·论著·

珊瑚共附生黄柄曲霉次级代谢产物研究

王洪亮[1,2]，姜文丽[1]，李　冉[1]，许聪聪[3]，张　文[1]（1. 海军军医大学药学院 上海 200433；2. 陆军军医大学士官学校，河北 石家庄 050000；3. 安徽中医药大学，安徽 合肥 230000）

［摘要］ **目的**　研究东沙短足软珊瑚（*Cladiella* sp.）来源的黄柄曲霉菌（*Aspergillus flavipes*）中的活性次级代谢产物。**方法**　采用硅胶柱层析、凝胶柱层析、制备 HPLC 等分离手段对真菌发酵液乙酸乙酯提取物进行分离，运用现代波谱技术结合文献报道数据，对化合物的结构进行鉴定；采用核因子 κB 受体活化因子配基（RANKL）诱导小鼠骨髓单核巨噬细胞（bone marrow macrophage cells，BMMs）分化为成熟的破骨细胞，经抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）特异性染色，对化合物抑制破骨细胞分化活性进行研究。**结果**　从该株真菌中分离得到 4 个细胞松弛素类化合物，其结构鉴定为 trichalasins H，aspergilluchalasin，aspochalasin I 和 aspochalasin D。体外活性测试结果显示，化合物 **3** 和 **4** 可不同程度抑制 BMMs 向破骨细胞分化。**结论**　对化合物 **3** 和 **4** 抑制破骨细胞分化活性的报告是本文首次报道，对新型抗骨质疏松活性物质研究具有科学价值。

［关键词］ 珊瑚共附生真菌；黄柄曲霉；细胞松弛素；抑制破骨细胞分化
［中图分类号］ R284.1　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1006-0111(2019)02-0151-05
［DOI］ 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.010

Study on the secondary metabolites of *Aspergillus flavipes* isolated from coral

WANG Hongliang[1,2], JIANG Wenli, LI Ran, XU Congcong, ZHANG Wen[1] (1. Research Center for Marine Drugs, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Sergeant School of Army Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

［**Abstract**］ **Objective**　To investigate the active secondary metabolites of coral derived fungi *Aspergillus flavipes*. **Methods**　Compounds were isolated and purified by means of various chromatographic techniques, including Silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and HPLC. The structure of the compounds was identified by NMR combined with the data reported. The nuclear factor kappa B receptor activating factor ligand (RANKL) was used to induce bone marrow macrophage cells (BMMs) differentiate into mature osteoclasts. The tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) specific staining was used to test the inhibitory activity of compounds on osteoclast differentiation. **Results**　Four cytochalasins were isolated from the fungus and their structures were identified as trichalasins H, aspergilluchalasin, aspochalasin I and aspochalasin D. Compounds **3** and **4** showed inhibitory activity on osteoclast differentiation. **Conclusion**　This was the first report of inhibiting osteoclast differentiation activity of compounds **3** and **4**. These two compounds might have great significance in the study of new anti-osteoporosis drugs.

［**Key words**］ coral derived fungi; *Aspergillus flavipes*; cytochalasin; inhibit osteoclast differentiation

真菌是珊瑚共附生微生物的主要组成部分，目前已报道的珊瑚共附生真菌涵盖 44 个属[1]。在海洋高盐、高压、低温、寡营养的生存环境下，以及真菌与宿主珊瑚之间的相互作用下，形成了独特的代谢机制，产生了许多结构新颖、活性显著的次级代谢产物[2]。

曲霉属（*Aspergillus* sp.）真菌是海洋真菌中优势菌种之一，分布非常广泛[3]。黄柄曲霉（*Aspergillus flavipes*）属于伞囊菌目发菌科曲霉属，在海洋和陆地均有分布。其次级代谢产物的主要类型包括细胞松弛素类[4-6]、epicoccine 衍生物[7-8]、丁内酯类[9]等。本次研究的黄柄曲霉是采自东沙的短足软珊瑚（*Cladiella* sp.）中分离得到的，通过运用多种色谱分离技术，得到 4 个细胞松弛素类化合物（图 1）。对这 4 个化合物进行体外抑制破骨细胞分化活性测试中，发现化合物 **3** 和 **4** 对 BMMs 向成熟破骨细胞分化有不同程度的抑制活性。本文是对化合物 **3** 和 **4** 抑制破骨细胞分化活性的首次报道。

［基金项目］ 国家自然科学基金（41576157）
［作者简介］ 王洪亮，硕士研究生，研究方向：海洋药物，Email：wanghl0918@163.com
［通讯作者］ 张　文，教授，博士生导师，研究方向：海洋药物，Email：wenzhang1968@163.com

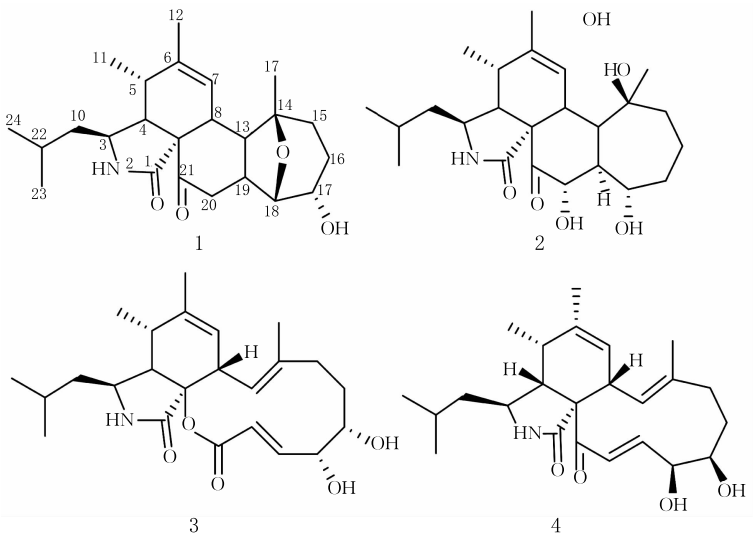

图 1　4 个细胞松弛素类化合物的结构式

1　材料和方法

1.1　样品

从采自东沙的短足软珊瑚(*Aspergillus flavipes*)，菌种目前保存于海军军医大学药学院海洋药物研究中心备查(菌株编号 33)。菌株接种至 20 L Biomalt 琼脂培养基上，28 ℃培养 28 d 得到真菌发酵物。

1.2　主要仪器和试剂

仪器：制备 HPLC［DAD 检测器］(美国 Aglient 公司)，DRX 500 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)，高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂)。

试剂：α-MEM 培养基(美国 Hyclone 公司)，灭活胎牛血清(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)，巨噬细胞集落刺激因子、核因子 kB 受体活化因子配基、抗酒石酸酸性磷酸酶(美国 R&D 公司)。

1.3　提取与分离

真菌经 28 d 发酵后，加入乙酸乙酯对发酵物进行超声萃取(5 次)，合并萃取液，经减压浓缩得到粗浸膏 10.7 g。采用正相硅胶柱层析，经梯度洗脱［二氯甲烷-甲醇(80∶1 ～ 1∶1)］得到 12 个组分(Fr. 1 ～ 12)。Fr. 7 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析［二氯甲烷-甲醇(2 ∶1)］、正相硅胶柱层析［二氯甲烷-甲醇(40∶1)］和制备 HPLC［甲醇-水(70∶30)；流速∶2.0 ml/min］得化合物 1(t_R = 21.0 min，13.3 mg)；Fr. 9 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析［二氯甲烷-甲醇(2∶1)］、正相硅胶柱层析［二氯甲烷-甲醇(40∶1)］和制备 HPLC［甲醇-水(63∶37)；流速∶2.0 ml/min］得到化合物 2(t_R = 29.0 min，8.1 mg) 和 3(t_R = 32.5 min，5.0 mg)；Fr. 10 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析［二氯甲烷-甲醇(2∶1)］、正相硅胶柱层析［二氯甲烷-甲醇(30∶1)］和制备 HPLC［甲醇-水(75∶25)；流速∶2.0 ml/min］得化合物 4(t_R = 19.0 min，18.2 mg)。

1.4　活性测试

从 C57BL/6 小鼠的股骨及胫骨分离出小鼠骨髓单核巨噬细胞(bone marrow macrophage cells，BMMs)，采用 CCK-8 法检测化合物 1-4 对 BMMs 细胞毒性。检测无毒性后，向 BMMs 中加入含有 M-CSF(30 ng/ml) 和 RANKL(100 ng/ml) 的 α-MEM 培养基，以受试化合物作为实验组，不加化合物的为对照组，37 ℃，5% CO_2 培养箱中孵育，每 48 h 换一次含有化合物的培养基，并观察细胞状态。孵育 5 ～ 6 d，当对照组出现成熟破骨细胞时，停止换液。使用 TRAP 染色，染色后在显微镜下观察并拍照。采用 Image J 图像分析软件对 TRAP+ 面积进行分析。

2　结果与分析

2.1　化合物的结构鉴定

化合物 **1**：白色粉末，ESI-MS (m/z)∶402.26 $[M+H]^+$，分子式为 $C_{24}H_{35}NO_4$。其 NMR 数据如下：^{1}H-NMR (600M，$CDCl_3$) δ=3.08 (1H，dt，J=10.5，3.5 Hz，H-3)，2.62 (1H，dd，J = 5.0，3.5 Hz，H-4)，2.34 (1H，brs，H-5)，5.40 (1H，s ，H-7)，2.41 (1H，brd，H-8)，1，26，1.70 (2H，m，H-10)，1.14 (3H，d，J = 7.5 Hz，H-11)，1.76 (3H，brd，H-12)，2.84 (1H，dd，H-13)，1.56，1.68 (2H，m ，H-15)，1.72，1.96 (2H，m，H-16)，3.78 (1H，brs，H-17)，3.64 (1H，d，J = 3.4 Hz，H-18)，3.26

(1H, dd, J=9.0, 9.0 Hz, H-19), 2.52 (2H, d, J=9.0 Hz, H-20), 1.55 (1H, m, H-22), 0.91 (3H, d, J=6.5 Hz, H-23), 0.94 (3H, d, J=6.5 Hz, H-24), 1.19 (3H, s, H-25); ^{13}C-NMR (150M, $CDCl_3$) δ=173.9 (C-1), 52.1 (C-3), 52.0 (C-4), 35.2 (C-5), 139.9 (C-6), 127.3 (C-7), 36.7 (C-8), 64.3 (C-9), 47.6 (C-10), 13.8 (C-11), 20.4(C-12), 44.5 (C-13), 82.1 (C-14), 38.7 (C-15), 27.0 (C-16), 68.1 (C-17), 83.5 (C-18), 36.4 (C-19), 43.0 (C-20), 210.9 (C-21), 25.4 (C-22), 21.3 (C-23), 24.0 (C-24), 22.7 (C-25)。以上数据与文献[10]报道一致，确定化合物 **1** 为 trichalasin H。

化合物 **2**：白色粉末，ESI-MS (m/z)：420.27 $[M+H]^+$，分子式为 $C_{24}H_{37}NO_5$。其 NMR 数据如下：^{1}H-NMR (600M, $CDCl_3$) δ=3.07 (1H, dt, J=10.5, 3.4 Hz, H-3), 2.63 (1H, t, J=4.5 Hz, H-4), 2.34 (1H, m, H-5), 5.40 (1H, s, H-7), 2.40 (1H, m, H-8), 1.27, 1.68 (2H, m, H-10), 1.14 (3H, d, J=7.2 Hz, H-11), 1.75 (3H, s, H-12), 2.95 (1H, m, H-13), 2.53, 2.95 (2H, m, H-15), 1.41, 1.88 (2H, dd, td, J=13.2, 5.0 Hz, J=13.1, 4.6 Hz, H-16), 1.71, 2.01 (2H, m, H-17), 3.55 (1H, brs, H-18), 2.53 (1H, m, H-19), 3.69 (1H, s, H-20), 1.56 (1H, m, H-22), 0.92 (3H, d, J=6.5 Hz, H-23), 0.89 (3H, d, J=6.5 Hz, H-24), 1.21 (3H, s, H-25); ^{13}C-NMR (150M, $CDCl_3$) δ=174.0 (C-1), 52.1 (C-3), 51.9 (C-4), 35.3(C-5), 140.0 (C-6), 127.2 (C-7), 36.5 (C-8), 64.4 (C-9), 47.6 (C-10), 13.7 (C-11), 20.4 (C-12), 39.0 (C-13), 82.8 (C-14), 42.7 (C-15), 35.2 (C-16), 24.8 (C-17), 66.8 (C-18), 42.8 (C-19), 84.3 (C-20), 210.3 (C-21), 25.3 (C-22), 24.0 (C-23), 21.3 (C-24), 23.4 (C-25)。以上数据与文献[9]报道一致，确定化合物 **2** 为 aspergilluchalasin。

化合物 **3**：白色粉末，ESI-MS (m/z)：418.60 $[M+H]^+$，分子式为 $C_{24}H_{35}NO_5$。其 NMR 数据如下：^{1}H-NMR (600M, CD_3OD) δ=3.21 (1H, m, H-3), 2.89 (1H, dd, J=3.0, 5.1 Hz, 1H), 3.04 (1H, brs, H-5), 5.25 (1H, brs, H-7), 3.82 (1H, d, J=11.1 Hz, H-8), 1.47, 1.71 (2H, m, H-10), 1.25 (3H, d, J=7.3 Hz, H-11), 1.76 (3H, m, H-12), 6.15 (1H, dt, J=10.8, 1.6 Hz, H-13), 2.14, 2.32 (2H, m, H-15), 1.37, 2.10 (2H, m, H-16), 3.75 (1H, brd, J=5.4 Hz, H-17), 4.46 (1H, s, H-18), 7.25 (1H, dd, J=2.45, 15.3 Hz, H-19), 5.91 (1H, dd, J=2.45, 15.3 Hz, H-20), 1.70 (1H, m, H-22), 0.94 (3H, d, J=6.0 Hz, H-23), 0.94 (3H, d, J=6.0 Hz, H-24), 1.37 (3H, brs, H-25); ^{13}C-NMR (150M, CD_3OD) δ=175.3 (C-1), 51.7 (C-3), 53.5 (C-4), 35.5 (C-5), 141.5 (C-6), 125.2 (C-7), 41.1 (C-8), 90.3 (C-9), 50.0 (C-10), 14.2 (C-11), 19.7 (C-12), 123.8 (C-13), 140.5 (C-14), 40.7 (C-15), 28.4 (C-16), 79.2 (C-17), 74.4 (C-18), 154.5 (C-19), 120.5 (C-20), 169.3 (C-21), 25.7 (C-22), 22.0 (C-23), 24.1 (C-24), 15.4(C-25)。以上数据与文献[11]报道一致，确定化合物 **3** 为 aspochalasin I。

化合物 **4**：白色粉末，ESI-MS (m/z)：402.26 $[M+H]^+$，分子式为 $C_{24}H_{35}NO_4$。其 NMR 数据如下：^{1}H-NMR (600M, $CDCl_3$) δ=3.14 (1H, ddd, J=9.5, 3.0, 3.0 Hz, H-3), 3.03 (1H, dd, J=6.0, 3.0 Hz, H-4), 2.49 (1H, m, H-5), 5.44 (1H, brs, H-7), 2.90 (1H, d, J=10.5 Hz, H-8), 1.20 (2H, m, H-10), 1.23 (3H, d, J=6.0 Hz, H-11), 1.75 (3H, brs, H-12), 5.96 (1H, d, J=10.5 Hz, H-13), 2.18 (2H, m, H-15), 1.45, 2.04 (2H, m, H-16), 3.80 (1H, brs, H-17), 4.56 (1H, s, H-18), 6.40 (1H, dd, J=16.4, 4.8 Hz, H-19), 7.15 (1H, d, J=16.5 Hz, H-20), 1.51 (1H, m, H-22), 0.89 (3H, d, J=7.0 Hz, H-23), 0.89 (3H, d, J=7.0 Hz, H-24), 1.31 (3H, d, J=0.5 Hz, H-25); ^{13}C-NMR (150M, $CDCl_3$) δ=175.0 (C-1), 51.2 (C-3), 49.7 (C-4), 35.2 (C-5), 140.5 (C-6), 125.9 (C-7), 43.7 (C-8), 68.1 (C-9), 48.5 (C-10), 13.6 (C-11), 20.0 (C-12), 124.4 (C-13), 137.4 (C-14), 39.6 (C-15), 29.5 (C-16), 79.3 (C-17), 75.7 (C-18), 141.5 (C-19), 129.8 (C-20), 197.6 (C-21), 25.2 (C-22), 21.6 (C-23), 23.7 (C-24), 15.7 (C-25)。以上数据与文献[12]报道一致，确定化合物 **4** 为 aspochalasin D。

2.2 活性测试结果

细胞毒性检测结果表明，所有化合物在10 μmol/L浓度下对 BMMs 细胞没有毒性。抑制破骨细胞分化结果显示，在 5 μmol/L 和 10 μmol/L 浓度下，化合物 **3** 和 **4** 对 BMMs 向破骨细胞分化表现出不同程度的抑制(见图 2)。

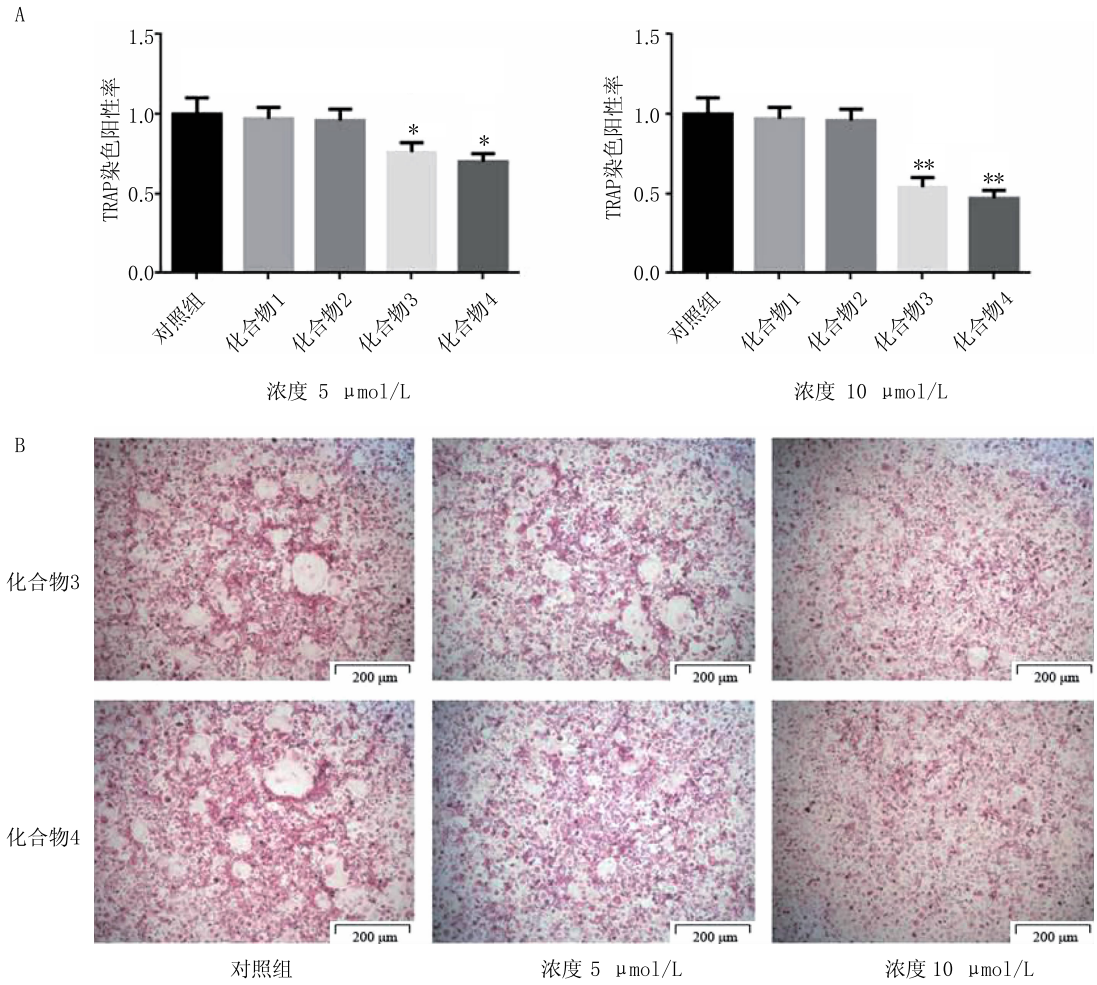

图 2　化合物 1～4 抑制破骨细胞分化结果

A. TRAP+ 细胞面积统计；B. TRAP 染色显示破骨细胞形态(40×)；

*P<0.05，**P <0.01，与对照组比较

3　讨论

本次研究从东沙短足软珊瑚共附生的黄柄曲霉中分离得到 4 个细胞松弛素类化合物。细胞松弛素在真菌中来源非常广泛，在多个真菌属中都有发现，包括曲霉属[5,13]（*Aspergillus* sp.），青霉属[14]（*Penicillium* sp.），团碳菌属[15]（*Hypoxylon* sp.），茎点霉属[16]（*Phoma* sp.）等。其结构上都具有异吲哚酮骈合大环的结构，主要变化集中在大环的取代基上。这类化合物具有多种生物活性，包括抗菌、抗肿瘤、抗 HIV、自由基清除等[4,10-11,17]。文献报道化合物 1 具有抗菌活性，同时对肿瘤细胞 HL-60 具有细胞毒性[10]；化合物 **3** 具有抑制黑色素生成作用[11]；化合物 **4** 具有诱导 IL-3 依赖的 Ba/F3 细胞凋亡活性[12]；化合物 **3** 和 **4** 都对肿瘤细胞 THP1、HL-60、PC3 具有较弱的细胞毒性[18]。

研究表明，在骨骼形成和发育过程中，破骨细胞和成骨细胞处于相互协调的动态平衡状态。当破骨细胞数量增加，破骨功能增强时，这一平衡将被打破，会造成骨质疏松，增加骨折风险等骨代谢疾病[19-20]。本研究中测试了这 4 个化合物对破骨细胞分化的抑制活性，发现化合物 **3** 和 **4** 对破骨细胞分化有一定程度的抑制活性，可以减少破骨细胞的生成。表明这两个化合物对新型抗骨质疏松药物的研究具有重要意义。本文是对化合物 **3** 和 **4** 抑制破骨细胞分化活性的首次报道。化合物 **3** 和 **4** 在结构上都含有 C-13，14 和 C-19，20 双键，推测活性的存在可能与这两个位置的双键有关。

【参考文献】

[1] HOU X M, XU R F, GU Y C, et al. Biological and chemical diversity of coral-derived microorganisms [J]. Curr Med Chem, 2015, 22 (32): 3707-3762.

[2] ZHU W M, WANG J F. A review on studies of secondary metabolites from marine fungi[J]. Mycosystema, 2011, 30 (2): 218-228.

[3] 宋双，许佳怡．海洋来源的曲霉属真菌次级代谢产物及其活

性研究进展[J]. 中山大学研究生学刊:自然科学与医学版, 2015 (3):20-32.

[4] ROCHFORT S, FORD J, OVENDEN S, et al. A novel aspochalasin with HIV-1 integrase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes*[J]. J Antibiot, 2005, 58(4):279-283.

[5] ZHOU G X, WIJERATNE E M K, BIGELOW D, et al. Aspochalasins I, J, and K: Three new cytotoxic cytochalasans of Aspergillus flavipes from the Rhizosphere of Ericameria laricifolia of the Sonoran desert1 [J]. J Nat Prod, 2004, 67(3):328-332.

[6] BARROW C J, SUN H H. Spiroquinazoline, a novel substance P inhibitor with a new carbon skeleton, isolated from *Aspergillus flavipes*[J]. J Nat Prod, 1994, 57 (4):471-476.

[7] KWON YJ, MJ, CJ, et al. Flavimycins A and B, dimeric 1, 3-dihydroisobenzofurans with peptide deformylase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes* [J]. J Nat Prod, 2012, 75 (2):271-274.

[8] EL AMRANI M, LAI D, DEBBAB A, et al. Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*[J]. J Nat Prod, 2014, 77(1):49-56.

[9] RUKACHAISIRIKUL V, RUNGSAIWATTANA N, KLAIKLAY S, et al. γ-Butyrolactone, cytochalasin, cyclic carbonate, eutypinic acid, and phenalenone derivatives from the soil fungus *Aspergillus* sp. PSU-RSPG185[J]. J Nat Prod, 2014, 77(11):2375-2382.

[10] CHEN L, LIU Y T, SONG B, et al. Stereochemical determination of new cytochalasans from the plant endophytic fungus *Trichoderma gamsii*. [J]. Fitoterapia, 2014, 96 (3):115-122.

[11] CHOO S J, YUN B S, RYOO I J, et al. Aspochalasin I, a melanogenesis inhibitor from *Aspergillus* sp. [J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19 (4):368-371.

[12] TOMIKAWA T, SHIN-YA K, KINOSHITA T, et al. Selective cytotoxicity and stereochemistry of aspochalasin D[J]. J Antibiot, 2001, 54(4):379-381.

[13] ZHANG Y, WANG T, PEI Y, et al. Aspergillin PZ, a novel isoindole-alkaloid from *Aspergillus awamori*[J]. J Antibiot, 2002, 55(8):693-695.

[14] IWAMOTO C, YAMADA T, ITO Y, et al. Cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium*, species separated from a marine alga[J]. Tetrahedron, 2001, 57 (15):2997-3004.

[15] QUANG D N, STADLER M, FOURNIER J, et al. Carneic acids A and B, chemotaxonomically significant antimicrobial agents from the xylariaceous ascomycete Hypoxylon carneum [J]. J Nat Prod, 2006, 69 (8):1198-1202.

[16] ALVI K A, NAIR B, PU H, et al. Phomacins: Three novel antitumor cytochalasan constituents produced by a *Phoma* sp. [J]. J Org Chem, 1997, 62(7):2148-2151.

[17] ZHANG Y, TIAN R, LIU S, et al. Alachalasins A - G, new cytochalasins from the fungus *Stachybotrys charatum* [J]. Bioorg Med Chem, 2009, 16 (5):2627-2634.

[18] SI Y, TANG M, LIN S, et al. Cytotoxic cytochalasans from *Aspergillus flavipes* PJ03-11 by OSMAC method[J]. Tetrahedron Letters, 2018, 59(18):1767-1771.

[19] ZHAI Z J, LI H W, LIU G W, et al. Andrographolide suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(3):663-675.

[20] KIM J Y, CHEON Y H, KWAK S C, et al. Emodin regulates bone remodeling by inhibiting osteoclastogenesis and stimulating osteoblast formation[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(7):1541-1553.

[收稿日期] 2018-11-04 **[修回日期]** 2019-03-04
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 114 页)

[38] 张海啸, 尹智炜, 李芳芳, 等. 何首乌水提液对去卵巢大鼠骨组织的动态影响[J]. 中日友好医院学报, 2006, 20(4):217-221.

[39] 董佳梓, 鞠大宏, 贾朝娟, 等. 桑寄生、枸杞子、桑椹对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(6):483-486.

[40] 何昌强. 山茱萸总甙促骨质疏松大鼠骨代谢的 TRPV5/TRPV6 通道机制及补肾壮骨法的临床应用研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2015.

[收稿日期] 2018-11-29 **[修回日期]** 2019-01-10
[本文编辑] 李睿旻