

白茅内生菌 *Chaetomium globosum* WQ 产生的一个新细胞松弛素化合物

夏文静^{1,2}, 曹兴琴^{1,2}, 刘 琴³, 王莎莎^{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. 江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007)

摘要: 白茅内生菌 *Chaetomium globosum* WQ 固体发酵能产生丰富的细胞松弛素化合物。在前期实验基础上, 以 ¹H NMR 谱和 TLC 为指导, 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 *C. globosum* WQ 固体发酵产物乙酸乙酯相浸膏中分离得到 1 个新细胞松弛素化合物, 其结构经高分辨质谱、一维和二维核磁共振谱等波谱技术鉴定为 20-iso-chaetoglobosin E (1)。

关键词: 白茅; 内生菌; *Chaetomium globosum*; 次生代谢产物; 20-iso-chaetoglobosin E; 细胞松弛素化合物
中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-0967-04

A new cytochalasan compound from endophyte *Chaetomium globosum* WQ in *Imperata cylindrical*

XIA Wen-jing^{1,2}, CAO Xing-qin^{1,2}, LIU Qin³, WANG Sha-sha^{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. Jiangsu Lixiahe Institute of Agricultural Science, Yangzhou 225007, China)

Abstract: *Chaetomium globosum* WQ, an endophyte derived from *Imperata cylindrical*, can produce abundant cytochalasan compounds through solid state fermentation. Based on previous research and guided by ¹H NMR spectrum and TLC, a new cytochalasan compound was isolated from the ethyl acetate extract of a solid culture of *C. globosum* WQ using silica gel column chromatography, gel filtration over Sephadex LH-20 and HPLC. The new compound was characterized as 20-iso-chaetoglobosin E (1) by a combination of spectroscopic (HR-MS, 1D and 2D NMR) analyses.

Key words: *Imperata cylindrical*; endophyte; *Chaetomium globosum*; secondary metabolites; 20-iso-chaetoglobosin E; cytochalasan compound

球毛壳菌 *Chaetomium globosum* 是一类重要的资源微生物, 其广泛分布于空气、土壤和动植物中。 *C. globosum* 能产生多种结构类型的新活性化合物, 如: 从

海鱼 *Mugil cephalus* 共生菌 *C. globosum* OUPS-T106B-6 发酵产物中分离得到的具有显著选择性细胞毒活性的含氯 azaphilone 类化合物 chaetomugilins A-F^[1,2]; 植物内生菌 *C. globosum* IFB-E019 发酵产生的新骨架 azaphilone 二聚体化合物 chaetoglobins A 对人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人结肠腺癌细胞株 SW1116 具有较好的体外抗肿瘤活性^[3]; 从 *Christmas cactus* 根际 *C. globosum* 中分离得到的具有显著细胞毒活性的新 dihydroxanthone 衍生物 globosuxanthone A, 其能诱导人肺癌细胞株 NCI-H460 和人前列腺癌细胞株 PC-3M 细胞周期

收稿日期: 2019-12-03; 修回日期: 2020-02-02.

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (17KJA350005); 江苏省重点研究计划 (现代农业) 项目 (BE2017339); 扬州市重点研发计划项目 (YZ2017043, YZ2018063); 扬州大学科技创新培育基金项目 (2015CXJ074); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX18_0807).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0966

阻滞,还能促进 NCI-H460 细胞凋亡^[4]; 动物共生菌 *C. globosum* 产生的对多株人肿瘤细胞株具有较强细胞毒活性的新骨架细胞松弛素类化合物 armochaeglobine B^[5]; 以及 *C. globosum* 和 *A. flavipes* 共培养产生的具有 2*H*-1,4-thiazine 结构的 merocytochalasan 化合物 cytothiazine B, 其能抑制人白血病细胞株 NB4 和 HL-60 增殖并诱导细胞凋亡^[6]等。

细胞松弛素类化合物是 *C. globosum* 产生的一类特征次生代谢产物, 因丰富的结构与多样的生物活性而备受关注^[7,8]。 *Chaetomium globosum* WQ 是从传统药用植物白茅 (*Imperata cylindrical*) 中分离获得的一株内生真菌, 前期实验已从其固体发酵产物中分离得到 14 个化合物, 包括 11 个细胞松弛素类化合物^[9,10]。 以 ¹H NMR 谱和 TLC 为指导, 进一步对 *C. globosum* WQ 固体发酵产物乙酸乙酯相化学成分进行分离纯化, 结果又分离得到 1 个新细胞松弛素化合物 20-*iso*-chaetoglobosin E (**1**) (图 1)。



Figure 1 Structure of 20-*iso*-chaetoglobosin E (**1**)

结果与讨论

化合物 **1** 为白色粉末。其正源 HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 m/z 553.267 7 [M+Na]⁺, 说明其分子量为 530, 分子式为 C₃₂H₃₈N₂O₅ (C₃₂H₃₈N₂O₅Na, 计算值: 553.267 3), 不饱和度为 15。化合物 **1** 的 ¹H NMR 谱显示吡啶环的特征氢信号, 即: δ_{H-4} 7.52 (d, $J = 7.8$ Hz)、 δ_{H-5} 7.15 (t, $J = 7.8$ Hz)、 δ_{H-6} 7.22 (t, $J = 7.8$ Hz)、 δ_{H-7} 7.39 (d, $J = 7.8$ Hz) 和 δ_{H-2} 7.00 (s)。进一步分析其 ¹H 和 ¹³C NMR 谱, 可推测化合物 **1** 可能是 10-吡啶基-细胞松弛素化合物。化合物 **1** 的分子式与细胞松弛素化合物 chaetoglobosin E^[9,11]、penochalasin H^[12] 和 chaetoglobosin O^[13] 相同, 且与它们具有相同的碳谱特征。仔细比较化合物 **1** 与 penochalasin H^[12] 和 chaetoglobosin O^[13] 的 ¹³C NMR 谱可发现, 这 3 个化合物从 C-1 到 C-16 以及 C-1' 到 C-7' 的化学位移基本相同, 但化合物 **1** 从 C-17 到 C-21 的化学位移与 penochalasin H 和 Chaetoglobosin O 存在明显差异, 提示化合物 **1** 与 penochalasin H^[12] 和 chaetoglobosin O^[13] 可能仅存在 C-19 和 C-20 位的结构差异, 即其 C-19 位是羰基、C-20 位连接羟基。

再与 chaetoglobosin E^[9] 相比, 化合物 **1** 的 C-20 向低场移动 ($\Delta\delta = 2.6$ ppm)、C-21 向高场移动 ($\Delta\delta = -5.8$ ppm), 表明该化合物可能是 chaetoglobosin E 的 C-20 位异构体。随后进行的一系列二维核磁共振谱 [HSQC、HMBC、¹H-¹H COSY (图 2) 和 NOESY (图 3)] 分析证实了这个结构推测。

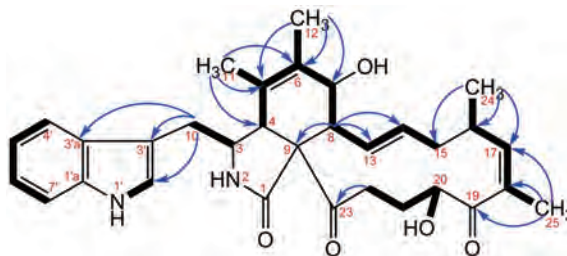


Figure 2 Key ¹H-¹H COSY (—) and HMBC (→) correlations of 20-*iso*-chaetoglobosin E (**1**)

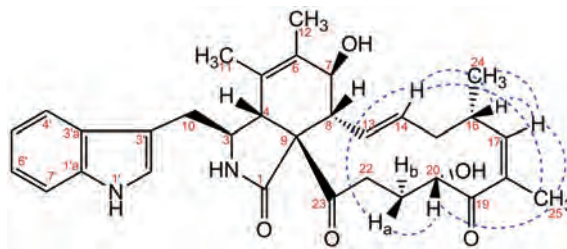


Figure 3 Key NOESY (····) correlations of 20-*iso*-chaetoglobosin E (**1**)

化合物 **1** 的 ¹H-¹H COSY 谱显示 H-8 到 H-15、H-24 到 H-25、H-22 与 20-OH 的相关, 同时, HMBC 谱中存在 H-8 与 C-9、C-13 和 C-14 的相关; H-24 与 C-15、C-16 和 C-17 的相关; H-25 与 C-17、C-18 和 C-19 的相关; 以及 H-22 与 C-23 的相关, 说明结构中存在十三元碳环。从 H-4 到 H-8 的 COSY 相关, 以及 H-11 与 C-4、C-5 和 C-6 的 HMBC 相关, H-12 与 C-5、C-6 和 C-7 的 HMBC 相关, 说明化合物 **1** 结构中存在六元环 (C4-C5-C6-C7-C8-C9)。此外, ¹H-¹H COSY 谱中 1'-NH 与 H-2'、H-3 与 H-10、H-4' 到 H-7' 的相关, 以及 HMBC 谱中 H-10 与 C-2'、C-3' 和 C-3'a 的相关, 证实吡啶基通过 C-10 与 C-3 相连。综上可确定化合物 **1** 的平面结构如图 1 所示。在此基础上, 进一步利用 NOESY 谱确定化合物 **1** 的 C-20 位的立体构型。Chaetoglobosin E 的 NOESY 谱可观察到 H-17 与 H-16、H-17 与 H-20、H-17 与 H-21a、H-17 与 H-22a、H-20 与 H-21ab、H-20 与 H-22ab 的 NOE 相关, 表明其 H-20 与 H-17 在异侧, H-20 在 α 位^[9,12]。而化合物 **1** 的 NOESY 谱中存在 H-17 与 H-16、H-17 与 H-25、H-20 与 H-21ab 存在 NOE 相关, 说明 H-20、H-16、H-17 与 H-25 在同侧, H-20 在 β 位, C-20 位构型

为 *S* 型。10-吡啶基-细胞松弛素化合物一般具有相同的色氨酸合成途径^[11,14], 且化合物 **1** 与 chaetoglobosin E、penochalasin H 和 Chaetoglobosin O 具有基本相同的 C1 到 C16 化学位移, 因此, 化合物 **1** 其余手性中心的构型确定为 3*S*,4*R*,7*S*,8*R*,9*R*,16*S*。最终化合物 **1** 被鉴定为 20-*iso*-chaetoglobosin E (**1**), 该结构尚未见文献报道, 其 ¹H 和 ¹³C NMR 数据归属列于表 1。

Table 1 ¹H and ¹³C NMR data of 20-*iso*-chaetoglobosin E (**1**) in CDCl₃ (*J* in Hz)

Position	δ_c	δ_H
1	174.2	
2-NH		5.70 (s)
3	58.2	3.56 (t, 6.6)
4	49.4	3.07 (s)
5	126.2	
6	132.1	
7	68.9	3.93 (d, 9.6)
8	52.5	2.21 (m)
9	61.9	
10	32.8	2.83 (dd, 14.4, 6.6) 2.75 (dd, 14.4, 7.8)
11	17.5	1.54 (s)
12	14.0	1.69 (s)
13	128.9	6.04 (dd, 15.6, 10.2)
14	136.1	5.34 (m)
15	41.0	2.10 (m) 1.98 (m)
16	34.5	2.71 (m)
17	147.0	5.56 (d, 10.8)
18	132.9	
19	206.1	
20	72.7	4.40 (d, 3.0)
21	27.6	2.18 (m) 1.63 (m)
22	35.8	3.31 (m) 2.18 (m)
23	208.2	
24	22.4	1.08 (d, 6.6)
25	20.4	1.96 (s)
1'a	136.3	
1'-NH		8.10 (s)
2'	123.2	7.00 (s)
3'	111.0	
3'a	127.1	
4'	118.6	7.52 (d, 7.8)
5'	119.9	7.15 (t, 7.8)
6'	122.5	7.22 (t, 7.8)
7'	111.4	7.39 (d, 7.8)
20-OH		3.76 (br s)

实验部分

Bruker AVANCE 600 核磁共振波谱仪和 Bruker UHR-TOF-Maxis 超高分辨飞行时间质谱仪 (德国 Bruker 公司); Jasco J-810 圆二色光谱仪 (日本分光公司);

Hitachi Primaide 高效液相色谱仪和 Hitachi LaChrom C-18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 液相色谱柱 (日本日立公司); 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); 色谱甲醇 (美国 TEDIA 公司); 其他试剂均为分析纯。

菌株 WQ 是从药用植物白茅 *Imperata cylindrical* 中分离得到的一株内生真菌, 南京大学宋勇春副教授根据形态学特征鉴定其为球毛壳菌 *Chaetomium globosum*。该菌株现存放于南京大学功能生物分子研究所。C. *globosum* WQ 采用固体发酵法^[15]。固体发酵产物粉碎阴干后, 用氯仿/甲醇 (1:1) 混合溶剂浸提 3 次, 减压去除溶剂得粗浸膏, 该浸膏水悬液经乙酸乙酯萃取得乙酸乙酯相浸膏 26 g。

C. *globosum* WQ 固体发酵产物乙酸乙酯相浸膏经硅胶柱色谱分离, CHCl₃:CH₃OH 梯度洗脱 (100:1→0:100) 得到 7 个组分 Fr.1~Fr.7 (100:0, 2.6 g; 100:1, 3.82 g; 100:2, 1.43 g; 100:4, 5.2 g; 100:8, 8.2 g; 100:16, 1.44 g; 0:100, 2.0 g)。其中, Fr.2 (3.82 g) 先后经硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱进一步分离得到 Fr.2-2-3-2, Fr.2-2-3-2 再经 HPLC 纯化 (MeOH:H₂O *v/v* 52:48, 0.75 mL·min⁻¹) 得到化合物 **1** (0.63 mg)。

20-*iso*-chaetoglobosin E (**1**): 白色粉末, 分子式 C₃₂H₃₈N₂O₅。HR-ESI-MS: *m/z* 553.267 7 [M+Na]⁺ (C₃₂H₃₈N₂O₅Na, 计算值: 553.267 3)。UV (CH₃OH): λ_{max} (logε) = 221 (4.51) nm; CD (CH₃OH): λ_{max} (Δε) = 205 (15.30), 242 (-4.23), 284 (1.05), 303 (0.31), 318 (1.08) nm。¹H 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

References

- [1] Yamada T, Doi M, Shigeta H, et al. Absolute stereostructures of cytotoxic metabolites, chaetomugilins A-C, produced by a *Chaetomium* species separated from a marine fish [J]. Tetrahedron Lett, 2008, 49: 4192-4195.
- [2] Yasuhide M, Yamada T, Numata A, et al. Chaetomugilins, new selectively cytotoxic metabolites, produced by a marine fish-derived *Chaetomium* species [J]. J Antibiot, 2008, 61: 615-622.
- [3] Ge HM, Zhang WY, Ding G, et al. Chaetoglobosins A and B, two unusual alkaloids from endophytic *Chaetomium globosum* culture [J]. Chem Commun, 2008, (45): 5978-5980.
- [4] Wijeratne EMK, Turbyville TJ, Fritz A, et al. A new dihydroxanthone from a plant-associated strain of the fungus *Chaetomium globosum* demonstrates anticancer activity [J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14: 7917-7923.
- [5] Chen C, Zhu H, Li XN, et al. Armochaeglobines A and B, two

- new indole-based alkaloids from the arthropod-derived fungus *Chaetomium globosum* [J]. *Org Lett*, 2015, 17: 644-647.
- [6] Wang WJ, Zeng FR, Bie Q, et al. Cytochathiazines A-C: three merocytochalasans with a 2*H*-1,4-thiazine functionality from coculture of *Chaetomium globosum* and *Aspergillus flavipes* [J]. *Org Lett*, 2018, 20: 6817-6821.
- [7] Scherlach K, Boettger D, Remme N, et al. The chemistry and biology of cytochalasans [J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 869-886.
- [8] Elizabeth S. The biosynthesis of cytochalasans [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34: 1252-1263.
- [9] Shen L, Zhu L, Wei ZQ, et al. Chemical constituents from endophyte *Chaetomium globosum* in *Imperata cylindrical* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40: 4645-4649.
- [10] Chen LM, Zhu L, Liu Q, et al. Research of cytochalasan compounds from endophyte *Chaetomium globosum* WQ in *Imperata cylindrical* [J]. *J Yangzhou Univ (Agric Life Sci Ed)* (扬州大学学报 农业与生命科学版), 2019, 40: 101-106.
- [11] Sekita S, Yoshihira K, Natori S. Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13] cytochalasans from *Chaetomium* spp. IV. ¹³C-nuclear magnetic resonance spectra and their application to a biosynthetic study [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31: 490-498.
- [12] Iwamoto C, Yamada T, Ito Y, et al. Cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium* species separated from a marine alga [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57: 2997-3004.
- [13] Ichihara A, Katayama K, Teshima H, et al. Chaetoglobosin O and other phytotoxic metabolites from *Cylindrocladium floridanum*, a causal fungus of alfalfa black rot disease [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60: 360-361.
- [14] Probst A, Tamm C. Biosynthesis of the cytochalasans. Biosynthetic studies on chaetoglobosin A and 19-*O*-acetylchaetoglobosin A [J]. *Helv Chim Acta*, 1981, 64: 2065-2077.
- [15] Shen L, Jiao RH, Ye YH, et al. Absolute configuration of new cytotoxic and other bioactive trichothecene macrolides [J]. *Chem Eur J*, 2006, 12: 5596-5602.