

研究报告

银杏内生真菌 *Aspergillus oryzae* YX-5 抗肿瘤活性物质的分离与鉴定缪莉^{1,2} 杨佳凡¹ 姜薇¹ 周惠茹¹ 周恒¹ 董昆明^{*1}

1 扬州大学环境科学与工程学院 江苏 扬州 225127

2 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东 广州 510301

摘要:【背景】植物内生真菌是天然活性物质的重要来源。【目的】对一株具有抗肿瘤活性的银杏内生真菌米曲霉 *Aspergillus oryzae* YX-5 进行活性物质的分离与鉴定。【方法】将该菌株发酵培养后,发酵液经乙酸乙酯萃取,采用减压柱层析、葡聚糖凝胶柱层析和高效液相色谱分析,从其代谢产物中分离活性化合物,在分离过程中以 MTT 法跟踪检测分离到的各组分及纯化合物的抗肿瘤活性。【结果】从菌株 YX-5 的发酵产物中分离纯化得到 4 个化合物。经核磁共振和高分辨质谱分析,将其分别鉴定为羟基曲霉酸(1)、环(4-羟脯氨酸-苯丙氨酸)(2)、环(亮氨酸-苯丙氨酸)(3)和环(丙氨酸-苯丙氨酸)(4)。其中羟基曲霉酸对人宫颈癌 HeLa 细胞具有显著的细胞毒活性,其 IC_{50} 为 1.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。【结论】报道羟基曲霉酸在抗肿瘤方面的活性,表明米曲霉及羟基曲霉酸在抗肿瘤天然产物开发中具有一定的应用潜力。

关键词: 内生真菌, 抗肿瘤, 米曲霉, 羟基曲霉酸

Isolation and identification of antitumor substance from endophytic fungus *Aspergillus oryzae* YX-5 isolated from *Ginkgo biloba*MIAO Li^{1,2} YANG Jia-Fan¹ JIANG Wei¹ ZHOU Hui-Ru¹ ZHOU Heng¹
DONG Kun-Ming^{*1}

1 School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China

2 Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China

Abstract: [Background] Plant endophytic fungi are an important source of natural bioactive substances. [Objective] The active substance of an antitumor endophytic fungus *Aspergillus oryzae* YX-5 isolated from *Ginkgo biloba* was investigated. [Methods] First, strain YX-5 was fermented. Then, the culture broth

Foundation item: Open Project of Key Laboratory of Marine Medicine of Guangdong Province and Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences (2018011008)

*Corresponding author: Tel: 86-514-87351875; E-mail: kmdong@yzu.edu.cn

Received: 13-04-2018; Accepted: 17-09-2018; Published online: 09-11-2018

基金项目: 广东省海洋药物重点实验室开放课题及中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室开放课题 (2018011008)

*通信作者: Tel: 0514-87351875; E-mail: kmdong@yzu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-13; 接受日期: 2018-09-17; 网络首发日期: 2018-11-09

was extracted with ethyl acetate. By using vacuum liquid chromatography, Sephadex gel chromatography and high performance liquid chromatography, the active compound was isolated from the crude extract and the antitumor activity was measured by MTT assay. [Results] Four pure compounds were isolated from the crude extract of strain YX-5. Based on the analysis of NMR and HR-ESI-MS, these compounds were identified as hydroxyaspergillic acid (1), cyclo(4-Hydroxypro-Phe) (2), Cyclo(Leu-Phe) (3) and Cyclo(Ala-Phe) (4). Hydroxyaspergillic acid exhibited significant cytotoxic activity against HeLa cell with IC_{50} of 1.07 $\mu\text{g/mL}$. [Conclusion] Hydroxyaspergillic acid exhibited antitumor activity, indicating that *Aspergillus oryzae* and hydroxyaspergillic acid might have application potential in antitumor natural products development.

Keywords: Endophytic fungi, Antitumor, *Aspergillus oryzae*, Hydroxyaspergillic acid

生活在健康植物组织和组织间隙内的内生真菌通常能够产生生长激素或抗生素类化合物, 刺激宿主植物生长, 帮助植物抵御生物或非生物环境胁迫^[1]。由于植物种类繁多, 其内生真菌所处生态环境特殊, 这使得植物内生真菌具有代谢途径多样性, 可产生与宿主相同或独特的生物活性物质的能力^[2-3]。因此, 植物内生真菌已成为微生物天然产物的一个重要来源。

银杏, 别名白果树, 是重要的观赏树种和药用树种。银杏的外种皮、果实、树叶、树皮、树根等均有良好的药用价值, 具有防治心脑血管疾病、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、消炎、抗血小板活化因子、延缓衰老和美容等医疗和保健功效^[4-5]。然而银杏生长缓慢, 严重制约其药用功效的开发。因此, 从其内生真菌中寻找天然活性物质有望为银杏类药物或其他生物活性物质的开发提供新来源^[6]。

目前银杏内生真菌活性物质的研究主要集中在抗菌和抗氧化活性上, 有关其抗肿瘤活性的报道较少。我们在前期研究植物内生真菌抗肿瘤活性时发现 14 株分离自银杏树皮的内生真菌对 EC109 食道癌细胞具有一定的抗肿瘤活性, 其中一株米曲霉 *Aspergillus oryzae* YX-5 对多种癌细胞具有显著的细胞毒活性^[7-8]。张峥嵘等^[9]也发现 17 株银杏内生真菌对 A549 肺癌细胞或 HepG2 肝癌细胞具有一定的抑制作用。因此, 银杏内生真菌在抗肿瘤活性方面也应具有一定的应用潜力。本研究对菌株 YX-5 进行了发酵培养, 以活性为导向, 从其发酵产物中分离到 4 个化合物,

其中一个化合物具有很高的抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所采用的真菌菌株 YX-5 为分离自安徽阜阳银杏树皮组织的米曲霉菌 *Aspergillus oryzae*, 取材部位为距地 1.5 m 左右的主干树皮, 厚度约 3 mm–8 mm, 银杏树龄 30–40 年, 树干直径 50 cm–60 cm。采用的指示肿瘤细胞为人宫颈癌 HeLa 细胞, 购自上海复祥生物科技有限公司。

主要试剂和仪器: 噻唑蓝 MTT, Amresco 公司; RPMI1640 培养基, Gibco 公司; 色谱用硅胶, 青岛海洋化工公司。分析型高效液相色谱仪, HITACHI 公司; 半制备高效液相色谱仪, 北京 LabTech 公司; 离心浓缩仪, LABCONCO 公司; 旋转蒸发仪, BUCHI 公司; CO₂ 培养箱, New Brunswick 公司; 酶标仪, 上海新科公司; 旋光仪, Rudolph 公司; 核磁共振仪、超高分辨飞行时间质谱仪, Bruker 公司。

1.2 培养基

细胞培养基(g/L): RPMI-1640 细胞培养基 10.4, NaHCO₃ 2.4, HEPES 2.0, 10% 灭活的新生牛血清和 1% 二抗母液(10⁴ U/mL 青霉素和 10⁴ U/mL 链霉素), pH 7.1–7.3, 经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌, 于 4 °C 保存。

察氏培养基(g/L): NaNO₃ 3.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.5, FeSO₄ 0.01, 蔗糖 30.0, pH 7.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.3 真菌的发酵培养及代谢产物的粗提取

取 50 mL 察氏培养基分装于 250 mL 三角瓶中, 将活化后的菌株 YX-5 挖块接种于培养基中, 25 °C、110 r/min 振荡培养 3 d, 再转入装有 1.2 L 培养基的 2 L 三角瓶中继续培养 14 d。将发酵液用 8 层纱布过滤, 用等体积乙酸乙酯萃取滤液 3 次, 经旋转蒸发仪减压浓缩蒸干, 称重后于 4 °C 冰箱中避光保存。

1.4 代谢产物的分离纯化与鉴定

采用减压硅胶柱、减压 C18 ODS (50 μm) 柱对提取到的代谢物进行初步分离。将代谢物或分离到的组分与等质量的 100–200 目硅胶或 ODS 混合搅拌均匀, 过夜待干; 在减压柱中装入 200–300 目硅胶或 ODS, 柱高 5 cm, 用真空泵抽真空 4 h; 将拌好的样品加入减压柱中, 轻轻敲打柱身使样品层表面水平, 抽真空 20 min, 再加入 1 cm 高的硅胶或 ODS 和棉花做保护层; 配制 4–5 个柱体积的洗脱剂, 梯度洗脱, 收集洗脱组分, 浓缩蒸干后称重, 测定活性。

采用葡聚糖凝胶柱 Sephadex LH-20 对活性组分进行进一步分离。湿法装柱, 上样, 以甲醇进行洗脱, 控制流速 25 s/滴, 观察色带移动情况, 待所有色带都洗脱后停止。用试管收集洗脱液, 每管收集 8 mL 左右, 每隔 10 管蒸干一次, 用薄层层析法确定其组成是否相似, 将相似的组分合并, 测定抗肿瘤活性。

采用分析型 HPLC 对柱层析收集到各组分进行分析, 采用 Apollo RP-18 色谱柱 (5 μm, 4.6 mm×250 mm), 甲醇/0.1% 甲酸水梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 检测波长 210 nm。采用半制备 HPLC 对活性组分进行分析制备, 选用 Kromasil RP-18 色谱柱 (10 mm×250 mm), 甲醇/0.1% 甲酸水等度洗脱, 流速 1.5 mL/min, 检测波长 210 nm。对分纯的样品采用真空干燥后溶于 0.5 mL 氘代 DMSO 中进行核磁共振 (NMR) 分析, 另取少量样品溶于二氯甲烷进行高分辨质谱 (HR-ESI-MS) 分析, 结合核

磁图谱确定活性物质结构。

1.5 抗肿瘤活性测试

采用 MTT 法进行样品的抗肿瘤活性测定。将处于对数生长期的 HeLa 细胞消化后稀释成 6×10^4 个/mL 细胞悬液, 每孔 80 μL 接种于 96 孔板中, 于 37 °C 的 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。用 DMSO 将待测样品配制成 20 mg/mL, 再用培养基适当稀释, 每孔加入 20 μL 稀释后的样品液, 使样品终浓度达到检测浓度。以纯细胞培养基为空白对照, 添加 20 μL 含 0.5% DMSO 的培养基为阴性对照。每个处理设 3 个重复。继续培养 48 h 后, 每孔添加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL, 37 °C 培养 4 h, 吸弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 低速振荡, 待颜色均匀后用酶标仪于 490 nm 波长处测定 OD₄₉₀ 值, 按以下公式计算抑制率:

抑制率 (%) = (阴性对照组 OD₄₉₀ 值 - 测试组 OD₄₉₀ 值) / (阴性对照组 OD₄₉₀ 值 - 空白组 OD₄₉₀ 值) × 100%。

2 结果与分析

2.1 发酵产物提取

采用察氏液体培养基于 25 °C、110 r/min 发酵真菌 YX-5, 共 60 L, 发酵液经 8 层纱布过滤, 滤液以等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 浓缩蒸干后称重得到粗提物 22.91 g。

2.2 代谢产物分离及抗肿瘤活性测试

2.2.1 减压柱层析

采用减压硅胶柱层析对粗提物进行粗分。将粗提物用二氯甲烷溶解, 与等质量硅胶拌样, 干法上柱, 采用纯二氯甲烷、80:1、60:1、40:1、30:1、20:1、15:1 的二氯甲烷/甲醇溶液和纯甲醇作为洗脱剂, 分别以 5 个柱体积进行梯度洗脱, 收集各组分浓缩蒸干后称重, 得到了 8 个组分, 抗肿瘤活性测定显示 8 个组分都有一定的活性。采用 HPLC 进行分析检测, 流动相甲醇和 0.1% 甲酸水溶液, 30 min 内洗脱梯度从 5% 甲醇升至 100% 甲醇, 等梯度变化发现各组分间有较大重叠, 因此将活性相对较高的几个中

低极性组分混合后标记为 F2, 共 7.23 g。

采用 ODS 减压柱对混合组分 F2 进行分离, 选择 40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 和 100% 甲醇水溶液梯度洗脱。收集洗脱液蒸干后称重, 依次标记为 F2-1 (2.96 g)、F2-2 (1.66 g)、F2-3 (1.23 g)、F2-4 (0.77 g)、F2-5 (0.15 g)、F2-6 (0.55 g)、F2-7 (0.05 g)、F2-8 (0.03 g), 并测定各组分对 HeLa 细胞的抑制率。结果显示: 前 3 个组分集中了大部分的代谢产物, 且活性都比较高。其中以组分 F2-3 的抗肿瘤活性最高, 在浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时对 HeLa 细胞的抑制率为 92.22%, 在 25 $\mu\text{g/mL}$ 时依然有 74.36% 的抑制率; 组分 F2-2 的抗肿瘤活性在各测试浓度下也均高于 60%; 组分 F2-1 在较高浓度时(100 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$)对 HeLa 细胞的抑制率在 75% 以上, 当浓度降至 25 $\mu\text{g/mL}$ 时其抗肿瘤活性显著下降, 抑制率仅为 35.17%; 其他组分均无明显的抗肿瘤活性(图 1)。由于组分 F2-2 和 F2-3 极性比较接近, 以极性为依据分离的方式难以将活性物质分离出来, 因此采用葡聚糖凝胶进一步分离。

2.2.2 葡萄糖凝胶柱层析

在高 200 cm、直径 4 cm 的开放柱中加入溶胀的葡聚糖凝胶 LH-20 至 150 cm 高处, 将组分 F2-2 和 F2-3 混合, 标记为 F3, 质量为 2.89 g, 取出 1.0 g

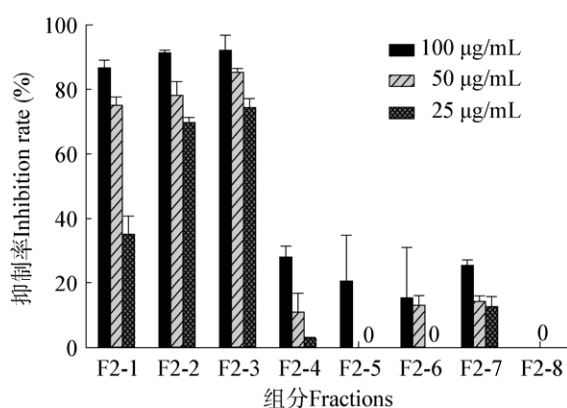


图 1 减压 ODS 柱分离后各组分抗肿瘤活性
Figure 1 The antitumor activity of each fractions after vacuum ODS column separation ($n=3, \bar{x} \pm \text{SD}$)

用少量甲醇溶解, 在装好的葡聚糖凝胶柱上湿法上柱, 用甲醇溶液进行洗脱。用试管收集洗脱液, 根据薄层层析判定其组成是否相似, 将相似组分合并, 共得到 18 个组分, 分别测定各组分的抗肿瘤活性。结果显示: 所得各组分均具有不同程度的抗肿瘤活性。在浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 HeLa 细胞的抑制率在 70% 以上的有组分 F3-1 (2.6 mg)、F3-6 (16.9 mg)、F3-8 (10.1 mg)、F3-11 (34.5 mg)、F3-14 (22.1 mg)、F3-15 (15.9 mg)、F3-16 (76.5 mg), 其中组分 F3-1、F3-14、F3-15 的活性最高, 抑制率均在 85% 以上(图 2)。

采用半制备液相色谱对组分 F3-14、F3-15 进行检测, 洗脱剂为甲醇:0.1% 甲酸水=1:1 (体积比)。色谱显示, F3-14 和 F3-15 纯度较高且具有相同的主峰, 标记其为化合物 1 (38 mg, $R_t=34.75$ min, 图 3)。进一步测定化合物 1 的抗肿瘤活性, 结果显示, 其对 HeLa 细胞具有显著的细胞毒活性, 半抑制浓度 IC_{50} 为 1.07 $\mu\text{g/mL}$ (即在该浓度下化合物 1 对 HeLa 细胞的抑制率为 50%)。

采用半制备 HPLC 对质量相对较多、活性较高的组分 F3-11 和 F3-16 进行制备, 洗脱剂为甲醇:0.1% 甲酸水=1:1 (体积比)。从组分 F3-11 中分离纯化得到化合物 2 (3.1 mg) 和 3 (2.6 mg), 从组分 F3-16 中分离得到化合物 1 (5.3 mg) 和化合物

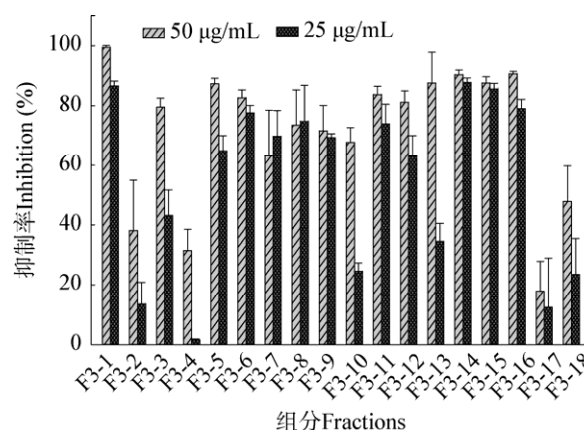


图 2 葡聚糖凝胶柱分离后各组分抗肿瘤活性
Figure 2 The antitumor activity of each fractions after Sephadex column separation ($n=3, \bar{x} \pm \text{SD}$)

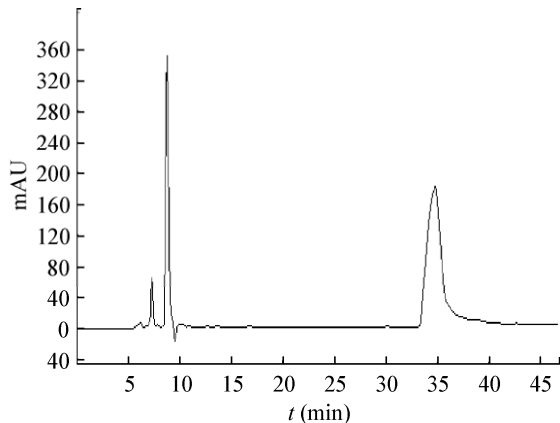


图3 组分F3-14的HPLC谱图

Figure 3 The HPLC spectrum of F3-14

Note: RP-18, 10×250 mm, MeOH:H₂O (0.1% HCOOH)=1:1, 1.5 mL/min, 210 nm, $R_t=34.75$ min.

4 (4.8 mg)。进一步测定这些化合物的抗肿瘤活性,结果显示,在测试浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,化合物 2 对 HeLa 细胞没有细胞毒活性,化合物 3 对 HeLa 细胞的抑制率为 17.5%,化合物 4 对 HeLa 细胞具有一定的细胞毒活性,其半抑制浓度为 45.77 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 化合物的结构鉴定

化合物 1:浅黄色油状物; $[\alpha]_D^{25} +28.8^\circ$ (c 0.50, MeOH); HR-ESI-MS 分析显示准分子离子峰 m/z 263.136 6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. 263.137 2), 分子组成为 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$, 不饱和度为 4; ^{13}C NMR 谱显示化合物有 12 个碳, 结合 HSQC, 归属了相对应的氢质子。12 个碳中有 4 个 CH_3 (δ_c 8.6, 24.3, 2×22.7), 2 个 CH_2 (δ_c 31.9, 41.4), 2 个 CH (δ_c 121.3, 26.2), 4 个季碳 (δ_c 156.9, 147.9, 142.6, 72.6), 其中 C_7 (δ_c 72.63) 为氧取代季碳。从 ^1H - ^1H COSY 谱中连接出 2 个结构片段 H_8 (δ_H 1.93, 2H, q, $J=7.1$ Hz)- H_9 (δ_H 0.80, 3H, t, $J=7.1$ Hz) 和 H_{11} (δ_H 2.54, 2H, overlap)- H_{12} (δ_H 2.18, 1H, m)- H_{13} (δ_H 0.89, 3H, d, $J=6.4$ Hz)- H_{14} (δ_H 0.88, 3H, d, $J=6.4$ Hz)。HMBC 谱中 H_5 (δ_H 7.30, 1H, s) 和 H_9 (δ_H 0.80, 3H, t, $J=7.1$ Hz) 都与 C_7 相关, H_{10} 与 C_8 (δ_c 31.9) 及 C_6 (δ_c 142.6) 相关, H_{11} 与 C_2 (δ_c 156.9)、 C_{13} (δ_c 22.7)

和 C_{14} (δ_c 22.7) 相关。结合相关文献[10]的数据,推断该物质的结构为羟基曲霉酸,其关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关如图 4 所示。化合物 1 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据归属见表 1。

化合物 2: 无色油状; $[\alpha]_D^{25} +14.5^\circ$ (c 1.0, MeOH); 易溶于甲醇; HRESI-MS m/z 283.106 3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. 283.105 9), 分子组成为 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ 。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_H 1.52 (1H, m, H-3a), 1.94 (1H, m, H-3b), 3.06 (2H, dd, $J=5.2, 12.4$ Hz, H_2 -3'), 3.16 (1H, dd, $J=3.8, 12.0$ Hz, H-5a), 3.54 (1H, dd, $J=4.6, 12.0$ Hz, H-5b), 4.19 (1H, t, $J=5.2$ Hz, H-2'), 4.32 (1H, dd, $J=6.2, 11.2$ Hz, H-2), 4.42 (1H, m, H-4), 5.12 (1H, brs, 4-OH), 7.20 (1H, m, H-7'), 7.26–7.30 (4H, overlap, H-5',6',8',9'), 8.02 (1H, brs, 苯丙氨酸 NH)。APT ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz): 35.1 (t, C-3), 37.1 (t, C-3'), 53.7 (t, C-5), 55.6 (d, C-2), 56.9 (d, C-2'), 66.7 (d, C-4), 126.2 (d, C-7'), 128.2 (d, C-6'/8'), 129.7 (d, C-5'/9'), 137.3 (s, C-4'), 165.1 (s, C-1'), 169.4 (s, C-1)。结合相关文献[11]的数据,确定该化合物为环(4-羟脯氨酸-苯丙氨酸),结构如图 5 所示。

化合物 3: 无色晶体; $[\alpha]_D^{25} +23.5$ (c 0.6, MeOH); 易溶于甲醇; mp 261–263 $^\circ\text{C}$; HRESI-MS m/z 283.142 5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. 283.142 2), 分子组成为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_H 0.10

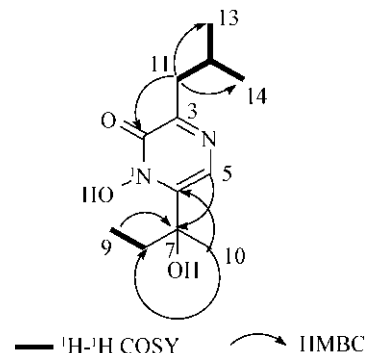


图4 化合物1的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关
Figure 4 The key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlation of compound 1

表 1 化合物 1 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC (600 MHz, 150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

Table 1 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY and HMBC of compound 1 (600 MHz, 150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

位置 Position	碳化学位移 δ_{C}	氢化学位移 δ_{H}	氢-氢相关 ^1H - ^1H COSY	碳氢三键相关 HMBC
2	156.9 (C)	—	—	—
3	147.9 (C)	—	—	—
5	121.3 (CH)	7.30 (1H, s)	—	7
6	142.6 (C)	—	—	—
7	72.6 (C)	—	—	—
8	31.9 (CH_2)	1.93 (2H, q, $J=7.1$ Hz)	9	—
9	8.6 (CH_3)	0.80 (3H, t, $J=7.1$ Hz)	8	7
10	24.3 (CH_3)	1.45 (3H, s)	—	6, 8
11	41.4 (CH_2)	2.54 (2H, overlap)	12	2, 13, 14
12	26.2 (CH)	2.18 (1H, m)	11, 13, 14	—
13	22.7 (CH_3)	0.89 (3H, d, $J=6.4$ Hz)	12	—
14	22.7 (CH_3)	0.88 (3H, d, $J=6.4$ Hz)	12	—
OH	—	7.54 (brs)	—	—

注: —: 无信号.

Note: —: No signal.

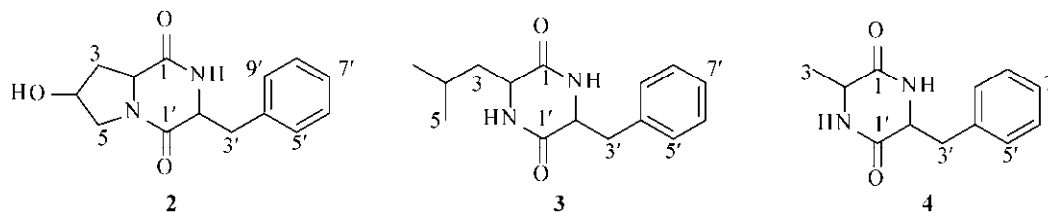


图 5 化合物 2-4 的化学结构

Figure 5 Chemical structures of the compounds 2-4

(1H, m, H-3a), 0.63 (1H, m, H-3b), 0.54-0.63 (3H, overlap, H-5), 0.54-0.63 (3H, overlap, H-6), 1.40 (1H, m, H-4), 2.85 (1H, dd, $J=4.8$, 13.3, H-3'a), 3.14 (1H, dd, $J=3.0$, 13.3, H-3'b), 3.58 (1H, m, H-2), 4.22 (1H, m, H-2'), 7.13-7.25 (5H, m, H-5',6',7',8',9'), 7.90 (1H, brs, 亮氨酸 NH), 8.14 (1H, brs, 苯丙氨酸 NH)。结合相关文献[12]的数据, 确定该化合物为环(亮氨酸-苯丙氨酸), 结构如图 5 所示。

化合物 4: 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -26.5 (c 0.5, MeOH); 易溶于甲醇; HRESI-MS m/z 241.094 7

$[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. 241.095 3), 分子组成为 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{H} 0.45 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H₃-3), 2.85 (1H, dd, $J=5.0$, 13.0 Hz, H-3'a), 3.10 (1H, dd, $J=3.2$, 13.0 Hz, H-3'b), 3.61 (1H, dd, $J=3.2$, 5.0 Hz, H-2'), 4.17 (1H, q, $J=6.8$ Hz, H-2), 7.14 (2H, m, H-5'/9'), 7.22 (1H, m, H-7'), 7.27 (2H, m, H-6'/8'), 8.00 (1H, brs, 苯丙氨酸 NH), 8.10 (1H, brs, 丙氨酸 NH)。结合相关文献[12]的数据, 确定该化合物为环(丙氨酸-苯丙氨酸), 结构如图 5 所示。

3 讨论与结论

米曲霉具有出色的产酶能力,可产生多种酶类,包括蛋白酶、淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、植酸酶等,因此有关米曲霉代谢产物的研究主要集中在其产酶能力及酶活性等方面。如马俊阳等^[13]从一株米曲霉中分离纯化到两种蛋白酶,对酪蛋白具有很强的水解活性;Ge等^[14]从米曲霉 NL-1 中分离到一种新的 α -L-鼠李糖苷酶,具有很强的转糖基活性。相对而言,有关米曲霉小分子活性物质的研究非常少见。近期 Liu 等^[15]从一株植物内生真菌米曲霉 L1020 中分离到 13 个新的生物碱类化合物 Asperorydines A-M,其中有 3 个化合物对神经细胞 PC12 具有显著的促进增生效果。在前期研究中,我们发现一株银杏内生真菌米曲霉 *Aspergillus oryzae* YX-5 具有突出的抗肿瘤活性。因此,在本实验中对该菌株的次级代谢产物进行了进一步的研究,分离得到一个具有很强抗肿瘤活性的化合物羟基曲霉酸以及 3 个环二肽类化合物,其中环(丙氨酸-苯丙氨酸)和环(亮氨酸-苯丙氨酸)对 HeLa 细胞具有一定的细胞毒活性。活性测试结果表明,羟基曲霉酸为该菌株的主要活性化合物。实验中共分离得到该化合物 43.3 mg,占总浸膏量的 0.55%,产率为 0.72 mg/L。但是由于还有一些活性组分没有进行分离,可能其中还有在柱层析过程中被分散或损失的羟基曲霉酸,因此,这个活性成分的产率可能应该更高一些。

有关曲霉酸类物质的研究相对较少,仅有的一些报道显示,这类化合物一般具有较好的抗菌活性。从清酒发酵菌米曲霉中分离到的曲霉酸对军团杆菌具有很强的抑制作用^[10];朱峰等^[16]从榄钱附生真菌发现了具有抗菌作用的新曲霉酸;秦岭等^[17-18]发现几种烟曲霉酸型甾体可以和抗生素组合,对多种耐药菌具有明显的协同抗菌作用,能降低抗生素的用量和副作用,可应用于抗耐药菌药物的生产中;司书毅等^[19]分离得到一种新结构曲霉酸类衍生

物脱氧新羟曲霉酸,发现其可以上调高密度脂蛋白受体表达和抑制巨噬细胞泡沫化的作用,能用于治疗动脉粥样硬化。关于曲霉酸类物质抗肿瘤活性的报道很少。陈修文等^[20]从一株深海来源的曲霉菌 16-02-1 中分离得到新曲霉酸和新羟基曲霉酸,在 100 μ g/mL 时对 K562、LH60、HeLa 和 BGC-823 等肿瘤细胞均具有一定的抑制作用,抑制率在 21.8%–53.3% 之间。本实验中分离到的羟基曲霉酸对 HeLa 细胞的 IC_{50} 达 1.07 μ g/mL,显示曲霉酸类物质在抗肿瘤方面也具有一定的应用潜力,值得进一步关注。本实验中分离得到的羟基曲霉酸与脱氧新羟曲霉酸结构相似,对于其是否能用于治疗动脉粥样硬化尚需进一步的实验证明。

REFERENCES

- [1] Jia M, Chen L, Xin HL, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00906
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216
- [3] dos Santos Souza B, dos Santos TT. Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications[J]. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 2017, 4(2): 113-126
- [4] Singh B, Kaur P, Singh GRD, et al. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*[J]. *Fitoterapia*, 2008, 79(6): 401-418
- [5] Zhang YQ, Chen AY, Li M, et al. *Ginkgo biloba* extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Journal of Surgical Research*, 2008, 148(1): 17-23
- [6] Li HQ, Gao Y, Li XJ. Advances of endophyte associated with *Ginkgo biloba*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(25): 1-6 (in Chinese)
李虎强, 高义, 李晓君. 银杏内生真菌研究进展[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(25): 1-6
- [7] Miao L, Wang YY, Zhu L, et al. Endophytic fungi from four plant species: their isolation and antitumor activity[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(6): 865-869 (in Chinese)
缪莉, 王元元, 朱磊, 等. 四种植物内生真菌的分离及其抗肿瘤活性的筛选[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(6): 865-869
- [8] Zhou HR, Luan HB, Wang H, et al. Optimization of the fermentation medium of an antitumor endophytic fungus *Aspergillus oryzae* YX-5 isolated from *Ginkgo biloba*[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(7): 1358-1367 (in Chinese)
周惠茹, 栾海彬, 王慧, 等. 抗肿瘤银杏内生真菌 *Aspergillus*

- oryzae* YX-5 发酵培养基的优化[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1358-1367
- [9] Zhang ZR, Kang JC, Lei BX, et al. Anti-tumor activity of extracts from Ginkgo endophytic fungi[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2015, 34(1): 52-55,65 (in Chinese)
张峥嵘, 康冀川, 雷帮星, 等. 银杏内生真菌及发酵液粗提物抗肿瘤活性研究[J]. 山地农业生物学报, 2015, 34(1): 52-55,65
- [10] Sano Y, Ishikawa Y, Muramatsu S, et al. Study on the *Koji* mold producing substrate — possible application as a food supplement[J]. Food Science and Technology Research, 2007, 13(1): 13-19
- [11] Liu H, Chen J, Deng ZW, et al. Secondary metabolites from marine derived fungus *Penicillium terrestre*[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2010, 19(6): 482-486
- [12] Stark T, Hofmann T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(18): 7222-7231
- [13] Ma JY, Zhuge B, Fang HY, et al. Purification and characterization of proteases from *Aspergillus oryzae*[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 83-89 (in Chinese)
马俊阳, 诸葛斌, 方慧英, 等. 米曲霉蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 83-89
- [14] Ge L, Xie JC, Wu T, et al. Purification and characterisation of a novel α -L-rhamnosidase exhibiting transglycosylating activity from *Aspergillus oryzae*[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(12): 2596-2603
- [15] Liu L, Bao L, Wang L, et al. Asperorydines A–M: prenylated tryptophan-derived alkaloids with neurotrophic effects from *Aspergillus oryzae*[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2018, 83(2): 812-822
- [16] Zhu F, Hu GP, Chen X, et al. Studies on the secondary metabolites produced by mixed cultures of two epiphytic fungi isolated from a fruit of mangrove *Avicennia marina*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2009, 48(6): 79-82 (in Chinese)
朱峰, 胡谷平, 陈忻, 等. 榄钱两株附生真菌混合培养次级代谢产物研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 48(6): 79-82
- [17] Qin L, Guan JF, Li BG, et al. New use of fumigacin type steroids in producing medicine for anti-drug fast bacteria: CN, 200510021822.9[P]. 2007-04-11 (in Chinese)
秦岭, 官家发, 李伯刚, 等. 一种烟曲霉酸型甾体在制造抗耐药菌药物中的新用途: 中国, 200510021822.9[P]. 2007-04-11
- [18] Qin L, Li BG, Guan JF, et al. Chemical study on *Aspergillus* sp.136[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2007, 13(1): 66-68
- [19] Si SY, Hong B, Jiang W, et al. Deoxyneohydroxyaspergillic acid and its prepn and use: CN, 200410029901.X[P]. 2009-01-14 (in Chinese)
司书毅, 洪斌, 姜威, 等. 脱氧新羟曲霉酸及制备及其用途: 中国, 200410029901.X[P]. 2009-01-14
- [20] Chen XW, Li CW, Hua W, et al. Metabolites of *Aspergillus* sp.16-02-1 isolated from a deep sea sediment and preliminary test of their antitumor and antifungal activities[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2013, 32(3): 1-10 (in Chinese)
陈修文, 李长伟, 华威, 等. 深海来源曲霉 16-02-1 的代谢产物及其抗肿瘤抗真菌活性初步测评[J]. 中国海洋药物, 2013, 32(3): 1-10