

文章编号: 1674-7054(2017)01-0029-08

角果木内生真菌 *Cladosporium cladosporioides* JG-12 次生代谢产物及其生物活性

崔岩^{1,2}, 王佩², 孔凡栋², 梅文莉², 郭志凯², 陈惠琴², 戴好富^{1,2}

(1. 海南大学环境与植物保护学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口 571101)

摘要: 采用多种柱色谱技术对角果木内生真菌 *Cladosporium cladosporioides* JG-12 的次生代谢产物进行分离纯化, 通过波谱数据分析, 结合理化常数对化合物的结构进行鉴定, 同时, 对化合物的抗菌活性、乙酰胆碱酯酶抑制活性以及全齿复活线虫 (*Panagrellus redivivus*) 抑制活性进行测试。结果表明, 从角果木内生真菌 *Cladosporium cladosporioides* JG-12 的次生代谢产物中分离鉴定了 6 个化合物, 分别为: (5*S*)-5-hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxy-phenyl)-1-phenyl-3-heptanone (1), ilicicolin H (2), 2-chloro-3, 5-dimethoxybenzyl alcohol (3), (7*R*)-methoxypurpuride (4), (5*aS*, 9*S*, 9*aS*)-1, 3, 4, 5, 5*a*, 6, 7, 8, 9, 9*a*-decahydro-6, 6, 9*a*-trimethyl-3-oxonaphtho [1, 2-*c*] furan-9-yl N-acetyl-L-valinate (5), ergosterolperoxide (3 β -hydroxy-5, 8-epidioxy-ergosta-6, 22-diene) (6)。其中, 化合物 1 具有抗青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的活性, 化合物 3 具有抗白色念珠菌 (*Candida albicans*) 的活性; 化合物 1 和 3~5 具有全齿复活线虫抑制活性; 化合物 1~5 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性。

关键词: 角果木; 内生真菌; 化学成分; 生物活性

中图分类号: R 931.77 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.01.005

红树林是分布于热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落, 是陆地向海洋过渡的特殊生态系统, 为了适应这种特殊生存环境, 红树植物及其共附生微生物可能具有独特的适应机制和新陈代谢途径, 从而代谢产生生物活性多样的次生代谢产物^[1]。近年来, 在红树林的微生物中发现了大量的活性化合物, 其中, 红树林植物内生真菌是活性先导化合物的重要来源之一, 如具有抗菌活性的 2-O-acetylaltersolanol B^[2], Pestalotiopens A 和 B^[3] 等, 具有细胞毒活性的 marinamide^[4], 4-seco-sonderianol^[5] 等, 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的 Asperterpenol A 和 B^[6], anhydrojavanicin^[7] 等及具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的 botryorhodines E-G^[8] 等。本研究组从多株来源于红树植物根、茎、叶的内生真菌中分离得到萜类、萜酮及甾体等多种类型的化合物, 部分化合物表现出抗菌和细胞毒性^[9-14]。为了进一步探究红树植物内生真菌的代谢潜力, 从中获得结构多样的活性化合物, 笔者继续进行红树林内生真菌的次生代谢产物研究。内生真菌 *Cladosporium cladosporioides* JG-12 分离自红树林植物角果木根部, 其发酵产物乙酸乙酯提取物在 10 g · L⁻¹ 浓度下对青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 表现出一定的抑制活性。为了从中寻找活性化合物, 笔者对该菌株发酵产物乙酸乙酯提取物进行研究, 分离得到了 6 个化合物, 其中包括 2 个苯的衍生物、3 个生物碱及 1 个甾体类化合物。

收稿日期: 2016-12-08

修回日期: 2017-01-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (41506096); 海南省自然科学基金面上项目 (20163117); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (41406083); 海南省重点研发计划项目 (社会发展) (ZDYF2016140)

作者简介: 崔岩 (1992-), 男, 海南大学环境与植物保护学院 2014 级硕士研究生, E-mail: cuiyan502@163.com

通信作者: 戴好富 (1974-), 男, 研究员, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: daihaofu@itbb.org.cn

1 材料与amp;方法

1.1 菌株来源及其鉴定 角果木 (*Ceriops tagal*) 来源于海南东寨港红树林自然保护区,由中国热带农业科学院热带生物技术研究所刘寿柏博士进行鉴定。内生真菌 JG-12 分离自角果木根部,通过分子克隆手段,以 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 作为引物,对该菌株 18S rDNA 基因序列进行测定,将测序结果提交于 NCBI 基因库,并与 BLAST 数据库进行同源比对,比对结果显示,菌株 JG-12 与 *Cladosporium cladosporioides* 相似度达 100%。因此,鉴定该菌株为 *Cladosporium cladosporioides*。菌种保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究所农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室。

1.2 仪器与试剂 DHG-9075A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),质谱仪 Autospec300(Bruker),Polar-L 型旋光仪(CATACrO Co. Ltd),CA-1111 冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司),核磁共振波谱仪 Bruker AV-500(Bruker),核磁共振波谱仪 Bruker AV-600(Bruker),旋转蒸发仪(Heidolph Laborota),PYX-300Q 人工气候箱(广东科力公司),高压湿热灭菌锅(Sanyo),酶标仪(BioTek Instruments, Inc.),CO₂ 培养箱(RS Biotech Ltd.),SW-CJ-1F 超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司),ZWY-2112B 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司),Agilent Technologies 1260 (Hewlett Packard 公司);RP-18 和 Sephadex LH-20(Merck 公司),薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂产品),Kanamycin Sulfate(上海生工有限公司),万古霉素(上海金穗生物科技有限公司),醋酸氯己定(宜昌永诺药业有限公司),他克林(Sigma 公司),5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB),乙酰胆碱酯酶等。

1.3 指示菌及测试线虫 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 来源于海南省药品检验所;白色念珠菌 (*Candida albicans*) 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供;青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和全齿复活线虫 (*Panagrellus redivivus*) 由云南大学生物资源保护利用重点实验室莫明和教授提供。

1.4 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g·L⁻¹,葡萄糖 20 g·L⁻¹,琼脂 15 g·L⁻¹,自来水定容至 1L;马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB):马铃薯 200 g·L⁻¹,葡萄糖 20 g·L⁻¹,自来水定容至 1L;大米培养基:大米 80 g,自来水 160 mL。

1.5 菌株发酵 将内生真菌 *Cladosporium cladosporioides* JG-12 于 PDA 培养基上进行活化后,挑取黄豆粒大小的菌块,接种于装有 150 mL PDB 培养基的 500 mL 三角瓶中,于 28 °C 条件下,以转速为 150 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 3 d,获得发酵种子液。取 5 mL 种子液接种于事先准备好的大米培养基中,室温条件下静置培养 60 d,共发酵 60 瓶。

1.6 菌株次生代谢产物的提取与分离纯化 待菌株发酵结束后,用浓度为 95% 的工业乙醇对菌株发酵产物进行浸提,经多层纱布过滤得发酵产物上清液,将上清液于 20 L 圆底烧瓶中,55 °C 条件下减压浓缩得乙醇提取物,将所得乙醇提取物经水悬浮,以等体积的乙酸乙酯萃取 3 遍,合并乙酸乙酯层,减压浓缩得到乙酸乙酯萃取物(7.1 g)。

乙酸乙酯提取物经减压硅胶柱色谱,以石油醚-氯仿和氯仿-甲醇为流动相梯度洗脱,得到 12 个流份(Fr. 1~Fr. 12)。Fr. 6(2.4 g)经 RP-18 柱色谱,以甲醇-水梯度洗脱得到 45 个流份(Fr. 6-1~Fr. 6-45)。Fr. 6-25(102.8 mg)分别以甲醇-氯仿(体积比为 1:1)和纯甲醇为流动相,经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱进行分离,再经硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(体积比 12:1~5:1)梯度洗脱得化合物 1(5.5 mg);Fr. 6-26(117.7 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,分别以甲醇-氯仿(体积比 1:1)和纯甲醇系统洗脱后,再以甲醇-水系统(体积比为 65:35)为流动相,经高效液相色谱(HPLC)半制备分离得到化合物 4(t_R 10.0 min, 5.1 mg)和 5(t_R 10.9 min, 30.6 mg);Fr. 5(231.4 mg)以甲醇为流动相,经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,合并得到 6 个流份(Fr. 5-1~Fr. 5-6)。Fr. 5-2(69.0 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,丙

酮洗脱,再经硅胶柱色谱分离,以石油醚-乙酸乙酯(体积比 40:1~15:1)梯度洗脱得化合物 6(1.2 mg)。Fr. 5-6(8.7 mg)以甲醇-水系统(体积比为 60:40)为流动相,经高效液相色谱(HPLC)半制备分离得化合物 3(t_R 9.8 min, 7.0 mg); Fr. 7(423.3 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,以纯甲醇系统进行洗脱得 6 个流份(Fr. 7-1~Fr. 7-6)。Fr. 7-4(15.3 mg)经硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(体积比 15:1~8:1)梯度洗脱,得化合物 2(4.6 mg)。

1.7 抗菌活性测试 采用滤纸片琼脂扩散法^[15]对单体化合物的抗菌活性进行测试。青枯雷尔氏菌和金黄色葡萄球菌采用 NA 培养基进行培养,以 YPD 培养基培养白色念珠菌。将样品溶于氯仿甲醇混合溶液中,配制成终浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液,取 $25 \mu\text{L}$ 样品溶液滴加于事先准备好的灭菌滤纸片上,待溶剂挥发纸片完全干燥后,将其贴于涂有 $100 \mu\text{L}$ 测试菌悬液(菌液浓度 $10^5 \sim 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)的培养皿中。将培养皿置于培养箱中进行培养,青枯雷尔氏菌(硫酸卡那霉素为阳性对照)和金黄色葡萄球菌(万古霉素作为阳性对照)于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养,白色念珠菌(醋酸氯己定作为阳性对照)于 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养,12 h 后观察抑菌情况,并测量抑菌圈直径进行记录,以氯仿甲醇混合溶液作为阴性对照。

1.8 全齿复活线虫抑制活性测试^[16] 将全齿复活线虫接种于燕麦培养基上, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养 7~10 d。按贝曼漏斗法,利用多层擦镜纸于无菌水中过滤线虫 3 次,得到线虫悬浮液。将 1 mg 待测样品溶于 $20 \mu\text{L}$ DMSO 中配制待测样品溶液。于 96 孔板中,每个孔加入 $30 \mu\text{L}$ 线虫悬浮液(约 200~300 条线虫),并加入无菌水 $65 \mu\text{L}$ 和待测样品溶液 $5 \mu\text{L}$ (待测样品终浓度为 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),混合均匀后,室温条件下培养 24 h, DMSO 为阴性对照,阳性对照为阿苯达唑(终浓度为 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),在解剖镜下观察并计数线虫死亡数,统计的线虫数量大于 100 条。每个待测样品设置 3 组平行。

$$\text{线虫死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{计数线虫总数}} \times 100\%$$

$$\text{线虫校正死亡率}(\%) = \frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100\%$$

1.9 乙酰胆碱酯酶抑制活性测定 使用 Ellman^[17]法对化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性进行评价。使用 pH 8.0 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液(PBS 溶液)作为反应溶液。待测样品溶液的配制: 1 mg 待测化合物溶解于 $20 \mu\text{L}$ 的二甲基亚砜后,取 $2 \mu\text{L}$ 的该溶液加至 $98 \mu\text{L}$ 的 PBS 溶液中,配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的待测化合物溶液。将以下各溶液混匀于 96 孔酶标板后置于酶标仪中: 实验组 $10 \mu\text{L}$ 待测样品溶液 + $110 \mu\text{L}$ PBS 溶液 + $40 \mu\text{L}$ PBS 溶液溶解的 $0.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 乙酰胆碱酯酶溶液(A), 阴性对照 $10 \mu\text{L}$ 2% 的 DMSO-PBS 溶液 + $40 \mu\text{L}$ PBS 溶液溶解的 $0.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 乙酰胆碱酯酶溶液(B), 阳性对照 $10 \mu\text{L}$ 的 $6.66 \mu\text{M}$ 他克林溶液 + $110 \mu\text{L}$ PBS 溶液 + $40 \mu\text{L}$ PBS 溶液溶解的 0.1 U/mL 乙酰胆碱酯酶溶液, 背景对照 $10 \mu\text{L}$ 待测样品溶液 + $150 \mu\text{L}$ PBS 溶液(A_0), 空白对照 $10 \mu\text{L}$ 2% 的 DMSO-PBS 溶液 + $150 \mu\text{L}$ 的 PBS 溶液(B_0)。将 96 孔板于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 20 min 后,各组均加入等体积混合的 6.25 mM 的 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)溶液与 6.25 mM 的硫代乙酰胆碱溶液 $40 \mu\text{L}$; 将 96 孔板于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 30 min 后,于酶标仪 405 nm 波长下测量每孔的 OD 值吸光度并计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制活性。计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{[(B - B_0) - (A - A_0)]}{(B - B_0)} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 角果木内生真菌 6 种化合物的鉴定结果 化合物 1: 黄色油状, $[\alpha]_D^{20} = 17.4$ ($c = 0.31$, CHCl_3), ESI-MS 在 m/z 351 处给出 $[M + \text{Na}]^+$ 峰, 结合 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 数据推测该化合物分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.28(2H, t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, H-3', H-5'), 7.19(1H, dd, $J = 7.3, 7.3 \text{ Hz}$, H-4'), 7.16(2H, d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, H-2', H-6'), 6.81(1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-5''), 6.69(1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, H-2''), 6.66(1H, dd, $J = 2.0, 8.0 \text{ Hz}$, H-6''), 4.03(1H, m, H-5), 3.86(3H, s, 3''-OCH₃), 2.53~2.90(8H, m, H-1,

H-2, H-4, H-7) 1.58 ~ 1.67 (2H, m, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 31.5 (C-1), 45.1 (C-2), 211.4 (C-3), 49.4 (C-4), 67.0 (C-5), 38.5 (C-6), 29.6 (C-7), 140.8 (C-1'), 128.4 (C-2'), 128.7 (C-3'), 126.4 (C-4'), 128.7 (C-5'), 128.4 (C-6'), 133.8 (C-1''), 111.2 (C-2''), 146.6 (C-3''), 143.9 (C-4''), 114.4 (C-5''), 121.0 (C-6''), 55.9 (3" -OCH₃)。根据波谱数据和理化性质分析, 结合文献 [18] 比对, 化合物 1 被鉴定为 (5S)-5-hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxy-phenyl)-1-phenyl-3-heptan-one。

化合物 2: 黄色油状, $[\alpha]_D^{20} = -41.7$ ($c = 0.24$, MeOH), ESI-MS 在 m/z 456 处给出 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰, 结合 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 数据推测该化合物分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{NO}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.37 (1H, s, H-6), 7.29 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2', H-6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-3', H-5'), 5.35 (1H, m, H-21), 5.27 (1H, brs, H-17), 5.19 (1H, dd, $J = 9.3, 15.1$ Hz, H-20), 4.94 (1H, brd, $J = 9.0$ Hz, H-8), 2.54 (1H, m, H-9), 2.01 (1H, m, H-14 β), 1.80 (1H, overlap, H-11 β), 1.77 (1H, overlap, H-13 β), 1.72 (1H, overlap, H-15), 1.64 (3H, s, H-18), 1.56 (3H, dd, $J = 1.7, 6.4$ Hz, H-22), 1.36 (1H, m, H-12), 1.26 (1H, m, H-10), 0.94 (2H, overlap, H-13 α , H-14 α), 0.89 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-19), 0.56 (1H, m, H-11 α); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 163.6 (C-2), 107.3 (C-3), 176.7 (C-4), 115.5 (C-5), 138.6 (C-6), 210.2 (C-7), 53.7 (C-8), 45.1 (C-9), 43.3 (C-10), 39.5 (C-11), 32.9 (C-12), 35.7 (C-13), 29.9 (C-14), 44.5 (C-15), 139.1 (C-16), 119.0 (C-17), 21.2 (C-18), 22.9 (C-19), 133.1 (C-20), 126.5 (C-21), 18.1 (C-22), 124.8 (C-1'), 130.6 (C-2'), 115.6 (C-3'), 156.0 (C-4'), 115.6 (C-5'), 130.6 (C-6')。根据波谱数据和理化性质分析, 结合文献 [19] 比对, 化合物 2 被鉴定为 ilicicolin H。

化合物 3: 白色粉末, ESI-MS 在 m/z 225 处给出 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰, 结合 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱数据推断其分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClO}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 6.68 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-2), 6.46 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-4), 4.76 (2H, s, H-7), 3.88 (3H, s, 3-OCH₃), 3.82 (3H, s, 5-OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 142.3 (C-1), 104.7 (C-2), 156.3 (C-3), 98.8 (C-4), 160.1 (C-5), 111.7 (C-6), 62.0 (C-7), 56.4 (3-OCH₃), 55.7 (5-OCH₃)。根据波谱数据和理化性质分析, 结合文献 [20] 比对, 化合物 3 被鉴定为 2-chloro-3,5-dimethoxybenzyl alcohol。

化合物 4: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20} = 6.1$ ($c = 0.36$, MeOH), ESI-MS 在 m/z 445 处给出 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰, 结合 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱数据推断其分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.97 (1H, t, $J = 2.9$ Hz, H-9), 4.70 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-1 β), 4.56 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-1 α), 4.33 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-16), 4.06 (1H, m, H-4), 3.47 (3H, s, 4-OCH₃), 1.94 ~ 2.22 (6H, m, H-5 α , H-5 β , H-8 β , H-19), 1.80 (1H, m, H-8 α), 1.61 (1H, m, H-7 β), 1.54 (1H, m, H-5 α), 1.37 (1H, m, H-7 α), 1.26 (1H, m, H-20), 1.20 (3H, s, H-13), 1.05 (3H, s, H-11), 0.90 (9H, m, H-12, H-21, H-22); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 68.2 (C-1), 173.1 (C-3), 125.9 (C-3a), 69.2 (C-4), 22.8 (C-5), 40.0 (C-5a), 32.4 (C-6), 35.2 (C-7), 22.3 (C-8), 74.5 (C-9), 41.7 (C-9a), 172.1 (C-10), 33.1 (C-11), 21.6 (C-12), 19.8 (C-13), 171.0 (C-15), 58.9 (C-16), 170.9 (C-18), 24.0 (C-19), 30.7 (C-20), 18.5 (C-21), 19.2 (C-22), 57.9 (4-OCH₃)。根据波谱数据和理化性质分析, 结合文献 [21] 比对, 化合物 4 被鉴定为 (7R)-methoxypurpuride。

化合物 5: 白色粉末, $[\alpha]_D^{20} = 24.3$ ($c = 0.63$, MeOH), ESI-MS 在 m/z 415 处给出 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰, 结合 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱数据推断其分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_5$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.97 (1H, t, $J = 2.9$ Hz, H-9), 4.69 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-1 β), 4.45 (2H, m, H-1 α , H-16), 2.37 ~ 2.43 (1H, m, H-5 β), 2.01 ~ 2.22 (1H, m, H-4 β), 2.00 (3H, s, H-19), 1.90 ~ 1.97 (2H, m, H-8 β , H-20), 1.78 ~ 1.85 (1H, m, H-5 α), 1.76 (1H, dd, $J = 2.0, 12.8$ Hz, H-5a), 1.47 ~ 1.62 (2H, m, H-7 β , H-8 α), 1.30 ~ 1.37 (1H, m, H-7 α), 1.24 (3H, s, H-13), 1.01 (3H, s, H-11), 0.96 (1H, m, H-4 α), 0.94 (3H, s, H-12), 0.90 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-22), 0.83 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-21); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 68.2 (C-1), 170.3 (C-3), 126.2 (C-3a), 21.7 (C-4), 21.6 (C-5), 45.5 (C-5a), 32.8 (C-6), 35.0 (C-7), 22.5 (C-8), 75.3 (C-9), 41.0 (C-9a),

167.2 (C-10) 33.3 (C-11) 19.2 (C-12) 21.4 (C-13) 174.1 (C-15) 57.9 (C-16) 171.5 (C-18) 23.1 (C-19) 30.9 (C-20) 17.6 (C-21) 17.9 (C-22)。根据波谱数据和理化性质分析,结合文献[21]比对,化合物 5 被鉴定为(5*aS*, 9*S*, 9*aS*)-1, 3, 4, 5, 5*a*, 6, 7, 8, 9, 9*a*-decahydro-6, 6, 9*a*-trimethyl-3-oxonaphtho[1, 2-*c*]furan-9-yl *N*-acetyl-L-valinate。

化合物 6: 黄色油状, $[\alpha]_D^{20} = -31.4$ ($c = 0.06$, CHCl_3)。ESI-MS 在 m/z 451 处给出 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰, 结合 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱数据推断其分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3COCD_3 , 600 MHz) δ : 6.49 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-7) 6.23 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-6) 5.30 (1H, *dd*, $J = 7.7, 15.3$ Hz, H-23) 5.23 (1H, *dd*, $J = 8.3, 15.3$ Hz, H-22) 3.78 (1H, *m*, H-3) 2.06 ~ 2.10 (2H, *m*, H-4 β , H-20) 1.69-2.02 (7H, *m*, H-1 α , H-1 β , H-2 β , H-4 α , H-12 β , H-16 β , H-24) 1.39 ~ 1.68 (7H, *m*, H-2 α , H-9, H-11 β , H-14, H-15 α , H-15 β , H-25) 1.22 ~ 1.29 (2H, *m*, H-11 α , H-12 α , H-16 α , H-17) 1.02 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-21) 0.93 (3H, *d*, $J = 6.9$ Hz, H-28) 0.89 (3H, *s*, H-19) 0.85 (6H, *m*, H-18, H-27) 0.83 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3COCD_3 , 150 MHz) δ : 35.7 (C-1) 31.1 (C-2) 66.3 (C-3) 38.1 (C-4) 82.4 (C-5) 136.5 (C-6) 131.2 (C-7) 79.4 (C-8) 52.5 (C-9) 37.8 (C-10) 21.3 (C-11) 40.3 (C-12) 45.2 (C-13) 52.7 (C-14) 24.0 (C-15) 29.4 (C-16) 57.0 (C-17) 13.2 (C-18) 18.5 (C-19) 40.6 (C-20) 21.3 (C-21) 136.5 (C-22) 132.9 (C-23) 43.7 (C-24) 33.8 (C-25) 20.3 (C-26) 20.0 (C-27) 18.1 (C-28)。根据波谱数据和理化性质分析,结合文献[22]比对,化合物 6 被鉴定为 ergosterolperoxide (3 β -hydroxy-5, 8-epidioxyergosta-6, 22-diene)。6 个化合物的分子结构式见图 1。

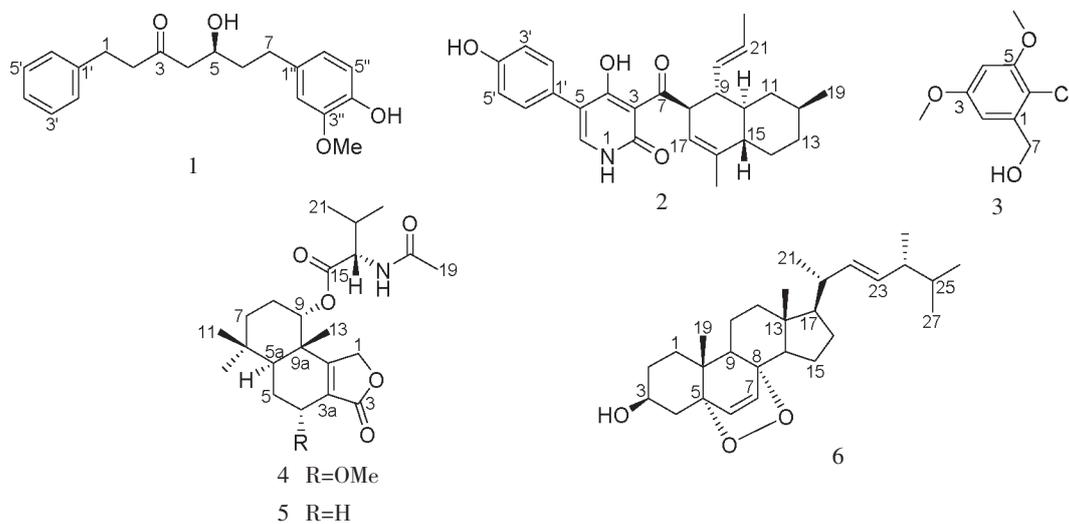


图 1 化合物 1~6 的结构式

Fig. 1 The structures of compounds 1-6

2.2 角果木内生真菌 6 种化合物的生物活性

2.2.1 抗菌活性测试结果 从表 1 可知,化合物 1 具有抗青枯雷尔氏菌和金黄色葡萄球菌的活性,化合物 3 具有抗白色念珠菌的活性,以上化合物抗菌活性均弱于阳性对照。

2.2.2 全齿复活线虫抑制活性测试结果 由表 2 可知,化合物 1, 3, 4 和 5 在浓度为 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,均可以显著抑制线虫生长,抑制率分别为 57.7% ($P < 0.01$) 89.6% ($P < 0.01$) 78.2% ($P < 0.01$) 和 80.7% ($P < 0.01$)。阳性对照阿苯达唑抑制率为 37.2% ($2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$)。由此可见,4 个化合物均具有全齿复活线虫抑制活性,且均强于阳性对照阿苯达唑,其中化合物 3 活性最好。

表 1 角果木内生真菌化合物 1 和 3 的抗菌活性
Tab. 1 Anti-bacterial activities of compounds 1 and 3

化合物 Compound	抑菌圈直径/mm IZD		
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	青枯雷尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>
1	6.45 ± 0.11	6.29 ± 0.10	-
3	-	-	7.43 ± 0.12
万古霉素 Vancomycin	17.62 ± 0.08	ND	ND
硫酸卡那霉素 Kanamycin Monosulfate	ND	25.16 ± 0.06	ND
醋酸氯己定 Chlorhexidine Acetate	ND	ND	12.00 ± 0.09

注：“-”表示无活性，“ND”表示未进行检测；抗菌活性测试所用滤纸片为“5.5 mm”
Note：“-” means inactive, “ND” shows not detected for testing; the diameter of the filter is “5.5 mm”

表 2 角果木内生真菌化合物 1 和 3~5 的线虫抑制活性
Tab. 2 Anti-nematode activities of compounds 1 and 3-5

化合物 Compound	线虫校正死亡率/% Nematodes corrected mortality
1	57.7 ± 2.1**
3	89.6 ± 0.9**
4	78.2 ± 0.7**
5	80.7 ± 0.4**
阿苯达唑 Albendazole	37.2 ± 0.3**

注：与空白组相比，** $P < 0.01$ ；阿苯达唑为阳性对照
Note: comparing with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Albendazole was used as positive control

2.2.3 乙酰胆碱酯酶抑制活性测试结果 由表 3 可知,化合物 1 2 3 4 和 5 在浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时作用于乙酰胆碱酯酶后,均可以显著抑制乙酰胆碱酯酶,抑制率分别为 23.54% ($P < 0.01$) 37.20% ($P < 0.01$), 25.43% ($P < 0.01$) 26.94% ($P < 0.05$) 和 26.35% ($P < 0.01$),由此可见 5 个化合物均具有全齿复活线虫抑制活性。

表 3 角果木内生真菌化合物 1~5 的乙酰胆碱酯酶抑制活性
Tab. 3 Anti-acetylcholinesterase activities of compounds 1-5

化合物 Compound	抑制率/% Inhibition rate	化合物 Compound	抑制率 Inhibition rate
1	23.54 ± 0.70**	4	26.94 ± 5.64*
2	37.20 ± 1.31**	5	26.35 ± 1.55**
3	25.43 ± 1.08**	他克林 Tacrine	77.43 ± 1.47**

注：与空白组相比，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ；他克林为阳性对照
Note: Compared with the blank control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Tacrine was used as positive control

3 讨论

本研究利用多种柱色谱分离手段从红树植物角果木内生真菌 *Cladosporium cladosporioides* JG-12 的次生代谢产物中分离鉴定了 6 个化合物。生物活性测试结果表明,化合物 1 对青枯雷尔氏菌和金黄色葡萄

球菌具有弱的抑制活性,化合物 3 对白色念珠菌具有抑制活性,化合物 1~5 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性,化合物 1 和 3~5 具有全齿复活线虫抑制活性。

先导化合物中引入卤原子是一种普遍的结构修饰手段,引入卤素可增加药物的有效性和生物利用度、延长半衰期等^[23]。研究表明,利用富含卤离子的培养基对一些极端微生物进行培养,其能够产生结构新颖的卤代化合物^[24]。本研究结果表明,红树林内生真菌 *Cladosporium cladosporioides* JG-12 能够产生多种活性多样的化合物,其中化合物 3 为氯化化合物,表明该菌能利用培养基中的氯离子代谢产生氯化化合物,因此,可以通过添加溴代物对其进行培养,尝试获得溴代化合物,进一步对其生物活性进行研究,从中发现新的活性先导化合物。同时,据文献报道,倍半萜烯醇酯类化合物具有抗菌^[21]和细胞毒活性^[25],本研究首次报道了该类化合物 4 和 5 的抗线虫活性,为该类化合物提供了新的活性研究方向。可对菌株 *Cladosporium cladosporioides* JG-12 进一步研究,在本研究的基础上,对其发酵条件进行优化,利用 HPLC-UV-MS 联用的检测技术、以全齿复活线虫抑制活性跟踪为指导,并结合有机合成手段,获得系列倍半萜烯醇酯类化合物,对其抑制线虫活性进行深入研究,为研究农业病原线虫抑制剂提供物质基础。

参考文献:

- [1] 林鹏. 中国红树林研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 592-603.
- [2] Zhou X M, Zheng C J, Chen G Y, et al. Bioactive anthraquinone derivatives from the mangrove-derived fungus *Stemphylium* sp. 33231 [J]. *Journal of Natural Products*, 2014, 77(9): 2021-2028.
- [3] Hemberger Y, Xu J, Wray V, et al. Pestalotiopsis A and B: Stereochemically challenging flexible sesquiterpene-cyclopaldic acid hybrids from *Pestalotiopsis* sp [J]. *Chemistry-A European Journal*, 2013, 19(46): 15556-15564.
- [4] Zhu F, Chen G Y, Wu J S, et al. Structure revision and cytotoxic activity of marinamide and its methyl ester, novel alkaloids produced by co-cultures of two marine-derived mangrove endophytic fungi [J]. *Natural Product Research*, 2013, 27(21): 1960-1964.
- [5] Zeng Y B, Gu H G, Zuo W J, et al. Two new sesquiterpenoids from endophytic fungus J3 isolated from mangrove plant *Ceriops tagal* [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2015, 38(5): 673-676.
- [6] Huang X, Huang H, Li H, et al. Asperterpenoid A, a new Sesterterpenoid as an inhibitor of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B from the culture of *Aspergillus* sp. 16-5c [J]. *Organic Letters*, 2013, 15(4): 721-723.
- [7] Deng C M, Liu S X, Huang C H, et al. Secondary metabolites of a mangrove endophytic fungus *Aspergillus terreus* (No. GX7-3B) from the South China Sea [J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(7): 2616-2624.
- [8] Chen S, Liu Z, Liu Y, et al. New depsidones and isoindolinones from the mangrove endophytic fungus *Meyerozyma guilliermondii* (HZ-Y2) isolated from the South China Sea [J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2015, 11(1): 1187-1193.
- [9] Jin P F, Zuo W J, Guo Z K, et al. Metabolites from the endophytic fungus *Penicillium* sp. FJ-1 of *Ceriops tagal* [J]. *Acta Pharm. Sin* 2013, 48(11): 1688-1691.
- [10] 古海刚, 白红进, 曾艳波, 等. 中国红树植物角果木内生真菌的分离及其初步鉴定 [J]. *微生物学杂志*, 2012, 32(6): 1-6.
- [11] 古海刚, 戴好富, 白红进, 等. 红树植物角果木内生真菌 J62 生物活性成分研究 [J]. *中国海洋药物*, 2014, 33(4): 1-7.
- [12] 丘柳明, 左文健, 王辉, 等. 角果木内生真菌 *Penicillium* sp. J54 代谢产物及活性研究 [J]. *中国海洋药物*, 2015, 34(2): 17-21.
- [13] 陈亮亮, 王佩, 王昊, 等. 角果木内生真菌 *Corioliopsis* sp. J5 代谢产物及活性研究 [J]. *中国海洋药物*, 2016, 35(2): 7-12.
- [14] 李元铭, 郭志凯, 王佩, 等. 海南海桑内生真菌 *Bionectria ochroleuca* HHS111023 次生代谢产物的研究 [J]. *中国海洋药物*, 2016, 35(2): 1-6.
- [15] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1651-1653.
- [16] 马青云, 黄圣卓, 李红芳, 等. 杠板归中化学成分生活活性研究 [J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(21): 5245-5247.
- [17] Ellman G L, Courtney K D, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem. Pharmacol*, 1961, 7(2): 88-95.
- [18] Itokawa H, Morita H, Midorikawa I, et al. Diarylheptanoids from the rhizome of *Alpinia officinarum* Hance [J]. *Chem. Pharm. Bull*, 1985, 33(11): 4889-4893.

- [19] 邵志宇,冯永红,邓云霞,等. 互花米草内生真菌 *Fusarium* sp. F4 中的活性代谢物[J]. 中国天然药物,2007,5(2): 108-111.
- [20] Nozawa K, Nakajima S, Kawai K I. Synthesis of 6-chloro-3,5-dimethoxyhomophthalic acid, a key intermediate for the synthesis of radicicol and natural isocoumarin[J]. Chem. Pharm. Bull., 1980, 28(4): 1112-1116.
- [21] Wang H, Wang Y, Liu P, et al. Purpurides B and C, Two new sesquiterpene esters from the aciduric fungus *Penicillium purpogenum* JS03-21[J]. Chem. Biodiversity, 2013, 10(7): 1185-1192.
- [22] Shen G, Oh S R, Min B S, et al. Phytochemical investigation of *Tiarella polyphylla* [J]. Arch. Pharmacol. Res., 2008, 31(1): 10-16.
- [23] 王心,王佩,朱统汉,等. 微生物生物活性卤代化合物的研究进展[J]. 中国海洋药物,2011,30(6): 40-51.
- [24] Murphy C D. Biodegradation and biotransformation of organofluorine compounds[J]. Biotechnol. Lett. 2010, 32(3): 351-359.
- [25] Ngokpol S, Suwakulsiri W, Sureram S, et al. Drimane sesquiterpene-conjugated amino acids from a marine isolate of the fungus *Talaromyces minioluteus* (*Penicillium minioluteum*) [J]. Mar. Drugs, 2015, 13(6): 3567-3580.

Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Cladosporium cladosporioides* JG-12 of *Ceriops tagal* and Their Biological Activity

CUI Yan^{1,2}, WANG Pei², KONG Fandong², MEI Wenli², GUO Zhikai², CHEN Huiqin², DAI Haofu^{1,2}

(1. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops/ Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

Abstract: The secondary metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* JG-12 of *Ceriops tagal* were isolated and purified by various column chromatographic techniques. The structures of the compounds were identified through a combined analysis of physicochemical properties and spectroscopic evidence. The compounds were tested to observed their anti-bacterial, anti-acetylcholinesterase activities and their inhibitory activity against *Panagrellus redivivus* *in vitro*. Six compounds were isolated from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* JG-12 of *Ceriops tagal*, and their structures were determined as (5*S*)-5-hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxy-phenyl)-4-phenyl-3-heptanone (1), ilicicolin H (2), 2-chloro-3,5-dimethoxybenzyl alcohol (3), (7*R*)-methoxypurpuride (4), (5*aS*, 9*S*, 9*aS*)-1,3,4,5,5*a*,6,7,8,9,9*a*-decahydro-6,6,9*a*-trimethyl-3-oxonaphtho[1,2-*c*]furan-9-yl N-acetyl-L-valinate (5), ergosterolperoxide (3*β*-hydroxy-5,8-epidioxyergosta-6,22-diene) (6). The Compound 1 showed weak inhibitory effect against *Ralstonia solanacearum* and *Staphylococcus aureus*, and the Compound 3 exhibited inhibitory effect against *Candida albicans*. The Compounds 1 and 3-5 displayed their inhibitory activities against *Panagrellus redivivus*. The Compounds 1-5 revealed their inhibitory activities against acetylcholinesterase.

Keywords: *Ceriops tagal*; endophytic fungus; chemical constituent; bioactive activities