

恒山黄芪内生真菌 *Penicillium* sp. 中 gliotoxin 类代谢产物的分离和生物活性

张弘弛, 刘瑞, 李慧, 安志鹏, 周凤*

(大同大学 生命科学学院, 应用生物技术研究, 山西 大同 037009)

[摘要] 目的:研究恒山黄芪内生真菌 *Penicillium* sp. 的 gliotoxin 类代谢产物和其对黄芪白粉病原菌 *Erysiphe pisi*. 的抑制作用。方法:次生代谢产物的分离纯化采用反复硅胶柱色谱法, Sephadex LH-20 凝胶色谱法和 HPLC 方法, 并通过化学方法结合核磁共振分析和质谱鉴定其化学结构, 抑菌活性测试方法采用最小抑制浓度法。结果:从恒山黄芪内生真菌 *Penicillium* sp. 的固体发酵萃取物中分离得到 7 个 gliotoxin 类代谢产物, 经波谱分析分别鉴定为 gliotoxin(1), bisdethiobis(methylthio) gliotoxin(2), dehydroxybisdethiobis(methylthio) gliotoxin(3), dehydrogliotoxin(4), 6-deoxy-5a, 6-didehydrogliotoxin(5), didehydrobisdethiobis(methylthio) gliotoxin(6), bis-N-norgliovietin(7), 抑菌活性测试结果显示, 化合物 1, 4 和 5 对黄芪白粉病原菌显示出强抑制作用, 最小抑菌浓度(MIC)分别达到 1.56, 0.78, 6.25 mg·L⁻¹。结论:所有化合物都是首次从黄芪内生真菌发酵产物中分离得到, 黄芪内生真菌 *Penicillium* sp. 可以作为潜在的产生 gliotoxin 类代谢产物的菌种资源。

[关键词] 内生真菌; 黄芪; 胶霉毒素; 黄芪白粉病

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0068-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070068

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1402.064.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 14:02

Gliotoxins Isolated from Endophytic *Penicillium* sp. of Astragali Radix and Their Antimicrobial Activity

ZHANG Hong-chi, LIU Rui, LI Hui, AN Zhi-peng, ZHOU Feng*

(College of Life Science, Applied Biotechnology Institute, Datong University, Datong 037009, China)

[Abstract] **Objective:** To study on gliotoxin metabolites from endophytic *Penicillium* sp. of Astragali Radix and investigate their antimicrobial activity to *Erysiphe pisi*. **Method:** The compounds were isolated and purified by repeated silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel chromatography, and HPLC method; their chemical structures were identified by chemical methods combined with nuclear magnetic resonance analysis and mass spectrometry. The MIC values for *E. pisi*. were determined as sensitivity to the compounds in biological evaluation. **Result:** Seven gliotoxins were obtained and elucidated as gliotoxin (1), bisdethiobis(methylthio) gliotoxin (2), dehydroxybisdethiobis(methylthio) gliotoxin (3), dehydrogliotoxin (4), 6-deoxy-5a, 6-didehydrogliotoxin (5), didehydrobisdethiobis(methylthio) gliotoxin (6), and bis-N-norgliovietin (7). Bacteriostatic activity test results showed that compounds 1, 4 and 5 had strong inhibitory activity for *E. pisi*, MIC values of 1.56, 0.78 and 6.25 mg·L⁻¹. **Conclusion:** All compounds were isolated from the endophytic fungi of Astragali Radix for the first time, and the endophytic fungus *Aspergillus* sp. from the stems of Astragali Radix, is a promising source for gliotoxins.

[Key words] endophytic fungus; Astragali Radix; gliotoxin; *Erysiphe pisi*

[收稿日期] 20160609(004)

[基金项目] 山西省科技攻关项目(20130311011-6);大同市科技攻关项目(201468-1)

[第一作者] 张弘弛, 博士, 讲师, 从事天然产物化学的研究, Tel:0352-7158938, E-mail: zhanghclw@163.com

[通讯作者] *周凤, 硕士, 教授, 从事农业基础相关研究, Tel:0352-7158938, E-mail: linzhoufeng@163.com

胶霉毒素 (gliotoxin) 最早来源于粘帚菌 (*Gliocladium*), 目前发现其还可来源于烟曲霉、土曲霉、黑曲霉等曲霉属真菌, 属于表聚硫代哌嗪二酮 (epipolythiodioxopiperazine, ETP) 毒素^[1]。生物活性研究发现, gliotoxin 类化合物对多种肿瘤细胞具有很强的细胞毒活性, 除有细胞毒活性外, 还具有抗菌、抗病毒和抗真菌等生物活性, 所以近年药物学研究者对源自天然和人工合成的 gliotoxin 类化合物进行了深入的研究^[2-3]。

本课题组近年一直致力于对恒山黄芪内生真菌的系统研究^[4-6], 近期研究发现了 1 株可以产生 gliotoxin 类代谢产物的内生真菌, 本论文报道了从该内生真菌固体发酵产物中分离得到的 7 个 gliotoxin 类代谢产物, 并进一步测试了这些化合物对影响黄芪栽培主要病害——白粉病原菌的抑制作用, 为进一步探寻此化合物新的内生真菌来源提供依据, 并为黄芪白粉病的防治提供一些新的思路。

1 材料

柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂分厂), 薄层色谱硅胶 G (青岛海浪硅胶干燥剂厂); LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 上海浩然生物技术有限公司)。HPLC 用试剂色谱纯 (上海星可生化有限公司), 其他试剂均为分析纯。

JEOL SX102A 型 ESI-MS 质谱仪 (日本电子株式会社), ADVANCE 400 MHz 型核磁共振仪 (德国布鲁克公司, TMS 作为内标), XT5 型显微熔点测定仪 (未校正, 北京市科仪电光仪器厂), 1200 型高效液相色谱 (美国安捷伦公司), Welch Material XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 上海月旭科技股份有限公司)。

2 内生真菌 AS06 的来源和鉴定

从 2013 年 8 月采自山西省北岳恒山阳坡的恒山黄芪, 由大同大学生命科学学院周凤教授鉴定为豆科植物黄芪 *Astragalus membranaceus* 的茎部, 分离得到内生真菌 AS06, 现菌株保存于山西大同大学应用生物技术研究所以。

将菌株 AS06 接种于 PDA 平板上, 27 °C 培养 2 d 后, 开始观察生长形态以及外观性状; 采用玻片培养法, 显微观察孢子梗的分枝状况和孢子形态等情况。同时, AS06 转接到 PDA 平板上, 培养 12 d 后, 在液氮中将菌丝研磨成粉末状, 选用 CTAB 法来提取该内生真菌 DNA。以提取到的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增序列。PCR 扩增产物送交三联兄弟生物医药研究 (北京) 有限公司测序, 测序结果通过

Blast 比对分析, 构建系统发育树。

AS06 生长迅速, 菌体生长前期呈现白色, 慢慢变为墨绿色, 产生大量的粉末状的孢子, 培养基质由白色变为橙色; 显微观察发现, 菌丝短, 丝绒状, 菌丝发达多分枝, 主枝上有多个分生的孢子梗, 类似扫帚, 顶端分生出多个孢子, 且是绿色的单胞体 (图 1), 初步鉴定为青霉属。经过 PCR 扩增后获得的 ITS 序列长 589 bp, 聚类分析 (图 2) 该菌株与多株 *Penicillium* sp. 具有同源性, 综合形态学特征和 ITS 序列分析, 将 AS06 鉴定为 *Penicillium* sp.。

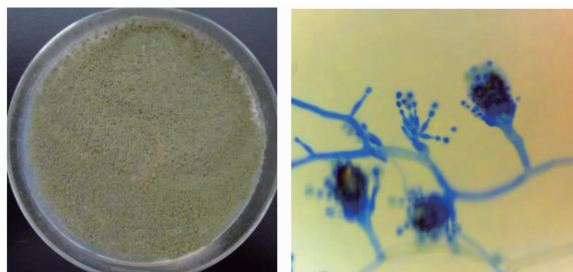


图 1 菌株 AS06 菌落形态

Fig. 1 Colonial morphology of strain AS06

3 内生真菌 AS06 的发酵及代谢产物的分离

内生真菌 AS06 经平板活化, 接种于含察氏液体培养基 100 mL 的 250 mL 锥形瓶, 28 °C, 150 r·min⁻¹ 振荡培养 5 d, 制备种子液, 备用。大量发酵采用固体发酵^[7], 发酵瓶中含大米基质 100 g 和改良营养液体培养基 (NaCl 30 g·L⁻¹, NaNO₃ 2 g·L⁻¹, 谷氨酸钠 3.5 g·L⁻¹, pH 7.5) 30 mL, 10% 的接种量, 接种制备好的种子液 (共 100 瓶), 室温培养 40 d, 80 °C 将发酵培养物烘干, 分别用乙酸乙酯和甲醇浸提 3 次, 浓缩后得粗提物浸膏 398 g。粗提物经硅胶柱色谱, 以乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱 (1:0, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0:1) 得到 9 个部分 Fr. A ~ Fr. I。

Fr. B 以乙酸乙酯和石油醚梯度洗脱, 得亚组分 sFr. B (1 ~ 12), sFr. B2 用甲醇溶解, 经半制备 HPLC, 以甲醇-水为流动相 (1:3, 流速 3 mL·min⁻¹), 得化合物 1 (306 mg) 和化合物 2 (94 mg), sFr. B3 经 Sephadex LH-20, 以甲醇为流动相, 得化合物 3 (59 mg), sFr. B4 再次经硅胶柱色谱, 以乙酸乙酯和石油醚梯度洗脱, 得化合物 4 (63 mg) 和化合物 5 (39 mg); Fr. C 经 Sephadex LH-20, 以甲醇为流动相, 得亚组分 sFr. C (1 ~ 6), sFr. C2 经半制备 HPLC, 以甲醇-水为流动相 (1:4, 流速 4 mL·min⁻¹), 分离纯化得化合物 6 (52 mg) 和化合物 7 (25 mg)。

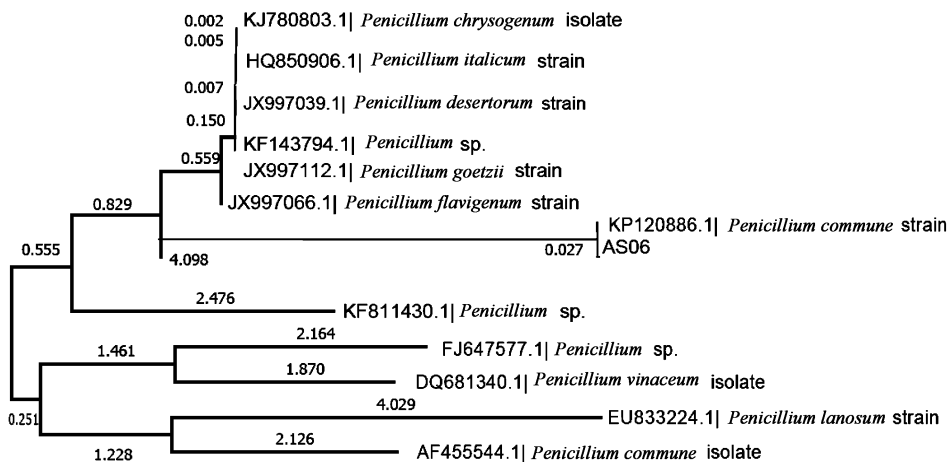


图 2 菌株 AS06 系统发育分析

Fig. 2 Polymeric analysis of strain AS06

4 内生真菌 AS06 代谢产物的结构鉴定

菌株 AS06 分离到的 7 个代谢产物经过波谱表征和分析,与文献对比,被鉴定为胶霉毒素 gliotoxin (**1**), bisdethiobis (methylthio) gliotoxin (**2**), dehydroxybisdethiobis (methylthio) gliotoxin (**3**), dehydrogliotoxin (**4**), 6-deoxy-5a, 6-didehydrogliotoxin (**5**), didehydrobisdethiobis (methylthio) gliotoxin (**6**), bis-N-norgliovietin(**7**)(图 3)。

化合物 **1** 白色针状结晶, mp 192 ~ 195 °C, 易溶于三氯甲烷。正离子 ESI-MS 在 m/z 327.1 处给出准分子离子峰 $[M + H]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.43 (1H, dd, $J = 12.8, 5.4$ Hz, H-3a₁), 4.25 (1H, dd, $J = 12.7, 9.5$ Hz, H-3a₂), 4.82 (1H, s, H-5a), 4.82 (1H, s, H-6a), 5.78 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-7), 5.97 ~ 5.92 (1H, m, H-8), 6.00 (1H, s, H-9), 3.74 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-10), 2.96 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-10),

3.21 (3H, s, H-11); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.0 (C-1), 77.2 (C-3), 60.6 (C-3a), 165.3 (C-4), 69.8 (C-5a), 73.1 (C-6), 129.9 (C-7), 123.5 (C-8), 120.2 (C-9), 130.7 (C-9a), 36.6 (C-10), 75.6 (C-10a), 27.5 (C-11)。以上数据与文献 [8] 的核磁数据一致, 化合物 **1** 鉴定为 gliotoxin。

化合物 **2** 淡黄色油状, mp 204 ~ 206 °C, 易溶于三氯甲烷。正离子 ESI-MS 在 m/z 357.1 处给出准分子离子峰 $[M + H]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.21 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3a₁), 3.80 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3a₂), 4.62 (1H, d, $J = 13.3$ Hz, H-5a), 4.89 (1H, m, H-6), 5.69 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-7), 5.91 (1H, m, H-8), 5.99 (1H, m, H-9), 3.14 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-10), 2.91 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-10), 3.13 (3H, s, H-11), 2.25 (3H, s, H-12), 2.21 (3H, s, H-13);

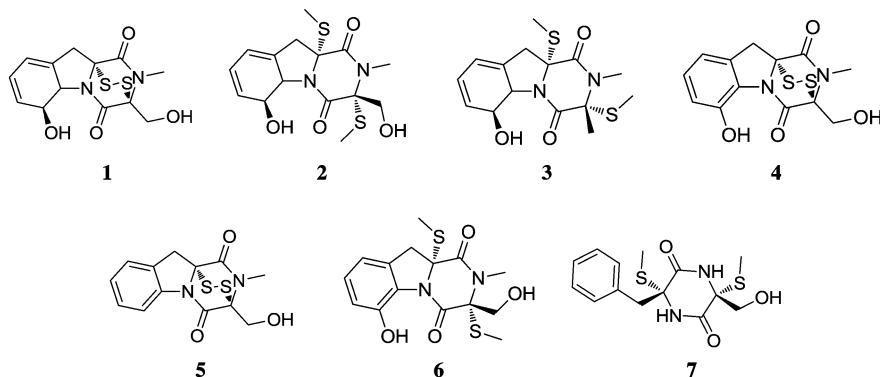


图 3 黄芪内生真菌 AS06 代谢产物 1~7 的结构

Fig. 3 Compounds 1-7 structure isolated from strain AS06 of Astragali Radix

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.9 (C-1), 75.2 (C-3), 63.1 (C-3a), 168.1 (C-4), 70.4 (C-5a), 74.3 (C-6), 130.1 (C-7), 123.7 (C-8), 120.8 (C-9), 131.6 (C-9a), 38.6 (C-10), 73.2 (C-10a), 28.1 (C-11), 13.6 (C-12), 14.9 (C-13)。以上数据与文献[9]的核磁数据一致, 化合物**2**鉴定为 bisdethiobis(methylthio)gliotoxin。

化合物**3** 淡黄色固体, mp 214 ~ 216 °C, 正离子 ESI-MS 在 m/z 341.1 处给出准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.81 (3H, s, H-3a), 4.76 (1H, d, $J = 13.4$ Hz, H-5a), 4.70 (1H, d, $J = 13.4$ Hz, H-6), 5.64 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-7), 5.90 (1H, m, H-8), 5.95 (1H, m, H-9), 3.03 ~ 3.07 (2H, m, H-10), 3.01 (3H, s, H-11), 2.15 (3H, s, H-12), 2.20 (3H, s, H-13), 5.45 (1H, s, 6-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.4 (C-1), 67.8 (C-3), 23.3 (C-3a), 167.5 (C-4), 69.2 (C-5a), 73.9 (C-6), 130.5 (C-7), 123.4 (C-8), 119.0 (C-9), 132.8 (C-9a), 37.9 (C-10), 72.1 (C-10a), 28.4 (C-11), 14.1 (C-12), 14.5 (C-13)。以上数据与文献[10]的核磁数据一致, 化合物**3** 鉴定为 dehydroxybisdethiobis(methylthio)gliotoxin。

化合物**4** 白色针状结晶, mp 184 ~ 186 °C, 正离子 ESI-MS 在 m/z 325.1 处给出准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.39 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3a₁), 4.11 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3a₂), 6.92 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7), 7.15 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-8), 6.86 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9), 4.32 (1H, d, $J = 18.2$ Hz, H-10), 3.24 (1H, d, $J = 18.2$ Hz, H-10), 3.28 (3H, s, H-11), 10.6 (1H, s, 6-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.3 (C-1), 76.5 (C-3), 61.3 (C-3a), 162.2 (C-4), 130.9 (C-5a), 147.3 (C-6), 120.0 (C-7), 128.8 (C-8), 118.5 (C-9), 128.2 (C-9a), 37.4 (C-10), 73.2 (C-10a), 27.4 (C-11)。以上数据与文献[11]的核磁数据一致, 化合物**4** 鉴定为 dehydrogliotoxin。

化合物**5** 白色针状结晶, mp 176 ~ 179 °C, 正离子 ESI-MS 在 m/z 331.1 处给出准分子离子峰 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.45 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3a₁), 4.31 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-3a₂), 7.94 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6), 7.35 (1H, dd, $J = 8.2$ Hz, 8.0, H-7), 7.21 (1H,

dd, $J = 8.0, 7.8$ Hz, H-8), 7.38 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9), 4.29 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-10), 3.42 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-10), 3.28 (3H, s, H-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.8 (C-1), 76.8 (C-3), 61.4 (C-3a), 161.9 (C-4), 138.1 (C-5a), 116.3 (C-6), 125.7 (C-7), 129.1 (C-8), 128.2 (C-9), 128.0 (C-9a), 37.2 (C-10), 73.9 (C-10a), 27.5 (C-11)。以上数据与文献[12]的核磁数据一致, 化合物**5** 鉴定为 6-deoxy-5a, 6-didehydrogliotoxin。

化合物**6** 白色无定型粉末, mp 214 ~ 216 °C, 易溶于三氯甲烷。正离子 ESI-MS 在 m/z 355.1 处给出准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.70 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3a₁), 4.11 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3a₂), 6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.25 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.03 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 3.54 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-10), 3.61 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-10), 3.23 (3H, s, H-11), 2.58 (3H, s, H-12), 2.34 (3H, s, H-13), 10.01 (1H, s, 6-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 163.9 (C-1), 72.4 (C-3), 63.8 (C-3a), 166.3 (C-4), 131.6 (C-5a), 147.5 (C-6), 119.3 (C-7), 129.1 (C-8), 117.9 (C-9), 128.0 (C-9a), 39.1 (C-10), 72.2 (C-10a), 28.5 (C-11), 14.1 (C-12), 15.2 (C-13)。以上数据与文献[13-14]的核磁数据一致, 化合物**6** 鉴定为 didehydrobisdethiobis(methylthio)gliotoxin。

化合物**7** 白色粉末, mp 178 ~ 180 °C。正离子在 ESI-MS m/z 349.2 处给出准分子离子峰 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.99 (1H, s, H-2), 8.46 (1H, s, H-5), 3.52 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, H-7), 3.00 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, H-7), 7.03 ~ 7.42 (5H, m, H-9 ~ 13), 2.29 (3H, s, H-14), 2.11 (3H, s, H-15), 3.39 (2H, s, H-16), 4.82 (1H, s, 16-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.9 (C-1), 66.3 (C-3), 165.7 (C-4), 66.1 (C-6), 43.7 (C-7), 135.6 (C-8), 130.9 (C-9), 128.3 (C-10), 127.1 (C-11), 128.3 (C-12), 130.9 (C-13), 13.9 (C-14), 13.1 (C-15), 65.3 (C-16)。以上数据与文献[14]的核磁数据一致, 化合物**7** 鉴定为 bis-N-norgliovietin。

5 gliotoxin 类代谢产物对黄芪白粉病原菌的 MIC 测定^[15]

将 7 个 gliotoxin 类代谢产物配制成 1 g·L⁻¹ 的

DMSO 溶液。在 96 孔培养板上用察氏液体培养基稀释浓度梯度至 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种黄芪白粉病原菌悬液, 96 孔板培养 48 h, 以三唑酮为阳性, DMSO 为阴性。观察结果, 找出抑制微生物生长的最小抑菌浓度(MIC)。

采用 96 孔法测量了 7 个 gliotoxin 类代谢产物对黄芪白粉病原菌 *Erysiphe pisi* 的 MIC。7 个 gliotoxin 类代谢产物对黄芪白粉病原菌显示出不同程度的抑制活性, gliotoxin(1), dehydrogliotoxin(4) 和 6-deoxy-5a,6-didehydrogliotoxin(5) 的抑菌活性高于或者相当于黄芪栽培生产中的商用杀菌剂三唑酮, 其 MIC 分别达到 1.56, 0.78, 6.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; bisdethiobis (methylthio) gliotoxin(2), dehydroxybisdethiobis(methylthio) gliotoxin(3) 和 bis-N-norgliovietin(7) 对黄芪白粉病原菌有一定的抑制活性, MIC 分别为 100, 200, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 而 didehydrobisdethiobis (methylthio) gliotoxin(6) 在最大测试浓度(200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对黄芪白粉病原菌也没有任何抑制活性。

这 7 个 gliotoxin 类代谢产物是首次从黄芪内生真菌发酵产物中分离得到, 后续的生物活性测试发现化合物 1, 4 和 5 对影响黄芪生长的最主要病害——黄芪白粉病菌 *Erysiphe pisi* 有很好的抑制作用。化合物 1, 4 和 5 都是二硫桥氧哌嗪类化合物, 这类化合物通常具有显著的抗病毒、抗真菌和抑菌作用, 活性集团主要是分子结构中的硫桥, 而打开二硫键, 生物活性会有明显降低甚至消失^[2], 如化合物 2, 3, 6 和 7, 本文的抑菌测试结果也验证了这类化合物的构效关系。二硫桥氧哌嗪类化合物具有很强的细胞毒活性, 目前研究领域主要是作为免疫抑制剂。化合物 2, 3, 6 和 7 这类打开二硫的化合物, 虽然缺乏抑菌活性, 但文献报道其具有拮抗血小板激活因子(PAF)的活性^[15], 因此有望开发成抗炎、抗过敏的临床用药。本文的研究也证实黄芪内生真菌 *Penicillium* sp. 可以作为潜在的产生 gliotoxin 类代谢产物的菌种资源。

[参考文献]

[1] Coméra C, André K, Laffitte J, et al. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils [J]. *Microbes Infect*, 2007, 9(1): 47-54.
[2] Gardiner D M, Waring P, Howlett B J. The epipo-

lythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis [J]. *Microbiology*, 2005, 151(4): 1021-1032.
[3] Scharf D H, Heinekamp T, Remme N, et al. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(2): 467-472.
[4] 周凤, 张弘弛, 刘瑞, 等. 恒山黄芪内生真菌 *Aspergillus* sp. 代谢产物的分离和生物活性的测定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4): 125-129.
[5] ZHOU F, ZHANG H C, LIU R, et al. Isolation and biological evaluation of secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from *Astragalus membranaceus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2013, 49(3): 568-570.
[6] 刘瑞, 张弘弛, 李慧, 等. 一株恒山产蒙古黄芪内生真菌 *Penicillium griseofulvum* 次生代谢产物的分离和菌种鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(16): 25-29.
[7] 王维, 马养民, 张弘弛, 等. 黑果枸杞内生真菌 E21 菌株次生代谢产物的研究 [J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(4): 460-464.
[8] Kaouadji M, Steiman R, Seigle-Murandi F, et al. Gliotoxin: uncommon ¹H coupling and revised ¹H- and ¹³C-NMR assignments [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(3): 717-719.
[9] Kirby G W, Robins D J, Sefton M A, et al. Biosynthesis of bisdethiobis (methylthio) gliotoxin, a new metabolite of *Gliocladium deliquescens* [J]. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1980, 1(1): 119-121.
[10] LI X F, Kim S K, Nam K W, et al. A new antibacterial dioxopiperazine alkaloid related to gliotoxin from a marine isolate of the fungus *Pseudallescheria* [J]. *J Antibiot*, 2006, 59(4): 248-250.
[11] Anent A G, Hanson J R, Truneh A. Metabolites of *Gliocladium flavofuscum* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(1): 197-198.
[12] Sun Y, Takada K, Takemoto Y, et al. Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp., and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(1): 111-114.
[13] Okamoto M, Yoshida K, Uchida I, et al. Studies of platelet activating factor (PAF) antagonists from microbial products I. Bisdethiobis (methylthio) gliotoxin and its derivatives [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(1): 340-344.
[14] Kirby G W, RAO G V, Robins D J. New co-metabolites of gliotoxin in *Gliocladium virens* [J]. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1988, 2(2): 301-304.
[15] Andrews J M. Determination of minimum inhibitory concentrations [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(S1): 5-16.

[责任编辑 顾雪竹]