

利福霉素抗性突变菌 *Streptomyces* sp. HS-NF-1046R 中的两个新化合物

齐欢^{1,3}, 马正¹, 薛正莲², 阮海宁³, 高美越³, 张辉³, 俞晓平^{1*}, 王继栋^{2,3*}

(1. 中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量与检验检疫重点实验室, 浙江 杭州 310018; 2. 安徽工程大学生物与化学工程学院, 微生物发酵安徽省工程技术中心, 安徽 芜湖 241000; 3. 浙江海正药业股份有限公司, 浙江省抗真菌药物重点实验室, 浙江 台州 318000)

摘要: 采用硅胶色谱、凝胶色谱及液相色谱分离纯化一株利福霉素抗性突变菌 *Streptomyces* sp. HS-NF-1046R 发酵物中的次级代谢产物, 通过波谱技术鉴定了 3 个化合物: 3-hydroxyl-2-*N*-propionyl-anthranilamide (**1**)、2,3-dihydro-8-hydroxy-2,2-dimethyl quinazolin-4-(1*H*)-one (**2**) 和 2-aminobenzamide (**3**), 其中 **1** 和 **2** 是新化合物。通过 SRB 法评价新化合物的细胞毒活性, 化合物 **1** 和 **2** 对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG2、人结肠癌细胞 HCT-116 和白血病细胞 K562 的 IC₅₀ 值均大于 100 μmol·L⁻¹, 未表现出明显的细胞毒性。

关键词: 链霉菌; 利福霉素抗性筛选; 次级代谢产物; 结构解析

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0117-05

Two new compounds from rifamycin resistant mutant strain *Streptomyces* sp. HS-NF-1046R

QI Huan^{1,3}, MA Zheng¹, XUE Zheng-lian², RUAN Hai-ning³, GAO Mei-yue³, ZHANG Hui³,
YU Xiao-ping^{1*}, WANG Ji-dong^{2,3*}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Microorganism Fermentation Engineering and Technology Research Center of Anhui Province, Institute of Biologic and Chemical Engineering of Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Antifungal Drugs, Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China)

Abstract: Using silica gel column chromatography, gel chromatography and HPLC, we isolated secondary metabolites in fermentation broth of a rifamycin resistant mutation strain *Streptomyces* sp. HS-NF-1046R. Based on spectroscopic data, the chemical structures of three compounds were identified as 3-hydroxyl-2-*N*-propionyl-anthranilamide (**1**), 2,3-dihydro-8-hydroxy-2,2-dimethyl quinazolin-4-(1*H*)-one (**2**) and 2-aminobenzamide (**3**). Compounds **1** and **2**, as new entities, were evaluated for cytotoxicity against A549, HepG2, HCT-116 and K562 cells using the SRB assay. Compounds **1** and **2** exhibited no cytotoxicity with IC₅₀ over 100 μmol·L⁻¹.

Key words: *Streptomyces*; rifamycin resistant screening; secondary metabolites; structure elucidation

微生物次级代谢产物化学结构丰富、生物学功能

收稿日期: 2018-10-29; 修回日期: 2018-11-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31772213); 浙江省杰出青年基金资助项目 (LR17C140002).

*通讯作者 Tel: 86-571-87676258, E-mail: yuxiaoping19630306@163.com;

Tel: 86-576-88827216, E-mail: jdwang@hisunpharm.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0974

多样, 在医药工业、食品工业、畜牧业和农业等领域具有重要的研究和开发价值^[1,2]。然而, 由于重复发现率不断升高, 使得采用传统手段从原有的微生物资源中发现新的次级代谢产物变得越来越困难^[3-5]。因此, 开发新策略使微生物产生更多新的生物活性化合物的需求越来越迫切^[6-8]。近些年来, 一些新的手段已经被尝

试用于从已有的抗生素生产菌中寻找新的微生物次级代谢产物,如:对全局性调控基因进行操作、多种菌株混合培养、抗生素抗性筛选等^[9-11]。其中,抗生素抗性筛选是利用一些作用于核糖体的特定抗生素进行耐药性诱变筛选,得到的突变菌株的核糖体或RNA聚合酶会发生改变导致其基因表达发生变化,因而可以提高次级代谢产物的产量或产生新的次级代谢产物^[12-15]。在前期研究中,本课题组从一株放线菌 *Streptomyces* sp. HS-NF-1046 中分离得到了新的环戊烯多取代衍生物 hisunic acid^[16]。为进一步挖掘该菌株的生物合成潜力,本文采用利福霉素抗性筛选获得一株次级代谢产物的液相谱图发生变化的突变株,对该菌株进行发酵,然后通过提取分离与鉴定,得到化合物 **1**~**3** (图 1),其中化合物 **1** 和 **2** 为新化合物。

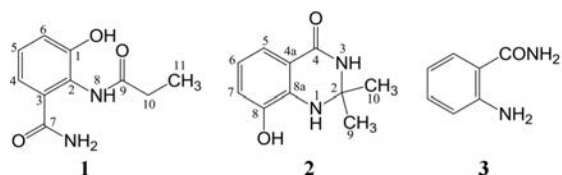


Figure 1 The chemical structures of compounds 1-3

结果与讨论

化合物 **1** 为白色粉末, HR-ESI-MS: m/z : 209.093 1 $[M+H]^+$ ($C_{10}H_{13}N_2O_3$, 计算值为 209.092 1), 提示化合物的分子式为 $C_{10}H_{12}N_2O_3$, 计算其不饱和度为 6。IR 谱在 3443 cm^{-1} 和 1666 cm^{-1} 处的吸收峰提示分子中含有羟基和羰基。在 ^1H NMR 谱 (表 1) 中, δ_{H} 6.99 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6\text{ Hz}$)、7.10 (1H, br d, $J = 7.8\text{ Hz}$) 和 7.13 (1H, t, $J = 7.8\text{ Hz}$) 说明化合物 **1** 的结构中含有 1 个 1,2,3-三取代的苯环; δ_{H} 1.09 (3H, t, $J = 7.5\text{ Hz}$) 和 2.37 (2H, m) 提示化合物的结构中存在 1 个乙基; 4 个化学位移为 δ_{H} 10.29 (1H, br s)、9.70 (1H, s)、7.76 (1H, br s)、7.51 (1H, br s) 的氢信号, 提示化合物中存在 4 个活泼氢。 ^{13}C NMR 和 DEPT 135 谱 (表 1) 显示, 化合物 **1** 中含有 10 个碳原子, 包括 2 个酰胺羰基碳原子 (δ_{C} 174.4、170.3)、3 个芳香族季碳原子 (δ_{C} 151.8、130.9、124.8)、3 个芳香族次甲基碳原子 (δ_{C} 126.7、120.2、119.8)、1 个脂肪族亚甲基碳原子 (δ_{C} 29.6) 和 1 个甲基碳原子 (δ_{C} 10.0)。 H_3 -11 (δ_{H} 1.09) 和 H_2 -10 (δ_{H} 2.37) 的 ^1H - ^1H COSY 相关以及 H_3 -11 和 H_2 -10 与 C-9 (δ_{C} 174.4) 的 HMBC 相关, 说明化合物 **1** 中存在 1 个丙酰基。再结合化合物 **1** 的分子量, 4 个活泼氢分别为 1 个氨基、1 个亚氨基和 1 个羟基。通过比较化合物 **1** 和化合物 3-hydroxy-2-*N*-iso-butryl-anthranilamide 的 ^1H 与 ^{13}C NMR 谱^[17], 发现它们具有相似的化学结构, 其主要的区别在于化合物

1 中的丙酰基基团取代了 3-hydroxy-2-*N*-iso-butryl-anthranilamide 上的异丁酰基团。同时, 在 HMBC 谱上 (图 2), 羟基氢 (δ_{H} 9.70, s) 与 C-1、C-2、C-6 的相关关系表明该羟基位于 1 位, H-4 与 C-7、H-5 与 C-3 的相关关系说明酰胺羰基 C-7 直接与 C-3 相连。在 ^1H - ^1H COSY 谱中 (图 2), 两个活泼氢信号 δ_{H} 7.76 (br s) 和 δ_{H} 7.51 (br s) 存在相关信号, 能确定为 CONH₂ 基团中的两个氢信号。在 HMBC 谱中 NH₂ 与 C-3 的相关关系进一步证明了 CONH₂ 位于 3 位。因此, 结合化合物的分子式, 推导出丙酰基通过 NH 与苯环的 2 位相连。H-4、H-6 与 C-2, H-5 与 C-1 的远程相关关系更进一步确证了 **1** 的化学结构。通过文献检索, 该化合物为新化合物, 名称为 3-hydroxyl-2-*N*-propionyl-anthranilamide。

化合物 **2** 为白色粉末, HR-ESI-MS: m/z : 193.096 8 $[M+H]^+$ ($C_{10}H_{13}N_2O_2$, 计算值为 193.097 2), 提示化合物的分子式为 $C_{10}H_{12}N_2O_2$, 计算其不饱和度为 6。在 ^1H NMR 谱中, 3 个相互耦合的芳香质子信号 δ_{H} 6.47 (1H, t, $J = 7.8\text{ Hz}$)、6.78 (1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$)、7.10 (1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$), 提示化合物 **2** 中存在 1 个 1,2,3-三取代的苯环。此外, 化合物 **2** 的高场区还存在两个甲基氢信号 δ_{H} 1.39 (6H, s), 提示化合物 **2** 的结构中含有 2 个偕二甲基, 同时 ^1H NMR 谱中还显示有 3 个活泼氢信号 δ_{H} 5.96 (1H, s)、7.95 (1H, s)、9.57 (1H, s)。化合物 **2** 的 ^{13}C NMR, DEPT135 (表 1) 及 HMQC 谱显示化合物 **2** 共有 10 个碳原子, 包括 2 个甲基碳原子 δ_{C} 29.3, 1 个脂肪族季碳原子 δ_{C} 67.6, 1 个酰胺羰基碳原子 δ_{C} 163.7, 3 个芳香族的次甲基碳原子 δ_{C} 116.4、117.5、118.0 和 3 个芳香族的季碳原子 δ_{C} 115.0、136.9、144.4。通过比较, 化合物 **2** 和化合物 2,3-dihydro-5,8-dimethoxy-2,2-dimethyl quinazolin-4-(1*H*)-one 的 ^1H 与 ^{13}C NMR 谱信号非常相似^[18], 其不同点在于, 化合物 2,3-dihydro-5,8-dimethoxy-2,2-dimethyl quinazolin-4-(1*H*)-one 结构中的 5,8-dimethoxy 基团在化合物 **2** 中分别替换成了 1 个氢原子和 1 个羟基基团。化合物 **2** 中 NH-1 与 C-2、C-4a、C-8, NH-3 与 C-2、C-4、C-4a, H-5 与 C-4, H-6 与 C-8、C-4a, H-7 与 C-8a, 8-OH 与 C-7、C-8 和 C-8a, 以及偕二甲基与 C-2 的 HMBC 相关更进一步确定了化合物 **2** 的结构。通过文献检索, 该化合物为新化合物, 名称为 2,3-dihydro-8-hydroxy-2,2-dimethyl quinazolin-4-(1*H*)-one。

化合物 **3** 为淡黄色粉末, ESI-MS 谱图给出相对分子质量为 135, 结合化合物的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱推出化合物的分子式为 $C_7H_8N_2O$ 。 ^1H NMR 谱中给出 4 组次甲基氢信号, 包括 δ_{H} 6.78 (1H, d, $J = 8.2\text{ Hz}$)、7.49 (1H, d, $J = 7.88\text{ Hz}$)、6.59 (1H, t, $J = 6.96\text{ Hz}$)、7.18 (1H, t, $J = 7.16\text{ Hz}$), ^{13}C NMR 谱中给出 7 个碳信号, 包

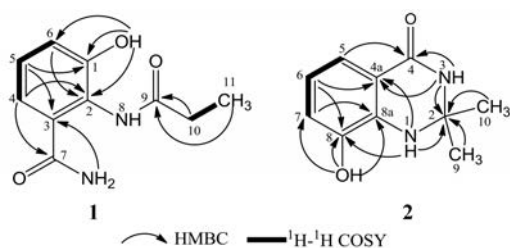


Figure 2 Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of **1** and **2**

括 3 个季碳信号 δ_{C} 173.3、128.3、132.2, 4 个次甲基碳信号 δ_{C} 116.9、115.7、114.4、107.7。将上述数据与 2-aminobenzamide 的数据进行比较^[19], 可以将化合物 **3** 确定为 2-aminobenzamide。

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR spectral data for **1** and **2** (DMSO- d_6 , J in Hz)

| Position | 1 | | 2 | |
|-----------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1 | | 151.8, C | 5.96 (s) | |
| 2 | | 124.8, C | | 67.6, C |
| 3 | | 130.9, C | 7.95 (s) | |
| 4 | 7.10 (br d, 7.8) | 119.8, CH | | 163.7, C |
| 4a | | | | 115.0, C |
| 5 | 7.13 (t, 7.8) | 126.7, CH | 7.10 (d, 7.8) | 118.0, CH |
| 6 | 6.99 (dd, 7.8, 1.6) | 120.2, CH | 6.47 (t, 7.8) | 116.4, CH |
| 7 | | 170.3, C | 6.78 (d, 7.8) | 117.5, CH |
| 8 | 10.29 (br s) | | | 144.4, C |
| 8a | | | | 136.9, C |
| 9 | | 174.4, C | 1.39 (s) | 29.3, CH ₃ |
| 10 | 2.37 (m) | 29.6, CH ₂ | 1.39 (s) | 29.3, CH ₃ |
| 11 | 1.09 (t, 7.5) | 10.0, CH ₃ | | |
| 1-OH | 9.70 (s) | | | |
| 8-OH | | | 9.57 (s) | |
| NH ₂ | 7.76 (br s) | | | |
| | 7.51 (br s) | | | |

实验部分

仪器 Innova 5000 摇床 (New Brunswick Scientific, 美国); 50 L 发酵罐 (上海国强生化工程装备有限公司); Agilent 1100 半制备 HPLC, Zorbax SB-C18 (5 μm , 250 mm \times 9.4 mm) 色谱柱 (Agilent, 美国); Nicolet Magna FT-IR 750 光谱仪 (Nicolet, 日本); Varian CARY 300 BIO 分光光度计 (Varian, 美国); Bruker DRX-400 核磁共振仪 (Bruker, 日本); Q-TOF Micro LC-MS-MS 质谱仪 (Waters, 美国)。

试剂 丙酮、石油醚 (国药集团化学试剂公司); 甲醇 (临海市浙东特种试剂有限公司); 乙醇 (安徽省安特食品有限公司)、乙酸乙酯 (临安市青山化工试剂厂)、乙腈 (Merck, 德国); 柱色谱硅胶、硅胶薄层色谱板 (青岛海洋化工集团); Sephadex LH-20 (GE Healthcare, 英国); 氘代试剂 (Cambridge Isotope Laboratory, 美国); 利福霉素 (浙江海正药业股份有限公司); 麦芽抽提物

(BD, 美国); 酵母抽提物 (Oxoid, 英国); 琼脂 (BD, 美国); 葡萄糖 (国药集团化学试剂公司); 大豆粉 (宁波北仑江南油脂公司); 甘露醇 (青岛明月海藻集团有限公司)。

1 利福霉素抗性筛选

原始菌株 *Streptomyces* sp. HS-NF-1046 在 ISP2 固体培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 生长 7 天。配制浓度分别为 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5 和 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的利福霉素平板, 将原始菌株的孢子悬液 (1×10^8) 分别涂布在不同浓度的抗生素平板上, 每个浓度设 3 个平行, 28 $^{\circ}\text{C}$ 生长 4 天后, 目测无菌落生长的最小浓度即为 MIC (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。再将原始菌株孢子液悬液 (1×10^8) 分别涂于 1、2、4、8、16、32 倍 MIC 浓度的利福霉素平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6~9 天, 挑取生长出来的菌落, 共得到突变菌 41 株。将得到的突变菌株于对应利福霉素浓度的平板上划线, 28 $^{\circ}\text{C}$ 生长 7 天。然后刮取突变株孢子, 接种种子培养基 (葡萄糖 0.4%、酵母抽提物 0.4%、麦芽抽提物 1.0%、碳酸钙 0.2%, pH 7.0~7.2; 250 mL 摇瓶装量 25 mL), 250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 2 天, 转接摇瓶发酵 (大豆粉 2.0%、甘露醇 2.0%, pH 7.0~7.2; 250 mL 摇瓶装量 25 mL), 250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床发酵 7 天。取摇瓶发酵液, 加入 3 倍体积甲醇浸泡, 超声 30 min, 过滤取上清, 用氮吹浓缩后, 再用 HPLC [色谱柱: Zorbax SB-C18 (5 μm , 250 mm \times 9.4 mm); 流动相: CH₃CN/H₂O (10:90, v/v); 流速: 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 220 nm] 分析。最终发现一株菌落形态、孢子颜色发生明显变化的抗性突变株 HS-NF-1046R, 其发酵产物 HPLC 分析图谱也发生了明显的变化 (图 3)。

2 突变菌株发酵

利福霉素抗性突变株 HS-NF-1046R 在 ISP2 固体培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 生长 8 天。刮取孢子进种子 (葡萄糖

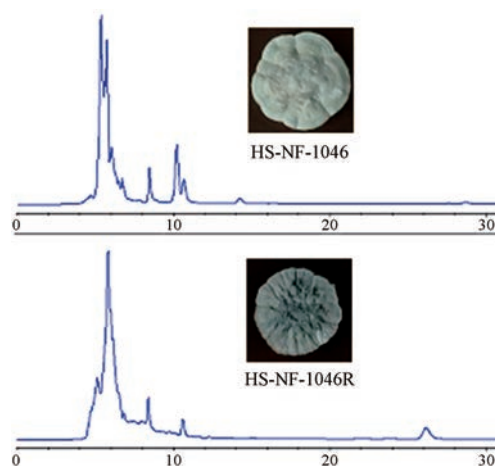


Figure 3 HPLC figure of the the strain HS-NF-1046 and the rifamycin resistant mutant strain HS-NF-1046R

0.4%、酵母抽提物 0.4%、麦芽抽提物 1.0%、碳酸钙 0.2%, pH 7.0~7.2; 1000 mL 摇瓶装量 250 mL), 250 r·min⁻¹ 摇床 28 °C 培养 2 天。以 5% 接种量进 50 L 罐发酵 (大豆粉 2.0%、甘露醇 2.0%, pH 7.0~7.2; 50 L 罐装量 30 L), 搅拌转速 200 r·min⁻¹, 通气量 1 000 L·h⁻¹, 罐压 0.05 MPa, 28 °C 发酵 7 天, 最后得到发酵液 30 L。

3 化合物分离提取

发酵液经过滤得到菌丝体和上清液。其中, 菌丝体用 3 L 的纯化水冲洗, 冲洗液并入上清液, 然后将混合液用 Diaion HP-20 树脂吸附, 并用 95% 乙醇洗脱得到乙醇洗脱液; 另外, 菌丝体用 3 L 的甲醇浸泡过夜, 过滤得甲醇提取液。合并所得乙醇洗脱液和甲醇提取液, 在 50 °C 减压将其浓缩至 1 L, 然后用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次得乙酸乙酯相。合并乙酸乙酯相, 并浓缩至干得到膏状物 30 g。膏状物使用正相硅胶柱色谱 (100~200 目), 以石油醚/丙酮 (10:0~60:40) 梯度洗脱, 分别收集流分。各流分经薄层色谱检测, 合并得到 4 个组分 (Fr.1~Fr.4)。组分 Fr.3 用半制备高压液相进行反相色谱分离 [(洗脱剂: CH₃CN-H₂O, 10:90, v/v), 流速: 1.5 mL·min⁻¹, 检测波长: 220 nm], 得到化合物 **1** (t_R 17 min, 6.4 mg)。组分 Fr.4 以上述相同的液相条件进行分离, 得到化合物 **2** (t_R 27.8 min, 9.2 mg) 和化合物 **3** (t_R 26.1 min, 30.2 mg), 其中化合物 **3** 对应于 HPLC 谱图上约 26 min 处的新峰。

4 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 217 (4.36)、304 (3.50) nm; $[\alpha]_D^{25}$ -136 (c 0.03, EtOH)。IR (KBr) ν_{max} : 1 666、1 578、1 548、1 398、1 296、1 260、1 189、1 072、1 019、957 cm⁻¹; HR-ESI-MS: m/z 209.093 1 [M+H]⁺ (计算值为 209.092 1, C₁₀H₁₃N₂O₃)。¹H 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

化合物 **2** 白色粉末; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 220 (4.14)、348 (3.17) nm; $[\alpha]_D^{25}$ -113 (c 0.05, EtOH)。IR (KBr) ν_{max} : 3 356、1 644、1 574、1 517、1 419、1 265、1 204、1 073、1 011、950 cm⁻¹; HR-ESI-MS: m/z 193.096 8 [M+H]⁺ (计算值为 193.097 2, C₁₀H₁₃N₂O₂)。¹H 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

5 化合物抗肿瘤活性测定

采用 SRB 法^[20]评价新化合物对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG2、人结肠癌细胞 HCT-116 和白血病细胞 K562 的细胞毒活性, 结果显示, 化合物 **1** 和 **2** 对所有细胞的 IC₅₀ 值均大于 100 μ mol·L⁻¹, 无明显的细胞毒性。

本研究表明通过利福霉素抗性筛选可以激活非常规的或处于沉默状态的次级代谢通路, 使突变株产生

新的次级代谢产物, 有利于对已有的微生物资源进行深入挖掘。

References

- [1] Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2016, 43: 155-176.
- [2] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites [J]. J Antibiot, 2005, 58: 1-26.
- [3] Li JW, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? [J]. Science, 2009, 325: 161-165.
- [4] Desbois AP. How might we increase success in marine-based drug discovery? [J]. Expert Opin Drug Discov, 2014, 9: 985-990.
- [5] Peláez F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—can history repeat? [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71: 981-990.
- [6] Chiang YM, Chang SL, Oakley BR, et al. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms [J]. Curr Opin Chem Biol, 2011, 15: 137-143.
- [7] Shi C, Sun Y, Xiao B, et al. Discovery of new antibiotics using genome data mining [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 845-851.
- [8] Yan W, Ge HM, Wang G, et al. Pictet - spengler reaction-based biosynthetic machinery in fungi [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111: 18138-18143.
- [9] Bok JW, Hoffmeister D, Maggio-Hall LA, et al. Genomic mining for aspergillus natural products [J]. Chem Biol, 2006, 13: 31-37.
- [10] Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, et al. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12 [J]. Nat Biotechnol, 2009, 27: 462-464.
- [11] Kurosawa K, Ghiviriga I, Sambandan TG, et al. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians* [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130: 1126-1127.
- [12] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production [J]. Adv Appl Microbiol, 2004, 56: 156-184.
- [13] Wu CJ, Yi L, Cui CB, et al. Activation of the silent secondary metabolite production by introducing neomycin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59 [J]. Mar Drugs, 2015, 13: 2465-2487.
- [14] Tanaka Y, Kasahara K, Hirose Y, et al. Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (rpoB) mutations in actinomycetes [J]. J Bacteriol, 2013, 195: 2959-2970.
- [15] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 7: 1373-1386.

- [16] Gao MY, Qi H, Li JS, et al. A new polysubstituted cyclopentene derivative from *Streptomyces* sp. HS-NF-1046 [J]. *J Antibiot*, 2017, 70: 216-218.
- [17] Chen GD, Gao H, Tang JS, et al. Benzamides and quinazolines from a mangrove actinomycetes *Streptomyces* sp. (No. 061316) and their inhibiting caspase-3 catalytic activity *in vitro* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59: 447-451.
- [18] Gould SJ, Eisenberg RL, Hillis LR, et al. Synthesis directed towards putative advanced intermediates in sarubicin A biosynthesis [J]. *Tetrahedron*, 1991, 47: 7209-7218.
- [19] Roy AD, Subramanian A, Roy R. Auto-redox reaction: tin(II) chloride-mediated one-step reductive cyclization leading to the synthesis of novel biheterocyclic 5,6-dihydro-quinazolino [4,3-*b*] quinazolin-8-ones with three-point diversity [J]. *J Org Chem*, 2010, 75: 3311-3316.
- [20] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82: 1107-1112.