

## · 论著 ·

真菌 *Chaetomium* sp. 的次级代谢产物研究

孟 慧, 许 勇 (中国人民解放军海军 905 医院设备科, 上海, 200052)

**[摘要]** 目的 对海洋毛壳属真菌 *Chaetomium* sp. 的次级代谢产物进行研究。方法 运用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、HPLC 等现代色谱方法对 *Chaetomium* sp. 的发酵产物进行分离纯化, 利用现代波谱技术结合文献报道进行结构鉴定。结果 共分离得到 4 个十元环内酯化合物, botryolides A, botryolides B, botryolides D 和 decarestrictine I, 1 个倍半萜类化合物 trichothecolone。结论 本研究是对海洋真菌 *Chaetomium* sp. 次级代谢产物的首次报道, 5 种化合物均为首次从该种真菌中分离得到。

**[关键词]** 海洋真菌; 毛壳属; 十元环内酯; 倍半萜; 细胞毒活性

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)04-0314-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.006

Study on the secondary metabolites of the fungus *Chaetomium* sp.

MENG Hui, XU Yong (Hospital 905 of PLA Navy, Shanghai 200052, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the secondary metabolites of the marine fungi *Chaetomium* sp. **Methods** The EtO-Ac extract of *Chaetomium* sp. fermentation was purified by repeated column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, and high-performance liquid chromatography. The isolated compounds were structurally elucidated by spectroscopic analysis and by comparison with literatures previously reported. **Results** Four nonanolides including botryolides A, B, D, decarestrictine I, together with one sesquiterpene trichothecolone were isolated and structurally elucidated. **Conclusion** 5 Compounds were reported for the first time from the marine fungi *Chaetomium* sp.

**[Key words]** marine fungi; *Chaetomium* sp.; nonanolide; sesquiterpene; cytotoxicity

以抗生素为代表的微生物天然产物因具有重要生物活性一直是人类治疗疾病的主要药物, 如抗感染药物青霉素 (penicillin) 和红霉素 (erythromycin)、抗肿瘤药物博来霉素 (bleomycin) 和埃博霉素 (epothilone)、抗寄生虫药物阿维菌素 (avemectin) 和免疫抑制剂环孢素 (cyclosporin) 等<sup>[1]</sup>。迄今, 仅从微生物的次生代谢产物中就发现了 16000 余种活性物质和数万种衍生物和结构修饰物, 先后推向临床的微生物药物约有 200 余种。海洋特殊的生存环境, 如高盐、高压、低温和寡营养, 使生活在其中的微生物具备特殊的遗传物质, 在长期进化过程中获得产生结构新颖次级代谢产物的能力, 因此, 海洋微生物被看作是下一代新药研发的蓝色宝库<sup>[2-3]</sup>。近年来, 从我国近海的海洋微生物中发现了大量活性显著、结构新颖的天然产物, 成为药物研发领域的

热点<sup>[4-5]</sup>。

鉴于海洋微生物产生新颖天然产物的巨大潜力, 本研究对来源于海洋近海的海洋真菌开展次级代谢产物研究, 运用正、反相硅胶柱色谱、凝胶柱色谱以及高效液相色谱 (HPLC) 等分离纯化技术, 对分离自海南三亚附近海域的共附生真菌 *Chaetomium* sp. 进行次级代谢产物的研究。毛壳属 (*Chaetomium*) 是腐生子囊菌中数量最多的类群之一, 至今共鉴定了 81 种, 是一类重要的资源真菌, 呈世界性分布<sup>[6]</sup>。Ahmed 课题组在对爵床科鸭嘴花 (*Justicia adhatoda* L.) 的内生真菌研究中发现 *Chaetomium* sp. NF15 的提取物对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) 都有显著的抗菌活性<sup>[7]</sup>。谭仁祥课题组从沙参 (*Adenophora axilliflora*) 的内生真菌 *Chaetomium* sp. IFB-E015. 中分离得到新颖的生物碱 chaetominine, 其对白血病 K562 细胞和结肠癌 SW116 细胞具有强力的细胞毒活性<sup>[8]</sup>。本研究从 *Chaetomium* sp. 中分离纯化得到 4 个十元环内酯

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81573342)

**[作者简介]** 孟 慧, 主任药师, 研究方向: 药效物质基础

**[通讯作者]** 许 勇, 副主任药师, 研究方向: 药效物质基础。  
Email: xyong95@hotmail.com

类化合物(nonanolide)和1个倍半萜类化合物,并运用质谱、核磁共振等现代波谱技术结合文献报道完成了结构鉴定(见图1)。

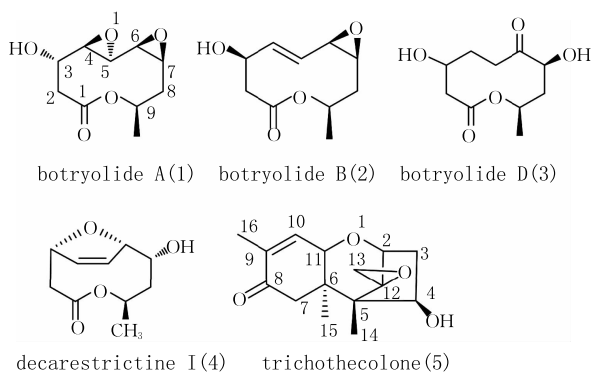


图1 从 *Chaetomium* sp. 中分离鉴定的5个化合物结构式

## 1 仪器、试剂与材料

### 1.1 仪器与试剂

HZQ-F280 型全温震荡培养箱(中国,常州金坛精达仪器制造有限公司);LDZH-200KBS 型立式压力蒸汽灭菌器(中国,上海申安医疗器械有限公司);Bruker Varian Inova-600、Avance-500 核磁共振仪(德国,Bruker 公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪配有 RID 检测器(美国,Agilent 公司)和 Zorbax 300-C<sub>18</sub>柱(250 mm × 9.4 mm,5 μm,美国,Agilent 公司);Sephadex LH-20 凝胶(美国,Amersham Pharmacia Biotech 公司);TLC 薄层板、柱色谱(中国,烟台黄务硅胶开发实验厂);开放柱色谱所用溶剂甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚和丙酮均为分析纯(中国,国药集团上海化学试剂公司),HPLC 所用试剂为色谱纯甲醇(中国,上海阿达玛斯有限公司)和水(中国,娃哈哈集团有限公司)。

### 1.2 样品

实验所用菌株由本实验室从海南三亚沿海的海底沉积物中分离得到,并鉴定为 *Chaetomium* sp., 菌株编号 HN1186。将菌株接种到培养基上(50 g 生物麦芽糖,15 g 琼脂,800 ml 人工海水,pH 7.4),培养箱温度 28℃,固体培养 30 d,共培养 480 块。

## 2 提取与分离

共附生真菌 *Chaetomium* sp. (编号 HN1186) 菌株用含 5% 生物麦芽提取物的 Biomalt 固体琼脂培养基室温发酵 30 d,培养物用乙酸乙酯提取(3.0 L × 5 次),合并提取液,浓缩得总浸膏 2.50 g。将总浸膏进行正相硅胶柱色谱分离,依次用石油醚/丙酮(100 : 0,50 : 1,20 : 1,10 : 1,5 : 1,4 : 1,3 :

1,2 : 1,1 : 1,0 : 1)和甲醇系统作为洗脱剂进行梯度洗脱,TLC 点板合并得到 Fr. A ~ K 共 11 个部分。对 Fr. E 进行 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = (2 : 1)],TLC 点板合并得到 Fr. E1 ~ E9 共 9 个组分,对 Fr. E5 进行 ODS 柱色谱分离(20% ~ 100% 甲醇/水)和半制备 HPLC (40% 甲醇/水,2.0 ml/min)纯化,得到单体化合物 2 (4.0 mg)和 5 (3.2 mg)。对 Fr. E7 进行半制备 HPLC(35% 甲醇/水,2.0 ml/min)纯化,得到单体化合物 1 (1.8 mg)。对 Fr. H 进行 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 2 : 1),TLC 点板合并得到 Fr. H1 ~ H7 共 7 个组分,对 Fr. H2 进行半制备 HPLC(25% 甲醇/水,2.0 ml/min)纯化,得到单体化合物 3 (1.5 mg)和 4 (1.8 mg)。

## 3 结构鉴定

所有化合物进行 MS 谱和<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR 谱的波谱数据采集,经过波谱解析和与参考文献比对,完成了结构鉴定。

化合物 1:ESI-MS:m/z [M+H]<sup>+</sup> 215.08,分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz,CDCl<sub>3</sub>)<sub>δ</sub><sub>H</sub>: 2.88(1H,dd,J=14.5,6.8,H-2a),2.41(1H,dd,J=14.5,10.0 Hz,H-2b),3.51(1H,dd,J=14.5,10.0 Hz,H-3),2.80(1H,dd,J=7.0,1.7 Hz,H-4),2.63(1H,dd,J=8.2,1.8 Hz,H-5),2.56(1H,dd,J=8.2,4.4 Hz,H-6),3.02(1H,dt,J=8.2,4.0 Hz,H-7),2.25(1H,dd,J=14.9,4.8 Hz,H-8a),1.70(1H,dd,J=14.9,4.1 Hz,H-8b),4.89(1H,m,H-9),1.30(3H,d,J=6.4 Hz,H-9Me)。<sup>13</sup>C-NMR(100 MHz,CDCl<sub>3</sub>)<sub>δ</sub><sub>C</sub>:172.6(C-1),44.0(C-2),72.6(C-3),60.2(C-4),60.5(C-5),58.9(C-6),55.2(C-7),38.8(C-8),73.1(C-9),23.9(C-9Me)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>的 botryolide A 基本一致。

化合物 2:ESI-MS:m/z [M+H]<sup>+</sup> 199.09,分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz,CDCl<sub>3</sub>)<sub>δ</sub><sub>H</sub>: 2.67(1H,dd,J=10.3,3.6 Hz,H-2a),2.44(1H,dd,J=10.5,10.0 Hz,H-2b),4.89(1H,m,H-3),5.72(1H,ddd,J=11.5,8.1,1.8 Hz,H-4),5.47(1H,ddd,J=11.5,5.4,1.0 Hz,H-5),3.48(1H,m,H-6),3.00(1H,m,H-7),2.18(1H,m,H-8a),1.25(1H,m,H-8b),5.30(1H,m,H-9),1.29(3H,d,J=6.2 Hz,H-9Me)。<sup>13</sup>C-NMR(100 MHz,CDCl<sub>3</sub>)<sub>δ</sub><sub>C</sub>:170.2(C-1),43.7(C-2),67.9(C-3),128.1(C-4),135.9(C-5),57.2(C-6),53.5(C-7),

38.2(C-8), 67.9(C-9), 20.6(C-9Me)。以上数据与文献[9]的 botryolide B 基本一致。

化合物 3: ESI-MS:  $m/z$   $[M+H]^+$  217.10, 分子式为  $C_{10}H_{16}O_5$ 。 $^1H$ -NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 2.67(1H, dd,  $J=16.4, 2.4$ , H-2a), 2.28(1H, m, H-2b), 4.12(1H, m, H-3), 2.42(1H, m, H-4a), 1.46(1H, m, H-4b), 2.46(1H, m, H-5a), 2.25(1H, m, H-5b), 4.12(1H, m, H-7), 2.29(1H, m, H-8a), 1.94(1H, m, H-8b), 4.99(1H, m, H-9), 1.20(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-9Me)。 $^{13}C$ -NMR(100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 170.3(C-1), 42.5(C-2), 64.1(C-3), 30.9(C-4), 35.1(C-5), 211.0(C-6), 74.4(C-7), 39.5(C-8), 69.2(C-9), 19.8(C-9Me)。以上数据与文献[9]的 botryolide D 基本一致。

化合物 4: ESI-MS:  $m/z$   $[M+H]^+$  199.06, 分子式为  $C_{10}H_{14}O_4$ 。 $^1H$ -NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 2.58(2H, m, H-2), 4.99(1H, m, H-3), 5.86(1H, d,  $J=6.1$  Hz, H-4), 5.76(1H, d,  $J=6.1$  Hz, H-5), 4.85(1H, s, H-6), 3.75(1H, m, H-7), 1.82(1H, m, H-8a), 1.57(1H, m, H-8b), 4.95(1H, m, H-9), 1.17(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-9Me)。 $^{13}C$ -NMR(100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 171.3(C-1), 39.5(C-2), 81.2(C-3), 127.3(C-4), 131.3(C-5), 92.2(C-6), 72.9(C-7), 41.9(C-8), 71.0(C-9), 21.3(C-9Me)。以上数据与文献[10]的 decarestrictine I 基本一致。

化合物 5: ESI-MS:  $m/z$   $[M+H]^+$  265.14, 分子式为  $C_{15}H_{20}O_4$ 。 $^1H$ -NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 3.91(1H, d,  $J=14.5$  Hz, H-2), 2.01(1H, ddd,  $J=13.6, 5.6, 1.8$  Hz, H-3a), 2.68(1H, dd,  $J=14.0, 4.0$  Hz, H-3b), 4.30(1H, brs, H-4), 2.88(1H, d,  $J=9.2$  Hz, H-7a), 2.28(1H, d,  $J=9.2$  Hz, H-7b), 6.45(1H, d,  $J=5.7$  Hz, H-10), 3.81(1H,  $J=5.7$  Hz, H-11), 3.02(1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-13a), 2.83(1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-13b), 0.79(3H, s, H-14), 0.97(3H, s, H-15), 1.81(3H, s, H-16)。 $^{13}C$ -NMR(100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 79.3(C-2), 40.3(C-3), 73.3(C-4), 49.3(C-5), 43.3(C-6), 42.2(C-7), 198.9(C-8), 138.3(C-9), 137.4(C-10), 69.9(C-11), 65.7(C-12), 47.3(C-13), 6.0(C-14), 18.4(C-15), 15.5(C-16)。以上数据与文献[11]的 trichothecolone 基本一致。

#### 4 讨论

笔者对海洋真菌 *Chaetomium* sp. 的次级代谢产物进行研究,首次从该真菌中发现 5 个化合物,从

结构上看,5 个化合物分别属于十元环内酯类和倍半萜类。botryolides A, B, D 和 decarestrictine I 均为十元环内酯(nonanolide),属于典型的真菌来源的聚酮类化合物,由真菌中的高度还原型聚酮合成酶负责合成。该类化合物在自然界广泛分布,具有细胞毒性、抗菌、抗真菌和除草等广泛的生物活性<sup>[12]</sup>。botryolides A, B 和 D 最早分离自真菌 *Botryotrichum* sp. (NRRL 38180), 化学结构和绝对构型由波谱解析方法和改良 Mosher 法确定, botryolides B 的绝对构型还经过化学全合成实验验证<sup>[10]</sup>。前期活性评价表明,该 3 个化合物在 100  $\mu$ g/板的浓度下对人体致病菌金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌以及对农作物致病真菌黄曲霉和轮枝样镰刀菌均无活性。decarestrictine I 属于结构特殊的十元环内酯,分子中包括一个含(Z)式双键的二氢咪喃环,受到化学合成学家的关注<sup>[10,13-14]</sup>。trichothecolone 为倍半萜类化合物,属于单端孢霉烯(trichothecene)类真菌毒素,该类毒素可以由曲霉菌、青霉菌和镰刀霉菌等真菌产生,在自然界广泛存在,是污染粮食的主要毒素,能引起人类食物中毒,主要症状表现为恶心、呕吐和厌食,主要靶器官是肝脏和肾脏<sup>[15]</sup>。trichothecolone 细胞毒活性筛选表明,它对口腔表皮样癌(KB),人皮肤黑色素瘤(SK-MEL 30),人肺癌(A-459)和人乳腺癌(MCF-7)细胞株具有明显活性,  $IC_{50}$  值分别为 10.6, 8.6, 7.1 和 10.6  $\mu$ g/ml<sup>[15]</sup>。海洋真菌 *Chaetomium* sp. 中获得的十元环内酯类和倍半萜类,在其他种属的真菌也见有报道,提示负责这些次级代谢产物的生物合成基因簇可能在真菌物种分化的早期就已经存在,或能够通过水平基因转移在不同种属之间进行交流。

#### 【参考文献】

- [1] NEWMAN D J, CRAGG G M, SNADER K M. The influence of natural products upon drug discovery [J]. *Nat Prod Rep*, 2000, 17 (3): 215-234.
- [2] JENSEN P R, MOORE B S, FENICAL W. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery [J]. *Nat Prod Rep*, 2015, 32 (5): 738-751.
- [3] FENICAL W, JENSEN P R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria [J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2 (12): 666-673.
- [4] HOU X M, XU R F, GU Y C, et al. Biological and chemical diversity of coral-derived microorganisms [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22 (32): 3707-3762.
- [5] ZHAO C Y, ZHU H T, ZHU W M. New marine natural

- products of microbial origin from 2010 to 2013 [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2013, 33 (6): 1195-1234.
- [6] KIRK P M, CANNON P F, DAVID J C, et al. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*, 9th Edition, [M]. CABI Publishing, 2001.
- [7] FATIMA N, MUKHTAR U, IHSAN UL H, et al. Biological evaluation of endophytic fungus *Chaetomium* sp. NF15 of *Justicia adhatoda* L.: A potential candidate for drug discovery [J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2016, 9 (6): e29978.
- [8] JIAO R H, XU S, LIU J Y, et al. Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium* sp. IFB-E015 [J]. *Org Lett*, 2006, 8 (25): 5709-5712.
- [9] SY A A, SWENSON D C, GLOER J B, et al. Botryolides A-E, decarestrictine analogues from a fungicolous *Botryotrichum* sp. (NRRL 38180) [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71 (3): 415-419.
- [10] RADHA KRISHNA P, RAO T J. Total synthesis of decarestrictine I and botryolide B via RCM protocol [J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8 (14): 3130-3132.
- [11] LOUKACI A, KAYSER O, BINDSEIL K, et al. New trichothecenes isolated from *Holarrhena floribunda* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63 (1): 52-56.
- [12] SUN P, LU S, REE T, et al. Nonanolides of natural origin: structure, synthesis, and biological activity [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19: 3417-3455.
- [13] YADAV J S, VENKATESH M, KUMAR A S, et al. Astereoselective total synthesis of decarestrictine I [J]. *Helv Chim Acta*, 2014, 97 (6): 830-838.
- [14] PHILIPPS S, MAYER M, G HRT A, et al. [P], EP, 0497300A12, 1992.
- [15] WU Q, DOHNAL V, KUCA K, et al. Trichothecenes: structure-toxic activity relationships [J]. *Curr Drug Metab*, 2013, 14 (6): 641-660.
- [收稿日期] 2018-11-06 [修回日期] 2019-02-25  
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 313 页)

- [8] 颜秉强, 张永清. 月腺大戟研究进展 [J]. *山东中医药大学学报*, 2008(5): 432-435.
- [9] WANG X Y, LIU L P, KANG T G, et al. Chemical constituents of *Euphorbia fischeriana* [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10 (4): 299-302.
- [10] DENG B, MU S Z, HAO X J. Chemical constituents from *uphorbia ebracteolata* [J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(3): 18-185.
- [11] 王晓阳, 刘丽萍, 康廷国, 等. 狼毒大戟的化学成分 [J]. *中国天然药物*, 2012, 10(4): 299-302.
- [12] 董云发, 丁云梅. 月腺大戟根中乙酰基间苯三酚衍生物 [J]. *植物资源与环境学报*, 1992(2): 1-3.
- [13] 邓彬, 穆淑珍, 黄烈军, 等. 月腺大戟中二萜类化学成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(6): 789-791.
- [14] 潘勤, 施敏锋, 闵知大. 狼毒大戟中 4 种 Jolkinolide 型二萜的二维核磁共振研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2004, 35 (1): 16-19.
- [15] 杨阳, 蔡飞, 杨琦, 等. 头花蓼化学成分的研究 (I) [J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30(8): 937-940.
- [16] PEI Y, KOIKE K, HAN B, et al. Fischeria A, a novel norditerpene lactone from *Euphorbia fischeriana* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40(5): 951-952.
- [17] 浮光苗, 余伯阳, 朱丹妮. 月腺大戟化学成分的研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(4): 377-379.
- [18] 刘文洁. 苍耳根化学成分及其药理活性的研究 [D]. 海口: 海南师范大学, 2013.
- [收稿日期] 2018-04-25 [修回日期] 2019-02-25  
[本文编辑] 陈盛新