

• 化学 •

喜树内生真菌 *Diaporthe* sp. XZ-07 中的 2 个新内酯及其抑制肿瘤活性研究

史铮, 袁琳^{1*}, 林翔², 赵沛基²

(1. 昆明学院 化学科学与技术系, 云南 昆明 650214;

2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

[摘要] 对 1 株喜树内生真菌 *Diaporthe* sp. XZ-07 的次生代谢产物进行研究。采用 RP-18, Sephadex LH-20, 硅胶等材料进行色谱柱分离纯化得到 2 个新化合物, 鉴定为 5-(*E*)-1,4,5-三羟基hex-2-烯基呋喃-2(5H)-one (**1**) 和 (5*Z*)-5-(2,3,4,5-四羟基hexylidene)呋喃-2(5H)-one (**2**)。用 MTT 法测试化合物活性, 结果显示化合物 **1** 对 HeLa 有较强抑制活性, 化合物 **2** 对 MCF-7, SH-SY5Y, 3LL 均有较强抑制活性。

[关键词] 喜树; 内生真菌; *Diaporthe* sp.; 内酯; 抗肿瘤活性

Two new lactone derivatives from an endophyte *Diaporthe* sp. XZ-07 cultivated on *Camptotheca acuminata*

SHI Cheng¹, YUAN Lin^{1*}, LIN Xiang², ZHAO Pei-Ji²

(1. Chemical Science and Technology Department, Kunming University, Kunming 650214, China;

2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

[Abstract] To study the secondary metabolites and their cytotoxic activities of an endophytic fungus *Diaporthe* sp. XZ-07 cultivated on *Camptotheca acuminata*. Column chromatography by RP-18, Sephadex LH-20 and silica gel was used to isolate and purify the chemical constituent. Two new compounds were isolated and identified as 5-(*E*)-1,4,5-trihydroxyhex-2-enyl furan-2(5H)-one (**1**) and (5*Z*)-5-(2,3,4,5-tetrahydroxyhexylidene) furan-2(5H)-one (**2**) by spectroscopic analysis. Cytotoxic activities were evaluated by MTT method. Compound **1** showed strong inhibitory activity against Human cervical carcinoma cell line HeLa, and compound **2** showed strong inhibitory activity against breast cancer cell line MCF-7, Human neuroblastoma SH-SY5Y and Lewis lung carcinoma cells 3LL.

[Key words] *Camptotheca acuminata*; endophytic fungus; *Diaporthe* sp.; lactone; cytotoxic activities

doi: 10.4268/cjcm20161016

植物内生菌与其宿主植物互利共生的关系,使植物为其内生真菌提供生存环境和必需的营养物质的同时,内生菌则产生丰富多样的有生物活性的次生代谢产物,使其宿主比未感染植株具有生长快速、抗逆境和抗病害等优势。这些次生代谢产物在药物

开发、生物防治和固氮方面中具有重要的应用潜力^[1-4]。

在对喜树 *Camptotheca acuminata* 内生菌研究过程中,本实验室发现多株具有抗肿瘤活性的内生真菌^[5]。其中菌株 *Diaporthe* sp. XZ-07 对肿瘤细胞

[收稿日期] 2016-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31260073)

[通信作者] * 袁琳 教授,主要从事天然药物开发与研究, Tel: (0871) 65098482, E-mail: sunrainyl@outlook.com

[作者简介] 史铮 实验师,主要从事天然药物研究, E-mail: kmxysz@126.com

• 1860 •

Hela 具有很强的抑制活性。而在前期研究中并未发现活性很强的化合物^[6]。本文报道从该菌中分离得到的 2 个新的内酯衍生物,分别鉴定为 5-((*E*)-4,4,5-trihydroxyhex-2-enyl) furan-2(5H)-one (**1**) 和 (5*Z*)-5-(2,3,4,5-tetrahydroxyhexylidene) furan-2(5H)-one(**2**)。并对化合物 **1** 和 **2** 进行了抑制宫颈癌细胞 Hela、乳腺癌细胞 MCF-7、人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 和 Lewis 肺癌细胞 3LL 的活性筛选。

1 材料

Bruker AM-400 型核磁共振仪, VG Auto-Spec-3000 质谱仪。薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); 柱色谱材料: 硅胶(200~300 目)及硅胶 H (青岛海洋化工厂)、Sephadex LH-20(Pharmacia 公司)和反相硅胶 RP-18(Merck 公司)。

Diaporthe sp. XZ-07 的 GenBank 系列号为 DQ272498, 分离自药用植物喜树 *C. acuminata* 的枝条, 现保存于中国科学院昆明植物研究所。

2 提取与分离

将菌株 XZ-07 用 GPY 液体培养基液体发酵 1.5 L(包含蛋白胨 2 g·L⁻¹ 酵母提取物 0.5 g·L⁻¹ 和葡萄糖 10 g·L⁻¹; pH 7.0) 28 °C 培养 2 d, 将该培养物转接到发酵罐中, 用 30 L GPY 培养基继续培养 7 d(28 °C, 200 r·min⁻¹)。

用纱布过滤去除菌丝体后的滤液用等体积的乙酸乙酯萃取 5 次, 45 °C 减压回收有机溶剂后得到浸膏 4.5 g。粗提物用 145 g RP-18 柱依次以水 30%, 50%, 70%, 85% 及 100% 甲醇梯度洗脱(各梯度洗脱 2 L), 经 TLC 检测合并得 Fr. 1~Fr. 6 组分。组分 Fr. 1(1.14 g) 经减压硅胶柱(200~300 目)分离, 氯仿-甲醇梯度(50:1, 30:1, 10:1)洗脱得到 7 个流分(Fr. 1.1~Fr. 1.7)。流分 Fr. 1.6 经 Sephadex LH-20(甲醇)色谱纯化后, 再用减压硅胶柱色谱(硅胶 H), 氯仿-甲醇(5:1)洗脱得到化合物 **1**(6 mg)。Fr. 2(809 mg) 经减压硅胶柱(200~300 目)分离, 以氯仿-甲醇梯度洗脱(50:1, 40:1, 20:1, 10:1)得到 8 个流分(Fr. 2.1~Fr. 2.8)。流分 Fr. 2.4 经 Sephadex LH-20(丙酮)色谱纯化后, 用减压硅胶柱色谱(硅胶 H), 氯仿-乙酸乙酯(1:5)洗脱得到 **2**(2 mg), 见图 1。

3 细胞毒活性测试方法

用 MTT 法^[7] 测试化合物 **1** 和 **2** 对宫颈癌细胞 Hela、乳腺癌细胞 MCF-7、人神经母细胞瘤 SH-SY5Y

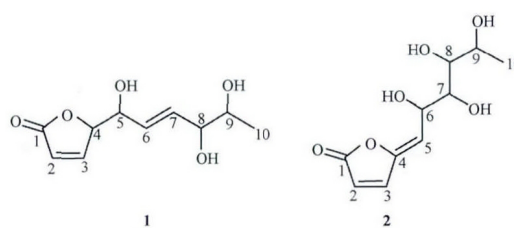


图 1 化合物 **1** 和 **2** 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds **1** and **2**

和 Lewis 肺癌细胞 3LL 的体外抗肿瘤活性, 阳性对照为顺铂。将化合物溶解于 DMSO 中, 取指数生长期的细胞悬液接种于 96 孔板上, 置于 CO₂ 培养箱中 37 °C 恒温培养 24 h 后, 加入不同浓度的化合物(浓度分别为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 和 40 μmol·L⁻¹), 每个浓度均为 3 个复孔。培养 36 h 后, 将 MTT 加入 96 孔板中, 继续培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 在酶标仪上波长为 570 nm 处测定每孔的吸收度, 计算细胞抑制率。

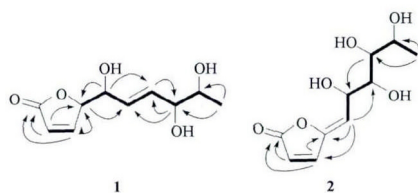
4 结构鉴定

化合物 **1** 无色油状, 由 HR-ESI-MS m/z 237.0745 [M+Na]⁺(计算值 237.0738) 可知其分子式为 C₁₀H₁₄O₅, 不饱和度为 4。其红外光谱在 3394, 1750 cm⁻¹ 处有吸收说明分子中存在羟基和羰基官能团。化合物 **1** 的 ¹³C-NMR 显示出 1 个羰基碳(δ_C 175.4), 4 个烯碳(δ_C 156.4, 134.6, 130.6, 123.3), 4 个连氧的次甲基(δ_C 87.8, 77.1, 72.9, 71.4) 和 1 个甲基(δ_C 18.8)。¹H-NMR 显示出 4 个烯氢信号(δ_H 7.65, 6.19, 5.84, 5.74) 见表 1。以上数据结合不饱和度推测分子中应有 1 个环。HMBC 显示 H-2 与 C-1, C-3 和 C-4 有相关, 同时 H-3 与 C-1, C-2 和 C-4 也有相关。结合 H-2 和 H-3 的 ¹H-¹H COSY 相关可以推测分子中存在一个 αβ 不饱和的 γ 内酯环。¹H-¹H COSY 谱还显示出 H-4/H-5, H5/H6, H-7/H-8, H-8/H-9, H-9/Me-10 几组相关。HMBC 谱显示出 H-4 与 C-2, C-3, C-5 和 C-6, 以及 H-9 与 C-7, C-8 和 C-10 的相关, 结合其他的 HMBC 相关, 侧链的 NMR 数据得以确定见表 1 和图 2。由侧链双键烯氢之间偶合常数($J=16.0$ Hz) 可确定该双键构型为 *E*。综上所述, 化合物 **1** 被确定为 5-((*E*)-4,4,5-trihydroxyhex-2-enyl) furan-2(5H)-one。

化合物 **2** 无色油状, 通过 HR-ESI-MS m/z 230.0792(计算值 230.0790) 可确定其分子式为

表1 化合物1和2的NMR数据(CD₃OD)Table 1 NMR data of 1 and 2 in CD₃OD

No.	1			2		
	δ_H	δ_C	HMBC(H→C)	δ_H	δ_C	HMBC(H→C)
1		175.4, C			171.4, C	
2	6.19(1H, dd, 5.8, 2.0)	123.3, CH	1, 3, 4	6.50(1H, d, 5.5)	121.2, CH	1, 3
3	7.65(1H, dd, 5.7, 1.5)	156.4, CH	1, 2, 4	7.68(1H, d, 5.5)	145.7, CH	1, 2, 4
4	5.10(1H, m)	87.8, CH	2, 3, 5, 6		152.9, C	
5	4.32(1H, m)	72.9, CH	3, 4, 6, 7	5.48(1H, d, 9.2)	116.0, CH	3, 4, 7
6	5.74(1H, dd, 16.0, 6.0)	130.6, CH	5, 7, 8	4.84(1H, t, 8.7)	76.8, CH	4, 7
7	5.84(1H, dd, 16.0, 5.8)	134.6, CH	5, 6, 8	4.10(1H, m)	79.5, CH	5, 6
8	3.86(1H, m)	77.1, CH	6, 7, 9, 10	3.97(1H, m)	74.4, CH	6, 9
9	3.61(1H, m)	71.4, CH	7, 8, 10	4.26(1H, m)	78.3, CH	8, 10
10	1.09(3H, m)	18.8, CH ₃	8, 9	1.24(3H, d, 6.4)	15.2, CH ₃	8, 9

图2 化合物1和2的主要HMBC相关(H→C)和¹H-¹H COSY相关(—)Fig. 2 Key HMBC(H→C) and ¹H-¹H COSY(—) correlations of compounds 1 and 2

C₁₀H₁₄O₆。与化合物1相似,化合物2的¹³C-NMR显示出一个羰基碳(δ_C 171.4) 4个烯碳(δ_C 152.9, 145.7, 121.2和116.0), 4个连氧的次甲基(δ_C 79.5, 78.3, 76.8和74.4)和1个甲基(δ_C 15.2)。但¹H-NMR只显示出3个烯氢信号(δ_H 7.68, 6.50和5.48)(表1)。从HMBC谱可以观察到H-2与C-1及C-3, H-3与C-1, C-2和C-4(δ_C 152.9), 以及H-5(δ_H 5.48)与C-3(δ_C 145.7)和C-4的HMBC相关。结合H-2/H-3的¹H-¹H COSY相关表明分子中的共轭双烯和五元环内酯结构。¹H-¹H COSY谱还显示出H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8, H-8/H-9和H-9/Me-10的相关。HMBC谱图显示出Me-10与C-8及C-9, H-5与C-7, H-8与C-6及C-9的相关, 结合对HMBC谱其他相关的分析可确定化合物2的结构(表1和图2)。ROESY谱显示H-5与H-3的相关说明C-4/C-5双键为Z构型。根据以上的分析化合物2被确定为(5Z)-5-(2,3,4,5-tetrahydroxyhexylidene) furan-2(5H)-one。

• 1862 •

化合物1 无色油状物 [α]_D¹⁸ = -41.5° (c = 0.69, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 202 (3.85) nm; IR (ν_{max}): 3394, 2975, 2931, 2886, 1750, 1451, 1382, 1172, 1044 cm⁻¹; HR-ESI-MS m/z 237.0745 [M + Na]⁺ (计算值 C₁₀H₁₄O₅Na⁺, 237.0738); ¹H-NMR和¹³C-NMR数据见表1。

化合物2 无色油状物 [α]_D¹⁸ = -9.4° (c = 0.46, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 201 (3.96), 277 (3.95) nm; IR (ν_{max}): 3508, 3422, 2947, 2896, 1737, 1675, 1447, 1366, 1129, 1030 cm⁻¹; HR-ESI-MS m/z 230.0792 (计算值 C₁₀H₁₄O₆, 230.0790); ¹H-NMR和¹³C-NMR数据见表1。

3 细胞毒活性测试

用MTT法测试了化合物1和2对宫颈癌细胞Hela、乳腺癌细胞MCF-7、人神经母细胞瘤SH-SY5Y和Lewis肺癌细胞3LL的体外抗肿瘤活性, 实验选用顺铂(DDP)为阳性对照化合物, 以IC₅₀评价化合物的抗肿瘤活性见表2。实验结果显示, 化合物1对Hela有较强抑制活性, 对MCF-7和SH-SY5Y有较弱抑制活性; 化合物2对MCF-7, SH-SY5Y和3LL都有较强抑制活性, 尤其是MCF-7, IC₅₀可达2.03 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表2 化合物1和2对4株肿瘤细胞株的IC₅₀Table 2 IC₅₀ values of compounds 1 and 2 in four cell lines

化合物	$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
	Hela	MCF-7	SY5Y	3LL
1	4.65	16.91	25.23	>40
2	>40	2.03	4.12	4.89
DDP	12.83	19.42	17.23	14.53

[参考文献]

- [1] Schulz B , Boyle C , Draeger S , et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites [J]. *Mycol Res* , 2002 , 106: 996.
- [2] Tan R X , Zou W X. Endophytes: a rich source of functional metabolites [J]. *Nat Prod Rep* , 2001 , 18: 448.
- [3] Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products [J]. *Microbes Infect* , 2003 5(6) : 535.
- [4] Zhang H W , Song Y C , Tan R X. Biology and chemistry of endophytes [J]. *Nat Prod Rep* , 2006 , 23: 753.
- [5] Lin X , Lu C H , Huang Y J , et al. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant , *Camptotheca acuminata*: isolation , identify cation and bioactivity [J]. *World J Microbiol Biotechnol* , 2007 , 23: 1037.
- [6] Yuan L , Lin X , Zhao P J , et al. New polyketides from endophytic *Diaporthe* sp. XZ-07 [J]. *Helv Chim Acta* , 2009 , 92: 1184.
- [7] Masmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods* , 1983 , 65: 55.

[责任编辑 丁广治]