

中华剑角蝗共生真菌 *Penicillium oxalicum* 中抗肿瘤次级代谢产物研究

喻梦岚, 徐 帮, 程 凡, 邹 坤, 陈剑锋*

三峡大学生物与制药学院 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 宜昌 443002

摘要: 采用活性追踪法, 从中华剑角蝗肠道共生真菌 *Penicillium oxalicum* 的发酵产物中分离得到一个具有较高抗肿瘤活性的苯并吡喃酮二聚体类化合物, 经波谱数据及理化性质鉴定为 secalonic acid A, 为首次从该属菌种中分离得到。Secalonic acid A 对多种肿瘤细胞如人肝癌细胞 (HepG2)、人肺癌细胞 (A549)、人宫颈癌细胞 (Ca Ski)、鼻咽癌细胞 (CNE2) 和人乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 均有显著的生长抑制作用, IC_{50} 值分别为 1.12、2.23、4.16、20.18 和 22.65 μM , 但对正常细胞如人永生表皮细胞 (HaCAT) 和犬肾细胞 (MDCK) 的细胞毒性较小, IC_{50} 值大于 100 μM , 具有一定的选择性。流式细胞仪检测表明, Secalonic acid A 能有效诱导 HepG2 细胞凋亡, 早期凋亡率最高达到 40.6%, 并能有效破坏 HepG2 细胞的线粒体膜电位, 相对破坏率最高达到 97.3%。提示该化合物可能通过线粒体途径诱导肿瘤细胞发生凋亡而发挥抗肿瘤作用。

关键词: *Penicillium oxalicum*; secalonic acid A; 细胞毒活性; 凋亡

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

The Study of Antitumor Secondary Metabolites from *Penicillium oxalicum*, a Fungus Residing in *Acrida cinerea*

YU Meng-lan, XU Bang, CHENG Fan, ZOU Kun, CHEN Jian-feng*

Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: A dimeric naphthopyrones were activity-guided isolated by MTT method from the fermentation broth extract of *Penicillium oxalicum*, a fungus residing in *Acrida cinerea*. On the basis of spectral data and physicochemical properties, it was identified as secalonic acid A that isolated for the first time from the endophytic fungus of *Penicillium oxalicum*. Secalonic acid A showed significant cytotoxicity to several human cancer cell lines such as HepG2, A549, Ca Ski, CNE2, MDA-MB-231 with IC_{50} values of 1.12, 2.23, 4.16, 20.18, 22.65 μM , but slightly cytotoxicity to normal cell lines such as HaCAT and MDCK with IC_{50} values greater than 100 μM . Flow cytometry assay confirmed that secalonic acid A caused a dose-dependent early apoptotic effect with a highest-level of 40.6%. Furthermore, secalonic acid A triggered a rapid decrease of the mitochondrial membrane potential by 97.3% relatively. These findings suggested that secalonic acid A induced mitochondrial-mediated apoptosis in HepG cells.

Key words: *Penicillium oxalicum*; secalonic acid A; cytotoxicity; apoptosis

昆虫与微生物的共生是自然界的一种普遍的现象, 缘于昆虫庞大的种群和复杂的生活环境, 其共生菌有着异常丰富的多样性, 故有可能产生结构新颖, 类型丰富的活性次级代谢产物, 因而昆虫共生真菌已成为寻找新生物活性物质的新的重要来源^[1]。本课题组从中华剑角蝗的肠道中分离得到一株草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*) 菌株, 采用细胞毒活性追

踪法对其发酵产物进行了化学分离, 从中分离得到 1 个具有较好抗肿瘤活性的化合物, 通过波谱数据分析及理化性质鉴定结构。同时对其进行了体外抗肿瘤活性研究并利用流式细胞仪技术初步探究了该活性产物的抗肿瘤机制, 为进一步的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Bruker AV 400 核磁共振波谱仪, 瑞士布鲁克公司; AmozonSL + 1200 液相色谱-双重漏斗传输离子

阱质谱仪,德国布鲁克·道尔顿公司; Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪,美国戴安公司; Cosmosil MS-II RP-C₁₈ 色谱柱(5 μm, 250 × 10 mm 半制备型; 5 μm, 250 × 4.6 mm 分析型); EPICS XL-4 型流式细胞仪,美国 Beckman Coulter 公司; Stat Fax-2100 型酶标仪,美国 Awareness 公司; 倒置显微镜,日本 Olympus CKX41 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT) 购自 Sigma 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、JC-1 细胞线粒体膜电位检测试剂盒购自南京凯基生物。

1.2 菌株和细胞株

实验菌株分离自中华剑角蝗肠道,昆虫样品于 2011 年 7 月采集于湖北省神农架大九湖国家湿地公园,菌株由三峡大学涂璇博士鉴定为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*),保存于三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室;人永生表皮细胞 HaCAT、犬肾细胞 MDCK、人肝癌细胞 HepG2、人肺癌细胞 A549、人宫颈癌细胞 Ca Ski、鼻咽癌细胞 CNE2 和人乳腺癌细胞(MDA-MB-231) 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,由三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室传代保藏。

1.3 培养基

培养基:SDA 培养基(葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,琼脂 20 g,水 1000 mL,pH 值自然);SD 培养基(葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,水 1000 mL,pH 值自然),1.25 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.4 菌株 *Penicillium oxalicum* 的发酵

菌株经 SDA 培养基斜面活化后,接种于 SD 种子培养基中,于 28 °C、125 rpm 振荡培养 3 d;将培养好的种子以 5% 的接种量接种于 SD 发酵培养基中,于 28 °C、125 rpm 振荡培养 16 d,共发酵 40 L。

表 1 粗提物及各洗脱部分对不同肿瘤细胞的 IC₅₀ (μg/mL) (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 IC₅₀ (μg/mL) of total extract and its eluted fractions against tumor cells (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

肿瘤细胞 Tumor cells	丝裂霉素 Mitomycin	粗提物 Total extract	洗脱部分 Eluted fractions				
			1	2	3	4	5
HepG2	7.18 ± 0.42	34.39 ± 3.95	9.34 ± 0.59	85.96 ± 6.89	89.34 ± 5.21	90.67 ± 6.33	>100
A549	6.26 ± 0.39	77.58 ± 5.36	17.14 ± 0.78	>100	>100	>100	>100

从表 1 可以看出,菌株发酵产物的粗提物具有一定的抗肿瘤活性,而且对 HepG2 细胞的细胞毒性要比 A549 细胞强。过正相硅胶柱,用不同比例的氯仿-甲醇梯度洗脱后,抗肿瘤活性化合物主要集中

1.5 活性追踪法分离提取 *Penicillium oxalicum* 的发酵次级代谢产物

发酵液 40 L 过滤,用乙酸乙酯萃取滤液,减压浓缩得 12.2 g 粗提物;菌丝体经 37 °C 烘干处理后,用氯仿-甲醇(1:1)浸提烘干的菌丝体,过滤,上清液减压浓缩得 10.6 g 粗提物。将上述粗提物合并,经正相硅胶柱色谱(800 g 正相硅胶,200 ~ 300 目)分离,氯仿-甲醇(100:0 ~ 50:50%, v/v) 梯度洗脱,得 5 个洗脱部分(1 ~ 5)。对合并的粗提物和 5 个洗脱部分进行体外抗肿瘤活性研究(MTT 法^[2])。根据各段活性进行下一步分离,其中 1 部分在低温下析出一黄色晶体化合物(36.6 mg),通过波谱分析与查阅文献对纯化合物进行结构鉴定,并测定其体外抗肿瘤活性。

1.6 单体化合物抗肿瘤活性机制初步探究

鉴于 1 部分及其分离到的单体化合物对 HepG2 细胞抑制活性相对较好,故以 HepG2 细胞为检测模型,应用倒置显微镜观察细胞凋亡形态学变化、流式细胞仪检测细胞凋亡和线粒体膜电位的变化。细胞凋亡用 AnnexinV-PI 双染法检测,线粒体膜电位用 JC-1 探针法检测,试剂盒均购自南京凯基生物,按照说明书提供的方法操作。

2 结果与分析

2.1 菌液粗提物及 5 个分离部分的活性筛选结果

菌液粗提物及经正相硅胶柱色谱分离后的 1 ~ 5,5 个洗脱部分,用 DMSO 溶解配制成 100 mg/mL 的储存浓度,然后用细胞培养基稀释成 100、50、25 至 1.56 μg/mL,分别通过 MTT 法进行体外抗肿瘤活性试验,以丝裂霉素为阳性药物对照,根据 SPSS 软件计算 IC₅₀ 值。其结果如表 1 所示。

于 100:0 (v/v) 的氯仿-甲醇洗脱部位(1 部分),IC₅₀ 值达到 9.34 μg/mL,相对其他部分而言活性最好,故综合考虑首先分离 1 部分。将 1 部分放置于 4 °C 冰箱过夜,结果析出大量黄色晶体化合物。

2.2 单体化合物的结构鉴定

化合物 1 的理化性质和波谱数据如下:黄色针晶, mp. 244 ~ 248 °C; ESI-MS m/z : 639 $[M+1]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 13.78 (2H, s, 8, 8'-OH), 11.74 (2H, s, 1, 1'-OH), 7.45 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 3'), 6.63 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4, 4'), 3.93 (2H, d, $J = 11$ Hz, H-5, 5'), 3.72 (6H, s, 13, 13'-OCH₃), 2.73 (2H, dd, $J = 6.0, 19.1$ Hz, H-7a, 7a'), 2.41 (2H, m, H-6, 6'), 2.31 (2H, dd, $J = 10.5, 19.2$ Hz, H-7b, 7b'), 1.17 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, H-11, 11'); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 187.2 (C-9, 9'), 177.5 (C-8, 8'), 170.3 (C-12, 12'), 159.4 (C-1, 1'), 158.3 (C-4a, 4a'), 140.2 (C-3, 3'), 117.3 (C-2, 2'), 107.5 (C-4, 4'), 106.3 (C-9a, 9a'), 101.7 (C-8a, 8a'), 84.7 (C-10a, 10a'), 77.0 (C-5, 5'), 53.2 (13, 13'-OCH₃), 36.3 (C-7, 7'), 29.3 (C-6, 6'), 18.0 (C-11, 11'). 结合文献报道^[3-5]的波谱数据, 化合物 1 可能是 secalonic acid A (SAA) 或 secalonic acid D (SAD), 两者不同之处在于 5、6、10a 和 5'、6'、10a' 位羟基构型不同。通过测定比旋光度与文献值相比较, 化合物 1 的比旋光度 $[\alpha]_D^{20} - 73.3^\circ (c = 0.10, \text{氯仿})$,

文献中, SAA 的比旋光度 $[\alpha]_D^{20} + 88^\circ (c = 0.10, \text{氯仿})$ ^[3,5], SAD 的比旋光度 $[\alpha]_D^{20} - 75^\circ (c = 0.10, \text{氯仿})$ ^[4]。最终鉴定化合物 1 为 secalonic acid A, 结构式如图 1 所示。

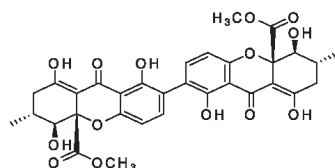


图 1 secalonic acid A 的化学结构

Fig. 1 The structure of secalonic acid A

2.3 secalonic acid A 的体外抗肿瘤活性

为了评价 secalonic acid A (SAA) 的体外抗肿瘤活性, 我们扩大了肿瘤细胞谱, 并增加了 2 种正常细胞株, 结果如表 2 所示, secalonic acid A 对多种肿瘤细胞株均具有较好的细胞毒活性, 其中对肝癌 HepG2 细胞的毒性最强, IC₅₀ 值为 1.12 μM , 而且对 2 种正常细胞的毒性均较小, IC₅₀ 值在 100 μM 以上, 两者相差 100 倍左右, 可见 secalonic acid A 具有一定的细胞毒选择性。

表 2 secalonic acid A 对不同肿瘤细胞的 IC₅₀ (μM) ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 IC₅₀ (μM) of secalonic acid A against tumor cells ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

	肿瘤细胞 Tumor cells					正常细胞 Ordinary cells	
	HepG2	A549	Ca Ski	CNE2	MDA-MB-231	HaCAT	MDCK
SAA	1.12 ± 0.054	2.23 ± 0.093	4.16 ± 0.26	20.18 ± 0.57	22.65 ± 0.86	>100	>100

2.4 secalonic acid A 对 HepG2 细胞形态的影响

用不同浓度 (5.0、2.5、1.25 μM) 的 secalonic acid A 作用 HepG2 细胞 48 小时, 在光学显微镜下观察细胞形态的变化 (放大倍数 10 × 10), 如图 2 所示, 与未加药的对照组细胞相比, 1.25 μM Secalonic acid A 作用后, 可见细胞收缩变圆, 细胞贴壁能力减弱, 随着药物作用浓度的增加, 细胞的生长逐渐受到抑制, 细胞表面逐渐突起形成小膜泡不断脱落悬浮于细胞培养液中。5.0 μM Secalonic acid A 作用于 HepG2 细胞 48 h 后, 细胞出现大量的细胞碎片, 细胞坏死。而对照组细胞生长良好。

2.5 secalonic acid A 对 HepG2 细胞凋亡的影响

HepG2 细胞经不同浓度的 Secalonic acid A (5.0、2.5、1.25 μM) 作用 24 h 后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡的变化, FITC + /PI-为早期凋亡细胞, FITC

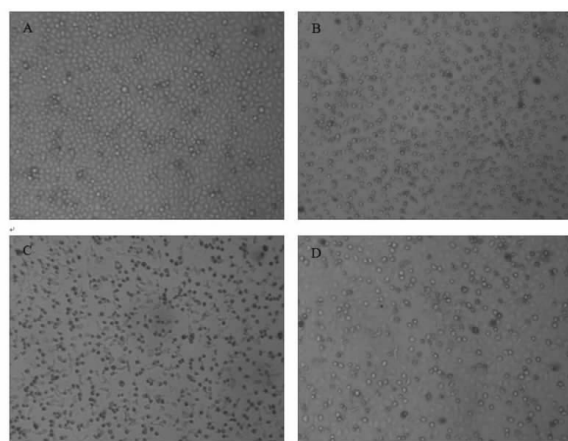


图 2 A: 正常 HepG2 细胞;

Fig. 2 A: normal HepG2 cell;

B、C、D: 5.0、2.5、1.25 μM Secalonic acid A 处理 48 h 的 HepG2 细胞
B、C、D: HepG2 cell were treated with 5.0、2.5、1.25 μM Secalonic acid A of 48 h

+ /PI + 为晚期凋亡细胞,结果如图 3 所示,Secalonic acid A 诱导 HepG2 细胞发生了显著的凋亡,且具有浓度依赖性。0、1.25、2.5 和 5.0 μM 的 Secalonic

acid A 诱导的早期凋亡率分别为 2.6%、27.8%、32.5%、40.6%,晚期凋亡率分别为 1.8%、17.2%、23.6% 和 23.2%。

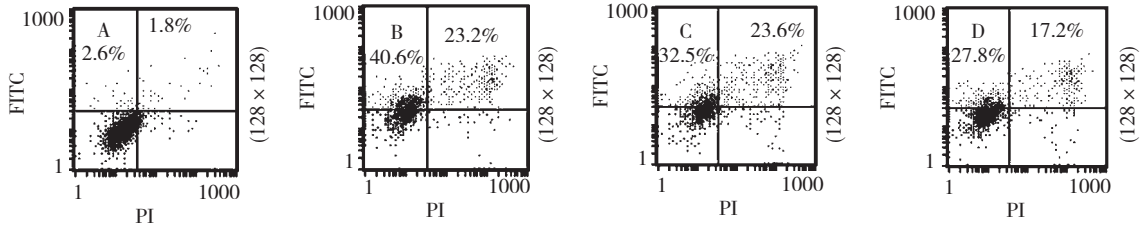


图 3 A :正常 HepG2 细胞

Fig. 3 A; normal HepG2 cell

B、C、D:5.0、2.5、1.25 μM Secalonic acid A 处理 24 小时的 HepG2 细胞

B、C、D; HepG2 cell were treated with 5.0、2.5、1.25 μM Secalonic acid A of 24 h

2.6 secalonic acid A 对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

HepG2 细胞经不同浓度的 Secalonic acid A (5.0、2.5、1.25 μM) 作用 24 h 后,用流式细胞仪检

测细胞凋亡的变化(JC-1 探针法),结果如图 4 所示,Secalonic acid A 显著破坏了 HepG2 细胞的线粒体膜电位,相对破坏率由 15.3% (0 μM SAA) 上升到 97.3% (5.0 μM SAA)。

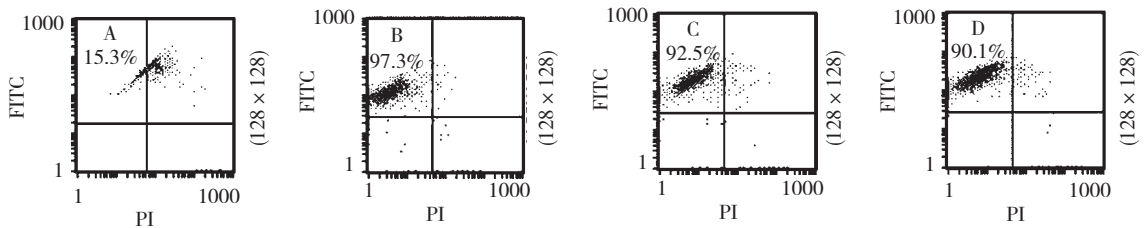


图 4 A :正常 HepG2 细胞

Fig. 4 A; normal HepG2 cell

B、C、D:5.0、2.5、1.25 μM Secalonic acid A 处理 24 小时的 HepG2 细胞;

B、C、D; HepG2 cell were treated with 5.0、2.5、1.25 μM Secalonic acid A of 24 h;

3 讨论

本研究将 1 株昆虫来源的草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*) 菌株的发酵液和菌丝体的粗提物经正相硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇(100:0 ~ 50:50%, v/v) 梯度洗脱,得 5 个洗脱部分(1 ~ 5),通过细胞毒性 MTT 法进行活性追踪分离,从 1 洗脱部分获得了 1 个较好活性的单体化合物 Secalonic acid A,该化合物为首次从该属菌种中分离得到。Secalonic acid A 对多种肿瘤细胞株均具有较好的细胞毒性,尤其对人肝癌细胞 Hep G2, IC_{50} 值达到 1.12 μM ,而且对正常细胞株的毒性较小,显示了一定的选择性细胞毒力。初步的机制研究结果表明,Secalonic acid A 主要通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡从而发挥抗肿瘤

作用。另外,该化合物得率高,分离方法简单(低温结晶析出),容易获得较大产量,所以下一步我们将进行动物试验和深入的机制研究,以综合评估 Secalonic acid A 的应用价值。

微生物次级代谢产物之间往往存在着各种拮抗或协同作用,因此粗提物的活性与分离到的单体化合物活性之间没有绝对的联系,各种活性次级代谢产物在微生物体内的代谢产生与分布平衡可能取决于微生物的体内生长代谢机制和所处外部环境等^[6]。所以有必要对其余部分的化合物进行分离。本课题组从余下的 2 ~ 5 洗脱部分分离到 5 个化合物^[7],分别为 asperpyrones A、asperpyrones B、asperpyrones C、asperpyrones D 和 aurasperone A,均为苯并吡喃酮二聚体类化合物。但 MTT 结果显示,上述

5个化合物对人肝癌细胞 Hep G2 和人肺癌细胞 A549 均无细胞毒活性, IC_{50} 值均大于 $100 \mu\text{M}$, 这也和洗脱部位的活性结果相符, 说明 *Penicillium oxalicum* 菌株次级代谢产物的抗肿瘤活性主要由 Secalonic acid A 体现。苯并吡喃酮类化合物的单体及二聚体类广泛分布于黑曲霉和镰刀属真菌的次级代谢产物中^[8-11]。根据文献报道, 这类化合物对大鼠和小鼠的中枢神经系统表现出急性毒性作用^[12], 并且对 Taq DNA 聚合酶具有抑制作用。所以其其它活性更是有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Zhang YL(张应烙). Microbes associated with Insect - an extensive Source of new drug molecules. 2011 Chinese Medicinal Chemistry Symposium(2011 年全国药物化学学术会议).
- 2 Tan WD(谭卫东), Jin H(金红), Luo DX(罗弟祥), *et al.* Comparison Of MTT With SRB assays *in vitro* anticancer drug screening. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1999, 11(3):17-22.
- 3 Steyn PS. The isolation, structure and configuration of secalonic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium Oxalicum*. *Tetrahedron*, 1970, 26:51-57.
- 4 Steffens JC, Robeson DJ. Secalonic acid A, a vivotoxin in pink root-infected onion. *Phytochem*, 1987, 26:1599-1602.
- 5 Chen L(陈立), Gu QQ(顾谦群). Study on the antitumor metabolites of a sponge-derived fungus, *Aspergillus repens*. *Periodi Ocean Univer China* (中国海洋大学学报), 2010, 40(5):69-71.
- 6 Li HY(李海燕), Liu L(刘丽). Recent advances on bioactive compounds producing endophytes. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16:482-485.
- 7 Xu B(徐帮), Zou Kun(邹坤), Guo LZ(郭玲芝), *et al.* Dimeric naphthopyrones from *Penicillium oxalicum*, a fungus residing in *Acrida cinerea*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013(accepted).
- 8 Tanaka H, Wang PL, Yamada O. Yellow pigments of *Aspergillus niger* and *Asp. awamori*. I. Isolation of aurasperone A and related pigments. *Agric Biol Chem*, 1966, 30:107-113.
- 9 Wang PL, Tanaka H. Yellow pigments of *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. II. Chemical structure of aurasperone A. *Agric Biol Chem*, 1966, 30:683-687.
- 10 Tanaka H, Wang PL, Namiki M. Structure of Aurasperone C. *Agric Biol Chem*, 1972, 36:2511-2517.
- 11 Priestap HA. New naphthopyrones from *Aspergillus fonsecae-us*. *Tetrahedron*, 1984, 40:3617-3624.
- 12 Ghosal S, Biswas K, Chakrabarti DK. Toxic naphtho-gamma-pyrones from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, 1979, 27:1347-1351.