

海星共附生真菌 *Aspergillus* sp. WXF1904 中一个新的异香豆素

汪玲玲¹, 管 达^{1,2}, 王晓芳⁴, 庞小艳², 刘永宏^{2,3*}, 林秀萍^{2,3*}

(1. 华南农业大学生命科学学院, 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广东 广州 510642; 2. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458; 4. 中国科学院南海海洋研究所, 海洋环境工程中心, 广东 广州 510301)

摘要: 从南海一种海星样品中分离获得共附生真菌菌株 WXF1904。经 ITS 区序列分析, 鉴定该菌株属于曲霉属, 命名为 *Aspergillus* sp. WXF1904。采用正相硅胶柱色谱、ODS 柱色谱和高效液相色谱等方法从 *Aspergillus* sp. WXF1904 发酵液粗浸膏中分离出 7 个化合物, 根据各种波谱数据及结合文献分析, 将其中 1 个鉴定为新的含卤素的异香豆素 6-chloro-5,7-dihydroxy-3,8-dimethylisocoumarin (**1**), 6 个鉴定为已知化合物, 分别为 pilobolusate (**2**)、对羟基苯甲醛 (**3**)、methyl orsellinate (**4**)、catechol (**5**)、vanillic acid (**6**) 和 wasabidienone E (**7**)。生物活性检测结果表明, 化合物 **1** 和 **2** 具有微弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

关键词: 海星共附生真菌; *Aspergillus* sp. WXF1904; 次级代谢产物; 异香豆素; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)11-3356-05

A new isocoumarin from a starfish-associated fungus *Aspergillus* sp. WXF1904

WANG Ling-ling¹, GUAN Da^{1,2}, WANG Xiao-fang⁴, PANG Xiao-yan²,
LIU Yong-hong^{2,3*}, LIN Xiu-ping^{2,3*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China; 4. Marine Environmental Engineering Center, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: A fungal strain WXF1904, was isolated from a starfish sample collected in the South China Sea. According to its internal transcribed spacer (ITS) analysis, the strain was identified as a member of the genus *Aspergillus* and designated as *Aspergillus* sp. WXF1904. One new isocoumarin containing halogenated 6-chloro-5,7-dihydroxy-3,8-dimethylisocoumarin (**1**), along with six known compounds pilobolusate (**2**), *p*-hydroxybenzaldehyde (**3**), methyl orsellinate (**4**), catechol (**5**), vanillic acid (**6**), and wasabidienone E (**7**), were isolated from the cultures of *Aspergillus* sp. WXF1904 by silica gel column chromatography, ODS gel column chromatography, and high performance liquid chromatography (HPLC). Their structures were elucidated by high resolution mass spectrometry (HR-MS), nuclear magnetic resonance (NMR) as well as literature comparison. The new compound 5-chloro-6,7-dihydroxy-3,8-dimethylisocoumarin and compound **2** showed weak acetylcholinesterase inhibitory activity.

收稿日期: 2022-05-12; 修回日期: 2022-07-19.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2020A1515010997); 广东省海洋经济发展(海洋六大产业)专项资金项目(粤自然资合[2020]039).

*通讯作者 Tel: 86-20-89023174, E-mail: yonghongliu@scsio.ac.cn; xiupinglin@scsio.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0577

Key words: starfish-associated fungus; *Aspergillus* sp. WXF1904; secondary metabolite; isocoumarin; acetylcholinesterase inhibitory activity

海星是一类棘皮动物, 广泛分布于沙质和软泥海底、珊瑚礁及各种深度的海洋中。已报道从海星的共附生真菌中分离得到一些具有生物学活性的新化合物。例如, 从棘冠海星 (*Acanthaster planci*) 的 3 种共附生真菌中, 分离得到新的二萜内酯^[1]、sorbicillin 类似物^[2]、苯并呋喃酮衍生物^[3]、氯苯并呋喃^[4]、diketopiperazine^[5] 等, 其中一些化合物具有细胞毒等生物学活性。

在本研究中, 对采集自南海西北次海盆海域的海星样品进行共附生真菌的分离和筛选, 发现其中一株曲霉属菌株 *Aspergillus* sp. WXF1904 具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, 对其进行扩大发酵并用乙酸乙酯浸提, 从发酵粗浸膏中分离得到 7 个化合物, 其中化合物 **1** 为新的含卤素的异香豆素 5-chloro-6,7-dihydroxy-3,8-dimethylisocoumarin。生物学活性实验结果表明, 新的异香豆素具有微弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性。本文主要报道菌株的分离、筛选和鉴定, 新化合物的分离和结构鉴定, 以及所有化合物的波谱数据和生物学活性测试结果。

结果与讨论

1 菌株鉴定

以菌株 WXF1904 的总 DNA 为模板, 以通用引物 ITS1 和 ITS4 为引物, 进行了 ITS 区序列的扩增。PCR

产物经过测序, 获得 542 bp 的准确序列。将该序列与 GenBank 中的数据进行 BLAST 分析, 将紧密相关的菌株的 ITS 区序列进行比较, 结果显示菌株 WXF1904 的 ITS 区序列与菌株 *Aspergillus unguis* IFM 65054、*Aspergillus sublatatus* CK1245、*Aspergillus mellinus* CBS 129250 的 ITS 区序列同源性均为 100%。在 MEGA 软件中, 采用“Align by ClustalW”对这些序列进行对齐, 对齐完成后, 将序列两端切齐, 菌株 WXF1904 的 519 个确定的核苷酸被用于计算进化距离。通过邻接法 (Neighbor-joining) 来构建系统发育树 (图 1)。结果表明, 菌株 WXF1904 与上述 3 株曲霉属菌株聚类在同一簇上, 其属于曲霉属 (*Aspergillus*) 的一个种, 命名为 *Aspergillus* sp. WXF1904。

2 化合物结构鉴定

化合物 **1** 为灰色粉末, 其 HR-ESI-MS 显示准分子离子峰 m/z 为 239.012 4, 确定 **1** 的分子式为 $C_{11}H_9ClO_4$ 。¹H NMR 谱图 (表 1) 可以明显看出两个甲基氢信号 [δ_H 2.11 (s, 3H), 2.29 (s, 3H)]、一个孤立的双键氢信号 [δ_H 6.69 (s, 1H)] 和两个活泼氢信号 [δ_H 10.65 (br s, 1H)、11.37 (s, 1H)]。¹³C NMR 谱图 (表 1) 显示 11 个碳信号, 根据其化学位移确认为 1 组苯环碳信号 (δ_C 158.81, 158.56, 133.10, 111.52, 105.47, 98.41)、1 个内酯

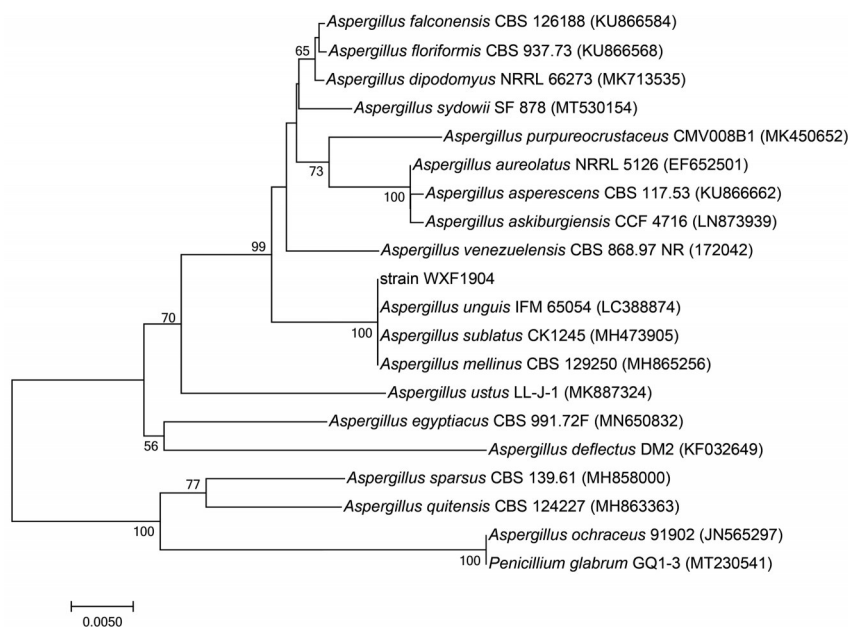


Figure 1 The Neighbor-joining tree of *Aspergillus* sp. WXF1904 from analysis of the ITS1-5.8S-ITS4 sequences. Bootstrap values >50% from 1 000 replicates are shown at the branch nodes. GenBank accession numbers are provided in parentheses. Bar: 0.5% sequence divergence

羰基信号 (δ_c 165.60) 和 2 个甲基信号 (δ_c 19.07, 9.91)。这提示该化合物可能是一个异香豆素类化合物, 其结构由 HMBC 谱图 (表 1) 进一步确定, 双键氢信号 [δ_H 6.69 (s, 1H)] 位于 C-4 (δ_c 100.59) 且与 C-5 (δ_c 105.47)、C-3 (δ_c 155.06)、C-8a (δ_c 98.41) 相关。甲基氢信号 [δ_H 2.29 (s, 3H)] 与 C-4 (δ_c 100.59)、C-3 (δ_c 155.06) 相关, 说明甲基 (δ_c 19.07) 为内酯环上的 3 位取代。甲基氢信号 [δ_H 2.11 (s, 3H)] 与 C-8a (δ_c 98.41)、C-7 (δ_c 158.81)、C-8 (δ_c 111.52) 相关, 说明甲基 (δ_c 8.91) 为苯环上的 8 位取代。高分辨质谱确定其含有 1 个氯原子及两个羟基。经文献比对发现化合物 **1** 为新的异香豆素类衍生物^[6], 并将其命名为 5-chloro-6,7-dihydroxy-3,8-dimethylisocoumarin (图 2)。

Table 1 ^1H (500 MHz), ^{13}C NMR (125 MHz) and HMBC data of compound **1** in DMSO- d_6

Position	δ_H	δ_c	HMBC
1		165.60	
3		155.06	
4	6.69 (s, 1H)	100.59	C-3,5,8a
4a		133.10	
5		105.47	
6		158.56	
7		158.81	
8		111.52	
8a		98.41	
CH ₃ -3	2.29 (s, 3H)	19.07	C-3,4
CH ₃ -8	2.11 (s, 3H)	8.91	C-7,8,8a
OH	11.37 (s, 1H)		C-6,7,8,8a
OH	10.65 (br s, 1H)		

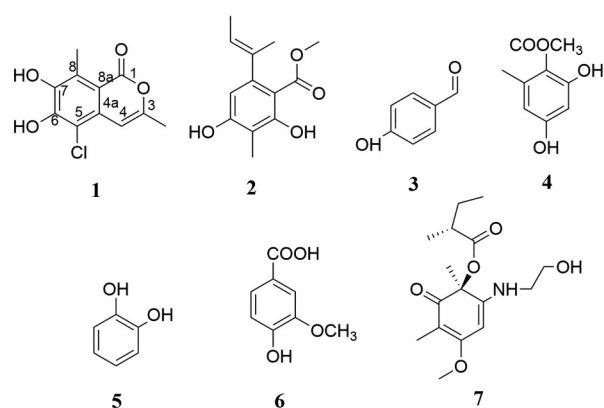


Figure 2 Structure of compounds 1–7

根据各种波谱数据及结合文献分析, 已知化合物被鉴定为 pilobolusate (**2**)、对羟基苯甲醛 (**3**)、methyl orsellinate (**4**)、catechol (**5**)、vanillic acid (**6**) 和 wasabi-dienone E (**7**) (图 2)。

3 生物活性测试

异香豆素类化合物广泛存在于很多的药用植物中, 常常具有较好的药理活性。采用 Ellman 法进行所

有化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性评价, 结果发现新化合物 **1** 和已知化合物 **2** 具有较弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 抑制率分别为 19.9%、15.6%。采用滤纸片扩散法对所有化合物进行抗菌活性筛选, 氨苄西林为革兰阳性菌的阳性对照, 庆大霉素为革兰阴性菌的阳性对照, 制霉菌素为病原真菌的阳性对照, 测试化合物对金葡菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、粪链球菌 (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumonia* ATCC 13883)、白色念珠菌的抑制活性。结果表明这些化合物均未表现抗菌活性。

实验部分

ZYJ-S 型超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 振荡培养箱 (ZQZY-CF8 型, 上海知楚仪器有限公司); 旋转蒸发器 (EYELAN-1100V-W 型, 日本东京理化株式会社); 中压制备柱色谱仪 (Buchi 公司产品 C615/605); 中压色谱仪 (瑞士 Buchi 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 高效液相色谱半制备柱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm × 10 mm, 5 μm , 日本 YMC 公司); Bruker Avance 700 核磁共振仪、质谱仪 HR-ESM-MS (德国 Bruker 公司); 薄层色谱硅胶板 (青岛海洋化工厂); 正相硅胶 (100~200 目, 烟台江友硅胶开发有限公司); 反相硅胶 (Merck 公司); 分析纯化学试剂 (广州化学试剂厂和天津市富宇精细化工有限公司) 等; 色谱纯乙腈、甲醇 (上海星可高纯溶剂有限公司); 乙酰胆碱酯酶 (北京索莱宝科技有限公司); 他克林 (批号 Lot # 07220AV, 美国 Aldrich 公司); 碘化硫代乙酰胆碱、DTNB、Tacrine (美国 Sigma 试剂公司)。

1 菌株的分离、纯化

海星样品采集自南海西北次海盆石中海山海域。在研钵中剪碎生物样品, 加入 1 mL 无菌海水, 研磨, 涂布于 Medium A (MA) 琼脂培养基 (麦芽提取物 15 g, 琼脂 18 g, 海盐 16 g, 氯霉素 0.2 g·L⁻¹, 蒸馏水 1 000 mL, pH 调至 7.4)^[7], 置于 25 °C 恒温培养。挑取培养特征差异较大的菌落, 切下菌落边缘菌丝体, 转接到新鲜 Medium B (MB) 琼脂培养基 (麦芽提取物 15 g, 琼脂 18 g, 海盐 16 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 调至 7.4) 进行纯化, 重复此步骤直到得到纯培养物为止。根据菌落的培养特征, 进行初步排重, 得到 27 株真菌, 接种于 MB 琼脂斜面培养基, 生长成熟后, 置于 4 °C 冰箱进行短期保藏, 或加入无菌石蜡油, 置于室温进行长期保藏。

2 菌株的 ITS 区域序列和系统发育分析

菌株分子生物学鉴定: 采用引物 ITS1: 5'-TCCG

TAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4: 5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3' 扩增真菌 ITS rDNA 序列。该测序过程由北京擎科生物科技有限公司完成。将所测得的 ITS 区序列提交到 GenBank 数据库 (NCBI), 用 BLASTN 程序进行序列比对, 以获得相似序列。用 ClustalW 进行相似性分析, 使用 MEGA 7.0 软件 Neighbor-joining 方法构建系统发育树, 自展值 (Bootstrap) 为 1 000, 确定菌株的亲缘关系及分类地位。

3 菌株的筛选

采用大米固体培养基 (200 g 大米, 200 mL 水, 3.2 g 粗海盐), 对分离得到的 27 株真菌进行小量发酵, 于 25 °C 恒温静置培养 30 天, 对它们的代谢产物进行 HPLC 分析及乙酰胆碱酯酶抑制活性测试, 结合菌株的次级代谢产物的分析以及活性测试结果, 选择目标菌株。

4 菌株的发酵

将保藏于 4 °C 冰箱的菌株转接到新鲜的 MB 琼脂培养基平板上, 置于 25 °C 培养 7 天, 转接到 MB 液体种子培养基 (麦芽提取物 15 g, 海盐 16 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 调至 7.4), 于 25 °C、180 r·min⁻¹ 摇床培养 2 天, 接种至大米固体培养基中, 25 °C 恒温静置培养 30 天。

5 提取与分离

发酵 30 天后, 加入乙酸乙酯浸泡, 将培养物捣碎, 超声处理 8 min, 再浸泡过夜, 用纱布过滤, 回收滤液。滤渣再用乙酸乙酯浸提, 如此反复浸提 3 次, 合并滤液, 用旋转蒸发器进行浓缩。将所得浓缩液溶解于 95% 的甲醇溶液中, 用石油醚萃取 3 次, 得到石油醚萃取部位和甲醇部位。用旋转蒸发器分别除去石油醚和甲醇, 石油醚萃取部位得到油状浸膏 145.5 g, 甲醇部位得到棕黑色浸膏 46.7 g。

将 46.7 g 棕黑色浸膏均匀拌于 50 g 硅胶 H (100~200 目)。经中压硅胶 (200~300 目) 柱色谱分离, 石油醚-乙酸乙酯-甲醇洗脱体系进行梯度洗脱。经 TLC 检测分析后合并相似流分, 得到 10 个组分 (Frs. A~J)。Frs. A 经半制备 HPLC, 以 70% 乙腈-水等度洗脱 (3.0 mL·min⁻¹), 得到化合物 1 (10.2 mg, $t_R = 7.5$ min) 和化合物 2 (3.9 mg, $t_R = 7.8$ min)。Frs. C 经半制备 HPLC, 以 80% 乙腈-水等度洗脱 (3 mL·min⁻¹), 得到化合物 3 (4.16 mg, $t_R = 5$ min) 和化合物 4 (7.59 mg, $t_R = 9$ min)。Frs. D 经半制备 HPLC, 以 40% 甲醇-水等度洗脱 (3 mL·min⁻¹), 得到化合物 5 (10.07 mg, $t_R = 7.8$ min) 和化合物 6 (8.77 mg, $t_R = 8.3$ min)。Frs. F 经半制备 HPLC, 以 70% 甲醇-水等度洗脱 (3 mL·min⁻¹), 得到化合物 7 (14.6 mg, $t_R = 7$ min)。

6 结构鉴定

化合物 1 灰色粉末, ESI-MS [M]⁻ m/z : 239.012 4,

分子式为 C₁₁H₉ClO₄。IR: 3 388.93、1 674.21、1 651.07、1 435.05、1 199.72、1 139.93、842.89、802.39、723.31、667.37、547.78 cm⁻¹; UV (MeOH): λ_{max} (log ϵ) = 249.40 (3.279) nm; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 和 ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) 见表 1。

化合物 2 白色固体, 分子式为 C₁₃H₁₆O₄, ¹H NMR 和 ¹³C NMR 与文献^[8]报道的一致, 该化合物被鉴定为 pilobolusate。

化合物 3 黄色固体, 分子式为 C₇H₆O₂。 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与文献^[9]报道的一致, 故鉴定化合物为对羟基苯甲醛。

化合物 4 棕褐色固体, 分子式为 C₉H₁₀O₄。 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与文献^[10]报道的一致, 故鉴定化合物为 methyl orsellinate。

化合物 5 白色固体, 分子式为 C₆H₆O₂。 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与文献^[11]报道的一致, 故鉴定化合物为 catechol。

化合物 6 白色针状, 分子式为 C₈H₈O₄。 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与文献^[12]报道的一致, 故鉴定化合物为 vanillic acid。

化合物 7 棕色固体, 分子式为 C₁₆H₂₅NO₃。 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与文献^[13]报道的一致, 故鉴定化合物为 wasabidienone E。

7 乙酰胆碱酯酶抑制活性测试

使用 Ellman 法进行化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性评价。以 pH = 8.0, 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液 (PBS 溶液) 作为反应溶液。待测样品的配制: 1 mg 待测化合物溶解于 20 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 取 2 μ L 该溶液加至 98 μ L 的 PBS 溶液中, 配制成质量浓度 1 mg·mL⁻¹ 的待测化合物溶液。将以下各溶液混匀于 96 孔板后置于酶标仪中。实验组: 10 μ L 待测样品溶液 + 110 μ L PBS 溶液 + 40 μ L PBS 溶液溶解的 0.1 U·mL⁻¹ 乙酰胆碱酯酶溶液 (A); 阴性对照组: 10 μ L 2% DMSO-PBS 溶液 + 110 μ L PBS 溶液 + 40 μ L PBS 溶液溶解的 0.1 U·mL⁻¹ 乙酰胆碱酯酶溶液 (B); 阳性对照组: 10 μ L 6.66 μ mol·L⁻¹ 他克林溶液 + 110 μ L PBS 溶液 + 40 μ L PBS 溶液溶解的 0.1 U·mL⁻¹ 乙酰胆碱酯酶溶液; 背景对照组: 10 μ L 待测样品溶液 + 150 μ L PBS 溶液 (A₀); 空白对照组: 10 μ L 2% DMSO-PBS 溶液 + 150 μ L PBS 溶液 (B₀)。

将 96 孔板于 30 °C 放置 20 min 后, 各组均加入等体积混合的 6.25 mmol·L⁻¹ 的 5,5-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) 溶液与 6.25 mmol·L⁻¹ 的硫代乙酰胆碱溶液 40 μ L; 将 96 孔板于 30 °C 放置 30 min 后, 于 405 nm 波长下测量每孔的光密度 (OD) 值, 计算化合物对乙酰

胆碱酯酶的抑制活性, 计算公式为抑制率 = $[(B-B_0)-(A-A_0)]/(B-B_0) \times 100\%$ 。

8 抗菌活性测试

化合物的抗菌活性初筛采用滤纸片扩散法, 每个滤纸片载样量为 50 μg , 采用混合培养的方式将指示菌加入细菌营养培养基 (胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 5 g、蒸馏水 1 000 mL、琼脂 15 g) 和 PDA 培养基 (葡萄糖 20 g、马铃薯 200 g、蒸馏水 1 000 mL、琼脂 15 g) 中混匀, 凝固后放置滤纸片。采用氨苄西林为革兰阳性菌的阳性对照, 庆大霉素为革兰阴性菌的阳性对照, 制霉菌素为病原真菌的阳性对照, 甲醇作为阴性对照, 测试化合物对指示菌金葡菌 (*S. aureus* ATCC 29213)、粪链球菌 (*E. faecalis* ATCC 29212)、大肠杆菌 (*E. coli* ATCC 25922)、鲍曼不动杆菌 (*A. baumannii* ATCC 19606)、肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumonia* ATCC 13883)、白色念珠菌的抑制活性。指示菌均购自美国标准菌库 (ATCC, Manassas, VA, USA)。

作者贡献: 汪玲玲和管达分别是本文第一作者和第二作者, 共同负责微生物的分离、发酵及其次级代谢产物的分离鉴定、活性测定、文献的调研整理和初稿的撰写; 王晓芳负责海星样品的采集; 庞小艳负责核磁共振图谱的分析指导; 刘永宏是本文的通讯作者, 负责实验设计和把关、稿件修改等工作; 林秀萍是本文的最后通讯作者, 负责实验设计和把关、菌株的鉴定、论文框架的构建、稿件的撰写和修改等工作。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Xie ZL, Li HJ, Wang LY, et al. Trichodermaerin, a new diterpenoid lactone from the marine fungus *Trichoderma erinaceum* associated with the sea star *Acanthaster planci* [J]. Nat Prod Commun, 2013, 8: 67-68.
- [2] Lan WJ, Zhao Y, Xie ZL, et al. Novel sorbicillin analogues from the marine fungus *Trichoderma* sp. associated with the sea star *Acanthaster planci* [J]. Nat Prod Commun, 2012, 7: 1337-1340.
- [3] Lan WJ, Liu W, Liang WL, et al. Pseudoboydins A and B: novel isobenzofuranone derivatives from marine fungus *Pseudallescheria boydii* associated with starfish *Acanthaster planci* [J]. Mar Drugs, 2014, 12: 4188-4199.
- [4] Yan DF, Lan WJ, Wang KT, et al. Two chlorinated benzofuran derivatives from the marine fungus *Pseudallescheria boydii* [J]. Nat Prod Commun, 2015, 10: 621-622.
- [5] Liang WL, Le X, Li HJ, et al. Exploring the chemodiversity and biological activities of the secondary metabolites from the marine fungus *Neosartorya pseudofischeri* [J]. Mar Drugs, 2014, 12: 5657-5676.
- [6] Prompanya C, Dethoup T, Bessa LJ, et al. New isocoumarin derivatives and meroterpenoids from the marine sponge-associated fungus *Aspergillus similanensis* sp. nov. KUFA 0013 [J]. Mar Drugs, 2014, 12: 5160-5173.
- [7] Kjer J, Debbab A, Aly AH, et al. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products [J]. Nat Protoc, 2010, 5: 479-490.
- [8] Rajachan OA, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, et al. Bioactive depsidones from the fungus *Pilobolus heterosporus* [J]. Planta Med, 2014, 80: 1635-1640.
- [9] Guo JW, Chen JM, Lin LJ, et al. Five chemical constituents of the ethyl acetate fraction from ethanol extract of *Semen litchi* [J]. J Med Plants Res, 2012, 6: 168-170.
- [10] Rojas IS, Lotina-Hennsen B, Mata R. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts [J]. J Nat Prod, 2000, 63: 1396-1399.
- [11] Feng WS, Su FY, Zheng XK, et al. Study on chemical constituents of *Aquilegia yabeana* Kitag [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2011, 46: 496-499.
- [12] Su J, Feng Y, Lin BF, et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Acanthopanax senticosus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 4783-4788.
- [13] Shin HJ, Choi BK, Trinh PTH, et al. Suppression of RANKL-induced osteoclastogenesis by the metabolites from the marine fungus *Aspergillus flocculosus* isolated from a sponge *Stylissa* sp. [J]. Mar Drugs, 2018, 16: 14.