

·化学·

羊蹄躅内生真菌 *Penicillium* sp. RM 的次生代谢产物
及其肿瘤细胞增殖抑制活性研究王雪¹, 周磊¹, 胡倚航¹, 刘洋², 张雪^{1*}, 刘云宝^{2*}

(1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

[摘要] 对羊蹄躅内生真菌 *Penicillium* sp. RM 的次级代谢产物进行研究, 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、半制备液相色谱等进行分离纯化, 共从 *Penicillium* sp. RM 发酵物的乙酸乙酯部位中分离鉴定出 10 个化合物, 利用 NMR、MS、UV、IR、CD 等现代波谱技术确定了化合物的结构, 分别为 penicidienone A (1)、diversonol (2)、alternariol (3)、alternariol 9-methyl ether (4)、methylated dechloromonilicin (5)、norliquexantona (6)、alternethanoxin A (7)、 α -diversonolic ester (8)、($\pm$)-asperlone A (9)、verruculotoxin (10), 其中化合物 1 是 1 种新的环戊烯酮衍生物。肿瘤细胞增殖抑制活性筛选结果表明化合物 9 对 HepG2、HGC27、U251 细胞具有抑制作用, IC_{50} 分别为 9.7、9.3、8.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

[关键词] 羊蹄躅; 内生真菌; *Penicillium* sp. RM; 次生代谢产物; 环戊烯酮

Secondary metabolites from *Rhododendron molle* endophyte *Penicillium* sp.
RM and their inhibitory effects on tumor cell proliferationWANG Xue¹, ZHOU Lei¹, HU Yi-hang¹, LIU Yang², ZHANG Xue^{1*}, LIU Yun-bao^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

[Abstract] This study investigated the secondary metabolites of the endophytic fungus *Penicillium* sp. RM isolated from the toxic plant *Rhododendron molle*. Ten compounds were isolated and purified from the ethyl acetate extract of the fungal fermentation broth by silica gel column chromatography, gel column chromatography, and semi-preparative HPLC. The structures of these compounds were elucidated by comprehensive spectroscopic analyses, including NMR, MS, UV, IR, and CD. The identified compounds were as follows: penicidienone A (1), diversonol (2), alternariol (3), alternariol 9-methyl ether (4), methylated dechloromonilicin (5), norliquexantona (6), alternethanoxin A (7), α -diversonolic ester (8), ($\pm$)-asperlone A (9), and verruculotoxin (10). Compound 1 was identified as a new cyclopentenone derivative. Compound 9 showed inhibitory activity against the proliferation of HepG2 (IC_{50} = 9.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), HGC27 (IC_{50} = 9.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and U251 (IC_{50} = 8.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) cell lines.

[Key words] *Rhododendron molle*; endophytic fungi; *Penicillium* sp. RM; secondary metabolites; cyclopentenone derivative

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20251009.202

[收稿日期] 2025-05-27

[通信作者] * 刘云宝, 研究员, 主要从事特殊生境微生物中新颖结构活性分子的发现及其形成机制研究, Tel: (010) 83162679, E-mail: liuyunbao@imm.ac.cn; * 张雪, 副教授, 主要从事药用植物内生真菌和根际真菌活性次级代谢产物及作用机制研究、中药和天然药物活性成分及质量控制研究, Tel: (024) 43520730, E-mail: syzxalice@163.com

[作者简介] 王雪, 硕士研究生, E-mail: 2260203008@qq.com

内生真菌作为与宿主植物互利共生的微生物,可通过合成多样化的次生代谢产物增强宿主生态适应性并调控其毒性,被誉为“天然化工厂”^[1]。来自内生真菌的天然产物在药用先导化合物开发中持续发挥关键作用,引起了广泛关注^[2]。研究发现,有毒药用植物(如雷公藤、乌头、曼陀罗等)的内生真菌能够合成与宿主植物化学成分类似的活性物质,甚至产生新型化合物^[3-5]。近年来,青霉菌属 *Penicillium* sp. 因次生代谢产物的多样性和显著生物活性备受关注。研究表明,该属真菌可合成聚酮类、萜

类、生物碱类等化合物,在抗菌、抗肿瘤及抗炎领域展现潜力^[6-8]。为了继续发掘青霉菌中的新颖结构或活性次生代谢产物,本研究聚焦杜鹃花科有毒植物羊躑躅 *Rhododendron molle* 的内生真菌资源。该植物含木藜芦烷类毒素(如 grayanotoxin),可通过激活钠离子通道引发神经毒性,但其内生真菌的次生代谢产物研究较少^[9-11]。基于此,本研究从新鲜羊躑躅叶片内生真菌 *Penicillium* sp. RM 的乙酸乙酯部位,成功分离鉴定了 10 个化合物,其中化合物 1 为新的环戊烯酮类化合物(图 1)。

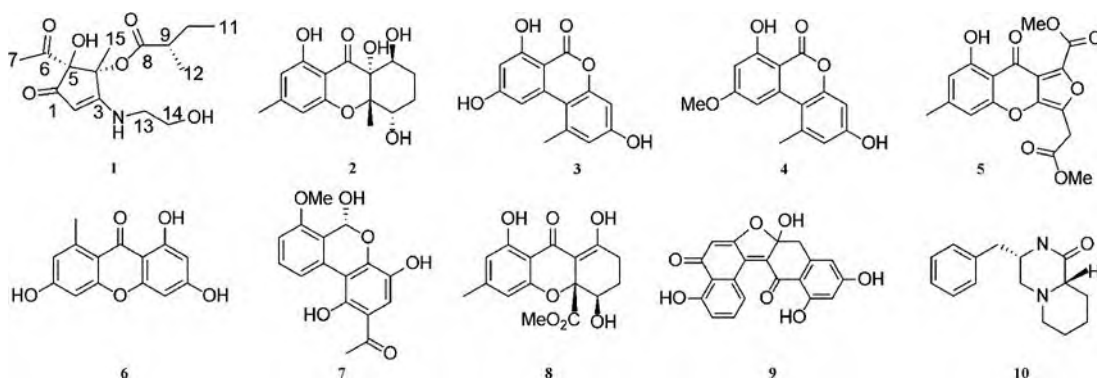


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-10

1 材料

AL104 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];EYELA 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);MPC-301Z 隔膜泵(南京科尔仪器设备有限公司);Bruker AVANCE NEO 700 MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司);Bruker NMR 800 MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司);Thermo Q Exactive Focus LC/MS(美国赛默飞世尔科技公司);BrukerD8 Quest diffractometer (Mo $K\alpha$, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$)/(Cu $K\alpha$, $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$)(北京厄恩斯特检测技术有限公司);CV 600 冷冻离心浓缩仪(北京吉艾姆科技有限公司);Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);LC3050N 型高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司);YMC-Pack ODS-A (4.6 mm×250 mm, 5 μm , 12 nm)(日本 YMC 公司);YMC-Pack ODS-A (10 mm×250 mm, 5 μm , 12 nm)(日本 YMC 公司);硅胶(100~200、200~300 目)和薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工集团公司);HSGF₂₅₄ 制备板(烟台市化学工业研究所);显色剂(10%浓硫酸-

乙醇溶液);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);色谱甲醇、色谱乙腈(北京伊诺凯科技有限公司),其他所用试剂和溶剂若无特别说明均购自北京通广精细化工有限公司,级别为分析纯或色谱纯,未经处理直接使用。

菌株是从新鲜羊躑躅叶片中分离纯化所得到的一株内生真菌,由北京新时代众和科技有限公司根据 ITS 序列鉴定为 *Penicillium* sp. RM。菌种号为 PV563029,该菌株现保存于中国医学科学院北京协和医学院药物研究所刘云宝课题组。

2 方法

2.1 菌株发酵 无菌条件下,将斜面保存的 *Penicillium* sp. RM 接种到新的 PDA 固体平板上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养至长出菌落。将带有菌落的 PDA 平板在无菌条件下划成 1 cm×1 cm 的方块,加入到 140 瓶灭菌后的大米培养基中(每瓶加入 2~3 块),大米培养基(500 mL 锥形瓶,每瓶中放入 250 g 大米和 200 mL 自来水;120 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 30 min),室温,湿度为 40%~90%,自然光照,静置发酵 28 d。

2.2 提取分离 在发酵完成的锥形瓶中加入适量乙醇,多次超声提取,每次 30 min,直至提取液接近无色,合并提取液减压浓缩得到浸膏 904.9 g。所得浸膏用水分散后直接用乙酸乙酯进行萃取,得到乙酸乙酯部位 207.5 g,水部位 655.4 g。采用硅胶柱色谱对 207.5 g 乙酸乙酯部位进行分离,用二氯甲烷-甲醇梯度洗脱(1:0、500:1、250:1、100:1、75:1、50:1、25:1、15:1、10:1、5:1、2:1、1:1、0:1),每 1 000 mL 为 1 个组分,利用薄层色谱检识、合并,共得 8 个组分(Fr. 1~Fr. 8)。Fr. 3(14.5 g)经 ODS 中压柱色谱(甲醇-水 0~100%)梯度洗脱,利用 TLC 和高效液相色谱仪共检识,得到 6 个亚组分(C1~C6)。C3(2 g)使用二氯甲烷-甲醇溶剂系统进行硅胶柱色谱分离,利用薄层色谱检识、合并,共得 6 个组分(K1~K6),K1(60 mg)经制备液相 C₁₈ 半制备柱(YMC-Pack ODS-A, 10 mm×250 mm, 5 μm, 12 nm, 3 mL·min⁻¹, 以下分离流程中若无特殊说明均为该型号和流速),通过流动相甲醇-水(40:60)洗脱得到化合物 **1**(2.0 mg, *t_R* = 22.2 min)。K2(200.2 mg)经半制备液相,通过流动相乙腈-水(45:55)洗脱得到化合物 **2**(6.8 mg, *t_R* = 8.3 min)。

Fr. 4(15.1 g)经 ODS 中压柱色谱(甲醇-水 0~100%)梯度洗脱,利用 TLC 和高效液相色谱仪共检识,得到 9 个亚组分(D1~D9)。D1(105.4 mg)经半制备液相(甲醇-水 70:30)得到化合物 **4**(6.6 mg, *t_R* = 29.9 min)。D2(602.4 mg)经半制备液相(乙腈-水 45:55)得到化合物 **10**(34.5 mg, *t_R* = 17.8 min)。D3(435 mg)经半制备液相(乙腈-水 35:65, 0.1%三氟乙酸)得到化合物 **8**(26.5 mg, *t_R* = 15.2 min)。D4(506 mg)经半制备液相(乙腈-水 35:65, 0.1%三氟乙酸)得到化合物 **7**(9.1 mg, *t_R* = 22.5 min)。D5(230 mg)经半制备液相(乙腈-水 45:55)得到化合物 **5**(10.3 mg, *t_R* = 32.3 min)。D7(103.2 mg)经半制备液相(甲醇-水 75:25)得到化合物 **9**(3.2 mg, *t_R* = 9.1 min)。D9(400 mg)经半制备液相(乙腈-水 35:65)得到化合物 **3**(9.9 mg, *t_R* = 23.9 min),通过乙腈-水(45:55)洗脱得到化合物 **6**(2.1 mg, *t_R* = 16.1 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末; [α]_D²⁰ +45.9° (c 0.27, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* 314.159 8 [M+H]⁺ (计算值 314.159 9), 结合 NMR 数据, 确定化合物 **1** 的分

子式为 C₁₅H₂₃NO₆, 不饱和度为 5。¹H-NMR 数据(表 1)显示化合物 **1** 具有 4 个甲基信号[δ_{H} 2.24 (3H, s, H-7), 0.92 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-11), 1.07 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-12), 1.61 (3H, s, H-15)]; 1 个烯氢信号[δ_{H} 5.09 (1H, s, H-2)]。¹³C-NMR 数据(表 1)和 HSQC 数据显示化合物 **1** 具有 15 个碳信号, 包括 6 个季碳信号[δ_{C} 194.4 (C-1), 178.3 (C-3), 87.5 (C-4), 92.7 (C-5), 207.3 (C-6), 177.9 (C-8)]; 2 个 CH 信号[δ_{C} 94.8 (C-2), 42.2 (C-9)]; 3 个 CH₂ 信号[δ_{C} 27.4 (C-10), 48.1 (C-13), 60.6 (C-14)]; 4 个 CH₃ 信号[δ_{C} 26.6 (C-7), 11.8 (C-11), 16.8 (C-12), 23.0 (C-15)]。¹H-¹H COSY 和 HSQC 图谱显示化合物 **1** 具有 2 个自旋偶合系统: CH₂-CH₂ 和 CH₃-CH-CH₂-CH₃ (图 2)。在 HMBC 图谱中, H-2 与 C-1/3/4/5 相关, H-7 与 C-5/6 相关, H-15 与 C-3/4/5 相关, 表明化合物 **1** 存在 α,β 不饱和环戊酮结构, 并且 C-15 位甲基与乙酰基分别连接在 C-4 与 C-5 位上。H-13 与 C-3 的 HMBC 相关信号说明含氮侧链接在 C-3 位。生源途径分析提示化合物 **1** 可能由化合物 phomaligin A 转化而成(图 3)^[12-14]。因此, 异戊酸应与在 C-4 位羟基形成酯键。综上, 确定化合物 **1** 的平面结构(图 1)。

表 1 化合物 **1** 的¹H-NMR(700 MHz)和¹³C-NMR(175 MHz)数据(CD₃OD)

Table 1 ¹H-NMR (700 MHz) and ¹³C-NMR (175 MHz) data of compound **1** (CD₃OD)

No.	δ_{C}	δ_{H}
1	194.4, C	—
2	94.8, CH	5.09 (1H, s)
3	178.3, C	—
4	87.5, C	—
5	92.7, C	—
6	207.3, C	—
7	26.6, CH ₃	2.24 (3H, s)
8	177.9, C	—
9	42.2, CH	2.40 (1H, m)
10	27.4, CH ₂	1.66 (1H, m); 1.45 (1H, m)
11	11.8, CH ₃	0.92 (3H, t, 7.0 Hz)
12	16.8, CH ₃	1.07 (3H, d, 7.0 Hz)
13	48.1, CH ₂	3.40 (2H, m)
14	60.6, CH ₂	3.74 (2H, t, 5.7 Hz)
15	23.0, CH ₃	1.61 (3H, s)

为确定化合物 **1** 的相对构型, 对其进行 NOESY 实验。在 NOESY 图谱中(CD₃OD), 可观测到 H-7

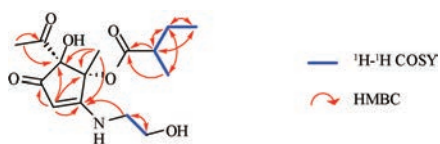
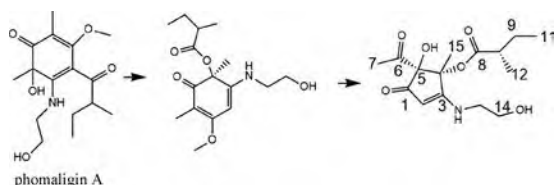
图 2 化合物 1 的关键¹H-¹H COSY 和 HMBC 相关信号Fig. 2 Key ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compound 1

图 3 化合物 1 的生源途径分析

Fig. 3 Biosynthetic pathway analysis of compound 1

与 H-12 的相关信号。在 DMSO-*d*₆ 中可以观测到 5-OH 与 H-7/H-15 相关。以上数据推测 C-5 位乙酰基与 C-4 位异戊酰氧基位于同侧, 5-OH 与 15-CH₃ 在环的另一侧。这样化合物 1 则可能具有 4 种绝对构型, 分别是 4*R*, 5*R*, 9*R*, 4*S*, 5*S*, 9*S*, 4*S*, 5*S*, 9*R*, 4*R*, 5*R*, 9*S*, 是 2 对对映异构体。将化合物 1 的 4 种可能的绝对构型的计算 ECD 图谱与实验测得的 ECD 图谱相比对, 发现化合物的绝对构型为 4*R*, 5*R*, 9*S* 时, 其计算 ECD 图谱与实验 ECD 图谱具有高度一致的 Cotton 效应 (图 4), 因此, 其绝对构型为 4*R*, 5*R*, 9*S*。化合物 1 命名为 penicidienone A。

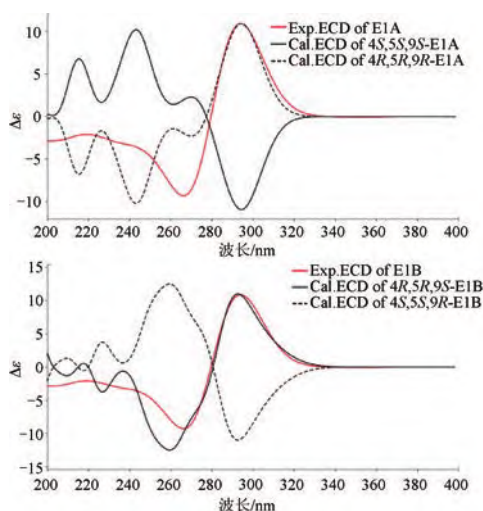


图 4 化合物 1 的实验 ECD 图谱及其计算 ECD 图谱

Fig. 4 Experimental ECD and calculated ECD spectra of compound 1

化合物 2 无色晶体; HR-ESI-MS m/z 295.118 3 $[M + H]^+$ (计算值 295.117 7), 分子式为 C₁₅H₁₈O₆。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 700 MHz) δ_H : 11.32 (1H, s, 1-OH), 6.32 (1H, s, H-2), 6.30 (1H, s, H-4), 4.28 (1H, t, $J = 3.1$ Hz, H-5), 3.99 (1H, dt, $J = 5.3, 2.8$ Hz, H-8), 2.25 (3H, s, H-10), 2.16 (1H, tdd, $J = 14.0, 4.5, 3.0$ Hz, H-6 β), 1.96 (1H, tdd, $J = 14.2, 4.4, 2.4$ Hz, H-7 α), 1.68 (1H, m, H-6 α), 1.46 (1H, m, H-7 β), 1.39 (3H, s, H-11); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 175 MHz) δ_C : 194.3 (C-9), 161.7 (C-1), 158.5 (C-4a), 149.5 (C-3), 109.0 (C-2), 108.7 (C-4), 104.5 (C-9a), 81.2 (C-8a), 75.6 (C-5a), 73.4 (C-8), 66.2 (C-5), 24.9 (C-6), 22.7 (C-7), 21.9 (C-10), 19.5 (C-11)。根据单晶 X 射线衍射数据及以上核磁数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 2 为 diversanol。

化合物 3 淡黄色晶体; HR-ESI-MS m/z 259.060 1 $[M + H]^+$ (计算值 259.060 1), 分子式为 C₁₄H₁₀O₅。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 800 MHz) δ_H : 11.77 (1H, s, 7-OH), 10.90 (1H, s, 3, 9-OH), 10.33 (1H, s, 3, 9-OH), 7.25 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-10), 6.72 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-4), 6.64 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-2), 6.37 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 2.71 (3H, s, H-11); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ_C : 165.5 (C-9), 164.7 (C-6), 164.1 (C-7), 158.4 (C-3), 152.6 (C-4a), 138.3 (C-1), 138.1 (C-10a), 117.5 (C-2), 108.9 (C-10b), 104.3 (C-10), 101.6 (C-4), 100.9 (C-8), 97.4 (C-6a), 25.2 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 3 为 alternariol。

化合物 4 黄色晶体; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 700 MHz) δ_H : 11.83 (1H, s, 7-OH), 10.37 (1H, s, 3-OH), 7.23 (1H, s, H-10), 6.73 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-4), 6.65 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-2), 6.62 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 3.91 (3H, s, 9-OMe), 2.74 (3H, s, H-11); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 175 MHz) δ_C : 166.2 (C-9), 164.7 (C-6), 164.2 (C-7), 158.6 (C-3), 152.6 (C-4a), 138.5 (C-1), 137.8 (C-10a), 117.6 (C-2), 108.8 (C-10b), 103.4 (C-10), 101.6 (C-4), 99.2 (C-8), 98.5 (C-6a), 55.9 (9-OMe), 25 (C-11)。以上数据与

文献报道基本一致^[17],故鉴定化合物 **4** 为 alternariol 9-methyl ether。

化合物 **5** 淡黄色粉末; HR-ESI-MS m/z 347.075 8 $[M+H]^+$ (计算值 347.076 2), 分子式为 $C_{17}H_{14}O_8$ 。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 800 MHz) δ_H : 12.40 (1H, s, 6-OH), 6.81 (1H, s, H-9), 6.65 (1H, s, H-7), 4.20 (2H, s, H-13), 3.91 (3H, s, 1-OMe), 3.69 (3H, s, 14-OMe), 2.38 (3H, s, H-15); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ_C : 177.9 (C-4), 168.1 (C-14), 161.8 (C-6), 156.9 (C-1), 156.1 (C-10), 150.1 (C-8), 141.5 (C-11), 137.9 (C-2), 135.2 (C-12), 116.3 (C-3), 111.7 (C-7), 107.7 (C-9), 106.8 (C-5), 52.5 (14-OMe), 52.3 (1-OMe), 30.7 (C-13), 21.8 (C-15)。以上数据与文献报道基本一致^[18],故鉴定化合物 **5** 为 methylated dechloromonilicin。

化合物 **6** 淡黄色针状晶体; HR-ESI-MS m/z 259.059 4 $[M+H]^+$ (计算值 259.060 1), 分子式为 $C_{14}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 700 MHz) δ_H : 13.40 (1H, s, 1-OH), 10.90 (1H, s, 3-OH), 10.84 (1H, s, 6-OH), 6.66 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-7), 6.64 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-5), 6.27 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-4), 6.12 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 175 MHz) δ_C : 181.4 (C-9), 164.7 (C-3), 163 (C-1), 162.8 (C-6), 158.8 (C-5a), 156.5 (C-4a), 142.8 (C-8), 116.2 (C-7), 110.8 (C-8a), 102.1 (C-9a), 100.5 (C-5), 97.8 (C-2), 93.2 (C-4), 22.9 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[19],故鉴定化合物 **6** 为 norliquexantona。

化合物 **7** 白色粉末; HR-ESI-MS m/z 303.085 6 $[M+H]^+$ (计算值 303.086 4), 分子式为 $C_{16}H_{14}O_6$ 。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 800 MHz) δ_H : 11.44 (1H, s, 1-OH), 9.85 (1H, s, 4-OH), 7.38 (1H, dd, $J=7.9, 1.0$ Hz, H-8), 7.28 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-9), 7.08 (1H, dd, $J=8.1, 1.0$ Hz, H-10), 6.09 (1H, s, H-3, 6), 3.66 (1H, s, 7-OMe), 2.16 (1H, s, H-12); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ_C : 200.1 (C-1), 165.8 (C-7), 161.7 (C-4, 4a), 153.4 (C-6a), 147.4 (C-1), 133.1 (C-9), 128.6 (C-10a), 127.3 (C-2), 119.9 (C-8), 119.7 (C-10), 108.9 (C-10b), 107.5 (C-3, 6), 51.9

(7-OMe), 21.6 (C-12)。以上数据与文献报道基本一致^[20],故鉴定化合物 **7** 为 alternethanoxin A。

化合物 **8** 白色晶体; HR-ESI-MS m/z 321.096 2 $[M+H]^+$ (计算值 321.096 9), 分子式为 $C_{16}H_{16}O_7$ 。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 800 MHz) δ_H : 12.32 (1H, s, 8-OH), 6.87 (1H, dd, $J=1.4, 0.8$ Hz, H-5, 7), 6.64 (1H, dd, $J=1.4, 0.7$ Hz, H-5, 7), 5.45 (1H, s, 1-OH), 5.33 (1H, s, 4-OH), 3.82 (1H, dd, $J=6.9, 2.6$ Hz, H-4), 3.59 (3H, s, 4'-a-OMe), 2.90 (1H, ddd, $J=18.2, 9.1, 5.7$ Hz, H-2 α), 2.70 (1H, dt, $J=18.1, 5.3$ Hz, H-2 β), 2.37 (3H, s, H-6'), 2.04 (1H, dddd, H-3 α), 1.94 (1H, m, H-3 β); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ_C : 180.9 (C-9), 172.9 (C-4'a), 167.4 (C-1), 159.5 (C-8), 155.3 (C-10a), 147.5 (C-6), 117.3 (C-9a), 111.6 (C-7), 107.6 (C-8a), 107.3 (C-5), 74.3 (C-4a), 71.2 (C-4), 51.8 (4'-a-OMe), 25.0 (C-2), 24.1 (C-3), 21.8 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[21],故鉴定化合物 **8** 为 α -diversonolic ester。

化合物 **9** 红色粉末; HR-ESI-MS m/z 365.065 9 $[M+H]^+$ (计算值 365.065 6), 分子式为 $C_{20}H_{12}O_7$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 700 MHz) δ_H : 8.93 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5), 7.57 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-6), 7.12 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.33 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-5'), 6.22 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-7'), 6.02 (1H, s, H-2), 3.55 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-4'), 3.33 (1H, s, H-4'); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 175 MHz) δ_C : 193.3 (C-1), 187.6 (C-1'), 172.9 (C-3), 168.7 (C-8'), 165.3 (C-6'), 163.4 (C-8), 144.2 (C-4'a), 143.2 (C-2'), 135.6 (C-6), 131.3 (C-4), 129.7 (C-4a), 123.4 (C-7), 123.1 (C-5), 115.1 (C-8a), 114 (C-3'), 113.2 (C-8'a), 111.2 (C-5'), 102.9 (C-2), 102.6 (C-7'), 42.1 (C-4')。以上数据与文献报道基本一致^[22],故鉴定化合物 **9** 为外消旋($\pm$)-asperlone A。

化合物 **10** 无色晶体; HR-ESI-MS m/z 245.165 6 $[M+H]^+$ (计算值 261.196 2), 分子式为 $C_{15}H_{20}N_2O$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 700 MHz) δ_H : 7.20 (2H, m, H-13, 17), 7.12 (1H, m, H-15), 7.09 (1H, m, H-14, 16), 3.35 (1H, m, H-3), 2.91 (1H, dd, $J=13.0, 8.8$ Hz, H-11), 2.83 (1H, dd,

$J=13.0, 5.7$ Hz, H-11), 2.72 (1H, dtd, $J=11.2, 3.5, 1.4$ Hz, H-6), 2.55 (1H, dd, $J=12.0, 1.5$ Hz, H-4), 2.39 (1H, m, H-10), 2.31 (1H, dd, $J=12.0, 4.1$ Hz, H-4), 2.10 (1H, dt, $J=11.7, 3.1$ Hz, H-9), 2.03 (1H, dtd, $J=14.1, 11.3, 6.6$ Hz, H-6), 1.78 (1H, m, H-8), 1.54 (2H, tt, $J=5.6, 3.6$ Hz, H-7), 1.26 (2H, m, H-8, 9); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 175 MHz) δ_{C} : 173.5 (C-1), 139.7 (C-12), 130.5 (C-14, 16), 129.6 (C-13, 17), 127.6 (C-15), 66.6 (C-10), 56.7 (C-6), 53.9 (C-4), 53.6 (C-3), 42.5 (C-11), 28.6 (C-9), 26.3 (C-7), 25.7 (C-8)。根据单晶 X 射线衍射数据及以上核磁数据与文献报道基本一致^[23],故鉴定化合物 **10** 为 verruculotoxin。

4 生物活性

对上述化合物进行体外抗肿瘤细胞增殖活性测试,结果显示化合物 **9** 在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,对人肝癌细胞 HepG2、人胃癌细胞 HGC27、人胶质瘤细胞 U251 和人结直肠癌细胞 HCT-116 的 72 h 抑制率分别为 44.92%、75.86%、40.68%、62.65%。复筛设 3 个浓度分别为 $10, 1, 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 每个浓度设置 3 个复孔,72 h 内化合物 **9** 对 HepG2、HGC27、U251 具有抑制作用, IC_{50} 分别为 $9.7, 9.3, 8.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

5 讨论

本研究通过综合运用高效液相色谱、核磁共振及高分辨质谱等色谱和波谱技术,从有毒植物羊蹄躅 *R. molle* 新鲜叶片内生真菌 *Penicillium* sp. RM 中分离鉴定出 10 个单体化合物。其中包括 1 个结构新颖的环戊烯酮类化合物(化合物 **1**)、8 个聚酮类衍生物(化合物 **2~9**)及 1 个哌嗪类生物碱(化合物 **10**)。该研究不仅揭示了羊蹄躅内生真菌次级代谢产物的化学多样性(涵盖环戊烯酮、聚酮及生物碱三大类),并通过抗肿瘤细胞增殖活性评价,发现了 1 个具有抑制 HepG2、HGC27、U251 等肿瘤细胞活性的化合物,为进一步挖掘利用有毒植物内生真菌资源奠定了基础,为基于宿主-微生物互作的天然药物发现提供新思路。

[参考文献]

- [1] SONIA W, AMEEN A B, AHMAD A K. Endophytic fungi: unravelling plant-endophyte interaction and the multifaceted role of fungal endophytes in stress amelioration [J]. Plant Physiol Bioch, 2024, 206: 108174.
- [2] TAO H L, YUE S, FEI X, et al. Xanthene and citrinin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium* sp. T2-11

- [J]. Tetrahedron Lett, 2021, 90: 153626.
- [3] 纪红燕,许贤瑞,赵瑞,等.药用植物雷公藤内生真菌分离及其抑菌活性筛选研究[J].中国现代应用药学,2023,40(2):197.
- [4] 陈小晶,朱丽君,段礼新,等.附子内生真菌 *Trichoderma* sp. FZ-31 的化学成分研究[J].中草药,2021,52(4):931.
- [5] 王晓晴,刘博,王子墨,等.曼陀罗内生真菌 *Fusarium solani* MBM-5 活性次级代谢产物研究[J].中国中药杂志,2024,49(10):2722.
- [6] ZHANG L, LONG Y, LEI X, et al. Azaphilones isolated from an alga-derived fungus *Penicillium* sp. ZJ-27 [J]. Phytochem Lett, 2016, 18: 180.
- [7] LI H, YANG R, XIE F, et al. Multioxygenated polyketides from an endophytic *Penicillium* sp. YUD17006 associated with *Gastrodia elata* [J]. Chin J Nat Med, 2024, 22(11): 1057.
- [8] YING Y, LEI P, XU Y, et al. Secondary metabolites from *Penicillium* sp. HS-11, a fungal endophyte of *Huperzia serrata* [J]. Fitoterapia, 2024, 175: 105943.
- [9] LI Y, ZHU Y, ZHANG Z, et al. Antinociceptive grayanane-derived diterpenoids from flowers of *Rhododendron molle* [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(6): 1073.
- [10] LIU Y, CHEN K L, ZHAO J Y, et al. A derivative of trihydroxynaphthalenone and a pyrone metabolite from the endophytic fungus *Talaromyces purpurigenus* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2024, 26(5): 555.
- [11] YANG J, ZHAO J, ZHANG J. The efficacy and toxicity of grayanoids as analgesics: a systematic review [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 298: 115581.
- [12] PEDRAS M S C. The chemistry of cyclohexenediones produced by the blackleg fungus [J]. Can J Chem, 1996, 74(8): 1597.
- [13] PEDRAS M S C, MORALES V M, TAYLOR J L. Phomaligols and phomaligadiones: new metabolites from the blackleg fungus [J]. Tetrahedron, 1993, 49(37): 8317.
- [14] PEDRAS M S C, TAYLOR J L, MORALES V M. Phomaligin a and other yellow pigments in *Phoma lingam*, and *P. wasabiae* [J]. Phytochemistry, 1995, 38(5): 1215.
- [15] WANG C N, LU H M, GAO C H, et al. Cytotoxic benzopyranone and xanthone derivatives from a coral symbiotic fungus *Cladosporium halotolerans* GXIMD 02502 [J]. Nat Prod Res, 2021, 35(24): 5596.
- [16] TAKAO T, MIHO K, AKIKO K, et al. Four phenolics from the cultured lichen mycobiont of *Graphis scripta* var. *pulverulenta* [J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(7): 1183.
- [17] 陈良,葛朝伦,魏鸿雁,等.分心木化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J].中草药,2022,53(12):3595.
- [18] FANZ Y, TIAN C, TONG Y S, et al. Chromones from the endophytic fungus *Bipolaris eleusines* [J]. Phytochemistry, 2024, 221: 114046.
- [19] 夏雪奎,李庆,邵长伦,等.南海红树林内生真菌 ZZF13 次级代谢产物的研究[J].中山大学学报(自然科学版),2009,48(4):133.
- [20] 任姿霖,张运动,王文雪,等.南极潮间带来源真菌 *Pseudeurotium* sp. HDN17-894 的次级代谢产物研究[J].中国海洋药物,2024,43(2):67.
- [21] HOLKER J S E, O'BRIEN E, SIMPSON T J. The structures of some metabolites of *Penicillium diversum*: α - and β -diversonolic esters [J]. J Chem Soc Perkin Trans I, 1983, doi:10.1039/p19830001365.
- [22] 赵静怡,刘震,孙森凤,等.娃儿藤内生真菌 *Talaromyces purpurigenus* 次级代谢产物研究[J].中国中药杂志,2020,45(6):1368.
- [23] MACMILLAN J G, SPRINGER J P, CLARDY J, et al. Structure and synthesis of verruculotoxin, a new mycotoxin from *Penicillium verruculosum* Peyronel [J]. J Am Chem Soc, 1976, 98(1): 246.

[责任编辑 张宁宁]