

# 云南美登木内生真菌 *Chaetomium globosum* Ly50 菌株的抗菌活性成分研究

倪志伟<sup>1,2</sup>, 李国红<sup>1</sup>, 赵沛基<sup>1</sup>, 沈月毛<sup>1\*</sup>

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;

<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:**从云南美登木叶中分离筛选到具抗菌活性的内生真菌 *Chaetomium globosum* Ly50 菌株, 利用活性追踪法在其发酵产物中分离到抗橙色青霉和抗结核分支杆菌的化合物, 经 ESHMS、NMR 等波谱数据确认该活性成分为球毛壳甲素, chaetoglobosin A 和球毛壳乙素 chaetoglobosin B。首次发现 chaetoglobosin B 具有抗结核分支杆菌活性。

**关键词:**内生真菌; 云南美登木; 球毛壳菌; chaetoglobosin A; chaetoglobosin B

中图分类号: R915; Q939.9

文献标识码: A

## Antimicrobial Components of the Endophytic Fungal Strain *Chaetomium globosum* Ly50 from *Maytenus hookeri*

NI Zhiwei<sup>1,2</sup>, LI Guo-hong<sup>1</sup>, ZHAO Pei-ji<sup>1</sup>, SHEN Yue-mao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; <sup>2</sup>Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** The fungal strain *Chaetomium globosum* Ly50 was isolated from the leaf of *Maytenus hookeri* and was active against *Penicillium avellaneum* UC-4376 and *Mycobacterium tuberculosis*. Activity-guided isolation led two compounds from the secondary metabolites. They were determined to be chaetoglobosin B (1) and chaetoglobosin A (2) on the basis of spectroscopic analysis. Chaetoglobosin B possesses obvious antituberculosis activity.

**Key words:** endophytic fungi; *Maytenus hookeri*; *Chaetomium globosum*; chaetoglobosin A; chaetoglobosin B

植物内生菌 (endophyte) 指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部或细胞间隙的真菌或细菌<sup>[1,2]</sup>。植物内生真菌是寻找具有生物活性天然产物的丰富资源, 目前已报道从内生真菌中得到的次生代谢产物包括抗生素、抗肿瘤化合物、抗氧化化合物等<sup>[3]</sup>。我们研究的内生真菌来自云南美登木 (*Maytenus hookeri*), 属于卫矛科 (Celastraceae) 美登木属 (*Maytenus*) 植物, 是云南特有种。从云南美登木分离得到的美登木素 (Maytansine) 具有非常好的抗肿瘤活性, 其衍生物正在做临床研究。从云南美登木叶中分离到的内生真菌 Ly50, 经鉴定为球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*)<sup>[4]</sup>, 张玲琪等曾从中分离得到抗癌物质球毛壳

甲素<sup>[5]</sup>。我们进一步以结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和橙色青霉 (*Penicillium avellaneum* UC-4376) 为指示菌株, 通过活性追踪, 从球毛壳菌的 PDA 发酵物中分离得到具有明显抗菌生物活性的化合物, 鉴定为球毛壳甲素 chaetoglobosin A、球毛壳乙素 chaetoglobosin B。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及仪器

柱层析硅胶 200 ~ 300 目、薄层层析硅胶板 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工厂); RP-18 反相材料 (Merck 公司); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (Amersham 生科公司); Bruker AM-400、DRX-500 型超导共振仪 (TMS 内标); Thermo Finnigan LCQ Advantage 型电喷雾质谱仪; XCR-1 型显微熔点仪, 温度计未校正; BRUKER TENSOR 27 红外光谱仪; Shimadzu UV 2401PC 紫外可见分光光度计; Jasco P-1020 全自动

收稿日期: 2007-04-11 接受日期: 2007-07-17

基金项目: 国家杰出青年基金项目 (30325044); 国家自然科学基金项目 (30430020)

\*通讯作者 Tel: 86-871-5223111; E-mail: yshen@xmu.edu.cn

旋光仪。

## 1.2 内生真菌

Ly50从云南美登木 (*Maytenus hookeri*)叶中分离到。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,分离方法参考文献<sup>[6]</sup>。

## 1.3 活性的评估方法

Ym1033结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*),由云南省微生物所提供;大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、橙色青霉 (*Penicillium avellaneum* UC-4376),本实验室留存。采用纸片扩散法<sup>[7]</sup>测定抑菌圈大小。结核分支杆菌指示平板的制备:用牛肉膏蛋白胨液体培养基在37℃活化结核分支杆菌,24 h后涂布至对应的固体培养基平板上,在超净工作台上吹干后,4℃冰箱保存备用。橙色青霉指示平板的制备:首先取1 mL灭过菌的吐温80(0.5%)至已生长1周的橙色青霉平板上,轻轻摇动平板,使液滴在平板上滚动冲刷尽可能多的孢子后,用枪头吸出,转移至冷却到50℃左右的UC-4376固体培养基( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7.7 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,葡萄糖 10 g,酵母提取物 5 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL, pH 7.2)中,迅速摇匀后倒平板,4℃冰箱保存备用。用打孔器将滤纸制成直径为6 mm的小圆纸片,灭菌后,备用。分别测定初提物,不同组分以及纯化化合物的活性。利福平(Rifampicin)为抗细菌活性的阳性对照。化合物2的抗肿瘤活性由国家新药筛选中心测试,白血病细胞株(P388和 HL-60)用四氮唑盐(Methyl-Thiazol-Tetrazolium, MTT)还原法测定,肺癌细胞株(A-549和 BEL-7402)用磺酰罗丹明B(Sulforhodamine B, SRB)蛋白染色法测定。

## 1.4 Ly50的发酵及抗细菌活性物质的分离

将Ly50在PDA(马铃薯200 g,去皮煮沸半小时取滤液;葡萄糖20 g,琼脂粉15 g,自来水1000 mL, pH自然)平板上活化培养3~5代后,用竹签挑取小块带菌培养基接至新鲜PDA固体培养基上,共发酵培养10 L,28℃,黑暗条件下培养17 d。

将培养物划成小块,用混合溶剂(乙酸乙酯/甲醇/冰醋酸80:15:5, v/v/v)浸泡提取三次得到浸膏。将粗浸膏水溶,用乙酸乙酯萃取。将得到的约4.9 g浸膏上RP-18反相,分别用50%、70%、100%甲醇洗脱,通过纸片扩散法检测各组分的抗结核杆菌的活性,合并有活性的各管,称重得4.6 g浸膏。

将该部分用3 g 80~100目硅胶拌样,用30 g 200~300目硅胶装柱,分别氯仿/甲醇洗脱(100:1, 50:1, 20:1),得到A浸膏(1.3 g)、B(104 mg)、C(590 mg)、D浸膏(1.39 g)、E(1.95 g)、F、G浸膏(1.27 g)各部分;通过纸片法的抑菌实验发现,C、D、E有明显抑菌活性,其中D活性最好。将D组分用石油醚/丙酮(90:10, 85:15, 75:25)洗脱,通过TLC合并,得到三个组分(D1, D2, D3),经活性测试发现D2组分有明显抑菌圈;将D2反复过Sephadex LH-20,丙酮洗脱,根据TLC及活性检测,得到化合物1(8 mg)。

500 mL Ly50固体培养物经混合溶剂提取后,溶于水中,氯仿萃取部位浓缩后重224 mg,硅胶柱(25 g)层析,用氯仿/甲醇(100:1 50:1 20:1)洗脱,12 mL的试管收集,检测抗橙色青霉活性,将活性部位合并后重52 mg,活性部位继续用硅胶柱(5 g)分离,石油醚/乙酸乙酯3:1洗脱,洗脱液经TLC和抗真菌活性检测,得到化合物2(5 mg)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化合物的鉴定

**Chaetoglobosin B (1)** 淡黄色针晶(丙酮), mp. 184~186℃,  $[\alpha]_D^{25} -97^\circ$  (c 0.12, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 529  $[\text{M} + 1]^+$ ;  $\text{R}_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$ : 3407, 2924, 1689 (s), 1620, 1560, 1456, 1435, 1043. UV (MeOH)  $\text{max}$  (log): 204.0 (4.45), 221.2 (4.52), 273.2 (3.72), 280.0 (3.72);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz): 7.75 (1H, d,  $J = 16.5$  Hz, H-22), 7.49 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-4), 7.38 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-7), 7.21 (1H, t(dd),  $J = 7.3$  Hz, H-5), 7.13 (1H, t(dd),  $J = 7.4$  Hz, H-6), 7.00 (1H, s, H-2), 6.76 (1H, d,  $J = 16.5$  Hz, H-21), 6.19 (1H, dd,  $J = 19.5, 12.5$  Hz, H-13), 5.36 (1H, ddd,  $J = 18.0, 13.0, 4.0$  Hz, H-14), 5.61 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H-17), 5.07 (1H, d,  $J = 4.4$  Hz, H-19), 3.95 (1H, br, d,  $J = 6$  Hz, H-7), 3.84 (1H, br, d,  $J = 6$  Hz, H-3), 2.93 (1H, dd,  $J = 14.3, 5.3$  Hz, H-10), 2.65 (1H, dd,  $J = 10.6, 5.4$  Hz, H-10), 2.52 (1H, m, H-16), 2.30 (1H, br d,  $J = 13.2$  Hz, H-8), 2.04~2.18 (2H, m, H-15), 1.74 (3H, s, H-11), 1.66 (3H, s, H-12), 1.38 (3H, s, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.03 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, 16- $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): 172.9 (C-1), 52.5 (C-3), 58.1 (C-4), 126.1 (C-5), 132.3 (C-6), 68.7 (C-7), 47.7 (C-

8), 61.3 (C-9), 33.2 (C-10), 13.9 (C-11), 17.9 (C-12), 127.7 (C-13), 133.0 (C-14), 41.4 (C-15), 32.3 (C-16), 21.1 (16-CH<sub>3</sub>), 137.3 (C-17), 131.8 (C-18), 10.7 (18-CH<sub>3</sub>), 82.0 (C-19), 197.3 (C-20), 136.0 (C-21), 136.0 (C-22), 201.3 (C-23), 119.9 (C-2), 111.0 (C-3), 126.8 (C-3 a), 118.4 (C-4), 122.9 (C-5), 119.9 (C-6), 111.5 (C-7), 136.3 (C-1 a)。IR、UV 及 NMR 数据与报道的数据一致<sup>[8,9]</sup>, 鉴定为 chaetoglobosin B, 结构如图 1。

**Chaetoglobosin A (2)** 淡黄色粉末, ESIMS  $m/z$  529 [M + 1]<sup>+</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -265° (c 0.06, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7.67 (1H, d,  $J$  = 16.6 Hz, H-22), 7.47 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-4), 7.32 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-7), 7.17 (H, t (dd),  $J$  = 7.8 Hz, H-5), 7.12 (1H, t (dd),  $J$  = 7.8 Hz, H-6), 7.00 (1H, s, H-2), 6.42 (1H, d,  $J$  = 16.6 Hz, H-21), 6.05 (1H, dd,  $J$  = 15.2, 10.0 Hz, H-13), 5.20 (1H, m, H-14), 5.54 (1H, d,  $J$  = 9.3 Hz, H-17), 2.93 (2H, dd,  $J$  = 14.5, 4.0 Hz, H-10), 2.73 (1H, d,  $J$  = 4.5 Hz, H-7), 2.64 (1H, dd,  $J$  = 14.5, 7.5 Hz, H-10), 2.23 (1H, br d,  $J$  = 15.0 Hz, H-15), 1.28 (3H, s, H-12), 1.22 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, d,  $J$  = 6.7, 16-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): 172.5 (C-1), 52.1 (C-3), 45.9 (C-4), 35.3 (C-5), 57.0 (C-6), 61.3 (C-7), 46.0 (C-8), 62.9 (C-9), 32.6 (C-10), 12.1 (C-11), 19.0 (C-12), 127.3 (C-13), 133.2 (C-14), 40.2 (C-15), 31.7 (C-16), 20.8 (16-CH<sub>3</sub>), 137.6 (C-17), 131.5 (C-18), 10.6 (18-CH<sub>3</sub>), 81.5 (C-19), 200.3 (C-20), 135.4 (C-21), 133.7 (C-22), 199.2 (C-23), 120.7 (C-2), 109.1 (C-3), 127.2 (C-3 a), 118.0 (C-4), 123.9 (C-5), 118.3 (C-6), 111.3 (C-7), 136.0 (C-1 a)。NMR、比旋光数据与报道的数据一致<sup>[8,9]</sup>, 鉴定为球毛壳甲素 (chaetoglobosin A), 结构如图 1。

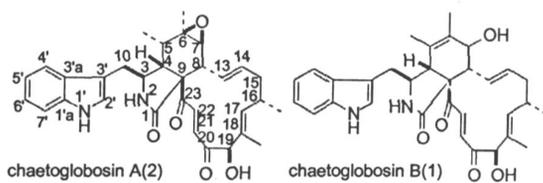


图 1 Chaetoglobosin A 与 Chaetoglobosin B 的结构

Fig. 1 Structures of chaetoglobosins A and B

## 2.2 化合物的活性评估

通过纸片扩散法测定了 chaetoglobosin B (1) 对结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的抑制作用, 阳性对照为 rifampicin, 所用滤纸片直径为 6 mm。

表 1 Chaetoglobosin B (1) 的抗菌活性

	Chaetoglobosin B		Rifampicin	
	$\mu\text{g}/\text{disc}$	抑菌圈直径 (mm)	$\mu\text{g}/\text{disc}$	抑菌圈直径 (mm)
<i>S. aureus</i>	4 $\mu\text{g}$	-	4 $\mu\text{g}$	11.5
	8 $\mu\text{g}$	-	8 $\mu\text{g}$	13
	16 $\mu\text{g}$	-	16 $\mu\text{g}$	14
<i>M. tuberculosis</i>	32 $\mu\text{g}$	8	32 $\mu\text{g}$	15.5
	4 $\mu\text{g}$	7~8	4 $\mu\text{g}$	-
	8 $\mu\text{g}$	7~8	8 $\mu\text{g}$	8
	16 $\mu\text{g}$	10	16 $\mu\text{g}$	8
	32 $\mu\text{g}$	11	32 $\mu\text{g}$	9

注: “-”表示没有明显的抑菌圈; 抑菌圈测量数据为三次平行实验取平均值。

chaetoglobosin B 对于结核杆菌的抗菌活性明显好于对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌, 而且 chaetoglobosin B 的抗结核杆菌的活性也明显好于作为阳性对照利福平 (Rifampicin)。对金黄色葡萄球菌的抗性实验中, chaetoglobosin B 仅表现出微弱的活性。对于革兰氏阴性菌的大肠杆菌, 在 32  $\mu\text{g}/\text{disc}$  的浓度下, 没有检测到明显的抗菌活性。chaetoglobosin B 可能为抗结核杆菌的潜在药物。另外, 对 chaetoglobosin A 进行抗真菌活性测定, 剂量在 50  $\mu\text{g}/\text{disc}$  时, 产生橙色青霉的抑菌圈直径为 2.0 cm。

表 2 Chaetoglobosin A (2) 的细胞毒性 (抑制率 %)

Table 2 Effect of chaetoglobosin A (2) on the growth of tumor cell lines (%)

样品浓度 (mol/L) Concentration	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	评价
P388	90.5	99.2	41.3	22.3	28.2	弱效
A-549	92.4	80.4	55.5	20.3	0	弱效
HL-60	90.8	32.2	12.7	0	14.1	无效
BEI-7402	92.7	90.8	70.3	22.3	27.1	弱效

球毛壳甲素是真核细胞的分裂抑制剂, 可造成多核细胞的产生<sup>[8,9]</sup>。根据表 2 结果, chaetoglobosin A (2) 对三株肿瘤细胞有一定的抑制作用。

### 2.3 讨论

我们从具抗癌活性物质的云南美登木内生菌中,用活性追踪法分离到两个活性化合物。据文献报道这两个化合物具有一定的抗肿瘤活性,而且经本次实验数据显示,球毛壳甲素的确对肿瘤细胞有一定的抑制作用。同时,还首次发现 chaetoglobosin B 具有较好的抗结核杆菌的活性。微生物是寻找活性天然产物的重要来源之一,而植物内生微生物由于其宿主间形成了紧密联系,内生微生物的次生代谢可能受到植物调控<sup>[10]</sup>或者利用植物成分作为生物合成的前体,通常可能会产生活性很强的新的代谢产物<sup>[11]</sup>。因此,从具有某种生理活性的植物中分离到具有相似生理活性的内生微生物的几率较大,例如从红豆杉、*Phleum pratense*等植物中分离到的内生菌<sup>[12,13]</sup>的次生代谢产物,其生源合成的基本单元是由宿主植物大量产生的,表明内生微生物与宿主植物之间有着密切的关系。球毛壳菌与美登木产生结构类型完全不同的抗肿瘤活性物质,也说明从植物内生微生物中可以产生与宿主植物活性相似化合物。植物及其内生真菌对彼此具有一定毒性化合物的相互适应,是长期协同进化的结果。

### 参考文献

- 1 Fisher PJ, Petrini O, Scott HML. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytol*, 1992, 122: 299-305.
- 2 Stöbel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod*, 2004, 67: 257-268.
- 3 Li HY (李海燕), Liu L (刘丽). Recent advances on bioactive compounds producing endophytes *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16: 482-485.
- 4 Wei JC (魏景超). *Fungi Identification Manual* (真菌鉴定手册). Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979, 196-197.
- 5 Zhang LQ (张玲琪), Wang HK (王海昆), Shao H (邵华), et al. Isolation and determination of the anti-cancer substance of chaetoglobosin A producing by endophytic fungus of in *Maytenus hookeri*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37: 172-175.
- 6 Zhao PJ, Li GH, Shen YM. New chemical constituents from the endophyte streptomyces species LR4612 cultivated on *Maytenus hookeri*. *Chin Biodivers*, 2006, 3: 337-342.
- 7 Espinel-Ingroff A, White T, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility tests, In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7<sup>th</sup> Ed. (Murray PR ed.), American Society for Microbiology, Washington DC, 1999. 1640-1652.
- 8 Sekita S, Yoshihira K, Natori S, et al. Chaetoglobosin, cytotoxic 10-(Indo-3-yl)-[13] cytochalasans from *Chaetium* spp. <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectra and their application to a biosynthetic study. *Chin Pharm Bull*, 1983, 31: 490-498.
- 9 Sekita S, Yoshihira K, Natori S. Structure of chaetoglobosin A and B, cytotoxic metabolites of *Chaetium globosum*. *Tetrahedron Lett*, 1973, 14: 2109-2112.
- 10 Loh J, Pierson EA, Pierson LS, et al. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 285-290.
- 11 Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, 2001, 18: 448-459.
- 12 Stierle A, Stöbel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*. *Sci*, 1993, 260: 214-216.
- 13 Koshino H, Terada S, Yoshihara T, et al. Three phenolic acid derivatives from stomata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*. *Phytochemistry*, 1988, 27: 1333-1338.