

南海海洋真菌帚状弯孢聚壳次级代谢产物及其抗肿瘤活性研究

孙利^{1,2}, 李冬利², 陈玉婵², 陶美华², 但飞君¹, 章卫民^{2*}

1. 三峡大学化学与生命科学学院 湖北省天然产物研究与利用重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070

摘要: **目的** 研究南海海洋真菌帚状弯孢聚壳 *Eutypella scoparia* 的次级代谢产物及其抗肿瘤活性。**方法** 采用硅胶柱、反相硅胶柱、凝胶柱和薄层制备等色谱技术和重结晶进行分离纯化, 通过波谱分析进行结构鉴定; 以神经胶质瘤细胞 SF-268、乳腺癌细胞 MCF-7、大细胞肺癌细胞 NCI-H460 为供试细胞株, 采用 MTT 法对化合物进行体外抗肿瘤活性研究。**结果** 从发酵物中分离并鉴定了 10 个化合物, 其中 6 个为海松烷型二萜, 分别为 isopimara-8(14),15-diene (1)、libertellenone A (2)、scopararane B (3)、diaporthein A (4)、diaporthein B (5)、11-deoxydiaporthein A (6); 4 个为麦角甾醇类化合物, 分别为麦角甾酮 (7)、麦角甾醇 (8)、过氧化麦角甾醇 (9)、啤酒甾醇 (10), 其中化合物 5 对 3 种肿瘤细胞株的 IC₅₀ 分别为 9.2、4.4、9.9 μmol/L。**结论** 化合物 1、2 和 6~10 均为首次从该属真菌中分离得到, 化合物 5 具有显著的细胞毒活性。

关键词: 海洋真菌; 帚状弯孢聚壳; 次级代谢产物; 海松烷型二萜; 甾醇; 抗肿瘤活性; diaporthein B

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0432-05

Secondary metabolites of marine fungus *Eutypella scoparia* from the South China Sea and their antitumor activities

SUN Li^{1,2}, LI Dong-li², CHEN Yu-chan², TAO Mei-hua², DAN Fei-jun¹, ZHANG Wei-min²

1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Chemistry and Life Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Guangdong Provincial Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

Abstract: Objective To study the secondary metabolites of the marine fungus *Eutypella scoparia* from the South China Sea and their antitumor activities. **Methods** The compounds were isolated by various chromatographic methods (silica gel, reverse silica gel, Sephadex-LH20, preparative TLC, and so on) and recrystallization. Their structures were identified by extensive analysis of their spectroscopic data. The inhibitory effects of these compounds on SF-268, MCF-7, and NCI-H460 cell lines were observed *in vitro* by MTT method. **Results** Ten compounds (six pimarane diterpenes and four steroids) were isolated from the culture and identified as isopimara-8(14),15-diene (1), libertellenone A (2), scopararane B (3), diaporthein A (4), diaporthein B (5), 11-deoxydiaporthein A (6), (22E,24R)-ergosta-4,6,8(14)-22-tetraen-3-one (7), ergosterol (8), ergosterol peroxide (9), and cerevisterol (10). Compound 5 has the notable cytotoxic activities on SF-268, MCF-7, and NCI-H460 cell growth with IC₅₀ values of 9.2, 4.4, and 9.9 μmol/L, respectively. **Conclusion** Compounds 1, 2, and 6—10 are isolated from the fungi of *Eutypella* (Nits.) Sacc. for the first time and compound 5 demonstrates the significant inhibition on above three cell lines.

Key words: marine fungus; *Eutypella scoparia* (Schw.) Ell. et Ev.; secondary metabolites; pimarane diterpenes; steroids; antitumor activity; diaporthein B

海洋特殊的生态环境造就了海洋微生物特殊的生长和代谢机制, 进而产生结构新颖、活性独特的代谢产物, 是新的海洋生物活性物质的重要来源。近年来, 从海洋微生物资源中发掘药物先导化合物

已成为新药研究的一个重要发展趋势。来自海底沉积物的海洋真菌, 作为海洋微生物的重要成员之一, 同样有着巨大的发掘潜力^[1-2]。

海洋真菌帚状弯孢聚壳 *Eutypella scoparia*

收稿日期: 2010-08-17

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-G-073, KSCX2-EW-G-12B); 广东省科技计划项目 (2010B030600010); 广东省科学院优秀青年科技人才基金

*通讯作者 章卫民 Tel: (020)37656321 E-mail: wmzhang58@yahoo.com.cn

(Schw.) Ell. et Ev. 是一种适应力极强的真菌, 从南极土壤、澳大利亚和泰国的热带树林和热带海洋中都被发现^[3]。文献报道该属真菌的次级代谢产物有海松烷型二萜、桉烷型倍半萜、细胞松弛素类、 γ -内酯类、苯并吡喃类和环二肽类化合物^[4-6]。为了寻找新的海洋生物活性物质, 本课题组对分离自南海沉积物海洋真菌帚状弯孢聚壳的代谢产物及其抗肿瘤活性进行了研究。从其发酵液和菌丝体中共分离得到 10 个化合物, 包括 6 个海松烷型二萜, 分别为

isopimar-8(14),15-diene (1)、libertellenone A (2)、scopararane B (3)、diaporthein A (4)、diaporthein B (5) 和 11-deoxydiaporthein A (6), 其余 4 个为麦角甾醇类化合物, 分别为麦角甾酮(7)、麦角甾醇(8)、过氧化麦角甾醇(9)和啤酒甾醇(10)。其中化合物 1、2 和 6~10 均为首次从该属真菌中分离得到。对分离到的 6 个海松烷型化合物进行体外抗肿瘤活性研究, 结果显示化合物 5 具有显著的细胞毒活性。化合物 1~10 的化学结构见图 1。

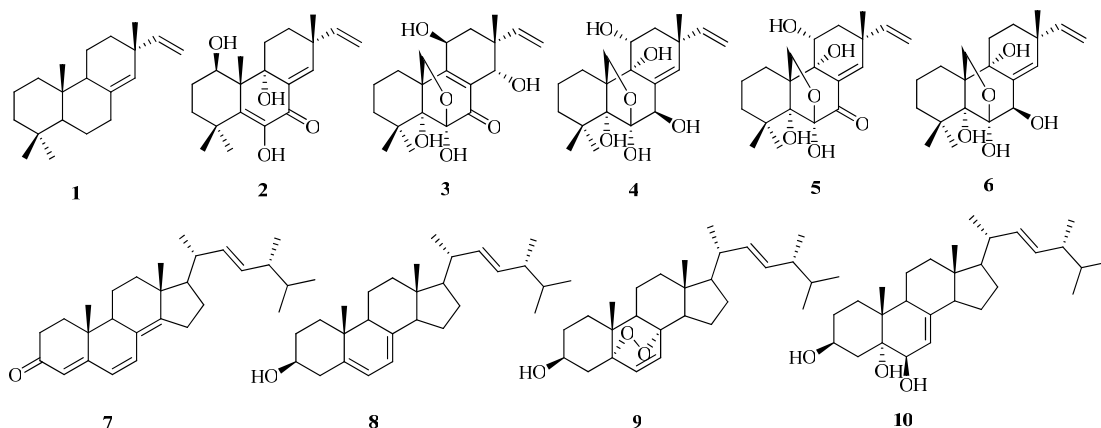


图 1 化合物 1~10 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1—10

1 仪器与材料

核磁共振波谱仪 500 MHz, Bruker 公司; API 2000 LC/MS/MS 质谱仪, MDS SCIEX 公司; PZ1000B 旋转式大容量普通摇床, 武汉瑞华仪器设备有限公司; RE-2000 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 超净工作台, 上海恒益科技有限公司。柱色谱硅胶 (100~200 目、200~300 目)、GF₂₅₄ 高效薄层硅胶板, 青岛海洋化工厂; C₁₈ 反相硅胶 (40~75 μ m), Fuji Silysia Chemical Ltd.; 凝胶 Sephadex LH-20 (18~110 μ m), Amersham Biosciences; 其他试剂均为国产分析纯。神经胶质瘤细胞 SF-268、乳腺癌细胞 MCF-7 和大细胞肺癌细胞 NCI-H460 均由江苏省药用植物生物技术重点实验室蒋继宏教授提供; 海洋真菌帚状弯孢聚壳从采集自南海 (18°42.878'N, 111°2.797'E) 139 m 深处的沉积物中分离得到, 经章卫民研究员鉴定为 *Eutypella scoparia* (Schw.) Ell. et Ev., 基因登录号为 HM989831, 保存于广东省微生物研究所。

2 菌种的培养

发酵培养基为马铃薯葡萄糖 (PD) 半海水液体

培养基: 葡萄糖 2%, KH₂PO₄ 0.3%, MgSO₄ 0.15%, 维生素 B₁ 10 mg/L, 半海水煮 20% 马铃薯汁, pH 自然。500 mL 三角瓶内装培养基 250 mL, 共接种 100 L, 在 28 °C、120 r/min 条件下培养 7 d。

3 提取与分离

100 L 发酵产物经离心得发酵液和菌丝体, 发酵液经醋酸乙酯萃取 4 次, 40 °C 下减压浓缩得浸膏 24.8 g; 菌丝体置于 55 °C 烘箱烘干、粉碎, 用 98% 乙醇冷浸提取多次至提取液基本无色, 合并提取液减压浓缩至无醇味, 加 500 mL 水悬浮, 用醋酸乙酯萃取 4 次, 40 °C 下减压浓缩得浸膏 48.3 g。浸膏分别过硅胶柱, 以石油醚-醋酸乙酯-甲醇梯度洗脱, 用薄层色谱 (TLC) 检测 (显色剂为茴香醛-浓硫酸试剂), 合并相似组分, 再经反复硅胶柱色谱, 制备薄层色谱和重结晶等分离, 从发酵液中得到化合物 2、4 和 6, 从菌丝体中得到化合物 1、3、5、7~10。

4 结构鉴定

化合物 1: 白色固体。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 显示一个末端双键的信号 δ : 5.78 (1H, dd, J = 17.5, 10.6 Hz, H-15), 4.91 (1H, dd, J = 17.5, 1.5

Hz, H-16a), 4.88 (1H, dd, $J = 10.6, 1.5$ Hz, H-16b), 1 个三取代双键的信号 δ : 5.21 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-14), 和 4 个甲基单峰信号 δ : 1.04 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.79 (3H, s), 另外在高场区还有一些饱和氢的多重峰信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ 显示 20 个碳信号, 因此, 可以推断化合物 **1** 可能为海松烷型二萜。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 149.2 (C-15), 137.4 (C-8), 128.5 (C-14), 109.9 (C-16), 54.8 (C-5), 50.7 (C-9), 42.2 (C-3), 39.4 (C-1), 38.3 (C-10), 37.4 (C-13), 36.0 (C-7), 34.6 (C-12), 33.8 (C-18), 33.3 (C-4), 26.0 (C-17), 22.6 (C-6), 22.1 (C-19), 19.1 (C-2), 18.8 (C-11), 15.0 (C-20)。以上数据与文献报道的 isopimara-8(14),15-diene 一致^[6]。

化合物 **2**: 无色针晶。ESI-MS m/z : 333 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 355 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 687 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, ESI-MS m/z : 331 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据提示其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 7.11 (1H, s, 6-OH), 6.90 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-14), 5.91 (1H, dd, $J = 17.5, 10.7$ Hz, H-15), 5.07 (1H, dd, $J = 17.5$ Hz, 0.9 Hz, H-16a), 5.01 (1H, dd, $J = 10.7, 0.9$ Hz, H-16b), 4.38 (1H, dd, $J = 9.9, 5.0$ Hz, H-1), 4.06 (1H, s, 9-OH), 3.62 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, 1-OH), 2.19 (1H, ddd, $J = 14.0, 14.0, 3.2$ Hz, H-11a), 2.10 (1H, ddd, $J = 14.0, 14.0, 3.2$ Hz, H-11b), 1.91 (1H, ddd, $J = 14.0, 14.0, 3.2$ Hz, H-12a), 1.82~1.68 (2H, m, H-2), 1.55~1.48 (3H, m, H-3, H-12b), 1.39 (3H, s, H-18), 1.30 (3H, s, H-19), 1.20 (3H, s, H-20), 1.13 (3H, s, H-17)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 181.6 (C-7), 146.4 (C-14), 146.2 (C-15), 145.0 (C-6), 143.5 (C-5), 134.5 (C-8), 111.4 (C-16), 74.2 (C-9), 68.2 (C-1), 50.0 (C-10), 38.4 (C-13), 38.3 (C-3), 35.5 (C-4), 29.6 (C-12), 28.5 (C-2), 28.5 (C-18), 28.0 (C-11), 26.0 (C-19), 22.8 (C-17), 22.6 (C-20)。以上数据与文献报道的 libertellenone A 一致^[7]。

化合物 **3**: 无色针晶。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.06 (1H, dd, $J = 17.7, 11.0$ Hz, H-15), 5.30 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-16a), 5.21 (1H, d, $J = 17.7$ Hz, H-16b), 4.39 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-20a), 4.37 (1H, dd, $J = 6.7, 5.6$ Hz, H-11), 4.34 (1H, s, H-14), 3.24 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-20b), 2.18 (1H, dd, $J = 14.2, 5.6$ Hz, H-12a), 1.98 (1H, dd, $J = 14.2, 6.7$ Hz, H-12b), 1.85~1.55 (5H, m, H-1, H-2, H-3a), 1.51 (3H, s, H-19), 1.28 (1H, m, H-3b), 1.24 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-17)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 194.8 (C-7), 164.9 (C-9), 144.0 (C-15), 132.7 (C-8), 114.5 (C-16), 105.0 (C-6), 81.3 (C-5), 70.5 (C-20), 69.5 (C-11), 64.8 (C-14), 54.3 (C-10), 40.1 (C-12), 39.5 (C-13), 37.7 (C-3), 36.9 (C-4), 28.0 (C-18), 24.3 (C-17), 24.1 (C-19), 23.9 (C-1), 17.8 (C-2)。以上数据与文献报道的 scopararane B 一致^[4]。

化合物 **4**: 无色针晶。ESI-MS m/z : 389 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, ESI-MS m/z : 365 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 731 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据提示其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 6.43 (1H, s, OH), 5.98 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, H-14), 5.84 (1H, dd, $J = 17.5, 10.6$ Hz, H-15), 5.67 (1H, s, OH), 5.00 (1H, dd, $J = 17.5, 1.2$ Hz, H-16a), 4.94 (1H, dd, $J = 10.6, 1.2$ Hz, H-16b), 4.72 (1H, s, OH), 4.65 (1H, dd, $J = 9.7, 2.1$ Hz, H-7), 4.26 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, 7-OH), 3.97 (2H, m, H-11, OH), 3.87 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-20a), 3.29 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-20b), 1.92~1.44 (7H, m, H-1, H-2, H-3a, H-12), 1.38 (3H, s, H-19), 1.19 (3H, s, H-18), 1.13 (3H, s, H-17), 1.02 (1H, m, H-3b)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 147.6 (C-15), 136.8 (C-8), 131.3 (C-14), 110.2 (C-16), 106.4 (C-6), 80.5 (C-5), 77.7 (C-9), 72.4 (C-7), 67.4 (C-20), 66.2 (C-11), 49.7 (C-10), 40.0 (C-12), 38.1 (C-13), 37.9 (C-3), 37.9 (C-4), 28.0 (C-18), 24.5 (C-17), 24.5 (C-1), 24.0 (C-19), 18.2 (C-2)。以上数据与文献报道的 diaporthein A 一致^[8]。

化合物 **5**: 无色片状结晶。ESI-MS m/z : 387 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 751 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, ESI-MS m/z : 363 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据提示其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.81 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-14), 5.82 (1H, dd, $J = 17.5, 10.5$ Hz, H-15), 5.50 (1H, s, OH), 5.10 (1H, d, $J = 17.5$ Hz, H-16a), 5.07 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-16b), 4.98 (1H, s, OH), 4.13 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-20a), 4.03 (1H, dt, $J = 10.9, 3.0$ Hz, 11-H), 3.71 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-20b), 2.93 (1H, s, OH), 2.45 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, 11-OH), 2.08~1.95 (3H, m, H-1, H-12a), 1.52~1.75 (4H, m, H-2, H-3a, H-12b), 1.44 (3H, s, H-19), 1.25 (1H, m, H-3b), 1.22 (3H, s, H-17), 1.20 (3H, s, H-18)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 196.3 (C-7), 150.6 (C-14), 144.0 (C-15), 134.6 (C-8), 113.1 (C-16), 104.0 (C-6), 81.9 (C-5), 76.2 (C-9), 68.7 (C-20), 67.7

(C-11), 51.1 (C-10), 40.0 (C-13), 39.9 (C-12), 37.4 (C-3), 37.3 (C-4), 27.0 (C-18), 26.0 (C-17), 25.2 (C-1), 23.7 (C-19), 17.7 (C-2)。以上数据与文献报道的 diaporthein B 一致^[8]。

化合物 6: 无色针晶。ESI-MS m/z : 349 $[M-H]^-$, 结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据提示其分子式为 $C_{20}H_{30}O_5$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.89 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-14), 5.86 (1H, dd, $J = 17.6, 10.7$ Hz, H-15), 5.05 (1H, s, 9-OH), 5.05 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-16a), 4.99 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-16b), 4.56 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-7), 4.47 (1H, s, 6-OH), 4.43 (1H, s, 5-OH), 3.88 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-20a), 3.38 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-20b), 2.62 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 7-OH), 1.94~1.83 (2H, m, H-1a, 12a), 1.71~1.57 (5H, m, H-2, 11, 3a), 1.49 (1H, m, H-12b), 1.40 (1H, m, H-1b), 1.39 (3H, s, H-19), 1.21 (3H, s, H-18), 1.17 (1H, m, H-3b), 1.06 (3H, s, H-17)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 147.3 (C-15), 137.2 (C-8), 133.7 (C-14), 111.2 (C-16), 106.3 (C-6), 81.1 (C-5), 76.2 (C-9), 73.0 (C-7), 68.2 (C-20), 48.7 (C-10), 37.9 (C-3), 37.8 (C-4), 37.6 (C-13), 29.7 (C-12), 28.4 (C-11), 27.8 (C-18), 24.4 (C-19), 24.0 (C-17), 21.7 (C-1), 17.9 (C-2)。以上数据与文献报道的 11-deoxydiaporthein A 一致^[9]。

化合物 7: 黄色粉末。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.61 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-7), 6.03 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-6), 5.74 (1H, s, H-4), 5.26 (1H, dd, $J = 15.2, 7.3$ Hz, H-23), 5.20 (1H, dd, $J = 15.2, 8.0$ Hz, H-22), 1.06 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 1.00 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.85 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 2.57~1.23 (m)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 199.5 (C-3), 164.4 (C-5), 156.1 (C-14), 135.0 (C-22), 134.0 (C-7), 132.5 (C-23), 124.5 (C-8), 124.4 (C-6), 123.0 (C-4), 55.7 (C-17), 44.3 (C-9), 44.0 (C-13), 42.9 (C-24), 39.3 (C-20), 36.8 (C-10), 35.6 (C-12), 34.1 (C-2), 34.1 (C-1), 33.1 (C-25), 27.7 (C-16), 25.4 (C-15), 21.2 (C-21), 20.0 (C-26), 19.7 (C-27), 19.0 (C-18), 19.0 (C-11), 17.6 (C-28), 16.7 (C-19)。以上数据与文献报道的 (22*E*,24*R*)-ergosta-4,6,8(14)-22-tetraen-3-one (麦角甾酮) 一致^[10]。

化合物 8~10: 均为无色针晶。将这 3 个化合物分别与麦角甾醇、过氧化麦角甾醇、啤酒甾醇对

照品在同一块薄层板上展开, 采用 3 种不同的展开系, 样品 R_f 值均一致, 混合点不分离, 故分别确定为麦角甾醇、过氧化麦角甾醇、啤酒甾醇。

5 单体化合物体外抗肿瘤活性

取对数期生长的 3 种肿瘤细胞, 利用 MTT 法测定海松烷型化合物 1~6 在 590 nm 下的吸光度 (A) 值, 计算各化合物对 3 种肿瘤细胞株的抑制率 (表 1)。结果表明, 化合物 2 和 5 对 3 种肿瘤细胞均有较显著的抑制作用, 在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率均在 95% 以上; 其他化合物则无明显抑制作用。通过进一步测试化合物 2 和 5 对 3 种肿瘤细胞的 IC_{50} , 结果化合物 5 对 3 种肿瘤细胞表现出较强的抑制活性, 对 SF-268、MCF-7 和 NCI-H460 的 IC_{50} 较低, 分别为 9.2、4.4 和 9.9 $\mu\text{mol/L}$; 而化合物 2 对不同肿瘤细胞株具有一定的细胞毒选择性, 其对 MCF-7 抑制作用最强, IC_{50} 为 12.0 $\mu\text{mol/L}$, 对 SF-268 抑制作用次之, IC_{50} 为 20.5 $\mu\text{mol/L}$, 对 NCI-H460 抑制作用最弱, IC_{50} 为 40.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 化合物 1~6 对 3 种肿瘤细胞株的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibition of compounds 1—6 on three tumor cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$C/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑制率/%		
		MCF-7	NCI-H460	SF-268
1	1	-1.0 ± 1.0	6.7 ± 0.8	1.6 ± 0.9
	10	0.1 ± 1.6	5.3 ± 0.6	2.7 ± 1.1
	100	43.6 ± 1.8	5.9 ± 1.1	14.2 ± 0.8
2	1	7.8 ± 0.7	3.6 ± 0.8	4.7 ± 1.1
	10	50.9 ± 1.0	17.9 ± 1.0	13.2 ± 2.0
	100	100.0 ± 0.0	95.3 ± 1.5	100.0 ± 0.0
3	1	-2.5 ± 0.8	5.6 ± 0.7	1.6 ± 0.6
	10	4.4 ± 1.3	15.0 ± 0.3	4.6 ± 0.2
	100	66.3 ± 0.5	21.9 ± 0.6	54.3 ± 0.7
4	1	5.4 ± 0.8	1.8 ± 0.8	0.3 ± 0.8
	10	5.4 ± 0.6	1.0 ± 0.2	0.5 ± 1.0
	100	36.4 ± 0.9	3.1 ± 0.7	13.4 ± 0.5
5	1	13.0 ± 0.5	5.8 ± 1.4	5.7 ± 1.3
	10	67.8 ± 0.2	37.5 ± 0.5	49.7 ± 1.2
	100	100.0 ± 0.1	99.0 ± 0.2	99.2 ± 0.5
6	1	0.9 ± 0.1	6.5 ± 1.6	-0.3 ± 2.0
	10	3.9 ± 0.2	5.0 ± 0.5	0.8 ± 1.2
	100	32.5 ± 0.1	9.9 ± 1.1	20.4 ± 1.6

6 讨论

在本研究分得的 10 个化合物中, 1、2 和 6~10 均为首次从 *Eutypella* (Nits.) Sacc. 属真菌中分离得到, 其中化合物 2~6 均为近几年来分别从海洋

真菌盘针孢菌 *Libertella* sp.、植物瓜哇凤果 *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz. 的内生真菌 *E. scoparia* (Schw.) Ell. et Ev.、真菌 *Diaporthe* sp. 以及海洋真菌 *Cryptosphaeria eunomia* var. *eunomia* (Fr.) Fuckel 中分离得到的海松烷型新化合物^[3-5], 且化合物 **2**、**3** 和 **6** 为第2次报道。化合物 **2** 对结肠癌细胞 HCT-116 的 IC_{50} 为 $15 \mu\text{mol/L}$, 而从同一真菌中分离得到的同类型化合物 *libertellenone D* 具有更为显著的抗肿瘤活性, 其 IC_{50} 达 $0.76 \mu\text{mol/L}$ ^[7]。本研究结果进一步显示化合物 **2** 具有较好的抗肿瘤活性, 对大细胞肺癌细胞 NCI-H460 的 IC_{50} 为 $12.0 \mu\text{mol/L}$ 。化合物 **4** 和 **5** 结构很相似, 差别仅在于化合物 **4** 的 C-7 位是羟基, 而化合物 **5** 为酮基。Dettrakul 等^[8]报道, 化合物 **4** 对结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* 的 MIC 值为 $200 \mu\text{g/mL}$, 对 Vero 细胞的 IC_{50} 大于 $50 \mu\text{g/mL}$, 但化合物 **5** 对结核分枝杆菌的 MIC 值为 $3.1 \mu\text{g/mL}$, 对 Vero 细胞 IC_{50} 为 $1.5 \mu\text{g/mL}$, 有望开发成为新的抗结核病药物^[11], 说明化合物 **5** 的 C-7 位的酮基为其活性的必须基团。本研究结果也显示化合物 **4** 对 SF-268、MCF-7 和 NCI-H460 没有明显的细胞毒活性, 但化合物 **5** 对这3种肿瘤细胞具有显著的抑制活性, 其 IC_{50} 分别为 9.2 、 4.4 和 $9.9 \mu\text{mol/L}$, 从而也进一步证实, 化合物 **5** 的 C-7 位酮基对其生物活性的重要性。此外, 化合物 **4** 为本研究中海洋真菌 *E. scoparia* 主要的胞外代谢产物, 约占发酵液醋酸乙酯粗提物质量的 65%, 而化合物 **5** 仅占 0.35%, 因此, 如果化合物 **5** 或者结构类似物能够被成功开发成药物, 则化合物 **4** 可作为先导化合物进一步合成化合物 **5** 及其类似物。海洋真菌 *E. scoparia* 的重要特征是其次级代谢产物中富含结构新颖的海松烷型二萜, 并且有些具有明显的抗肿瘤、抗菌活性, 因此该株海洋真菌 *E. scoparia* 具有重要的研究价值和很好的开发前景。

参考文献

[1] Saleem M, Ali M, Hussain S, et al. Marine natural

productsof fungal origin [J]. *Nat Prod Rep*, 2007, 24(5): 1142-1152.

- [2] Du L, Li D H, Zhu T J, et al. New alkaloids and diterpenes from a deep ocean sediment derived fungus *Penicillium* sp [J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(5): 1033-1039.
- [3] Maria L C, Lopez-Gresa M P, Gavagnin M, et al. Cytosporin-related compounds from the marine-derived fungus *Eutypella scoparia* [J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(22): 5365-5369.
- [4] Pongcharoen W, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, et al. Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44 [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(5): 856-858.
- [5] Isaka M, Palasarn S, Lapanun S, et al. Gamma-lactones and ent-eudesmane sesquiterpenes from the endophytic fungus *Eutypella* sp. BCC 13199 [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(9): 1720-1722.
- [6] Guajardo Touché E M, Gómez Lopez E, Reyes P A, et al. Parryin, a diterpene with a tricyclic 6-7-5-ring system from *Salvia parryi* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(2): 387-390.
- [7] Oh D C, Jensen P R, Kauffman C A, et al. Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(17): 5267-5273.
- [8] Dettrakul S, Kittakoop P, Isaka M, et al. Anti-mycobacterial pimarane diterpenes from the fungus *Diaporthe* sp [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(7): 1253-1255.
- [9] Yoshida S, Kito K, Ooi T, et al. Four pimarane diterpenes from marine fungus: chloroform incorporated in crystal lattice for absolute configuration analysis by X-ray [J]. *Chem Lett*, 2007, 36(11): 1386-1387.
- [10] Fujimoto H, Nakamura E, Okuyama E, et al. Six immunosuppressive features from an ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(8): 1005-1008.
- [11] de Souza M V N, Vasconcelos T R A. Drugs against tuberculosis: past, present and future [J]. *Quimica Nova*, 2005, 28(4): 678-682.