

石果衣菌藻次级代谢产物的初步研究

柳润东^{1,2} 蒋淑华¹ 李二伟¹ 魏江春^{2,1}

①中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室 北京 100101

②中国科学院大学 北京 100049

摘要: 荒漠地衣石果衣 *Endocarpon pusillum* 中未能检测出任何次级代谢产物, 然而, 其共生菌基因组中却含有 14 个 PKS 基因和 2 个 NRPS 基因。通过激活培养后从中分离出 3 个次级代谢产物, 4,6,9-三羟基-7-甲基-1H,3H-萘并[1,8-cd]吡喃-1,3-二酮 (lamellicolic anhydride)、石果衣菌素 A (endocarpin A) 及石果衣菌素 B (endocarpin B), 后二者为新结构化合物。从其共生藻柯氏复球藻 *Diplosphaera chodatii* 中分离出 3 个脱镁叶绿素类化合物, 即脱镁叶绿素甲酯酸 b (phaeophorbide b)、13-表-脱镁叶绿素甲酯酸 a (13-*epi*-phaeophorbide a) 及脱镁叶绿素甲酯酸 a (phaeophorbide a)。其中脱镁叶绿素甲酯酸 b 具有中等的清除 DPPH 活性。

关键词: 地衣型真菌, 地衣共生藻, 柯氏复球藻, 异吲哚-1-酮类, 萘醌类

A preliminary study on the secondary metabolites from the mycobiont and phycobiont of lichen *Endocarpon pusillum*

LIU Run-Dong^{1,2} JIANG Shu-Hua¹ LI Er-Wei¹ WEI Jiang-Chun^{2,1}

①State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

②University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In the desert lichen *Endocarpon pusillum* can not be detected any secondary metabolite. But, its mycobiont genome contains fourteen PKS genes and two NRPS genes. Through the activation of culture in vermiculite medium, three secondary metabolites have been obtained from the mycobiont, including a new isoindolin-1-one compound (endocarpin A), a new naphthoquinone (endocarpin B) and lamellicolic anhydride. Other three demagnesium chlorophyll compounds were isolated from its phycobiont *Diplosphaera chodatii*. They are phaeophorbide b, 13-*epi*-phaeophorbide a and phaeophorbide a. Phaeophorbide b owned medium antioxidant activity based on the ability to scavenge DPPH free radicals *in vitro*.

Key words: lichenized fungus, phycobiont, *Diplosphaera chodatii*, isoindolin-1-one, naphthoquinone

基金项目: 国家自然科学基金 (31470149)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470149).

✉ Corresponding authors. E-mail: lieuw@im.ac.cn, weijc2004@126.com

ORCID: LIU Run-Dong (0000-0002-4612-4530)

Received: 2017-10-23, accepted: 2017-10-31

地衣是地球生物圈内生态系统中稳定的菌藻胞外互惠共生群落。每一个共生群落都是由一种地衣型真菌作为建群种和一种相应的藻类或蓝细菌作为伴生种所组成 (Wei 2018)。地衣型真菌能够产生各种各样的次级代谢产物,其中绝大多数是在地衣化条件下所独有的。其中更具前景的是地衣型真菌及其 1 000 多种已知的次级代谢产物。这些次级代谢产物已经展示出令人瞩目的生物活性,包括抗细菌、抗真菌、抗艾滋病毒、抗癌以及抗原生动物等活性。由此看来,地衣型菌藻可能是最有希望的抗菌和抗癌药物的源泉 (Shrestha & Clair 2013)。

在石果衣属 *Endocarpon* 和网盘衣属 *Sarcogyne* 地衣中未能检测出任何次级代谢产物,只是在网盘衣属的某些子囊盘中含有未鉴定的色素 (Nash *et al.* 2002, 2007)。然而,在石果衣 *E. pusillum* Hedwig 地衣型真菌基因组中却含有 14 个聚酮合成酶 (PKS) 基因和 2 个非核糖体肽合成酶 (NRPS) 基因 (Wang *et al.* 2014)。这表明上述基因通常处于沉默状态。据此推测,未检测出任何次级代谢产物的小囊网盘衣 *Sarcogyne parviascifera* Jiao-Hong Wang & J.C. Wei 中也可能含有沉默状态的 PKS 基因等。基于这一推测,通过不同分离培养途径以激活可能的沉默基因,从中分离到 10 个次级代谢产物,其中 8 个为新结构化合物 (王娇红 2016; 王娇红等 2016)。

本项目的研究任务就在于通过各种不同分离培养途径以激活石果衣 *E. pusillum* Hedwig 地衣型真菌基因组中处于沉默状态的聚酮合成酶 (PKS) 基因和非核糖体肽合成酶 (NRPS) 基因,以获得其中的次级代谢产物。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和试剂

1.1.1 试剂与仪器: Waters2695-2998 高效液相色谱仪, ODS C18 分析柱 (Hypersil GOLD, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm, 1.0mL/min); Agilent1200 系列高效液相色谱仪, ODS C18 半制备色谱柱 (Waters, 7.8mm \times 300mm, 7 μ m, 2.2mL/min); Anton Paar

MCP200 旋光仪; Bruker Avance-500 核磁共振波谱仪; Agilent Accurate-Mass-Q-TOF LC/MS 6520 液质联用仪; N-1000D-W/WD 型旋转蒸发仪[埃朗科技国际贸易(上海)有限公司], A-1000S 型循环水式真空泵[埃朗科技国际贸易(上海)有限公司]; AL204 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司); Millipore 纯水仪 F7JN55901 型(美国 Millipore 公司); KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 柱层析硅胶、薄层层析硅胶板(GF254)均购自青岛海洋化工有限公司; ZHJH-C1106B 型超净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司); ZHWY211B 型摇床(上海智城分析仪器制造有限公司); AnkeTgl-16c 型离心机(上海安享科学仪器厂); Sephadex LH-20 购自美国 Fluka 公司; 显色剂 10% 硫酸-乙醇溶液由实验室配制; 色谱甲醇及其他试剂均购自于北京化学试剂公司。

1.1.2 实验材料: 地衣型真菌 *Endocarpon pusillum* Hedwig 和相应的藻类柯氏复球藻 *Diplosphaera chodatii* Bialsuknia 由本实验室杨军博士于 2007 年 1 月采集自宁夏中卫沙坡头,并由张涛博士分离培养,采集号 Z07012,标本室号 300191。地衣凭证标本保存在中国科学院微生物研究所菌物标本馆地衣标本室(HMAS-L),相应的地衣型真菌菌株及其共生藻保存于中国科学院微生物研究所地衣生物学实验室菌藻库。

经分子系统学分析确认菌株确系地衣型真菌 *E. pusillum* Hedwig 和相应的藻类柯氏复球藻 *D. chodatii* Bialsuknia。

1.2 蛭石培养基静置培养

将斜面上的地衣型真菌 *E. pusillum* Hedwig 接种于含有 150mL 优化液体 PDA 培养基(张涛 2011)的 250mL 三角瓶中,摇床培养 2 个月作为种子培养液;将种子培养液接种于含有 200mL 蛭石培养基(Li *et al.* 2008)的 500mL 三角瓶中,培养量为 10 瓶共 2L, 26 $^{\circ}$ C 静置培养 4 个月。蛭石培养基: 30g 蛭石, 6%糊精, 2%麦芽糖, 0.75%棉籽粉, 0.7%蛋白胨, 0.25% CaCO₃, 0.25% MgSO₄·7H₂O, 0.1%

FeSO₄·7H₂O, 0.0001% ZnSO₄, pH 6.0。

1.3 共生藻的液体深层培养

将斜面上的柯氏复球藻 *D. chodatii* Bialskunia 接种于含有 150mL BBM 培养基 (张涛 2011) 的 250mL 三角瓶中, 摇床培养 2 个月作为种子培养液; 将种子培养液接种于含有 1.5L 优化 PDA 培养基 (张涛 2011) 的三角瓶中, 培养 4 瓶共 6L, 培养时间为 45d (19℃, 120r/min)。

1.4 次级代谢产物提取与分离

共生菌静置培养结束后将培养基和菌体用乙酸乙酯浸泡提取 4 次并使用旋转蒸发仪在 38℃ 减压浓缩, 蒸干溶剂, 得到 5g 粗提物, 与 200 目硅胶 1:1 拌样, 然后进行减压硅胶柱层析 (vacuum liquid chromatography, VLC), 以石油醚-二氯甲烷-甲醇体系梯度洗脱, 得到馏分 Frs. 1–20。HPLC 分析发现馏分 Frs. 7–9 化合物类型一致, 合并后得到 0.120g 经过凝胶层析柱 (Sephadex LH-20, MeOH) 分离后的一个馏分经过 HPLC (80% MeOH-H₂O+0.1% HCOOH-H₂O) 制备得到 **3** (t_R 16.1min; 4.3mg); 另一馏分 Fr.6 (92.7mg) 经过凝胶层析柱 (Sephadex LH-20, MeOH) 分离后的一个馏分经过 HPLC (44% MeOH-H₂O+0.1% HCOOH-H₂O) 制备得到 **2** (t_R 39.8min; 0.8mg); 另一馏分 Fr.17 (82.5mg) 经过 HPLC (50% MeOH-H₂O+0.1% HCOOH-H₂O) 制备得到 **1** (t_R 48min; 1.9mg)。

共生藻液体深层培养后将培养液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 收集有机相, 并使用旋转蒸发仪在 38℃ 减压浓缩, 蒸干溶剂, 得到 1.8g 粗提物, 反相硅胶层析柱分离 (ODS, MeOH-H₂O, 梯度洗脱) 得到馏分 Frs. 1–13。HPLC 分析发现馏分 Frs. 10–12 化合物类型一致, 合并后得到 0.375g 经过凝胶层析柱 (Sephadex LH-20, MeOH) 分离后的一个馏分经过 HPLC (MeCN-H₂O+0.1% HCOOH-H₂O; 70:30→100:0; 50min) 制备得到 **4** (t_R 25.3min; 2.5mg)、**5** (t_R 41.8min; 7.2mg)、**6** (t_R 48.1min; 4.4mg)。

1.5 DPPH 自由基清除试验

参照 Ma *et al.* (2014) 的实验方法并进行改进。

配置 200μmol/L 的各个化合物样品、抗坏血酸标品和 DPPH 标品。各个化合物样品和抗坏血酸标品溶解在 DMSO 中, DPPH 样品溶解在乙醇中。取 100μL 的各个化合物样品及抗坏血酸样品分别与 100μL 的 DPPH 标品混合, 对应加入 96 孔板中, 摇匀, 避光处理 30min, 然后用酶标仪测定 517nm 下的吸光值。使用抗坏血酸为阳性对照, 对照组的 IC₅₀ 控制在 (27.36±0.10)μmol/L。DPPH 自由基的清除率 (%) = [(A_{517 对照} - A_{517 样品}) / A_{517 对照}] × 100。

筛选出 DPPH 自由基的清除率大于 50 的化合物后, 同时使用 200μmol/L、100μmol/L、50μmol/L、25μmol/L 化合物样品进行上述实验。

1.6 抗菌活性测试

本实验主要测试了 6 个化合物对 3 种病原菌的抗菌活性, 分别为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC6538, SA), 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 北京朝阳医院临床菌株, MRSA) 以及牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2, BCG), 实验步骤参照 Song *et al.* (2012) 的方法进行。

1.6.1 抗 SA 和抗 MRSA 活性检测: 用 DMSO 溶解待测化合物, 起始浓度为 4mg/mL, 并采用倍半稀释准备不同浓度梯度的样品; 待测菌株划线接种于 LB 培养基, 37℃ 恒温培养 18–20h; 挑单克隆至 MHB 培养基, 调节菌悬液浓度至 10⁴CFU/mL; 将 78μL 菌悬液加入 96 孔板, 随后加入 2μL 待测样品, 万古霉素作为阳性对照, 二甲基亚砷作为阴性对照; 37℃ 恒温培养 16h 后, 用酶标仪测定 600nm 下的吸光值, 确定待测化合物的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.6.2 抗 BCG 活性检测: 待测菌株接种于 7H9 培养基, 37℃、60r/min 恒温振荡培养 7d; 用 7H9 调节菌悬液浓度至 OD₆₀₀ 为 0.025; 将 98μL 菌悬液加入 96 孔板, 随后加入 2μL 上述方法准备的待测样品, 异烟肼作为阳性对照, 二甲基亚砷作为阴性对照; 37℃ 恒温培养 3d 后, 用酶标仪测定荧光值 (激发波长 480nm, 发射波长 535nm), 确定待测化合物的 MIC 值。

2 结果与分析

从石果衣（采集号为 Z07012）中分离的共生菌（300191-1: *E. pusillum* Hedwig）进行激活培养后从中分离得到 3 个次级代谢产物, 它们分别是石果衣菌素 A (endocarpin A) (1)、石果衣菌素 B (endocarpin B) (2) 和 4,6,9-三羟基-7-甲基-1H,3H-萘并[1,8-cd]吡喃-1,3-二酮 (lamellicolic anhydride) (3), 其中前二者为新结构化合物。

对于从石果衣（采集号为 Z07012）中分离的共生藻柯氏复球藻（300191-2: *D. chodatii*

Bialskunia) 进行纯培养后从中分离得到 3 个脱镁叶绿素类化合物, 它们分别是脱镁叶绿素甲酯酸 b (phaeophorbide b) (4)、13-表-脱镁叶绿素甲酯酸 a (13-*epi*-phaeophorbide a) (5) 和脱镁叶绿素甲酯酸 a (phaeophorbide a) (6)。应用质谱、核磁共振技术确定了它们的结构 (图 1, 图 2)。

2.1 次级代谢产物结构鉴定

石果衣共生菌次级代谢产物结构详见图 1。

石果衣共生藻柯氏复球藻次级代谢产物结构详见图 2。

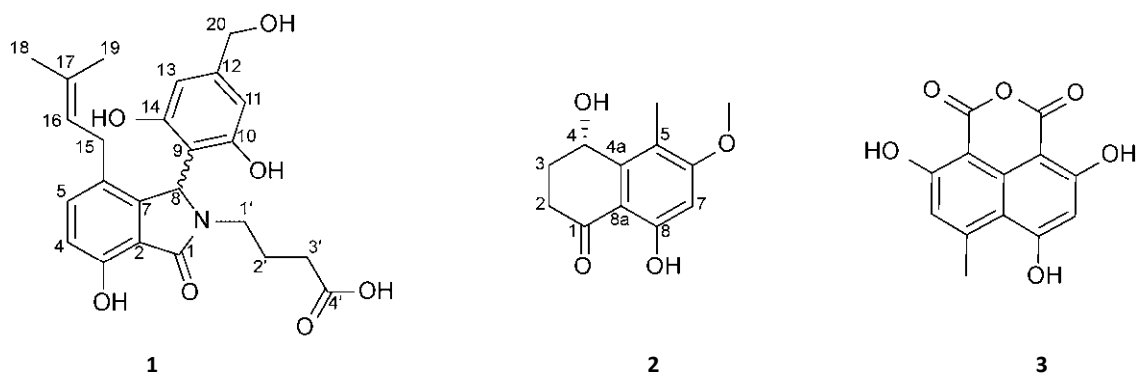


图 1 石果衣菌素 A (1)、石果衣菌素 B (2) 和 4,6,9-三羟基-7-甲基-1H,3H-萘并[1,8-cd]吡喃-1,3-二酮 (3) 结构

Fig. 1 The structures of endocarpin A (1), endocarpin B (2) and lamellicolic anhydride (3).

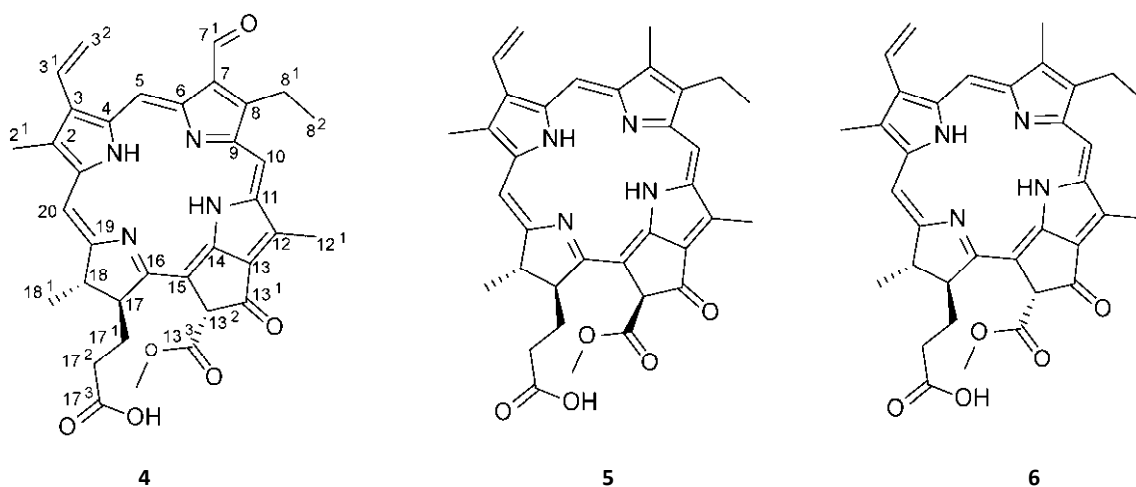


图 2 脱镁叶绿素甲酯酸 b (4)、13-表-脱镁叶绿素甲酯酸 a (5) 和脱镁叶绿素甲酯酸 a (6) 结构

Fig. 2 The structures of phaeophorbide b (4), 13-*epi*-phaeophorbide a (5) and phaeophorbide a (6).

2.2 化合物鉴定

2.2.1 化合物 1: 黄色粉末, $[\alpha]_{25}^D$ 0 (c 0.03, MeOH); UV (DMSO) λ_{\max} nm (log ϵ) 210(1.95), 305(0.28); IR (neat) ν_{\max} : 3 416, 2 930, 1 633, 1 443, 1 393, 1 286, 1 264, 1 208, 1 154, 961, 826 cm^{-1} . ^1H NMR(500MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 6.99(1H, d, $J = 8.2\text{Hz}$, H-5), 6.68(1H, d, $J = 8.2\text{Hz}$, H-4), 6.38(1H, br. s, H-11), 6.07(1H, br. s, H-13), 6.07(1H, s, H-8), 4.91(1H, t, $J = 7.5\text{Hz}$, H-16), 4.30(2H, s, H-20), 3.64(1H, m, H-1'b), 3.02(1H, dd, $J = 15.5, 7.5\text{Hz}$, H-15b), 2.84(1H, dd, $J = 16.4, 8.1\text{Hz}$, H-15a), 2.61(1H, dd, $J = 14.3, 7.6\text{Hz}$, H-1'a), 2.08(2H, d, $J = 12.4\text{Hz}$, H-3'), 1.70(2H, dt, $J = 14.0, 7.1\text{Hz}$, H-2'), 1.56(3H, s, H-19), 1.50(3H, s, H-18). ^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 175.0(C-4'), 169.5(C-1), 157.8(C-14), 157.7(C-10), 153.1(C-3), 145.3(C-7), 144.7(C-12), 132.7(C-5), 131.7(C-17), 127.0(C-6), 122.9(C-16), 118.2(C-2), 114.4(C-4), 105.7(C-9), 105.0(C-13), 104.6(C-11), 63.1(C-20), 55.1(C-8), 39.0(C-1'), 32.8(C-3'), 28.8(C-15), 25.9(C-19), 24.1(C-2'), 18.0(C-18)。HMBC 相关 (500MHz, DMSO- d_6): H-4 \rightarrow C-1, 2, 3, 6; H-5 \rightarrow C-3, 7, 8, 15; H-8 \rightarrow C-1, 2, 6, 7, 9, 10, 14; H-11 \rightarrow C-9, 10, 20; H-13 \rightarrow C-9, 14, 20; H-20 \rightarrow C-11, 12, 13; H₂-15 \rightarrow C-6, 7, 16, 17; H-16 \rightarrow C-15, 18, 19; H-18 \rightarrow C-16, 17, 19; H-19 \rightarrow C-16, 17, 18; H₂-1' \rightarrow C-1, 8, 2', 3'; H₂-2' \rightarrow C-1', 3'; H₂-3' \rightarrow C-2', 4'。

正源高分辨电喷雾质谱图显示其准分子离子峰为 m/z 442.1863 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 对应分子式 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{NO}_7$ (计算值为 442.1866; 不饱和度为 12)。分析 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、HMQC (表 1) 表明该化合物含有 2 个羰基碳 (δ_{C} 169.5, 175.0)、3 个 sp^2 杂化的连氧碳、5 个 sp^2 杂化的次甲基碳、6 个 sp^2 杂化的季碳、1 个次甲基碳、5 个亚甲基碳 (1 个与氧相连)、2 个甲基碳。依据核磁数据及化合物的不饱和度推测, 化合物 1 的结构中含有 3 个环。分析 1 的 ^1H - ^1H COSY, 发现 1 中含有 C-4-C-5、

C-15-C-16 以及 C-1'-C-3' 自旋耦合体系。分析 1 的 HMBC 相关谱, H-5 与 C-7、C-8 (1 个四键的 W 型耦合) 相关, H-4 与 C-1 (1 个四键的 W 型耦合) (Lösger *et al.* 2007)、C-2、C-3 相关, H-8 与 C-1、C-2、C-6 相关, 确定化合物的基本骨架含有异吲哚环。化合物 1 的 C-1 (δ_{C} 169.5)、C-8 (δ_{C} 55.1) 的化学位移, 与含有异吲哚-1-酮的 pestalachloride A (Li *et al.* 2008)、sterenin K (Wang *et al.* 2014) 中相应位置的碳化学位移一致, 它们具有相似结构骨架, 都含有异吲哚-1-酮的骨架。分析 HMBC, H-18、H-19 分别与 C-16、C-17 相关, H₂-15 与 C-6 相关, 确定了异戊烯基 C-15-C-18/C-19; H₂-3' 与 C-4' 相关, C-3' 与 C-4' 相连, 确定了丁酸片段 C-1'-C-4'; H-13 与 C-9、C-14 相关, H-11 与 C-9、C-10 相关, H-13、H-11 为单峰, 确定了苯环基本结构。而且 H-20 与 C-11、C-12、C-13 有相关信号, 确定 C-20 与 C-12 相连, C-20 化学位移在 63.1, 确定 C-20 连氧, 从而确定了 1,3,4,5-四取代苯环结构片段; H-4 与 C-3 (δ_{C} 153.1) 相关, C-3 连氧。综上, 可确定化合物 1 具有剩下 3 个片段: 异戊烯基 C-15-C-18/C-19, 丁酸片段 C-1'-C-4', 1,3,4,5-四取代苯环。分析 HMBC, H₂-15 与 C-6、C-7 相关, H-5 与 C-15 相关, 从而确定异戊烯基连接在 C-6 上; H-8 与 C-9、C-10、C-14 相关, C-10 化学位移在 157.7, C-14 化学位移在 157.8, 确定 C-10、C-14 连氧, 进而确定 C-8 与 C-9 相连; H₂-1' 与 C-1、C-8 有 HMBC 相关信号, 结合与化合物 1 相似的 sterenin K 丁酸片段化学位移的比对, 确定 C-1' 与氮相连, 从而确定了化合物 1 的平面结构。化合物 1 与 pestalachloride A、entonalactam A (Choomuenwai *et al.* 2015) 均属于异吲哚-1-酮生物碱化合物, C-8 所处化学环境相似; pestalachloride A、entonalactam A 均为外消旋体, 比旋光值为 0; 化合物 1 所测比旋光值也为 0, CD 测试没有明显的 CD 效应, 表明化合物 1 是外消旋体 (图 3)。

表 1 化合物 1 的 NMR 数据 (DMSO- d_6)Table 1 NMR spectroscopic data (DMSO- d_6) for compound 1

Position	δ_H (J in Hz)	δ_C	1H - 1H COSY (H \rightarrow H)	HMBC (H \rightarrow C#)
1		169.5		
2		118.2		
3		153.1		
4	6.68, d (8.2)	114.4	5	1, 2, 3, 6
5	6.99, d (8.2)	132.7	4	3, 7, 8, 15
6		127.0		
7		145.3		
8	6.07, s	55.1		1, 2, 6, 7, 9, 10, 14
9		105.7		
10		157.7		
11	6.38, br. s	104.6	13	9, 10, 20
12		144.7		
13	6.07, br. s	105.0	11	9, 14, 20
14		157.8		
15	2.84, dd (16.4, 8.1)	28.8	16	6, 7, 16, 17
16	3.02, dd (15.5, 7.5)		16	
17	4.91, t(7.5)	122.9	15	15, 18, 19
18		131.7		
19	1.50, s	18.0	15, 16	16, 17, 19
20	1.56, s	25.9	15, 16	16, 17, 18
21	4.30, s	63.1		11, 12, 13
1'	2.61, dd (14.3, 7.6)	39.0	2'	1, 8, 2', 3'
2'	3.64, m		2'	
3'	1.70, dt (14.0, 7.1)	24.1	1', 3'	1', 3'
4'	2.08, d (12.4)	32.8	2'	4', 2'
5'		175.0		

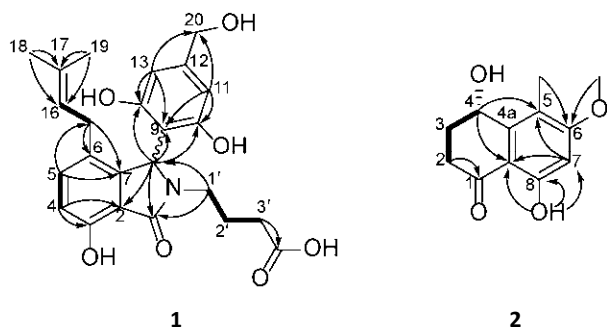


图 3 化合物 1 和化合物 2 的 HMBC

Fig. 3 Key HMBC (\rightarrow) correlations of compounds 1 and 2.

2.2.2 化合物 2: 淡黄色粉末, $[\alpha]_{25}^D +30.4$ (c 0.03, $CHCl_3$); CD (c 2.22×10^{-3} M, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 210 (+7.76), 237 (+1.59), 257 (-0.69), 280 (+0.95), 307 (-3.80); UV (DMSO) λ_{max} nm ($\log \epsilon$) 236(4.21), 282(4.05), 334(2.87); IR (neat) ν_{max} : 3 413, 3 048, 1 647, 1 438, 1 405, 1 261, 1 039, 824 cm^{-1} . 1H NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ_H : 13.13 (1H, s, OH-8), 6.39(1H, s, H-7), 5.17(1H, t, $J = 3.1$ Hz, H-4), 3.86(3H, s, OCH_3 -6), 3.10(1H, ddd, $J = 17.8, 13.9, 5.2$ Hz, H-2b), 2.52(1H, ddd, $J = 17.8, 4.6, 2.5$ Hz, H-2a), 2.31(1H, m, H-3b), 2.21(3H, s, CH_3 -5), 2.16(1H, m, H-3a). ^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$) δ_C : 203.4(C-1), 165.0(C-6), 164.3(C-8), 141.8(C-4a), 116.8(C-5), 109.5(C-8a), 99.1(C-7), 63.7(C-4), 56.0(OCH_3 -6), 31.8(C-2), 29.7(C-3), 10.5(CH_3 -5). HMBC (500MHz, $CDCl_3$); H_2 -2 \rightarrow C-1, 3, 4; H_2 -3 \rightarrow C-2; H-4 \rightarrow C-2, 5, 8a; CH_3 -5 \rightarrow C-4a, 5, 6, 7, 8a; OCH_3 -6 \rightarrow C-6; H-7 \rightarrow C-5, 8, 8a; OH-8 \rightarrow C-7, 8, 8a.

正源高分辨电喷雾质谱图显示其准分子离子峰为 m/z 223.0973 $[M+H]^+$, 对应分子式 $C_{12}H_{15}O_4$ (计算值为 223.0970; 不饱和度为 6)。分析 1H NMR、 ^{13}C NMR、HMQC (表 2) 表明该化合物含有 1 个羰基碳 (δ_C 203.4)、2 个 sp^2 杂化的连氧碳、1 个 sp^2 杂化的次甲基碳、3 个 sp^2 杂化的季碳、1 个甲氧基碳、1 个次甲基碳、2 个亚甲基碳、1 个甲基碳。分析核磁数据及化合物的不饱和度推测 2 的结构中含有 2 个环。分析化合物 2 的 1H - 1H COSY, 发现 2 中含有 C-2-C-4 自旋耦合体系。6 个 sp^2 杂化碳 (C-4a-C-8a) 的化学位移在 141.8、116.8、165.0、99.1、164.3、109.5, 确定化合物 2 结构中有一个苯环片段。分析化合物 2 的 HMBC 相关谱, 羟基氢 (δ_H 13.13) 与 C-7、C-8 和 C-8a 相关, 其中与 C-8 的相关信号最强, 确定羟基连在 C-8 上, 而羟基氢的化学位移在 13.13, 表明存在分子内氢键作用, C-8 的间位有羰基; H-2 与 C-1 相关, 确定 C-2 与羰基相连; H-4 与 C-5、C-8a 相关, 确定了 C-4 与 C-4a 相连, 同时确定了 C-7 与 C-8a 的位置。C-4 的化学位移在 63.35, H-4 的化学位移在 5.17, 确

定 C-4 连氧; 甲基氢与 C-4a、C-5 和 C-6 相关, 其中与 C-5 的相关信号最强, 确定甲基连在 C-5 上; 甲氧基中氢的化学位移在 3.87, 与 C-6 相关, 确定甲氧基连在 C-6, 从而确定 **2** 的平面结构。化合物 **2** 与 (4S)-4,8-二羟基-6-甲基-7-甲基-1-四氢萘酮 (**7**) 结构类似 (Shan *et al.* 1997)。化合物 **2** 与 **7** 的 C-4 位所处的化学环境基本相同, 化合物 **2** 的比旋光, $[\alpha]_{25}^D +30.4$ (c 0.03, CHCl_3) 与化合物 **7** 的实验值 (+33, CHCl_3) 以及计算值 (+38.7, CHCl_3) (沈岚等 2011) 数据一致, 表明化合物 **2** 中 C-4 位的绝对构型与化合物 **7** 相同, 为 S 型 (图 4)。

表 2 化合物 **2** 的 NMR 数据 (CDCl_3)

Table 2 NMR spectroscopic data (CDCl_3) for compound **2**

Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	^1H - ^1H COSY (H \rightarrow H)	HMBC (H \rightarrow C#)
1		203.4		
2	2.52, ddd (17.8, 4.6, 2.5) 3.10, ddd (17.8, 13.9, 5.2)	31.8	2b, 3a, 3b	1, 3, 4
3	2.16, m 2.31, m	29.7	2a, 2b, 3b 2a, 2b, 3a	2
4	5.17, t (3.1)	63.7	3a, 3b	2, 5, 8a
4a		141.8		
5		116.8		
CH_3 -5	2.21, s	10.5		4a, 5, 6, 7, 8a
6		165.0		
OCH_3 -6	3.86, s	56.0		6
7	6.39, s	99.1		5, 8, 8a
8		164.3		
OH-8	13.13, s			7, 8, 8a
8a		109.5		

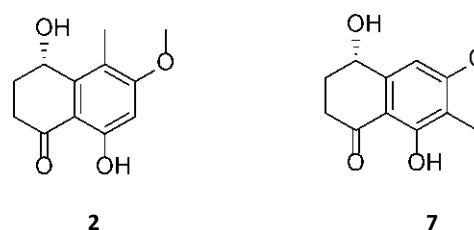


图 4 石果衣菌素 B (**2**) 和 (4S)-4,8-二羟基-6-甲基-7-甲基-1-四氢萘酮 (**7**) 结构

Fig. 4 The structures of endocarpin B (**2**) and (4S)-4,8-Dihydroxy-6-methoxy-7-methyl-1-tetralone (**7**).

2.2.3 化合物 **3**: 淡黄色晶体, ^1H NMR(500MHz, acetone-d_6) δ_{H} : 6.88 (1H, s, H-10), 6.59(1H, s, H-1), 2.87(3H, s, H_3 -12)。 ^{13}C NMR (125MHz, acetone-d_6) δ_{C} : 168.2(C-2), 167.9(C-14), 166.3(C-9), 166.1(C-7), 165.5(C-5), 151.9(C-11), 136.7(C-4), 118.1(C-10), 112.6(C-13), 100.5(C-1), 98.3(C-8), 93.1(C-3), 25.5(C-12)。 (+)-ESIMS m/z 261.03[M + H]⁺。碳谱和氢谱的数据与 4,6,9-三羟基-7-甲基-1H,3H-萘并 [1,8-cd] 吡喃-1,3-二酮 (lamellicolic anhydride) (Elsebai *et al.* 2011) 一致。

2.2.4 化合物 **4**: 灰黑色粉末, ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ_{H} : 11.14(1H, s, H-7¹), 10.37(1H, s, H-5), 9.65(1H, s, H-10), 8.55(1H, s, H-20), 8.00(1H, dd, J = 17.9, 11.6Hz, H-3¹), 6.37(1H, d, J = 17.9Hz, H-3^{2b}), 6.24(1H, d, J = 2.4Hz, H-3^{2a}), 6.21(1H, s, H-13²), 4.45(1H, d, J = 8.0Hz, H-18), 4.20(1H, d, J = 9.7Hz, H-17), 4.05(1H, d, J = 7.8Hz, H-8¹), 3.87(3H, s, H-OMe), 3.67(3H, s, H-12¹), 3.38(3H, s, H-2¹), 2.57–2.67 (2H, m, H-17²), 2.19–2.40 (2H, m, H-17¹)。 ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ_{C} : 189.6(C-13¹), 187.9(C-7¹), 175.3(C-19), 174.1(C-17³), 169.4(C-13³), 164.1(C-16), 159.7(C-8), 151.4(C-6), 150.9(C-14), 147.3(C-9), 143.8(C-1), 138.2(C-11), 137.9(C-3), 137.4(C-4), 133.1(C-7), 132.7(C-13), 132.4(C-2), 129.8(C-12), 128.8(C-3¹), 123.8(C-3²), 107.2(C-10), 105.0(C-15), 101.8(C-5), 93.6(C-20), 64.7(C-13²), 53.2(C-OMe), 51.4(C-17), 50.3(C-18), 30.8(C-17²),

29.9(C-17¹), 23.2(C-18¹), 19.6(C-8²), 19.3(C-8¹), 12.49(C-12¹), 12.2(C-2¹)。 (+)-ESIMS *m/z* 607.25[M+H]⁺。氢谱的数据与脱镁叶绿素甲酯酸 b (phaeophorbide b) (Michael & Walter 1980) 一致。

2.2.5 化合物 5: 黑绿色粉末, ¹H NMR(500MHz, CDCl₃)δ_H: 9.43(1H, s, H-10), 9.28(1H, s, H-5), 8.54(1H, s, H-20), 7.91(1H, dd, *J* = 17.8, 11.5Hz, H-3¹), 6.26(1H, s, H-13²), 6.22(1H, d, *J* = 17.9Hz, H-3^{2b}), 6.13(1H, d, *J* = 11.6Hz, H-3^{2a}), 4.45(1H, tt, *J* = 7.8, 3.8Hz, H-18), 4.20(1H, d, *J* = 9.0Hz, H-17), 3.86(3H, s, H-OMe), 3.63(3H, s, H-12¹), 3.59(2H, t, *J* = 7.7Hz, H-8¹), 3.36(3H, s, H-2¹), 3.15(3H, s, H-7¹), 2.62 (1H, m, H-17^{1b}), 2.58(1H, m, H-17^{2b}), 2.31 (1H, m, H-17^{1a}), 2.24(1H, m, H-17^{2a}), 1.81(3H, d, *J* = 7.3Hz, H-18¹), 1.65(3H, t, *J* = 7.2Hz, H-8²)。 ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ_C: 189.7(C-13¹), 177.8(C-17³), 172.2(C-19), 169.8(C-13³), 161.3(C-16), 155.7(C-6), 151.0(C-9), 149.8(C-14), 145.3(C-8), 142.2(C-1), 138.0(C-11), 136.6(C-4), 136.4(C-7), 136.3(C-3), 132.0(C-2), 129.2(C-12), 129.2(C-3¹), 129.0(C-13), 122.9(C-3²), 105.3(C-15), 104.5(C-10), 97.7(C-5), 93.3(C-20), 64.8(C-13²), 53.0(C-OMe), 51.2(C-17), 50.2(C-18), 30.9(C-17²), 29.8(C-17¹), 23.3(C-18¹), 19.5(C-8¹), 17.5(C-8²), 12.2(C-12¹), 12.2(C-2¹), 11.3(C-7¹)。 (+)-ESIMS *m/z* 593.28[M+H]⁺。碳谱和氢谱的数据与 13-表-脱镁叶绿素甲酯酸 a (13-*epi*-phaeophorbide a) (Duan *et al.* 2002) 一致。

2.2.6 化合物 6: 暗绿色粉末, ¹H NMR(500MHz, CDCl₃)δ_H: 9.48(1H, s, H-10), 9.34(1H, s, H-5), 8.49(1H, s, H-20), 7.97(1H, dd, *J* = 17.9, 11.5Hz,

H-3¹), 6.28(1H, d, *J* = 17.9Hz, H-3^{2b}), 6.17(1H, d, *J* = 11.6Hz, H-3^{2a}), 6.14(1H, s, H-13²), 4.44(1H, q, *J* = 7.4 Hz, H-18), 4.29(1H, d, *J* = 7.2Hz, H-17), 3.84(3H, s, H-OMe), 3.68(2H, t, *J* = 2.8Hz, H-8¹), 3.65(3H, s, H-12¹), 3.37(3H, s, H-2¹), 3.22(3H, s, H-7¹), 2.51 (1H, m, H-17^{1b}), 2.48(1H, m, H-17^{2b}), 2.33 (1H, m, H-17^{1a}), 2.27(1H, m, H-17^{2a}), 1.68(3H, t, *J* = 7.6Hz, H-8²), 1.62(3H, d, *J* = 7.3Hz, H-18¹)。 ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃)δ_C: 189.8(C-13¹), 175.6(C-17³), 172.5(C-19), 171.1(C-13³), 160.8(C-16), 156.2(C-6), 151.1(C-9), 150.6(C-14), 145.5(C-8), 142.4(C-1), 138.0(C-11), 136.9(C-4), 136.5(C-7), 136.5(C-3), 132.2(C-2), 129.2(C-12), 129.2(C-3¹), 129.0(C-13), 123.0(C-3²), 105.9(C-15), 104.8(C-10), 97.7(C-5), 93.3(C-20), 65.9(C-13²), 53.3(C-OMe), 51.7(C-17), 51.0(C-18), 32.1(C-17²), 29.9(C-17¹), 22.7(C-18¹), 19.6(C-8¹), 17.6(C-8²), 12.3(C-12¹), 12.2(C-2¹), 11.49(C-7¹)。

(+)-ESIMS *m/z* 593.27[M+H]⁺。碳谱和氢谱的数据与脱镁叶绿素甲酯酸 a (phaeophorbide a) (Cheng *et al.* 2001; Chee *et al.* 2005; Hargus *et al.* 2007) 一致。

2.3 抗氧化试验

在 200μmol/L 下, 化合物 4 具有中等的 DPPH 自由基清除活性, 其半数抑制浓度 IC₅₀ 在 (69.77±0.10)μmol/L。

2.4 抗菌活性测试

化合物 3 对 *Staphylococcus aureus* 和 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 有抑制活性, MIC 值分别为 25.0μg/mL 和 25.0μg/mL。化合物 3 和化合物 5 对 *Mycobacterium bovis* 有抑制活性, MIC 值分别为 40.0μg/mL 和 10.0μg/mL。

表 3 化合物 1-6 的抗菌活性

Table 3 Antimicrobial activities of compounds 1-6

Microorganism strain	Minimum inhibitory concentration (μg/mL)						
	1	2	3	4	5	6	Control
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	>100	>100	25.0	>100	>100	>100	0.625 ^a
MRSA ^b (clinical strain)	>100	>100	25.0	>100	>100	>100	0.625 ^a
<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG Pasteur 1173P2)	>80	>80	40.0	>80	10.0	>80	0.05 ^c

Note: ^a Vancomycin; ^b Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; ^c Isoniazid.

3 讨论

本研究以荒漠地衣石果衣(采集号为 Z07012)子囊壳中释放的共生菌子囊孢子及其共生藻柯氏复球藻 *D. chodatii* Bialuknia (张涛 2011) 作为材料进行次级代谢产物的初步研究。从石果衣共生菌中分离得到的化合物 **2** 和化合物 **3** 均为萘醌类化合物, 两者结构中均含有聚酮单元, 表明系 PKS 基因表达的结果; 而化合物 **1** 中含有丝氨酸单元和聚酮类单元, 可能是 PKS-NRPS 基因共同表达的结果。

在菌藻共生状态下的石果衣未检测出任何次级代谢产物可能与其共生藻柯氏复球藻提供的光合碳化物山梨糖醇 (sorbitol) 的影响有关 (Elshobary *et al.* 2016)。对此问题, 有待进一步研究。

从共生藻中分离得到 3 个脱镁叶绿素类化合物, 其中脱镁叶绿素甲酯酸 b (phaeophorbide b) 具有中等的 DPPH 清除活性; 13-表-脱镁叶绿素甲酯酸 a (13-*epi*-phaeophorbide a) 对 *Mycobacterium bovis* 有较好的抑制活性, 能抑制 IL-2、IFN- γ 的合成量 (Duan *et al.* 2002); 脱镁叶绿素甲酯酸 a (phaeophorbide a) 具有细胞毒活性 (Cheng *et al.* 2001), 抗炎活性 (Okai & Higashi 1997), 可作为光敏剂 (Tang *et al.* 2009), 并能够诱导细胞凋亡等 (Tang *et al.* 2009)。

由此可见, 由于菌藻共生状态下的地衣次级代谢产物的研发受到相关基因沉默以及难以培养的制约, 以地衣共生菌藻为对象分别进行研究, 既可以通过不同途径激活其 PKS 基因和 NRPS 基因等以丰富化合物资源库, 又可以通过液体深层培养途径进行规模化生产, 为药用活性物质筛选开辟新的研发途径。

[REFERENCES]

Chee CF, Lee HB, Ong HC, Ho AS, 2005. Photocytotoxic pheophorbide-related compounds from *Aglaonema simplex*. *Chemistry & Biodiversity*, 2(12): 1648-1655
Cheng HH, Wang HK, Ito J, Bastow KF, Tachibana Y, Nakanishi

Y, Xu Z, Luo TY, Lee KH, 2001. Cytotoxic pheophorbide-related compounds from *Clerodendrum calamitosum* and *C. cyrtophyllum*. *Journal of Natural Products*, 64(7): 915-919
Choomuenwai V, Beattie KD, Healy PC, Andrews KT, Fechner N, Davis RA, 2015. Entonolactams A-C: isoindolinone derivatives from an Australian rainforest fungus belonging to the genus *Entonaema*. *Phytochemistry*, 117: 10-16
Duan H, Takaishi Y, Momota H, Ohmoto Y, Taki T, 2002. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. *Phytochemistry*, 59(1): 85-90
Elsebai MF, Kehraus S, Lindequist U, Sasse F, Shaaban S, Gutschow M, Josten M, Sahl HG, König GM, 2011. Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(3): 802-808
Elshobary ME, Osman ME, Abo-Shady AM, Komatsu E, Perreault H, Sorensen J, Piercey-Normore MD, 2016. Algal carbohydrates affect polyketide synthesis of the lichen-forming fungus *Cladonia rangiferina*. *Mycologia*, 108(4): 646-656
Hargus JA, Fronczek FR, Vicente MG, Smith KM, 2007. Mono-(L)-aspartylchlorin-e6. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5): 1006-1015
Li EW, Jiang LH, Guo LD, Zhang H, Che YS, 2008. Pestalochlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(17): 7894-7899
Lösger S, Schlörke O, Meindl K, Herbst-Irmer R, Zeeck A, 2007. Structure and biosynthesis of chaetocyclinones, new polyketides produced by an endosymbiotic fungus. *European Journal of Organic Chemistry*, 2007: 2191-2196
Ma K, Han JJ, Bao L, Wei T, Liu H, 2014. Two sarcoviolins with antioxidative and alpha-glucosidase inhibitory activity from the edible mushroom *Sarcodon leucopus* collected in Tibet. *Journal of Natural Products*, 77(4): 942-947
Michael WR, Walter AS, 1980. Synthesis of covalently linked dimeric derivatives of chlorophyll a, pyrochlorophyll a, chlorophyll b, and bacteriochlorophyll a. *Journal of Organic Chemistry*, 45(10): 1969-1974
Nash TH III, Ryan BD, Gries C, Bungartz F, 2002. Lichen flora of the Greater Sonoran Desert Region. Vol. 1. Lichens

- Unlimited, Arizona State University, Arizona. 1-531
- Nash TH III, Gries C, Bungartz F, 2007. Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region. Vol. 3. Lichens Unlimited, Arizona State University, Arizona. 1-567
- Okai Y, Higashi OK, 1997. Potent anti-inflammatory activity of pheophytin a derived from edible green alga, *Enteromorpha prolifera* (SuJiao-nori). *International Journal of Immunopharmacology*, 19(6): 355
- Shan R, Stadler M, Anke H, Sterner O, 1997. Naphthalenone and phthalide metabolites from *Lachnum papyraceum*. *Journal of Natural Products*, 60(8): 804-805
- Shen L, Zhao SD, Zhu HJ, 2011. Absolute configuration determination for natural products (I)—absolute configuration determination for ketone, lactone and alcohol by comparing computed optical rotations and ^{13}C NMR with the experimental results. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 32(11): 2568-2573 (in Chinese)
- Shrestha G, Clair LL, 2013. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews*, 12(1): 229-244
- Song FH, Liu XR, Guo H, Ren B, Chen CX, Piggott AM, Yu K, Gao H, Wang Q, Liu M, Liu XT, Dai HQ, Zhang LX, Capon RJ, 2012. Brevianamides with antitubercular potential from a marine-derived isolate of *Aspergillus versicolor*. *Organic Letters*, 14(18): 4770-4773
- Tang MK, Zhang DM, Xuan NHB, Tsui KW, Waye MY, Kong SK, 2009. Photodynamic therapy inhibits p-glycoprotein mediated multi-drug resistance via JNK activation in human hepatocellular carcinoma using the photosensitizer pheophorbide a. *Molecular Cancer*, 8(1): 56
- Wang BT, Qi QY, Ma K, Pei YF, Han JJ, Xu W, Li EW, Liu HW, 2014. Depside alpha-glucosidase inhibitors from a culture of the mushroom *Stereum hirsutum*. *Planta Medica*, 80(11): 918-924
- Wang JH, 2016. A new lichen species of *Sarcogyne* and preliminary study of its fungal secondary metabolites. Master Thesis, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing. 1-51 (in Chinese)
- Wang JH, Wei JC, Li EW, 2016. A preliminary study of the isoprenylated chromones from lichenized fungus *Sarcogyne parviascifera*. *Mycosystema*, 36(4): 492-502 (in Chinese)
- Wang YY, Liu B, Zhang XY, Zhou QM, Zhang T, Li H, Yu YF, Zhang XL, Hao XY, Wang M, Wang L, Wei JC, 2014. Genome characteristics reveal the impact of lichenization on lichen-forming fungus *Endocarpon pusillum* Hedwig (Verrucariales, Ascomycota). *BMC Genomics*, 15: 34-52
- Wei JC, 2018. An enumeration of lichenized and lichenicolous fungi in China. China Forestry Publishing House, Beijing. 1-586 (in press)
- Zhang T, 2011. A preliminary research on the biology of vegetative reproduction and resistance of desert lichen symbionts. PhD Dissertation, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing. 50-51 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 沈岚, 赵声定, 朱华结, 2011. 天然产物的绝对构型研究(I)——通过比较旋光和碳谱的实验值与计算值确定酮类、内酯类和醇类化合物的绝对构型. *高等学校化学学报*, 32(11): 2568-2573
- 王娇红, 2016. 网盘衣属地衣新种及其真菌次级代谢产物的初步研究. 中国科学院微生物研究所硕士论文, 北京. 51
- 王娇红, 李二伟, 魏江春, 2016. 小囊网盘衣真菌新色原酮类次级代谢产物初步研究. *菌物学报*, 36(4): 492-502
- 张涛, 2011. 荒漠地衣共生菌藻营养繁殖及其抗旱生物学初步研究. 中国科学院微生物研究所博士论文, 北京. 50-51

(本文责编: 韩丽)