

• 医药生物技术 •

## 艾纳香内生真菌粉红粘帚霉抗菌次生代谢产物

舒雪纯<sup>1</sup>, 张影波<sup>2</sup>, 官玲亮<sup>2</sup>, 陈振夏<sup>2</sup>, 黄梅<sup>2</sup>, 陈晓鹭<sup>2</sup>, 袁媛<sup>3</sup>, 元超<sup>2</sup>

1 海南大学 林学院, 海南 海口 570228

2 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 海南省热带药用植物工程研究中心, 海南 儋州 571737

3 广东药科大学 生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006

舒雪纯, 张影波, 官玲亮, 等. 艾纳香内生真菌粉红粘帚霉抗菌次生代谢产物. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1650–1658.

Shu XC, Zhang YB, Guan LL, et al. Antibacterial secondary metabolites of *Clonostachys rosea*, an endophytic fungus from *Blumea balsamifera* (L.) DC. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1650–1658.

**摘要:** 植物内生真菌一直是发现结构新颖、活性广泛的化合物的重要宝库。文中对一株艾纳香内生真菌粉红粘帚霉 *Clonostachys rosea* 进行化学研究, 通过活性跟踪手段, 结合硅胶柱色谱、凝胶色谱、以及半制备液相色谱技术从该菌株的发酵提取物中共分离获得 6 个单体化合物, 经波谱学技术结合质谱鉴定其分别为 verticillin A (1)、(S)-(+)-fusarinolic acid (2)、8-hydroxyfusaric acid (3)、cerebroside C (4)、3-Maleimide-5-oxime (5) 以及 bionectriol A (6)。所有化合物进行了体外抗大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌以及铜绿假单胞菌 4 株细菌的活性评价, 其中 1、4 和 6 对 3 株细菌表现出显著的抑菌活性, MIC 值 2–16 μg/mL。研究结果为从黎药植物艾纳香的内生真菌中寻找新型抗生素提供重要参考。

**关键词:** 艾纳香, 内生真菌, 次生代谢产物, 抗菌活性

## Antibacterial secondary metabolites of *Clonostachys rosea*, an endophytic fungus from *Blumea balsamifera* (L.) DC.

Xuechun Shu<sup>1</sup>, Yingbo Zhang<sup>2</sup>, Lingliang Guan<sup>2</sup>, Zhenxia Chen<sup>2</sup>, Mei Huang<sup>2</sup>, Xiaolu Chen<sup>2</sup>, YuanYuan<sup>3</sup>, and Chao Yuan<sup>2</sup>

1 College of Forestry, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

2 Tropical Crops Genetic Resources Institute, CATAS/Hainan Provincial Engineering Research Center for Tropical Medicinal Plant, Danzhou 571737, Hainan, China

3 School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

**Abstract:** Endophytic fungus is an important treasure trove for discovery of structurally unusual and biologically diverse

**Received:** December 12, 2019; **Accepted:** February 13, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81560624), Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund for Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (No. 1630032019045), Hainan Provincial Natural Science Foundation of China (No. 219MS079).

**Corresponding authors:** Chao Yuan. Tel: +86-898-23300645; E-mail: yuanchao79@126.com

Yuan Yuan. E-mail: yuanyuanhaida@126.com

国家自然科学基金 (No. 81560624), 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金 (No. 1630032019045), 海南省自然科学基金 (No. 219MS079) 资助。

compounds. A phytochemical investigation on a fungus *Clonostachys rosea* inhabits inner tissue of *Blumea balsamifera* (L.) DC. was initiated recently in our lab. Six pure compounds were isolated through silica gel column chromatography, sephadex LH-20, and semi-preparative HPLC techniques, with bio-guided strategy. Their structures were characterized as verticillin A (1), (S)-(+)-fusarinolic acid (2), 8-hydroxyfusaric acid (3), cerebroside C (4), 3-Maleimide-5-oxime (5), and bionectriol A (6) by analyses of NMR and MS data. All compounds were tested *in vitro* antibacterial activities against four strains of bacteria, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, and results revealed that 1, 4 and 6 display notable inhibition against three bacteria, with MIC values ranging from 2 to 16  $\mu\text{g/mL}$ . Our findings provide references for mining novel antibiotics from endophytes originated from Li Minority medicinal plant *B. balsamifera* (L.) DC.

**Keywords:** *Blumea balsamifera* (L.) DC., endophytes, secondary metabolites, antimicrobial activity

艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 为菊科艾纳香属多年生草本植物, 又名大风艾、冰片艾<sup>[1]</sup>, 广泛分布在我国海南省、贵州省、广西壮族自治区等地<sup>[2]</sup>。其性温, 味辛苦, 具有祛风消肿、活血散瘀之功效<sup>[3]</sup>。作为传统黎药, 艾纳香首载于公元 741 年 (唐开元二十九年) 陈藏器所编著《本草拾遗》, 有着悠久的用药历史<sup>[4]</sup>。海南民间百姓经常将其用于刀枪伤口、虫蛇咬伤, 以及妇女的产后沐浴, 具有很好杀菌消炎功效<sup>[5-6]</sup>。现代药理学研究表明其具有较好的抗菌活性<sup>[7-8]</sup>。由于内生真菌与寄主植物在自然界的长期协同进化, 使从抗菌药用植物内生真菌中寻找抗菌先导化合物成为一种有效的策略<sup>[9]</sup>。

多种多样的内生真菌在植物体内微环境中存在复杂的相互作用, 微生物间通过分泌小分子次生代谢产物来相互抑制, 相互影响, 激烈地竞争着有限的生存空间和养分<sup>[10]</sup>, 微生物间的复杂互动, 诱导产生更加多样化的次生代谢产物, 因此, 植物内生真菌一直是寻找新型小分子活性先导化合物的重要源泉。目前有关艾纳香内生真菌次生代谢产物方面目前研究相对较少, 元超等<sup>[11]</sup>从艾纳香内生真菌间座壳菌 *Diaporthe* sp. 中获得 dicerandrol 类化合物, 其对多种病原菌表现出非常好的广谱抑菌性; 元超等<sup>[12]</sup>对分离自海南艾纳香植物中的一株多主棒孢霉 *Corynespora cassiicola* J9 内生真菌进行次生代谢产物的研究, 获得一个新的缩酚酸环醚类化合物, 而此类化合物多具有较强的抗菌活性; 郭玉华等<sup>[13]</sup>通过结合天然产物词典、活性筛选以及液相色谱质谱联用技术从一株艾纳香

内生真菌中获得一个活性化合物 cytochalasin H。Yuan 等<sup>[14]</sup>对一株艾纳香内生真菌炭团菌 *Hypoxyton investiens* J2 进行研究获得了 4 个结构新颖的  $\alpha$ -吡喃酮类化合物。上述研究结果均表明艾纳香内生真菌次生代谢产物具有很好的研究价值。

本研究在前期对实验室已有艾纳香内生真菌活性筛选的基础上, 获得 1 株抗菌活性较好的内生真菌粉红粘帚霉 *Clonostachys rosea*。为从中寻找新型抗菌活性先导化合物, 我们对该菌株进行了大规模发酵, 通过活性跟踪的技术对其活性组分进行分离, 最终获得 6 个单体化合物, 并对单体化合物进行了结构确证和体外抗菌活性评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料, 仪器和试剂

#### 1.1.1 内生真菌菌株

艾纳香内生真菌 *C. rosea* 为 2019 年 4 月元超等采用水琼脂培养基法分离自农业农村部儋州热带药用植物种质资源圃采集的黎药植物艾纳香 *B. balsamifera* (L.) DC.。

#### 1.1.2 细菌菌株

大肠埃希菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 9372)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), 由青岛大学药学院李刚老师赠送。

#### 1.1.3 仪器和试剂

核磁共振波谱仪 (Bruker Avance 500 MHz);

质谱仪 (Waters Synapt G2, USA); Waters 2489 半制备液相色谱系统 (Waters Corporation, Milford, MA, USA); 半制备色谱柱 YMC-Pack ODS-A (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 10 mm, 北京慧德易科技有限责任公司); 200–300 目柱层析硅胶和 GF254 薄层硅胶板 (青岛海洋化工厂); PDA、MHB (g/L, 牛肉粉 5.0, 淀粉 1.5, 酸水解酪蛋白 17.5, pH 值 7.2, 水 1 000)、MHA 培养基 (g/L, 牛肉粉 5.0, 淀粉 1.5, 酸水解酪蛋白 17.5, pH 值 7.2, 琼脂 17.0, 水 1 000) (青岛海博生物科技有限公司); 乙酸乙酯、二氯甲烷和甲醇均为分析纯 (天津市富宇精细化工有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 内生真菌的分子鉴定

艾纳香内生真菌的分子鉴定方法参考文献方法<sup>[11]</sup>, 提取基因组 DNA, PCR 扩增其 ITS-rDNA 片段, 所用引物为 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3')。将 PCR 扩增后的产物送北京六合华大基因科技有限公司武汉分公司进行测序, 将序列提交 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析。然后使用 MEGA-X 中 NJ 法构建系统发育树, 确定真菌种属地位。

### 1.2.2 抗细菌活性实验

滤纸片法抗细菌实验采用 2019 年杜晓娜等报道的方法<sup>[15]</sup>, 供试细菌用 MHB 培养基 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡过夜, 转速 90 r/min, 取 200  $\mu\text{L}$  加入到无菌 MHA 平板培养基上, 涂抹均匀, 获得带菌培养基。将待测样品分别用甲醇溶解配置成 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的浓度, 取 20  $\mu\text{L}$  滴加到直径 6 mm 的无菌滤纸片上, 超净台上挥发干溶剂, 终浓度 40  $\mu\text{g}/\text{片}$ , 滤纸片均匀平贴到带菌平板培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中放置 24 h, 测量抑菌圈直径, 链霉素 (1  $\mu\text{g}/\text{片}$ ) 为阳性对照, 所有实验重复 3 次。

96 孔板倍比稀释法抗菌实验参考 2007 年 Zhang 等报道的方法<sup>[16]</sup>, 将滤纸片法抗菌实验中振荡培养过夜的菌液, 经血细胞计数板调整浓度

约  $1\times 10^8$  CFU/mL, 用 MHB 培养基稀释 100 倍至  $10^6$  CFU/mL 作为供试菌液。测定时除了第一个孔加入菌液体积为 200  $\mu\text{L}$  外, 其余每孔均为 100  $\mu\text{L}$ , 用甲醇溶解样品, 第一孔中加入 10  $\mu\text{L}$ , 采用倍比稀释法依次稀释各孔, 保证各孔甲醇体积均不高于 5  $\mu\text{L}$ , 最终样品浓度范围为 2–32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 置 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中 24 h, 酶标仪读取吸光度值, 计算最低抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC), 链霉素为阳性对照, 5  $\mu\text{L}$  甲醇加入到 100  $\mu\text{L}$  菌液中为阴性对照, 所有实验重复 3 次。

### 1.2.3 艾纳香内生真菌的发酵

将艾纳香内生真菌接种到直径 6 cm 的无菌 PDA 平板培养基上, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 5 d, 至菌落布满整个培养基平板, 无菌条件下切成约 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的组织块备用。60 g 大米、80 mL 水加入 500 mL 的三角瓶中, 锡箔纸包扎, 121  $^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min, 取出并放室温, 备用。将带菌的培养基块无菌条件下接种至大米培养基中, 每瓶 2–3 块, 28  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 30 d, 乙酸乙酯终止发酵。

### 1.2.4 次生代谢产物的提取和分离

将艾纳香内生真菌 *C. rosea* 的大米发酵产物用乙酸乙酯超声提取 3 次, 30 min/次, 减压浓缩至干, 得次生代谢产物总浸膏 8.8 g。总浸膏用甲醇溶解, 按照 1:3 比例拌硅胶, 进行硅胶柱层析, 洗脱系统为二氯甲烷/甲醇 (100/0, 99/1, ..., 1/1, V/V), 依次获得 8 个馏分 A(100/0)、B(100/0)、C(99/1)、D(99/1)、E(98/2)、F(20/1)、G(10/1)、H(1/1)。由于 A 和 B 主要为油状小极性组分难溶于甲醇, 薄层检测显示难以分离, 因此我们对 C–H 6 个组分进行了基于活性跟踪的成分分离。在滤纸片法抗菌活性结果指导下, 对 C、D、F 三个活性较好组分进行化学分离。C 组分室温下静置后析出无定形粉末, 砂芯抽滤装置抽滤, 用无水甲醇淋洗, 获得单体化合物 1 (20.8 mg)。D 组分室温下静置, 析出白色粉末, 滤出后获得化合物 5, 滤出的母液经过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 甲醇为洗脱剂, 获得组分 D1, D1 组分进一

步通过半制备液相色谱仪进行分离, 获得化合物 **2** (12.8 mg,  $t_R=10.0$  min, 甲醇-水/40-60, 流速=2.0 mL/min) 和 **3** (8.2 mg,  $t_R=12.2$  min, 甲醇-水/40-60, 流速=2.0 mL/min), F 部分经过葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析, 甲醇洗脱, 根据薄层色谱检测合并, 共得到 2 个馏分 F-1 和 F-2, 室温静置, 分别析出白色无定形粉末, 抽滤后分别获得化合物 **4** (8 mg) 和 **6** (576 mg)。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生真菌分子鉴定结果

对内生真菌菌株的 ITS-rDNA 测序, 将获得的序列进行比对以及数据库检索, 构建系统发育树, 进一步分析发现, 该菌株与其他 3 株 *C. rosea* 菌株聚为一个分支, 明显区别于另外两个大的分

支, 因此该菌株被鉴定为 *C. rosea* (GenBank 登录号 MN486561), 菌株保存于 $-80$  °C 冰箱的 30% 甘油/水中, 存放于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所南药研究室, 编号 JSt-190421-1-1。

### 2.2 内生真菌 6 个组分段抗菌活性

采用滤纸片法对艾纳香内生真菌发酵产物经硅胶柱层析洗脱下来的 6 个组分段 C、D、E、F、G、H 分别进行了抗细菌活性实验。结果显示, 所有组分段对金黄色葡萄球菌均表现出很强抑制活性, 尤其是 C、D、F 三段。进一步比较分析发现, 组分段 C、D、F 对枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌亦表现出较好的抑制作用, 基于此, 我们决定对组分段 C、D、F 分别进行化学成分分离, 以期获得活性单体化合物。然而, 所有 6 个组分段对供试大肠埃希菌的抑制作用均不明显。

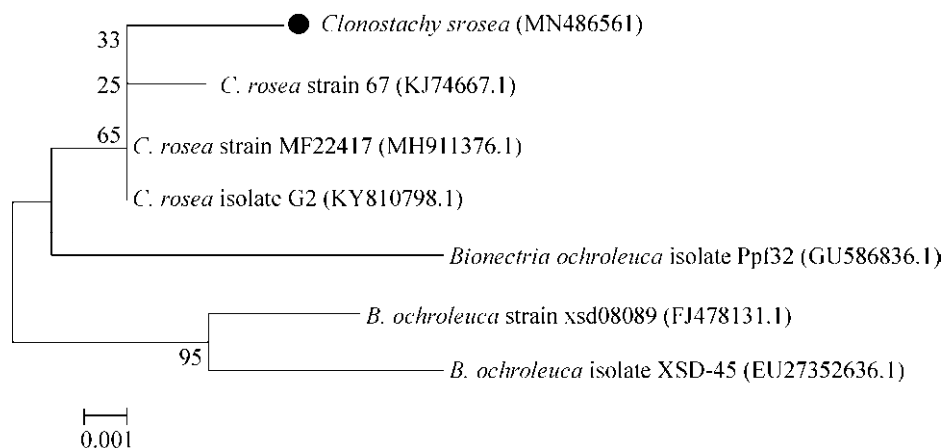


图 1 植物内生菌 *Clonostachys rosea* 的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of the endophytic fungus *Clonostachys rosea*. The numbers of nodes indicate bootstrap values and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together. The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position.

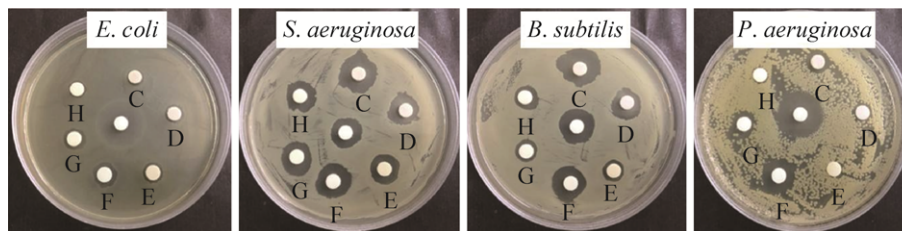


图 2 六个组分的抗细菌活性结果, 40 µg/片 (中间: 链霉素, 1 µg/片)

Fig. 2 Inhibition of 6 fractions against four bacteria at 40 µg/disc (centre: streptomycin at 1 µg/disc).

### 2.3 化合物结构解析

化合物 **1**, 淡黄色结晶性粉末, mp 233–235°C, ESIMS:  $m/z$  697.8  $[M+H]^+$ , 分子式为  $C_{30}H_{28}N_6O_6S_4$ , 化合物谱图数据如下:  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.71 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-10), 7.03 (1H, t,  $J=7.5$  Hz, H-8), 6.65 (1H, t,  $J=7.5$  Hz, H-9), 6.69 (1H, s, 6-NH), 6.55 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-7), 5.97, (1H, d,  $J=2.0$  Hz, 11-OH), 5.49 (1H, d,  $J=4.5$  Hz, H-5a), 4.89 (1H, s, H-11), 3.08 (3H, s, H-12), 1.43 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, H-13);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 166.1 (C-1, 1'), 161.0 (C-4, 4'), 150.3 (C-6a, 6'a), 129.9 (C-10a, 10'a), 129.6 (C-10, 10'), 127.9 (C-8, 8'), 118.6 (C-9, 9'), 109.6 (C-7, 7'), 82.2 (C-11, 11'), 81.5 (C-5a), 81.1 (C-5a'), 77.7 (C-11a, 11a'), 66.6 (C-10b), 66.4 (C-10b'), 29.4 (C-12, 12'), 20.1 (C-13, 13')。谱图数据经过与文献[17-19]比对, 确定该化合物为 Verticillin A。

化合物 **2**, 无色油状物, ESIMS:  $m/z$  196.2  $[M+H]^+$ , 分子式为  $C_{10}H_{13}NO_3$ , 化合物谱图数据如下:  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 8.56 (1H, s, H-6), 8.10 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-3), 7.96 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-4), 3.75 (1H, m, H-9), 2.87 (1H, m, H-7a), 2.78 (1H, m, H-7b), 1.75 (2H, m, H-8), 1.19 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, H-10);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 166.8 (C-11), 148.5 (C-6), 146.6 (C-2), 144.1 (C-5), 140.7 (C-4), 126.2 (C-3), 67.5 (C-9), 40.8 (C-8), 30.0 (C-7), 23.6 (C-10); 以上数据与文献[20]报道基本一致, 故鉴定该化合物为 (*S*)-(+)-fusarinolic acid。

化合物 **3**, 无色油状物, ESIMS:  $m/z$  196.2  $[M+H]^+$ , 分子式为  $C_{10}H_{13}NO_3$ , 化合物谱图数据如下:  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 8.58 (1H, s, H-6), 8.12 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-3), 7.99 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-4), 3.73 (1H, m, H-8), 2.93 (1H, m, H-7a), 2.77 (1H, m, H-7b), 1.50 (H, m, H-9a), 1.57 (H, m, H-9b), 1.01 (3H, t,  $J=6.0$  Hz, H-10);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 166.1 (C-11), 148.3 (C-6), 146.0 (C-2), 140.1 (C-5), 139.9 (C-4), 124.5 (C-3), 72.7 (C-8), 39.8 (C-7), 29.7 (C-9), 9.1 (C-10); 谱图数据与文献[21]报道基本一致, 确定该化合物为 8-hydroxyfusaric acid。

化合物 **4**, 白色无定形粉末, FABMS:  $m/z$

753.1  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_{43}H_{79}NO_9$ ,  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 0.90 (6H, t,  $J=7.0$  Hz, Me-18, 18'), 1.29 (34H, m, H-12~17, H-7'~17'), 1.36-1.42 (4H, m, H-11, 6'), 1.60 (3H, s, Me-19), 1.97 (2H, t,  $J=7.5$  Hz, H-10), 2.02 (2H, m, H-5'), 2.04 (2H, m, H-6), 2.08 (2H, m, H-7), 3.21 (1H, dd,  $J=9.0, 7.5$  Hz, H-2''), 3.27 (1H, m, H-4''或5''), 3.28 (1H, m, H-4''或5''), 3.36 (1H, dd,  $J=9.5, 8.0$  Hz, H-3''), 3.67 (1H, dd,  $J=11.5, 5.0$  Hz, H-6''), 3.71 (1H, dd,  $J=10.0, 3.5$  Hz, H-1), 3.87 (1H, d,  $J=12.0$  Hz, H-6''), 3.97 (1H, dt,  $J=5.5, 3.5$  Hz, H-2), 4.12 (1H, dd,  $J=10.5, 3.5$  Hz, H-1), 4.14 (1H, dd,  $J=7.5, 5.5$  Hz, H-3), 4.28 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-1''), 4.44 (1H, d,  $J=6.0$  Hz, H-2'), 5.14 (1H, t,  $J=7.0$  Hz, H-8), 5.45 (1H, dd,  $J=15.5, 7.0$  Hz, H-4), 5.49 (1H, dd,  $J=16.0, 6.0$  Hz, H-3'), 5.71 (1H, dt,  $J=15.0, 6.5$  Hz, H-5), 5.83 (1H, dt,  $J=15.5, 7.0$  Hz, H-4');  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 175.4 (C-1'), 136.7 (C-9), 134.7 (C-4'), 134.5 (C-5), 131.0 (C-4), 129.0 (C-3'), 124.8 (C-8), 104.7 (C-1''), 77.9 (C-3''), 77.8 (C-5''), 74.9 (C-2''), 74.1 (C-2'), 72.9 (C-3), 71.5 (C-4''), 69.6 (C-1), 62.6 (C-6''), 54.6 (C-2), 40.8 (C-10), 33.8 (C-6), 33.4 (C-5'), 33.1 (C-16, 16'), 30.2-30.8 (C-12, 13, 14, 15, 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13', 14', 15'), 29.1 (C-11), 28.8 (C-7), 23.8 (C-17, 17'), 16.2 (C-19), 14.5 (C-18, 18')。以上数据与文献[11]报道基本一致, 确定化合物 **4** 为 cerebroside C。

化合物 **5**, 结晶性粉末, mp 170–172°C, ESIMS:  $m/z$  126.1  $[M+H]^+$ , 分子式为  $C_5H_6N_2O_2$ , 化合物谱图数据如下:  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 11.0 (1H, s, -NH), 10.6 (1H, s, N-OH), 7.25 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-4), 1.73 (3H, d,  $J=0.6$  Hz, H-6);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 165.1 (C-2), 151.9 (C-5), 138.2 (C-4), 108.1 (C-3), 12.3 (C-6)。上述谱图数据与文献[22]报道基本一致, 确定化合物 **5** 为 3-Maleimide-5-oxime。

化合物 **6**, 白色无定形粉末, ESIMS:  $m/z$  797.5  $[M+Na]^+$ , 分子式为  $C_{40}H_{70}O_{14}$ ,  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.81 (1H, dd,  $J=9.5, 1.5$  Hz, H-3), 5.36 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-11), 5.31 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-7), 5.21 (1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-15), 4.35 (1H, bs, H-1''), 4.26 (1H, dd,  $J=11.5, 6.0$  Hz, H-1'b), 4.18 (1H, dd,  $J=11.5, 6.0$  Hz, H-1'a), 4.15 (1H, ddd,  $J=7.5, 5.5, 1.5$  Hz, H-2'), 3.95 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-13), 3.85

(1H, dd,  $J=12.0, 2.5$  Hz, H-6''b), 3.82 (1H, m, H-5), 3.81 (1H, dd,  $J=11.0, 3.5$  Hz, H-5'a), 3.74 (1H, m, H-2''), 3.72 (1H, m, H-6''a), 3.71 (1H, m, H-4'), 3.68 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-9), 3.64 (1H, dd,  $J=11.0, 6.0$  Hz, H-5'b), 3.53 (1H, m, H-3'), 3.53 (1H, m, H-4''), 3.37 (1H, dd,  $J=9.5, 3.0$  Hz, H-3''), 3.05 (1H, ddd,  $J=9.5, 5.5, 2.5$  Hz, H-5''), 2.73 (1H, m, H-4), 2.72 (1H, m, H-12), 2.63 (1H, m, H-8), 2.60 (1H, m, H-16), 1.89 (3H, s, H-21), 1.67 (3H, s, H-23), 1.66 (3H, s, H-25), 1.59 (3H, s, H-27), 1.28 (2H, m, H-17), 1.16 (2H, m, H-19), 0.98 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, H-28), 0.86 (3H, m, H-20), 0.85 (3H, m, H-22), 0.84 (3H, m, H-29), 0.79 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, H-26), 0.77 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, H-24);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 168.8 (C-1), 146.2 (C-3), 139.6 (C-14), 135.9 (C-6), 134.8 (C-10), 133.3 (C-11), 132.8 (C-7), 129.8 (C-15), 127.5 (C-2), 96.0 (C-1''), 87.3 (C-13), 83.0 (C-8), 82.3 (C-5), 76.9 (C-5''), 74.2 (C-2''), 71.5 (C-4'), 71.4 (C-3'), 69.5 (C-3''), 69.1 (C-2'), 67.2 (C-4''), 66.8 (C-1'), 63.8 (C-5'), 61.3 (C-6''), 44.4 (C-17), 36.6 (C-4), 35.3 (C-7), 33.8 (C-12), 32.5 (C-18), 30.2 (C-16), 29.8 (C-19), 21.2 (C-28), 18.3 (C-29), 16.6 (C-24), 16.5 (C-26), 15.6 (C-22), 11.8 (C-21), 10.7 (C-27), 10.2 (C-20), 9.9 (C-23), 9.9 (C-25)。上述谱图数据与文献[23]报道

基本一致, 确定化合物 **6** 为 bionectriol A。

## 2.4 单体化合物抗菌活性结果

单体化合物的抗细菌活性显示, 化合物 **1**、**4**、**6** 对铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌以及金黄色葡萄球菌均表现出很强的抑制作用, 尤其是化合物 **6** 对 3 株供试细菌的 MIC 值均达到  $2 \mu\text{g/mL}$ , 显著强于阳性对照链霉素的活性, 另外化合物 **1** 对铜绿假单胞菌的 MIC 值也达到  $2 \mu\text{g/mL}$ , 然而所有单体化合物对大肠埃希菌抑制效果均不理想, 仅化合物 **6** 对其 MIC 值为  $16 \mu\text{g/mL}$ 。

## 3 讨论

植物内生菌之间, 以及植物内生菌与寄主植物间存在着复杂的互作关系。Li 等<sup>[24]</sup>对一株植物内生真菌 *Fusarium decemcellulare* LG53 的研究发现, 其产生的一种多肽类化合物 fusaristatin A 可以很好地抑制分离自同一植物组织中的另一株植物内生真菌 *Glomerella acutata* LG52。一株水仙植物内生真菌 *F. solani* 产生的一系列六环多肽类化

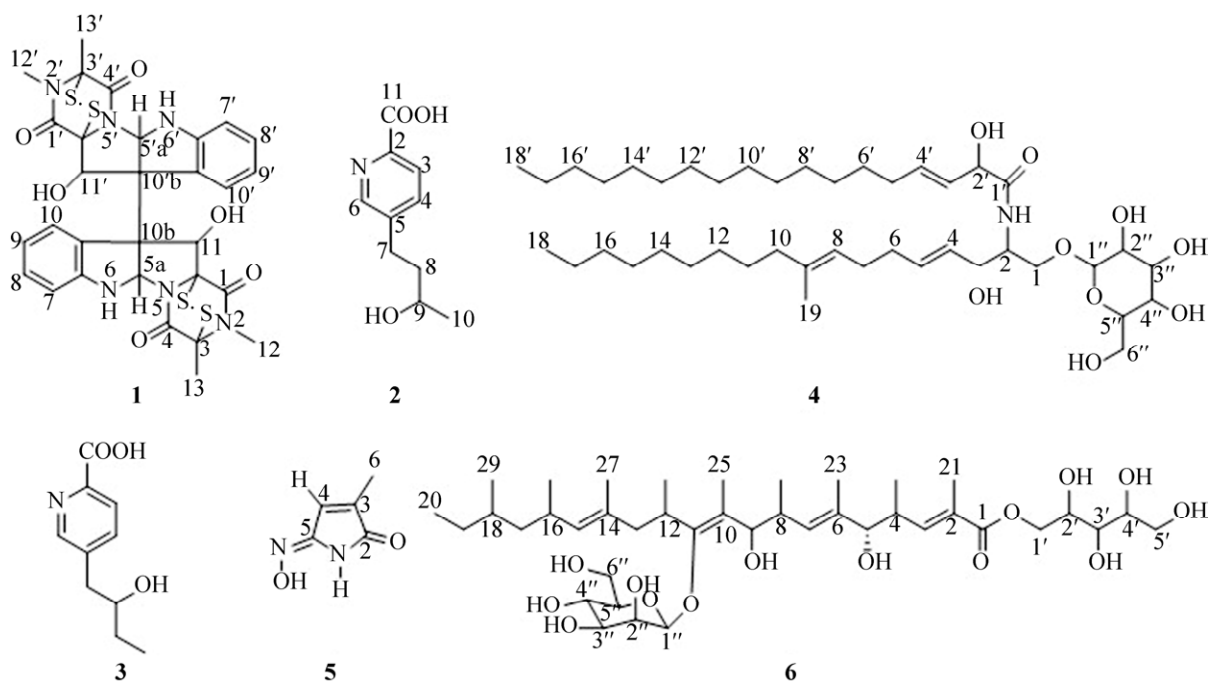


图3 化合物 1-6 的结构

Fig. 3 Structure of compounds 1-6.

表 1 化合物 1-6 对 4 株供试细菌的最低抑菌浓度  
Table 1 Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the compounds 1-6 against four strains of bacteria

Compounds	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1	>32	2	8	8
2	>32	>32	>32	>32
3	>32	>32	>32	>32
4	>32	8	8	>32
5	>32	>32	>32	>32
6	16	2	2	2
Streptomycin	1	5	5	5

合物是该菌株与环境另外一株细菌进行信息交流的重要媒介<sup>[25]</sup>。一株喜树植物内生真菌 *F. solani* 可以通过微生物与寄主植物间生物合成基因的交叉转移,产生与寄主植物成分一样的重要抗癌化学成分喜树碱<sup>[26-27]</sup>。Li 等<sup>[28]</sup>从沙漠植物内生真菌 *Rhinochadiella similis* 中获得一系列含氯原子的 resorcylic acid 类化合物,而含氯化合物在陆地植物内生菌中并不常见,推测该内生真菌可能有助于协助寄主植物代谢沙漠环境中的多余盐分。植物内生真菌在与环境中其他生物因子长期共存过程中,逐步形成了一种化学生态适应机制,即通过分泌大量活性小分子次生代谢产物并释放到周围环境中,来应对周围的不利因素。植物内生真菌能够产生结构骨架新颖、抗细菌活性显著的次生代谢产物,一直吸引着包括药物化学家、生物学家在内的很多学者的关注<sup>[29]</sup>。因此,对药用植物内生真菌的次生代谢产物研究,不仅有利于获得新型药用抗生素,用于解决临床和农业上日益加剧的细菌耐药性问题,还有助于我们深入理解微生物与环境长期协同进化的生态功能。

粉红粘帚霉 *C. rosea* 作为一种重要的植物内生真菌,因其具有强大的破坏力,成为很多植物病原真菌的克星,如葡萄孢菌、草莓灰霉菌等,是一种很好的生防菌株,然而有关其次生代谢产物研究较少,兰州大学的翟明明<sup>[30]</sup>报道了 15 个聚酮类化合物,其中 2 个糖类化合物表现很好的

抗细菌活性,对枯草芽孢杆菌的 MIC 分别为 6.5 和 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 。笔者所在实验室在持续从药用植物内生真菌中寻找活性先导化合物的过程中,获得一株粉红粘帚菌 *C. rosea*,基于活性跟踪的策略,获得了不同结构类型的 6 个单体化合物,说明相同菌株由于来源不同,次生代谢产物也不相同,化合物 1、4 和 6 表现出非常强的抗细菌活性。化合物 1 属于 Epidithiodioxopiperazines (ETPs) 类化合物,此类化合物最早由 Weindling 和 Emerson 于 1936 年从一株木生真菌 *Gliocladium fimbriatum* 中分得,由于其非常突出的抗真菌和抗病毒活性而受到广泛关注。其具有显著的结构特征——二硫桥,这也是此类化合物具有很强生物活性的重要原因,目前此类化合物已报道了 20 种结构类型,大多结构骨架新颖<sup>[31]</sup>。化合物 4 和 6 属于脑苷酯类和糖苷类,均为长脂肪链糖苷类化合物,此类化合物在病原微生物与寄主植物的互作过程中作为微生物产生的小分子信号分子可以诱导寄主植物产生应激毒素,同时,此类化合物亦具有很强的抗菌活性<sup>[32]</sup>。Shu 等<sup>[33]</sup>报道从一株植物内生真菌 *Fusarium* sp. 中获得的 2 个脑苷脂类化合物,均具有很强的抗细菌作用和嘌呤氧化酶抑制活性,提示了此类化合物的潜在抗生素活性。

本研究首次采用活性跟踪的方法从艾纳香内生真菌 *C. rosea* 中获得 3 个抗细菌活性强的单体化合物,进一步说明植物内生真菌是寻找新型抗菌先导化合物的重要宝库,以及活性跟踪的研究策略的有效性。然而,活性跟踪分离过程中,从活性组分 D 中分到的单体化合物抗菌活性并不好,推测可能是我们分离过程中漏掉了某些活性成分。同时,除 C、D、F 三个活性较强组分外,其他组分也可能含有活性较好的化合物,但由于含量低,而没有体现出来,有待于我们下一步的深入分析。另外,基于植物内生真菌之间以及微生物与寄主植物间长期互作的考虑,我们推测,艾纳香内生真菌 *C. rosea* 可能通过分泌产生如 1、

4 和 6 这样的小分子化合物来抑制环境中其他微生物的生长, 以保证自身的存活。

## REFERENCES

- [1] Pang YX, Xie XL, Chen ZX, et al. Textual research of *Blumea balsamifera*. Guizhou Agric Sci, 2014, 42(6): 10–13 (in Chinese).  
庞玉新, 谢小丽, 陈振夏, 等. 艾纳香本草考证. 贵州农业科学, 2014, 42(6): 10–13.
- [2] Zha Y, Bai L, Xie XL, et al. Bioinformatics analysis of the AP2/EREBP transcription factor family in *Blumea blasamifera*. Mol Plant Breed, 2019, 17(18): 5953–5959 (in Chinese).  
查英, 白琳, 谢小丽, 等. 艾纳香 AP2/EREBP 转录因子家族生物信息学分析. 分子植物育种, 2019, 17(18): 5953–5959.
- [3] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Beijing: Science Press, 1978: 19–20 (in Chinese).  
中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1978: 19–20.
- [4] Guan LL, Xia QF, Pang YX, et al. Analysis of metabolic pathway of terpenoids in *Blumea balsamifera*. China J Chin Mater Med, 2016, 41(9): 1585–1591 (in Chinese).  
官玲亮, 夏奇峰, 庞玉新, 等. 艾纳香萜类物质生物合成途径分析. 中国中药杂志, 2016, 41(9): 1585–1591.
- [5] Chen Y, Wang K, Yang Q, et al. Prescription screening test and inhibitory rate experiment of blumea gynecological lotion. Chin J Inf TCM, 2017, 24(3): 87–90 (in Chinese).  
陈艳, 王凯, 杨全, 等. 艾纳香妇科洗液处方筛选及抑菌试验. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(3): 87–90.
- [6] de Boer HJ, Cotington C. Medicinal plants for women's healthcare in Southeast Asia: a meta-analysis of their traditional use, chemical constituents, and pharmacology. J Ethnopharmacol, 2014, 51(2): 747–767.
- [7] Wen Q, Pang YX, Hu X, et al. Study on antibacterial activity of extracts from residues of *Blumea balsamifera* (L.) DC. *in vitro*. J Guangdong Pharmaceut Univ, 2015, 31(6): 713–716 (in Chinese).  
闻庆, 庞玉新, 胡璇, 等. 艾纳香残渣不同提取部位体外抑菌活性研究. 广东药学院学报, 2015, 31(6): 713–716.
- [8] Zou J, Yang Q, Pang YX, et al. Study on the prescription screening and bacteriostatic effects of *Blumea* mouthwash. J Guangdong Pharmaceut Univ, 2015, 31(5): 571–575 (in Chinese).  
邹婧, 杨全, 庞玉新, 等. 艾纳香口腔护理液的处方筛选及其抑菌效果研究. 广东药学院学报, 2015, 31(5): 571–575.
- [9] Gao H, Li G, Lou HX. Structural diversity and biological activities of novel secondary metabolites from endophytes. Molecules, 2018, 23(3): 646.
- [10] Tan XM, Li LY, Sun LY, et al. Spiciferone analogs from an endophytic fungus *Phomabetae* collected from desert plants in West China. J Antibiot, 2018, 71(6): 613–617.
- [11] Yuan C, Li G, Zhang YB, et al. Secondary metabolites of an endophytic fungus *Diaporthe* sp. derived from *Blumea balsamifera* (L.) DC. Acta Microbiol Sin, 2018, 59(4): 753–761 (in Chinese).  
元超, 李刚, 张影波, 等. 艾纳香内生真菌 *Diaporthe* sp. 次生代谢产物. 微生物学报, 2018, 59(4): 753–761.
- [12] Yuan C, Guo YH, Zhang YB, et al. Secondary metabolites from *Corynespora cassicola* J9, an endophytic fungus associated with *Blumea balsamifera* (L.) DC. Acta Pharmaceut Sin, 2019, 54(5): 892–896 (in Chinese).  
元超, 郭玉华, 张影波, 等. 艾纳香内生真菌 *Corynesporacassicola* J9 次生代谢产物研究. 药学报, 2019, 54(5): 892–896.
- [13] Guo YH, Shu XC, Zhang YB, et al. Screening of bioactive secondary metabolites of endophytes associated with *Blumea balsamifera* (L.) DC. by UPLC-QToF-MS, DNP and bio-assay. Microbiol China, 2019: 1–14. [2019-12-01]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.China.190493> (in Chinese).  
郭玉华, 舒雪纯, 张影波, 等. 基于超高效液相色谱-电喷雾-质谱、天然产物词典和活性筛选的艾纳香内生真菌次生代谢产物. 微生物学通报, 2019: 1–14. [2019-12-01]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.China.190493>.
- [14] Yuan C, Yang HX, Guo YH, et al. New  $\alpha$ -pyrones



- from an endophytic fungus, *Hypoxyloninvestiens* J2. RSC Adv, 2019, 9(47): 27419–27423.
- [15] Du XN, Gao YH, Zhang Y, et al. Diversity and antibacterial activities of fungi associated with the South China Sea sponge. Mycosystema, 2019, 38(1): 64–73 (in Chinese).  
杜晓娜, 高渊皓, 张雁, 等. 一株南海指海绵共生真菌多样性及其抗菌活性. 菌物学报, 2019, 38(1): 64–73.
- [16] Zhang DH, Noviendri D, Nursid M, et al. 12, 13-dihydroxyfumitremorgin C, fumitremorgin C, and brevianamide F, antibacterial diketopiperazine alkaloids from the marine-derived fungus *Pseudallescheria* sp. Nat Prod Sci, 2007, 13(3): 251–254.
- [17] Li LY, Li DH, Luan YP, et al. Cytotoxic metabolites from the antarctic psychrophilic fungus *Oidiodendron truncatum*. J Nat Prod, 2012, 75(5): 920–927.
- [18] Minato H, Matsumoto M, Katayama T. Studies on the metabolites of *Verticillium* sp. structures of Verticillins A, B, and C. J Chem Soc Perkin 1, 1973, 17: 1819–1825.
- [19] Chu M, Truumees I, Rothofsky ML, et al. Inhibition of *c-fos* Proto-oncogene induction by Sch 52900 and Sch 52901, novel diketopiperazines produced by *Gliocladium* sp. J Antibiot, 1995, 48(12): 1440–1445.
- [20] Song JJ, Yee NK. A concise synthesis of fusaric acid and (S)-(+)-fusarinolic acid. J Org Chem, 2001, 66(2): 605–608.
- [21] Crutcher FK, Puckhaber LS, Bell AA, et al. Detoxification of fusaric acid by the soil microbe *Mucorrouxii*. J Agric Food Chem, 2017, 65(24): 4989–4992.
- [22] Kijjoa A, Bessa J, Wattanadilok R, et al. Dibromotyrosine derivatives, a maleimide, aplysamine-2 and other constituents of the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. Zeitschr Naturforsch B, 2005, 60(8): 904–908.
- [23] Freinkman E, Oh DC, Scott JJ, et al. Bionectriol A, a polyketide glycoside from the fungus *Bionectria* sp. associated with the fungus-growing ant, *Apterostigma dentigerum*. Tetrahed Lett, 2009, 50(49): 6834–6837.
- [24] Li G, Kusari S, Golz C, et al. Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53. RSC Adv, 2016, 6(59): 54092–54098.
- [25] Wang WX, Kusari S, Sezgin S, et al. Hexacyclopeptides secreted by an endophytic fungus *Fusarium solani* N06 act as crosstalk molecules in *Narcissus tazetta*. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(18): 7651–7662.
- [26] Kusari S, Zühlke S, Spiteller M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. J Nat Prod, 2009, 72(1): 2–7.
- [27] Kusari S, Zühlke S, Spiteller M. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. J Nat Prod, 2011, 74(4): 764–775.
- [28] Li LY, Zhang XY, Tan XM, et al. Rhinoclactones A-E, resorecylic acid analogs from desert plant endophytic fungus *Rhinocladia similis*. Molecules, 2019, 24(7): E1405.
- [29] Deshmukh SK, Verekar SA, Bhave SV. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. Front Microbiol, 2015, 5: 715.
- [30] Zhai MM. Investigation on the secondary metabolites of two characteristic symbiotic fungi[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016 (in Chinese).  
翟明明. 两种特色共生菌次生代谢产物研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [31] Welch TR, Williams RM. Epidithiodioxopiperazines. Occurrence, synthesis and biogenesis. Nat Prod Rep, 2014, 31(10): 1376–1404.
- [32] Koga J, Yamauchi T, Shimura M, et al. Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. J Biol Chem, 1998, 273(48): 31985–31991.
- [33] Shu RG, Wang FW, Yang YM, et al. Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium* sp. IFB-121, and endophytic fungus in *Quercus variabilis*. Lipids, 2004, 39(7): 667–673.

(本文责编 陈宏宇)