

◆特邀栏目◆

海洋来源真菌 *Penicillium citrinum* 的化学成分及其活性研究*杨素梅¹, 杨曦亮^{1**}, 肖绍羽佳¹, 周梦蝶¹, 张亚妮², 吴兆圆², 刘芳², 刘曼丽², 方伟^{2**}

(1. 武汉科技大学医学院药理学系, 湖北武汉 430065; 2. 湖北省农业科学研究院, 湖北省生物农药工程研究中心, 湖北武汉 430064)

摘要:为研究海洋来源真菌橘青霉(*Penicillium citrinum*)的次生代谢产物及其活性,采用凝胶柱层析、正相硅胶柱层析以及高效液相色谱等方法对菌株发酵液的乙酸乙酯提取物进行分离,通过LC-MS、NMR结构鉴定和文献数据对比等方法进行鉴定。结果表明,分离到的7个已知化合物经鉴定分别为3,3-二吡啶烷基-1,2-丙二醇(**1**)、robillafuran(**2**)、asperfuran A(**3**)、gamahorin(**4**)、7-羟基-5-甲氧基-4,6-二甲基-异苯并呋喃酮(**5**)、5-甲氧基-4,6-二甲基-7-氧- α -L-鼠李糖基-异苯并呋喃酮(**6**)、pestynol(**7**)。化合物**1-7**均为首次从青霉属真菌中分离得到,化合物**1**首次从真菌的次生代谢产物中发现。活性筛选结果表明,化合物**7**具有抗菌活性,化合物**1**和**7**对Marc-145细胞具有较强的细胞毒活性,半数致死浓度(Median Lethal Concentration, LC₅₀)值分别为57.397 μ g/mL和35.386 μ g/mL;在LPS诱导的BV-2细胞模型中,化合物**2**和**4**在浓度为12 μ g/mL时,BV-2细胞的存活率分别为76.77%和69.69%,具有潜在的抗神经炎症活性。

关键词:橘青霉 真菌 次生代谢产物 神经炎症 细胞毒活性

中图分类号:R284.1,R284.2 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2022)04-0760-08

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20220616.002

海洋微生物是海洋天然产物的主要来源,海洋来源的真菌逐渐成为发现活性代谢产物的重要目标之一,具有潜在的治疗应用前景。其中丝状真菌因其庞大的元基因组和复杂的遗传背景,成为具有生物活性天然产物的重要来源^[1]。与陆生真菌相比,海洋真菌在高压、低温、有限光照和缺乏营养的极端海洋环境

中可以产生更多新的次生代谢产物。近年来,已经陆续从海洋来源青霉属(*Penicillium*)真菌中分离出结构新颖且活性良好的次生代谢产物,具有抑制酶活性^[2]、抑菌^[3]、抑制氧自由基^[4]等功效。因此,青霉菌在药物开发中起着至关重要的作用。

橘青霉(*Penicillium citrinum*)是一种具有广谱

收稿日期:2022-03-31

* 国家自然科学基金项目(31900286),湖北省自然科学基金项目(2020CFB521)和武汉亚心总医院科研创新基金项目(2022KYCX1-A02)资助。

【作者简介】

杨素梅(1997-),女,硕士,主要从事天然产物及其活性研究,E-mail:ysm03_19@163.com。

【**通信作者】

杨曦亮(1980-),女,博士,副教授,主要从事天然产物及其活性研究,E-mail:yxlyx1117@163.com。

方伟(1983-),男,博士,副研究员,主要从事天然产物及其活性研究,E-mail:wei.fang@nberc.com。

【引用本文】

杨素梅,杨曦亮,肖绍羽佳,等.海洋来源真菌 *Penicillium citrinum* 的化学成分及其活性研究[J].广西科学,2022,29(4):760-767.

YANG S M, YANG X L, XIAO S Y J, et al. Studies on the Chemical Constituents and Activities of Marine-derived Fungus *Penicillium citrinum* [J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(4): 760-767.

抗菌活性的真菌,其粗提物对人类致病菌嗜水气单胞杆菌 (*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、须毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) 均有抑制作用^[5,6],为产生具有生物活性的化合物提供了新的思路。橘青霉次生代谢产物中的橘霉素二聚体衍生物 penicitol D 和 1-epi-citrinin H1 具有抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性^[7], penicitrinone A 对乳腺癌细胞 MCF-7 具有细胞毒作用^[8],能抑制黑色素瘤细胞 A-375 增殖和转移^[9],且具有抑制乳腺癌细胞迁移和增殖的作用^[10]。

此前,本课题组已从海藻内生真菌 *Penicillium citrinum* SCSIO41402 中发现了两个新的化合物 Sorbicillfurans A 和 Sorbicillfurans B,这两个化合物是含双环[2.2.2]辛烷和四氢呋喃结构的山梨素加合物,其中 Sorbicillfurans B 对人白血病细胞系 HL-60 有细胞毒作用^[11]。为进一步研究该菌株的活性次生代谢产物,本研究对其进行扩大发酵培养及运用色谱、光谱技术对发酵液的乙酸乙酯提取物进行分离纯化,并对所获单体化合物进行抗神经炎症活性、抗菌活性和细胞毒活性测试,从中筛选出活性成分,旨在发现新颖的活性天然产物,为天然产物的研究和开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

腔节藻属 (*Coelarthrum*) 海藻采集于南海永兴岛 (16°50' N, 112°20' E) 的珊瑚礁,从中分离得到真菌菌株 SCSIO41402,根据菌株的形态特征和 ITS 序列区域,将其鉴定为 *Penicillium citrinum*,该信息已保存于 GenBank 数据库中,登录号为 MK988578。该菌株在 MB 琼脂培养基(麦芽提取物 15 g,人造海盐 24.4 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 L, pH 值 7.4-7.8)斜面上 4℃ 保存,存放于中国科学院南海海洋研究所热带海洋生物资源与生态重点实验室。

1.1.2 试剂

RPMI-1640 (Hyclone, SH30809.01B); DMEM 培养基 (Hyclone, SH30243.01B); 胎牛血清 (Hyclone; SH30084.03); PBS (Life, C10010500BT); MTT (Sigma, M5655-1G); LPS (Sigma, L2630-10

mg); Donepezil (MCE, HY-14566); Sunfire C18 OBD 色谱柱 (美国 Waters 公司); 柱色谱用硅胶 (200-300 目,青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 凝胶 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 瑞士); 制备级乙腈 (湖北弗顿生化科技有限公司); LC-MS 级乙腈和甲醇 (美国飞世尔科学世界公司); 其他试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.3 仪器与设备

Centrifuge 离心机 (德国 Eppendorf 公司); HGC-36A 氮吹仪 (天津市恒奥科技发展有限公司); Rotavapor R-200 旋转蒸发器 (瑞士 BUCHI 公司); Bruker AVANCE 核磁共振仪 (德国 Bruker BioSpin 公司); Waters 2695 超高压液质联用色谱仪 (美国 Waters 公司); Waters 2767 制备型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); MicroBeta2 多功能微孔板检测仪 (美国 PerkinElmer 公司); Neofuge 15R 冷冻离心机 [力新仪器 (上海) 有限公司]; HF160W 水套式 CO₂ 培养箱 [力新仪器 (上海) 有限公司]; IX71 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 发酵与提取

从 PDA 培养基 (马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L) 斜面挑取菌株 *Penicillium citrinum* SCSIO41402,接种于 100 mL PDB 培养基 (马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L),置于恒温摇床上 150 r/min, 28℃ 振荡培养 2 d,按照 5% 的接种量转接于发酵培养基 (麦芽糖 6.25 g/L, 麦芽提取物 6.25 g/L, 酵母提取物 1 g/L, 蛋白胨 0.625 g/L, 磷酸二氢钾 1.25 g/L, 硫酸镁 0.625 g/L, 琼脂 0.3 g/L), 28℃ 静置培养 7 d 发酵。发酵液中加入等体积的乙酸乙酯进行萃取,提取液 40℃ 减压浓缩,浓缩后获得提取物 (2.8 g)。

1.2.2 分离与纯化

粗提物经葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析分离,用 100% 甲醇洗脱,合并相同部分得到 6 个组分 (Fr. A-F)。将 Fr. F 溶于甲醇后,通过制备型高效液相色谱 HPLC 以 24 mL/min 的流速,乙腈-0.2% 乙酸水 (10% - 50% - 100%) 梯度洗脱得到化合物 **1** (1.2 mg)。Fr. C 经正相硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯体积比 (10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0:1) 梯度洗脱得到 8 个组分 (sFr. C1-C8)。sFr. C1 通过制备型 HPLC,经 OBD 柱以乙腈-水 (25% - 100%) 洗脱得到化合物 **2** (6.22 mg); sFr. C7 通过制备型

HPLC, 经 OBD 柱以乙腈-水(10% - 100%)梯度洗脱分离化合物 **3** (1.19 mg); sFr. C2 通过制备型 HPLC, 经 OBD 柱以乙腈-水(25% - 100%)梯度洗脱得到化合物 **4** (4.93 mg); sFr. C4 用制备型 HPLC, 经 C_{18} 柱以乙腈-水(20% - 100%)洗脱分离得到化合物 **5** (2.2 mg); sFr. C8 通过制备型 HPLC, 经 OBD 柱以乙腈-水(20% - 80%)溶剂梯度洗脱得到化合物 **6** (1.18 mg) 和化合物 **7** (1.85 mg)。

1.2.3 活性筛选

(1) 抗神经炎症活性。

体外培养 BV-2 小胶质细胞, 建立脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的神经炎症细胞模型。实验组以化合物浓度分别为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 给药处理, 以 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多奈哌齐作阳性对照, 采用噻唑蓝(MTT)法^[12]检测细胞存活率。将 BV-2 细胞悬液以 1×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 于 37°C 培养箱中培养。待细胞贴壁, 每孔加入 200 μL 不同浓度样品预处理 4 h, 然后加入 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理 24 h, 再加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液处理 4 h, 于 37°C 培养箱中培养, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO), 振荡 10 min 至结晶完全溶解后, 用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度值(OD 值)。

(2) 抗菌活性。

化合物在 96 孔灭菌板上进行抗菌实验, 并用微孔稀释法^[13]测定最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。将受试化合物溶解于 DMSO 中, 采用二倍串联稀释法将化合物稀释到指定浓度, DMSO 的最终浓度不超过 5%。病原菌包括动物病原细菌(绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、猪丹毒杆菌 *Erysipelas suis* 和猪链球菌 *Streptococcus suis*) 和植物病原真菌(灰霉菌 *Botrytis cinerea*、小麦颖枯病菌 *Septoria nodorum*、小麦叶枯病菌 *S. tritici*、棉花黄萎病菌 *Verticilium dahliae*)。抑菌活性测定以接种培养液和 DMSO 作为阴性对照, 链霉素和头孢匹罗作为阳性对照。真菌于 28°C 培养 48 h, 细菌于 37°C 培养 24 h, 观察病原菌的生长状况。

(3) 细胞毒活性。

采用 MTT 法测定化合物 **1-7** 对非洲绿猴胚胎肾细胞 Marc-145 细胞的抗增殖活性, 以 5-氟尿嘧啶作阳性对照^[12]。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色油状(CH_3OH), 结合¹H-NMR 和¹³C-NMR 数据推测分子式为 $C_{19}H_{18}N_2O_2$ 。¹H-NMR(700 MHz, CD_3OD) δ : 7.56(2H, ddt, $J = 7.6, 6.46, 0.98$, H-4, 4'), 7.30(3H, m, H-7, 5', 7'), 7.15(1H, s, H-5), 7.03(2H, m, H-6, 6'), 6.91(2H, m, H-2, 2'), 4.70(1H, d, $J = 6.7$, H-1''), 4.49(1H, td, $J = 7.0, 4.04$, H-2''), 3.62(1H, dd, $J = 11.2, 4.2$, H-3''), 3.49(1H, dd, $J = 11.2, 7.0$, H-3'); ¹³C-NMR(175 MHz, CD_3OD) δ : 124.1(C-2), 118.0(C-3), 129.3(C-3a), 119.4(C-4), 122.1(C-5), 120.2(C-6), 112.1(C-7), 138.1(C-7a), 123.9(C-2'), 116.5(C-3'), 128.4(C-3'a), 119.3(C-4'), 122.0(C-5'), 120.0(C-6'), 138.0(C-7'a), 38.1(C-1''), 76.4(C-2''), 66.4(C-3'')。以上核磁数据与文献[14]报道基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为 3,3-二吡啶烷基-1,2-丙二醇。

化合物 **2**: 淡黄色无定形固体(CH_3OH), 结合¹H-NMR 和¹³C-NMR 数据推测分子式为 $C_{10}H_{12}O_3$ 。¹H-NMR(500 MHz, CD_3OD) δ : 1.85(3H, d, $J = 7.0$, H-1), 6.62(1H, m, H-2), 6.12(1H, d, $J = 2.0$, H-5), 5.56(1H, d, $J = 2.0$, H-6), 1.87(3H, s, H-9), 3.86(3H, s, H-10); ¹³C-NMR(125 MHz, CD_3OD) δ : 14.3(C-1), 131.0(C-2), 128.3(C-3), 162.7(C-4), 98.9(C-5), 88.6(C-6), 167.0(C-7), 174.1(C-8), 12.1(C-9), 57.0(C-10)。以上核磁数据与文献[15]报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 robilafuran。

化合物 **3**: 白色粉末(CH_3OH), 结合¹H-NMR 和¹³C-NMR 数据推测分子式为 $C_{10}H_{12}O_4$ 。¹H-NMR(500 MHz, CD_3OD) δ : 4.31(2H, d, $J = 6.0$, H-1), 6.59(1H, td, $J = 6.0, 0.5$, H-2), 6.21(1H, d, $J = 2.0$, H-5), 5.60(1H, d, $J = 2.0$, H-6), 1.89(3H, d, $J = 1.0$, H-9), 3.86(3H, s, H-10); ¹³C-NMR(125 MHz, CD_3OD) δ : 59.6(C-1), 135.0(C-2), 128.1(C-3), 161.9(C-4), 100.0(C-5), 89.2(C-6), 166.6(C-7), 173.8(C-8), 12.5(C-9), 57.0(C-10)。以上核磁数据与文献[16]报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 asperfuran A。

化合物 **4**: 白色固体(CH_3OH), 结合¹H-NMR 和¹³C-NMR 数据推测分子式为 $C_{12}H_{14}O_4$ 。¹H-NMR(500 MHz, CD_3OD) δ : 4.54(1H, m, H-3), 2.93(1H,

m, H-4), 6.88(1H, d, $J = 7.0$, H-5), 7.61(1H, d, $J = 7.0$, H-6), 1.41(3H, d, $J = 6.5$, H-9), 1.34(3H, d, $J = 7.0$, H-10), 4.64(2H, s, H-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 171.0(C-1), 82.7(C-3), 38.4(C-4), 144.6(C-4a), 117.8(C-5), 136.0(C-6), 129.3(C-7), 160.5(C-8), 108.0(C-8a), 19.9(C-9), 18.0(C-10), 59.4(C-11)。以上核磁数据与文献[17]报道基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 gamahorin。

化合物 **5**: 无色晶体(CH_3OH), 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据推测分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 5.23(2H, s, H-2), 2.13(3H, s, 4- CH_3), 3.75(3H, s, 5- OCH_3), 2.16(3H, s, 6- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 173.9(C-1), 70.8(C-3), 146.2(C-3a), 117.5(C-4), 155.0(C-5), 119.8(C-6), 165.0(C-7), 107.5(C-7a), 11.2(4- CH_3), 60.3(5- OCH_3), 8.9(6- CH_3)。以上核磁数据与文献[18]报道基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 7-羟基-5-甲氧基-4,6-二甲基-异苯并呋喃酮。

化合物 **6**: 黄色油状(CH_3OH), 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据推测分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_8$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 5.53(1H, d, $J = 2.0$, H-1'), 5.23(2H, d, $J = 6.0$, H-2), 4.47(1H, dd, $J = 3.5$, 2.0, H-2'), 3.98(1H, m, H-5'), 3.87(1H, dd, $J = 10.0$, 3.5, H-3'), 3.78(3H, s, 5- OCH_3), 3.48(1H, t, $J = 9.5$, H-4'), 2.27(3H, s, 6- CH_3), 2.20(3H, s, 4- CH_3), 1.22(3H, d, $J = 6.0$, H-6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 171.3(C-1), 69.8(C-3), 148.6(C-

3a), 122.2(C-4), 164.4(C-5), 126.6(C-6), 154.9(C-7), 113.2(C-7a), 106.4(C-1'), 72.0(C-2'), 72.3(C-3'), 73.4(C-4'), 72.2(C-5'), 18.0(C-6'), 11.3(4- CH_3), 60.9(5- OCH_3), 10.6(6- CH_3)。以上核磁数据与文献[19]报道基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 5-甲氧基-4,6-二甲基-7-氧- α -L-鼠李糖基-异苯并呋喃酮。

化合物 **7**: 无色油状(CH_3OH), 结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据推测分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.24(1H, d, $J = 2.0$, H-1), 3.95(1H, m, H-2), 3.93(1H, m, H-3), 4.34(1H, dd, $J = 4.5$, 2.0, H-4), 6.07(1H, d, $J = 4.5$, H-5), 2.23(2H, m, H-4'), 2.28(2H, m, H-5'), 5.17(1H, m, H-6'), 2.02(2H, t, $J = 7.0$, C-8'), 2.11(2H, q, $J = 7.0$, H-9'), 5.13(1H, m, H-10'), 5.34(1H, d, $J = 2.0$, H-12'), 5.29(1H, d, $J = 2.0$, H-12'), 1.70(3H, s, H-13'), 1.66(3H, s, H-14'), 1.63(3H, s, H-15'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 70.2(C-1), 70.9(C-2), 70.5(C-3), 67.8(C-4), 136.3(C-5), 126.1(C-6), 89.5(C-1'), 90.0(C-2'), 132.9(C-3'), 38.5(C-4'), 27.7(C-5'), 124.5(C-6'), 136.9(C-7'), 40.9(C-8'), 27.7(C-9'), 125.4(C-10'), 132.1(C-11'), 121.8(C-12'), 16.2(C-13'), 25.9(C-14'), 17.7(C-15')。以上核磁数据与文献[20]报道基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 pestynol。

化合物 **1-7** 的结构如图 1 所示。

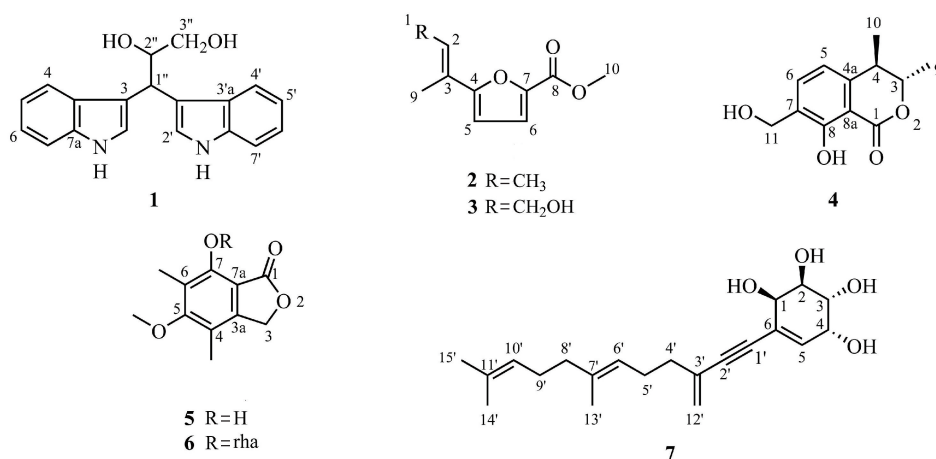


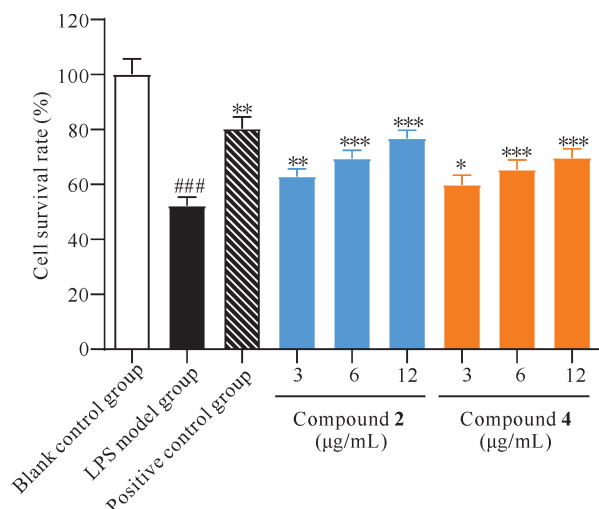
图 1 化合物 **1-7** 的结构

Fig. 1 Structures of compounds **1-7**

2.2 活性筛选结果

2.2.1 抗神经炎症活性

由图2可知,与空白对照组相比,LPS造模组细胞存活率显著降低($P < 0.001$),平均存活率为52.23%,证明LPS模型造模成功。与LPS造模组



Compared with the blank control group, ### $P < 0.001$; compared with the LPS group, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图2 化合物2和4对BV-2细胞存活率的影响($n = 5$)

Fig.2 Effects of compounds 2 and 4 on the viability of BV-2 cell ($n = 5$)

表1 化合物的抗菌活性结果

Table 1 Antibacterial activity results of compounds

细菌/真菌 Bacteria/Fungi	MIC值($\mu\text{g/mL}$) MIC value ($\mu\text{g/mL}$)			
	化合物 1-6 Compounds 1-6	化合物 7 Compound 7	链霉素 Streptomycin	头孢匹罗 Cefpirome
<i>Escherichia coli</i>	-	-	50	<3.125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	3.125	<3.125
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	100	25	<3.125
<i>Erysipelas suis</i>	-	100	25	<3.125
<i>Streptococcus suis</i>	-	100	>100	<3.125
<i>Botrytis cinerea</i>	-	50	-	-
<i>Septoria nodorum</i>	-	50	-	-
<i>Verticilliumdahliae</i>	-	-	-	-
<i>Septoria tritici</i>	-	-	-	-

Note: "-" indicates at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, the bacterial OD_{630} value did not decrease significantly

3 讨论

海洋环境的高压、高盐、低温和营养稀缺等特点决定了海洋真菌独特的代谢机制和适应机制,可以产生结构新颖和良好药理活性的天然产物。青霉菌真

相比,各给药组对BV-2细胞损伤均有明显的抑制作用。化合物2在3 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 和12 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下BV-2细胞的存活率分别为62.84%、69.44%和76.77%;化合物4在3 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 和12 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下BV-2细胞的存活率分别为59.89%、65.42%和69.69%,以上结果均具有统计学意义。综上所述,在一定的浓度范围内,药物浓度与抗神经炎症作用具有一定的量效关系,其中化合物2在12 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对LPS损伤的BV-2细胞抑制作用最显著($P < 0.001$),与阳性对照组活性接近。

2.2.2 抗菌活性

由表1可知,化合物7对金黄色葡萄球菌、猪丹毒杆菌和猪链球菌显示弱的抑制活性,MIC值均为100 $\mu\text{g/mL}$;对植物病原真菌灰霉菌以及小麦颖枯病菌具有中等的抑制活性,MIC值均为50 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.3 细胞毒活性

化合物1和7对Marc-145细胞表现出一定的细胞毒活性,其 LC_{50} 值分别为57.397 $\mu\text{g/mL}$ 和35.386 $\mu\text{g/mL}$,其中化合物7的活性相对最强,与阳性对照药5-氟尿嘧啶(28.281 $\mu\text{g/mL}$)的效果最为接近。化合物2-6对Marc-145细胞的 LC_{50} 都大于80 $\mu\text{g/mL}$ 。

菌是海洋真菌中研究较多的真菌之一,也是重要的药物产生菌。

本研究结果显示,化合物1-7均为首次从青霉菌属真菌中分离得到。化合物7对5种病原菌(金黄色葡萄球菌、猪丹毒杆菌、猪链球菌、灰霉菌以及小麦颖

枯病菌)具有一定的抑制活性。据报道,化合物 **7** 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌(肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*)有微弱的生长抑制作用,且对 Jurakat、HL60、THP-1、HT29 和 A549 细胞具有微弱的细胞毒活性^[20]。此外,也有文献报道,化合物 **1** 对大肠杆菌和污垢分歧杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)有抑制活性^[14],具有 98.6% 的卤虫致死率^[21]。化合物 **1** 和 **7** 具有研发抗菌药物的潜力。

在抗肿瘤方面,化合物 **1** 和 **7** 对 Marc-145 细胞显示细胞毒活性,其中化合物 **7** 的活性相对最强,与 5-氟尿嘧啶药效接近,具有进一步筛选成为抗肿瘤药物的潜力。研究表明,化合物 **2-6** 对 Marc-145 细胞显示较弱的抗肿瘤活性。但也有文献报道,化合物 **5** 对 HeLa 肿瘤细胞有明显的抑制作用,其 48 h 的半抑制浓度(Median Inhibitory Concentration, IC₅₀) 值为 7.8 μmol/mL,而化合物 **6** 对 HeLa 肿瘤细胞无抑制活性^[22]。从结构上来看,化合物 **5** 为 7-羟基-5-甲氧基-4,6-二甲基-异苯并咪唑酮,化合物 **6** 为 5-甲氧基-4,6-二甲基-7-氧-α-L-鼠李糖基-异苯并咪唑酮,化合物 **6** 为化合物 **5** 的 7-O 鼠李糖苷,其构效关系值得后续深入研究。

在神经炎症活性方面,发现化合物 **2** 和 **4** 具有良好的抑制神经炎症活性的作用,这两个化合物活性筛选研究很少,只有化合物 **2** 对小鼠 ST-13 脂肪细胞的诱导分化作用^[15]以及化合物 **4** 的抗菌活性有少量研究^[23]。化合物 **4** 为异香豆素类天然产物。有研究表明,异香豆素化合物在一定的浓度范围内能显著地保护由 H₂O₂ 诱导引起的 SH-SY5Y 细胞损伤,并具有良好的剂量依赖性^[24]。因此,后续工作将进一步研究化合物对细胞内炎症因子肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素 1β(IL-1β)、白细胞介素 6(IL-6)以及一氧化氮(NO)的释放情况,并在计算机虚拟筛选技术指导下,观察 NF-κB/p65 的磷酸化水平以及 iNOS 的表达。

4 结论

橘青霉的次生代谢产物种类丰富,且具有广泛的生物活性。从菌株 *Penicillium citrinum* 的发酵液中共分离得到 7 个已知化合物,均为首次从青霉属中分离得到,其中 3,3-二吡啶烷基-1,2-丙二醇(**1**)为首次从真菌中分离得到。活性筛选结果表明,robilla-furan (**2**)和 gamahorin (**4**)具有良好的抑制神经炎症活性;3,3-二吡啶烷基-1,2-丙二醇(**1**)和 pestynol

(**7**)对 Marc-145 细胞具有细胞毒活性,LC₅₀ 值分别为 57.397 μg/mL 和 35.386 μg/mL;且 pestynol (**7**)具有抗革兰氏阳性菌和植物病原菌活性。以上结果丰富了海洋来源 *Penicillium citrinum* 的药效物质基础,为发掘新型神经保护药物、抗菌药物及天然活性产物提供了参考依据。

参考文献

- [1] MA H G, LIU Q, ZHU G L, et al. Marine natural products sourced from marine-derived *Penicillium* fungi [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2016, 18(1):92-115.
- [2] CHEN M Y, XIE Q Y, KONG F D, et al. Two new indole-diterpenoids from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. KFD28 [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2020, 23(11):1030-1036.
- [3] 柳小英,徐伟峰,海洋,等. 1 株海洋真菌 *Penicillium chrysogenum* 次级代谢产物及其抗菌活性研究[J]. 中国海洋药物, 2020, 39(3):26-30.
- [4] AFIYATULLOV S S, ZHURAVLEVA O I, ANTONOV A S, et al. Piltunines A-F from the marine-derived fungus *Penicillium piltunense* KMM 4668 [J]. Marine Drugs, 2019, 17(11):647.
- [5] KUMARI P, SINGH A, SINGH D K, et al. Isolation and purification of bioactive metabolites from an endophytic fungus *Penicillium citrinum* of *Azadirachta indica* [J]. South African Journal of Botany, 2021, 139:449-457.
- [6] MAZUMDER P M, MAZUMDER R, MAZUMDER A, et al. Anti-microbial activity of the mycotoxin citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum* [J]. Ancient Science of Life, 2002, 21(3):191-197.
- [7] WANG W Y, LIAO Y Y, ZHANG B B, et al. Citrinin monomer and dimer derivatives with antibacterial and cytotoxic activities isolated from the deep sea-derived fungus *Penicillium citrinum* NLG-S01-P1 [J]. Marine Drugs, 2019, 17(1):46.
- [8] SALENDRA L, LIN X P, CHEN W H, et al. Cytotoxicity of polyketides and steroids isolated from the sponge-associated fungus *Penicillium citrinum* SCSIO 41017 [J]. Natural Product Research, 2021, 35(6):900-908.
- [9] LIU Q Y, ZHOU T, ZHAO Y Y, et al. Antitumor effects and related mechanisms of penicitrinine A, a novel alkaloid with a unique spiro skeleton from the marine fungus *Penicillium citrinum* [J]. Marine Drugs, 2015, 13(8):4733-4753.
- [10] MADY M, HOUSSEN W, ABDOU R, et al. Breast cancer migration and proliferation inhibitory and antibi-

- otic secondary metabolites from the Egyptian olive tree endophytic fungus *Penicillium citrinum* [J]. Journal of Advanced Pharmacy Research, 2017, 1(3): 160-170.
- [11] WANG J J, LI K L, LUO X W, et al. Sorbicillfurans A and B, two novel sorbicillinoid adducts from the fungus *Penicillium citrinum* SCSIO41402 [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2019, 17(38): 8721-8725.
- [12] SYLVESTER P W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability [J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 716: 157-168.
- [13] FANG Y S, YANG M H, CAI L, et al. New phenylpropanoids from *Bulbophyllum retusiusculum* [J]. Archives of Pharmacal Research, 2018, 41(11): 1074-1081.
- [14] WU L X, ZHAO L X, XU X D, et al. Secondary metabolites of an endophytic actinomycete isolated from *Sedum* sp. [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2017, 53(2): 400-402.
- [15] SHIMOYAMA T, MIYOSHI M, NEHIRA T, et al. Two new secondary metabolites from a fungus of the genus *Robillarda* [J]. The Journal of Antibiotics, 2018, 71(4): 432-437.
- [16] DENG M Y, LIU Y P, HUANG Y Y, et al. New bioactive secondary metabolites from the *Anoectochilus roxburghii* endophytic fungus *Aspergillus versicolor* [J]. Fitoterapia, 2020, 143: 104532.
- [17] KOSHINO H, YOSHIHARA T, OKUNO M, et al. Gamahonolides A, B, and gamahorin, novel antifungal compounds from stromata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense* [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1992, 56(7): 1096-1099.
- [18] SCHNEIDER G, ANKE H, STERNER O. New Secondary metabolites from a *Mycophilic hansfordia* species [J]. Natural Product Letters, 1997, 10(2): 133-138.
- [19] XING J G, DENG H Y, LUO D Q. Two new compounds from an endophytic fungus *Pestalotiopsis heterocornis* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2011, 13(12): 1069-1073.
- [20] SAKAI K, HIROSE T, IWATSUKI M, et al. Pestynol, an antifungal compound discovered using a *Saccharomyces cerevisiae* 12gene 0HSR-iERG6-based assay [J]. Journal of Natural Products, 2018, 81(7): 1604-1609.
- [21] 王宏鹏, 谢泽平, 况焱, 等. 海洋链霉菌 B170167 发酵产物中含氮化合物及其细胞毒活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 8(10): 1557-1561.
- [22] 关永强, 曹蒙蒙, 刘亭, 等. *Pestalotiopsis adusta* 次级代谢产物对 HeLa 细胞抑制作用[J]. 中成药, 2014, 36(2): 325-329.
- [23] LEI H, LIN X P, HAN L, et al. New metabolites and bioactive chlorinated benzophenone derivatives produced by a marine-derived fungus *Pestalotiopsis heterocornis* [J]. Marine Drugs, 2017, 15(3): 69.
- [24] 程凡. 宜昌润楠化学成分和生物活性的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.

Studies on the Chemical Constituents and Activities of Marine-derived Fungus *Penicillium citrinum*

YANG Sumei¹, YANG Xiliang¹, XIAO Shaoyujia¹, ZHOU Mengdie¹, ZHANG Yani²,
WU Zhaoyuan², LIU Fang², LIU Manli², FANG Wei²

(1. Department of Pharmacy, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430065, China; 2. Hubei Biopesticide Engineering Research Center, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei, 430064, China)

Abstract: In order to study the secondary metabolites and activities of the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*, the ethyl acetate extract of the strain fermentation broth was isolated by gel column chromatography, normal phase silica gel column chromatography and high performance liquid chromatography. According

to LC-MS, NMR structural identification and literature data comparison, seven known compounds were identified as 3,3-di-1*H*-indol-3-yl-1,2-propanediol (**1**), robillafuran (**2**), asperfuran A (**3**), gamahorin (**4**), 7-hydroxy-5-methoxy-4,6-dimethyl-isobenzofuranone (**5**), 5-methoxy-4,6-dimethyl-7-*O*- α -L-rhamnosyl-phthalide (**6**), pestynol (**7**), respectively. Compounds **1** to **7** were isolated from penicillium fungi for the first time, and compound **1** was discovered from secondary metabolites of fungi for the first time. The activity screening results showed that compound **7** had antibacterial activity. Compounds **1** and **7** exhibited cytotoxic activity against Marc-145 cell. The Median Lethal Concentration (LC_{50}) values were 57.397 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 35.386 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. In LPS-induced BV-2 cell model, the survival rates of compounds **2** and **4** at 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were 76.77% and 69.69%, respectively, showing potential anti-neuroinflammatory activity.

Key words: *Penicillium citrinum*; fungus; secondary metabolites; neuroinflammation; cytotoxic activity

责任编辑:唐淑芬



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>