

溶洞真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 中两个新的 异香豆素类化合物

伍荣香¹, 郭杰兰¹, 黄桦¹, 廖婧婧¹, 郝祎¹, 孔凡栋¹, 周丽曼^{1*}, 张朝军^{2*}

(1. 广西民族大学化学化工学院, 林产化学与工程国家民委重点实验室, 广西林产化学与工程重点实验室, 广西林产化学与工程协同创新中心, 广西高校少数民族医药古方挖掘与开发重点实验室, 广西 南宁 530006;
2. 浙江康莱特药业有限公司, 浙江 杭州 310018)

摘要: 对来自广西伊岭岩风景区喀斯特溶洞真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 的次级代谢产物进行提取研究。利用薄层色谱、高效液相色谱等对真菌次级代谢产物进行分离纯化, 得到 10 个化合物, 其中 7-羟基-3-羟甲基-5,6-二甲基异咯-1-酮 (1) 与 7-羟基-3,5,6-三甲基异咯-1-酮 (2) 为新结构的异香豆素类化合物, *N*-乙酰苯丙氨酸 (3)、毛壳素 J (4)、2-one-13-hydroxy-3,5,8,7(11)-eudesmatetraen-12,8-olide (5)、1*H*-吲哚-3-甲醛 (6)、irpexolaceus B (7)、irlactin L (8)、细胞松弛素 K (9)、烟曲霉酸 (10), 共 8 个已知化合物。运用核磁共振谱、质谱等方法确定化合物结构, 分别采用 CCK-8 法对化合物进行肿瘤细胞毒性评价, 结果显示, 新化合物 2 对 HepG2 细胞的 IC₅₀ 为 29.83 μmol·L⁻¹, 化合物 9 对 HCT116 细胞的 IC₅₀ 为 27.44 μmol·L⁻¹。

关键词: 溶洞真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2; 肿瘤细胞毒性; 异香豆素类化合物; 次级代谢产物
中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2588-06

Two new isocoumarins from cave-derived *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2

WU Rong-xiang¹, GUO Jie-lan¹, HUANG Hua¹, LIAO Jing-jing¹, HAO Yi¹, KONG Fan-dong¹,
ZHOU Li-man^{1*}, ZHANG Chao-jun^{2*}

(1. Key Laboratory of Universities in Guangxi for Excavation and Development of Ancient Ethnomedicinal Recipes, Guangxi Collaborative Innovation Center for Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, State Ethnic Affairs Commission, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China; 2. Zhejiang Kanglaite Pharmaceutical Limited Company, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Extracting extracts of secondary metabolites from the karst cave fungus *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 from the Yilingyan Scenic Area in Guangxi. Ten compounds were isolated and purified from fungal secondary metabolites using thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. 7-Hydroxy-3-hydroxypropyl-5,6-dimethylisochromen-1-one (1) and 7-hydroxy-3,5,6-trimethyl-isochromen-1-one (2) were new isocoumarin compounds, *N*-acetyl phenylalanine (3), chaetosumin J (4), 2-one-13-hydroxy-3,5,8,7(11)-eudesmatetraen-12,8-olide (5), 1*H*-indole-3-carboxaldehyde (6), irpexolaceus B (7), irlactin L (8), cytochalasin K (9), and

收稿日期: 2024-03-07; 修回日期: 2024-04-28.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82104034); 广西科技基地与人才专项 (AD22035018); 广西自然科学基金项目 (2021GXNSFBA220040); 广西民族大学校级引进人才科研启动项目 (2020KJQD09, 2021KJQD09); 广西民族大学自治区级大学生创新创业训练计划项目 (S202210608141); 广西民族大学相思湖青年创新团队 (2021RSCXSHQN01); 广西民族大学校级科研项目 (2021MDKJ003).

*通讯作者 E-mail: zhouliman88@126.com; zhangchaojun@jemincare.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0211

helvolic acid (10), a total of 8 known compounds. The structure of the compound was determined using methods such as NMR and mass spectrometry. The tumor cytotoxicity of the compound was evaluated using the CCK-8 method. The results showed that the IC_{50} of compound 2 on HepG2 cells was $29.83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and compound 9 on HCT116 cells was $27.44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2; tumor cytotoxicity; isocoumarin compound; secondary metabolite

当今社会发展中, 肿瘤令人闻风丧胆, 其病因及发病机制未明晰, 对人类生活质量影响极其严重。其中, 结肠癌随社会经济的发展呈现上升趋势, 占癌症病例和死亡病例的十分之一; 原发性肝癌确诊病例和死亡病例分别排全球第六和第三^[1]。为筛选新的抗肿瘤药物, 许多研究者将目光投向独特的生态环境, 从中筛选未知的微生物次级代谢产物, 如溶洞、沙漠、湖泊等。喀斯特溶洞是由水和岩石相互作用下形成的, 其地理位置特殊, 生态环境极端且稳定, 常年无光、温度恒定、湿度90%以上、氧气浓度低、营养贫瘠, 其生境特异性对溶洞微生物的生存策略及代谢途径有着重要的影响。溶洞作为天然实验室, 对发现药源分子、拓宽药物研发资源选择范围存在得天独厚的优势, 意义十分重大。

本文研究的真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 是绿僵菌属, 来自广西伊岭岩风景区内喀斯特溶洞, 目前尚未发现绿僵菌对哺乳动物或植物有毒害作用, 可用于害虫防治, 绿僵菌代谢产物具有较强生物活性的特点引起许多研究者的关注, 主要表现为抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等活性。绿僵菌主要代谢产物有糖苷类、生物碱类、环肽类、酚酸类、含氮杂环类、吡喃酮类等。从金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 的发酵产物中分离鉴定10个化合物, 分别为7-羟基-3-羟甲基-5,6-二甲基异咯-1-酮 (1) 与7-羟基-3,5,6-三甲基异咯-1-酮 (2) 为新结构的异香豆素类化合物, *N*-乙酰苯丙氨酸 (3)、毛壳素 J (4)、2-one-13-hydroxy-3,5,

8,7(11)-eudesmatetraen-12,8-olide (5)、1*H*-吲哚-3-甲醛 (6)、irpexolaceus B (7)、irlactin L (8)、细胞松弛素 K (9)、烟曲霉酸 (10), 其中化合物1和化合物2均为新结构的异香豆素类化合物 (图1)。抗肿瘤活性评价结果显示, 从菌株 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 中分离鉴定的化合物9对人结肠癌细胞 HCT116 具有一定的抑制活性, 此外, 新化合物2对人肝癌细胞 HepG2 生长有较好抑制作用。

结果与讨论

1 菌株鉴定及菌丝体切片结果

菌株 NHC-M3-2 已被鉴定为绿僵菌属, 命名为 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2^[2]。该菌株不同生长时期的孢子呈现不同程度的绿色, 初期、中期、后期分别为白色、黄绿色、深绿色, 与金龟子绿僵菌形态特征一致。对产孢子初期、中期和后期的菌丝进行显微镜切片观察, 菌丝体呈现绒毛状, 光滑透明, 纵横交错, 颜色由无色加深至黄绿色 (图2)。

2 结构解析

化合物1: 浅黄色膏状; 正离子高分辨质谱 HR-ESI-MS 在 m/z 220.224 0 (计算值 221.080 9) 给出准分子离子峰 $[M+H]^+$, 不饱和度为 7, 提示分子式为 $C_{12}H_{12}O_4$; 紫外光谱 (UV) 在 295、252、245、225 和 213 nm 给出特征吸收峰。化合物1的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 及 HSQC 谱图 (表1) 显示其具有 8 个双键或苯环碳 (2 个次甲基及

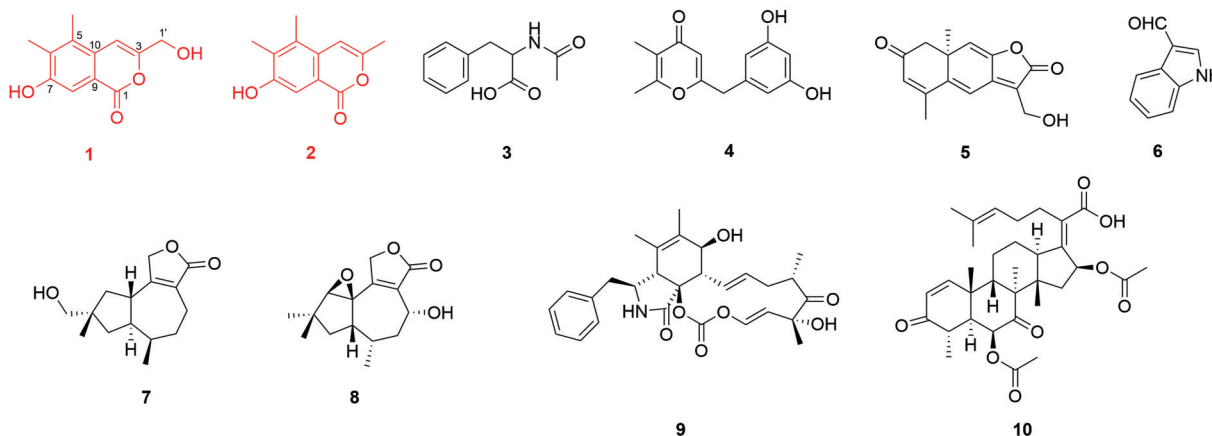


Figure 1 Structures of compounds 1-10

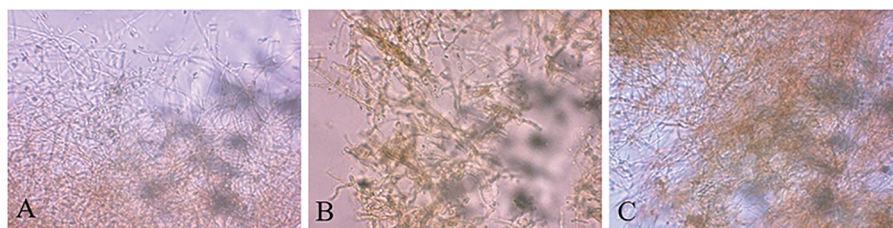


Figure 2 NHC-M3-2 mycelium. A: Early stage; B: Hyphal metaphase; C: Late stage

6个季碳)、1个含氧亚甲基、2个甲基和1个酯羰基。这些数据与已知化合物(10*R*)-7-hydroxy-3-(2-hydroxypropyl)-5,6-dimethyl-isochromen-1-one的核磁数据^[3]非常相似,区别仅是7-hydroxy-3-(2-hydroxypropyl)-5,6-dimethyl-isochromen-1-one中的C-3位2-羟丙基取代基的信号在化合物**1**中被羟甲基信号取代,说明化合物**1**的C-3位为羟甲基取代基。HMBC谱图中给出H₂-1'与C-3及C-4和H-4与C-1'的相关信号(图3),这些数据进一步证明了以上推断。通过仔细分析HMBC数据(图3),化合物**1**的其他部分结构被证明与7-hydroxy-3-(2-hydroxypropyl)-5,6-dimethyl-isochromen-1-one相同。因此,化合物**1**被命名为7-hydroxy-3-hydroxymethyl-5,6-dimethyl-isochromen-1-one。

化合物**2**:无色固体;正离子高分辨质谱HR-ESI-MS在*m/z* 204.225 0(计算值205.085 6)给出准分子离子峰[M+H]⁺,不饱和度为7,提示分子式为C₁₂H₁₂O₃;紫外光谱(UV)在293、252、245、224和213 nm给出特征吸收峰。仔细对比化合物**2**和**1**的1D NMR数据发现它们的结构非常相似,区别仅是化合物**1**中的C-3位羟甲基取代基在化合物**2**中被甲基取代。化合物**2**的HMBC谱图给出H₃-1'与C-3和C-4的相关信号(图3),进一步确证了以上推断。故化合物**2**被命名为7-hydroxy-3,5,6-trimethyl-isochromen-1-one。

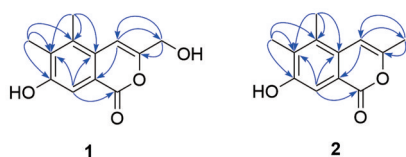


Figure 3 The key HMBC correlations for **1** and **2**

3 肿瘤细胞毒活性测试

使用CCK-8法,对化合物**1**~**10**对人肝癌细胞HepG2、人宫颈癌细胞HeLa、人结肠癌细胞HCT116、人正常肝细胞L02进行抗肿瘤活性筛选。发现化合物**2**和化合物**9**分别对人肝癌细胞HepG2和人结肠癌细胞HCT116具有一定的细胞毒活性,其抑制结果如表2所示。

Table 1 ¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) data of compounds **1** and **2** in DMSO-*d*₆

C No.	1		2	
	δ_{H} (J/Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J/Hz)	δ_{C}
1	-	178.8, C	-	178.7, C
2	-	-	-	-
3	-	166.1, C	-	163.2, C
4	6.72 (1H, s)	108.6, C	6.71 (1H, s)	110.0, C
5	-	139.3, C	-	139.1, C
6	-	122.4, C	-	122.2, C
7	-	159.4, C	-	159.2, C
8	6.07 (1H, s)	99.8, CH	5.96 (1H, s)	99.7, CH
9	-	156.8, C	-	156.9, C
10	-	114.6, C	-	114.1, C
1'	4.32 (2H, s)	59.5, CH ₂	2.26 (3H, s)	19.3, CH ₃
1'-OH	5.70 (1H, s)	-	-	-
7-OH	10.70 (s)	-	10.64 (s)	-
5-CH ₃	2.70 (3H, s)	17.0, CH ₃	2.70 (3H, s)	16.9, CH ₃
6-CH ₃	2.09 (3H, s)	11.4, CH ₃	2.09 (3H, s)	11.3, CH ₃

Table 2 Antitumor activity of compounds **2** and **9**. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

Compound	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹			
	HepG2	HeLa	HCT116	L02
2	29.83 ± 2.74	-	-	-
9	-	-	27.44 ± 3.29	-
Sunitinib	16.66 ± 2.79	7.37 ± 0.68	6.01 ± 0.48	17.34 ± 1.44
Doxorubicin	11.18 ± 0.47	3.43 ± 0.15	6.94 ± 0.17	12.87 ± 1.44

实验部分

YXQ-LS-75S II型高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);日立Primaide高效液相色谱仪(北京日立科学仪器有限公司);CR-080R型春霖超声波清洗机(深圳市春霖清洗设备有限公司);HCB-1300V洁净工作台(青岛海尔特种电器有限公司);LRH-500A生化培养箱(广东泰宏君科学仪器股份有限公司);AL104分析天平(瑞士梅特勒公司);兰博seriesIII制备型高效液相色谱;赛默飞高分辨质谱仪;Bruker AVANCE 400MHz核磁共振(德国布鲁克公司);Agilent Cary60紫外-可见分光光度计、Agilent Infinity Lab LC/MSD质谱仪(美国安捷伦科技有限公司);K3 TOUCH酶标仪(上海飞世尔实验器材有限公司);色谱级甲醇、乙腈(苏州速研医药科技有限公司);三氟乙酸(山东科源生化有限公司);二氯甲烷(成都市科隆化学品有限公司);琼脂粉(广州赛国生物科技

有限公司); YMC*GEL ODS-A-HG 反相硅胶 (日本株式会社 YMC 公司)。制备型高效液相色谱柱 5PFP (250 mm × 10 mm, 5 μm), 5C18-MS- II (250 mm × 10 mm, 5 μm) 和分析高效色谱柱 5PFP (50 mm × 4.6 mm, 5 μm); C18-MS- II (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 日本 Nacalai Tesque 公司。本实验提纯分离使用的甲醇、醋酸乙酯、二氯甲烷等均为工业用化学纯产品。

1 菌株的发酵

本实验使用马铃薯培养基为葡萄糖 2%、琼脂 2%、马铃薯 20%; 大米培养基为大米 80 g 和水 120 mL。在马铃薯培养基中接种真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2, 置于 28 °C 恒温培养箱中培养 3 天, 挑取菌株接种于大米培养基的锥形瓶 (1 L), 室温培养 75 天, 发酵规模为 156 瓶。

2 化合物的提取和分离

2.1 菌株提取物萃取 对真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 进行大米培养基发酵, 使用醋酸乙酯浸提发酵物 4 次, 合并代谢产物提取液, 经过过滤、减压浓缩后得到粗提物 83.28 g。使用 90% 甲醇-水和石油醚对浸膏进行萃取, 得到的甲醇层和石油醚层萃取物分别为 16.61、55.58 g。

2.2 化合物的分离纯化 取甲醇层萃取物, 进行反向 ODS 色谱柱洗脱, 洗脱梯度依次为 20%、40%、60%、80%、100% 甲醇-水, 共 5 个梯度, 每个梯度收集 3 次, 每次收集 300 mL, 得到 15 个组分, 将 20% 甲醇-水梯度洗脱第一次收集得到的 300 mL 编号为 Fr1.1, 20% 甲醇-水梯度洗脱第二次收集得到的 300 mL 编号为 Fr1.2, 20% 甲醇-水梯度洗脱第三次收集得到的 300 mL 编号为 Fr1.3, 以此类推, 依次编号为 Fr1.1~Fr15.3。Fr2.2 (118.4 mg) 通过半制备液相色谱 (5PFP 半制备柱, 0.1% 三氟乙酸-甲醇 60:40, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 3 (16.4 mg, $t_R = 10.8$ min) 和化合物 4 (21.0 mg, $t_R = 13.4$ min)。Fr3.2 (358.4 mg) 通过半制备液相色谱 (5PFP 半制备柱, 0.1% 三氟乙酸-甲醇 50:50, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 1 (3.2 mg, $t_R = 16.5$ min)。Fr3.3 (185.0 mg) 通过半制备液相色谱 (C18 半制备柱, 0.1% 三氟乙酸-乙腈 35:65, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 2 (1.6 mg, $t_R = 16.5$ min), 通过两次半制备液相色谱, 第一次 (C18 半制备柱, 0.1% 三氟乙酸-乙腈 35:65, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到组分 (5.9 mg), 第二次 (5PFP 半制备柱, 0.1% 三氟乙酸-甲醇 60:40, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 7 (1.6 mg, $t_R = 12.3$ min), 通过半制备液相色谱 (C18 半制备柱, 0.1% 三氟乙酸-乙腈 35:65, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 8 (5.1 mg, $t_R = 18.4$ min)。Fr3.1 (350.3 mg)

通过半制备液相色谱 (5PFP 半制备柱, 50% 甲醇-水, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 5 (2.1 mg, $t_R = 10.0$ min) 和化合物 6 (3.3 mg, $t_R = 12.5$ min)。Fr4.1 (280.3 mg) 通过两次半制备液相色谱, 第一次 (C18 半制备柱, 40% 乙腈-水, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到组分 (14.1 mg), 第二次 (5PFP 半制备柱, 35% 乙腈-水, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 9 (8.3 mg, $t_R = 22.8$ min)。Fr4.3 (1 107.3 mg) 通过半制备液相色谱 (C18 半制备柱, 0.1% 三氟乙酸-乙腈 55:45, 流速 4 mL·min⁻¹) 纯化得到化合物 10 (7.5 mg, $t_R = 12.7$ min)。

3 结构鉴定

化合物 3: 浅棕色膏状; ESI-MS m/z 437.2 [2M+Na]⁺, 分子式 C₁₁H₁₃NO₃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 8.22 (1H, d, $J = 7.8$, -NH), 7.23 (5H, overlap, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.37 (1H, m, H-8), 3.02 (1H, dd, $J = 4.24, 14.11$, H-7a), 2.81 (1H, dd, $J = 9.81, 13.71$, H-7b), 1.76 (3H, s, H-11); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 173.1 (C, C-9), 169.3 (C, C-10), 137.6 (C, C-1), 129.0 (CH, C-5), 129.0 (CH, C-3), 128.2 (CH, C-2), 128.1 (CH, C-6), 126.4 (CH, C-4), 53.5 (CH, C-8), 36.7 (CH₂, C-7), 22.2 (CH₃, C-11)。该化合物的数据与文献^[4]报道的一致, 故化合物 3 鉴定为 *N*-乙酰苯丙氨酸。

化合物 4: 棕膏状; ESI-MS m/z 247.1 [M+H]⁺, 分子式 C₁₄H₁₄O₄; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 6.10 (2H, overlap, H-8, H-10), 6.09 (1H, overlap, H-12), 6.05 (1H, s, H-5), 3.62 (2H, overlap, H-7a, H-7b), 2.22 (3H, s, H-15), 1.77 (3H, s, H-14); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 178.5 (C, C-4), 166.8 (C, C-6), 161.6 (C, C-2), 158.6 (C, C-9, C-11), 137.8 (C, C-13), 119.7 (C, C-3), 111.9 (CH, C-5), 107.0 (C-8, C-12), 101.2 (CH, C-10), 40.2 (CH₂, C-7), 17.5 (CH₃, C-15), 9.4 (CH₃, C-14)。该化合物的数据与文献^[3]报道的一致, 故化合物 4 鉴定为毛壳素 J。

化合物 5: 浅黄色粉末; ESI-MS m/z 281.1 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₅H₁₄O₄; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 7.41 (1H, s, H-6), 6.14 (2H, s, H-3, H-9), 5.36 (1H, t, 13-OH), 4.40 (2H, dd, $J = 5.5, 1.3$, H-13), 2.60 (1H, s, H-1a), 2.55 (1H, overlap, H-1b), 2.21 (3H, d, $J = 1.29, 1.26$, H-15), 1.26 (3H, s, H-14); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 196.4 (C, C-2), 169.6 (-OC=O, C-12), 151.9 (C, C-4), 150.8 (C, C-5), 145.6 (C, C-8), 142.2 (C, C-7), 128.5 (CH, C-3), 120.3 (C, C-11), 117.2 (CH, C-6), 116.4 (CH, C-9), 53.8 (CH₂, C-13), 48.2 (CH₂, C-1), 42.8 (C, C-10), 27.7 (CH₃, C-13), 19.6 (CH₃, C-15)。该化合物的数据与文献^[5]报道的一致, 故化合物 5 鉴定为 2-one-13-

hydroxy-3,5,8,7(11)-eudesmatetraen-12,8-olide。

化合物 **6**: 浅黄色粉末; ESI-MS m/z 146.1 [M+H]⁺, 分子式 C₉H₇NO; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 12.15 (1H, s, -NH), 9.93 (1H, s, H-10), 8.29 (1H, s, H-2), 8.09 (1H, dd, *J* = 7.21, 1.17, H-4), 7.52 (1H, d, *J* = 7.76, H-7), 7.25 (2H, m, H-5, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 185.2 (C, C-10), 138.6 (C, C-2), 137.1 (CH, C-8), 124.2 (C, C-9), 123.6 (CH, C-4), 122.3 (CH, C-5), 120.9 (CH, C-6), 118.2 (C, C-3), 112.5 (CH, C-7)。该化合物的数据与文献^[6]报道的一致, 故化合物 **6** 鉴定为 1*H*-吡啶-3-甲醛。

化合物 **7**: 浅黄色粉末; ESI-MS m/z 523.4 [2M+Na]⁺, 分子式 C₁₅H₂₂O₃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 4.72 (2H, overlap, H-11), 3.27 (2H, overlap, H-15), 2.75 (1H, m, H-1), 2.20~2.35 (2H, m, H-4), 2.00~2.12 (2H, m, H-6, H-7), 1.18~1.70 (6H, overlap, H-5, H-8, H-10), 1.08 (1H, s, H-14), 0.89 (3H, d, *J* = 6.99, H-13); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 175.4 (C, C-12), 166.1 (C, C-2), 126.3 (C, C-3), 70.9 (CH₂, C-11), 70.3 (CH₂, C-15), 48.5 (CH, C-7), 41.9 (C, C-9), 40.8 (CH₂, C-8), 39.2 (CH₂, C-1), 39.2 (CH₂, C-10), 33.7 (CH₂, C-5), 32.5 (CH, C-6), 27.3 (CH₃, C-14), 20.0 (CH₂, C-4), 12.0 (CH₃, C-13)。该化合物的数据与文献^[7]报道的一致, 故化合物 **7** 鉴定为 *irpexolaceus* B。

化合物 **8**: 黄色膏状; ESI-MS m/z 265.1 [M+H]⁺, 分子式 C₁₅H₂₀O₄; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 4.62 (1H, d, *J* = 2.12, H-4), 4.58 (1H, d, *J* = 18.0, H-11a), 4.36 (1H, d, *J* = 18.0, H-11b), 3.53 (1H, overlap, H-10), 2.54 (1H, m, H-7), 1.71~1.76 (2H, overlap, H-5a, H-6), 1.67~1.70 (1H, overlap, H-5b), 1.54~1.63 (2H, overlap, H-8), 1.15 (3H, s, H-15), 1.06 (3H, s, H-14), 0.89 (3H, d, *J* = 6.5, H-13); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 173.2 (C, C-12), 156.6 (C, C-2), 128.9 (C, C-3), 76.7 (CH, C-10), 69.0 (CH₂, C-11), 67.6 (C, C-1), 64.5 (CH, C-4), 47.3 (CH, C-7), 42.8 (CH₂, C-8), 38.0 (C, C-9), 38.0 (CH₂, C-5), 28.9 (CH, C-6), 26.6 (CH₃, C-15), 25.3 (CH₃, C-14), 19.5 (CH₃, C-13)。该化合物的数据与文献^[8]报道的一致, 故化合物 **8** 鉴定为 *irlactin* L。

化合物 **9**: 浅黄色固体; ESI-MS m/z 512.5 [M+H]⁺, 分子式 C₂₉H₃₇NO₇; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 8.47 (1H, s, -NH), 7.31 (2H, t, *J* = 7.3, H-3', H-5'), 7.24 (1H, t, H-4'), 7.15 (2H, d, *J* = 6.7, H-2', H-6'), 6.46 (1H, d, *J* = 11.8, H-20), 5.92 (2H, m, H-13, H-19), 5.19 (1H, s, H-4), 5.07 (1H, ddd, *J* = 15.0, 10.6, 3.8, H-14), 4.75 (1H, d, *J* = 7.8, H-7), 3.61 (3H, overlap, H-16, H-8, H-3),

2.88 (1H, m, H-15a), 2.59 (2H, m, H-10a, H-10b), 2.38 (1H, m, H-15b), 1.52 (3H, s, H-24), 1.38 (3H, s, H-12), 1.20 (3H, s, H-11), 1.00 (3H, d, *J* = 6.8, H-23); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 211.7 (C, C-17), 169.3 (C, C-1), 148.9 (C, C-22), 141.2 (CH, C-20), 137.2 (C, C-1'), 133.3 (C, C-6), 130.6 (CH, C-14), 129.6 (CH, C-13), 129.5 (CH, C-2', C-6'), 128.5 (CH, C-3', C-5'), 126.7 (CH, C-4'), 124.2 (C, C-5), 121.3 (CH, C-19), 87.0 (C, C-9), 76.8 (C, C-18), 69.5 (CH, C-7), 58.0 (CH, C-3), 52.1 (CH, C-8), 48.7 (CH, C-4), 46.5 (CH₂, C-10), 43.0 (CH, C-16), 40.1 (CH₂, C-15), 25.0 (CH₃, C-25), 20.2 (CH₃, C-24), 17.2 (CH₃, C-11), 14.5 (CH₃, C-12)。该化合物的数据与文献^[9]报道的一致, 故化合物 **9** 鉴定为细胞松弛素 K。

化合物 **10**: 浅灰色固体 ESI-MS m/z 591.4 [M+Na]⁺, 分子式 C₃₃H₄₄O₈; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 7.41 (1H, d, *J* = 10.0, H-1), 5.76 (1H, d, *J* = 10.0, H-16), 5.64 (1H, d, *J* = 8.2, H-2), 5.10 (1H, t, *J* = 7.2, H-24), 5.04 (1H, s, H-6), 2.73 (1H, m, H-4), 2.62 (1H, d, *J* = 11.3, H-9), 2.22~2.47 (5H, overlap, H-22, H-15b, H-12b, H-5), 2.14 (2H, overlap, H-23), 2.07 (3H, s, 6-OCOCH₃), 1.98 (1H, m, H-11b), 1.92 (1H, s, H-15a), 1.88 (3H, s, 16-OCOCH₃), 1.73 (1H, m, H-12a), 1.64 (3H, m, H-27), 1.59 (1H, s, H-11a), 1.57 (3H, s, H-26), 1.38 (3H, s, H-28), 1.07~1.13 (6H, overlap, H-29, H-19), 0.8 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 209.3 (C, C-7), 201.0 (C, C-3), 171.1 (C, C-21), 169.8 (C, C-32), 169.2 (C, C-30), 158.5 (CH, C-1), 144.3 (C, C-17), 131.7 (C, C-25), 131.1 (C, C-20), 126.9 (CH, C-2), 123.3 (CH, C-24), 73.1 (C, C-6), 73.1 (6-CH₃, C-16), 52.3 (C, C-8), 48.0 (CH, C-5), 46.1 (CH, C-13), 45.6 (C, C-14), 41.2 (CH, C-9), 40.4 (CH₂, C-15), 40.1 (CH, C-4), 37.7 (C, C-10), 28.3 (CH₂, C-22), 28.0 (CH₂, C-23), 27.2 (CH₃, C-19), 25.5 (CH₂, C-12), 25.4 (CH₃, C-27), 23.2 (CH₂, C-11), 20.5 (CH₃, C-31), 20.4 (CH₃, C-33), 17.7 (CH₃, C-29), 17.7 (CH₃, C-18), 17.6 (CH₃, C-26), 12.3 (CH₃, C-28)。该化合物的数据与文献^[10]报道的一致, 故化合物 **10** 鉴定为烟曲霉酸。

4 抗肿瘤活性测试

本文使用 CCK-8 法检测化合物对肿瘤细胞的抑制活性。将处于对数生长期的肿瘤细胞及人正常肝细胞按每孔 9 000 个接种于 96 孔板中, 孵育箱中孵育 24 h, 去除旧培养基后加入 50 μmol·L⁻¹ 的化合物稀释液, 孵育 48 h 后弃去培养基, 加入含 10% CCK-8 增强型溶液的培养基后孵育 3.5 h, 检测细胞在 450 nm 吸光

度并计算抑制率, 化合物 **1**~**10** 均进行 3 组平行实验, 阳性对照为苏尼替尼和多柔比星。若初筛抑制率高于 50%, 则进行 IC₅₀ 实验。IC₅₀ 实验根据半对数稀释法, 将实验方案浓度配置为 0、0.625、1.25、2.5、5、10、20、30、40、50 μmol·L⁻¹, 实验步骤与初筛一致。

作者贡献: 伍荣香是本文第一作者, 负责实验设计与论文的写作; 郭杰兰和黄桦负责化合物分离纯化; 廖婧婧和郝祎负责样本的采集和前处理; 孔凡栋负责实验指导及结构解析的指导; 周丽曼是本文的通讯作者, 负责实验设计及把关, 提供本文思路, 参与稿件修改等工作; 张朝军同为本文的通讯作者, 负责抗肿瘤活性筛选的指导。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Sung H, Ferla J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209-249.
- [2] Zhou LM, Hao Y, Meng JX, et al. One new glycoside naphthopyranone from the Yiling cave-derived *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 3076-3081.
- [3] Zhang W, Liu D, Wen Z, et al. Chemical investigation of metabolites produced by a deep-sea-derived fungus *Penicillium* sp. [J]. *Chem Nat Compd*, 2023, 59: 193-196.
- [4] Chen QW, Tian Y, Chen HW, et al. Nitrogenous chemical constituents of Weiceng [J]. *Milit Med Sci (军事医学)*, 2014, 38: 62-66.
- [5] Wang YZ, Wang Y, Wu AA, et al. New 12, 8-eudesmanolides from *Eutypella* sp. 1-15 [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017, 70: 1029-1032.
- [6] Zhou HF, Jian RJ, Kang J, et al. Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 12717-12721.
- [7] Luo HZ, Jiang H, Sun B, et al. Sesquiterpenoids and furan derivatives from the *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. schulz endophytic fungus *Irpex acteus* OV38 [J]. *Phytochemistry*, 2022, 194: 112996.
- [8] Ding JH, Li ZH, Feng T, et al. Two new sesquiterpenes from cultures of the fungus *Irpex lacteus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2021, 23: 348-352.
- [9] Liu R, Gu Q, Zhu W, et al. 10-Phenyl-[12]-cytochalasins Z7, Z8, and Z9 from the marine-derived fungus *Spicaria elegans* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 871-875.
- [10] Ratnaweera PB, Williams DE, de Silva ED, et al. Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka [J]. *Mycology*, 2014, 5: 23-28.