

## 一株藤壶内生真菌的次生代谢产物

蔡彩虹<sup>1,2</sup>, 郑浩<sup>1,2</sup>, 盖翠娟<sup>1,2</sup>, 戴好富<sup>1,2</sup>, 梅文莉<sup>1,2</sup>, 陈惠琴<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室, 海口 571101;<sup>2</sup>海南热带农业资源研究院, 海口 571101)

**摘要** 采用硅胶、Sephadex LH-20、C<sub>18</sub>反相硅胶和重结晶等分离技术从藤壶内生真菌 *Aspergillus* sp. Dq-25 的大米固体发酵产物的乙酸乙酯提取物中分离得到 6 个化合物, 并通过理化性质和波谱学方法对单体化合物进行结构鉴定, 分别为: demethyldihydropenicillic acid(**1**)、dihydropenicillic acid(**2**)、penicillic acid(**3**)、fortisterol(**4**)、22*E*, 24*R*-3*P*, 5*a*-dihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one(**5**)和(22*E*, 24*R*)-麦角甾-7, 22-二烯-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -三醇-6-酮(**6**)。其中化合物**1**为一新的丁内酯类化合物。通过 MTT 法测试化合物的细胞毒性, 结果显示化合物**3**对慢性髓原白血病细胞 K562、人宫颈癌细胞 HeLa、人胃癌细胞 SGC-7901、人肺癌细胞 A549 和人肝癌细胞 BEL-7402 均有一定的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 范围为 38.0 ~ 105.0  $\mu$ mol/L。

**关键词** 藤壶; 内生真菌; *Aspergillus* sp.;  $\gamma$ -丁内酯; 化学成分; 分离鉴定; 细胞毒

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)01-0062-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220531001

引用本文 蔡彩虹, 郑浩, 盖翠娟, 等. 一株藤壶内生真菌的次生代谢产物[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(1): 62–67.

Cite this article as: CAI Caihong, ZHENG Hao, GAI Cuijuan, et al. Secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus* sp. Dq-25 from barnacle[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(1): 62–67.

Secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus* sp. Dq-25 from barnacleCAI Caihong<sup>1,2</sup>, ZHENG Hao<sup>1,2</sup>, GAI Cuijuan<sup>1,2</sup>, DAI Haofu<sup>1,2</sup>, MEI Wenli<sup>1,2</sup>, CHEN Huiqin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Hainan Provincial Key Laboratory for Research and Development of Natural Product from Li Folk Medicine, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101; <sup>2</sup>Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources, Haikou 571101, China

**Abstract** The chemical constituents of solid rice culture of the endophytic fungus *Aspergillus* sp. Dq-25 from barnacle were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, C<sub>18</sub> reversed silica gel column chromatography and recrystallization. Their structures were identified by the physical and chemical properties, and by various spectroscopic methods. Six compounds were isolated and identified as: demethyldihydropenicillic acid (**1**), dihydropenicillic acid (**2**), penicillic acid (**3**), fortisterol (**4**), 22*E*, 24*R*-3*P*, 5*a*-dihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one (**5**), and (22*E*, 24*R*)-ergosterol-7, 22-diene-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -triol-6-one (**6**). Compound **1** was a new butyrolactone. MTT method was used to analyze cytotoxicity, and the result showed that compound **3** exhibited inhibitory activity on five cell lines, including K562, HeLa, SGC-7901, A542 and BEL-7402, with IC<sub>50</sub> values of 38.0 ~ 105.0  $\mu$ mol/L.

**Key words** barnacle; endophytic fungus; *Aspergillus* sp.;  $\gamma$ -butyrolactone; chemical constituents; isolation and identification; cytotoxicity

This study was supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 220RC702), and Special Financial Project of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (No. NFZX2021)

收稿日期 2022-05-31 \* 通信作者 Tel: 0898-66968572 E-mail: chenhuiqin@itbb.org.cn

基金项目 海南省自然科学基金资助项目(No. 220RC702); 农业农村部财政专项资助项目(No. NFZX2021)

海洋微生物为适应海洋独特的高湿、高压、高盐的环境产生了不同于陆地微生物的代谢途径和防御体系,使其成为产生大量结构新颖活性化合物的重要来源<sup>[1-2]</sup>。藤壶是附着在海水中的固定或浮动硬物上的甲壳动物,靠过滤海水中的有机物生存,由于特殊的生理特征,在通过长期的自然选择进化,与体内的微生物已经达成了合作关系。由于环境和宿主共生的相互作用,海洋微生物的沉默基因被激活从而能够产生结构特殊、活性显著的次生代谢产物<sup>[3]</sup>。近年来从海洋动物内生真菌中发现了数量相当的具有抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗菌<sup>[5]</sup>、抗炎<sup>[6]</sup>等活性的新颖结构,已成为活性天然产物的重要来源之一。

前期研究发现藤壶内生真菌 *Aspergillus* sp.

Dq-25 的大米固体发酵产物具有较好的抗肿瘤活性,而目前对于藤壶内生真菌的报道尚不多见,故本研究开展了对该菌株大米固体发酵产物乙酸乙酯提取物的化学成分研究,从中共分离得到了6个化合物,其中包括3个丁内酯类化合物 demethyldihydropenicillic acid (**1**)、dihydropenicillic acid (**2**)、penicillic acid (**3**),和3个甾体类化合物 fortisterol (**4**)、22*E*, 24*R*-3*P*, 5*a*-dihydroxyerogosta-7, 22-diene-6-one (**5**)和 (22*E*, 24*R*)-麦角甾-7, 22-二烯-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -三醇-6-酮 (**6**) (图1)。其中化合物 **1** 是新化合物。对化合物 **1** ~ **3** 进行细胞毒活性筛选,结果发现化合物 **3** 对多种肿瘤细胞株均有一定的生长抑制作用,包括 K562、HeLa、SGC-7901、A549 和 BEL-7402,其 IC<sub>50</sub> 为 38.0 ~ 105.0  $\mu$ mol/L。

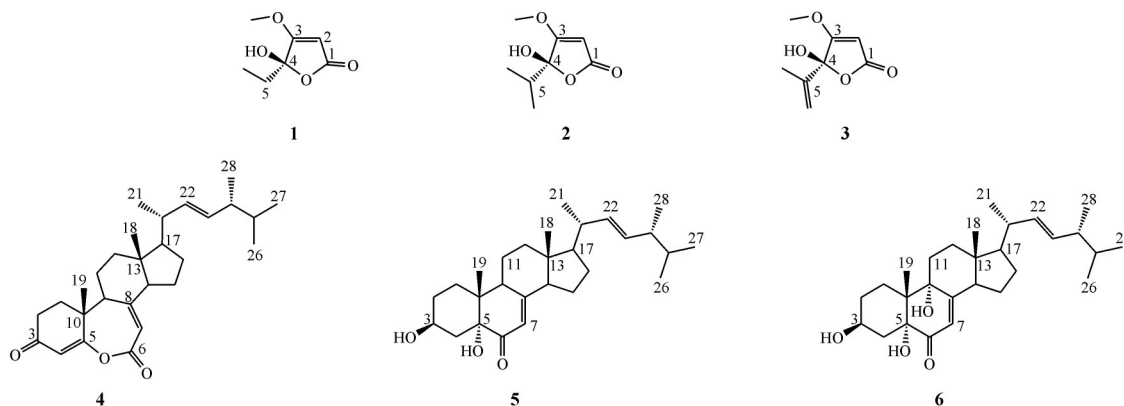


Figure 1 Structures of compounds 1-6 from *Aspergillus* sp. Dq-25

## 1 材料

### 1.1 试剂

Sephadex LH-20(德国 Sigma-Aldrich 公司); C<sub>18</sub> 反相硅胶(日本 Fuji 公司);柱色谱硅胶 G(200 ~ 300、60 ~ 80 目)、薄层色谱硅胶 H(青岛海洋化工厂);顺铂(德国 Sigma-Aldrich 公司);MTT(北京索莱宝科技有限公司);氘代试剂(天津市科密欧有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

Compact 质谱仪, Avance III 500 核磁共振波谱仪(TMS 为内标)(德国 Bruker 公司); Autopol III 旋光仪(美国 Rudolph 公司); J-815 圆二色谱仪(日本 Jasco 公司); SB-1100 旋转蒸发仪(日本 Eyela 公司); 1260 分析型 HPLC, 配置 1260 Infinity II 四元泵和 Agilent DAD G1315D 检测器(美国 Agilent 公

司); SUMMIT p680A 半制备型 HPLC, 配置 P680A 四元泵和 PDA-100 紫外/可见二极管阵列检测器(美国 Dionex 公司);分析性和半制备型 C<sub>18</sub> 色谱柱(日本 Nacalai Tesque 公司); Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司); BSA224S 万分之一天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

### 1.3 菌株和细胞株

本实验菌株 *Aspergillus* sp. Dq-25 于 2018 年 8 月从三沙采集的藤壶中分离获得,现保藏于中国热带农业科学院热带生物技术研究所,标本编号为 20180825Dq-25。

细胞株人慢性髓原白血病细胞 K562、人宫颈癌细胞 HeLa、人胃癌细胞 SGC-7901、人肺癌细胞 A549 和人肝癌细胞 BEL-7402 均购自中国科学院细胞库。

## 2 方法

### 2.1 菌株发酵

菌株在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基中活化后,接种到装有PDA液体培养基的三角瓶中,置于28℃、200 r/min的摇床中振荡培养2 d作为种子液。1 L三角瓶中装入大米100.0 g、NaCl 3.3 g和水110 mL,在121℃条件下灭菌20 min,放凉至室温后,每瓶接入种子液10 mL,室温下静置培养30 d。

### 2.2 提取和分离

菌株发酵结束后,用乙酸乙酯提取3遍,回收合并乙酸乙酯相,减压浓缩,获得乙酸乙酯提取物132.6 g。

将提取物经过减压硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(100:1→1:1)和二氯甲烷-甲醇(50:1→0:1)梯度洗脱,得到15个流份(Fr. 1~Fr. 15)。Fr. 6[1.5 g,石油醚-乙酸乙酯(2:1)洗脱流份]经过 $C_{18}$ 反相硅胶柱色谱,以甲醇-水(4:1→1:0)为流动相洗脱得到8个流份(Fr. 6.1~Fr. 6.8),其中Fr. 6.3[833.5 mg,甲醇-水(3:1)洗脱流份]经硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(100:1→1:1)为流动相得到7个流份(Fr. 6.3.1~Fr. 6.3.7),Fr. 6.3.1[113.6 mg,石油醚-乙酸乙酯(100:1)洗脱流份]再经硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮(100:1→30:1)为流动相,分离纯化得到化合物5(1.3 mg)。Fr. 6.4[940.8 mg,甲醇-水(3:1)洗脱流份]经Sephadex LH-20柱色谱,以氯仿-甲醇(1:1)为流动相,分离得到12个流份,Fr. 6.4.4(97.4 mg)经硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(30:1→10:1)为流动相,梯度洗脱得到化合物6(19.0 mg)。

Fr. 8[3.2 g,石油醚-乙酸乙酯(1:1)洗脱流份]经Sephadex LH-20柱色谱(甲醇为流动相)分离得到10个流份(Fr. 8.1~Fr. 8.10)。其中,Fr. 8.4经重结晶(甲醇)纯化获得白色晶体即化合物3(420.6 mg)。Fr. 8.2(763.5 mg)经硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(80:1→10:1)梯度洗脱,得到10个流份(Fr. 8.2.1~Fr. 8.2.10)。化合物2(20.9 mg)由流份Fr. 8.2.3[87.7 mg,石油醚-乙酸乙酯(60:1)洗脱流份]经硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(60:1→1:1)梯度洗脱纯化后得到。Fr. 8.3(258.8 mg)经硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸

乙酯(80:1→10:1)梯度洗脱得到8个流份,Fr. 8.3.5[98.8 mg,石油醚-乙酸乙酯(40:1)洗脱流份]经反复硅胶柱色谱,分别以二氯甲烷-丙酮(200:1)和石油醚-二氯甲烷-异丙醇(7:5:0.4)为流动相,得到化合物1(1.2 mg)。

Fr. 9[1.8 g,石油醚-乙酸乙酯(1:1)洗脱流份]经Sephadex LH-20柱色谱(甲醇为流动相)分离得到14个流份(Fr. 9.1~Fr. 9.14)。Fr. 9.2(392.5 mg)用硅胶柱色谱以石油醚-乙酸乙酯(80:1→10:1)梯度洗脱,得到10个流份(Fr. 9.2.1~Fr. 9.2.10)。Fr. 9.2.1[78.3 mg,石油醚-乙酸乙酯(80:1)洗脱流份]经反复硅胶柱色谱,分别以二氯甲烷-丙酮(200:1)和石油醚-二氯甲烷-异丙醇(7:5:0.4)为流动相,得到化合物4(1.4 mg)。

### 2.3 细胞毒活性测试

采用MTT法<sup>[7]</sup>对分离得到的化合物进行细胞毒活性测试。细胞株包括:人慢性髓原白血病细胞K562、人宫颈癌细胞HeLa、人胃癌细胞SGC-7901、人肺癌细胞A549和人肝癌细胞BEL-7402。供试细胞均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

## 3 结果与分析

### 3.1 菌株鉴定

菌株ITS序列与BLAST数据库进行同源比对鉴定该菌株Dq-25为真菌*Aspergillus* sp.。将ITS序列提交GenBank,获得编录号:ON357962。

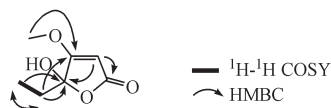
### 3.2 结构鉴定

化合物1 无色结晶; $[\alpha]_D^{25} + 25.6$ (c 0.1, MeOH);HR-ESI-MS  $m/z$  181.0491  $[M+Na]^+$  (Calcd. for  $C_7H_9O_4Na$ , 181.0471),确定其分子式为 $C_7H_9O_4$ ,不饱和度为3。 $^{13}C$  NMR和DEPT( $CD_3OD$ , 125 MHz)谱图(表1)共显示出7个碳信号,结合 $^1H$  NMR( $CD_3OD$ , 500 MHz)谱图(表1)和HSQC谱图分析发现,结构中具有1个甲基信号 $[\delta_C 7.54/\delta_H 0.88$  (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-6)]、1个甲氧基信号 $[\delta_C 60.4/\delta_H 3.93$  (3H, s,  $OCH_3$ )]、1个亚甲基信号 $[\delta_C 29.9/\delta_H 1.94$  (1H, dq,  $J = 15.0, 7.4$  Hz, H-5 $\alpha$ )],  $\delta_H 1.86$  (1H, dq,  $J = 14.7, 7.4$  Hz, H-5 $\beta$ )]、1个季碳信号 $[\delta_C 105.8$  (C-4)]、1组三取代双键信号 $[\delta_C 181.7$  (C-3);  $\delta_C 89.9/\delta_H 5.22$  (1H, s, H-2)]和1个羰基信号 $[\delta_C 173.2$  (C-1)]。将化合物1的波谱

**Table 1**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data of compound **1** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , MHz 500/125 MHz)

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	173.2	—
2	89.9	5.22(1H, s)
3	181.7	—
4	105.8	—
5	29.9	1.94(1H, dq, $J = 15.0, 7.5$ Hz) 1.86(1H, dq, $J = 14.7, 7.5$ Hz)
6	7.54	0.88(3H, t, $J = 7.5$ Hz)
$\text{OCH}_3$	60.4	3.93(3H, s)

数据与已知丁内酯类化合物 dihydropenicillic acid<sup>[8-9]</sup>对照,两者的信号非常相似,主要区别在于该化合物中少了1个甲基信号和1个次甲基信号,多了1个亚甲基信号 [ $\delta_{\text{C}}$  29.9/ $\delta_{\text{H}}$  1.94(1H, dq,  $J = 15.0, 7.5$  Hz, H-5 $\alpha$ );  $\delta_{\text{H}}$  1.86(1H, dq,  $J = 14.7, 7.5$  Hz, H-5 $\beta$ )], 并且甲基峰由原来的双峰变为三重峰 [ $\delta_{\text{C}}$  7.54/ $\delta_{\text{H}}$  0.88(3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-6)]。提示化合物**1**为已知化合物 dihydropenicillic acid 4位的异丙基被乙基所替代的衍生物。在 HMBC 谱中(图2)观察到甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  0.88(H<sub>3</sub>-6)与  $\delta_{\text{C}}$  105.8(C-4)和  $\delta_{\text{C}}$  29.9(C-5)有相关信号,  $\delta_{\text{H}}$  1.94(H-5 $\alpha$ )和  $\delta_{\text{H}}$  1.86(H-5 $\beta$ )与  $\delta_{\text{C}}$  181.7(C-3)、 $\delta_{\text{C}}$  105.8(C-4)和  $\delta_{\text{C}}$  7.54(C-6)有相关信号,  $\delta_{\text{H}}$  5.22(H-2)与  $\delta_{\text{C}}$  173.2(C-1)和  $\delta_{\text{C}}$  105.8(C-4)有相关信号,甲氧基  $\delta_{\text{H}}$  3.93( $\text{OCH}_3$ )与  $\delta_{\text{C}}$  181.7(C-3)有相关信号,结合  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 中  $\delta_{\text{H}}$  1.94(H-5 $\alpha$ )和  $\delta_{\text{H}}$  1.86(H-5 $\beta$ )与  $\delta_{\text{H}}$  0.88(H<sub>3</sub>-6)有相关信号,证明该化合物与已知化合物比较少了1个甲基,结构如图2。

**Figure 2** Key HMBC and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY correlations of compound **1**

根据测试 CD 数据在 210 nm 出现正的 Cotton 效应 ( $\Delta\epsilon = 1.46, c = 6.4 \times 10^{-3}$  mol/L), 与 5,6-dihydro-6-hydroxyphenicillic acid<sup>[5]</sup>一致,故推断 4 位的绝对构型为 *S*。综上所述,化合物**1**的结构鉴定为 demethyldihydropenicillic acid,经查阅文献,该化合物为一新化合物。

化合物**2** 无色结晶 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ESI-MS  $m/z$  195.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.20(1H, s, H-2), 3.92(3H, s, H- $\text{OCH}_3$ ), 2.12(1H,

m, H-5), 1.04(3H, d,  $J = 6.8$ , H-6), 0.88(3H, d,  $J = 6.9$ , H-7);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 173.5(C-1), 90.0(C-2), 182.2(C-3), 107.2(C-4), 34.7(C-5), 16.1(C-6), 16.8(C-7), 60.3(C- $\text{OCH}_3$ )。以上数据与文献[8-9]报道基本一致,故鉴定化合物**2**为 dihydropenicillic acid。

化合物**3** 无色结晶 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ESI-MS  $m/z$  193.2  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.39(1H, s, H-6a), 5.27(1H, s, H-2), 5.14(1H, s, H-6b), 3.92(3H, s, H- $\text{OCH}_3$ ), 1.74(3H, s, C-7);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 173.3(C-1), 89.9(C-2), 181.8(C-3), 104.6(C-4), 141.6(C-5), 116.1(C-6), 17.6(C-7), 60.6(C- $\text{OCH}_3$ )。以上数据与文献[8-9]报道基本一致,故鉴定化合物**3**为 penicillic acid。

化合物**4** 无色晶体 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ESI-MS  $m/z$  425.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.65(1H, s, H-4), 5.57(1H, s, H-7), 5.25(1H, dd,  $J = 15.3, 7.5$  Hz, H-23), 5.16(1H, dd,  $J = 15.3, 8.3$  Hz, H-22), 2.82(1H, m, H-9), 2.69(1H, ddd,  $J = 18.5, 14.7, 5.0$  Hz, H-2a), 2.31(1H, dd,  $J = 12.0, 6.4$  Hz, H-14), 2.14 ~ 2.24(2H, m, H-1a, 2b), 2.02(1H, m, H-20), 1.94(1H, m, H-12a), 1.91 ~ 1.83(2H, m, H-1b, 15a, 24), 1.64 ~ 1.72(1H, m, H-16a), 1.43 ~ 1.56(4H, m, H-11a, 12b, 15b, 25), 1.34 ~ 1.40(2H, m, H-11b, 17), 1.20 ~ 1.31(1H, m, H-16b), 1.10(3H, s, H-19), 1.00(3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.88(3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 0.81(3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-26), 0.79(3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-27), 0.57(3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 33.4(C-1), 32.9(C-2), 198.4(C-3), 113.8(C-4), 173.6(C-5), 161.9(C-6), 111.8(C-7), 161.1(C-8), 46.0(C-9), 39.9(C-10), 21.9(C-11), 37.9(C-12), 46.7(C-13), 56.7(C-14), 24.9(C-15), 27.5(C-16), 56.3(C-17), 12.1(C-18), 19.4(C-19), 39.7(C-20), 20.9(C-21), 135.0(C-22), 131.8(C-23), 42.0(C-24), 32.5(C-25), 19.4(C-26), 19.8(C-27), 17.3(C-28)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[10]</sup>,故鉴定化合物**4**为 fortisterol。

化合物**5** 白色固体 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ESI-MS  $m/z$  451.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{actone}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ :



5.47 (1H, br s, H-7), 5.29 (1H, dd,  $J = 15.3, 7.4$  Hz, H-23), 5.23 (2H, dd,  $J = 15.3, 8.1$  Hz, H-22), 3.95 (1H, m, H-3), 2.60 (1H, m, H-9), 2.06 ~ 2.19 (4H, m, H-4a, 12a, 14, 20), 1.88 (1H, m, H-24), 1.72 ~ 1.84 (4H, m, H-1a, 1b, 11a, 16a), 1.55 ~ 1.68 (4H, m, H-2a, 4b, 11b, 15a), 1.45 ~ 1.53 (3H, m, H-12b, 15b, 25), 1.36 ~ 1.43 (3H, m, H-2b, 16b, 17), 1.06 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.94 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 0.91 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-26), 0.84 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-27), 0.65 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  NMR (actone- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 31.5 (C-1), 31.3 (C-2), 67.1 (C-3), 37.1 (C-4), 77.7 (C-5), 198.9 (C-6), 120.5 (C-7), 164.0 (C-8), 44.6 (C-9), 41.2 (C-10), 22.5 (C-11), 39.7 (C-12), 45.2 (C-13), 56.2 (C-14), 23.2 (C-15), 28.7 (C-16), 56.8 (C-17), 12.9 (C-18), 16.6 (C-19), 41.2 (C-20), 21.5 (C-21), 136.3 (C-22), 133.0 (C-23), 43.7 (C-24), 33.8 (C-25), 20.3 (C-26), 20.0 (C-27), 18.0 (C-28)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[11]</sup>, 故鉴定化合物 **5** 为 22*E*, 24*R*-3*P*, 5*a*-dihydroxyerogosta-7, 22-diene-6-one。

化合物 **6** 白色粉末 (CH<sub>3</sub>OH); ESI-MS  $m/z$  445.3 [M + H]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.58 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-7), 5.21 (1H, dd,  $J = 15.3, 7.5$  Hz, H-23), 5.14 (1H, dd,  $J = 15.3, 8.1$

Hz, H-22), 3.93 (1H, m, H-3), 2.72 (1H, ddd,  $J = 11.9, 6.8, 2.1$  Hz, H-14), 2.28 (1H, td,  $J = 13.9, 4.00$  Hz, H-1a), 1.98 ~ 2.04 (2H, m, H-4a, 20), 1.77 ~ 1.93 (5H, m, H-2a, 11a, 11b, 12a, 16a, 24), 1.71 (1H, m, H-12b), 1.63 (1H, dd,  $J = 14.1, 11.5$  Hz, H-4b), 1.58 (1H, m, H-15a), 1.38 ~ 1.50 (5H, m, H-1b, 2b, 15b, 17, 25), 1.33 (1H, m, H-16b), 1.00 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.96 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-28), 0.81 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-26), 0.80 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-27), 0.60 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 26.0 (C-1), 30.1 (C-2), 67.1 (C-3), 36.4 (C-4), 79.5 (C-5), 199.8 (C-6), 120.3 (C-7), 164.8 (C-8), 75.4 (C-9), 42.1 (C-10), 28.8 (C-11), 35.8 (C-12), 45.6 (C-13), 52.2 (C-14), 22.9 (C-15), 28.4 (C-16), 56.6 (C-17), 12.6 (C-18), 20.4 (C-19), 40.8 (C-20), 21.4 (C-21), 135.7 (C-22), 133.0 (C-23), 43.4 (C-24), 33.6 (C-25), 20.2 (C-26), 19.9 (C-27), 17.9 (C-28)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 (22*E*, 24*R*)-麦角甾-7, 22-二烯-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -三醇-6-酮。

### 3.3 细胞毒活性筛选结果

对分离得到的化合物 **1** ~ **3** 进行细胞毒活性筛选, 发现化合物 **3** 对 K562、HeLa、SGC-7901、A549 和 BEL-7402 均有一定的抑制作用, 结果表 2 所示。

Table 2 Cytotoxicity of compound **3** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Compd.	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol/L}$ )				
	K562	HeLa	SGC-7901	A549	BEL-7402
<b>3</b>	38.78 $\pm$ 0.11	104.77 $\pm$ 0.36	45.78 $\pm$ 0.55	56.01 $\pm$ 0.36	65.56 $\pm$ 0.55
Cisplatin	3.08 $\pm$ 0.05	4.02 $\pm$ 0.06	4.11 $\pm$ 0.02	1.93 $\pm$ 0.02	4.02 $\pm$ 0.06
Taxol	1.04 $\pm$ 0.13	1.02 $\pm$ 0.09	1.44 $\pm$ 0.48	3.81 $\pm$ 0.26	0.76 $\pm$ 0.04

## 4 讨论

本研究从藤壶内生真菌 *Aspergillus* sp. Dq-25 中共分离得到了 6 个化合物, 包括 3 个丁内酯类化合物和 3 个甾体类化合物, 其中化合物 **1** 为新化合物。通过细胞毒活性筛选发现丁内酯类化合物 **3** 具有一定的细胞毒活性, 但 **1** 和 **2** 未筛选到活性。通过结构对比, 发现区别仅在于 4 位链接的脂肪链, 推测可能脂肪链上的双键对该类化合物的细胞毒活性具有一定的促进作用, 但还需更多实验

进行验证。丁内酯类化合物是具有五元不饱和内酯环, 具有广泛的生物活性, 包括抗菌<sup>[13]</sup>、抗肿瘤<sup>[14]</sup>和抗病毒<sup>[15]</sup>等, 是天然产物中一类重要的次生代谢产物, 也是药物研究的热点关注结构之一<sup>[16]</sup>。本研究为丁内酯类化合物的进一步开发利用提供了科学参考。

本研究中尚未对甾体类化合物 **4** ~ **6** 进行细胞毒活性筛选, 但文献报道化合物 **5** 和 **6** 均有细胞毒活性<sup>[11-12]</sup>, 所以该菌株代谢产物中的细胞毒活性成

分的化学结构具有多样性,后续有必要对不同类型结构进行深入研究。

## References

- [1] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, *et al.* Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, **38**(2):362-413.
- [2] Bhatnagar I, Kim SK. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds [J]. *Mar Drugs*, 2010, **8**(10): 2673-2701.
- [3] Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, *et al.* Marine natural products [J]. *Nachrichten Aus Der Chemie*, 2018, **35**(8):235-254.
- [4] Wang L, Jiao JY, Liu D, *et al.* Cytotoxic meroterpenoids from the fungus *Alternaria* sp. JJY-32 [J]. *Chem Biodivers*, 2020, **17**(7):e2000226.
- [5] Zhou YM, Debbab A, Wray V, *et al.* Marine bacterial inhibitors from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp [J]. *Tetrahedron Lett*, 2014, **55**(17):2789-2792.
- [6] Du XW, Liu D, Huang J, *et al.* Polyketide derivatives from the sponge associated fungus *Aspergillus europaeus* with antioxidant and NO inhibitory activities [J]. *Fitoterapia*, 2018, **130**: 190-197.
- [7] Zheng H, Mei WL, Cai CH, *et al.* Study on the secondary metabolites and their bioactivities of the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. HK-08 from the leaves of *Nerium indicum* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2020, **32**(1):75-80.
- [8] Phainuphong P, Rukachaisirikul V, Tadpetch K, *et al.*  $\gamma$ -Butenolide and furanone derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178 [J]. *Phytochemistry*, 2017, **137**:165-173.
- [9] Kimura Y, Nakahara S, Fujioka S. Aspyrone a nematocidal compound isolated from the fungus, *Aspergillus melleus* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60**(8):1375-1376.
- [10] Huang XC, Guo YW, Song GQ. Fortisterol, a novel steroid with an unusual seven-membered lactone ring B from the Chinese marine sponge *Biemna fortis* Topsent [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, **8**(6):485-489.
- [11] Fangkrathok N, Sripanidkulchai B, Umehara K, *et al.* Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus poly-chrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells [J]. *Nat Prod Res*, 2013, **27**(18): 1611-1619.
- [12] Gong QF, Zhang YM, Tan NH, *et al.* Chemical constituents of Basidiomycetes *Russula subnigricans* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, **19**:436-438.
- [13] Chen M, Wang KL, Liu M, *et al.* Bioactive steroid derivatives and butyrolactone derivatives from a Gorgonian-derived *Aspergillus* sp. fungus [J]. *Chem Biodivers*, 2015, **12**(9):1398-1406.
- [14] Parvatkar RR, D'Souza C, Tripathi A, *et al.* Aspermolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus* [J]. *Phytochemistry*, 2009, **70**(1):128-132.
- [15] Gao HQ, Guo WQ, Wang Q, *et al.* Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* Gwq-48 with anti-influenza A viral (H1N1) activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, **23**(6):1776-1778.
- [16] Liu B, Tang ZJ, Chen N, *et al.* Research progress of butyrolactones isolated from marine-derived *Aspergillus* sp [J]. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物), 2021, **40**(5):59-70.