

伊岭岩溶洞真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 中 一个新的萘并吡喃酮糖苷

周丽曼, 郝 祎, 蒙菊香, 覃芳芳, 覃清华, 王 聪, 孔凡栋*

(广西民族大学化学化工学院, 林产化学与工程国家民委重点实验室, 广西林产化学与工程重点实验室,
广西林产化学与工程协同创新中心, 广西高校少数民族医药古方挖掘与开发重点实验室, 广西 南宁 530006)

摘要: 利用硅胶和高效液相等柱色谱方法对溶洞真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 发酵产物进行分离纯化, 得到了7个化合物。通过紫外、红外、核磁共振谱与质谱方法分别鉴定为2,3-dehydroindigotide G (**1**)、(-)-regiolone (**2**)、萘吡喃酮 (**3**)、indigotide G (**4**)、indigotide B (**5**)、破伤风毒素 A (**6**) 和破伤风毒素 B (**7**), 其中化合物 **1** 为新萘并吡喃酮糖苷类化合物。对分离得到的化合物进行抗乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 活性测试, 结果显示化合物 **3** 的抗 HBV 作用 EC_{50} 为 $4.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CC_{50} 为 $92.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 这是首次报道化合物 **3** 的抗病毒活性。

关键词: 溶洞真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2; 次生代谢产物; 糖苷类化合物; 抗乙型肝炎活性
中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-3076-06

One new glycoside naphthopyranone from the Yiling cave-derived *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2

ZHOU Li-man, HAO Yi, MENG Ju-xiang, QIN Fang-fang, QIN Qing-hua,
WANG Cong, KONG Fan-dong*

(Key Laboratory of Universities in Guangxi for Excavation and Development of Ancient Ethnomedicinal Recipes, Guangxi Collaborative Innovation Center for Chemistry and Engineering of Forest Products, Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, State Ethnic Affairs Commission, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China)

Abstract: Seven compounds were isolated from fermentation extract of cave-derived *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 by silica gel, semi-preparative HPLC and other chromatographic methods. Their structures were elucidated by UV, IR, MS and NMR methods as 2,3-dehydroindigotide G (**1**), (-)-regiolone (**2**), naphtho- γ -pyrone (**3**), indigotide G (**4**), indigotide B (**5**) destruxin A (**6**) and destruxin B (**7**). Compound **1** is a new glycoside naphthopyranone compound. The anti-hepatitis B virus (HBV) activity of these compounds was evaluated. The EC_{50} and CC_{50} of compound **3** against HBV were $4.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $92.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. This is the first report of the antiviral activity of compound **3**.

Key words: cave-derived *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2; secondary metabolite; glycoside compound; anti-hepatitis B activity

收稿日期: 2023-03-21; 修回日期: 2023-04-22.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82104034); 广西自然科学基金项目 (2021GXNSFBA075036, 2021GXNSFBA220040); 广西民族大学校级引进人才科研启动项目 (2020KJQD09, 2021KJQD09); 广西民族大学相思湖青年创新团队 (2021RSCXSHQN01); 广西民族大学校级科研项目 (2021 MDKJ003).

*通讯作者 Tel: 15621367387, E-mail: kongfandong0127@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0346

溶洞是典型的喀斯特地貌, 地理位置相对隔离, 长期阴暗且缺乏直接来自光合作用的有机质, 湿度接近饱和, 温度变化小, 被认为是极端环境。广西溶洞分布广泛, 溶洞微生物活性天然产物的研究鲜有报道。伊岭岩溶洞是一座典型的喀斯特岩溶洞, 被誉为大自然的艺术宝库, 是广西首府南宁的著名风景区, 素有“地下宫殿”之美誉, 具有独特的生态环境。独特的生态环境必然蕴含独特的真菌, 洞穴真菌在长期适应这一特殊生存环境的过程中, 必然进化出与陆生真菌截然不同的代谢途径和适应机制, 进而能够产生大量结构新颖、活性显著的次生代谢物, 是发现药物先导化合物的重要途径^[1,2]。溶洞真菌的研究正在开拓中, 找到更多存在生物活性的新化合物, 对于开创溶洞真菌药物与发现药源分子具有重要意义^[3,4]。

病毒性肝炎是一类严重的传染性疾病, 而乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 则是其中危害极为严重的两种典型肝炎病毒^[5,6]。感染后主要症状包括乏力、发热、肝脏肿大、肝功能异常等。此外, 肝炎病毒感染还可能导致肝硬化、肝癌等严重疾病^[7]。因此, 有必要从药物先导化合物获取的角度, 积极探索抗肝炎活性的有效途径。本文对来自广西伊岭岩风景区的溶洞真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 次级代谢产物进行研究, 从其发

酵产物中分离鉴定了 7 个化合物, 分别鉴定为 2,3-dehydroindigotide G (1)、(-)-regiolone (2)、萘吡喃酮 (3)、indigotide G (4)、indigotide B (5)、破伤风毒素 A (6) 和破伤风毒素 B (7), 其中化合物 1 为一个新的萘并吡喃酮糖苷类化合物 (图 1)。活性测试结果显示化合物 3 具有一定的抗 HBV 活性。

结果与讨论

1 伊岭岩溶洞真菌 NHC-M3-2 的鉴定

菌株 NHC-M3-2 的 PCR (polymerase chain reaction) 扩增序列的长度为 533 bp, 与 NCBI 数据库中的菌株 *Metarhizium anisopliae* (MH859069.1) 的 ITS (internally transcribed spacer) 序列同源率为 100%, 亲缘关系在系统发育树上处于同一分支。初步鉴定该溶洞真菌 NHC-M3-2 (GenBank 登录号: OQ398188) 为绿僵菌属 *Metarhizium* sp. (图 2)。菌株生长一段时间后再进一步观察其形态特征, 菌落呈深绿色、绒状, 与金龟子绿僵菌的形态特征一致, 故鉴定菌株 NHC-M3-2 为绿僵菌属 *Metarhizium anisopliae*^[8]。

2 结构解析

化合物 1 浅黄色膏状, 不饱和度为 11, 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = 168$ (c 0.1, CH₃OH); 正离子高分辨质谱 HR-ESI-MS 在 m/z 449.148 3 (计算值 499.146 2) 给出准分子离

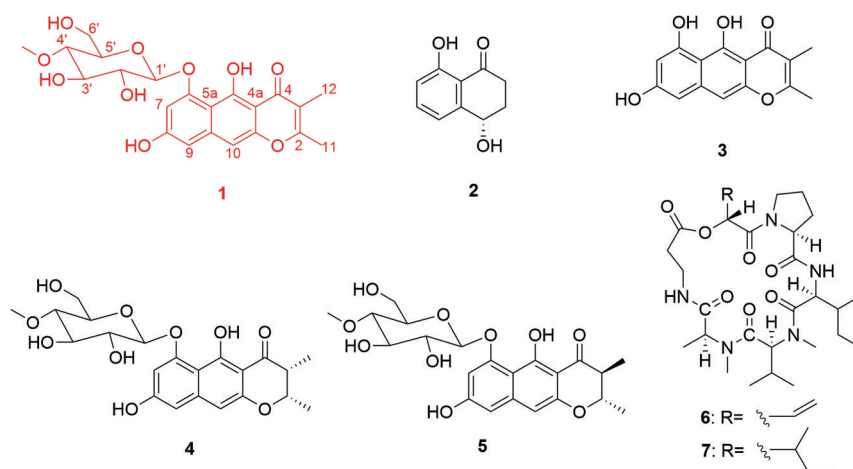


Figure 1 Structures of compounds 1-7

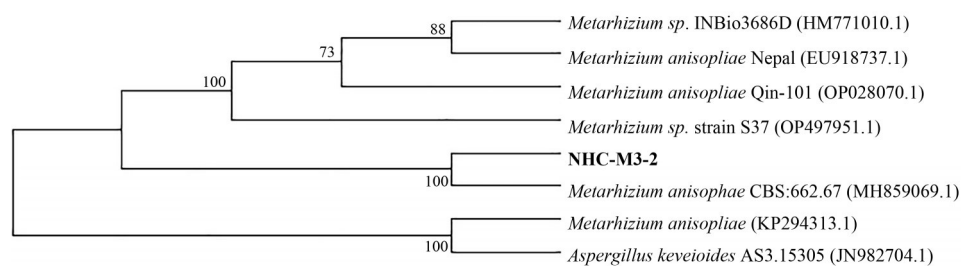


Figure 2 Phylogenetic tree analysis of strain NHC-M3-2

子峰 $[M+H]^+$, 提示分子式为 $C_{22}H_{24}O_{10}$; 红外光谱 (IR) 给出羟基和羰基 (3382 和 1664 cm^{-1}) 等官能团的特征吸收峰; 紫外光谱 (UV) 在 227 和 274 nm 给出特征吸收峰, 且与已知化合物萘并吡喃糖苷 G (化合物 **5**) 紫外吸收相似, 提示 **1** 也是萘并吡喃糖苷类化合物。化合物 **1** 的 ^{13}C NMR 和 HSQC 谱图给出 13 个 sp^2 杂化的碳信号 (表 1), 包括 1 个酮羰基 (δ 182.8)、3 个次甲基 (δ_{CH} 100.2/6.47, 101.1/6.88, 100.3/7.09), 以及 9 个季碳; 3 个甲基信号, 包括一个氧甲基 (δ_{CH} 59.6/3.47); 5 个含氧次甲基; 一个含氧亚甲基 (δ_{CH} 60.0/3.54, 3.66)。这些数据与 indigotide G 的核磁共振波谱数据非常相似^[9]。它们核磁数据的明显区别仅是 indigotide G 中 CH-2 和 CH-3 两个次甲基信号被 **1** 中两个 sp^2 杂化的季碳取代, 以及 H_3-11 和 H_3-12 两个双重峰的氢信号被化合物 **1** 中两个单峰甲基信号取代。以上数据提示, indigotide G 中的 CH-2/CH-3 在化合物 **1** 中被氧化为双键。化合物 **1** 的 HMBC 谱图中给出 H_3-11 和 H_3-12 到两个双键碳 C-2 和 C-3 的相关, 此外 H_3-12 还与 C-4 酮羰基相关, 这进一步证明了以上推断 (图 3)。通过详尽 HMBC 和 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 信号分析 (图 3) 确定化合物 **1** 的其他部分结构与萘并吡喃糖苷 G 一致。故化合物 **1** 被鉴定为 2,3-dehydroindigotide G。化合物 **1** 中的糖部分的核磁数据与此菌株分离的两个已知化合物 **4** 和 **5** 的数据相同^[10,11], 提示它们具有相同的 4'-O-甲基- β -D-葡萄糖片段。此外, 化合物 **1** 糖部分的氢谱数据显示 H-1/H-2、H-2/H-3、H-3/H-4 及 H-4/H-5 之间的耦合常数分别是 8.0、8.2、9.4 和 9.4 Hz, 这说明这些氢全部位于糖六元环的 α 键, 进一步证明化合物 **1** 的糖部分构型与已知化合物 **4** 和 **5** 相同。

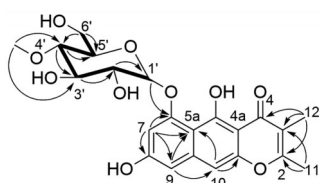


Figure 3 Key $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (—), HMBC (---) key correlations of compound **1**

3 抗肝炎活性测试

使用人肝癌细胞 HepAD38 为宿主细胞, 以甲磺酸莫非赛定 (GLS4, morphothiadin) 为阳性对照, 对化合物进行抗乙型肝炎病毒活性测试, 结果 (表 2) 表明, 化合物 **3** 有一定的抗 HBV 活性, 其 EC_{50} 即体外实验中 50% 的病毒被抑制时的药物浓度为 $4.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最高的病毒抑制率达到 80%, CC_{50} 即体外实验中 50% 的宿主细胞被破坏时的药物浓度为 $92.26\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而化合物 **3**

Table 1 ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR data of compound **1** in $\text{DMSO}-d_6$

C No.	δ_{H} (J/Hz)	δ_{C}
2		165.4, C
3		112.1, C
4		182.8, C
4a		102.1, C
5		161.7, C
5a		106.5, C
6		159.5, C
7	6.47 (1H, d, $J = 2.0$)	100.2, CH
8		158.0, C
9	6.88 (1H, d, $J = 2.0$)	101.1, CH
9a		139.6, C
10	7.09 (1H, s)	100.3, CH
11	2.40 (3H, s)	18.6, CH_3
12	1.92 (3H, s)	8.6, CH_3
1'	5.01 (1H, d, $J = 8.0$)	99.5, CH
2'	3.27 (1H, dd, $J = 8.0, 8.2$)	73.3, CH
3'	3.44 (1H, overlap)	75.6, CH
4'	3.08 (1H, dd, $J = 9.4, 9.4$)	78.7, CH
4'-OMe	3.47 (3H, s)	59.6, CH_3
5'	3.44 (1H, overlap)	76.2, CH
6'	3.54 (1H, overlap) 3.66 (1H, dd, $J = 11.3, 3.1$)	60.0, CH_2
5-OH	15.90 (1H, br s)	
8-OH	9.95 (1H, s)	
2'-OH	5.45 (1H, br s)	
3'-OH	5.30 (1H, br s)	
6'-OH	4.73 (1H, br s)	

的 OH-6 被糖苷化的化合物 **1** 却无活性, 说明 OH-6 对该化合物抗乙型肝炎病毒活性的重要性。综上, 化合物 **3** 的细胞毒性低而抗乙型肝炎病毒活性较好, 具有开发抗病毒药物应用的潜能, 这也是首次发现该化合物的抗 HBV 活性。

Table 2 Anti-hepatitis activities of compounds **1**, **3**, **4** and **7**. GLS4: Morphothiadin

Compound	HepAD38			
	$EC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA qPCR	Highest inhibition rate/%	$CC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$EC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
GLS4	14.99	98%	72.92	N/A
1	>50 000	N/A	>100	N/A
3	4 451	80%	92.26	N/A
4	>50 000	N/A	>1 000	N/A
7	>50 000	N/A	52.28	N/A

实验部分

XYQ-LS-75SII 型高压灭菌锅 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); HCB-1300V 洁净工作台 (青岛海尔特种电器有限公司); LRH-500A 型生化培养箱 (广东泰宏科学仪器股份有限公司); CR-080R 型春霖超声波清洗机 (深圳市春霖清洗设备有限公司); K3 TOUCH 酶标仪 (上海飞世尔实验器材有限公司); TD4N 离心

机(长沙英泰仪器有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪和 Agilent Cary60 紫外可见光谱仪(美国安捷伦科技有限公司); 日立 Primaide 高效液相色谱仪(北京日立科学仪器有限公司); 中压液相制备色谱仪(天津博纳艾杰尔科技有限公司); 色谱级甲醇(苏州速研医药科技有限公司); AL104 型分析天平(瑞士梅特勒托利多科技有限公司); Mariner API-TOF 型质谱仪(美国应用生物系统公司); WZZ-2S 自动旋光仪(上海申光仪器仪表有限公司); YMC*GEL ODS-A-HG 反相硅胶(日本株式会社 YMC 公司); MAGNA-1R550 傅里叶变换红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); 核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司 400 MHz); 200~300 目正相硅胶(青岛海洋化工集团公司); SCI-VS 混匀仪(美国塞洛捷克公司); 琼脂粉(广州赛国生物科技有限公司); 葡萄糖、甘露醇、酵母膏、麦芽糖(中国国药集团化学试剂有限公司); 味精(南宁味一香食品有限公司); 磷酸二氢钾(天津大茂化学试剂厂); 提取分离用醋酸乙酯、甲醇、二氯甲烷(成都市科隆化学品有限公司)均为工业用化学纯产品。

溶洞真菌 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 分离于广西伊岭岩风景区来源的内河水(N23°0'39.07", E108°2'97.21")。真菌保存于广西民族大学药理学系。

1 菌株分子鉴定

溶洞真菌基因组 DNA 的提取、扩增以及测序纯化三部分是由上海生工生物工程股份有限公司测试。

2 菌株的发酵

将菌株 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 接种于 PDA 平板培养基中, 在 28 °C 培养 3 天, 将此菌株接种于真菌 2 号培养基(葡萄糖 1%、甘露醇 2%、酵母膏 0.3%、麦芽糖 2%、味精 1%、磷酸二氢钾 0.05%) 的锥形瓶(1 000 mL) 中, 室温静置培养 30 天, 发酵规模为 50 瓶。

3 发酵产物的提取分离

3.1 菌株提取物制备 采用醋酸乙酯对菌株 *Metarhizium anisopliae* NHC-M3-2 发酵物萃取 3 次, 菌丝体和发酵液经过滤和减压浓缩后分别得到 5.55、2.02 g 粗提物。

3.2 产物的分离 化合物的分离: 对发酵液萃取物(2.02 g) 进行减压硅胶柱层析, 采用甲醇-水(30:70→60:40→90:10→100:1, v/v) 梯度洗脱, 共 4 个梯度(Fr.1~Fr.4), 每个梯度分 3 次收集。以 Fr.1 为例, 编号依次为 Fr.1.1~Fr.1.3。Fr.1.3(40.9 mg) 通过 HPLC 制备(C18 半制备柱, 甲醇-水体积比为 45:55, 流量 4 mL·min⁻¹), 得到化合物 2 ($t_R = 13.4$ min, 1.5 mg)。Fr.2.2(107.7 mg) 通过 HPLC 制备(C18 半制备柱, 甲醇-水体积比为 65:35, 流量 4 mL·min⁻¹), 得到化合物

5 ($t_R = 14$ min, 9.8 mg)。Fr.2.3(164.5 mg) 通过 HPLC 制备(C18 半制备柱, 甲醇-水体积比为 65:35, 流量 4 mL·min⁻¹), 得到化合物 6 ($t_R = 16$ min, 6.7 mg)。Fr.3.3(163.9 mg) 通过 HPLC 制备(C18 半制备柱, 甲醇-水体积比为 60:40, 流量 4 mL·min⁻¹), 得到化合物 7 ($t_R = 12.2$ min, 7.1 mg)。

对菌丝体萃取物(5.55 g) 进行中压硅胶柱层析(C18 硅胶柱, 流量 30 mL·min⁻¹), 采用甲醇-水(58:42→69:31→73:27→79:21→85:15→90:10→100:1, v/v) 梯度洗脱, 共 7 个梯度(分别为 Jr.1~Jr.7), 每个梯度分多次收集。以 Jr.1 为例, 编号依次为 Jr.1.1~Jr.1.n。Jr.2 合并得到化合物 4(113.2 mg), Jr.4 合并得到化合物 1(1.16 g)。Jr.5.3(101.1 mg) 通过 HPLC 制备(C18 半制备柱, 甲醇-水体积比为 80:20, 流量 4 mL·min⁻¹), 得到化合物 3 ($t_R = 12.3$ min, 5.7 mg)。

4 结构鉴定

化合物 1 浅黄色膏状; 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = 168$ (c 0.1, CH₃OH); 正离子高分辨质谱 HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 449.148 3 [M+H]⁺ (计算值 499.146 2), 提示分子式为 C₂₂H₂₄O₁₀; UV (CH₃OH) λ_{max} : (log ϵ) 227.0 (1.09)、274.0 (1.67) nm; IR (KBr) ν_{max} : 3 382, 1 664 cm⁻¹; HR-ESI-MS m/z 449.148 3 [M+H]⁺ (C₂₂H₂₄O₁₀, 计算值), ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) 和 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) 数据见表 1。

化合物 2 浅黄色粉末, ESI-MS m/z 201.0 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₀H₁₀O₃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, J /Hz): δ_H 12.42 (1H, s, 8-OH), 7.50 (1H, t, $J = 7.9$, H-6), 7.02 (1H, d, $J = 7.9$, H-5), 6.93 (1H, d, $J = 7.9$, H-7), 4.92 (1H, q, $J = 3.9$, H-4), 3.01 (1H, m, H-2), 2.65 (1H, m, H-2), 2.35 (1H, m, H-3), 2.20 (1H, m, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 204.3 (C, C-1), 162.6 (C, C-8), 145.8 (C, C-4a), 137.0 (CH, C-6), 117.7 (CH, C-7), 117.4 (CH, C-5), 115.2 (CH, C-8a), 67.6 (CH, C-4), 34.5 (CH₂, C-2), 31.2 (CH₂, C-3)。该化合物的数据与文献^[12]报道的一致, 故化合物 2 鉴定为 (-)-regiolone。

化合物 3 黄色固体, ESI-MS m/z 273.0 [M+H]⁺, 分子式 C₁₅H₁₂O₃; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, J /Hz): δ_H 16.10 (1H, s, 5-OH), 10.21 (1H, s, 6-OH), 9.88 (1H, s, 8-OH), 6.94 (1H, s, H-10), 6.55 (1H, s, H-9), 6.30 (1H, s, H-7), 2.38 (1H, s, H-11), 1.92 (1H, s, H-12); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 182.6 (C, C-4), 165.2 (C, C-2), 162.1 (C, C-5), 160.6 (C, C-8), 158.4 (CH, C-6), 151.4 (C, C-10a), 140.3 (C, C-9a), 111.9 (C, C-3), 105.3 (C, C-5a), 101.3 (C, C-4a), 100.6 (CH, C-9), 100.4 (CH, C-7), 99.2 (CH, C-10), 18.6 (CH₃, C-11), 8.7 (CH₃, C-12)。该化合

物的数据与文献^[13]报道的一致, 故化合物**3**鉴定为萘并吡喃酮。

化合物**4** 浅黄色油状; ESI-MS m/z 473.1 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{22}H_{26}O_{10}$; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD , J /Hz): δ_H 6.70 (1H, s, H-9), 6.53 (1H, s, H-10), 6.41 (1H, s, H-7), 4.92 (H, d, $J = 5.4$, H-1'), 4.59 (H, m, H-2), 3.92 (H, dd, $J = 2.3, 12.1$, H-6'), 3.76 (H, dd, $J = 4.9, 12.1$, H-6'), 3.61 (3H, s, 4'-OMe), 3.50 (3H, m, H-2', H-3', H-5'), 3.23 (H, overlap, H-4'), 2.67 (H, m, H-3), 1.24 (3H, d, $J = 6.7$, H-11), 0.96 (3H, d, $J = 6.4$, H-12); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ_C 202.1 (C, C-4), 165.4 (C, C-5), 161.8 (C, C-8), 160.5 (C, C-6), 157.0 (C, C-10a), 144.4 (C, C-9a), 107.6 (C, C-5a), 104.7 (CH, C-9), 103.9 (C, C-4a), 103.8 (C, C-1'), 101.8 (CH, C-7), 101.4 (CH, C-10), 80.5 (CH, C-4'), 79.3 (CH, C-5'), 77.5 (CH, C-3'), 77.4 (CH, C-2), 75.2 (CH, C-2'), 62.1 (CH_2 , C-6'), 60.9 (CH_3 , 4'-OMe), 47.8 (CH, C-3), 15.7 (CH_3 , C-11), 10.5 (CH_3 , C-12)。该化合物的数据与文献^[10]报道的一致, 故化合物**4**鉴定为 indigotide G。

化合物**5** 浅黄色油状; ESI-MS m/z 473.1 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{22}H_{26}O_{10}$; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD , J /Hz): δ_H 7.25 (1H, m, H-7), 7.10 (1H, m, H-9), 6.67 (1H, s, H-10), 6.32 (1H, d, $J = 8.9$, H-1''), 4.50 (H, m, H-2''), 4.12 (H, m, H-3''), 3.95 (2H, overlap, H-2 and H-6''), 3.75 (2H, dd, overlap, H-6'' and H-4''), 3.63 (3H, s, 4''-OMe-H), 3.50 (H, m, H-5''), 2.72 (H, m, H-3), 1.46 (3H, d, $J = 6.0$, H-11), 1.21 (3H, d, $J = 6.4$, H-12); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ_C 202.0 (C, C-4), 165.2 (C, C-5), 161.6 (C, C-8), 160.4 (C, C-6), 156.9 (C, C-10a), 144.2 (C, C-9a), 107.5 (C, C-5a), 104.7 (CH, C-9), 103.9 (C, C-4a), 103.8 (C, C-1''), 103.1 (CH, C-7), 101.7 (CH, C-10), 80.5 (CH, C-4''), 79.2 (CH, C-2), 77.5 (CH, C-3''), 77.4 (CH, C-5''), 75.2 (CH, C-2''), 62.1 (CH_2 , C-6''), 60.9 (CH_3 , 4''-OMe-C), 47.7 (CH, C-3), 20.0 (CH_3 , C-11), 10.5 (CH_3 , C-12)。该化合物的数据与文献^[11]报道的一致, 故化合物**5**鉴定为 indigotide B。

化合物**6** 浅棕色固体; ESI-MS m/z 600.3 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{29}H_{47}N_5O_7$; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, J /Hz): δ_H 8.07 (1H, d, $J = 10.0$, 17-NH), 6.96 (1H, d, $J = 9.6$, 1-NH), 5.80 (1H, m, H-22), 5.15 (1H, overlap, H-23), 5.00 (2H, overlap, H-8 and H-14), 4.79 (1H, dd, $J = 6.4, 9.2$, H-1), 4.35 (1H, t, $J = 7.6$, H-28), 3.82 (3H, m, H-13), 1.17 (3H, d, $J = 6.6$, H-15), 0.87 (3H, d, $J = 6.5$, H-10), 0.84 (3H, d, $J = 6.7$, H-11), 0.77 (6H, overlap, H-3 and H-5); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ_C 173.2

(C, C-6), 172.9 (C, C-19), 170.5 (C, C-29和C-12), 169.0 (C, C-24), 168.2 (C, C-16), 132.2 (CH, C-22), 118.8 (CH_2 , C-23), 72.1 (CH, C-2), 60.0 (CH, C-28), 57.1 (CH, C-8), 54.7 (CH_2 , C-14), 52.6 (CH_2 , C-1), 46.3 (CH_2 , C-25), 36.7 (CH, C-2), 34.2 (CH_2 , C-21), 34.0 (CH_3 , C-18), 32.9 (CH_2 , C-17), 30.5 (CH_2 , C-27), 27.7 (CH_3 , C-13), 27.1 (CH_3 , C-7), 26.7 (CH, C-9), 23.7 (CH_2 , C-4), 23.5 (CH_2 , C-26), 19.1 (CH_3 , C-10和C-11), 15.3 (CH_3 , C-3), 15.1 (CH_3 , C-15), 11.2 (CH_3 , C-5)。该化合物的数据与文献^[14]报道的一致, 故化合物**6**鉴定为破伤风毒素A。

化合物**7** 浅棕色油状; ESI-MS m/z 630.3 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{31}H_{53}N_5O_7$; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, J /Hz): δ_H 8.07 (1H, d, $J = 9.5$, 17-NH), 6.98 (1H, d, $J = 9.4$, 1-NH), 5.17 (1H, m, H-14), 4.93 (1H, d, $J = 3.1$, H-8), 4.78 (1H, dd, $J = 6.7, 9.2$, H-1), 4.72 (1H, dd, $J = 5.8, H-20$), 2.54 (3H, s, H-13), 1.17 (3H, d, $J = 6.7$, H-15), 0.92 (3H, d, H-11), 0.87 (3H, d, H-10), 0.84 (3H, d, H-3), 0.77 (3H, m, H-5); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ_C 173.3 (C, C-6), 172.9 (C, C-19), 170.5 (C, C-12), 169.0 (C, C-30), 168.9 (C, C-25), 159.5 (C, C-16), 71.6 (CH, C-20), 59.6 (CH, C-29), 57.2 (CH, C-8), 54.7 (CH, C-14), 52.6 (CH, C-1), 46.1 (CH_2 , C-26), 38.3 (CH_2 , C-21), 36.7 (CH, C-2), 34.0 (CH_2 , C-18), 32.9 (CH_2 , C-17), 30.5 (CH_3 , C-7), 28.9 (CH_2 , C-28), 27.7 (CH_3 , C-13), 26.7 (CH, C-9), 24.0 (CH_2 , C-4), 23.8 (CH, C-22), 23.6 (CH_2 , C-27), 23.2 (CH_3 , C-23), 21.4 (CH_3 , C-24和C-10), 19.1 (CH_3 , C-11), 15.4 (CH_3 , C-3), 15.1 (CH_3 , C-15), 11.1 (CH_3 , C-5)。该化合物的数据与文献^[15]报道的一致, 故化合物**7**鉴定为破伤风毒素B。

5 抗肝炎活性测试

本文使用PCR-荧光探针法^[16]检测化合物对肝炎的抑制活性。

致谢: 上海生工生物工程股份有限公司做了菌株测试工作。

作者贡献: 周丽曼是本文第一作者, 负责实验设计、结构解析与论文的写作; 郝祎是本文共同第一作者, 负责谱图整理及文章初稿的撰写; 蒙菊香和覃芳芳负责化合物分离纯化; 覃清华负责样本的采集和前处理; 王聪负责实验指导及结构解析的指导; 孔凡栋是本文的通讯作者, 负责实验设计及把关, 提供本文思路, 参与稿件修改等工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Barton H, Jurado V. What's up down there? Microbial diversity in caves microorganisms in caves survive under nutrient-poor

- conditions and are metabolically versatile and unexpectedly diverse [J]. *Microbe*, 2007, 2: 132-138.
- [2] Yang ZQ, Cheng XY, Wang HM, et al. Environmental driving mechanism and community building process of bacteria community in Luohandu Cave, Guilin [J]. *Acta microbiol Sin (微生物学报)*, 2021, 61: 4118-4136.
- [3] Gao CH, Xia JL, Liang KY, et al. Research progress on secondary metabolites of marine plants and their co-epiphytic microorganisms in the Beibu Gulf [J]. *Guihaia (广西植物)*, 2022, 42: 1259-1272.
- [4] Alonso L, Creuzé -des-Châtelliers C, Trabac T, et al. Rock substrate rather than black stain alterations drives microbial community structure in the passage of Lascaux Cave [J]. *Microbiome*, 2018, 6: 1-15.
- [5] But DYK, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 1652.
- [6] Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E [J]. *Hepatology*, 2011, 54: 2218-2226.
- [7] Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis [J]. *J Hepatol*, 2010, 52: 594-604.
- [8] Dorin J, Debourgogne A, Zaïdi M, et al. First unusual case of keratitis in Europe due to the rare fungus *Metarhizium anisopliae* [J]. *Int J Med Microbiol*, 2015, 305: 408-412.
- [9] Asai T, Yamamoto T, Oshima Y. Aromatic polyketide production in *Cordyceps indigotica*, an entomopathogenic fungus, induced by exposure to a histone deacetylase inhibitor [J]. *Org Lett*, 2012, 14: 2006-2009.
- [10] Kong X, Ma X, Xie Y, et al. Aromatic polyketides from a sponge-derived fungus *Metarhizium anisopliae* mxh-99 and their antitubercular activities [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36: 739-744.
- [11] Asai T, Yamamoto T, Chung YM, et al. Aromatic polyketide glycosides from an entomopathogenic fungus, *Cordyceps indigotica* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2012, 53: 277-280.
- [12] Fujimoto H, Nagano J, Yamaguchi K, et al. Immunosuppressive components from an ascomycete, *Diplogelasinospora grovesii* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1998, 46: 423-429.
- [13] Zheng YY, Liang ZY, Shen NX, et al. New naphtho- γ -pyrones isolated from marine-derived fungus *Penicillium* sp. HK1-22 and their antimicrobial activities [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17: 322.
- [14] Tsunoo A, Kamijo M, Taketomo N, et al. Roseocardin, a novel cardiogenic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum* TT103 [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1997, 50: 1007-1013.
- [15] Ayer WA, Pena-Rodriguez LM. Metabolites produced by *Alternaria brassicae*, the black spot pathogen of canola. Part 1, the phytotoxic components [J]. *J Nat Prod*, 1987, 50: 400-407.
- [16] Jia H, Yu J, Du X, et al. Design, diversity-oriented synthesis and biological evaluation of novel heterocycle derivatives as non-nucleoside HBV capsid protein inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 202: 112495.