海洋真菌抗老年痴呆相关活性成分的筛选与追踪研究

张翼[1]，鲍海燕[1,2]，聂影影[1]，伦彦玲[1]，党梓文[1]，宋采[1]，邵海艳[1]，胡雪琼[1]

（1.广东海洋大学食品与科技学院，广东省水产品加工与安全重点实验室，水产品深加工广东普通高等学校重点实验室，湛江市脑健康海洋药物与营养品重点实验室，广东海洋大学海洋药物研究所，广东湛江 524088）

（2.大连交通大学环境与化学工程学院，辽宁大连 116028）

摘要：本文作者对 44 株海洋真菌的抗老年痴呆相关活性成分进行了筛选与追踪。采用 DTNB 法和 DPPH 自由基清除法分别评价其提取物抑制乙酰胆碱酯酶（AChE）和抗氧化活性，采用生物自显影和专一性显色剂分析活性物质多样性及结构类型，采用高分辨液质联用分析代表性菌株的活性代谢产物。发现共计 32 株菌在不同培养基中的发酵产物，显示了显著的双重活性，它们来自不同真菌类群。生物自显影显示它们可产生多样化活性成分，化学显色显示其活性成分可能为生物碱等含氮化合物、酚类及其他结构类型的天然产物。通过液质联用分析，发现一株真菌中分子式为 $C_{16}H_{13}NO_2$ 的代谢产物具有较强抑制 AChE 活性。本研究表明海洋真菌是多样化抗老年痴呆活性物质的重要来源，为活性物质的后续分离鉴定奠定了基础。

关键词：海洋生境；真菌；抗氧化；乙酰胆碱酯酶；酶抑制剂

文章篇号：1673-9078(2016)11-63-71 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.010

Screening and Tracing of Anti-alzheimer Related Bioactive Constituents from Marine Fungi

ZHANG Yi[1], BAO Hai-Yan[1,2], NIE Ying-Ying[1], LUN Yan-Ling[1], DANG Zi-Wen[1], SONG Cai[1], SHAO Hai-Yan[1], HU Xue-Qiong[1]

(1.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University (GDOU), Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang Municipal Key Laboratory of Brain Health Related Marine Drugs and Nutritions, Research Institute for Marine Drugs and Nutritions of GDOU, Zhanjiang 524088, China)

(2.School of Environmental and Chemical Engineering, Dalian Jiaotong University, Dalian 116028, China)

Abstract: Active constituents having anti-Alzheimer's effects were screened and traced in 44 marine fungal strains. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and antioxidant activities were assessed using the 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid method and the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free-radical scavenging method, respectively. Bioautography and specific color-developing reagents were applied to investigate the diversity of bioactive substances and their structural types, respectively. HPLC-Q-TOF-ESI-HRMS was used to characterize representative fungal bioactive metabolites. The fermentation extracts of 32 strains in different culture media showed remarkable dual bioactivity against AChE and DPPH. These dual-bioactive strains originated from different fungal taxa. Bioautography revealed their diverse bioactive constituents. Chemical colorization further suggested that their active components were nitrogenated compounds (alkaloids), phenols, and other types of natural products. Based on HPLC-Q-TOF-ESI-HRMS analysis, a metabolite with molecular formula $C_{16}H_{13}NO_2$ of a strain exhibited relatively strong inhibition effect against AChE. The present study revealed that marine fungi were an important source of diverse anti-Alzheimer's active substances, and provided a foundation for future studies involving the isolation and elucidation of bioactive compounds.

Key words: marine habitats; fungi; antioxidants; acetylcholinesterase; enzyme inhibition

收稿日期：2016-04-14

基金项目：国家自然科学基金项目（20902009）；广东省“扬帆计划”项目（201433009）；中国博士后科学基金项目（2011M500051，2012T50258）；广东海洋大学引进人才科研启动项目（E15155）；广东海洋大学自然科学研究项目（C14519）；广东海洋大学创新强校项目（GDOU2014030502）。作者简介：张翼（1978-），男，博士，副教授，研究方向：海洋天然产物化学；鲍海燕（1991-），女，硕士研究生，研究方向：海洋真菌生物活性物质，共同第一作者

随着世界人口老龄化的加剧，老年痴呆（Alzheimer's Disease，AD）发病率不断增加，寻找抗 AD 新药迫在眉睫。目前，胆碱能神经递质缺乏或胆碱能神经元凋亡是被广泛接受的 AD 发病机制学说[1]。在该理论的指导下，乙酰胆碱酯酶（Acetylcholinesterase，AChE）抑制剂成为目前最主流的抗 AD 药物[2~3]。不少研究发现，需氧细胞代谢过程中产生的超氧自由基会对脑组织造成损害，促进脑细胞的衰老和死亡，而且自由基还能损害细胞染色体，使第 21 号染色体畸变，从而发生 AD[4]。而抗氧化剂不仅能够稳定细胞膜，消除活性氧，同时还能抑制和清除脑内 β 淀粉样蛋白沉积，从而来预防和保护神经细胞免受损伤，从而延缓 AD 的发展进程[5]。因此，乙酰胆碱酯酶抑制剂和抗氧化剂均有治疗或延缓 AD 的作用，筛选具有抑制 AChE 活性和抗氧化双重功能的天然药物具有重要意义。而海洋真菌作为生物活性天然产物的重要资源，已逐渐成为抗老年痴呆活性化合物的研究热点。目前，已从曲霉属、鹿角菌属、链格孢属和镰刀霉属等多类海洋真菌中都发现了具有抑制乙酰胆碱酯酶或抗氧化神经保护活性的化合物[6]。本研究对从潮间带动植物或沉木和鲨鱼鳃部分离到的 44 株真菌，分别用海水马铃薯蔗糖蛋白胨（PSP）培养基和麦芽膏（M）培养基这两种液体培养基发酵，从中筛选出能够体外抗氧化和抑制乙酰胆碱酯酶的发酵提取物，对其活性物质多样性、化学性质及一株真菌中的活性化合物进行了初步分析，以期为活性化合物的进一步筛选和研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海洋真菌：供试用 44 株海洋真菌为本实验室所保藏，其中 21 株来自大连潮间带动植物或沉木，23 株来自鲨鱼鳃部，多数菌株通过 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 序列测定已被鉴定到种或属[7~9]，如表 1。

培养基：（1）海水马铃薯蔗糖蛋白胨培养基（PSP）：200 g 去皮土豆块煮制的新鲜土豆汁 500 mL，海盐 20 g，蔗糖 20 g，蛋白胨 5 g，蒸馏水 500 mL，pH 值未调节，实测值为 5.0 左右；（2）麦芽膏培养基（M）：麦芽浸膏 15 g，海盐 20 g，蒸馏水 1 L、pH 7.4~7.8。

试剂：碘化硫代乙酰胆碱（ATCh）（sigma DA0048）、5,5-二硫代二硝基苯甲酸（DTNB）（Ruibio ED8514）、乙酰胆碱酯酶（AChE）（Sigma C3389）、牛血清白蛋白（BSA）（Sigma A1933）、十二烷基硫酸钠（SDS）、二苯代苦味酰自由基（DPPH）（Sigma）和他可林(Sigma A79922-1G)，其他试剂均为国产分析纯试剂。

表 1 供试海洋真菌菌株清单

Table 1 List of marine fungal strains tested

菌株编号	种属及 Genbank 序列号	来源	菌株编号	种属及 Genbank 序列号	来源
潮间带真菌			鲨鱼鳃真菌		
6-F	*Aspergillus sydowii* GU244528	海藻	AP2T1	*Penicillium polonicun* JN368448	鲨鱼
11-N1	*Alternaria* sp. HQ149771	海藻	BP2T2	*Penicillium commune* JN368450	鲨鱼
19-10-1	*Aspergillus fumigates* HQ149777	海绵	BP321	*Aspergillus unguis* JF731256	鲨鱼
6-N	*Chaetomium globosum* GU244529	海藻	BP3T4	*Penicillium concentricum* JN368449	鲨鱼
13-F1	*Aspergillus fumigates* GU266273	海藻	BP3T10	*Chaetomium globosum* JF731257	鲨鱼
DLEN2008016	*Penicillium glabrum* FJ618520	海藻	BM3T2	*Neosartorya glabra* JQ082501	鲨鱼
DLEP2008001	*Aspergillus unguis* GU117635	海藻	BM3T6	*Aspergillus sydowii* JN368457	鲨鱼
DLEN2008004	*Hypocrea lixii* GU266272	海藻	BCT1-4	*Aspergillus versicolor* JN368459	鲨鱼
DLEN2008006	*Aspergillus clavatus* GU266275	海绵	BCT2-3	*Aspergillus flavipes* JQ082507	鲨鱼
DLEN2008010	*Hypocrea lixii* HQ149775	海绵	TBG1-1	*Penicillium citrinum* JQ082503	鲨鱼
DLEN2008005	*Trichoderma harzianum* KU530201	海藻	TBG1-5	*Penicillium polonicum* JF731266	鲨鱼
DLEN2008007	*Arthrinium phaeospermum* GU266274	沉木	TBG1-8	*Penicillium corylophilum* JF731268	鲨鱼
DLEP2008014	*Alternaria alternata* FJ618522	海藻	TBG1-16	*Penicillium polonicum* JN368453	鲨鱼
DLEP2008005	*Fusarium oxysporum* FJ618521	海绵	TBG1-21	*Penicillium crustosum* KF746907	鲨鱼

转下页

接上页

11-N2	未鉴定	海藻
12-F	未鉴定	海藻
DLEN2008012	未鉴定	海藻
DLS2008001	未鉴定	贝类
DLEN2008018	未鉴定	海绵
DLEN2008009	未鉴定	海绵
DLEP2008013	未鉴定	海绵
TBG2-1	*Mucor circinelloides* KF746908	鲨鱼
TBG2-2	*Penicillium polonicum* JF731269	鲨鱼
TBG2-8	*Penicillium chrysogenum* JF731271	鲨鱼
TBG2-10	*Chaetomium sp.* JQ082500	鲨鱼
TBG3-1	*Penicillium polonicum* JQ082508	鲨鱼
TBG3-3	*Aspergillus fumigates* JQ082499	鲨鱼
TBG3-14	*Penicillium chrysogenum* JF731274	鲨鱼
TBG3-15-1	未鉴定	鲨鱼
TBG2-4	未鉴定	鲨鱼

1.2 主要仪器设备

HPX-9082MBE 电热恒温培养箱，上海博讯实业；N-1001S-W 旋转蒸发仪，上海爱朗仪器有限公司；LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；WFH-201B 紫外透射反射仪，上海精科实业有限公司；Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Agilent 1260-Bruker maxis Q-TOF 高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联用仪。

1.3 方法

1.3.1 发酵粗提物的制备

将活化后的斜面菌种接种到培养皿上，于 28 ℃恒温培养箱中培养至长满平板，然后分别接种于 200 mL PSP 和 M 培养基中，28 ℃静置发酵 20 d。培养结束后，加入 200 mL 海洋真菌发酵液提取中常用的极性适中、提取范围较广且易于蒸馏的溶剂乙酸乙酯过夜杀菌 12~16 h，超声 30 min 后加入硅藻土，抽滤。滤渣用 100 mL 甲醇浸泡后再抽滤一次。两次滤液合并后用乙酸乙酯再萃取两次，所得有机相用旋转蒸发仪 45 ℃减压浓缩至干，称重，用少量甲醇多次溶解洗涤后转入样品瓶中，冷藏备用。

1.3.2 发酵粗提物抑制乙酰胆碱酯酶活性的测定

在 96 孔板中加入 5 μL 质量浓度为 20 mg/mL 样品，晾干后依次加入 10 μL、10% DMSO，40 μL、0.1 M 的 PBS（pH 7.4），10 μL 终浓度为 0.02 U/mL AChE，20 μL、5 mM DTNB，37 ℃孵育 10 min，加入 20 μL、10 mM ATCh，再 37 ℃孵育 10 min 后加入 30 μL、1% SDS 终止反应，用酶标仪在 405 nm 处检测 OD 值，其值为 $OD_{样品}$。同时每个样品都设一对应的样品本底，用同体积 PBS 缓冲液代替 ATCh，同上检测，设为 $OD_{样品本底}$。空白对照用 10% DMSO 代替样品，同上检测，设为 $OD_{空白}$；空白本底为用 BSA 代替酶液，其他反应条件同 $OD_{空白}$，其它同上检测，设为 $OD_{空白本底}$。所有试验重复 3 次并计算平均值和标准差。设 AChE 抑制率为 I(%)，如下公式计算：

$$I\%=[(OD_{空白}-OD_{空白本底})-(OD_{样品}-OD_{样品本底})]/(OD_{空白}-OD_{空白本底})\times 100\%$$

对于初筛平均抑制率接近或超过 50%的样品，进一步测定系列浓度梯度（质量浓度为 1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.1 mg/ mL 和 0.05 mg/ mL）下的抑制率，用 origin 软件做抑制率-浓度半对数曲线，用三次回归方程计算半抑制浓度（IC_{50}），阳性对照为他克林（Tacrine）。

1.3.3 发酵粗提物抗氧化活性的测定

DPPH（二苯代苦味酰自由基）是一种稳定的自由基，在有机溶剂中呈紫色，可见光区最大吸收峰为 517 nm，加入抗氧化剂后，部分自由基被清除，使吸收减弱，可以此来评价自由基清除活性[10]。

取 50 μL 质量浓度为 20 mg/mL 样品，挥发干溶剂后加入 100 μL DMSO 溶解，加入 100 μL、0.16 mmol/L DPPH 甲醇溶液，混匀，对照用甲醇代替样品溶液；空白组是在 100 μL DPPH 中加入 100 μL DMSO 混合，对照组用 100 μL 甲醇溶液代替 DPPH。室温暗处放置 30 min，于 517 nm 处测定吸光度，分别记为 A_1、A_2、A_3 和 A_4。

$$清除率\%=100-(A_1-A_2)\times 100/(A_3-A_4)$$

式中，A_1 为实验组的吸光值；A_2 为实验对照组的吸光值；A_3 为空白组的吸光值；A_4 为空白对照组的吸光值。

平行测定 2 次，计算平均值。对于初筛平均清除率≥90%的样品，进一步测定更低浓度梯度（质量浓度为 4 mg/mL、2 mg/mL、1 mg/mL、0.1 mg/mL 和 0.5 mg/mL）下的清除率，用 origin 软件做清除率-浓度半对数曲线，用三次回归方程计算半清除浓度（EC_{50}），阳性对照为抗坏血酸（Vc）。

1.3.4 TLC 生物自显影活性成分分析

TLC 生物自显影法具有操作简单、耗费低、灵敏度和专属性高等优点，尤其适用于对具有抑制胆碱酯酶、抗氧化以及清除自由基和抗菌/真菌等活性成分的

比较研究[11~12]。

1.3.4.1 乙酰胆碱酯酶抑制活性成分的TLC生物自显影分析

先用干净的甲醇将GF_{254}硅胶板预展干净后晾干，点样10 μL后，用二氯甲烷:甲醇=25:1展开，再均匀喷上0.5 U/mL AChE，晾干，使酶液固定，然后在37 ℃的恒温培养箱中保湿孵育 20 min。孵育结束后，将DTNB与ATCh以1:1混合，喷雾到硅胶板上，再37 ℃孵育10 min，观察实验现象，活性部分显白色，而薄层板其余部分显黄色。

1.3.4.2 自由基清除活性成分的TLC生物自显影分析

用毛细管吸取活性样品各约10 μL点样于GF_{254}硅胶薄层层析板，置层析缸中以二氯甲烷：甲醇（*V/V*=25:1）为展开剂展开后取出晾干，置于254 nm及365 nm的紫外灯下观察并拍摄图像，然后在薄层板上喷1.28 mmol/L的DPPH甲醇溶液，暗处放置5~8 min后，观察实验现象，活性部分不显色，而薄层板其余部分显紫色，由此可区分活性化合物和非活性化合物。

1.3.5 特征化学显色剂显色实验

取3块相同大小的GF_{254}硅胶薄层层析板，分别用毛细管吸取适量活性样品点样于层析板上，置层析缸中以二氯甲烷:甲醇（*V/V*=25:1）为展开剂展开后取出晾干，置于254 nm及365 nm的紫外灯下观察并拍摄图像，然后分别用改良碘化铋钾、Ehrlich试剂及酸化的$FeCl_3$乙醇溶液显色，观察实验现象。

1.3.6 一株真菌的小规模发酵及活性组分追踪分析

对菌株DLEN2008010进行了1 L规模的静置发酵与活性自显影引导下的活性物质提取分离与分析。发酵采用PSP培养基，发酵与提取条件同1.3.1。发酵提取物共613.4 mg经过800 mg、100~200目硅胶拌样，30 g、200~300目硅胶柱层析分离，洗脱剂为石油醚:丙酮=10:1~0:1，最后甲醇冲洗，用TLC及茴香醛显色进行检测，得到组分1~7。组分1洗脱剂为石油醚:丙酮=10:1，洗脱体积为200 mL；组分2洗脱剂为石油醚:丙酮=8:1与6:1，洗脱体积为300 mL；组分3洗脱剂为石油醚:丙酮=5:1与4:1，洗脱体积为400 mL；组分4洗脱剂为石油醚:丙酮=3:1，洗脱体积为200 mL；组分5洗脱剂为石油醚:丙酮=2:1，洗脱体积为200 mL；组分6洗脱剂为石油醚:丙酮=1:1~0:1，洗脱体积为300 mL；组分7洗脱剂为甲醇，洗脱体积为500 mL。由于生物自显影显示组分1、2和6具有抑制乙酰胆碱酯酶的活性，组分1和6还显示了清除DPPH的活性斑点，故对组分1和组分2采用制备薄层硅胶板继续分离，展开剂均为氯仿:甲醇=50:1，对组分6采用反相C-18柱分离，流动相为甲醇:水=4:1，自然流速，10 min/试管，自动收集器收集，并用TLC及茴香醛显色进行检测，将相同组分合并，得到相应的亚组分。

采用生物自显影法检测上述分离过程得到的亚组分抑制AChE和清除DPPH的生物活性。并对活性亚组分采用96孔板法测定其对AChE的半抑制浓度和清除DPPH的半效应浓度，方法同1.3.2和1.3.3，浓度梯度设置为0.5~1024 μg/mL，倍半稀释，设置3个平行。

对于具有显著活性的亚组分2-2进行了高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联用分析（HPLC-Q-TOF-ESI-HRMS）。液相色谱条件为：色谱柱为Luna 5u C18(2) 100A，150×4.60 mm，填料粒径5 μm；流动相为0~20 min、15%~100%甲醇，20~30 min、100%甲醇；进样量10 μL，浓度1 mg/mL。质谱条件为正离子模式ESI源，毛细管电压4500 V，喷雾干燥气流速度5.0 L/min，气化温度180 ℃，质量扫描范围（*m/z*）为100~2000。

1.3.7 数据分析

（1）发酵粗提物抑制AChE和清除DPPH活性筛选中，每个样品设三个平行，用Excel 2003软件计算平均抑制率与标准差。

（2）测定样品抑制AChE的IC_{50}和清除DPPH的EC_{50}时，测定并用Excel 2003软件计算系列浓度梯度下样品的抑制率，再将抑制率、浓度对数（lnC）导入Origin 9.0软件，作3次多项式回归方程，求解出$\ln(IC_{50})$或$\ln(EC_{50})$后，用Excel计算IC_{50}或EC_{50}。

（3）液质联用中对于化合物分子式的分析计算采用Bruker Daltonics DataAnalysis软件的SmartFormula功能及其默认设置。

2 结果与讨论

2.1 海洋真菌发酵提取物抑制AChE活性和清除DPPH自由基活性

对44株海洋真菌在PSP和M两种培养基上的发酵粗提物活性筛选显示（图1和图2），终浓度1 mg/mL时，PSP培养基发酵得到的44株菌提取物中有20株对AChE的抑制率达到20%以上，最高达到100%，其中有7株菌提取物的半抑制浓度（IC_{50}）介于0.38~1.28 mg/mL；且这20株菌同时具有清除DPPH自由基的活性，终浓度5 mg/mL时清除率均在49%以

上，其中有 14 株的半清除浓度（EC_{50}）低于阳性对照 V_c。M 培养基发酵得到了 42 株菌的提取物（另 2 株无明显生长），其中有 22 株同时表现出较明显的 AChE 抑制活性和 DPPH 自由基清除活性，AChE 抑制率介于 20%~65%，其中 6 株的半抑制浓度（IC_{50}）介于 0.81~1.15 mg/mL，DPPH 清除率多数均超过 44%，其中 14 株的半清除浓度（EC_{50}）低于阳性对照 V_c。有 10 株菌在这两种培养基上均可产生双重活性物质。在双重活性样品中，DLEN2008006（P）、DLEN2008005（P）、BM3T6（M）和 TBG1-21（M）抑制 AChE 和清除 DPPH 的活性均较强，具有相对更高的研究和应用价值。

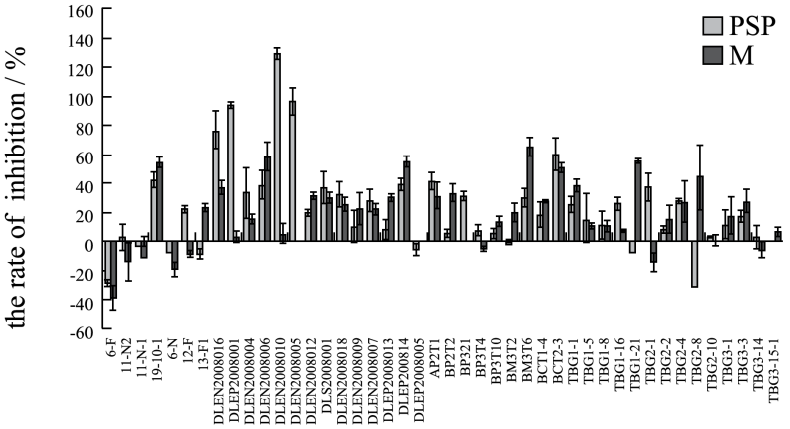


图 1 海洋真菌发酵提取物抑制 AChE 活性

Fig.1 Inhibition effect of of marine fungi fermentation extracts on AChE activity

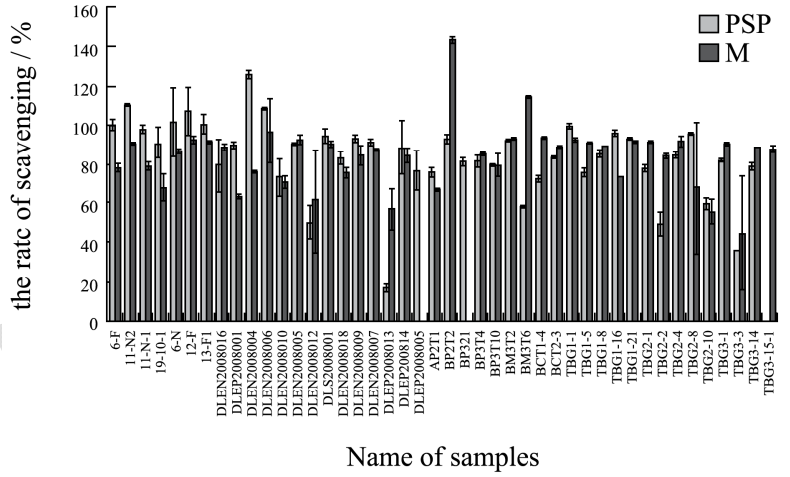


图 2 海洋真菌发酵提取物清除 DPPH 自由基活性

Fig.2 Activity of marine fungi fermentation extracts in scavenging DPPH free radicals

陈霞等[13]评价了来源于东海的 8 株海洋真菌提取物的抗氧化和抗肿瘤生物活性，发现 4 个菌株的发酵液提取物清除自由基的效率较高，在浓度为 2 mg/mL 时，对 DPPH 的清除效率最好高达 90%以上，其他的则对 DPPH 的清除率在 40%~80%之间。董玉洁等[14]发现从长岛海洋生物中分离的 42 株内生真菌中，24 株具有抑制乙酰胆碱酯酶活性（提取物终浓度为 1.58 mg/mL），抑制率最高达到 61.98%，33 株具有清除 DPPH 活性（终浓度为 6.25 mg/mL），清除率最高达到 92.94%，15 株兼具 2 种活性。而在本研究中，当提取物终浓度为 1 mg/mL 时，AChE 抑制率最高达到 100%，样品 TBG1-1（P）和 DLEN2008006（M）在该浓度下的 DPPH 清除率也逼近 100%（EC_{50} 达 0.07 和 0.16 mg/mL），相比较而言，本研究所报道的活性菌株显示了更好的生物活性。

对结果的分析还显示培养基对于菌株的生物活性也会产生显著影响，如 DLEN2008004 在 PSP 培养基中 DPPH 自由基清除率达到 100%，AChE 抑制率为 34%，而在 M 培养基中清除率只有 75%，抑制率为 15%；BM3T6 在 PSP 培养基中 DPPH 自由基清除率为 58%，AChE 抑制率为 30%，而在 M 培养基中清除率达到 100%，抑制率达到 65%。因此，不同培养基

得到的发酵提取物具有不同的生物活性，这为充分挖掘菌株代谢潜力，开发新的抗老年痴呆药物提供了一定的依据。

从分类地位来看，29 株可在一种或两种培养基中产生双重生物活性成分的菌株中，9 株为曲霉属（*Aspergillus*，6 个种），7 株为青霉属（*Penicillium*，6 个种），3 株为木霉属/肉座菌属（*Trichoderma*/*Hypocrea*，2 个种），节菱孢属（*Arthrinium*）、链格孢属（*Alternaria*）、毛霉属（*Mucor*）各 1 株，另有 7 株为未鉴定种属。与已经报道的产 AChE 抑制剂或抗氧化剂的海洋真菌类群相比，本文发现的活性菌株分布更为广泛[6]。丰富的种属分布也为多样化活性物质的发掘提供了可能性。

表 2 初筛强活性样品的 AChE 半抑制浓度（IC_{50}）和 DPPH 半清除浓度（EC_{50}）(mg/mL)

Table 2 IC_{50} to AChE and EC_{50} to DPPH of potent samples selected from preliminary screening (mg/mL)

样品	IC_{50}	EC_{50}	样品	IC_{50}	EC_{50}	样品	IC_{50}	EC_{50}
6-F(P)	-	0.10	DLEN2008006(M)	-	0.16	BCT2-3（M）	1.01	-
11-N2(P)	-	0.84	DLEN2008010（P）	0.38	-	TBG1-1(P)	-	0.07
11-N2(M)	-	0.69	DLEN2008005（P）	0.74	0.39	TBG1-1(M)	-	0.54
11-N1(P)	-	0.15	DLEN2008005（M）	-	0.17	TBG1-8（M）	-	0.57
19-10-1（M）	0.95	-	DLS2008001(P)	-	0.41	TBG1-16(P)	-	0.17
6-N(P)	-	0.11	DLS2008001(M)	-	0.25	TBG1-21(P)	-	0.28
12-F(P)	-	0.65	DLEN2008007(P)	-	0.25	TBG1-21(M)	0.88	0.24
12-F（M）	-	0.51	DLEP2008014（M）	0.90	-	TBG2-1(M)	-	0.47
13-F1(P)	-	1.05	AP2T1(P)	1.28	-	TBG2-4(M)	-	0.13
13-F1(M)	-	0.38	BM3T2(P)	-	0.14	TBG2-8 (M)	1.15	-
DLEN2008016（P）	0.67	-	BM3T2(M)	-	0.15	TBG3-1(M)	-	0.52
DLEP2008001（P）	0.71	2.57	BM3T6(M)	0.81	0.21	对照		
DLEN2008004（P）	-	1.37	BCT1-4(P)	-	0.51	Tacrine	5.01 μM	-
DLEN2008006（P）	0.90	0.55	BCT2-3（P）	0.78	-	Vc	-	1.01

表 3 化学显色为阳性反应的主要活性斑点

Table 3 The main active spots showing positive reactions in chemical coloration

菌株样品号	斑点 Rf (图 4)	不同显色剂显色结果			菌株样品号	斑点 Rf (图 4)	不同显色剂显色结果		
		碘化铋钾	Ehrlich	酸化 $FeCl_3$			碘化铋钾	Ehrlich	酸化 $FeCl_3$
DLEN2008006(P)	0.54	-	淡蓝	-	TBG1-21(M)	0.41	棕黄	-	蓝
DLEN2008010(P)	0.61	-	浅蓝	-	BCT2-3(P)	0.32	橙	-	-
	0.43	棕红	浅黄	灰蓝	BCT2-3(M)	0.32	橙	-	-
	0.22	棕红	棕黄	深蓝	AP2T1(P)	0.75	橙	紫	-
DLEN2008016(P)	0.50	-	淡蓝	-		0.42	棕红	浅棕	浅蓝
DLEP2008014(M)	0.33	-	浅棕	-		0.21	棕红	浅棕	深蓝
BM3T6(M)	0.59	-	蓝	-	TBG2-8(M)	0.26	橙	橙	-
	0.43	-	浅蓝	-					
	0.24	橙	橙	-					

2.2 TLC 生物活性自显影及特征性化学显色分析

为研究真菌活性成分的多样性，对部分活性较强的样品，进行了 DPPH 清除和 AChE 抑制活性的薄层层析自显影分析。如图 3 所示，着色背景上的空白斑点为活性成分所在，结果表明这些活性菌株中的活性产物具有较高的多样性，其中抑制 AChE 活性斑点主要分布在 Rf 为 0.2~0.8 之间，而清除 DPPH 自由基活性斑点大部分都在 Rf 为 0.5 以下，也有部分斑点同时显示了抑制 AChE 活性和清除 DPPH 自由基活性，如图 3 和 4 中所标识。其中多数菌株的活性斑点 Rf 值及紫外特征存在明显差异，不同种、属间代谢产物有明显的差异，同一种菌株（BCT2-3）在不同培养基上的活性代谢产物也有明显差异，这些都表明这些活性菌

株中蕴含了丰富多样的 AChE 抑制剂及 DPPH 自由基清除剂。

鉴于 AChE 抑制剂多属生物碱类，而抗氧化剂酚类物质较多，为初步探讨菌株活性成分的化学性质，采用改良碘化铋钾试剂、Ehrlich 试剂及酸化的 FeCl3 乙醇显色剂进行了薄层显色实验（表 3）。结果显示 DLEN2008010(P)、AP2T1(P)中具有 DPPH 清除及 AChE 抑制双重活性的斑点（图 4 中红色箭头标记斑点）在三种特征显色剂下都有颜色反应，可能具有生物碱或吡咯类等其他含氮化合物及酚类的特征基团。TBG1-21(M)中的抗氧化活性斑点与 DLEN2008010(P)中位置、显色相近，可能也为类似成分。其他菌株中部分活性斑点可能为生物碱等含氮类物质；但多数活性斑点对这三种显色剂均不敏感，说明它们很可能为其他类型化合物，这为结构多样化抗老年痴呆活性物质的研究提供了有益启示，有待进一步研究。

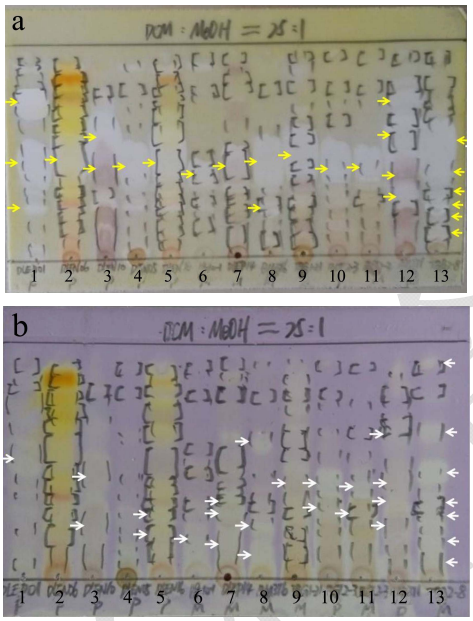


图 3 乙酰胆碱酯酶(a)和 DPPH(b)生物自显影图像

Fig.3 Bioautography image of AChE (a) and DPPH (b)

注：黄色箭头标识 AChE 抑制活性斑点；白色箭头标识 DPPH 清除活性斑点。图中编号代表的样品分别为：1、*Aspergillus unguis* DLEP2008001(P)；2、Asp. clavatus DLEN2008006(P)；3、*Hypocrea lixii* DLEN2008010(P)；4、*Trichoderma harzianum* DLEN2008005(P)；5、*Penicillium glabrum* DLEN2008016(P)；6、Asp. fumigates 19-10-1(M)；7、*Alternaria alternata* DLEP2008014(M)；8、*Asp. sydowii* BM3T6(M)；9、*P. crustosum* TBG1-21(M)；10、*Asp. flavipes* BCT2-3(P)；11、*Asp. flavipes* BCT2-3(M)；12、*P. polonicum* AP2T1(P)；13、*P. chrysogenum* TBG2-8(M)。图中的圆括号铅笔标记为具有 254 nm 紫外吸收，方括号标记为具有 365 nm 紫外吸收，以下薄层图片同例。

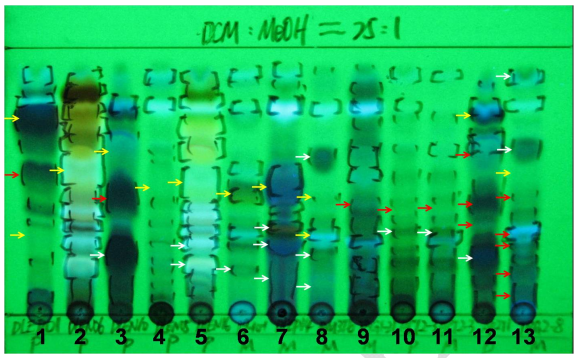


图 4 活性菌株的薄层层析图像及主要活性斑点定位

Fig.4 TLC image of bioactive strains and localization of main bioactive spots

注：图中编号代表的样品同图 3。波长：254 nm 及 365 nm 双波长；箭头颜色：黄色标识 AChE 抑制活性斑点；白色标识 DPPH 清除活性斑点；红色标识双重活性斑点。

2.3 菌株 DLEN2008010 的发酵及活性组分追踪分析

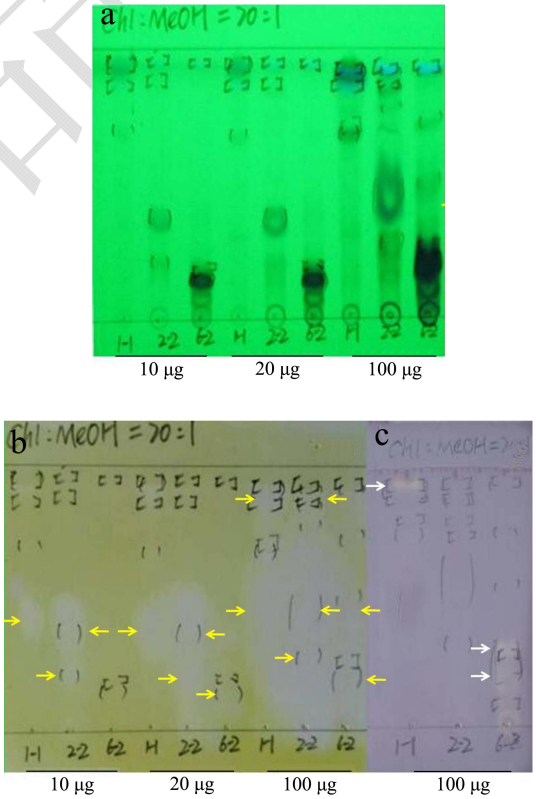


图 5 菌株 DLEN2008010 活性亚组分的薄层层析(a)、抑制 AChE 生物自显影(b)与清除 DPPH 活性自显影(c)图像

Fig.5 The images of TLC (a), AChE-inhibiting bioautography (b), and DPPH-scavenging bioautography (c) of bioactive subfractions of strain DLEN2008010

注：图片下方标注为点样量；箭头颜色标识同图 3 和图 4。

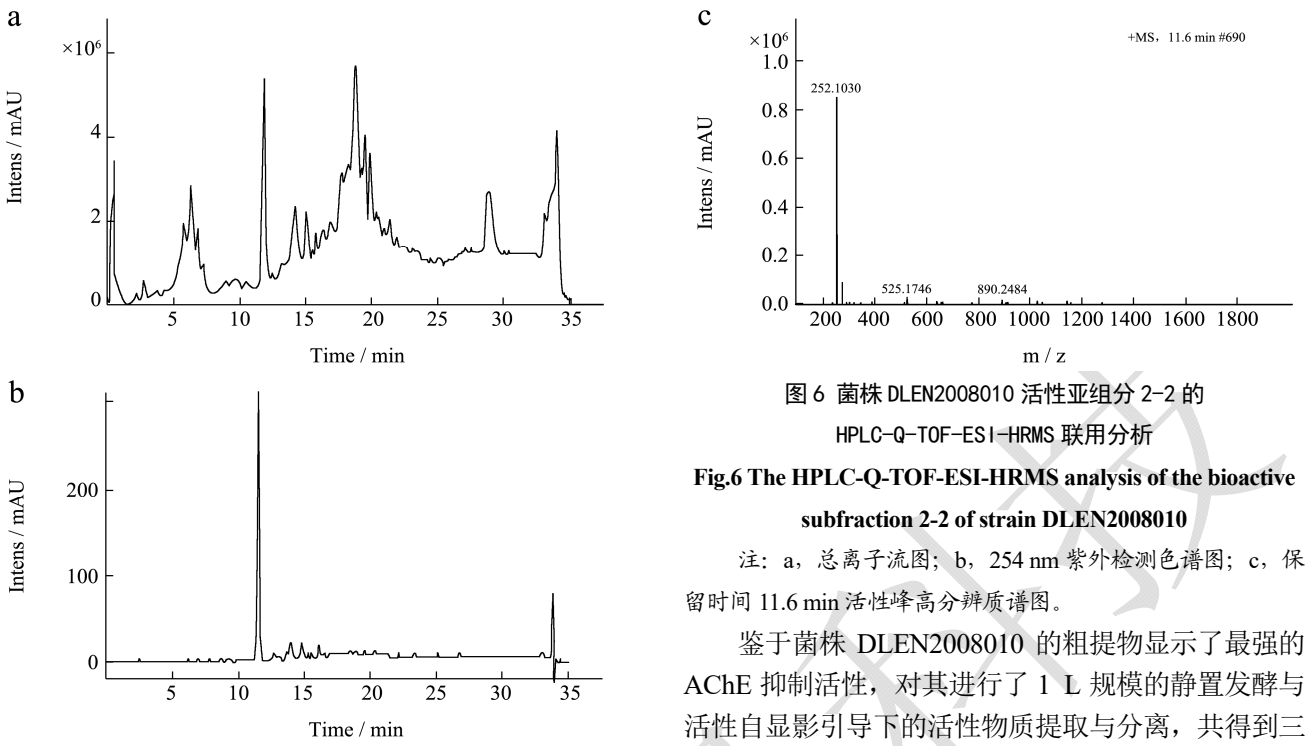


图 6 菌株 DLEN2008010 活性亚组分 2-2 的 HPLC-Q-TOF-ESI-HRMS 联用分析

Fig.6 The HPLC-Q-TOF-ESI-HRMS analysis of the bioactive subfraction 2-2 of strain DLEN2008010

注：a，总离子流图；b，254 nm 紫外检测色谱图；c，保留时间 11.6 min 活性峰高分辨质谱图。

鉴于菌株 DLEN2008010 的粗提物显示了最强的 AChE 抑制活性，对其进行了 1 L 规模的静置发酵与活性自显影引导下的活性物质提取与分离，共得到三个活性亚组分。

表 3 菌株 DLEN2008010 提取物亚组分 2-2 中保留时间 11.6 min 主峰的分子式计算分析

Table 3 The molecular formula calculation and analysis of the main peak with retention time 11.6 min in the subfraction 2-2 of strain DLEN2008010 extract

测量精确质量 *m/z*	离子化学式	离子形式	得分	计算精确质量 *m/z*	绝对误差[mu]
252.1030	$C_{16}H_{14}NO_2$	$[M+H]^+$	100.0	252.1019	-1.1
274.0818	$C_{16}H_{13}NNaO_2$	$[M+Na]^+$	52.1	274.0838	2.1
525.1746	$C_{32}H_{26}N_2NaO_4$	$[2M+Na]^+$	100.0	525.1785	3.9

测量精确质量 *m/z*	相对误差[ppm]	同位素分布匹配因子(mSigma)	rdb	e¡¥Conf	氮规则
252.1030	-4.4	13.2	10.5	even	ok
274.0818	7.6	17.3	10.5	even	ok
525.1746	7.3	6.8	20.5	even	ok

生物自显影分析表明（图 5），亚组分 1-1、亚组分 2-2 和亚组分 6-2 分别具有弱的抑制 AChE+清除 DPPH 活性、较强抑制 AChE 活性和弱的抑制 AChE+清除 DPPH 活性，其中亚组分 2-2 在 10 μg 的点样量下即显示明显的抑制 AChE 活性斑点，亚组分 1-1 中可能含少量同一活性物质，应为柱层析过程中的交叉部位；亚组分 6-2 中的活性物质在较高点样量下才显示活性。

96 孔板药效浓度测试表明，亚组分 2-2 显示了最强的抑制 AChE 活性，其 IC_{50} 达到 96.5 μg/mL，而亚组分 1-1 和 6-2 相对较弱，IC_{50} 分别为 685.4 μg/mL 和 601.9 μg/mL。而三个亚组分对 DPPH 的清除活性都比较弱，在测试最大浓度（1024 μg/mL）下清除率均未达到 50%，故 EC_{50} 均大于 1024 μg/mL。该结果与生物自显影结果一致。

对于具有显著活性的亚组分 2-2 进行了 HPLC-Q-TOF-ESI-HRMS 联用分析，发现其中抑制 AChE 的主要活性物质（254 nm 紫外波长下有显著吸收的斑点），在 254 nm-UV 色谱图及总离子流图中保留时间为 11.6 min（图 6）。经 Bruker Daltonics DataAnalysis 软件的 SmartFormula 功能计算（表 3），最强的准分子离子（$[M+H]^+$）的精确质量测量值与理论计算值之间误差仅为-1.1 mu，同位素分布匹配因子达到 13.2，综合得分为满分；其他相关准分子离子 $[2M+Na]^+$和$[M+Na]^+$的质量误差也小于 5 mu，同位素分布匹配因子及综合得分均达到较高标准，因此确定

该化合物的分子式为 $C_{16}H_{13}NO_2$，这也验证了 2.2 中通过化学显色推断其为生物碱类成分的预测。

对光盘版天然产物数据库（Dictionary of Natural Products 2011）的查询显示，符合该分子式的收藏记录为真菌代谢产物 3-O-Methylviridicatin，该化合物此前从软毛青霉 *Penicillium puberulum* 中被报道过，且被发现具有抑制肿瘤坏死因子 TNF-α 诱导的 HIV 病毒复制的活性[15]。本研究中，薄层层析实验发现该疑似化合物斑点对于酚类显色剂显色，可能是由于内酰胺与内酰亚胺结构互变异构产生的羟基与铁离子螯合所致。当然本研究中发现的抑制 AChE 活性物质是否确为该化合物，还有待进一步的放大发酵、分离纯化、进行核磁共振谱测试的验证，如确为该化合物，则为对前人关于该天然产物药理活性报道的有益补充；也不排除该化合物是另一种同分异构活性化合物的可能性。由于薄层层析表明该化合物是此菌株主要代谢产物之一，可见该菌株及化合物可能具有一定的潜在药用价值。

3 结论

本研究发现 44 株不同来源海洋真菌使用 PSP 和 M 两种培养基发酵提取后，各有 20 株菌和 22 株菌可产生显著抑制 AChE 和清除 DPPH 自由基双重活性的代谢产物，有 10 株菌在这两种培养基上均可产生双重活性物质。培养基成分可显著影响菌株的生物活性。生物自显影显示它们可产生较具多样性的活性成分，化学显色显示其中 3 株菌的活性成分可能具有生物碱或吡咯类等含氮化合物及酚类的特征结构，其他菌株可能产生含氮类化合物或其他结构类型活性化合物。通过对菌株 DLEN2008010 的小规模放大发酵、生物活性引导的分离、活性测试及高分辨液质联用分析，还发现了分子式为 $C_{16}H_{13}NO_2$ 的化合物具有较强的抑制 AChE 活性。上述研究表明海洋真菌是多样化的抗老年痴呆活性物质的重要来源，并为后续的发酵条件优化及活性物质分离鉴定工作奠定了基础。

参考文献

[1] Duysen E G, Lockridge O. Phenotype comparison of three acetylcholinesterase knockout strains [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2006, 30: 91-92

[2] 李岩,冯宗妹,李宁,等.老年痴呆症的药物治疗[J].职业与健康,2016,32(1):131-134
LI Yan, FENG Zong-mei, LI Ning, et al. Drug treatment for senile dementia [J]. Occupation and Health, 2016, 32(1): 131-134

[3] 费晶,刘松.阿尔茨海默病的胆碱酯酶抑制剂治疗进展[J].医药综述,2008,14(9):1397-1398
FEI Jing, LIU Song. Research progress in cholinesterase inhibitor treatment of Alzheimer's disease [J]. Medical Recapitulate, 2008, 14(9): 1397-1398

[4] 范红波.氧自由基在老年痴呆发病机制中的作用[J].中国现代医药杂志,2012,14(4):130-132
FAN Hong-bo. The roles of oxygen free radicals in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Modern Medicine Journal of China, 2012, 14(4): 130-132

[5] Lleo A, Greenberg S M, Growdon J H. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease [J]. Annual Review of Medicine, 2006, 57: 513-533

[6] Choi D Y, Choi H. Natural products from marine organisms with neuroprotective activity in the experimental models of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and ischemic brain stroke: their molecular targets and action mechanisms [J]. Archives of Pharmacal Research, 2015, 38(2): 139-170

[7] Zhang Y, Mu J, Feng Y, et al. Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy [J]. Marine Drugs, 2009, 7(2): 97-112

[8] Zhang Y, Mu J, Feng Y, et al. Biological and chemical diversity of cytotoxin-producing symbiotic marine fungi in intertidal zone of Dalian [J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(19): 2290-2297.

[9] Zhang Y, Han J Y, Feng Y, et al. Isolation and characterization of bioactive fungi from shark *Carcharodon carcharias*' gill with biopharmaceutical prospects [J]. Chinese Journal Oceanology and Limnology, 2016, 34(1), 186-199

[10] Iglesias C G, Salas E, Barouh N, et al. Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods [J]. Food Chemistry, 2016, 194: 749-757

[11] Jesionek W, Choma I M, Majer-Dziedzic B, et al. Screening bacterial and radical scavenging properties of chosen plant extracts using thin-layer chromatography-direct bioautography [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2014, 37(20): 2882-2891

[12] Ramirez A, Gutierrez R, Diaz G, et al. High-performance thin-layer chromatography bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk [J]. Journal of Chromatography B, 2003, 784(2): 315-322

[13] 陈霞,易喻,赵美蓉,等.8 株海洋真菌的抗氧化和抗肿瘤活性筛选[J].中国海洋药物杂志,2012,31(2):1-6

CHEN Xia, YI Yu, ZHAO Mei-rong, et al. Screening of antioxidative and antitumor activities of eight marine fungi [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2012, 31(2): 1-6

[14] 董玉洁,朴美子,王懋存,等.长岛海洋生物内生真菌的分离及其抗老年痴呆活性筛选[J].中国食品学报,2012,12(4):43-47

DONG Yu-jie, PIAO Mei-zi, WANG Mao-cun, et al. Isolation of endophytic fungi from marine organisms of changdao and anti demenntia activity screening [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(4): 43-47

[15] Heguy A, Cai P, Meyn P, et al. Isolation and characterization of the fungal metabolite 3-O-methylviridicatin as an inhibitor of tumour necrosis factor alpha-induced human immunodeficiency virus replication [J]. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1998, 9(2): 149-155

现代食品科技