

中国红豆杉内生真菌次生代谢产物及其生物活性研究

陈蕾蕾, 杨中铎*, 魏汉楠, 马科贞, 郭文林, 张甜
(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: **目的** 研究中国红豆杉内生真菌次生代谢产物及其生物活性。**方法** 利用组织块法、划线法分离纯化内生菌, 所得菌株采用分子鉴定法进行鉴定。采用大孔树脂柱、硅胶柱进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。采用化学发光激酶检测试剂盒法、刃天青细胞活力测定法、酶标法测定磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、磷酸二酯酶 (PDE)、尖孢镰刀菌抑制活性。**结果** 从中分离得到 8 种内生真菌, 分别鉴定为木霉属、曲霉属、孢球托霉属、荃点霉属和青霉菌属真菌。菌株 ZGG-5 具有较强的 PI3K 抑制活性, IC_{50} 值为 $(0.17 \pm 0.05) \mu\text{g/mL}$, 被鉴定为卵形孢球托霉。从 ZGG-5 中分离得到 13 个化合物, 化合物 **13** 在 1 mg/mL 质量浓度下具有较强的 PI3K 抑制活性, 抑制率为 $(97.8 \pm 0.51)\%$ 。**结论** 中国红豆杉中存在具有 PI3K 有抑制活性的内生真菌。化合物 **1~12** 为首次从卵形孢球托霉中分离得到。

关键词: 中国红豆杉; 内生真菌; 卵形孢球托霉; 次生代谢产物; 分离鉴定; PI3K

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2024)10-3324-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.023

Secondary metabolites from endophytic fungi of *Taxus wallichiana* var. *chinensis* and their biological activities

CHEN Lei-lei, YANG Zhong-duo*, WEI Han-nan, MA Ke-zhen, GUO Wen-lin, ZHANG Tian
(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the secondary metabolites from endophytic fungi of *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin and their biological activities. **METHODS** Endophytes were isolated and purified by tissue block and scribing method, the obtained strains were identified by molecular method. Macroporous resin column and silica gel column were used for separation and purification, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. The inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase, phosphodiesterase and fusarium oxysporum activities were determined by chemiluminescence kinase assay kit method, resazurin cell viability assay and enzyme linked immunosorbent assay. **RESULTS** Eight endophytic fungi were isolated and identified as *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Gongronella*, *Phoma*, *Penicillium*. Strain ZGG-5 had strong PI3K inhibitory activity with IC_{50} value of $(0.17 \pm 0.05) \mu\text{g/mL}$, and was identified as *Gongronella butleri*. Thirteen compounds were isolated from ZGG-5, and compound **13** had strong activities of inhibiting PI3K at concentration of 1 mg/mL , and the inhibitory rate was $(97.8 \pm 0.51)\%$. **CONCLUSION** *T. wallichiana* var. *chinensis* contains endophytic fungi with strong activities of inhibiting PI3K. Compounds **1~12** are first isolated from *G. butleri*.

KEY WORDS: *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin; endophytic fungi; *Gongronella butleri*; secondary metabolites; isolation and identification; PI3K

收稿日期: 2023-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22267011); 甘肃省高等学校产业支撑计划项目 (2022CYZC-29); 温州市科技局项目 (2022Y0872)

作者简介: 陈蕾蕾 (1999—), 女, 硕士生, 从事内生真菌分离纯化及其次级代谢产物生物活性研究。E-mail: 15117203746@163.com

* 通信作者: 杨中铎 (1976—), 男, 博士, 教授, 从事天然药物化学研究。E-mail: yangzhongduo@126.com

内生菌是指在一定阶段或全部阶段,生活于健康植物的各种组织和器官细胞间隙或细胞内的微生物^[1],为一种无处不在且高度多样化的生物群体。近年来,研究者从植物内生真菌中发现了许多结构新颖的化合物,包括生物碱、萜类、类固醇、喹诺酮、异香豆素、木酚素、苯丙素、酚类、内酯等,具有抗菌、杀虫、抗癌活性^[2-3]。

中国红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin 是一种主要分布在长江以南的常青树,因其良好的药理作用,有望被用于治疗消化、呼吸、神经、骨骼系统疾病^[4]。例如,中国红豆杉的假种皮具有利尿、止泻作用,还可用于治疗毒蛇咬伤和狂犬病^[5],但目前未见其内生真菌抗 PI3K、PDE、真菌活性的相关报道。因此,本研究对中国红豆杉内生真菌进行分离鉴定,获得了一株对 PI3K 具有较高抑制活性的菌株卵形孢球托霉 *Gongronella butleri*, 并对其活性作进一步研究。

1 材料

1.1 仪器 SW-CJ-1G 超净工作台、YYQ-LS-18 高压灭菌锅、RE-5286A 旋转蒸发器、303-0B 恒温培养箱、LZY-103B 恒温振荡摇床(上海龙跃仪器设备有限公司); HH-2 数显恒温水浴锅(江苏环宇科学仪器厂); SHB-IIIS 循环水式多用真空泵(杭州亚讯生物科技有限公司); JJ323BC 电子分析天平(上海越平科学仪器有限公司); 303-0B 电热恒温培养箱(潍坊腾龙重工科技有限公司); P-1200 显微镜(德国 Dstyson 公司); TC1000-G/S DNA 扩增仪[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]; H-1650R 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); DNM-9602 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司); 移液枪(德国 Eppendorf 公司); 96 孔酶标板(常德比克曼生物科技有限公司); NP7000C 型高效液相色谱仪(江苏汉邦科技股份有限公司); YMC-Pack ODS-A 色谱柱(10 mm×250 mm, 5 μm, 日本 YMC 公司); 0.45 μm 微孔过滤器(美国 Gibco 公司); Agilent DD2 600 MHz 核磁共振波谱仪(美国 Agilent 公司); micrOTOF-Q II 电喷雾飞行时间质谱仪(美国 Bruker Daltonics 公司)。

1.2 试剂 薄层色谱硅胶、Sephadex LH-20 凝胶(青岛海洋化工有限公司); 大孔吸附树脂(北京绿百草科技发展有限公司); 乙酸乙酯(色谱纯,兰州西固永达化工厂); 甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司); RNA 酶(美国 Amresco 公司); PCR buffer、浓盐酸、苯酚、氯仿、异戊醇、

Tris、Tap DNA 聚合酶、EDTA(美国 Sigma 公司); 75% 医用酒精(邢台春雨工贸有限公司); 甲醇、乙酸乙酯、石油醚、丙酮(工业级,安徽省沃土化工有限公司)。

1.3 植物及菌种 植物采自甘肃省陇南市,经兰州理工大学生命科学与工程学院杨林副教授鉴定为红豆杉科植物中国红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin, 凭证标本保存于兰州理工大学生命科学与工程学院杨中铎教授实验室(编号 20200903whn-1)。尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 购自北京北纳创联生物技术研究院(货号 BNCC336354)。

1.4 培养基 PDA 培养基:选取合适大小的马铃薯,清洗,削皮,称取 200 g,切成薄片,加入 1 000 mL 水,煮沸 20~30 min,放冷后用 8 层纱布过滤,滤液加水定容至 1 000 mL,取 300 mL,置于 500 mL 锥形瓶中,加入 6~7 g 葡萄糖、8 g 琼脂粉,封口后高压蒸汽灭菌 30 min,温度降至 55 ℃ 左右时加入适量链霉素(50 μg/mL)和青霉素(15 g/L)以防止细菌污染,趁热倒进平板,冷却凝固,即得。

大米培养基:将 80 g 大米置于 500 mL 锥形烧瓶中,加 200 mL 水,高压蒸汽灭菌 30 min,即得。

2 方法

2.1 内生真菌分离 取新鲜中国红豆杉适量,无菌水清洗干净,将其根、茎、叶剪成小块,放入 75% 酒精中灭杀表面细菌(根部位灭菌 60 s,茎、叶、花部位各灭菌 35 s),用无菌水漂洗 1 min,再放入 0.1% HgCl₂ 溶液中消毒(根部位消毒 80 s,茎、叶、花部位各消毒 35 s),再用无菌水漂洗 1 min,无菌滤纸吸干水分。将消毒后的根、茎、叶放入 PDA 培养基中,28 ℃ 恒温培养 3 d,同时设置 2 组平行对照组,一组取第 3 次漂洗植物表面的蒸馏水 100 μL,均匀涂布于空白 PDA 培养基上;另一组将进行消毒操作但未切片的植物组织直接放入空白 PDA 培养基上,28 ℃ 恒温培养 3 d,根据植物组织周围是否有菌落生长来判断表面消毒是否彻底,以及分离得到的菌株是否为内生真菌,定期向培养箱中喷洒 75% 酒精进行消毒,防止空气中的杂菌污染。观察含植物组织的 PDA 培养基,看组织切面是否有菌丝长出,将新长出的菌丝用接种环挑出,用平板划线法接种到新的培养基上,待菌丝长出后根据菌落颜色、形态、分泌物等特征判断

是否为单一菌株，多次纯化直至成功得到。

2.2 内生真菌分子鉴定 8株内生菌的DNA提取及ITS序列的PCR扩增、产物纯化和测序均由甘肃一棵树生物科技有限公司完成，使用双脱氧测序法对菌株DNA进行提取和测序。其中，PCR扩增产物的正向引物为TCCGTAGGTGAACC TGCGG，反向引物为TCCTCCGCTTATTGATATGC。

2.3 发酵与提取 用接种针挑取少量菌株ZG-G-5的菌丝，接种于大米培养基，于28℃恒温下振荡培养40d，共100瓶。培养结束后，用乙酸乙酯萃取发酵产物，浓缩除去溶剂，得相应部位浸膏206g。

2.4 次级代谢产物分离 乙酸乙酯部位浸膏(206g)经大孔树脂柱分离，以乙醇-水(0:100~90:10)梯度洗脱，得到Fr. A~Fr. E。

Fr. A (14.0 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物1(300 mg)和Fr. A-1~Fr. A-2，Fr. A-1 (1.5 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(100:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物2(7 mg)；Fr. A-2 (3.1 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物3(20 mg)。Fr. B (15 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(100:1~1:1)梯度洗脱，得到Fr. B-1~Fr. B-3，Fr. B-2 (4.5 g) 经硅胶柱分离，

以氯仿-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物4(8 mg)；Fr. B-3 (2.0 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(30:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物5(5 mg)、6(10 mg)。Fr. C (24 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(80:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物7(30 mg)和Fr. C-1~Fr. C-3，Fr. C-1 (3.0 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物8(13 mg)；Fr. C-2 (2.8 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(100:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物9(30 mg)；Fr. C-3 (4.5 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(80:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物10(14 mg)、11(18 mg)。Fr. D (22.0 g) 经硅胶柱分离，以氯仿-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱，得到化合物12(13 mg)、13(1 mg)。

2.5 PI3K活性测定 参照课题组前期报道^[6]。

2.6 磷酸二酯酶1活性测定 参照文献[7]报道。

2.7 抗尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)生长活性测定 参照文献[8]报道。

3 结果

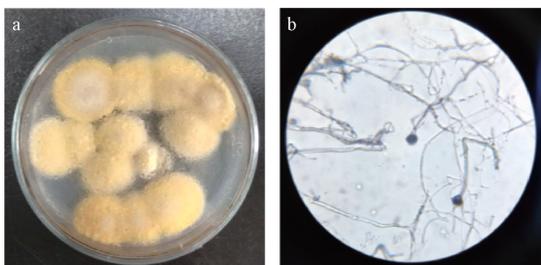
3.1 内生菌分离 共分离到8株内生真菌(表1)，代表性菌株ZG-G-5的形态学特征见图1。

表1 8株内生真菌鉴定及活性测试结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 1 Identification and activities test results of 8 endophytic fungi ($\bar{x}\pm s, n=3$)

菌株	拉丁名	GenBank 登录号	PI3K 抑制率/% (1 mg/mL)	PDE 抑制率/% (0.1 mg/mL)	MIC/(mg·mL ⁻¹) (尖孢镰刀菌)
ZG-G-2	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	OK323252	-8.90±0.52	0.27±0.45	>5.00±0.03
ZG-G-3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OM866153	12.21±0.54	15.66±0.41	>5.00±0.05
ZG-G-4	<i>Aspergillus sp.</i>	—	11.70±0.62	—	>5.00±0.04
ZG-G-5	<i>Gongronella butleri</i>	OM866008	97.22±0.36	22.35±0.65	>5.00±0.05
ZG-J-2	<i>Phoma sp</i>	OK323248	-7.32±0.43	—	>5.00±0.02
ZG-J-4	<i>Aspergillus flavus</i>	OK323249	13.93±0.58	1.69±0.71	2.50±0.04
ZG-J-5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OK323250	8.82±0.78	4.69±0.58	>5.00±0.03
ZG-Y-2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	OK323251	53.93±0.50	31.03±0.32	(2.50~5.00)±0.02

注：—为未提交 GeneBank 数据库。



注：a 为在 PDA 上的菌落形态，b 为分生孢子形状 (×400)。

图1 ZG-G-5的形态学特征

Fig. 1 Morphological characteristics of ZG-G-5

3.2 菌种鉴定 将8株真菌的ITS测序结果分别在NCBI数据库中进行在线BLAST对比，下载相似度最高的10株菌种序列，使用MAGE 7.0软件进行多序列比较并构建系统进化树，分析亲缘和进化关系，序列相似度在98%以上可认为是同一属菌株，结合形态学特征进行鉴定。结果，8个菌株分别被鉴定为曲霉属(*Aspergillus*)、孢球托霉属(*Gongronella*)、茎点霉属(*Phoma*)和青霉属(*Penicillium*)真菌，见表1。

3.3 代表性菌株 ZG-G-5 鉴定 在 PDA 培养基上, 菌株 ZG-G-5 培养物呈黄色, 菌丝呈线状, 边缘呈波浪状, 1 周后表面变为红色。显微镜下观察发现, ZG-G-5 有粗细不一的分隔菌丝。结合 ITS 序列对比, 鉴定菌株 ZG-G-5 为卵形孢球托霉 *Gongronella butleri*, 其 ITS 序列已提交 GeneBank 数据库, 登录号 OM866008。

3.4 生物活性 结果见表 1。由此可知, 菌株 ZG-G-5 显示出较强的抗 PI3K 活性, 其 IC₅₀ 值为 (0.17±0.05) μg/mL, 但所有菌株对磷酸二酯酶 1 (PDE1)、尖孢镰刀菌均未表现出明显抑制活性。

3.5 结构鉴定

化合物 1: 无色针晶, ESI-MS m/z : 181.079 0 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 4.38 (2H, d, $J=5.5$ Hz, 3, 4-OH), 4.29 (2H, t, $J=5.7$ Hz, 2, 5-OH), 4.10 (2H, d, $J=7.1$ Hz, 1, 6-OH), 3.58 (2H, ddd, $J=10.9, 5.6, 3.5$ Hz, H-1a, 6a), (2H, t, $J=7.7$ Hz, H-1b, 6b), 3.42 (2H, dt, $J=8.9, 5.8, 3.5$ Hz, H-2a, 5a), 3.35 (2H, dd, $J=11.2, 5.8$ Hz, H-3a, 4a);¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 71.7 (C-3, 4), 70.1 (C-2, 5), 64.2 (C-1, 6)。以上数据与文献 [9] 报道基本一致, 故鉴定为 galactitol。

化合物 2: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 239.319 0 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8.09 (1H, s, H-5), 4.26 (2H, dd, $J=7.2, 5.7$ Hz, H-1'), 1.72 (1H, d, $J=6.2$ Hz, H-2'), 1.45 (2H, dd, $J=7.1, 3.7$ Hz, H-3'), 1.39 (2H, d, $J=8.1, 4.4$ Hz, H-4'), 1.32 (2H, d, $J=4.0$ Hz, H-5'), 1.43~1.45 (2H, m, H-1''), 1.45~1.47 (2H, m, H-2''), 1.25 (2H, s, H-3''), 0.96 (3H, t, $J=5.3$ Hz, H-3''), 0.90 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-6');¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 166.1 (C-6), 134.4 (C-4), 129.6 (C-5), 67.9 (C-1'), 39.0 (C-2'), 32.0 (C-1''), 30.7 (C-3'), 29.8 (C-4'), 24.1 (C-2''), 23.1 (C-5'), 14.2 (C-6'), 11.2 (C-3'')。以上数据与文献 [10] 报道基本一致, 故鉴定为 (*R*)-2-丙基己基-2*H*-1, 2, 3-三唑-4-羧酸酯。

化合物 3: 白色晶体, ESI-MS m/z : 142.026 6 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ: 8.15 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-6), 8.02 (1H, dd, $J=9.6, 2.5$ Hz, H-4), 6.52 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-

3);¹³C-NMR (150 MHz, D₂O) δ: 113.1 (C-3), 121.3 (C-5), 165.7 (C-7), 164.8 (C-2), 143.3 (C-6), 139.9 (C-4), 121.3 (C-5), 113.1 (C-3)。以上数据与文献 [11] 报道基本一致, 故鉴定为 kojic acid。

化合物 4: 白色固体, ESI-MS m/z : 138.026 9 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 8.15 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-6), 8.02 (1H, dd, $J=9.6, 2.5$ Hz, H-4), 6.52 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3);¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 113.1 (C-3), 121.3 (C-5), 165.7 (C-7), 164.8 (C-2), 143.3 (C-6), 139.9 (C-4), 121.3 (C-5), 113.1 (C-3)。以上数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定为 6-hydroxynicotinic acid。

化合物 5: 无色晶体, ESI-MS m/z : 175.068 5 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 6.52 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-2), 2.60 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-3b), 2.48 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-3b), 1.81 (1H, q, $J=6.9$ Hz, H-5), 1.23 (6H, d, $J=6.9$ Hz, H-6, 7);¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 176.7 (C-1), 172.8 (C-4), 74.0 (C-2), 42.8 (C-3), 37.6 (C-5), 17.8 (C-6), 17.1 (C-7)。以上数据与文献 [13] 报道基本一致, 故鉴定为 (*S*)-(-)-2-isopropyl malic acid。

化合物 6: 白色固体, ESI-MS m/z : 151.047 3 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.14~7.04 (2H, d, $J=7.3$ Hz, H-2, 6), 6.73 (2H, d, $J=7.3$ Hz, H-3, 5), 3.54 (2H, s, H-7);¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 172.4 (C-8), 157.5 (C-4), 116.2 (C-3, 5), 126.3 (C-1), 131.3 (C-2, 6), 38.6 (C-7)。以上数据与文献 [14] 报道基本一致, 故鉴定为 4-hydroxyphenylacetic acid。

化合物 7: 黄色晶体, ESI-MS m/z : 543.137 0 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.53 (2H, s, H-6, 6'), 7.14 (2H, s, H-8, 8'), 4.56 (2H, dd, $J=5.5, 2.4$ Hz, H-3, 3'), 3.50 (2H, s, H-4, 4'), 2.89 (2H, d, $J=5.5$ Hz, H-2, 2'), 2.47 (6H, s, H-15, 15');¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 195.2 (C-13), 186.6 (C-13'), 183.4 (C-11'), 162.9 (C-9, 9'), 149.5 (C-7, 7'), 137.8 (C-14, 14'), 124.9 (C-8, 8'), 121.7 (C-6, 6'), 115.8 (C-10, 10'), 107.7 (C-12'), 70.1 (C-3), 59.4 (C-3'), 58.1 (C-2'),

49.8 (C-2), 22.0 (C-15, 15')。以上数据与文献 [15] 报道基本一致, 故鉴定为 rugulosin A。

化合物 8: 无色晶体, ESI-MS m/z : 222.063 3 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 8.06 (4H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1, 2, 13, 14), 7.44 (5H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6 ~ 10); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 168.3 (C-4, 11), 143.1 (C-5), 134.1 (C-3, 12), 133.6 (C-7, 9), 130.2 (C-1, 14), 127.9 (C-2, 6, 10, 13), 127.8 (C-8)。以上数据与文献 [16] 报道基本一致, 故鉴定为 *N*-(phenyl) phthalimide。

化合物 9: 无色透明晶体, ESI-MS m/z : 301.151 8 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.16 (4H, d, $J = 8.6$ Hz, H-4, 8, 4', 8'), 6.86 (4H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5, 7, 5', 7'), 3.79 (6H, s, H-6, 6'), 3.48 (2H, m, H-1, 1'), 2.93 (4H, d, $J = 14.0$ Hz, H-2, 2'); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 158.3 (C-3), 132.9 (C-6), 132.1 (C-5, 5', 7, 7'), 114.0 (C-4, 4', 8, 8'), 77.1 (C-1, 1'), 38.3 (C-2, 2')。以上数据与文献 [17] 报道基本一致, 故鉴定为 (2*S*, 3*R*)-1, 4-di (4-methoxyphenyl) -2, 3-butandiol。

化合物 10: 黄色油状液体, ESI-MS m/z : 277.151 8 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.01 (2H, dd, $J = 8.0, 3.6$ Hz, H-3, 6), 7.82 (2H, dd, $J = 8.0, 8.2$ Hz, H-4, 5), 4.61 (4H, t, $J = 6.7$ Hz, H-8, 8'), 0.96 (6H, t, $J = 6.4$ Hz, H-11, 11'); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 167.6 (C-7, 7'), 132.4 (C-3, 6), 130.9 (C-4, 5), 128.8 (C-1, 2), 65.5 (C-8, 8'), 30.6 (C-9, 9'), 19.2 (C-10, 10'), 13.7 (C-11, 11')。以上数据与文献 [18] 报道基本一致, 故鉴定为 dibutyl phthalate。

化合物 11: 无色透明晶体, ESI-MS m/z : 155.042 3 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.94 (1H, s, H-6), 6.50 (1H, s, H-3), 4.41 (2H, s, H-7), 3.35 (3H, s, H-5); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 168.0 (C-2), 110.7 (C-3), 172.8 (C-4), 147.9 (C-5), 139.0 (C-6), 59.3 (C-7), 56.1 (5-OCH₃)。以上数据与文献 [19] 报道基本一致, 故鉴定为 kojic acid monomethyl ether。

化合物 12: 无色透明晶体, ESI-MS m/z : 342.245 7 [M-H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ :

5.44 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-1), 4.23 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 3'-OH), 4.01 (1H, dd, $J = 3.3, 1.2$ Hz, 4'-OH), 3.88 ~ 3.94 (1H, m, 5'-OH), 3.90 (1H, dd, $J = 6.2, 2.2$ Hz, 4-OH), 3.84 (2H, d, $J = 3.1$ Hz, H-6'), 3.80 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-6), 3.75 (1H, dd, $J = 3.2, 0.9$ Hz, H-3), 3.68 (2H, s, H-1'), 3.58 (1H, dd, $J = 10.0, 4.0$ Hz, H-2), 3.54 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-5); ¹³C-NMR (150 MHz, D₂O) δ : 61.5 (C-1'), 103.8 (C-2'), 76.5 (C-3'), 74.2 (C-4'), 81.5 (C-5'), 62.5 (C-6'), 92.3 (C-1), 71.2 (C-2), 72.7 (C-3), 69.4 (C-4), 72.5 (C-5), 60.3 (C-6)。以上数据与文献 [20] 报道基本一致, 故鉴定为蔗糖。

化合物 13: 黄色固体, ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.82 (3H, s), 2.04 (3H, s), 3.27 (3H, s), 3.50 (3H, s), 4.35 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 6.00 (1H, dd, $J = 15.0, 8.2$ Hz), 7.13 (1H, s), 8.60 (1H, dd, $J = 15.0, 8.2$ Hz)。但由于量太少 (1 mg), 未能得到信号明显的 ¹³C-NMR 数据, 故未能对其结构进行确定。

3.6 PI3K 抑制活性 由表 2 可知, 仅化合物 13 显示出较强的抗 PI3K 活性, 在 1 mg/mL 质量浓度下抑制率为 (97.8±0.51)%, 而其他化合物无明显活性。

表 2 各化合物的 PI3K 酶抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab. 2 PI3K enzyme inhibition rates of various compounds ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	抑制率/%	化合物	抑制率/%
1	—	8	—
2	48.21±0.54	9	39.12±0.86
3	15.12±1.45	10	11.01±1.46
4	21.91±0.49	11	—
5	—	12	—
6	—	13	97.80±0.51
7	22.80±1.34		

4 讨论

红豆杉属植物中含有许多紫杉烷、生物碱、多糖、黄酮类化合物, 具有抗肿瘤 (卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、肺癌、前列腺癌等)、抗氧化、抗菌、抗纤维化、抗炎等多种活性^[21]。此外, 其内生菌也被广泛研究, 如张智慧等^[22]从东北红豆杉 *T. cuspidate* 中分离得到 10 株内生真菌, 发现一株特异性产紫杉醇的链格孢菌 *Alternaria alternata*, 其发酵液提取物对肺癌 A549 和宫颈癌

HeLa 细胞具有显著抑制作用; Li 等^[23]从东北红豆杉中分离到一株镰刀菌属内生真菌 *F. mairei*, 发现其能刺激东北红豆杉愈伤组织细胞生长, 显著提高培养物中的紫杉醇产量。近年来, 人们对中国红豆杉的内生真菌也进行了研究, Wu 等^[24]分离出卧孔菌属真菌 *Perenniporia tephropora*, 并从中得到一个具有细胞毒性的倍半萜化合物 perenniporin A。但迄今为止, 未见关于中国红豆杉内生菌抗 PI3K、抗 PDE、抗真菌活性的报道。

本实验对中国红豆杉根、茎、叶中的内生真菌进行分离, 结果得到了 8 株, 并发现了一株活性较好的 *G. butleri*, 查阅文献发现目前对其研究很少。然后, 从该菌株乙酸乙酯部位中分离出 13 个化合物, 并鉴定了其中 12 个的结构; 所有化合物均为首次分得, 但仅化合物 **13** 表现出较强的 PI3K 抑制活性。

参考文献:

[1] Wang L W, Zhang Y L, Lin F C, *et al.* Natural products with antitumor activity from endophytic fungi [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(12): 1056-1074.

[2] Tang Z Z, Wang Y S, Yang J Y, *et al.* Isolation and identification of flavonoid-producing endophytic fungi from medicinal plant *Conyza blinii* H. Lévl that exhibit higher antioxidant and antibacterial activities [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8978.

[3] Silva G H, Teles H L, Trevisan H C, *et al.* New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis* [J]. *J Braz Chem Soc*, 2005, 16(6b): 1463-1466.

[4] Hao D C, Ge G B, Yang L. Bacterial diversity of *Taxus* rhizosphere: culture-independent and culture-dependent approaches [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 284 (2): 204-212.

[5] 陈雪英, 梁敬钰. 人工栽培的南方红豆杉化学成分研究 (III) [J]. *药学学报*, 2008, 43(12): 1205-1207.

[6] Zhao J W, Yang Z D, Zhou S Y, *et al.* Wortmannine F and G, two new pyranones from *Talaromyces wortmannii* LGT-4, the endophytic fungus of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Phytochem Lett*, 2018, 29: 115-118.

[7] Fozing C D A, Ali Z, Ngadjui B T, *et al.* Phosphodiesterase I-inhibiting Diels-Alder adducts from the leaves of *Morus mesozygia* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(2): 154-159.

[8] Zhang Y, Kao P L, Rampal A, *et al.* High-throughput screening assays to identify plant natural products with antifungal properties against *Fusarium oxysporum* [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2391: 171-184.

[9] 巢剑非, 殷志琦, 叶文才, 等. 构树的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(13): 1078-1080.

[10] 陈彦君, 祝丽君, 于红梅, 等. 霸王鞭内生真菌烟曲霉中 1 个新的生物碱类化合物 [J]. *中草药*, 2019, 50(22): 5400-5403.

[11] Ola A R B, Metboki G, Lay C S, *et al.* Single production of kojic acid by *Aspergillus flavus* and the revision of flufuran [J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4200.

[12] Payne R J, Bulloch E M M, Kerbarh O, *et al.* Inhibition of chorismate-utilising enzymes by 2-amino-4-carboxypyridine and 4-carboxypyridone and 5-carboxypyridone analogues [J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8(15): 3534-3542.

[13] Inoue S, Wakai A, Konishi T, *et al.* Studies on *Galeola septentrionalis* Reichb. fil. 1. isolation and structures of the constituents of *Dotuusoos* [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1984, 104(1): 42-49.

[14] 杨春贵, 李琳, 魏佩瑶, 等. 罗汉松果内生真菌次级代谢产物研究 [J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(2): 29-30.

[15] Yamazaki H, Koyama N, Omura S, *et al.* New rugulosins, anti-MRSA antibiotics, produced by *Penicillium radicum* FKI-3765-2 [J]. *Org Lett*, 2010, 12(7): 1572-1575.

[16] Rauf M K, Mushtaq R, Badshah A, *et al.* Synthesis and crystal structure studies of three *N*-phenylphthalimide derivatives [J]. *J Chem Crystallogr*, 2013, 43(3): 144-150.

[17] Yang B, Yang Z D, Li X F, *et al.* Secondary metabolites of the endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* cultivated in maize medium and their bioactivity [J]. *Chem Nat Compd*, 2020, 56(6): 1143-1145.

[18] Roy R N, Laskar S, Sen S K. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2 [J]. *Microbiol Res*, 2006, 161(2): 121-126.

[19] Li X F, Jeong J H, Lee K T, *et al.* γ -Pyrone derivatives, kojic acid methyl ethers from a marine-derived fungus *Altenaria* sp [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(7): 532-534.

[20] 周乐, 王宁, 苗芳, 等. 秦岭龙胆的化学成分 [J]. *有机化学*, 2004, 24(10): 1249-1252.

[21] 邸亮, 许燕, 殷光发, 等. 红豆杉属植物化学成分及其药理作用机制研究进展 [J]. *山东化工*, 2021, 50(16): 101-103; 119.

[22] 张智慧. 东北红豆杉产紫杉醇内生真菌 *Alternaria alternata* F3 的分离鉴定及体外抗癌活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.

[23] Li Y C, Tao W Y. Effects of paclitaxel-producing fungal endophytes on growth and paclitaxel formation of *Taxus cuspidata* cells [J]. *Plant Growth Regul*, 2009, 58(1): 97-105.

[24] Wu L S, Hu C L, Han T, *et al.* Cytotoxic metabolites from *Perenniporia tephropora*, an endophytic fungus from *Taxus chinensis* var *mairei* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(1): 305-315.