

欧阳锦逵, 吴春银, 王裕阳, 等. 窿缘桉内生真菌 *Chaetomium* sp. Eef-10 的鉴定及活性成分分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 104-110.
OUYANG Jinkui, WU Chunyin, WANG Yuyang, et al. Identification of endophytic fungus *Chaetomium* sp. Eef-10 from *Eucalyptus exserta* and analysis of its active ingredients[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(2): 104-110.

窿缘桉内生真菌 *Chaetomium* sp. Eef-10 的鉴定及活性成分分析

欧阳锦逵, 吴春银, 王裕阳, 张成彬, 毛子翎, 单体江

(华南农业大学 林学与风景园林学院/广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】确定内生真菌 Eef-10 的分类地位, 分离和鉴定该真菌中的次生代谢产物并评价其抗细菌和抗肿瘤细胞活性, 以期得到具有抗细菌和抗肿瘤活性的天然活性化合物。【方法】内生真菌的鉴定采用形态学和分子生物学相结合的方法; 次生代谢产物的分离和纯化主要采用减压硅胶柱层析、葡聚糖凝胶 LH-20 和半制备高效液相色谱等方法; 化合物的鉴定主要依据 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 等波谱学数据以及相关的参考文献; 采用 MTT 显色法测定了次生代谢产物对 5 种不同供试细菌的抑制活性; 采用 CCK8 法测定了次生代谢产物对 2 种不同癌细胞的抑制活性。【结果】从内生真菌 Eef-10 中分离到的 3 个化合物, 分别鉴定为 Atraric acid(化合物 I)、2, 4-二羟基-3, 6-二甲苯基甲酸乙酯 (Ethyl 2, 4-dihydroxy-3, 6-dimethylbenzoate)(化合物 II) 和 4-甲基-5, 6-二氢-2H-吡喃-2-酮 (4-methyl-5, 6-dihydro-2 H-pyran-2-one)(化合物 III)。化合物 II 对 5 种革兰阴性细菌表现出强抑制活性, 最大半数抑制质量浓度 (IC₅₀) 为 35.87~55.50 μg/mL, 化合物 I 的 IC₅₀ 为 67.25~130.55 μg/mL, 化合物 III 的 IC₅₀ 均大于 200 μg/mL。抗肿瘤细胞活性的测定结果表明, 化合物 II 对肝癌细胞株 Hep-G2 的 IC₅₀ 为 1.50 μg/mL, 活性强于阳性对照喜树碱 (IC₅₀ 为 3.6 μg/mL)。【结论】从内生真菌 *Chaetomium* sp. Eef-10 中分离得到化合物 I~III, 化合物 II 对桉树青枯病菌和 Hep-G2 细胞具有较好的抑制作用。

关键词: 内生真菌; *Chaetomium* sp. Eef-10; 抗细菌活性; 抗肿瘤细胞活性
中图分类号: S788.1;S789.8 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2020)02-0104-07

Identification of endophytic fungus *Chaetomium* sp. Eef-10 from *Eucalyptus exserta* and analysis of its active ingredients

OUYANG Jinkui, WU Chunyin, WANG Yuyang, ZHANG Chengbin, MAO Ziling, SHAN Tijiang
(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University/Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To determine the classification status of endophytic fungus Eef-10. To isolate and identify secondary metabolites of Eef-10 and evaluate their antibacterial and antitumor activities in order to obtain natural active compounds. 【Method】The endophytic fungus was identified by combining morphology and molecular biology methods. The secondary metabolites were mainly separated and purified by vacuum silica gel column chromatography, sephadex LH-20 column chromatography and semi-preparative HPLC. The compounds were identified mainly based on ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data as well as related references. The antibacterial activities against five different test bacteria were determined by the MTT method and the antitumor activities against two cancer cells were determined by the CCK8 method. 【Result】Three compounds were isolated from

收稿日期:2019-05-05 网络首发时间:2020-01-07 11:38:45
网络首发地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20200106.0923.014.html>
作者简介:欧阳锦逵 (1992—), 男, 博士研究生, E-mail: ouyangjinkui@stu.scau.edu.cn; 通信作者: 毛子翎 (1988—), 女, 副教授, 博士, E-mail: zlmiao@scau.edu.cn; 单体江 (1983—), 男, 讲师, 博士, E-mail: tjshan@scau.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金青年科学基金 (31400544); 广东省自然科学基金 (2017A030313200)

the endophytic fungus Eef-10, namely atraric acid (Compound I), ethyl 2, 4-dihydroxy-3, 6-dimethylbenzoate (Compound II) and 4-methyl-5, 6-dihydro-2 *H*-pyran-2-one (Compound III). Compound II displayed strong inhibitory activities against five test gram-negative bacteria, and the IC₅₀ values were 35.87–55.50 µg/mL. The IC₅₀ values of compound I were 67.25–130.55 µg/mL, while compound III had IC₅₀ values of more than 200 µg/mL for all five bacteria. The IC₅₀ value of compound II for Hep-G2 was 1.50 µg/mL, which was stronger than the positive control camptothecin of 3.6 µg/mL. 【Conclusion】 Compounds I–III were isolated from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Eef-10 and compound II showed great antibacterial and antitumor activities on *R. solanacearum* and Hep-G2 tumor cells.

Key words: endophytic fungus; *Chaetomium* sp. Eef-10; antibacterial activity; antitumor activity

植物内生真菌 (Endophytic fungus) 是指那些生活史的部分阶段或全部生活于健康植物组织或器官内部, 且在长期的协同进化过程中与宿主植物形成互惠共生关系的一类真菌^[1-2]。内生真菌与宿主植物形成的这种互惠共生关系为研究者从植物内生真菌次生代谢产物中寻找新型的天然活性先导物提供了新的方向^[3]。近年来, 内生真菌次生代谢产物的研究越来越受到人们的重视, 尤其是从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 韧皮部分离到产紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanae* 后, 掀起了人们对内生真菌次生代谢产物研究的热潮^[4-5]。内生真菌作为一种新型的天然活性物质资源宝库, 能够产生多种结构新颖的次生代谢产物, 其具有抗菌、杀虫、抗氧化、抗肿瘤以及促进植物生长和提高植物抗病性等多种生物活性, 从植物内生真菌中寻找具有开发潜能的生物活性物质引起了人们极大的兴趣^[6-9]。

目前对于桉树内生真菌及其次生代谢产物的研究多集中在内生真菌的生理学和生态学作用方面。谢安强等^[10-12]研究发现桉树内生真菌能够显著提高桉树的抗逆能力, 如促进植株对磷的吸收能力, 提高桉树的抗寒能力, 促进植株的光合作用效能等。Kharwar 等^[13]从柠檬桉 *Eucalyptus citriodora* 中分离得到的曲霉属 *Aspergillus* sp. 和毛壳菌属 *Chaetomium* sp. 内生真菌表现出较强的抗真菌和抗细菌活性。格希格图等^[14]从不同桉树根部分离到的内生真菌对桉树青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 有不同程度的拮抗作用, 其中以大叶桉 *Eucalyptus robusta* 内生真菌的抗菌活性最为明显。Mohali 等^[15]从桉树和金合欢 *Acacia farnesiana* 中分离到 2 株新的内生真菌 *Fusicoccum* sp., 但并未对其次生代谢产物的生物活性进行研究。华南农业大学林学与风景园林学院森林保护教研室的前期研究表明, 窿缘桉 *Eucalyptus exserta* 果实内生真菌 Eef-10 表现出较好的抗桉树青枯病菌活性^[16], 本文在前期研

究的基础上, 以内生真菌 Eef-10 为研究对象, 通过形态学和分子生物学相结合的方法确定其分类地位, 同时分离和鉴定内生真菌 Eef-10 中的活性成分, 并测定其抗细菌和抗肿瘤细胞活性, 以期为内生真菌资源的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和肿瘤细胞

内生真菌 Eef-10 分离自健康的窿缘桉果实, 目前保藏于华南农业大学林学与风景园林学院植物和微生物健康实验室。

供试细菌包括大肠埃希菌 *Escherichia coli*(G⁻)、根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*(G⁻)、黄瓜角斑病菌 *Pseudomonas lachrymans*(G⁻)、桉树青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*(G⁻) 和番茄疮痂病菌 *Xanthomonas vesicatoria*(G⁻), 以上菌株均保藏于华南农业大学林学与风景园林学院植物和微生物健康实验室。

供试细胞株系为肝癌细胞 (Hep-G2) 和宫颈癌细胞 (HeLa), 供试肿瘤细胞由中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所提供。

1.2 仪器与试剂

核磁共振波谱仪 (Bruker Avance-600, 美国 Bruker 公司), 半制备型液相色谱仪 (泵: UC-3281, 紫外检测器: UC-3292S, 上海 Welch 公司), 分析型液相色谱仪 (LC-10F, 天津博纳艾杰尔科技有限公司), 三用紫外仪 (ZQ-1, 上海安亭科学仪器厂), 超净工作台 (SW-CJ-2G, 苏州净化设备有限公司), 生化培养箱 (LRH-250, 上海一恒科技有限公司)。

Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (瑞士 GE Healthcare 公司), GF₂₅₄ 薄层层析硅胶和正相柱层析硅胶 (青岛化工有限公司), 硫酸链霉素 (w=98%, 上海麦克林生化科技有限公司), 噻唑蓝 (MTT) 生物显色剂 (w=98%, 美国 Amresco 公司), 喜树碱 (w≥

99%, 上海麦克林生化科技有限公司), 真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 甲醇、二甲基亚砜、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷、二氯甲烷和石油醚 (分析纯, 天津富宇精细化工厂), 甲醇 (色谱纯, 上海星可高纯溶剂有限公司), 氘代氯仿、氘代丙酮 (巴斯夫化学有限公司)。

1.3 内生真菌 Eef-10 的鉴定

采用形态学和分子生物学相结合的方法对内生真菌 Eef-10 进行鉴定。

1.3.1 形态学鉴定 用灭菌牙签挑取 PDA 培养基上菌落边缘生长旺盛的菌丝, 接种于新的 PDA 培养基中, 置于生化培养箱中培养 7~10 d, 然后用生物显微镜观察菌丝、有性孢子和产孢结构等特征, 参照 Sekhar 等^[17] 对内生真菌 Eef-10 进行形态学鉴定。

1.3.2 分子生物学鉴定 参照单体江等^[18] 的方法对内生真菌 Eef-10 进行分子生物学鉴定。将纯化后的内生真菌 Eef-10(在 PDA 培养基上生长 5 d) 接种到 PDB 培养基中, 28 ℃、150 r/min 条件下振荡培养 5 d, 分液漏斗过滤后收集菌丝, 用液氮进行充分研磨至粉末状, 采用真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取其总 DNA, 使用真菌的通用引物 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 扩增其 ITS 序列。PCR 反应体系 (50 μL): 去离子水 21 μL, 2×*Taq* PCR MasterMix (含染料) 25 μL, ITS4 (10 μmol/L) 1 μL, ITS5 (10 μmol/L) 1 μL, 模板 DNA (10 ng/μL) 2 μL; PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 40 s, 56 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 1 min 20 s, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。将测序成功的 ITS 序列提交至 GenBank 数据库, 获得登录号。通过在 NCBI 网站上进行 BLAST, 下载与其相似性较高的序列及其近似属的序列, 使用 MAFFT version 7 处理后, 用 MEGA6 软件采用最大似然法构建系统发育树。

1.4 内生真菌 Eef-10 次生代谢产物的制备

采用大米固体培养基对内生真菌 Eef-10 进行大规模发酵。首先从 4 ℃ 冻存管中挑取少许 Eef-10 菌丝接种到 PDA 平板上活化培养 5~7 d, 再将其菌丝接种在 500 mL 装有 200 mL PDB 培养基的三角瓶中, 置于 28 ℃、150 r/min 条件下振荡培养 3~5 d。将获得的液体种子接入已灭菌的大米培养基中, 共发酵 6 kg, 28 ℃ 条件下暗培养 60 d, 以确保菌丝将大米培养基营养消耗完毕。而后将发酵好的固体发酵物用甲醇冷浸提取 3 次, 每次 7 d, 减压浓缩后水

混悬, 依次用等体积的石油醚和乙酸乙酯萃取, 分别得到石油醚层和乙酸乙酯层粗提物。

1.5 次生代谢产物的分离、纯化和鉴定

乙酸乙酯层提取物 (51.40 g) 经减压硅胶柱层析, 先用石油醚洗脱, 再用二氯甲烷和甲醇梯度洗脱, 通过薄层层析合并成 A~D 4 个部分。其中 B 部分 (25.19 g) 再经减压硅胶柱层析, 采用二氯甲烷和甲醇梯度洗脱, 通过薄层层析合并成 11 个馏分, 分别编号为 B₁~B₁₁。B₄ 馏分 (2.9 g) 经 Sephadex LH-20 柱层析 (三氯甲烷: 甲醇体积比为 1:1), 通过薄层层析检测后合并为 7 个组分, 分别编号为 B_{4.1}~B_{4.7}。B_{4.7} (30 mg) 经 semi-HPLC (甲醇: 水体积比为 65:35, 流速 5 mL/min, λ = 210 nm, 进样体积为 0.1 mL) 制备, 得到化合物 I (4.5 mg) 和化合物 II (5.5 mg)。B₆ 馏分 (9.5 g), 经 Sephadex LH-20 (三氯甲烷: 甲醇体积比为 1:1) 柱层析, 通过薄层层析检测后合并成 6 个组分, 编号为 B_{6.1}~B_{6.6}。其中 B_{6.3} (95 mg) 经 semi-HPLC (甲醇: 水体积比为 50:50, 流速 5 mL/min, λ = 210 nm, 进样体积为 0.1 mL) 制备, 得到化合物 III (30 mg)。

单体化合物的结构主要通过 ¹H NMR、¹³C NMR 等波谱学数据进行鉴定, 并与文献比对后确定。

1.6 抗菌活性的测定

抗菌活性的测定参照刘志强等^[19] 的方法, 精密称取单体化合物 I~III 各 2.0 mg 分别溶于 0.3 mL 丙酮中, 再加入 0.7 mL 蒸馏水, 配成质量浓度为 2 000 μg/mL 的母液, 然后用 φ 为 30% 的丙酮溶液依次稀释成质量浓度为 2 000.000、1 000.000、500.000、250.000、125.000、62.500、31.250、15.625 μg/mL 的样品溶液。阳性对照为硫酸链霉素, 采用相同的方法配成质量浓度为 500.000 00、250.000 00、125.000 00、62.500 00、31.250 00、15.625 00、7.812 50、3.906 25 μg/mL 的溶液, 备用。在无菌的 96 微孔板中加入 10⁶ CFU/mL 的供试菌液 90 μL, 然后加入不同浓度的测试样品溶液 10 μL。同时设空白对照 (H₂O) 和溶剂对照 (φ 为 30% 的丙酮溶液), 每处理 6 个重复。用封口膜将 96 微孔板四周封口, 于 28 ℃、黑暗条件下振荡 (15 r/min) 培养 24 h, 每孔加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后, 以 3 000 r/min 离心 20 min, 去上清, 每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 150 μL, 振荡 (15 r/min) 30 min, 为了测定半抑制浓度 (IC₅₀), 多孔板离心后, 每孔取 100 μL, 于 510 nm 下测定吸光度 (D_{510 nm})。按下面公式计算待测样品对供试细菌的抑制率:

抑制率 =
$$\frac{\text{溶剂对照孔}D_{510\text{ nm}} - \text{药液孔}D_{510\text{ nm}}}{\text{溶剂对照孔}D_{510\text{ nm}}} \times 100\%。$$

所得数据采用 Microsoft excel 软件进行分析, 供试样品浓度取对数 (X), 抑制率换算成概率值 (Y), 求得抑制活性回归方程 ($Y = aX + b$) 和半抑制浓度 (IC_{50})。

1.7 抗肿瘤细胞活性测定

抗肿瘤细胞活性的测定参照 Ouyang 等^[20] 的方法, 阳性对照为喜树碱。将对数生长期细胞接种于 96 孔细胞培养板 (Nest) 中, 待 6~8 h 后细胞贴壁。用含有 5%(w)FBS(Gibco) 的 DMEM(Hyclone) 细胞培养基将化合物以 2 倍梯度稀释, 共制备 8 个梯度 (质量浓度分别为 80.000、40.000、20.000、10.000、5.000、2.500、1.250 和 0.625 $\mu\text{g/mL}$) 备用。小心吸弃各孔内原生长培养基后, 将制备好的各浓度化合物分别加入对应孔中, 每孔 200 μL , 每个化合物每个浓度设置 4 组重复孔。对照孔加入相应浓度的 DMSO。在 37 $^{\circ}\text{C}$, $\varphi(\text{CO}_2)$ 为 5% 条件下, 化合物与细胞继续共培养 48 h。每孔加入 CCK8 试剂 15 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi(\text{CO}_2)$ 为 5% 条件下继续培养 4 h 后, 采用多功能微孔板检测仪在 450 nm 下检测各孔

的吸光度 ($D_{450\text{ nm}}$), 记录并保存数据。采用 GraphPad Prism 5 拟合各化合物在各细胞株的生长抑制曲线并计算其 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 内生真菌 Eef-10 的鉴定

内生真菌 Eef-10 的菌落和显微形态如图 1 所示。在 PDA 培养基上, 菌落呈规则圆形 (图 1a), 气生菌丝发达, 绒毛状, 初始时菌落白色, 后期菌落颜色逐渐变灰, 且随时间延长而逐渐加深, 培养 7 d 后可布满整个培养皿 ($d = 7.5\text{ cm}$)。在显微镜下观察发现, 菌丝有隔 (图 1b), 内含多个油滴, 菌丝后期颜色较深且粗细不均, 隔间距缩短; 子囊果近球形 (图 1d), 有孔口; 附属丝较长, 呈菌丝状, 有隔, 周生于子囊果且大部分集中生长于子囊果顶部; 子囊孢子灰褐色 (图 1c), 单孢, 卵圆形, 光滑, 长 $\times$ 宽平均为 7.0 $\mu\text{m} \times 5.5\text{ }\mu\text{m}$, 有顶生萌发孔; 与毛壳菌属 *Chaetomium* 的特征相一致^[17, 21]。

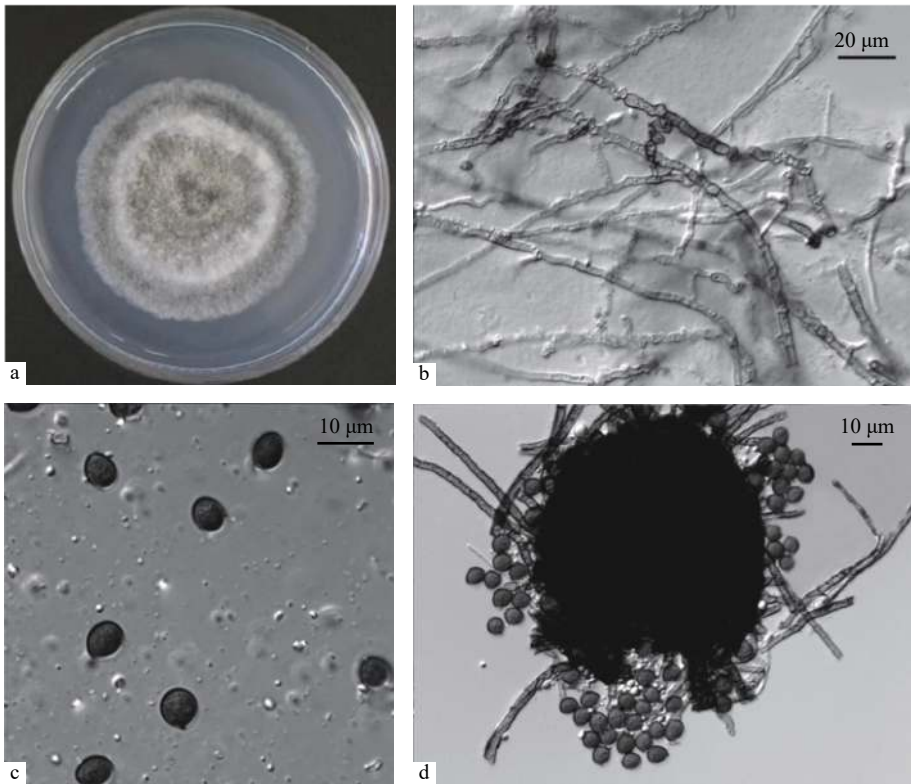


图 1 内生真菌 Eef-10 的菌落 (a)、菌丝 (b)、子囊孢子 (c) 和子囊果 (d)
Fig. 1 Colony (a), mycelium (b), ascospore (c) and ascoma (d) of endophytic fungus Eef-10

进一步通过真菌通用引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 扩增, 获得大小为 592 bp 的目的序列, 将该目的序列提交至 GenBank, 获得登录号 MK120863。在 GenBank 数据库中进行同源性比对, 采用最大似然法通过 MEGA 6 构建系统发育树 (图 2)。从图 2

可以看出, 内生真菌 Eef-10 与 *Chaetomium* sp.(登录号: KU504294.1) 聚在同一支上, 其最大相似度为 99.82%, 结合形态学特征最终将内生真菌 Eef-10 确定为子囊菌门 Ascomycota 核菌纲 Pyrenomycetes 粪壳目 Sordariales 毛壳菌科 Chaetomiaceae 毛壳菌

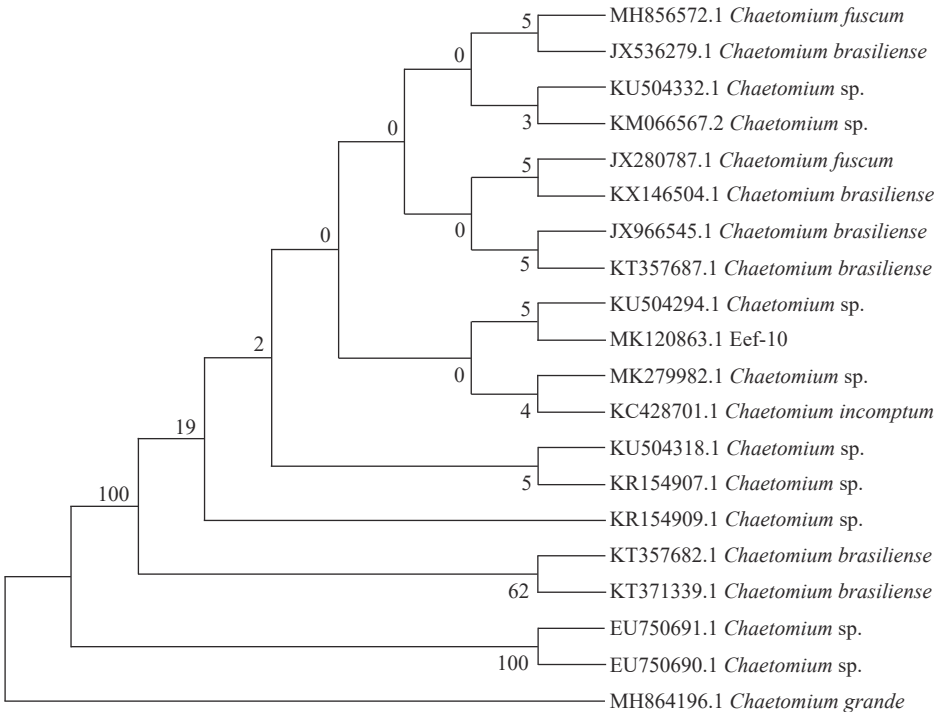


图 2 依据内生真菌 Eef-10 的 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of endophytic fungus Eef-10 based on rDNA-ITS sequence

属 *Chaetomium* sp. 真菌。

2.2 化合物的结构鉴定

通过¹H NMR、¹³C NMR 等波谱学数据以及文献比对, 确定了 3 种化合物的结构 (图 3)。

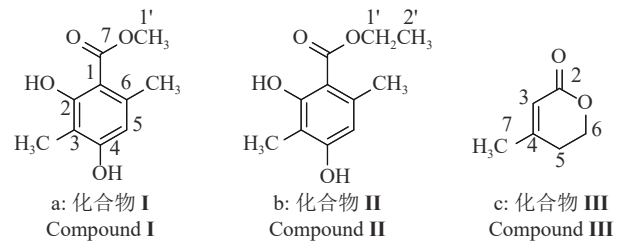


图 3 化合物 I ~ III 的结构

Fig. 3 The structures of compounds I - III

化合物 I, 淡黄色固体, ¹H NMR 谱在 δ_{H} 6.20 (1H, s) 处有 1 个苯基质子信号, 在 δ_{H} 2.09 (3H, s) 和 2.46 (3H, s) 处有 2 个苯甲基质子信号, 在 δ_{H} 3.91 (3H, s) 处有 1 个甲氧基质子信号, δ_{H} 12.06 (1H, s) 和 5.14 (1H, s) 表明其结构中含有 2 个羟基信号, 而且 ¹³C NMR 谱中的 2 个芳香族碳信号 δ_{C} 163.37 和 158.20 进一步支持了苯环在 C-2 和 C-4 处的氧化; 通过 ¹H NMR 谱的相关信息及 ¹³C NMR 谱 δ_{C} 163.37, 158.20, 140.39, 110.75, 108.70, 105.46 可以推导其结构中含有 1 个五取代苯环; ¹³C NMR 谱在 δ 172.83 处表明其结构中含有 1 个羰基。化合物 I 的 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 12.06 (1H, s, 2-OH), 6.20 (1H, s, H-5), 5.14 (1H, s,

5-OH), 3.91 (3H, s, H-1'), 2.45 (3H, s, H-6), 2.10 (3H, s, H-3); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 172.83 (C-7), 163.37 (C-2), 158.20 (C-4), 140.39 (C-6), 110.75 (C-5), 108.70 (C-3), 105.46 (C-1), 52.08 (C-1'), 24.36 (C-6), 7.89 (C-3)。上述数据与文献 [22] 数据一致, 故将化合物 I 鉴定为 2, 4-二羟基-3, 6-二甲基苯甲酸甲酯 (Methyl 2, 4-dihydroxy-3, 6-dimethylbenzoate, 即 Atraric acid)(图 3a)。

化合物 II, 白色固体, 化合物 II 的 ¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱与化合物 I 数据非常接近, 基本骨架一致, ¹H NMR 谱中 δ_{H} 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H) 信号, 表明其结构中含有 1 个 R—CH₂—CH₃ 信号。化合物 II 的 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 12.14 (1H, s, 2-OH), 6.19 (1H, s, H-5), 5.18 (1H, s, 5-OH), 4.38 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-1'), 2.46 (3H, s, H-6), 2.09 (3H, s, H-3), 1.40 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-2'); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 172.17 (C-7), 163.18(C-2), 158.01 (C-4), 140.18 (C-6), 110.53 (C-5), 108.55 (C-3), 105.28(C-1), 61.22(C-1'), 24.23(C-6), 14.26(C-2'), 7.67(C-3)。上述数据与文献 [23] 数据一致, 最终化合物 II 鉴定为 2, 4-二羟基-3, 6-二甲基苯甲酸乙酯 (Ethyl 2, 4-dihydroxy-3, 6-dimethylbenzoate)(图 3b)。

化合物 III, 无色油状液体, 化合物 III 的 ¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ_{H} : 5.71(1H, s, H-3), 4.32 (2H, t, *J* = 6.2 Hz, H-6), 2.42 (2H, t, *J* = 6.2 Hz, H-5),

2.01(3H, s, H-7); ¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆)δ_C: 164.55 (C-2), 159.51 (C-4), 116.95 (C-3), 66.64 (C-6), 29.75 (C-5), 22.87(C-7)。上述数据与参考文献 [24] 数据基本一致, 所以化合物III鉴定为 4-甲苯-5, 6-二氢-2*H*-吡喃-2-酮 (4-methyl-5, 6-dihydro-2*H*-pyran-2-one)(图 3c)。

2.3 抗菌活性

内生真菌 Eef-10 次生代谢产物对 5 种供试细菌的抑制活性如表 1 所示。其中化合物III在供试浓度下对 5 种供试细菌的 IC₅₀ 均大于 200 μg/mL;

化合物 II 对所有供试细菌的抑制活性均强于化合物 I, 其中对桉树青枯病菌的抑制活性最强, 其 IC₅₀ 为 35.87 μg/mL, 与阳性对照硫酸链霉素非常接近, 其次是对黄瓜角斑病菌和番茄疮痂病菌的抑制活性, 其 IC₅₀ 分别为 38.91 和 40.80 μg/mL, 对大肠埃希菌和根癌土壤杆菌的抑制活性较弱; 化合物 I 对黄瓜角斑病菌的抑制活性最强, 其 IC₅₀ 为 67.25 μg/mL, 其次是对番茄疮痂病菌的抑制活性, 其 IC₅₀ 为 93.59 μg/mL, 而对其他供试细菌的 IC₅₀ 均大于 100 μg/mL。

表 1 内生真菌 Eef-10 次生代谢产物的抗菌活性

Table 1 Antibacterial activities of the secondary metabolites isolated from endophytic fungus Eef-10

供试样品 Tested sample	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)				
	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	根癌土壤杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	黄瓜角斑病菌 <i>Pseudomonas lachrymans</i>	桉树青枯病菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	番茄疮痂病菌 <i>Xanthomonas vesicatoria</i>
化合物 I Compound I	130.55 ± 3.57	105.39 ± 4.52	67.25 ± 1.23	113.11 ± 3.58	93.59 ± 0.43
化合物 II Compound II	48.52 ± 0.33	55.50 ± 1.61	38.91 ± 0.54	35.87 ± 0.18	40.80 ± 0.70
化合物III Compound III	>200	>200	>200	>200	>200
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	18.51 ± 0.46	5.10 ± 0.03	30.54 ± 0.89	33.07 ± 2.46	13.81 ± 1.62

2.4 抗肿瘤细胞活性

抗肿瘤细胞活性的测定结果如表 2 所示, 通过 GraphPad Prism 5 拟合各化合物在各细胞株的生长抑制曲线计算其 IC₅₀, 除化合物 II 之外, 其他化合物对 2 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 均大于 50 μg/mL; 化合物 II 对 HeLa 细胞的 IC₅₀ 大于 50 μg/mL, 但对 Hep-G2 的 IC₅₀ 仅为 1.50 μg/mL, 明显强于阳性对照喜树碱的 3.6 μg/mL, 表明化合物 II 对 Hep-G2 肿瘤细胞具有较好的生长抑制作用。

表 2 内生真菌 Eef-10 次生代谢产物的抗肿瘤细胞活性

Table 2 Antitumor activities of the secondary metabolites isolated from endophytic fungus Eef-10

供试细胞 Tested cell	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)			
	化合物 I Compound I	化合物 II Compound II	化合物III Compound III	喜树碱 Camptothecin
Hep-G2	>50	1.50	>50	3.6
HeLa	>50	>50	>50	6.3

3 讨论与结论

本研究以分离和鉴定抗细菌和抗肿瘤的活性化合物为导向, 从隆缘桉内生真菌 *Chaetomium* sp. Eef-10 中共分离出 3 个化合物, 包括 2 个苯酚类和 1 个戊烯酸内酯类化合物。前人的研究表明, 化合物 I (Atraric acid) 是一种天然的雄激素受体拮抗

剂, 主要应用于前列腺癌的治疗^[25-26], 该化合物曾在地衣植物 *Parmotrema cooperi*^[27]、*Lecidella carpathica*^[28] 和 *Pseudevernia furfuracea*^[22] 以及地钱植物 *Frullania brasiliensis*^[29]、非洲臀果木 *Pygeum africanum*^[23] 和紫葳科植物 *Newbouldia laevis*^[30] 中被发现和报道, 而有关化合物 II 的研究却很少, 一般是作为 Atraric acid 衍生物的形式被报道, 但化合物 II 对雄激素受体的拮抗作用甚至略高于 Atraric acid, 亦可作为抗前列腺癌优先级的候选药物^[31]。本研究中性活性的结果显示, 化合物 II 表现出较好的抗细菌活性, 其中对桉树青枯病菌的抑制活性最强, IC₅₀ 为 35.87 μg/mL, 与阳性对照结果相当, 且化合物 II 对 Hep-G2 肿瘤细胞也具有较好的抑制作用, 研究结果为寻找抗桉树青枯病菌天然微生物源活性药物提供了新的思路。

致谢: 感谢华南农业大学农学院谢辉和徐春玲老师在内生真菌形态学鉴定方面提供的帮助!

参考文献:

[1] 杨镇, 曹君. 植物内生菌及其次级代谢产物的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(4): 1-6.
[2] 黄敬瑜, 张楚军, 姚瑜龙, 等. 植物内生菌生物抗菌活性物质研究进展[J]. 生物工程学报, 2017(2): 178-186.
[3] 王举涛, 马宗慧, 王国凯, 等. 毫苣内生真菌 *Alternaria alternata* 次生代谢产物的研究[J]. 中草药, 2019, 50(5):

- 1061-1065.
- [4] 马养民, 乔珂, 李梦云, 等. 夹竹桃内生真菌 R22 的次生代谢产物研究[J]. *陕西科技大学学报*, 2016, 34(6): 125-129.
- [5] 王富乾, 蒋捷, 马浩然, 等. 一株毛壳属内生真菌次生代谢产物研究[J]. *中草药*, 2017, 48(7): 1298-1301.
- [6] LI S, ZHANG X, WANG X H, et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 156: 316-343.
- [7] YU J, WU Y, HE Z, et al. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Camellia oleifera*[J]. *Mycobiology*, 2018, 46(2): 85-91.
- [8] WANG D, WANG H, LI J, et al. Investigating the role of endophytic fungi in *Gentiana scabra* by cross-growth period inoculation[J]. *Indian J Microbiol*, 2018, 58(3): 319-325.
- [9] SHAN T, TIAN J, WANG X, et al. Bioactive spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus *Berkleasium* sp.[J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(10): 2151-2160.
- [10] 谢安强, 洪伟, 吴承祯, 等. 桉树内生菌对尾巨桉幼苗抗寒性的影响[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2011, 40(2): 138-144.
- [11] 谢安强, 洪伟, 吴承祯, 等. 10 株桉树内生真菌对尾巨桉 (*E. urophylla*×*E. grandis*) 光合作用的影响[J]. *福建林学院学报*, 2011, 31(1): 31-37.
- [12] 谢安强, 洪伟, 吴承祯, 等. 内生真菌对低磷胁迫下尾巨桉生理及土壤特性的影响[J]. *西南林业大学学报*, 2013, 33(3): 1-7.
- [13] KHARWAR R N, GOND S K, KUMAR A, et al. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, 26(11): 1941-1948.
- [14] 格希格图, 胡鸾雷, 慈忠玲, 等. 桉树根部内生菌与青枯病相关关系研究[J]. *林业实用技术*, 2009(8): 42-43.
- [15] MOHALI S, SLIPPERS B, WINGFIELD M J. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data[J]. *Mycol Res*, 2006, 110(4): 405-413.
- [16] 冯皓. 桉树内生真菌及其次生代谢产物生物活性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [17] SEKHAR V C. Morphology and selection of potential region for DNA barcoding to identify *Chaetomium* species[D]. New Delhi: Indian Agricultural Research Institute, 2015.
- [18] 单体江, 秦楷, 谢银燕, 等. 木麻黄内生真菌次生代谢产物及生物活性[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(3): 67-74.
- [19] 刘志强, 王平, 单体江, 等. 稻曲球脂溶性成分及其抗细菌和抗氧化活性[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(12): 1777-1781.
- [20] OUYANG J K, MAO Z L, GUO H, et al. Mollicellins O-R, four new depsidones isolated from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Eef-10[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3218-3229.
- [21] 谭悠久. 毛壳菌科 (Chaetomiaceae) 分类及分子系统发育研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [22] AYSEGUL G, ESRA K A, IPEK S, et al. Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 726-734.
- [23] SCHLEICH S, PAPAIOANNOU M, BANIAHMAD A, et al. Activity-guided isolation of an antiandrogenic compound of *Pygeum africanum*[J]. *Planta Med*, 2006, 72(6): 547-551.
- [24] YING Y M, ZHANG L W, SHAN W G, et al. Secondary metabolites of *Peyronella* sp. XW-12, an endophytic fungus of *Huperzia serrata*[J]. *Chem Nat Comp*, 2014, 50(4): 723-725.
- [25] PAPAIOANNOU M, SCHLEICH S, PRADE I, et al. The natural compound atraric acid is an antagonist of the human androgen receptor inhibiting cellular invasiveness and prostate cancer cell growth[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8b): 14.
- [26] ROELL D, BANIAHMAD A. The natural compounds atraric acid and N-butylbenzene-sulfonamide as antagonists of the human androgen receptor and inhibitors of prostate cancer cell growth[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 332(1/2): 1-8.
- [27] CHOUDHARY M L, ALI M, WAHAB A, et al. *Parmotrema cooperi* 中的新型抗糖化物质和酶抑制剂 (英文)[J]. *中国科学: 化学*, 2012, 42(1): 97-98.
- [28] SEO C, HANYIM J, LEE H K, et al. PTP1B inhibitory secondary metabolites from the Antarctic lichen *Lecidella carpathica*[J]. *Mycology*, 2011, 2(1): 18-23.
- [29] ALICIA B, GRACIELA B M, NORMA K, et al. Eremophilanolides and other constituents from the Argentine liverwort *Frullania brasiliensis*[J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(2): 205-213.
- [30] GORMANN R, KALOGA M, LI X C, et al. Furanonaphthoquinones, atraric acid and a benzofuran from the stem barks of *Newbouldia laevis*[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(2): 583-587.
- [31] PAPAIOANNOU M, ANNU A S, HONG W, et al. Computational and functional analysis of the androgen receptor antagonist atraric acid and its derivatives[J]. *Anti-Cancer Agents Med Chem*, 2013, 13(5): 801-810.

【责任编辑 李晓卉】