

鹿衔草内生真菌 *Penicillium solitum* 次生代谢产物的分离鉴定与神经保护活性筛选

梅佳辉¹, 杨曦亮^{*1}, 方伟², 杨素梅¹, 任梦瑶¹, 汪超¹, 王强¹, 邹瑜¹

1 武汉科技大学医学院药学系药物先进技术研究所 感染免疫与肿瘤微环境研究所 职业危害识别与控制湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430081

2 湖北省生物农药工程研究中心, 湖北 武汉 430064

梅佳辉, 杨曦亮, 方伟, 杨素梅, 任梦瑶, 汪超, 王强, 邹瑜. 鹿衔草内生真菌 *Penicillium solitum* 次生代谢产物的分离鉴定与神经保护活性筛选[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3784-3797

Mei Jiahui, Yang Xiliang, Fang Wei, Yang Sumei, Ren Mengyao, Wang Chao, Wang Qiang, Zou Yu. Isolation, identification, and neuroprotective activity screening of secondary metabolites of endophytic *Penicillium solitum* from *Pyrola incarnata* Fisch[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3784-3797

摘要: 【背景】鹿衔草(*Pyrola incarnata* Fisch)化学成分丰富, 而且具有多种药理活性, 在食品、医药领域得到广泛应用, 但尚未见其内生真菌次生代谢产物的相关报道。【目的】对鹿衔草内生真菌 *Penicillium solitum* (*P. solitum*)的次生代谢产物进行分离鉴定, 筛选出具有抗神经炎症的活性成分。【方法】采用柱层析和制备型高效液相色谱对鹿衔草内生真菌 *P. solitum* 次生代谢产物进行分离和纯化, 通过核磁共振和高分辨质谱进行结构鉴定, 利用反向分子对接技术筛选出抗神经炎症活性的化合物, 采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 BV-2 细胞炎症模型进行验证。【结果】从鹿衔草内生真菌 *P. solitum* 次生代谢产物中分离鉴定出 12 个化合物, 分别为 cyclophenin (1)、dehydrocyclopeptin (2)、viridicatin (3)、对羟基苯甲酸(4)、吲哚乙酸(5)、methyl compactin (6)、cyclopeptine (7)、cyclophenol (8)、原儿茶酸(9)、viridicatol (10)、N-[2-(3-indolyl)ethyl]malonamic acid (11)和 solitumidine A (12)。分子对接结果显示化合物 11 与炎症相关的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, 简称 p38)和细胞外信号调节激酶 1 (extracellular regulated protein kinase 1, ERK1)有较高的结合活性。BV-2 细胞实验表明, 化合物 11 (10、20 μmol/L)能显著提高 BV-2 细胞存活率, 并有效抑制炎症因子(肿瘤坏死因子-α、白介素-1β、白介素-6)和一氧化氮的释放。【结论】化合物 11 是新天然产物, 具有抗神经炎症活性, 其作用机制可能与抑制 MAPK 信

基金项目: 国家自然科学基金(31900286); 湖北省自然科学基金(2020CFB521); 湖北省大学生创新训练项目(S202010488012)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31900286); Natural Science Foundation of Hubei Province (2020CFB521); Innovation Training Project for College Students of Hubei Province (S202010488012)

*Corresponding author: E-mail: yxlyx1117@163.com

Received: 2022-01-10; Accepted: 2022-03-18; Published online: 2022-04-16

号通路中 p38 和 ERK 蛋白的表达有关。

关键词: 中草药; 真菌; 青霉属; 分子对接; 神经炎症

Isolation, identification, and neuroprotective activity screening of secondary metabolites of endophytic *Penicillium solitum* from *Pyrola incarnata* Fisch

MEI Jiahui¹, YANG Xiliang^{*1}, FANG Wei², YANG Sumei¹, REN Mengyao¹, WANG Chao¹, WANG Qiang¹, ZOU Yu¹

¹ Department of Pharmacy, Institute of Advanced Pharmaceutical Technology, Hubei Province Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Institute of Infection, Immunology and Tumor Microenvironments, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei, China

² Hubei Biopesticide Engineering Research Center, Wuhan 430064, Hubei, China

Abstract: **[Background]** *Pyrola incarnata* Fisch (*P. incarnata*) has been widely used in the fields of food and medicine owing to the abundant chemical components with a variety of pharmacological activities. However, no report on the secondary metabolites of its endophytic fungi is available. **[Objective]** To isolate and identify the secondary metabolites of endophytic *Penicillium solitum* from *P. incarnata* and screen out the ones with anti-neuroinflammatory activity. **[Methods]** They were isolated and purified by column chromatography and preparative high performance liquid chromatography (HPLC). The structures were identified by nuclear magnetic resonance (NMR) and high-resolution mass spectrometry (HRMS). Moreover, the anti-neuroinflammatory activity was verified in LPS-induced inflammatory BV-2 cells by reverse docking. **[Results]** A total of 12 compounds were isolated and identified: cyclopenin (1), dehydrocyclopeptin (2), viridicatin (3), *p*-hydroxybenzoic acid (4), indoleacetic acid (5), methyl compactin (6), cyclopeptine (7), cyclophenol (8), protocatechuic acid (9), viridicatol (10), N-[2-(3-indolyl)ethyl]malonamic acid (11), solitumidine A (12). Molecular docking showed that compound 11 had remarkable binding activity to p38 mitogen-activated protein kinase (p38) and extracellular regulated protein kinase 1 (ERK1) in mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway which was associated with inflammation. In the experiment on BV-2 cells, compound 11 (10, 20 μmol/L) significantly improved the survival rate of BV-2 cells. Moreover, it inhibited the release of inflammatory factors (tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, and interleukin-6) and nitric oxide (NO) in BV-2 cells induced by LPS. **[Conclusion]** Compound 11 is a new natural product with potential anti-neuroinflammatory activities, and the mechanism is the likelihood that it inhibits the expression of p38 and ERK proteins in MAPK signal pathway, which needs further investigation.

Keywords: Chinese herbal medicine; fungi; *Penicillium*; molecular docking; neuroinflammation

植物内生真菌是指寄居在健康植物组织内部而不引起植物明显感染迹象的一类真菌^[1]。植物内

生真菌是重要的天然产物来源, 具有丰富的化学结构和生物活性多样性。植物内生真菌的次生代

谢产物研究已成为活性化合物筛选的一条重要途径^[2]。鹿衔草是传统中草药,具有补肾填髓、祛风除湿、强筋健骨等作用,被用来治疗类风湿关节炎、高血压、心血管疾病,提高机体免疫力等^[3-5]。前期课题组对鹿衔草进行了较为系统的化学成分研究,在传统中医药“肾通于脑”的理论指导下,对其活性成分的神经保护作用 and 潜在的药理机制进行了持续探究^[6-7]。截至目前,对于鹿衔草内生真菌次生代谢产物的研究未见报道。

本研究从鹿衔草中分离出内生真菌 *Penicillium solitum* (*P. solitum*), 并对该真菌次生代谢产物进行分离鉴定,采用反向对接将分离得到的化合物与神经炎症相关蛋白进行对接,在其指引下筛选出抗神经炎症的潜在活性化合物,并在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 BV-2 细胞炎症模型上进行验证。本研究以期后续鹿衔草内生真菌的药效物质基础及其活性研究提供参考,同时为新颖神经退行性疾病药物的开发提供先导化合物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物

鹿衔草于 2019 年 10 月在黑龙江省大兴安岭地区加格达奇区采集,植物样本经过干燥处理(编号 191001-01)存放于武汉科技大学医学院药理学系天然药化实验室。

1.1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 加蒸馏水定容至 1 L, 不加琼脂为 PDB 培养基, 0.1 MPa 高压灭菌 30 min, 冷却后备用。大米培养基: 190 mL 蒸馏水, 150.0 g 大米, 0.1 MPa 高压灭菌 30 min, 冷却后备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

柱层析硅胶(200-300 目), 青岛海洋化工厂

分厂; MTT, Sigma 公司; BV-2 细胞, 武汉 Procell 公司; 胎牛血清和 DMEM 培养基, Hyclone 公司; 一氧化氮检测试剂盒, 南京建成公司; ELISA 试剂盒, Immunoway 公司。超高效液质联用仪、制备型高效液相色谱仪、C18 OBD 制备柱(19 mm×250 mm/10 mm×250 mm, 5 μm), Waters 公司; 核磁共振仪, Bruker BioSpin 技术有限公司; 倒置相差显微镜, Olympus 公司; 超高分辨质谱仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 菌株的分离纯化

将鹿衔草洗净室温干燥, 叶片用 75%乙醇表面消毒后, 无菌水冲洗 3 次, 用灭菌的剪刀将其剪成 1 cm 左右的小方块, 转移至灭菌的研钵中研碎, 加入 5 mL 无菌水, 再继续研磨均匀。使用移液枪吸取研钵中混匀的液体 100 μL 至 PDA 平板上, 用无菌刮刀将菌液在平板上涂布均匀。将处理好的平板先平放于桌面 30 min 左右, 以便菌液能够完全渗透入培养基内, 再将平板翻转, 28 °C 培养 5 d, 观察到平板上有菌落形成后, 挑取单菌落至新的培养基上, 28 °C 恒温培养 3 d, 重复操作, 直至观察到单菌落状态, 将纯化好的菌种转移到甘油管中, 编号并低温保存。

1.3 菌株的发酵

将低温保存的菌种转移至 PDA 平板上活化, 28 °C 培养 3 d, 将活化好的菌株接种至 8 瓶装有 100 mL PDB 培养基的锥形瓶中, 28 °C、150 r/min 避光培养 48 h 获得种子液, 按 20% 的接种量接种至 30 瓶大米培养基中, 无菌搅拌均匀, 28 °C 避光静置培养 15 d。

1.4 菌株次生代谢产物提取、分离和鉴定

发酵结束后每瓶加入 500 mL 乙酸乙酯, 合并, 搅拌 2 h 后静置, 萃取 3 次, 两层纱布过滤, 合并滤液, 减压浓缩得到浸膏 115.3 g, 进行硅胶(200-300 目)柱层析, 用石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇体积比为 15:1:0-0:0:1 进行梯度洗脱,

通过超高效液质联用仪进行组分分析, 合并相同部分, 共得到 9 组分(Fr.1-9)。Fr.5 组分(8.3 g)经制备型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)梯度洗脱(流动相均为乙腈和水) 30 min, 流速 24 mL/min, 得到化合物 **1** (2.61 mg, $T_R=7.69$ min)、**2** (62.77 mg, $T_R=8.91$ min)和 **3** (9.53 mg, $T_R=10.76$ min); Fr.6 组分(18.3 g)分别经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(甲醇洗脱), 制备型 HPLC 梯度洗脱 30 min, 流速 7.5 mL/min, 得到化合物 **4** (18.05 mg, $T_R=9.45$ min)和 **5** (5.81 mg, $T_R=11.60$ min); Fr.7 组分(45.3 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(甲醇洗脱), 分离获得组分 Fr.7.1-7.6, Fr.7.1 经制备型 HPLC 梯度洗脱 32 min, 流速 24 mL/min, 纯化得到化合物 **6** (6.21 mg, $T_R=16.72$ min); Fr.7.2 经制备型 HPLC 梯度洗脱 28 min, 流速 20 mL/min, 纯化得到化合物 **7** (5.31 mg, $T_R=15.89$ min); Fr.7.4 经制备型 HPLC 梯度洗脱 30 min, 流速 20 mL/min, 纯化得到化合物 **8** (6.21 mg, $T_R=16.72$ min); Fr.7.5 经制备型 HPLC 梯度洗脱 40 min, 流速 24 mL/min, 纯化得到化合物 **9** (7.79 mg, $T_R=7.24$ min); Fr.7.6 经制备型 HPLC 梯度洗脱 23 min, 流速 20 mL/min, 纯化得到化合物 **10** (4.01 mg, $T_R=8.38$ min); Fr.8 组分(5.3 g)经制备型 HPLC 梯度洗脱 28 min, 流速 24 mL/min, 得到化合物 **11** (20.23 mg, $T_R=12.50$ min); Fr.9 组分(4.6 g)经制备型 HPLC 梯度洗脱 27 min, 流速 24 mL/min, 得到化合物 **12** (2.86 mg, $T_R=8.67$ min)。化合物采用一维、二维核磁(nuclear magnetic resonance, NMR)及高分辨质谱(high-resolution mass spectrometry, HRMS)进行结构鉴定, 并结合相关文献确证。

1.5 化合物活性研究

1.5.1 化合物与神经炎症相关靶点蛋白分子对接

通过检索文献[6,8], 优先选择只含一个配

体、解析度高的人源蛋白, 最终确定 6 个与神经炎症相关的靶点蛋白作为对接受体蛋白, 包括诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, 简称 p38)、大麻素受体 2 (cannabinoid receptor 2, CNR2)和细胞外信号调节激酶 1 (extracellular regulated protein kinase 1, ERK1), 从 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org>)下载蛋白晶体结构的 pdb 文件, 使用 ChemOffice 构建化合物 3D 结构。运用 Discovery studio 4.0 软件(软件版权来源于中国药科大学)对化合物结构进行空间构象优化, 对靶点蛋白加氢、去水、补全氨基酸残基等处理, 以原配体的空间结构为中心定义活性口袋, 其余对接参数默认。运用 CDOCKER 模块对化合物和靶点蛋白进行半柔性对接打分, 根据打分值(-CDOCKER_ENERGY)来确定具有潜在抗神经炎症的化合物, 原配体与靶点蛋白重新对接, 其对接打分为阈值, 均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD)<2 Å 说明分子对接结果能较好地反映原配体和靶点蛋白的结合模式。若对接打分值超过阈值, 说明化合物与靶点蛋白有结合活性, 反之无结合活性。筛选出具有潜在抗神经炎症活性的化合物, 并对构象进行可视化分析。

1.5.2 四甲基偶氮唑盐(terazolium, MTT)比色法测定细胞存活率

BV-2 细胞用含有 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 待细胞密度达到 80%时接种到 96 孔板中(1×10^4 个/孔), 在 37 °C 培养 24 h, 待细胞贴壁。实验设置空白组、LPS (5 μg/mL)模型组、阳性药物多奈哌齐(20 μg/mL)组和化合物 **11**

(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)组, 每组 5 个复孔。化合物 11 组加入不同浓度的化合物, 除空白组外, 其余组均加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS, 细胞经药物预处理 4 h 后再加 LPS 处理。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h, 吸除上清液, 加入 150 μL DMSO 溶液, 振荡 10 min 溶解结晶, 使用酶标仪测定细胞在 490 nm 波长处的吸光度值, 计算细胞存活率。

1.5.3 Griess 法测定 NO 水平

实验各组设置同上, 化合物 11 组加入不同浓度的化合物, 除空白组外, 其余组均加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS, 细胞经药物预处理 4 h 后再加 LPS 处理。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, 每组细胞取 100 μL 上清液与等体积的 Griess 反应试剂混合, 室温下共同孵育 15 min, 全自动酶标仪测定各孔在 550 nm 波长的吸光度值。

1.5.4 ELISA 法测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平

实验各组设置同上, 化合物 11 组加入不同浓度的化合物, 除空白组外, 其余各组均加入

5 $\mu\text{g/mL}$ LPS, 细胞经药物预处理 4 h 后再加 LPS 处理。4 $^{\circ}\text{C}$ 共同孵育 24 h, 3 000 r/min 离心 20 min 取上清液, 测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。

1.5.5 统计学处理

所有数据用 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示, 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据统计分析和作图, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

纯化后编号为 LXC-15 菌株的 ITS 序列(包括 ITS1、5.8S 和 ITS2)长度为 491 bp, 将其提交至 GenBank, 得到登录号为 ON164812.1。利用 BLAST 对该序列进行相似性分析, 将所获与其相似的序列通过 Muscle^[9]进行多序列比对, 比对结果通过 trimAl V1.2 (official release)软件^[10]的 automated 方法对齐, 之后通过 MEGA-X V10.1.7^[11]采用邻接法构建系统发育树, bootstrap 值重复计算 1 000 次(图 1)。结果显示,

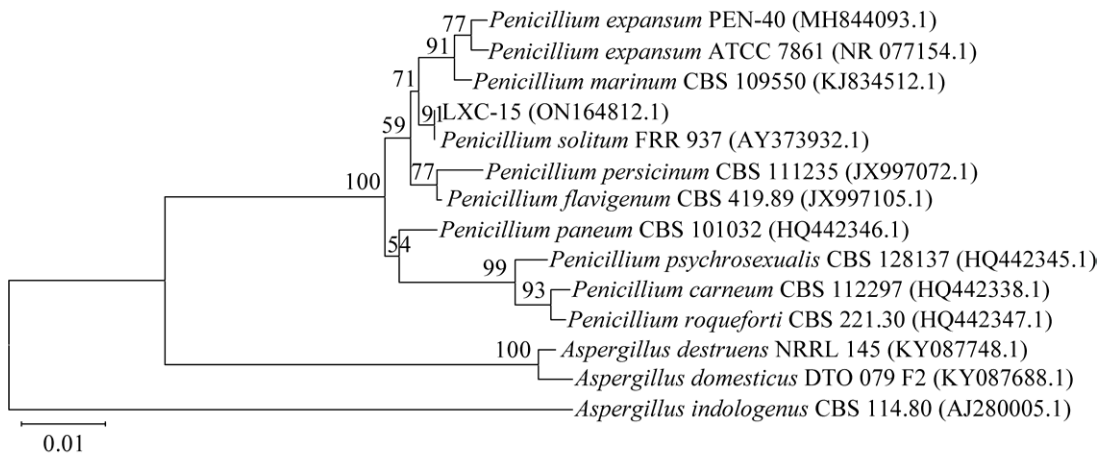


图 1 LXC-15 菌株基于 ITS 序列构建的系统发育树 分支处数值表示 bootstrap 值; 括号内序号为菌株的 GenBank 登录号; 数值 0.01 代表序列偏差值

Figure 1 Phylogenetic tree of LXC-15 strain based on ITS sequence similarity. Numbers at branch nodes present bootstrap value; The serial number in brackets is the GenBank accession No. of the strain; The value 0.01 represents the sequence deviation.

LXC-15 菌株与 *Penicillium solitum* FRR 937 (AY373932.1) (该种模式序列)亲缘关系最近, 相似性为 100%, 因此确定该株真菌为 *Penicillium solitum*。

2.2 化合物结构鉴定结果

化合物 1: 白色固体, 分子式为 $C_{17}H_{14}N_2O_3$, ESI-MS m/z : 293 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.57 (1H, m, H-5), 7.30 (1H, t, $J=7.2$ Hz, H-14), 7.25 (1H, dd, $J=1.0, 7.8$ Hz, H-4), 7.22 (2H, t, $J=7.8$ Hz, H-13,15), 7.16 (1H, td, $J=1.0, 7.8, 8.0$ Hz, H-6), 7.14 (1H, dd, $J=1.0, 7.8$ Hz, H-7), 6.69 (2H, d, $J=7.4$ Hz, H-12,16), 4.17 (1H, s, H-17), 3.20 (3H, s, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 168.6 (C-1), 168.4 (C-3), 136.6 (C-8), 134.1 (C-5), 132.2 (C-4), 132.1 (C-11), 130.1 (C-14), 129.2 (C-13), 129.2 (C-15), 128.0 (C-9), 127.3 (C-12), 127.3 (C-16), 126.1 (C-6), 122.4 (C-7), 71.8 (C-2), 66.0 (C-17), 31.6 (C-10)。以上数据与文献[12]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 1 为 cyclopenin。

化合物 2: 白色固体, 分子式为 $C_{17}H_{14}N_2O_2$, ESI-MS m/z : 277 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.91 (1H, dd, $J=1.4, 7.9$ Hz, H-6), 7.53 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-8), 7.40 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-12,16), 7.36 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-14), 7.34 (2H, d, $J=7.0$ Hz, H-13,15), 7.28 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-7), 7.14 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-9), 6.91 (1H, s, H-10), 3.11 (3H, s, H-17); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 172.3 (C-2), 169.0 (C-5), 137.9 (C-9a), 135.3 (C-11), 134.1 (C-8), 133.6 (C-5a), 131.8 (C-6), 131.8 (C-10), 130.9 (C-3), 130.2 (C-13,15), 130.1 (C-12,16), 126.7 (C-14), 125.9 (C-7), 122.0 (C-9), 36.1 (C-17)。以上数据与文献[13]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 2 为 dehydrocyclopeptin。

化合物 3: 白色固体, 分子式为 $C_{15}H_{11}NO_2$, ESI-MS m/z : 236 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.28 (1H, s, 1-NH), 9.25 (1H, s, 3-OH), 7.56 (2H, t, $J=7.4$ Hz, H-3',5'), 7.49 (1H, t, $J=7.4$ Hz, H-4'), 7.39 (2H, m, H-7,8), 7.38 (2H, m, H-2',6'), 7.13 (2H, m, H-5,6); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 158.5 (C-2), 142.7 (C-8a), 134.0 (C-1'), 133.3 (C-3), 130.0 (C-2',6'), 128.5 (C-3',5'), 127.8 (C-4'), 126.6 (C-7), 124.5 (C-5), 124.1 (C-4), 121.1 (C-4a), 122.3 (C-6), 115.5 (C-8)。以上数据与文献[14]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 3 为 viridicatin。

化合物 4: 无色针晶, 分子式为 $C_7H_6O_3$, ESI-MS m/z : 137 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.03 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2,6), 6.69 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3,5); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 173.4 (C-7), 156.2 (C-4), 130.5 (C-2,6), 125.3 (C-1), 115.2 (C-3,5)。以上数据与文献[15]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 4 为对羟基苯甲酸。

化合物 5: 淡黄色油状物, 分子式为 $C_{10}H_9NO_2$, ESI-MS m/z : 174 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.93 (1H, s, NH), 7.49 (1H, dd, $J=1.8, 7.5$ Hz, H-4), 7.35 (1H, dd, $J=1.8, 7.5$ Hz, H-7), 7.23 (1H, s, H-2), 7.07 (1H, m, H-6), 6.98 (1H, m, H-5), 3.63 (2H, s, H-8); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 173.3 (C-9), 136.3 (C-7a), 127.4 (C-3a), 124.1 (C-2), 121.1 (C-6), 118.7 (C-5), 118.6 (C-4), 111.5 (C-7), 107.8 (C-3), 31.2 (C-8)。以上数据与文献[16]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 5 为吡啶-3-乙酸。

化合物 6: 无色针晶, 分子式为 $C_{24}H_{38}O_6$, ESI-MS m/z : 423 [M+H]⁻; ¹H NMR (500 MHz,

CD₃OD) δ 5.96 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H-4), 5.74 (1H, dd, $J=6.3, 9.9$ Hz, H-3), 5.52 (1H, br s, H-5), 5.34 (1H, br d, $J=2.7$ Hz, H-8), 4.18 (1H, m, H-13), 3.79 (1H, m, H-11), 3.68 (3H, s, H-16), 3.48 (1H, s, H_b-14), 2.51 (1H, m, H_a-14), 2.44 (1H, m, H_b-12), 2.33-2.43 (5H, m, overlapped, H-2,2',6,8a), 1.92 (2H, br s, 11,13-OH), 1.38-1.70 (9H, m, overlapped, H-1, H_a-7,9,12,3', H_b-7,9,10,3'), 1.30 (1H, m, H_a-10), 1.12 (3H, d, $J=7.8$ Hz, 2'-Me), 0.91 (3H, d, $J=3.6$ Hz, 2-Me), 0.89 (3H, t, $J=3.9$ Hz, H-4'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 176.8 (C-1'), 172.2 (C-15), 133.8 (C-3), 132.3 (C-4a), 129.3 (C-5), 127.9 (C-4), 70.0 (C-11), 67.8 (C-13), 66.7 (C-8), 50.5 (C-16), 43.3 (C-14), 41.5 (C-12), 41.5 (C-2'), 37.2 (C-8a), 36.9 (C-1), 35.0 (C-10), 31.5 (C-7), 30.6 (C-2), 26.6 (C-6), 26.4 (C-3'), 25.6 (C-9), 15.9 (2'-Me), 12.9 (2-Me), 10.7 (C-4')。以上数据与甲酯型莫纳克林 K 文献[17]的报道比较, 化合物 6 的 C-6 上缺少一个甲基碳(δ 22.8)和甲基氢(δ 1.08)信号, 其他位置的波谱数据与文献报道的甲酯型莫纳克林 K 基本一致, 因此鉴定化合物 6 为 methyl compactin。

化合物 7: 无色晶体, 分子式为 C₁₇H₁₆N₂O₂, ESI-MS m/z : 279 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.48 (1H, br s, H-1), 7.96 (1H, d, $J=7.68$ Hz, H-6), 7.83 (1H, d, $J=7.68$ Hz, H-6), 7.60 (1H, t, $J=7.68$ Hz, H-8), 7.53 (1H, t, $J=7.68$ Hz, H-8), 7.35 (2H, t, $J=7.68$ Hz, H-7), 7.23-7.29 (6H, m, H-12, 14, 16), 7.17 (4H, d, $J=8.28$ Hz, H-13, 15), 7.08 (1H, d, $J=7.68$ Hz, H-9), 7.04 (1H, d, $J=7.68$ Hz, H-9), 4.43 (1H, t, $J=7.14$ Hz, H-3), 4.33 (1H, dd, $J=6.06, 11.04$ Hz, H-3), 3.43 (1H, m, H-10), 3.27 (1H, m, H-10), 3.08 (3H, s, H-17), 2.92 (3H, s,

H-17), 2.80 (1H, m, H-10), 2.68 (1H, m, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 172.3 (C-2), 171.2 (C-2), 170.7 (C-5), 168.3 (C-5), 138.2 (C-11), 138.0 (C-11), 137.2 (C-9a), 137.0 (C-9a), 134.2 (C-8), 133.8 (C-8), 132.3 (C-6), 131.8 (C-6), 130.1 (C-12, 16), 130.0 (C-12, 16), 129.8 (C-13, 15), 129.7 (C-13, 15), 128.3 (C-14), 128.2 (C-14), 127.8 (C-5a), 127.7 (C-5a), 126.0 (C-7), 125.9 (C-7), 122.1 (C-9), 121.6 (C-9), 69.8 (C-3), 57.9 (C-3), 39.8 (C-17), 29.6 (C-17), 32.9 (C-10), 30.6 (C-10)。以上数据与文献[18]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 7 为 cyclopeptin。

化合物 8: 白色晶体, 分子式为 C₁₇H₁₄N₂O₄, ESI-MS m/z : 309 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.47 (1H, s, 13-OH), 7.54 (1H, td, $J=1.8, 7.0, 7.0$ Hz, H-5), 7.24 (1H, dd, $J=0.7, 7.8$ Hz, H-7), 7.18 (1H, dd, $J=1.7, 7.8$ Hz, H-4), 7.11 (1H, td, $J=1.0, 7.2, 7.8$ Hz, H-6), 6.98 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-15), 6.67 (1H, dt, $J=1.8, 7.0, 7.8$ Hz, H-14), 6.26 (1H, t, $J=1.8$ Hz, H-12), 6.00 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-16), 4.61 (1H, s, NH), 4.24 (1H, s, H-17), 3.06 (3H, s, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 166.1 (C-1), 165.5 (C-3), 157.1 (C-13), 135.3 (C-8), 132.5 (C-5), 132.5 (C-11), 130.7 (C-4), 129.1 (C-15), 126.6 (C-9), 124.4 (C-6), 121.2 (C-7), 117.1 (C-16), 115.9 (C-14), 112.9 (C-12), 70.3 (C-2), 63.9 (C-17), 31.0 (C-10)。以上数据与文献[12]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 8 为 cyclophenol。

化合物 9: 无色针晶, 分子式为 C₇H₆O₄, ESI-MS m/z : 153 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.44 (1H, br s, H-2), 7.42 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-5)。

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) 170.3 (C=O), 151.5 (C-4), 146.0 (C-3), 123.9 (C-6), 123.2 (C-1), 117.7 (C-5), 115.7 (C-2)。以上数据与文献[15]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 **9** 为原儿茶酸。

化合物 **10**: 棕褐色粉末, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3$, ESI-MS m/z : 252 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.12 (1H, s, 1-NH), 9.52 (1H, s, 3-OH), 9.10 (1H, s, 3'-OH), 7.28-7.34 (3H, m, H-5',7,8), 7.06-7.11 (2H, m, H-5,6), 6.83 (1H, dd, $J=1.5, 8.3$ Hz, H-4'), 6.73 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6'), 6.71 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-2'); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 158.3 (C-2), 157.4 (C-3), 140.9 (C-3'), 134.3 (-C1'), 133.1 (C-8a), 129.5 (C-5'), 126.4 (C-7), 124.5 (C-5), 124.1 (C-4), 122.2 (C-6), 120.9 (C-4a), 120.6 (C-6'), 116.9 (C-2'), 115.4 (C-8), 114.7 (C-4')。以上数据与文献[19]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 **10** 为 viridicatol。

化合物 **11**: 白色粉末, 分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$, HR-MS m/z : 245.092 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值为 245.092 5); ^1H 、 ^{13}C NMR 以及 DEPT 图谱表明, 化合物含有 2 个羰基、3 个亚甲基、5 个次甲基、5 个季碳, 根据 ^1H 和 ^{13}C -NMR 数据推测具有吲哚母核, 进一步结合 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 和 HMBC 图谱(图 2), 鉴定其结构为

N-[2-(3-indolyl)ethyl]malonamic acid。通过 Scifinder 检索, 化合物 **11** 在文献中仅通过合成得到^[20], 确定化合物 **11** 是新的天然产物, 相关波谱数据未见报道。化合物 **11** 的波谱数据如表 1 所示。

化合物 **12**: 棕色粉末, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$, ESI-MS m/z : 356 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.47 (1H, s, NH-1), 8.20 (1H, t, $J=5.0$ Hz, NH-15), 7.49 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-7), 7.29 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-4), 7.00 (1H, ddd, $J=1.0, 7.1, 8.3$ Hz, H-6), 6.94 (1H, ddd, $J=1.0, 7.1, 8.3$ Hz, H-5), 6.13 (1H, dd, $J=10.6, 17.3$ Hz, H-9), 5.06 (1H, dd, $J=1.0, 17.3$ Hz, H-10a), 5.05 (1H, dd, $J=1.0, 10.6$ Hz, H-10b), 3.32 (1H, bt, $J=5.4$ Hz, H-19), 3.17 (2H, m, H-14), 2.85 (2H, dd, $J=7.4, 8.3$ Hz, H-13), 2.26 (2H, m, H-17), 1.90 (2H, m, H-18), 1.49 (3H, s, H-11), 1.49 (3H, m, H-12); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 172.0 (C-16), 170.7 (C-20), 146.4 (C-9), 140.2 (C-2), 134.8 (C-7a), 129.2 (C-3a), 120.5 (C-6), 118.4 (C-5), 117.7 (C-7), 111.1 (C-4), 111.1 (C-10), 107.2 (C-3), 54.0 (C-19), 38.9 (C-8), 39.9 (C-14), 32.2 (C-17), 28.0 (C-11), 28.0 (C-12), 27.3 (C-18), 25.5 (C-13)。以上数据与文献[21]的报道基本一

表 1 化合物 **11** 的 ^1H -NMR (500 MHz) 和 ^{13}C -NMR (125 MHz) 波谱数据 ($\text{DMSO}-d_6$)

Table 1 ^1H -NMR(500 MHz) and ^{13}C -NMR(125 MHz) of compound 11($\text{DMSO}-d_6$)

C	δ_{C}	δ_{H}	C	δ_{C}	δ_{H}
1	/	10.82 (1H, br s)	7a	136.3	/
2	122.7	7.16 (1H, d, $J=1.8$ Hz)	8	25.1	2.84 (2H, t, $J=7.4$ Hz)
3	111.7	/	9	39.5	3.35 (2H, td, $J=7.4, 5.2$ Hz)
3a	127.2	/	10	/	8.19 (1H, t, $J=5.2$ Hz)
4	118.2	7.54 (1H, d, $J=7.8$ Hz)	11	165.8	/
5	118.3	6.98 (1H, t, $J=7.4$ Hz)	12	42.7	3.15 (2H, s)
6	120.9	7.07 (1H, t, $J=7.4$ Hz)	13	169.6	/
7	111.4	7.34 (1H, d, $J=8.1$ Hz)			

注: /: 无 δ_{C} 和 δ_{H}

Note: /: No δ_{C} and δ_{H} .

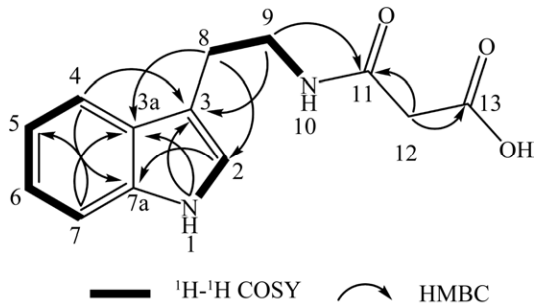


图 2 化合物 11 的主要 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 和 HMBC 相关信号

Figure 2 Key $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations of compound 11.

致, 因此鉴定化合物 12 为 solitumidine A。

从鹿衔草内生真菌 *P. solitum* 的乙酸乙酯

粗提取物中分离纯化得到的 12 个化合物结构见图 3。

2.3 分子对接结果

结果显示, 化合物 11 与 iNOS、PI3K、p38 和 ERK1 的打分值均超过阈值, 而且有较高的结合活性(表 2)。p38 和 ERK1 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中重要蛋白, 化合物 11 与 p38、ERK1 的多种氨基酸残基存在范德华力, 与 3DT1 受体氨基酸残基 ALA111、MET109 形成氢键, 同时与 LEU167 形成疏水相互作用; 与 2ZOQ 受体氨基酸残基 MET125、LYS131、ASP184 和 ILE48 形成氢键, 同时与 LEU173、ALA69 和 VAL56 形成疏水相互作用, 见图 4。

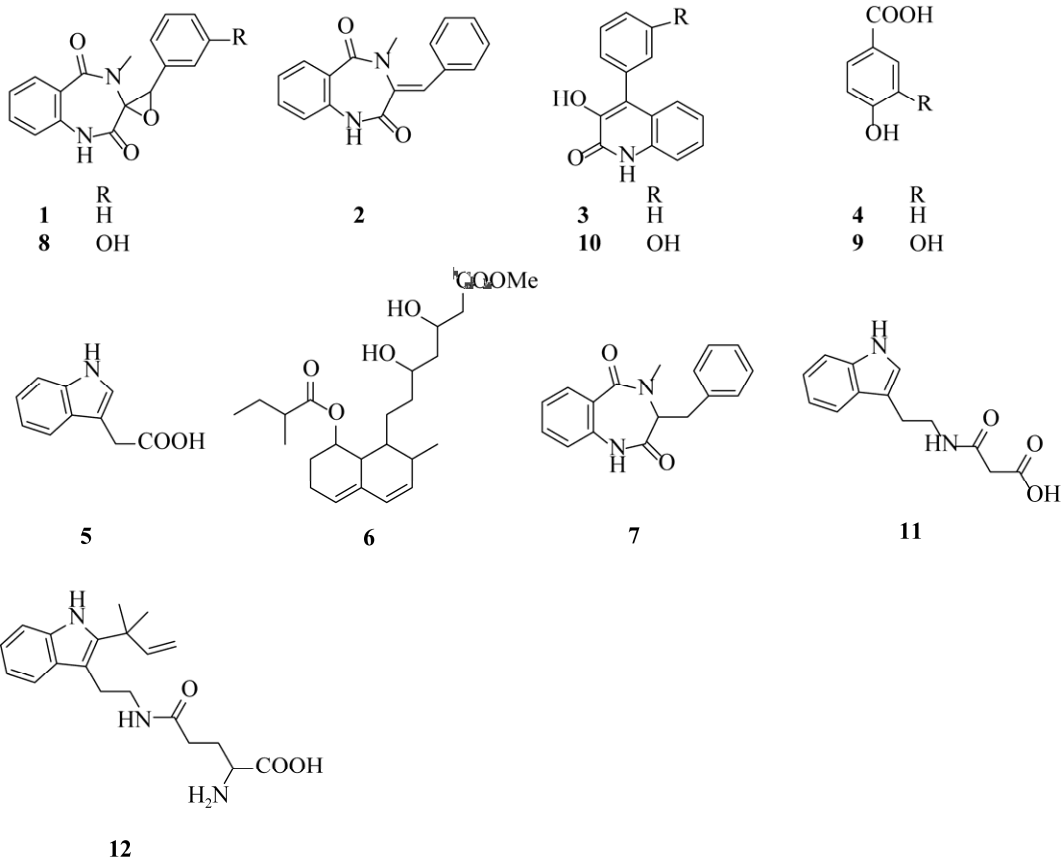


图 3 化合物 1-12 的结构

Figure 3 The structures of compounds 1-12.

表 2 化合物 11 分子对接相关信息

Table 2 Related information of molecular docking model

Proteins	PDB ID	Site sphere				-CDOCKER ENERGY		RMSD(Å)
		x	y	z	r	O.L.	Compound 11	
iNOS	2Y37	4.926 0	-73.731 4	-22.837 9	7.044 7	21.646 6	32.057 4	1.514 5
PI3K	1E7V	20.614 8	62.246 3	21.599 4	6.577 8	24.787 8	46.107 4	0.739 6
SAPK	3V6R	21.950 5	-59.127 5	-15.840 3	11.000 9	39.067 5	35.194 2	1.625 1
p38	3DT1	22.295 5	11.013 2	29.603 7	11.856 6	22.919 8	40.436 1	1.701 0
CNR2	6KPC	10.510 4	1.389 9	-45.075 4	9.525 1	46.371 9	42.055 0	0.672 1
ERK1	2ZOQ	0.701 2	-22.751 4	49.430 2	6.065 3	19.970 1	38.670 8	0.984 3

注: O.L.: 原配体

Note: O.L.: original ligand.

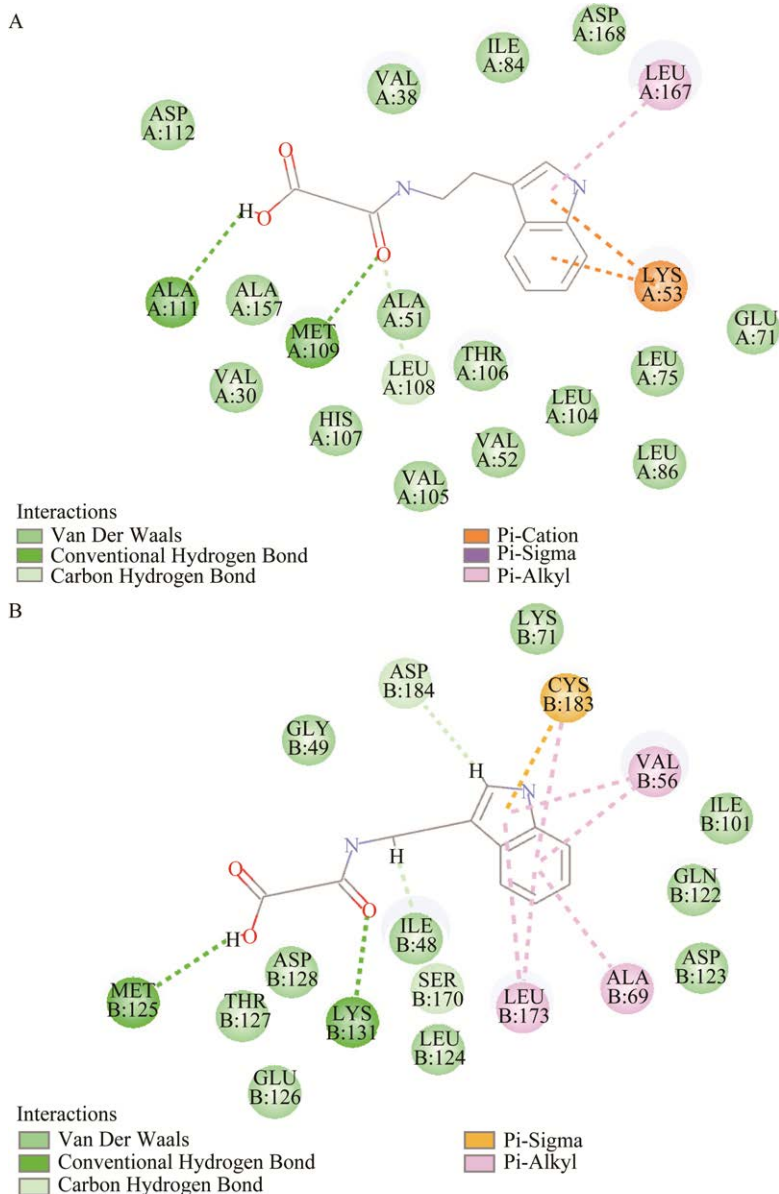


图 4 化合物 11 与靶点蛋白相互作用 2D 图 A: 化合物 11-3DT1; B: 化合物 11-2ZOQ

Figure 4 2D diagram of the interaction of compound 11 with target proteins. A: compound 11-3DT1; B: compound 11-2ZOQ.

2.4 化合物 11 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞存活率的影响结果

BV-2 细胞存活率试验结果(图 5)显示,与空白组相比,LPS 模型组 BV-2 细胞存活率显著降低($P<0.001$);与 LPS 模型组相比,化合物 11 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)给药后可显著提高细胞存活率($P<0.001$),随着化合物 11 浓度升高,细胞存活率升高,在浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞存活率($81.49\%\pm 9.08\%$)接近阳性对照组($83.47\%\pm 0.45\%$),提示化合物 11 能抑制 LPS 诱导 BV-2 细胞的神经炎症。

2.5 化合物 11 对炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)和炎症介质(NO)表达的抑制作用

如图 6 所示,空白组中 NO 处于较低水平 [$(4.058\ 0\pm 0.294\ 4)\ \mu\text{mol/L}$],与空白组比较,LPS 组 BV-2 细胞 NO 水平显著增加($P<0.001$),化合物 11 (10、20 $\mu\text{mol/L}$)组 NO 水平显著降低($P<0.001$),呈剂量相关性,提示化合物 11 对 NO 的产生具有良好的抑制作用。空白组

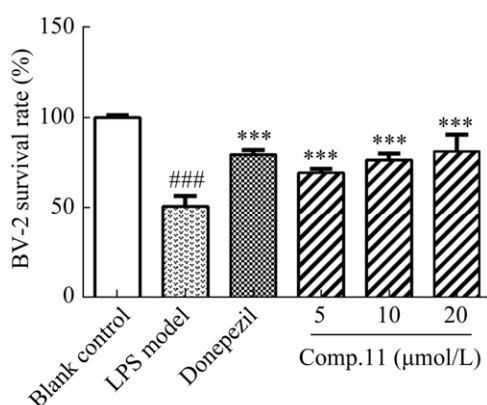


图 5 化合物 11 对 LPS 诱导 BV-2 细胞存活率的影响($\bar{x}\pm SD$, $n=5$) 与空白组比较,### $P<0.001$;与 LPS 模型组比较,*** $P<0.001$

Figure 5 Effect of the compound 11 on LPS-induced BV-2 cell viability ($\bar{x}\pm SD$, $n=5$). ### $P<0.001$ vs blank control; *** $P<0.001$ vs LPS model.

TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 均处于较低水平,与空白组比较,LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著升高($P<0.001$),化合物 11 (10、20 $\mu\text{mol/L}$)组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著降低($P<0.05$),提示化合物 11 可抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌。

3 讨论与结论

神经退行性疾病发病机制广泛,其病理过程涉及 A β_{25-35} 、神经炎症、氧化应激和 Tau 蛋白等多种因素影响。神经炎症反应是中枢神经系统的一种免疫应答反应,在阿尔兹海默病、帕金森病等神经退行性疾病中发挥着重要的调节作用。小胶质细胞过度活化会释放大量炎症介质(NO)和炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-6),从而导致神经炎症性疾病的发生,抑制小胶质细胞过度活化可以减弱各种神经系统疾病的病理进程,因此 BV-2 小胶质细胞常用来评价各种小分子化合物的抗神经炎症作用^[22-23]。分子对接是目前运用最广泛的天然化合物虚拟筛选技术^[24]。

青霉属内生真菌次生代谢产物的多样性为寻找新药先导化合物开辟了道路,已经成为发现活性化合物的重要来源,在农业、生物技术和医药领域也有着广泛的应用前景^[25-26]。本研究首次对鹿衔草内生真菌的次生代谢产物进行了分离,对内生真菌 *P. solitum* 采用经典固体发酵法,从该菌株的发酵液乙酸乙酯部分中分离得到 12 个化合物 cyclophenin (1)、dehydrocyclopeptin (2)、viridicatin (3)、对羟基苯甲酸(4)、吲哚乙酸(5)、methyl compactin (6)、cyclopeptine (7)、cyclophenol (8)、原儿茶酸(9)、viridicatol (10)、N-[2-(3-indolyl)ethyl]malonamic acid (11)和 solitumidine A (12),化合物 11 是新的天然产物,化合物 4、5 和 9 为首次自 *P. solitum* 分离得到。利用反向分子对接技术筛选出具有潜在抗神经

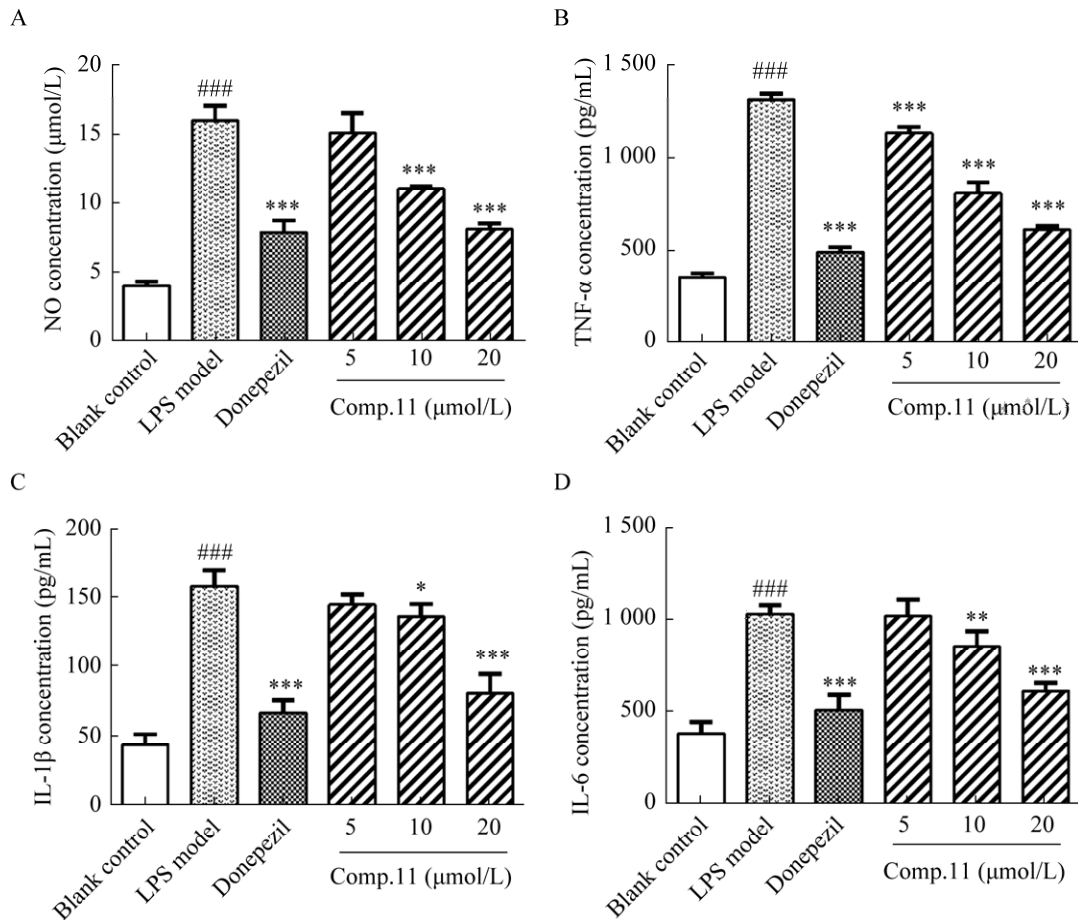


图 6 化合物 11 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症因子 NO (A)、TNF- α (B)、IL-1 β (C)和 IL-6 (D)水平的影响($\bar{x} \pm SD$, $n=5$) 与空白组比较, ### $P < 0.001$; 与 LPS 模型组比较, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$
Figure 6 Effect of the compound 11 on NO (A), TNF- α (B), IL-1 β (C) and IL-6 (D) level in LPS-induced BV-2 cells ($\bar{x} \pm SD$, $n=5$). ### $P < 0.001$ vs blank control; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs LPS model.

炎症的化合物 11, 并在细胞水平证实其可提高 BV-2 细胞存活率和抑制炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)和 NO 的释放。MAPK 通路是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者, 是细胞增殖、应激、炎症和凋亡等信号转导的共同交汇通路之一, 主要亚族包括 JNK、p38 和 ERK, 三者主要以非磷酸化形式存在于细胞质中^[27]。过度活化的小胶质细胞能通过提高 MAPK 家族中 3 个亚型的磷酸化水平进而调控神经炎症因子的产生, 导致神经炎性疾病的发生^[28]。分子对接和细胞炎症实验结果表明, 化合物 11

发挥抗神经炎症活性的作用机制可能与抑制 MAPK 信号通路中 p38 和 ERK 蛋白的磷酸化有关, 但其具体的分子调控机制有待进一步研究。

鹿衔草作为我国传统的中草药, 在我国种类较丰富且药理活性显著, 但国内外相关研究报道较少, 其化学成分和内生菌、共生菌次生代谢产物的研究也亟待开发。此研究丰富了鹿衔草内生真菌的成分研究, 为后续鹿衔草内生真菌的药效物质基础及其活性研究提供了参考, 同时为新颖神经退行性疾病药物的开发提供了先导化合物。

REFERENCES

- [1] Zhao J, Shan T, Mou Y, Zhou L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(2): 159-168
- [2] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2003, 67(4): 491-502
- [3] Yao XH, Zhang DY, Luo M, Jin S, Zu YG, Efferth T, Fu YJ. Negative pressure cavitation-microwave assisted preparation of extract of *Pyrola incarnata* Fisch. rich in hyperin, 2'-O-galloylhyperin and chimaphilin and evaluation of its antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2015, 169: 270-276
- [4] Lee MH, Lee JM, Jun SH, Lee SH, Kim NW, Lee JH, Ko NY, Mun SH, Kim BK, Lim BO, et al. The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 112(1): 49-54
- [5] 罗定强, 杨燕子, 宋莉, 王军宪. 中国特有鹿蹄草属植物的研究进展[J]. *中草药*, 2004, 35(4): 463-466
- Luo DQ, Yang YZ, Song L, Wang JX. Advances in studies on special plants of *Pyrola* L. in China[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2004, 35(4): 463-466 (in Chinese)
- [6] Liu Q, Liu JP, Mei JH, Li SJ, Shi LQ, Lin ZH, Xie BY, Sun WG, Wang ZY, Yang XL, et al. Betulin isolated from *Pyrola incarnata* Fisch. inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation with the guidance of computer-aided drug design[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2020, 30(12): 127193
- [7] Li SJ, Liu Q, He XB, Liu JP, Liu XL, Hu J, Tang ZP, Peng QY, Cui LJ, Zhang HN, et al. *Pyrola incarnata* demonstrates neuroprotective effects against β -amyloid-induced memory impairment in mice[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2020, 30(2): 126858
- [8] 汤建, 孙惠芳, 张腾腾, 安凤霞, 耿春叶, 闻崇炜. 红藤中 sargentol 对 PC12 细胞的神经保护作用 and 分子对接研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(12): 2067-2072
- Tang J, Sun HF, Zhang TT, An FX, Geng CY, Wen CW. Neuroprotective effect and molecular docking of sargentol isolated from *Sargentodoxa cuneata* on PC12 cells[J]. *Natural Product Research and Development*, 2021, 33(12): 2067-2072 (in Chinese)
- [9] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1792-1797
- [10] Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(15): 1972-1973
- [11] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549
- [12] 刘军亮, 楼盈凯, 胡志钰, 郑忠辉, 黄耀坚, 徐庆妍. 圆弧菌醇和圆弧菌素的分离纯化及结构解析[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2012, 51(3): 386-390
- Liu JL, Lou YK, Hu ZY, Zheng ZH, Huang YJ, Xu QY. Purifications and structure elucidations of cyclopenol and cyclopenin[J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2012, 51(3): 386-390 (in Chinese)
- [13] 张灿灿. 两株真菌漆斑菌 *Myrothecium* sp. 和肉色曲霉 *Aspergillus carneus* 中次级代谢产物的研究[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2016
- Zhang CC. Study on secondary metabolites from the fungi *Myrothecium* sp. and *Aspergillus carneus*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2016 (in Chinese)
- [14] Rudolf O, Rouchal M, Lyčka A, Klásek A. Pinacol rearrangement of 3,4-dihydro-3,4-dihydroxyquinolin-2(1H)-ones: an alternative pathway to viridicatin alkaloids and their analogs[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2013, 96(10): 1905-1917
- [15] 王暉, 杨崇仁, 张颖君. 草果果实中的酚性成分[J]. *云南植物研究*, 2009, 31(3): 284-288
- Wang W, Yang CR, Zhang YJ. Phenolic constituents from the fruits of *Amomum tsaoko* (*Zingiberaceae*)[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2009, 31(3): 284-288 (in Chinese)
- [16] 郭书举, 苏华, 李宪瑾, 史大永, 朱校斌. 海洋链霉菌 L211 次生代谢产物分离和结构鉴定[J]. *海洋科学*, 2014, 38(9): 75-78
- Guo SJ, Su H, Li XC, Shi DY, Zhu XB. Isolation and identification of secondary metabolites produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. L211[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(9): 75-78 (in Chinese)
- [17] 董世豪, 巩婷, 朱平. 相似蜂海绵相关真菌杂色曲霉 F62 活性代谢产物研究[J]. *菌物学报*, 2011, 30(4): 636-643
- Dong SH, Gong T, Zhu P. The bioactive metabolites of *Aspergillus versicolor* F62 isolated from *Haliclona simulans*[J]. *Mycosystema*, 2011, 30(4): 636-643 (in Chinese)

- Chinese)
- [18] 辛志宏, 方玉春, 朱天骄, 段琳, 顾谦群, 朱伟明. 海绵来源真菌黄灰青霉 Sp-19 中的抗肿瘤活性成分研究[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(6): 1-6
Xin ZH, Fang YC, Zhu TJ, Duan L, Gu QQ, Zhu WM. Antitumor components from sponge-derived fungus *Penicillium auratiogriseum* Sp-19[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2006, 25(6): 1-6 (in Chinese)
- [19] Mamedov VA, Mamedova VL, Kadyrova SF, Galimullina VR, Khikmatova GZ, Korshin DE, Gubaidullin AT, Krivolapov DB, Rizvanov IK, Bazanova OB, et al. Synthesis of 3-hydroxy-4-arylquinolin-2-ones including viridicatol via a darzens condensation/Friedel-Crafts alkylation strategy[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2018, 83(21): 13132-13145
- [20] Itagaki M, Soejima H, Ishii K, Sugiyama T, Hayashi Y. Biological activities and structure-activity relationship of substitution compounds of N-[2-(3-indolyl)ethyl]succinamic acid and N-[2-(1-naphthyl)ethyl]succinamic acid, derived from a new category of root-promoting substances, N-(phenethyl)succinamic acid analogs[J]. Plant and Soil, 2003, 255(1): 67-75
- [21] Rodríguez JPG, Bernardi DI, Gubiani JR, De Oliveira JM, Morais-Urano RP, Bertonha AF, Bandeira KF, Bulla JIQ, Sette LD, Ferreira AG, et al. Water-soluble glutamic acid derivatives produced in culture by *Penicillium solitum* IS₁-A from King George Island, maritime Antarctica[J]. Journal of Natural Products, 2020, 83(1): 55-65
- [22] Nebel C, Aslanidis A, Rashid K, Langmann T. Activated microglia trigger inflammasome activation and lysosomal destabilization in human RPE cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 484(3): 681-686
- [23] Torika N, Asraf K, Roasso E, Danon A, Fleisher-Berkovich S. Angiotensin converting enzyme inhibitors ameliorate brain inflammation associated with microglial activation: possible implications for Alzheimer's disease[J]. Journal of Neuroimmune Pharmacology: the Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 2016, 11(4): 774-785
- [24] Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2015, 20(7): 13384-13421
- [25] Kozlovskii AG, Zhelifonova VP, Antipova TV. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (review)[J]. Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya, 2013, 49(1): 5-16
- [26] Toghueo RMK, Boyom FF. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications[J]. 3 Biotech, 2020, 10(3): 107
- [27] 李笑迪, 郭兴龙, 戴荣继, 吕芳, 丛林, 邓玉林. 厚朴酚与厚朴酚衍生物的合成及其生物活性[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(5): 536-542
Li XD, Guo XL, Dai RJ, Lyu F, Cong L, Deng YL. Synthesis and activities of derivatives of magnolol and honokiol[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2017, 48(5): 536-542 (in Chinese)
- [28] 方明楚, 林振浪. 氯喹通过抑制 NF-κB 和 MAPK 信号通路减轻脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞炎症反应[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(7): 1320-1326
Fang MC, Lin ZL. Chloroquine attenuates lipopolysaccharide-stimulated BV₂ microglial activation by inhibiting NF-κB and MAPK signaling pathways[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2020, 36(7): 1320-1326 (in Chinese)