

深海真菌 *Aspergillus puniceus* A2 次级代谢产物及其药物开发潜力

蔡松岩^{1,2}, 何建林², 牛四文², 洪碧红^{2*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 自然资源部第三海洋研究所海洋生物资源开发利用工程技术创新中心, 福建 厦门 361005)

摘要:本研究采用硅胶柱层析、高效液相色谱等方法对深海真菌 *Aspergillus puniceus* A2 发酵产物进行了化学成分分离纯化, 通过核磁共振等现代波谱学方法, 同时结合相关文献进行数据分析, 鉴定化合物的结构。从 *A. puniceus* A2 中分离鉴定出 6 个咕吨酮并双咪喃环类化合物, 化学结构分别确定为 Austocystin I (1)、Austocystin G (2)、6-methoxyl Austocystin A (3)、Austocystin F (4)、F02ZA-1593B₂ (5)、Austocystin A (6), 化合物 1~6 均为首次从该真菌中分离得到。通过细胞毒性和抗炎活性评价发现化合物 1、2、4 和 6 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, 对肝星状细胞 LX2 显示出毒性作用, 提示其可能有抗肝纤维化的作用; 化合物 2、3、5 和 6 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, 能显著抑制 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞分泌 NO, 显示出一定的抗炎活性。

关键词: 海洋生物学; 深海真菌; *Aspergillus puniceus*; 咕吨酮并双咪喃环类化合物; 细胞毒活性; 抗炎活性

DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.2023.02.003

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2023)02-0203-07

深海环境条件极端, 其特点是没有阳光照射、低温、厌氧以及高静水压力^[1]。为了适应深海环境, 深海真菌进化出了独特的生理结构和代谢途径^[2], 能够产生结构新颖的次级代谢产物^[3], 如生物碱^[4]、聚酮^[5]、萜类^[6]、多肽^[7]等, 并且这些代谢产物展现出了广泛的生物活性, 如抗氧化^[8]、抗菌^[9]、抗炎^[10]、抗病毒^[11]和抗肿瘤等^[12-13]。这些生物活性化合物不仅可以帮助深海真菌防御自然生态系统中的天敌, 而且还具有治疗人类疾病的潜力, 为海洋药物研发提供了重要支撑^[14]。

深海曲霉是深海真菌的一个重要组成种群, 主要类型有烟曲霉、土曲霉、黑曲霉、黄曲霉等^[15]。曲霉的代谢产物成分包括聚酮类、生物碱类、内酯类和萜类等多种结构类型, 具有抗菌、抗肿瘤^[16]、免疫抑制和降胆固醇等生物活性^[17]。研究表明深海曲霉的次级代谢产物已成为发现新药前体的丰富来源^[18]。例如, 从深海来源曲霉 *Aspergillus fumigatus*

SCSIO 41012 次级代谢产物中分离得到的一种生物碱类化合物, 对鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606) 表现出显著活性^[19]; 从深海来源曲霉 *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7 次级代谢产物中分离得到的一种咕吨酮类化合物, 对肝癌细胞 HepG2 表现出细胞毒性^[20]; 从深海来源曲霉 SD-311 次级代谢产物中分离得到的一种新型类固醇化合物显示出对鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的抗菌活性^[21]。

本研究选用从太平洋深海沉积物中分离得到的曲霉属真菌 *Aspergillus puniceus* A2 为研究对象, 经查阅文献, 国内外尚未报道有关该菌次生代谢产物的研究。前期通过小规模固体发酵, 对提取的粗体物进行 TLC、HPLC 分析, 发现其代谢产物丰富。之后进行大规模固体发酵培养, 利用薄层层析、硅胶柱层析和高效液相色谱等多种色谱技术对该菌株固体发酵物进行分离纯化, 并对所得化合物的生物活性进行了初步研究, 以探索该深海真菌次级代谢产物

收稿日期: 2022-01-25

资助项目: 福建省科技计划农业引导性(重点)项目(2020N0030); 国家自然科学基金(82073763)

作者简介: 蔡松岩(1997—), 男, 硕士研究生; E-mail: caisongyan1@163.com

* 通讯作者: 洪碧红(1968—), 女, 博士, 正高级工程师; E-mail: bhong@tio.org.cn

的海洋药用开发价值,为其在医药行业中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源及培养基 实验所用菌种分离自太平洋站位(12°27'07"N,156°31'20"E)4 841 m 深处的沉积物。ITS 基因序列分析结果显示与 *Aspergillus puniceus strain* SRRC 2155 相似度为 99.83%,鉴定该菌为 *Aspergillus puniceus* A2。测序结果提交 GenBank,登录号为 OM063154。菌种保藏于自然资源部第三海洋研究所海洋生物资源开发利用工程技术创新中心,于 PDA 斜面,4 °C 冰箱,甘油管,-80 °C 冰箱保存。

种子液培养基:土豆 50 g,葡萄糖 5 g,水 250 mL (500 mL 三角瓶)。

发酵培养基:大米 130 g,海盐 5.6 g,水 170 mL (1 L 三角瓶)。

1.1.2 仪器与试剂 所用仪器有核磁共振波谱仪 (Ascend 600 MHz, Bruker 公司);高效液相制备型色谱仪 (Waters2489/3100, 沃特世科技有限公司);高效液相色谱仪 (SPD-20A, 岛津株式会社);半制备高效液相色谱仪 (SSI-1500, SSI 公司);洁净工作台 (SW-CJ-1FD, 安泰空气技术有限公司);高速冷冻离心机 (Centrifuge 5427R, Eppendorf 公司);CO₂ 细胞培养箱 (IL-161CT, STIK 公司);倒置显微镜 (XD-202, 江南光电股份有限公司);酶标仪 (Sunrise, TECAN 公司)。

所用材料有 5C18-MS-II 色谱柱 250 mm × 10 mm, 5 μm (Cosmosil 公司);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (Pharmacia 公司);反相 ODS 填料 (50 μm) (O-saka soda 公司);薄层层析硅胶板 (烟台江友硅胶开发有限公司);柱色谱硅胶 (青岛海洋化工集团公司);氘代试剂 (氘代二甲基亚砷、氘代氯仿等, CIL 公司);石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、丙酮 (分析纯, 汕头达濠精细化学品有限公司);甲醇、乙腈 (色谱纯, 安徽大地高纯溶剂有限公司);肝星状细胞 LX2、小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 (上海中科院细胞库);高糖 DMEM 培养基 (L120KJ, 上海源培生物科技股份有限公司);胎牛血清 (10270-106, Gibco 公司);脂多糖 (L4391, Sigma-Aldrich 公司);CCK-8 (HY-K0301, MedChemExpress 公司);缓冲液 (PB180327, 上海淳麦生物科技股份有限公司);Griess 试剂盒 (G7921, Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养 在无菌条件下,将活化后的菌株转接到装有种子液的培养基中,28 °C, 100 r/min 摇床培养 3 d,将适量种子液转接到装有大米 130 g,海盐 5.6 g,水 170 mL 的 1 L 锥形瓶中,制作成大米固体培养基。25 °C 恒温静置培养 50 d,发酵培养基总共 230 瓶。

1.2.2 提取与分离纯化 发酵结束后,培养基使用乙酸乙酯提取 4 次,将全部提取液合并之后旋蒸浓缩,得到黑红色提取物。粗浸膏使用正相硅胶柱层析 (100~200 目,石油醚-乙酸乙酯体积比 1:0 至 3:1) 进行梯度洗脱,使用薄层色谱检测 (TLC)。合并相似组分,得到 2 个组分 Fr.1—2。

Fr.1 经反相硅胶柱 (甲醇-水,体积比 9:11 至 1:0) 梯度洗脱得到 5 个组分 Fr.1.1—Fr.1.5。组分 Fr.1.4 使用正相硅胶柱层析 (200~300 目,石油醚-乙酸乙酯 3:1) 等度洗脱,得到组分 Fr.1.4.1—4。组分 Fr.1.4.2 使用正相硅胶柱层析 (200~300 目,二氯甲烷) 等度洗脱得到组分 Fr.1.4.2.1—2。Fr.1.4.2.1 经半制备 HPLC (乙腈-水体积比 7:3, 2 mL/min) 分离纯化得到化合物 4 (23.9 mg)、5 (9.7 mg)、6 (23.1 mg)。组分 Fr.1.4.3 使用正相硅胶柱层析 (200~300 目,二氯甲烷) 等度洗脱得到组分 Fr.1.4.3.1—3。Fr.1.4.3.2 经半制备 HPLC (乙腈-水体积比 11:9, 2 mL/min) 分离纯化得到化合物 1 (90.5 mg)、2 (16.0 mg)、3 (24.2 mg)。

1.2.3 细胞培养 肝星状细胞 LX2,小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 使用含 10% 胎牛血清,1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。

1.2.4 化合物的细胞毒性检测 取对数期的 LX2 细胞沉淀,调整细胞密度为 5×10^4 ind/mL,接种至 96 孔板,每孔接种 100 μL 细胞悬液,之后于培养箱中过夜培养。实验分组为空白组、对照组、实验组。空白组不含细胞和培养基,对照组含有细胞和培养基,实验组加入 20 μmol/L 的样品,每组重复 6 孔。孵育 1 d,弃上清,加入比例为 1:9 的 CCK8-DMEM 培养基 100 μL 继续培养 2 h,之后使用酶标仪在 450 nm 波长处测定其吸光度值。

取对数生长期的 RAW264.7 细胞,调整细胞密度为 2×10^5 ind/mL,接种至 96 孔板,每孔接种 100 μL 细胞悬液,之后于培养箱中培养过夜。实验分组为空白组、对照组、模型组、实验组。空白组不含细胞和培养基,对照组含有细胞和培养基,模型组加入 1 μg/mL 浓度的 LPS,实验组加入 20 μmol/L 的样品

和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 LPS, 每组重复 6 孔。孵育 1 d, 弃上清, 加入比例为 1 : 9 的 CCK8-DMEM 培养基 100 μL 继续培养 2 h, 之后使用酶标仪在 450 nm 波长处测定其吸光度值。细胞活力(S)计算公式如下:

$$S(\%) = \left[\frac{(OD_{\text{模型}}/OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}})}{(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})} \right] \times 100 \quad (1)$$

式(1)中: $OD_{\text{模型}}$ 为 450 nm 波长下, 模型组吸光度值; $OD_{\text{实验}}$ 为 450 nm 波长下, 实验组吸光度值; $OD_{\text{空白}}$ 为 450 nm 波长下, 空白组吸光度值; $OD_{\text{对照}}$ 为 450 nm 波长下, 对照组吸光度值。

1.2.5 化合物对 NO 释放的影响 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 ind/mL, 接种至 96 孔板, 每孔接种 100 μL 细胞悬液, 之后于培养箱中培养过夜。实验分组为对照组、模型组、实验组。模型组加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 LPS, 实验组加入 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的样品和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 LPS, 每组重复 6 孔。孵育 1 d, 每孔取上清液, 按照 Griess 试剂盒说明书操作加入 Griess 试剂, 避光反应 30 min 之后使用酶标仪在 548 nm 波长处测定其吸光度值。

1.2.6 统计学分析 使用 GraphPadPrism 8 软件进行处理, 数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1(图 1 中 1): 黄色粉末, 分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_7$, ESI-MS m/z : 341 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 13.08 (s, 8-OH), 7.66 (t, $J = 8.3$ Hz, H-6), 6.97 (d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.96 (s, H-4), 6.81 (d, $J = 2.8$ Hz, H-4'), 6.78 (d, $J = 8.3$ Hz, H-7), 6.59 (s, 2'-OH), 6.42 (s, H-1'), 5.60 (d, $J = 2.8$ Hz, H-3'), 4.00 (s, 1-OCH₃)。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 63.0 (1-OCH₃, CH₃), 88.8 (C-2', C), 95.1 (C-4, CH), 106.4 (C-5, CH), 107.2 (C-3', CH), 108.2 (C-8a, C), 109.7 (C-9a, C), 110.5 (C-7, CH), 117.0 (C-1' CH), 120.8 (C-2, C), 136.6 (C-6, CH), 148.5 (C-4', CH), 154.8 (C-10a, C), 157.5 (C-1, C), 159.4 (C-4a, C), 161.2 (C-8, C), 164.8 (C-3, C), 180.6 (C-9, C)。上述数据与文献报道^[22]基本一致, 故鉴定化合物 1 为 Austocystin I。

化合物 2(图 1 中 2): 淡黄色粉末, 分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{ClO}_7$, ESI-MS m/z : 376 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 13.38 (s, 1-OH), 7.94 (dd, $J = 9.1, 3.7$ Hz, H-6), 7.41 (dd, $J = 9.1, 4.0$ Hz,

H-5), 6.77 (d, $J = 2.8$ Hz, H-4'), 6.64 (d, $J = 3.6$ Hz, H-4), 6.40 (d, $J = 10.4$ Hz, H-1'), 5.62 (d, $J = 2.8$ Hz, H-3'), 3.88 (s, 8-OCH₃)。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 61.5 (8-OCH₃, CH₃), 88.4 (C-4, CH), 89.6 (C-2', C), 104.5 (C-9a, C), 106.7 (C-3', CH), 111.7 (C-2, C), 115.0 (C-5, CH), 115.6 (C-8a, C), 117.3 (C-1', CH), 123.3 (C-7, C), 136.0 (C-6, CH), 148.2 (C-4', CH), 154.9 (C-8, C), 155.5 (C-10a, C), 157.0 (C-4a, C), 158.1 (C-1, C), 165.7 (C-3, C), 180.1 (C-9, C)。上述数据与文献报道^[23]基本一致, 故鉴定化合物 2 为 Austocystin G。

化合物 3(图 1 中 3): 淡黄色粉末, 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClO}_7$, ESI-MS m/z : 404 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_{H} 7.15 (s, H-5), 6.75 (d, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 6.73 (s, H-4), 6.47 (s, H-4'), 5.34 (s, H-3'), 4.74 (d, $J = 7.0$, H-2'), 4.03 (s, 1-OCH₃), 3.95 (s, 6-/8-OCH₃)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ_{C} 48.3 (C-2', CH), 56.8 (6-OCH₃, CH₃), 62.0 (1-OCH₃, CH₃), 62.1 (8-OCH₃, CH₃), 94.8 (C-4, CH), 103.3 (C-3', CH), 111.6 (C-2, C), 112.8 (C-1', CH), 116.0 (C-5, CH), 118.0 (C-8a, C), 118.5 (C-9a, C), 123.1 (C-7, C), 144.9 (C-6, C), 145.3 (C-4'/4a, CH, C), 148.2 (C-10a, C), 156.9 (C-8, C), 158.5 (C-1, C), 163.1 (C-3, C), 174.1 (C-9, C)。上述数据与文献报道^[24]基本一致, 故鉴定化合物 3 为 6-methoxyl Austocystin A。

化合物 4(图 1 中 4): 淡黄色粉末, 分子式 $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{O}_7$, ESI-MS m/z : 327 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 7.67 (t, $J = 8.3$ Hz, H-6), 6.97 (d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.78 (m, overlapped, H-4', H-7), 6.64 (s, H-4), 6.40 (s, H-1'), 5.62 (d, $J = 2.7$ Hz, H-3')。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 88.4 (C-2', C), 90.2 (C-4, CH), 103.2 (C-9a, C), 106.7 (C-3', CH), 106.9 (C-8a, C), 107.1 (C-5, CH), 110.9 (C-7, CH), 111.9 (C-2, C), 117.3 (C-1' CH), 137.5 (C-6, CH), 148.3 (C-4', CH), 155.5 (C-10a, C), 157.4 (C-1, C), 157.9 (C-4a, C), 160.2 (C-8, C), 166.3 (C-3, C), 184.3 (C-9, C)。上述数据与文献报道^[22]基本一致, 故鉴定化合物 4 为 Austocystin F。

化合物 5(图 1 中 5): 白色粉末, 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClO}_7$, ESI-MS m/z : 404 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 7.84 (d, $J = 9.1$, H-6), 7.41

(d, $J = 9.1$, H-5), 6.93 (d, $J = 6.9$ Hz, H-1'), 6.76 (t, $J = 2.4$ Hz, H-4'), 5.40 (t, $J = 2.6$ Hz, H-3'), 4.86 (dt, $J = 6.9, 2.2$ Hz, H-2'), 3.92 (s, 4-OCH₃), 3.89 (s, 1-OCH₃), 3.87 (s, 8-OCH₃). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ_c 47.7 (C-2', CH), 60.9(4-OCH₃, CH₃), 61.4 (8-OCH₃, CH₃), 61.6 (1-OCH₃, CH₃), 103.2 (C-3', CH), 111.5 (C-9a, C), 113.1 (C-1', CH), 114.7 (C-5, CH), 117.5 (C-8a, C), 118.7 (C-2, C), 122.8 (C-7, C), 127.5 (C-4, C), 134.6 (C-6, CH), 145.6 (C-4', CH), 150.0 (C-4a, C), 150.6 (C-1, C), 153.5 (C-3, C), 154.6 (C-10a, C), 154.8 (C-8, C), 172.9 (C-9, C)。上述数据与文献报道^[22]基本一致,故鉴定化合物 5 为 F02ZA-1593B₂。

化合物 6(图 1 中 6):淡黄色粉末,分子式 C₁₉H₁₃ClO₆,ESI-MS m/z :374 [M+H]⁺。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 7.81 (d, $J = 9.0$ Hz, H-6),

7.31 (d, $J = 9.0$ Hz, H-5), 6.89 (d, $J = 6.9$ Hz, H-1'), 6.81 (s, H-4), 6.74 (t, $J = 2.4$ Hz, H-4'), 5.40 (t, $J = 2.5$ Hz, H-3'), 4.85 (dt, $J = 7.0, 2.5$ Hz, H-2'), 3.94 (s, 1-OCH₃), 3.87 (s, 8-OCH₃)。 ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ_c 47.5 (C-2', CH), 61.4 (1-OCH₃, CH₃), 61.4 (8-OCH₃, CH₃), 93.6 (C-4, CH), 103.3 (C-3', CH), 110.7 (C-9a, C), 112.7 (C-1', CH), 114.4 (C-5, CH), 117.6 (C-2, C), 117.8 (C-8a, C), 122.7 (C-7, C), 134.5 (C-6, CH), 145.4 (C-4', CH), 154.7 (C-10a, C), 154.8 (C-8, C), 156.2 (C-1, C), 157.8 (C-4a, C), 162.6 (C-3, C), 172.8 (C-9, C)。上述数据与文献报道^[22]基本一致,故鉴定化合物 6 为 Austocystin A。

从 *Aspergillus puniceus* A2 菌株固体发酵物中分离纯化得到的以上 6 种化合物均属于咕吨酮并双呋喃环类化合物。

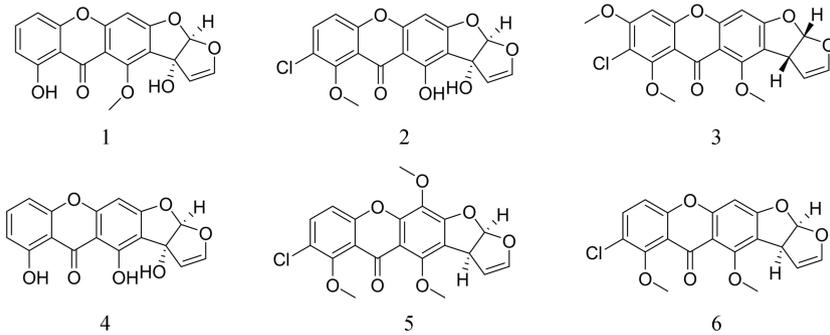


图 1 化合物 1~6 的化学结构

Fig.1 Chemical structures of 6 compounds

2.2 化合物生物活性

2.2.1 六种化合物对 LX2 细胞活性的影响 由图 2 可知,与对照组相比,加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度样品的实验组中化合物 1、2、4 和 6 作用下的 LX2 细胞存活率显著下降($P < 0.0001$),化合物 3 和 5 作用的细胞存活率没有受到抑制,说明化合物 1、2、4 和 6 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对细胞 LX2 有毒性作用。

2.2.2 六种化合物对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 由图 3 可知,与对照组相比,加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的模型组中,细胞 RAW264.7 由于受到刺激细胞增殖,细胞活力显著提高($P < 0.0001$),加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度样品的实验组与模型组相比,化合物 4 所作用的细胞存活率显著降低($P < 0.0001$),其他化合物细胞存活率没有受到抑制,说明化合物 4 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对细胞有毒性作

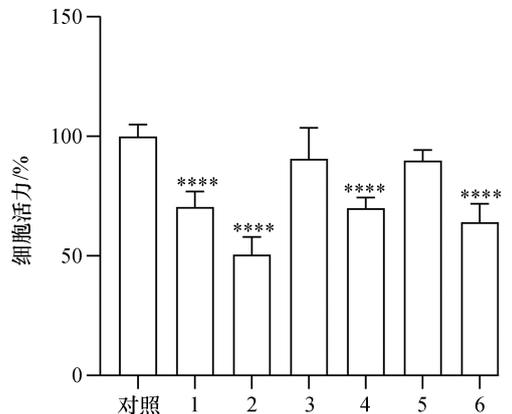


图 2 化合物对 LX2 细胞活性的影响

Fig.2 Effect of 6 compounds on cell viability of LX2 cells

与对照组比较,“****”表示 $P < 0.0001, n = 6$ 。

用,而其他化合物在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对细胞不显

示毒性作用,因此在下述实验中,化合物选择使用 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度。由图 4 可知,加入 LPS 作用后与对照组相比,细胞培养上清液 NO 含量显著增加($P < 0.000 1$),说明 LPS 诱导 RAW264.7 细胞成功建立炎症模型。与模型组相比,实验组中化合物 2、3、4、5 和 6 细胞培养上清液 NO 的释放量明显低于 LPS 组($P < 0.01$),同时化合物 2、3、5 和 6 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对细胞没有毒性作用,因此化合物 2、3、5 和 6 可以有效的减少炎症细胞 NO 的释放。

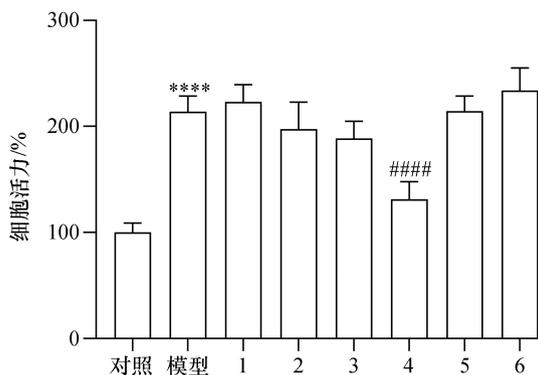


图 3 化合物对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($n=6$)

Fig.3 Effect of 6 compounds on cell viability of RAW264.7 cells ($n=6$)

与对照组比较,“****”表示 $P < 0.000 1$;与模型组比较,“####”表示 $P < 0.000 1$ 。

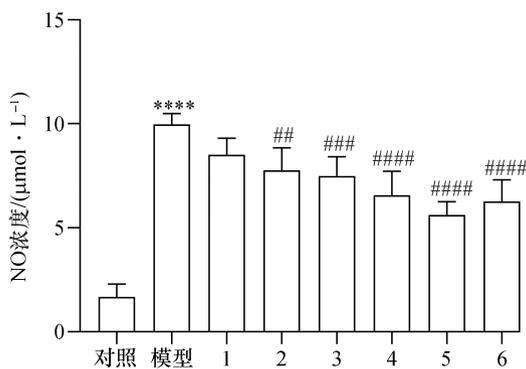


图 4 化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 ($n=6$)

Fig. 4 Effect of 6 compounds on the release of NO from LPS-treated RAW264.7 cells ($n=6$)

与对照组比较,“****” $P < 0.000 1$;与模型组比较,“###” $P < 0.01$,“####” $P < 0.001$,“#####” $P < 0.000 1$ 。

2.3 讨论

天然咕吨酮类化合物主要存在于高等植物中,如龙胆科、藤黄科和远志科等,部分咕吨酮类成分及其衍生物分布在植物内生菌及海洋菌类中,此类化合物具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等良好的药理活性。例如从印度獐牙菜中分离得到两种咕吨酮类化合

物,可以抑制促炎因子白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的产生,发挥抗炎作用^[25],从金丝李中分离得到一种咕吨酮类化合物,对人前列腺癌细胞(PC3)表现出细胞毒作用^[26]。从曲霉中分离出的咕吨酮类化合物,也具有较好的药理活性,例如,从南海沉积物中曲霉 *Aspergillus versicolor* 和 *Aspergillus sydowii* SCSIO 00305 分离得到咕吨酮类化合物显示出抗氧化活性^[24,27],从冲绳海槽沉积物中曲霉 *Aspergillus puniceus* SCSIO z021 分离出化合物 1、4 和 6,发现其具有一定的蛋白质酶抑制活性和对 VERO 细胞毒性^[22];从曲霉 *Aspergillus* sp. F02Z-1593 分离出化合物 5,通过小鼠糖尿病模型实验,发现其显示出较好的降血糖、降血脂和降胆固醇的作用^[28]。本研究首次从深海真菌 *A. puniceus* A2 发酵产物中分离得到 6 个咕吨酮并双呋喃环类化合物,并首次报道了化合物 1~6 对肝星状细胞 LX2 的细胞毒性和抗炎活性。实验结果显示对肝星状细胞 LX2 有细胞毒性的化合物基本都带有羟基官能团,同时氯元素取代的化合物都表现出了较好的抗炎活性。咕吨酮结构中羟基是活性基团之一,且羟基数目和位置与活性的强弱有关,含有羟基的咕吨酮具有一定的抗炎效果,但是过多羟基的取代可能会导致化合物疏水性降低,使化合物无法与酶活性部位的疏水性结构连接从而降低活性。同时实验结果显示氯取代的咕吨酮抗炎活性强于无卤素取代的咕吨酮。另外,苯环上连接的羟基中氢原子较易电离,使细胞环境显示一定的酸性,可能会破坏细胞组分,导致细胞寿命缩短甚至死亡,从而对细胞产生一定的细胞毒性。研究表明从曲霉属真菌中分离得到的天然咕吨酮类化合物具有显著多样的生物活性,值得进一步研究。后续以天然咕吨酮类骨架为基础对其进行羟基烷基化以及引入卤素等方法修饰改造,有望获得更有开发利用价值的咕吨酮类衍生物。

3 结论

本研究通过对深海真菌 *A. puniceus* A2 次级代谢产物的研究,从其固体发酵物中分离纯化得到 6 个咕吨酮并双呋喃环类化合物,分别是 Austocystin I (1)、Austocystin G (2)、6-methoxyl Austocystin A (3)、Austocystin F(4)、F02ZA-1593B2(5)、Austocystin A(6)。活性测试结果表明化合物 2、3、5 和 6 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下可以有效的减少炎症细胞 NO 的释放,发挥抗炎活性;化合物 1、2、4 和 6 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对细胞 LX2 有毒性作用,表现出潜在的抗肝纤维化的活性,研究结果为发现新型抗炎或

抗肝纤维化先导化合物奠定基础。

参考文献:

- [1] THORNBURG C C, ZABRISKIE T M, MCPHAIL K L. Deep-sea hydrothermal vents: potential hot spots for natural products discovery? [J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73(3): 489-499.
- [2] RICHARDS T A, JONES M D M, LEONARD G, et al. Marine fungi: their ecology and molecular diversity[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2012, 4: 495-522.
- [3] SKROPETAD, WEI L Q. Recent advances in deep-sea natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(8): 999-1 025.
- [4] LIU W, LI H J, XU M Y, et al. Pseudellones A-C, three alkaloids from the marine-derived fungus *Pseudallescheria ellipsoidea* F42-3[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(21): 5 156-5 159.
- [5] LI H L, LI X M, LI X, et al. Antioxidant Hydroanthraquinones from the marine algal-derived endophytic fungus *Talaromyces islandicus* EN-501 [J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(1): 162-168.
- [6] JIAO W H, CHENG B H, CHEN G D, et al. Dysiarenone, a dimeric C-21 meroterpenoid with inhibition of COX-2 expression from the marine sponge *Dysidea arenaria*[J]. *Organic Letters*, 2018, 20(10): 3 092-3 095.
- [7] IWASAKI A, OHNO O, SUMIMOTO S, et al. Jahanyne, an apoptosis-inducing lipopeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp.[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(3): 652-655.
- [8] MATSUO H, MOKUDAI T, HIGO M, et al. Cipralphelin, a new anti-oxidative N-cinnamoyl tripeptide of Antibiotics[J]. *The Journal of Antibiotic*, 2019, 72(10): 775-778.
- [9] NIU S W, LIU D, SHAO Z Z, et al. Eutypellazines N-S, new thiodiketopiperazines from a deep sea sediment derived fungus *Eutypella* sp with anti-VRE activities[J]. *Tetrahedron Letters*, 2017, 58(38): 3 695-3 699.
- [10] NIU S W, YANG L H, ZHANG G Y, et al. Phenolic bisabolane and cuparenesesquiterpenoids with anti-inflammatory activities from the deep-sea-derived *Aspergillus sydowii* MCCC 3A00324 fungus[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 105: 104420.
- [11] HUANG Z H, NONG X H, REN Z, et al. Anti-HSV-1, antioxidant and antifouling phenolic compounds from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor* SCSIO 41502[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 27(4): 787-791.
- [12] YANG C B, ZHANG W, DONG X D, et al. A natural product solution to aging and aging-associated diseases[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2020, 216: 107673.
- [13] WANG Y T, XUE Y R, LIU C H. A brief review of bioactive metabolites derived from deep-sea fungi[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(8): 4 594-4 616.
- [14] XU J L, LIU H X, CHEN Y C, et al. Highly substituted benzophenone aldehydes and eremophilane derivatives from the deep-sea derived fungus *Phomopsis lithocarpus* FS508[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(9): 329.
- [15] ZHAO W Y, YI J, CHANG Y B, et al. Recent studies on terpenoids in *Aspergillus fungi*: chemical diversity, biosynthesis, and bioactivity[J]. *Phytochemistry*, 2022, 193: 113011.
- [16] YUAN S W, GOPAL J V, REN S Y, et al. Anticancer fungal natural products: mechanisms of action and biosynthesis[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 202: 112502.
- [17] DEISKE A S, ELVY L G, GRACIA A V P, et al. Antimicrobial activities of Rhopalaea-associated fungus *Aspergillus flavus* strain MFABU9[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 2020, 23(7): 911-916.
- [18] KORNIENKO A, EVIDENTE A, VURRO M, et al. Toward a cancer drug of fungal origin[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2015, 35(5): 937-967.
- [19] LIMBADRI S, LUO X W, LIN X P, et al. Bioactive novel indole alkaloids and steroids from deep sea-derived fungus *Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2 379.
- [20] WANG W Y, GAO M L, LUO Z H, et al. Secondary metabolites isolated from the deep sea-derived fungus *Aspergillus sydowii* C1-S01-A7[J]. *Natural Product Research*, 2019, 33(21): 3 077-3 082.
- [21] CHI L P, YANG S Q, LI X M, et al. A new steroid with 7 beta,8 beta-epoxidation from the deep sea-derived fungus *Aspergillus penicillioides* SD-311[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2021, 23(9): 884-891.
- [22] LIANG X, HUANG Z H, MA X, et al. Mycotoxins as inhibitors of protein tyrosine phosphatases from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus puniceus* SCSIO z021[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 107: 104571.
- [23] STEYN P S, VLEGGAR R. Dihydrofuro[3',2' 4,5] furo[3,2-b] xanthenones; the structures of austocystins G, H and I[J]. *South African Journal of Chemistry*, 1975, 28(3): 375-377.
- [24] AMIN M, LIANG X, MA X, et al. New pyrone and cyclopentenone derivatives from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO 00305[J]. *Natural Product Research*, 2021, 35(2): 318-326.
- [25] HU T Y, JU J M, MO L H, et al. Anti-inflammation action of xanthenes from *Swertiachirayita* by regulating COX-2/NF-kB/MAPKs/Akt signaling pathways in RAW 264.7 macrophage cells[J]. *Phytomedicine*, 2019, 55: 214-221.
- [26] JIA C C, XUE J J, GONG C, et al. Chiral resolution and anticancer effect of xanthenes from *Garcinia paucinervis*[J]. *Fitoterapia*, 2018, 127: 220-225.
- [27] WU Z H, LIU D, XU Y, et al. Antioxidant xanthenes and anthraquinones isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2018, 16(3): 219-224.

[28] CUI X L, HUA Z, ZHANG Y S, et al. New xanthones compounds, preparation method and use thereof; 200710061911.5[P]. 2008.11.26.

Secondary metabolites of a deep-sea-derived fungus *Aspergillus puniceus* A2 and their potential in drug development

CAI Songyan^{1,2}, HE Jianlin², NIU Siwen², HONG Bihong^{2*}

(1. College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Technology Innovation Center for Exploitation of Marine Biological Resources, Third Institute of Oceanography, MNR, Xiamen 361005, China)

Abstract: The fermentation product of a deep-sea-derived fungus *Aspergillus puniceus* A2 was isolated and purified with silica gel column and high-performance liquid chromatography, which isolated 6 compounds. The chemical structures of the 6 compounds were identified as Austocystin I (1), Austocystin G (2), 6-methoxyl Austocystin A (3), Austocystin F (4), F02ZA-1593B₂ (5), and Austocystin A (6) by NMR spectrum analysis and compared with literature data. All the isolated compounds were reported firstly in this fungus. Among them, compounds 1, 2, 4 and 6 showed toxic effects on hepatic stellate cells LX2 at the concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$, suggesting that they may have anti-hepatic fibrosis effects. Compounds 2, 3, 5 and 6 inhibited significantly the LPS-induced NO secretion in mouse monocyte macrophage RAW264.7 at 20 $\mu\text{mol/L}$, showing anti-inflammatory activity.

Key words: marine biology; deep-sea fungus; *Aspergillus puniceus*; xanthone-bisfuran rings; cytotoxic activity; anti-inflammatory activity

DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.2023.02.003

(责任编辑:杜俊民)