张旭东,李啸飞,杨中铎. 踝节菌属真菌 *Talaromyces wortmannii* LGT-4化学成分及生物活性研究[J]. 湖北农业科学,2021,60(9):106-109.

踝节菌属真菌 *Talaromyces wortmannii* LGT-4 化学成分及生物活性研究

张旭东,李啸飞,杨中铎
(兰州理工大学生命科学与工程学院,兰州　730050)

摘要:将一株踝节菌属真菌 *Talaromyces wortmannii* LGT-4活化并接种在改良马丁氏培养基上进行发酵,通过色谱技术分离纯化,运用酶标法及体外激酶检测试剂盒的方法对单体化合物的乙酰胆碱酯酶、磷脂酰肌醇3-激酶的抑制活性进行测定,并对次级代谢产物的生物活性进行研究。结果表明,共分离到10个已知化合物,分别鉴定为Cyclo-(Pro-Ile)(1)、Cyclo(L-Tyr-L-Leu)(2)、Cyclo-(L-Pro-L-Phe)(3)、Aspergillumarin B(4)、Deacetylisowortmin(5)、Chaetominine(6)、(E)-2-(Hydroxymethyl)-3-(2-Hydroxypent-3-enyl) phenol(7)、N-(2-Phenylethyl)acetamide(8)、4-Hydroxynaphthalide(9)、1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibuty ester(10)。Cyclo-(Pro-Ile)(1)具有较好的抗乙酰胆碱酯酶活性,其 IC_{50} 为11.76 μg/mL。10个化合物均无明显抗磷脂酰肌醇3-激酶的活性。且化合物1、2、3、6、8为首次从该真菌中分离得到。

关键词:踝节菌属真菌;次级代谢产物;乙酰胆碱酯酶抑制剂;磷脂酰肌醇3-激酶抑制剂
中图分类号:R284.2　　**文献标识码**:A
文章编号:0439-8114(2021)09-0106-04
DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2021.09.020　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID)**:

The chemical constituents and biological activities of *Talaromyces wortmannii* LGT-4

ZHANG Xu-dong, LI Xiao-fei, YANG Zhong-duo
(College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: A strain of *Talaromyces wortmannii* was isolated LGT-4 was activated and inoculated on the modified Martin's medium for fermentation. The compounds were separated and purified by chromatography. The inhibitory activities of acetylcholinesterase and phosphatidylinositol 3-kinase of the monomers were determined by enzyme labeling method and in vitro kinase detection kit, and the biological activities of secondary metabolites were studied. The results showed that ten known compounds were isolated and identified as Cyclo-(Pro-Ile)(1)、Cyclo(L-Tyr-L-Leu)(2)、Cyclo-(L-Pro-L-Phe)(3)、Aspergillumarin B(4)、Deacetylisowortmin(5)、Chaetominine(6)、(E)-2-(hydroxymethyl)-3-(2-hydroxypent-3-enyl) phenol(7)、N-(2-Phenylethyl) acetamide(8)、4-hydroxynaphthalide(9)、1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibuty ester(10). Cyclo-(Pro-Ile)(1) shoewed potent anti-acetylcholinesterase activity with IC_{50} value of 11.76 μmol/L. None of the 10 compounds showed significant activity against phosphatidylinositol 3-kinase. Compounds 1,2,3,6,8 were first isolated from this fungus.

Key words: *Talaromyces wortmannii* LGT-4; secondary metabolites; acetylcholinesterase inhibitors; phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors

近年来,天然产物已成为寻求高生物活性物质和新药前体的主要路径,天然产物作为药物的主要来源,种类丰富,数量庞大,毒副作用小。植物内生真菌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,是天然产物的重要来源,是一类具有高度开发价值的新型生物资源,对其的研究已经成为微生物学研究的一大热点。

收稿日期:2020-07-23
基金项目:国家自然科学基金项目(21762027)
(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net
作者简介:张旭东(1995-),男,甘肃兰州人,在读硕士研究生,研究方向为天然产物与开发,(电话)13679480311(电子信箱)729980188@qq.com;通信作者,杨中铎(1976-),男,教授,博士,主要从事天然产物的开发与研究,(电子信箱)yangzhongduo@126.com。

雷公藤（*Tripterygium wilfordii*）为卫矛科雷公藤属植物，是传统的中药材，性苦、寒，具有清热解毒、祛风通络、舒筋活血等功效，用于治疗类风湿性关节炎、肾炎、红斑狼疮、血小板减少性紫癜等[1]。经过长期的研究发现，植物内生真菌可以产生与宿主相似甚至相同的次级代谢产物，其中包括抗肿瘤、抗炎、抗菌等多方面的天然产物。目前已经有多种药用植物的代谢产物应用于临床，在医药领域发挥着举足轻重的作用。

本课题组从雷公藤中分离得到了一株踝节菌属内生真菌，经分子生物学鉴定为踝节菌属（*Talaromyces*）*Talaromyces wortmannii*，又名篮状菌，是青霉菌属（*Penicillium*）的一个亚属。该属真菌能代谢出丰富的新次级代谢产物，包括生物碱、多肽、内酯、聚酮等类化合物。其中，生物碱（Alkaloid）是广泛存在于自然界中的一类含氮的碱性化合物，有显著的生物活性，是中草药中重要的有效成分之一[2]；酯类（Esters）化合物是踝节菌属真菌的最主要次级代谢产物[3]；聚酮（Polyketides）是一类由细菌、真菌、植物与动物所生产出来的次级代谢产物，可用于抵抗病虫害[4]。在抗生素、细胞稳定（Cytostatic）和天然杀虫剂等领域具有极高的价值；多肽主要控制人体的生长、发育、免疫调节和新陈代谢[5]。前期研究表明，该菌株能产生许多新化合物如 Secovironolide、Epoxyvirone[6] 和 Wortmannolol[7]。为了进一步从该菌株中获得结构新颖、具有一定药理活性的化合物，本研究对 *Talaromyces wortmannii* LGT-4 的改良马丁氏培养基发酵产物的化学成分和生物活性进行了研究。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试剂及材料　踝节菌属真菌 *Talaromyces wortmannii* LGT-4（GenBank 收录号：KF850714）为本课题组前期从药用植物雷公藤根中分离得到的一株植物内生真菌，该菌株现保存于兰州理工大学生命科学与工程学院。

1.1.2　培养基　改良马丁氏培养基：葡萄糖 20 g，蛋白胨 5 g，磷酸氢二钾 1 g，酵母浸出粉 2 g，硫酸镁 0.5 g，去离子水 1 L。

1.1.3　仪器　600 MHz 液体超导核磁共振波谱仪；双泵双波长高效液相色谱；Bruker Daltonics APEX Ⅱ 47e 质谱仪；BioTek 酶标仪 Elx808；96 孔酶标板。

1.2　方法

1.2.1　次级代谢产物的提取分离方法　将活化好的 *Talaromyces wortmannii* LGT-4 接入 50 L 发酵罐中发酵 25 d。发酵结束后，将菌丝与菌液分离，用乙酸乙酯对菌液等体积萃取，共得到 *Talaromyces wortmannii* LGT-4 改良马丁氏培养基发酵产物浸膏 10 g。经大孔吸附树脂分离，乙醇-水梯度洗脱（10%、30%、50%、70%、90%），得到 4 个组分，分别为 G-A（1.5 g）、G-B（3.0 g）、G-C（2.5 g）、G-D（1.5 g）。

G-A 组分用硅胶柱层析，二氯甲烷：甲醇（30∶1、20∶1、8∶1、5∶1、2∶1）梯度洗脱，得到 4 个组分：G-A-A、G-A-B、G-A-C、G-A-D。G-A-C（300 mg）用高效液相色谱（流速 1.2 mL/min，流动相 53% 的甲醇水，t_R=18 min）分离得到化合物 9（2 mg），G-A-D（390 mg）用高效液相色谱（流速 0.8 mL/min，流动相 32% 的甲醇水，t_R=21min）分离得到化合物 4（1.8 mg）。

G-B 组分用 MCI 柱层析，甲醇水（20%、30%、40%、50%、60%、100%）梯度洗脱，得到 5 个组分：G-B-A、G-B-B、G-B-C、G-B-D、G-B-E。G-B-C（800 mg）用硅胶柱层析，石油醚：丙酮（50∶1、30∶1、10∶1、8∶1、5∶1）梯度洗脱，得到 3 个组分 G-B-C-A、G-B-C-B 和 G-B-C-C。其中 G-B-C-B 组分（92 mg）用高效液相色谱（流速 1.5 mL/min，流动相 62% 的甲醇水，t_R=25.2 min）分离，得到化合物 7（20 mg），G-B-D 选用硅胶柱层析，石油醚：丙酮（30∶1、20∶1、15∶1、10∶1、5∶1）梯度洗脱，得到 4 个组分 G-B-D-A、G-B-D-B、G-B-D-C 和 G-B-D-D。其中 G-B-D-B 组分（40 mg）用高效液相色谱（流速 1.2 mL/min，流动相 66% 的甲醇水，t_R=44.8min）分离，得到化合物 5（1.2 mg）。

G-C 组分用 MCI 柱层析，甲醇水（20%、40%、50%、60%、80%、100%）梯度洗脱，得到 5 个组分：G-C-A、G-C-B、G-C-C、G-C-D、G-C-E。G-C-B（560 mg）选用硅胶柱层析，石油醚：丙酮（30∶1、20∶1、10∶1、5∶1）梯度洗脱，得到 G-C-B-A、G-C-B-B。G-C-B-A（60 mg）使用高效液相色谱（流速 1.2 mL/min，流动相 47% 的甲醇水，t_R=46.6 min）分离，得到化合物 2（3 mg）。G-C-B-B（70 mg）用高效液相色谱（流速 0.8 mL/min，流动相 27% 的乙腈水，t_R=18.1 min）分离，得到化合物 6（2 mg）。G-C-C（630 mg）选用硅胶柱层析，二氯甲烷：丙酮（30∶1、20∶1、15∶1、6∶1、3∶1）梯度洗脱，得到组分 G-C-C-C（72 mg），使用葡聚糖凝胶 LH-20 分离，用氯仿甲醇 1∶1 洗脱，得到化合物 3（10 mg）。G-C-D（320 mg）选用硅胶柱层析，石油醚：丙酮（100∶1、30∶1、20∶1、15∶1、10∶1）梯度洗脱，得到 2 个组分 G-C-D-A 和 G-C-D-B。其中 G-C-D-A 组分（45 mg）用高效液相色谱（流速 0.8 mL/min，流动相 47% 的甲醇水，t_R=23min）分离，得到化合物 1（1.6 mg）。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

G-D 组分选用 MCI 柱层析，甲醇水（40%、50%、

60%、70%、80%、100%)梯度洗脱,得到3个组分:G-D-A、G-D-B、G-D-C。G-D-A(200 mg)选用硅胶柱层析,石油醚:丙酮(120:1、80:1、30:1、20:1、10:1)梯度洗脱,得到化合物10(12 mg)。G-D-B(250 mg)选用硅胶柱层析,石油醚:丙酮(60:1、35:1、30:1、20:1、10:1)梯度洗脱,得到化合物8(30 mg)。

1.2.2 次级代谢产物的生物活性测定

1)乙酰胆碱酯酶抑制活性测定。采用改进的Ellman法(酶标法)对分离出的化合物进行乙酰胆碱酯酶抑制活性评价,测定方法同文献[8]。其样品终浓度均为30 μg/mL,用石杉碱甲作为阳性药。

2)磷脂酰肌醇3-激酶抑制活性测定。采用体外激酶检测试剂盒的方法测定了样品的PI3K抑制活性,通过检测磷脂酰肌醇3-激酶反应后生成ADP的量来确定化合物的抑制率,测定方法同文献[9]。样品终浓度均为0.2 μg/mL,阳性药为GDC-0941。

1.3 化合物结构鉴定

从踝节菌属真菌 *Talaromyces wortmannii* LGT-4改良马丁氏培养基发酵产物中分离得到10种化合物,运用^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、ESI-MS等现代波谱技术,结合文献比对,对分离的10个化合物进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 化合物鉴定结果

从踝节菌属真菌 *Talaromyces wortmannii* LGT-4改良马丁氏培养基发酵产物中分离得到10种化合物,结合文献比对,对分离的10个化合物进行了鉴定。分别鉴定为Cyclo-(Pro-Ile)(1)、Cyclo(L-Tyr-L-Leu)(2)、Cyclo-(L-Pro-L-Phe)(3)、Aspergillumarin B(4)、Deacetylisowortmin(5)、Chaetominine(6)、(E)-2-(hydroxymethyl)-3-(2-hydroxypent-3-enyl)phenol(7)、N-(2-Phenylethyl)acetamide(8)、4-hydroxynaphthalide(9)、1,2-Benzenedicarboxylic acid,dibuty ester(10)。

2.2 乙酰胆碱酯酶抑制活性

采用Ellman法对10个单体化合物的抗AChE活性进行了测定,结果见表1。单体化合物的初浓度为300 μg/mL(终浓度为30 μg/mL),阳性药石杉碱甲的IC_{50}=(0.31±0.12)μg/mL。化合物1表现出较好的抗乙酰胆碱酯酶的活性,IC_{50}为11.76 μg/mL。

2.3 磷脂酰肌醇3-激酶抑制活性

采用体外激酶检测试剂盒的方法,对10个单体化合物的抗PI3K活性进行了测定,结果见表2。单体化合物的初浓度为20 μg/mL(终浓度为0.2 μg/mL),阳性药GDC-0941的IC_{50}为(4.5±0.2) nmol/L。结果表明化合物均没有很好的抗磷脂酰肌醇3-激酶活性。

3 小结与讨论

研究从 *Talaromyces wortmannii* LGT-4改良马丁氏培养基发酵产物中分离得到10个单体化合物,其

表1 10种化合物抗乙酰胆碱酯酶活性

化合物	名称	抑制率//%	IC_{50}//μg/mL
1	Cyclo-(Pro-Ile)	76.33	11.76
2	Cyclo(L-Tyr-L-Leu)	8.00	Nd
3	Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	28.33	Nd
4	Aspergillumarin B	51.67	Nd
5	Deacetylisowortmin	52.33	Nd
6	Chaetominine	23.00	Nd
7	(E)-2-(Hydroxymethyl)-3-(2-Hydroxypent-3-enyl)phenol	48.00	Nd
8	N-(2-Phenylethyl)acetamide	45.00	Nd
9	4-Hydroxynaphthalide	30.76	Nd
10	1,2-Benzenedicarboxylic acid,dibuty ester	54.00	Nd

表2 10种化合物抗磷脂酰肌醇3-激酶抑制活性

化合物	名称	抑制率//%	IC_{50}//μg/mL
1	Cyclo-(Pro-Ile)	5.2	Nd
2	Cyclo(L-Tyr-L-Leu)	2	Nd
3	Cyclo-(L-Pro-L-Phe)	0	Nd
4	Aspergillumarin B	0	Nd
5	Deacetylisowortmin	12.3	Nd
6	Chaetominine	23	Nd
7	(E)-2-(hydroxymethyl)-3-(2-hydroxypent-3-enyl)phenol	8.6	Nd
8	N-(2-Phenylethyl)acetamide	0	Nd
9	4-hydroxynaphthalide	0	Nd
10	1,2-benzenedicarboxylic acid,dibuty ester	0	Nd

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中化合物 1、2、3、6、8 为首次从该真菌中分离得到。采用酶标法及激酶检测试剂盒的方法，对 10 个单体化合物进行了抗乙酰胆碱酯酶、抗磷脂酰肌醇 3-激酶的活性测定。结果表明，化合物 1 具有较好的抗乙酰胆碱酯酶的活性，IC_{50} 为 11.76 μg/mL。化合物的抗磷脂酰肌醇 3-激酶活性均比较弱。到目前为止，未见对本研究中分离化合物的抗乙酰胆碱酯酶和抗磷脂酰肌醇 3-激酶活性的报道。

Chen 等[10]研究发现，N-(2-Phenylethyl) acetamide(8)具有较好的 α-葡萄糖苷酶抑制作用，其 IC_{50} 为(75.87±4.86) μmol/L，同时还具有抗 hepG2 细胞增殖的作用，其 IC_{50} 为(133.56±10.69) μmol/L。Jiao 等[11]从沙参内生真菌 *Chaetomium* sp. IFBE015 中分离得到 Chaetominine(6)，发现 Chaetominine(6)相比于 5-氟尿嘧啶具有更好的人类白血病 K562 细胞和结肠癌 SW1116 细胞毒性，表明 Chaetominine(6)具有成为抗癌药物的潜力。本研究首次报道了化合物 7 的抗乙酰胆碱酯酶活性，由于乙酰胆碱酯酶抑制剂常用于阿尔茨海默症的治疗，因此化合物 7 可能具有抗阿尔茨海默症作用，有待于进一步研究。

参考文献：

[1] 黄宝祥，朱培林，聂　韡，等.雷公藤的栽培与应用[J].江西林业科技，2012(5)：26-29.

[2] 周贤春，何春霞，苏力坦·阿巴白克力.生物碱的研究进展[J].生物技术通讯，2006，17(3)：476-479.

[3] 李喆宇，崔玉彬，张静霞，等.大环内酯类抗生素的研究新进展[J].国外医药抗生素分册，2013，34(1)：6-15.

[4] 黄惠娟，乔建军.聚酮类抗生素组合生物合成[J].中国细胞生物学学报，2007，29(5)：692-696.

[5] 杜增鹏.海参活性肽口服液蛋白含量检测技术研究[J].食品安全导刊，2015(12)：63-64.

[6] DING H, YANG Z, SHENG L, et al. Secovironolide, a novel furanosteroid scaffold with a five-membered B ring from the endophytic fungus *Talaromyces wortmannii* LGT-4 [J]. Tetrahedron letters, 2015, 56(48): 2604.

[7] ZHI K K, YANG Z D, ZHOU S Y, et al. A new furanosteroid from Talaromyces sp. lgt-4, a fungal endophyte isolated from Tripterygium wilfordii[J]. Natural product research, 2016, 30(1-19): 1-5.

[8] ORHAN I, SENER B, CHOUDHARY M I, et al. Acetylcholinesterase and butyrylcho -linesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants[J]. J ethnopharmacol, 2004, 91(1): 57-60.

[9] HAN F, LIN S, LIU P, et al. Discovery of a novel series of thienopyrimidine as highly potent and selective PI3K inhibitors[J]. ACS medicinal chemistry letters, 2015, 6(4): 434-438.

[10] CHEN S, YONG T, XIAO C, et al. Pyrrole alkaloids and ergosterols from *Grifola frondosa* exert anti-α-glucosidase and anti-proliferative activities[J]. Journal of functional foods, 2018, 43: 196-205.

[11] JIAO R H, XU S, LIU J Y, et al. Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic chaetomium sp. IFB-E015[J]. Organic letters, 2006, 8(25): 5709-5712.

(上接第 105 页)

前的研究多针对黄牛[14]和皖东牛[15]等牛种。已有学者对麦洼牦牛体尺和乳房性状选育进行了主成分分析，最终筛选出了选育高产奶量麦洼牦牛应重点关注的指标[16]。此外，有研究者对麦洼牦牛 9 个选育性状进行了主成分分析，研究找出了麦洼牦牛选育的两类重点性状[17]。而对于标准化生产牦牛生产性能的主成分研究还未见于报道，本研究通过对 30 头牦牛的体尺和屠宰性状的主成分分析，最终确定了 3 个主成分，主成分 Ⅰ～Ⅲ 的贡献率分别为 40.064%、18.394% 和 12.386%，累积贡献率达到了 70.844%，反映了大部分信息量。

参考文献：

[1] 肖　敏，李世林，董丽娟，等.浅析阿坝州牦牛产业发展现状及对策[J].草业与畜牧，2018(5)：82-86.

[2] WOLD S, ESBENSEN K, GELADI P.Principal component analysis [J].Chemometr intell lab，1987，2(1-3)：37-52.

[3] 李欣钰，邱晓辉，陈昌义，等.广丰白翎鹅体重与体尺性状指标主成分分析[J].中国畜牧兽医，2012，39(9)：164-168.

[4] 吴胜利，刘　毅，吴华莉，等.8 周龄罗曼鹅体重与体尺指标主成分分析[J].中国家禽，2014，26(8)：48-50.

[5] 袁龙飞，文勇立，杨合琴，等.金川牦牛屠宰数据的聚类和主成分分析[J].草学，2017(1)：58-66，88.

[6] 周利兵，陈　伟，刘先国，等.青海高原牦牛角中微量元素的主成分分析和聚类分析[J].中国兽医杂志，2011，47(3)：17-18.

[7] 何世明.牦牛标准化生产技术规范[M].成都：四川科技出版社，2019.

[8] 赵晓东，李世林，肖　敏，等.冷季全舍饲对麦洼牦牛生长及屠宰性能的影响[J].黑龙江畜牧兽医，2018(8)：189-191.

[9] 徐　英，李石友，段　刚，等.蛋白质水平对肉牛屠宰指标的影响[J].中国牛业科学，2010，36(4)：30-33.

[10] 李　强，傅昌秀，文勇立，等.金川多肋牦牛体尺和屠宰性状测定及其相关性分析[J].中国草食动物科学，2012，32(2)：18-20.

[11] 王文森.变异系数——一个衡量离散程度简单而有用的统计指标[J].中国统计，2007，36(6)：41-42.

[12] 朱光星，昝林森，张亚冉，等.秦川肉牛新品系公牛肉用性能研究[J].家畜生态学报，2012，33(6)：20-24.

[13] 谢荣清，杨平贵，曾　华.牦牛不同年龄段的屠宰测定[J].草业与畜牧，2005(5)：27-29.

[14] 刘庆华，梁学武，鲍若虹.闽南黄牛体尺体重主成分分析及肉用性能研究[J].家畜生态学报，2008，29(4)：29-32.

[15] 刘洪瑜，刘成雪，王　恒，等.皖东牛体尺与体重的主成分分析[J].安徽农业大学学报，2016，43(6)：885-890.

[16] 吴锦波，何世明，艾　鹭，等.麦洼牦牛体尺和乳房性状与 153 d 产奶量的相关性及主成分分析[J].黑龙江畜牧兽医，2019(3)：149-152.

[17] 钟仑城，陈智华，马　力，等.麦洼牦牛若干选育性状的主成分分析[J].西南民族大学学报(自然科学版)，2000，26(4)：407-410.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net