

金樱子内生真菌 *Diaporthe* sp. JH-1 的化学成分及生物活性研究许倩倩^{1†}, 张咪^{2†}, 庞良芳¹,
刘雅瑞¹, 李亮霞¹, 鄢家艳¹, 卢圆圆^{1*}¹华中科技大学同济医学院附属湖北省妇幼保健院药学部, 武汉 430075;²中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要:为探究药用植物金樱子(*Rosa laevigata* Michx)来源内生真菌(*Diaporthe* sp. JH-1)的化学成分,本实验联合运用硅胶柱色谱、ODS柱色谱、凝胶柱色谱(Sephadex LH-20)、半制备型高效液相色谱(HPLC)等分离技术,高分辨质谱、核磁共振(NMR)等鉴定技术从该菌株大米固体发酵产物的乙酸乙酯提取物中分离及鉴定得到6个间座壳素类衍生物,包括 diaporisoindoles A、B 和 E(1~3)和 diaporindenenes B~D(4~6)。化合物1~6均为首次从*Diaporthe* sp. JH-1中分离得到。对化合物1~6进行体外抗炎活性测试,发现化合物1和3能显著抑制NO生成。此外,化合物1和3能显著抑制COX-2、PEG2的活性,其作用机制与抑制NF-κB相关。

关键词:内生真菌; *Diaporthe* sp. JH-1; 间座壳素; 抗炎

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024) Suppl-0022-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.S.003

Study on chemical constituents and biological activity of the endophytic fungus *Diaporthe* sp. JH-1 from *Rosa laevigata* Michx

XU Qian-qian^{1†}, ZHANG Mi^{2†}, PANG Liang-fang¹,
LIU Ya-rui¹, LI Liang-xia¹, YAN Jia-yan¹, LU Yuan-yuan^{1*}¹Department of Pharmacy, Maternal and Child Health Hospital of Hubei Province, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430057, China; ²National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: To investigate the chemical composition of the medicinal plant *Rosa laevigata* Michx derived endogenous fungi (*Diaporthe* sp. JH-1), we used a combination of multiple approaches, including silicon, ODS and gelatin rod chromatography, semi-prepared high-performance liquid chromatography (HPLC), high-resolution mass spectrometry, and magnetic resonance imaging (NMR). As a result, six chitin derivatives, including diaporisoindoles A, B, and E (1-3), and diaporindenenes B-D (4-6) were isolated and characterized. These compounds were isolated from the genus *Diaporthe* sp. JH-1 for the first time. *In vitro* anti-inflammatory activity testing of compounds 1-6 revealed significant inhibition of NO production by compounds 1 and 3. Further investigation uncovered that 1 and 3 exert strong inhibitory effect on COX-2, PEG2, and its mechanism was related to the suppression of NF-κB.

Key words: endophytic fungi; *Diaporthe* sp. JH-1; diaporisoindoles; anti-inflammatory

金樱子(*Rosa laevigata* Michx)是蔷薇科常绿攀缘植物,主产于广东,广西,湖南,江西,浙江,江苏,安徽等地,是一种常用的药用植物,有抗氧化,降血

脂,抗炎镇痛等作用^[1]。间座壳属(*Diaporthe* sp.)真菌是属于子囊菌门粪壳菌纲间座壳目黑腐皮壳科的真菌,是金樱子的常见内生真菌,也是引起其病症的病原菌。据统计,植物内生真菌产生了萜类、生物碱类、苯丙素类、黄酮类、甾体类、醌类、糖类、有机酸类、脂类、肽类等多种结构类型次生代谢产物,并且具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化、抗病毒、抗炎、杀虫等广泛的活性^[2-4]。内生真菌已成为寻找活性物质的良好资源。

收稿日期: 2023-08-15 接受日期: 2023-10-17

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31700294); 湖北省自然科学基金面上项目(2021CFB490); 湖北省妇幼保健院院内课题(2023SFYY006、2021SFYZ002、2021SFYY003)

† 共同第一作者

* 通信作者 E-mail: Luyuan200715@163.com

间座壳属真菌广泛存在于世界各地,在热带和亚热带地区分布更多,已有研究表明该属真菌也是活性代谢产物的潜在来源之一^[5]。研究显示该属真菌中发现了聚酮类、生物碱类、萜类、葱醌类及其他类型结构新颖的代谢产物,其中相当一部分产物具有显著抗肿瘤、抗菌、抗高脂血症、抑制肺纤维化、抗氧化等生物活性^[6-8]。对间座壳属次生代谢产物的研究调查发现,间座壳素为间座壳属真菌特有次生代谢产物,具有良好的结核分枝杆菌蛋白酪氨酸磷酸酶 B 抑制作用^[9]。为了进一步深入研究,本研究从植物金樱子中分离得到间座壳属真菌 *Diaporthe* sp. JH-1,用大米作为培养基,进行大量固体发酵,对其次生代谢产物进行分离纯化和结构鉴定,并进行体外抗炎活性评价和机制研究,以期发现活性更好的天然产物,为该微生物资源的开发利用提供一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

旋光测试仪 (Rudolph Autopol IV, 美国鲁道夫公司);圆二色谱仪 (JASCO-810, 日本 JASCO 公司);傅里叶红外变换光谱仪 (Bruker Vertex 70, 美国布鲁克公司);紫外分光光度计 (Horiba Jobin Yvon LabRAM HR800, 法国 HORIBA Jobin Yvon 公司);单晶衍射仪 (Bruker SMART APEX-II, 德国布鲁克科学仪器公司);核磁共振仪 (Bruker AM-400, 德国布鲁克科学仪器公司);高分辨质谱 (Bruker micrOTOF II, 德国布鲁克科学仪器公司);高效液相色谱 (Agilent 1260, 安捷伦科技(中国)有限公司);半制备色谱柱 (Welch Ultimate XB-C18, 月旭科技(上海)股份有限公司);葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 美国 GE Healthcare Biosciences 公司);ODS 填料 (50 μm , 德国默克公司);正相硅胶柱 (80 ~ 100、100 ~ 200、200 ~ 300 目, 硅胶 H, 青岛海洋化工有限公司);TLC 薄层板 (烟台启维化工有限公司)。

RAW 264.7 细胞 (批号:CL-0190)、DMEM 高糖培养基 (批号:PM150210)、胎牛血清 (批号:164210-50)、青霉素-链霉素溶液 (批号:PB180120) (武汉普诺赛生命科技有限公司);CCK-8 (批号:CK04, 日本同仁公司);细胞培养板 (批号:3516、3599, 美国康宁公司);脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) (德国默克公司) 来源于大肠杆菌 0111:B4, L2630;地塞米松 (dexamethasone) (批号 HY-14648, 纯度 99.86%)、塞来昔布 (celecoxib) (批号:HY-14398, 纯度

99.09%) (美国 MedChemExpress 生物科技公司);TRIZol (批号:15596-026CN, 美国 Life 公司);逆转录试剂盒 (批号:D006-1)、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (批号:D007-2) (美国 ABP 生物科技公司);一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (批号:S0021S)、环氧氧化酶-2 (COX-2) 抑制剂筛选试剂盒 (批号:S0168) (上海碧云天生物技术有限公司);前列腺素 E2 (PGE2) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (批号:E-EL-0034, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);甲醇、乙腈、乙酸乙酯、石油醚、二氯甲烷等色谱试剂 (色谱级, 湖北弗顿科学技术有限公司)。

1.2 菌株来源

间座壳属 *Diaporthe* sp. JH-1 于 2018 年从江西省吉安市采集的金樱子 *Rosa laevigata* Michx 中分离纯化得到,其 DNA 扩增和 ITS 序列由北京擎科生物科技有限公司测定,并经过 BLAST 对比,发现与菌株 *Diaporthe* sp. 的 ITS 序列 99.48% 相似,结合形态学特征,将该菌株鉴定为间作壳属,保藏于天然药物化学与资源评价湖北省重点实验室 (ZMJYZ4141)。

1.3 提取方法

在无菌操作台中将菌种复活,拷贝三代后进行鉴定,基因序列鉴定无误后,大量拷贝菌种作为种子。在 1 L 的玻璃锥形瓶中加入 200 g 大米和 200 mL 水灭菌后作为固体培养基,将种子接入培养基中进行大量发酵,发酵 20 kg (以大米计),在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温条件下发酵 28 天,用乙醇超声提取,得到的提取物用乙酸乙酯/水体系进行萃取,萃取后得到粗膏 201 g。粗膏拌样后,采取 80 ~ 100 目正相硅胶填料,石油醚-乙酸乙酯 (10:1, V/V) 作为流动相进行梯度洗脱,间座壳属总膏根据极性划分为 Fr. 1 ~ Fr. 7。Fr. 4 为中等极性,采用 200 ~ 300 目硅胶石油醚乙酸乙酯体系为流动相阶段,再经正相硅胶柱、凝胶柱和反向硅胶柱等常用色谱分离方法反复分离后,使用高效液相色谱纯化,得到化合物 **4** (80% 甲醇, 5.5 mg, $t_{\text{R}} = 25$ min)、**5** (77% 甲醇, 9.5 mg, $t_{\text{R}} = 25$ min)、**6** (80% 甲醇, 9.4 mg, $t_{\text{R}} = 40$ min)。Fr. 5 为中等极性,采用 200 ~ 300 目硅胶拌样填料,以二氯甲烷甲醇体系为流动相阶段,再经正向硅胶柱、葡聚糖凝胶和 MPLC (ODS) 等常用色谱分离方法反复分离后,采用高效液相色谱 (Agilent 1260) 制备,得到化合物 **1** (69% 乙腈, 22.5 mg, $t_{\text{R}} = 27$ min)、**2** (69% 乙腈, 34.3 mg, $t_{\text{R}} = 27$ min)、**3** (80% 甲醇, 10.1 mg, $t_{\text{R}} = 21.5$ min)。

1.4 化合物抗炎活性测试

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,接种于 96 孔板中,培养 24 h 后加入含不同浓度(1、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$)化合物的 DMEM 完全培养基,每组 4 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8,培养 4 h,酶标仪 450 nm 测定各孔吸光值(OD 值),计算细胞存活率。

采用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型,分别设置空白组(无细胞)、对照组(培养基)、模型组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS)、阳性药物组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 1、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松)、实验组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 1、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 1~6)每组 4 个复孔。模型组、阳性药物组、实验组加入 LPS 诱导 1 h 后,再加入相应药物继续培养 24 h,随后取其上清液采用 NO 检测试剂盒 NO 的含量,根据标准曲线计算各组浓度。采用 Graphpad prism 5.0 计算 IC_{50} 。

1.5 环氧酶-2(COX-2)、前列腺素 E2(PEG2)抑制活性测试

采用 COX-2 抑制剂筛选试剂盒检测化合物 1 和 3(10、20 $\mu\text{mol/L}$)对 COX-2 的抑制作用,塞来昔布(celecoxib, 1 $\mu\text{mol/L}$)作为阳性对照,按说明书计算化合物对 COX-2 的抑制率。采用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型,分别设置空白组(无细胞)、对照组(培养基,Con 组)、模型组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS, Mod 组)、阳性药物组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 1 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布, Cel 组)、实验组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 1 和 3; 1-10、1-20、3-10、3-20 组)每组 4 个复孔。采用前列腺素 E2(PGE2)酶联免疫吸附测定试剂盒检测各组上清液中 PEG2 的含量,根据标准曲线计算各组浓度。

1.6 荧光定量 PCR 检测

将 RAW 264.7 细胞接种于 12 孔板中,采用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型,分别设置对照组(培养基, Con 组)、模型组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS, Mod 组)、阳性药物组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 1 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布, Cel 组)、实验组(1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 1 和 3; 1-10、1-20、3-10、3-20 组)。24 h 后采用 TRIzol 提取细胞总 RNA,采用 cDNA 第一链合成试剂盒配置反转录体系、将 mRNA 反转录为对应的 cDNA。采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒检测 NF- κ B 的转录水平。NF- κ B 的引物序列为: F: 5'-ATGACATCCAGATTCGGTT-3', R: 5'-AGGTCTGATTTCCTCCGAAG-3'。 β -actin 作为内参,序列为: F: 5'-

CGTGCCTGACATCAAAGAGAA-3', R: 5'-TGGATGCCACAGGATTCCAT-3'。

1.7 统计学分析

采用 Graphpad prism 5.0 统计分析数据,所有结果均采用 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$) 值显示。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 淡紫色油状;分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}$; ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 7.21(1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.85(1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-4), 6.65(1H, br s, H-12), 6.27(1H, s, H-14), 5.82(1H, s, H-8), 5.00(1H, t, $J = 6.2$ Hz, H-2'), 4.37(1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 3.91(1H, br s, H-1'), 3.89(1H, br s, H-2''), 3.06(1H, dd, $J = 15.9, 7.2$ Hz, H-1'), 2.97(1H, dd, $J = 15.9, 6.3$ Hz, H-1'), 2.13(3H, s, H-15), 1.64(3H, s, H-5'), 1.44(3H, s, H-5''), 1.28(3H, s, H-4'), 1.26(3H, s, H-4''); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ : 172.9(C-1), 116.3(C-2), 154.4(C-3), 115.6(C-4), 135.2(C-5), 128.6(C-6), 144.4(C-7), 55.0(C-8), 124.1(C-9), 139.9(C-10), 143.2(C-11), 118.0(C-12), 131.1(C-13), 121.4(C-14), 20.8(C-15), 30.0(C-1'), 121.7(C-2'), 133.3(C-3'), 17.7(C-4'), 25.7(C-5'), 65.0(C-1''), 79.9(C-2''), 70.7(C-3''), 25.7(C-4''), 24.7(C-5'')。以上数据与文献^[9]报道基本一致,因此确定化合物 1 为 diaporisoindole A。

化合物 2 淡紫色油状;分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}$; ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 7.31(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.93(1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-4), 6.68(1H, br s, H-12), 6.11(1H, s, H-14), 5.88(1H, s, H-8), 5.07(1H, t, $J = 6.4$ Hz, H-2'), 4.47(1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-1''), 4.13(1H, br s, H-1''), 3.97(1H, br s, H-2''), 3.12(1H, dd, $J = 15.9, 8.0$ Hz, H-1'), 3.0(1H, dd, $J = 15.9, 5.2$ Hz, H-1'), 2.12(3H, s, H-15), 1.67(3H, s, H-5'), 1.50(3H, s, H-4'), 1.39(3H, s, H-5''), 1.32(3H, s, H-4''); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ : 172.9(C-1), 116.9(C-2), 154.0(C-3), 116.7(C-4), 135.2(C-5), 128.8(C-6), 144.0(C-7), 55.0(C-8), 124.0(C-9), 139.9(C-10), 143.1(C-11), 118.0(C-12), 130.9(C-13), 120.0(C-14), 20.8(C-15), 30.6(C-1'), 121.5(C-2'), 133.3(C-

3'), 17.5 (C-4'), 27.0 (C-5'), 64.7 (C-1''), 79.2 (C-2''), 70.9 (C-3''), 24.7 (C-4''), 25.8 (C-5'')。以上数据与文献^[9]报道基本一致,因此确定化合物 **2** 为 diaporisoindole B。

化合物 3 淡紫色油状;分子式为 $C_{26}H_{32}NO_6$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.30 (1H, s, OH-3), 7.31 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-5), 7.24 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-14), 6.90 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 6.71 (1H, dd, $J = 2.2, 0.8$ Hz, H-12), 6.10 (1H, s, NH), 4.92 (1H, m, H-2'), 4.22 (1H, dd, $J = 11.2, 2.3$ Hz, H-1''), 3.80 (1H, dd, $J = 9.1, 2.2$ Hz, H-1''), 3.65 (1H, dd, $J = 9.3, 5.2$ Hz, H-2''), 3.11 (3H, s, 8-OCH₃), 3.04 (1H, m, H-1'), 2.99 (1H, m, H-1'), 2.27 (3H, s, H-15), 1.62 (3H, s, H-5'), 1.47 (3H, s, H-4'), 1.06 (3H, s, H-5''), 0.96 (3H, s, H-4''); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.2 (C-1), 115.9 (C-2), 154.2 (C-3), 117.5 (C-4), 135.9 (C-5), 129.6 (C-6), 142.3 (C-7), 90.4 (C-8), 125.7 (C-9), 138.9 (C-10), 143.2 (C-11), 118.5 (C-12), 130.2 (C-13), 121.1 (C-14), 21.1 (C-15), 28.2 (C-1'), 121.9 (C-2'), 133.0 (C-3'), 17.8 (C-4'), 26.1 (C-5'), 64.5 (C-1''), 80.2 (C-2''), 70.0 (C-3''), 24.2 (C-4''), 25.8 (C-5''), 49.5 (8-OCH₃)。以上数据与文献^[10]报道基本一致,因此确定化合物 **3** 为 diaporisoindole E。

化合物 4 淡紫色油状;分子式为 $C_{25}H_{30}O_6$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.23 (1H, s, OH-3), 9.87 (1H, s, H-1), 7.49 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.85 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4), 6.57 (1H, s, H-12), 6.00 (1H, s, H-14), 5.31 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-8), 4.47 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-1''), 4.03 (1H, m, H-1''), 4.01 (1H, m, H-2''), 3.25 (1H, m, H-1'), 2.92 (1H, m, H-1'), 2.88 (1H, m, H-2'), 2.05 (3H, s, H-15), 1.41 (3H, s, H-5''), 1.40 (3H, s, H-4''), 1.24 (3H, s, H-5'), 1.05 (3H, s, H-4''); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 195.5 (C-1), 115.8 (C-2), 161.8 (C-3), 117.0 (C-4), 134.1 (C-5), 134.6 (C-6), 150.9 (C-7), 40.3 (C-8), 129.3 (C-9), 137.0 (C-10), 143.8 (C-11), 117.1 (C-12), 131.9 (C-13), 122.8 (C-14), 21.0 (C-15), 32.2 (C-1'), 56.9 (C-2'), 71.9 (C-3'), 28.5 (C-4'), 30.1 (C-5'), 64.8 (C-1''), 79.5 (C-2''), 71.0 (C-3''), 26.0 (C-4''), 26.1 (C-5'')。以上数据与文献^[10]报道基本一致,因此确定化合物 **4** 为 diaporindene B。

化合物 5 淡紫色油状;分子式为 $C_{25}H_{30}O_6$; 1H

NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 9.82 (1H, s, H-1), 7.52 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 6.52 (1H, s, H-12), 5.99 (1H, s, H-14), 5.41 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-8), 4.51 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-1''), 3.94 (1H, m, H-1''), 3.92 (1H, m, H-2''), 3.14 (1H, t, $J = 16.6$ Hz, H-1'), 2.94 (1H, m, H-1'), 2.92 (1H, m, H-2'), 2.02 (3H, s, H-15), 1.43 (3H, s, H-5''), 1.34 (3H, s, H-4''), 1.17 (3H, s, H-5'), 1.01 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 196.6 (C-1), 116.8 (C-2), 117.1 (C-4), 134.8 (C-5), 135.7 (C-6), 153.1 (C-7), 41.5 (C-8), 131.2 (C-9), 139.0 (C-10), 144.8 (C-11), 117.4 (C-12), 131.8 (C-13), 124.2 (C-14), 20.9 (C-15), 33.1 (C-1'), 58.7 (C-2'), 73.0 (C-3'), 28.1 (C-4'), 29.1 (C-5'), 66.2 (C-1''), 81.5 (C-2''), 71.3 (C-3''), 24.9 (C-4''), 26.9 (C-5'')。以上数据与文献^[10]报道基本一致,因此确定化合物 **5** 为 diaporindene C。

化合物 6 淡紫色油状;分子式为 $C_{25}H_{30}O_6$; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 9.93 (1H, s, H-1), 7.42 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 6.54 (1H, s, H-12), 4.44 (1H, m, H-1''), 3.94 (1H, m, H-1''), 3.84 (1H, m, H-2''), 3.18 (1H, dd, $J = 16.3, 9.4$ Hz, H-1'), 2.96 (1H, dd, $J = 16.3, 5.6$ Hz, H-1'), 2.69 (1H, s, 2'), 2.11 (3H, s, H-15), 1.28 (3H, s, H-5''), 1.18 (3H, s, H-5'), 1.13 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 195.9 (C-1), 115.3 (C-2), 161.4 (C-3), 116.2 (C-4), 135.1 (C-5), 135.9 (C-6), 150.2 (C-7), 130.9 (C-9), 137.3 (C-10), 143.3 (C-11), 116.3 (C-12), 133.0 (C-13), 121.4 (C-14), 19.4 (C-15), 32.8 (C-1'), 59.8 (C-2'), 72.2 (C-3'), 64.6 (C-1''), 79.6 (C-2''), 69.9 (C-3''), 26.0 (C-4''), 26.6 (C-5'')。以上数据与文献^[10]报道基本一致,因此确定化合物 **6** 为 diaporindene D。

化合物 **1**~**6** 的化学结构见图 1。

2.2 化合物抗 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 的分泌

细胞毒检测结果显示,化合物 **1**~**6** 各浓度均对 RAW 264.7 细胞无明显的毒性。采用 LPS 诱导 RAW 264.7 炎症模型,检测化合物 **1**~**6** 对其 NO 分泌的影响。结果显示,化合物 **1** 和 **3** 则能显著抑制其 NO 的分泌,IC₅₀ 分别为 9.45 ± 2.98 、 12.22 ± 3.31 $\mu\text{mol/L}$ (见表 1)。

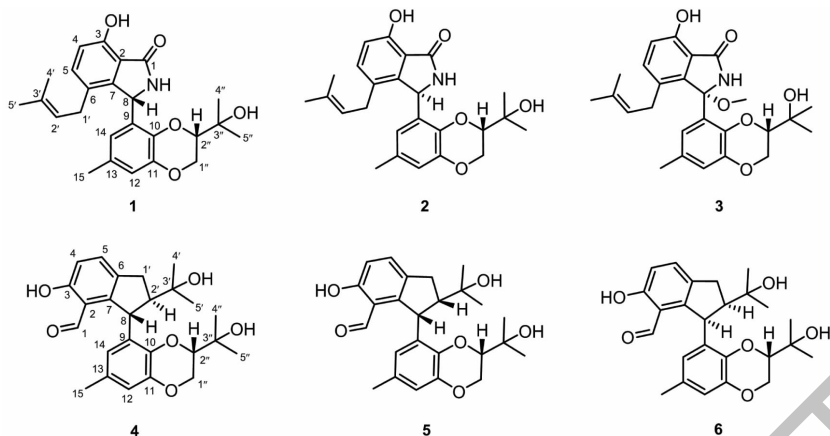


图1 化合物1~6的化学结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-6

表1 化合物1~6对LPS诱导的RAW 264.7细胞NO分泌抑制的作用($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 NO inhibition activity of compound 1-6 on LPS-induced RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

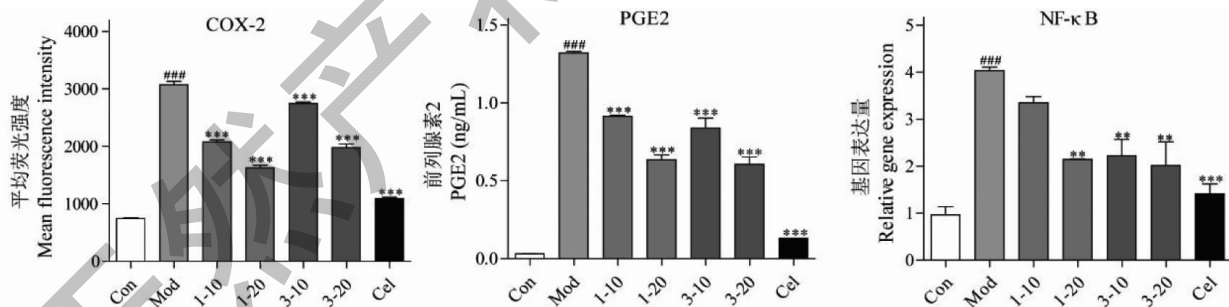
化合物 Compound	IC ₅₀ (μmol/L)
1	9.45 ± 2.98
2	>50
3	12.22 ± 3.31
4	>50
5	>50
6	>50
地塞米松 Dexamethasone	8.32 ± 1.25

注:地塞米松为阳性药。

Note:Dexamethasone is positive control.

2.3 化合物1和3抗炎的作用机制

COX-2抑制活性结果显示,化合物1和3能显著抑制COX-2的酶活性,且存在一定的剂量依赖性(见图2A)。前列腺素E₂(PGE₂)是COX-2活化的产物,如图2B所示,化合物1和3也能显著抑制LPS诱导的RAW 264.7细胞分泌的PGE₂含量。NF-κB是核转录因子,能与COX-2的启动子序列相结合激活COX-2的转录,也是炎症相关的重要信号通路枢纽。我们结果也显示,化合物1和3能显著抑制炎症相关的核转录因子NF-κB的表达水平(见图2C)。

图2 化合物1和3的对COX-2、PGE₂和NF-κB的抑制作用Fig. 2 The inhibition effect of 1 and 3 on COX-2、PGE₂ and NF-κB

注: Cel: 塞来昔布(阳性药); 与 Con 组相比, $^{###}P < 0.001$; 与 Mod 组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。Note: Cel is celecoxib (positive control); Compared with Con, $^{###}P < 0.001$; Compared with Mod, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

3 讨论与结论

本研究从药用植物金樱子来源内生真菌 *Diaporthe* sp. JH-1 大米发酵物的乙酸乙酯部位分离鉴定得到6个间座壳素类衍生物,包括 diaporisoindoles A、B、E(1~3)和 diaporindenones B~D(4~6)。化合

物1~6均首次从该真菌中分离得到,极大地丰富了间座壳属次生代谢产物结构的多样性。大量的研究结果已经证明,植物内生菌是多种具有丰富生物活性的次级代谢产物的重要来源,许多间座壳属来源的新天然产物具有较好的抗肿瘤、抗炎等多种生物

活性。本研究对化合物 **1** ~ **6** 进行了抗炎活性测试,发现化合物 **1** 和 **3** 能显著抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的炎症因子 NO 的分泌,具有较为明显的抗炎活性。其中化合物 **1** 抗 NO 分泌的 IC_{50} 为 $9.45 \pm 2.98 \mu\text{mol/L}$,接近阳性对照地塞米松。环氧化酶(cyclooxygenase, COX) 又称前列腺素内氧化酶合成酶(prostaglandin-endoperoxide synthase, PTGS),是一种同时具有环氧化酶和过氧化氢酶活性的双功能酶。COX-2 是诱导性表达的环氧化酶,在巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞和单核细胞等发生炎症反应时,可以被诱导表达,与炎症和肿瘤的发生发展密切相关^[11]。对化合物 **1** 和 **3** 的抗炎机制进一步研究发现,**1** 和 **3** 能显著抑制炎症因子 COX-2 的酶活性,抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 PGE2 的分泌,同时抑制炎症相关转录因子 NF- κ B 的表达。NF- κ B/COX-2/PGE2 炎症信号通路在多种肿瘤的恶性发展中均发挥了重要作用,发现新型有效的抗炎先导化合物对炎症及肿瘤的防治均有重要意义。本研究发现化合物 **1** 和 **3** 能显著抑制 NF- κ B/COX-2/PGE2 信号通路,从而抑制炎症因子 NO 的分泌,发挥抗炎作用,初步阐明了化合物 **1** 和 **3** 的抗炎作用机制,为后续的进一步开发提供科学参考依据。

参考文献

- 1 Wu JF, Jiang TX, Li L, et al. Research progress on plant chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of *Rosa Laevigata* Michx [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2022, 41: 54-63.
- 2 Cai J, Zhou WY, Xu GM, et al. Research progress on natural products of fungi of *Diaporthe* sp. [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 1717-1726.

- 3 Chen L, Zhang QY, Jia M, et al. Endophytic fungi with anti-tumor activities; their occurrence and anticancer compounds [J]. Crit Rev Microbiol, 2016, 42: 454-473.
- 4 Li S J, Zhang X, Wang XH, et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity [J]. Eur J Med Chem, 2018, 156: 316-343.
- 5 Li WJ, Li M, Su XH, et al. Mycoepoxydiene induces apoptosis and inhibits TPA-induced invasion in human cholangiocarcinoma cells via blocking NF- κ B pathway [J]. Biochimie, 2014, 101: 183-191.
- 6 Guo LF, Niu SB, Chen SL, et al. Diaporone A, a new antibacterial secondary metabolite from the plant endophytic fungus *Diaporthe* sp. [J]. J Antibiot, 2020, 73: 116-119.
- 7 Andolfia A, Boari A, Evidente M, et al. Gulypyrones A and B and phomentrioloxins B and C produced by *Diaporthe gulyae*, a potential mycoherbicide for saffron thistle (*Carthamus lanatus*) [J]. J Nat Prod, 2015, 78: 623-629.
- 8 Luo XW, Yang J, Chen FM, et al. Structurally diverse polyketides from the mangrove-derived fungus *Diaporthe* sp. SCSIO 41011 with their anti-influenza A virus activities [J]. Front Chem, 2018, 6: 282.
- 9 Cui H, Lin Y, Luo M, et al. Diaporisoindoles A-C; three isoprenylisoindole alkaloid derivatives from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe* sp. SYSU-HQ3 [J]. Org Lett, 2017, 19: 5621-5624.
- 10 Cui H, Liu YN, Li J, et al. Diaporindenones A-D; Four unusual 2,3-dihydro-1H-indene analogues with anti-inflammatory activities from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe* sp. SYSU-HQ3 [J]. Org Chem, 2018, 83: 11804-11813.
- 11 Xie SS, Qi CX, Duan YL, et al. Discovery of new polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols with diverse architectures as potent cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. Org Chem Front, 2020, 7: 1349-1357.