

海带内生菌 *Alternaria* sp. W-1 次生代谢产物研究

王莎莎^{1,2}, 陈曦³, 王凤舞⁴, 徐亚平^{1,2}, 叶桐^{1,2}, 申丽^{1,2*}

(1. 扬州大学医学院(转化医学研究院), 江苏扬州 225001; 2. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏扬州 225001; 3. 扬州市中医院, 江苏扬州 225001; 4. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109)

摘要: 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和高效液相色谱等方法从海带内生菌 *Alternaria* sp. W-1 发酵液粗浸膏中分离得到 6 个化合物, 经高分辨质谱、核磁共振谱及文献比对的方法将它们鉴定为: 6-*iso*-tricycloalternarene 6a (**1**)、tricycloalternarene 6a (**2**)、tricycloalternarene B (**3**)、uracil (**4**)、5-methyluracil (**5**) 和 lumichrome (**6**), 其中, 6-*iso*-tricycloalternarene 6a (**1**) 是一个未见文献报道的新化合物。体外细胞毒活性测定显示, 化合物 **1**~**3** 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 和人胃癌细胞株 SGC-7901 有微弱的抑制活性。

关键词: 海带; 内生菌; *Alternaria* sp.; 次生代谢产物; tricycloalternarene 化合物

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)08-2248-04

Secondary metabolites of endophyte *Alternaria* sp. W-1 from *Laminaria japonica*

WANG Sha-sha^{1,2}, CHEN Xi³, WANG Feng-wu⁴, XU Ya-ping^{1,2}, YE Tong^{1,2}, SHEN Li^{1,2*}

(1. Institute of Translational Medicine, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Yangzhou 225001, China; 3. Yangzhou Hospital of TCM, Yangzhou 225001, China; 4. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Six compounds were isolated from the crude extract of the liquid culture of *Alternaria* sp. W-1 by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, and HPLC. They were identified as 6-*iso*-tricycloalternarene 6a (**1**), tricycloalternarene 6a (**2**), tricycloalternarene B (**3**), uracil (**4**), 5-methyluracil (**5**), and lumichrome (**6**) through HR-MS, NMR and literature comparison. 6-*iso*-Tricycloalternarene 6a (**1**) is a new compound which has never been reported in the literature. In cytotoxicity assay, compounds **1**~**3** showed weak inhibition activity to human hepatoma cell line SMMC-7721 and human gastric cell line SGC-7901.

Key words: *Laminaria japonica*; endophyte; *Alternaria* sp.; secondary metabolite; tricycloalternarene compound

链格孢 (*Alternaria* sp.) 是自然界中常见的一种半知菌类真菌, 广泛分布于植物、土壤和海洋环境中。链格孢属真菌能产生丰富的次生代谢产物, 如: 含氮化合物、甾体、萜类及类萜类、吡喃酮类、醌类、酚类等, 它们往往具有细胞毒、抗菌等多种药理活性^[1], 是新药先导化合物的重要来源。*Alternaria* sp. W-1 是青岛农业大

学王凤舞博士从大型海生褐藻——海带 (*Laminaria japonica*) 中分离获得的一株内生真菌, 前期实验已从 *Alternaria* sp. W-1 发酵液中分离得到 6 个 tricycloalternarene (TCA) 化合物, 其中 1 个新化合物^[2]。Tricycloalternarenes (TCAs) 是一类由 *Alternaria* sp.^[3]、*Aspergillus* sp.^[4]、*Guignardia* sp.^[5] 和 *Ulocladium* sp.^[6] 等真菌产生的类萜类化合物, 大多数 TCAs 结构中具有环己-2-烯酮的环系统, 并通过亚甲基和氧原子与环戊烯基/环戊基连接而形成三环化合物。TCA 类化合物曾被命

收稿日期: 2021-04-06; 修回日期: 2021-04-28.

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2020MB101).

*通讯作者 Tel: 86-514-87992233, E-mail: shenli@yzu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0488

名为 ACTG-toxin, 它们在结构上很相似, 主要区别在于类异戊二烯侧链和 C 环的取代方式不同^[1]。进一步对 *Alternaria* sp. W-1 发酵液粗浸膏中的化学成分进行分离纯化, 结果又分离得到 1 个新 tricycloalternarene 化合物 6-*iso*-tricycloalternarene 6a (**1**, 图 1) 和 5 个已知物 tricycloalternarene 6a (TCA 6a, **2**)^[7]、tricycloalternarene B (TCA B, **3**)^[3]、uracil (**4**)^[8]、5-methyluracil (**5**)^[8] 和 lumichrome (**6**)^[9]。

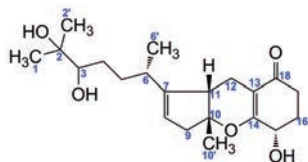


Figure 1 Structure of 6-*iso*-tricycloalternarene 6a (**1**)

结果与讨论

化合物 **1** 为黄色固体。其正源 HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 m/z 365.232 8 $[M+H]^+$, 387.214 5 $[M+Na]^+$ 和 751.438 3 $[2M+Na]^+$, 说明其相对分子质量为 364, 分子式为 $C_{21}H_{32}O_5$ ($C_{21}H_{32}O_5Na$ 理论值: 387.214 7), 不饱和度为 6。化合物 **1** 的 1H NMR 谱显示, 3 个甲基单峰 δ_{H-1} 1.18、 δ_{H-2} 1.12、 $\delta_{H-10'}$ 1.50, 1 个甲基双峰 $\delta_{H-6'}$ 0.98, 1 个双键氢 δ_{H-8} 5.35; ^{13}C NMR 谱显示 20 个碳信号 (C-18 位羰基碳信号未观察到), 其中 4 个双键碳 δ_{C-7} 150.0、 δ_{C-8} 120.0、 δ_{C-13} 105.0 和 δ_{C-14} 170.2。 1H 和 ^{13}C NMR 谱提示, 化合物 **1** 是一个 tricycloalternarene 化合物。仔细分析其 1H 和 ^{13}C NMR 数据发现, 化合物 **1** 与 TCA 6a (**2**) 和 TCA 6b 比较相似 (三者分子式皆为 $C_{21}H_{32}O_5$), 但也存在明显的差异^[10]。与 TCA 6b 相比, 化合物 **1** 的 1H 和 ^{13}C NMR 谱中分别观察到 δ_{H-15} 4.35 和 δ_{C-15} 66.5, 说明其存在 15-OH, 而非 17-OH^[10]。LC-MS/MS 分析显示, 化合物 **1** 和 TCA 6a (**2**) 具有相同的二级质谱图, 说明它们具有相同的平面结构; 与 TCA 6a (**2**) 相比, 化合物 **1** 的 C-5 和 C-6' 向低场移动 ($\Delta\delta_{C-5} = 1.1$, $\Delta\delta_{C-6'} = 0.7$)^[10]; 同时 H-5 向低场显著移动 ($\Delta\delta_{H-5ab} = 0.52$), H-6 向高场移动 ($\Delta\delta = -0.20$)。这说明化合物 **1** 可能是 TCA 6a 的 C-6 位异构体。随后进行的一系列 2D NMR 谱 (HSQC、HMBC、COSY 和 NOESY) 确证了对化合物 **1** 的结构推测。

1H - 1H COSY 谱中观察到: H-3 与 H-4、H-4 与 H-5、H-5 与 H-6、H-4 与 H-6 以及 H-5 与 H-6' 相关; H-8 与 H-9 相关; H-11 与 H-12 相关; H-15、H-17 与 H-16 相关。HMBC 谱中可以观察到: H-2' 与 C-1 相关; H-1 与 C-2' 相关; H-1、H-2' 与 C-2 相关; H-1、H-2' 与 C-3 相关; H-5、H-6'、H-9、H-12 与 C-7 相关; H-9 与 C-8 相关; H-8、H-10' 与 C-9 相关; H-8、H-9、H-10' 与 C-10 相关; H-8、H-9、

H-10'、H-12 与 C-11 相关; H-12、H-16 与 C-14 相关 (图 2)。因此, 化合物 **1** 被确定为 6-*iso*-tricycloalternarene 6a, 该结构尚未见文献报道, 其 1H 和 ^{13}C NMR 谱归属列于表 1。

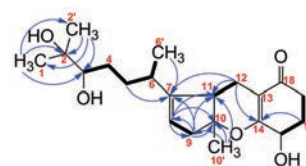


Figure 2 1H - 1H COSY (—) and HMBC (↷) correlations of compound **1**

Table 1 NMR spectral data of compound **1** ($CDCl_3$, 600 MHz (H)/150 MHz (C), J in Hz)

Position	δ_H	δ_C
1	1.18 (s)	26.5
2		73.0
2'	1.12 (s)	23.3
3	3.25 (d, 9.6)	78.9
4	1.43 (m)	29.8
5	1.25 (m)	
	1.97 (m)	32.9
6	1.71 (m)	
6'	0.98 (d, 6.6)	32.1
7		150.0
8	5.35 (s)	120.0
9	2.64 (m)	45.0
	2.47 (d, 15.6)	
10		88.8
10'	1.50 (s)	23.7
11	2.80 (m)	46.8
12	2.64 (m)	15.2
	2.23 (m)	
13		105.0
14		170.2
15	4.35 (m)	66.5
16	2.23 (m)	28.9
	1.97 (m)	
17	2.59 (m)	
	2.31 (m)	33.6

采用 MTT 法测定化合物 **1**~**3** 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 和人胃癌细胞株 SGC-7901 的体外细胞毒活性, 结果发现, 化合物 **1**~**3** 对上述两种肿瘤细胞株表现出微弱的抑制活性, 在 $50 \mu g \cdot mL^{-1}$ 时, 对 SMMC-7721 细胞的抑制率分别为 25.71%、20.22% 和 28.91%, 对 SGC-7901 细胞的抑制率分别为 23.10%、19.40% 和 41.04%, 而阳性对照顺铂对这两种肿瘤细胞株的 IC_{50} 值分别为 6.12 和 $1.25 \mu g \cdot mL^{-1}$ 。

实验部分

Bruker AVANCE 600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker

公司); Bruker UHR-TOF-Maxis 超高分辨飞行时间质谱仪 (德国 Bruker 公司); 超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱 TripleTOF 4600 (美国 AB SCIEX 公司); WZZ-2B 自动旋光仪 (上海精密科学仪器有限公司); Jasco J-810 圆二色谱仪 (日本分光公司); Hitachi Primaide 高效液相色谱仪 (日本日立公司), 液相色谱柱 Sinochrom ODS-AP (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 和 Sinochrom ODS-AP (4.6 mm×250 mm, 5 μm) (大连依利特分析仪器有限公司); Isolera one 快速纯化制备液相色谱 (瑞典 Biotage 公司); Thermo Series II CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Bio-Tek SYNERGY2 多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司) 等。柱色谱硅胶 (200~300 目) (青岛海洋化工厂分厂); Merck Silica gel 60 F254 铝板 (20 cm×20 cm) (德国 Merck 公司); Sephadex LH-20 (瑞典 Pharmacia Biotech 公司); CDCl₃ (美国 Sigma-Aldrich 公司); CD₃OD (青岛腾龙微波技术有限公司); DMSO-*d*₆ (美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司); 色谱甲醇 (美国 TEDIA 公司); 色谱乙腈 (国药集团化学试剂有限公司); RPMI 1640、新生胎牛血清和青-链霉素混合液 (以色列 Biological Industries 公司); 0.25% 胰蛋白酶 (上海碧云天生物技术有限公司); 噻唑蓝 (MTT) (大连美仑生物技术有限公司); 顺铂 (江苏豪森药业股份有限公司); 其他试剂均为分析纯。人胃癌细胞株 SGC-7901 (上海生命科学研究院细胞库); 人肝癌细胞株 SMMC-7721 (美国 ATCC 公司)。

1 提取与分离

菌株 W-1 是青岛农业大学王凤舞博士从山东威海海域采集的野生新鲜海带中分离得到的一株内生真菌, 根据形态学特征及与 18S rDNA 序列比较, 鉴定其为链格孢 *Alternaria* sp. (GenBank 登录号 MF184928), 该菌株保存在中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC No.15181)。 *Alternaria* sp. W-1 采用海水配制的查氏培养基进行液体发酵, 发酵液经乙酸乙酯萃取 3 次、减压蒸馏去除溶剂后得粗浸膏 20 g^[2]。

发酵液粗浸膏经硅胶柱色谱粗分离, 二氯甲烷: 甲醇梯度洗脱 (v/v 100:0→0:100), 得到 10 个组分 Fr.1~Fr.10。 Fr.1 经进一步硅胶柱色谱分离得到 Fr.1-1~Fr.1-4, Fr.1-3 经 HPLC (Sinochrom ODS-AP 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 254 nm, 甲醇: 水 v/v 55:45, 1 mL·min⁻¹) 分离纯化得到化合物 **3** (3.1 mg, *t*_R = 118 min)。 Fr.6 经进一步硅胶柱色谱分离得到 Fr.6-1 和 Fr.6-2, Fr.6-1 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离得到的 Fr.6-1-3 经 HPLC (Sinochrom ODS-AP 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 254 nm, 乙腈: 水 v/v 15:85, 1 mL·min⁻¹) 分离纯化得到

化合物 **6** (1.1 mg, *t*_R = 39 min)。 Fr.7 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离得到 Fr.7-1~Fr.7-3, Fr.7-1 经 HPLC (Sinochrom ODS-AP 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 254 nm, 甲醇: 水 v/v 34:66, 1 mL·min⁻¹) 分离纯化得到化合物 **1** (1.6 mg, *t*_R = 78 min) 和 **2** (7.8 mg, *t*_R = 73 min); Fr.7-3 经 HPLC (Sinochrom ODS-AP 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 254 nm, 甲醇: 水 v/v 10:90, 1 mL·min⁻¹) 分离纯化得到化合物 **4** (1.2 mg, *t*_R = 3.5 min) 和 **5** (1.1 mg, *t*_R = 4.3 min)。

2 结构鉴定

6-*iso*-Tricycloalternarene **6a** (**1**) 黄色固体, 分子式 C₂₁H₃₂O₅。 HR-ESI-MS *m/z*: 365.232 8 [M+H]⁺, 387.214 5 [M+Na]⁺, 751.438 3 [2M+Na]⁺ (C₂₁H₃₂O₅Na 理论值: 387.214 7)。 [α]_D²⁵ = -52.2 (c 0.009 6, MeOH); UV (MeOH): λ_{max} (log ε) = 262 (3.82) nm; CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 207 (-0.33), 226 (1.40), 288 (-0.23), 304 (0.38) nm; ¹H 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

Tricycloalternarene **6a** (TCA **6a**, **2**) 黄色粉末, 分子式 C₂₁H₃₂O₅。 HR-ESI-MS *m/z*: 365.232 5 [M+H]⁺, 387.213 9 [M+Na]⁺, 751.440 9 [2M+Na]⁺ (C₂₁H₃₂O₅Na 理论值: 387.214 7); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 5.37 (1H, s, H-8), 4.22 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-15), 3.16 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-3), 2.87 (1H, s, H-11), 2.63 (2H, m, H-12a, H-9a), 2.56 (1H, m, H-17a), 2.49 (1H, m, H-9b), 2.28 (1H, m, H-17b), 2.19 (2H, m, H-12b, H-16a), 1.94 (2H, m, H-16b, H-6), 1.53 (1H, m, H-5a), 1.50 (3H, s, H-10'), 1.44 (1H, m, H-5b), 1.30 (1H, m, H-4a), 1.15 (1H, m, H-4b), 1.13 (3H, s, H-1), 1.09 (3H, s, H-2'), 0.99 (3H, br s, H-6'); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 200.0 (C-18), 174.1 (C-14), 151.3 (C-7), 121.4 (C-8), 108.7 (C-13), 90.1 (C-10), 79.9 (C-3), 73.7 (C-2), 67.1 (C-15), 47.9 (C-11), 45.9 (C-9), 34.2 (C-17), 33.8 (C-6), 33.5 (C-5), 30.6 (C-4), 30.5 (C-16), 25.8 (C-1), 24.9 (C-10'), 23.6 (C-2'), 20.6 (C-6'), 16.1 (C-12)。

Tricycloalternarene B (TCA B, **3**) 白色粉末, 分子式 C₂₃H₃₂O₅。 HR-ESI-MS *m/z*: 411.215 5 [M+Na]⁺, 387.217 6 [M-H]⁻ (C₂₃H₃₂O₅Na 理论值: 411.214 2); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 5.39 (1H, s, H-3), 5.33 (1H, s, H-8), 4.43 (2H, s, H-1ab), 4.02 (1H, d, *J* = 12.6 Hz, H-17), 2.74 (1H, s, H-11), 2.66 (1H, d, *J* = 16.8 Hz, H-12a), 2.59 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-9a), 2.49 (1H, m, H-15a), 2.43 (1H, d, H-9b), 2.38 (1H, m, H-15b), 2.33 (1H, m, H-16a), 2.24 (1H, br d, *J* = 18.6 Hz, H-12b), 2.07 (3H, s, 1-OOCCH₃), 2.02 (1H, m, H-6), 1.95 (2H, m, H-4ab), 1.72 (1H, m, H-16b), 1.61 (3H, s, H-2'), 1.51 (2H, m, H-5ab), 1.43 (3H, s, H-10'), 0.96 (3H, br s, H-6')。

Uracil (4) 白色固体, 分子式 $C_4H_4N_2O_2$ 。HR-ESI-MS m/z : 113.037 4 $[M+H]^+$, 135.017 8 $[M+Na]^+$ ($C_4H_5N_2O_2$ 理论值: 113.034 6); 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.96 (2H, s, 1-NH, 3-NH), 7.38 (1H, s, H-6), 5.45 (1H, s, H-5)。

5-Methyluracil (5) 白色固体, 分子式 $C_5H_6N_2O_2$ 。HR-ESI-MS m/z : 127.051 9 $[M+H]^+$, 253.091 1 $[2M+H]^+$ ($C_5H_7N_2O_2$ 理论值: 127.050 2); 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.99 (1H, s, 3-NH), 10.59 (1H, s, 1-NH), 7.23 (1H, s, H-6), 1.72 (3H, d, $J = 0.6$ Hz, 5- CH_3)。

Lumichrome (6) 黄绿色粉末, 分子式 $C_{12}H_{10}N_4O_2$ 。HR-ESI-MS m/z : 265.070 4 $[M+Na]^+$, 507.152 7 $[2M+Na]^+$ ($C_{12}H_{10}N_4O_2Na$ 理论值: 265.069 6); 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 11.70 (2H, s, 1-NH, 3-NH), 7.92 (1H, s, H-9), 7.71 (1H, s, H-6), 2.49 (3H, s, 7- CH_3), 2.47 (3H, s, 8- CH_3)。

3 体外细胞毒活性测定

采用 MTT 法测定化合物的体外细胞毒活性。肿瘤细胞在含 10% 新生胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 于 37 °C、5% CO_2 的 CO_2 培养箱内培养至对数生长期。收集对数生长期细胞, 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板, 当细胞密度达到 80% 左右时, 药物组分别加入 100 μL 一定浓度 (0.1、1、10、20 和 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$) 的待测化合物 (少量 DMSO 助溶), 阴性对照组和空白组分别加入等体积 0.1% 的 DMSO 和培养液。培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT (5 $mg \cdot mL^{-1}$), 继续培育 4 h。然后弃去培养液, 每孔加 100 μL DMSO, 37 °C 振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 酶标仪在波长 490 nm 处测定各孔吸光度 OD 值。顺铂为阳性对照药。计算公式如下:

$$\text{增殖抑制率} = \frac{OD_{\text{空白组}} - OD_{\text{药物组}}}{OD_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

致谢: 扬州大学分析测试中心承担化合物结构的分析测试工作。

作者贡献: 王莎莎与陈曦负责海带内生菌 *Alternaria* sp. W-1 次生代谢产物的分离及结构鉴定, 另王莎莎负责完成论文初稿; 青岛农业大学王凤舞博士承担 *Alternaria* sp. W-1 的

分离、鉴定与发酵; 徐亚平承担化合物的质谱分析; 叶桐承担化合物的体外细胞毒活性测定; 申丽负责实验设计和论文框架的构建及稿件修改等。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Lou J, Fu L, Peng Y, et al. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities [J]. *Molecules*, 2013, 18: 5891-5935.
- [2] Shen L, Tian SJ, Song HL, et al. Cytotoxic tricycloalternarene compounds from endophyte *Alternaria* sp. W-1 associated with *Laminaria japonica* [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16: 402.
- [3] Yuan L, Zhao PJ, Ma J, et al. Tricycloalternarenes A-E: five new mixed terpenoids from the endophytic fungal strain *Alternaria alternata* Ly 83 [J]. *Helv Chim Acta*, 2008, 91: 1588-1594.
- [4] Bai ZQ, Lin X, Wang J, et al. New meroterpenoids from the endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived from the mangrove plant *Acanthus ilicifolius* [J]. *Mar Drugs*, 2015, 13: 237-248.
- [5] Mei WL, Zheng B, Zhao YX, et al. Meroterpenes from endophytic fungus A1 of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10: 1993-2001.
- [6] Wang QX, Bao L, Yang XL, et al. Tricycloalternarenes F-H: three new mixed terpenoids produced by an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. using OSMAC method [J]. *Fitoterapia*, 2013, 85: 8-13.
- [7] Duan RT, Zhou H, Li HT, et al. Chemical constituents of endophytic fungus *Alternaria* sp. TY2-3 associated with *Gastrodia elata* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28 (Suppl): 188-191.
- [8] Pretsch E, Buhlmann P, Affolter C. Rong GB (translation). *Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data* (波谱数据表-有机化合物的结构解析) [M]. Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 2002: 238.
- [9] Yang LH, Jin XQ, Zhang W. Studies on the chemical constituents from the skin of *Bufo bufo gargarizans canton* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17: 292-295.
- [10] Nussbaum RP, Günther W, Heinze S, et al. New tricycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 593-599.