

海洋红树林植物卤蕨内生真菌 *Cladosporium perangustum* MA-318 中一个新的链烯酸酐衍生物 methylate cordyanhydride A

李衍荷^{1,2}, 李晓明¹, 徐蕊^{1,2}, 李洪雷^{1,2}, 王斌贵¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 从采自海南东寨港的红树林卤蕨(*Acrostichum aureum* Linn.)中分离得到的一株内生真菌 *Cladosporium perangustum* MA-318, 对其次级代谢产物进行了研究。利用反相硅胶柱层析、正相硅胶柱层析以及葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析等分离手段获得一个单体化合物。通过波谱数据分析(HRESIMS、1D NMR、2D NMR)鉴定该化合物为新的链烯酸酐, 其结构为 methyl (E)-3-(4-(2-((4-(but-1-en-1-yl)-2,5-dioxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl)butyl)-2,5-dioxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)propanoate, 命名为 methylate cordyanhydride A。抗菌实验表明该化合物对藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)表现出一定的抑制作用。

关键词: 红树林; 内生真菌; 化学成分; 结构鉴定; 抗菌活性

中图分类号: O629

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2017)09-0110-04

DOI: 10.11759/hyxx20170307003

天然产物是药物研发先导化合物的重要来源^[1]。其中, 来自特殊生态位的微生物, 例如海洋内生共生体, 为了适应海洋生态系统的特殊生活环境(高盐、高压、低氧、低光、营养限制等)^[2], 在长期进化过程中形成了独特的生物代谢途径, 能够产生许多结构新颖、具有良好生物活性的天然产物^[3]。近年来我们系统开展了海洋生物天然产物研究, 发现、报道了一系列分子多样性丰富的海洋天然产物, 若干化合物具有显著的抗肿瘤、抗菌活性^[4-6]。

本文报道从红树林植物卤蕨(*Acrostichum aureum* Linn.)中分离得到的一株内生真菌 *Cladosporium perangustum* MA-318 的化学成分研究。从该菌发酵产物中分离得到一个新的链烯酸酐类成分, 通过波谱数据分析鉴定其结构为 methyl (E)-3-(4-(2-((4-(but-1-en-1-yl)-2,5-dioxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)methyl)butyl)-2,5-dioxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)propanoate, 命名为 methylate cordyanhydride A, 在其长直链上含有 2 个顺丁烯二酸酐结构单元(图 1)。

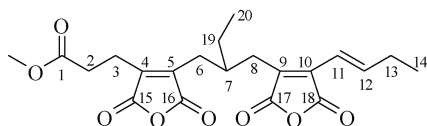


图 1 化合物 1 的结构

Fig. 1 Structure of compound 1

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

核磁共振图谱由 Bruker Avance 500 核磁共振仪测定, TMS 为内标; 质谱数据由 API QSTAR Pulsar 1 质谱仪测定; 薄层色谱硅胶 GF254 和柱色谱硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂分厂产品; Lobar LiChro-prep RP-18 硅胶 (40~63 μ m, Merck); 显色剂为茴香醛硫酸溶液; 所用有机溶剂为重蒸的工业级溶剂。

1.2 菌株发酵

(1) 菌株: 菌株 *C. perangustum* MA-318 分离自 2015 年 3 月采集自海南东寨港的卤蕨(*Acrostichum aureum* Linn.)。通过形态学观察与 ITS 序列系统发育分析^[7], 将该菌株鉴定为 *Cladosporium perangustum*。

(2) 菌株发酵: 菌种于 -80℃ 以 20% 甘油-水保存。发酵采用改良 PDB 培养基, 组成为: 蔗糖 6.0 g, 甘露醇 6.0 g, 蛋白胨 1.5 g, 酵母浸粉 0.9 g, 含 20% 土豆汁的纯海水 300 mL。

收稿日期: 2017-03-07; 修回日期: 2017-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570356)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.31570356]

作者简介: 李衍荷(1992-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事天然产物化学研究; 王斌贵, 通信作者, 电话: 0532-82898553, E-mail: wangbg@ms.qdio.ac.cn

采用 1 L 三角瓶发酵培养, 每瓶装液体培养基 300 mL, 于 116℃ 灭菌 30 min 后接种。共接种液体培养基 18 L, 于 28℃ 恒温、自然光条件下培养 30 d, 分别收集菌丝体和发酵液。

1.3 提取分离

收集发酵液约 18 L, 用乙酸乙酯萃取。菌丝体晾干、粉碎后用丙酮: 水(4: 1)浸泡。将丙酮蒸出, 水相用乙酸乙酯萃取, 萃取物经薄层层析检测发现与发酵液萃取物一致, 合并得粗提物 39.7 g。

将上述粗提物进行硅胶柱层析, 以石油醚-乙酸乙酯、氯仿-甲醇体系梯度洗脱, 经 TLC 检测合并为 9 个组分(Fr.1-9)。其中组分 Fr.5 经反相硅胶柱层析(甲醇—水从 10: 90 到 90: 10 梯度洗脱)、Sephadex LH-20 凝胶柱层析(甲醇)及正相硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯 20/1 到 5/1 梯度洗脱)分离得到化合物 1(20.9 mg)。

1.4 抑菌活性 MIC 测试

(1) 病原指示菌: 抗菌活性所使用的病原指示菌包括大肠杆菌(*Escherichia coli*), 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*), 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*), 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*), 以上所有供试菌株均来自于中国科学院海洋研究所。

(2) 指示菌菌悬液制备: 将接种于 LB 培养基表面的指示菌于 37℃ 培养 24 h 后, 吸取 2 mL 无菌 0.85% NaCl 溶液洗涤培养物, 并用刮刀将菌刮下。吸取适量菌悬液于无菌试管中, 然后用 0.85% NaCl 溶液将菌悬液调至 0.5 麦氏浊度(相当于 1.5×10^8 CFU/mL), 备用。

(3) 抑菌活性 MIC 测试: 采用微量肉汤稀释法^[8], 测定化合物的抗菌活性。采用无菌操作, 以氯霉素为阳性对照, 将梯度稀释后不同浓度的样品溶液分别加到无菌的 96 孔聚苯乙烯板中(每孔 5 μ L)。然后取 95 μ L 麦氏浊度为 0.5 的指示菌悬液, 依次加入到 96 孔板中。轻轻震荡后, 将 96 孔板置于 37℃ 培养箱中, 培养 24 h, 在 600 nm 波长下使用酶标仪测定每孔的吸光值, 以完全抑制指示菌生长的最低样品浓度为该化合物的 MIC 值。

2 化合物的结构鉴定

化合物 1 为无色油状, 旋光值为 $[\alpha]_D^{25} +12.1$ (c 0.99, MeOH), 紫外吸收(MeOH)为 $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 207 (2.98),

243 (3.12), 311 (3.04) nm, 高分辨质谱(HRESIMS)给出准分子离子峰 m/z 405.1541 $[M+H]^+$, 提示其分子式为 $C_{21}H_{24}O_8$ (准分子离子 $C_{21}H_{25}O_8^+$ 的理论计算值为 405.1549), 通过其 1H -、 ^{13}C -NMR、 1H - 1H COSY 以及 HMQC 可以推断该化合物的分子中含有三个结构片段, 包括 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_2CH_3)CH_2-$ 以及反式 1-丁烯基。 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱提示该化合物存在 5 个羰基, 分别在 δ_C 172.4(C-1)、166.0(C-15)、166.6(C-16)、166.4(C-17)和 164.9(C-18); 4 个双键季碳, 分别在 δ_C 143.5(C-4)、144.4(C-5)、138.6(C-9)和 138.1(C-10); 3 个次甲基, 分别在 δ_C 38.0(C-7)、117.4(C-11)和 148.2(C-12); 6 个亚甲基, 分别在 δ_C 27.9(C-2)、19.9(C-3)、31.1(C-6)、28.4(C-8)、27.1(C-13)和 26.2(C-19); 3 个甲基(其中 1 个为甲氧基), 分别在 δ_C 12.9(C-14)、11.0(C-20)和 52.0(1-OCH₃)(表 1)。通过 HMBC 可以确定这三个结构片段以及 9 个季碳的位置(图 2)。以上数据与 Isaka 等人报道的分离自昆虫病原菌 *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620 中的马来酸酐类化合物 cordyanhydride A 的数据非常相似^[9], 不同之处是该化合物在 C-1 的位置由 $-CO_2H$ 变成了 $-CO_2CH_3$ 。化合物 1 的结构由此得以确定。该化合物命名为 methylate cordyanhydride A, 其分子中含有两个顺丁烯二酸酐结构单元。酸酐类化合物在自然界中很少报道^[9], 该类化合物稳定性较差。化合物 1 的分子中含有一个手性中心(C-7), 我们曾尝试培养其单晶以期通过 X-射线晶体衍射来确定其绝对构型, 但遗憾的是在培养晶体的过程中发现其已分解。另外, 模型化合物 cordyanhydride A 的绝对构型也未确定^[9], 因此也难以通过与其比对的方法确定化合物 1 的绝对构型。

3 化合物的抗菌活性

化合物 1 是已知化合物 cordyanhydride A 的甲酯化产物^[9], 迄今为止未见该类化合物的活性报道。我们对分离得到的化合物 1 进行了抗菌活性测试, 受试菌包括大肠杆菌(*E. coli*), 藤黄微球菌(*M. luteus*), 铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*), 迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*), 副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)和哈氏弧菌(*V. harveyi*)。测试结果表明化合物 1 对藤黄微球菌表现出一定的抑制活性, 其 MIC 值为 16 μ g/mL(阳性对照氯霉素的 MIC 值为 4 μ g/mL)。

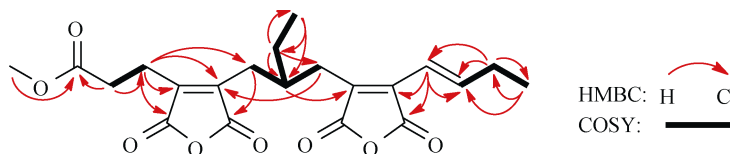


图 2 化合物 1 的 HMBC 以及 ^1H - ^1H COSY 相关

Fig. 2 Key HMBC and COSY correlations of **1**

表 1 化合物 1 的 ^1H -(500 MHz)和 ^{13}C -NMR(125 MHz)数据(DMSO- d_6)

Tab. 1 ^1H and ^{13}C NMR data of **1** DMSO- d_6 (at 500 and 125 MHz, respectively)

Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		172.4, C	10		138.1, C
2	2.59 (dd, 8.9, 7.1)	27.9, CH ₂	11	6.42 (dt, 15.9, 1.6)	117.4, CH
3	2.68 (t, 6.9)	19.9, CH ₂	12	7.07 (dt, 15.9, 6.7)	148.2, CH
4		143.5, C	13	2.29 (m)	27.1, CH ₂
5		144.4, C	14	1.04 (t, 7.4)	12.9, CH ₃
6	2.43 (dd, 7.9, 14.1)	31.1, CH ₂	15		166.0, C
	2.53 (dd, 7.9, 14.1)		16		166.6, C
7	2.06 (hex, 6.9)	38.0, CH	17		166.4, C
8	2.39 (dd, 7.9, 13.9)	28.4, CH ₂	18		164.9, C
	2.49 (dd, 7.9, 13.9)		19	1.28 (m)	26.2, CH ₂
9		138.6, C	20	0.87 (t, 7.4)	11.0, CH ₃
1-OCH ₃	3.58 (s)	52.0, CH ₃			

参考文献:

- [1] Kaobayashi J. Search for new bioactive marine natural products and application to drug development[J]. Chem Pharm Bull, 2016, 64: 1079-1083.
- [2] Song Y X, Qiao L T, Wang J J, et al. Two new meroterpenes from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 085241B[J]. Helv Chim Acta, 2011, 94: 1875-1880.
- [3] Blunt J W, Copp B R, Keyzers R A, et al. Marine natural products[J]. Nat Prod Rep, 2015, 32: 116-211.
- [4] Meng L H, Wang C Y, Mándi A, et al. Three dike-topiperazine alkaloids with spirocyclic skeletons and one bisthiodiketopiperazine derivative from the mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231[J]. Org Lett, 2016, 18: 5304-5307.
- [5] Liu H, Li X M, Liu Y, et al. Chermesins A-D: meroterpenoids with a drimane-type spirosesquiterpene skeleton from the marine algal-derived endophytic fungus *Penicillium chermesinum* EN-480[J]. J Nat Prod, 2016, 79: 806-811.
- [6] Li X D, Li X M, Li X, et al. Asperwentins D-H, 20-nor-isopimarane derivatives from the deep sea sediment-derived fungus *Aspergillus wentii* SD-310[J]. J Nat Prod, 2016, 79: 1347-1353.
- [7] Wang S, Li X M, Teuscher F, et al. Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from marine red alga *Polysiphonia urceolata*[J]. J Nat Prod, 2016, 69: 1622-1625.
- [8] 孙好芬. 两株热带马尾藻内生真菌次生代谢产物研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2010.
Sun Haofen. Study on secondary metabolites of two endophytic fungal strains from tropical *Sargassum* species[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010
- [9] Isaka M, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Cordyanhydrides A and B, two unique anhydrides from the insect pathogenic fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620[J]. Tetrahedron Lett, 2000, 41: 1657-1660.

Methylate cordyanhydride A, a new alkenoic anhydride from *Cladosporium perangustum* MA-318, an endophytic fungus derived from the marine mangrove plant *Acrostichum aureum*

LI Yan-he^{1, 2}, LI Xiao-ming¹, XU Rui^{1, 2}, LI Hong-lei^{1, 2}, WANG Bin-gui¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Mar. 7, 2017

Key words: Mangrove; endophytic fungus; chemical constituents; structure elucidation; antimicrobial activity

Abstract: The biochemical investigation of *Cladosporium perangustum* MA-318, an endophytic fungus isolated from the mangrove plant *Acrostichum aureum* Linn., resulted in the identification of a new alkenoic anhydride, methylate cordyanhydride A. Spectroscopic methods were used to elucidate the structure of this compound. Regarding the antimicrobial activity, this compound was found to possess moderate activity against *Micrococcus luteus*, with an MIC value of 16 µg/mL.

(本文编辑: 康亦兼)