

分类号_____

密 级_____

U D C_____

单位代码_____10435

青島農業大學

硕 士 学 位 论 文

两株真菌次级代谢产物及其促斑马鱼血管生成活性研究

Study on secondary metabolites of two fungi and their
proangiogenic activity in zebrafish model

姓 名：_____江春娇_____

指导教师：_____郭立忠 教授_____

_____樊亚琴 副教授_____

学科专业：_____微生物学_____

研究方向：_____真菌活性代谢产物_____

中国 青岛
二〇二二年六月

Study on secondary metabolites of two fungi and their proangiogenic activity in zebrafish model

Thesis submitted to

Qingdao Agricultural University

In Fulfillment of the Requirement

for the Degree of

Master of Science

Jiang Chunjiao

(College of Life Science)

Supervisor: Prof. Guo Lizhong

Qingdao, China

June, 2022

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得青岛农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的人员对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：江春娇

时间：2022 年 6 月 1 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解青岛农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意青岛农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：江春娇

时间：2022 年 6 月 1 日

导师签名：郭立忠

时间：2022 年 6 月 1 日

两株真菌次级代谢产物及其促斑马鱼血管生成活性研究

摘 要

心血管疾病 (Cardiovascular disease, CVD) 是威胁人类健康和生命的头号杀手, 全球每年死于该病的人数超过 1800 万, 血管生成不足是缺血性心血管疾病最常见的原因, 近年来, 促血管生成作为心血管药物开发的新靶点受到高度重视。促血管生成是指通过各种方式促进或诱导缺血组织形成新的血管网络, 或在原有血管上长出新血管, 以实现血供重建, 改善血供不足, 从而达到治疗 CVDs 的效果。斑马鱼模型用于心血管疾病的体内功能表征和潜在药物测试, 是评价血管新生活性的理想动物模型。

天然产物 (Natural products, NPs) 是新药的重要来源, 而在医学中发挥着关键作用的 NPs 大多数是微生物来源的次级代谢产物 (secondary metabolites, SMs)。真菌种类丰富, 可以持续利用、易调控、易实现产业化, 具有特殊的代谢机制, 能产生丰富新颖的药物先导化合物, 因此, 充分利用真菌资源, 发掘其活性次级代谢产物, 为人类提供安全有效的活性药物先导化合物仍是当下研究的热点。

为了寻找新颖有效的心血管疾病药物先导化合物, 本文开展了对 22 种食药真菌子实体和深海真菌的次级代谢产物的化学多样性和活性筛选, 结果确定了两株具有促斑马鱼血管生成活性的真菌, 树舌灵芝 *Ganoderma applanatum* 和超深渊真菌 *Chaetomium globosum* YP-106 作为目标菌株进行进一步研究。

综合采用硅胶柱色谱、薄层色谱、凝胶柱色谱和半制备高效液相等多种色谱方法对他们进行活性次级代谢产物分离, 利用 NMR (核磁共振谱)、MS (质谱)、UV (紫外光谱)、IR (红外光谱)、CD (圆二色谱) 等现代波谱学方法进行化合物构型确定。结果从树舌灵芝 *Ganoderma applanatum* 分离得到了 8 个化合物, 包括 2 个新羊毛甾烷型三萜类化合物 ganoderenicfys A (1) 和 ganoderenicfys B (2), 以及 6 个类似物 (3-8)。对其进行促斑马鱼血管生成活性测定, 结果表明化合物 1-6 都呈剂量依赖性的方式表现出显著的促斑马鱼血管生成活性, 新化合物 1 和 2 在 100 mg/ml 浓度下, 促生成活性超过同等浓度的阳性药人参皂苷。这是首次发现羊毛甾烷型三萜类具有相关活性。此外, 从 *Chaetomium globosum* YP-106 中分离纯化获得 6 个新颖的氯代喹氮酮类化合物 chaetoviridin L (9)、chaetofanixin A-E (10-14) 和 11 个 (15-25) 已知类似物。其中, 新化合物 chaetofanixin E (14) 的结构具有高度刚性的 6/6/5/3/5 五环系统。对所有化合物

进行活性评价,结果显示,化合物 **9-14**、**16-18** 和 **25** 都以剂量依赖性的方式表现出显著的促斑马鱼血管生成活性。此外,对化合物 **9-25** 进行肿瘤细胞抑制活性和病原菌抑制活性筛选,结果显示化合物 **18** 和 **19** 对 2 种人类肿瘤细胞有较弱的抑制活性,化合物 **20** 对 4 株农业致病菌表现出微弱的抑菌活性。

综上,本文对两株真菌的次级代谢产物进行了系统研究,共分离鉴定了 25 个化合物,包括 2 个新的羊毛甾烷型三萜类化合物、6 个新的氯代嗜氮酮类化合物和 17 个相关已知物,这两类化合物表现出显著的促斑马鱼血管生成活性。氯代嗜氮酮类和羊毛甾烷型三萜类化合物有可能成为治疗心血管疾病的先导化合物,为抗心血管疾病药物的开发提供有效资源。

关键词: 心血管疾病; 球毛壳菌 YP-106; 树舌灵芝; 分离纯化; 促血管生成活性

Abstract

Cardiovascular disease (CVD) is the number one threat to human health and life, with more than 18 million people dying from this disease each year worldwide. Insufficient angiogenesis is the most common cause of ischaemic CVDs, including ischaemic heart disease, peripheral arterial disease, and stroke. Pro-angiogenesis refers to promoting or inducing ischemic tissues to form new vascular network, or sprout new blood vessels on original blood vessels through various means. As the result, the body can realize blood supply reconstruction, improve blood supply insufficiency, and achieve the therapeutic effect of CVDs. Zebrafish models are used in in vivo characteristics and potential drug tests for cardiovascular diseases, which is an ideal animal model for evaluating blood vessels.

Natural products (NPs) are an important source of new drugs, and the majority of NPs that play a key role in medicine are secondary metabolites (SMs) of microbial origin. Since fungi are rich in species, can be utilized continuously, easily regulated and industrialized, and have special metabolic mechanisms, they can produce abundant and novel drug lead compounds. Therefore, it is still a hot research topic to make full use of fungal resources and explore their active secondary metabolites to provide safe and effective active drug lead compounds for human.

In order to find novel and effective drug lead compounds for cardiovascular diseases, the chemical diversity and activity screening of secondary metabolites of 22 edible and medicinal fungi and deep-sea fungi were carried out in this paper. As a result, two fungi with cardiovascular activity of zebrafish, *Ganoderma applanatum* and *Chaetomium globosum* YP-106, were identified as target strains for further study.

The active secondary metabolites were separated by silica gel column chromatography, thin layer chromatography, gel column chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography, and the configuration of the compounds was determined by modern spectroscopic methods such as NMR, MS, UV, IR and CD. Results Eight compounds were isolated from *Ganoderma applanatum*, including two new lanosterone-type triterpenoids, ganoderenicfys A (**1**) and ganoderenicfys B (**2**), and six related known terpenoids (**3-8**). The results showed that compounds **1-6** showed significant angiogenesis promoting activity in zebrafish in a dose-dependent manner, and new compounds **1** and **2** had higher angiogenesis promoting activity than positive medicine at the same concentration of 100 mg/ml. This is the first time that lanostane-type triterpenoids have related activities. In addition, six novel chloro-azaphilone derivatives compounds chaetoviridin L (**9**), chaetofanixin A-E (**10-14**) and 11 (**15-25**) known analogues were isolated and purified from *Chaetomium globosum* YP-106. Among them, the new compound chaetofanixin E (**14**) has a highly

rigid 6/6/5/3/5 pentacyclic system. The activity of all compounds was evaluated, and the results showed that compounds **9-14**, **16-18** and **25** showed significant angiogenesis promoting activity in zebrafish in a dose-dependent manner. In addition, compounds **9-25** were screened for tumor cell inhibitory activity and pathogenic bacteria inhibitory activity. The results showed that compounds **18** and **19** had weak inhibitory activity against two kinds of human tumor cells, and compound **20** showed weak inhibitory activity against four strains of agricultural pathogenic bacteria.

To sum up, the secondary metabolites of two fungi were systematically studied in this paper. A total of 25 compounds were isolated and identified, including 2 new lanostane triterpenoids, 6 new chlorinated azone compounds and 17 related known substances. These two compounds showed significant angiogenesis promoting activity in zebrafish. Chloro-azaphilones and lanostane triterpenoids may become the leading compounds for the treatment of cardiovascular diseases and provide effective resources for the development of anti-cardiovascular drugs.

Key words: Cardiovascular disease; *Ganoderma applanatum*; *Chaetomium globosum* YP-106; Isolation and purification; Pro-angiogenic activity

目 录

第一章 前言 1

1.1 心血管疾病的研究现状..... 1

1.2 斑马鱼模型是评价血管新生活性的理想动物模型 1

1.3 真菌是天然药物的重要来源..... 2

1.4 食用菌活性次级代谢产物研究现状..... 3

1.5 深海真菌活性次级代谢产物研究现状..... 4

1.6 本研究实验目的..... 6

第二章 食药菌菌株筛选 7

2.1 试验材料..... 7

2.1.1 供试菌株..... 7

2.1.2 主要仪器设备..... 8

2.2 食药菌株筛选..... 9

2.2.1 粗提物提取..... 9

2.2.2 粗提物 HPLC 检测..... 9

2.2.3 粗提物 LC-MS 检测..... 9

2.3 菌株筛选结果..... 10

2.4 本章小结..... 10

第三章 树舌灵芝 (*Ganoderma applanatum*) 次级代谢产物促斑马鱼血管生成活性研究 12

3.1 试验材料..... 13

3.1.1 试验仪器..... 13

3.1.2 试验材料..... 14

3.1.3 主要试剂..... 15

3.2 树舌灵芝粗提物提取..... 15

3.3 分离纯化方法..... 16

3.3.1 硅胶柱层析分离..... 16

3.3.2 Sephadex LH-20 凝胶柱层析..... 16

3.3.3 TLC 分析与合样..... 17

3.3.4 化合物制备及验纯.....	17
3.4 次级代谢产物分离与纯化.....	17
3.5 次级代谢产物的鉴定.....	19
3.6 促斑马鱼血管生成活性研究.....	28
3.7 本章小结.....	29
第四章 超深渊真菌 <i>Chaetomium globosum</i> YP-106 次级代谢产物促斑马鱼血管生成活性研究	30
4.1 试验材料.....	31
4.1.1 试验仪器.....	31
4.1.2 试验材料及试剂.....	31
4.2 发酵培养基条件筛选.....	32
4.2.1 种子液制备.....	32
4.2.2 接种与培养.....	32
4.2.3 发酵代谢产物提取.....	32
4.2.4 乙酸乙酯粗提取物 HPLC 检测.....	32
4.2.5 培养基筛选结果.....	33
4.3 YP-106 菌株活性测试.....	34
4.4 YP-106 菌株粗提物提取.....	34
4.4.1 YP-106 扩大规模发酵.....	34
4.4.2 YP-106 发酵产物萃取.....	34
4.5 分离纯化方法.....	35
4.5.1 快速液相制备色谱系统分离.....	35
4.5.2 硅胶柱色谱、凝胶柱层析、薄层色谱.....	35
4.6 菌液次级代谢产物分离及纯化.....	35
4.7 菌丝次级代谢产物分离及纯化.....	37
4.8 次级代谢产物的鉴定.....	38
4.9 促斑马鱼血管生成活性研究.....	70
4.10 本章小结.....	71
第五章 <i>Chaetomium globosum</i> YP-106 次级代谢产物其他活性研究	72

5.1 试验材料..... 72

5.1.1 试验仪器..... 72

5.1.2 试验材料及试剂..... 73

5.2 肿瘤细胞抑制活性..... 73

5.2.1 试验方法..... 73

5.2.2 试验结果..... 74

5.3 抑菌活性..... 75

5.3.1 试验方法..... 75

5.3.2 试验结果..... 76

5.4 本章小结..... 76

第六章 结论与展望..... 77

参考文献..... 77

附录..... 82

导师组意见..... 112

致谢..... 113

作者简介..... 114

Contents

Chapter 1 Preface	1
1.1 Research Status of Cardiovascular Disease.....	1
1.2 Zebrafish model is an ideal animal model for evaluating new vascular life	1
1.3 Fungi is an important source of natural drugs	2
1.4 Research Status of Substrate Active Subcommittees	3
1.5 Research Status of Excellent Metabolic Products in Deep Sea Fungi.....	4
1.6 Experimental purpose of this study	6
Chapter 2 screening of edible fungi strains	7
2.1 Test Materials	7
2.1.1 Test strain	7
2.1.2 Main instrumentation	8
2.2 Screening of edible strains	9
2.2.1 Rough extract extraction	9
2.2.2 HPLC detection of crude extract.....	9
2.2.3 LC-MS detection of crude extract	9
2.3 Base screening results	10
2.4 Summary of this chapter.....	10
Chapter 3 Studies on the angiogenesis activity of secondary metabolites of <i>Ganoderma applanatum</i> in zebrafish	12
3.1 Test materials.....	13
3.1.1 Test instrument	13
3.1.2 Test materials.....	14
3.1.3 Main reagents	15
3.2 Extraction of crude extract of <i>Ganoderma applanatum</i>	15
3.3 Separation and purification methods	16
3.3.1 Silica gel column chromatography separation.....	16
3.3.2 Sephadex LH-20 gel column chromatography.....	16

3.3.3 TLC analysis and sample combination.....	17
3.3.4 Preparation and purity test of compounds.....	17
3.4 Separation and purification of secondary metabolites.....	17
3.5 Identification of secondary metabolites.....	19
3.6 Studies on promoting angiogenic activity in zebrafish	28
3.7 Summary of this chapter.....	29
Chapter 4 Studies on the angiogenesis of zebrafish induced by secondary metabolites of <i>Chaetomium Globosum</i> YP-106	30
4.1 Test materials.....	31
4.1.1 Test instrument	31
4.1.2 Test materials and reagents.....	31
4.2 Screening of fermentation medium conditions.....	32
4.2.1 Preparation of seed liquid.....	32
4.2.2 Inoculation and culture.....	32
4.2.3 Extraction of fermentation metabolites	32
4.2.4 Determination of ethyl acetate crude extract by HPLC.....	32
4.2.5 Culture medium screening results	33
4.3 Activity test of YP-106 strain	34
4.4 Extraction of crude extract from YP-106 strain	34
4.4.1 YP-106 Expanded fermentation	34
4.4.2 Extraction of YP-106 fermentation products.....	34
4.5 Separation and purification methods.....	35
4.5.1 Rapid liquid preparation chromatography system for separation.....	35
4.5.2 Silica gel column chromatography, gel column chromatography, thin layer chromatography	35
4.6 Separation and purification of secondary metabolites in bacterial fluid	35
4.7 Separation and purification of secondary metabolites from mycelia	37
4.8 Identification of secondary metabolites.....	38
4.9 Studies on promoting angiogenic activity of zebrafish	70
4.10 Summary of this chapter.....	71

Chapter 5 Studies on other activities of <i>Chaetomium globosum</i> YP-106 secondary metabolites..	72
5.1 Test materials.....	72
5.1.1 Test instrument	72
5.1.2 Test materials and reagents.....	73
5.2 Tumor cell inhibition activity	73
5.2.1 Test method	73
5.2.2 Test results.....	74
5.3 Antibacterial activity	75
5.3.1 Test method	75
5.3.2 Test results.....	76
5.4 Summary of this chapter.....	76
Chapter 6 Conclusion and prospect.....	77
Reference.....	77
The appendix	82
Mentor group's opinion	112
Acknowledgement	113
The author resumes.....	114

第一章 前言

1.1 心血管疾病的研研究现状

心血管疾病（CVD）是造成人类过早死亡和病残的首要原因，也是当前全球最主要的疾病负担。与 1990 年相比，2020 年全球心血管疾病患者从 2.71 亿例增加到 5.23 亿例；每年心血管疾病的死亡人数从 1210 万增加到 1860 万（Roth G A et al., 2020）。血管生成不足是心血管疾病最常见的病因之一，伴随着血管生成不足的症状有心肌缺血、脑缺血、闭塞性脉管炎、外周血管病变等（Jude E B et al., 2010; Kurusamy S et al., 2017）。目前，缺血性心血管疾病的研究正处于医学领域的前沿，促血管生成作为开发心血管病药物的新靶点受到高度重视，各种治疗性血管生成研究在动物模型和临床上得到了深入开展（Zhou F et al. 2021; Li P et al. 2021）。治疗性血管生成是指通过各种途径促进或诱导缺血组织形成新的血管网络或是在原始血管上芽生出新的血管，使其从原有血管重新融合缺血组织。实现血运重建，改善供血不足，达到治疗心血管病的效果。目前关于血管生成的治疗策略有小分子治疗、细胞因子疗法、内皮祖细胞治疗、干细胞疗法、基因治疗和机械疗法（Pötz B A et al., 2017）。然而，在治疗性血管生成过程中还存在很多血管内皮生长因子失控表达等失控性问题和急性低血压、血管瘤等副作用。且与血管生成抑制剂的研究相比，寻找促血管生成活性物质的研究还太少（Zhou X et al., 2014; Dettin M et al., 2011）。因此，寻找新型、安全、高效的促血管生成药物是开发治疗冠心病等缺血性疾病药物的一种迫切需要。

1.2 斑马鱼模型是评价血管新生活性的理想动物模型

目前已经有许多体外和体内模型被用于分析血管生成。但是由于内皮细胞来源、传代数、底物和所用培养基组成的差异，在体外有效的底物在体内可能没有任何活性（Liekens S et al., 2001），反之亦然。因此，药物的体内评价是药物开发中的一个重要步骤。许多体内模型，如鸡胚、兔子和小鼠，都被开发用于分析血管生成（Zhang J et al., 2019）。但是，由于育种所需的成本和空间使这些模型进行大规模化学筛选时受到阻碍。而斑马鱼个体小，繁殖快，每次交配可产生数百个胚胎。克服了动物繁殖速度慢、实验

周期长、实验强度大、样品处理分析困难等缺陷 (Phelps H A and Neely M N, 2005)。此外, 斑马鱼是目前继人、小鼠之后第 3 种破解全基因组的脊椎模式生物, 它与哺乳动物共享许多血管生成调节的基因和机制, 不仅成为分析血管系统发育和功能的有用系统 (Evason K J et al., 2015), 也是分析发育过程和模拟人类遗传疾病的有用工具 (Zhao H et al., 2016)。与其他动物模型相比, 斑马鱼在研究血管发育方面很多优势, 例如, 斑马鱼受精胚胎发育迅速, 可以在短时间内观察其早期发育的整个过程。另外, 斑马鱼胚胎和早期幼虫在光学上是清晰透明的, 可以直接、无创地观察整个血管系统, 而标记绿色荧光的转基因斑马鱼有利于实时完整的观察活胚胎中血管的形成与成长, 筛查血管模式缺陷。斑马鱼在发育的起始阶段, 即使在完全没有血液循环的情况下, 也能通过被动扩散获得足够的氧气, 以继续存活发育一段时间, 这在研究致死性心血管畸形及侧枝动脉生成等方面使其有着特有的优势 (Chávez M N et al., 2016)。因此, 斑马鱼模型用于心血管疾病的体内功能表征和潜在药物测试的新治疗靶点, 是评价血管新生活性的理想动物模型。

1.3 真菌是天然药物的重要来源

天然产物 (Natural products, NPs) 是新药的重要来源。在 1981-2019 年期间全世界上市的 1881 个小分子新药中, 直接或间接天然产物来源的占到 68% (Newman D J and Cragg G M, 2020)。医学中发挥着关键作用的 NPs 大多数是次级代谢产物 (secondary metabolites, SMs)。它们通常被定义为有机体生存非必需分子, 但有助于提高其竞争力。天然产品药物发现已经从天然来源产生了重要的药物。早在 1928 年, Alexander Fleming 就开创了微生物的药物时代, 他从青霉菌中分离出一种名为青霉素的黄色粉末物质。后来, 青霉素作为抗菌药物在第二次世界大战中被广泛应用。通过该方法继续分离出来的其他天然物质, 如氯霉素和链霉素。这些物质彻底改变了一些严重疾病的治疗, 成为药物开发的主要来源 (Wermuth C G, 2008)。当今, 天然产品仍然是寻找新型药物或活性模板的最佳选择, 随着青霉素的发现和 20 世纪 70 年代潜水技术的提高, 微生物来源的药物发现也赫然进入了人们的视野 (Cragg G M and Newman D J, 2013)。如何从微生物中挖掘新颖活性物质, 用于开发治疗人类各种疾病的药物依旧是当今的热点。

真菌在地球环境中的扮演着关键角色, 其作为分解者在推动环境中的营养循环、寄生虫和共生体生存中都发挥着重要作用 (Webster J, 2007)。真菌在地球

微生物多样性中占很大比例。据估计,全球真菌多样性达 220-380 万种。其中,大约只有 10%已被分类描述 (Kumar T K A et al, 2011; Hawksworth D L and R Lücking, 2017), 因此, 90%的真菌可能是还未被探索过的。而在所有已描述过的真菌中, 大约只有 7%的真菌进行了次生代谢物的化学研究 (Bills G F and Gloer J B, 2016)。从真菌次生代谢产物中分离出来的活性物质作为成药的重要来源, 在医药界发挥着重要作用。治疗心血管疾病的药物美伐他汀、洛伐他汀, 抗生素药物青霉素, 免疫抑制剂环孢菌素 A, 抗真菌药物灰黄霉素等均来源于真菌 (Newman D and Cragg G, 2012)。因此, 真菌已经成为,并将继续成为发现新化学多样性的成熟来源。

1.4 食用菌活性次级代谢产物研究现状

食用菌俗称蘑菇, 可用于食用和药用。食用菌作为人类饮食的一个重要组成部分, 它的使用已经扩大到更广泛的范围, 不仅作为食物, 而且可以作为人类的药物、营养制品。大约 35 种食用菌被商业化种植, 而近 200 种野生食用菌被用于医药和保健品研发 (Phillips KM et al., 2016)。食用菌在治疗各种退行性疾病方面的巨大作用而一直受到人们的珍视和赞赏。关于它们的化学成分、营养价值和治疗特性的信息在过去几年中不断被发掘。食用菌中的药用功效促使人们对其多糖, 萜类, 生物碱, 甾醇和核苷酸等有效成分进行了广泛地研究, 其中一些代谢物有着丰富的生物特性, 例如抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、神经保护和保肝护肝等。

近年来, 食用菌在药品的开发领域中也成为研究的热点, 大量新颖活性化合物从中分离并鉴定。例如, 2017 年, 从猴头菇 (*Hericium caput-medusae*) 中分离得到两种结构新颖的含有亚多烯类化合物的二聚异吲哚酮衍生物 caputmedusins A 和 B, 对 α -葡萄糖苷酶表现出中度抑制活性 (Chen L et al., 2017)。2018 年, 从地花菌 (*Albatrellus confluens*) 中分离出结构新颖的一对差向异构体 albattredines A 和 B, 它们具有天然来源的新型 1,2,4-噁二唑烷-5-酮骨架, 化合物 albattredines A 对刀豆球蛋白 a 诱导的 T 淋巴细胞增殖表现出免疫抑制活性, 为通过抑制 T 细胞增殖探索新的免疫抑制剂提供了新的可能性 (Zhang S et al., 2018)。2019 年, 有研究者从平菇 (*Pleurotus ostreatus*) 中分离得到的一种新的二聚萘- γ -吡喃酮 asperpyrone F, 显示出了高度的抗氧化和免疫调节活性 (Cai X et al., 2019)。2021 年, 从卷边桩菇 (*Paxillus involutus*) 分离出新的罕见的 2,5-二芳基环戊烯酮衍生物 involutenone A-H, 表现出显著的抗氧化活性 (Lv J H et al., 2021)。同年, 从

赤芝中分离得到新颖的三萜类化合物 ganoderterpene A，可以通过限制炎症反应来对细胞凋亡产生保护作用(Kou R W et al., 2021)。

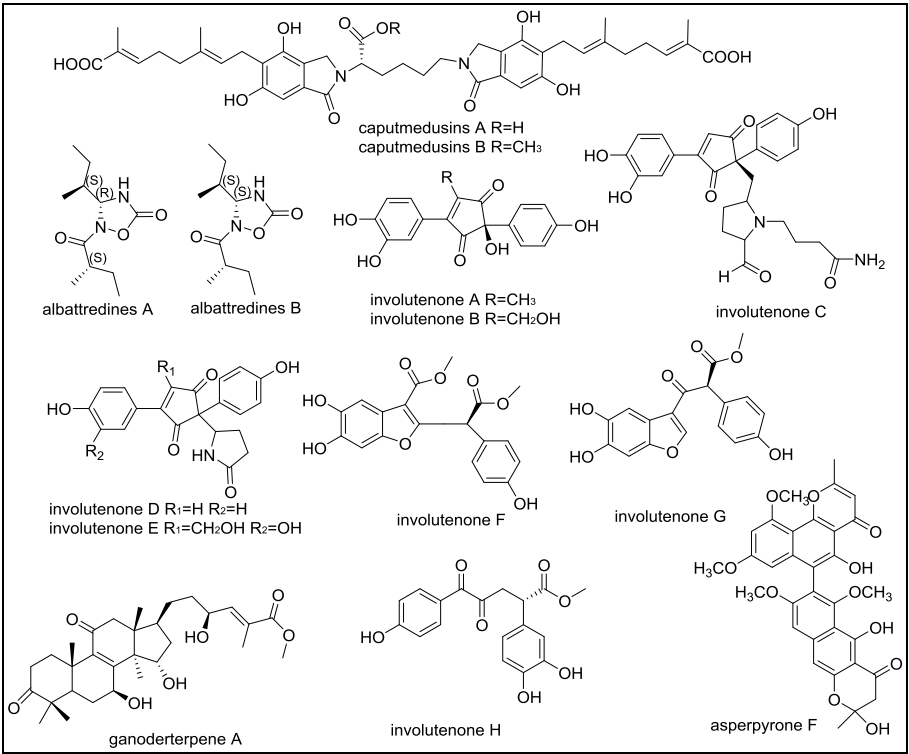


图 1-1 从食用菌中发现的代表性新颖活性代谢产物

Figure 1-1 Representative novel active metabolites found from edible fungi

1.5 深海真菌活性次级代谢产物研究现状

海洋天然产物是现代海洋药物的源泉（Carroll A R et al., 2022；朱伟明等，2019）。随着陆地微生物被证实是生物活性化合物的重要来源，人们的注意力也转向了海洋微生物。目前国内外共有 17 个海洋药物被批准上市，它们在治疗心脑血管病、抗肿瘤、抗菌及抗病毒等领域发挥了重要作用。

海洋真菌种类丰富，可以持续利用、易调控、易实现产业化，且具有复杂的遗传背景，能产生丰富新颖的药物先导化合物，因此，它逐渐成为药物开发的重要战略资源，为解决药源问题带来了希望（Deshmukh S K et al., 2018）。海洋占地球表面积的 71%，其中 95%是水深超过 1000 米的深海区域。超深渊带（Hadal zone）由水深范围>6000 米的深部海沟组成（Jamieson A J et al., 2010），具有低氧、低温、高压、无光等特点，是深海

中最特殊的生境之一。由于“V”形截面产生的“漏斗效应”，海底生源要素向超深渊带积聚和埋藏，加之两侧隔离造成的局部小生境，超深渊带聚集了大量具有丰富生物多样性和物种特殊性的超深渊微生物群落 (Zhang X et al., 2018)。在超深渊的极端环境中，超深渊真菌逐渐进化形成了与之相适应的生理特征、遗传机制和代谢系统，使其容易在特殊生存环境下产生和积累不同于陆地和近、浅海微生物的独特的次级代谢产物，其产生的化学物质多样性、结构和功能特征方面也是独一无二的。随着探测和保真取样技术的快速发展，特别是我国自主研发、具有国际领先地位的 7000 米级“蛟龙号”载人潜水器的投入使用，超深渊微生物天然产物资源的挖掘与利用逐步成为现实，其作为亟待开发的“新宝藏”蕴藏无限潜能 (Deshmukh S K et al., 2018)。

深海真菌资源丰富、开发前景广阔，吸引着研究者的目光，关于深海真菌活性代谢产物的研究不乏让人眼前一亮的成果 (Zain ul Arifeen M et al., 2019)。例如，2016 年从印度洋 3386 米沉积物来源的产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 中发现 1 个结构独特的硝基苯环氧酰胺二聚体 chrysamide A，该化合物具有中心对称特点，且具有一个五骈五的氮氧杂环，表现出显著的抗炎活性 (Chen S et al., 2016)；2017 年，从印度洋 3927 米沉积物来源的杂色曲霉中 (*Aspergillus versicolor*) 发现 2 个新颖的含氧杂草片段的生物碱 versicoloids A 和 B，具有显著的抗植物病原菌活性 (Wang D et al., 2017)；2019 年从西太平洋 5572 米海水来源的灰葡萄孢霉 (*Botryotinia fuckeliana*) 中发现 71 个新型的阿非迪霉素衍生物，其中的 aphidicolins A54–57 和 A58–64 是罕见含有四氢呋喃和二氢呋喃环的 6/6/5/6/5 五环化合物，aphidicolins A8 具有较 DNA 聚合酶 α 抑制剂-阿非迪霉素更强的肿瘤细胞抑制活性 (Niu S et al., 2019)；此外，还从该菌中发现一系列结构新颖的 botryotins 类四环二萜化合物，在活性测试中表现出抗过敏效果 (Niu S et al., 2019)。

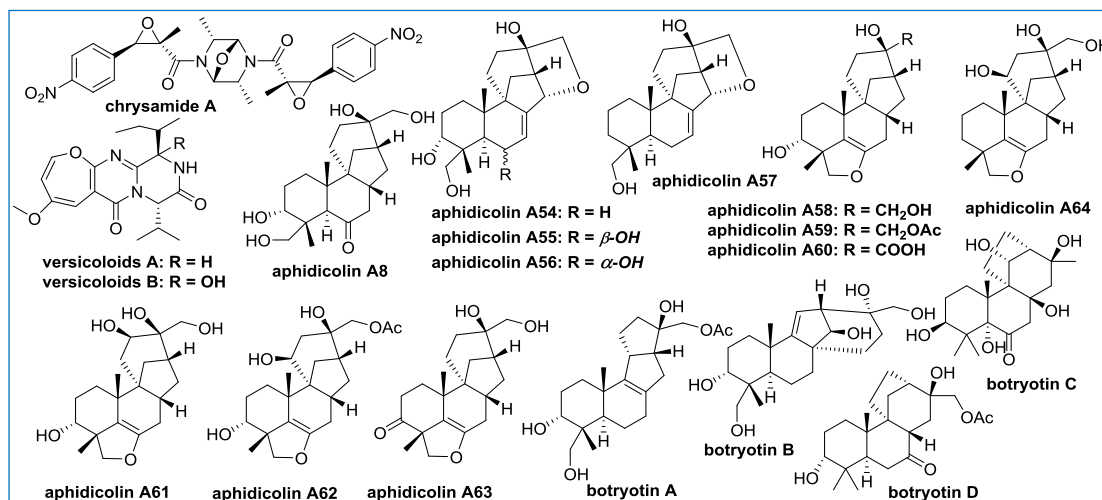


图 1-2 从深海真菌中发现的代表性新颖活性代谢产物

Figure 1-2 representative novel active metabolites found in deep sea fungi

1.6 本研究实验目的

寻找高效低毒的促血管生成药物已是当前治疗心血管疾病的迫切需要。食药真菌化学成分种类丰富、活性显著，是活性天然产物的重要来源。超深渊真菌因其特殊的生存环境和复杂的遗传背景，其产生的次级代谢产物种类各异、结构新颖，作为人类涉足尚浅的特殊海资源，从中发现新颖的药物先导化合物潜力巨大。斑马鱼因其独特的生物构造，成为血管生成相关疾病模型和药物筛选研究的重要模式动物。因此，本实验将目光锁定在食药真菌和超深渊真菌，拟通过国际通用的提取手段及色谱示踪的追踪分离方法，结合促斑马鱼血管生成活性筛选模型，从中分离、纯化，发掘结构新颖的天然产物作为新型药源分子，发掘具有潜在应用价值的新型血管生成促进剂，为心血管病药物的开发奠定物质基础。

第二章 食药菌菌株筛选

近年来，食药菌作为真菌中的重要资源，其在治疗各种退行性疾病方面一直受到人们的珍视和赞赏，其药用功效促使人们对其有效成分进行了广泛地研究，包括多糖、萜类、生物碱、核苷酸和氨基酸等，其中一些代谢物有着丰富的生物特性，包括抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保肝护肝和神经保护等。为了给缺血性疾病提供新的药物先导化合物，对 22 种食药菌子实体中代谢产物进行化学筛选，结合斑马鱼血管生成活性初筛，结果确定了代谢产物多样，产量丰富的树舌灵芝（*Ganoderma applanatum*）为下一步研究的目标菌株。

2.1 试验材料

2.1.1 供试菌株

根据已查阅的文献报道，实验室收集得到了 22 种食药菌真菌子实体，见下表。

表 2-1 供试筛选菌株

Table 2-1 Test screening of strains	
种/学名	种/中文名
<i>Ganoderma sinense</i>	紫芝
<i>Boletus edulis</i>	美味牛肝菌
<i>Sarcodon aspratum</i>	黑虎掌菌
<i>Inonotus obliquus</i>	桦褐孔菌 1
<i>Ganoderma astum</i>	黑芝
<i>Phellinus pini</i>	松针层孔菌
<i>Ganoderma leucocontextum</i>	白芝
<i>Ganoderma macrospora</i>	反柄紫芝
<i>Ganoderma tsugae</i> Murr	松杉灵芝
<i>Suillus flavus</i>	黄牛肝
<i>Ganoderma applanatum</i>	树舌灵芝
<i>Boletus brunneissimus</i>	黑牛肝

<i>Phellinus igniarius</i>	桑黄
<i>Ganoderma Resinaceum</i>	无柄赤芝 1
<i>Ganoderma lucidum</i>	赤芝 1
<i>Tricholoma matsutake</i>	松茸
<i>Coriolus versicolor</i>	杂色云芝
<i>Inonotus obliquus</i>	斑褐孔菌
<i>Ganoderma lucidum</i>	赤芝 2
<i>Ganoderma Resinaceum</i>	无柄赤芝 2
<i>Schizophyllum commune</i>	裂褶菌
<i>Morchella importuna</i>	羊肚菌

2.1.2 主要仪器设备

表 2-2 实验中使用的主要仪器设备

Table 2-2 Main Instruments and Equipment Used in the Experiment

名称	型号	生产厂家
旋转蒸发仪	N-1100	EYELA 公司
三重四级杆液质联用仪	UPLC/Q-TOF	Agilent 公司
冷冻干燥机	EZ-DRY	美国 FTS 公司
电热恒温培养箱	HZQ-F160	上海福玛实验设备有限公司
循环水式多用真空泵	SHB	郑州长城科工贸有限公司
落地恒温振荡器	HZQ-F160	常州诺基仪器有限公司
台式冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
快速液相制备色谱系统	SepaBean machineT	常州三泰科技有限公司
电子天平	AS 60/220.R2	RADWAG Wagi Elektroniczne
真空浓缩仪	SC250DDA	Savant 公司
超声仪	KQ5200E	昆山市超声仪器有限公司
高效液相色谱柱	YMC-pack ODS-A(分析型: 5μm, 4.6*250 nm; 半制备型: 5μm, 10*250nm)	YMC 公司
高效液相色谱柱	Cosmosil 5C18-PAQ(分析型: 5μm, 4.6*250 nm; 半制备型: 5μm, 10*250nm)	Cosmosil 公司
高效液相色谱仪	PM1000	日立仪器（大连）有限公司

2.2 食药菌菌株筛选

2.2.1 粗提物提取

将实验室收集得到的 22 种真菌子实体，称重各取 50 g，用高速多功能粉碎机破碎成粉末状，浸泡在盛有 95%乙醇的圆底烧瓶中，在 85℃的水浴锅中回流 3 h。真空抽滤后留滤液，将滤液转移至旋蒸瓶中，旋转蒸干其中的乙醇，剩余溶液转移至分液漏斗，加入等体积的乙酸乙酯充分混匀后静置取上清液。重复萃取 3 遍，将得到的乙酸乙酯溶液通过旋转蒸发仪蒸干，得到粗提浸膏。

2.2.2 粗提物 HPLC 检测

将得到的粗提浸膏分别用色谱级甲醇溶解，经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后，取上清液 1.5 ml 至棕色液质小瓶作为检测样品。选用 YMC 的 C18 分析柱在高效液相色谱仪上进行检测，每次进样 25 μL 。高效液相的梯度洗脱相条件 HPLC 条件见表 2-3。

表 2-3 HPLC 指纹图谱分析条件

Table 2-3 HPLC fingerprint analysis conditions

Time (min)	Flow (mL/min)	MeOH%	H ₂ O%
0	1	10	90
15.00	1	100	0
20.00	1	100	0
21.00	1	10	90
25.00	1	10	90

通过分析真菌发酵提取物的 HPLC 指纹分析，选择吸收峰独特，产量丰富的食用菌进行下一步的研究。

2.2.3 粗提物 LC-MS 检测

将粗提物溶于甲醇，用 0.22 μm 有机相滤膜过滤，吸取少量放入棕色进样瓶作为 LC-MS 检测样品，LC-MS 方法见樊亚琴硕士毕业论文（樊亚琴，2013）。

2.3 菌株筛选结果

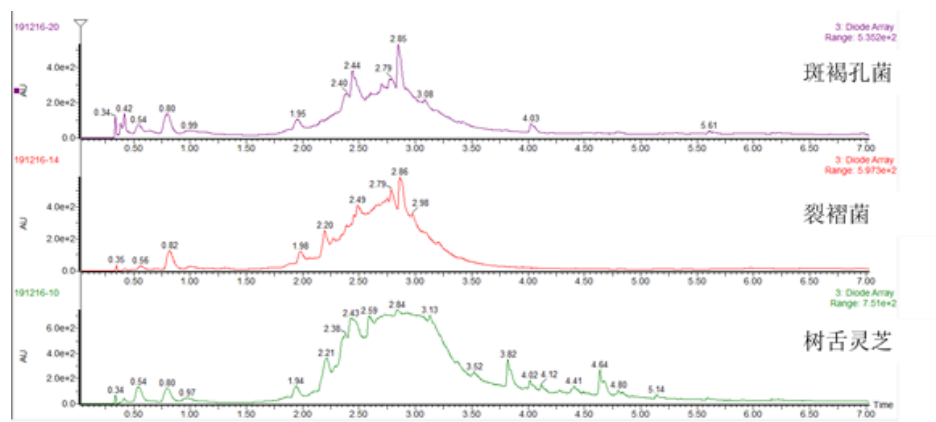


图 2-1 不同菌株 LC-MS 分析结果

Figure 2-1 Results of different strains LC-MS analysis

根据不同菌株的 LC-MS 谱图显示可知，裂褶菌、斑褐孔菌和树舌灵芝的代谢产物较为丰富，且它们的代谢产物大都集中在 2-3.5 min，树舌灵芝在 4-5.5 min 时出现独特吸收峰。

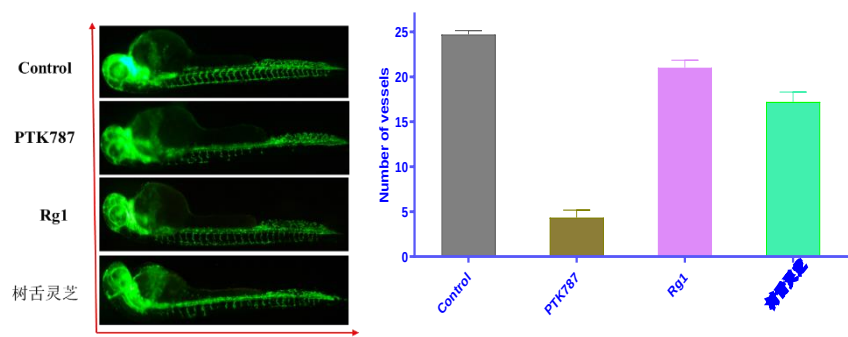


图 2-2 树舌灵芝促斑马鱼血管生成活性结果

Figure 2-2 Results of Ganoderma applanatum promoting angiogenesis of zebrafish

对裂褶菌、斑褐孔菌和树舌灵芝的粗提物进行促斑马鱼血管生成活性初筛，以阳性药人参皂苷为对照，实验中仅树舌灵芝粗提物显示出了较好的促血管生成活性。

2.4 本章小结

对实验室收集得到的 22 种真菌子实体进行破碎、萃取得到乙酸乙酯粗浸提膏。进

行 HPLC 指纹分析, LC-MS 确定真菌代谢产物的分子量, 化学筛选到产物丰富的裂褶菌、斑褐孔菌和树舌灵芝。对这三种食药菌的浸提膏进行促斑马鱼血管生成活性筛选, 确定了代谢产物丰富、产量大且活性较好的树舌灵芝为目标菌株。

第三章 树舌灵芝 (*Ganoderma applanatum*) 次级代谢产物促斑马鱼血管生成活性研究

树舌灵芝 (*Ganoderma applanatum*) 是灵芝野生品种中的一种, 可入药治疗多种疾病。本章围绕树舌灵芝开展其次级代谢产物促斑马鱼血管活性研究, 综合采用硅胶柱色谱、薄层色谱、凝胶柱色谱和半制备高效液相等多种色谱方法从树舌子实体中分离获得 8 个单体化合物, 利用 NMR (核磁共振谱)、MS (质谱)、UV (紫外光谱)、IR (红外光谱)、CD (圆二色谱) 等现代波谱学方法确定了 8 个化合物的结构, 包括 2 个新的羊毛甾烷型三萜类化合物 ganoderenicfys A (1) 和 ganoderenicfys B (2), 以及六种相关已知萜类化合物 (3-8)。外送样品至山东省科学院生物研究所, 运用斑马鱼筛选模型, 对树舌灵芝中分离得到的 8 个单体化合物进行活性评价, 结果表明羊毛甾烷型三萜类化合物 ganoderenicfys A (1)、ganoderenicfys B (2)、ganoderic acid A (3)、betulinic acid (4)、betulin (5) 和(22E)-ergosta-5,22-dien-3-one (6) 都以剂量依赖性方式显示出显著的促斑马鱼血管生成活性。且在 100 μ g/mL 时, 新化合物 ganoderenicfys A 和 ganoderenicfys B 对斑马鱼血管促生长作用效果与阳性药人参皂昔相持甚至更好。这是首次发现羊毛甾烷型三萜类化合物具有相关活性, 表明了羊毛甾烷型三萜类化合物作为治疗心血管疾病药物先导化合物的潜在价值。

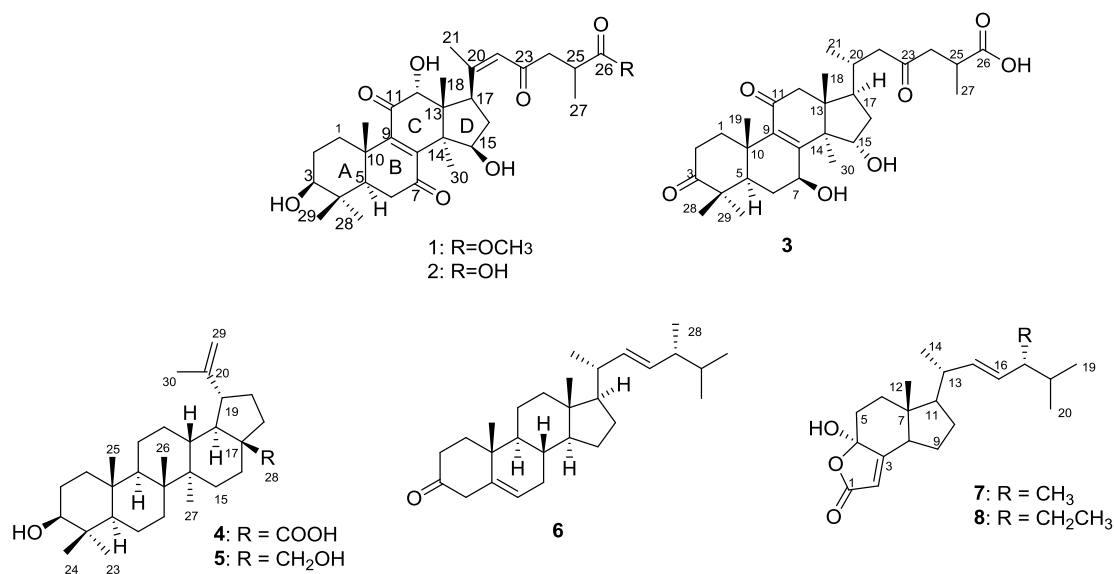


图 3-1 化合物结构图

Figure 3-1 Structure of Compounds

3.1 试验材料

3.1.1 试验仪器

表 3-1 浓缩提取分离仪器

Table 3-1 Concentration extraction separation instruments

名称	型号	生产厂家
旋转蒸发仪	N-1100	EYELA 公司
三重四级杆液质联用仪	UPLC/Q-TOF	Agilent 公司
冷冻干燥机	EZ-DRY	美国 FTS 公司
电热恒温培养箱	HZQ-F160	上海福玛实验设备有限公司
循环水式多用真空泵	SHB	郑州长城科工贸有限公司
落地恒温振荡器	HZQ-F160	常州诺基仪器有限公司
台式冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
快速液相制备色谱系统	SepaBean machineT	常州三泰科技有限公司
电子天平	AS 60/220.R2	RADWAG Wagi Elektroniczne
真空浓缩仪	SC250DDA	Savant 公司
超声仪	KQ5200E	昆山市超声仪器有限公司
高效液相色谱柱	YMC-pack ODS-A(分析型: 5μm,	YMC 公司

	4.6*250 nm; 半制备型: 5μm, 10*250nm)	
高效液相色谱柱	Cosmosil 5C18-PAQ(分析型: 5μm, 4.6*250 nm; 半制备型: 5μm, 10*250nm)	Cosmosil 公司
高效液相色谱仪	PM1000	日立仪器（大连）有限公司

表 3-2 结构测定仪器

Table 3-2 Structure Determination Instruments

名称	型号	生产厂家
核磁共振仪	JNM-ECP600 型	日本 JEOL 公司
紫外光谱仪	DU®640 型	美国 Beckman 公司
圆二色谱仪	J-810 型	日本 JASCO 公司
红外光谱仪	NEXUS 470FT-IR 型	美国 NICOLET 公司
质谱仪	低分辨用 Q-TOF ULTIMA GLOBAL GAA076 LC	Waters 公司
	高分辨用 Micromass EI- 4000 (Autospec- Ultima-TOF)型;	
	Waters ACQUITY 型	
液质联用	Masslynx 工作站	Waters 公司
旋光仪	POLAX-L 型	美国 A TAGO 公司

3.1.2 试验材料

树舌灵芝子实体 40 kg，2019 年 8 月从中国四川省成都市荷塘国际贸易城的中药专业市场收集。该材料经青岛农业大学李忠国教授认证。凭证标本（编号 20190808）存放于青岛农业大学应用真菌学重点实验室研究所。

3.1.3 主要试剂

表 3-3 主要材料及试剂

Table 3-3 Main materials and reagents	
材料及试剂	生产厂家
柱层析及薄层层析用硅胶 H	青岛海洋化工集团公司
Sephadex™ LH-20	Pharmacia 公司生产
LiChroprep® RP-18 (25–40 μm)	Merck 公司
XAD-16 型大孔吸附树脂	美国 AMBERLITE 公司
酵母浸膏 (粉)	生工生物工程（上海）有限公司
葡萄糖	天津博迪化工有限公司
麦芽浸膏汤	德国 Biomol 公司
蛋白胨	青岛高科技工业园海博生物技术有限公司
海盐	黄骅通宝特种盐有限公司
甘露醇	天津市北联精细化学品开发有限公司
麦芽糖	国药集团化学试剂有限公司
玉米浆膏	北京双旋微生物培养基制品厂
味精	莲花健康产业集团有限公司
磷酸二氢钾	天津市北辰方正试剂厂
硫酸镁	天津鼎盛鑫化工有限公司
大米	吉林吉河现代农业股份有限公司
试剂：氯仿、丙酮、DMSO、乙酸乙酯、甲醇、二氯甲烷、石油醚、乙酸、浓硫酸、磷酸、三氟乙酸、盐酸、DMF 等均为分析纯；液相用甲醇、乙腈为色谱纯，液相用水为 Milli-Q 超纯水，液相用甲醇、乙腈为色谱纯	

3.2 树舌灵芝粗提物提取

将树舌灵芝（40 kg）用高速多功能粉碎机破碎成粉末状，将粉末浸泡在 95%乙醇中，85℃的水浴锅中回流 3 h 过滤，留滤液，将滤液旋转蒸发至其中没有乙醇。剩余溶液转移至分液漏斗，加入乙酸乙酯充分混匀后静置取上清液。重复萃取 3 遍，将得到的乙酸乙酯溶液通过旋转蒸发仪蒸干，得到树舌灵芝粗提浸膏 1.3 kg。

3.3 分离纯化方法

3.3.1 硅胶柱层析分离

3.3.1.1 拌样装柱（干法上柱）

1) 将粗提物用甲醇充分溶解，在研钵中加入等质量的硅胶(100-200 目)，用胶头滴管将样品少量多次加入研钵中研磨混匀，充分混匀至无细小颗粒，放入通风橱中静置等待甲醇挥发完全。

2) 选择合适的空柱，垂直固定于铁架台上，加入与拌样硅胶体积呈 3 倍体积量的硅胶(200-300 目)，抽气减压，使硅胶压实，表面压平。再加入与样品混合均匀的硅胶，同样压实压平。在上方塞入棉花压实，起到缓冲作用。

3.3.1.2 洗脱

采用减压硅胶柱色谱（一定比例的石油醚/二氯甲烷/甲醇相互混合）、加压硅胶柱色谱（石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇等二元混合溶剂系统），RP-18 反相硅胶柱色谱（不同比例 MeOH/H₂O）。将配好的各比例试剂搅拌均匀倒入硅胶柱中，每个比例洗脱三个柱体积。注意控制洗脱试剂的极性，以达到分离效果。洗脱下来的样品旋转蒸干。

3.3.2 Sephadex LH-20 凝胶柱层析

3.3.2.1 装柱

将层析柱清洗干净后垂直地固定在铁架台上，拧紧层析柱下端后，加约 2 cm 洗脱试剂，待试剂充满下端软管后，用夹子夹紧软管，防止液体流出，后用玻璃棒轻敲柱身使底部气泡浮出。并用玻璃棒搅拌已脱好气的填料，使其与洗脱试剂充分混匀，然后在玻璃棒引流下缓缓加入层析柱中，并轻敲柱身防止填料中产生气泡。待层析柱上端产生 2 厘米高上清液时打开下端夹子，使液体缓缓流出，并不断像柱内添加填料，直到填料高度为该柱的 2/3 的填充床，静置待凝胶柱压实。

3.3.2.2 上样与洗脱

上样：当柱子里填料上方的流动相与凝胶面平齐后，用胶头吸管或移液枪吸入样品，沿柱内壁缓缓加入样品。

洗脱：根据样品的溶解度，选择 CHCl₃:MeOH=1:1 或 MeOH 溶解样品上样并进行洗脱，注意控制流速，使同一分子量的样品尽量在同一液面洗脱。在下端用试管收集，每个试管收集 10 ml。

3.3.3 TLC 分析与合样

采用薄层层析 (Thin Layer Chromatography, TLC) 法对初步分离化合物进行定性检测。将粗提取物用有机试剂溶解, 用玻璃毛细管吸取少量溶液, 点在硅胶板上。通过尝试确定展开剂配比后, 即可用毛细管在硅胶板同一水平线上间隔点上不同样品, 将硅胶板水平放入展开剂中, 等到样品展开至 R_f 值在 0.2 - 0.8 时, 可将硅胶板用紫外分析仪进行观察并标记化合物的位置, 对硅胶板喷洒香草醛-冰醋酸显色剂, 热吹显色, 根据显色后的位置和颜色将相同组分合并。

3.3.4 化合物制备及验纯

1) 样品进行 HPLC 检测与筛选: 将分离样品溶于色谱级甲醇, 0.22 μm 滤膜过滤除杂质后转移至液相小瓶中待检测。流动相选用甲醇和超纯水, 也要经 0.45 μm 滤膜过滤除杂质, 超声 15 min 去气泡。洗脱条件为 25 min 指纹梯度洗脱, 根据谱图显示的化合物极性大小和吸收峰数量筛选出待分离纯化的组分。

2) 制备条件摸索: 调整流动相的比例或色谱柱型号, 对样品进行恒梯度或变梯度洗脱, 使样品中的不同化合物能在 5-20 min 内单一出峰, 并且每个化合物都可以达到基线分离, 则确定为制备条件。

3) 化合物制备: 根据摸索条件的 HPLC 结果, 更换相同填料的制备色谱柱, 可适当增大进样量和并设置流速 4 ml/min, 按相同的洗脱极性制备样品, 根据谱图在出峰时即可接出样品, 达到峰谷时结束, 每个吸收峰分开接样, 待制备完成后, 将样品旋转蒸干, 用色谱级甲醇转移至洁净的玻璃小瓶中, 称重确定化合物质量, 放至 4℃ 冰箱保存。

4) 纯化合物验证: 将制备完成的化合物吸取少量作为样品, 用制备时相同方法进行 HPLC 验证, 若只出现单一峰形且在薄层层析硅胶板上点板后呈单一色带即可确认为纯化合物。

3.4 次级代谢产物分离与纯化

提取物 (1.3 kg) 进行减压硅胶柱层析分离, 采用石油醚— CH_2Cl_2 (2:1 和 0:1) 和 CH_2Cl_2 -MeOH (100:1、90:1、70:1、50:1、30:1、10:1、5:1 和 0:1) 极性递增梯度洗脱, 每个极性用三倍柱体积洗脱, 将其分成 11 个组分 (Fr.1-Fr.11)。

组分 9 (19.1 g) 经反相减压硅胶 (C_{18} , 4×60cm) 极性递减梯度洗脱 (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% MeOH/ H_2O , v/v), 组分 Fr.9.5 (65.1 mg) 通过半制备 HPLC (50%

CH₃CN/H₂O, 4 mL/min) 得到化合物 **1** (1.5 mg) 和 **2** (7 mg)。组分 Fr.9.9 (25 mg) 通过半制备 HPLC (60% MeOH/H₂O, 4 mL/min) 得到化合物 **3** (11.1 mg)。

组分 7 (53.8 g) 经反相减压硅胶 (C₁₈, 4×60 cm) 极性递减梯度洗脱 (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% MeOH/H₂O, v/v) 分为了六个组分 Fr.7.1–7.6。组分 Fr.7.5 (132.2 mg) 经过甲醇溶解重结晶得到化合物 **4** (56.6 mg)，组分 Fr.7.5 其余的物质用 Sephadex LH-20(MeOH)分离得到 7 个亚组分 Fr.7.5.1–Fr.7.5.7(65.1 mg)。组分 Fr.7.5.7 经 Sephadex LH-20 ($V_{(\text{Coroform})} : V_{(\text{Mthanol})} = 1 : 1$) 后经甲醇溶解重结晶得到化合物 **5** (14.6 mg)

组分 6 (47.1 g) 进行正向硅胶析分离，采用石油醚-乙酸乙酯 (40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 0:1) 将其分成 11 个组分 (Fr.6.1–Fr.6.11) 组分 Fr.6.2 (110.3 mg) 经葡聚糖凝胶色谱柱 Sephadex LH-20($V_{(\text{Coroform})} : V_{(\text{Mthanol})} = 1 : 1$) 得到化合物 **6** (70.1 mg)。组分 Fr.6.5 (9.1 g) 经反相减压硅胶 (RP-18, 4×60 cm) 减梯度洗脱 (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% MeOH/H₂O, v/v)，分为 Fr.6.5.1–Fr.6.5.10。组分 Fr.6.5.9 经过 HPLC 制备 (MeOH-H₂O, 90:10, v/v) 得到化合物 **7** (30.0 mg)。组分 Fr.6.5.7 (65.1 mg) 也通过半制备 HPLC (CH₃OH-H₂O, 90:10, v/v) 得到化合物 **8** (8.8 mg)。分离流程图如下。

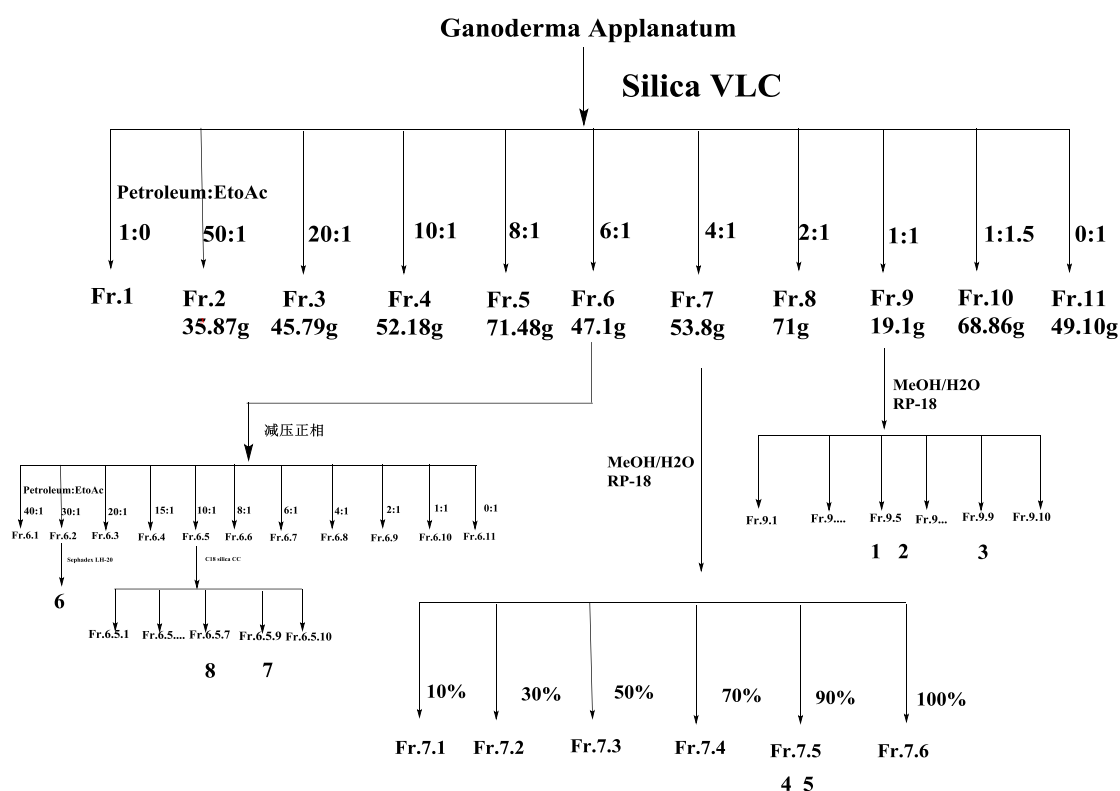


图 3-2 化合物分离流程图

Figure 3-2 Compound separation flow chart

3.5 次级代谢产物的鉴定

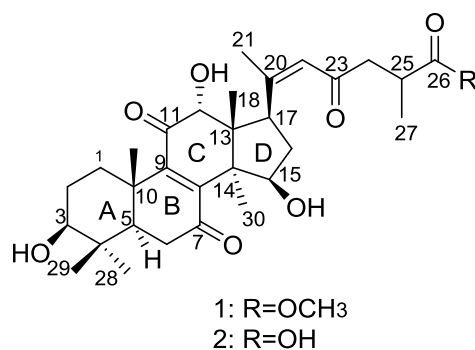


图 3-3 化合物 1 和 2 的结构

Figure 3-3 Structure of Compound 1 and 2

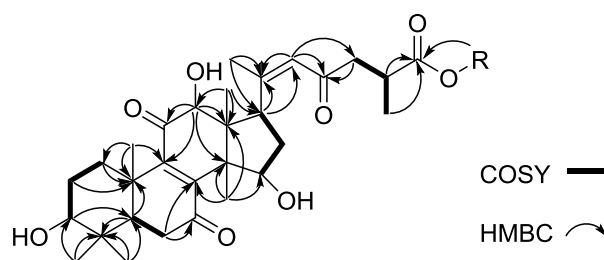


图 3-4 化合物 1 和 2 的关键 ¹H-¹H COSY 和 HMBC 谱图

Figure 3-4 Key ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compounds 1 and 2.

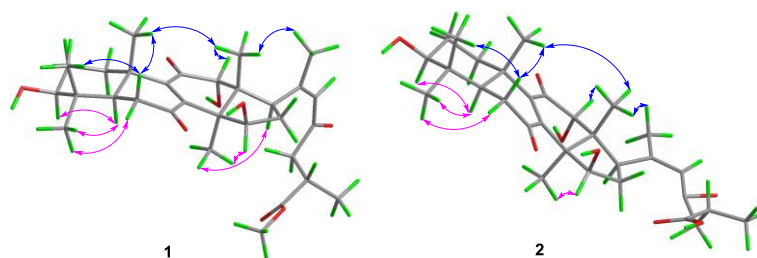


图 3-5 化合物 1 和 2 的关键 NOESY 相关性 (蓝线: β -取向; 粉线: α -取向)

Figure 3-5. Key NOESY correlations (blue lines: β -orientation; Pink lines: α -orientation) for compounds 1 and 2.

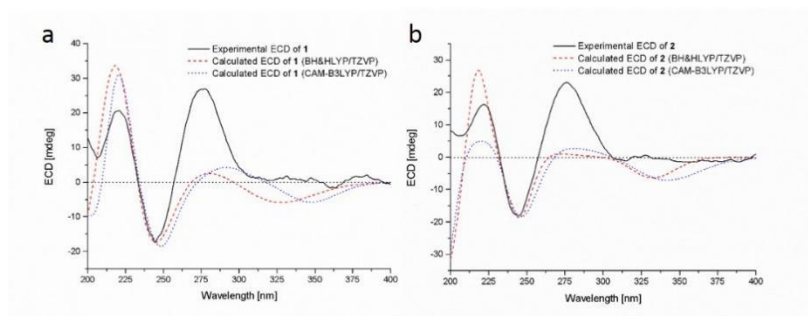


图 3-6 化合物 1 和 2 的 ECD 实验和计算谱图

Figure 3-6 Experimental and calculated ECD spectra of 1 (a) and 2 (b).

表 3-4 化合物 1 和 2 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (600, 150MHz, DMSO- d_6)Table 3-4 Compound 1 and 2 ^1H and ^{13}C NMR data (600, 150 MHz, DMSO- d_6)

No.	1		2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	33.6, CH ₂	α 1.17, m; β 2.67, m	33.6, CH ₂	α 1.17, m; β 2.67, m
2	27.3, CH ₂	1.56, m	27.3, CH ₂	1.56, m
3	75.5, CH	3.08, dd (5.1, 11.0)	75.6, CH	3.09, dd (7.0, 13.9)
4	38.6, C		38.7, C	
5	50.4, CH	1.51, dd (1.9, 14.8)	50.5, CH	1.48, d (17.9)
6	36.4, CH ₂	α 2.34, m; β 2.64, m	36.5, CH ₂	α 2.34, m; β 2.67, m
7	202.2, C		202.3, C	
8	149.4, C		149.5, C	
9	151.2, C		151.2, C	
10	39.5, C		39.0, C	
11	202.3, C		202.3, C	
12	79.7, CH	3.58, s	79.8, CH	3.57, s
13	52.7, C		52.8, C	
14	49.8, C		49.9, C	
15	76.0, CH	4.25, d (6.7)	76.1, CH	4.26, d (8.6)
16	34.5, CH ₂	α 1.88, dd (9.9, 14.2); β 2.26, dd (7.8, 14.4)	34.6, CH ₂	α 1.88, td (10.3, 13.7); β 2.25, m
17	46.8, CH	3.15, t (9.5)	46.9, CH	3.15, t (9.9)
18	17.9, CH ₃	0.76, s	18.0, CH ₃	0.76, s
19	17.5, CH ₃	1.23, s	17.5, CH ₃	1.23, s
20	156.9, C		156.6, C	
21	20.2, CH ₃	2.09, s	20.3, CH ₃	2.09, s
22	124.3, CH	6.22, s	124.5, CH	6.22, s

23	198.2, C		198.6, C	
24	47.1, CH ₂	2.63, m; 2.85, m	47.3, CH ₂	2.55, m; 2.79, m
25	34.4, CH	2.79, m	34.4, CH	2.71, m
26	175.7, C		176.9, C	
27	16.8, CH ₃	1.07, d (7.0)	17.0, CH ₃	1.05, d (7.2)
28	27.8, CH ₃	0.92, s	27.8, CH ₃	0.91, s
29	15.8, CH ₃	0.77, s	15.9, CH ₃	0.77, s
30	26.5, CH ₃	1.28, s	26.6, CH ₃	1.28, s
	51.5, OCH ₃	3.57, s		

Ganoderenicfy A (**1**) 为白色无定形粉末。阳离子高分辨质谱 HRESIMS (图 A.1) 在 545.3113 给出 $[M+H]^+$ 准离子峰, 根据 1H 和 ^{13}C NMR (图 A.2 和 A.3) 谱推测分子式为 $C_{31}H_{44}O_8$, 不饱和度为 10。 ^{13}C -DEPTQ-NMR (图 A.3) 和 HSQC (图 A.4) 光谱显示存在 31 个碳原子, 这些碳原子包括八个甲基 (含一个甲氧基)、五个亚甲基、七个次甲基 (含三个含氧基和一个烯基) 和十一个季碳 (含三个烯基和四个羰基)。上述数据与 elfvingic acid A (Yoshikawa K. et al., 2002) 的数据非常相似, 除了在 C-3 位 (δ_C 215.2) 的酮羰基信号被次甲基信号 ($\delta_{C/H}$ 75.5/3.08) 取代, 此外还有额外的甲氧基 ($\delta_{C/H}$ 51.5/3.57) 信号存在。 1H - 1H COSY (图 A.5) 显示了 H_2 -1 (δ_{H2} 1.17, 2.67) / H_2 -2 (δ_H 1.56) / H -3 有相关信号, 结合 HMBC (图 A.6) 中, H_3 -28 (δ_H 0.92) 与甲氧基甲烷 C-3、 H -3 与 C-2 (δ_C 27.3) / C-28 (δ_C 27.8) 之间的相关信号, 化合物 **1** 在 C-3 处为羟基。甲氧基质子 (δ_H 3.57) 与 C-26 (δ_C 175.7) 之间的 HMBC 关联证明了甲氧基在 C-26 上的位置。**1** 的整体平面结构最终由 HMBC 和 COSY 相关性确定, 如图 3-4 所示。

通过分析 NOESY 数据 (图 A.7), **1** 的相对构型得以确定 (图 3-5)。从 H -6 β (δ_H 2.64) 和 H_3 -19 (δ_H 1.23) / H_3 -29, H_3 -18 (δ_H 0.76) 和 H -12 (δ_H 3.58), H_3 -19 和 H_3 -21 (δ_H 2.09) 的 NOESY 关联表明了这些质子的在同一平面, 从 H -5 (δ_H 1.51) 和 H -3/ H_3 -28 (δ_H 0.92), H -6 α (δ_H 2.34) 和 H_3 -28 的关联, H_3 -30 (δ_H 1.28) 和 H -15 (δ_H 4.25) / H -17 (δ_H 3.15) 表明相关性, 表明这些位置位于 H_3 -19 的另一面。为了确定 **1** 的绝对构型, 对其进行构象分析和 TDDFT-ECD 计算。在 BH&HLYP/TZVP 和 CAM-B3LYP/TZVP 水平上计算了优化 MMFF 构象的 TDDFT-ECD 光谱。(3*S*、5*R*、10*S*、12*R*、13*R*、14*R*、15*R*、17*R*) -1 计算 ECD 光谱与实验 ECD 光谱吻合, 实验 ECD 光谱在 220 和 275nm 附近显示正 cotton 效应, 在 245nm 附近显示负 cotton 效应 (图 3-6), 因此, 化合物 **1** 的绝对构型为 3*S*, 5*R*, 10*S*, 12*R*, 13*R*, 14*R*, 15*R*, 17*R*。

Ganoderenicfy B (**2**) 为白色无定形粉末。阳离子高分辨质谱 HRESIMS (图 A.8) 在 531.2968 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 确定化合物分子式为 $C_{30}H_{42}O_8$ 。根据化合物 **2**

的 ^1H 和 ^{13}C NMR 以及 HSQC 数据 (图 A.9-A.12) 说明含有 30 个碳, 包括七个甲基、五个亚甲基、七个甲基 (三个含氧甲基和一个烯甲基) 和十一个季碳 (三个烯基和四个羰基)。化合物 **2** 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据的总体特征与化合物 **1** 相似, 只是缺少 OCH_3 信号和 C-26 的明显向低场位移 (图 A.13-A.14)。这些数据表明化合物 **2** 是化合物 **1** 的去甲基化衍生物。化合物 **2** 的 NOE (图 A.15) 与 **1** 的 NOE 一致, 表明 **2** 具有与 **1** 相同的相对构型。化合物 **2** 的实验 ECD 光谱 (图 3-6) 与 **1** 非常相似, 并且与 (3*S*、5*R*、10*S*、12*R*、13*R*、14*R*、15*R*、17*R*) -1 的计算结果完全匹配, 表明它们的绝对构型相同。

Ganoderenicfy A (**1**): White amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +32.8^\circ$ (c0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} : 248.4 (3.45) nm; ECD (1.13 mmol/L, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 222 (+0.97), 246 (−0.81), 276 (+1.17) nm; IR (KBr) ν_{max} 3379, 2923, 1726, 1626, 1603, 1383, 1161, 1117, 1031, 674 cm^{-1} (Figure A16); HRESIMS m/z = 545.3113 ($[\text{M} + \text{H}]^+$; calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{O}_8$: 545.3109)。

Ganoderenicfy B (**2**): White amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +26.9^\circ$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} : 248.4 (3.40) nm; ECD (1.89 mmol/L, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 224 (+0.97), 242 (−1.12), 278 (+1.24) nm; IR (KBr) ν_{max} 3414, 2937, 1713, 1676, 1608, 1456, 1383, 1204, 1115, 1029, 577 cm^{-1} (Figure A16); HRESIMS m/z = 531.2968 ($[\text{M} + \text{H}]^+$; calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_8$: 531.2952)。

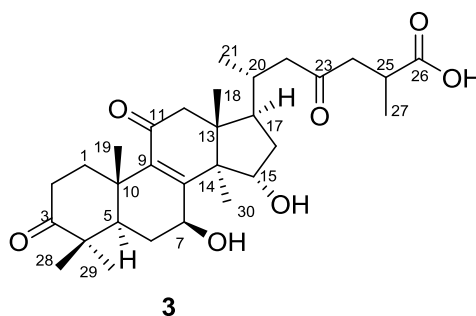


图 3-7 化合物 **3** 的结构式

Figure 3-7 Structure of Compound **3**

表 3-5 化合物 **3** ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 3-5 Compound **3** ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	3	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	35.2, CH_2	1.75-1.71, m

2	33.8, CH ₂	2.28-2.25, m
3	216.2, C	
4	46.0, C	
5	47.8, CH	1.44-1.38, m
6	28.8, CH ₂	1.69-1.67, m
7	67.3, CH	4.70, t, (8.1)
8	161.2, C	
9	139.0, C	
10	37.3, C	
11	119.2, C	
12	51.7, CH ₂	2.26, d (15.9)
13	46.3, C	
14	53.7, C	
15	70.7, CH	4.49, m
16	36.2, CH ₂	1.87-1.81, m
17	47.7, CH	1.27-1.26, m
18	17.1, CH ₃	
19	19.2, CH ₃	1.13, s
20	32.2, CH	1.64-1.62, m
21	19.9, CH ₃	0.76, d (6.25)
22	49.0, CH ₂	2.67-2.62, m
23	208.8, C	
24	45.9, CH ₂	2.79-2.72, m
25	34.2, CH	2.70, m
26	176.7, C	
27	16.9, CH ₃	1.05, d (6.8)
28	26.8, CH ₃	1.03, s
29	20.4, CH ₃	0.97, s
30	18.8, CH ₃	1.15, s

化合物 **3**: 白色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 517.3 给出 $[M + H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7$, 不饱和度为 9。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 10 个季碳 (1 个羧基, 3 个羰基碳, 2 个烯烃碳)、6 个次甲基碳和 7 个亚甲基碳、7 个甲基。进一步文献比对发现, 化合物 **3** 的核磁数据与文献报道甾醇 Ganoderic acid A 的基本一致 (Seo H W et al., 2009), 故将化合物 **3** 鉴定为 Ganoderic acid A。

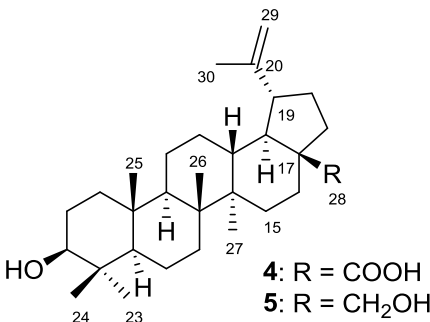


图 3-8 化合物 4 和 5 的结构式

Figure 3-8 Structure of Compounds 4 and 5

表 3-6 化合物 4 和 5 ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz)和 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz)数据

Table 3-6 Compounds 4 and 5 ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz)

Data				
No.	4		5	
	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)
1	40.0, CH ₂	1.47-1.39, m	40.0, CH ₂	1.40-1.34, m
2	28.1, CH ₂	1.74-1.69, m	28.0, CH ₂	1.70, m
3	79.7, CH	3.14, dd, (11.1, 4.6)	78.7, CH	3.14, dd (11.6, 4.7)
4	40.1, C		40.1, C	
5	57.5, CH	0.75-0.71, m	56.8, CH	0.72, m
6	19.5, CH ₂	1.47-1.39, m	19.5, CH ₂	1.48-1.42, m
7	35.6, CH ₂	1.36-1.32, m	35.5, CH ₂	1.38-1.34, m
8	41.9, C		42.1, C	
9	52.0, CH	1.26-1.17, m	51.9, CH	1.26-1.18, m
10	38.1, C		38.3, C	
11	22.1, CH ₂	1.26-1.17, m	22.0, CH ₂	1.26-1.18, m
12	26.9, CH ₂	1.66-1.62, m	26.6, CH ₂	1.63, m
13	39.7, CH	2.25, m	39.9, CH	2.11, m
14	43.6, C		43.8, C	
15	31.7, CH ₂	1.99-1.90, m	31.0, CH ₂	2.01-1.95, m
16	33.3, CH ₂	2.32, m	33.3, CH ₂	2.45-2.40, m
17	56.9, C		49.9, C	
18	48.5, CH	3.36, m	49.6, CH	3.31, m
19	50.4, CH	1.57-1.53, m	50.0, CH	1.59-1.55, m
20	151.9, C	1.99-1.90, m	151.9, C	
21	30.8, CH ₂	1.73, m	30.8, CH ₂	1.71, m
22	38.3, CH ₂	1.99-1.90, m	38.7, CH ₂	1.96, m
23	28.6, CH ₃	1.02, s	28.6, CH ₃	1.09, s
24	16.7, CH ₃	0.98, s	16.7, CH ₃	1.03, s

25	16.4, CH ₃	0.87, s	16.5 CH ₃	0.88, s
26	16.1, CH ₃	0.77, s	16.1, CH ₃	0.77, s
27	15.1, CH ₃	0.96, s	15.2, CH ₃	0.97, s
28	180.0, C		60.4, CH ₂	3.76, dd (11.2, 1.9)
29	110.2,CH ₂	4.72, brs,	110.2,CH ₂	4.70, brs
		4.60, brs		4.59, brs
30	19.4, CH ₃	1.71, s	19.4, CH ₃	1.70, s

化合物 **4**: 无色晶体, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 457.4 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$, 不饱和度为 7。其 1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 7 个季碳 (1 个羧基和 1 个烯烃碳)、5 个次甲基碳和 12 个亚甲基碳(包括 1 个烯烃碳)、6 个甲基。化合物 **4** 的核磁数据与文献报道甾醇 Betulinic acid 的基本一致, 因此将化合物 **4** 鉴定为 betulinic acid (Chatterjee P et al., 1999)。

化合物 **5**: 无色晶体, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 443.4 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $C_{30}H_{50}O_2$ 。不饱和度为 6。其 1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 30 个碳信号, 包括 6 个季碳 (包括 1 个烯烃碳)、5 个次甲基碳和 13 个亚甲基碳(12 个非连氧饱和碳和 1 个烯烃碳)、6 个甲基碳。化合物 **5** 的 1H 和 ^{13}C NMR 与化合物 **4** 相比除 C-28 位出现不同信号, 其他数据的总体特征相似, 与化合物进一步文献比对发现, 化合物 **5** 的核磁数据与文献报道甾醇 betulin 的基本一致, 结合旋光值比对, 故将化合物 **5** 鉴定为 Betulin。

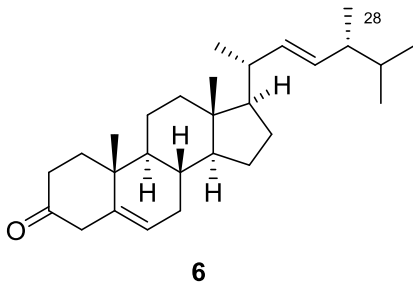


图 3-9 化合物 6 的结构式

Figure 3-9 Structure of Compounds 6

表 3-7 化合物 6 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz)和 ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 150 MHz)数据

Table 3-7 Compounds 6 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) and ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 150 MHz) Data

No.	6	
	δ_C	δ_H (J in Hz)

1	38.9, CH ₂	1.76-1.68, m
2	44.4, CH ₂	2.27-2.22, m
3	212.3, C	
4	39.5, CH ₂	2.44-2.38, m
5	139.7, C	
6	117.1, CH	5.21, m
7	34.5, CH ₂	2.12-1.84, m
8	38.2, CH	1.27-1.22, m
9	55.1, CH	1.22-1.16, m
10	36.8, C	
11	21.2, CH ₂	1.76-1.68, m
12	40.6, CH ₂	1.55-1.31, m
13	43.0, C	
14	51.7, CH	0.92, m
15	23.1, CH ₂	1.86-1.78, m
16	30.2, CH ₂	1.86-1.78, m
17	56.1, CH	1.28-1.24, m
18	23.1, CH ₃	1.01, s
19	17.7, CH ₃	0.83, s
20	43.0, CH	2.04-2.01, m
21	21.2, CH ₃	1.02, d, (6.9)
22	132.1, CH	5.16, m
23	135.7, CH	5.16, m
24	33.2, CH	2.04-2.01, m
25	33.8, CH	1.51-1.44, m
26	20.1, CH ₃	0.81, d, (9.0)
27	19.8, CH ₃	0.82, d, (9.1)
28	21.8, CH ₃	0.91, d, (6.9)

化合物 **6**: 白色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 397.3 给出 $[M + H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ 。不饱和度为 7。其 ^1H NMR 中显示含有 6 个甲基, ^{13}C NMR 显示具有 4 个季碳 (1 个羰基碳和 1 个烯烃碳)、10 个次甲基碳 (包含 3 个烯烃碳) 和 8 个亚甲基碳、6 个甲基。进一步文献比对发现, 化合物 **6** 的核磁数据与文献报道比较以后 (Xu Y et al., 2018), 确定该化合物为 (22E)-ergosta-5,22-dien-3-one。

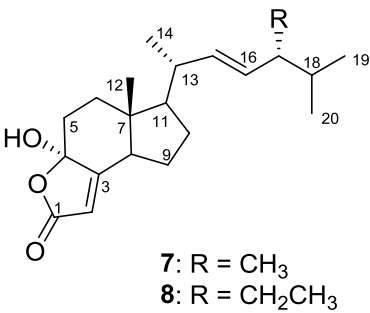


图 3-10 化合物 7 和 8 的结构式

Figure 3-10 Structure of Compounds 7 and 8

表 3-8 化合物 7 和 8 ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz)和 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz)数据

Table 3-8 Compounds 7 and 8 ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (DMSO- *d*₆, 150 MHz)

Data				
No.	7		8	
	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)
1	172.3, C		173.1, C	
2	112.3, CH	5.59, d, (1.8)	112.5, CH	5.64, d, (1.9)
3	171.3, C		171.5, C	
4	105.8, C		105.5, C	
5	35.6, CH ₂	2.30, dt, (12.9, 3.4)	35.6, CH ₂	2.28, dt, (13.9, 4.5)
6	35.4, CH ₂	1.95, dt, (13.0, 3.0)	36.3, CH ₂	1.92, m
7	49.1, C		49.4, C	
8	50.8, CH	2.65, ddd, (11.8, 7.0, 1.5)	50.7, CH	2.62, ddd, (12.0, 7.6, 1.5)
9	21.4, CH ₂	1.71, m	20.6, CH ₂	1.74, m
		1.63, m		1.65, m
10	33.4, CH ₂	1.89, m	33.6, CH ₂	2.02, m
		1.43, m		1.44, m
11	55.7, CH	1.50, m	55.5, CH	1.52, m
12	12.1, CH ₃	0.59, s	11.6, CH ₃	0.61, s
13	40.5, CH	2.04, m	39.2, CH	2.07, m
14	20.3, CH ₃	1.03, d, (6.6)	20.6, CH ₃	0.94, d, (6.4)
15	135.0, CH	5.24, dd, (15.3, 7.8)	135.7, CH	5.26, dd, (15.2, 8.0)
16	133.1, CH	5.16, dd, (15.3, 7.8)	133.9, CH	5.18, dd, (15.2, 8.0)
17	43.2, CH	1.85, dd, (13.7, 7.1)	53.3, CH	1.91, m
18	29.2, CH	1.49, m	30.6, CH	
19	21.7, CH ₃	0.82, d, (6.0)	21.7, CH ₃	0.79, d, (6.9)
20	20.0, CH ₃	0.81, d, (6.0)	28.7, CH ₂	1.43, m
				1.25, m

21	17.9, CH ₃	0.91, d, (6.8)	17.7, CH ₃	0.86, t, (6.9)
----	-----------------------	----------------	-----------------------	----------------

化合物 **7**: 白色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 332.2 给出 $[M + H]^+$ 准分子离子峰, 结合 1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $C_{21}H_{32}O_3$, 不饱和度为 6。其 1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 4 个季碳 (1 个羰基碳和 1 个烯烃碳)、8 个次甲基碳 (3 个烯烃碳)和 4 个亚甲基碳、5 个甲基。化合物进一步文献比对发现, 将化合物 **7** 鉴定为 demethylincisterol A4。

化合物 **8**: 白色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 347.2 给出 $[M + H]^+$ 准分子离子峰, 结合 1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $C_{22}H_{34}O_3$, 不饱和度为 6。其 1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 4 个季碳 (1 个羰基碳和 1 个烯烃碳)、8 个次甲基碳 (包含 3 个烯烃碳)和 5 个亚甲基碳、5 个甲基。化合物 **8** 的 1H 和 ^{13}C NMR 数据的总体特征与化合物 **7** 相近, 只比化合物 **7** 多了一个亚甲基, 通过文献对比(Mansoor T A et al., 2005), 将化合物 **8** 鉴定为 demethylincisterol A3。

3.6 促斑马鱼血管生成活性研究

将各样品分别溶解成不同浓度,于 24 孔板内分别加入 PTK787 和不同剂量的样品, 阳性药为人参皂苷 (Rg1, 100 $\mu g/mL$), 同时每孔加入 10 个发育至 24 hpf 脱膜后的斑马鱼胚胎 (每个样品组设 2 个复孔), 该斑马鱼为加入 PTK787 (终浓度 0.25 $\mu g/mL$) 造成斑马鱼血管损伤模型。混匀后加盖置于恒温培养箱, 给药 24 h 后于荧光显微镜下观察拍照节间血管生长情况并计数节间血管生成数, 采用 Image Pro Plus 5.0 测量统计血管生成长度。该实验由山东省科学院生物研究所测试。

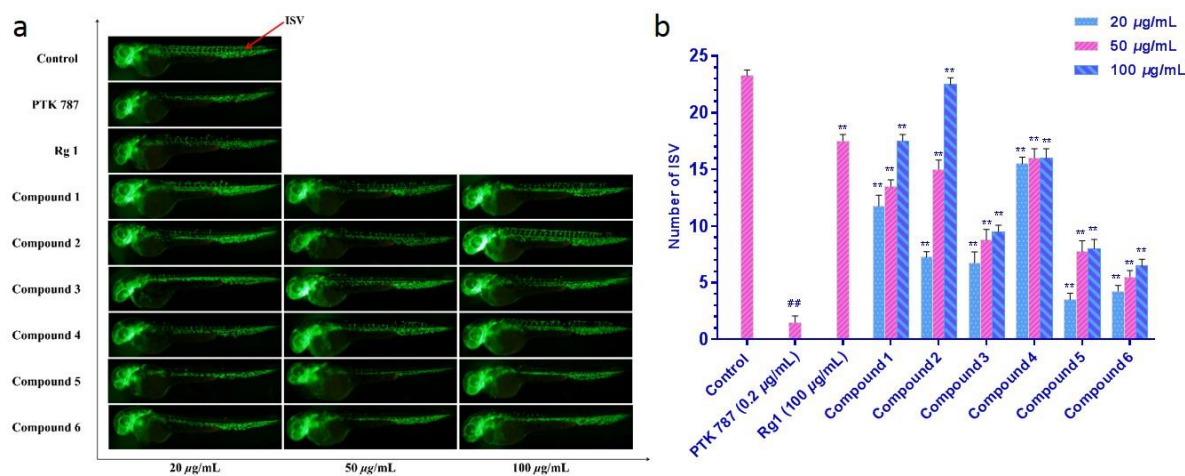


图 3-11 a: 转基因荧光斑马鱼经 PTK787 和 1-6 不同浓度 (20、50 和 100 $\mu g/mL$) 处理后的组织间血管 (ISV) 图像, 使用 100 $\mu g/mL$ 人参皂苷作为阳性对照。b: 定量分

析 1-6 处理斑马鱼的 ISV 数量。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差, ##表示与对照组相比, $P<0.01$; **表示与 PTK787 诱导组相比, $P<0.01$ 。

Figure 3-11 a: Images of intersomitic vessels (ISV) in transgenic fluorescent zebrafish (Tg(vegfr2:GFP)) treated with PTK787 and different concentrations (20, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$) of 1-6, using 100 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rg1 as a positive control. b: Quantitative analysis of the number of ISV in zebrafish treated with 1–6. Data represented as mean $\pm$ SD. ## $P < 0.01$ compared to the control group; ** $P < 0.01$ compared to the PTK787-induced group.

结果显示,除化合物 7 和 8 有药物致死性在此不显示外,羊毛甾烷三萜类化合物 1-6 对 PTK787 诱导的斑马鱼都有促血管生成活性,且随着化合物浓度的增加,促斑马鱼血管生成的活性也更加明显。此外,化合物 1 和 2 在 100mg/ml 的浓度下与阳性药人参皂苷相比,促斑马鱼血管生成作用基本相同甚至更高。

3.7 本章小结

本章对树舌灵芝开展其次级代谢产物的结构和活性研究,从树舌子实体中分离、纯化,并鉴定出两种新的羊毛甾烷型三萜类化合物 ganoderenicfys A (1) 和 ganoderenicfys B (2),以及六种相关已知萜类化合物 ganoderic acid A (3)、betulinic acid (4)、betulin (5)、(22E)-ergosta-5,22-dien-3-one (6)、demethylcisterol A4 (7) 和 demethylcisterol A3 (8)。通过 NMR、HRESIMS 和量子化学 ECD 计算得到化合物 1 和 2 的立体构型。化合物 1-6 在 PTK787 诱导的血管损伤斑马鱼模型中显示出剂量依赖性促血管生成活性,这是首次发现羊毛甾烷型三萜类化合物具有相关活性,这表明羊毛甾烷型三萜类化合物是具有潜在应用价值的新型血管生成促进剂,有望成为新型心血管病药物开发的先导化合物。

第四章 超深渊真菌 *Chaetomium globosum* YP-106 次级代谢产物促斑马鱼血管生成活性研究

超深渊带 (Hadal zone) 由水深超过 6000 米的深部海沟组成, 具有低氧、低温、高压、无光等特点, 是深海中最特殊的生境之一。在超深渊的极端环境中, 超深渊真菌容易产生和积累不同于陆地和近、浅海微生物的独特的次级代谢产物。

通过筛选, 选取了超深渊球形毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) YP-106 作为目标菌株, 开展了发酵培养基条件的摸索, 确定选用代谢产物丰富的 MEA 培养基, 静置, 28℃ 为该菌发酵培养条件, 经过大规模发酵萃取。对乙酸乙酯浸提膏采用硅胶柱色谱、薄层色谱、凝胶柱色谱和半制备高效液相等多种色谱方法进行化学分离, 获得 17 个单体化合物, 利用 NMR (核磁共振谱)、MS (质谱)、UV (紫外光谱)、IR (红外光谱)、CD (圆二色谱) 等现代波谱学方法, 确定了这 17 个化合物的绝对构型。这些化合物包括 6 个新的氯代嗜氮酮衍生物 chaetoviridin L (9)、chaetofanixin A-E (10-14) 以及 11 个已知的类似物 chaetoviridine E (15)、chaetomugilin D (16)、chaetomugilin A (17)、chaetomugilin Q (18)、chaetomugilin O (19)、chaetoglobosin X (20)、chaetomugilin F (21)、chaetomugilin J (22)、chaetovorodin I (23)、chaetoviridin J (24) 和 chaephilone D (25)。其中, 新化合物 chaetofanixin E (14) 的结构具有高度刚性的 6/6/5/3/5 五环系统, 该结构在天然产物中首次发现。对以上 17 个单体化合物进行促斑马鱼血管生成活性评价, 结果表明化合物 9-14、16-18 和 25 都以剂量依赖性方式显示出显著的促斑马鱼血管生成活性。为开发缺血性心血管疾病药物先导化合物带来希望。

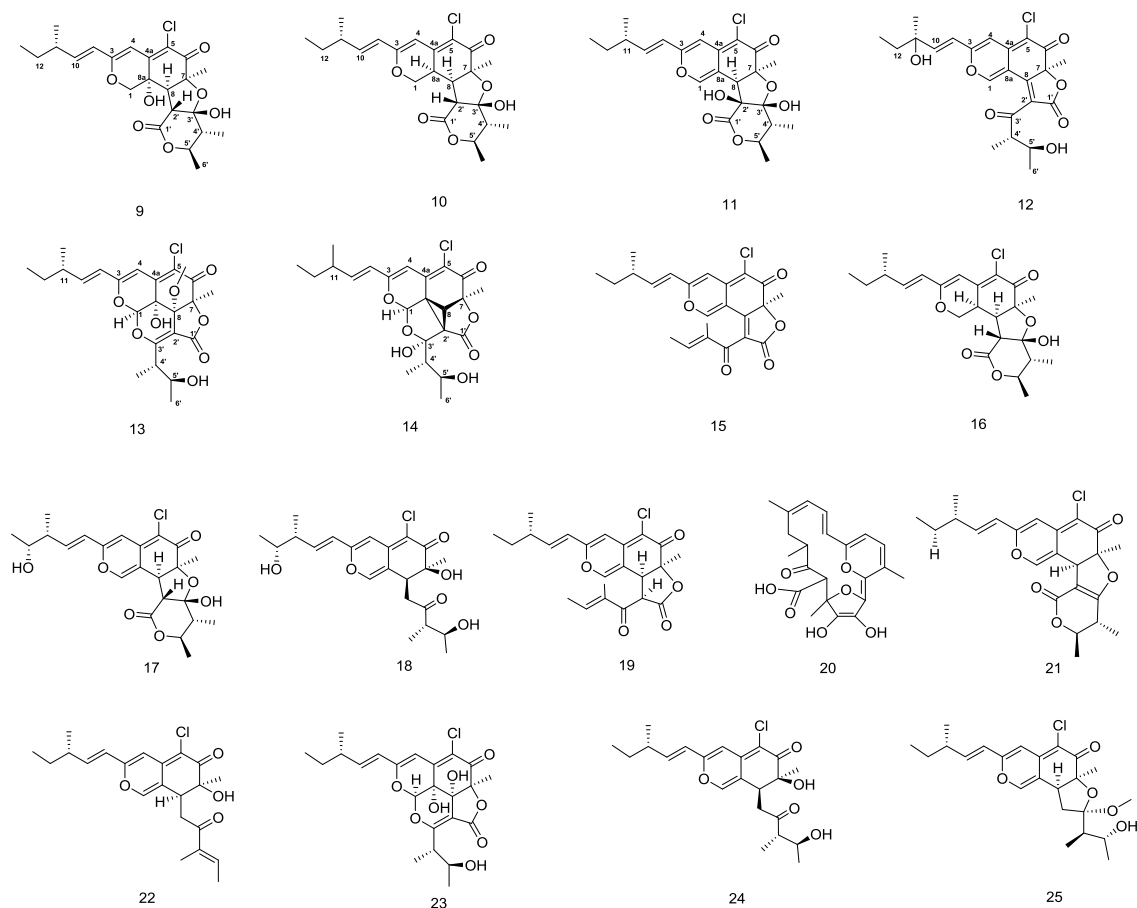


图 4-1 化合物结构式

Figure 4-1 Structure of Compounds

4.1 试验材料

4.1.1 试验仪器

同表 2-2、3-1、3-2 主要仪器设备

4.1.2 试验材料及试剂

同表 3-3 主要试剂

4.2 发酵培养基条件筛选

4.2.1 种子液制备

将 YP-106 菌种在 PDA 平板上接种后放在 28℃ 培养箱活化备用。配制 PDB 培养基，每 500 mL 锥形瓶配制 200 mL 培养基，灭菌冷却后，在超净工作台无菌接入 3 块菌饼，放置于 28℃、150 rpm 的摇床中培养 3 d 作为种子液。

4.2.2 接种与培养

表 4-1 培养基配方

Table 4-1 Culture Formulation

培养基名称	配方
真菌 2 [#] 培养基	甘露醇 20g、酵母浸膏 3g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.3g、味精 10g、玉米浆膏 1g、葡萄糖 10g、KH ₂ PO ₄ 0.5g、麦芽糖 20g、海盐 33g、蒸馏水 1L
MEA 培养基	麦芽浸膏汤 17g、葡萄糖 3g、蛋白胨 3g、海盐 33g、蒸馏水 1L
大米培养基	大米 80g、海盐 3.96g、蒸馏水 120ml
PDA 培养基	马铃薯 200g、琼脂 20g、葡萄糖 20g、蒸馏水 1L
PDB 培养基	马铃薯 200g、葡萄糖 20g、蒸馏水 1L

在 1L 锥形瓶中分别配制 MEA 培养基、真菌 2[#] 培养基和大米培养基，灭菌冷却后备用。每瓶培养基接入 YP-106 种子液各 10 mL，接入后放在 28℃ 的环境中静置培养一个月，每个培养基各三个平行。

4.2.3 发酵代谢产物提取

向锥形瓶中加入少量乙酸乙酯进行灭活处理，后用破壁机或组织研磨仪破碎获得组织匀浆，加入 2 倍体积乙酸乙酯，超声提取 20 min，用分液漏斗收集上层乙酸乙酯然后旋转蒸干。蒸干后用甲醇溶解转移至玻璃瓶中，蒸干后称重，获得乙酸乙酯粗提物备用。

4.2.4 乙酸乙酯粗提取物 HPLC 检测

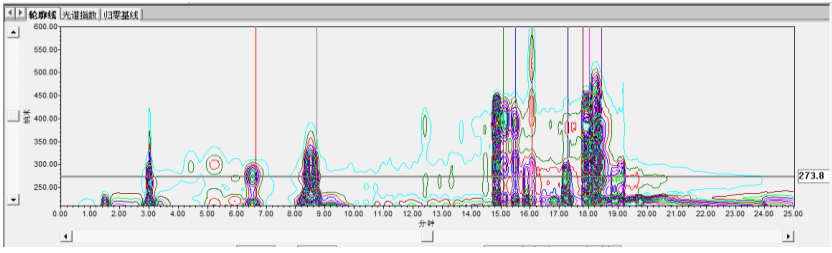
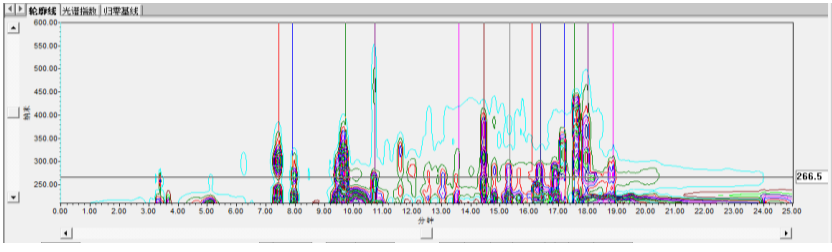
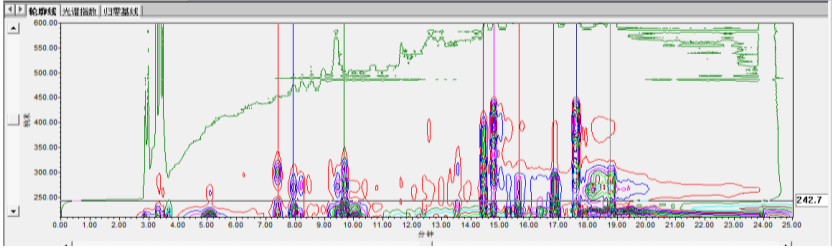
将得到的粗提浸膏分别用色谱级甲醇溶解，经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后，取上清液 1.5 ml 至棕色液质小瓶作为检测样品。选用 YMC 的 C18 分析柱在高效液相色谱仪上

进行检测，每次进样 25 μ L。

4.2.5 培养基筛选结果

表 4-2 培养基筛选结果

Table 4-2 Medium Screening Results

MEA 培养基	
大米培养基	
真菌 2#培养基	

根据 HPLC 指纹谱图结果显示，YP-106 菌株在 MEA 培养基中产生的小分子代谢产物更为丰富且产物量更高。因此，最后确定筛选 MEA 培养基为 YP-106 菌株发酵培养基。

4.3 YP-106 菌株活性测试

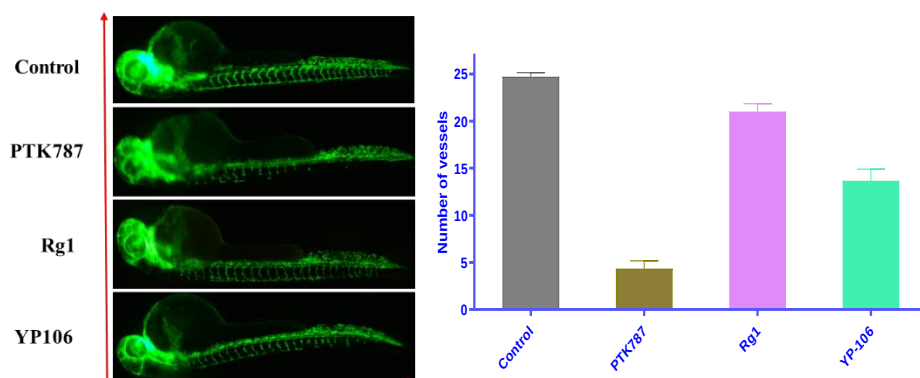


图 4-2 *Chaetomium globosum* YP-106 促斑马鱼血管生成活性结果

Figure 4-2 Results of *Chaetomium globosum* YP-106 promoting angiogenesis of zebrafish

对上述 MEA 培养基发酵的次级代谢产物乙酸乙酯浸提膏进行促斑马鱼血管生成活性初筛，结果显示 MEA 培养基发酵的 YP-106 菌株有较好的促斑马鱼血管生成活性。

4.4 YP-106 菌株粗提物提取

4.4.1 YP-106 扩大规模发酵

准备 300 个 1 L 的锥形瓶，洗净备用。每个锥形瓶配制 300 ml 的 MEA 培养基，灭菌后冷却备用，在超净工作台中接入 YP-106 的种子液。封口后在 28℃ 的环境中静置培养一个月。

4.4.2 YP-106 发酵产物萃取

YP-106 菌种在 MEA 培养基中静置培养一个月后，表面已经产生一层厚实的菌丝体饼。向培养基中倒入一些乙酸乙酯进行灭活。将培养基倒入布氏漏斗中进行抽滤，使菌丝体和菌液分离，进行不同处理。

1) 菌液：向菌液中倒入大量乙酸乙酯，加入磁子后放在磁力搅拌器上搅拌 40min，使菌液与乙酸乙酯充分混合，萃取完全。静置一段时间待菌液和乙酸乙酯分层后，取上清液通过旋转蒸发仪旋转蒸干，再向菌液中加入乙酸乙酯，多次操作至上清液无色透明。

2) 菌丝体：将菌丝体切成小块，用破壁机打碎，向菌丝体中加入 80% 丙酮和 20%

水超声 40min，过滤，通过旋转蒸发仪蒸干其中的丙酮，多次重复上述操作。向不含丙酮的滤液中加入乙酸乙酯，用磁力搅拌器搅拌混合 40 min，静置一段时间待菌液和乙酸乙酯分层后，取上清液通过旋转蒸发仪旋转蒸干，再向滤液中加入乙酸乙酯，多次操作至上清液无色透明。

4.5 分离纯化方法

4.5.1 快速液相制备色谱系统分离

将粗提取物加入适量甲醇溶解完全后转移至旋蒸瓶，加入等体积 200-300 目硅胶，放在旋转蒸发仪上旋转至甲醇蒸干、硅胶松散且与样品充分混匀。取合适体积空柱，将与样品混匀的硅胶转移至柱子中，压实表面，表面压平，再塞入一块棉花起缓冲作用。拧好盖子安装在快速液相制备色谱系统，根据系统匹配合适的反向硅胶柱。

流动相设置为甲醇和水，设置参数甲醇和水梯度洗脱，每个梯度流动相流量为 3 个柱体积，可实时根据出峰极性改变流动相比比例，使达到良好的分离效果，洗脱下来的样品接入洁净试管，每个试管 40 mL，直至分离结束。

4.5.2 硅胶柱色谱、凝胶柱层析、薄层色谱

分离方法见 3.3

4.6 菌液次级代谢产物分离及纯化

提取物(70 g)采用正相减压硅胶柱层析的分离手段，流动相为石油醚-乙酸乙酯(1:0、80:1、50:1、20:1、10:1、8:1、6:1、4:1、2:1 和 1:1)和二氯甲烷-甲醇(50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1 和 0:1)极性递增梯度洗脱，每个极性洗脱三个柱体积。得到 52 个组分，将每个组分用甲醇溶解后经 HPLC 分析后合样。

组分 21-26 合样后编号 Fr.21 (0.83 g) 经快速液相制备系统极性递减梯度洗脱，根据液相谱图分析的吸收峰进行合样分为 12 个组分。每个组分经过 HPLC 指纹分析，将组分 Fr.21.10 又经葡聚糖凝胶色谱柱 Sephadex LH-20 (1.7×130 cm, 100%MeOH) 分为 8 个组分 (Fr.21.10.1–Fr.21.10.8)。其中的 Fr.21.10.6 通过半制备 HPLC (75% MeOH/H₂O, 4mL/min) 纯化得到化合物 **15**。

组分 Fr.33.12 采用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析 (1.7×130 cm, 100%MeOH), TLC 点板合样为 6 个组分(Fr.33.12.1–Fr.33.12.6)。将 Fr.33.12.4 进一步采用半制备 HPLC (75% MeOH/H₂O, 4 mL/min)纯化得到化合物 **16**。

组分 37 (8.71 g) 快速液相制备系统进行反相硅胶柱层析分离, 合样得到 13 个组分。组分 Fr.37.4 再采用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析 (100% MeOH) 分离为 8 个组分 (Fr.37.4.1–Fr.37.4.8)。其中的 Fr.37.4.3 进一步通过半制备 HPLC (35% MeCN/H₂O, 4 mL/min) 纯化得到化合物 **17**。

组分 36、39、40 合样后编号 Fr.36 (2.48 g), 该组分经快速液相制备系统的反相硅胶柱层析分离后按照系统谱图合样得到 10 个组分。经过 HPLC 分析后将组分 Fr.36.6 采用葡聚糖凝胶色谱柱 Sephadex LH-20 (1.7×130 cm, 100% MeOH) 分离, TLC 点板后合样为 13 个组分 (Fr.36.6.1–Fr.36.6.13)。再经 HPLC 液相指纹谱图分析后对 Fr.36.6 采用半制备 HPLC (35% MeCN/H₂O, 4 mL/min) 纯化得到化合物 **18**。

分离流程图如下

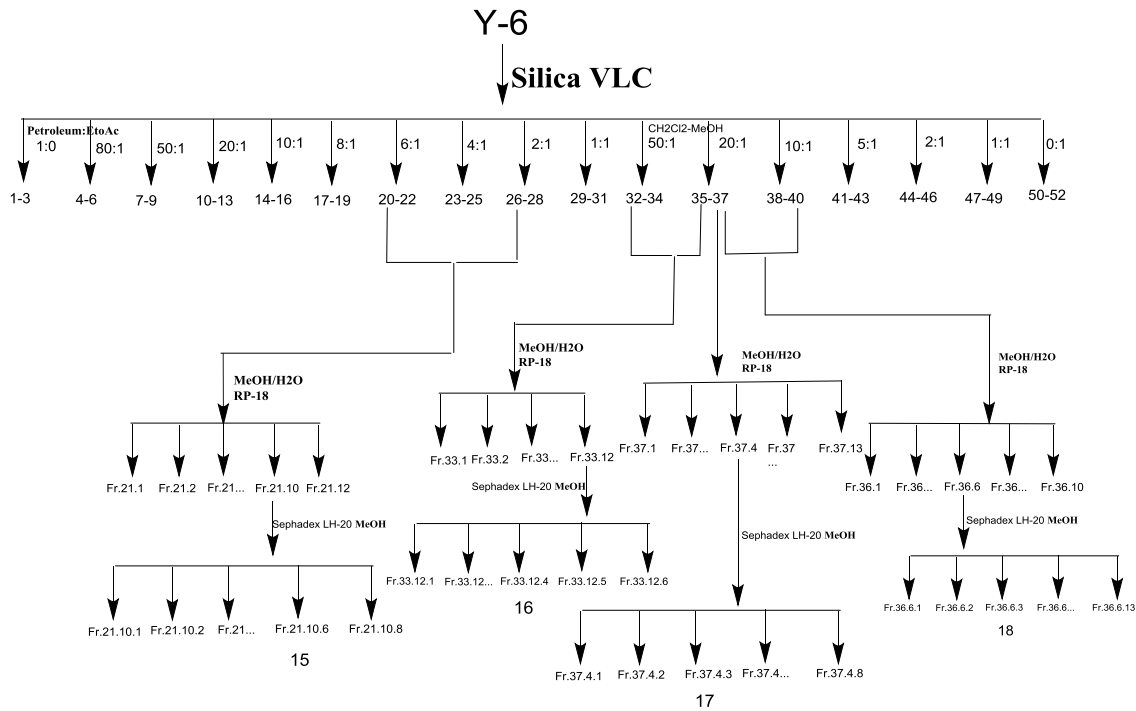


图 4-3 菌液分离流程图

Figure 4-3 Separation flow chart

4.7 菌丝次级代谢产物分离及纯化

提取物 (20 g) 进行正相减压硅胶柱层析分离, 采用石油醚-乙酸乙酯 (1:0、80:1、50:1、20:1、10:1、8:1、4:1、2:1 和 1:1) 和二氯甲烷-甲醇 (50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1 和 0:1) 极性递增梯度洗脱, 每个极性用三倍柱体积洗脱。得到 44 个组分, 将每个组分经 TLC 点板后合样得到 20 个组分, 用甲醇溶解后用 HPLC 指纹谱图分析后对各组分进行下一步分离。

组分 9 通过葡聚糖凝胶色谱柱 Sephadex LH-20 (100% MeOH) 分离后点板合样为 10 个组分 (Fr.9.1–Fr.9.10)。HPLC 液相分析后把 Fr.9.3 和 Fr.9.4 合样进一步通过半制备 HPLC (75% MeOH/H₂O, 4 mL/min) 纯化得到化合物 **10**、**19**。

组分 11 采用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析 ($V_{(\text{MeOH})} : V_{(\text{CH}_3\text{Cl})} = 1 : 1$) 进行分离, 经过 TLC 点板合样为 10 个组分 (Fr.9.1–Fr.9.10)。HPLC 分析后将 Fr.11.5 通过半制备 HPLC (75% MeOH/H₂O, 4 mL/min) 纯化得到化合物 **20**。

组分 12 先采用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析分离, TLC 点板后合样为 4 个组分 (Fr. 12.1–Fr.12.4)。HPLC 分析后将其中的 Fr.12.2 和 Fr.12.3 合样摸条件后通过半制备 HPLC (45% MeCN/H₂O, 4 mL/min) 纯化得到化合物 **9**、**12**、**13**、**14**。

组分 13 经葡聚糖凝胶色谱柱 Sephadex LH-20 (1.7×130 cm, 100% MeOH) 的分离, TLC 点板合样为 9 个组分 (Fr.13.1–Fr.13.9)。组分 Fr.3.4 通过半制备 HPLC (55% MeCN/H₂O, 4 mL/min) 纯化得到化合物 **21**、**22**。

组分 14 经葡聚糖凝胶柱层析 Sephadex LH-20 (1.7×130cm, 100% MeOH) 分离, 经过 TLC 点板后合样为 11 个组分 (Fr.14.1–Fr.14.11)。其中的 Fr.14.3–Fr.14.5 根据 HPLC 指纹分析后合样, 摸条件后通过半制备 HPLC (45% MeCN/H₂O, 4 mL/min) 纯化得到化合物 **11**、**23**、**24**、**25**。

分离流程图如下。

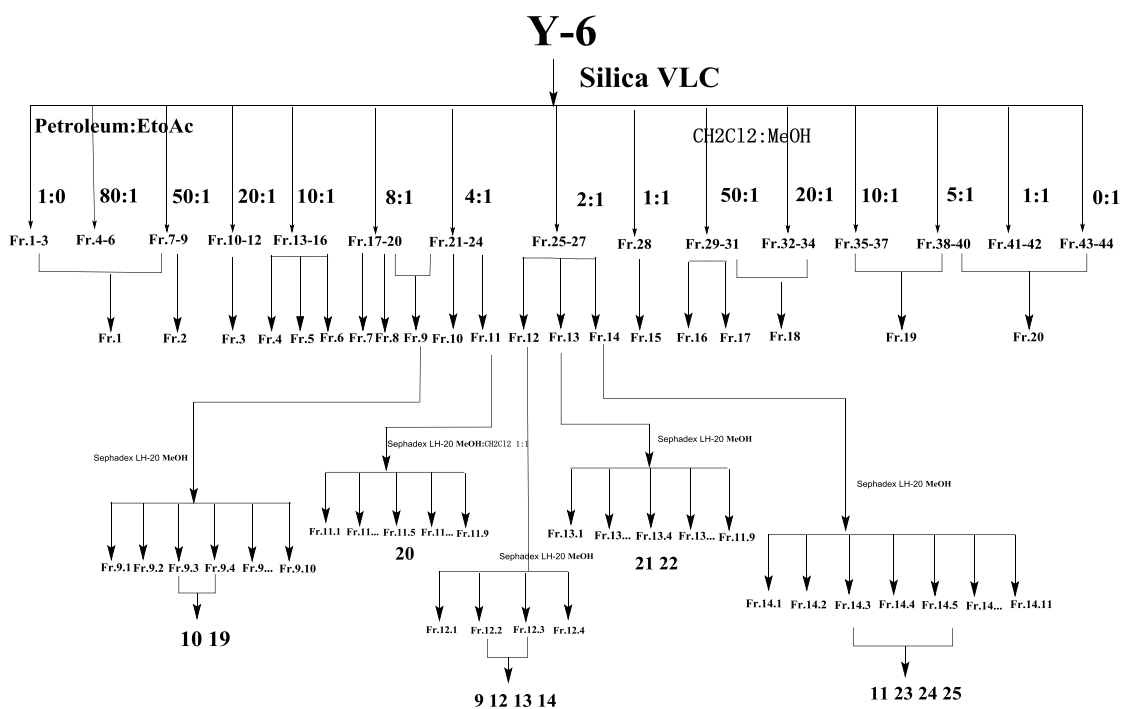


Figure 4-4 Filament separation flow chart

4.8 次级代谢产物的鉴定

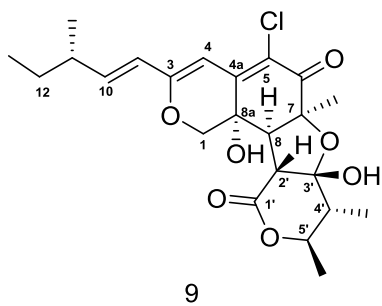


图 4-5 化合物 9 的结构式

Figure 4-5 Structure of Compound 9

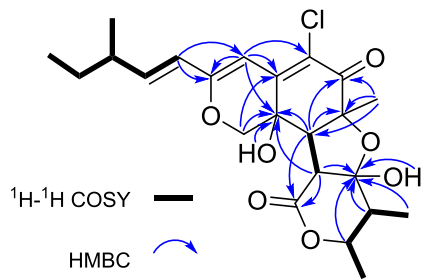


图 4-6 化合物 9 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 谱图

Figure 4-6 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 9.

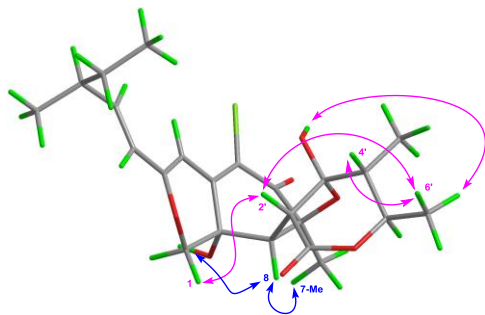


图 4-7 化合物 9 的关键 NOESY 相关性（蓝线： β -取向；粉线： α -取向）

Figure 4-7 Key NOESY correlations (blue lines: β -orientation; pink lines: α -orientation) for compound 9.

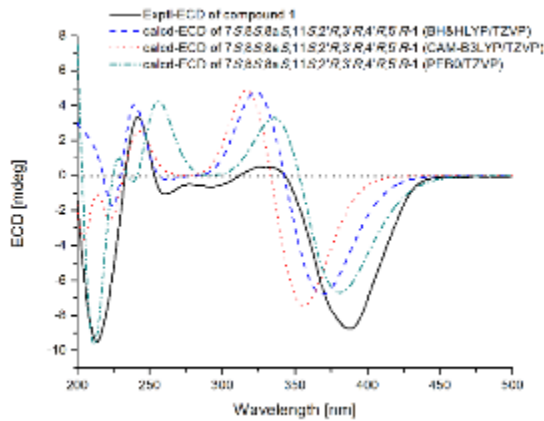


图 4-8 化合物 9 的 ECD 实验和计算谱图

Figure 4-8 Experimental and calculated ECD spectra of compound 9.

表 4-3 化合物 9 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (600, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
Table 4-3 Compound 9 ^1H and ^{13}C NMR data (600, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

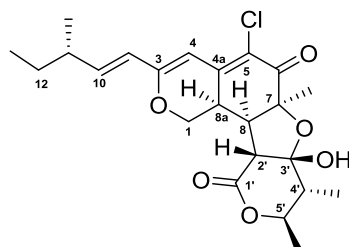
No.	9	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)

1	73.5, CH ₂	4.16 (1H, d, 12.3); 4.30 (1H, d, 12.3)
3	160.3, C	
4	100.7, CH	6.04 (2H, d)
4a	143.4, C	
5	120.9, C	
6	189.2, C	
7	83.3, C	
8	55.4, CH	2.67 (1H, d, 9.1)
8a	67.5, C	
9	123.0, CH	6.23 (1H, d, 15.8)
10	144.5, CH	6.40 (1H, dd, 15.6, 7.9)
11	37.9 CH	2.22 (1H, dq, 13.7, 6.8)
12	28.7, CH ₂	1.36 (2H, dq, 14.2, 7.2)
13	11.6, CH ₃	0.85 (3H, t, 7.4)
7-Me	25.2, CH ₃	1.54 (3H, s)
11-Me	19.3, CH ₃	1.02 (3H, d, 6.7)
1'	171.4, C	
2'	54.6, CH	2.80 (1H, d, 9.1)
3'	103.6, C	
4'	44.5, CH	1.69 (1H, dq, 13.9, 6.9)
5'	76.7, CH	4.30 (1H, dd, 15.5, 6.3)
6'	18.5, CH ₃	1.25 (3H, d, 6.4)
4'-Me	9.4, CH ₃	0.93 (3H, d, 6.9)
3'-OH		6.23, s
8a-OH		6.03, s

化合物 **9** 为黄色无定形粉末。在 HRESIMS (图 A.18) 光谱中, $[M+H]^+/[M+H+2]^+$ 的两个同位素峰强度为 3:1, 表明化合物 **9** 中存在氯原子。化合物 **9** 阳离子质谱 HRESIMS 在 m/z 453.1684 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 分子式确定为 $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_7\text{Cl}$, 不饱和度为 9。化合物 **9** 的紫外光谱在 λ_{max} 239、296 和 375 nm 处显示出对氮杂菲酮生色团的特征吸收, 表明该体系具有高度共轭性。 ^{13}C -DEPTQ (图 A.20) 和 HSQC (图 A.21) 核磁共振谱显示存在 23 个碳原子, 这些碳原子为五个甲基、两个亚甲基、八个次甲基 (包括三个烯烃和一个含氧化合物) 和八个季碳 (包含三个含氧季碳、三个烯烃和两个羰基)。将其 1D 和 2D 数据与 chaetomugilin D 的数据进行广泛比较 (Yasuhide M et al., 2008) 发现, 这两种化合物的结构非常相似, 除了在 chaetomugilin D 中的烯基次甲基 ($\delta_{\text{C/H}}$ 145.6/7.28) 和烯基季碳 (δ_{C} 114.3) 的信号消失, 在化合物 **9** 中, 这两个位置被亚甲基 (δ_{C} 73.5/ δ_{H} 4.16, 4.29) 和含氧季碳 (δ_{C} 67.5) 所取代。上述观察结果表明, 化合物 **9** 是 chaetomugilin D 的 C-1 位氢化、8a 位羟基化的衍生物。这一推论进一步在 HMBC (图 A.23) 谱图中得到了证实, 图中可以找到 H-1 和 C-4a/C-8a, 以及

H-4/H-8/H-2'/8a-OH 和 C-8a 的相关信号。**9** 的整体平面结构 (图 4-5) 最终由 HMBC (图 A.23) 和 ^1H - ^1H COSY (图 A.22) 相关性确定。

通过 ^1H -NMR (图 A.19) 中的耦合常数 ($J_{9/10}=15.8\text{ Hz}$) 推断出 C-9/C-10 处的双键构型为反式。从 H-2' 和 H-1/H-6'、H-6' 和 H-4'/3'-OH 的 NOESY (图 A.24) 相关信号表明了这些基团在同一面, 而从 H-8 和 7-CH₃/8a-OH 的相关性表明这些基团位于相反的面上 (图 4-6)。为了确认 **9** 的绝对构型, 在三个不同水平上进行了 ECD 计算。计算得出的 ECD 光谱与实验光谱吻合 (图 4-7)。因此, 化合物 **9** 的绝对构型为 7*S*、8*S*、8a*S*、11*S*、2'*R*、3'*R*、4'*R*、5'*R*。



10

图 4-9 化合物 10 的结构式

Figure 4-9 Structure of Compound 10

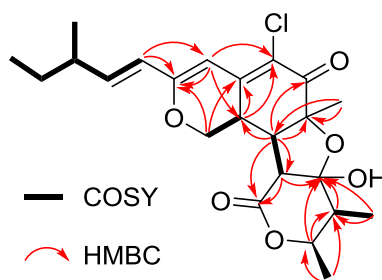


图 4-10 化合物 10 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 谱图

Figure 4-10 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 10.

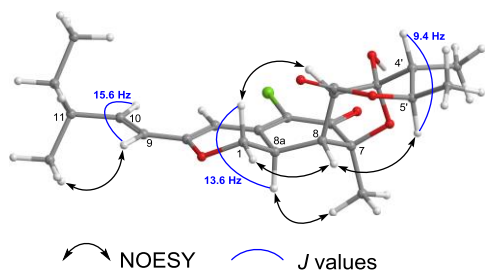


图 4-11 化合物 10 的关键 NOESY 相关性

Figure 4-11 Key NOESY correlations for compound 10.

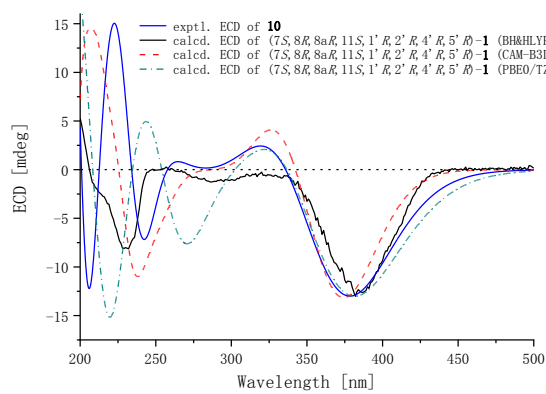


图 4-12 化合物 10 的 ECD 实验和计算谱图

Figure 4-12 Experimental and calculated ECD spectra of compound 10.

表 4-4 化合物 10 ¹H 和 ¹³C NMR 数据 (600, 125 MHz, DMSO-*d*₆)

Table 4-4 Compound 10 ¹H and ¹³C NMR data (600, 125 MHz, DMSO-*d*₆)

No.	10	
	δ_C	δ_H (<i>J</i> in Hz)
1	68.5, CH ₂	4.41 (1H, dd, 11.4, 5.0); 4.15 (1H, dd, 13.6, 11.4)
3	161.7, C	
4	101.3, CH	6.11 (1H, s)
4a	144.5, C	
5	119.0, C	
6	188.9, C	
7	83.6, C	

8	48.9, CH	2.83 (1H, overlap)
8a	33.3, CH	3.39 (1H, ddd, 13.6, 5.0, 2.0)
9	122.8, CH	6.19 (1H, d, 15.6)
10	144.8, CH	6.39 (1H, dd, 15.6, 7.8)
11	37.8 CH	2.23 (1H, m)
12	28.6, CH ₂	1.36 (2H, m)
13	11.6, CH ₃	0.85 (3H, t, 7.4)
7-Me	21.5, CH ₃	1.39 (3H, s)
11-Me	19.2, CH ₃	1.01 (3H, d, 6.7)
1'	171.4, C	
2'	54.3, CH	2.82 (1H, overlap)
3'	104.2, C	
4'	45.3, CH	1.64 (1H, dq, 9.4, 6.9)
5'	76.1, CH	4.27 (1H, dq, 9.4, 6.4)
6'	18.3, CH ₃	1.24 (3H, d, 6.4)
4'-Me	8.8, CH ₃	0.95 (3H, d, 6.9)
1'-OH		6.25, s

化合物 **10** 为黄色无定形粉末。通过 HRESIMS 确定化合物 **10** 的分子式为 C₂₃H₂₉O₆Cl (图 A.25)。光谱中 [M+H]⁺/[M+H+2]⁺ 的两个同位素峰强度为 3:1, 确定化合物中含有一个氯原子。¹H 和 ¹³C NMR 数据表明化合物含有 23 个碳原子, 分别为五个甲基、两个亚甲基 (包括一个含氧亚甲基)、九个次甲基 (包括三个烯烃和一个含氧次甲基) 和七个季碳 (包含两个含氧季碳、三个烯烃和两个羰基)。将其 1D 和 2D NMR 数据与 chaetomugilin D (**16**) 的数据进行比较, 发现除化合物 **10** 中缺少双键 ($\Delta^{1,8a}$) 外, 这两种化合物的结构非常相似。另外, 在化合物 **10** 的 NMR 光谱中观察到亚甲基 (CH₂-1, $\delta_{H/C}$ 4.41, 4.15 / 68.5) 和甲基 (CH-8a, $\delta_{H/C}$ 3.39 / 33.3) 的共振。上述结果表明, 化合物 **10** 是 chaetomugilin D (**16**) 的双键氢化衍生物。同时, H₂-1 / H-8a 的关键 COSY 相关性 (图 4-9 和 A.29) 以及 H₂-1 到 C-4a 和 C-8a, H-8a 到 C-4a / 5, H-4 / H-8 到 C-8a 的 HMBC 相关性 (图 4-9 和 A.30) 进一步证实了上述论点。化合物 **10** 的整体平面结构最终也由 HMBC 和 COSY 相关性确定, 如图 4-9 所示。

另外, H-9 / H-10 的耦合常数 (15.6 Hz) 指定 Δ^9 双键的构型由为 *E*。H _{β} -1 / H-8a 的耦合常数 (13.6 Hz) 表明了其跨双轴关系。NOESY 相关性 (图 A.31) 显示 H _{β} -1 / H-2' 在同一平面, 而 H-8a / CH₃-7 位于与 H _{β} -1 的相对面上。H _{α} -1 / H-8 / H-5' 的 NOESY 为共相关

系。H-4'与 H-5'的耦合常数 (9.4 Hz) 确定它们为相反方向。化合物 **10** 的绝对构型通过与其相似的化合物 **16** 的 ECD 曲线分配为 (7*S*、8*R*、8*aR*、11*S*、1'*R*、2'*R*、4'*R*、5'*R*)。通过 ECD 计算 (图 4-11) 进一步证实该化合物的绝对构型为 7*S*, 8*R*, 8*aR*, 11*S*, 1'*R*, 2'*R*, 4'*R*, 5'*R*。

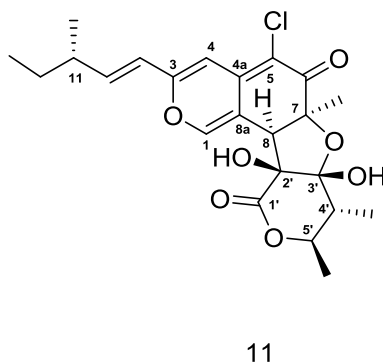


图 4-13 化合物 **11** 的结构式

Figure 4-13 Structure of Compound 11

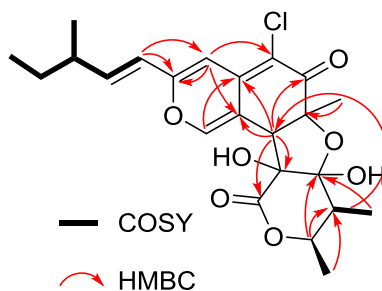


图 4-14 化合物 **11** 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 谱图

Figure 4-14 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 11

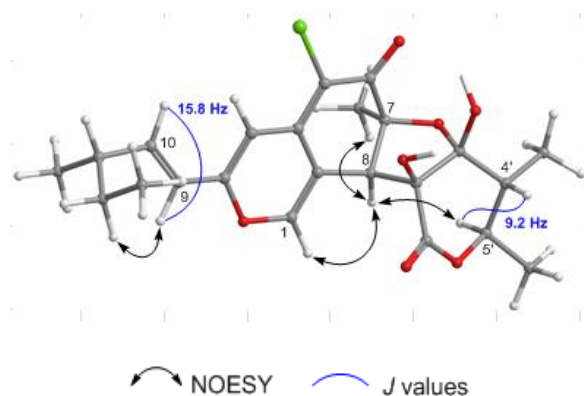


图 4-15 化合物 **11** 的关键 NOESY 相关性

Figure 4-15 Key NOESY correlations for compound 11.

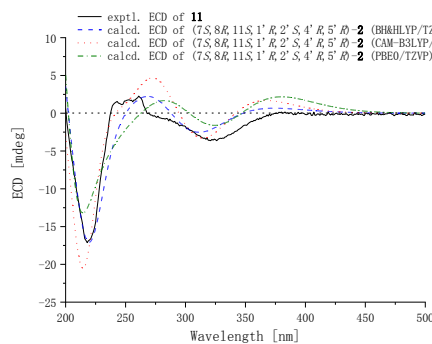


图 4-16 化合物 11 的 ECD 实验和计算谱图

Figure 4-16 Experimental and calculated ECD spectra of compound 11.

表 4-5 化合物 11 ¹H 和 ¹³C NMR 数据 (600, 125 MHz, DMSO-*d*₆)

Table 4-5 Compound 11 ¹H and ¹³C NMR data (600, 125 MHz, DMSO-*d*₆)

No.	11	
	δ_{C}	δ_{H}
1	144.4, CH	7.25 (1H, s)
3	156.0, C	
4	104.6, CH	6.54 (1H, s)
4a	141.7, C	
5	109.4, C	
6	188.1, C	
7	81.9, C	
8	52.4, CH	3.35 (1H, overlap)
8a	112.0, C	
9	120.9, CH	6.35 (1H, d, 15.8)
10	145.2, CH	6.43 (1H, dd, 15.8,7.6)
11	38.0, CH	2.25 (1H, m)
12	28.6, CH ₂	1.39 (2H, m)
13	11.6, CH ₃	0.85 (3H, t,7.4)
7-Me	24.2, CH ₃	1.26 (3H, s)
11-Me	19.4, CH ₃	1.02 (3H, d,6.9)

1'	170.7, C	
2'	81.7, C	
3'	104.6, C	
4'	46.2, CH	1.65 (1H, dq, 9.2, 6.7)
5'	75.3, CH	4.37 (1H, dq, 9.2, 6.2)
6'	18.5, CH ₃	1.27 (3H, d, 6.2)
4'-Me	9.5, CH ₃	1.01 (3H, d, 6.7)

化合物 **11** 为黄色无定形粉末。其 HRESIMS 在 m/z 449.1368 给出 $[M - H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C -DEPTQ NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_7\text{Cl}$ 。不饱和度为 10。将其 ^1H 和 ^{13}C NMR 结果与 chaetomugilin D (**16**) 的核磁共振谱进行比较, 发现它们的主要区别为化合物 **11** 的羟基化 sp^3 非质子化碳的信号取代了化合物 **16** 中 CH-2' 的信号, 这表明化合物 **11** 是化合物 **16** 在 C-2' 处的羟基化衍生物。H-9/H-10 的耦合常数 (15.8 Hz) 说明 Δ^9 双键的构型为 *E*。H-8 与 CH₃-7 和 H-5' 的 NOESY (图 4-14 和 A.38) 关联表明这些质子为共相关系。H-4'/H-5' 的耦合常数 (9.2 Hz) 表明它们为跨双轴关系。最后, 在 ECD 计算机模拟实验时发现化合物 **11** 曲线与化合物 **16** 相似, 结果表明化合物 **11** 的绝对构型为 (7*S*、8*R*、11*S*、1'*R*、2'*S*、4'*R*、5'*R*)。

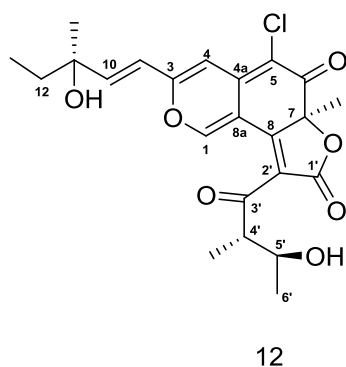


图 4-17 化合物 **12** 的结构式

Figure 4-17 Structure of Compound 12

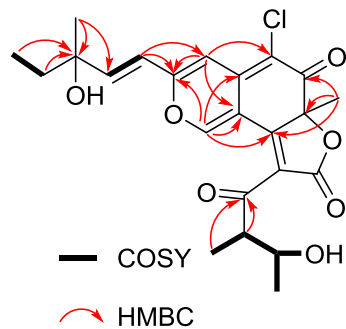


图 4-18 化合物 12 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 谱图

Figure 4-18 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 12

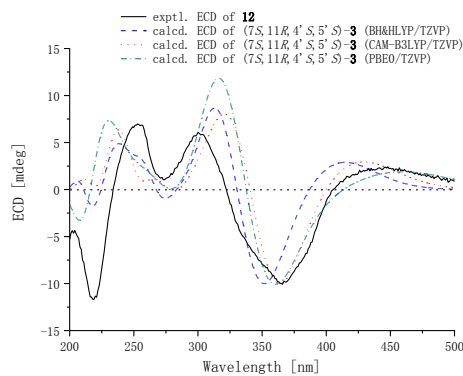


图 4-19 化合物 12 的 ECD 实验和计算谱图

Figure 4-19 Experimental and calculated ECD spectra of compound 12.

表 4-6 化合物 12 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (600, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
Table 4-6 Compound 12 ^1H and ^{13}C NMR data (600, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	12	
	δ_{C}	δ_{H}
1	150.8, CH	8.62 (1H, s)
3	157.2, C	
4	105.7, CH	6.88 (1H, s)
4a	140.2, C	
5	107.4, C	
6	183.2, C	
7	87.3, C	
8	160.5, C	

8a	110.0, C	
9	118.4, CH	6.54 (1H, d, 15.7)
10	148.5, CH	6.74 (1H, d, 15.7)
11	72.0, C	
12	34.4, CH ₂	1.54 (1H, dd, 14.9, 7.4) 1.53 (1H, dd, 14.9, 7.4)
13	8.2, CH ₃	0.82 (3H, t, 7.4)
7-Me	25.2, CH ₃	1.63 (3H, s)
11-Me	27.3, CH ₃	1.23 (3H, s)
1'	168.0, C	
2'	125.9, C	
3'	200.9, C	
4'	50.5, CH	3.41 (1H, dq, 8.6, 6.3)
5'	69.6, CH	3.56 (1H, m)
6'	21.5, CH ₃	0.98 (3H, d, 6.2)
4'-Me	12.7, CH ₃	0.99 (3H, d, 6.3)
5'-OH		4.66 (1H, d, 6.2)
11-OH		4.85 (1H, br, s)

化合物 **12** 为黄色无定形粉末。其 HRESIMS 在 m/z 449.1362 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰，结合 ^1H 和 ^{13}C -DEPTQ NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_7\text{Cl}$ 。根据 HSQC 光谱（图 A.42）、 ^1H 和 ^{13}C -DEPTQ NMR 数据（图 A.40-A.41）确定该化合物含有 23 个碳原子，分别为五个甲基、一个亚甲基、六个次甲基（包括四个烯烃和一个含氧次甲基）和十一个季碳（包含两个含氧季碳、六个烯烃和三个羰基）。将上述数据与 *epi*-chaetoviridin A（N. Phonkerd et al., 2008）的数据进行广泛比较后发现这两种化合物的结构非常相似，只是 *epi*-chaetoviridin A 中 CH-11 ($\delta_{\text{H}/\text{C}}$ 2.29 /38.9) 的信号在化合物 **12** 的 NMR 谱中不存在。但在化合物 **12** 的 NMR 谱中发现一个羟基 (δ_{H} 4.85) 和一个含氧季碳 (δ_{C} 72.0)。因此化合物 **12** 是 *epi*-chaetoviridin A 的 11-OH 衍生物。该化合物整体平面结构最终由 HMBC 和 COSY 相关性确定（图 A.43 和 A.44）。此外该化合物在 H-4'/H-5' 的耦合常数 (8.6 Hz) 与两种已知化合物 chaetomugilin Q (**18**) 和 chaetoviridin J (**22**) 的数值相似，表明两个手性中心 C-4' 和 C-5' 的相对关系与化合物 **18** 和 **22** 的相对关系相同。从生物合成的角度考虑认为化合物 **12** 的 C-7、C-4' 和 C-5' 的绝对构型其共代谢体化合物 **10**、化合物 **11** 等都相同，最后通过 ECD 计算进一步证实（图 4-18）。

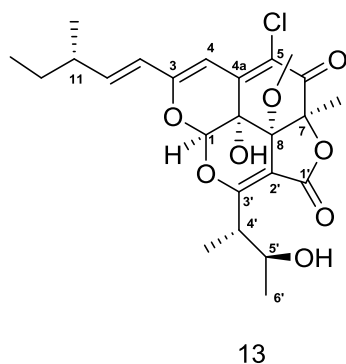


图 4-20 化合物 13 的结构式

Figure 4-20 Structure of Compound 13

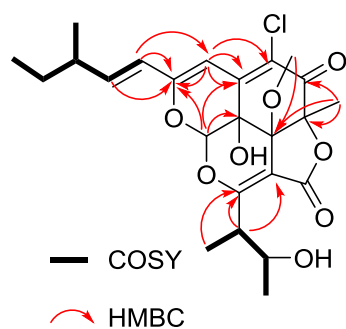


图 4-21 化合物 13 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 谱图

Figure 4-21 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 13

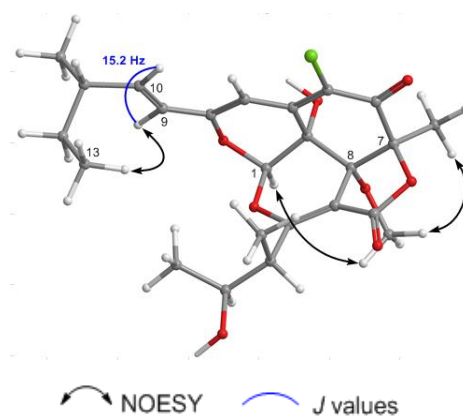


图 4-22 化合物 13 的关键 NOESY 相关性

Figure 4-22 Key NOESY correlations for compound 13.

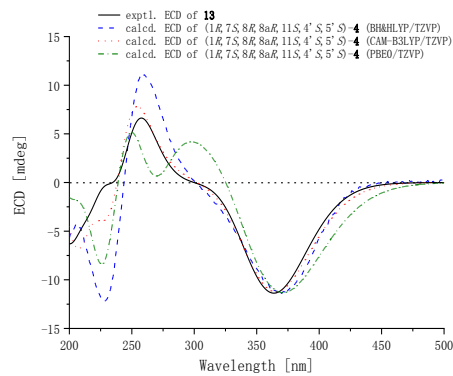


图 4-23 化合物 13 的 ECD 实验和计算谱图

Figure 4-23 Experimental and calculated ECD spectra of compound 13.

表 4-7 化合物 13 ¹H 和 ¹³C NMR 数据 (600, 125 MHz, DMSO-*d*₆)

Table 4-7 Compound 13 ¹H and ¹³C NMR data (600, 125 MHz, DMSO-*d*₆)

No.	13	
	δ_{C}	δ_{H}
1	96.2, CH	6.00 (1H, s)
3	155.8, C	
4	101.4, CH	6.20 (1H, s)
4a	144.1, C	
5	123.0, C	
6	186.2, C	
7	85.9, C	
8	77.2, C	
8a	65.3, C	
9	123.0, CH	6.28 (1H, d, 15.2)
10	146.4, CH	6.52 (1H, dd, 15.2, 6.7)
11	38.4, CH	2.27 (1H, m)
12	29.1, CH ₂	1.40 (2H, m)
13	12.1, CH ₃	0.85 (3H, t, 7.4)
7-Me	18.3, CH ₃	1.61 (3H, s)
11-Me	19.4, CH ₃	1.04 (3H, d, 6.7)

1'	166.7, C	
2'	98.3, C	
3'	169.6, C	
4'	40.9, CH	3.38 (1H, dq, 10.9, 6.7)
5'	68.0, CH	3.40 (1H, dq, 10.9, 6.7)
6'	20.9, CH ₃	0.92 (3H, d, 6.7)
4'-Me	13.4, CH ₃	1.00 (3H, d, 6.7)
OCH ₃	53.1, CH ₃	3.29 (3H, s)

化合物 **13** 为黄色无定形粉末。其 HRESIMS 在 m/z 481.1613 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C -DEPTQ NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{Cl}$, 不饱和度为 11。其 ^{13}C -DEPTQ 和 HSQC NMR 光谱 (图 A.47 和 A.48) 显示存在 24 种碳, 包括六个甲基 (包括一种含氧甲基)、一个亚甲基、七个次甲基 (包括三种烯烃和两种含氧次甲基) 和十个季碳 (包括五种烯烃、三种含氧季碳和两种羰基季碳)。将其 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据与已知化合物 chaetoviridin I (**23**) 进行比较, 只在化合物 **13** 的 NMR 波谱中找到氧化甲基 ($\text{CH}_3\text{O}-8$, $\delta_{\text{H/C}}$ 3.29/53.1) 的额外信号。 $\text{CH}_3\text{O}-8$ 与 C-8 的关键 HMBC 相关性 (图 4-20 和 A.50) 表明该含氧甲基在 C-8 上。化合物 **13** 和化合物 **23** 之间的耦合常数和化学位移的相似性以及 $\text{CH}_3\text{O}-8$ 到 CH_3-7 和 H-1 的 NOESY 关联, 表明它们具有相同的相对构型。化合物 **13** 的旋光值 (-107) 和实验 ECD 曲线都与 **23** (-37) 非常相似, 表明它们具有相同的 ((1*R*, 7*S*, 8*R*, 8*aR*, 11*S*, 4'*S*, 5'*S*) 绝对构型。在计算得出的 (1*R*, 7*S*, 8*R*, 8*aR*, 11*S*, 4'*S*, 5'*S*) -4 的 ECD 光谱也与实验曲线吻合良好, 进一步证实了上述推断 (图 4-22)。

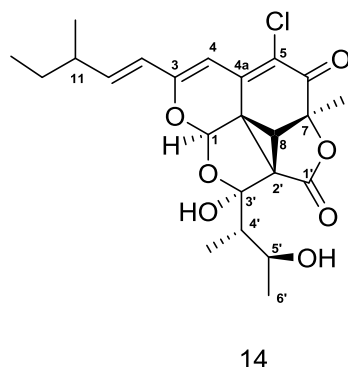


图 4-24 化合物 14 的结构式

Figure 4-24 Structure of Compound 14

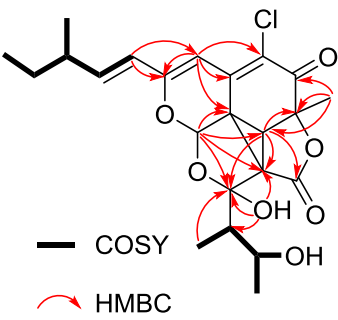


图 4-25 化合物 14 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 谱图

Figure 4-25 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 14

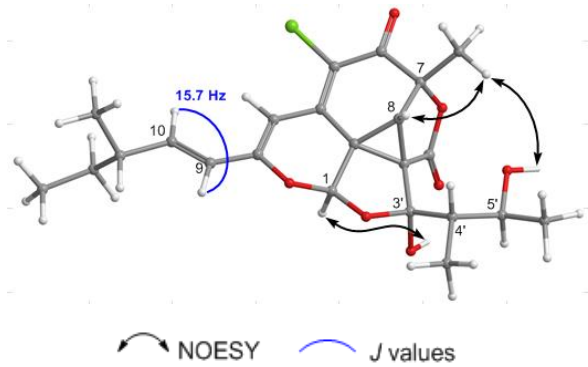


图 4-26 化合物 14 的关键 NOESY 相关性

Figure 4-26 Key NOESY correlations for compound 14

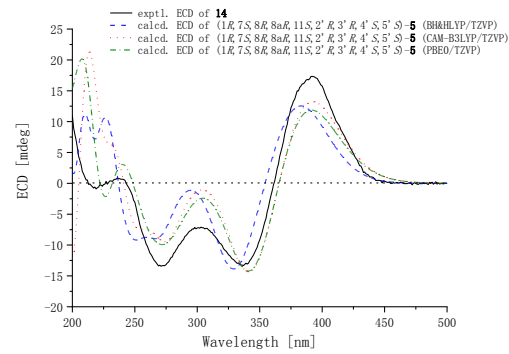


图 4-27 化合物 14 的 ECD 实验和计算谱图

Figure 4-27 Experimental and calculated ECD spectra of compound 14.

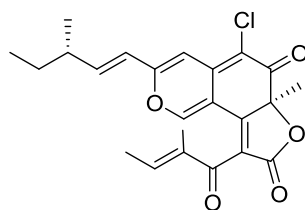
表 4-8 化合物 14 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (600, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
Table 4-8 Compound 14 ^1H and ^{13}C NMR data (600, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	14	
	δC	δH

1	99.2, CH	5.74 (1H, s)
3	160.5, C	
4	100.0, CH	6.09 (1H, s)
4a	141.0, C	
5	117.3, C	
6	183.9, C	
7	80.5, C	
8	39.1, CH	2.93 (1H, s)
8a	39.2, C	
9	123.9, CH	6.19 (1H, d, 15.7)
10	146.1, CH	6.39 (1H, dd, 15.7, 7.9)
11	38.5, CH	2.22 (1H, m)
12	29.2, CH ₂	1.37 (2H, m)
13	12.3, CH ₃	0.85 (3H, t, 7.4)
7-Me	20.0, CH ₃	1.55 (3H, s)
11-Me	19.7, CH ₃	1.02 (3H, d, 6.8)
1'	167.7, C	
2'	55.0, C	
3'	107.8, C	
4'	47.9, CH	1.64(1H, dq, 9.2, 7.1)
5'	66.3, CH	3.70 (1H, ddq, 9.2, 3.8, 6.6)
6'	22.1, CH ₃	1.03 (3H, d, 6.6)
4'-Me	11.3, CH ₃	0.93 (3H, d, 7.1)
1'-OH		
3'-OH		7.12 (1H, s)
5'-OH		4.79 (1H, d, 3.8)

化合物 **14** 为黄色无定形粉末。其 HRESIMS 在 m/z 473.1345 给出 $[M+Na]^+$ 准分子离子峰, 结合 1H 和 ^{13}C -DEPTQ NMR 谱确定分子式为 $C_{23}H_{27}O_7Cl$, 不饱和度为 11。 $[M+H]^+/[M+H+2]^+$ 的两个同位素峰强度为 3:1, 表明化合物 **14** 中存在氯原子。 ^{13}C NMR 显示出 23 个信号, 通过 HSQC 比对将其分为 9 个非质子化碳 (两个酮羰基、三个烯碳、两个含氧碳)、两个 sp^2 次甲基碳、六个 sp^3 次甲基碳 (两个含氧碳)、一个亚甲基碳和五

个甲基碳。其 ^1H NMR 显示, 在 δ_{H} 为 0.85 (d, $J=7.4$ Hz)、0.93 (d, $J=7.1$ Hz)、1.55 (s)、1.02 (d, $J=6.8$ Hz) 和 1.03 (d, $J=6.6$ Hz) 处有五个甲基信号, 在 δ_{H} 为 6.09 (s)、6.19 (d, $J=15.7$ Hz) 和 6.39 (dd, $J=15.6, 7.9$ Hz) 处有三个烯烃信号, 在 δ_{H} 为 5.74 (s) 和 3.70 (m) 处有两个含氧信号。对其 NMR 数据的进一步分析表明, 化合物 **14** 与已知化合物 chaetoviridin I (**23**) 相似, 将该两个化合物的 NMR 数据进行比较, 发现化合物 **23** 中两个含氧非质子化碳 (C-8 /C-8a) 和一个双键 ($\Delta^{2', 3'}$) 在化合物 **14** 中被 sp^3 甲基 (CH-8, $\delta_{\text{H/C}}$ 2.93 /39.1)、两个非质子化 sp^3 碳 (C-8a, δ_{C} 39.2; C-2', δ_{C} 55.0) 和一个含氧非质子化碳 (C-3', δ_{C} 107.8) 所取代。在 HMBC 光谱中 (图 A.57), H-1 和 H-8 均与 δ_{C} 39.2 处的两个四元碳 C-8a 和 δ_{C} 55.0 处的 C-2' 相关, 表明 C-8a 和 C-2' 之间存在直接联系。另外, 从 CH_3 -4' 到 C-4', C-5', 以及脱氧非质子化碳 C-3' 的 HMBC 相关性 (图 A.57) 表明 C-3 上存在羟基。因此, 化合物 **14** 是氯代嗜氮酮类化合物中的一个新化合物, 其结构具有高度刚性的 6/6/5/3/5 五环系统。 ^1H -NMR 中的耦合常数 ($J_{9/10}=15.7$ Hz) 推断出 C-9/C-10 处双键的构型为反式。通过 H8 / CH_3 -7 /OH-5' 和 H-1 /OH-3' 的 NOESY (图 4-25 和 A.58) 相关性并结合其他共代谢体的生物合成分析, 确定化合物 **14** 的相对构型, 计算得出的 (1*R*、7*S*、8*R*、8a*R*、11*S*、2'*R*、3'*R*、4'*S*、5'*S*) -5 的 ECD 光谱与实验曲线高度匹配, 因此化合物 **14** 的手性中心定为 1*R*、7*S*、8*R*、8a*R*、11*S*、2'*R*、3'*R*、4'*S*、5'*S*。



15

图 4-28 化合物 15 的结构式

Figure 4-28 Structure of Compound 15

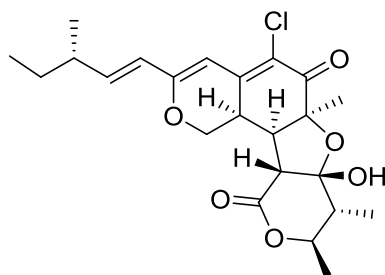
 表 4-9 化合物 15 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

 Table 4-9 Compound 15 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	15
δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)

1	148.7, CH	8.03 (1H, s)
3	157.2, C	
4	105.2, CH	6.45 (1H, s)
4a	139.6, C	
5	108.1, C	
6	183.0, C	
7	87.4, C	
8	157.4, C	
8a	110.0, C	
9	120.3, CH	6.07 (1H, d, 15.6)
10	148.0, CH	6.56 (1H, dd, 15.6, 7.7)
11	38.1, CH	2.28 (1H, m)
12	28.5, CH ₂	1.39 (2H, m)
13	11.5, CH ₃	0.84 (3H, t, 7.4)
7-Me	25.4, CH ₃	1.64 (3H, s)
11-Me	19.1, CH ₃	1.04 (3H, d, 6.7)
1'	167.5, C	
2'	124.8, C	
3'	190.0, C	
4'	137.0, C	
5'	15.3, CH	6.43 (1H, s)
4'-Me	146.7, CH ₃	1.79 (3H, s)
6'	10.5, CH ₃	1.86 (3H, d, 6.9)

化合物 **15**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 415.4 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClO}_5$, 不饱和度为 12。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示含有五个烯烃质子, 五个甲基, 两个共轭羰基和一个共轭酯。该分子的核磁数据具有 chaetoviridines 类化合物特征, 可以阐明该结构为氮杂菲酮型, 进一步文献比对发现, 化合物 **15** 的核磁数据与文献报道甾醇 chaetoviridine E 的基本一致, 结合 **15** ($[\alpha]_D^{25}$ -90.0) 和文献中 ($[\alpha]_D^{25}$ -385) 的旋光比对, 最终将化合物 **15** 鉴定为 chaetoviridine E (Phonkerd N et al., 2008)



16

图 4-29 化合物 16 的结构式

Figure 4-29 Structure of Compound 16

表 4-10 化合物 16 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 4-10 Compound 16 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	16	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	145.6, CH	7.49 (1H, s)
3	156.7, C	
4	104.4, CH	6.67 (1H, s)
4a	138.7, C	
5	109.7, C	
6	187.1, C	
7	82.6, C	
8	48.3, CH	3.40 (1H, d, overlapped)
8a	114.1, C	
9	120.7, CH	6.38 (1H, d, 15.8)
10	145.1, CH	6.49 (1H, dd, 15.8, 7.7)
11	38.0, CH	2.26 (1H, dq, 13.8, 6.9)
12	28.6, CH_2	1.39 (2H, dq, 15.4, 8.0)
13	11.5, CH_3	0.85 (3H, t, 7.4)
Me	22.9, CH_3	1.24 (3H, s)
11-Me	19.2, CH_3	1.04 (3H, d, 6.3)
1'	169.9, CH_3	
2'	58.4, CH	2.73 (1H, d, 10.7)

3'	104.4, C	
4'	45.8, CH	1.69 (1H, dq, 13.8, 6.9)
5'	76.1, CH	4.32 (1H, dd, 10.1, 6.3)
6'	18.2, CH ₃	1.27 (3H, d, 6.3)
4'-Me	8.7, CH ₃	1.01 (3H, d, 6.9)
3'-OH		6.30, s

化合物 **16**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 435.5 给出 $[M + H]^+$ 准离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{ClO}_6$ 。不饱和度为 10。其 ^{13}C NMR 显示了 23 个碳信号, 包括 8 个季碳 (2 个连氧季碳, 2 个羰基碳, 4 个烯烃碳,)、9 个次甲基碳 (4 个烯烃碳) 和 1 个亚甲基碳、5 个甲基。进一步文献比对, 将化合物 **16** 鉴定为 Chaetomugilin D(Wang D C et al., 2017)。

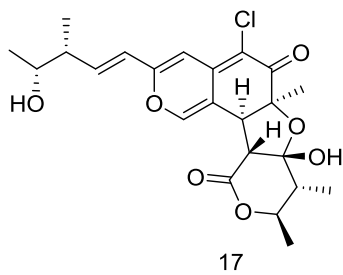


图 4-30 化合物 17 的结构式

Figure 4-30 Structure of Compound 17

表 4-11 化合物 17 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 4-11 Compound 17 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	17	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	145.5, CH	7.49 (1H, s)
3	156.7, C	
4	14.3, CH	6.66 (1H, s)
4a	138.6, C	
5	109.7, C	
6	187.0, C	

7	82.5, C	
8	48.3, CH	3.38 (1H, d, overlapped)
8a	114.1, C	
9	121.4, CH	6.39 (1H, d, 15.9)
10	142.8, CH	6.60 (1H, dd, 15.9, 7.7)
11	43.9, CH	2.33 (1H, dq, 13.0, 6.5)
12	69.1, CH	3.58 (1H, dq, 11.7, 5.7)
13	20.5, CH ₃	1.02 (3H, t, 5.7)
Me	22.9, CH ₃	1.23 (3H, s)
11-Me	14.9, CH ₃	1.00 (3H, d, 6.5)
1'	169.8, CH ₃	
2'	58.4, CH	2.72 (1H, d, 10.7)
3'	103.3, C	
4'	45.7, CH	1.68 (1H, dq, 13.6, 6.9)
5'	76.0, CH	4.31 (1H, dd, 12.3, 6.2)
6'	18.2, CH ₃	1.27 (3H, d, 6.2)
4'-Me	8.7, CH ₃	1.01 (3H, d, 6.9)
12-OH		4.66, s

化合物 **17**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 451.7 给出 $[M+H]^+$ 准离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{ClO}_7$, 不饱和度为 10。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有四种仲甲基、一种叔甲基、四种 sp^2 杂交甲基 (包含 1 个含氧碳)、六种 sp^3 甲基 (包含 2 种含氧甲基)、两个含氧的四元 sp^3 碳 (包含 1 个半缩醛碳)、四个四元 sp^2 碳和两个羰基, 进一步文献比对发现, 化合物 **17** 的核磁数据与文献报道 chaetomugilin A 的基本一致, 结合 **17** 和文献中的旋光比对, 将化合物 **17** 鉴定为 chaetomugilin A (Yamada T et al., 2008)

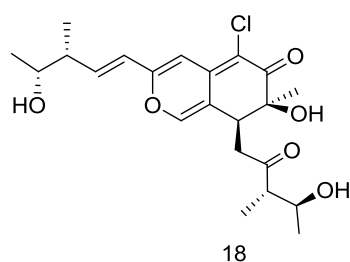


图 4-31 化合物 18 的结构式

Figure 4-31 Structure of Compound 18

表 4-12 化合物 18 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 4-12 Compound 18 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	18	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	144.8, CH	7.45 (1H, s)
3	156.4, C	
4	104.0, CH	6.33 (1H, s)
4a	139.8, C	
5	107.2, C	
6	191.0, C	
7	74.0, C	
8	40.4, CH	3.19 (1H, dd, 9.8, 3.2)
8a	118.9, C	
9	121.6, CH	6.31 (1H, d, 15.8)
10	142.3, CH	6.55 (1H, dd, 15.8, 8.5)
11	43.8, CH	2.48 (1H, m)
12	72.5, CH	3.29 (1H, m)
13	20.5, CH_3	1.01 (3H, d, 7.1)
7-Me	25.9, CH_3	1.17 (3H, s)
11-Me	14.9, CH_3	0.94 (3H, d, 6.2)
1'	40.8, CH_2	2.31 (1H, dd, 17.6, 9.8) 2.94 (1H, dd, 17.6, 3.0)
2'	212.1, C	

3'	53.7, CH	2.45, (1H, m)
4'	69.1, CH	3.57 (1H, m)
5'	20.7, CH ₃	0.99 (3H, d, 6.4)
3'-Me	12.1, CH ₃	0.80 (3H, d, 6.8)

化合物 **18**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 425.2 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{ClO}_6$, 不饱和度为 8。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 7 个季碳 (2 个羰基碳, 4 个烯炔碳)、9 个次甲基碳 (4 个烯炔碳), 1 个亚甲基和 5 个甲基。进一步文献比对发现, 化合物 **18** 的核磁数据与文献报道 chaetomugilin Q 的基本一致, 结合 **18** 和文献中的旋光比对, 故将化合物 **18** 鉴定为 chaetomugilin Q (Yamada T et al., 2011)。

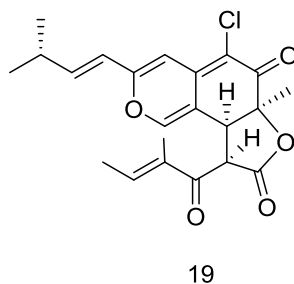


图 4-32 化合物 **19** 的结构式

Figure 4-32 Structure of Compound 19

表 4-13 化合物 **19** ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 4-13 Compound 19 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	19	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	144.8, CH	7.45 (1H, s)
3	156.4, C	
4	104.0, CH	6.33 (1H, s)
4a	139.8, C	
5	107.2, C	
6	191.0, C	
7	74.0, C	

8	40.4, CH	3.19 (1H, dd, 9.8, 3.2)
8a	118.9, C	
9	121.6, CH	6.31 (1H, d, 15.8)
10	142.3, CH	6.55 (1H, dd, 15.8, 8.5)
11	43.8, CH	2.48 (1H, m)
12	72.5, CH	3.29 (1H, m)
13	20.5, CH ₃	1.01 (3H, d, 7.1)
7-Me	25.9, CH ₃	1.17 (3H, s)
11-Me	14.9, CH ₃	0.94 (3H, d, 6.2)
1'	40.8, CH ₂	2.31 (1H, dd, 17.6, 9.8) 2.94 (1H, dd, 17.6, 3.0)
2'	212.1, C	
3'	53.7, CH	2.45 (1H, m)
4'	69.1, CH	3.57 (1H, m)
5'	20.7, CH ₃	0.99 (3H, d, 6.4)
3'-Me	12.1, CH ₃	0.80 (3H, d, 6.8)

化合物 **19**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 417.2 给出 $[M + H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClO}_5$, 不饱和度为 11。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 9 个季碳、8 个次甲基, 1 个亚甲基和 5 个甲基。化合物 **19** 的核磁数据与文献报道 chaetoglobosin O 的基本一致, 结合 **19** ($[\alpha]_D^{25}$ -104.3) 和文献中 ($[\alpha]_D^{25}$ -116.1) 的旋光比对, 故将化合物 **19** 鉴定为 chaetomugilin O (Muroga Y et al., 2009)。

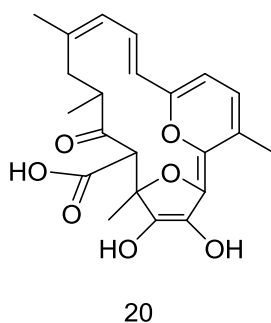


图 4-33 化合物 **20** 的结构式

Figure 4-33 Structure of Compound 20

表 4-14 化合物 **20** ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 4-14 Compound 20 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	20	
	δ_C	δ_H (<i>J</i> in Hz)
1	145.7, CH	7.69 (1H, s)
3	157.2, C	
4	104.6, CH	6.65 (1H,s)
4a	140.5, C	
5	108.9, C	
6	184.0, C	
7	83.3, C	
8	43.5, CH	4.28 (1H, d, 12.0)
8a	113.4, C	
9	120.6, CH	6.62 (1H, s)
10	146.0, CH	6.72 (1H, dd, 15.8, 7.6)
11	38.0, CH	2.76 (1H, m)
12	28.6, CH ₂	1.63 (2H, m)
13	11.6, CH ₃	1.09 (3H, t, 7.4)
7-CH ₃	23.3, CH ₃	1.76 (3H, s)
11-CH ₃	19.2, CH ₃	1.28 (3H, d, 6.7)
1'	169.9, C	
2'	51.3, CH	5.36 (1H, d, 12.1)
3'	192.9, C	
4'	136.9, C	
5'	145.3, CH	6.94 (1H, s)
6'	15.1, CH ₃	2.09 (3H, d, 6.9)
4'-Me	11.0, CH ₃	1.99 (3H, s)

化合物 **20**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 415.2 给出 $[M + H]^+$ 准分子离子峰, 结合 1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $C_{23}H_{26}O_7$ 。不饱和度为 9。其 1H NMR 显示了 6 组甲基炔质子, ^{13}C NMR 显示 13 个信号, 其中不饱和碳在低磁场中, 包括 2 个羰基, 4 个三级碳, 7 个四级碳和 5 个一级碳, 1 个二级碳, 3 个三级碳, 以及一个四级碳在高磁场中。化合物 **20** 的核磁数据与文献报道 chaetoglobosin X 的基本一致, 结合 **20** ($[\alpha]_D^{25}$ -58.3) 和文献中 ($[\alpha]_D^{25}$ -123) 的旋光比对, 最后将化合物 **20** 鉴定为 chaetoglobosin X (Wang Y et al., 2012)。

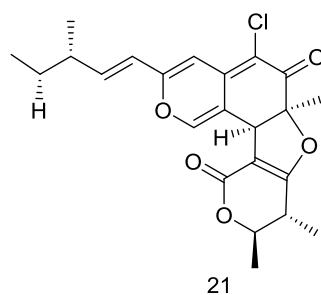


图 4-34 化合物 21 的结构式

Figure 4-34 Structure of Compound 21

表 4-15 化合物 21 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 4-15 Compound 21 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	21	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	147.7, CH	8.2 (1H, s)
3	157.5, C	
4	104.5, CH	6.93 (1H, s)
4a	141.7, C	
5	108.7, C	
6	181.8, C	
7	91.2, C	
8	43.8, CH	3.59 (1H, s)
8a	113.5, C	
9	120.5, CH	6.64 (1H, d, 15.8)
10	145.8, CH	6.79 (1H, dd, 15.8, 7.7)
11	38.0, CH	2.74 (1H, sept, 7.7)
12	28.5, CH_2	1.63 (2H, m)
13	11.6, CH_3	1.09 (3H, t, 8.85)
7- CH_3	23.3, CH_3	1.83 (3H, s)
11- CH_3	19.1, CH_3	1.27 (3H, d, 6.65)
1'	163.2, C	
2'	100.6, C	
3'	174.7, C	

4'	34.2, CH	2.96 (1H, m)
5'	78.7, CH	4.64 (1H, m)
6'	18.7, CH ₃	1.34 (3H, d, 7.0)
4'-CH ₃	12.9, CH ₃	1.52 (3H, d, 6.35)

化合物 **21**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 417.7 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClO}_5$, 不饱和度为 11。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 9 个季碳 (2 个羰基碳, 6 个烯烃碳)、8 个次甲基碳 (4 个烯烃碳), 1 个亚甲基和 5 个甲基。进一步文献比对确认化合物 **21** 为 chaetomugilin F (Yasuhide M et al., 2008)。

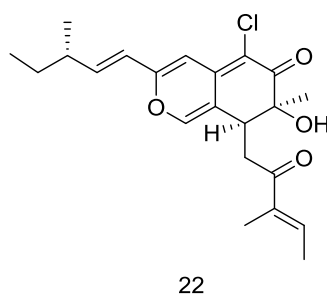


图 4-35 化合物 **22** 的结构式

Figure 4-35 Structure of Compound 22

表 4.16 化合物 **22** ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 4.16 Compound 22 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	22	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	144.6, CH	7.71 (1H, s)
3	156.3, C	
4	104.0, CH	6.83 (1H, s)
4a	139.6, C	
5	107.4, C	
6	191.1, C	
7	74.2, C	
8	41.9, CH	3.68 (1H, m)
8a	118.8, C	
9	120.8, CH	6.59 (1H, d, 17.0)

10	144.7, CH	6.69 (1H, dd, 14.35, 6.85)
11	37.9, CH	2.81 (1H, m)
12	28.6, CH ₂	1.64 (2H, m)
13	11.5, CH ₃	1.10 (3H, t, 8.45)
7-CH ₃	26.2, CH ₃	1.45 (3H, s)
11-CH ₃	19.2, CH ₃	1.29 (3H, d, 6.6)
1'	34.9, CH ₂	3.13 (1H, m); 3.45 (1H, m)
2'	199.3, C	
3'	138.4, C	
4'	137.2, CH	1.97 (1H, m)
5'	14.6, CH ₃	2.03 (3H, d, 6.8)
3'-CH ₃	10.9, CH ₃	1.92 (3H, s)

化合物 **22**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 391.7 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClO}_4$, 不饱和度为 9。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 8 个季碳 (包含 2 个羰基碳, 5 个烯烃碳)、7 个次甲基碳 (包含 5 个烯烃碳), 2 个亚甲基和 5 个甲基。化合物 **22** 的核磁数据与文献报道 chaetomugilin J 的基本一致, 结合 **22** ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} +45.5$) 和文献中 ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} +243.8$) 的旋光比对, 将其鉴定为 chaetomugilin J (Muroga Y et al., 2010)。

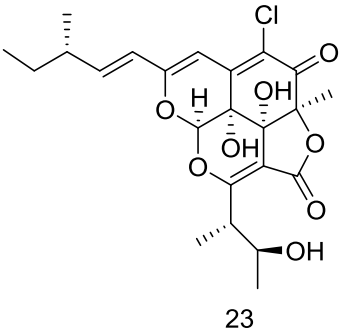


图 4-36 化合物 23 的结构式

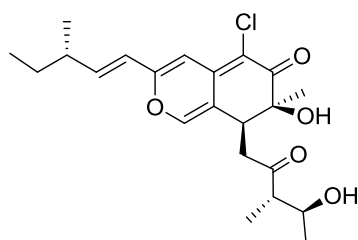
Figure 4-36 Structure of Compound 23

表 4-17 化合物 23 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
Table 4-17 Compound 23 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	23	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)

1	96.2, CH	6.00 (1H, s)
3	156.0, C	
4	101.4, CH	6.18 (1H, s)
4a	144, C	
5	123.3, C	
6	186.8, C	
7	85.8, C	
8	72.7, C	
8a	65.1, C	
9	123.0, CH	6.03 (1H, d, 15.7)
10	146.3, CH	6.51 (1H, dd, 7.7, 15.7)
11	38.5, CH	2.26 (1H, m)
12	29.1, CH ₂	1.56 (2H, m)
13	12.5, CH ₃	0.85 (3H, t, 6.9)
7-Me	19.5, CH ₃	1.74 (3H, s)
11-Me	20.6, CH ₃	0.94 (3H, d, 7.0)
1'	167.1, C	
2'	103.5, C	
3'	166.7, C	
4'	40.4, CH	3.15 (1H, m)
5'	68.0, CH	3.25 (1H, dq, 6.7, 7.0)
4'-Me	12.1, CH ₃	1.04 (3H, d, 6.7)
6'	18.6, CH ₃	0.85 (3H, d, 6.9)

化合物 **23**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 467.9 给出 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{ClO}_8$, 不饱和度为 10。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 10 个季碳 (包含 2 个羰基碳, 5 个烯烃碳)、7 个次甲基碳 (包含 3 个烯烃碳), 1 个亚甲基和 5 个甲基。进一步文献比对发现, 化合物 **23** 的核磁数据与文献报道 chaetovorodin I 的基本一致, 结合旋光比对, 将化合物 **23** 鉴定为 chaetovorodin I (Muroga Y et al., 2010)。



24

图 4-37 化合物 24 的结构式

Figure 4-37 Structure of Compound 24

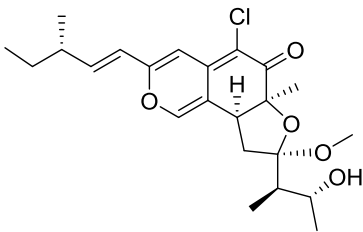
表 4-18 化合物 24 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Table 4-18 Compound 24 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	24	
	δ_{C}	δ_{H}
1	144.6, CH	7.71 (1H, s)
3	156.4, C	
4	104.0, CH	6.83 (1H, s)
4a	139.8, C	
5	107.2, C	
6	191.1, C	
7	74.0, C	
8	40.4, CH	3.45 (1H, dd, 9.8, 3.2)
8a	118.9, C	
9	120.8, CH	6.58 (1H, d, 14.6)
10	144.7, CH	6.70 (1H, dd 14.6, 8.8)
11	37.9, CH	1.95 (1H, m)
12	28.6, CH_2	1.64 (2H, m)
13	11.5, CH_3	1.10 (3H, t, 8.3)
7-Me	25.9, CH_3	1.43 (3H, s)
11-Me	19.2, CH_3	1.19 (3H, d, 5.6)
1'	40.9, CH_2	2.34 (1H, dd, 17.8, 9.6) 2.92 (1H, dd, 17.8, 3.2)

2'	212.1, C	
3'	53.6, CH	2.77 (1H, m)
4'	68.2, CH	3.85 (1H, m)
5'	20.7, CH ₃	1.28 (3H, d, 6.15)
3'-Me	12.0, CH ₃	1.06 (3H, d, 7.9)

化合物 **24**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 409.2 给出 $[M + H]^+$ 准分子离子峰, 结合 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{ClO}_5$ 。不饱和度为 8。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 7 个季碳 (2 个羰基碳, 4 个烯烃季碳)、8 个次甲基碳 (4 个烯烃碳), 2 个亚甲基和 5 个甲基。进一步文献比对发现, 化合物 **24** 的核磁数据与文献报道 chaetoviridin J 的基本一致, 化合物 **24** 鉴定为 chaetoviridin J (Ui J. Y. et al., 2015)。



25

图 4-38 化合物 25 的结构式

Figure 4-38 Structure of Compound 25

表 4-19 化合物 25 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据 (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
Table 4-19 Compound 25 ^1H and ^{13}C NMR data (500, 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	25	
	δ_{C}	δ_{H}
1	146.1, CH	7.84(1H, s)
3	157.3, C	
4	104.4, CH	6.63(1H, s)
4a	140.5, C	
5	108.2, C	
6	188.3, C	
7	84.4, C	
8	42.1, CH	3.39 (1H, 溶剂中)
8a	116.0, C	

9	120.8, CH	6.36(1H, d, 15.8)
10	145.3, CH	6.48(1H, dd, 15.8, 7.7)
11	38.0, CH	2.25(1H, dt, 13.6, 6.7)
12	28.7, CH ₂	1.38 (2H, dq, 14.4, 7.2)
13	11.6, CH ₃	0.83 (3H, t, 7.4)
7-Me	24.4, CH ₃	1.28 (3H, s)
11-Me	19.2, CH ₃	1.02 (3H, d, 6.7)
1'	40.2, CH ₂	2.09 (1H, dd, 13.1, 7.4); 1.98 (1H, t, 13.0)
2'	109.8, C	
3'	44.7, CH	1.74 (1H, dq, 13.9)
4'	66.2, CH	3.42(1H, 溶剂中)
5'	20.8, CH ₃	0.93(3H, d, 6.3)
3'-Me	11.2, CH ₃	0.75 (3H, d, 7.1)
6'	48.0, CH ₃	3.18(3H, s)

化合物 **25**: 黄色无定型粉末, 阳离子质谱 ESI-MS 在 m/z 445.1 给出 $[M + Na]^+$ 准分子离子峰, 结合 1H 和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $C_{23}H_{31}ClO_5$ 。不饱和度为 8。其 1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 7 个季碳 (1 个羰基碳, 4 个烯烃碳)、8 个次甲基碳 (4 个烯烃碳) 2 个亚甲基和 6 个甲基。结合 **25** ($[\alpha]_D^{25} + 25$) 和文献中 ($[\alpha]_D^{25} + 27$) 的旋光比对, 对将化合物 **25** 鉴定为 chaephilone D (Gao W et al., 2020)。

4.9 促斑马鱼血管生成活性研究

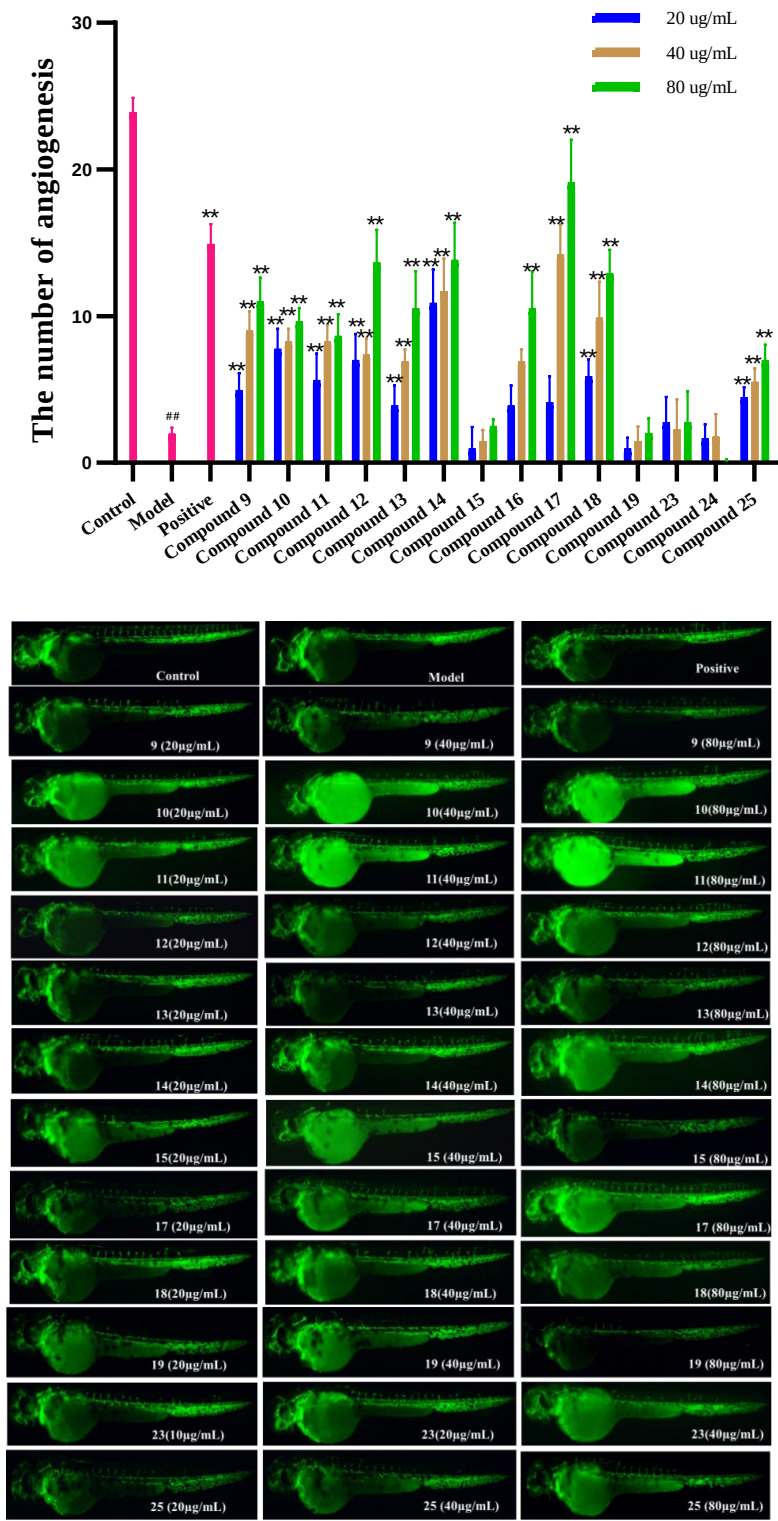


图 4-39 促斑马鱼血管生成活性结果

Figure 4-39 Results of promoting angiogenic activity in zebrafish

如图所示, YP-106 次级代谢产物中除少数化合物有斑马鱼致死性外, 大多数化合物 chaetoviridin L (9)、chaetofanixin A-E (10-14) Chaetomugilin S (16)、chaetomugilin A (17)、chaetomugilin Q (18) 和 chaephilone D (25) 都以剂量依赖性方式显示出显著的血管生长促进作用。此外, 在浓度为 80 μ g/mL 时, 化合物 12、14 和 17 显示出比阳性药作用相持甚至更好的促血管生成活性。

4.10 本章小结

本章围绕 YP-106 菌株, 开展最适培养基的条件摸索, 筛选确定了产物种类丰富的 MEA 培养基为发酵条件进行扩大培养发酵, 对菌液和菌丝采取不同的萃取手段提取次级代谢产物, 选用了不同的化学分离手段最终获得 17 个单体化合物, 通过高分辨质谱、核磁共振谱图和旋光比对, 鉴定了 6 个新的氯代嗜氮酮类衍生物 chaetoviridin L (9) chaetofanixin A-E (10-14) 以及 11 种 (15-25) 已知的类似物。对该 17 种化合物进行了促斑马鱼血管生成活性筛选, 结果显示化合物 chaetoviridin L (9)、chaetofanixin A-E (10-14) Chaetomugilin S (16)、chaetomugilin A (17)、chaetomugilin Q (18) 和 chaephilone D (25) 都以剂量依赖性方式显示出显著的促斑马鱼血管生成活性。表明了氯代嗜氮酮类化合物作为治疗缺血性心血管疾病药物先导化合物的潜在价值。

第五章 Chaetomium globosum YP-106 次级代谢产物其他活性研究

高含氮、卤代是海洋微生物代谢产物区别于陆地微生物的显著化学特征，而氮和卤是两种成药性高的化学元素。为从深海真菌中挖掘更多药用价值，对 *Chaetomium globosum* YP-106 分离出的化合物进行肿瘤细胞抑制活性和抑菌活性筛选，采用 CCK-8 法对 A549（人肺癌细胞）、MCF7（人乳腺癌细胞）等 20 种人类肿瘤细胞进行肿瘤细胞抑制活性筛选，结果显示化合物 chaetomugilin Q（18）人甲状腺癌细胞有微弱的抑制活性，其 IC₅₀ 为 13.570μM。化合物 chaetomugilin O（19）对人甲状腺癌细胞和人横纹肌肉瘤细胞也有微弱的抑制活性，IC₅₀ 分别为 9.289μM 和 13.660μM。采用纸片法对番茄早疫病菌(*Alternaria sonali*)等 10 种植物致病菌进行抑菌活性评价，化合物 chaetoglobosin X（20）对芒果镰刀菌、小麦根霉病菌、苹果轮纹病菌、小麦纹枯病菌表现出微弱的抑菌活性。

5.1 试验材料

5.1.1 试验仪器

表 5-1 实验仪器

Table 5-1 Experimental Instruments

名称	型号	生产厂家
超净工作台	SW-CJ-2FD	苏净集团安泰公司
显微镜	NIB-100	PHcbi 公司
二氧化碳细胞培养箱	MCO-18AC	Agilent 公司
电热恒温培养箱	HWS-24	上海一恒科技有限公司
多功能酶标仪	MULTISKAN MK3	Thermo 公司
十万分之一天平	MS105DU	瑞士梅特勒公司
离心机	TD4N	长沙英泰仪器有限公司
混匀仪	SCI-VS	美国塞洛捷克
立式高压蒸汽灭菌器	LDZF-75L	上海申安医疗器械厂

5.1.2 试验材料及试剂

表 5-2 主要材料及试剂

Table 5-2 Main materials and reagents

名称	生产厂家
PBS 磷酸盐缓冲液(PB180327)	武汉普诺赛生命科技有限公司
胎牛血清 (FBS) 04-001-1acs)	Biological industries
青霉素-硫酸链霉素双抗混合液 (100×) (P1400)	Solarbio life sciences
RPMI1640 培养液 (PM150110)	武汉普诺赛生命科技有限公司
CCK-8 试剂	Biosharp life sciences
96 孔细胞培养板	康宁生命科学(吴江)有限公司
25、75cm ² 细胞培养瓶	康宁生命科学(吴江)有限公司
血球计数板	上海求精生化试剂仪器有限公司
盐酸阿霉素 (D8740)	Solarbio life sciences
电子天平	RADWAG Wagi Elektroniczne

5.2 肿瘤细胞抑制活性

对化合物 **15-29**、**24**、**25** 进行了 20 种癌细胞系的细胞抑制活性评价。

20 种人类肿瘤细胞：A549（人肺癌细胞）、MCF7（人乳腺癌细胞）、MKN-45（人胃癌细胞）、HCT 116（人结肠癌细胞）、HepG2（人肝癌细胞）、HeLa（人宫颈癌细胞）、K-562（人慢性髓原白血病细胞）、SF126（人脑瘤细胞）、PA-1（人卵巢畸胎瘤细胞）、786-O（人肾透明细胞腺癌细胞）、TE-1（人食管癌细胞）、5637（人膀胱癌细胞）、DU 145（人前列腺癌细胞）、CAL-62（人甲状腺癌细胞）、PATU8988T（人胰腺癌细胞）、HOS（人骨肉瘤细胞）、A-375（人恶性黑色素瘤细胞）、A-673（人横纹肌肉瘤细胞）、FaDu（人咽鳞癌细胞）、GBC-SD（人胆囊癌细胞）。

5.2.1 试验方法

（1）接种细胞：用含 10%胎牛血清的培养液将细胞配成单个细胞悬液，96 孔板每孔接种 100 μ L 5×10^4 /mL 的细胞，在 5% CO₂，37℃ 的条件下预培养 24 h。

(2) 加入待测样品溶液：用 DMSO 溶解样品，基础培养基稀释样品后，吸出孔内旧培养基（悬浮细胞直接加入 10 μ L 10 倍浓度的样品溶液），每孔加入 100 μ L 样品溶液，初筛每个样品设置 1 个浓度，设 3 个复孔；置于培养箱培养 48 h。实验分为空白组（Blank）、对照组（Control）和药物组（Drug）。

(3) 显色：吸出旧培养基（悬浮细胞直接加入 10 μ L CCK-8 溶液原液），每孔直接加入稀释十倍的 100 μ L CCK-8 溶液，在 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 继续培养 1-4 h（避光操作，实时观察）。

(4) 比色：用酶标仪测定 450 nm 处吸光度，记录原始数据结果。

(5) 应用 Excel 软件进行原始数据标准化处理，初筛通过每孔 OD 值计算细胞增殖抑制率（公式=（OD_{Control}-OD_{Drug}）/（OD_{Control}-OD_{Blank}） $\times$ 100%），统计抑制率，实验结果用 $\pm$ SD 表示。

(6) 阳性对照样品：盐酸阿霉素 Doxorubicin（Dox）。

5.2.2 试验结果

表 5-3 化合物活性测试（Cell Inhibition）

Table 5-3 Compound Activity Test (Cell Inhibition)

	15	16	17	18	19	20	24	25	Doxorubicin
A549	4.69%	-3.45%	-8.03%	23.62%	0.29%	-6.38%	-1.30%	-5.10%	68.68%
MCF7	11.11%	31.24%	38.02%	5.15%	27.14%	7.08%	3.70%	1.32%	62.88%
MKN-45	10.38%	8.11%	17.20%	10.38%	19.11%	5.31%	-0.30%	5.17%	81.10%
HCT 116	-0.20%	6.62%	-4.17%	20.92%	-5.04%	11.45%	-37.96%	2.83%	93.15%
HepG2	38.45%	42.21%	33.10%	45.73%	36.87%	32.31%	-15.09%	3.38%	82.36%
HeLa	28.47%	8.52%	30.89%	15.63%	30.82%	2.73%	-41.73%	-11.25%	100.03%
K-562	-1.48%	-0.12%	-3.40%	2.04%	2.16%	1.24%	13.91%	16.39%	75.87%
SF126	15.46%	45.72%	39.54%	9.28%	62.40%	16.01%	8.65%	5.55%	95.09%
PA-1	4.10%	9.76%	12.77%	16.98%	44.14%	7.97%	-12.12%	0.54%	99.65%
786-O	0.59%	11.98%	12.20%	7.93%	0.77%	4.63%	-17.87%	3.38%	80.83%
TE-1	0.28%	17.47%	2.92%	3.68%	2.30%	-7.12%	-12.97%	-5.09%	74.82%
5637	-3.21%	11.06%	-3.69%	16.51%	1.20%	-4.17%	-15.33%	-2.23%	99.52%
DU 145	-2.00%	-2.02%	-1.44%	0.87%	3.98%	0.60%	-0.47%	2.16%	76.66%
CAL-62	1.68%	31.91%	9.59%	34.19%	81.68%	-3.81%	-2.32%	3.06%	97.36%
PATU898	13.22%	20.03%	20.03%	12.82%	30.12%	1.82%	-3.79%	10.03%	99.44%
HOS	-0.12%	4.74%	1.42%	2.96%	0.95%	-1.36%	-13.64%	-17.72%	100.24%

A-375	14.81%	9.67%	31.57%	1.33%	13.39%	8.60%	-0.86%	17.67%	96.67%
A-673	65.82%	20.21%	11.28%	81.71%	88.47%	22.17%	-0.54%	-8.52%	100.15%
FaDu	36.06%	30.69%	33.27%	29.85%	42.43%	39.96%	-6.93%	-11.04%	97.82%
GBC-SD	2.92%	1.67%	-3.25%	10.14%	-0.62%	-8.42%	-5.89%	-0.31%	53.79%

如表中所示，使用 CCK-8 法对 20 种人类肿瘤细胞进行活性初筛，阿霉素作为阳性药。将抑制率超过 80%的化合物 **18** 和 **19** 分别对 CAL-62 和 A-673 进行 IC₅₀ 测试。

表 5-4 样品 IC₅₀ 检测结果

Table 5-4 Detection results of samples with 50% inhibitory concentration

样品编号	人甲状腺癌细胞		人横纹肌肉瘤细胞	
	CAL-62		A-673	
	IC50 (μM)	SD	IC50 (μM)	SD
18	13.570	0.170	9.289	0.962
19	-	-	13.660	0.863
DOX	0.167	0.023	0.053	0.003

结合表中结果可知，chaetomugilin Q (**18**) 对人甲状腺癌细胞有微弱的抑制活性，IC₅₀ 为 13.570 μM。化合物 chaetomugilin O (**19**) 对人甲状腺癌细胞和人横纹肌肉瘤细胞也有微弱的抑制活性，IC₅₀ 分别为 9.289 μM 和 13.660 μM。与阳性药相比有较弱的抑制活性。

5.3 抑菌活性

5.3.1 试验方法

以番茄早疫病菌(*Alternaria sonali*)、芒果镰刀菌(*Fusarium mangiferae*)、豇豆枯萎病菌(*Fusarium oxysporum f.sp.phaseolus*)、芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporoides*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum f.sp.cubense*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum f. sp.cucumebrium*)、苹果轮纹病菌 (*Botryosphaeria dothidea*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、小麦纹枯病菌(*Rhizotonia cerealis Vander Hoeven*)10 种致病菌为模型 (放线菌酮为阳性药，浓度为 4mg/ml)，采用纸片扩散法对化合物 (1 mg/ml 的甲醇溶液) 进行抑菌活性测试。

测试方法见梅显贵博士论文（梅显贵，2017）。

5.3.2 试验结果

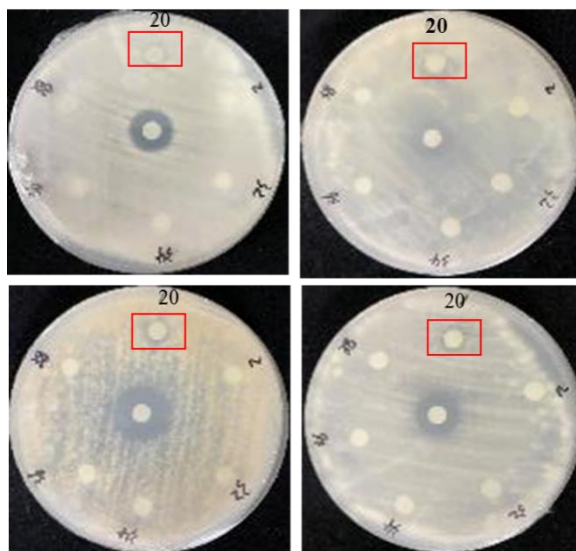


图 5-1 化合物抑菌活性结果：1. 芒果镰刀菌 2. 小麦根腐病菌 3. 苹果轮纹病菌 4. 小麦纹枯病菌

Figure 5-1 Compound antibacterial activity: 1. *Fusarium mangiferae* 2. *Bipolaris sorokiniana*

3. *Botryosphaeria dothidea* 4. *Rhizotonia cerealis* Vander Hoeven

在抑菌活性筛选中，只有化合物 chaetoglobosin X (20) 对芒果镰刀菌、小麦根霉病菌、苹果轮纹病菌、小麦纹枯病菌显示出微弱的抑菌作用。由于活性效果不明显，没有继续进行 MIC 测试。

5.4 本章小结

对 *Chaetomium globosum* YP-106 分离出的化合物进行肿瘤细胞抑制活性和抑菌活性筛选，采用 CCK-8 法对 A549（人肺癌细胞）、MCF7（人乳腺癌细胞）等 20 种人类肿瘤细胞进行肿瘤细胞抑制活性筛选。结果显示化合物 chaetomugilin Q (18) 人甲状腺癌细胞有微弱的抑制活性，其 IC_{50} 为 $13.570\mu M$ 。化合物 chaetomugilin O (19) 对人甲状腺癌细胞和人横纹肌肉瘤细胞也有微弱的抑制活性， IC_{50} 分别为 $9.289\mu M$ 和 $13.660\mu M$ 。采用纸片法对番茄早疫病菌 (*Alternaria sonali*) 等 10 种植物致病菌进行抑菌活性评价，化合物 chaetoglobosin X (20) 对芒果镰刀菌、小麦根霉病菌、苹果轮纹病菌、小麦纹枯病菌表现出微弱的抑菌活性。为深远海真菌资源利用提供新思路。

第六章 结论与展望

为了寻找新颖有效的治疗心血管疾病药物的先导化合物,本研究开展了对超深渊真菌 *Chaetomium globosum* YP-106 和大型食药真菌树舌灵芝次级代谢产物的研究。

本研究筛选了 22 种食药用于实体,把产物量大且种类丰富的树舌灵芝作为目标菌株,采用通用的化学分离手段对次级代谢产物进行分离纯化,共得到 8 种单体化合物,利用现代波谱学方法确定了 8 个化合物的结构,确定获得 2 个新的羊毛甾烷型三萜类化合物 ganoderenicfys A (1) 和 ganoderenicfys B (2) 和六种相关已知萜类化合物 ganoderic acid A (3)、betulinic acid (4)、betulin (5)、(22E)-ergosta-5,22-dien-3-one (6)、demethylcisterol A4 (7) 和 demethylcisterol A3 (8)。

本研究还对超深渊海洋真菌球毛壳菌 YP-106 进行了发酵条件筛选,通过 HPLC 分析选定为产物丰富的 MEA 培养基、静置、28℃作为发酵条件对菌株进行扩大培养。对乙酸乙酯萃取物进行次级代谢产物分离,采用不同化学手段减少微量成分的损失,获得单体化合物。利用多种光谱和波谱解析技术从中共得到 17 个纯化合物,包括 6 个新的氯代嗜氮酮类化合物 chaetoviridin L (9) chaetofanixin A-E (10-14) 和 11 个已知物,包括氯代嗜氮酮类化合物 chaetoviridine E (15)、Chaetomugilin S (16)、chaetomugilin A (17)、chaetomugilin Q (18)、chaetomugilin O (19)、chaetomugilin F (21)、chaetomugilin J (22)、chaetovorodin I (23)、chaetoviridin J (24) 和 chaephilone D (25) 和聚酮酯类化合物 chaetoglobosin X (20)。运用 ECD 计算手段确定了新化合物的绝对构型。其中,新化合物 chaetofanixin E (14) 的结构为具有高度刚性的 6/6/5/3/5 五环系统,该结构在天然产物中首次发现。

对树舌灵芝和深海真菌 *Chaetomium globosum* YP-106 分离得到的次级代谢产物进行了促血管生成活性评价,以斑马鱼为生物模型,通过观察其经过 PTK787 给药后使受损血管重新生长的数量来评价其促斑马鱼血管生成活性。结果表明,羊毛甾烷型三萜化合物 1-6 均有血管生成活性,且浓度越高作用越明显。在 100μg/ml 的浓度下,新化合物 1 和 2 与阳性药人参皂苷的活性作用相平甚至更好。氯代嗜氮酮类化合物 9-14、16-18 和 25 都以剂量依赖性方式显示出显著的促斑马鱼血管生成活性。且 80μg/mL 时,化合物 17 的效果最明显。

此外,高含氮、卤代是海洋微生物代谢产物区别于陆地微生物的显著化学特征,而氮和卤是两种成药性高的重要因素。为从深海真菌中挖掘更多药用价值,对从 *Chaetomium globosum* YP-106 分离的化合物采用 CCK-8 法进行了 20 种肿瘤细胞抑制活

性筛选,结果表明化合物 **18** 对人甲状腺癌细胞有微弱的抑制活性,其 IC_{50} 为 $13.570\mu M$ 。化合物 **19** 对人甲状腺癌细胞和人横纹肌肉瘤细胞也有微弱的抑制活性, IC_{50} 分别为 $9.289\mu M$ 和 $13.660\mu M$ 。还采用纸片扩散法对收集得到的 10 种植物致病菌进行抑菌活性评价,结果显示化合物 **20** 对芒果镰刀菌、小麦根腐病菌、苹果轮纹病菌、小麦纹枯病菌表现出微弱的抑菌活性。

综上,本文为寻找高效低毒的促血管生成药物先导化合物,对两株真菌的次生代谢产物进行了系统研究,共分离鉴定了 25 个化合物,包括 2 新的羊毛甾烷型三萜类化合物、6 个新的氯代嗜氮酮类和 17 个相关已知物,这两类化合物在通过斑马鱼评价血管新生活性中表现出显著的促血管生成作用。使得羊毛甾烷型三萜类化合物和氯代嗜氮酮类化合物有可能成为治疗缺血性心血管疾病的先导化合物,为抗心血管疾病药物的开发提供有效资源。

参考文献

- 樊亚琴. 红树林耐酸真菌 *Penicillium camemberti* OUCMDZ-1492 抗 H1N1 活性产物研究[D]. 中国海洋大学, 2013.
- 梅显贵. 多策略发掘海洋异壁放线菌 WH1-2216-6 活性次级代谢产物研究[D]. 中国海洋大学, 2017.
- 朱伟明. 海洋天然产物的高效发现与成药性研究[J]. 中草药, 2019, 50(23): 5645-5652.
- Amen Y M, Zhu Q, Afifi M S, et al. New cytotoxic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lingzhi*[J]. *Phytochemistry Letters*, 2016, 17: 64-70.
- Bills G F, Gloer J B. Biologically active secondary metabolites from the fungi[J]. *Microbiology spectrum*, 2016, 4(6): 4-6.
- c Ooi V E, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes[J]. *Current medicinal chemistry*, 2000, 7(7): 715-729.
- Chatterjee P, Pezzuto J M, Kouzi S A. Glucosidation of betulinic acid by *Cunninghamella species*[J]. *Journal of natural products*, 1999, 62(5): 761-763.
- Chen S, Wang J, Lin X, et al. Chrysamides A–C, three dimeric nitrophenyl trans-epoxyamides produced by the deep-sea-derived fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO41001[J]. *Organic letters*, 2016, 18(15): 3650-3653.
- Cragg G M, Newman D J. Natural products: a continuing source of novel drug leads[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, 1830(6): 3670-3695.
- Deshmukh S K, Prakash V, Ranjan N. Marine fungi: A source of potential anticancer compounds[J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 8: 2536.
- Fan Y Q, Li P H, Chao Y X, et al. Alkaloids with cardiovascular effects from the marine-derived fungus *Penicillium expansum* Y32[J]. *Marine drugs*, 2015, 13(10): 6489-6504.
- Fang Q H, Zhong J J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(7): 769-774.
- Hawksworth D L, Lücking R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species[J]. *Microbiology spectrum*, 2017, 5(4): 5-10.
- Hawksworth D L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation[J]. *Mycological research*, 1991, 95(6): 641-655.
- Hawksworth D L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited[J]. *Mycological research*, 2001, 105(12): 1422-1432.
- Jamieson A J, Fujii T, Mayor D J, et al. Hadal trenches: the ecology of the deepest places on Earth[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2010, 25(3): 190-197.
- Ji Z, Tang Q, Hao R, et al. Induction of apoptosis in the SW620 colon carcinoma cell line by triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* through activation of caspase-3[J]. *Oncology Letters*, 2011, 2(3): 565-570.
- Kawagishi H. Biologically Functional compounds from mushroom-forming fungi[M]. *Natural Products and Drug Discovery*. Elsevier, 2018: 309-326.
- Kumar T K A, Crow J A, Wennblom T J, et al. An ontology of fungal subcellular traits[J]. *American Journal of Botany*, 2011, 98(9): 1504-1510.

- Liu D, Zhu H, Zheng L, et al. Efficient transformation of the white jelly mushroom *Tremella fuciformis* (Tremellomycetes) and its companion fungus *Annulohyphoxylon stygium* (Ascomycetes) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2019, 21(9).
- Liu L Y, Yan Z, Kang J, et al. Three new triterpenoids from *Ganoderma theaecolum*[J]. Journal of asian natural Products research, 2017, 19(9): 847-853.
- Mansoor T A, Hong J, Lee C O, et al. Cytotoxic sterol derivatives from a marine sponge *Homaxinella* sp[J]. Journal of natural products, 2005, 68(3): 331-336.
- Muroga Y, Yamada T, Numata A, et al. 11- and 4'- epimers of chaetomugilin A, novel cytostatic metabolites from marine fish- derived fungus *Chaetomium globosum*[J]. Helvetica Chimica Acta, 2010, 93(3): 542-549.
- Muroga Y, Yamada T, Numata A, et al. Chaetomugilins I-O, new potent cytotoxic metabolites from a marine-fish-derived *Chaetomium* species. Stereochemistry and biological activities[J]. Tetrahedron, 2009, 65(36): 7580-7586.
- Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. Journal of natural products, 2020, 83(3): 770-803.
- Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010[J]. Journal of natural products, 2012, 75(3): 311-335.
- Niu S, Xia J M, Li Z, et al. Aphidicolin chemistry of the deep-sea-derived fungus *Botryotinia fuckeliana* MCCC 3A00494[J]. Journal of natural products, 2019, 82(8): 2307-2331.
- Niu S, Xie C L, Xia J M, et al. Botryotins A-H, tetracyclic diterpenoids representing three carbon skeletons from a deep-sea-derived *Botryotinia fuckeliana*[J]. Organic letters, 2019, 22(2): 580-583.
- O'Connor E, Owens R A, Doyle S, et al. Proteomic investigation of interhyphal interactions between strains of *Agaricus bisporus*[J]. Fungal Biology, 2020, 124(6): 579-591.
- Pennone V, Dygico K L, Coffey A, et al. Effectiveness of current hygiene practices on minimization of *Listeria monocytogenes* in different mushroom production-related environments[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(7): 3456-3468.
- Phillips K M, Rasor A S. A mixed mushroom control material to facilitate inter-laboratory harmonization of mushroom composition analyses[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2016, 48: 48-66.
- Phonkerd N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, et al. Bis-spiro-azaphilones and azaphilones from the fungi *Chaetomium cochliodes* VTh01 and *C. cochliodes* CTh05[J]. Tetrahedron, 2008, 64(40): 9636-9645.
- Seo H W, Hung T M, Na M K, et al. Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity[J]. Archives of Pharmacal Research, 2009, 32(11): 1573-1579.
- Simmons T L, Andrianasolo E, McPhail K, et al. Marine natural products as anticancer drugs[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2005, 4(2): 333-342.
- Tsivileva O M, Shaternikov A N, Nikitina V E. Bacteria of the azospirillum genus for the optimization of the artificial culture of xylotrophic mushrooms[J]. Biotekhnologiya, 2020, 36: 16-25.
- Tsivileva O, Perfileva A. Selenium compounds biotransformed by mushrooms: not only dietary sources, but also toxicity mediators[J]. Current Nutrition & Food Science, 2017, 13(2): 82-96.
- Wang D, Zhang Y, Li X, et al. Potential allelopathic azaphilones produced by the endophytic *Chaetomium globosum* TY1 inhabited in *Ginkgo biloba* using the one strain- many compounds method[J]. Natural

- product research, 2017, 31(6): 724-728.
- Wang J, He W, Huang X, et al. Antifungal new oxepine-containing alkaloids and xanthenes from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor* SCSIO 05879[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2016, 64(14): 2910-2916.
- Wang Y, Xu L, Ren W, et al. Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*[J]. Phytomedicine, 2012, 19(3-4): 364-368.
- Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2002, 60(3): 258-274.
- Webster J. Anamorphic fungi (nematophagous and aquatic forms) [J]. Introduction to fungi, 2007: 673-701.
- Weng C J, Fang P S, Chen D H, et al. Anti-invasive effect of a rare mushroom, *Ganoderma colossum*, on human hepatoma cells[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2010, 58(13): 7657-7663.
- Wermuth C G. Designing prodrugs and bioprecursors[M]. The practice of medicinal chemistry. Academic Press, 2008: 721-746.
- Xu Y, Zhu A, Cao F, et al. Diketopiperazine alkaloids and steroids from a marine-derived *Pleosporales* sp. fungus[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2018, 54(4): 818-820.
- Yasuhide M, Yamada T, Numata A, et al. Chaetomugilins, new selectively cytotoxic metabolites, produced by a marine fish-derived *Chaetomium species*[J]. The Journal of Antibiotics, 2008, 61(10): 615-622.
- Yoshikawa K, Nishimura N, Bando S, et al. New lanostanoids, elfvingic acids A–H, from the fruit body of *Elfvingia applanata*[J]. Journal of Natural products, 2002, 65(4): 548-552.
- Youn U J, Sripisut T, Park E J, et al. Determination of the absolute configuration of chaetoviridins and other bioactive azaphilones from the endophytic fungus *Chaetomium globosum*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015, 25(21): 4719-4723.
- Zain ul Arifeen M, Ma Y N, Xue Y R, et al. Deep-sea fungi could be the new arsenal for bioactive molecules[J]. Marine drugs, 2019, 18(1): 9.
- Zang H, Liu W, Cheng Y, et al. Bioremediation of historically chlorimuron-ethyl-contaminated soil by co-culture chlorimuron-ethyl-degrading bacteria combined with the spent mushroom substrate[J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 369.
- Zhang W R, Liu S R, Kuang Y B, et al. Development of a novel spawn (block spawn) of an edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, in liquid culture and its cultivation evaluation[J]. Mycobiology, 2019, 47(1): 97-104.
- Zhang X, Xu W, Liu Y, et al. Metagenomics reveals microbial diversity and metabolic potentials of seawater and surface sediment from a hadal biosphere at the Yap Trench[J]. Frontiers in microbiology, 2018: 2402.

附录

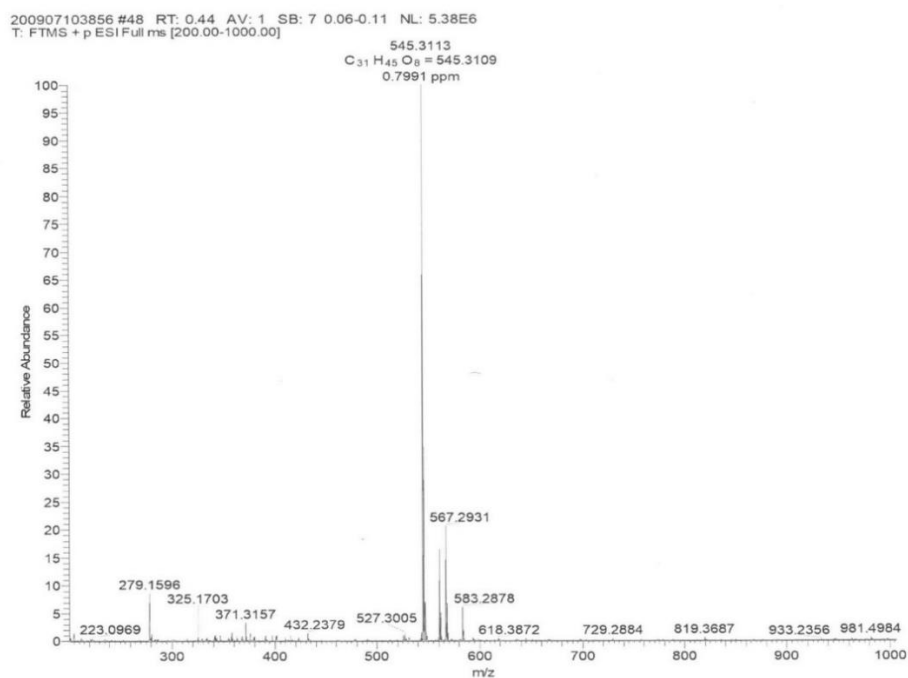


Figure A.1. HRESIMS spectrum of ganoderenicfy A (1)

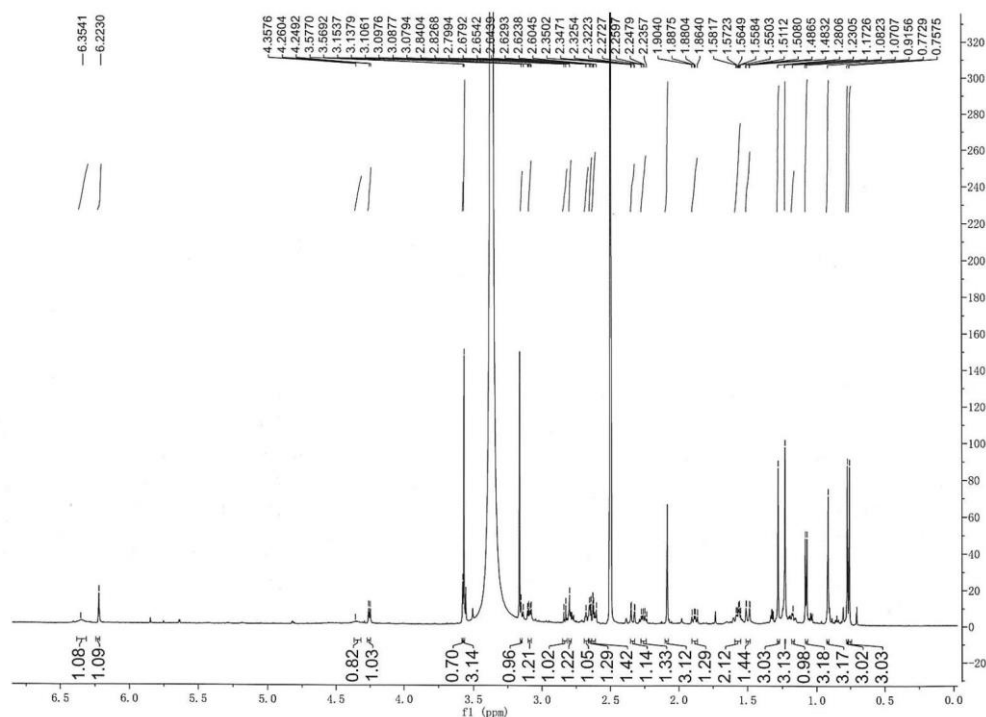


Figure A.2. ¹H-NMR spectrum of ganoderenicfy A (1) in DMSO-d₆

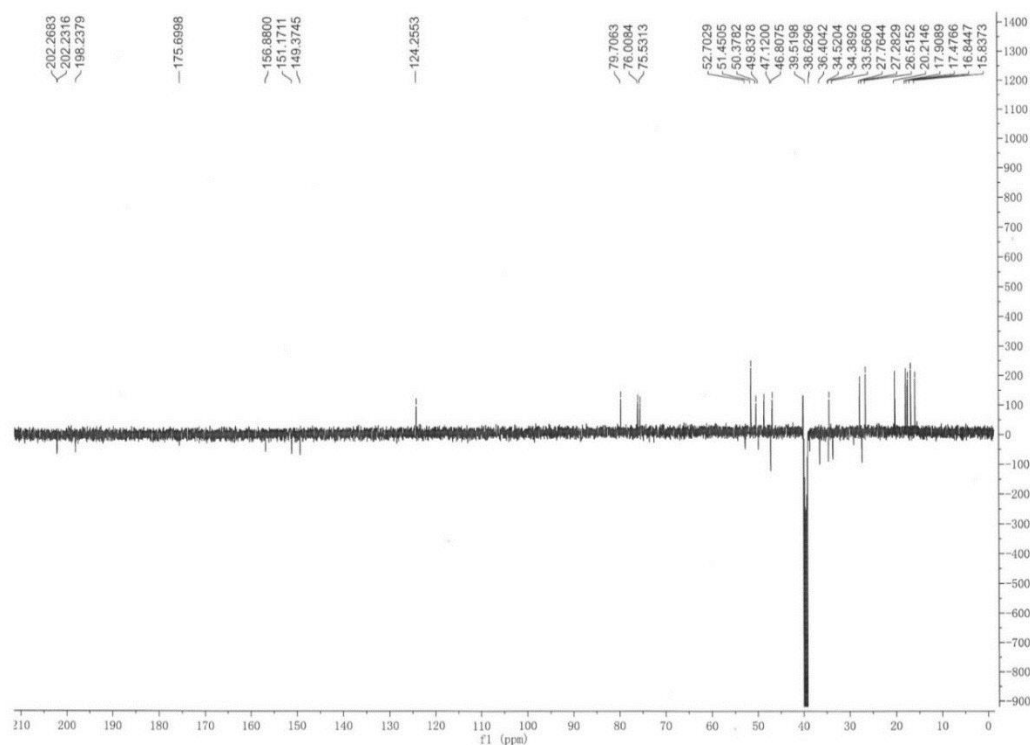


Figure A.3. ^{13}C -DEPTQ-NMR spectrum of ganoderenicfy A (1) in DMSO- d_6

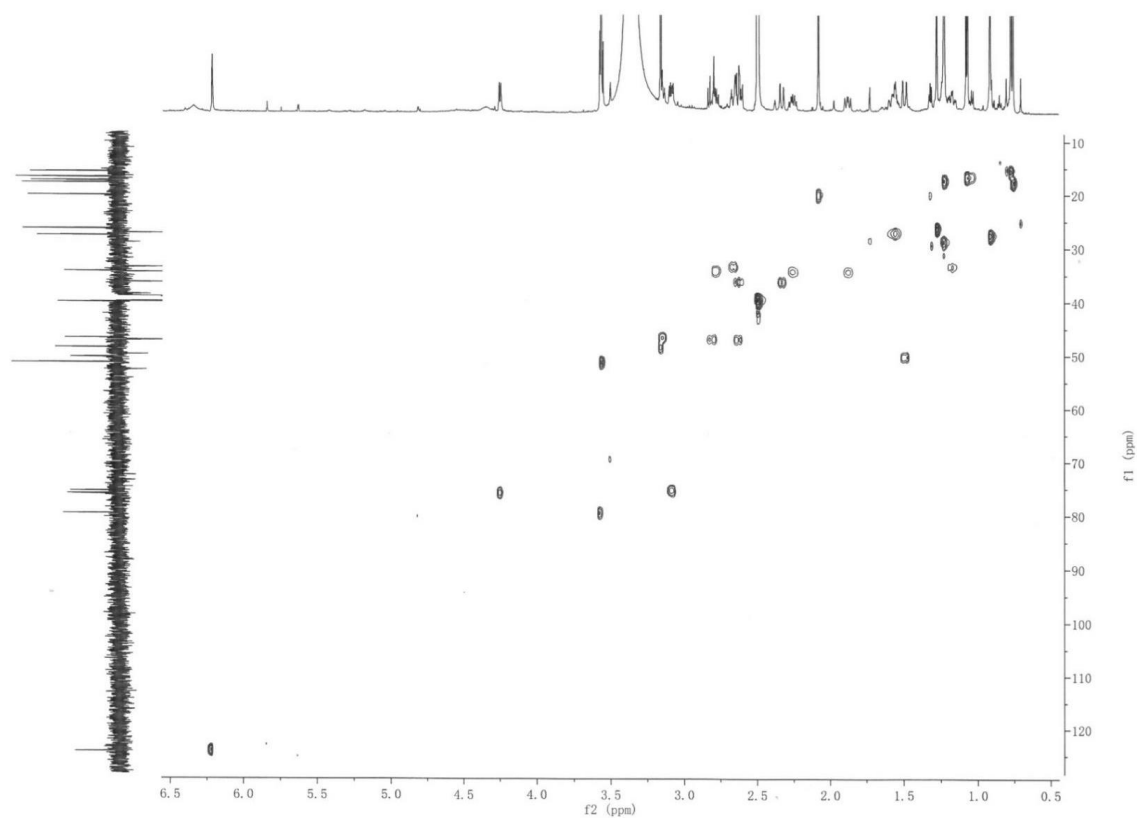


Figure A.4. HSQC spectrum of ganoderenicfy A (1) in DMSO- d_6

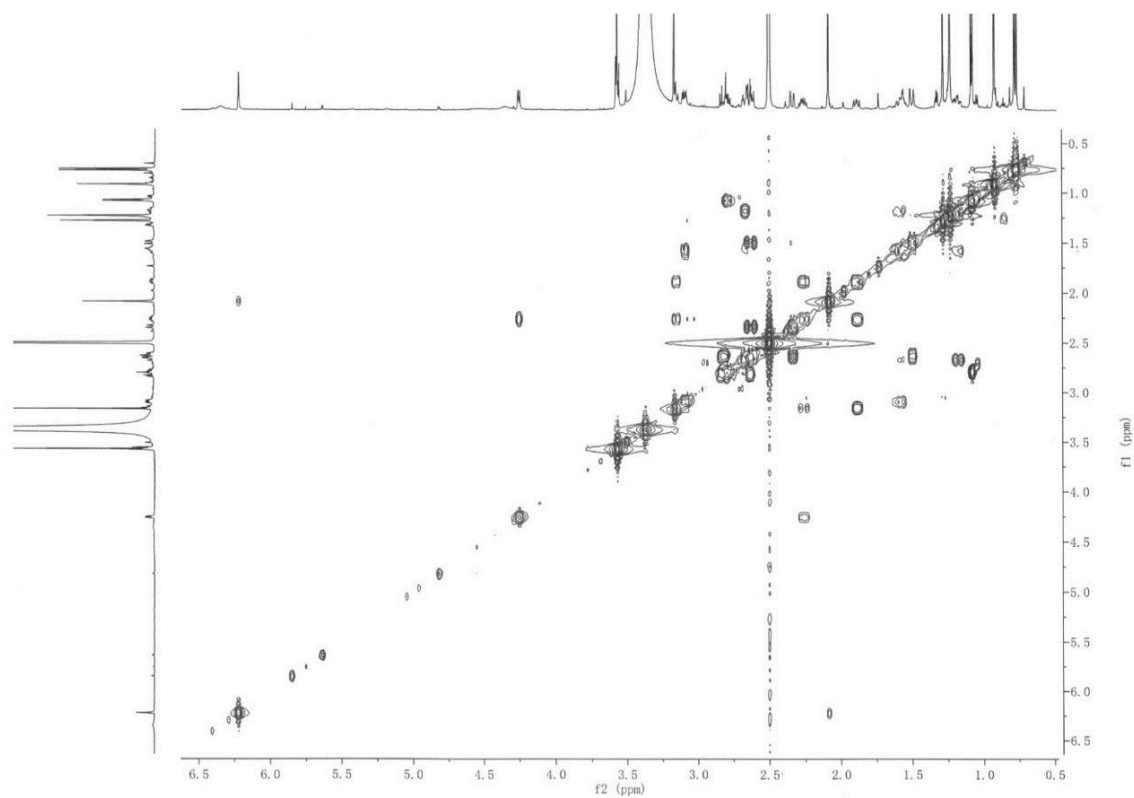


Figure A.5. ^1H - ^1H COSY spectrum of ganoderenicfy A (1) in DMSO- d_6

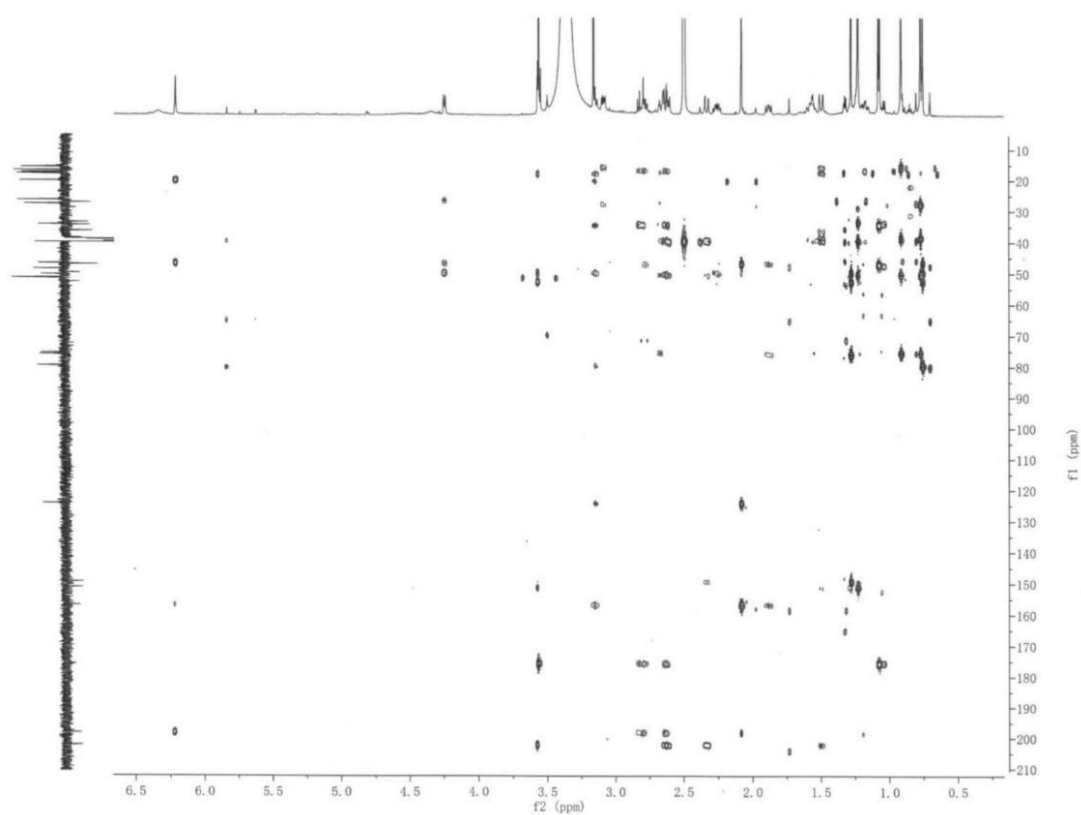


Figure A.6. HMBC spectrum of ganoderenicfy A (1) in DMSO- d_6

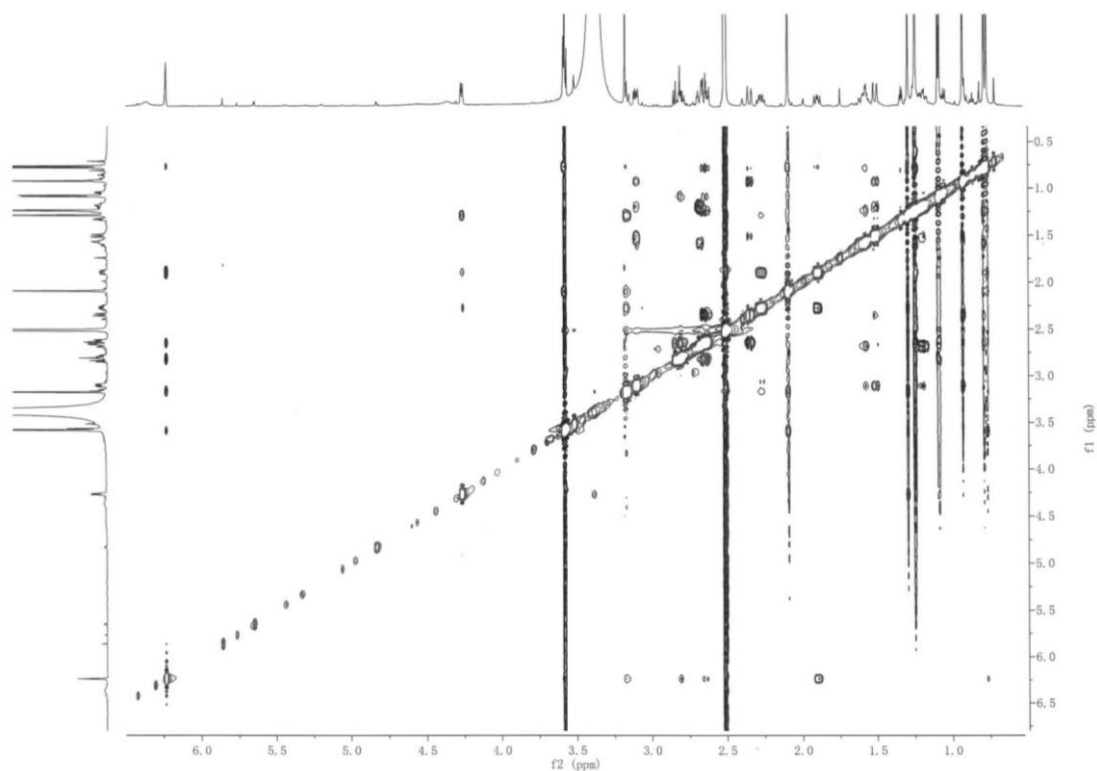


Figure A.7. NOESY spectrum of ganoderenicfy A (1) in DMSO- d_6

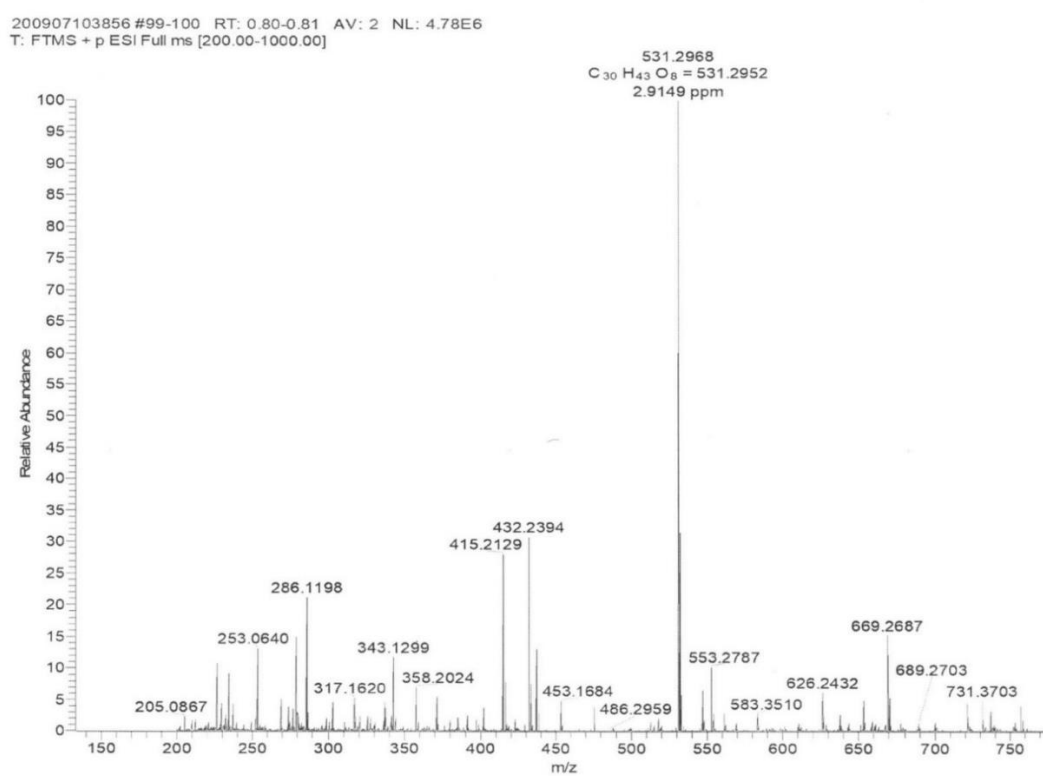


Figure A.8. HRESIMS spectrum of ganoderenicfy B (2)

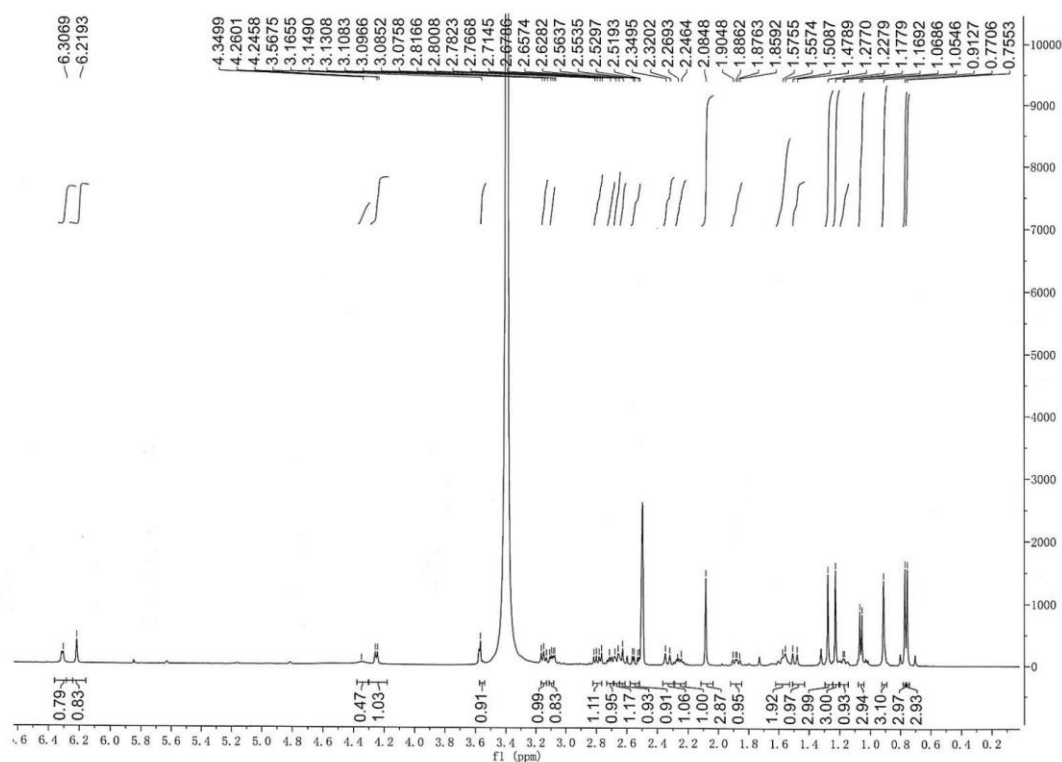


Figure A.9. ^1H -NMR spectrum of ganoderenicfy B (2) in $\text{DMSO}-d_6$

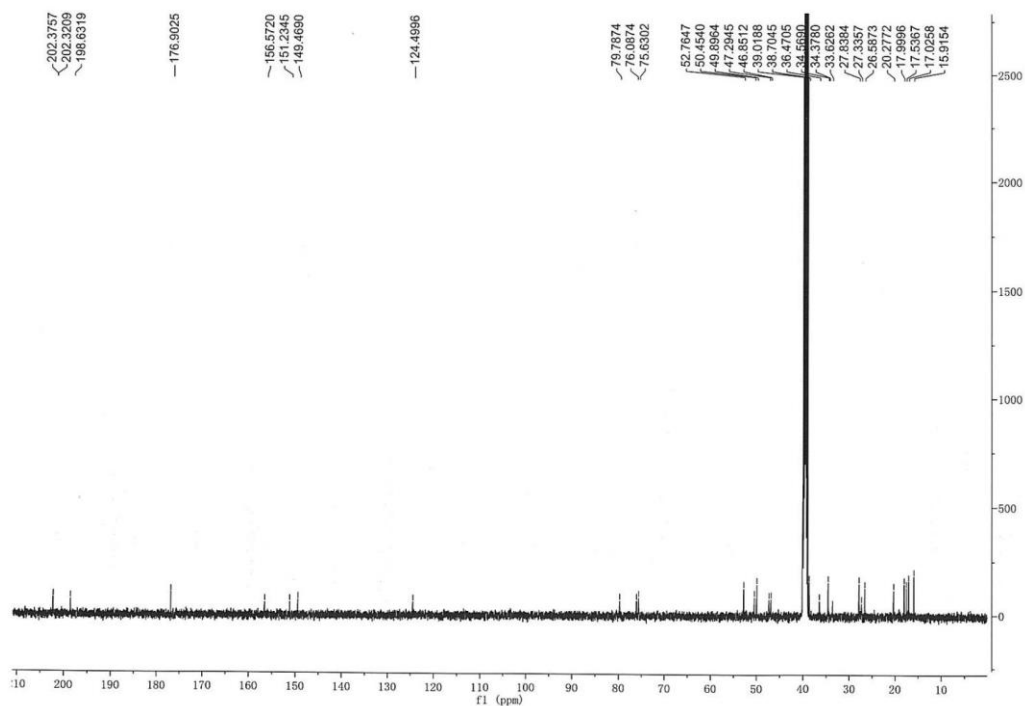


Figure A.10. ^{13}C NMR spectrum of ganoderenicfy B (2) in $\text{DMSO}-d_6$

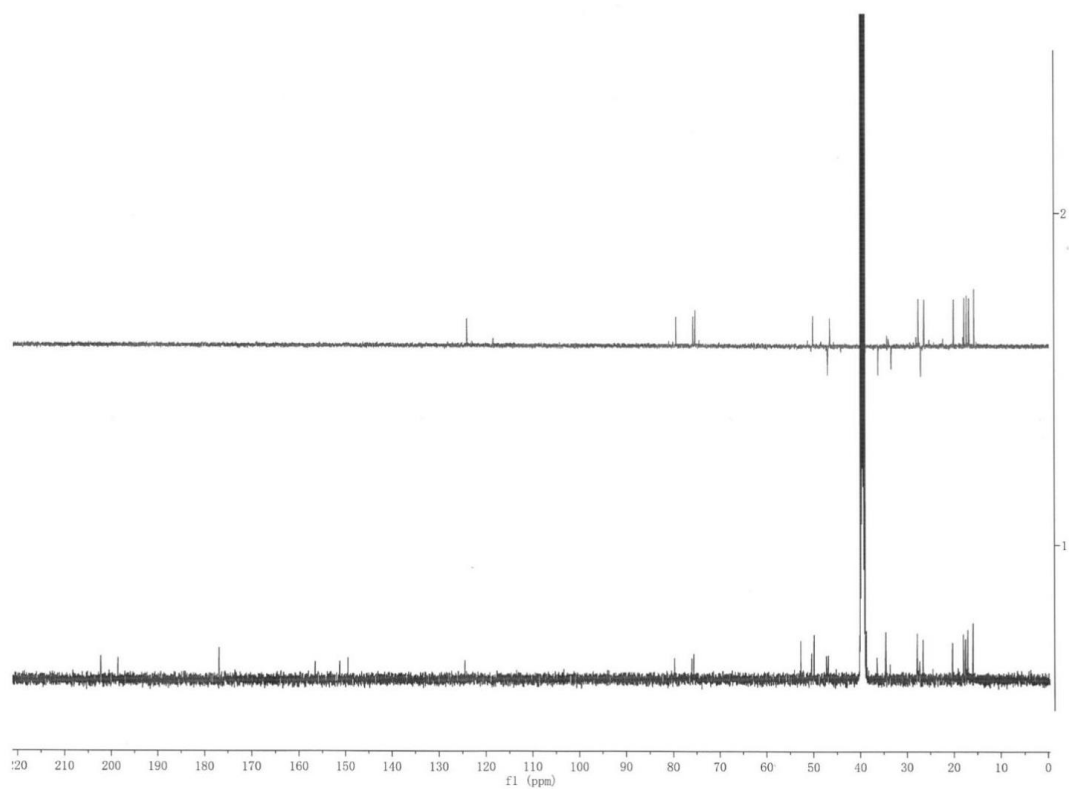


Figure A.11. DEPT spectrum of ganoderenicfy B (2) in DMSO- d_6

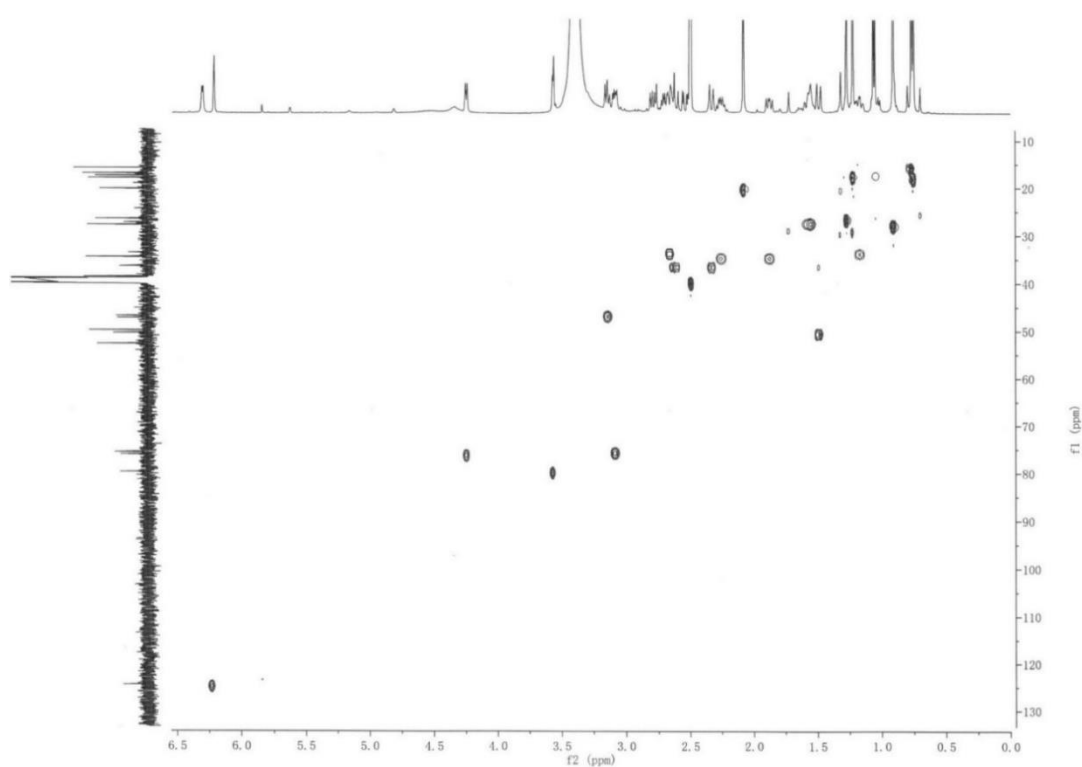


Figure A.12. HSQC spectrum of ganoderenicfy B (2) in DMSO- d_6

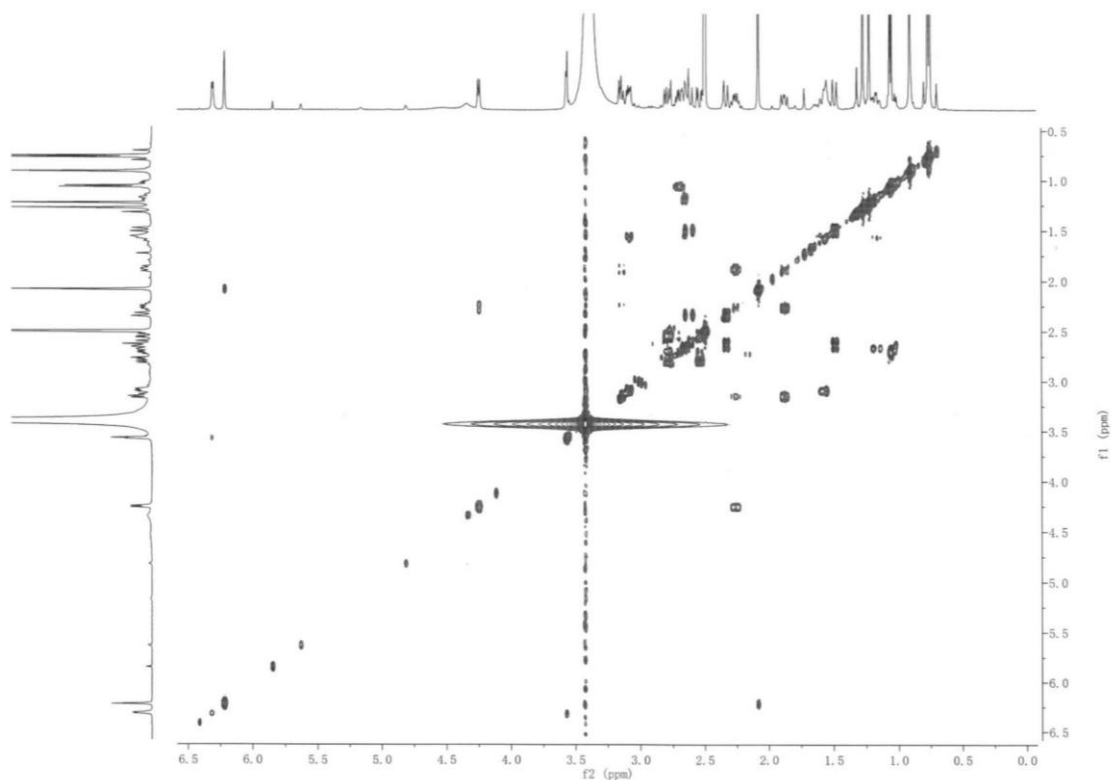


Figure A.13. ^1H - ^1H COSY spectrum of ganoderenicfy B (2) in $\text{DMSO}-d_6$

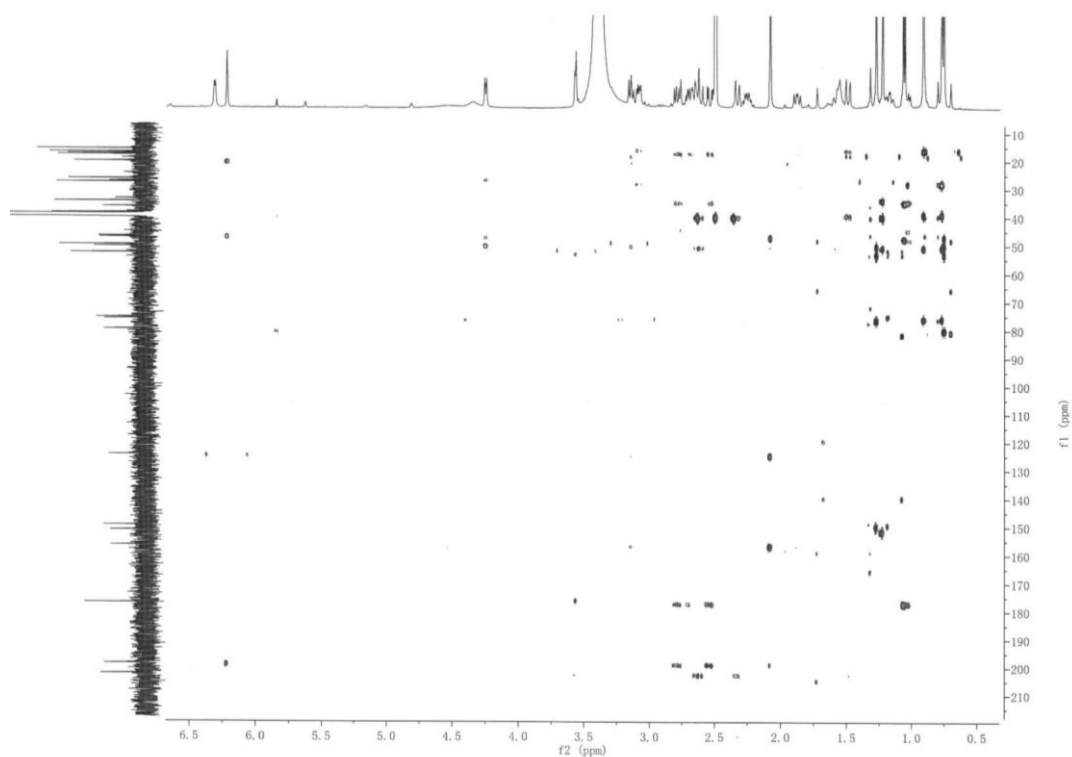


Figure A.14. HMBC spectrum of ganoderenicfy B (2) in $\text{DMSO}-d_6$

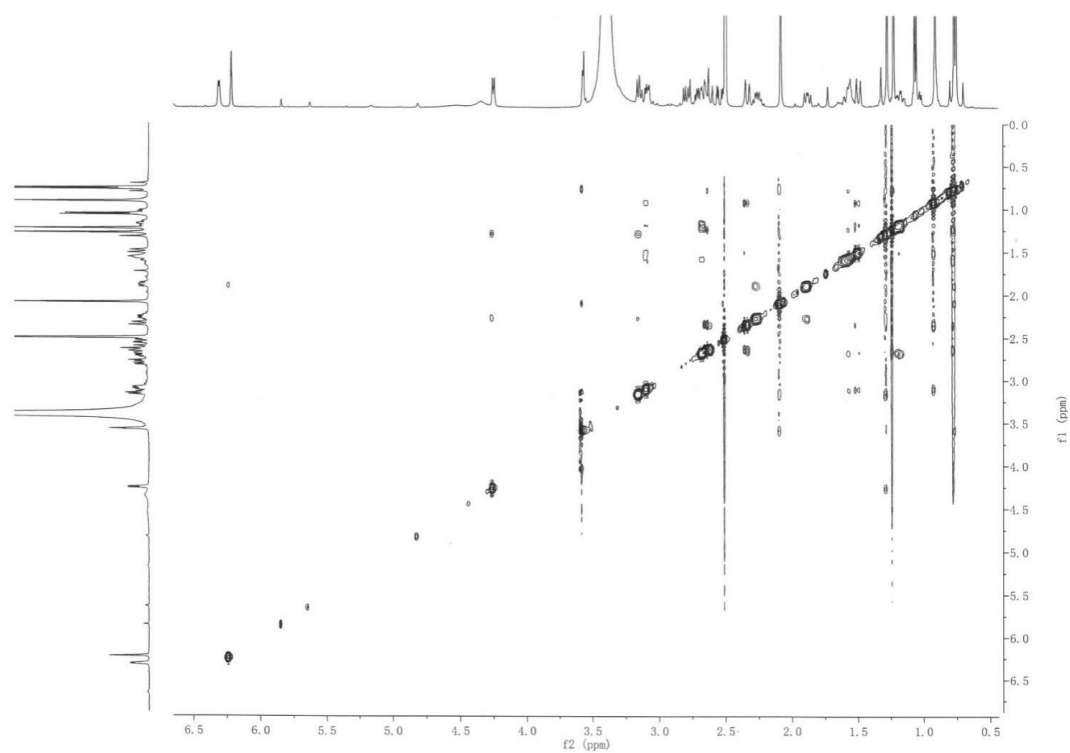


Figure A.15. NOESY spectrum of ganoderenicfy B (2) in DMSO- d_6

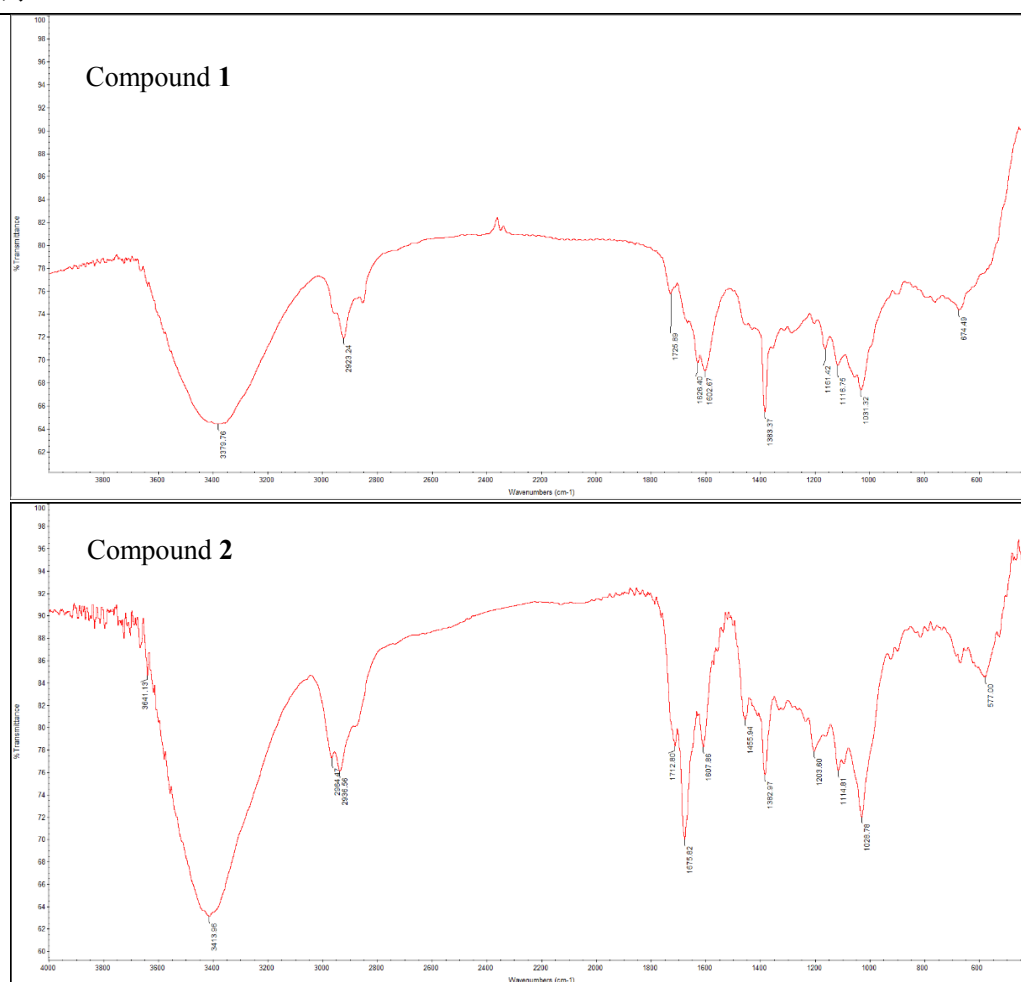


Figure A.16. The IR spectrum of compound 1 and 2.

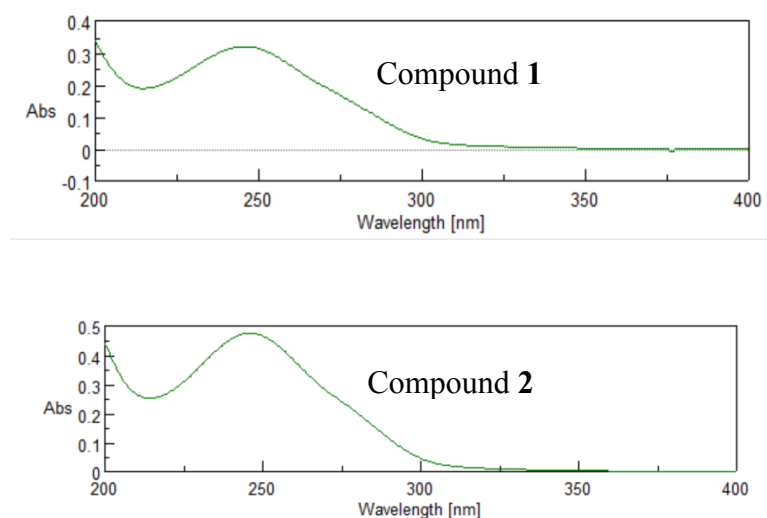


Figure A.17. The UV spectrum of compound 1 and 2.

20211210-Y-6-34 211213081116 #65 RT: 0.63 AV: 1 NL: 1.69E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

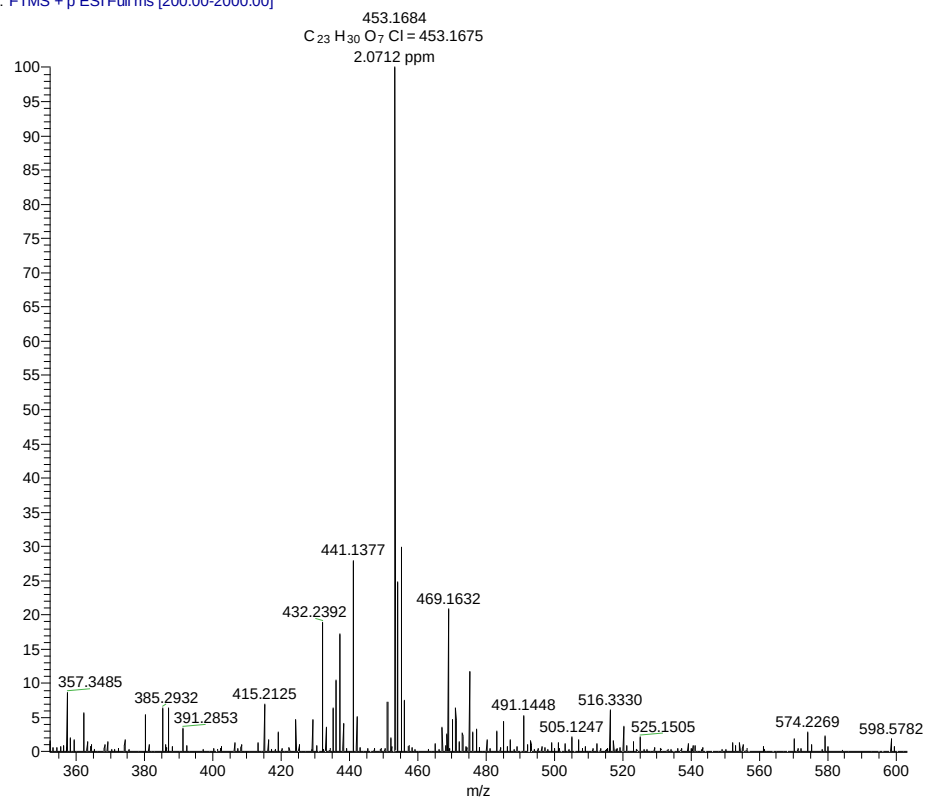


Figure A.18. HRESIMS spectrum of chaetoviridin L (9)

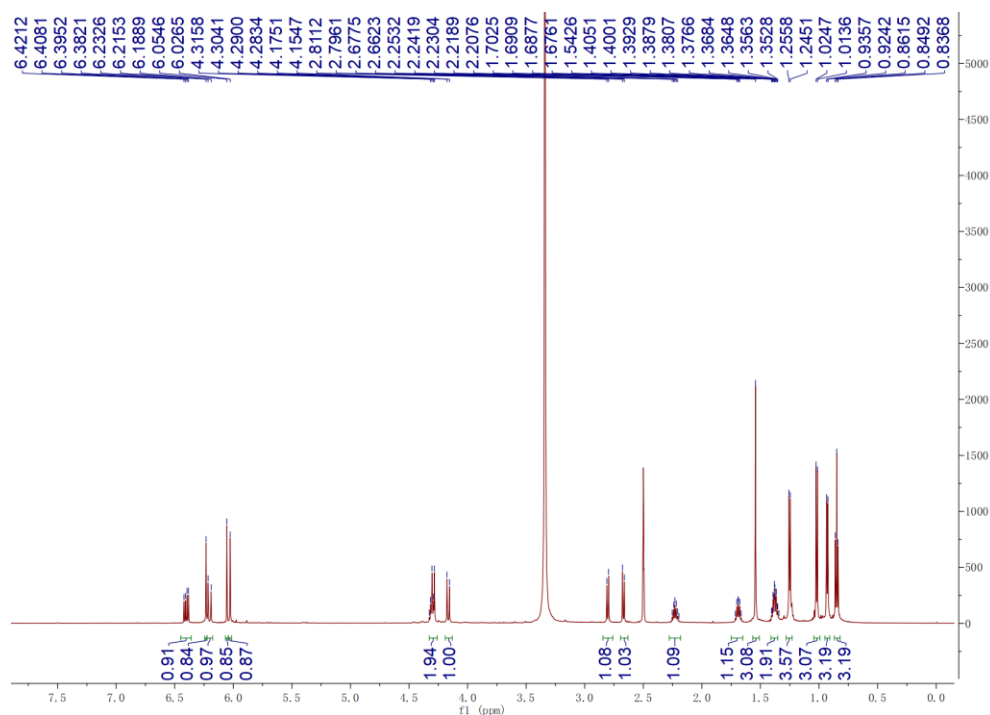


Figure A.19. ¹H-NMR spectrum of chaetoviridin L (9) in DMSO-*d*₆

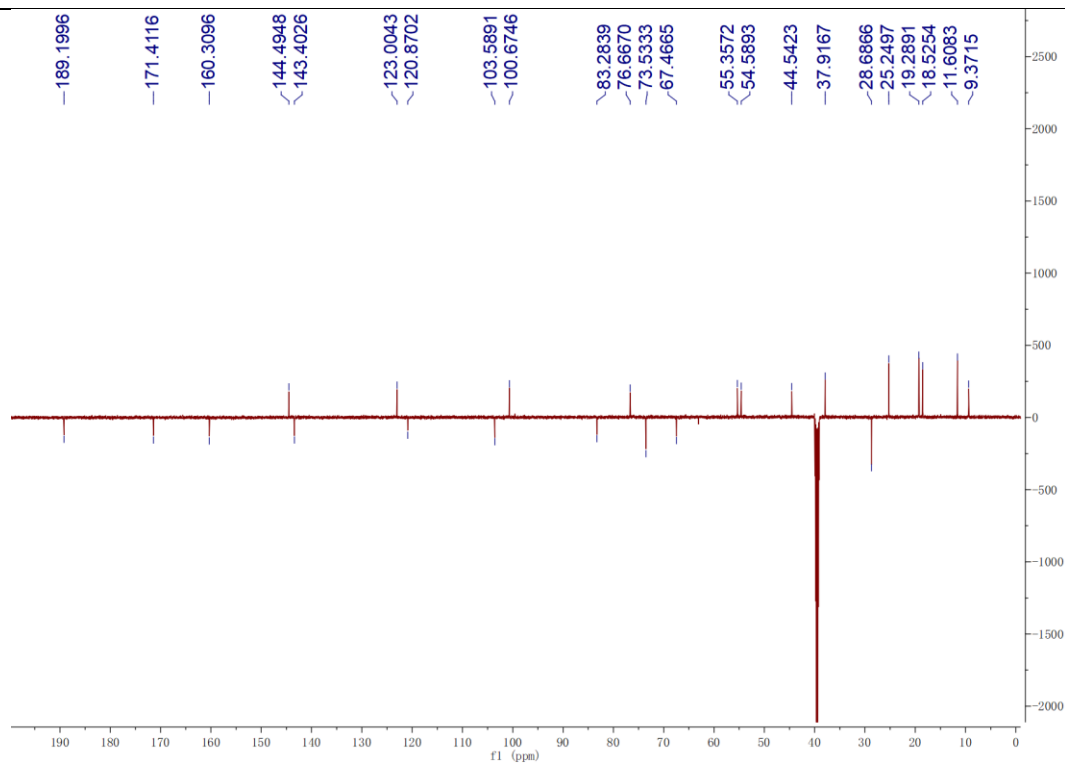


Figure A.20. ^{13}C - NMR spectrum of chaetoviridin L (**9**) in $\text{DMSO}-d_6$

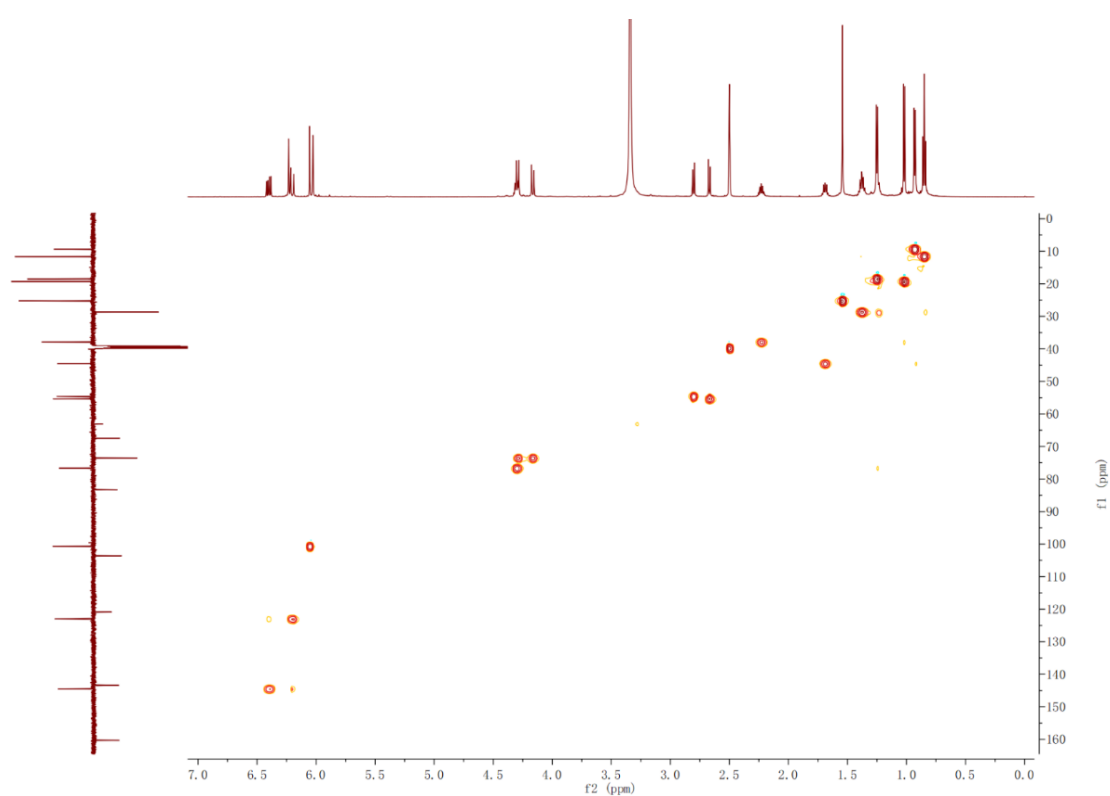


Figure A.21. HSQC spectrum of chaetoviridin L (**9**) in $\text{DMSO}-d_6$

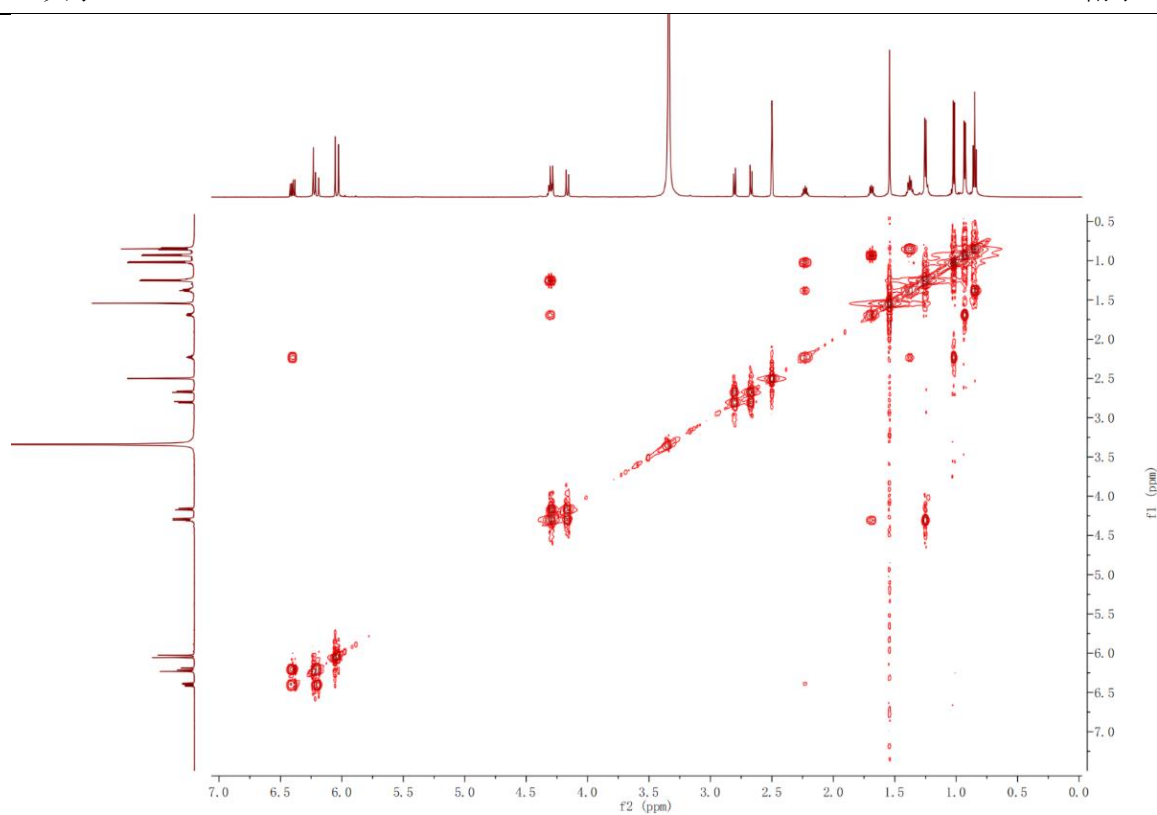


Figure A.22. ^1H - ^1H COSY spectrum of chaetoviridin L (**9**) in $\text{DMSO-}d_6$

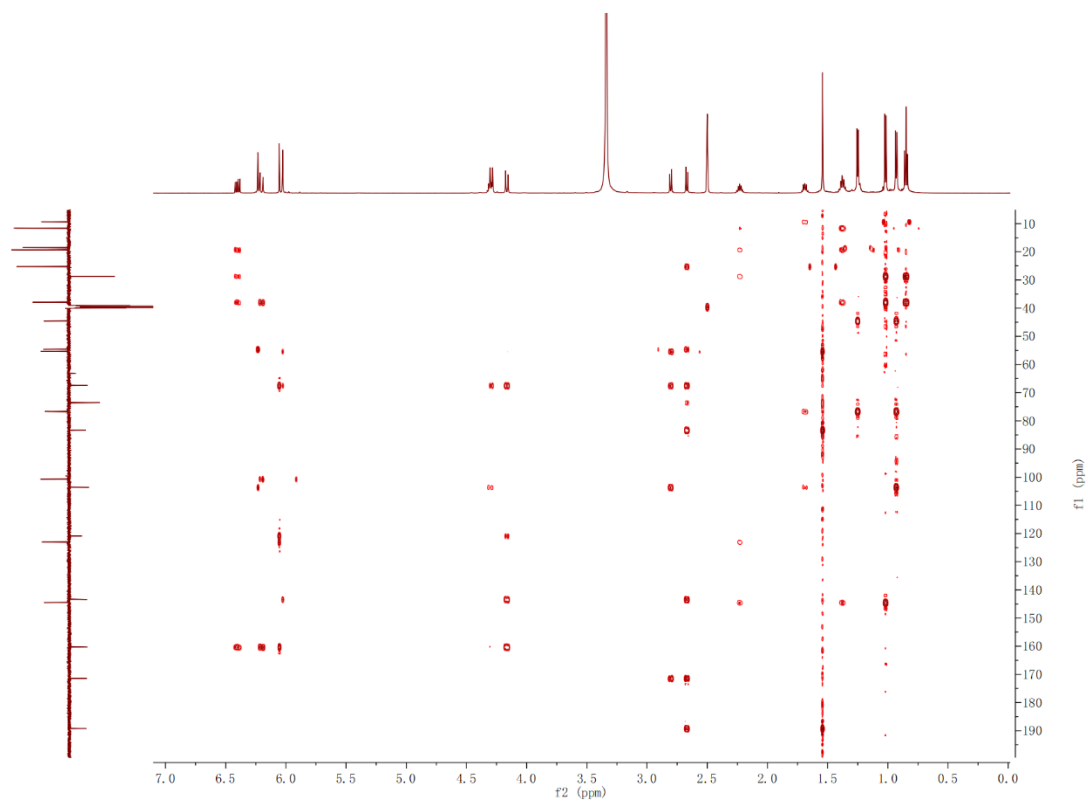


Figure A.23. HMBC spectrum of chaetoviridin L (**9**) in $\text{DMSO-}d_6$

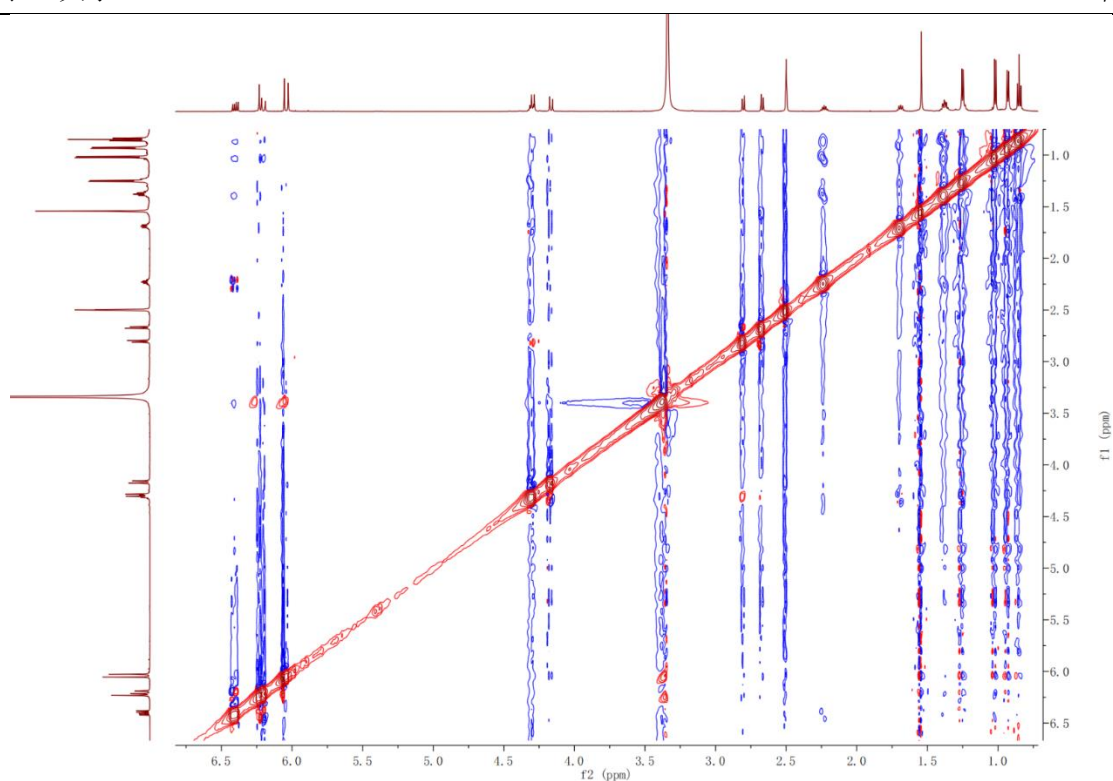


Figure A.24. NOESY spectrum of chaetoviridin L (**9**) in DMSO- d_6

20211125-Y-6-8_211125090036 #76 RT: 0.63 AV: 1 SB: 25 0.10-0.30 NL: 1.03E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

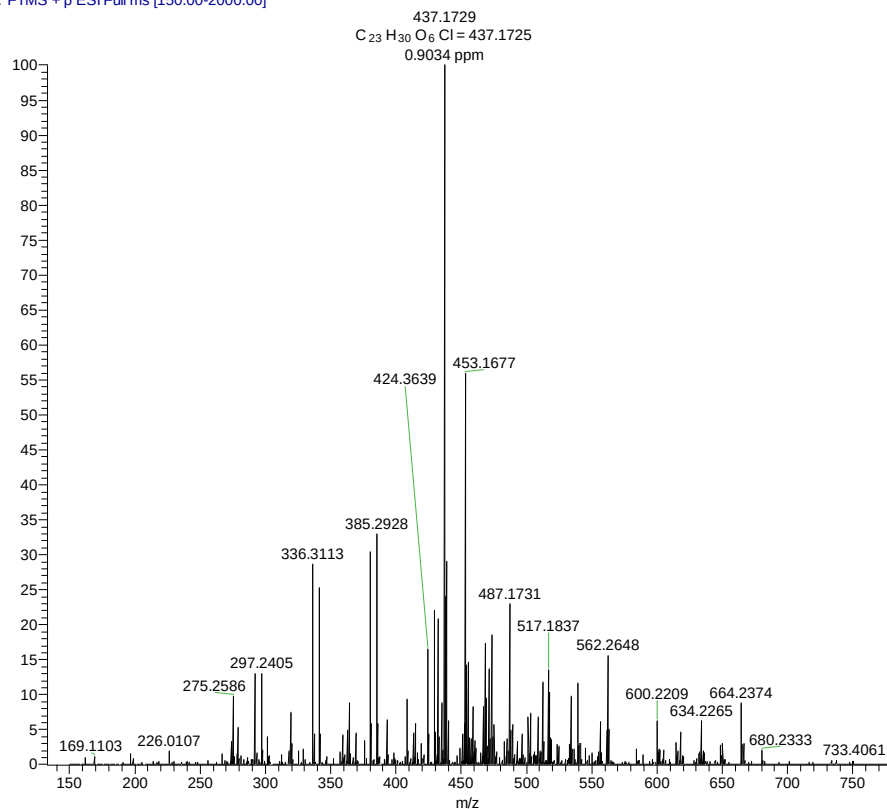


Figure A.25. HRESIMS spectrum of chaetofanixin A (**10**)

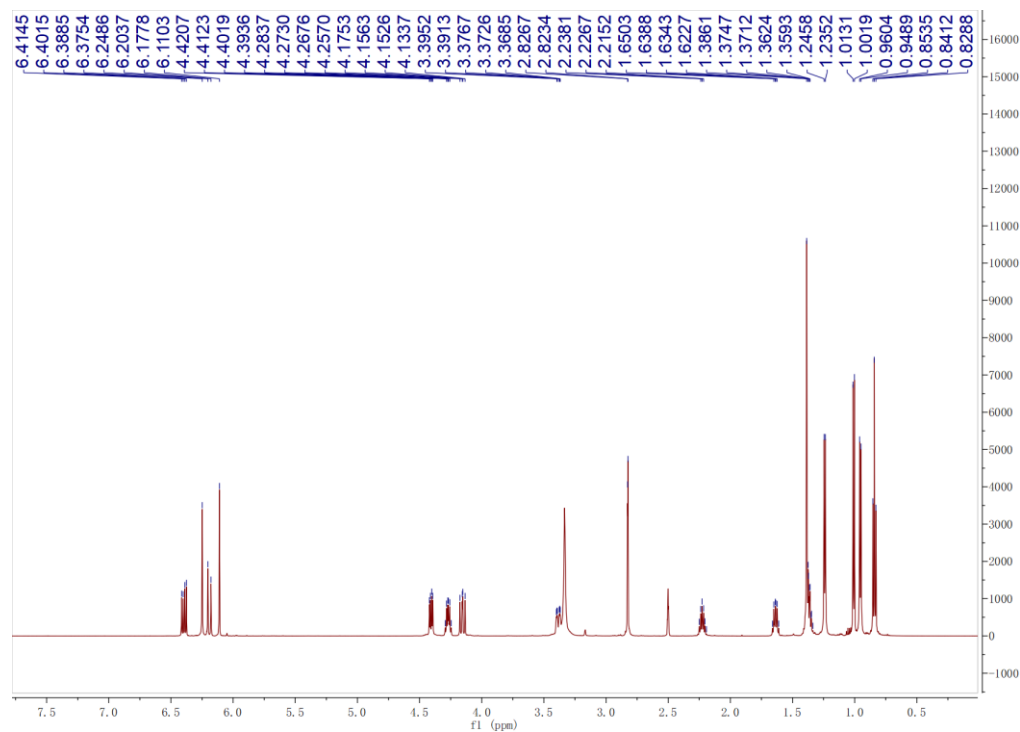


Figure A.26. ^1H -NMR spectrum of chaetofanixin A (10) in $\text{DMSO}-d_6$

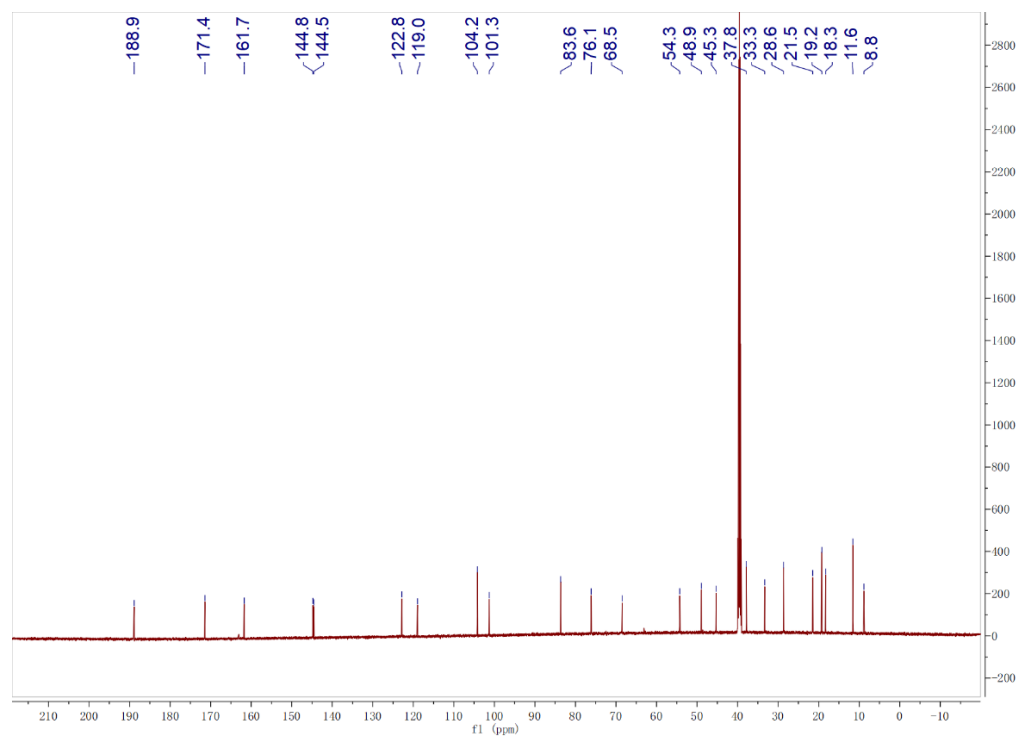


Figure A.27. ^{13}C -NMR spectrum of chaetofanixin A (10) in $\text{DMSO}-d_6$

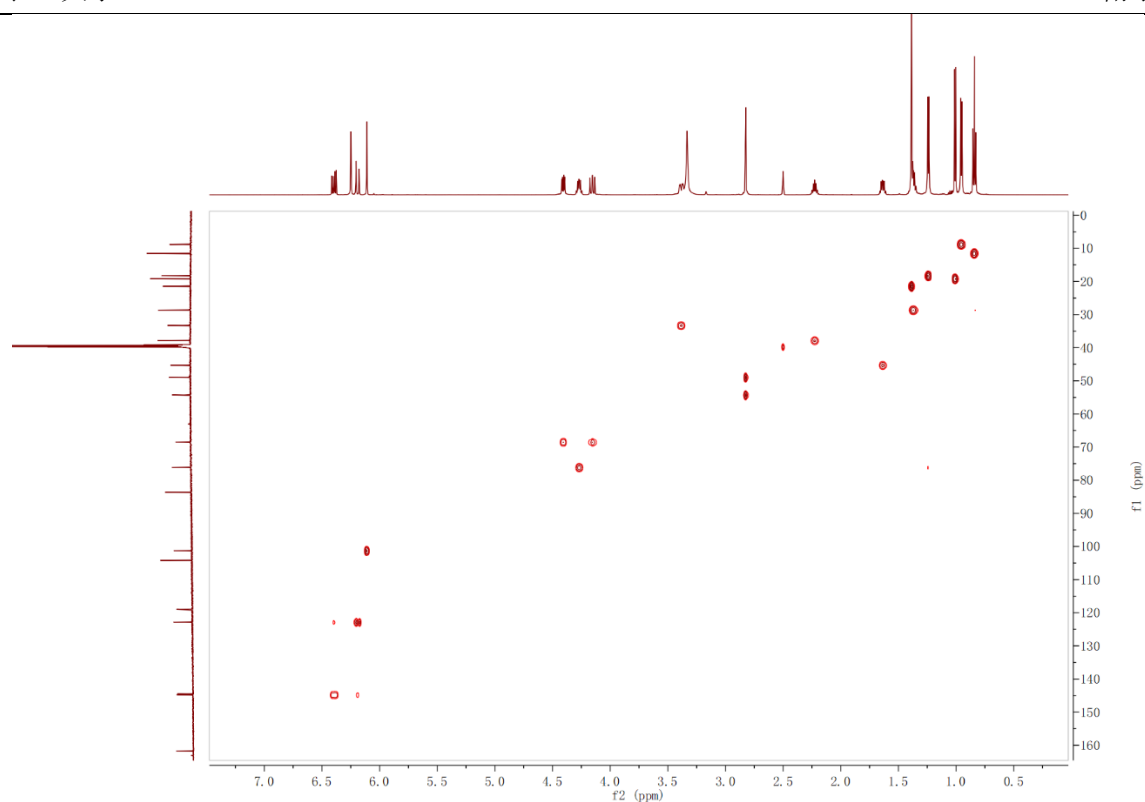


Figure A.28. HSQC spectrum of chaetofanixin A (**10**) in DMSO- d_6

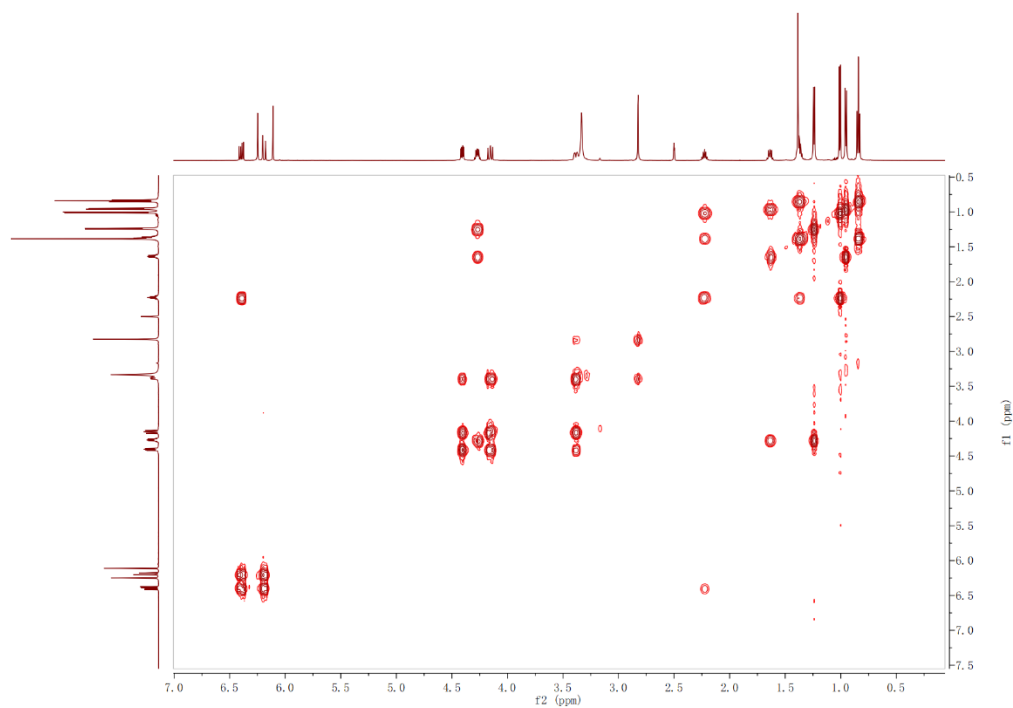


Figure A.29. ^1H - ^1H COSY spectrum of chaetofanixin A (**10**) in DMSO- d_6

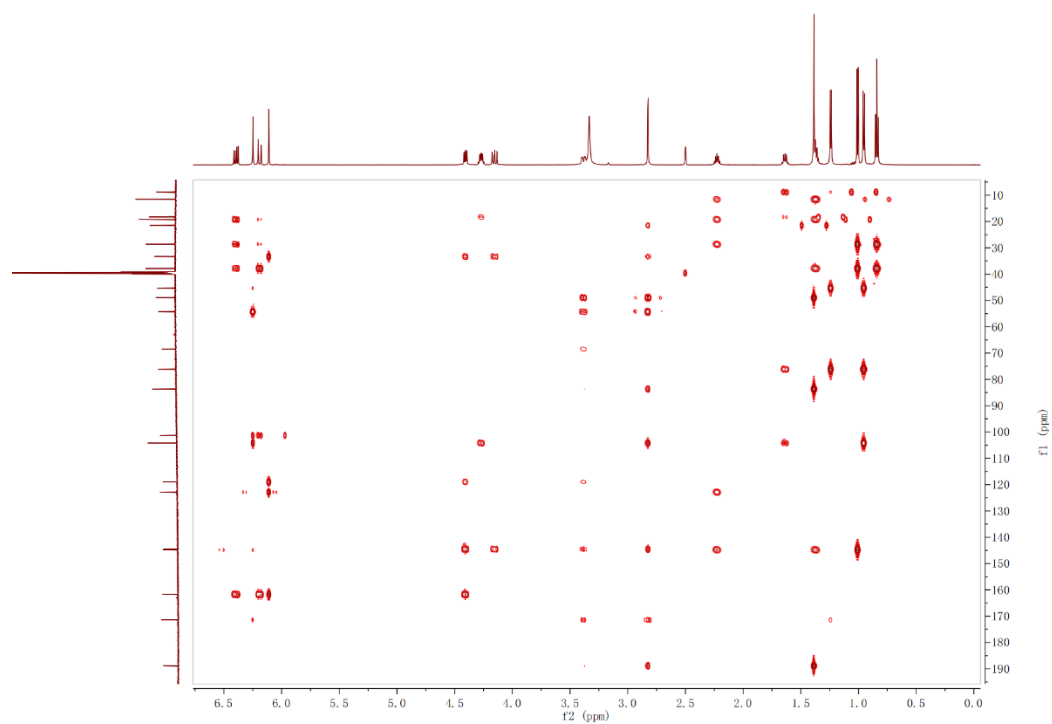


Figure A.30. HMBC spectrum of chaetofanixin A (**10**) in DMSO- d_6

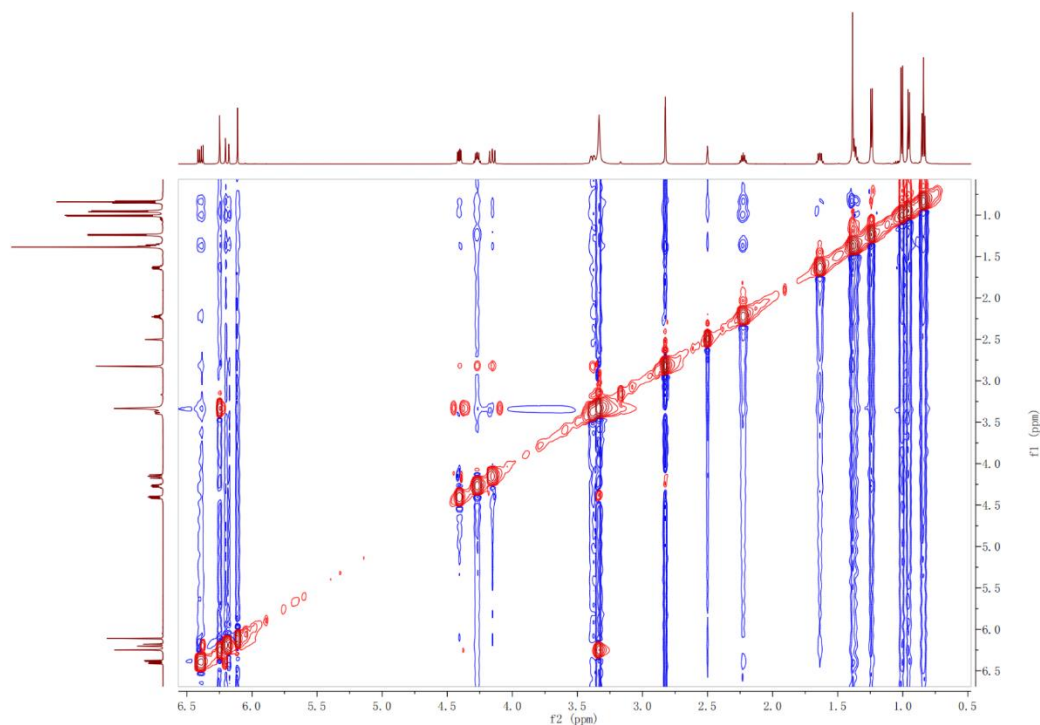


Figure A.31. NOEZY spectrum of chaetofanixin A (**10**) in DMSO- d_6

20211109-6Y-30_211109074313 #90-91 RT: 1.08-1.09 AV: 2 SB: 28 0.31-0.64 NL: 5.66E5
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-2000.00]

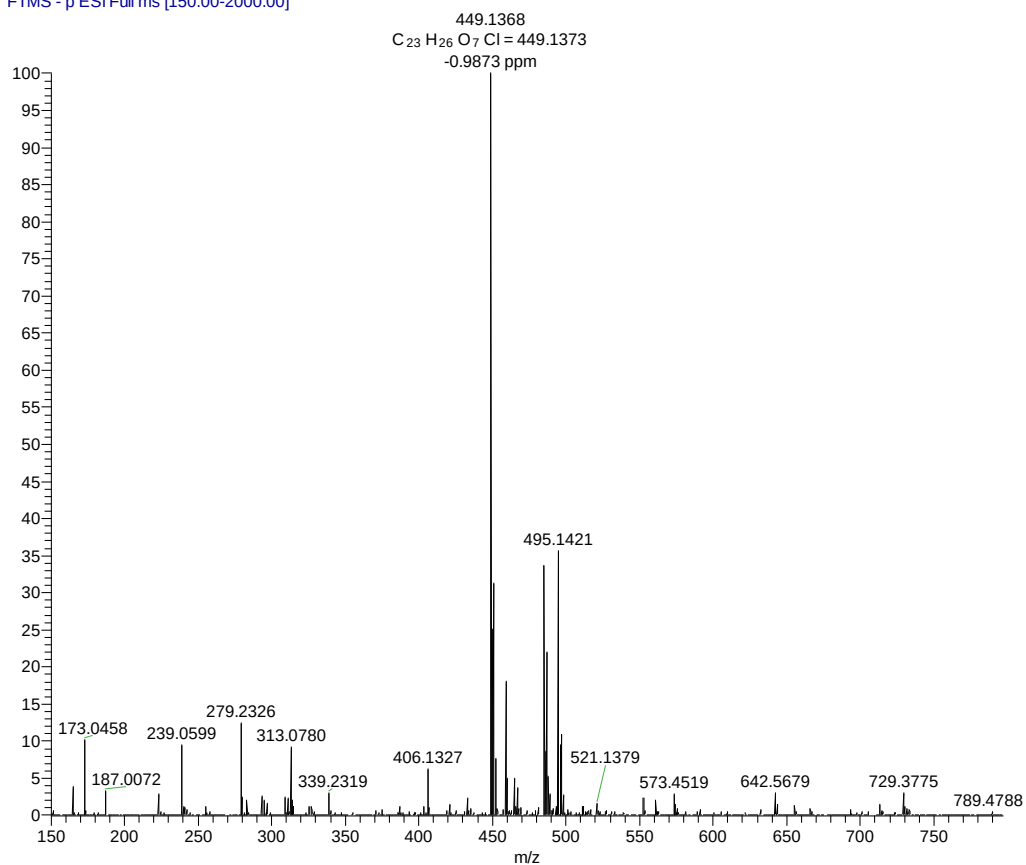


Figure A.32. HRESIMS spectrum of chaetofanixin B (11)

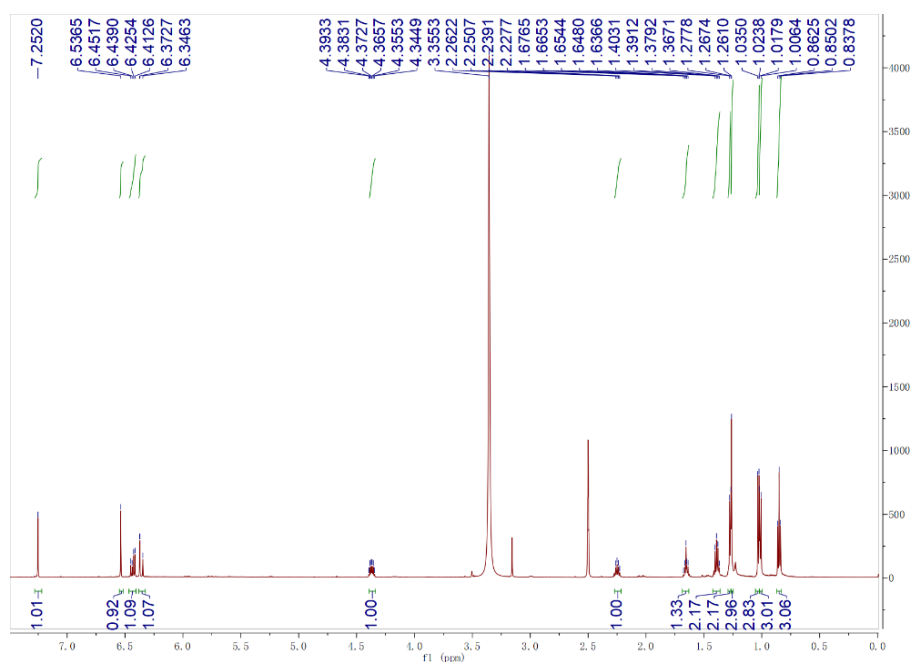


Figure A.33. 1H -NMR spectrum of chaetofanixin B (11) in $DMSO-d_6$

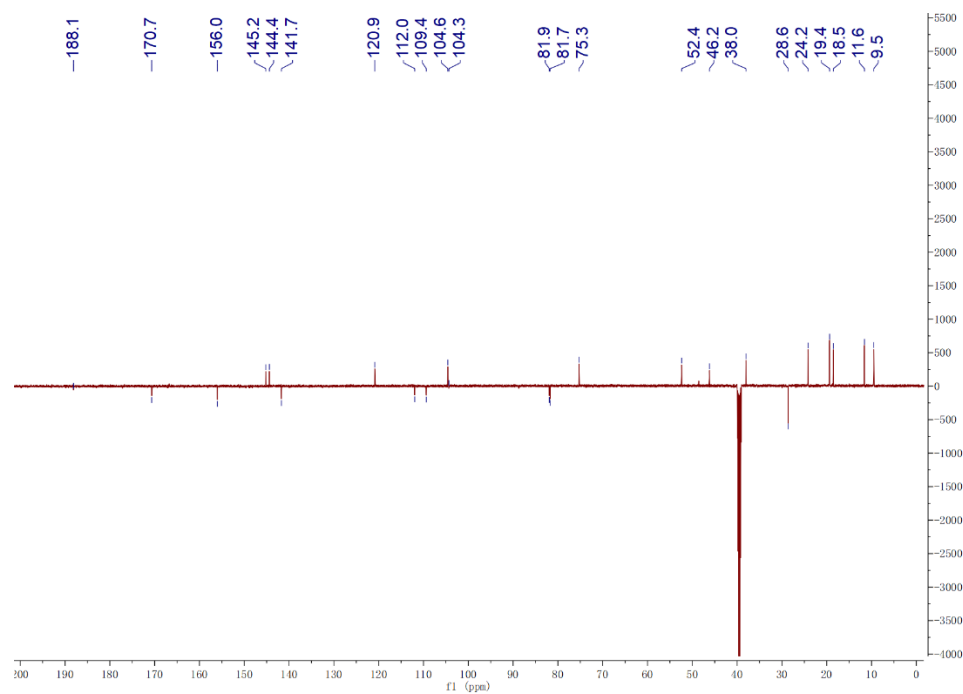


Figure A.34. ^{13}C -DEPTQ spectrum of chaetofanixin B (**11**) in $\text{DMSO}-d_6$

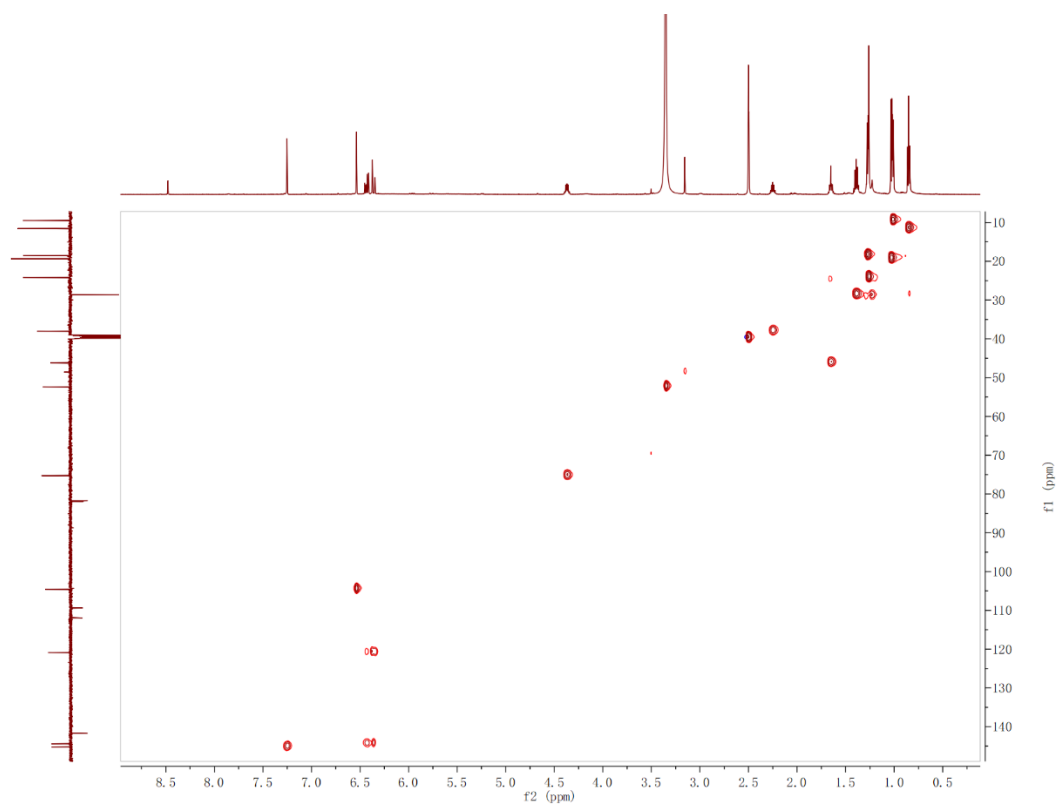


Figure A.35. HSQC spectrum of chaetofanixin B (**11**) in $\text{DMSO}-d_6$

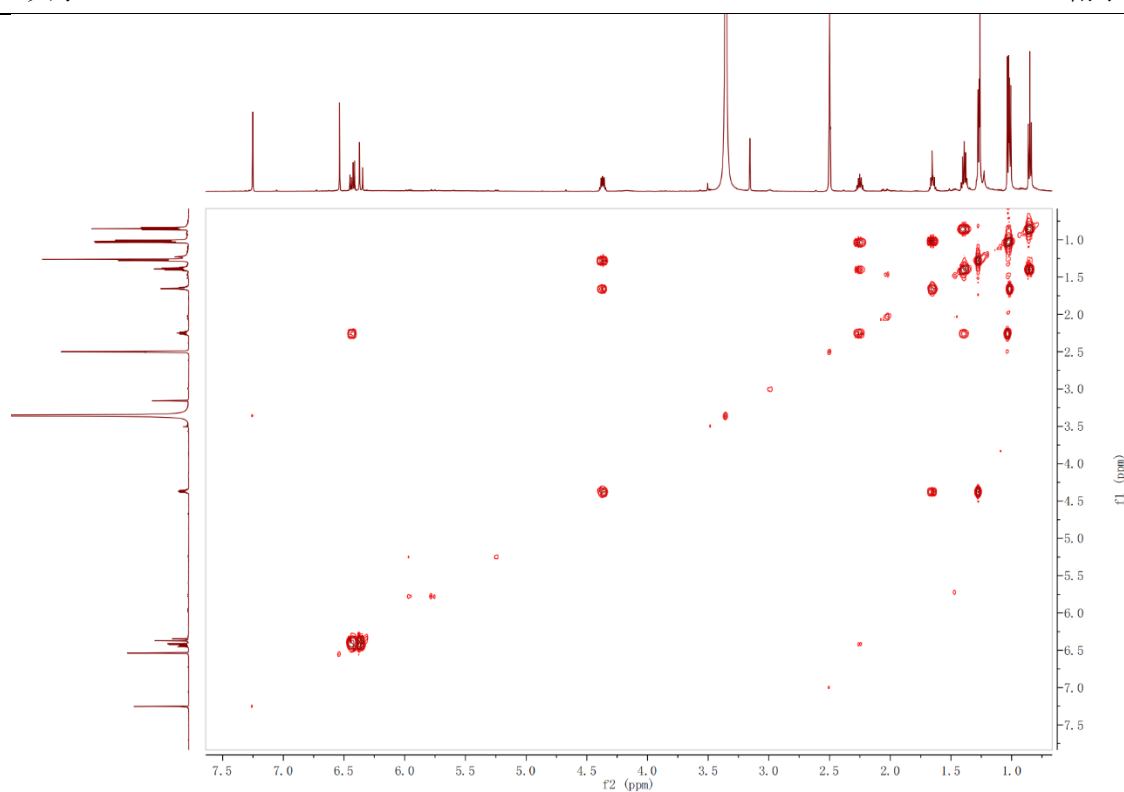


Figure A.36. ^1H - ^1H COSY spectrum of chaetofanixin B (**11**) in $\text{DMSO}-d_6$

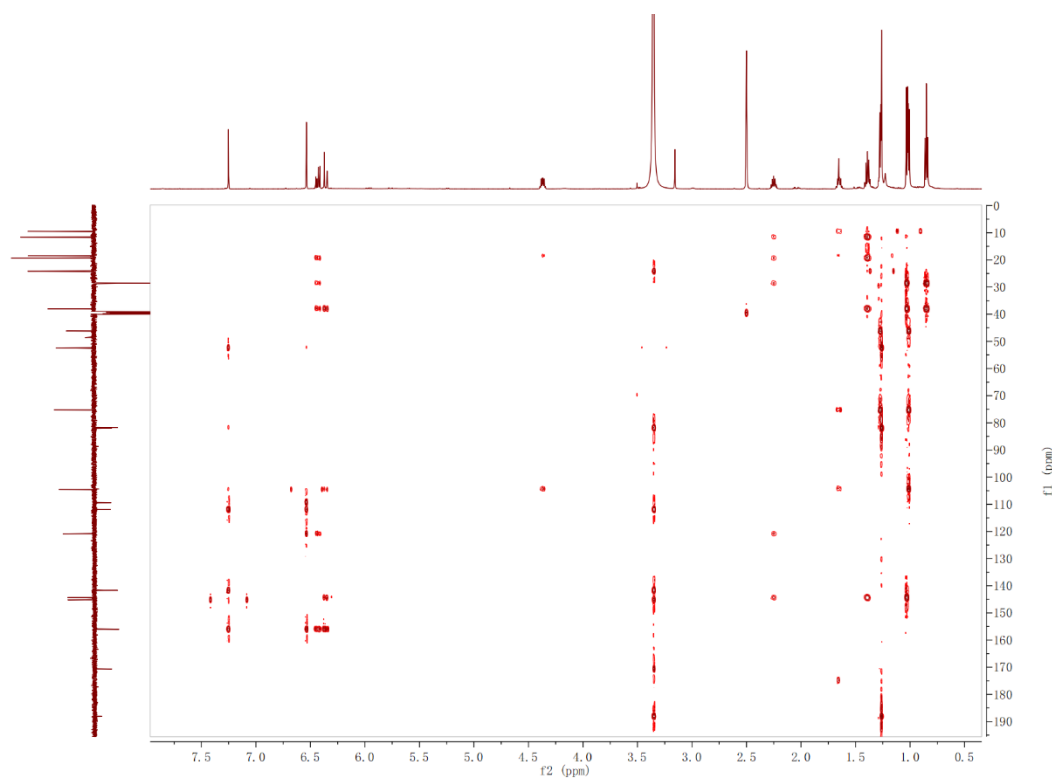


Figure A.37. HMBC spectrum of chaetofanixin B (**11**) in $\text{DMSO}-d_6$

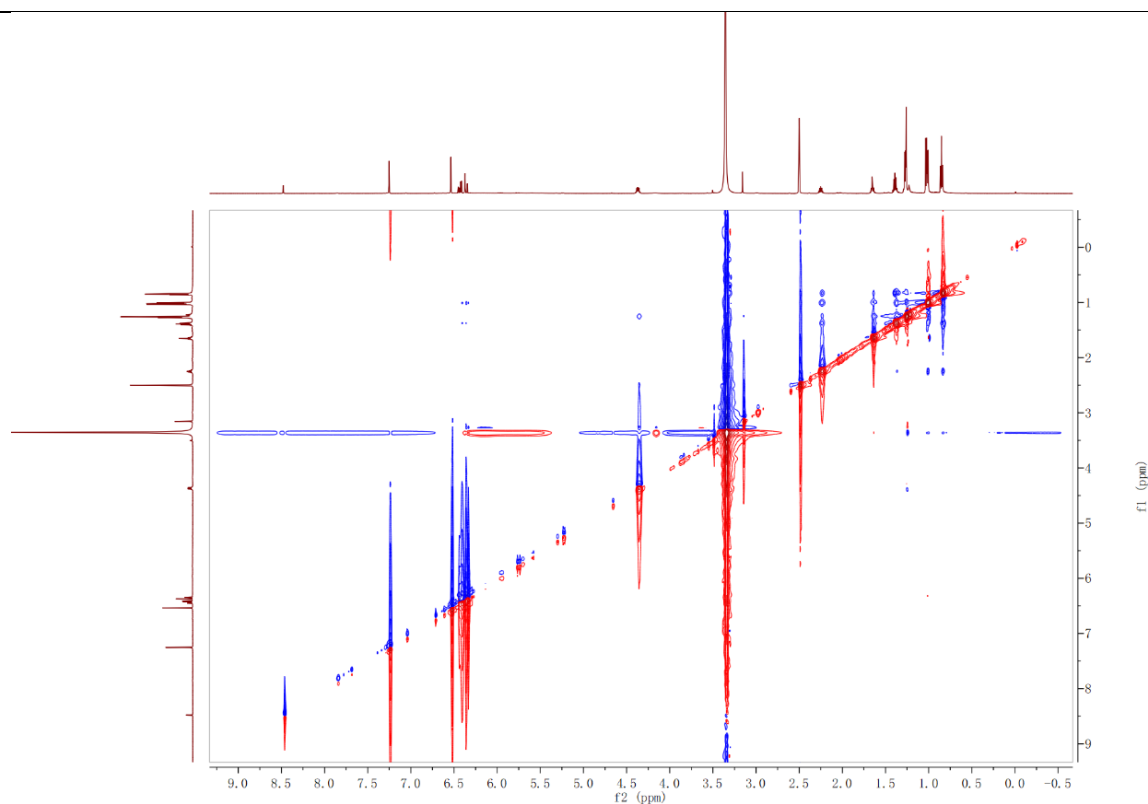


Figure A.38. NOEZY spectrum of chaetofanixin B (**11**) in DMSO- d_6

20211203-Y-6-36_211203092040 #40-41 RT: 0.58-0.59 AV: 2 SB: 12 0.00-0.17 NL: 1.58E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-1500.00]

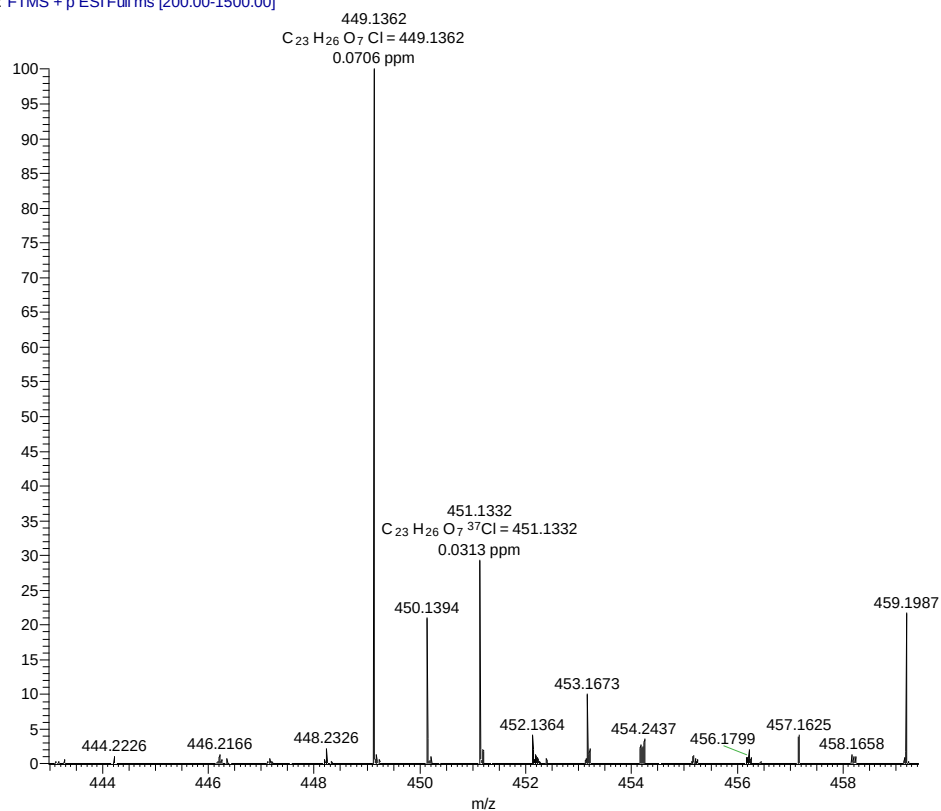


Figure A.39. HRESIMS spectrum of chaetofanixin C (**12**)

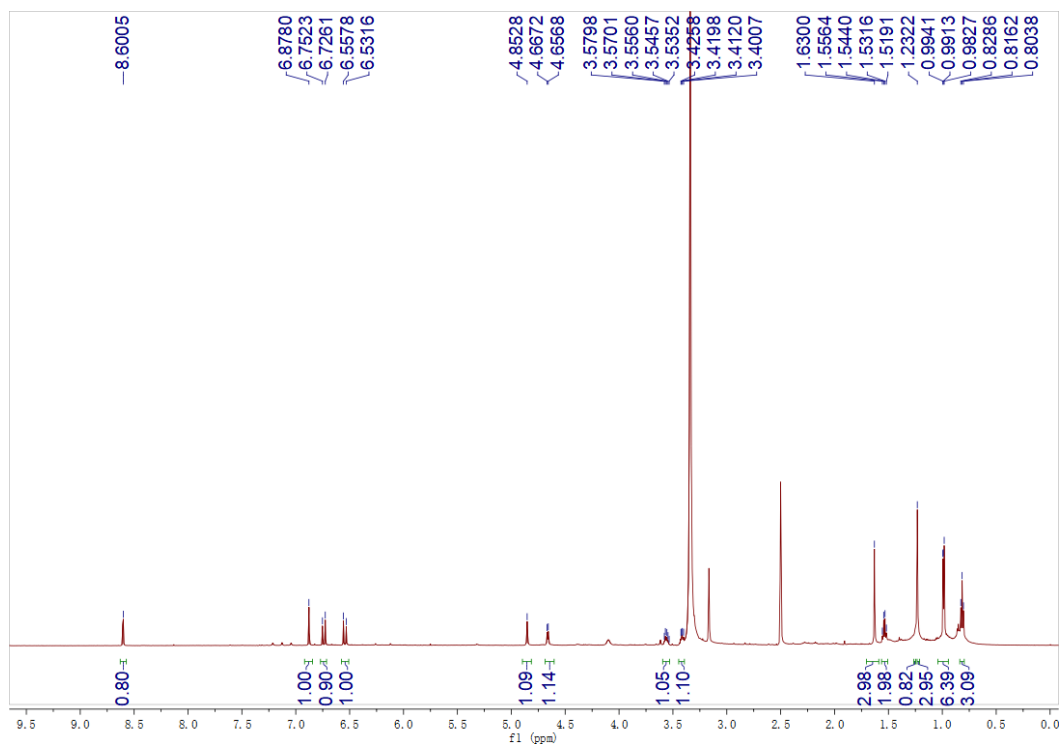


Figure A.40. ¹H-NMR spectrum of chaetofanixin C (12) in DMSO-*d*₆

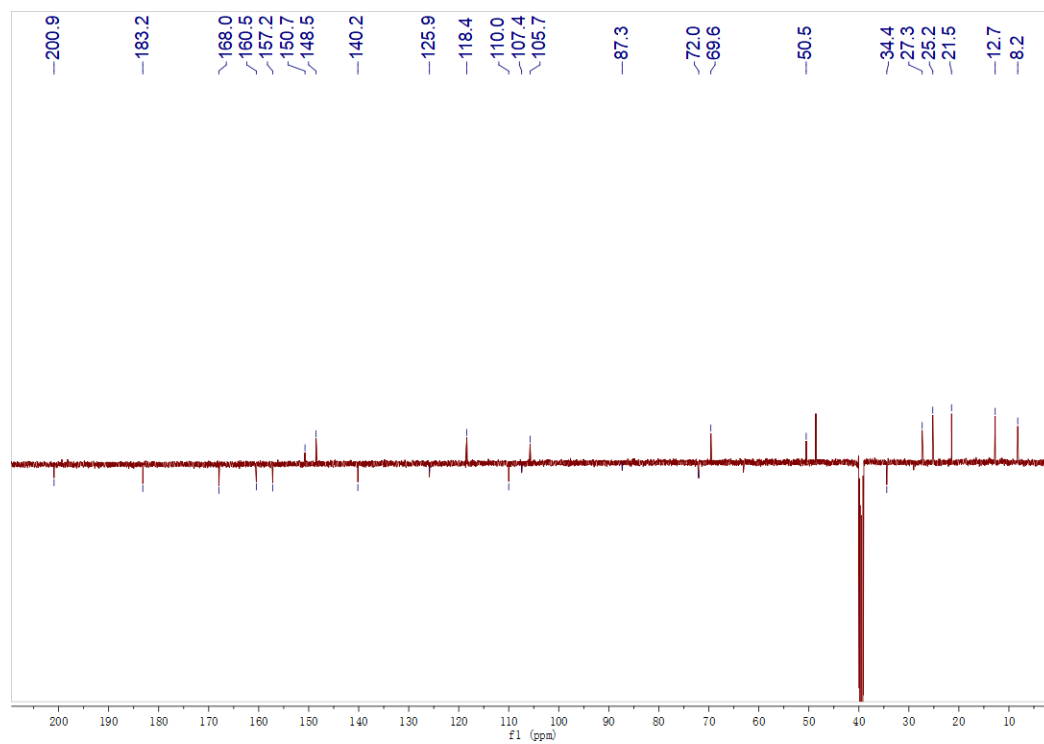


Figure A.41. ¹³C-DEPTQ spectrum of chaetofanixin C (12) in DMSO-*d*₆

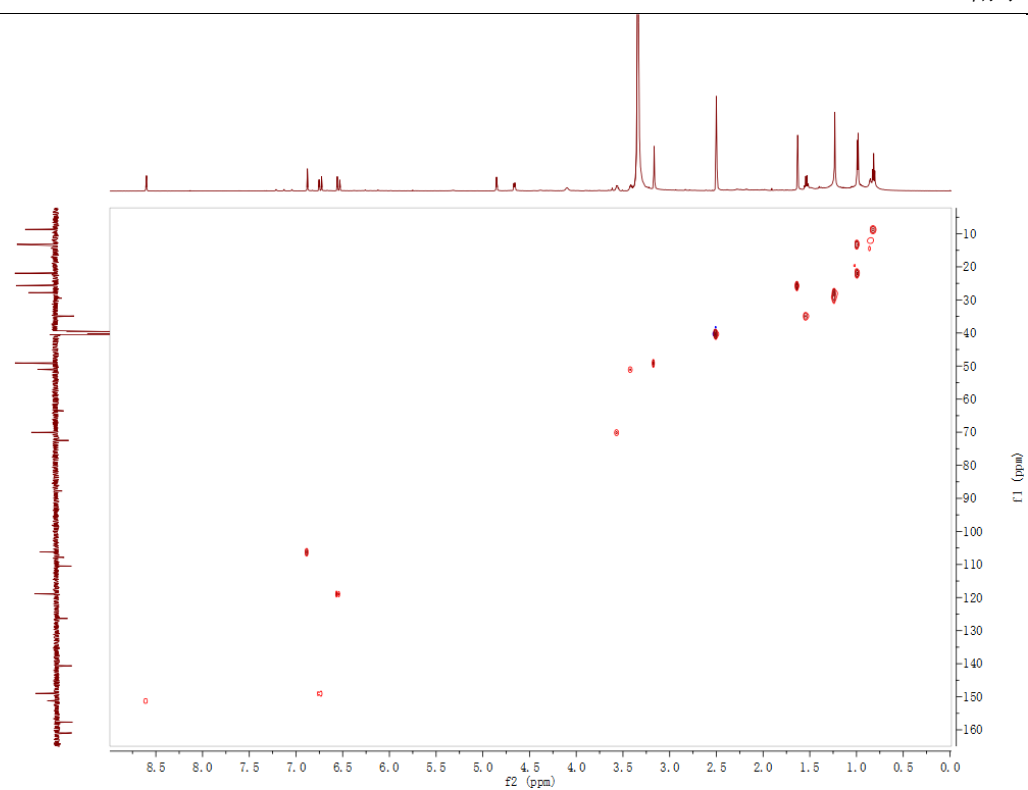


Figure A.42. HSQC spectrum of chaetofanixin C (**12**) in DMSO- d_6

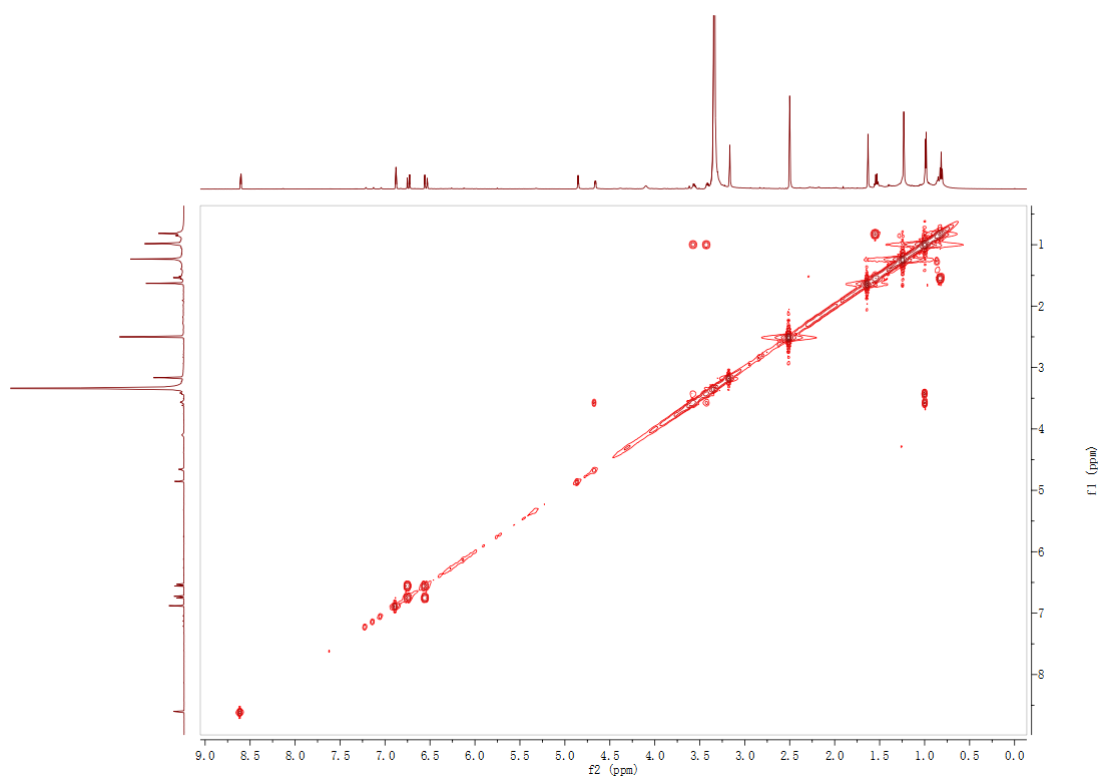


Figure A.43. ^1H - ^1H COSY spectrum of chaetofanixin C (**12**) in DMSO- d_6

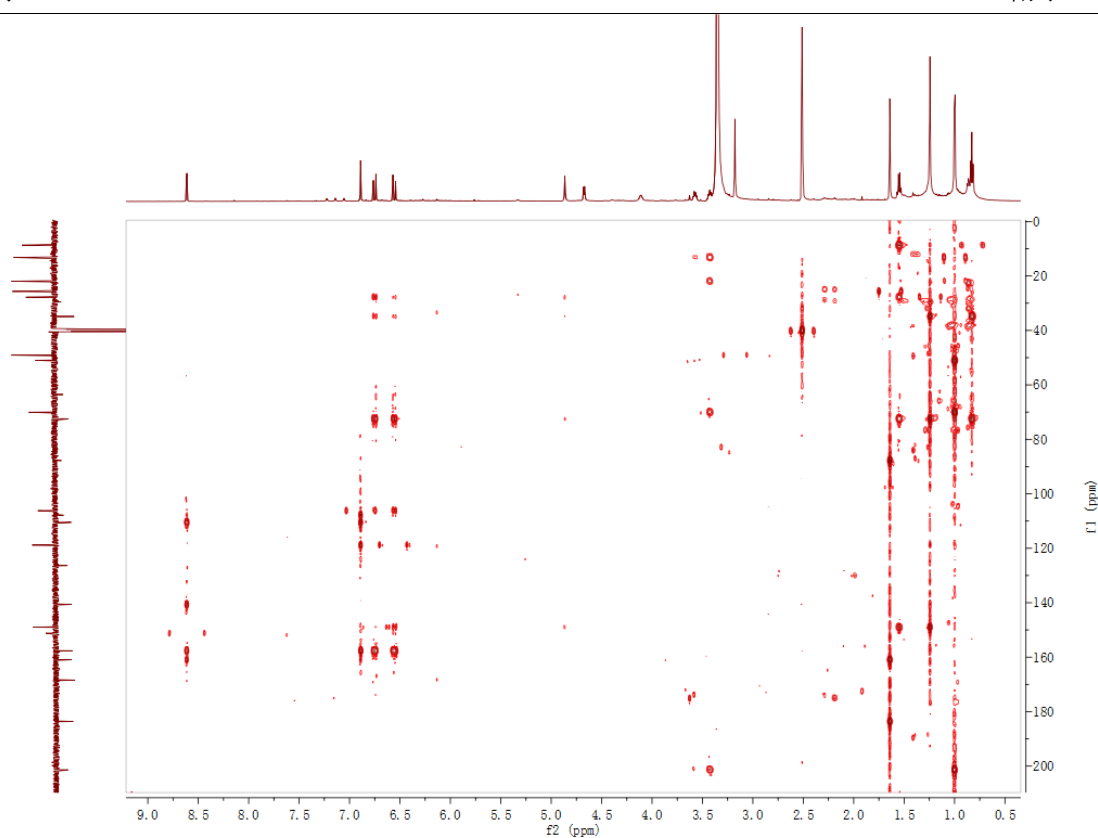


Figure A.44. HMBC spectrum of chaetofanixin C (**12**) in DMSO- d_6

20211210-Y-6-38_211210111413 #12 RT: 0.09 AV: 1 NL: 1.42E7
T: FTMS + p ESI Full ms [105.00-1000.00]

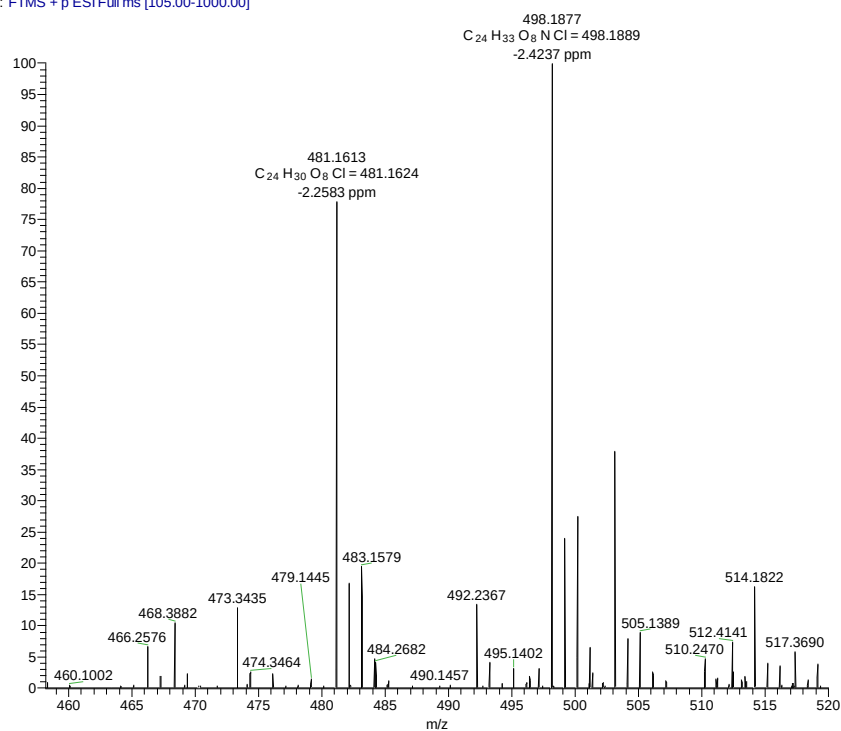


Figure A.45. HRESIMS spectrum of chaetofanixin D (**13**)

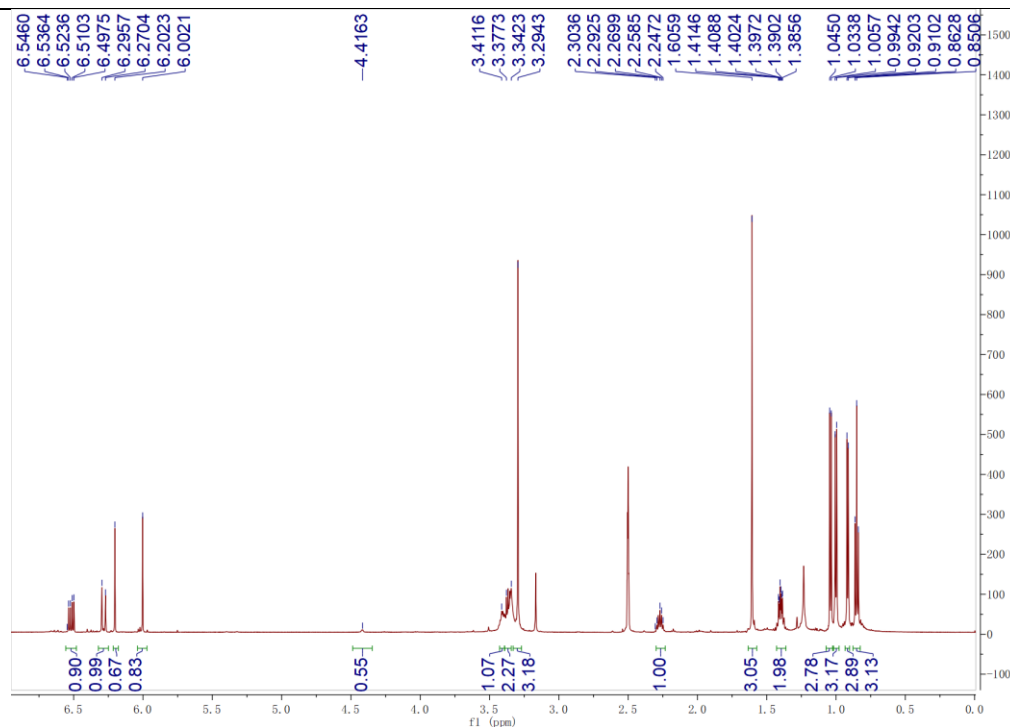


Figure A.46. ^1H -NMR spectrum of chaetofanixin D (**13**) in $\text{DMSO}-d_6$

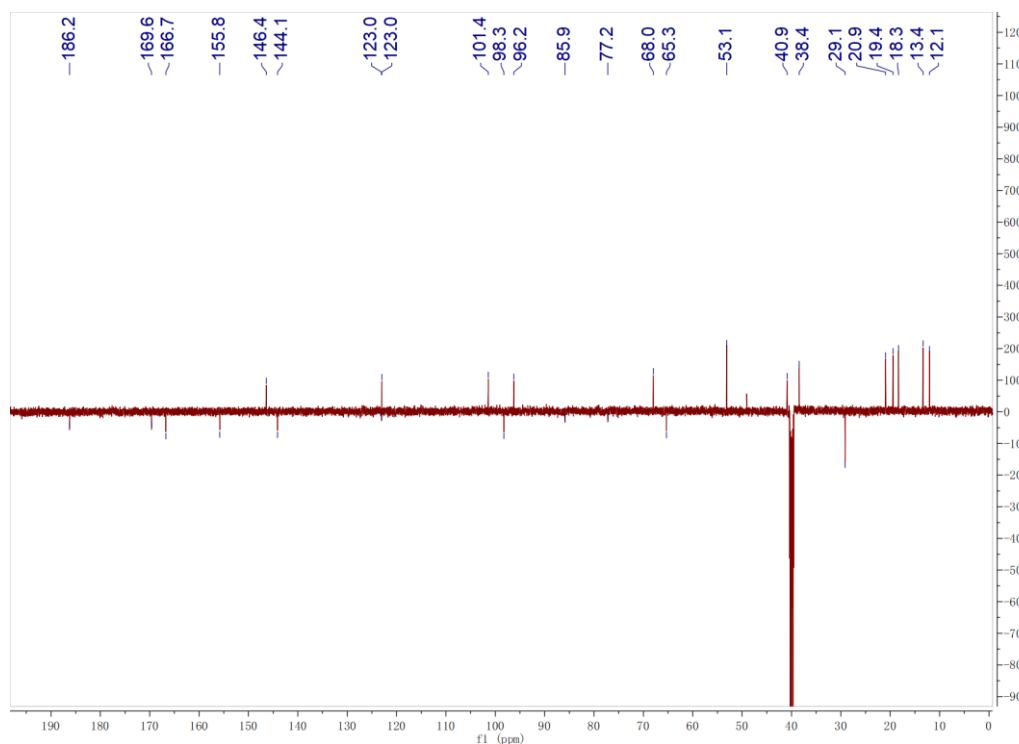


Figure A.47. ^{13}C -DEPTQ spectrum of chaetofanixin D (**13**) in $\text{DMSO}-d_6$

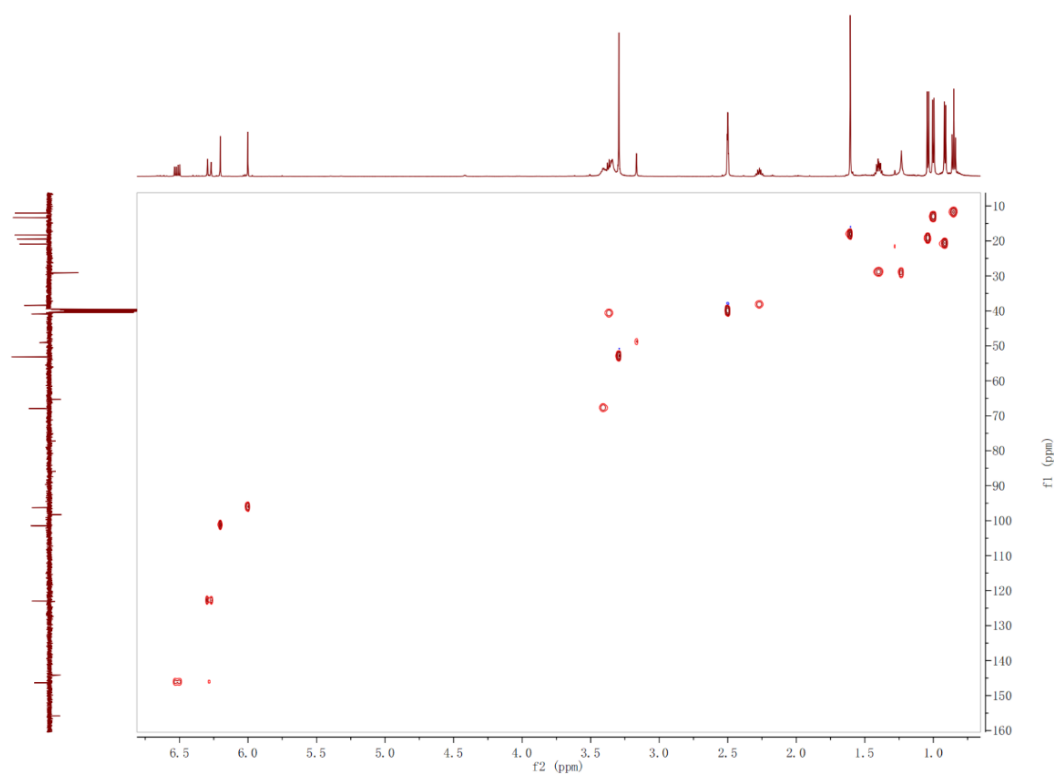


Figure A.48. HSQC spectrum of chaetofanixin D (**13**) in DMSO- d_6

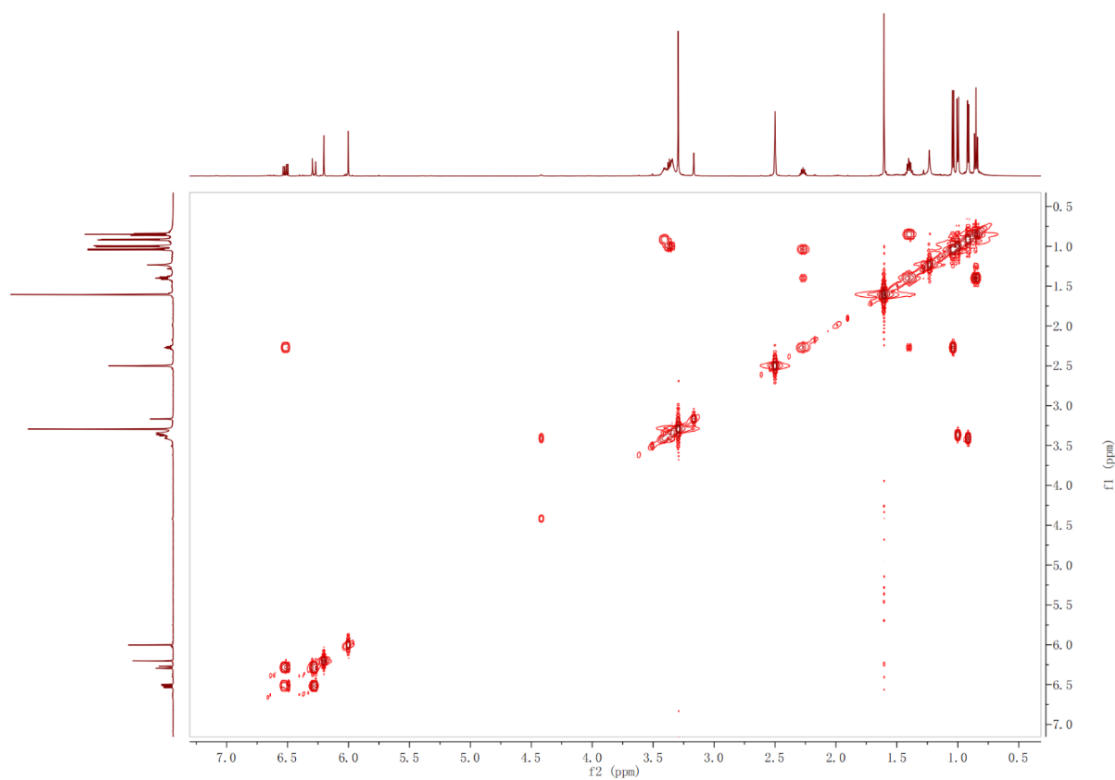


Figure A.49. ^1H - ^1H COSY spectrum of chaetofanixin D (**13**) in DMSO- d_6

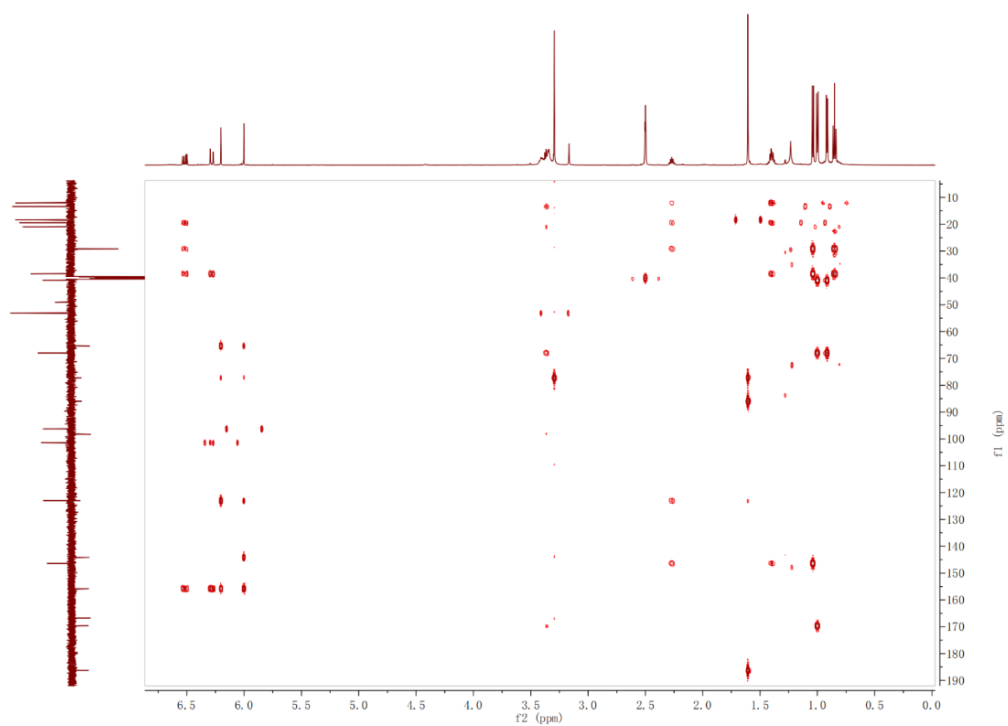


Figure A.50. HMBC spectrum of chaetofanixin D (**13**) in DMSO- d_6

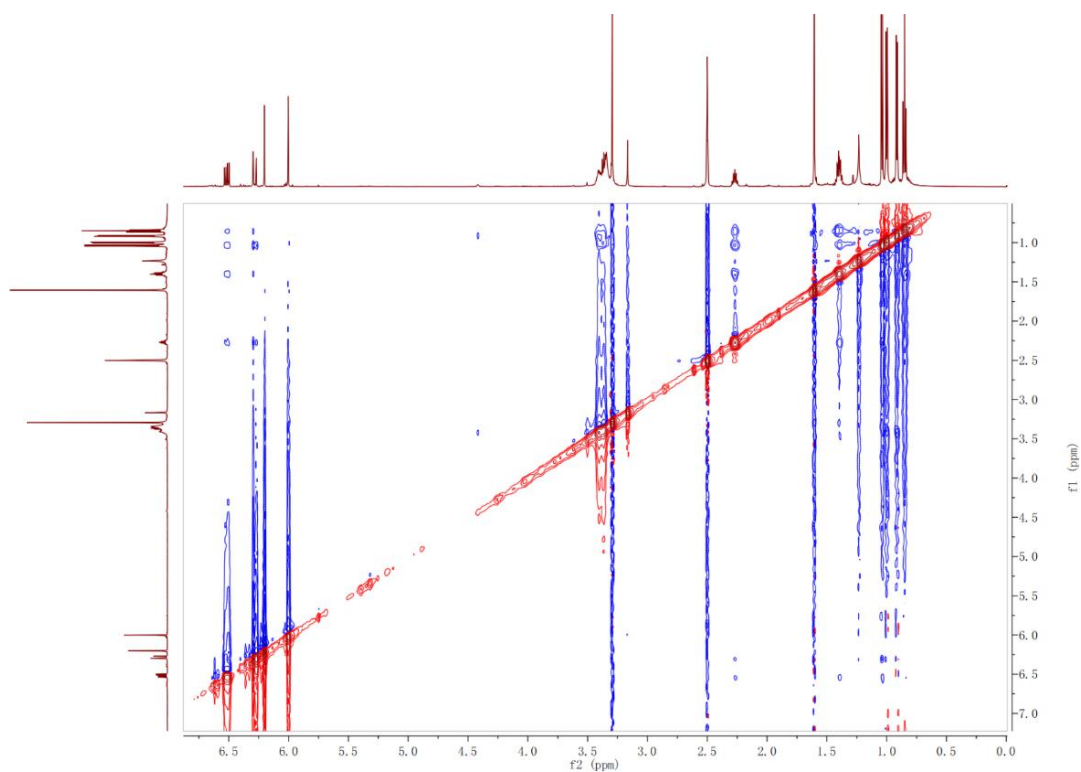


Figure A.51. NOESY spectrum of chaetofanixin D (**13**) in DMSO- d_6

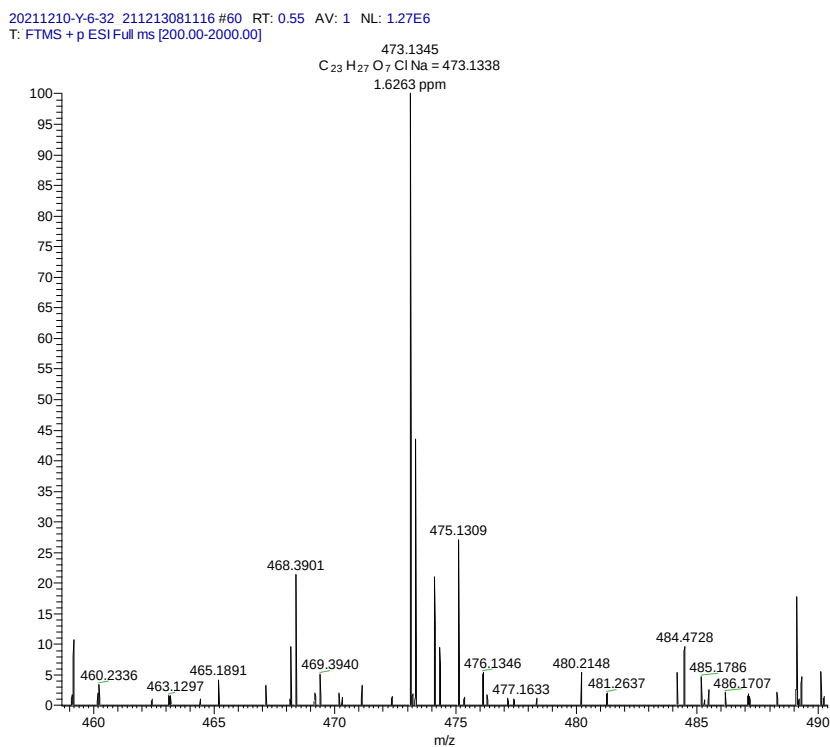


Figure A.52. HRESIMS spectrum of chaetofanixin E (**14**)

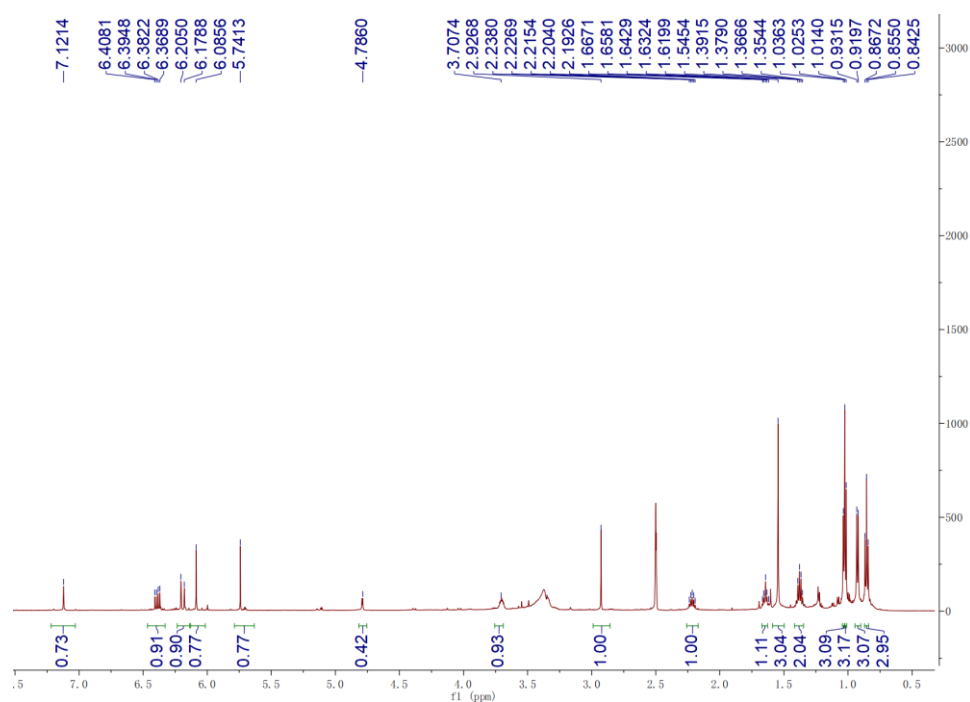


Figure A.53. ¹H-NMR spectrum of chaetofanixin E (**14**) in DMSO-*d*₆

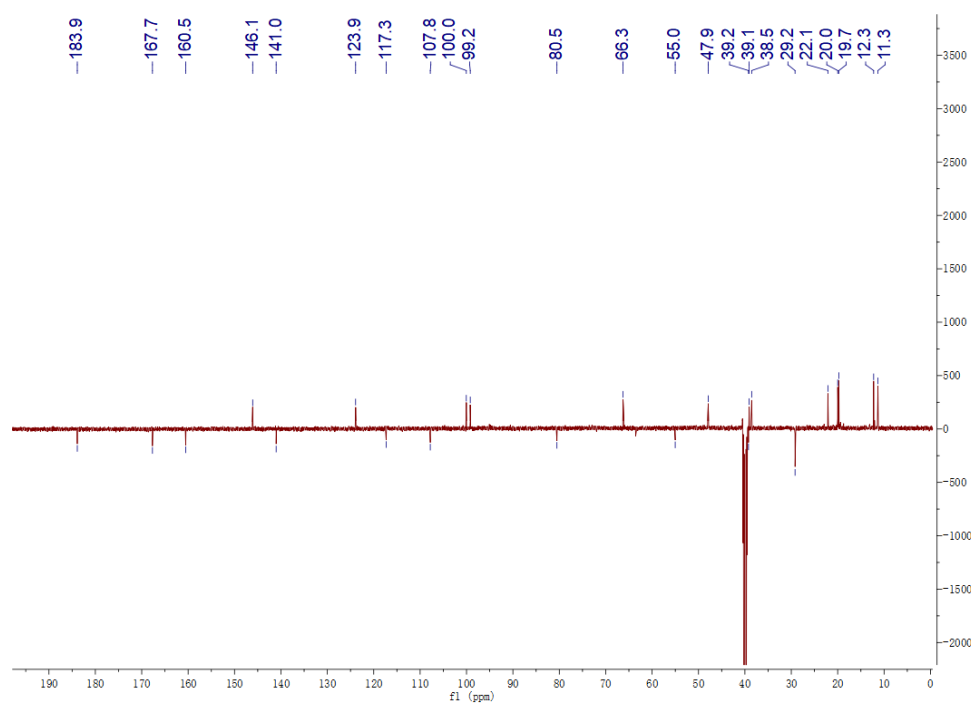


Figure A.54. ^{13}C -DEPTQ spectrum of chaetofanixin E (**14**) in $\text{DMSO}-d_6$

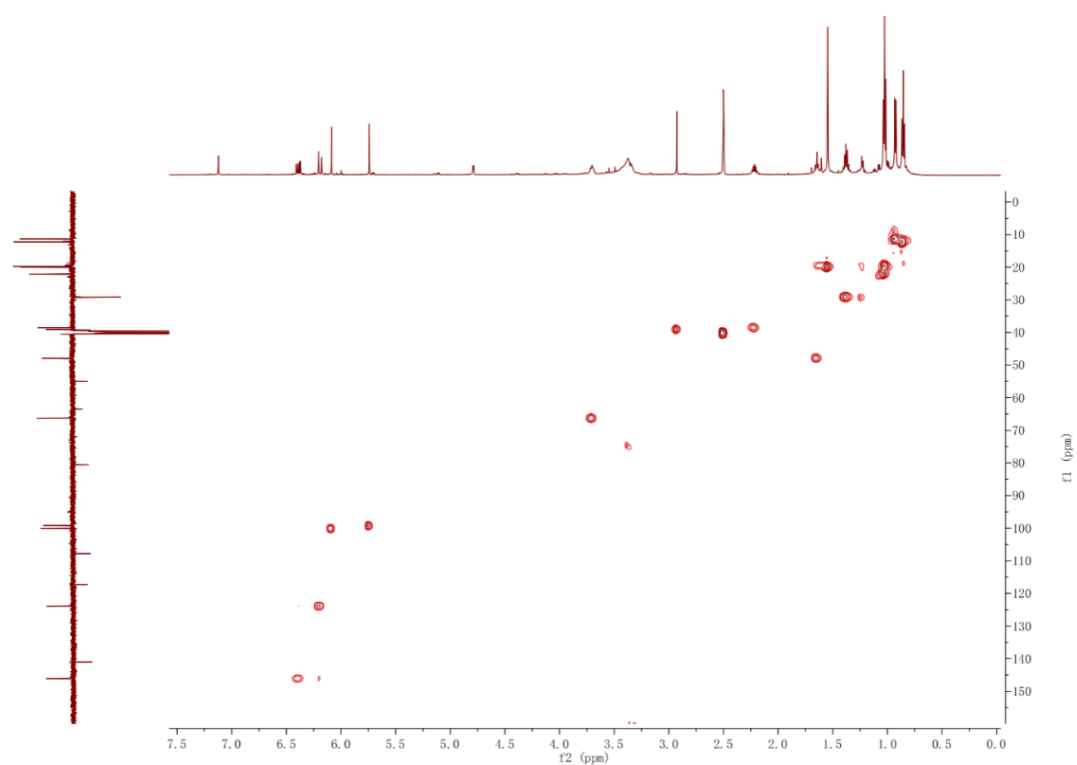


Figure A.55. HSQC spectrum of chaetofanixin E (**14**) in $\text{DMSO}-d_6$

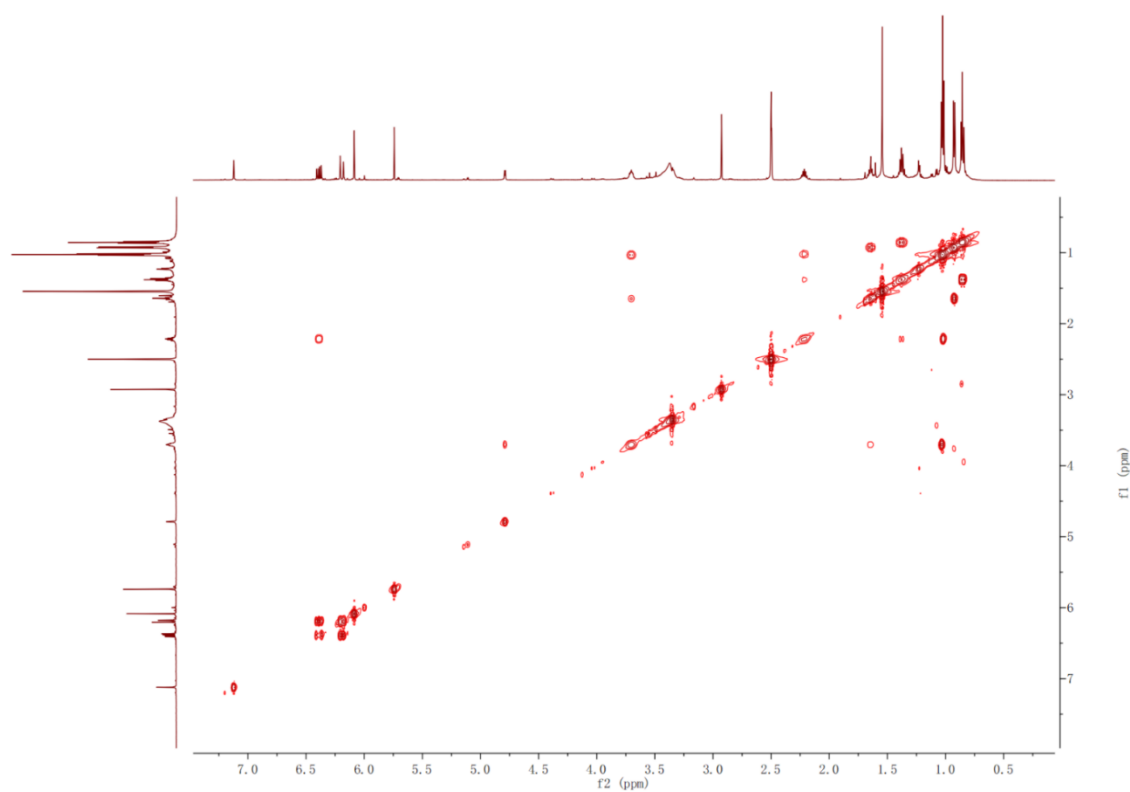


Figure A.56. ^1H - ^1H COSY spectrum of chaetofanixin E (**14**) in $\text{DMSO}-d_6$

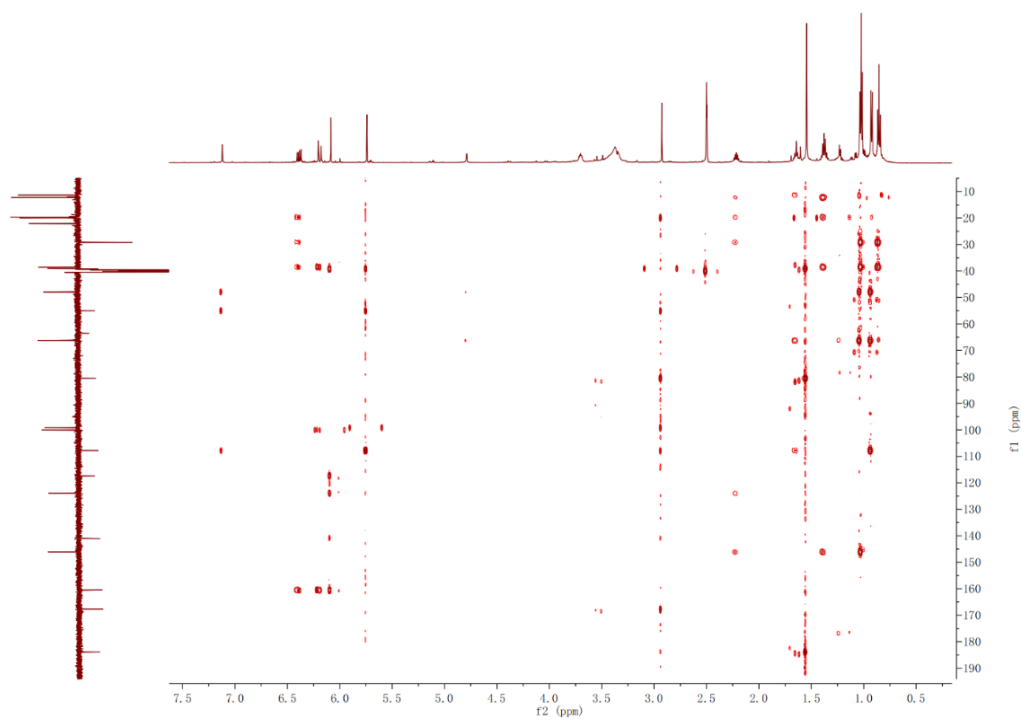


Figure A.57. HMBC spectrum of chaetofanixin E (**14**) in $\text{DMSO}-d_6$

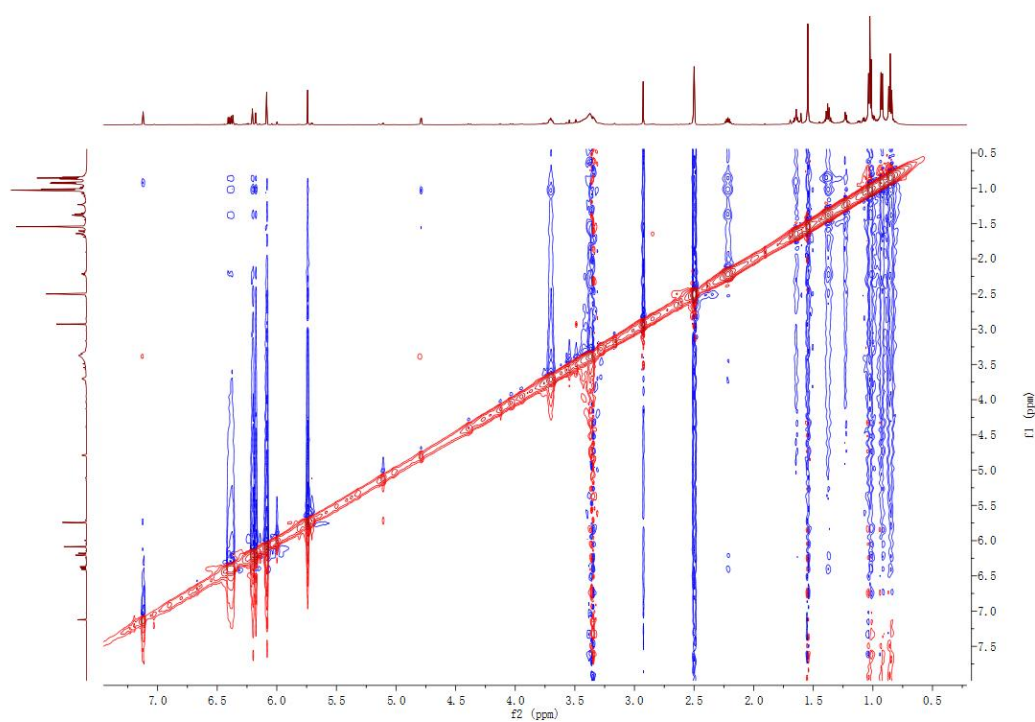


Figure A.58. NOESY spectrum of chaetofanixin E (**14**) in DMSO-*d*₆

导师组意见

导师组已通过江春娇的论文审查，同意并推荐其参加硕士学位论文答辩。

导 师： 郭立忠

导师组成员： 卢伟东 樊亚琴 杨秀青

2022 年 6 月 1 日

致谢

本文是在我的导师郭立忠教授和樊亚琴副教授的悉心指导下完成的，我的导师郭立忠教授学识渊博、严谨治学、思维敏捷。郭老师的高尚品德是我一生学习的楷模。三年来，导师言传身教，不仅教给我学习、科研和工作方法，更教给我如何做人，如何实现自身的价值，这是我人生中的一笔宝贵财富。

樊亚琴副教授从课题的选题、方案的设计与实施、试验及论文的书写，整个过程导师对我进行了无私的关怀与帮助。樊老师科研态度严谨细致、一丝不苟是我学习的典范。有很多问题在樊老师的指导下迎刃而解，感谢樊老师对我的悉心指导。三年来，樊老师于我而言亦师亦友，不仅在工作中，更是在生活中也对我无比照顾与关爱。承蒙厚爱，感激不尽！

研究生前两年，我一直作为备受宠爱的小师妹在温馨的氛围中成长，我的师兄师姐吉建成、王菲、高杰和赵建俊一直对我照顾有加。如今我作为研三师姐，也是在邱田美、张美华、金晓璠、张晨晓和李晓航的支持下得以顺利毕业。三年来，无数个实验不顺的日子是在和孟祥麟互相调侃互相安慰中度过的。当然实验室如今新鲜的血液苏瑶、毛承志、刘旭阳、杨舒婷和李丝竹也一如既往的创造了一个团结积极的工作环境。有幸与他们并肩走过一程，祝他们在以后的生活中工作顺利、前程似锦。

感谢我的师弟马志恒和师妹张燕，实验的顺利进展离不开他们的全力支持，同时他们无时无刻不吹捧我让我相信我就是最棒的师姐，希望他们也能在樊老师的带领下成果多多！

感谢我的舍友于松尼三年来给予我的支持与照顾，她是我心里的一块糖，一直能给我带来正能量，让我三年来的研究生生活乐观有趣。

感谢我的男朋友徐康，他内心温柔而兼具力量，懂我所想也会为我而想，希望以后的道路我们也会坚定并欢乐地走下去。

感谢国家自然科学基金项目 42006096 和山东省自然科学基金青年项目 ZR2020QD098 对本实验工作的大力支持。

最后我还要深深感谢我的家人对我的支持和帮助，二十年求学路你们一直是我坚强的后盾和温暖的港湾，是我的精神支柱，是我的前进动力。是你们的理解和支持让我顺利完成学业。希望你们身体健康，万事如意。还有伴我入学而出生的小外甥女，三年来你让我的生活充满阳光与童趣，希望你能开心快乐无忧无虑的长大。

作者简介

个人简介:

江春娇, 女, 1998 年出生于山东省威海市, 汉族。

2015 年 9 月至 2019 年 7 月就读于青岛农业大学化学与药学院, 药学专业, 获得理学学士学位。

2019 年 9 月至 2022 年 7 月就读于青岛农业大学生命科学学院, 微生物学专业, 从事活性天然产物分离纯化工作, 导师为郭立忠教授和樊亚琴副教授。2020 年主持青岛农业大学研究生创新计划, 项目名称《雅浦海沟超深渊耐低氧真菌次级代谢产物化学多样性及促血管生成活性研究》。研究生期间担任院文体部部长, 组织策划校、院级活动。

发表文章:

Jiang C, Ji J, Li P, et al. New lanostane-type triterpenoids with proangiogenic activity from the fruiting body of *Ganoderma applanatum*[J]. *Natural Product Research*, 2022, 36(6): 1529-1535. (4 区)

Yaqin Fan, **Chunjiao Jiang**(共同一作), Peihai Li, et al. A new chloro-azaphilone derivative with pro-angiogenesis activity from the hadal trench-derived fungus *Chaetomium globosum* YP-106, *Journal of Oceanology and Limnology* . (2 区, 已接收)

Yaqin Fan, **Chunjiao Jiang** (共同一作), Zhiheng Maa, et al. Pro-angiogenesis new chloro-azaphilone derivatives from the hadal trench-derived fungus *Chaetomium globosum* YP-106. *Frontiers in Microbiology*. (2 区, R1 修回中)

获得奖励:

2022 年, 获得校优秀毕业研究生称号。

2022 年, 获得 2022 届校研究生优秀毕业论文荣誉。

2022 年, 获得青岛农业大学第十一届研究生学术论坛三等奖。

2021 年, 获得青岛农业大学 2021 年“青岛东海药业”奖学金。

2021 年, 获得生命科学学院思科捷奖学金。

2019-2022 年获得青岛农业大学研究生一等奖学金 2 次、三等奖学金 1 次。