

· 论著 ·

金线莲内生真菌 *Aspergillus* sp. J218 的次生代谢产物研究

何旭辉, 李祥昂, 陈美言, 王一丁, 吴 睿, 郑承剑 (海军军医大学药理学系, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究从金线莲 *Anectochilus roxburhii* 中分离的一株曲霉属内生真菌 *Aspergillus* sp. J218 的次生代谢产物。方法 利用 Sephadex LH-20 凝胶、硅胶和高效液相制备等色谱法从 J218 固体发酵产物的乙酸乙酯部位分离化合物, 采用波谱方法对化合物进行结构鉴定。结果 从金线莲内生真菌 *Aspergillus* sp. J218 的次生代谢产物中共分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为 kotanin(1)、flavasperone(2)、aurasperone B(3)、fonsecinone B(4)、fonsecinone D(5)、tensidol A(6)、fonsecinone A(7)、fonsecinone C(8)、aurasperone A(9) 和 fonsecinone F(10)。结论 从金线莲内生真菌曲霉属 *Aspergillus* sp. J218 次生代谢产物分离鉴定多为二聚萘并吡喃酮类化合物, 提示该菌株含有丰富的二聚化合成酶, 可为后续探索该菌株中二聚萘并吡喃酮类化合物的生物合成途径提供线索。

[关键词] 曲霉属; 金线莲; 内生真菌; 次生代谢产物; 二聚萘并吡喃酮类化合物

[文章编号] 2097-2024(2023)07-0411-05 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202208068

Secondary metabolites of endophytic fungus *Aspergillus* sp. J218 from *Anectochilus roxburhii*

HE Xuhui, LI Xiang-ang, CHEN Meiyang, WANG Yiding, WU Rui, ZHENG Chengjian (School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To isolate the secondary metabolites of endophytic fungus *Aspergillus* sp. J218 from *Anectochilus roxburhii*. **Methods** Different chromatographic methods, including Sephadex LH-20 and silica gel chromatography as well as HPLC, were used to isolate compounds from the EtOAc fraction of the solid fermentation of J218, and their structures were identified by spectral methods. **Results** Ten compounds were isolated from the fermentation of J218 and their structures were individually identified as kotanin(1), flavasperone(2), aurasperone B(3), fonsecinone B(4), fonsecinone D(5), ensidol A(6), fonsecinone A(7), fonsecinone C(8), aurasperone A(9), and fonsecinone F(10). **Conclusion** Most compounds isolated from endophytic fungus *Aspergillus* sp. J218 in *Anectochilus roxburhii* were identified as dimeric naphthopyrones. These results suggest that this strain contains rich dimerization synthase, which could provide clues for the further exploration of the rational biosynthesis pathway of dimeric naphthopyrones in this strain.

[Key words] *Aspergillus* sp. J218; *Anectochilus roxburhii*; endophytic fungi; secondary metabolites; dimeric naphthopyrones

内生真菌经过长期进化与宿主植物形成互利共生的关系, 植物可以为内生真菌提供生长所需的营养物质, 内生真菌可以促进植物生长、协助对抗干旱与虫害等胁迫、产生结构新颖丰富的次生代谢物以及诱导植物次生代谢物积累^[1]。植物内生真菌作为来源于药用植物的一种新兴微生物资源, 在医药、农业和食品工业领域都展现出越来越广泛的应用前景^[2]。

金线莲 *Anectochilus roxburhii* 为兰科金线兰属 (*Anectochilus*) 多年生草本植物, 又名金线兰、金耳环、鸟人参等, 在民间有“药王”、“金草”等美称, 具有清热凉血、除湿解毒等功效, 主产于我国南部如福建、台湾、浙江等地, 富含多糖、内酯苷和黄酮及苷类等成分, 具有抗炎、提高免疫力、保肝、抗肿瘤降糖等生物活性^[3,4]。目前, 有关金线莲内生菌的研究多聚焦于植株体内内生菌生物多样性^[5]、促进宿主生长^[6], 以及提高宿主抗病性^[7]等研究。对于金线莲内生菌次生代谢产物的研究相对有限^[8,9], 从金线莲内生真菌次生代谢产物中发现结构新颖、具有显著药效活性的先导化合物具有较大潜能, 有待进一步挖掘。

本研究选取从金线莲中分离得到的一株内生

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82174081); 上海市浦江人才计划(21PJD082)

[作者简介] 何旭辉, 硕士研究生, 助教, 研究方向: 中药及其内生菌活性物质发现, Email: hexuhuismmu@163.com

[通信作者] 郑承剑, 博士, 教授, 研究方向: 中药及其内生菌资源开发, Email: cjzheng1984@126.com

真菌株 *Aspergillus* sp. J218, 采用大米固体发酵法进行发酵, 并从发酵产物的乙酸乙酯萃取物中分离纯化、鉴定得到 10 个化合物(图 1)。所鉴定成分多为二聚萜并吡喃酮类化合物, 提示该株内生真菌含有丰富的二聚化合成酶, 对其生物合成潜能有进一步挖掘的价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 Series 半制备型液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Eclipse XDB-C18 半制备色谱柱(250 mm×9.4 mm, 5 μm; 美国 Agilent 公司); Bruker Avance 600 MHz(德国 Bruker 公司); APEX7.0 FT-MS 型质谱仪(德国 Bruker 公司); RE-52C 旋转蒸发器(上海沪西分析仪器有限公司); HWS-24 型恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); SHZ-D III 型循环水式真空泵(巩义予华仪器有限责任公司); Sephadex LH-20(美国 Pharmacia 公司); 反相色谱硅胶 12 nm S-50 μm(日本株式会社 YMC); 柱色谱硅胶(200~300 目)和 GF254(100 mm×100 mm) 硅胶板(青岛海洋化工厂); 分析级乙醇、乙酸乙酯、甲醇、二氯甲烷(上海泰坦科技股份有限公司); 色谱级甲醇、乙腈(上海泰坦科技股份有限公司); 屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司); 发酵用水为去离子水; 显色剂为香草醛-硫酸显色剂(12 g 香草醛, 250 ml 乙醇, 200 ml 浓硫酸, 500 ml 蒸馏水)。

1.2 药材

本实验所用菌株为 2020 年从产自福建南靖的

一株金线莲(*Anectochilus roxburhii*)中分离得到。采样植株经福建中医药大学吴岩斌副研究员鉴定为金线莲, 内生真菌经形态学鉴定为曲霉菌属 *Aspergillus* sp., 编号为 J218, 现保存于海军军医大学中药鉴定学教研室。

1.3 菌株发酵

将保存的金线莲内生真菌菌株 *Aspergillus* sp. J218 接种至经高压灭菌的 PDA 平板培养基上, 于培养箱活化培养 7 d, 用灭菌的打孔器打孔取菌饼置于装有 250 g 大米培养基的 1000 ml 锥形瓶中, 共 40 瓶, 常温发酵 30 d。

1.4 代谢产物提取与分离

发酵产物每瓶用 500 ml 95% 乙醇超声提取二次, 每次 45 min, 过滤, 减压浓缩至无醇味, 将发酵提取物用石油醚(1:1.5)脱脂 2 次, 然后用乙酸乙酯(1:2)萃取 3 次, 合并乙酸乙酯部分萃取液, 减压浓缩得到褐色浸膏 24.7 g。将 24.7 g 浸膏由适量甲醇溶解, 上样于 Sephadex LH-20 柱色谱, 以 80% 甲醇进行洗脱, 得到 5 个组分(Fr. 1~5)。

Fr.2 析出淡黄色结晶, 经 300~400 目硅胶色谱以二氯甲烷: 甲醇(30:1)洗脱得到化合物 1(49.2 mg)。Fr.3 部分经 200 目硅胶柱色谱, 以二氯甲烷: 甲醇(200:1→7:1)进行梯度洗脱, 同时用 TLC 进行点板检测, 合并得到 5 个组分 Fr.3-1~3-5。Fr.3-4 经 300~400 目硅胶色谱以二氯甲烷: 甲醇(75:1)洗脱得到化合物 2(5 mg); Fr.3-5 经 Sephadex LH-20 凝胶柱(80% 甲醇洗脱)和 300~400 目硅胶色谱以石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇(5:10:0.5)洗脱得到化合物 3(22.6 mg); Fr.3-2

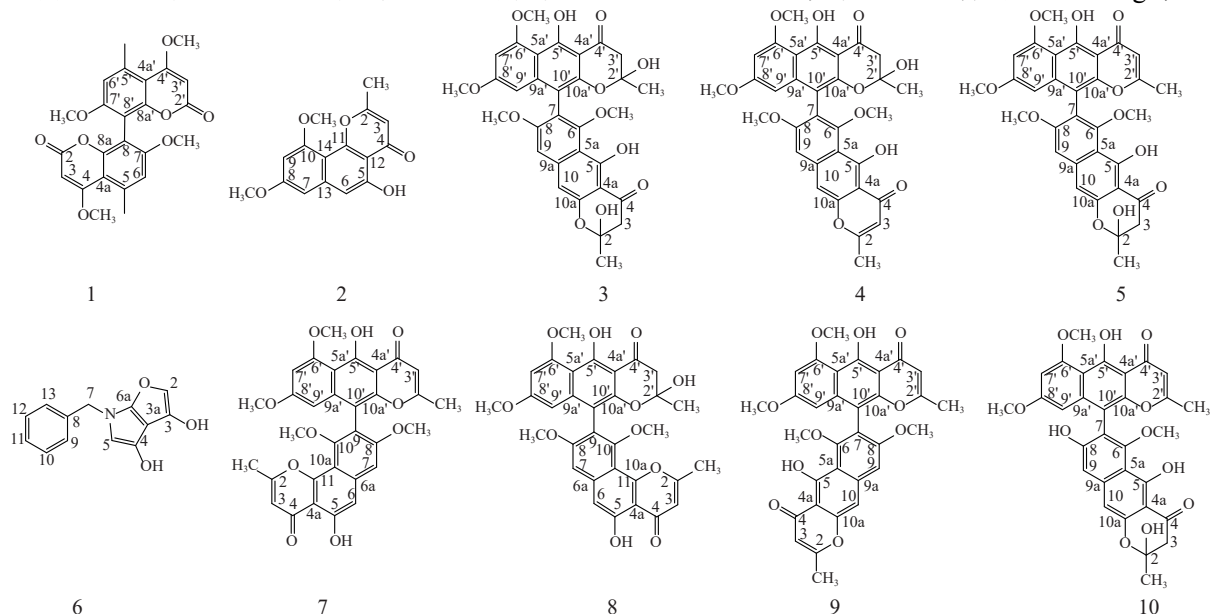


图 1 化合物 1~10 的化学结构式

经 200 目硅胶柱色谱(二氯甲烷: 二氯甲烷: 甲醇=1000: 1→100: 1)得到 5 个亚组分 Fr.3-2-1~3-2-5。Fr.3-2-5 经 300-400 目硅胶色谱以二氯甲烷: 甲醇(105: 1)洗脱得到化合物 4(27.7 mg); Fr.3-2-4 以 65% 甲醇-0.05% 甲酸水为流动相, 经 Agilent 1200 Series 半制备型液相色谱, 色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈, 流速为 2 ml/min, 收集 22 min 馏分减压浓缩得到化合物 5(49.3 mg); Fr.3-2-2 经 300-400 目硅胶色谱以二氯甲烷: 甲醇(135: 1)洗脱得到化合物 6(10.7 mg)和化合物 7(6.8 mg); Fr.3-2-2 经 300~400 目硅胶色谱以二氯甲烷: 甲醇(120: 1)洗脱得到化合物 8(15.7 mg)和化合物 9(11.5 mg)。Fr.4 部分经 200 目硅胶柱色谱, 以二氯甲烷: 甲醇(800: 1→80: 1)进行梯度洗脱, 得到化合物 10(2.3 mg)。

2 结果

化合物 1: 黄色粉末。分子式: C₂₄H₂₂O₈, ESI-MS m/z : 439 [M+H]⁺。¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 6.73 (s, 1H, H-6, 6'), 5.51 (s, 1H, H-3, 3'), 3.93 (s, 3H, 4,4'-OCH₃), 3.80 (s, 3H, 5, 5'-OCH₃), 2.70 (s, 3H, 7, 7'-CH₃)。 ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 169.88 (C-4, 4'), 163.12 (C-2, 2'), 159.57 (C-7, 7'), 153.49 (C-8a, 8a'), 138.52 (C-5, 5'), 111.43 (C-6, 6'), 108.45 (C-8, 8'), 107.47 (C-4a, 4a'), 87.72 (3, 3'-CH₃), 56.11 (7, 7'-OCH₃), 55.89 (4, 4'-OCH₃), 24.06 (5, 5'-CH₃)^[10], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 1 为 kotanin。

化合物 2: 黄色粉末。分子式: C₁₆H₁₄O₅, ESI-MS m/z : 285 [M-H]⁻。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 12.81 (s, 1H, 5-OH), 6.88 (s, 1H, H-6), 6.60 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 6.41 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-9), 6.29 (s, 1H, H-3), 3.99 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.94 (s, 3H, 8-OCH₃), 2.51 (s, 3H, 2-CH₃)。 ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 182.83 (C-4), 166.54 (C-2), 161.43 (C-8), 159.05 (C-10), 156.61 (C-5), 155.79 (C-11), 141.18 (C-13), 110.21 (C-3), 108.84 (C-14), 105.77 (C-6), 104.88 (C-12), 97.93 (C-7), 96.98 (C-9), 55.85 (10-OCH₃), 55.44 (8-OCH₃), 20.46 (2-CH₃)^[11], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 2 为 flavasperone。

化合物 3: 黄色粉末。分子式: C₃₂H₃₀O₁₂, ESI-MS m/z : 607 [M+H]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 14.53 (s, 1H, 5'-OH), 14.17 (s, 1H, 5-OH), 6.88~6.78 (m, 1H, H-9), 6.69 (d, J = 17.8 Hz,

1H, H-10), 6.37 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7'), 6.13 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H-9'), 4.00 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.79 (d, J = 9.8 Hz, 3H, 8-OCH₃), 3.68~3.61 (m, 3H, 8'-OCH₃), 3.38 (d, J = 3.1 Hz, 3H, 6-OCH₃), 3.07~2.99 (m, 2H, 3-H₂), 2.98~2.87 (m, 2H, 3'-H₂), 1.79 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 2-CH₃), 1.48 (d, J = 3.8 Hz, 3H, 2'-CH₃)。 ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 197.60 (C-4'), 196.89 (C-4), 164.85 (C-8'), 163.81 (C-8), 162.15 (C-6'), 161.81 (C-6), 161.01 (C-5'), 158.18 (C-5), 153.19 (C-10a), 151.34 (C-10a'), 142.66 (C-9a), 142.39 (C-9a'), 117.81 (C-7), 110.55 (C-5a), 107.73 (C-5a'), 106.44 (C-10'), 103.79 (C-4a), 103.58 (C-4a'), 102.77 (C-9), 102.24 (C-10), 100.21 (C-2), 100.11 (C-2'), 97.37 (C-7'), 96.21 (C-9'), 61.58 (C-6), 56.17 (C-6'), 55.89 (C-8), 55.16 (C-8'), 47.33 (C-3), 46.92 (C-3'), 29.24 (2'-CH₃), 28.69 (2-CH₃)^[12, 13], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 3 为 aurasperone B。

化合物 4: 微黄色粉末。分子式: C₃₂H₂₈O₁₁, ESI-MS m/z : 587 [M-H]⁻。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 14.77 (s, 1H, 5-OH), 14.52 (s, 1H, 5'-OH), 7.12 (s, 1H, H-10), 6.97 (s, 1H, H-9), 6.36 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7'), 6.13 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-9'), 6.04 (s, 1H, H-3), 4.00 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.82 (s, 3H, 8-OCH₃), 3.64 (s, 3H, 8'-OCH₃), 3.42 (s, 3H, 6-OCH₃), 2.92 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 3'-H₂), 2.40 (s, 3H, 2-CH₃), 1.48 (s, 3H, 2'-CH₃)。 ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 197.49 (C-4'), 184.46 (C-4), 167.68 (C-2), 164.96 (C-8'), 162.18 (C-8), 161.89 (C-6'), 161.86 (C-6), 160.22 (C-5), 157.40 (C-5'), 153.18 (C-10a), 151.30 (C-10a'), 142.62 (C-9a), 140.21 (C-9a'), 118.64 (C-7), 111.39 (C-5a), 107.83 (C-5a'), 107.36 (C-3), 106.62 (C-10'), 104.72 (C-4a), 103.84 (C-4a'), 101.75 (C-9), 101.18 (C-10), 100.23 (C-2'), 97.44 (C-7'), 96.23 (C-9'), 61.78 (6-OCH₃), 56.19 (6'-OCH₃), 55.90 (8-OCH₃), 55.15 (8'-OCH₃), 46.88 (C-3'), 28.86 (2'-CH₃), 20.74 (2-CH₃)^[14, 15], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 4 为 fonsecinone B。

化合物 5: 淡黄色粉末。分子式: C₃₂H₂₈O₁₁, ESI-MS m/z : 589 [M+H]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 14.94 (brs, 1H), 14.17 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H, H-10), 6.86 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-9), 6.73 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H-7'), 6.43 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-9'), 6.24 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 6.00 (t, J = 15.3 Hz, 1H, 2-OH), 4.04 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.78 (s, 3H, 8-

OCH₃), 3.65 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, 8'-OCH₃), 3.44 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.13 ~ 2.94 (m, 2H, 3-H₂), 2.21 ~ 2.10 (m, 3H, 2'-CH₃), 1.82 (s, 3H, 2-CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 196.59 (C-4), 184.58 (C-4'), 167.56 (C-2'), 164.06 (C-8), 162.63 (C-8'), 161.43 (C-6'), 161.04 (C-6), 160.96 (C-5), 159.43 (C-5'), 153.32 (C-10a'), 150.80 (C-10a), 142.74 (C-9a), 140.71 (C-9a'), 116.80 (C-7), 110.70 (C-5a'), 108.57 (C-5a), 107.20 (C-3'), 105.17 (C-10), 104.25 (C-4a'), 103.51 (C-4a), 102.67 (C-9), 101.85 (C-10'), 100.12 (C-2), 96.96 (C-7'), 96.49 (C-9'), 61.87 (6'-OCH₃), 56.19 (6-OCH₃), 55.91 (8'-OCH₃), 55.18 (8-OCH₃), 47.35 (C-3), 28.68 (2-CH₃), 20.68 (2'-CH₃)^[12, 14], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 **5** 为 fonsecinone D。

化合物 **6**: 黄色粉末。分子式: C₁₃H₁₁NO₃, ESI-MS m/z : 230 [M+H]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 9.11 (s, 1H, 4-OH), 8.75 (s, 1H, H-2), 7.42 ~ 7.37 (m, 2H, H-9, 13), 7.37 ~ 7.31 (m, 1H, H-11), 7.26 (dt, $J = 6.2, 1.4$ Hz, 2H, H-10, 12), 6.27 (s, 1H, H-5), 6.03 (s, 1H, 3-OH), 3.91 (s, 2H, 7-H₂); ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 178.08 (C-3), 168.85 (C-6a), 164.15 (C-4), 162.07 (C-2), 133.79 (C-8), 129.12 (C-9, 13), 127.83 (C-10, 12), 119.26 (C-3a), 116.06 (C-5), 39.60 (C-7)^[16], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 **6** 为 tensidol A。

化合物 **7**: 黄色粉末。分子式: C₃₂H₂₆O₁₀, ESI-MS m/z : 571 [M+H]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 15.22 (brs, 1H, 5'-OH), 12.81 (brs, 1H, 5-OH), 7.08 (s, 1H, H-6), 7.00 (s, 1H, H-7), 6.46 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-7'), 6.37 (s, 1H, H-3), 6.22 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-9'), 6.04 (s, 1H, H-3'), 4.06 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.81 (s, 3H, 8-OCH₃), 3.65 (s, 3H, 8'-OCH₃), 3.46 (s, 3H, 10-OCH₃), 2.52 (s, 3H, 2-CH₃), 2.15 (s, 3H, 2'-CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 184.59 (C-4'), 183.01 (C-4), 167.48 (C-2), 166.87 (C-2'), 162.83 (C-5'), 161.61 (C-8'), 161.16 (C-6'), 160.07 (C-8), 156.96 (C-10), 156.69 (C-5), 155.15 (C-11), 150.86 (C-10a'), 140.82 (C-6a), 140.67 (C-9a'), 117.16 (C-9), 110.68 (C-3), 108.65 (C-5a'), 108.01 (C-10a), 107.37 (C-3'), 106.07 (C-6), 105.05 (C-10'), 104.28 (C-4a'), 101.57 (C-7), 97.03 (C-7'), 96.36 (C-9'), 61.21 (10-OCH₃), 56.23 (6'-OCH₃), 55.98 (8-OCH₃), 55.18 (8'-OCH₃), 20.67 (2'-CH₃), 20.55 (2-CH₃)^[15, 17], 以上波谱数据与文献对照一

致, 确定化合物 **7** 为 fonsecinone A。

化合物 **8**: 黄色粉末。分子式: C₃₂H₂₈O₁₁, ESI-MS m/z : 588 [M+H]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 14.55 (s, 1H, 5'-OH), 12.79 (s, 1H, 5-OH), 7.07 (s, 1H, H-7), 7.02 (s, 1H, H-6), 6.41 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7'), 6.37 ~ 6.35 (m, 1H, H-3), 6.17 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-9'), 4.04 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.86 (s, 3H, 8-OCH₃), 3.67 (s, 3H, 8'-OCH₃), 3.42 (s, 3H, 6-OCH₃), 2.97 (d, $J = 18.4$ Hz, 2H, 3'-H₂), 2.51 (s, 3H, 2-CH₃), 1.49 (s, 3H, 2'-CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 197.18 (C-4'), 182.70 (C-4), 166.66 (C-2), 165.11 (C-8'), 162.45 (C-8), 161.91 (C-6'), 160.06 (C-10), 156.55 (C-5), 155.61 (C-5'), 154.98 (C-11), 151.13 (C-10a'), 142.53 (C-6a), 140.45 (C-9a'), 118.17 (C-9), 110.74 (C-10'), 109.4 (C-10a), 107.93 (C-5a'), 107.90 (C-3), 106.58 (C-10), 106.05 (C-4a), 103.71 (C-4a'), 102.01 (C-6), 100.22 (C-2'), 97.31 (C-7'), 96.49 (C-9'), 61.13 (10-OCH₃), 56.20 (6'-OCH₃), 55.98 (8-OCH₃), 55.21 (8'-OCH₃), 46.65 (C-3'), 29.16 (2'-CH₃), 20.51 (2-CH₃)^[15], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 **8** 为 fonsecinone C。

化合物 **9**: 黄色粉末。分子式: C₃₂H₂₆O₁₀, ESI-MS m/z : 571 [M+H]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 15.20 (s, 1H, 5'-OH), 14.79 (s, 1H, 5-OH), 7.11 (s, 1H, H-10), 6.93 (s, 1H, H-9), 6.37 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7'), 6.17 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-9'), 6.01 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-3), 5.94 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-3'), 3.98 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.74 (s, 3H, 8-OCH₃), 3.58 (s, 3H, 8'-OCH₃), 3.42 (s, 3H, 6-OCH₃), 2.37 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, 2-CH₃), 2.07 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, 2'-CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_{C} : 184.60 (C-4'), 184.43 (C-4), 167.62 (C-2), 167.54 (C-2'), 162.72 (C-5'), 162.01 (C-5), 161.41 (C-8'), 161.07 (C-6'), 160.20 (C-8), 158.61 (C-6), 153.37 (C-10a), 150.84 (C-10a'), 140.70 (C-9a), 140.55 (C-9a'), 117.63 (C-7), 111.45 (C-5a), 108.59 (C-5a'), 107.44 (C-3), 107.26 (C-3'), 105.17 (C-10'), 104.73 (C-4a), 104.27 (C-4a'), 101.35 (C-9), 101.21 (C-10), 96.88 (C-7'), 96.53 (C-9'), 62.01 (6-OCH₃), 56.21 (6'-OCH₃), 55.91 (8-OCH₃), 55.13 (8'-OCH₃), 20.75 (2-CH₃), 20.68 (2'-CH₃)^[11, 17], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 **9** 为 aurasperone A。

化合物 **10**: 黄色粉末。分子式: C₃₁H₂₆O₁₁, ESI-MS m/z : 575 [M+H]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} : 15.11 (s, 1H, 5'-OH), 14.28 (s, 1H,

5-OH), 7.05 (s, 1H, H-9), 6.68 (d, $J = 2.4$, 1H, H-7'), 6.28 (d, $J = 2.4$, 1H, H-9'), 5.95 (s, 1H, H-10), 5.91 (s, 1H, H-3'), 3.86 (s, 3H, 6'-OCH₃), 3.69 (s, 3H, 8'-OCH₃), 3.42 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.00 (dd, $J = 16.9, 3.8$ Hz, 2H, 3-H₂), 2.14 (s, 3H, 2'-CH₃), 1.28 (s, 3H, 2-CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, Chloroform-*d*) δ_C : 196.48 (C-4), 184.14 (C-4'), 168.21 (C-2'), 164.48 (C-5), 163.38 (C-5'), 162.22 (C-8'), 160.92 (C-6'), 159.81 (C-8), 157.63 (C-6), 152.99 (C-10a), 151.98 (C-10a'), 142.79 (C-9a), 140.72 (C-9a'), 115.05 (C-7), 110.59 (C-5a), 108.45 (C-5a'), 107.32 (C-3'), 106.50 (C-9), 106.48 (C-10'), 104.14 (C-4a'), 103.30 (C-4a), 102.31 (C-10), 100.02 (C-2), 97.21 (C-9'), 95.94 (C-7'), 62.03 (6-OCH₃), 55.86 (6'-OCH₃), 55.31 (8'-OCH₃), 47.19 (C-3), 28.80 (2-CH₃), 20.72 (2'-CH₃)^[18], 以上波谱数据与文献对照一致, 确定化合物 **10** 为 aurasperone F。

3 讨论

本研究选取从金线莲植株中分离得到的一株内生真菌 *Aspergillus* sp. J218 为研究对象, 从其大米固体发酵产物中共分离鉴定出 10 个化合物。其中化合物 **3**、**4**、**5**、**7**、**8**、**9**、**10** 均为二聚萘并吡喃酮类化合物, 化合物 **1** 为香豆素类化合物二聚体。据报道, 萘并吡喃酮类化合物的单体及二聚体类广泛分布于曲霉属和镰刀属真菌的次级代谢产物中, 二聚萘并吡喃酮类化合物对多种致病菌, 如绿脓杆菌、克鲁斯假丝酵母、幽门螺杆菌等, 有中等抑菌活性^[19], 对多种癌细胞如 MDA-MB-231、PANC-1、A549 等表现出一定抑制活性^[20-21]。研究表明, 化合物 **7** 和 **9** 对幽门螺杆菌具有中等抑制活性^[22]; 化合物 **8** 对 A549、HL-60 和 MGC-803 细胞具有不用程度抑制作用^[23]; 化合物 **6** 能够增强咪康唑对白色念珠菌的抑制活性^[24]; 化合物 **1** 对枯草芽孢杆菌和尖孢镰刀菌具有一定的抑制作用^[25]。由此可见, 从 *Aspergillus* sp. J218 中分离鉴定的多数化合物对病原微生物具有一定的抑制作用, 提示该菌株在提升宿主植物抗病性方面具有潜在的应用价值; 所鉴定化学结构类型提示该菌株含有丰富的二聚化合酶, 但相关研究较少。Frandsen 等推测二聚萘并吡喃酮类化合物是由乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 分子经过一系列缩合、甲基化和氧化还原反应形成萘并吡喃酮单体, 再由一种假定的漆酶 Gip1 将单体羟基上一个电子移除, 然后通过电子重排形成碳活化单体, 自身或相互偶联形成二聚体^[26]; 徐丹

等^[27]发现二聚萘并吡喃酮化合物 ustilaginoidins 中 C-2 和 C-3 双键的还原是由一种磷脂甲基转移酶 (UsgR) 催化形成, 这种还原酶对线性萘并- γ -吡喃酮单体的还原具有特异性, 但对二聚体则无特异性, 而漆酶 (UsgL) 对各种单体的阻转异构选择性偶联导致了 ustilaginoidins 系列衍生物的结构多样性。上述研究为该菌株后续探索该类芳香族聚酮化合物二聚化的生物合成途径提供了一条线索。

【参考文献】

- [1] 刘圣越, 王跃飞, 何永志, 等. 内生真菌对宿主植物生长和次级代谢产物影响研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(1): 128-136.
- [2] DOS SANTOS I R, ABDEL-AZEEM A M, MOHESIEN M T, et al. Insights into the bioprospecting of the endophytic fungi of the medicinal plant *Palicourea rigida* kunth (Rubiaceae): detailed biological activities[J]. *J Fungi (Basel)*, 2021, 7(9): 689.
- [3] 刘英孟, 张海燕, 汪镇朝, 等. 金线莲的研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(1): 186-192.
- [4] 陈育青, 林艺华, 邹毅辉, 等. 金线莲生药鉴定、活性成分影响因素及药理作用研究进展[J]. *中成药*, 2020, 42(8): 2141-2144.
- [5] 陈娟, 孟志霞, 邢咏梅, 等. 5种兰科药用植物可培养内生真菌的鉴定及多样性分析[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(4): 267-271.
- [6] 王涵, 林清强, 胡雪娇, 等. 金线莲内生促生真菌的筛选及其促生机制探讨[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 35(3): 72-79, 95.
- [7] ZHU Q, WU Y B, CHEN M, et al. Preinoculation with Endophytic fungus *Phomopsis liquidambaris* reduced rice bakanae disease caused by *Fusarium proliferatum* via enhanced plant resistance[J]. *J Appl Microbiol*, 2022, 133(3): 1566-1580.
- [8] 廖祖健. 两株金线莲内生真菌 *Annulohyphoxylon* cf. *stygium* (ARTCL-05)、*Diaporthe* sp. (ARL-09) 中具有特异性激活 ER α 的活性成分研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
- [9] 邓梦仪. 三株金线莲内生真菌次生代谢产物研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2021.
- [10] HÜTTEL W, MÜLLER M. Regio- and stereoselective intermolecular oxidative phenol coupling in kotanin biosynthesis by *Aspergillus niger*[J]. *Chembiochem*, 2007, 8(5): 521-529.
- [11] ABDELWAHAB G M, MIRA A, CHENG Y B, et al. Acetylcholine esterase inhibitory activity of green synthesized nanosilver by naphthopyrones isolated from marine-derived *Aspergillus niger*[J]. *PLoS One*, 2021, 16(9): e0257071.
- [12] SIRIWARDANE A M D A, KUMAR N S, JAYASINGHE L, et al. Chemical investigation of metabolites produced by an endophytic *Aspergillus* sp. isolated from *Limonia acidissima*[J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(14): 1384-1387.

(下转第 442 页)

- 验方剂学杂志, 2020, 26(20): 105-110.
- [13] 陈振声, 张志峰. 针刺结合经皮椎体成形术治疗绝经后骨质疏松性椎体压缩性骨折的临床研究[J]. 针灸临床杂志, 2018, 34(10): 18-22.
- [14] 林巧璇, 刘晶, 卢莉铭, 等. 补肾活血汤对骨质疏松性椎体压缩性骨折PKP术后患者疼痛和骨代谢的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(3): 21-26.
- [15] 赵海玲, 周宗波, 李建强, 等. 加味补肾活血汤联合中药熏蒸治疗骨质疏松性椎体压缩性骨折术后患者的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 95-100.
- [16] 李雷, 罗甲连, 郭红雪. 补肾活血壮骨汤联合椎体后凸成形术对骨质疏松性椎体压缩性骨折的疗效和远期生活质量的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(5): 671-674.
- [17] 刘保新, 蔡迎峰, 陈兵, 等. 中药膏方、八段锦联合钙剂预防骨质疏松性椎体压缩骨折PVP术后再骨折的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(4): 448-455.
- [18] 陈小龙, 辛坤, 赵光辉, 等. 固肾益精汤联合PVP术治疗骨质疏松性胸腰椎体压缩性骨折临床疗效及对患者oswestry功能障碍指数的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2020, 22(4): 94-96.
- [19] 李跃京, 刘锋伟, 李彦州, 等. 芎活四物汤联合介入疗法治疗骨质疏松性椎体压缩性骨折的疗效及对患者骨代谢的影响[J]. 陕西中医, 2018, 39(7): 938-940.
- [20] 崔凯, 曹玉强, 邵鹏越, 等. 补肾健骨汤对骨质疏松性压缩骨折术后愈合及腰椎功能的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(34): 114-117.
- [收稿日期] 2021-08-10 [修回日期] 2022-01-17
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 415 页)

- [13] SHAABAN M, SHAABAN K A, ABDEL-AZIZ M S. Seven naphtho- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Alternaria alternata*: structure elucidation and biological properties[J]. *Org Med Chem Lett*, 2012, 2: 6.
- [14] HUA Y, PAN R, BAI X L, et al. Aromatic polyketides from a symbiotic strain *Aspergillus fumigatus* D and characterization of their biosynthetic gene *D8. t287*[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(6): 324.
- [15] HE Y, TIAN J, CHEN X T, et al. Fungal naphtho- γ -pyrones: potent antibiotics for drug-resistant microbial pathogens[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24291.
- [16] FUKUDA T, HASEGAWA Y, HAGIMORI K, et al. Tensidols, new potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Aspergillus niger* FKI-2342[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2006, 59(8): 480-485.
- [17] CAMPOS F R, BARISON A, DAOLIO C, et al. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A, two bis-naphthopyrones produced by *Aspergillus aculeatus*[J]. *Magn Reson Chem*, 2005, 43(11): 962-965.
- [18] BOURAS N, MATHIEU F, COPPEL Y, et al. Aurasperone F - a new member of the naphtho-gamma-pyrone class isolated from a cultured microfungus, *Aspergillus niger*C-433[J]. *Nat Prod Res*, 2005, 19(7): 653-659.
- [19] ZHENG Y Y, LIANG Z Y, SHEN N X, et al. New naphtho- γ -pyrones isolated from marine-derived fungus *Penicillium* sp. HK1-22 and their antimicrobial activities[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(6): 322.
- [20] 陈赞鸿, 朱静琳, 林灵茵, 等. 红树林内生真菌 *Aspergillus fumigatus* SAS10二聚萆并吡喃酮类代谢产物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(6): 967-974.
- [21] QUANG T H, PHONG N V, ANH L N, et al. Secondary metabolites from a peanut-associated fungus *Aspergillus niger* IM-BC-NMTP01 with cytotoxic, anti-inflammatory, and antimicrobial activities[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 36(5): 1215-1223.
- [22] HAN J H, YANG N, WEI S Z, et al. Dimeric hexylitaconic acids from the marine-derived fungus *Aspergillus welwitschiae* CUGBMF₁₈₀₂₆₂[J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(2): 578-585.
- [23] LI D H, HAN T, GUAN L P, et al. New naphthopyrones from marine-derived fungus *Aspergillus niger* 2HL-M-8 and their *in vitro* antiproliferative activity[J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(10): 1116-1122.
- [24] TAKAGI M, MOTOHASHI K, HWANG J H, et al. New tensidols, JBIR-86 and JBIR-87, isolated from *Aspergillus* sp. fJ80[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2010, 63(7): 371-373.
- [25] LI W S, XIONG P, ZHENG W X, et al. Identification and antifungal activity of compounds from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus clavatus* R7[J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(8): 259.
- [26] FRANDSEN R J N, NIELSEN N J, MAOLANON N, et al. The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones[J]. *Mol Microbiol*, 2006, 61(4): 1069-1080.
- [27] XU D, YIN R Y, ZHOU Z Y, et al. Elucidation of ustilaginoid-in biosynthesis reveals a previously unrecognised class of eneductases[J]. *Chem Sci*, 2021, 12(44): 14883-14892.
- [收稿日期] 2022-08-16 [修回日期] 2023-01-09
[本文编辑] 李春德