

蛇足石杉内生真菌 *Alternaria alternata* FL7 中乙酰胆碱酯酶抑制活性成分

谢嘉豪¹, 张浩², 肖依文^{1*}, 朱笃^{1,2,3*}

1 江西科技师范大学生命科学学院 南昌市微生物资源与代谢重点实验室 天然微生物药物研究江西省重点实验室, 江西 南昌 330013

2 江西师范大学化学与材料学院 生物多样性保护与资源利用江西省重点实验室, 江西 南昌 330022

3 东华理工大学, 江西 南昌 330013

摘要: 本文主要探究蛇足石杉内生真菌 *Alternaria alternata* FL7 大米发酵产物中的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制活性成分。采用硅胶柱层析、制备型高效液相色谱、核磁共振波谱和高分辨质谱技术对其成分进行化合物的分离与鉴定, 共鉴定单体化合物 19 个, 包括甘露醇(1)、尿嘧啶(2)、链格孢酚单甲醚(3)、啤酒甾醇(4)、methyl 5-acetamidopentanoate (5)、cyclo(L-Pro-L-Pro) (6)、 β -sitosterol (7)、黄嘌呤(8)、2(3*H*)-benzothiazolethione (9)、邻苯二酚(10)、1-methyl- β -D-glucopyranoside (11)、cyclo(L-Pro-L-Tyr) (12)、cyclo(L-Pro-L-Val) (13)、alteamide (14)、(4*S*,5*S*)-5-[(*S*)-sec-butyl]-4-hydroxypyrrolidin-2-one (15)、allahabadolactones A (16)、邻苯二甲酸二辛酯(17)、methyl 4-acetamidobutanoate (18)和 2-phenylethyl α -D-glucopyranoside (19)。通过改良后的 Ellman 法测定, 化合物 3 具有中等 AChE 抑制活性, IC₅₀ 值为(15.8±0.13) μ mol/L, 分子对接模拟显示 AChE 122 位的丝氨酸可能为其结合靶点。此外, 化合物 5、15 和 18 作为天然产物首次报道, 对化合物 14 的结构进行了修正。该研究可为蛇足石杉内生菌来源代谢产物的开发和利用提供参考。

关键词: 蛇足石杉; 内生真菌; *Alternaria alternata*; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

[引用本文]

谢嘉豪, 张浩, 肖依文, 朱笃, 2026. 蛇足石杉内生真菌 *Alternaria alternata* FL7 中乙酰胆碱酯酶抑制活性成分. 菌物学报, 45(4): 250248

Xie JH, Zhang H, Xiao YW, Zhu D, 2026. Acetylcholinesterase inhibitory active constituents of the endophytic fungus *Alternaria alternata* FL7 isolated from *Huperzia serrata*. *Mycosystema*, 45(4): 250248

资助项目: 国家自然科学基金(82160671); 江西省自然科学基金(20224BAB215023); 江西科技师范大学博士科研启动基金(2023BSQD01)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82160671), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20224BAB215023), and the Doctoral Research Initiation Fund Project of Jiangxi Science and Technology Normal University (2023BSQD01).

*Corresponding authors. E-mails: XIAO Yiwen: xyw1152858687@163.com; ZHU Du: zhudu12@163.com

Received: 2025-08-19; Accepted: 2025-10-09

Acetylcholinesterase inhibitory active constituents of the endophytic fungus *Alternaria alternata* FL7 isolated from *Huperzia serrata*

XIE Jiahao¹, ZHANG Hao², XIAO Yiwen^{1*}, ZHU Du^{1,2,3*}

1 Jiangxi Province Key Laboratory of Natural Microbial Medicine Research, Key Laboratory of Microbial Resources and Metabolism of Nanchang City, College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

2 Jiangxi Province Key Laboratory of Biodiversity Conservation and Bioresource Utilization, College of Chemistry and Materials, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

3 East China University of Technology, Nanchang 330013, Jiangxi, China

Abstract: This study primarily investigates the acetylcholinesterase (AChE) inhibitory components in the fermentation product of the endophytic fungus *Alternaria alternata* FL7 from *Huperzia serrata*. Using silica gel column chromatography, preparative high-performance liquid chromatography (preparative HPLC), nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS), 19 monomeric compounds were isolated and identified. These include mannitol (**1**), uracil (**2**), alternariol monomethyl ether (**3**), cerevisterol (**4**), 1-methyl 5-acetamidopentanoate (**5**), cyclo (*L-Pro-L-Pro*) (**6**), stigmaterol (**7**), xanthine (**8**), 2(3*H*)-benzothiazolethione (**9**), catechol (**10**), 1-methyl β -*D*-glucopyranoside (**11**), cyclo (*L-Pro-L-Tyr*) (**12**), cyclo (*L-Pro-L-Val*) (**13**), alteamide (**14**), (4*S*,5*S*)-5-[(*S*)-*sec*-butyl]-4-hydroxypyrrolidin-2-one (**15**), allahabadolactones A (**16**), Bis(2-ethylhexyl) phthalate (**17**), methyl 4-acetamidobutanoate (**18**) and 2-phenylethyl α -*D*-glucopyranoside (**19**). Compound **3** was found to exhibit moderate AChE inhibitory activity with an IC₅₀ value of (15.8±0.13) μ mol/L, as determined using the modified Ellman method. Molecular docking simulations suggest that serine at position 122 of AChE may be its binding target. Additionally, compounds **5**, **15**, and **18** are reported as newly identified natural products, and the structure of compound **14** is revised. This study provides reference for the development and utilization of microbial resources from *Huperzia serrata*.

Keywords: *Huperzia serrata*; endophytes; *Alternaria alternata*; acetylcholinesterase inhibitory activity

蛇足石杉 *Huperzia serrata* 为石杉属 *Huperzia* 石杉科 Huperziaceae 多年生药用蕨类植物(吴其濬 1957), 具清热、除湿、消痛和止血等功效(蔡龚莉等 2015)。其化学成分石杉碱甲(huperzine A, Hup A)因乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)抑制活性高、可逆、分子量小、脂溶性高和易透过血脑屏障等特点, 已被应用于轻中度阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)的临床治疗(Liu *et al.* 1986)。然而, 从野生 *H. serrata* 中挖掘新型乙酰胆碱酯酶抑制剂(inhibitors of acetylcholinesterase, AChEIs)效率低下, 并且野生资源的大量采伐也会导致生态系统被破坏, 于是建立新的 AChEIs 资源库, 寻找新的 AChEIs 具有一定的可行性。

植物内生真菌(endophytes)是指全部生活史

或部分阶段定殖于健康植物组织内, 且不引发宿主产生病变的微生物(Zou & Tan 2001; 唐官美等 2024)。自 Stierle *et al.* (1993)从太平洋短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 韧皮部分离出一株可产紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanae* 后, 研究人员们意识到药用植物内生真菌在生产药用活性成分方面具有巨大的潜力。许多研究证明蛇足石杉内生真菌的次级代谢产物表现出多样的化学结构与生物活性, 包括细胞毒性(Ying *et al.* 2013)、乙酰胆碱酯酶抑制活性(Li *et al.* 2019)、抑菌活性等(Yang *et al.* 2019)和抗真菌活性(Cao *et al.* 2021)。

本课题组前期对江西省中国科学院庐山植物园的 *H. serrata* 内生真菌展开了系统的研究, 并从大量的内生真菌中筛选出多株具有 AChE

抑制活性的内生真菌, 包括 *Alternaria alternata* FL7 (Wang *et al.* 2016)。为探讨 *A. alternata* FL7 抗 AChE 的药效物质基础, 本研究对 FL7 的大米固体发酵提取物的化学成分进行分离与鉴定, 并系统测定了其 AChE 抑制活性, 最后通过分子对接技术对活性成分与靶蛋白之间的作用方式和位点进行探究。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和试剂

内生真菌 FL7 分离自江西省中国科学院庐山植物园的 *Huperzia serrata* 健康叶组织内, 现保藏于中国典型培养物保藏中心和天然微生物药物研究江西省重点实验室, 保藏编号为: CCTCC M 2023428。

乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)、碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCI)、5,5-二硫代-2-硝基苯甲酸(dithiobis-nitrobenzoic acid, DTNB)均购自 Sigma 公司, 石杉碱甲(huperzine A, Hup A)购自中国药品生物制品检定所。

1.1.2 仪器

Bruker AV 400 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker 公司), S1000 型 PCR 仪、多功能酶标仪和凝胶成像系统(Bio-Rad 公司), 电泳仪、电泳槽和 WD-9403F 紫外检测分析仪(北京六一厂), Waters 1525 分析型和制备型高效液相色谱仪(Waters 公司), YMC-Pack Pro C18 分析色谱柱(5 μm , 250 mm \times 10 mm)、YMC-Pack Pro C18 制备色谱柱(10 μm , 250 mm \times 10 mm) (YMC 公司), 超纯水仪(Milli-Q 公司), 制备型薄层色谱、GF254 薄层硅胶板和 200-300 目柱色谱硅胶填料(青岛海洋化工厂), 分析纯石油醚、乙酸乙酯、甲醇、乙腈和氯仿(西陇化工), 色谱级甲醇和乙腈(Merck 公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株形态学和分子生物学鉴定

菌株 FL7 由超低温冰箱取出, 接种至 PDA 培养基中, 在光照培养箱 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d,

观察其菌落形态, 并用光学显微镜观察其菌丝和孢子形态, 参照《真菌鉴定手册》(魏景超 1979)进行初步比对。

分子生物学鉴定采用 CTAB 法(Conlon *et al.* 2022)提取内生真菌总 DNA, 使用通用 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3')扩增真菌 ITS-rDNA 序列。扩增后引物序列送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序得到的 ITS rDNA 序列在 NCBI 的 GenBank 序列库进行比对, 并构建系统发育树。

1.2.2 培养、提取和分离

将内生真菌 FL7 接种至 PDA 平板培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 活化 7 d。用灭菌竹签挑取适量菌丝至装有 120 mL PDB 培养基的 250 mL 锥形瓶中 28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 扩大培养 5 d 获得种子液。配制 500 瓶大米固体培养基(80 g 大米, 120 mL 自来水), 每瓶接入 5 mL 种子液, 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 30 d。

待培养完毕, 用甲醇浸提 11 次, 每次 24 h, 过程中使用木棍进行搅拌, 然后减压旋蒸除去甲醇, 共获得甲醇浸膏(含溶剂) 10.5 kg。将甲醇浸膏溶于蒸馏水, 超声振荡形成水相悬浊液, 然后分别用石油醚、乙酸乙酯各萃取 3 次, 获得石油醚浸膏和乙酸乙酯浸膏(EA 浸膏) (192 g)。EA 浸膏与硅胶拌样, 采用干法装柱, 流动相使用石油醚:乙酸乙酯(3:1-0:1)梯度洗脱, 获得馏分 Fr.1-Fr.4, 使用乙酸乙酯:甲醇(3:1-0:1)梯度洗脱, 获得馏分 Fr.5-Fr.8。经乙酰胆碱酯酶活性测定, Fr.1 的 AChE 抑制活性最高, 故对其进行进一步分离。将 Fr.1 (35.4 g)与硅胶拌样, 采用干法装柱, 流动相使用石油醚:乙酸乙酯(3:1、1:1、1:3 和 0:1)洗脱, 获得馏分 Fr.1.1-Fr.1.4, 使用二氯甲烷:甲醇(3:1、1:1、1:3 和 0:1)洗脱, 获得馏分 Fr.1.5-Fr.1.8。经乙酰胆碱酯酶抑制活性测定, Fr.1.3 的 AChE 抑制活性最高, 进行系统分离。Fr.1.3 (4.67 g)采用湿法装柱, 流动相使用环己烷和乙酸乙酯(10:1、10:3、10:5、5:5、5:10、3:10 和 1:10)进行洗脱, 获得 Fr.1.3.1-Fr.1.3.7。

Fr.1.3.4 甲醇溶液在室温下析出白色簇状晶体, 经鉴定为化合物 **1** (95.9 mg)。Fr.1.3.6 在室

温下析出深棕色粉末, 经鉴定为化合物 **2** (399.5 mg)。Fr.1.3.1 在二氯甲烷和甲醇混合溶液中析出无色针尖状晶体, 经鉴定为化合物 **3** (130.7 mg)。Fr.1.3.1 (32.2 mg)经制备型 HPLC (乙腈:水, 70:30, 体积比)纯化, 获得化合物 **4** (13.6 mg, $t_R=14.5$ min), 剩余馏分浓缩, 经制备型 TLC 薄层板(二氯甲烷:甲醇, 10:1, 体积比)纯化, 获得化合物 **5** (1.9 mg, $R_f=0.48$)。Fr.1.3.2 经制备型 HPLC (乙腈:水, 60:40, 体积比)纯化, 获得化合物 **6** (10.2 mg, $t_R=10.1$ min)、化合物 **7** (10.2 mg, $t_R=17.2$ min)和化合物 **8** (4.3 mg, $t_R=34.1$ min)。Fr.1.3.3 经制备型 HPLC (乙腈:水, 50:50, 体积比)纯化, 获得化合物 **9** (2.8 mg, $t_R=16$ min)和化合物 **10** (2.6 mg, $t_R=26.1$ min)。将 Fr.1.3.3 剩余溶液浓缩, 经制备型 TLC 薄层板(纯二氯甲烷)纯化, 获得化合物 **11** (1.1 mg, $R_f=0.2$)。Fr.1.3.4 湿法上样, 经正相硅胶色谱柱, 洗脱溶剂比例为二氯甲烷:甲醇(40:1 和 20:1)获得化合物 **12** (10.0 mg)和化合物 **13** (9.6 mg)。Fr.1.3.5 经制备型 HPLC (甲醇:水, 30:70, 体积比)纯化, 获得化合物 **14** (4.1 mg, $t_R=19.5$ min)、化合物 **15** (6.1 mg, $t_R=42$ min)和化合物 **16** (3.5 mg, $t_R=107-123$ min)。Fr.1.3.6 经制备型 TLC (二氯甲烷:甲醇, 10:1, 体积比)获得化合物 **17** (5.1 mg, $R_f=0.7$)和化合物 **18** (4.3 mg, $R_f=0.45$)。Fr.1.3.7 经制备型 HPLC (乙腈:水, 70:30, 体积比)纯化, 获得化合物 **19** (2.1 mg, $t_R=23.5$ min)。

1.2.3 抗乙酰胆碱酯酶活性测定

采用改良的 Ellman 法测定各单体化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性(Liu *et al.* 2017)。在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 的 PBS 缓冲液(pH 8.0), 20 μ L 的乙酰胆碱酯酶(50 U/L, 溶于 PBS 中), 20 μ L 的样品溶液(终浓度为 1 mg/mL, 溶于含 2% DMSO 的 PBS 溶液中), 20 μ L 1.2 mmol/L 的碘代硫代乙酰胆碱作为酶的反应底物。在 37 $^{\circ}$ C 下恒温孵育 30 min 后加入 20 μ L 4%十二烷基硫酸钠(SDS)终止反应, 并加入 20 μ L 0.6 mmol/L 的 DTNB, 立即测定反应体系在 405 nm 波长下的吸光度。单体化合物的百分抑制率通过公式 $I=[1-(A_{\text{样品}}-A_{\text{背景}})/A_{\text{空白}}] \times 100\%$ 计算获得, 其中 $A_{\text{样品}}$

为加药组, $A_{\text{背景}}$ 为没有加入酶的对照组, $A_{\text{空白}}$ 为未加入样品组。通过计算不同样品浓度对乙酰胆碱酯酶的抑制率来计算不同单体化合物的 IC_{50} 值, 以上每组实验重复 3 次, 石杉碱甲作为阳性对照。

1.2.4 分子对接模拟方法

靶蛋白和小分子化合物的下载、处理和对接参考 Hsin *et al.* (2013)的方法, 具体对接参数如下: center_x=-52.859, center_y=32.657, center_z=-45.656; size_x/y/z=20.0, exhaustiveness=8, num_modes=9, energy_range=3, 取打分较高的构想并用 PYMOL 和 discovery studio 进行可视化分析。

2 结果与分析

2.1 形态学和分子生物学鉴定

菌株 FL7 在 PDA 培养基中培养 7 d 后, 对 PDA 培养基中菌株进行形态学观察, 菌落整体呈圆形, 中央菌丝浓密, 呈灰白色, 边缘菌丝生长缓慢呈土灰白色, 背部中央墨绿色, 有不明显的轮纹(图 1A, 1B)。通过光学显微镜观察其菌丝具有明显的隔段, 侧生较少(图 1C), 菌丝生长时, 由顶端先行膨大(图 1D); 分生孢子梗褐色, 单生, 直立或者弯曲(图 1E); 分生孢子为椭圆形或卵形, 深褐色, 具有多个横隔膜, 分割处不缢缩或者略微缢缩(图 1F)。根据 FL7 的培养性状和形态特征, 查阅资料《中国真菌志-链格孢属》(张天宇 2003), 初步鉴定为链格孢属真菌。

对菌株 FL7 进行 ITS-rDNA 基因 PCR 扩增, 将获得的条带进行测序, 并登录 NCBI 数据库进行 Blast 比对, 与 GenBank 中链格孢 *Alternaria alternata* 对应序列的相似性为 100%。按照 ITS-rDNA 基因顺序拼接构建系统发育树, 选用 *Curvularia canadensis* 为外群, 与链格孢 *A. alternata* 聚类成一个分支而与其他种类菌株各构成独立分支(图 2)。根据亲缘发生关系, 将 FL7 鉴定为链格孢 *A. alternata*。

2.2 结构鉴定 图 3

化合物 **1** 白色粉末; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 4.4(2H, d, $J=5.5$ Hz, 1/6-OH),

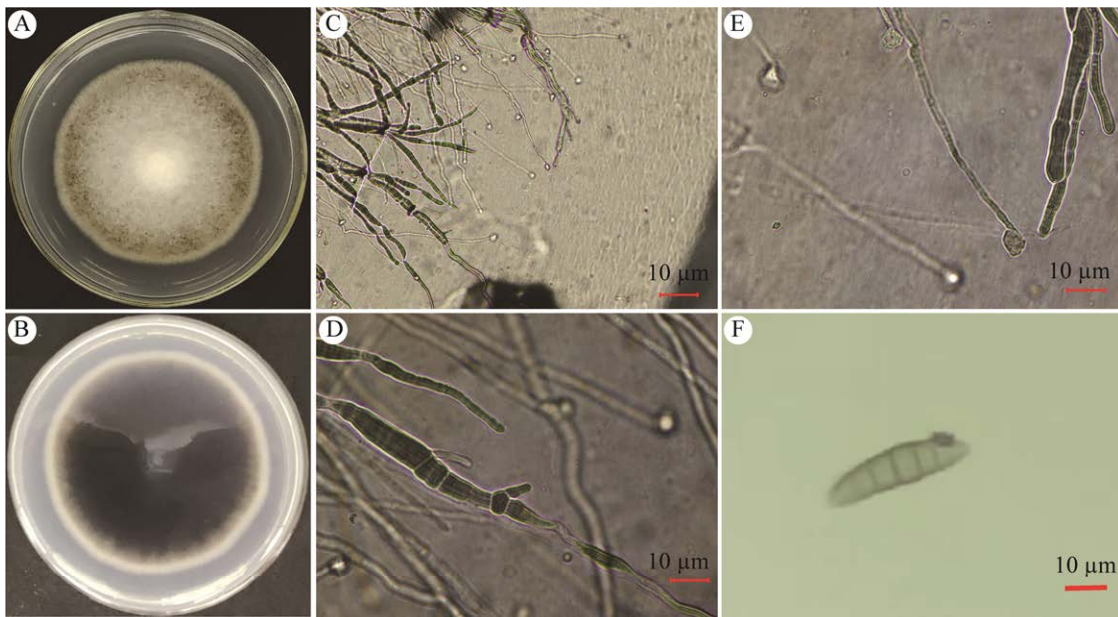


图 1 内生真菌 FL7 菌落形态及显微观察 A: 在 PDA 培养 7 d 的菌落形态正面; B: 在 PDA 培养 7 d 的菌落形态背面; C: 菌丝形态; D, E: 分生孢子梗和产孢细胞; F: 分生孢子

Fig. 1 Colony morphology and microscopic observation of endophytic fungus FL7. A: Front view of colony morphology cultured on PDA for 7 days. B: Reverse side view of colony morphology cultured on PDA for 7 days. C: Mycelial morphology. D, E: Conidiophores and conidiogenous cells. F: Conidia.

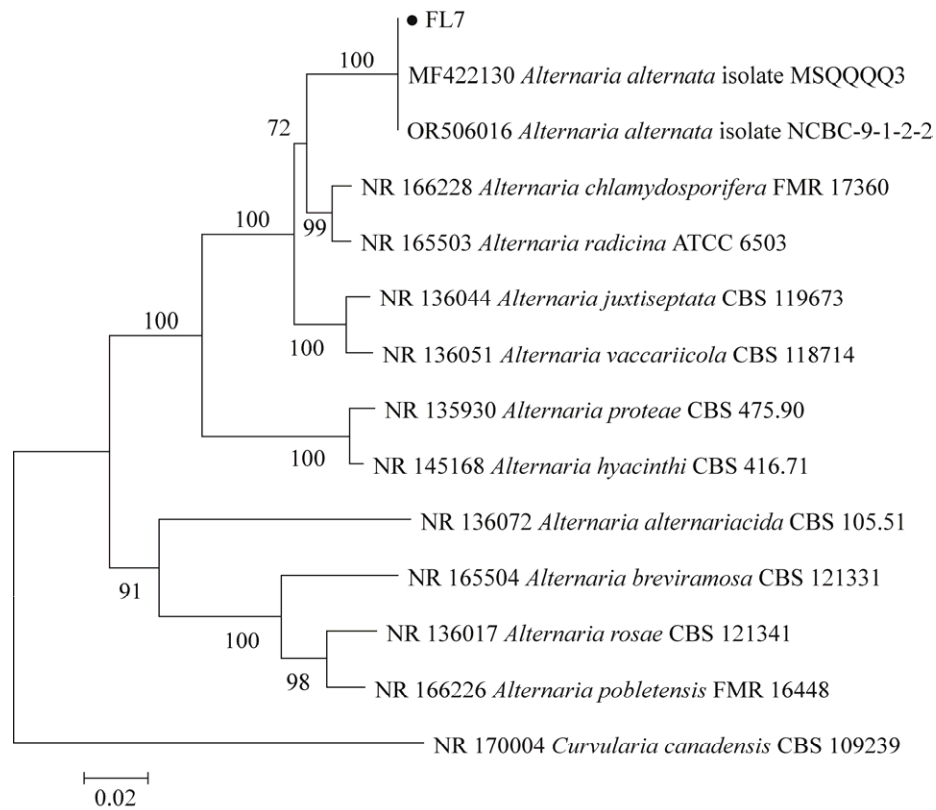


图 2 基于 ITS-rDNA 序列构建的菌株 FL7 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain FL7 constructed based on ITS-rDNA sequence.

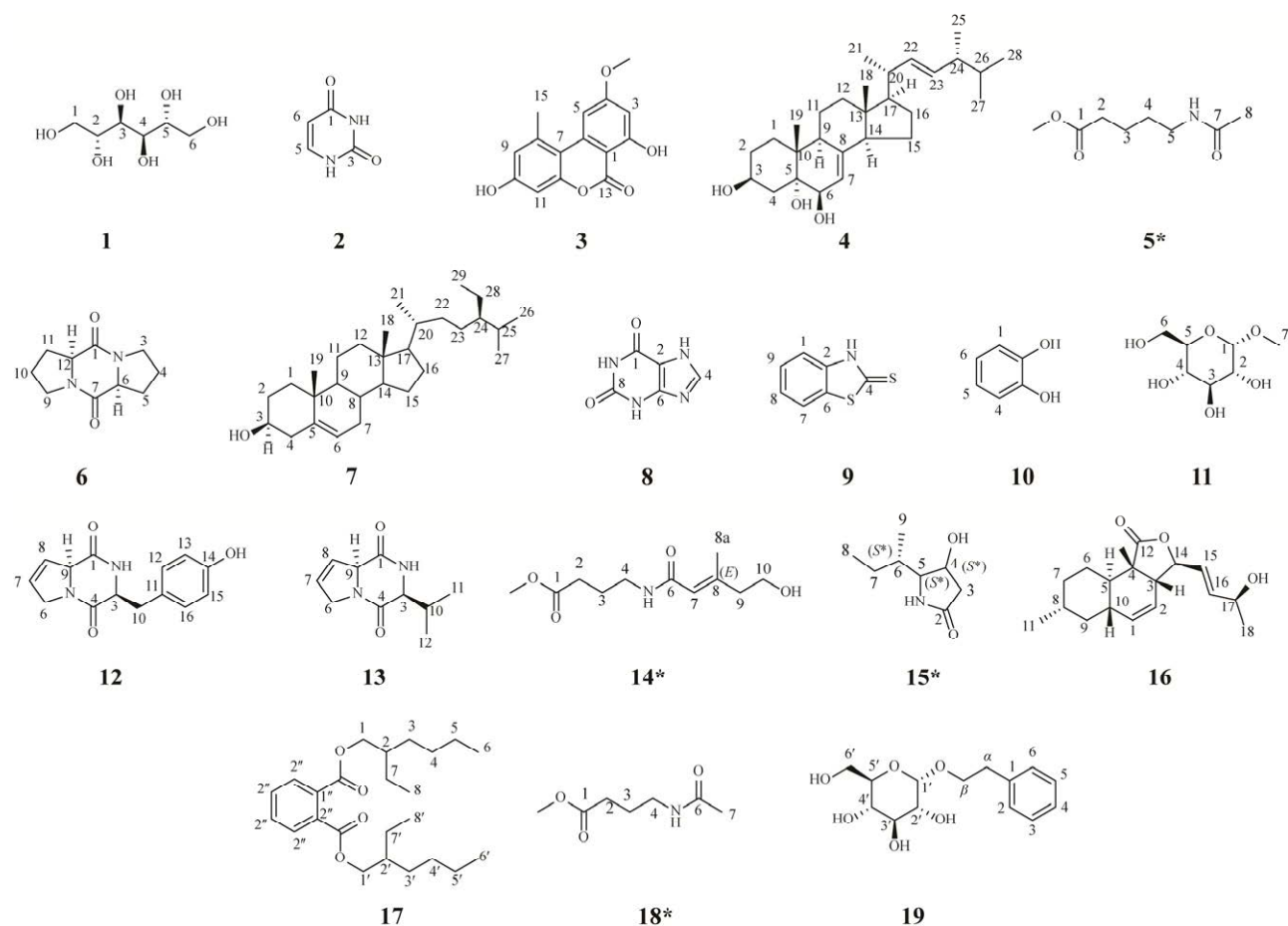


图3 化合物1-19的化学结构 *新天然产物(化合物5、15、18), 结构修正化合物(化合物14)

Fig. 3 Chemical structure of compounds 1-19. * New natural products (compounds 5, 15, 18) and structure-revised compound (compound 14).

4.33(2H, t, $J=5.0$ Hz, 3/4-OH), 4.13(2H, d, $J=7.2$ Hz, 1/6-OH), 3.37-3.61(8H, m); ^{13}C NMR(100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 63.8(s, C-1/6), 69.83(s, C-2/5), 71.40(s, C-3/4)。以上数据与 Forcina *et al.* (2015)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为甘露醇。

化合物 2 棕色粉末; ^1H NMR(400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 11.04(1H, s, NH-2), 10.84(1H, s, NH-4), 7.39(1H, t, $J=7.6$ Hz, H-6), 5.44(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-5); ^{13}C NMR(100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 151.96(s, C-2), 164.79(s, C-4), 100.69(s, C-5), 142.60(s, C-6)。以上数据与罗影子等(2023)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为尿嘧啶。

化合物 3 无色针状; ^1H NMR(400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 11.82(1H, s, OH-2), 10.36 (1H, s, OH-10), 7.21(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-5), 6.72(1H, d,

$J=2.5$ Hz, H-11), 6.64(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-9), 6.61(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-3), 3.91(3H, s, -OCH₃), 2.73(3H, s, H-15); ^{13}C NMR(100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ_{C} : 98.5(s, C-1), 164.7(s, C-2), 98.8(s, C-3), 165.0(s, C-4), 103.3(s, C-5), 137.9(s, C-6), 117.7(s, C-7), 138.06(s, C-8), 122.11(s, C-9), 152.9(s, C-10), 108.9(s, C-11), 152.9(s, C-12), 159.3(s, C-13), 54.8(s, C-14), 24.5(s, C-15), 22.0(-OCH₃), 165.9(s, C-17)。以上数据与 Tan *et al.* (2008)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为链格孢酚单甲醚。

化合物 4 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ_{H} : 5.7(1H, m, H-7), 5.2(3H, dd, $J=15.3$, 6.9 Hz, H-22), 5.16(3H, dd, $J=15.3$, 7.7 Hz, H-23), 4.80(1H, m, H-3), 1.52(3H, s, H-19), 1.06(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.96(3H, d, $J=6.8$ Hz,

H-28), 0.88(3H, d, $J=6.8$ Hz, H-26), 0.86(3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.68(3H, s, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ_{C} : 33.8(s, C-1), 32.6(s, C-2), 67.6(s, C-3), 41.9(s, C-4), 76.2(s, C-5), 74.3(s, C-6), 120.5(s, C-7), 141.1(s, C-8), 43.8(s, C-9), 38.1(s, C-10), 22.4(s, C-11), 40.0(s, C-12), 43.7(s, C-13), 55.2(s, C-14), 23.5(s, C-15), 28.4(s, C-16), 56.3(s, C-17), 12.5(s, C-18), 18.8(s, C-19), 40.8(s, C-20), 21.4(s, C-21), 136.2(s, C-22), 132.2(s, C-23), 43.1(s, C-24), 33.4(s, C-25), 20.1(s, C-26), 19.9(s, C-27), 17.8(s, C-28)。以上数据与 Zhang *et al.* (2005)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为啤酒甾醇。

化合物 5 白色粉末; ^1H NMR(500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 3.64(3H, s, OCH₃), 3.15(2H, t, $J=6.8$ Hz, H-5), 2.34(2H, t, $J=7.4$ Hz, H-2), 1.92(3H, s, H-8), 1.61(2H, m, H-3), 1.50(2H, m, H-4); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 52.0(q, -OCH₃), 175.8(s, C-1), 34.3(t, C-2), 23.2(t, C-3), 29.7(t, C-4), 40.0(t, C-5), 173.2(s, C-7), 22.6(q, C-8)。以上数据与 Li *et al.* (2023)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 methyl 5-acetamidopentanoate。

化合物 6 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 4.33(1H \times 2, t, $J=7.5$ Hz, α -H Pro), 3.48(2H \times 2, m, β -H Pro), 2.31(1H \times 2, β -H Pro), 1.98(1H \times 2, m, β -H Pro), 1.98(2H \times 2, m, γ -H Pro); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 168.9(s, C-1/7), 46.5(s, C-3/9), 24.5(s, C-4/16), 29.0(s, C-5/11), 62.0(s, C-6/12)。以上数据与 Bouř *et al.* (2002)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 cyclo(*L*-Pro-*L*-Pro)。

化合物 7 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.34(1H, m, H-6), 3.46(1H, m, H-3), 2.16-2.28(2H, m, H-4/7), 1.77-1.87(3H, m, H-21), 1.01(3H, s, H-19), 0.92-0.78-0.87(9H, m, H-26/27/29), 0.69(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 37.0(s, C-1), 30.2(s, C-2), 72.2(s, C-3), 40.4(s, C-4), 141.5(s, C-5), 122.0(s, C-6), 30.2(s, C-7), 29.7(s, C-8), 50.8(s, C-9), 36.7(s, C-10), 20.1(s, C-11), 39.9(s, C-12), 42.9(s, C-13), 57.3(s,

C-14), 24.8(s, C-15), 28.7(s, C-16), 56.6(s, C-17), 12.3(s, C-18), 20.1(s, C-19), 36.7(s, C-20), 19.1(s, C-21), 34.4(s, C-22), 26.5(s, C-23), 46.4(s, C-24), 29.7(s, C-25), 19.7(s, C-26), 19.3(s, C-27), 23.6(s, C-28), 12.1(s, C-29)。以上数据与肖本游等(2022)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 β -sitosterol。

化合物 8 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 13.30(1H, s, 3-NH), 11.51(1H, s, 7-NH), 10.82(1H, s, 9-NH), 7.92(1H, s, H-4); ^{13}C NMR(100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 151.2(s, C-2), 148.9(s, C-4), 106.5(s, C-5), 155.4(s, C-6), 140.4(s, C-8)。以上数据与 Chai *et al.* (2014)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为黄嘌呤。

化合物 9 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 165.979 5 [M+H]⁺ (计算值 165.979 1), 确定化合物分子式为 $\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}_2$ 。 ^1H NMR(400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 7.36 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-7), 7.23(1H, d, $J=6.0$ Hz, H-8), 7.06(1H, t, $J=6.0$ Hz, 6.0 Hz, H-9), 6.89(1H, t, $J=6.0$ Hz, 60 Hz, H-1); ^{13}C NMR(100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 120.0(C-1), 156.0(C-2), 184.8(C-4), 124.0(C-6), 116.7(C-7), 118.8(C-8), 137.14(C-9)。以上数据与 Stierle *et al.* (1991)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 2(3*H*)-benzothiazolethione。

化合物 10 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 8.18(2H, s, H-1/4), 8.12(2H, s, H-5/6); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 152.29(s, C-2/3), 139.85(s, C-1/4)。以上数据与 Parveen *et al.* (2020)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为邻苯二酚。

化合物 11 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 4.65(1H, d, $J=3.7$ Hz, H-1), 3.80(d, $J=2.2$ Hz, H-6a), 3.77(1H, dd, $J=11.8, 2.2$ Hz, H-2), 3.62(1H, t, $J=9.3$ Hz, H-3), 3.65(d, $J=2.2$ Hz, H-6b), 3.51(1H, m, H-5), 3.38(3H, s, H-7), 3.28(1H, t, $J=9.3$ Hz, H-4); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 101.3(C-1), 73.5(C-2), 75.2(C-3), 71.8(C-4), 73.6(C-5), 62.7(C-6), 55.5(C-7)。以上数据与 Boaventura & Galotta (2009)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 1-methyl- β -D-

glucopyranoside。

化合物 **12** 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.03(1H, s, H-12), 7.02(1H, s, H-16), 6.70(1H, s, H-13), 6.68(1H, s, H-15), 4.35(1H, m, H-9), 4.05(2H, m, H-6), 3.54/3.33(1H, m, H-3), 1.21/2.09(m, H-5), 1.79(m, H-4); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 167.0(s, C-1), 45.9(s, C-3), 22.7(s, C-4), 29.4(s, C-5), 60.0(s, C-6), 170.8(s, C-7), 57.9(s, C-9), 37.6(s, C-10), 127.7(s, C-11), 132.0(s, C-12), 116.2(s, C-13), 157.7(s, C-14), 116.2(s, C-15), 132.0(s, C-16)。以上数据与 Yang *et al.* (2021)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 cycol (*L*-Pro-*L*-Tyr)。

化合物 **13** 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 4.19(2H, m, H-6), 4.02(1H, s, H-9), 3.51-3.54(1H, m, H-3), 2.31-2.35(1H, m, H-10), 1.09(3H, d, $J=9.0$ Hz, H-11), 0.92(3H, d, $J=7.8$ Hz, H-12); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 167.5(s, C-1), 46.2(s, C-3), 23.2(s, C-4), 29.9(s, C-5), 60.1(s, C-6), 172.5(s, C-7), 61.5(s, C-9), 29.5(s, C-10), 18.8(s, C-11), 16.7(s, C-12)。以上数据与 Yang *et al.* (2021)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 cycol (*L*-Pro-*L*-Val)。

化合物 **14** 白色粉末; ^1H NMR(500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 5.70(1H, br s, H-7), 3.68(2H, t, $J=6.6$ Hz, H-10), 3.65(3H, s, OCH₃), 3.21(2H, t, $J=6.9$ Hz, H-4), 2.36(2H, t, $J=7.4$ Hz, H-2), 2.31(2H, br s, $J=6.6$ Hz, H-9), 2.10(3H, br s, H-8a), 1.79(2H, m, H-3); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 175.5(C-1), 32.2(C-2), 25.8(C-3), 39.3(C-4), 169.7(C-6), 120.9(C-7), 151.5(C-8), 44.5(C-9), 60.8(C-10), 18.5(C-8a), 52.1(OCH₃)。以上数据与文献报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 alteamide, 经过 C-8a 的化学位移比较, 并参考 Cystodiones A-FC-6 处所连甲基的化学位移, 确定化合物 **14** C-8 双键应为 *E* 构型(Wang *et al.* 2021)。

化合物 **15** 白色粉末; ^1H NMR(500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 4.36(1H, br dd, $J=5.5$ Hz, 4.1 Hz, H-4), 3.31(1H, overlapped, H-5), 2.64(1H, dd,

$J=17.0$ Hz, 5.5 Hz, H-3a), 2.20(1H, br d, $J=17.0$ Hz, H-3b), 1.78(1H, m, H-6), 1.63(1H, m, H-7a), 1.20(1H, m, H-7b), 0.96(3H, d, $J=6.7$ Hz, H-9), 0.94(3H, d, $J=7.5$ Hz, H-8); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 69.1(C-4), 66.2(C-5), 179.6(C-2), 42.7(C-3), 34.5(C-6), 27.1(C-7), 15.1(C-9), 10.8(C-8)。以上数据与 Schmidt *et al.* (1993)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 (4*S*,5*S*)-5-[(*S*)-sec-Butyl]-4-hydroxypyrrolidin-2-one。

化合物 **16** 白色粉末; ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 5.92(1H, br d, $J=12.0$ Hz, H-16), 5.72(1H, dd, $J=16.0, 8.0, 4.0$ Hz, H-15), 5.65(1H, d, $J=8$ Hz, H-1), 5.57(1H, ddd, $J=10.1, 4.4, 2.6$ Hz, H-2), 4.48(1H, dd, $J=4.4$ Hz, H-14), 4.28-4.33(1H, m, H-17), 2.40-2.44(1H, m, H-3), 1.99-1.87(each 1H, m, H-9/10), 1.82-1.75(1H, m, H-6/7), 1.33-1.25(1H, m, H-5), 1.43-1.57(1H, m, H-8), 1.30(3H, d, $J=6.4$ Hz, H-18), 1.25(3H, d, $J=4.4$ Hz, H-18), 1.12(3H, s, H-13), 0.87-0.99(1H, m, H-7), 0.94(3H, d, $J=4.4$ Hz, H-11), 0.82(1H, q, $J=12.2$ Hz, H-9); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 135.6(s, C-1), 122.0(s, C-2), 52.6(s, C-3), 46.0(s, C-4), 41.3(s, C-5), 26.6(s, C-6), 36.2(s, C-7), 34.0(s, C-8), 42.7(s, C-9), 37.5(s, C-10), 22.7(s, C-11), 181.6(s, C-12), 16.4(s, C-13), 84.7(s, C-14), 126.7(s, C-15), 141.0(s, C-16), 68.1(s, C-17), 22.7(s, C-18)。数据与 Sadorn *et al.* (2016)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 allahabadolactones A。

化合物 **17** 无色油滴状; ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7.69-7.71(2H, m, H-3''/6''), 7.51-7.54(2H, m, H-4''/5''), 4.20-4.23(4H, m, H-1/1'), 1.63-1.69(2H, m, H-2/2'), 1.25-1.43(16H, m, H-3/3', 4/4', 5/5', 7/7'), 0.87-0.93(6H, m, H-6/6', 8/8'); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 167.7(s, C=O), 132.5(s, C-1''/2''), 130.8(s, C-4''/5''), 128.5(s, C-3''/6''), 68.2(s, C-1/1'), 38.7(s, C-2/2'), 30.4(s, C-3/3'), 29.0(s, C-4/4'), 23.8(s, C-5/5'), 11.0(s, C-6/6'), 23.0(s, C-7/7'), 14.0(s, C-8/8')。以上数据与赵丽艳等(2010)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为邻苯二甲酸二辛酯。

化合物 **18** 白色粉末, ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 3.65(3H, s, OCH₃), 3.18(2H, t, $J=6.9$ Hz, H-4), 2.35(2H, t, $J=7.4$ Hz, H-2), 1.92(3H, s, H-7), 1.77(2H, m, H-3); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 175.5(C-1), 32.04(C-2), 25.6(C-3), 39.6(C-4), 173.6(C-6), 22.5(C-7)。其余数据与 Tsuge *et al.* (1986)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 methyl 4-acetamidobutanoate。

化合物 **19** 白色粉末, ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 7.29(2H, s, C-4/6), 7.26(2H, s, C-1/3), 7.18(2H, m, H-2/5), 4.68(3H, d, H-1'), 3.77(2H, m, H- β), 3.56(4H, m, H- β /6), 3.40(m, H-5'/6'), 3.27(1H, m, H-5'), 3.19(1H, m, H-3'), 3.05(4H, t, H- α); ^{13}C NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 139.0(s, C-1), 128.2(s, C-2/6), 128.9(s, C-3/5), 126.1(s, C-4), 35.5(s, C- α), 68.0(s, C- β), 98.6(s, C-1'), 72.0(s, C-2'), 72.8(s, C-3'), 70.3(s, C-4'), 73.3(s, C-5'), 60.9(s, C-6')。以上数据与 Shu & Lawrence (1994)报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 2-phenylethyl α -D-glucopyranoside。

2.3 乙酰胆碱酯酶抑制活性测定结果

在乙酰胆碱酯酶活性测定过程中, 化合物 **3** 的溶解度欠佳, 所以最终测试时的最大浓度为 0.2 mg/mL, 其余化合物均为 1 mg/mL。乙酰胆碱酯酶活性测定结果(图 4)显示, 化合物 **3** 具有明显的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 进一步系统测定其 IC_{50} 值为(15.8 \pm 0.13) $\mu\text{mol/L}$, 阳性对照组 Hup A 为(1.8 \pm 0.6) nmol/L, 其余化合物 IC_{50} 均大于 100 mmol/L, 无明显抑制活性。

2.4 分子对接模拟结果

采用 PyMol 和 Discovery Studio 软件对化合物 Hup A 与 AChE 的分子对接结果进行 3D 和 2D 结构可视化分析(图 5A–5C)。Hup A 能够有效地结合到蛋白的活性口袋, 其结合能为-10.1 kcal/mol, 其结合能小于-7, 表示化合物能够与蛋白结合口袋发生较强氢键相互作用、Pi-Pi T-shaped 和 Pi-Alkyl/Alkyl 共轭相互作用。随后通过分析三维相互作用, 化合物与蛋白的 SER122 和 SER200 氨基酸形成氢键相互作用, 其氢键长为 3.0、3.3 和 3.1 埃, 化合物与蛋白 LEU127、TRP84 和

PHE330 形成 Pi-Alkyl/Alkyl 共轭相互作用, 化合物的苯环与蛋白的 PHE330 形成 PI-PI 共轭相互作用, 从而使 Hup A 结合到蛋白的活性口袋形成复合物。

化合物 **3** 能够有效地结合到蛋白的活性口袋, 其结合能为-11.0 kcal/mol, 其结合能小于-7, 表示化合物能够与蛋白结合口袋发生较强氢键相互作用、Pi-Pi T-shaped 和 Pi-Alkyl/Alkyl 共轭相互作用, 随后通过分析三维相互作用; 化合物与蛋白的 SER122 氨基酸形成氢键相互作用, 其氢键长为 3.3 埃, 化合物与蛋白 TYR334 和 PHE330 形成 Pi-Alkyl/Alkyl 共轭相互作用, 化合物的苯环与蛋白的 PHE330 形成 PI-PI 共轭相互作用, 化合物与蛋白的 TRP84 和 TRP432 形成 carbon hydrogen bond, 从而使 ligand 结合到蛋白的活性口袋形成复合物(图 5D–5F)。

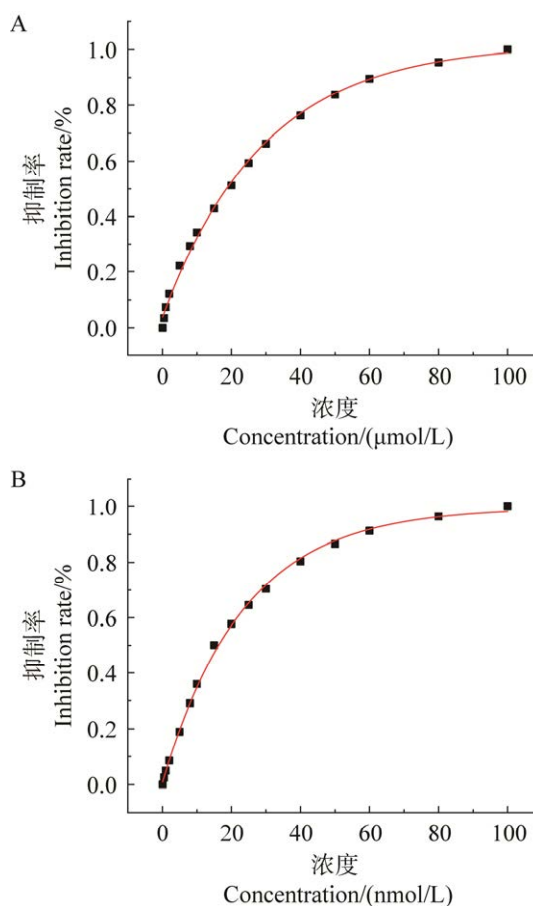


图 4 化合物 **3** (A) 与 Hup A (B) 的乙酰胆碱酯酶抑制活性
Fig. 4 The acetylcholinesterase inhibitory activities of compound **3** (A) and Hup A (B).

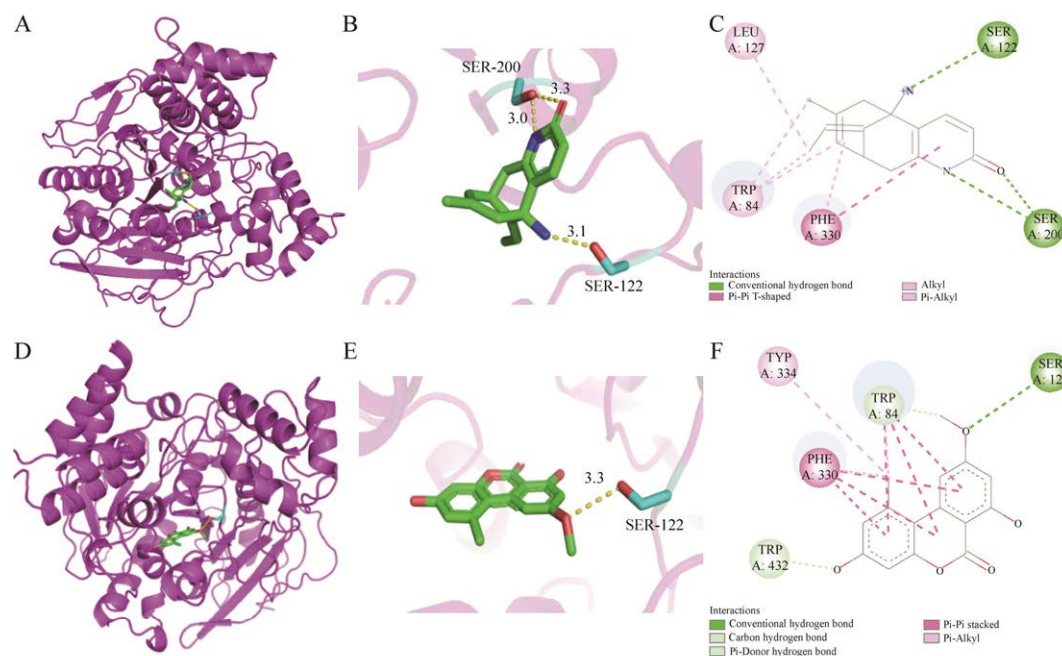


图 5 Hup A 与化合物 3 的分子对接示意图 A: HupA 与 AChE 分子对接 3D 示意图; B: HupA 与 AChE 分子作用位点的相互作用分析; C: HupA 与 AChE 分子对接 2D 示意图; D: 化合物 3 与 AChE 分子对接 3D 示意图; E: 化合物 3 与 AChE 分子作用位点的相互作用分析; F: 化合物 3 与 AChE 分子对接 2D 示意图

Fig. 5 Schematic diagram of molecular docking of Hup A and compound 3. A: 3D schematic diagram of HupA-AChE molecular docking. B: Interaction analysis of binding sites between HupA and AChE molecules. C: 2D schematic diagram of HupA-AChE molecular docking. D: 3D schematic diagram of compound 3-AChE molecular docking. E: Interaction analysis of binding sites between compound 3 and AChE molecules. F: 2D schematic diagram of compound 3-AChE molecular docking.

3 讨论

蛇足石杉内生真菌及其代谢产物丰富度高、生物活性优异,是新型 AChEIs 筛选的潜在资源宝库。FL7 是实验室前期从蛇足石杉中获得的具有显著 AChE 活性的菌株。本文利用正相硅胶柱色谱、制备型薄层色谱以及反相制备型高效液相色谱对 FL7 大米发酵产物的 Fr.1.3 馏分进行系统分离,获得单体化合物 19 个,然后采用核磁共振波谱和质谱方法对其结构进行确定。首次从天然产物中发现化合物 5、15 和 18,其中化合物 5 的核磁数据为首次报道;化合物 15 曾作为他汀类药物合成中间体报道(Schmidt *et al.* 1993);化合物 18 同样由化学法获得,无天然产物来源的报道(Tsuge *et al.* 1986)。同时发现结构纠错化合物 1 个(14),该化合物由 Wang *et al.* (2021)从芍药 *Paeonia lactiflora* 内生真菌 *A. alternata* 中获得,经 C-8a 化学位移确定 C-8 处应为 *E* 构型。采用改良后的 Ellman 法对所有化合物进行了乙酰胆

碱酯酶活性测定,结果显示除化合物 3 具有中等乙酰胆碱酯酶活性外,其余化合物均无明显抑制活性,其 IC_{50} 为 $(15.8 \pm 0.13) \mu\text{mol/L}$ 。最后通过分子对接技术模拟发现, AChE 122 位的丝氨酸可能是化合物 3 的作用靶点。

本研究结果丰富了蛇足石杉内生真菌 *A. alternata* 的化学成分,为该植物内生真菌资源进一步地开发和利用提供了参考和科学依据。

作者贡献

谢嘉豪:实验设计;数据分析;标本采集与图片拍摄;论文撰写、审核与修改。张浩:实验方案指导;数据分析;标本采集与图片拍摄;论文构思、审核与修改。肖依文:实验方案指导;审核与修改。朱笃:实验方案指导;审核与修改。

利益冲突声明

该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Boaventura MAD, Galotta ALQA, 2009. Polar constituents of *Euterpe precatoria* roots and their plant growth activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(5): 700-701
- Bouř P, Sychrovský V, Maloň P, Hanzlíková J, Baumruk V, Pospíšek J, Buděšínský M, 2002. Conformation of the dipeptide cyclo (L-Pro-L-Pro) monitored by the nuclear magnetic resonance and Raman optical activity spectra. Experimental and ab initio computational study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 106(32): 7321-7327
- Cai GL, Fang S, Zhang QH, 2015. Review on pharmaceutical study of *Huperzia serrata*. *Natural Product Research and Development*, 27(5): 931-939, 831 (in Chinese)
- Cao D, Sun P, Bhowmick S, Wei YH, Guo B, Wei YH, Mur LAJ, Sun ZL, 2021. Secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata*. *Fitoterapia*, 155: 104970
- Chai X, Li SS, Zhu L, Wang YF, Gao XM, 2014. Chemical constituents of the roots of *Trichosanthes kirilowii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(5): 965-967
- Conlon BH, Schmidt S, Poulsen M, Shik JZ, 2022. Orthogonal protocols for DNA extraction from filamentous fungi. *STAR Protocs*, 3: 101126
- Forcina GC, Castro A, Bokesch HR, Spakowicz DJ, Legaspi ME, Kucera K, Villota S, Narvaez-Trujillo A, McMahon JB, Gustafson KR, Strobel SA, 2015. Stelliosphaerols A and B, sesquiterpene-polyol conjugates from an Ecuadorian fungal endophyte. *Journal of Natural Products*, 78(12): 3005-3010
- Hsin KY, Ghosh S, Kitano H, 2013. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology. *PLoS One*, 8(12): e83922
- Li F, Gu S, Zhang S, Mo S, Guo J, Hu Z, Zhang Y, 2023. Three new amide derivatives from the fungus *Alternaria brassicicola*. *Natural Products and Bioprospecting*, 13(1): 28
- Li Z, Ma N, Zhao PJ, 2019. Acetylcholinesterase inhibitory active metabolites from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. YMF432. *Natural Product Research*, 33(12): 1794-1797
- Liu H, Liu L, Gao X, Liu Y, Xu W, He W, Jiang H, Tang J, Fan H, Xia X, 2017. Novel ferulic amide derivatives with tertiary amine side chain as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors: the influence of carbon spacer length, alkylamine and aromatic group. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 126: 810-822
- Liu JS, Zhu YL, Yu CM, Zhou YZ, Han YY, Wu FW, Qi BF, 1986. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*, 64(4): 837-839
- Luo YZ, Huang MJ, Shen SM, Su MZ, Yu DD, Guo YW, Qin YQ, Zhang GW, 2023. Chemical constituents from *Armillaria mellea* fermentation broth and its mycelia. *Natural Product Research and Development*, 35(7): 1183-1190 (in Chinese)
- Parveen A, Farooq MA, Kyunn WW, 2020. A new oleanane type saponin from the aerial parts of *Nigella sativa* with anti-oxidant and anti-diabetic potential. *Molecules*, 25(9): 2171
- Sadorn K, Saepua S, Boonyuen N, Laksanacharoen P, Rachtawee P, Prabpai S, Kongsaree P, Pittayakhajonwut P, 2016. Allahabadolactones A and B from the endophytic fungus, *Aspergillus allahabadii* BCC45335. *Tetrahedron*, 72(4): 489-495
- Schmidt U, Riedl B, Haas G, Griesser H, Vetter A, Weinbrenner S, 1993. Enantioselective and diastereoselective formation of syn-3-hydroxy-4-amino acids (syn-statinins) via tetramic acids. *Synthesis*, 1993(2): 216-220
- Shu CK, Lawrence BM, 1994. Synthesis of 2-phenylethyl. Alpha-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8): 1732-1733
- Stierle A, Strobel G, Stierle D, 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105): 214-216
- Stierle AA, Cardellina II JH, Singleton FL, 1991. Benzothiazoles from a putative bacterial symbiont of the marine sponge *Tedania ignis*. *Tetrahedron Letters*, 32(37): 4847-4848
- Tan N, Tao Y, Pan J, Wang S, Xu F, She Z, Lin Y, Gareth Jones EB, 2008. Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus No. 2240. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(3): 296-300
- Tang GM, Zhang L, Wei Y, Fu J, Chen HQ, Zhang XQ, Mei WL, Dai HF, Guo ZY, 2024. Alkaloid secondary metabolites from a plant endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum*. *Mycosystema*, 43(4): 230282 (in Chinese)
- Tsuge O, Kanemasa S, Hatada A, Matsuda K, 1986. Synthetic versatility of N-(silylmethyl) imines: water-induced generation of N-protonated azomethine ylides of nonstabilized type and fluoride-induced generation of 2-azaallyl anions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 59(8): 2537-2545
- Wang JT, Ma ZH, Wang GK, Xu FQ, Yu Y, Wang G, Peng DY, Liu JS, 2021. Chemical constituents from plant

- endophytic fungus *Alternaria alternata*. Natural Product Research, 35(7): 1199-1206
- Wang Y, Lai Z, Li XX, Yan RM, Zhang ZB, Yang HL, Zhu D, 2016. Isolation, diversity and acetylcholinesterase inhibitory activity of the culturable endophytic fungi harboured in *Huperzia serrata* from Jinggang Mountain, China. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(2): 20
- Wei JC, 1979. Manual of fungal identification. Shanghai Scientific & Technical Publishers, Shanghai. 609-611 (in Chinese)
- Wu QJ, 1957. An illustrated book of plants. The Commercial Press, Beijing. 1-418 (in Chinese)
- Xiao BY, Xiang JG, Wang SS, Zhang CP, Liu Y, Wang FS, 2022. Chemical constituents of chloroform extraction from root bark of *Celastrus stylosus* Wall. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 44(2): 380-386 (in Chinese)
- Yang H, Qi B, Ding N, Jiang F, Jia F, Luo Y, Xu X, Wang L, Zhu Z, Liu X, 2019. Polyketides from *Alternaria alternata* MT-47, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*. Fitoterapia, 137: 104282
- Yang W, Liang G, Sun Y, Gong Z, 2021. Bioactive secondary metabolites from marine *Streptomyces griseorubens* f8: isolation, identification and biological activity assay. Journal of Marine Science and Engineering, 9(9): 978
- Ying YM, Shan WG, Liu WH, Zhan ZJ, 2013. Alkaloids and nucleoside derivatives from a fungal endophyte of *Huperzia serrata*. Chemistry of Natural Compounds, 49(1): 184-186
- Zhang P, Li X, Li N, Xu J, Li ZL, Wang Y, Wang JH, 2005. Antibacterial constituents from fruit bodies of ascomycete *Bulgaria inquinans*. Archives of Pharmacal Research, 28(8): 889-891
- Zhang TY, 2003. Flora Fungorum Sinicorum. Vol. 16. *Alternaria*. Science Press, Beijing. 1-281 (in Chinese)
- Zhao LY, Zuo W, Fu QB, Zhao LJ, Zhu WL, Luo DQ, 2010. Chemical constituents from fruit body of *Lactarius vellereus*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 41(10): 1604-1608 (in Chinese)
- Zou WX, Tan RXI, 2001. Recent advances on endophyte research. Journal of Integrative Plant Biology, 43(9): 881-892

[附中文参考文献]

- 蔡龚莉, 方帅, 张起辉, 2015. 蛇足石杉的药学研究进展. 天然产物与开发, 27(5): 931-939, 831
- 罗影子, 黄明进, 沈寿茂, 苏明智, 于丹丹, 郭跃伟, 覃玉强, 张光文, 2023. 蜜环菌发酵液及其菌丝体的化学成分研究. 天然产物研究与开发, 35(7): 1183-1190, 1162
- 唐官美, 张丽, 韦媛, 付姣, 陈惠琴, 张雪晴, 梅文莉, 戴好富, 郭志勇, 2024. 植物内生真菌 *Purpureocillium lilacinum* 的生物碱类次级代谢产物. 菌物学报, 43(4): 230282
- 魏景超, 1979. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社. 609-611
- 吴其濬, 1957. 植物名实图考. 第十六卷. 石草类. 北京: 商务印书馆出版社. 1-418
- 肖本游, 向家桂, 王珊珊, 张昌鹏, 刘瑶, 王发松, 2022. 显柱南蛇藤根皮氯仿部位化学成分研究. 云南大学学报(自然科学版), 44(2): 380-386
- 张天宇, 2003. 中国真菌志. 第十六卷. 链格孢属. 北京: 科学出版社. 1-281
- 赵丽艳, 左伟, 付琪缤, 赵丽君, 朱文粮, 罗都强, 2010. 绒白乳菇子实体的化学成分研究. 中草药, 41(10): 1604-1608