



研究报告

基于超高效液相色谱-电喷雾-质谱、天然产物词典和活性筛选的艾纳香内生真菌次生代谢产物

郭玉华² 舒雪纯³ 张影波¹ 官玲亮¹ 于福来¹ 元超^{*1}

1 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 海南 海口 571101

2 中国热带农业科学院海口试验站 海南 海口 570102

3 海南大学林学院 海南 海口 570228

摘要:【背景】植物内生真菌是天然活性小分子的重要来源,但由于种类繁多,导致寻找结构新颖、活性强的化合物非常困难,重复分离已成为制约新型药源小分子发掘的瓶颈。【目的】综合各种技术,快速寻找目标活性次生代谢产物。【方法】通过对菌株分子鉴定、天然产物词典(dictionary of natural products, DNP)数据库检索、超高效液相色谱-电喷雾-质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QToF-MS)分析、滤纸片法抑菌实验和色谱技术跟踪获得活性单体化合物。运用质谱和单晶衍射技术对化合物结构进行鉴定,96孔板法对单体化合物进行活性评价。【结果】分离鉴定出11株艾纳香内生真菌,筛选出一株各方面表现良好的艾纳香内生菌菌株 *Diaporthe* sp., 从其大米培养基中获得一个单体化合物 Cytochalasin H, 活性评价显示其对枯草芽孢杆菌具有很好的抑制活性, MIC 值为 32 μg/mL。【结论】将多种筛选技术相结合的方法应用于艾纳香内生真菌活性代谢产物的发掘,为快速寻找活性先导化合物提供了很好的借鉴。

关键词: 艾纳香, 抗菌活性, 天然产物词典, 液质联用

Screening of bioactive secondary metabolites of endophytes associated with *Blumea balsamifera* (L.) DC. by UPLC-QToF-MS, DNP and bio-assay

GUO Yu-Hua² SHU Xue-Chun³ ZHANG Ying-Bo¹ GUAN Ling-Liang¹ YU Fu-Lai¹ YUAN Chao^{*1}

1 Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

2 Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 570102, China

3 College of Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: [Background] Endophytic fungi is a reservoir of bioactive small-molecular natural

Foundation items: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund for Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (1630032019045); Natural Science Foundation of Hainan Province (219MS079)

*Corresponding author: E-mail: yuanchao79@126.com

Received: 11-06-2019; Accepted: 09-10-2019; Published online: 06-11-2019

基金项目: 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630032019045); 海南省自然科学基金(219MS079)

*通信作者: E-mail: yuanchao79@126.com

收稿日期: 2019-06-11; 接受日期: 2019-10-09; 网络首发日期: 2019-11-06

compounds, but it is difficult to obtain structurally novel compounds and pronouncedly active analogues because of enormous species dispersed in nature, and repeated isolation became an bottleneck in the mining process. **[Objective]** The objective is to rapidly find new biologically active metabolites with combination of LC-MS, DNP and bioactivity evaluation. **[Methods]** Pure metabolite was isolated through silica gel and recrystallization. The structure was elucidated by spectroscopic and X-Ray techniques. The biological activity was evaluated through 96-well dilution method. **[Results]** Eleven endophytes were isolated and identified from *B. balsamifera* (L.) DC. A targeted endophyte identified as *Diaporthe* sp. was selected and an active compound Cytochalasin H was afforded from the rice extract of this fungus, its inhibitory effects against *Bacillus subtilis* was assayed with a MIC value of 32 $\mu\text{g/mL}$. **[Conclusion]** This study introduced a new extensive method in mining for bioactive secondary metabolites from endophytes of *B. balsamifera* (L.) DC., which provides references for rapidly exploration of effective lead agents.

Keywords: *Blumea balsamifera*, Antibacterial activity, DNP, UPLC-QToF-MS

天然产物仍然是新药发现的重要源泉, 1980–2010年间, 天然产物及其衍生物占到新研发抗菌药物的74%和抗肿瘤药物的59%^[1]。已报道的自然界中的化合物达到24.6万种, 且仍以每年4000种的速度增长^[2], 这导致出现了一个不可回避的关键问题: 重复分离(reisolation)。重复分离导致大量时间和经费的浪费, 因此, 科学家们做了很多尝试“去重复”(dereplication), 并取得较好效果。如, El-Elimat等^[3]2013年结合活性筛选、超高效液相色谱-高分辨质谱(ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrum, UPLC-HRMS)、MS、UV, 以及ACD/Intellixtract Analysis自建数据库可排除50%以上重复研究的真菌次生代谢产物, 大大节约了研究成本。Krug等^[4]2008年在研究粘细菌过程中采用超高效液相色谱-高分辨电喷雾质谱(UPLC-high resolution electrospray ionization mass spectroscopy, UPLC-HRESIMS)结合主成分分析(principal component analysis, PCA)的方法从粘细菌 *Myxococcus stipitatus* 中发现了一种目前数据库中无记载的已知生物碱类化合物 Phenalamide A。Laatsch^[5]2008年构建的Antibase数据库涵盖了95%以上已报道的天然产物质谱信息, 可为基于UPLC-MS的去重复发现新化合物提供强有力支撑。Nielsen等^[6]2011年对719种微生物天然产物分别在正负离子模式下的

各种加和峰进行了分析, 发现正离子模式可以离子化其中93%的化合物, 其中56.1%的化合物可通过各级离子特征信息进行确证。Floros等^[7]2016年采用分子网络(molecular networking)方法从来自1000多种海洋微生物的4000多份提取物样品中筛选出来自同一菌株的两个未报道的化合物 Maridric acids A、B。目前全球抗生素耐药性导致每年死亡人数达70万, 如不采取有效行动, 预计2050年这一数字将上升至1000万^[8]。1981–2014年全球范围内共有112个小分子化合物被批准为新的抗生素, 其中包括11个未经结构修饰的微生物天然产物(9.8%)和71个微生物天然产物衍生物(63.4%)^[9], 显然微生物天然产物在新型抗生素的研发中起着重要作用。

艾纳香 [*B. balsamifera* (L.) DC.] 又名大风艾、冰片艾, 为菊科艾纳香属植物, 始载于公元741年(唐开元二十九年)陈藏器编著的《本草拾遗》^[10], 作为传统黎药可用于妇女产后沐浴, 以防止妇科疾病的发生^[11], 现代药理研究显示艾纳香提取物具有很好的抗菌活性^[12]。为了从传统抗菌药用植物内生真菌中快速寻找到新型抗菌先导化合物, 我们对特色黎药植物艾纳香的内生真菌进行了分离和鉴定, 并对内生真菌发酵产物进行抗菌活性筛选、DNP数据库检索及UPLC-MS分析, 以期寻找活性次生代谢产物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物和菌株

艾纳香 [*B. balsamifera* (L.) DC.] 2018 年 12 月份采自农业农村部儋州热带药用植物种质资源圃, 经中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所王祝年研究员鉴定为艾纳香本品。

供试细菌菌株: 大肠埃希菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 9372) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) 均由青岛大学药学院李刚老师惠赠。

1.1.2 培养基

自制水琼脂培养基(g/L): 琼脂 15.0, 链霉素 0.1; 自制 PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0; 大米培养基(g/L): 大米 60.0; MHB (Mueller-Hinton agar) 培养基和 LB 培养基购自青岛海博生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、乙醇, 天津市富宇精细化工有限公司。数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 超高效液相飞行时间高分辨质谱联用系统, Waters 公司; 旋转蒸发器, BUCHI 公司。

1.2 方法

1.2.1 植物内生真菌分离方法

艾纳香内生真菌的分离采用水琼脂法^[13], 将采集的新鲜叶片用水龙头冲洗表面尘土, 超净台上用 70% 乙醇灭菌 1 min, 然后放入 1.3 mol/L 的次氯酸钠溶液中 3 min, 最后用 70% 乙醇浸泡 30 min, 无菌水冲洗干净, 切成 1 cm² 左右方块, 贴在添加有抗生素的自制水琼脂平板培养基中, 2 周后挑出叶片边缘长出的菌丝接种到 PDA 培养基。

1.2.2 菌株的分子鉴定

培养 1 周左右的菌株经液氮研磨后采用 CTAB 法^[14]提取基因组 DNA 作为模板, PCR 扩增

ITS-rDNA 片段, 所用引物为 ITS1 (5'-TCCGTAG GTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3')。PCR 反应体系(30 μ L): DNA 模板 1 μ L, ITS1 和 ITS4 引物(10 μ mol/L)各 3 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 10 \times Buffer 3 μ L, *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 17.8 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 12 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物送武汉华大基因公司进行 ITS-rDNA 测序。测序结果返回后, 首先使用 MEGA X^[15]软件去除重复测序序列和杂合序列, 将均匀整齐的序列提交至真菌分子鉴定数据库 UNITE (<https://unite.ut.ee>), 以 E 值 $\leq E^{-10}$ 和 Bits-score ≥ 1000 为鉴定指标确定真菌的种属地位^[16]。

1.2.3 次生代谢产物提取物的制备

将菌株接种于 PDA 平板培养基上, 25 $^{\circ}$ C 培养 10 d。无菌条件下将带菌培养基切块, 接种于制备好的大米培养基中, 共 30 瓶, 室温下静置培养 40 d 后, 加入乙酸乙酯终止发酵, 40 kHz 超声提取 3 次, 每次 30 min, 合并滤液, 减压浓缩至干, 获得粗提物。

1.2.4 单体化合物的分离

将目标菌株的发酵提取物用甲醇溶解, 经硅胶柱层析, 采用二氯甲烷/甲醇梯度洗脱(100/0, 99/1, ..., 0/100, 体积比), 依次获得 7 个馏分: Fr1 (100/0), Fr2 (99/1), Fr3 (98/2), Fr4 (95/5), Fr5 (90/10), Fr6 (50/50), Fr7 (0/100), 其中 Fr2 部分静置后析出大量方形结晶, 进一步用砂芯抽滤装置滤出后得单体化合物。

1.2.5 液质联用分析条件

液相条件: 采用 Waters ACQUITY UPLC 系统配置二元泵系统和自动进样器模块。色谱柱: BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, i.d, 1.7 μ m); 流动相: A: 水(含 0.1% 甲酸), B: 乙腈(含 0.1% 甲酸); 柱温: 45 $^{\circ}$ C; 样品室温度: 4 $^{\circ}$ C; 流速: 0.45 mL/min; 进样体积: 5 μ L; 流动相流动梯度见表 1。

表 1 样本 UPLC 流动相梯度程序

Table 1 Gradient elution process of UPLC mobile phase

| No. | Duration (min) | A (%) | B (%) | Curve |
|-----|----------------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.0 | 99.0 | 1.0 | |
| 2 | 4.0 | 90.0 | 10.0 | 6 |
| 3 | 6.0 | 88.0 | 12.0 | 6 |
| 4 | 11.0 | 80.0 | 20.0 | 6 |
| 5 | 13.0 | 65.0 | 35.0 | 6 |
| 6 | 17.0 | 55.0 | 45.0 | 6 |
| 7 | 20.0 | 0.0 | 100.0 | 6 |
| 8 | 24.0 | 0.0 | 100.0 | 6 |
| 10 | 27.0 | 99.0 | 1.0 | 1 |

质谱条件: Waters SYNAPT G2 HDMS 系统, 氮气作为质谱离子源的雾化、锥孔气; 电喷雾电离正离子模式; 毛细管电压: 3.0 kV; 锥孔电压: 40 V; 萃取锥孔电压: 3 V; 离子源温度: 100 °C; 脱溶剂气温度: 450 °C; 反向锥孔气流: 50 L/h; 脱溶剂气流速: 800 L/h; 碰撞气流速: 0.5 mL/min; 扫描时间: 0.5 s; 扫描时间间隔: 0.02 s; 质荷比范围: 50–1 200 m/z ; 数据采集形式: Centroid; 灵敏性: Normal; 动态范围: Extended; 锁定质量数: m/z 556.277 1。

1.2.6 提取物抗细菌活性筛选

粗提物的抗细菌实验采用滤纸片法^[17], 将供试细菌分别用 LB 培养基 37 °C 振荡培养过夜, 转速 90 r/min, 取 200 μL 加入到无菌 MHA 平板培养基上, 获得带菌培养基。将待测提取物分别用甲醇配置成 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度, 各取 20 μL 滴加到直径 6 mm 的无菌滤纸片上, 挥发干溶剂, 平贴到带菌平板培养基上, 37 °C 培养 24 h, 测量抑菌圈直径, 链霉素(1 $\mu\text{g}/\text{片}$)为阳性对照, 所有实验重复 3 次。

1.2.7 单体化合物的抗菌活性评价

单体化合物的抗菌活性实验采用 96 孔板倍比稀释法^[18]。分别将供试细菌接种到 LB 培养基中 37 °C 振荡过夜。经血细胞计数板调整菌悬液浓度约 1×10^8 CFU/mL, 用 MHB 培养基稀释 100 倍至

10^6 CFU/mL 作为供试菌悬液。测定时除了第一个孔加入菌悬液体积为 200 μL 外, 其余每孔均为 100 μL , 用 DMSO 溶解各供试样品, 采用倍比稀释法依次加入各孔, 保证各孔 DMSO 均低于 5 μL , 最终样品浓度范围为 128–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 置 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 酶标仪读取吸光度值, 计算最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 链霉素为阳性对照, 5 μL 的 DMSO 加入到 100 μL 菌液中为阴性对照, 所有实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

经 ITS 序列测定和 UNITE 真菌分子鉴定数据库比对, 鉴定 11 株植物内生真菌为: *Alternaria alternata*, *Phomopsis* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassicola*, *Diaporthe* sp., *Hypoxyylon investiens*, *Hypoxyylon monticulosum*, *Cladosporium iridis*, *Muscodor* sp., *Daldinia* sp., *Colletotrichum cliviae*。

2.2 粗提物的抗菌活性

11 株艾纳香植物内生真菌的发酵产物对 4 种细菌的抑制活性结果显示, 内生真菌 *Diaporthe* sp. 和 *Phomopsis* sp. 的发酵产物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌具有较好的抑制活性, 尤其是 *Diaporthe* sp. 发酵产物抑菌活性最强, 然而所有内生真菌发酵产物对大肠埃希菌活性均无抑制作用(表 2)。

2.3 内生真菌 *Diaporthe* sp. 和 *Phomopsis* sp. 的 DNP 检索

对两株活性较强的内生真菌进行 DNP 光盘数据库检索, 发现共报道 *Phomopsis* sp. 次生代谢产物 289 个, *Diaporthe* sp. 57 种次生代谢产物结构。进一步的分析显示, 两个菌株存在共有的次生代谢产物化学结构类型主要为 Dicerandrol 聚酮类化合物以及细胞松弛素类结构(图 1), 且该两类化合物结构新颖、活性广泛^[19-20]。

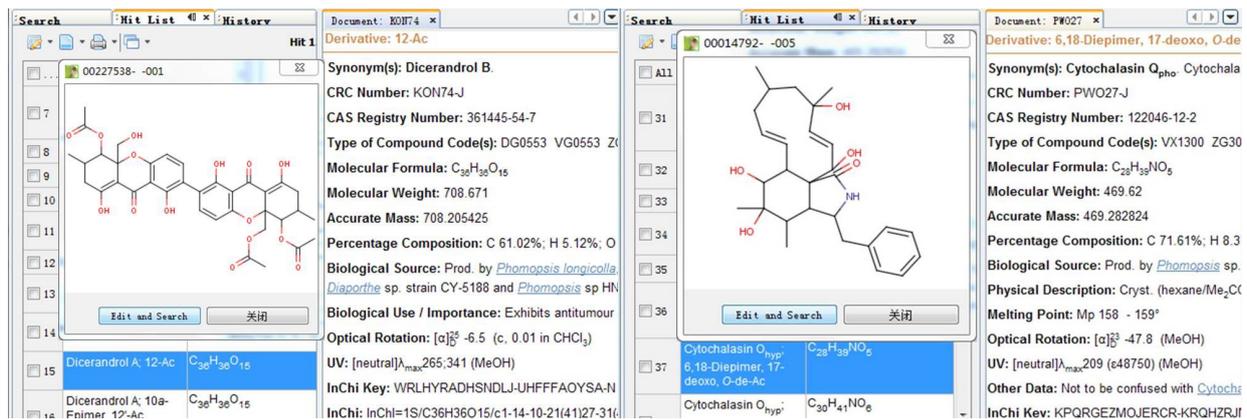
表 2 艾纳香内生真菌发酵产物对 4 株供试细菌的抑制活性(抑菌圈直径, mm)

Table 2 Inhibition of 11 endophytic extract of *B. balsamifera* (L.) DC. against four bacteria (inhibitory diameter, mm)

| 内生真菌 Endophytic fungi | 供试细菌 Four bacteria | | | |
|---|--------------------|--------------------|----------------------|----------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>Alternaria alternate</i> | — | — | — | — |
| <i>Phomopsis</i> sp. | 10.0 | 7.0 | 9.0 | — |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 9.0 | — | 7.0 | — |
| <i>Corynespora cassiicola</i> | 10.0 | — | 7.0 | — |
| <i>Diaporthe</i> sp. | 12.0 | 10.5 | 11.0 | — |
| <i>Hypoxyylon investiens</i> | — | — | — | — |
| <i>Hypoxyylon monticulosum</i> | 9.0 | — | 7.5 | — |
| <i>Cladosporium iridis</i> | 8.5 | — | — | — |
| <i>Muscodor</i> sp. | — | — | — | — |
| <i>Daldinia</i> sp. | 7.0 | — | — | — |
| <i>Colletotrichum cliviae</i> | — | — | — | — |
| 阳性对照药(链霉素) Positive control (streptomycin) | 14.0 | 12.0 | 14.0 | 14.0 |

注: —: 无抑菌活性. 提取物浓度: 40 $\mu\text{g}/\text{片}$; 阳性药: 1 $\mu\text{g}/\text{片}$.

Note: —: No inhibitory effects against bacteria. Dose of extract: 40 $\mu\text{g}/\text{disc}$; Positive control: 1 $\mu\text{g}/\text{disc}$.

图 1 菌株 *Diaporthe* sp.和 *Phomopsis* sp.在 DNP 数据库中检索到的结构信息Figure 1 Structural information of *Diaporthe* sp. and *Phomopsis* sp. screened in DNP database

2.4 UPLC-QToF-MS 分析结果

为进一步比较两株菌的差异,选出目标菌株进行化学成分研究,对两株菌发酵产物分别进行了 UPLC-QToF-MS 分析,通过对其总离子流图比较发现,整体相似度较大,如在 t_R 为 5.76 min 左右均出现 m/z 为 434.270 6 的离子峰,在 t_R 为 7.12 min 左右均出现 m/z 为 416.259 8 的离子峰,同时在 t_R 为 9.88、10.86、12.17 min 三处均出现相同离子峰,其 m/z 分别为 667.202 5、709.211 4、659.438 7 (图 2)。

进一步分析发现,*Diaporthe* sp.成分较为丰富,共出现 7 个明显的离子峰,通过对其中 6 个峰的质谱图分析(图 3),结合之前 DNP 数据库的分析以及氮素规则,发现 *Diaporthe* sp.的 ESI^+ 总离子流图中的前 3 个峰的 m/z (434.271 6, 416.259 8, 434.269 8) 均为偶数,推测其可能为含一个氮原子的细胞松弛素类化合物,后面的 3 处共有峰(t_R : 9.88、10.86、12.17 min) m/z 均为奇数,推测其可能为 Dicerandrol 类结构。基于此,决定对 *Diaporthe* sp.的次级代谢产物进行进一步研究。

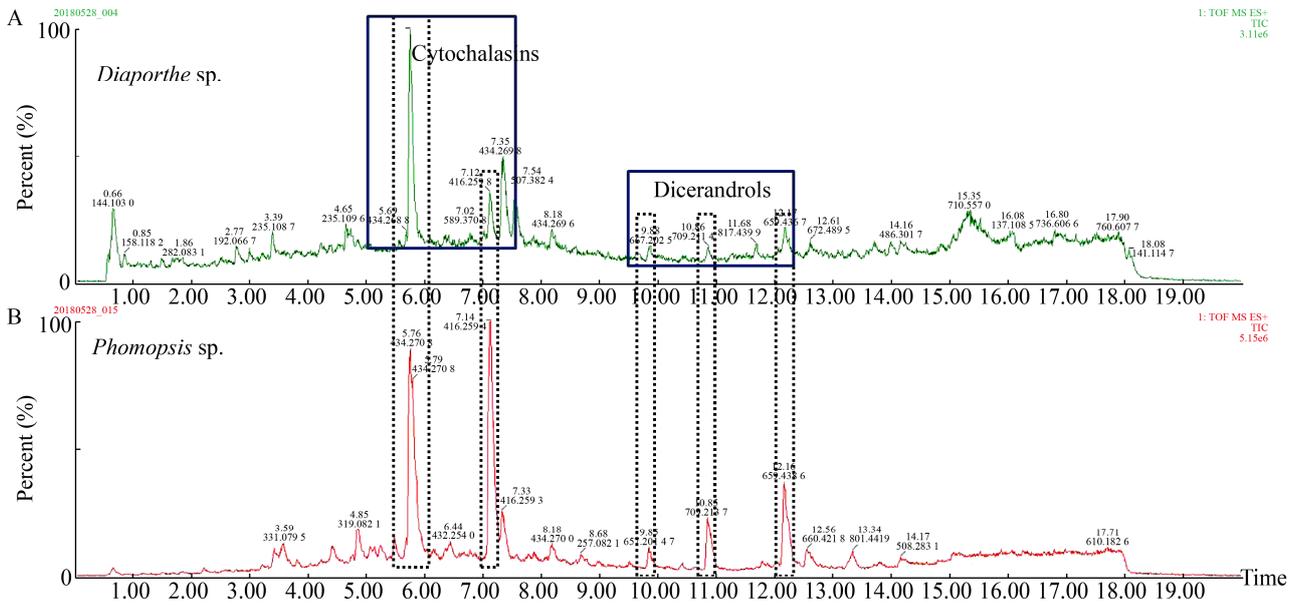


图 2 菌株 *Diaporthe* sp. (A)和 *Phomopsis* sp. (B)的 UPLC-QToF-MS 总离子流图

Figure 2 Base peak ion (BPI) chromatogram of extracts of *Diaporthe* sp. (A) and *Phomopsis* sp. (B) in positive ion mode by UPLC-QToF-MS

注: 虚线框: 可能的共有成分; 实线框: 推测的两种结构类型化合物。

Note: Dotted line: Possible same ingredient; Full line: Putative two skeletons.

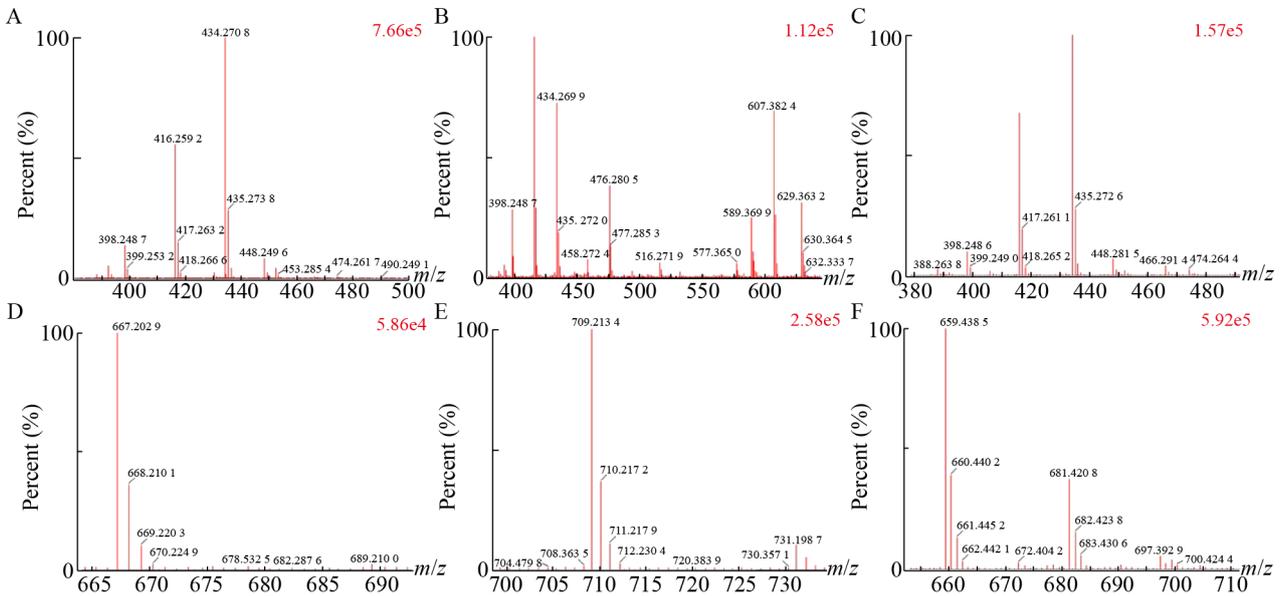


图 3 两种结构类型化合物的 MS 图

Figure 3 MS fragmentation of two distinctive structures

注: A-C 表示 3 个不同质荷比的 Cytochalasins (A: 434.271 6; B: 416.259 8; C: 434.269 8)的 MS 图; D-F 表示 3 个不同质荷比的 Dicerandrols (D: 667.202 9; E: 709.213 4; F: 659.438 5)的 MS 图。

Note: A-C represent MS spectra of three Cytochalasins with different m/z (A: 434.271 6; B: 416.259 8; C: 434.269 8); D-F represent MS spectra of three Dicerandrols with different m/z (D: 667.202 9; E: 709.213 4; F: 659.438 5).

2.5 *Diaporthe* sp.产生的 Cytochalasin H 的结构确证

通过对获得的单体化合物 UPLC-QToF-MS 与 *Diaporthe* sp.粗提物的图谱比对,显示该化合物为粗提物中的第 2 个峰($t_R=7.12$ min),进一步的单晶

衍射获得该化合物绝对构型,显示其为一种细胞松弛素类化合物。同时,通过对单体化合物的质谱裂解途径进行推测,其裂解规律与其单晶衍射结构完全相符,最终确定化合物的结构为 Cytochalasin H (图 4、5)。

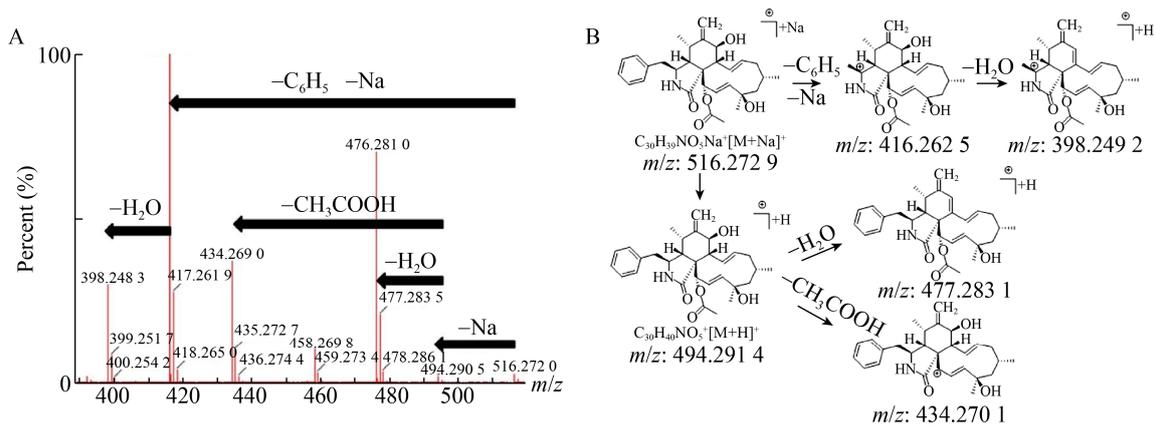


图 4 正离子模式下 Cytochalasin H 的 MS 图(A)和推测的 Cytochalasin H 裂解途径(B)

Figure 4 Positive MS spectrum of Cytochalasin H (A) and putative fragmentation pathway of Cytochalasin H (B)

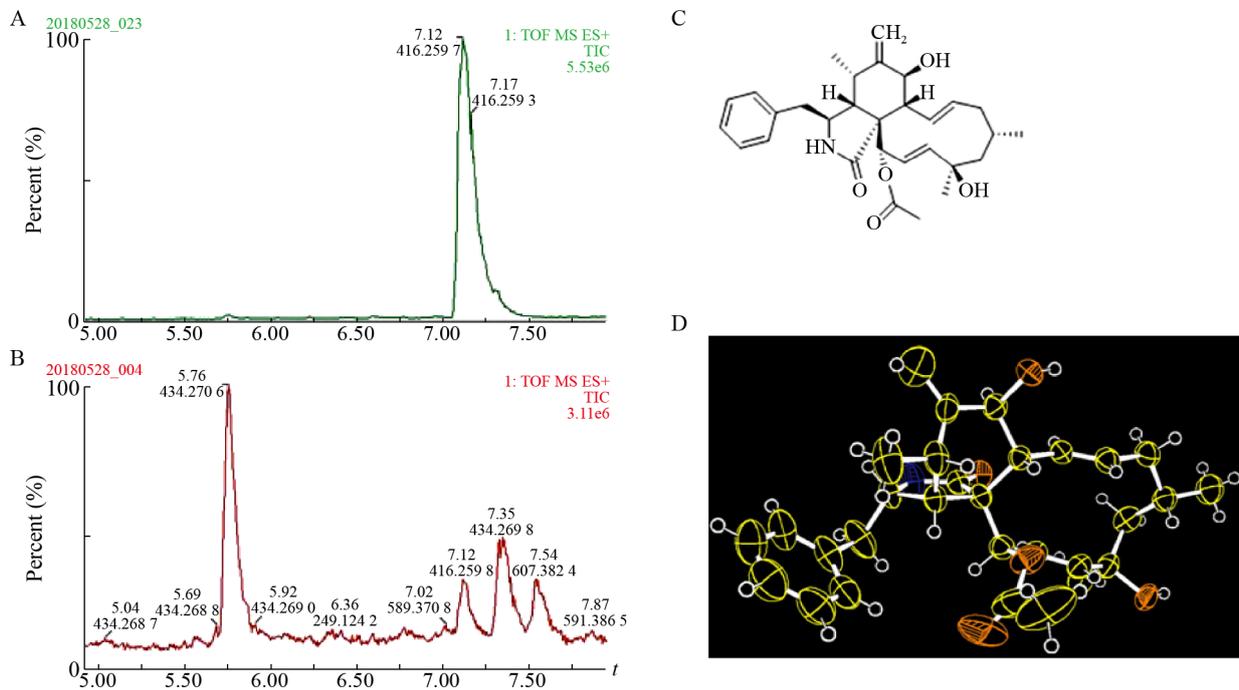


图 5 Cytochalasin H (A)与 *Diaporthe* sp. (B)的总离子流图和 Cytochalasin H 化学结构(C)及 Cytochalasin H 单晶衍射(D)

Figure 5 BPI chromatogram of Cytochalasin H (A) and *Diaporthe* sp. (B), chemical structure of Cytochalasin H (C), and single-crystal X-ray diffraction of Cytochalasin H (D)

2.6 *Diaporthe* sp.产生的 Cytochalasin H 的抗菌活性

抗菌活性结果显示, 该化合物对枯草芽孢杆菌表现较好的抑制活性, MIC 为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌表现较弱抑制活性, MIC 为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对大肠埃希菌无抑制活性(MIC>128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 链霉素为阳性对照(MIC 为 1–5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

3 讨论与结论

自弗莱明最早发现青霉素^[21]以来, 20 世纪 40–80 年代是抗生素发现的黄金时期, 一系列不同结构类型抗生素被发现和应用于临床, 如 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类和大环内酯类等^[22]。然而, 随着人们获取环境微生物手段的不断更新, 新发现抗生素的进度反而缓慢。据统计, 20 世纪 90 年代以后, 只有 3 种新型抗生素被发现^[23], 最主要的原因是已知化合物的大量重复分离, 导致人力和研究经费的浪费。尽管很多科研人员在去重复方面做了大量探索, 然而各种方法大多具有一定适用范围, 如 UPLC-MS-PCA 通常适用于同属或同种但不同采集地的菌株代谢产物差异性分析, 且仅适用于少量样本分析。UPLC-MS 结合 Antibase 数据库, 需要有较强的质谱裂解原理做基础以及对数据库的依赖, 而很多数据库都是收费的, 有的专用数据库是自建的, 仅限本实验室使用, 且数据库样本需要长期积累^[24]。UPLC-MS 结合分子网络是近几年发展起来的一种比较好的快速去重复技术^[25], 2019 年以来, 已有多篇基于该技术的天然产物化学方面的文章发表在 *American Chemical Society* (ACS) 相关杂志上^[26–28], 其在大样本数量(>1 000)的样品分析中具有很好的优势, 主要是根据化合物质谱碎片信息进行结构聚类, 可快速找到已知和未知结构类型化合物, 现在国内关于该技术的相关报道不多。本研究采用生物活性、DNP 数据库以及 UPLC-QToF-MS 分析相结合的方法寻找抗菌先导化合物, 其优势是可以快速而简便地筛选和发现活

性菌株, 并预测其中主要化学成分的结构类型, 然而本方法也存在一定不足, 如其仅在样本数量相对较少(通常 50 株以内)且次生代谢产物为非新骨架化合物情况下效果较好, 原因是 DNP 检索和 UPLC-QToF-MS 分析主要依靠人为逐个检索和分析, 大样本数量的分析使用该方法则会耗时漫长, 同时很多新骨架化合物并未被收录到 DNP 数据库, 导致该方法对新骨架化合物预测困难。另外, 由于很多菌株化学成分未被研究过, DNP 数据库中也检索不到相应的次生代谢产物结构信息, 使得该数据库的使用受到一定限制。当然, 本研究方法在新骨架化合物的寻找方面并非完全无能为力, 如果使用 DNP 数据库检索不到某一菌株相应的次生代谢产物结构信息, 以及 UPLC-QToF-MS 图谱中出现独特裂解规律的碎片信息等情况, 则说明该菌株极有可能产生新骨架化合物, 值得进一步跟踪研究其化学成分。另外, 在研究过程中借助本方法也可以快速去除一些被大量研究过的无效菌株, 大大节约研究成本。

随着抗生素的大量滥用, 各种耐药菌株 ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella* species, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* species) 不断出现, 急需从各种环境微生物中快速发现活性先导化合物。为了从药用植物内生真菌中寻找抗菌药源分子, 我们对海南传统黎族抗菌药用植物艾纳香的叶片进行了系统内生真菌分离, 并在次生代谢产物方面进行了探索。目前有关艾纳香内生真菌的研究相对较少, 唐青等^[29]2017 年对贵州多地艾纳香内生真菌多样性方面进行了系统研究, 共分离得到 152 株内生真菌, 分属于 11 个属。这提示我们药用植物艾纳香中蕴藏着丰富的内生真菌资源, 然而该研究并未进行活性筛选或次生代谢产物方面研究。元超等^[30–31]2019 年分别对两株艾纳香内生真菌次生代谢产物进行了研究, 发现了一系列结构类型多样、活性广泛的化合物, 显示艾纳香内生真菌是寻找活

性先导化合物的一大类重要的真菌资源,值得深入研究。本研究首次采用生物活性筛选结合 DNP 数据库以及 UPLC-QToF-MS 的策略对艾纳香内生真菌资源进行探索,获得了一株目标菌株 *Diaporthe* sp. 和一个抗菌活性化合物 Cytochalasin H。尽管本研究筛选到了活性成分,然而是个已知化合物,提示我们的研究策略可能存在一定的不足,因此在后续研究中,应该在此方法的基础上重点发挥 UPLC-QToF-MS 的分析功能,筛查化合物的重要碎片信息,为新化合物的发现提供有力支撑。

REFERENCES

- [1] Hou YP, Braun DR, Michel CR, et al. Microbial strain prioritization using metabolomics tools for the discovery of natural products[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(10): 4277-4283
- [2] Dictionary of Natural Products 28.1[EB/OL]. London, Britain: Taylor & Francis Group, 2019. <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>
- [3] El-Elimat T, Figueroa M, Ehrmann BM, et al. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products[J]. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(9): 1709-1716
- [4] Krug D, Zurek G, Schneider B, et al. Efficient mining of myxobacterial metabolite profiles enabled by liquid chromatography-electrospray ionisation-time-of-flight mass spectrometry and compound-based principal component analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 624(1): 97-106
- [5] Laatsch H. AntiBase 2011[EB/OL]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. 2011. <http://wwwuser.gwdg.de/~hlaatsc/antibase.htm>
- [6] Nielsen KF, Månsson M, Rank C, et al. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(11): 2338-2348
- [7] Floros DJ, Jensen PR, Dorrestein PC, et al. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space[J]. *Metabolomics*, 2016, 12(9): 145
- [8] O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations[EB/OL]. London: HM Government and the Wellcome Trust, 2016. <https://www.linkedin.com/pulse/tackling-drug-resistant-infections-globally-report-pooja-bheda>
- [9] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3): 629-661
- [10] Guan LL, Xia QF, Pang YX, et al. Analysis of metabolic pathway of terpenoids in *Blumea balsamifera*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(9): 1585-1591 (in Chinese)
官玲亮, 夏奇峰, 庞玉新, 等. 艾纳香萜类物质生物合成途径分析[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(9): 1585-1591
- [11] de Boer HJ, Cotingting C. Medicinal plants for women's healthcare in Southeast Asia: a meta-analysis of their traditional use, chemical constituents, and pharmacology[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 151(2): 747-767
- [12] Pang YX, Wang D, Fan ZW, et al. *Blumea balsamifera* — a phytochemical and pharmacological review[J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9453-9477
- [13] Kusari S, Lamshöft M, Zühlke S, et al. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin[J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(2): 159-162
- [14] Song B, Zhu XF, Xu BQ, et al. Identification of Kolra fragrant pear calyx-end black spot pathogen and its sequence analysis of ITS, GPD and EF-1 α [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(2): 329-336 (in Chinese)
宋博, 朱晓锋, 徐兵强, 等. 库尔勒香梨果萼黑斑病原鉴定及其 ITS、GPD 和 EF-1 α 序列分析[J]. *园艺学报*, 2016, 43(2): 329-336
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [16] Nilsson RH, Larsson KH, Taylor AFS, et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D259-D264
- [17] Du XN, Gao YH, Zhang Y, et al. Diversity and antibacterial activities of fungi associated with the South China Sea sponge[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(1): 64-73 (in Chinese)
杜晓娜, 高渊皓, 张雁, 等. 一株南海指海绵共附生真菌多样性及其抗菌活性[J]. *菌物学报*, 2019, 38(1): 64-73
- [18] Zhang DH, Noviendri D, Nursid M, et al. 12,13-dihydroxyfumitremorgin C, fumitremorgin C, and brevianamide F, antibacterial diketopiperazine alkaloids from the marine-derived fungus *Pseudallescheria* sp.[J]. *Natural Product Sciences*, 2007, 13(3): 251-254
- [19] Wagenaar MM, Clardy J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint[J]. *Journal of Natural Products*, 2001, 64(8): 1006-1009
- [20] Chen CM, Zhu HC, Li XN, et al. Armochaeglobines A and B, two new indole-based alkaloids from the arthropod-derived fungus *Chaetomium globosum*[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(3): 644-647
- [21] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*[J]. *British Journal of Experimental*

- Pathology, 1929, 10(3): 226-236
- [22] Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(9): 541-548
- [23] Wright GD. Antibiotics: a new hope[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(1): 3-10
- [24] Liu XY, Ashforth E, Ren B, et al. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63(8): 415-422
- [25] Koyama N, Tomoda H. MS network-based screening for new antibiotics discovery[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2019, 72(1): 54-56
- [26] Hou XM, Li YY, Shi YW, et al. Integrating molecular networking and ¹H NMR to target the isolation of chrysoeamides from a library of marine-derived *Penicillium* fungi[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2019, 84(3): 1228-1237
- [27] Woo S, Kang KB, Kim J, et al. Molecular networking reveals the chemical diversity of Selaginellin derivatives, natural phosphodiesterase-4 inhibitors from *Selaginella tamariscina*[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(7): 1820-1830
- [28] Mudalungu CM, von Törne WJ, Voigt K, et al. Noursamycins, chlorinated cyclohexapeptides identified from molecular networking of *Streptomyces noursei* NTR-SR4[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(6): 1478-1486
- [29] Tang Q, Zhou SX, Lei BX, et al. Diversity of endophytic fungi from *Blumea balsamifera* in Southwest Guizhou[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(11): 1498-1503 (in Chinese)
唐青, 周思旋, 雷帮星, 等. 贵州西南部艾纳香内生真菌多样性研究[J]. *菌物学报*, 2017, 36(11): 1498-1503
- [30] Yuan C, Li G, Zhang YB, et al. Secondary metabolites of an endophytic fungus *Diaporthe* sp. derived from *Blumea balsamifera* (L.) DC.[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(4): 753-761 (in Chinese)
元超, 李刚, 张影波, 等. 艾纳香内生真菌 *Diaporthe* sp. 次生代谢产物[J]. *微生物学报*, 2019, 59(4): 753-761
- [31] Yuan C, Guo YH, Zhang YB, et al. Secondary metabolites from *Corynespora cassiicola* J9, an endophytic fungus associated with *Blumea balsamifera* (L.) DC.[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2019, 54(5): 892-896 (in Chinese)
元超, 郭玉华, 张影波, 等. 艾纳香内生真菌 *Corynespora cassiicola* J9 次生代谢产物研究[J]. *药学学报*, 2019, 54(5): 892-896