

黄河三角洲盐碱土壤来源真菌 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 次级代谢产物及其抗炎抗肿瘤活性

张臻¹, 苗双¹, 齐世洲¹, 武艳¹, 蔡国伟², 宫凯凯¹

(1. 滨州医学院附属医院医学研究中心, 山东 滨州 256603;

2. 滨州医学院附属医院国家临床药物试验机构, 山东 滨州 256603)

摘要: **目的** 研究黄河三角洲盐碱土壤中真菌 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 的次级代谢产物及其生物活性。**方法** 采用多种色谱分离技术对真菌液态发酵次级代谢产物进行分离纯化, 并根据化合物的理化性质及波谱数据进行结构鉴定, 同时进行细胞毒活性和 NO 检测, 探究其抗肿瘤与抗炎活性。**结果** 最终从 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 发酵产物中分离鉴定 14 个单体化合物, 分别为倍半萜类 14-hydroxypetasol (1)、6-dehydropetasol (2)、isopetasol (3)、acrememophilane G (4)、phenone (6)、7-hydroxypetasol (7)、sporogen-AO1 (9)、petasol (10)、JBIR-28 (11)、JBIR-27 (12)、3-acetyl-13-deoxyphome (13)、penicilleremophilane A (14), 以及苯的衍生物 3-chloro-4-hydroxyphenylacetamide (5)、phenols (8), 其中化合物 1 (14-hydroxypetasol) 为新化合物。活性结果显示, 化合物 6 (phenone) 和 9 (sporogen-AO1) 对非小细胞肺癌细胞 A549 和 H1299 均具有显著的抗肿瘤活性, IC_{50} 值均在 10 $\mu\text{mol/L}$ 以下。在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 化合物 6 (phenone)、10 (petasol)、11 (JBIR-28) 在 LPS 诱导的炎症模型中表现出一定的抗炎活性。初步的构效关系研究发现, 6, 7 位的氧环结构可以显著提高化合物的抗肿瘤及抗炎活性。**结论** 真菌 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 的次级代谢产物中的倍半萜类在抗肿瘤抗炎先导化合物发现方面具有巨大研发潜力。

关键词: 黄河三角洲; 真菌; *Penicillium terrigenum* RD 4-3; 次级代谢产物; 抗肿瘤活性; 抗炎活性

中图分类号: R574

文献标志码: A

Secondary metabolites and their activities of *Penicillium terrigenum* RD 4-3 isolated from saline-alkali soil in the Yellow River Delta

ZHANG Zhen¹, MIAO Shuang¹, QI Shizhou¹, WU Yan¹, CAI Guowei², GONG Kaikai¹

(1. Medical Research Center, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, Shandong, China;

2. CFDA Certified Clinical Trials Institution, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, Shandong, China)

Abstract: Objective To study the secondary metabolites and biological activities of fungus *Penicillium terrigenum* RD 4-3 isolated from saline-alkali soil in the Yellow River Delta. **Methods** The secondary metabolites were isolated and purified using various chromatographic methods from culture broth, and the structures of the pure compounds were identified based on their physicochemical properties and spectral data. Cytotoxic activity and NO detection were performed to explore antineoplastic activity and anti-inflammatory activity. **Results** Fourteen pure compounds were isolated and identified from the extracts of *Penicillium terrigenum* RD 4-3, including sesquiterpenes 14-hydroxypetasol (1), 6-dehydropetasol (2), isopetasol (3), acrememophilane G (4), phenone (6), 7-hydroxypetasol (7), sporogen-AO1 (9), petasol (10), JBIR-28 (11), JBIR-27 (12), 3-acetyl-13-deoxyphome (13) and penicilleremophilane A (14), and benzene derivatives 3-chloro-4-hydroxyphenylacetamide (5) and phenols (8), among which 14-hydroxypetasol was a new compound. The activity results showed that phenone (6) and sporogen-AO1 (9) exhibited significant antitumor activities against non-small cell lung cancer cells A549 and H1299, with IC_{50} values below 10 $\mu\text{mol/L}$. At a con-

centration of 50 $\mu\text{mol/L}$, phomenone, petasol and JBIR-28 exhibited anti-inflammatory activity in the LPS-induced inflammation model. Preliminary structure-activity relationship revealed that the 6,7-epoxyl structure could significantly increase the antitumor and anti-inflammatory activities of the compounds. **Conclusion** The sesquiterpenes of the secondary metabolites from fungus *Penicillium terrigenum* RD 4-3 from the Yellow River Delta exhibit great potential in the discovery of antitumor and anti-inflammatory lead compounds.

Key words: Yellow River Delta; Fungi; *Penicillium terrigenum* RD 4-3; Secondary metabolites; Antitumor activity; Anti-inflammatory activity

真菌是自然界的第二大生物类群,其物种数量保守估计为 150 万种,但已经被人类认知的仅有 6% 左右,进行过生物与化学研究的比例则更低。真菌的物种多样性导致了其代谢产物结构与活性的多样性,因此是活性天然产物的重要来源之一。抗细菌药物青霉素、降血脂药洛伐他汀、免疫抑制剂环孢素和治疗多发性硬化症的芬戈默德等重磅药物,均为真菌次级代谢产物在药物研发中的体现^[1-2]。近年来,从特殊生境微生物中寻找活性次级代谢产物逐渐成为一个热点研究领域,为活性先导化合物的发现提供了有效途径。黄河三角洲滨海湿地是我国暖温带面积最大、自然性和原生性保持最好也是最年轻的滨海湿地生态系统。该区域土壤盐渍化严重,表层土壤通常含盐量范围为 0.40% ~ 3.97%^[3], pH 值范围为 7.74 ~ 8.26^[4],高盐和高碱可能会激活微生物体内的某些沉默基因,从而产生结构新颖的活性次级代谢产物。目前,黄河三角洲盐碱地真菌次级代谢产物主要包括萜类、环肽类、 α -吡喃酮类、酯类、酚酸类等。现代药理学研究表明,其次级代谢产物具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等生物活性^[5-10]。

本课题组前期对黄河三角洲盐碱土壤样品进行了微生物分离工作,通过抗肿瘤活性初筛发现真菌 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 的发酵产物具有良好的抗肿瘤活性(50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对肺癌细胞 A549 的抑制率为 75.5%),因此对该株真菌次级代谢产物进行深入的化学成分研究,从分离鉴定的结果发现该菌种的次级代谢产物多为艾里莫芬烷型的倍半萜。目前,对于艾里莫芬烷型倍半萜的活性研究主要集中于抗肿瘤、抗菌、抗炎和抗病毒等常规模型中^[11],因此本研究对分离得到的莫芬烷型倍半萜进行了抗肿瘤以及抗炎的活性评价,以期为先导化合物的发现与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂耗材与仪器

RPMI 1640 培养基、FBS、青霉素-链霉素双抗

购自上海肖鹏生物科技有限公司,薄层色谱硅胶预制板购自烟台华阳新材料科技有限公司,石油醚、乙酸乙酯、分析甲醇、乙醇购自烟台市双双化工有限公司,纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司,二氯甲烷、色谱甲醇、乙腈、异丙醇购自天津市科密欧化学试剂有限公司,CCK-8 检测试剂盒购自日本同仁化学研究所,NO 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

AVANCE600 型核磁共振仪、MicrOTOF QII 高分辨质谱仪(德国 Bruker 公司),Count star 全自动细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司),移液器(法国 Gilson 公司),低温离心机(德国 Eppendorf 公司),超净工作台、二氧化碳培养箱、质谱仪、多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),负压吸引器(海门市 Kylin-Bell Lab Instruments 公司),Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),柱色谱用 ODS(北京金欧亚科技发展有限公司),冷却水循环装置、化学隔膜真空泵、旋转蒸发仪(日本东京理化公司),微量电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.1.2 菌株来源

菌株 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 于 2016 年 4 月从山东东营渤海湾沿岸(37°44'3"N 和 119°11'8"E)盐碱地土壤中分离得到,以引物 ITS1(5'-TCCG-TACCACCTGC-3')及 ITS4(5'-TCCCCTTATATAT-GC-3')对菌株进行分子序列克隆,测定该菌株的 ITS 序列。将序列提交至 NCBI 中 BLAST 数据库进行同源比对,发现其与 *Penicillium terrigenum* (MK789192.1) 同源性达 100%,因此,该菌株被鉴定为青霉菌属。菌株保藏于滨州医学院附属医院医学研究中心。

1.1.3 细胞来源

非小细胞肺癌细胞 A549、H1299 和小鼠巨噬细胞 RAW264.7 均购自 ATCC。

1.1.4 培养基

马铃薯葡萄糖水(potato dextrose broth, PDB)培养基:将马铃薯去皮洗净切成小碎块,称取 200 g 加入 1 000 mL 蒸馏水,煮沸 20 min,然后用纱布过

滤,将滤液用蒸馏水补至 1 000 mL,然后加入 20 g 葡萄糖溶解,分装在玻璃锥形瓶中,121 °C 高压灭菌 20 min,冷却后备用。

1.2 方法

1.2.1 菌株发酵

将保藏在冻存管中的菌株 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 复苏后接种在马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 平板培养基,于 28 °C 恒温培养 7 d,用无菌接种环挑取适量菌体接种于培养基 (30 mL PDB 培养基加入 100 mL 三角瓶) 中,于 28 °C 振荡 (150 r/min) 培养 72 h 得到种子液。取 1.5 mL 种子液于发酵培养基 (300 mL PDB 培养基加入 1 000 mL 三角瓶) 中,28 °C 静置发酵 14 d,共发酵 120 瓶。

1.2.2 化合物分离纯化

真菌发酵培养结束后,将等量乙酸乙酯加入 1 000 mL 锥形瓶中,浸没菌体室温静置 24 h;然后通过纱布过滤法分离得到发酵液和菌丝体,发酵液通过等量乙酸乙酯萃取 3 次,浓缩蒸干得到发酵液的乙酸乙酯提取物,菌丝体利用甲醇浸泡并超声 30 min,室温静置 48 h 后对菌丝体甲醇浸泡液减压浓缩,得到菌丝体的甲醇提取物,通过 HPLC 分析后,将发酵液提取物与菌丝体提取物合并,得到真菌 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 的总提取物 (39.5 g)。

1.2.3 分离步骤

粗提物经过减压硅胶柱层析 (200~300 目),以石油醚-乙酸乙酯 (V:V=100:1、50:1、25:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:4)、二氯甲烷-甲醇 (V:V=20:1、10:1、5:1) 和甲醇梯度洗脱,洗脱液减压浓缩并结合薄层层析 (thin layer chromatography, TLC) 显色进行馏分合并,最后得到 6 个馏分 (Fr.1~Fr.6)。

Fr.1 经过 TLC 检测合并,利用 HPLC (C18 柱,甲醇-水, V:V=7:3, 流速 1.0 mL/min), 分离制备得到化合物 **13** (3.1 mg, t_R = 11.0 min)、化合物 **14** (2.8 mg, t_R = 29.5 min)。Fr.2 经过 ODS 柱层析,以甲醇-水 (V:V=35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5) 进行梯度洗脱,得到 Fr.3.1~Fr.3.7; Fr.3.1 用 HPLC (C18 柱, 甲醇/水, V:V=50:50, 流速 1.5 mL/min) 进一步纯化, 得到化合物 **2** (9.1 mg, t_R = 12.0 min)、化合物 **3** (3.5 mg, t_R = 15.0 min); Fr.3.1 用 HPLC (C18 柱, 乙腈/水, V:V=30:70, 流速 1.5 mL/min) 进一步分离制备得到化合物 **4** (2.3 mg, t_R = 20.0 min)。Fr.3 经过 ODS 柱层析以甲醇-水 (V:V=35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、

60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5) 进行梯度洗脱分离, 得到 Fr.3.1~Fr.3.8; Fr.4.1 用 HPLC (C18 柱, 甲醇/水, V:V=58:42, 流速为 1.5 mL/min) 进一步纯化, 得到化合物 **5** (97.3 mg, t_R = 13 min)、化合物 **6** (11.0 mg, t_R = 17 min) 及化合物 **7** (7.13 mg, t_R = 24 min); Fr.3.2 用 HPLC (C18 柱, 乙腈/水, V:V=20:80, 流速 1.0 mL/min) 进一步分离制备, 得到化合物 **8** (2.93 mg, t_R = 40 min)、化合物 **9** (13.0 mg, t_R = 47 min) 及化合物 **10** (27.0 mg, t_R = 50 min)。Fr.4 经过 ODS 柱层析以甲醇-水 (V:V=35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5) 进行梯度洗脱, 得到 Fr.4.1~Fr.4.8; Fr.4.1 用 HPLC (C18 柱, 乙腈-水, V:V=15:85, 流速 1.5 mL/min) 进一步分离制备, 得到化合物 **11** (5.9 mg, t_R = 15 min)、化合物 **12** (34.8 mg, t_R = 16.5 min) 和化合物 **1** (8.2 mg, t_R = 18.0 min)。

1.2.4 细胞毒活性检测

取对数生长期的 A549 及 H1299 细胞经胰酶消化台盼蓝染色并计数, 用新鲜的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 3×10^4 个/mL, 按每孔 100 μ L 接种于 96 孔细胞培养板中, 分别设置空白组、阴性对照组和实验组, 每组 3 个复孔, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。待细胞贴壁后, 实验组加入不同待测样品处理 48 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 在培养箱中继续培养 2 h。最后使用酶标仪测定 450 nm 处各孔吸光度 (optical density, OD) 值, 计算化合物对肿瘤细胞的生长抑制率。实验重复 3 次。取 3 孔平均值, 按照以下公式计算细胞生长抑制率: 抑制率 = $[(OD_{\text{阴性对照组}} - OD_{\text{实验组}}) / (OD_{\text{阴性对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。结合文献调研^[12], $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$ 表明化合物对 A549 及 H1299 细胞有较强的抑制活性, $10 \mu\text{mol/L} \leq IC_{50} < 20 \mu\text{mol/L}$ 表明中等抑制强度, $20 \mu\text{mol/L} \leq IC_{50} < 30 \mu\text{mol/L}$ 表明抑制强度较弱, $IC_{50} \geq 30.0 \mu\text{mol/L}$ 表明抑制强度极弱。

1.2.5 NO 测定

NO 的释放量是反映炎症反应的重要指标, 因此采用 Griess 法检测化合物 **1**~**12** 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 的水平。取对数生长期的 RAW264.7 细胞经胰酶消化后台盼蓝染色并计数, 用新鲜的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 按每孔 1 mL 接种于 24 孔细胞培养板中, 培养过夜。共设置培养基空白组 (细胞培养基)、模型组 (细胞培养基, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS)、实验组 (细胞培养基, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS, 50 $\mu\text{mol/mL}$ 待测样品), 用 50 $\mu\text{mol/mL}$ 的化合物预处理 1 h, 然后每孔加终浓

度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 LPS 继续培养 24 h。每孔取 $50 \mu\text{L}$ 上清液,与等体积的 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 加入 96 孔板混合,用酶标仪在 540 nm 处测量吸光度,然后用标准亚硝酸钠绘制标准曲线,用标准曲线计算各组 NO 浓度。

1.3 统计学处理

所有实验数据均有 3 次平行试验,使用 Graphpad Prism 7.0 软件和 SPSS 25.0 进行统计学分析,

满足正态性和方差齐性条件多组比较可用单因素方差分析 one-way ANOVA,而非正态分布或不满足方差齐性用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

化合物 1~14 的化学结构见图 1。

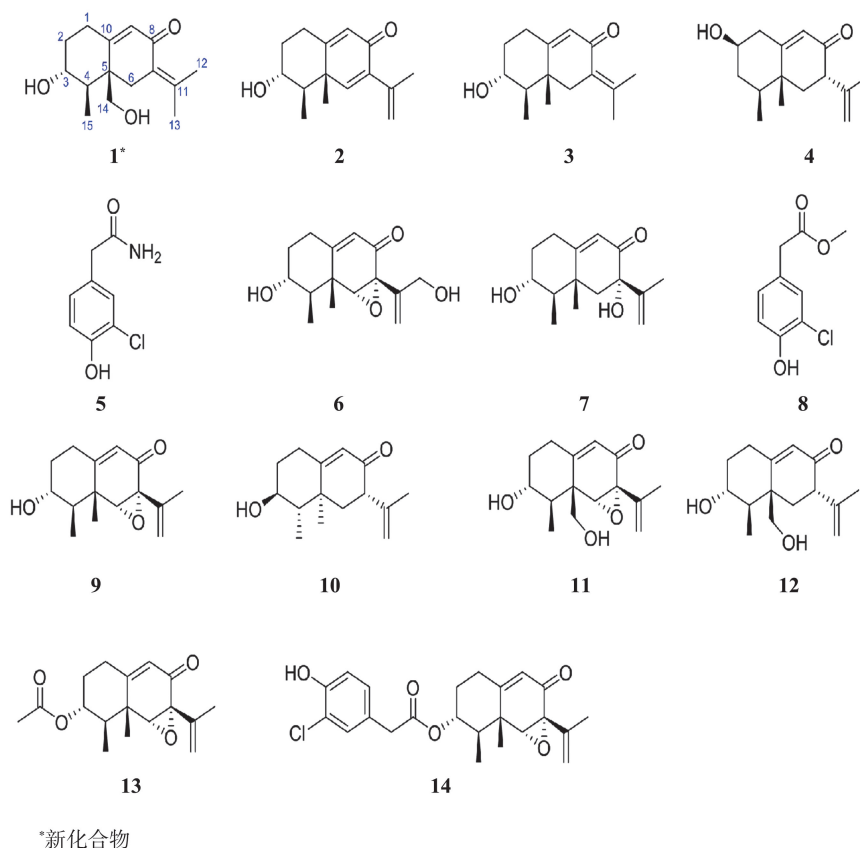


图 1 化合物 1~14 的化学结构

Figure 1 The chemical structures of compounds 1-14

2.1 结构解析

化合物 1: 白色粉末。HR-ESI-MS 显示出准分子离子峰 m/z 251.1642 $[M + H]^+$, 确定其分子式为 $C_{15}H_{22}O_3$, 不饱和度为 5。紫外光谱中 252 nm 处最大特征吸收, 表明分子可能存在 α, β -不饱和酮的取代。 ^1H NMR 数据显示, 分子中含有 3 个甲基: δ_{H} 1.07 (d, $J = 15.0$ Hz, CH_3 -15), 1.80 (s, CH_3 -13) 和 1.98 (d, $J = 1.8$ Hz, CH_3 -12); 一个烯烃质子信号 δ_{H} 5.74 (d, $J = 1.7$ Hz, H-9); 一个连氧亚甲基信号 δ_{H} 3.64 (1H, 重合), δ_{H} 3.41 (1H, dd, $J = 10.7, 4.5$ Hz), 一个连氧次甲基氢信号 δ_{H} 3.65 (1H, 重合)。 ^{13}C NMR 数据显示出 15 个碳信号: 3 个甲基信号 δ_{C} 11.8 (C-15)、22.3 (C-13) 和 22.6 (C-12); 4 个 sp^3 亚甲基包括一个连氧亚甲基 δ_{C} 32.2 (C-1)、36.0

(C-2)、37.5 (C-6) 和 64.5 (C-14); 2 个 sp^3 次甲基包括一个连氧次甲基 δ_{C} 48.8 (C-4) 和 69.8 (C-3); 1 个 sp^2 次甲基 δ_{C} 127.0 (C-9); 5 个季碳包括 3 个双键季碳和 1 个羰基季碳 δ_{C} 46.9 (C-5)、127.9 (C-7)、167.2 (C-10)、141.5 (C-11) 和 190.6 (C-8)。通过对比文献, 化合物 1 的核磁数据与已知化合物 isopetasol (3) [13] 非常相似。区别是化合物 1 相比于 isopetasol (3) 少了一个单峰的甲基, 而多了一个连氧的亚甲基 δ_{C} 64.5 (C-14)。 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 和 HMBC 谱图显示化合物 1 和 isopetasol 拥有相同的艾里莫芬烷倍半萜骨架, 不同之处在于化合物 1 中 14 位甲基被氧化为亚甲基。通过 HMBC 谱中 14 位的氢信号 δ_{H} 3.64 和 3.41 与 C-4 (δ_{C} 48.8)、C-5 (δ_{C} 46.9)、C-6 (δ_{C} 37.5) 以及 C-10 (δ_{C} 167.2) 的 HMBC 相关可证明

C-14位为羟甲基。NOESY 谱图中, δ_{H} 1.07 (CH₃-15)与 3.44 (CH₂-14) 和 2.15/2.93 (CH₂-6) 相关, 2.15 (CH₂-6) 与 1.27 (CH-4) 相关, 推测化合物存在两种相对构型—— $3R^*4S^*5R^*$ 和 $3R^*4R^*5S^*$ 。对以上两种相对构型进行 NMR 计算、DP4+分析($3R4S5R$,

100% ; $3R4R5S$, 0%), 确定了化合物的相对构型为 $3R^*4S^*5R^*$, 进一步通过 ECD 计算, 确定化合物的绝对构型为 $3S4R5S$ 。经文献检索, 确定该化合物为新化合物, 命名为 14-hydroxyisopetasol (**1**)。见表 1、图 2。

表 1 化合物 **1** 的 ^1H (600 MHz) 和 ^{13}C -NMR 数据 (150 MHz) 核磁数据 (溶剂为 Methanol-d₄)
Table 1 ^1H -NMR (600 MHz) and ^{13}C -NMR (150 MHz) data of compound **1** in Methanol-d₄

位置	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	NOESY
1	2.57 (1H, m) 2.25 (1H, m)	32.2	2, 9, 10	
2	1.99 (1H, m) 1.21 (1H, m)	36.0		
3	3.65 (1H, 重合)	69.8	4, 1, 5	15
4	1.27 (1H, m)	48.8	3, 5, 14	6 (2.15)
5		46.9		
6	2.93 (1H, d, $J=14.3$ Hz) 2.15 (1H, d, $J=14.3$ Hz)	37.5	5, 7	
7		127.9		
8		190.6		
9	5.74 (1H, d, $J=1.7$ Hz)	127.0	1, 5, 7	
10		167.2		
11		141.5		
12	1.98 (3H, d, $J=1.8$ Hz)	22.6	7, 11, 13	
13	1.80 (3H, s)	22.3	7, 11, 12	
14	3.64 (1H, 重合) 3.41 (1H, dd, $J=10.7, 4.5$ Hz)	64.5	4, 5	
15	1.07 (3H, d, $J=15.0$ Hz)	11.8	3, 4, 5	14 (3.41), 3-OH, 6 (2.15, 2.93), 3
3-OH	4.50 (1H, d, $J=5.9$ Hz)		15, 4	
14-OH	4.66 (1H, t, $J=4.8$ Hz)		15	

化合物 **2**: 白色粉末, 分子式 C₁₅H₂₀O₂; ESI-MS: m/z 233.2 [M+H]⁺; ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 6.96 (1H, s, H-6), 5.98 (1H, d, $J=13.5$ Hz, H-9), 5.24 (1H, dd, $J=2.52, 1.02$ Hz, H-2), 5.03 (1H, dt, $J=3.96, 1.5$ Hz, H-12), 4.68 (1H, s, 3-OH), 3.49 (1H, dd, $J=12.06, 4.2$ Hz, H-3), 2.31 (1H, dq, $J=13.56, 2.64$ Hz, H-1), 2.09 (1H, m, H-1), 1.90 (3H, s, H-13), 1.24 (1H, m, H-4), 1.23 (1H, m, H-2), 1.18 (1H, m, H-2); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 184.2 (C-8), 167.0 (C-10), 151.3 (C-6), 141.1 (C-11), 137.2 (C-7), 123.8 (C-9), 115.9 (C-12), 69.0 (C-3), 47.3 (C-4), 42.8 (C-5), 36.5 (C-2), 29.8 (C-1), 22.2 (C-13), 18.4 (C-14), 11.7 (C-15)。上述波谱数据与文献[14]报道的 6-dehydropetasol 数据基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 6-dehydropetasol。

化合物 **3**: 白色粉末, 分子式 C₁₅H₂₂O₂; ESI-MS: m/z 235.2 [M+H]⁺; ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 5.64 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-9), 4.61 (3H, d, $J=5.7$ Hz, 3-OH), 3.35 (1H, m, H-3), 2.86 (1H, d, $J=13.7$ Hz, H-6), 2.37 (1H, tdd, $J=14.5, 5.2, 2.0$ Hz, H-1), 2.24 (1H, ddd, $J=14.7, 3.2, 2.4$ Hz, H-1), 2.05 (1H, d, $J=13.9$ Hz, H-6), 1.97 (3H, m, H-2), 1.81 (3H, s, H-13), 1.26 (1H, m, H-4), 1.24 (1H, m, H-2), 1.00 (3H, d, $J=6.7$, H-15), 0.90 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 190.6 (C-8), 167.7 (C-10), 141.5 (C-11), 127.4 (C-7), 125.4 (C-9), 69.1 (C-3), 48.9 (C-4), 41.7 (C-5), 40.7 (C-6), 35.4 (C-2), 30.0 (C-1), 22.1 (C-12), 21.7 (C-13), 17.0 (C-14), 10.9 (C-15)。上述波谱数据与文献[13]报道的 isopetasol 数据基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 isopetasol。

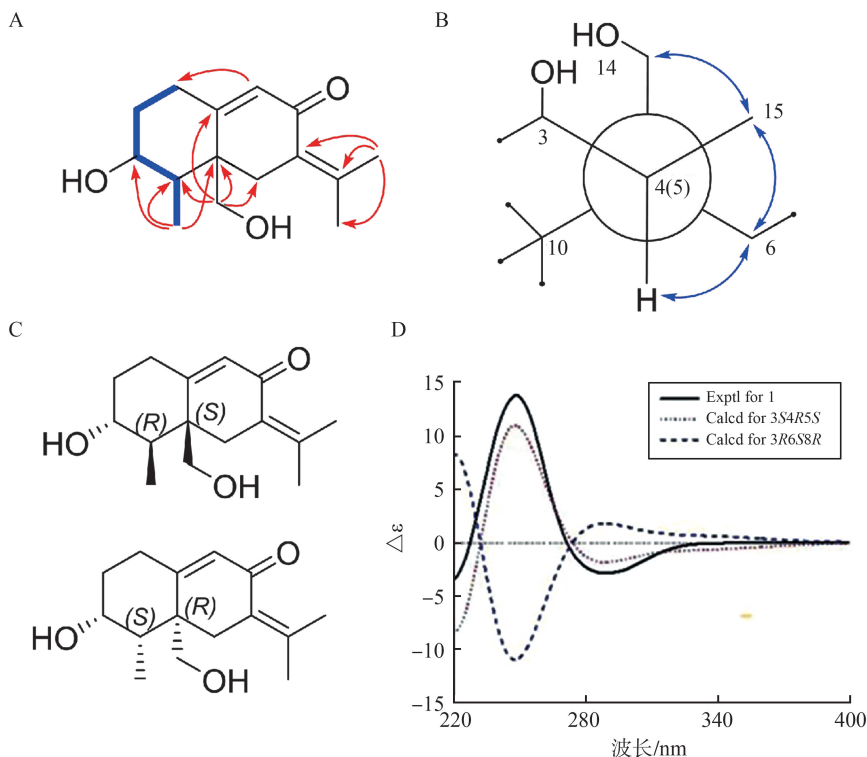


图2 化合物1结构解析相关信息

A: 化合物1主要的 ^1H - ^1H COSY和HMBC相关信号; B: C4、C5相对构型; C: 两种可能的相对构型; D: 化合物1的实验ECD谱图及其计算ECD谱图。

Figure 2 Information related to the structural elucidation of compound 1

A: The selected ^1H - ^1H COSY and HMBC related signals of compound 1; B: Relative configurations of C4 and C5; C: Two relative configurations; D: Experimental and calculated ECD spectra of compound 1.

化合物4: 无色油状物, 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$; ESI-MS: m/z 235.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 5.69 (1H, s, H-9), 4.75 (2H, s, H-12), 4.74 (1H, s, H-12), 3.41 (1H, s, H-2), 3.40 (1H, s, H-7), 2.43 (1H, s, H-1), 2.33 (1H, s, H-1), 2.30 (3H, d, $J=13.9$ Hz, H-3), 2.05 (1H, dd, $J=16.8, 3.8$ Hz, H-13), 1.88 (1H, m, H-4), 1.70 (1H, dd, $J=16.8, 3.8$ Hz, H-6), 1.66 (3H, s, H-15), 1.21 (3H, t, $J=13.3$ Hz, H-6), 1.07 (3H, s, H-14), 0.88 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 198.3 (C-8), 168.8 (C-10), 146.8 (C-11), 124.7 (C-9), 111.7 (C-12), 70.4 (C-2), 48.1 (C-7), 41.8 (C-1), 41.7 (C-6), 41.5 (C-4), 39.0 (C-3), 38.4 (C-5), 19.5 (C-13), 16.4 (C-14), 15.0 (C-15)。上述波谱数据与文献[15]报道的 *acrememophilane* G 数据基本一致, 故鉴定化合物4为 *acrememophilane* G。

化合物5: 白色粉末, 分子式 $\text{C}_8\text{H}_8\text{ClNO}_2$; ESI-MS: m/z 186.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 10.06 (1H, s, H-4), 7.43 (1H, s, H-8), 7.21 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-2), 6.99 (1H, dd, $J=8.0,$

1.5 Hz, H5), 6.88 (1H, d, $J=1.0$ Hz, H-5), 3.25 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 172.6 (C-8), 151.8 (C-4), 130.4 (C-2), 128.8 (C-6), 128.3 (C-1), 119.4 (C-3), 116.5 (C-5), 41.1 (C-7)。上述波谱数据与文献[16]报道的 3-chloro-4-hydroxyphenylacetamide 数据基本一致, 故鉴定化合物5为 3-chloro-4-hydroxyphenylacetamide。

化合物6: 白色结晶, 分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$; ESI-MS: m/z 265.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 5.68 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-9), 5.18 (1H, m, H-12), 5.06 (1H, m, H-12), 4.87 (1H, t, $J=5.4$ Hz, OH-13), 4.68 (1H, d, $J=5.94$ Hz, OH-3), 4.08 (1H, dd, $J=14.1, 5.0$ Hz, H-13), 4.02 (1H, t, $J=14.4$ Hz, H-13), 3.42 (1H, t, $J=6.0$ Hz, H-3), 3.34 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H-6), 2.49 (1H, m, H-12), 2.25 (1H, m, H-1), 1.97 (1H, m, H-2), 1.51 (1H, dd, $J=17.1, 6.78$ Hz, H-2), 1.20 (1H, m, H-4), 1.18 (3H, m, CH-14), 1.12 (3H, d, $J=6.72$ Hz, CH-15); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 192.0 (C-8), 165.3 (C-10), 145.1 (C-11), 119.7 (C-9), 111.2 (C-11), 68.7 (C-3), 68.3

(C-6), 61.7 (C-7), 61.1 (C-11), 44.3 (C-4), 40.7 (C-5), 35.4 (C-2), 30.3 (C-1), 17.9 (C-14), 11.3 (C-15) 上述波谱数据与文献[17]报道的 phomenone 数据基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 phomenone。

化合物 **7**: 白色粉末, 分子式 $C_{15}H_{22}O_3$; ESI-MS: m/z 251.2 $[M+H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 5.73 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-9), 5.35 (1H, d, $J=1.4$ Hz, OH-7), 5.01 (1H, dd, $J=2.1, 0.9$ Hz, H-12), 4.89 (1H, t, $J=1.62$ Hz, H-12), 4.57 (1H, d, $J=5.64$ Hz, OH-3), 3.38 (1H, m, H-3), 2.45 (1H, t, $J=1.86$ Hz, H-1), 2.26 (1H, dq, $J=14.7, 2.52$ Hz, H-1), 2.01 (1H, m, H-2), 1.92 (1H, d, $J=14.5$ Hz, H-6), 1.62 (1H, s, H-13), 1.24 (1H, m, H-2), 1.22 (1H, m, H-4), 1.19 (3H, s, H-4), 0.94 (3H, d, $J=6.72$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 197.0 (C-8), 169.5 (C-10), 147.8 (C-11), 121.8 (C-9), 112.0 (C-12), 76.3 (C-7), 68.9 (C-3), 49.4 (C-4), 45.4 (C-6), 39.1 (C-5), 35.9 (C-2), 30.8 (C-1), 20.9 (C-14), 19.3 (C-13), 11.0 (C-15)。上述波谱数据与文献[14]报道的 7-hydroxypetasol 数据基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 7-hydroxypetasol。

化合物 **8**: 白色粉末, 分子式 $C_8H_8O_3Cl$; ESI-MS: m/z 201.0 $[M+H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 7.22 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2), 7.00 (1H, dd, $J=8.3, 2.2$ Hz, H-6), 6.90 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5), 3.59 (3H, s, H-3), 3.56 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 172.0 (C-8), 152.3 (C-4), 130.9 (C-2), 129.3 (C-6), 126.2 (C-1), 119.5 (C-3), 116.7 (C-5), 52.0 (C-9), 38.9 (C-7)。上述波谱数据与文献[18]报道的 phenols 数据基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为 phenols。

化合物 **9**: 白色结晶, 分子式 $C_{15}H_{20}O_3$; ESI-MS: m/z 249.1 $[M+H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 5.70 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-9), 5.03 (1H, m, H-12), 5.00 (1H, m, H-12), 4.68 (1H, d, $J=6.0$ Hz, OH-3), 3.42 (1H, m, H-3), 3.33 (1H, s, H-6), 2.50 (1H, m, H-1), 2.22 (1H, m, H-1), 1.96 (1H, m, H-12), 1.76 (3H, s, H-13), 1.52 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2), 1.19 (H, t, $J=1.02$ Hz, H-4), 1.17 (3H, s, H-14), 1.12 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 192.5 (C-8), 165.7 (C-10), 139.7 (C-11), 120.1 (C-9), 113.9 (C-12), 69.0 (C-3), 68.3 (C-6), 63.1 (C-7), 44.5 (C-4), 40.9 (C-5), 35.6 (C-2), 30.6 (C-1),

19.9 (C-14), 18.7 (C-13), 11.6 (C-15)。上述波谱数据与文献[19]报道的 sporogen-AO1 数据基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为 sporogen-AO1。

化合物 **10**: 白色粉末, 分子式 $C_{15}H_{22}O_2$; ESI-MS: m/z 235.1 $[M+H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 5.64 (1H, d, $J=1.74$ Hz, H-9), 4.84 (1H, q, $J=1.38$ Hz, H-12), 4.77 (1H, d, $J=2.22$ Hz, H-12), 4.62 (1H, d, $J=5.64$ Hz, OH-3), 3.39 (1H, m, H-3), 3.15 (1H, dd, $J=14.4, 4.5$ Hz, H-7), 2.39 (1H, m, H-1), 2.25 (1H, m, H-1), 1.98 (1H, m, H-12), 1.96 (1H, dd, $J=13.0, 4.6$ Hz, H-6), 1.78 (1H, t, $J=13.8$ Hz, H-6), 1.63 (3H, t, $J=1.08$ Hz, H-13), 1.24 (1H, m, H-2), 1.11 (3H, s, H-14), 0.95 (3H, d, $J=6.72$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 198.0 (C-8), 169.3 (C-10), 144.1 (C-11), 123.6 (C-9), 113.9 (C-12), 69.2 (C-3), 50.3 (C-4), 49.7 (C-7), 41.5 (C-6), 35.6 (C-2), 30.7 (C-1), 20.3 (C-13), 17.0 (C-14), 10.8 (C-15)。上述波谱数据与文献[20]所报道的 petasol 数据基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 petasol。

化合物 **11**: 白色粉末, 分子式 $C_{15}H_{20}O_4$; ESI-MS: m/z 265.1 $[M+H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 5.80 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-9), 5.00 (1H, m, H-12), 4.98 (1H, m, H-12), 4.76 (1H, t, $J=5.1$ Hz, OH-14), 4.68 (1H, d, $J=5.8$ Hz, OH-3), 3.78 (1H, d, $J=10.9$ Hz, H-14), 3.67 (1H, d, $J=11.2$ Hz, H-14), 3.42 (1H, m, H-3), 3.41 (1H, t, H-6), 2.47 (1H, m, H-1), 2.26 (1H, m, H-1), 1.97 (1H, m, H-2), 1.77 (3H, s, H-13), 1.57 (1H, m, H-2), 1.13 (1H, s, H-4), 1.12 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 193.2 (C-8), 161.2 (C-10), 140.6 (C-11), 123.4 (C-9), 113.2 (C-12), 69.3 (C-3), 67.4 (C-6), 63.1 (C-7), 60.7 (C-14), 47.4 (C-5), 44.3 (C-4), 35.5 (C-2), 30.6 (C-1), 19.6 (C-13), 11.8 (C-15)。上述波谱数据与文献[17]所报道的 JBIR-28 数据基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 JBIR-28。

化合物 **12**: 白色粉末, 分子式 $C_{15}H_{22}O_3$; ESI-MS: m/z 251.1 $[M+H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 5.76 (1H, d, $J=1.68$ Hz, H-9), 4.82 (1H, m, H-12), 4.81 (1H, m, H-12), 4.72 (1H, d, $J=2.28$ Hz, OH-14), 4.58 (1H, d, $J=5.64$ Hz, H-3), 3.75 (1H, dd, $J=10.98, 3.78$ Hz, H-14), 3.70 (1H, dd, $J=11.04, 4.62$ Hz, H-14), 3.50

(1H, m, H-3), 3.49 (1H, t, $J=5.31$ Hz, H-7), 2.48 (1H, m, H-1), 2.27 (1H, m, H-1), 2.16 (1H, dd, $J=13.2, 5.1$ Hz, H-6), 1.98 (1H, m, H-2), 1.79 (1H, t, $J=13.5$ Hz, H-6), 1.60 (3H, s, CH₃-13), 1.25 (1H, m, H-3), 1.20 (1H, m, H-4), 0.99 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-15); ¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_c : 198 (C-8), 166.8 (C-10), 144.6 (C-11), 125.7 (C-9), 113.8 (C-12), 69.5 (C-3), 64.3 (C-14), 51.0 (C-7), 50.6 (C-4), 44.8 (C-5), 40.0 (C-6), 35.6 (C-2), 31.7 (C-1), 20.1 (C-13), 11.1 (C-15)。上述波谱数据与文献[11]报道的 JBIR-27 数据基本一致,故鉴定化合物 **12** 为 JBIR-27。

化合物 **13**: 白色粉末, 分子式 C₁₇H₂₂O₄; ESI-MS: m/z 291.1 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H : 5.76 (1H, d, $J=1.92$ Hz, H-9), 5.05 (1H, m, H-12), 5.01 (1H, m, H-12), 4.83 (1H, dt, $J=17.88, 4.44$ Hz, H-3), 3.49 (1H, s, H-6), 2.64 (1H, m, H-1), 2.35 (1H, m, H-1), 2.06 (1H, m, H-2), 2.05 (3H, m, H-13), 1.81 (1H, m, H-2), 1.80 (3H, m, H-13), 1.31 (1H, m, H-4), 1.26 (3H, m, H-14), 1.05 (3H, d, $J=6.72$ Hz, H-15); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_c : 192.0 (C-8), 170.0 (C-16), 163.4 (C-10), 139.2 (C-11), 120.3 (C-9), 113.9 (C-12), 72.3 (C-3), 67.5 (C-6), 62.8 (C-7), 41.3 (C-4), 40.7 (C-5), 31.2 (C-2), 29.5 (C-1), 20.8 (C-17), 19.5 (C-13), 18.1 (C-14), 10.9 (C-15)。上述波谱数据与文献[21]报道的 3-acetyl-13-deoxyphome 数据基本一致,故鉴定化合物 **13** 为 3-acetyl-13-deoxyphome。

化合物 **14**: 白色粉末, 分子式 C₂₃H₂₅ClO₅; ESI-MS: m/z 417.1 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H : 7.24 (1H, d, $J=2.16$ Hz, H-19), 7.03 (1H, q, $J=2.16$ Hz, H-23), 6.91 (1H, d, $J=8.34$ Hz, H-22), 5.75 (1H, d, $J=1.80$ Hz, H-9), 5.05 (1H, m, H-12), 5.01 (1H, m, H-12), 4.82 (1H, m, H-3), 3.58 (2H, q, $J=15.54$ Hz, H-17), 3.47 (1H, s, H-6), 2.63 (1H, m, H-1), 2.34 (1H, m, H-1), 2.04 (1H, m, H-12), 1.84 (1H, m, H-4), 1.77 (3H, m, H-13), 1.27 (H, m, H-21), 1.26 (1H, m, H-2), 1.25 (3H, m, H-4), 0.99 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-15); ¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_c : 192.0 (C-8), 170.8 (C-16), 163.4 (C-10), 152.0 (C-21), 139.2 (C-11), 130.5 (C-19), 128.9 (C-23), 125.9 (C-18), 120.3 (C-9), 119.2 (C-20),

116.5 (C-22), 113.9 (C-12), 72.8 (C-3), 67.4 (C-6), 62.9 (C-7), 41.4 (C-4), 40.7 (C-5), 40.0 (C-17), 31.2 (C-2), 29.4 (C-1), 19.5 (C-13), 18.1 (C-14), 10.8 (C-15)。上述波谱数据与文献[22]报道的 penicilleremophilane A 数据基本一致,故鉴定化合物 **14** 为 penicilleremophilane A。

2.2 细胞毒性

对化合物 **1**~**12** 进行的细胞毒活性检测结果表明,化合物 **6** (phomenone) 和 **9** (sporogen-AO1) 对非小细胞肺癌细胞 A549 和 H1299 均显示出较强的抑制活性。化合物 **6** (phomenone) 对 A549 和 H299 细胞的 IC_{50} 值分别为 5.1 和 7.9 $\mu\text{mol/L}$; 化合物 **9** (sporogen-AO1) 对 A549 和 H299 细胞的 IC_{50} 值分别为 1.2 和 3.8 $\mu\text{mol/L}$ 。化合物 **10** (petasol) 和 **11** (JBIR-28) 对 A549 细胞具有中等强度的抑制活性, IC_{50} 值分别为 15.4 和 13.1 $\mu\text{mol/L}$; 对 H1299 细胞显示出弱的抑制活性, IC_{50} 值分别为 27.6 和 28.9 $\mu\text{mol/L}$ 。见表 2。

表2 化合物 **1**~**12** 对非小细胞肺癌的细胞毒活性/($\mu\text{mol/L}$)
Table 2 Cytotoxic activity of compound **1** to **12** in non-small cell lung cancer / ($\mu\text{mol/L}$)

化合物	IC_{50}	
	A549	H1299
1	NA	NA
2	25.5	NA
3	NA	NA
4	28.8	NA
5	26.4	NA
6	5.1	7.9
7	NA	NA
8	NA	NA
9	1.2	3.8
10	15.4	27.6
11	13.1	28.9
12	NA	NA

注: NA 表示 $IC_{50}>30.0$ $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 NO 测定

模型组 RAW264.7 细胞 NO 水平 (4.13 ± 0.48) 与培养基空白组 (2.21 ± 0.00) 差异无统计学意义 ($P=0.422$); 与模型组 NO 水平 (4.13 ± 0.48) 相比, 化合物 **6**、化合物 **10**、化合物 **11** 的 NO 水平均降低 (1.56 ± 0.07 、 1.56 ± 0.07 、 1.60 ± 0.00), 差异有统计学意义 ($P=0.007$, $P=0.007$, $P=0.013$), 抑制率分别为 62.20%、62.20% 和 61.22%。初步的构效关系研究发现, 6,7 位的氧环能提高抗炎活性, 通过化合物 **6** 和 **11** 的结构和活性结果研究发现, 12,14 位的羟基也可能增加抗炎活性。见图 3。

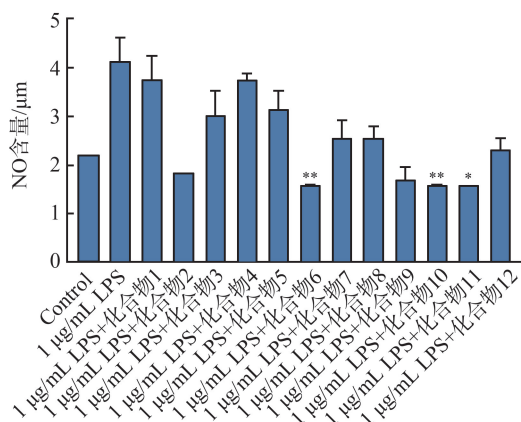


图3 化合物1~12对RAW264.7细胞中NO生成的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组)

Figure 3 Effect of compounds 1 to 12 on NO formation in RAW264.7 cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group)

3 讨论

真菌是地球上分布最广泛、生物多样性最丰富的生物之一,从真菌次级代谢产物中寻找活性产物进行药物开发研究具有巨大潜力。一项基于限制性片段长度多态性数据的网络研究表明,网络中模块显示细菌和真菌群落与土壤特性紧密相关。因此针对黄河三角洲盐碱地真菌次级代谢产物的研究有助于推动其开发利用。研究表明,黄河三角洲盐碱地曲霉属、枝孢霉属、镰孢属等真菌次级代谢产物对人早幼粒白血病细胞 HL-60 和人肝癌细胞 BEL-7402 增殖具有显著抑制作用^[23]。

本研究针对一株分离自黄河三角洲盐碱土壤的菌株 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 进行的次级代谢产物,通过使用硅胶、ODS 和 HPLC 等柱色谱从其发酵产物中分离、纯化获得了 14 个单体化合物,并用波谱技术对其进行了鉴定,分别为倍半萜类 14-hydroxypetasol (1)、6-dehydropetasol (2)、isopetasol (3)、acrememophilane G (4)、phomenone (6)、7-hydroxypetasol (7)、sporogen-AO1 (9)、petasol (10)、JBIR-28 (11)、JBIR-27 (12)、3-acetyl-13-deoxyphome (13)、penicilleremophilane A (14),以及苯环衍生物 3-chloro-4-hydroxyphenylacetamide (5)、phenols (8),均为首次从该菌株中分离得到,其中化合物 1 为新的倍半萜类化合物。目前未检索到文献报道真菌 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 的次级代谢产物。本研究首次报道了该菌株的次级代谢产物,所发现的部分化合物具有抗肿瘤和抗炎活性,极大地丰富了真菌 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 的次级

代谢产物多样性研究。

倍半萜在自然界中分布广泛,存在于植物、海洋微生物、细菌、真菌及昆虫组织等生物体^[24-30],其中大多数的倍半萜具有较强的生物活性和重要的生物功能,如抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗虫等作用^[31-33]。本研究对分离得到的次级代谢产物进行了抗肿瘤和抗炎生物活性研究,在抗肿瘤活性检测中,化合物 2、4、5、6、9、10、11 对非小细胞肺癌细胞 A549 增殖具有抑制作用,化合物 6、9、10 和 11 对非小细胞肺癌细胞 H1299 增殖具有抑制作用,其中化合物 6 和 9 对非小细胞肺癌细胞 A549 和 H1299 均具有显著的抗肿瘤活性,通过比较化合物的结构发现,化合物 6、7 和 9 的 6,7 位均含有环氧结构,说明 6,7 位氧环可能是显著增加抗肿瘤活性的因素之一,同时对化合物 6、9 和 11 的结构和活性结果发现,14 位的羟基可能降低其抗肿瘤活性。比较化合物 2、4 和 10 的结构发现,羟基的位置以及 3,4 位甲基的构型可能也会影响抗肿瘤活性。在抗炎活性检测中,除化合物 1 和 4 外,均有一定的抗炎活性,其中化合物 6、10 和 11 减轻 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症效果最佳,构效关系表明,其 6,7 位的环氧结构能增强倍半萜类化合物的抗肿瘤和抗炎活性,表明真菌 *Penicillium terrigenum* RD 4-3 的次级代谢产物具有较好的抗肿瘤和抗炎活性,后期可对其开展更为深入的化学及生物学研究。本研究为新药研发提供新分子实体,为进一步开发利用黄河三角洲盐碱土壤的真菌资源提供了参考。

参考文献:

- [1] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B influenzae [J]. Br J Exp Pathol, 1929, 10 (3): 226-236.
- [2] Schueffler A, Anke T. Fungal natural products in research and development [J]. Nat Prod Rep, 2014, 31 (10): 1425-1448.
- [3] 刘玉斌,韩美,刘延荣,等.黄河三角洲土壤盐分空间分异规律研究[J].人民黄河, 2018, 40(2): 76-80. LIU Yubin, HAN Mei, LIU Yanrong, et al. Spatial distribution of soil salinity and nutrients in the Yellow River Delta [J]. Yellow River, 2018, 40(2): 76-80.
- [4] 谭小丽,王岩宏,韩卫东.黄河三角洲湿地土壤剖面理化特征分析[J].资源节约与环保, 2018, 5(12): 9247-9250. TAN Xiaoli, WANG Yanhong, HAN Weidong. Analysis of physical and chemical characteristics of wetland soil

- profile in Yellow River Delta[J]. Resources Economiza- tion & Environment Protection, 2018, 5(12): 9247-9250.
- [5] 许言超,刘培培,王义,等. 黄河三角洲植物真菌的分离、活性菌株筛选及活性产物鉴定[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(4): 15-20.
- XU Yanchao, LIU Peipei, WANG Yi, et al. Isolation of plant fungi, screening of active strains and identification of active products in the Yellow River Delta[J]. Chinese Journal of Marine Medicine, 2014, 33(4): 15-20.
- [6] 陈正乾,刘培培,王义,等.黄河三角洲土曲霉 *Aspergillus terreus* OUCMDZ-1925 中具抗菌活性的聚酮类天然产物[J].菌物学报, 2013, 32(2): 277-285.
- CHEN Zhengqian, LIU Peipei, WANG Yi, et al. Polyketide natural products with antimicrobial activity in *Aspergillus terreus* OUCMDZ-1925 in the Yellow River Delta[J]. Mycosystema, 2013, 32(2): 277-285.
- [7] 曲鹏,刘培培,付鹏,等.黄河三角洲耐盐真菌 *Penicillium chrysogenum* HK14-01 的次生代谢产物[J].微生物学报, 2012, 52(9): 1103-1112.
- QU peng, LIU Peipei, FU Peng, et al. Secondary metabolites of salt-tolerant fungus *Penicillium chrysogenum* HK14-01 in the Yellow River Delta[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(9): 1103-1112.
- [8] 王聪,刘培培,王义,等. 海洋来源放线菌 *Streptomyces parvulus* OUCMDZ-2554 产放线菌素 D 的发酵条件优化[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(3): 34-42.
- WANG Cong, LIU Peipei, WANG Yi, et al. Optimization of fermentation conditions for actinomycin D production by *Streptomyces parvulus* OUCMDZ-2554 from marine actinomycetes[J]. Chinese Journal of Marine Medicine, 2014, 33(3): 34-42.
- [9] Fu P, Liu P, Qu H, et al. Alpha-pyrones and diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Nocardioopsis dassonvillei* HR10-5[J]. J Nat Prod, 2011, 74(10): 2219-2223.
- [10] Xu Y, Wang C, Liu H, et al. Meroterpenoids and isocoumarinoids from a *Myrothecium* fungus associated with *Apocynum venetum*[J]. Mar Drugs, 2018, 10(1): 1-13.
- [11] Wang C, Li J, Yang R, et al. Petasins from the rhizomes of *Ligularia fischeri* and its derivatives[J]. Records of Natural Products, 2014, 8(2): 156-164.
- [12] Li S, Qin C, Cui S, et al. Discovery of a natural-product-derived preclinical candidate for once-weekly treatment of type 2 diabetes[J]. J Med Chem, 2019, 62(5): 2348-2361.
- [13] Sugama K, Hayashi K, Nakagawa T, et al. Sesquiterpenoids from *Petasites fragrans* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(7): 1619-1622.
- [14] Sugawara F, Hallock YF, Bunkers GD, et al. Phytoactive eremophilanes produced by the weed pathogen *Drechslera gigantea* [J]. Biosci Biotech Bioch, 1993, 57(2): 236-239.
- [15] Cheng ZB, Zhao JJ, Liu D, et al. Eremophilane-type sesquiterpenoids from an *Acremonium* sp. Fungus isolated from deep-sea sediments[J]. J Nat Prod, 2016, 79(4): 1035-1047.
- [16] Davis RA, Watters D, Healy PC. The isolation and synthesis of 3-chloro-4-hydroxyphenylacetamide produced by a plant-associated microfungus of the genus *Xylaria* [J]. Tetrahedron Lett, 2005, 46(6): 919-921.
- [17] Motohashi K, Hashimoto J, Inaba S, et al. New sesquiterpenes, JBIR-27 and -28, isolated from a tunicate-derived fungus, *Penicillium* sp. SS080624SCf1[J]. J Antibiot, 2009, 62(5): 247-250.
- [18] Davis RA, Innocenti A, Poulsen SA, et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Identification of selective inhibitors of the human mitochondrial isozymes VA and VB over the cytosolic isozymes I and II from a natural product-based phenolic library [J]. Bioorgan Med Chem, 2010, 18(1): 14-18.
- [19] 高忠杰,曲莉,孙振青,等.烟草内生真菌土曲霉中一个新的苯乙酸类化合物[J].中国药物化学杂志, 2021, 31(8): 597-604.
- GAO Zhongjie, QU Li, SUN Zhenqing, et al. A new hydroxyphenylacetic acid derivative isolated from the endophyte *Aspergillus terreus* of *Nicotiana tabacum* L[J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 31(8): 597-604.
- [20] 蔡由生,刘海利,龚景旭,等.中国湛江木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 的化学成分研究[J]. 中国海洋药物, 2011, 30(1): 15-18.
- CAI Yousheng, LIU Haili, GONG Jingxu, et al. Chemical constituents of mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2011, 30(1): 15-18.
- [21] Huang YF, Qiao L, Lv AL, et al. Eremophilane sesquiterpenes from the marine fungus *Penicillium* sp. BL27-2 [J]. Chinese Chem Lett, 2008, 19(5): 562-564.
- [22] Daengrot C, Rukachaisirikul V, Tansakul C, et al. Eremophilane sesquiterpenes and diphenyl thioethers from the soil fungus *Penicillium copticola* PSU-RSPG138[J]. J Nat Prod, 2015, 78(4): 615-622.
- [23] 刘德胜.黄河三角洲盐碱地真菌多样性及活性次级代谢产物的初步研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2014.
- [24] Fraga BM. Natural sesquiterpenoids[J]. Nat Prod Rep, 2013, 30(9): 1226-1264.
- [25] Dickschat JS. Bacterial terpene cyclases[J]. Nat Prod Rep, 2016, 33(1): 87-110.
- [26] Mai F, Glomb MA. Structural and sensory characterization of novel sesquiterpene lactones from *Iceberg lettuce* [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(1): 295-301.

- [27] Raupp FM, Spring O. New sesquiterpene lactones from Sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobancha cumana*[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(44): 10481-10487.
- [28] Chen R, Feng T, Li M, et al. Characterization of tremulane sesquiterpene synthase from the basidiomycete *Irpex lacteus*[J]. Org Lett, 2022, 24(31): 5669-5673.
- [29] Cheong CB, Peh G, Wei Y, et al. A spirobicyclo[3.1.0] terpene from the investigation of sesquiterpene synthases from *Lactarius deliciosus*[J]. ACS Chem Bio, 2023, 18(1): 134-140.
- [30] Scavo A, Rial C, Varela RM, et al. Influence of genotype and harvest time on the *Cynara cardunculus* L. sesquiterpene lactone profile [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(23): 6487-6496.
- [31] Abraham W. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi are they useful for humans as well[J]. Curr Med Chem, 2001, 8(6): 583-606.
- [32] Dambolena JS, Zunino MP, Herrera JM, et al. Terpenes: natural products for controlling insects of importance to human health – a structure-activity relationship study[J]. Psyche-J Entomol, 2016: 1-17. doi:10.1155/2016/4595823.
- [33] Quintana J, Estevez F. Recent advances on cytotoxic sesquiterpene lactones [J]. Curr Pharm Design, 2018, 24(36): 4355-4361.

(编辑:相峰)

(上接第10页)

- [27] Islas-Preciado D, Splinter TFL, Ibrahim M, et al. Sex and BDNF Val66Met polymorphism matter for exercise-induced increase in neurogenesis and cognition in middle-aged mice [J]. Horm Behav, 2023, 148: 105297. doi: 10.1016/j.yhbeh.2022.105297.
- [28] Bleibel M, El Cheikh A, Sadier NS, et al. The effect of music therapy on cognitive functions in patients with Alzheimer's disease: a systematic review of randomized controlled trials [J]. Alzheimers Res Ther, 2023, 15(1): 65. doi: 10.1186/s13195-023-01214-9.
- [29] 于书卷, 王美娟, 陈丽, 等. 老年2型糖尿病患者轻度认知功能障碍的影响因素[J]. 山东大学学报(医学版), 2022, 60(11): 108-112.
- YU Shujuan, WANG Meijuan, CHEN Li, et al. Influencing factors of mild cognitive impairment in elderly patients with type 2 diabetes[J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2022, 60(11): 108-112.
- [30] Gavelin HM, Dong C, Minkov R, et al. Combined physical and cognitive training for older adults with and without cognitive impairment: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Ageing Res Rev, 2021, 66: 101232. doi: 10.1016/j.arr.2020.101232.

(编辑:刘霞)