

# Studies on the Taxonomic Identification and Secondary Metabolites from Endophytic Fungus HCCB06030\*

Chongyu Liu<sup>1</sup>, Zhijun Yang<sup>2</sup>, Yu Yin<sup>2</sup>, Mei Ge<sup>2</sup>, Xiuping Qian<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai

<sup>2</sup>Shanghai Health Creation Center for Biopharmaceuticals R&D, Shanghai

Email: liuchongyu11@126.com, #qianxp@sjtu.edu.cn

Received: Aug. 6<sup>th</sup>, 2012; revised: Aug. 21<sup>st</sup>, 2012; accepted: Sep. 6<sup>th</sup>, 2012

**Abstract:** The secondary metabolites from endophyte are one of the most important sources for bioactive compounds. In this paper the endophyte strain of HCCB06030, which had the inhibitory activity against tumor cells identified as *Alternaria sp.* by observing the characteristics of colony and spore and comparing with the sequence of internal transcribed spacer (ITS). The metabolites from the strain of HCCB06030 were isolated by using ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography and HPLC preparation, and the chemical structures of the compounds were identified with those of alternariol, dl-aloesol, Solaniol, Isoaltenuene, Altenuene and 5-methoxyl-alternariol by the analyses of their UV, MS and NMR spectra data. The compound of dl-aloesol was first reported in the genus of *Alternaria*.

**Keywords:** Endophytic Fungus; *Alternaria sp.*; Secondary Metabolites

## 植物内生真菌 HCCB06030 的菌种鉴定和次级代谢产物研究\*

刘崇玉<sup>1</sup>, 杨志钧<sup>2</sup>, 殷瑜<sup>2</sup>, 戈梅<sup>2</sup>, 钱秀萍<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学药学院, 上海

<sup>2</sup>上海来益生物药物研究开发中心, 上海

Email: liuchongyu11@126.com, #qianxp@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2012年8月6日; 修回日期: 2012年8月21日; 录用日期: 2012年9月6日

**摘要:** 植物内生真菌的次级代谢产物是生物活性化合物的重要来源之一。本论文对具有肿瘤细胞抑制活性的植物内生真菌菌株 HCCB06030 进行了菌落和孢子形态特征鉴定, 以及 ITS 序列的相似性分析, 确定该菌株为链格孢属真菌。采用乙酸乙酯萃取、硅胶柱层析和高压液相制备等方法对该菌株的代谢产物进行分离纯化, 利用紫外、质谱和核磁共振等波谱数据对化合物进行结构解析, 确定获得的 6 个化合物为格链孢酚、dl-aloesol、Solaniol、Isoaltenuene、Altenuene 和 5-甲氧基格链孢酚。化合物 dl-aloesol 在链格孢属真菌中首次报道。

**关键词:** 植物内生菌; 链格孢属; 次级代谢产物

### 1. 引言

自 1993 年加拿大科学家 Strobel 等首次从红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 中分离到 1 株产抗肿瘤化合物紫杉醇的内生真菌安德氏紫杉霉 (*Taxanyces andreanae*) 以来,

植物内生真菌丰富多样的次级代谢产物是人们寻找新型抗菌、抗肿瘤天然药物的重要资源<sup>[1,2]</sup>。植物内生菌具有生物多样性的特点, 不仅能够参与植物次生代谢产物的合成以及对植物次生代谢产物进行转化, 还能独立产生丰富的次生代谢产物, 是具有高度开发价值的新型生物资源。植物内生菌及其活性代谢产物成为微生物学研究的一大热点<sup>[3,4]</sup>。植物内生真菌

\*资助信息: “十一五”国家新药创制企业孵化基地项目(2010ZX-09401-403)。

#通讯作者。

HCCB06030 的提取物经 MTT 法检测, 具有较高的胰腺瘤细胞活性。本文报道了该菌株的菌种鉴定以及次级代谢产物发酵、分离纯化和结构鉴定。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 菌株和细胞株

植物内生真菌菌株 HCCB06030, 以及肿瘤细胞株 A549(肺癌细胞)、MDA-MB-231(乳腺癌细胞)、PANC1(胰腺癌细胞)由上海来益生物药物研究开发中心保藏。

### 2.2. 主要仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司), Bruker Avance II-400 型超导核磁共振仪, TMS 为内标; Q-ToFmicro 磁式质谱仪(Waters 公司)。

### 2.3. 菌株鉴定

#### 2.3.1. 形态特征

将菌株 HCCB06030 孢子接种于在 PDA 平板中央, 将灭菌盖玻片以 45° 角度插入培养基, 28°C 静置培养。分别在培养 3 d、5 d、7 d 后观察和镜检基内菌丝、气生菌丝、孢子和孢子丝的形态变化。

#### 2.3.2. ITS 序列的扩增和分析

植物内生真菌总 DNA 提取按照参考文献所述方法<sup>[5]</sup>。ITS 的扩增所用的引物为 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', 正向)和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 反向)。PCR 扩增体系为: 5  $\mu$ l 10  $\times$  PCR buffer, 2  $\mu$ l 2.5 mmol/L dNTP, 2  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L ITS1, 2  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L ITS4, 2  $\mu$ l 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l DNA 模板, 1  $\mu$ l 10 U/L 热稳定 Taq 聚合酶, 35.75  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 0.5 min, 72°C 延伸 1.5 min, 72°C 延伸 10 min, 从变性至第一次延伸重复 30 次。扩增产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳后, 于紫外检测仪上观察。PCR 产物由上海美季生物技术有限公司测序。将测序获得的 ITS 序列通过 Blast 程序在 GenBank 中核酸数据进行 BLAST 比对分析, 其序列连同近似序列导入 MEGA Version 4.1 中进行比对, 利用邻位互换算法(CNI)搜索最小进化树(ME Tree), 并进行 500 次重复的自展检验(Boot Strap), 将

ME 树上与之最接近的种类确定为可能的种属, 并参照文献[6]进行分类归属。

### 2.4. 发酵产物制备

将内生真菌菌株 HCCB06030 接种于种子培养基(2.0 g 葡萄糖、1.0 g 玉米粉、2.0 g 黄豆粉、0.1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 ml H<sub>2</sub>O、pH 自然)中, 28°C 180 rpm 振荡培养 3~4 d 后, 以 15%~25% 的接种量接种于大米固体发酵培养基(80 g 大米、100 ml H<sub>2</sub>O、pH 自然)中, 28°C 静置培养 30 d 后, 用乙酸乙酯浸泡培养物 3 次, 减压蒸干溶剂。

### 2.5. 抗肿瘤活性检测

肿瘤细胞 A549 采用 F12K 培养基, MDA-MB-231 采用 RPMI 1640 培养基, PANC-1 采用 DMEM 培养基进行培养。采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)检测样品的抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>。

### 2.6. 次级代谢产物的分离纯化

用乙酸乙酯浸泡 HCCB06030 大米固体发酵产物, 获得红棕色油状粗提物 66.75 g。经 300 目硅胶拌样(V/V = 1:1), 用石油醚 - 乙酸乙酯体系进行减压硅胶柱层析(8 cm  $\times$  40 cm)。洗脱液石油醚: 乙酸乙酯(11:9)的组份 817.3 mg 用 HPLC 制备柱进行分离(30% 乙腈和 70% 水等度洗脱), 获得化合物 1(5.5 mg; tR 48 min)。合并石油醚和乙酸乙酯不同梯度(3:7、1:4、1:9)的洗脱液, 得 5364.9 mg 固体物, 经 HPLC 半制备分离(0~15 min 用 55% 甲醇等度洗脱, 15~45 min 甲醇从 55% 线性增加至 100% 梯度洗脱)后得到化合物 2(8 mg; tR 21 min)。对半制备分离的其余组份继续进行 HPLC 分离, 洗脱液为 25% 甲醇和 75% 酸水(0.05% 甲酸)等度洗脱得到化合物 3(4.5 mg; tR 38 min)、化合物 4(3 mg; tR 37 min)。洗脱液为 35% 甲醇和 65% 酸水(0.05% 甲酸)等度洗脱得到化合物 5(4.5 mg; tR 43 min), 洗脱液为 50% 乙腈和 50% 酸水(0.05% 甲酸)等度洗脱得到化合物 6(3.5 mg; tR 38 min)。

## 3. 结果与讨论

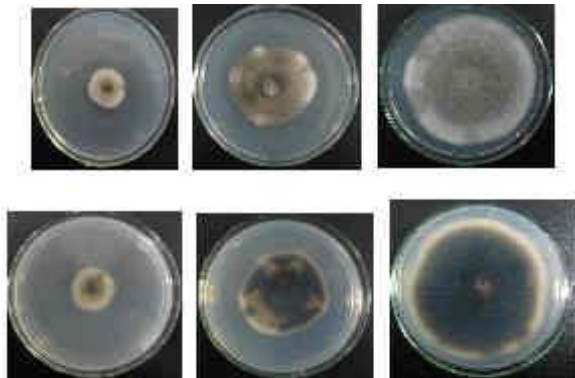
### 3.1. 菌株 HCCB06030 的分类鉴定

HCCB06030 在 PDA 培养基上生长速度很快, 每

天菌落直径增长 1 cm 左右, 菌落表面平展, 边缘整齐, 气生菌丝较长, 稠密, 菌丝体发达。培养 3 d 的气生菌丝为白色, 呈绒状。基内菌丝产少量黑色脂溶性色素; 5 d 左右气生菌丝表面逐渐呈灰白色, 脂溶性色素颜色加深; 7 d 后培养基色素呈黑色, 表面深灰白色至银灰色, 如图 1 所示。用插片法观察 HCCB06030 在 PDA 培养基上气生菌丝和孢子丝的特征。气生菌丝分支较多, 分生孢子梗短或分化不明显。分生孢子直接生长在菌丝上或分生孢子梗上, 孢子有隔膜, 倒棒状形, 如图 2 所示。

菌株 HCCB06030 的 ITS 序列为:

AAGAATAAGAAAAAGGGTTCCAATTAGGTGTGG  
CTCCTTTGCCTTGATGAGTTCTGGTTGACCCTGG  
AAGTTAATTGTTTCCTTGGTGGGTTGCCCCACCA  
CTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATC  
AGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTCA  
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA  
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC



上: 菌落表面特征, 下: 菌落背面特征, 左: 培养 3 d, 中: 培养 5 d, 右: 培养 7 d。

Figure 1. Cultural characteristics of strain HCCB06030  
图 1. 菌株 HCCB06030 的培养特征



Figure 2. Hypha and spores of strain HCCB06030  
图 2. 菌株 HCCB06030 的菌丝和孢子

AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC  
ATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTG  
TTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTG  
GTGTTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGA  
CTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGG  
TTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCA  
GCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTTCA  
ACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCT  
GAACTTAAGCATATCAAA。

链格孢属是以 *Alternaria tenuis* Nees 为模式种建立的。全世界已发表的链格孢种级分类单位 500 个左右, 并不断有新种发表, 有学者认为认真订正后可予承认的种约 300 种<sup>[8]</sup>。HCCB06030 的 ITS 序列经 NCBI 上进行 Blast 对比分析, 结果显示与菌株 HCCB06030 相似性最高的序列主要分布在链格孢属 (*Alternaria sp.*)。通过 Mega 软件构建系统发育树如图 3 所示。根据 HCCB06030 的菌落培养特征和 ITS 的进化比较, 确定该菌株为链格孢属 (*Alternaria sp.*), 并与 *Alternaria sp. longipes* 在亲缘关系上最为接近。

### 3.2. HCCB06030 的次级代谢产物

链格孢属真菌中已发现了各种不同结构类型的化合物, 如: Solanapyrone A、B 和 C<sup>[9]</sup>, Altertoxin<sup>[10]</sup>, Alternariol、Zinnimide、Deprenylzinnimide 和 Bianthraquinone、Alterporriol F<sup>[11]</sup>, AK-toxin I 和 II<sup>[12]</sup>。

从链格孢属植物内生真菌 HCCB06030 中分离出得 6 个化合物, 经紫外、MS 和 1H-NMR 波谱解析分别为格链孢酚、dl-aloesol、Solaniol、Isoaltenuene、Altenuene 和 5-甲氧基格链孢酚, 其中 dl-aloesol 在链格孢属真菌中首次报道(见图 4)。

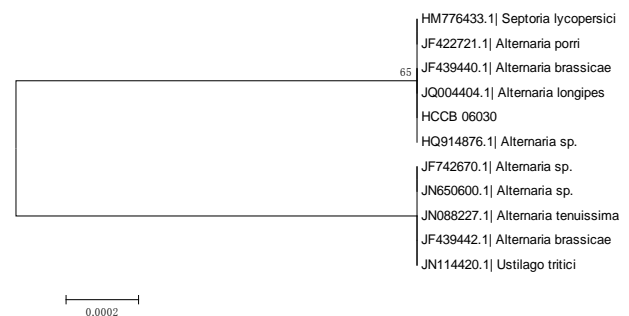


Figure 3. Phylogenetic tree of strain HCCB06030 based on the ITS sequences  
图 3. 根据 ITS 序列构建的 HCCB06030 系统发育树

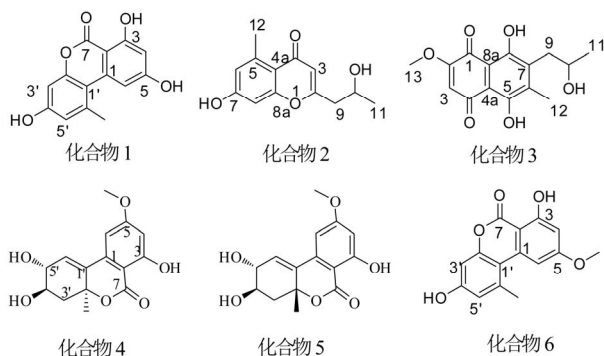


Figure 4. Chemical structures of compound 1 - 6

图 4. 化合物 1-6 的化学结构

化合物 1 为白色粉末, UV (MeOH)  $\lambda_{\max} = 230$  nm、290 nm, 分子式  $C_{14}H_{10}O_5$ 。TOF MS  $m/z$  259.0563  $[M+H]^+$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz, Acetone- $d_6$ ),  $\delta$ : 7.36 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz, H-6), 6.80 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-5'), 6.70 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-3'), 6.46 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-4), 2.78 (3H, s, 6'-CH<sub>3</sub>), 以上数据与文献报道一致以上数据与文献[13]基本一致, 确定为格链孢酚。

化合物 2 为黄色粉末, UV (MeOH)  $\lambda_{\max} = 230$  nm、250 nm、295 nm, 分子式  $C_{13}H_{14}O_4$ 。TOF MS  $m/z$  236.1163  $[M+H]^+$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 6.63 (1H, s, H-6), 6.61 (1H, s, H-8), 5.97 (1H, s, H-3), 4.03 (1H, m, H-10), 2.66 (3H, s, H-12), 2.58 (2H, t, H-9), 1.15 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-11)。以上数据与文献[14]基本一致, 确定为 dl-aloesol。

化合物 3 为白色粉末, 易溶于丙酮。UV (MeOH)  $\lambda_{\max} = 226$  nm、271 nm, 分子式为  $C_{15}H_{16}O_6$ 。TOF MS  $m/z$  293.1013  $[M+H]^+$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz, Acetone- $d_6$ ),  $\delta$ : 12.90 (1H, brs, OH-5), 12.50 (1H, brs, OH-8), 6.18 (1H, s, H-3), 4.18 (1H, m, H-10), 3.94 (3H, s, H-13), 2.96 (2H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-9), 2.37 (3H, s, H-12), 1.35 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-11)。以上数据与文献[15]基本一致, 确定为 Solaniol。

化合物 4 为白色固体, 易溶于氯仿。UV (MeOH)  $\lambda_{\max} = 245$  nm、280 nm、325 nm, 分子式  $C_{15}H_{16}O_6$ 。TOF MS  $m/z$  273.0721  $[M+H]^+$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 11.44 (1H, s, OH-3), 6.71 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-6), 6.45 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-4), 6.30 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, H-6'), 4.10-4.12 (1H, m, H-5'), 3.92 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-5), 3.83-3.86 (1H, s, H-4'), 2.37 (1H, dd,  $J = 14.3$ , 3.7 Hz, H-3'a), 1.98 (1H, dd,  $J = 14.3$ , 6.7 Hz, H-3'b),

1.52 (3H, s, CH<sub>3</sub>-2')。以上数据与文献[16]基本一致, 确定为 Isoaltenuene。

化合物 5 为白色粉末, 易溶于甲醇。UV (MeOH)  $\lambda_{\max} = 240$  nm、280 nm、320 nm, 分子式  $C_{14}H_{10}O_6$ 。TOF MS  $m/z$  275.0893  $[M+H]^+$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 11.35 (1H, s, OH-3), 6.56 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-6), 6.45 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-4), 6.10 (1H, d,  $J = 3.1$  Hz, H-6'), 4.47-4.49 (1H, m, H-3'), 4.28-4.30 (1H, s, H-4'), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-5), 2.48 (1H, dd,  $J = 14.3$ , 5.5 Hz, H-5'a), 2.25 (1H, dd,  $J = 14.3$ , 2.5 Hz, H-5'b), 1.67 (3H, s, CH<sub>3</sub>-2')。以上数据与文献[16]基本一致, 确定为 Altenuene。

化合物 6 为黄色粉末, UV (MeOH)  $\lambda_{\max} = 255$  nm、290 nm、340 nm, 分子式  $C_{15}H_{12}O_5$ 。TOF MS  $m/z$  273.0721  $[M+H]^+$ 。 $^1H$ -NMR (400 MHz, Acetone- $d_6$ ),  $\delta$ : 11.92 (1H, s, 3-OH), 7.29 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz, H-6), 6.80 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-5'), 6.70 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-3'), 6.56 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz, H-4), 3.96 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 2.03 (3H, s, 6'-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[17]基本一致, 确定为 5-甲氧基格链孢酚。

HCCB06030 的发酵培养物采用 MTT 法进行抗肿瘤细胞 MDA、PANC1 和 A549 的活性检测, 其抑制率分别为 13.15%、41.93%和 55.24%。分离纯化的 HCCB06030 次级代谢产物格链孢酚、dl-aloesol、Solaniol、Isoaltenuene、Altenuene 和 5-甲氧基格链孢酚, 在 MTT 的抑瘤检测中  $IC_{50} > 200$   $\mu g/mL$ 。据文献报道化合物 Alternariol 通过干扰细胞周期对细胞增殖有抑制作用<sup>[18]</sup>, 本实验将进一步应用其他抗肿瘤筛选模型进行生物学活性分析。

## 参考文献 (References)

- [1] G. A. Strobel. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 2003, 5(6): 535-544.
- [2] T. R. W. Zou. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 448-459.
- [3] H. W. Zhang, Y. C. Song and R. X. Tan. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 2006, 23(5): 753-771.
- [4] 陈宜涛, 王伟剑. 植物内生菌的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(16): 3169-3172.
- [5] 包丽霞, 殷瑜, 杨天等. 北细辛内生真菌的分离鉴定及代谢产物的生物活性[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(5): 1-6.
- [6] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 276-430.
- [7] F. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay.

- Journal of Immunological Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [8] 王洪凯, 张天宇, 张猛. 链格孢属真菌分类研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(3): 406-410.
- [9] A. Ichihara, H. Tazaki and S. Sakamura. Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*. Tetrahedron Letters, 1983, 24(48): 5373-5376.
- [10] H. Oikawa, T. Yokota, T. Abe, et al. Biosynthesis of Solanapyrone A, a phytotoxin of *Alternaria solani*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1989, (17): 1282-1284.
- [11] R. Pero, H. Posner, M. Blois, et al. Toxicity of metabolites produced by the *Alternaria*. Environmental Health Perspectives, 1973, 4: 87-94.
- [12] P. Phuwapraisirisan, J. Rangsang, P. Siripong, et al. New anti-tumour fungal metabolites from *Alternaria porri*. Natural Product Research, 2009, 23(12): 1063-1071.
- [13] N. Tan, Y. W. Tao, J. H. Pan, et al. Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus No. 2240. Chemistry of Natural Compounds, 2008, 44(3): 296-300.
- [14] T. Nakashima, T. Ueno, H. Fukami, et al. Isolation and structures of AK-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49(3): 807-815.
- [15] K. Ishii, K. Sakai, Y. Ueno, et al. Solaniol, a toxic metabolite of *Fusarium solani*. Applied Microbiology, 1971, 22(4): 718-720.
- [16] M. Altemöller, J. Podlech and D. Fenske. Total synthesis of altenuene and isoaltenuene. European Journal of Organic Chemistry, 2006, 7: 1678-1684.
- [17] G. F. Griffin, C. Bennett and F. S. Chu. Simple preparative liquid chromatography system and its application to the separation of *Alternaria* metabolites. Journal of Chromatography, 1983, 280(2): 363-369.
- [18] L. Lehmann, J. Wagner and M. Metzler. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(3): 398-408.