

海南红树林内生真菌 *Fusarium* sp. HSL-3 次级代谢产物研究

汪丽霞^{1,2}, 黎思慧², 马奕涵², 吴斌^{2*} (1.常山县农业特色产业发展中心, 浙江 常山 324200; 2.浙江大学海洋学院, 杭州 310000)

摘要: 目的 研究海南红树林内生真菌 *Fusarium* sp. HSL-3 次级代谢产物, 并对其进行抗炎和抗肿瘤活性筛选。方法 采用大米培养基对菌株静置培养, 同时采用柱层析色谱法和 HPLC 对该真菌的次级代谢产物进行分离纯化, 并且通过核磁共振及质谱等有机波谱手段, 对得到的化合物进行结构鉴定。结果 共分离得到 8 个化合物, 分别为 lateritin(1)、4-carbomethoxy-6-hydroxy-2-quinolone(2)、3,5-dimethoxydihydrofusarubin D(3)、anhydrofusarbin(4)、3,3'-methylene-bis(4-hydroxybenzaldehyde)(5)、crypticin B(6)、vanillyl alcohol(7)和 3,4-dihydroxyphenylaceticacid(8), 其中化合物 2 和 5 为首次从镰刀菌属 *Fusarium* 中分离得到。化合物 3 和 5 对 RAW264.7 细胞表现出良好的抗炎活性(化合物 3 在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 NO 抑制率为 87%, 化合物 5 在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 NO 抑制率为 71%), 而化合物 1 对非小细胞肺癌细胞 A549 有显著的细胞毒活性, IC_{50} 值为 $(7.92\pm 0.27) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论 从海南红树林内生真菌 *Fusarium* sp. HSL-3 中分离得到的化合物 3 和 5 具有较强的抗炎活性, 化合物 1 有显著的抗肿瘤活性。

关键词: 红树林; 内生真菌; *Fusarium* sp.; 次级代谢产物; 抗炎; 抗肿瘤

中图分类号: R927 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)13-1759-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222302

引用本文: 汪丽霞, 黎思慧, 马奕涵, 等. 海南红树林内生真菌 *Fusarium* sp. HSL-3 次级代谢产物研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(13): 1759-1764.

Study on Secondary Metabolites of Endophytic Fungus *Fusarium* sp. HSL-3 from Hainan Mangrove

WANG Lixia^{1,2}, LI Sihui², MA Yihan², WU Bin^{2*} (1.Changshan Agriculture Development Center, Changshan 324200, China; 2.Ocean College, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the secondary metabolites of the endophytic fungus *Fusarium* sp. HSL-3 isolated from Hainan Mangrove and screen their anti-inflammatory and anti-tumor activities. **METHODS** This fungus was fermented statically by using rice medium, and the secondary metabolites of the fungus were isolated and purified by column chromatography and HPLC. Structures identification of the obtained compounds was carried out through MS and NMR. **RESULTS** Eight compounds were respectively isolated and identified as follows: lateritin(1), 4-carbomethoxy-6-hydroxy-2-quinolone(2), 3,5-dimethoxydihydro-fusarubin D(3), anhydrofusarbin(4), 3,3'-methylene-bis(4-hydroxybenzaldehyde)(5), crypticin B(6), vanillyl alcohol(7) and 3,4-dihydroxyphenylaceticacid(8), among which, compounds 2 and 5 were isolated from the genus *Fusarium* for the first time. Compounds 3 and 5 showed good anti-inflammatory activity on RAW264.7 cells with the inhibition rate of NO at 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were 87% for compound 3 and 71% for compound 5, while compound 1 showed significant cytotoxic activity against human non-small cell lung cancer cell line A549, among which the IC_{50} value was $(7.92\pm 0.27) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** Compounds 3 and 5 isolated from endophytic fungus *Fusarium* sp. HSL-3 isolated from Hainan Mangrove show strong anti-inflammatory activity, while compound 1 shows significant anti-tumor activity.

KEYWORDS: Mangrove; endophytic fungus; *Fusarium* sp.; secondary metabolites; anti-inflammatory; anti-tumor

从植物中分离的内生真菌被认为是结构新颖、活性良好的天然产物来源之一, 在新药开发中具有潜在的应用价值^[1-2]。镰刀菌(*Fusarium* sp.)是一种遍布世界各地的大型丝状真菌属, 它能产生三类最重要的霉菌毒素, 包括单端孢霉烯族毒素、伏马菌素和玉米赤霉烯酮, 因此, 它可以作为植物病原体攻击各种各样的寄主植物, 如玉米、

小麦、香蕉、番茄和芒果等^[3-4]。然而, 也有大量证据表明, 镰刀菌具有产生大量有显著生物活性的次级代谢产物的潜力, 如抗菌活性^[5-6]、细胞毒性^[7-9]等。本研究报告来源于海南红树林内生真菌 *Fusarium* sp. HSL-3 中的化合物的体外生物活性, 以为植物内生菌来源化合物的挖掘与活性发现提供理论基础。

基金项目: 国家自然科学基金项目(42176098, 41876148); 常山县科技研发和成果转化项目(2021026)

作者简介: 汪丽霞, 女, 硕士, 农艺师 E-mail: wagnlixia809@126.com *通信作者: 吴斌, 男, 博士, 教授 E-mail: wubin@zju.edu.cn

1 仪器与材料

LDZX-50KBS 立式蒸汽压力灭菌器(上海申安医疗器械厂);超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司);ZF-20D 暗箱式紫外分析仪(杭州瑞佳精密科学仪器有限公司);LC3000 制备型高效液相色谱仪(北京创新同恒科技有限公司);LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津仪器公司);6460 Triple Quad LCMS 高分辨液质联用仪、6230 TOF LC/MS 高分辨液质联用仪均购自美国 Agilent 公司;JEOL 600 MHz 核磁共振波谱仪(日本电子株式会社);Elmer-341 旋光仪(美国 Perkinelmer 股份有限公司);Multiskan FC 酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

RAW264.7 小鼠巨噬细胞(美国典型培养物保藏中心);一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒(碧云天生物科技有限公司,货号:S0021S);小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) ELISA 检测试剂盒(货号:EK0527)、小鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 检测试剂盒(货号:EK0411)均购自博士德生物工程有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号:10270-106)、H-DMEM 培养基(批号:12800-082)均购自 Gibco;DC18105-25200 制备色谱柱[苏州科盛实验设备有限公司),填料类型 C_{18} (200 mm $\times$ 25mm)];脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 碧云天生物科技有限公司,货号:ST1470;规格:10mg);地塞米松(碧云天生物科技有限公司,货号:ST1258;规格:50mg);多比柔星(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号:D396221;规格:25mg);GF254 薄层硅胶色谱板、200~300 目硅胶层析填料、60~100 目硅胶层析填料均购自青岛海洋化工厂;分析纯石油醚、乙酸乙酯、甲醇均购自上海凌峰化学试剂有限公司;氘代甲醇、氘代氯仿、氘代 DMSO 均购自宁波旋光医药科技有限公司。

菌株分离自海南红树林木本样品,该菌种现保存于中国典型微生物保藏中心(CCTCC),保藏号为 CCTCC AF 2021086。

2 菌株发酵、提取与分离

菌株 *Fusarium* sp.HSL-3 采用大米培养基大规模发酵 200 盒,在恒温 28 $^{\circ}\text{C}$ 下静置发酵 28 d 后,用乙酸乙酯以 1 : 1 的体积比萃取 3 次,然后使用旋转蒸发器将其中的乙酸乙酯部分旋干,干燥后获得的浸膏为 78.2 g。

将获得的浸膏用适量的乙酸乙酯全部溶解后,加入质量比 1 : 1 的硅胶填料(已烘干)拌样,通过旋蒸除去乙酸乙酯溶剂之后用研钵将硅胶和浸膏混合物磨成粉末状。将拌样后的浸膏加至正相硅胶层析柱中,并采用乙酸乙酯 : 石油醚(20 : 80, 30 : 70, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30, 80 : 20, 90 : 10)溶剂体系进行洗脱,最后换用甲醇 : 乙酸乙酯(1 : 50, 1 : 30, 1 : 20, 1 : 10, 1 : 5, 1 : 2)溶剂体系洗脱。按照每 500 mL 接 1 份,将每个组分旋干之后,用少量洗脱剂溶解并转移至 10 mL 玻璃瓶中。根据薄层层析色谱(TLC)结果,将相近的组分合并,共得到 10 个分段;通过 HPLC 查看组分状况,进一步将相近的组分合并,共得到 7 个分段,记为 Frac. 1~7。将 Frac. 1 (11.4 g)用适量的甲醇溶解以后,加入质量比 1 : 1 的反向硅胶填料拌样,旋蒸除去溶剂之后用研钵研细,加至反向硅胶柱中,采用甲醇/水(20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%)进行梯度洗脱分离,按照每 300 mL 接 1 份,旋干之后,用少量甲醇溶解转移至 10 mL 玻璃瓶中,并将这些组分通过 TLC 点板合并,获得 5 个分段,记为 Frac. 1.1~1.5。Frac. 3 和 Frac. 5 同样按照上述操作,分别获得 6 个分段和 7 个分段,记为 Frac. 3.1~3.6 和 Frac. 5.1~5.7。

将以上组分通过制备型高效液相色谱仪进一步分离纯化(流速 10.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, UV=210 nm, 甲醇水体系)。从 Frac. 1.2(78 mg)中分离得到单体化合物 **3**(3.6 mg, t_R 65.8 min),条件为甲醇-水(20 : 80~100 : 0), 90 min。Frac. 1.3(102 mg)在制备型液相色谱仪上用 65%的甲醇水体系进行分离,得到单体化合物 **4**(67.3 mg, t_R 22.5 min)。从 Frac. 2 (240 mg)中分离得到单体化合物 **2**(2.4 mg, t_R 29.8 min),条件为甲醇-水(20 : 80~100 : 0), 90 min。从 Frac. 3.4(92 mg)中分离得到单体化合物 **1**(35.8 mg, t_R 35.2 min),条件为甲醇-水(50 : 50~70 : 30), 60 min。从 Frac. 4(203 mg)中分离得到单体化合物 **5**(3.7 mg, t_R 25.8 min),条件为甲醇-水(20 : 80~100 : 0), 90 min。从 Frac. 5.1(39 mg)中分离得到单体化合物 **7**(4.3 mg, t_R 57.9 min),条件为甲醇-水(20 : 80~100 : 0), 90 min。Frac. 7 (83 mg)在制备型液相色谱仪上用 30%的甲醇水体系进行分离,得到单体化合物 **6**(2.6 mg, t_R 24.1 min)和单体化合物 **8**(1.8 mg, t_R 25.6 min)。

3 活性测试

3.1 抗炎活性测试

参考文献方法,采用MTT比色法检测化合物对RAW264.7细胞活性的影响,检测 $\leq 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时化合物对RAW264.7的细胞毒性作用,Griess试剂法检测NO释放量,ELISA试剂法检测细胞释放IL-6和TNF- α 的水平^[10-12]。

3.1.1 细胞培养 将RAW264.7细胞加入含10% FBS、100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的H-DMEM培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的湿润培养箱中培养。

3.1.2 细胞存活率 将RAW264.7细胞按照每孔 2×10^4 个的密度接种于96孔板中过夜培养,用不同浓度的化合物(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和LPS在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养细胞24 h。然后向每个孔中加入20 μL 新配制的MTT溶液(5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT的ddH₂O溶液),并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育4 h。然后,向每个孔中加入100 μL DMSO,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育10 min。用酶标仪在480 nm下测量光密度(OD)值。细胞存活率=(OD_{给药组}/OD_{对照组}) $\times 100\%$ 。

3.1.3 NO水平检测 使用NO检测试剂盒检测用100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS和20, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物处理24 h的细胞中的NO产量。吸取50 μL 上清培养液至96孔板中,加入50 μL Griess试剂,轻轻摇晃使其充分混匀,在室温下孵育10 min后,在540 nm波长处测量每个孔的吸光值。

3.1.4 IL-6和TNF- α 的含量检测 为了检测化合物对LPS诱导的细胞中炎症介质产生的影响,用LPS和20, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物处理RAW264.7细胞(每孔 2×10^4 个细胞)24 h。收集上清培养液,并根据ELISA试剂盒说明书操作,检测IL-6和TNF- α 的浓度。

3.2 抗肿瘤活性测试

采用MTT法,对化合物进行非小细胞肺癌细胞A549的细胞毒活性测试,使用多柔比星作为阳性对照^[13]。初筛选择在20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,对样品的细胞毒活性进行测试。一般情况下,每个样品测试次数 $n\geq 2$ (抑制率 $>50\%$ 的样品 $n\geq 3$),在结果中以标准偏差(standard deviation, SD)表示。将空白对照组抑制率设为0,样品处理组与空白组进行比较。

3.3 统计学处理

数据处理采用GraphPad Prism 8进行统计数据整理分析,计量资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采

用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

4 结果与分析

4.1 结构鉴定

化合物1:红色粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +48.00$ (c 0.10, MeOH), ESIMS m/z 262.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ 。¹H-NMR(CDCl_3 , 600 MHz) δ : 7.21~7.28(m, 4H), 7.16~7.20(m, 1H), 5.68(dd, $J=13.2$, 3.8 Hz, 1H), 4.82(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 3.41(d, $J=13.2$ Hz, 1H), 3.06(s, 3H), 2.95(dd, $J=13.2$, 13.2 Hz, 1H), 1.87~1.95(m, 1H), 0.80(d, $J=6.5$ Hz, 3H), 0.35(d, $J=6.5$ Hz, 3H)。¹³C-NMR(CDCl_3 , 150 MHz) δ : 170.9, 169.9, 136.3, 128.7, 128.7, 128.7, 127.0, 127.0, 75.9, 56.9, 34.6, 31.9, 29.8, 18.3, 17.1。与文献数据^[14]基本一致,故化合物鉴定为lateritin。

化合物2:黄色粉末, ESIMS m/z 218.00 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_4$ 。¹H-NMR($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ : 7.48(d, $J=2.6$ Hz, 1H), 7.23(d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.07(dd, $J=8.8$, 2.6 Hz, 1H), 6.88(s, 1H), 3.91(s, 3H)。¹³C-NMR($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ : 165.5, 160.1, 152.4, 138.9, 132.7, 124.2, 120.6, 116.8, 116.2, 109.5, 52.7。与文献数据^[15]基本一致,故化合物鉴定为4-carbomethoxy-6-hydroxy-2-quinolone。

化合物3:红色粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -40.00$ (c 0.10, MeOH), ESIMS m/z 337.10 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$ 。¹H-NMR(CDCl_3 , 600 MHz) δ : 12.64(s, 1H), 7.26(s, 1H), 6.41(s, 1H), 4.57(d, $J=2.2$ Hz, 1H), 4.23(dd, $J=11.2$, 5.0 Hz, 1H), 3.95(s, 3H), 3.59(dd, $J=11.2$, 11.2 Hz, 1H), 3.41(s, 3H), 3.21(s, 3H), 3.05~3.11(m, 1H), 2.47~2.53(m, 1H), 2.01(dd, $J=12.9$, 12.9 Hz, 1H), 1.81(dd, $J=12.9$, 3.7 Hz, 1H), 1.37(s, 3H)。¹³C-NMR(CDCl_3 , 150 MHz) δ : 202.5, 159.6, 153.6, 135.9, 125.0, 108.5, 99.4, 97.8, 71.1, 60.1, 57.8, 56.3, 47.9, 41.4, 37.8, 37.3, 23.4。与文献数据^[16]基本一致,故化合物鉴定为3,5-dimethoxydihydrofusarubin D。

化合物4:紫色粉末, ESIMS m/z 287.00 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。¹H-NMR(CDCl_3 , 600 MHz) δ : 13.06(s, 1H), 12.67(s, 1H), 6.18(s, 1H), 6.00(s, 1H), 5.23(s, 2H), 3.92(s, 3H), 2.02(s, 3H)。¹³C-NMR(CDCl_3 , 150 MHz) δ : 183.0, 177.9, 161.6, 160.0, 157.9, 157.8, 133.1, 122.8, 111.0, 110.0, 108.0, 94.8, 63.0, 56.7, 20.1。与文献数据^[17]基本一致,

故化合物鉴定为 anhydrofusarbin。

化合物 **5**: 棕色粉末, HRESIMS m/z 257.045 6 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{14}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ : 9.95(s, 2H), 7.04(d, $J=3.0$ Hz, 2H), 7.02(dd, $J=8.8$, 3.0 Hz, 2H), 6.81(d, $J=8.8$ Hz, 2H)。 ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ : 196.0, 196.0, 156.6, 156.6, 151.6, 151.6, 126.2, 126.2, 122.7, 122.7, 119.0, 119.0, 117.5, 117.5。与文献数据^[18]基本一致, 故化合物鉴定为 3,3'-methylene-bis(4-hydroxybenzaldehyde)。

化合物 **6**: 黄色粉末, $[\alpha]_D^{20}$ -20.00(c 0.10, MeOH), HRESIMS m/z 195.066 4 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{10}H_{12}O_4$ 。 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.02(dd, $J=8.5$, 2.1 Hz, 2H), 6.68(dd, $J=8.5$, 2.1 Hz, 2H), 4.30(dd, $J=7.6$, 5.1 Hz, 1H), 3.67(s, 3H), 2.93(dd, $J=14.0$, 5.1 Hz, 1H), 2.82(dd, $J=14.0$, 7.6 Hz, 1H)。 ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ : 175.6, 157.0, 131.2, 131.2, 128.9, 115.8, 115.8, 73.1, 52.1, 40.6。与文献数据^[19]基本一致, 故化合物鉴定为 crypticin B。

化合物 **7**: 黄色粉末, ESIMS m/z 153.10 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_8H_{10}O_3$ 。 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ : 6.76(d, $J=1.9$ Hz, 1H), 6.71(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.64(dd, $J=8.0$, 1.9 Hz, 1H), 4.29(s, 2H), 3.31(s, 3H)。 ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ : 146.4, 146.3, 130.8, 121.1, 117.0, 116.1, 75.8, 57.8。与文献数据^[20]基本一致, 故化合物鉴定为 vanillyl alcohol。

化合物 **8**: 黄色粉末, HRESIMS m/z 169.0496 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_8H_8O_4$ 。 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ : 6.72(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.69(d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.55(dd, $J=8.0$, 2.0 Hz, 1H), 3.46(s, 2H)。 ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ : 174.4, 146.1,

145.2, 126.7, 121.4, 117.1, 116.1, 41.0。与文献数据^[21]基本一致, 故化合物鉴定为 3,4-dihydroxyphenylacetic acid。

8 个化合物的化学结构见图 1。

4.2 抗炎活性

对 *Fusarium* sp. HSL-3 中分离得到的 8 个次级代谢产物 **1~8** 进行 LPS 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 抗炎活性测试, 使用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松作为阳性对照。从 *Fusarium* sp. HSL-3 中分离得到的 8 个次级代谢产物 **1~8** 浓度为 20, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 使用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松作为阳性对照, 同时设置 LPS 组(无药物干预仅含 LPS 的完全培养基)、正常组(无药物干预且不含 LPS 的正常培养基)。

在被测试的 8 个化合物中, 化合物 3,5-dimethoxydihydrofusarubin D(**3**)和 3,3'-methylene-bis(4-hydroxybenzaldehyde)(**5**)表现出良好的抗炎活性。化合物 **3** 和 **5** 对细胞活力无显著影响, 说明这 2 个化合物对 RAW264.7 细胞没有毒性。LPS 的刺激显著上调了 NO、IL-6 和 TNF- α 的浓度 ($P<0.000 1$)。与 LPS 组相比, 20, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 **3** 以及化合物 **5** 均显著降低了 NO 的释放量 ($P<0.01$ 或 $P<0.000 1$), $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 **3** 的 NO 抑制率为 87%, 效果优于 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阳性药地塞米松, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 **5** 的 NO 抑制率为 71%, 效果优于 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阳性药地塞米松; 同时, 20, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 **3** 和 **5** 均显著降低了 IL-6 的含量 ($P<0.000 1$); 20, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 **3** 以及 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 **5** 还可以显著降低 TNF- α 的释放量 ($P<0.01$ 或 $P<0.000 1$)。这些结果表明, 化合物 **3** 和 **5** 通过降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO、IL-6 和 TNF- α 的释放量发挥抗炎活性。结果见图 2。

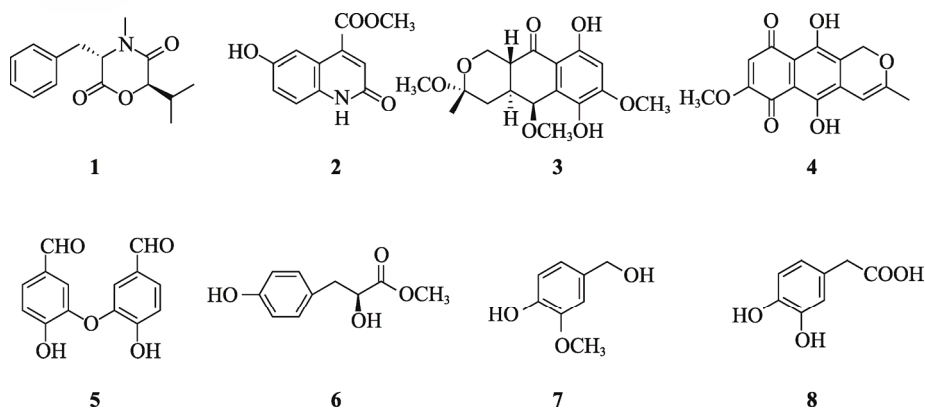


图 1 *Fusarium* sp. HSL-3 中化合物 **1~8** 的化学结构

Fig. 1 Structures of compounds **1~8** in *Fusarium* sp. HSL-3

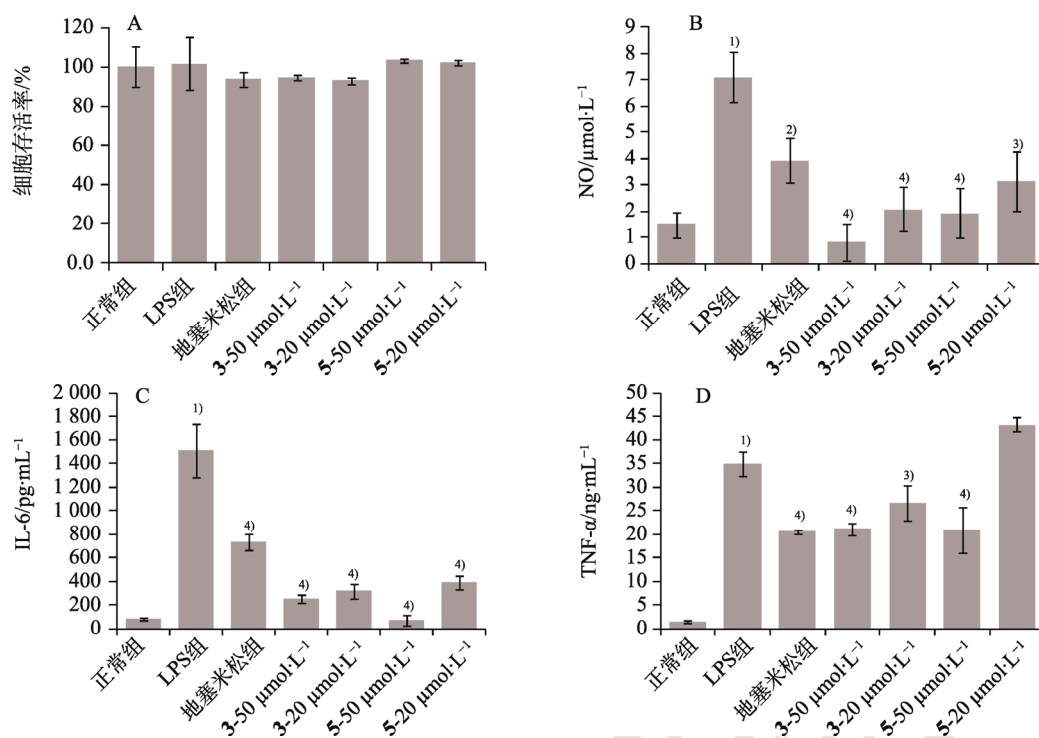


图2 化合物3和化合物5对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞的抗炎活性

A—化合物3和5对RAW264.7的细胞毒性作用；B—化合物3和5对NO产生的影响；C—化合物3和5对IL-6产生的影响；D—化合物3和5对TNF-α产生的影响；与正常组相比，¹⁾ $P < 0.0001$ ；与LPS组相比，²⁾ $P < 0.05$ ，³⁾ $P < 0.01$ ，⁴⁾ $P < 0.0001$ 。

Fig. 2 Anti-inflammatory effects of compounds 3 and 5 on LPS-induced RAW264.7 macrophages

A—cytotoxic effects of compounds 3 and 5 on RAW264.7; B—effects of compounds 3 and 5 on production of NO; C—effects of compounds 3 and 5 on production of IL-6; D—effects of compounds 3 and 5 on production of TNF-α; compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.0001$; compared with LPS group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.0001$.

4.3 抗肿瘤活性

对 *Fusarium* sp. HSL-3 中分离得到的次级代谢产物1和4进行非小细胞肺癌细胞A549的细胞毒活性测试，使用多柔比星作为阳性对照。实验结果表明，化合物lateritin(1)对A549细胞有显著的细胞毒活性，抑制率达到93.72%， IC_{50} 值为 $(7.92 \pm 0.27) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，阳性对照多柔比星的 IC_{50} 值为 $(2.57 \pm 0.69) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，而化合物4未显示细胞毒活性。由于化合物存量的限制，其他化合物未进行抗肿瘤活性测试。

5 讨论

近年来，中国学者在红树林共附生和内生真菌二次代谢产物领域取得了令人瞩目的成果^[2]，但是主要集中在曲霉属和青霉属代谢产物方面^[22]，关于红树林镰刀菌次生代谢产物及其活性研究方面的报道较少。镰刀菌主要产生3类最重要的霉菌毒素：单端孢霉烯族毒素、伏马菌素和玉米赤霉烯酮。其中，单端孢霉烯族毒素是三大类镰孢霉菌毒素中化学成分最多的一类，包括非常致命的二乙酰氧基蔗糖镰刀菌烯醇、T-2毒素、雪腐镰

刀菌烯醇和脱氧雪腐镰刀菌烯醇^[23]。然而也有大量证据表明，镰刀菌产生的化合物化学结构多样，包括聚酮、生物碱、萜、多肽、类固醇等，有合成显著生物活性次级代谢产物的潜力，如抗菌活性^[24]、细胞毒性^[25]等。本实验对从海南红树林中分离得到的镰刀菌属真菌 *Fusarium* sp. HSL-3 在大米固体培养基中次级代谢产物的化学成分及其生物活性进行了深入的研究。通过正相硅胶柱层析色谱、反向硅胶柱层析色谱、HPLC等手段从该菌的乙酸乙酯段提取物中分离纯化得到了8个化合物，其中化合物2和5为首次从镰刀菌属 *Fusarium* 中分离得到，证明了红树林镰刀菌属真菌二次代谢产物的丰富性。化合物3,5-dimethoxydihydrofusarubin D(3)和3,3'-methylenebis(4-hydroxy-benzaldehyde)(5)对LPS诱导的巨噬细胞RAW264.7表现出良好的抗炎活性，显著降低了LPS诱导的促炎介质(包括NO、IL-6和TNF-α)的含量；而化合物lateritin(1)对非小细胞肺癌细胞A549有显著的细胞毒活性，抑制率达到93.72%， IC_{50} 值为 $(7.92 \pm 0.27) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本实验结果为海南

红树林内生真菌镰刀菌属分离的化合物药物开发利用提供了基础, 为深入研究开发海南红树林资源提供了新思路。

REFERENCES

- [1] ZHANG X, LI Z, GAO J. Chemistry and biology of secondary metabolites from *Aspergillus* genus[J]. Nat Prod J, 2018, 8(4): 275-304.
- [2] HUA W, ZHANG X L, BAI M, et al. Bioactive natural products from endophytic microbes[J]. Nat Prod J, 2018, 8(2): 86-108.
- [3] SUMMERELL B, LAURENCE M, LIEW E C, et al. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review[J]. Fungal Divers, 2010, 44(1): 3-13.
- [4] JENNINGS P. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology[J]. Plant Pathol, 2010, 56(2): 337.
- [5] JAYASINGHE L, ABBAS H, JACOB M, et al. N-methyl-4-hydroxy-2-pyridinone analogues from *Fusarium oxysporum*[J]. J Nat Prod, 2006, 69(3): 439-442.
- [6] WANG Q X, LI S F, ZHAO F, et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*[J]. Fitoterapia, 2011(82): 777-781.
- [7] KOUR A, SHAWL A, REHMAN S, et al. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007, 24(7): 1115-1121.
- [8] KUMAR A, PATIL D, RAJAMOCHANAN P, et al. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e71805.
- [9] ELAVARASI A, RATHNA G, KALAISELVAM M. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2012(2): 1081-1085.
- [10] LIU D, CAO G, HAN L, et al. Flavonoids from *Radix Tetrastigmae* inhibit TLR4/MD-2 mediated JNK and NF- κ B pathway with anti-inflammatory properties[J]. Cytokine, 2016(84): 29-36.
- [11] CAO Y, CHEN G, REN J, et al. Punicalagin prevents inflammation in LPS-induced RAW264. 7 macrophages by inhibiting foxO3a/autophagy signaling pathway[J]. Nutrients, 2019, 11(11): 2794.
- [12] LYU P, LI X T. Molecular mechanism of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Lonicerae Japonicae* Flos based on *in vitro* experiments and network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(14): 1678-1685.
- [13] CAI Y S, WU J, ZHANG H, et al. A new fusicoccane-type norditerpene and a new indone from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatinus* WHUF0198[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(10): e2100562.
- [14] OH H, KIM T, OH G, et al. (3R, 6R)-4-methyl-6-(1-methylethyl)-3-phenylmethyl-perhydro-1, 4-oxazine-2, 5-dione: an apoptosis-inducer from the fruiting bodies of *Isaria japonica*[J]. Planta Med, 2002, 68(4): 345-348.
- [15] CHUNG H, WOO W. A quinolone alkaloid with antioxidant activity from the aleurone layer of anthocyanin-pigmented rice[J]. J Nat Prod, 2002, 64(12): 1579-1580.
- [16] KORNSAKULKARNA J, DOLSOPHONB K, BOONYUEN N, et al. Dihydronaphthalenones from endophytic fungus *Fusarium* sp. BCC 14842[J]. Tetrahedron, 2011, 67(39): 7540-7547.
- [17] KUROBANE I, ZAITA N, FUKUDA A. New metabolites of *Fusarium martii* related to dihydrofusarubin[J]. J Antibiot, 1986, 39(2): 205-214.
- [18] NIE H, GUAN X L, LI J, et al. Antimicrobial lignans derived from the roots of *Streblus asper*[J]. Phytochem Lett, 2016(18): 226-231.
- [19] CIMMINO A, NOCERA P, LINALDEDDU B, et al. The phytotoxic metabolites produced by *Diaportheella cryptica*, the causal agent of hazelnut branch canker[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(13): 3435-3442.
- [20] HEMMINGSON J A, LEARY G. The self-condensation reactions of the lignin model compounds, vanillyl and veratryl alcohol[J]. Aust J Chem, 1980, 33(4): 917-925.
- [21] SHI Q, HAN G, LIU Y, et al. Nutrient composition and quality traits of dried jujube fruits in Seven producing areas based on metabolomics analysis[J]. Food Chem, 2022(385): 132627.
- [22] 肖泽恩, 林少娥, 余志刚, 等. 海南红树林内生真菌 *Aspergillus* sp. HNY16-5C 的含氮类次级代谢产物[J]. 中山大学学报(自然科学版): 2022,61(04):65-69.
- [23] DESJARDINS A. *Fusarium* mycotoxins: Chemistry, genetics, and biology[J]. Trichothecenes, 2006, 56(2): 337.
- [24] JAYASINGHE L, ABBAS H, JACOB M, et al. N-methyl-4-hydroxy-2-pyridinone analogues from *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Natural Products, 2006(69): 439-442.
- [25] KOUR A, SHAWL A, REHMAN S, et al. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007(24): 1115-1121.

收稿日期: 2022-06-29
(本文责编: 陈怡心)