

仿刺参共附生真菌 *Aspergillus terreus* 来源的聚酮类化合物的研究

夏雪奎¹, 齐君¹, 刘昌衡², 张永刚¹, 贾爱荣¹, 袁文鹏², 刘新², 张绵松¹

(1. 山东省科学院中日友好生物技术研究中心, 山东省应用微生物重点实验室, 山东济南 250014)

(2. 山东省科学院生物研究所, 山东济南 250014)

摘要: 海参是海洋中重要的食物和药物资源, 含有丰富的活性物质。海参共附生微生物非常丰富。为了从海参共附生微生物获得具有强生物活性的物质, 对山东芝罘岛海域的仿刺参来源的共附生真菌 *Aspergillus terreus* 利用分子生物学手段进行了种属鉴定, 并利用固体基进行培养, 对其次级代谢产物进行了研究。通过薄层层析、柱层析、高效液相色谱对其化学成分进行了分离和纯化, 综合核磁共振、质谱对其进行结构鉴定。从该菌中获得 dihydrogeodin (1)、Territrems A (2)、Territrems B (3)、2, 4-二羟基苯乙酮 (4)、questin (5) 和 emodin (6) 六种物质。利用口腔上皮癌细胞株 (KB) 和多药耐药性的细胞株 (KBv200) 对 1, 5 和 6 进行了细胞毒活性测试。本研究首次对化合物 1 进行了完整的谱图解析, 并首次发现海洋环境来源的微生物可以代谢化合物 dihydrogeodin (1), 以及具有强抑制乙酰胆碱酶活性 Territrems (3), 而这些物质是海参本体不能够产生的, 为开发具有预防和治疗帕金森病相关的功能食品提供了新来源。

关键词: 仿刺参; 共附生真菌; 聚酮类化合物; 细胞毒活性; 抗乙酰胆碱酶活性

文章编号: 1673-9078(2014)4-10-14

Polyketones from *Aspergillus terreus* Associated with *Apostichopus japonicus*

XIA Xue-kui¹, QI Jun¹, LIU Chang-heng², ZHANG Yong-gang¹, JIA Ai-rong¹, YUAN Wen-peng², LIU Xin², ZHANG Mian-song¹

(1. Key Laboratory for Applied Microbiology of Shandong Province, Biotechnology Center of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China) (2. Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract: Sea cucumber comprised of rich bioactive components is an important marine food and also used as a traditional medicine. There are various microbes associated with sea cucumber. In order to obtain effective bioactive compounds from *Aspergillus terreus* associated with *Apostichopus japonicus* from Zhifu Island, the fungus was cultivated on solid medium to investigate its secondary metabolites. Thin liquid chromatography (TLC), column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to separate secondary metabolites, and NMR, MS were used to identify their structures. As a result, dihydrogeodin (1), Territrems A (2), Territrems B (3), 1-(2, 4-dihydroxyphenyl)-ethanone (4), questin (5) and emodin (6) had been obtained and identified. KB and KBv200 were used to detect the cytotoxicity of 1, 5 and 6. It was the first time to determine intact Dihydrogeodin (1) by NMR and MS and it could be metabolized by marine fungus. In addition, it was firstly found that Territrem B (3) had the strongest inhibitory effects on acetylcholinesterase activities. *Aspergillus terreus* might be a new candidate for the development of functional food that can be used for preventing and treating Parkinson disease.

Key words: *Apostichopus japonicus*; fungus; polyketone; cytotoxicity; acetylcholinesterase inhibition activity

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202452); 山东省优秀中青年科学奖励基金资助项目 (BS2009HZ004)

作者简介: 夏雪奎 (1980-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为海洋活性物质和海洋功能食品的研发

通讯作者: 刘昌衡 (1962-), 男, 研究员, 研究方向为海洋食品加工新技术和海洋功能食品的研发

海参是海洋中重要的食物资源和药物资源。含有丰富的海参皂苷、多糖、神经节苷脂等多种活性物质, 具有提高免疫力、抗肿瘤、促进造血功能以及降血脂等多种生物活性^[1-2]。特别是海参皂苷, 作为海参的重要化学防御物质, 具有抗真菌、抑制血管生成活性和细胞毒活性, 其化学多样性和生物活性得到了深入的研究。海参具有丰富的共附生微生物^[3], 而且共附生

微生物从海参本体获得营养, 和其长期共存, 共同抵御海洋特殊生态环境, 能够产生化学结构多样的次级代谢产物, 最近引起了科学家的重视。埃及科学家从埃及亚历山大的阿布海岸的海参分离了 5 个种的细菌以及 1 株白色念珠菌^[3]。俄罗斯科学院对海参共附生真菌次级代谢产物作了深入的研究, 从日本海域的海参 *Apostichopus japonicus*、*Eupentacta fraudatrix*、*Cucumaria japonica* 中分离得到真菌 27 种^[4], 从 *Acremonium striatisportm* 中分离得到 10 余个结构新颖的二萜皂苷^[5]。中国海洋大学王发左等人报道了从青岛灵山岛海域海参 *Stichopus japonicus* 来源的真菌 *Aspergillus fumigau* 中发现了一系列结构新颖的生物碱, 并具有中等的细胞毒活性^[6]。为了从海参共附生微生物中获得和海参本体相近或者相似的活性物质, 本课题组对山东海域的仿刺参共附生微生物及其活性物质展开研究, 已经从山东海域仿刺参 *Apostichopus japonicus* 来源的微生物中发现了结构新颖的、具有细胞毒活性的二萜类物质, 具有抑制血管生成活性的苯并呋喃类物质, 以及具有多种生物活性的神经酰胺类物质^[7-8]。我们将继续报道从芝罘岛海域采集的海参的共附生真菌 *Aspergillus terreus* 的分离, 种属的鉴定, 聚酮类物质 *dihydrogeodin* (1)、*Territrems A* (2)、*Territrems B* (3)、2,4-二羟基苯乙酮 (4)、*questin* (5) 和 *emodin* (6) (图 1) 的分离、纯化和结构鉴定, 以及化合物 1、5 和 6 的细胞毒活性。

1 材料与方法

1.1 仪器

SPX-2250 型电热恒温培养箱, 上海跃进医疗器械厂; SW-CJ-1FD 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; THZ-C 型恒温震荡培养箱, 江苏太仓市实验设备厂; 安捷伦 1100LC/MCD 液质连用色谱仪; 超导核磁共振仪 INOVA 600 MHz; SephadexLH-20。

1.2 材料

仿刺参采自烟台芝罘岛海域。KB 和 KBv200 细胞株保藏在广州医学院病理学院教研室。

1.3 试剂

石油醚, 乙酸乙酯, 二氯甲烷, 甲醇等为分析纯; 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 购自 Sigma 化学公司; Cisplatin 购自 Merck 公司。

1.4 方法

1.4.1 菌株的分离

将海参利用无菌水清洗 3 次, 将海参切成小块 (1 cm×0.5 cm), -20 °C 速冻, 打浆, 在 PDA 培养基 (80 mg/L, 硫酸链霉素) 涂布, 28 °C 培养 20 d。该菌株保存于山东省科学院生物研究所食品生物技术研究室。

1.4.2 菌株的发酵

利用液体培养基 (土豆 20 g/100 mL 海水, 葡萄糖 2 g/100 mL 海水), 室温下培养 20 d, 转速 170 r/min, 制备种子培养基。利用大米固体培养基 (120 g/200 mL 海水, 121 °C, 20 min 高温灭菌), 在室温下培养 28 d。

1.4.3 浸膏的制备和分离纯化

利用 3 倍体积的乙酸乙酯, 室温下连续萃取 3 次, 45 °C 减压蒸发, 得到浸膏 15 g。

利用色谱柱 (2 cm×40 cm), 以 PE/EtOAc/MeOH 为流动相进行梯度洗脱, 得到 15 个组分, 利用薄层层析和浓硫酸显色的方法检测到三个目标组分: 30% PE/EtOAc 洗脱得到的组分 3 (1.2 g); 50% PE/EtOAc 洗脱得到的组分 7 (0.78 g) 和 90% PE/EtOAc 洗脱得到的组分 10 (0.70 g), 以 CH₂Cl₂/MeOH (1:1) 为流动相, 利用 Sephadex LH20 填料继续对 3 个目标组分进行梯度洗脱, 最终得到化合物 *dihydrogeodin* (1) (5.0 mg), *Territrems A* (2) (3.6 mg), *Territrems B* (3) (5.6 mg), 2,4-二羟基苯乙酮 (4) (2.3 mg), *questin* (5) (4.9 mg) 和 *emodin* (6) (8.0 mg)。

1.4.4 菌株的分子生物学鉴定

将菌株接种于海水 PDA 培养基中, 28 °C 摇瓶培养 7 d, 收集新鲜菌丝体。利用真菌基因组提取试剂盒提取基因, 并利用 ITS1F 为引物进行扩增 (Fungus specific: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS4 (Universal: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 扩增真菌 rDNA 的间隔序列 (含 ITS1 区、5.8S 区、ITS2 区)。PCR 反应条件为: 94 °C 变性 5 min, 然后按 94 °C 30 s→55 °C 40 s→72 °C 90 s 进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后, 克隆到质粒上转化, 最后由上海生工生物工程技术有限公司直接测序。所得序列在 Genebank 中用 Blast 进行相似性分析, 用 Clustal 进行排列比较, 确定该菌株为 *Aspergillus terreus*。

1.4.5 细胞毒活性测试

利用 96 孔板培养 KB 和 KBv200 肿瘤细胞株, 最终 3.0×10³/每孔, 190 μL 溶液。培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL 待测物。68 h 后, 每孔加入 10 μL MTT 溶液。

4 h 后每孔加入 100 μL DMSO。半抑制浓度 IC_{50} 利用 Bliss's 软件通过细胞毒曲线计算。Cisplatin 用来作阴性对照。

2 结果与讨论

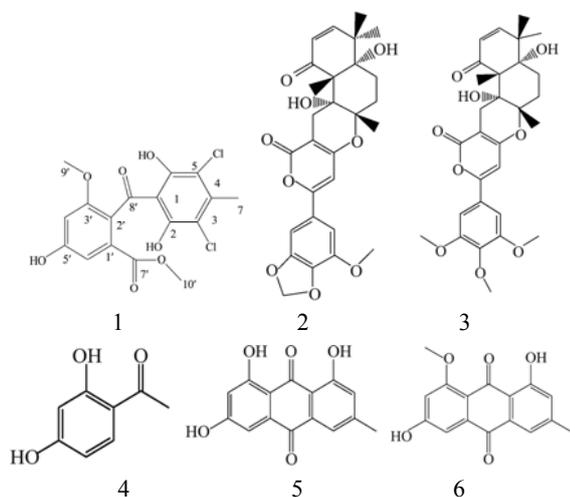


图1 化合物1、2、3、4、5和6结构式

Fig.1 Structures of 1, 2, 3, 4, 5 and 6

化合物 1 (图 1), 白色固体。HRTOFMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 401.0108。通过核磁氢谱 (表 1) 发现该化合物具有 1 个甲基 (δ 2.44), 两个甲氧基 (δ 3.66 和 3.67), 以及两个间位取代的芳香氢, 耦合常数分别为 2.4 和 3.0 Hz (δ 6.72 和 6.94)。除此之外还有 3 个羟基 (δ 10.12, 10.75 和 10.75)。通过核磁碳谱发现共有 15 个碳, 其中 1 个羰基碳 (δ 200.2), 其余分别属于两个苯环, 其中一个为 δ 111.1、155.1、141.7、112.2、141.7 和 155.1, 该苯环 1, 2, 3, 4, 5, 6-六取代的 1, 4 对称结构, 而另一个苯环为 δ 127.8、125.3、156.6、103.5、158.7 和 107.4。通过 HMBC, 得到 H-7 和 C-3、C-4 以及 C-5 相关, H-9' 和 C-3' 相关, H-10' 和 C-7' 相关, 确定了甲基和两个甲氧基的位置。通过 H-4' 和 C-2'、C-3'、C-5' 和 C-6', 以及 H-6' 和 C-1'、C-2'、C-4' 和 C-7' 相关, OH-5' 和 C-4'、C-5' 和 C-6' 相关确定了酮羰基和酯羰基的位置, 结合高分辨质谱, 确定该物质含有两个对称的氯原子, 最终确定该物质为 methyl-2-(3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-4-methylbenzoyl)-5-hydroxy-3-methoxybenzoate。对照文献, 该物质为 dihydrogeodin (1)。但是该文献中仅给出了该物质的部分氢谱^[9]。

化合物 2 (图 1), 白色固体, HRTOFMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 511.1967。¹H NMR (DMSO, 600 MHz) δ : 1.03 (3H, s), 1.16 (3H, s), 1.29 (3H, s), 1.35 (3H, s), 1.65 (1H, d, $J=12.0$ Hz), 1.73 (1H, d, $J=13.8$ Hz), 1.96 (1H, t, $J=13.8$ Hz), 2.28 (1H, t, $J=12.0$ Hz), 2.73 (1H, d, $J=18.0$ Hz),

3.47 (1H, d, $J=18.0$ Hz), 3.90 (3H, s), 5.62 (1H, d, 10.0 Hz), 6.09 (2H, s), 6.31 (OH, s), 6.35 (1H, d, $J=10.0$ Hz), 6.59 (OH, s), 6.87 (1H, s), 7.12 (1H, d, $J=2.8$ Hz), 7.12 (1H, d, $J=2.8$ Hz); ¹³C NMR (DMSO, 150 MHz) δ : 21.9, 23.1, 23.8, 25.2, 25.6, 26.2, 28.4, 42.4, 56.5, 60.2, 76.4, 79.5, 81.5, 98.2, 98.4, 99.5, 102.3, 105.3, 123.2, 127.1, 139.8, 143.0, 152.3, 153.2, 157.6, 163.4, 162.4, 201.8 (图 2)。

表 1 化合物 1 的核磁波谱

Table 1 NMR data (CDCl_3) of 1

Position	¹³ C NMR	¹ H NMR	HMBC (C to H)
1	111.1	-	-
2	155.1	-	-
3	141.7	-	H-7
4	112.2	-	H-7
5	141.7	-	H-7
6	155.1	-	-
7	18.8	2.44 (s)	-
1'	127.8	-	H-6'
2'	125.3	-	H-4', 6'
3'	156.6	-	H-4', 9'
4'	103.5	6.72 (d, $J=2.4$ Hz)	H-6', OH-5'
5'	158.7	-	H-4', 6', OH-5'
6'	107.4	6.94 (d, $J=3.0$ Hz)	H-4', OH-5'
7'	165.6	-	H-6', 10'
8'	200.2	-	-
9'	56.0	3.66 (s)	-
10'	52.2	3.67 (s)	-
OH-2	-	11.75 (s)	-
OH-5	-	11.75 (s)	-
OH-5'	-	10.12 (s)	-

核磁氢谱中显示两个芳香氢 δ 7.12 (d, $J=2.8$ Hz), 三个烯氢 δ 5.62 (d, $J=10.0$ Hz)、6.35 (d, $J=10.0$ Hz) 和 6.87 (s), 缩酮的两个氢 δ 6.09 (2H, s), 3 个亚甲基 δ 2.28 (t, $J=12.0$ Hz)、1.65 (d, $J=12.0$ Hz)、1.96 (t, $J=13.8$ Hz)、1.73 (d, $J=13.8$ Hz) 和 2.73 (d, $J=18.0$ Hz)、3.47 (d, $J=18.0$ Hz), 5 个甲基 δ 1.03 (s)、1.16 (s)、1.29 (s)、1.35 (s) 和 3.90 (s), 以及 2 个羟基 δ 6.31 (s)、6.59 (s, OH) 和 6.59 (s)。核磁碳谱中有 1 个酮羰基 δ 201.8 和 1 个酯羰基 δ 163.4, 1 个缩酮 δ 102.3, 1 个甲氧基和 4 个甲基, 结合 HMBC 和 HMQC, 以及质谱, 和文献对照, 最终确定化合物 2 为 Territrems A^[10]。

化合物 3 (图 1), 白色固体, HRTOFMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 527.2284。¹H NMR (DMSO, 600 MHz) δ : 7.12 (2H, s), 6.97 (1H, s), 6.59 (OH, s), 6.35 (OH, s), 6.34 (1H, d,

$J=4.8$ Hz), 5.60 (1H, d, $J=6.6$ Hz), 3.86 (6H, s), 3.71 (3H, s), 3.48 (1H, d, $J=16.8$ Hz), 2.76 (1H, d, $J=17.4$ Hz), 2.15 (1H, t, $J=12.0$ Hz), 1.95 (1H, t, $J=13.0$ Hz), 1.65 (1H, d, $J=12.0$ Hz), 1.75 (1H, d, $J=13.0$ Hz), 1.40 (3H, s), 1.36 (3H, s), 1.18 (3H, s), 1.08 (3H, s); ^{13}C NMR (DMSO, 150 MHz): δ 201.4, 163.6, 162.7, 157.1, 153.6, 139.8, 127.1, 123.7, 102.9, 98.6, 98.2, 81.2, 79.5, 75.4, 60.6, 56.5, 55.7, 42.5, 28.2, 26.2, 25.8, 25.2, 23.9, 23.7, 21.9 (图2)

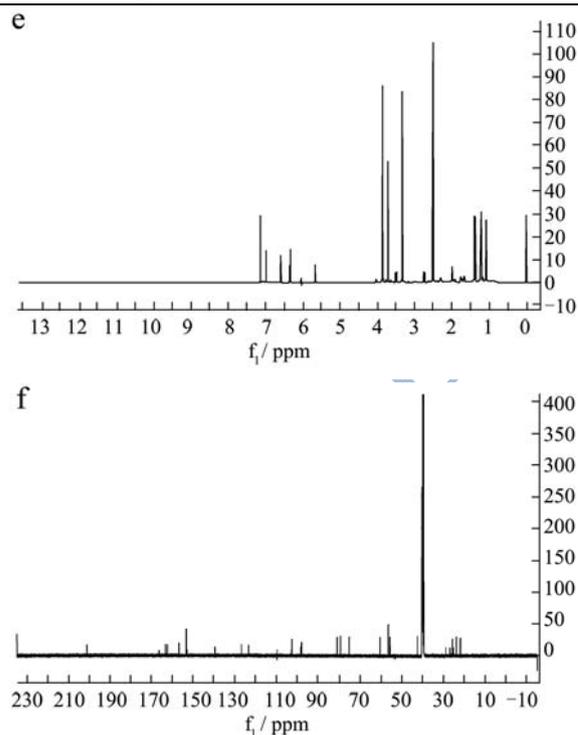
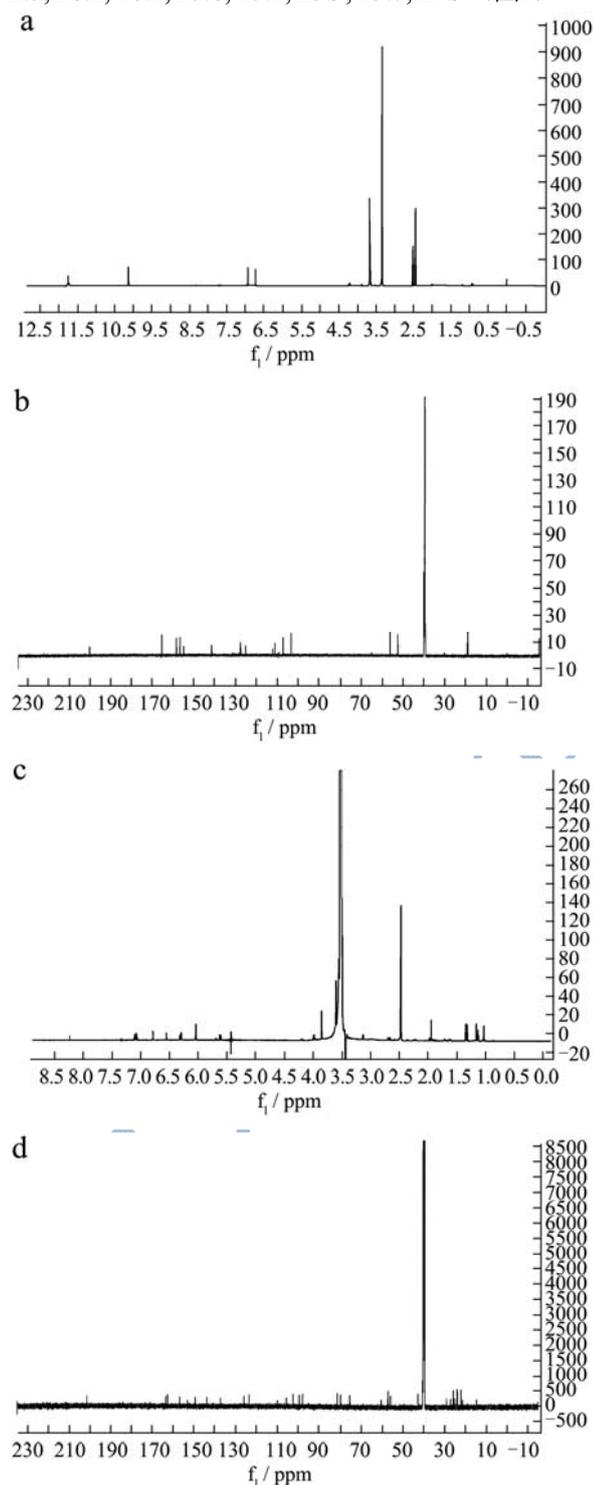


图2 化合物1、2和3的核磁氢谱和核磁碳谱

Fig.2 NMR data of 1, 2 and 3

注: a: ^1H NMR of 1, b: ^{13}C NMR of 1, c: ^1H NMR of 2, d: ^{13}C NMR of 2, e: ^1H NMR of 3, f: ^{13}C NMR of 3.

将3的核磁氢谱以及核磁碳谱和2对比,发现非常相似,主要差别在于多了两个甲氧基 δ_{H} 3.86 (6H, s)、 δ_{C} 56.5,但是缺少了缩酮的信号 δ_{H} 6.09 (2H, s)、 δ_{C} 102.3,结合高分辨质谱,发现连接的苯环为1,3,4,5-四取代的对称结构。通过文献对照,最终确定该物质为Territrems B^[10]。该物质有强抗乙酰胆碱酶活性,最小抑制浓度为 2.6×10^{-7} mol/L^[11]。

化合物4(图1),浅黄色针状晶体,ESI-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 151。 ^1H NMR (Acetone- d_6 , 600 MHz) δ : 2.55(3H, s), 6.31 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 6.43 (1H, dd, $J=2.5, 9.0$ Hz), 7.75 (1H, d, $J=9.0$ Hz), 9.28 (OH, s), 12.72 (OH, s); ^{13}C NMR (Acetone- d_6 , 150 MHz) δ : 26.2, 103.5, 107.7, 114.4, 133.1, 165.0, 166.2, 202.7

核磁氢谱显示化合物中有五组氢,两个邻位的芳香氢 δ 6.43 (1H, d, $J=9.0, 2.5$ Hz)和7.75 (1H, d, $J=8.5$ Hz),一个间位的芳香氢 δ 6.31 (1H, d, $J=2.5$ Hz), δ 2.56为甲基信号,与酮羰基相连。 δ 12.72 (OH, s)为螯合的酚羟基。 ^{13}C NMR谱显示4中有一个酮羰基 δ 202.7,另外还有两个连氧芳香碳 δ 165.0和166.2。综合以上信息,4是一个三取代的苯环。对照文献得知化合物4为2,4-二羟基苯乙酮(4)^[12]。

化合物5(图1),橘红色固体,ESI-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

271. $^1\text{H NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ : 2.40 (3H, s), 6.65 (1H, d, $J=2.4$ Hz), 7.14 (1H, s), 7.26 (1H, d, $J=2.6$ Hz), 7.59 (1H, s), 12.0 (OH, s), 12.10 (OH, s)。通过核磁氢谱发现该化合物具有两个螯合的氢 δ 12.10 (OH, s)、12.0 (OH, s), 一个连在苯环的甲基 δ 2.40 (3H, s), 以及 4 个间位的芳香氢 6.65 (1H, d, $J=2.4$ Hz)、7.14 (1H, s)、7.26 (1H, d, $J=2.6$ Hz)、7.59 (1H, s)。波谱数据和质谱和文献对照, 确定该物质为 1, 3, 8-trihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dione(emodin,5)^[9]。

化合物 6 (图 1), 黄色固体, ESI-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 285. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 2.42 (3H, s), 3.90 (3H, s), 7.10 (1H, s), 7.30 (2H, s), 7.48 (1H, s), 12.0 (OH, brd)。该物质的核磁氢谱和化合物 5 相似, 除了多了一个氧甲基 δ 3.90 (3H, s), 少了一个螯合的酚羟基。综合波谱数据和质谱, 与文献对照, 确定该物质为 questin (6)^[9]。

表 2 化合物 1、5、6 抑制 KB 和 KBv200 的 IC_{50} 值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Table 2 IC_{50} of 1, 5 and 6 to inhibit the growth of KB and

化合物	KBv200	
	KB	KBv200
1	促进生长	-
5	32.97	16.15
6	>50	>50
Cisplatin	0.56	0.78

利用人口腔上皮癌细胞株 (KB) 和多药耐药性的细胞株 (KBv200) 对 1、5 和 6 进行了细胞毒活性测试 (表 2), 发现化合物 1 对 KB 和 KBv200 没有细胞毒活性, 化合物 6 对两株肿瘤细胞株的细胞毒活性的 IC_{50} 大于 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$, 而化合物 5 对两株肿瘤细胞株的活性分别为 32.97 和 $16.15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。Cisplatin 用来做阳性对照, 对 KB 和 KBv200 的 IC_{50} 分别为 0.56 和 $0.78 \mu\text{g}/\text{mL}$ (该部分工作由广州医学院张建业博士协助完成)。

化合物 1, 含有两个氯原子的聚酮类化合物, 据文献报道该物质具有抗真菌和抗细菌活性, 通过 KB 肿瘤细胞株测试, 发现该物质没有细胞毒活性^[9]。化合物 2 和 3, 属于聚酮和萜类共同组成的杂萜类物质, 具有萜类物质和聚酮类物质的混合生源合成途径。该类 6/6/6/6 四环杂萜迄今为止发现的不多, 已经报道的仅有两株真菌 *Penicillium* sp 和 *Aspergillus terreus* 产生该类物质^[10-11], 但是从海洋微生物中发现该类物质还是首次。该类物质具有非常好的乙酰胆碱酶抑制活性, 可以达到 $1.0\sim 25.8 \text{ nM}$ ^[11]。化合物 5 和 6 为常见的醌类化合物, 化合物 1 可以通过 6 的羰基开环获得。为了获得结构更丰富、活性更强的次级代谢产物, 对该菌

株发酵条件的优化工作正在进行。

3 结论

本研究首次发现海洋环境来源的真菌可以代谢结构新颖的含有两个氯原子的聚酮化合物 1 以及 6/6/6/6 四环聚酮萜类 Territrems A (2), Territrems B (3)。首次对化合物 1 进行了完整的波谱数据解析并进行细胞毒活性测试, 发现该物质对 KB 和 KBv200 没有细胞毒活性。海参共附生真菌和海参长期共存, 共同进化, 抵御外部环境的威胁, 可以代谢结构丰富的聚酮类化合物, 而且是海参本体所不能产生的, 如化合物 1、2 和 3, 和海参本体的次级代谢产物三萜皂苷有较大差异, 但是化合物 3 具有强的抑制乙酰胆碱酶等生物活性, 为海洋药物先导化合物的发现提供了新资源。海参共附生微生物的研究为深入开发海参资源提供了新思路, 为开发具有预防和治疗帕金森疾病的功能食品提供了新来源。

参考文献

- [1] Esmat A Y, Said A A, El-Masry K S, et al. Bioactive compounds, Antioxidant potential, and Hepatoprotective activity of Sea cucumber (*Holothuria atra*) against Thioacetamide intoxication in Rats [J]. Nutrition, 2013, 29(1): 258-267
- [2] Mokhlesi A, Saeidnia S, Gohari A R, et al. Biological Activities of the Sea Cucumber *Holothuria Leucospilota* [J]. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 7(3): 243-249
- [3] Omran N E, Allam N G. Screening of Microbial contamination and Antimicrobial activity of Sea cucumber *Holothuria polii* [J]. Toxicol and Industrial Health, 2013, 29(10): 944-954
- [4] Michael V P. Filamentous fungi Associated with Holothurians from the Sea of Japan, off the Primorye Coast of Russia [J]. The Biological Bulletin, 2000, 198: 101-109
- [5] Afiyatullof S S, Kalinovsky A I, Pivkin M V, et al. New Diterpene glycosides of the Fungus *Acremonium striatisporum* Isolated from Sea cucumber [J]. Natural Product Research, 2006, 20(10): 902-908
- [6] Wang F Z, Li D H, Zhu T J, et al. Pseurotin A1 and A2, Two new 1-oxa-7-azaspiro[4,4]non-2-ene-4,6-diones from the Holothurian-derived Fungus *Aspergillus fumigatus* WFZ-25 [J]. Canadian Journal of Chemistry, 2011, 89: 72-76
- [7] Xia X K, Zhang J Y, Zhang Y G, et al. Pimarane Diterpenes from the Fungus *epicoccum* sp. HS-1 associated with *Apostichopus Japonicus* [J]. Bioorganic Medicinal Chemistry

- Letts, 2012, 22(18): 3017-3019
- [8] Xia X K, Qi J, Wei F, et al. Isolation and characterization of a new benzofuran from the *Fungus alternaria* sp. (HS-3) associated with a sea cucumber [J]. Natural Product Communication, 2011, 6(12): 1913-1914
- [9] Yoshihiko I, Yoshiaki K, Mayuri K, et al. Studies on metabolites produced by *Aspergillus terreus* var. aureus I. chemical structures and antimicrobial activities of metabolites isolated from culture broth [J]. Chemistry Pharmaceutical Bulletin, 1983, 31(12): 4543-4548
- [10] Lee S S. NMR assignment of Territrems A, B and C and the structure of MB2, the major metabolite of Territrem B by Rat liver microsomal fraction [J]. Journal of Natural Products, 1992, 55(2): 251-255
- [11] Peng F C. Acetylcholinesterase inhibition by Territrem B derivatives [J]. Journal of Natural Products, 1995, 58(6): 857-862
- [12] 吴雄宇,李曼玲,胡谷平等. 南海红树林内生真菌 2508 代谢产物的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),2002,41(3): 34-36
- Wu X Y, Li M L, Hu G P, et al. The metabolites of the *Endophyte fungus* No. 2508 in the Mangrove tree from the south China seacoast [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatsen. 2002, 41(3): 34-36