used for the manufacture of Karebushi, dried bonito (Katsuo-bushi) [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(6): 1323-1327.
- [22] Hosoe T, Fukushima K, Itabashi T, et al. A new nonaziridine derivative, dihydroepiaveadride, as characteristic antifungal agent against filamentous fungi, isolated from unidentified fungus IFM 52672[J]. The Journal of Antibiotics, 2004, 57(9): 573-578.
- [23] Ishikawa Y, Morimoto K, Hamasaki T. Flavoglucin, a metabolite of *Eurotium chevalieri*, its antioxidation and synergism with tocopherol[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1984, 61(12): 1864-1868.
- [24] Du F Y, Li X M, Song J Y, et al. Anthraquinone Derivatives and an Orsellinic Acid Ester from the Marine Alga-Derived Endophytic Fungus *Eurotium cristatum* EN-220[J]. Helvetica Chimica Acta, 2014, 97(7): 973-978.
- [25] Slack G J, Puniani E, Frisvad J C, et al. Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities[J]. Mycological Research, 2009, 113(4): 480-490.
- [26] Nazar M, Afzal M, Mirza J H, et al. *Aspergillus chevalieri* contamination of barley[J]. Journal of the University of Kuwait (science). Kuwait, 1987, 14(1): 121-126.
- [27] Chen L, Gu Q Q. Study on the Antitumor Metabolites of a Sponge-Derived Fungus, *Aspergillus repens*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(5): 69-71.
- [28] Oh D C, Jensen P R, Kauffman C A, et al. Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13(51): 5267-5273.
- [29] Kohn H, Widger W. The molecular basis for the mode of action of bicyclomycin[J]. Current Drug Targets-Infectious Disorders, 2005, 5(3): 273-295.
- [30] Musetti R, Polizzotto R, Vecchione A, et al. Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: An ultrastructural study[J]. Micron, 2007, 38(6): 643-650.
- [31] Rodriguez P L, Carrasco L. Gliotoxin: Inhibitor of poliovirus RNA synthesis that blocks the viral RNA polymerase 3Dpol[J]. Journal of Virology, 1992, 66(4): 1971-1976.
- [32] Kanzaki H, Yanagisawa S, Nitoda T. Enzymatic synthesis of dehydrocyclo(His-Phe)s, analogs of the potent cell cycle inhibitor, dehydrophenylahistin, and their inhibitory activities toward cell division[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2004, 68(11): 2341-2345.
- [33] Perez-Picazo L, Olivo H F, Argote-Ramos R, et al. Linear and cyclic dipeptides with antimalarial activity[J]. Bioorganic and Medical Chemistry Letters, 2012, 22(23): 7048-7051.

Cytotoxic activity of secondary metabolites from co-culture of *Eurotium cristatum* with *Staphylococcus aureus*

YANG Juanjuan^{1,2}, ZOU Xianwei², HUANG Yun², LI Qian², CHEN Benke², TANG Jintian²

1. Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin; College of Life Sciences, Tarim University, Alar 843300, China
2. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging, Ministry of Education; Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract To evaluate the cytotoxic activity of secondary metabolites from co-culture of *Eurotium cristatum* with *Staphylococcus aureus*, seven known compounds, including echinulin(1), cristatumin F(2), neoechinulin A(3), preechinulin (4), flavoglucin (5), tetrahydroauroglucine (6), and epiheveadride (7) are isolated from the solid culture of the co-culture of *Eurotium cristatum* with *Staphylococcus aureus*. The structures are checked on the basis of spectroscopic analysis NMR experiments and by mass spectrometric measurements. These metabolites are evaluated in vitro for cytotoxicity activities against four tumor cell lines such as A549, MCF-7, Bel-7402, and Colo205. Compounds 3, 5 and 7 are found to show moderate cytotoxicity against the Bel-7402 cancer cell line.

Keywords *Eurotium cristatum*; co-culture; secondary metabolites; cytotoxic activity

(编辑 田恬)