

云南美登木内生真菌 *Beauveria* sp. Lr89 中的两个环肽李俊天^{1,2}, 付晓莉², 曾英², 王琦¹, 赵沛基^{2*}¹吉林农业大学食药用菌教育部工程研究中心, 长春 130118;²中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204

摘要: 从云南美登木 (*Maytenus hookeri* Loes.) 的根部分离到内生真菌 Lr89, 根据 ITS 序列分析, 鉴定为白僵菌属 (*Beauveria*) 真菌。在 PDA 琼脂平板发酵物中分离得到 2 个环肽类化合物, 经波谱鉴定为 isaridin A (1) 和 isariin B (2), 本文首次报道了这两个化合物的 ¹³C NMR 数据。

关键词: 云南美登木; 内生真菌; *Beauveria* sp. Lr89; 环肽

中图分类号: Q936

文献标识码: A

Two Cyclopeptides from Endophytic Fungus *Beauveria* sp. Lr89 Isolated from *Maytenus hookeri*

LI Jun-tian^{1,2}, FU Xiao-li², ZENG Ying², WANG Qi¹, ZHAO Pei-ji^{2*}

¹Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; ²The State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming

Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China

Abstract: Endophytic fungus Lr89 was isolated from *Maytenus hookeri* and identified to be *Beauveria* by ITS sequence. Two cyclopeptides were isolated from PDA solid cultures of *Beauveria* sp. Lr89. They were determined to be isaridin A (1) and isariin B (2) on the basis of spectroscopic analysis, and the ¹³C NMR data of compounds 1 and 2 were reported for the first time.

Key words: *Maytenus hookeri*; endophytic fungus; *Beauveria* sp. Lr89; cyclopeptides

云南美登木 (*Maytenus hookeri*) 属于卫矛科 (Celastraceae) 美登木属 (*Maytenus*) 植物, 是云南特有种。Kupchan 等从齿叶美登木 (*Maytenus serrata*) 中获得有效抗癌成分美登素 (*Maytansine*)^[1], 从云南美登木中同样分离得到美登木素, 其衍生物正在做临床研究。我们曾从云南美登木内生菌中分离纯化到一些有意义的化合物^[2-4]。为了进一步寻找新型的天然产物及活性物质, 我们对美登木内生真菌 *Beauveria* sp. Lr89 进行了化学成分研究, 分离得到两个环肽 isaridin A (1) 和 isariin B (2), 它们首次由 Balaram 等从棒束孢属 (*Isaria*) 中分离纯化到^[5,6]。通过 ¹H NMR、¹H-¹H COSY 以及多级质谱鉴定, 没有提供 ¹³C NMR 数据。本研究首次从白僵菌属 (*Beauveria*) 中分离, 并归属其 ¹H 和 ¹³C NMR 数据, 其中 ¹³C

NMR 数据为首次报道。

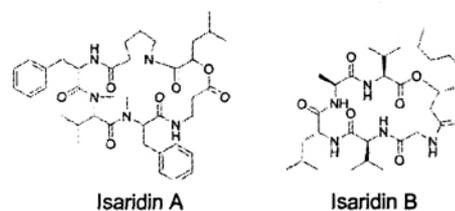


图 1 Isaridin A (1) 和 isariin B (2) 的结构

Fig. 1 The structures of Isaridin A (1) and Isariin B (2)

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

Finnigan LCQ-Advantage 型质谱仪; Bruker DRX-500 型核磁共振仪。柱层析硅胶 (200 ~ 300 目或 GF₂₅₄) 均为青岛海洋化工厂生产; 柱层析凝胶 (Sephadex LH-20) 购自 Amersham Pharmacia 公司, HPLC 为 Waters 996; 半制备柱 Waters 公司产品 XterraTM RP-C₁₈ (7.8 mm × 300 mm, 7 μm)。

收稿日期: 2010-12-13 接受日期: 2011-04-29

基金项目: 云南省基金 (2007C096M); 云南省后备人才培养项目 (2009CI071)

* 通讯作者 Tel: 86-871-5223111; E-mail: zhaopeiji@mail.kib.ac.cn

1.2 内生菌的分离纯化及鉴定

Lr89 从云南美登木 (*Maytenus hookeri*) 根中分离得到。云南美登木采自云南西双版纳热带植物园盆栽植物在中国科学院昆明植物所温室内培养,分离方法参照文献^[7]。

Lr89 的总 DNA 根据文献用 CTBA 法提取^[8]。本实验 ITS 研究中所用的 ITS4 与 ITS5 引物是真菌系统学研究中设计的通用引物 ITS1 (5' > TCC GTA GGT GAA CCT GCG G <3') 和 ITS4 (5' > TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC <3')。PCR 反应体系 20 μ L 中大约 100 ng DNA 模板, 0.5 μ M 引物, 0.2 mM dNTP, 1 \times Ex-Taq buffer (Takara), and 1.25 U of Ex-Taq (Takara)。PCR 的条件: 首先在 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 接着 30 个循环, 包括 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 延伸 1.5 min; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 后回收到大约 600 bp 的核酸片段, 测序后通过与 GenBank 数据库比对来鉴定菌株。

1.3 菌株发酵与产物的分离纯化

Lr89 用 PDA 琼脂平板培养 (马铃薯 200 ~ 300 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 水 1000 mL, pH 自然) 发酵 10 L。在 26 $^{\circ}$ C 黑暗培养 14 d, 发酵物连同琼脂块一起切碎, 用提取液 (乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸 = 80:15:5) 冷浸, 滤液经浓缩得浸膏 14 g。粗提物经 (80 g) 过正相柱层析 (200 ~ 300 目硅胶), 分别用石油醚: 乙酸乙酯 (10:1, 8:2, 7:3), 氯仿: 甲醇 (15:1, 10:1, 8:2, 7:3) 进行梯度洗脱, 共得到 4 部分 Fr-1

~ Fr-4。对 Fr-2 和 Fr-3 分别进行反复的正相柱层析和凝胶柱层析 (Sephadex LH-20, 30 g) 用氯仿-甲醇 (1:1) 洗脱, 最后以甲醇-水 (65:35, 水中含有 0.5% 的甲酸) 为流动相, 用半制备 HPLC 分离得到化合物 1 (107 mg) 和 2 (200 mg)。

2 结果与讨论

2.1 内生真菌的鉴定

Lr89 的 5.8S rDNA 序列通过与 GenBank 数据库序列比对, Lr89 与白僵菌属的 (*Beauveria felina*) 的同源性达 99.9%, 因此 Lr89 鉴定为白僵菌属真菌。

2.2 化合物的鉴定

化合物 1 无色固体。ESI-MS m/z : 704 [M + H]⁺; ¹H 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz) 数据见表 1。同文献比对化合物 1 鉴定为 isaridin A (图 1)^[5]。

化合物 2 白色粉末状固体。ESI-MS m/z : 596 [M + H]⁺; ¹H 和 ¹³C NMR (CDCl₃: CD₃OD = 3:1, 500 MHz) 数据见表 1。同文献比对化合物 2 鉴定为 isariin B (图 1)^[6]。

化合物 1 和 2 首次由 Balamam 等从棒束孢属 (*Isaria*) 中分离纯化到^[5,6], 通过 ¹H NMR、¹H-¹H CO-SY 以及多级质谱鉴定, 但没有报道其 ¹³C NMR 数据。本研究首次从白僵菌属 (*Beauveria*) 中分离得到 isaridin A 和 isariin B, 并首次报道了它们的 ¹³C NMR 数据。

表 1 化合物 1 和 2 的核磁共振数据

Table 1 The NMR data of compounds 1 and 2

	Isaridin A (1)		Isariin B (2)	
	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C
HyLeu	-	172.0 s	-	171.2 s
	5.21 (1H d, 11.5)	74.2 d	2.31 (1H dd, 1.7, 15.4)	39.7 t
	1.38 (1H m)	39.3 t	2.18 (1H dd, 5.8, 15.4)	
	1.77 (1H m)		4.63 (1H br s)	76.4 d
	1.80 (1H m)	25.6 d	1.28 (1H m overlap)	31.2 t
	1.01 (3H d, 6.6)	23.9 q	1.06 (1H m overlap)	
	0.93 (3H d, 6.5)	21.0 q	1.13 (2H m overlap)	27.9 t
Pro	-	173.3 s	1.13 (2H m overlap)	27.9 t
	4.18 (1H d, 8.3)	62.1 d	1.28 (1H m overlap)	31.2 t
	2.13 (1H m)	32.8 t	0.73 - 0.82 (m overlap)	18.6 t
	1.17 (1H m)	22.6 t	0.73 - 0.82 (m overlap)	13.5 q
	1.72 (1H m)			169.3 s
			Gly	-

	3.40 (2H μ m)	48.3 μ		4.18 (1H μ d ,17.3)	42.6 μ
Phe	—	174.0 μ s		3.35 (1H μ d ,17.3)	
	4.69 (1H μ dd 5.0 ,12.5)	54.8 μ d	Val	—	171.6 μ s
	2.98 (1H μ m)	36.0 μ		4.28 (1H μ d ,7.3)	57.1 μ d
	3.08 (1H μ dd 5.0 ,11.5)			1.94 (1H μ m)	29.4 μ d
	—	138.3 μ s		0.73 — 0.82 (m ρ overlap)	17.6 — 21.8
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	130.1 μ d		0.73 — 0.82 (m ρ overlap)	17.6 — 21.8
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	128.0 μ d	Leu	—	172.0 μ s
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	130.0 μ d		4.05 (1H μ d ,6.8)	52.0 μ s
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	128.0 μ d		1.38 (1H μ m)	39.3 μ
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	130.1 μ d		1.50 (1H μ m)	24.1 μ d
NMeVal	—	171.6 μ s		0.73 — 0.82 (m ρ overlap)	17.6 — 21.8
	5.00 (1H μ d ,10.7)	58.7 μ d		0.73 — 0.82 (m ρ overlap)	17.6 — 21.8
	2.21 (1H μ m)	27.9 μ d	Ala	—	172.3 μ s
	0.51 (3H μ d ,6.4)	19.4 μ d		4.11 (1H μ d ,7.4)	48.4 μ d
	0.78 (3H μ d ,6.5)	19.1 μ d		1.28 (3H μ d ,7.4)	17.6 μ d
	3.05 (3H μ s)	30.3 μ d	Val	—	171.6 μ s
NMePhe	—	169.8 μ s		3.99 (1H μ d ,9.7)	57.1 μ d
	5.27 (1H μ ,7.0)	63.8 μ d		1.96 (1H μ m ρ overlap)	28.9 μ d
	2.78 (1H μ dd 7.5 ,14.0)	36.9 μ		0.73 — 0.82 (m ρ overlap)	17.6 — 21.8
	3.55 (1H μ dd 7.5 ,14.0)			0.73 — 0.82 (m ρ overlap)	17.6 — 21.8
	—	138.6 μ s			
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	130.1 μ d			
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	130.0 μ d			
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	129.9 μ d			
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	130.0 μ d			
	7.22 — 7.32 (m ρ overlap)	130.1 μ d			
	2.96 (3H μ s)	30.2 μ d			
β -Ala	—	174.8 μ s			
	2.48 (1H μ dt 5.5 ,14.0)	35.3 μ			
	2.64 (1H μ dt ,14.0 ,4.5)				
	3.59 (1H μ m ρ overlap)	36.7 μ			
	3.68 (1H μ m ρ overlap)				

参考文献

- Kupchan SM ,Komoda Y ,Branfman AR ,*et al.* The maytansinoids isolation structural elucidation and chemical interrelation of novel ansa macrolides. *J Org Chem* 1977 42: 2349-2357.
- Zhao PJ ,Fan LM ,Li GH ,*et al.* Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. ls9131. *Arch Pharm Res* , 2005 28: 1228-1232.
- Zhao PJ ,Li GH ,Shen YM. New chemical constituents from the endophyte *Streptomyces* species LR4612 cultivated on *Maytenus hookeri*. *Chem Biodiv* 2006 3: 337-342.
- Zhao PJ ,Wang HX ,Li GH ,*et al.* Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces* sp. Lz531. *Chem Biodiv* ,2007 ,4: 899-904.
- Ravindra G ,Ranganayaki RS ,Raghothama S ,*et al.* Two novel hexadepsipeptides with several modified amino acid residues isolated from the fungus *Isaria*. *Chem Biodiv* 2004 1: 489-504.

(下转第 695 页)

4.4 东当归中紫花前胡素的含量测定

将“4.3”项下供试品溶液按照“4.1”项下色谱条件测定紫花前胡素含量,结果表明:东当归药材中紫花前胡素含量为 10.05 $\mu\text{g/g}$ 。

5 讨论

近年来关于东当归挥发油组分^[10]和提取物药理作用^[11]曾见报道,但对其化学组分及药理作用却未有报道。本文首次对延边地区东当归的根进行化学成分分析。紫花前胡素是1995年韩国学者研究发现的一种吡喃型香豆素,其对白血病、糖尿病高血压以及降低肾毒素具有显著效果^[12],有望开发成为抗肿瘤等疾病的新药。笔者曾用HPLC法测定过不同批次、不同产地的12种当归属植物中紫花前胡素的含量,结果表明12种植物均含有紫花前胡素;在此基础上,本文测定了东当归中紫花前胡素的含量,结果亦含有紫花前胡素。由此可知,紫花前胡素可能为当归属的特征活性成分,广泛存在于当归属植物中。本研究为东当归的质量控制、今后作为正式药材纳入国家标准以及当归属植物的化学分类提供了实验依据。

参考文献

- Li LL(李丽丽), Liu XQ(刘向前), Gao JM(高敬铭) *et al.* Studies on the volatile oils and determination of total coumarins from *Angelica* spp. growing in China, Japan and Korea. *China Pharm*(中国药师) 2009, 12: 1344-1347.
- Sun RW(孙仁文), Piao HS(朴惠善). Advances in studies on plants of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Mod Chin Med*(中国现代中药) 2006, 8(11): 31-33.
- Du LL(杜蕾蕾), Wang XJ(王晓静), Cai CZ(蔡传真) *et al.* Constituent analysis of essential oils from radix of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *J Chin Med Mat*(中药材) 2002, 25: 477-478.
- Li LL(李丽丽), Liu XQ(刘向前), Zhang XD(张晓丹). Advances in studies on plants of *Angelica* spp. *Chin Tradit Patent Med*(中成药) 2009, 31: 601-607.
- Zhang HQ(张涵庆), Ding YM(丁云梅), Chen GY(陈桂英) *et al.* Studies on active constituents of root of *Euphorbia ebracteolata* Hayata. *Acta Bot Sin*(植物学报), 1987, 29: 429-431.
- Liu ZL(刘振丽), Li LF(李林福), Chao ZM(巢志茂) *et al.* Chemical constituents from radix *Polygoni multiflori* thumb. after Preparing. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2009, 21: 239-241.
- Huang S(黄帅), Zhou XL(周先礼), Wang HY(王洪燕). Chemical studies on the flowers of *Tagetes erecta* L. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2006, 18(Suppl): 57-59.
- Sadtler Research Laboratories. Sadtler Standard NMR Spectra. USA: Sadtler Research Laboratories, 1980. 2594.
- Liu XQ(刘向前). One examination method of Decursin. ChinaPatent(中国专利) ZL 200610103386.4 2008-02-13.
- Sun RW(孙仁文), Piao HS(朴惠善). Extraction and analysis of constituents of essential oil from *Angelica acutiloba* Kitag. with supercritical fluid CO₂ and GC-MS method. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药) 2007, 18: 1136-1138.
- Hatano R, Takano F, Fushiya S *et al.* Water-soluble extracts from *Angelica acutiloba* Kitagawa. enhance hematopoiesis by activating immature erythroid cells in mice with 5-fluorouracil-induced anemia. *Exp Hematol* 2004, 10: 918-924.
- Kang YG, Lee JH, Chae HJ *et al.* HPLC Analysis and extraction methods of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* roots. *Korean J Pharmacogn* 2003, 34: 201-205.
- Sabareesh V, Ranganayaki RS, Raghobama S *et al.* Identification and characterization of a library of microheterogeneous cyclohexadepsipeptides from the fungus *Isaria*. *J Nat Prod*, 2007, 70: 715-729.
- Li LQ, Yang YG, Zeng Y *et al.* A new azaphilone, kasanosin C, from an endophytic *Talaromyces* sp. T1BF. *Molecules*, 2010, 15: 3993-3997.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001.

(上接第669页)