

谷胱甘肽促进 *Emericella sp.* 1454 中 emestrin 的产量提高

陈渝川, 肖同美, 苏冰洁, 闫璧滢, 余利岩, 司书毅*, 陈明华*

(中国医学科学院、北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 基于 *Emericella sp.* 1454 的基因组信息, 结合文献分析其二级代谢产物 emestrin 的生物合成前体, 并通过在培养基中添加前体的方法, 提高 emestrin 产量。本研究首次发现在培养基中添加 emestrin 的生物合成前体—还原型谷胱甘肽可显著提高其产量。每 50 g 大米培养基中加入 1.5 g 还原型谷胱甘肽, 培养 15 天, 可以得到 30.82 mg 的 emestrin, 相较于原始发酵培养方案提升了 11.71 倍。该方法既简单经济又高效, 为后续高效制备 emestrin 类化合物奠定了坚实的基础, 以及为其他类多硫代二酮哌嗪类化合物的产量提升提供了重要的借鉴。

关键词: 前体物质; 谷胱甘肽; emestrin; 产量提高; 培养基优化; *Emericella sp.*; 多硫代二酮哌嗪

中图分类号: R93 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-1087-05

Enhancing production of emestrin in *Emericella sp.* 1454 by adding the biosynthetic precursor glutathione

CHEN Yu-chuan, XIAO Tong-mei, SU Bing-jie, YAN Bi-ying, YU Li-yan,
SI Shu-yi*, CHEN Ming-hua*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,
Beijing 100050, China)

Abstract: Based on the genomic information of *Emericella sp.* 1454, in conjunction with literature analysis of its secondary metabolite emestrin, this study identified the biosynthetic precursors of emestrin and enhanced its production by supplementing the culture medium with these precursors. In this study, it was found for the first time that the addition of biosynthetic precursor, reduced glutathione, to the culture medium significantly increased emestrin yield. By incorporating 1.5 g of reduced glutathione into 50 g of rice culture medium and fermenting for 15 days, a yield of 30.82 mg of emestrin was obtained, which marked an 11.71-fold increase compared to the original fermentation approach. The method is both simple and cost-effective, establishing a solid foundation for the efficient synthesis of emestrin and similar compounds. Additionally, it serves as an important reference for enhancing the production of other epipolythiodioxopiperazine compounds.

Key words: biosynthetic precursor; glutathione; emestrin; yield improvement; fermentation medium optimization; *Emericella sp.*; epipolythiodioxopiperazine

多硫代二酮哌嗪 (epipolythiodioxopiperazines, ETPs) 主要来源于真菌次级代谢产物, 其结构特征为

两个氨基酸通过肽键缩合而成环二肽 (cyclic dipeptides), 并在该骨架上具有 2~4 个硫原子连接的硫桥结构。自 1936 年发现第一个多硫代二酮哌嗪类化合物 gliotoxin (图 1) 以来, 已发现约 20 种不同家族的 ETPs^[1]。ETPs 表现出抗细菌和真菌^[2,3]、抗病毒^[4]以及抗肿瘤^[5-7]等多种生物活性, 其硫桥结构为该化合物的一个关键药效团。

收稿日期: 2023-07-23; 修回日期: 2023-08-31.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2021-12M-1-028); 国家自然科学基金 (81302675, 82330110).

*通讯作者 Tel: 86-10-63180604, E-mail: sisymb@hotmail.com;

Tel: 86-10-83162728, E-mail: chenminghua@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0894

1985年, emestrin首次从 *Emericella striata* 中获得, 利用单晶X射线衍射实验确定了其结构(图1)^[8], 目前已发现 emestrin 类化合物约20个, 是一类含有独特的4,5-dihydro-oxepin片段, 并具有一个十五元内酯环的多硫代二酮哌嗪类化合物。研究发现 emestrin 具有较好的抗真菌和细菌活性, 其对禾谷镰孢菌和青霉菌的MIC分别为10和2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[9,10]。此外, emestrin对T47D、HepG2、C28和HeLa等多株肿瘤细胞均有细胞毒性, IC₅₀分别为1.8、4.2、2.6和13.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 根据细胞毒性试验、细胞周期分析和凋亡分析, 推断出 emestrin 具有潜在的抗肿瘤作用^[11]。前期本课题组还发现, emestrin对白血病细胞K562和MEG-01具有显著的抑制活性, IC₅₀值分别为1.15和0.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 伊马替尼为阳性对照, 前者与阳性药(1.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相当, 后者比阳性药(31.70 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)低两个数量级^[12]。因此, 该化合物可能为一个抗肿瘤活性先导化合物。

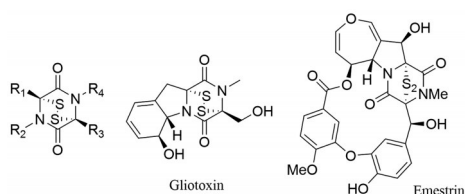


Figure 1 The skeleton of epipolythiodioxopiperazines (ETPs), and the structure of gliotoxin and emestrin

研究过程中发现 emestrin 在 *Emericella sp.* 1454 中产量极低, 每50 g大米固体发酵物中, 其产量为0.80 ± 0.18 mg。文献^[13]报道的 emestrin 产量也很低, 真菌 *Verticimonosporium ellipticus* 在NPF2培养基中培养18天时 emestrin 产量为7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 真菌 *E. nidulans* ATCC38163在1 L麦芽培养基中发酵14天可产生1 mg的 emestrin^[14]。因此, 该化合物的低产量可能限制了其深入研究。目前提高微生物次级代谢的方法通常有: ① 改变培养条件, 如: 改变培养基的营养条件;

改变培养时间; 改变氧气、光照、水等; ② 物理诱变如紫外诱变、等离子体诱变等^[15]、微波辐射^[16]; 化学诱变, 如加入硫酸二乙酯(DES)、亚硝酸胍等化学诱变剂^[17]; ③ 生物合成前体添加方法, 通过分析生物合成途径以及合成前体, 从而根据生物合成的需要加入相关物质调节微生物生物合成过程, 从而提高产量^[18-20]; ④ 通过基因工程的方法对相关基因进行过表达等^[21-23]。其中通过在培养基中加入合成途径中相对缺少的生物合成前体来提高目标产物的产量, 该方法简便、高效而经济。

基于 *Emericella sp.* 1454 的基因组信息, 前期对 emestrin 的生源途径进行了详细的推导(图2)^[12]。其中两分子的L-苯丙氨酸通过NRPS途径形成二酮哌嗪骨架结构; 通过谷胱甘肽巯基转移酶(*ercG*)为结构引入硫原子, 从而在硫氧还蛋白还原酶(*ercT*)等的催化下形成硫桥; 异香草酸在酰化酶(*ercH*)的催化下与二酮哌嗪骨架中 dihydro-oxepin 单元上的羟基成酯, 为构成十五元环内酯提供结构单元。因此, L-苯丙氨酸、还原型谷胱甘肽和异香草酸应为 emestrin 的主要生物合成前体。本研究主要考察了在培养基中添加以上三种生物合成前体对 emestrin 产量的影响, 并发现还原性谷胱甘肽的添加能显著增加 emestrin 的产量, 经优化其培养方案, 使 emestrin 的15日产量最高达到每50 g大米培养基产生30.82 mg, 较原始培养方案提高了11.71倍。

材料与方法

菌株 真菌 *Emericella sp.* 1454 从采集于宁夏沙坡头的地衣结皮中分离得到。由中国药学微生物菌种保藏管理中心(China Pharmaceutical Culture Collection, CPCC)张涛研究员鉴定并保存, 编号为No. CPCC 400858。

培养基 PDA培养基(批号: 0091369)、PDB培养

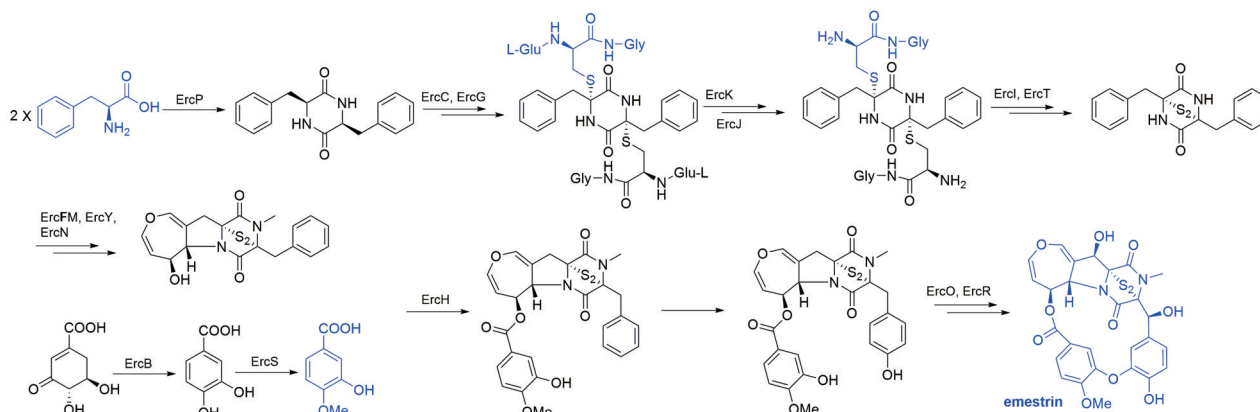


Figure 2 Proposed biosynthetic route of emestrin

基(批号: 6271571)购自美国BD公司。有机糙米购自北京和雅堂食品有限公司。每袋大米培养基包含大米50 g, 去离子水50 mL, pH为7.1。根据分组每袋中分别加入还原型谷胱甘肽0、0.5、1和1.5 g。

试剂 还原型谷胱甘肽(批号: J25GS155402)、L-苯丙氨酸(批号: LF60T135)、异香草酸(批号: Z28D8D51552)购自上海源叶生物科技有限公司。乙酸乙酯(分析纯)购自北京市通广精细化工公司。色谱甲醇和色谱乙腈购自上海星可高纯溶剂有限公司。

仪器设备 高效液相色谱仪LC-20AT(日本Shimadzu公司); 高压灭菌锅GR60DA(致微(厦门)仪器有限公司); 恒温振荡培养箱HZQ-X100(苏州培英实验设备有限公司); KQ-800B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 超净工作台BCM-1000A(苏州安泰空气技术有限公司); 旋转蒸发器EYELA N-1100(埃朗科技国际贸易(上海)有限公司); 生化培养箱(中仪国科(北京)科技有限公司)。

标准曲线绘制 取纯化制备得到的 emestrin (2.05 mg) 用甲醇溶解, 配置得到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 稀释得到 0.3、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25、0.015 625 和 $0.007 812 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 每个浓度做三个重复^[24]。用高效液相(HPLC)色谱检测在254 nm处 emestrin 的色谱峰面积, 并绘制标准曲线。HPLC检测方法如下: 5%~100%乙腈/0.1% TFA水溶液(v/v), 30 min, $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, COSMOSIL C18-PAQ分析型色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 进样体积为40 μL。

加入不同前体物质对 emestrin 产量的影响 根据基因组分析和文献调研, 初步确定 emestrin 的合成前体可能有 L-苯丙氨酸、异香草酸和还原型谷胱甘肽。其中 L-苯丙氨酸和异香草酸形成基本母核, 还原型谷胱甘肽主要参与硫桥的形成。每袋大米培养基中各加入一种 0.5 g 上述前体物质, 菌丝体 2 mL, 于 28 °C 恒温培养 30 天。

还原型谷胱甘肽加入量对 emestrin 产量的影响 在每袋大米培养基中分别加入 0.5、1 和 1.5 g 还原型谷胱甘肽, 分别在 28 °C 培养 6、10 和 15 天。每个加样浓度和培养时间均做三个重复。

培养方法 平板培养: 用无菌竹签从保存于 -80 °C 的甘油冻存管中取出保存的菌丝体, 接种于 PDA 中, 于 28 °C 恒温培养 7~10 天, 菌丝表面可观察到孢子产生。种子培养: 用无菌竹签从活化的菌种表面挑取孢子接种于 PDB 培养基中, 28 °C, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 2 天。大米发酵: 每袋大米培养基中加入菌丝球体 2 mL, 于 28 °C 根据分组分别恒温培养。

提取与含量测定 每袋发酵物加入乙酸乙酯

300 mL, 超声提取 2 次, 每次 40 min。合并两次提取液, 加乙酸乙酯定容至 600 mL。立即取 30 mL 提取液, 减压蒸发除去乙酸乙酯, 6 天及 10 天的发酵提取物加入 3 mL 甲醇溶解, 15 天的发酵提取物加入 6 mL 甲醇溶解, 0.22 μm 滤膜过滤后, 采用高效液相色谱分析。色谱条件与进样体积与标准曲线项下方法一致。读取 254 nm 波长下色谱峰面积, 根据标准曲线计算产量。

结果

1 标准曲线

对 7 个不同浓度的 emestrin 标准品溶液进行测试, 结果显示, 7 个浓度的标准品在 254 nm 波长下色谱峰峰形良好, 均在该色谱检测范围内。以峰面积为 y 轴, 以标准品浓度为 x 轴, 通过线性回归拟合, 得到标准曲线为 $y = 64 777 449x - 113 945$, $R^2 = 0.999 3$, 该曲线符合线性要求。

2 加入不同前体物质对 emestrin 产量的影响

在大米发酵培养基中加入不同前体 0.5 g, 包括 L-苯丙氨酸、异香草酸和还原型谷胱甘肽。28 °C 培养 30 天, 通过 HPLC 进行检测, 结果发现加入还原型谷胱甘肽后, emestrin ($t_{\text{R}} 20.3 \text{ min}$) 产量显著上升, 但加入其他前体物质如 L-苯丙氨酸和异香草酸后产量均略微降低, 差异并不显著(图3)。因此认为加入还原型谷胱甘肽有利于 emestrin 的产生。

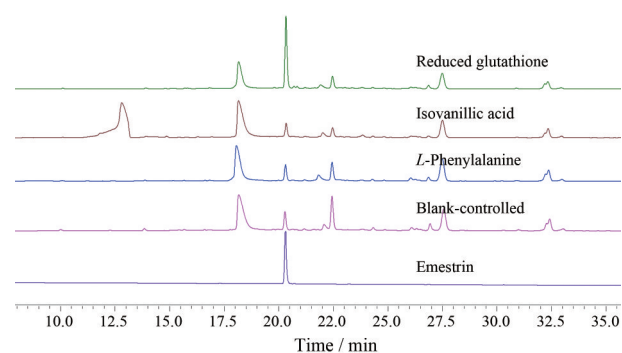


Figure 3 The effect of the production of emestrin in *Emericella* sp. 1454 by adding different biosynthetic precursors

3 还原型谷胱甘肽加入量和培养时间对 emestrin 产量的影响

基于不同前体物质对 emestrin 产量的影响的实验结果, 考察还原型谷胱甘肽(GSH)的添加量及培养时间对 emestrin 产量的影响。对培养 6、10 和 15 天的发酵提取物分析均表明, 谷胱甘肽的加入量与 emestrin 的产量具有一定的线性关系, 当还原型谷胱甘肽加入量由每 50 g 大米 0.5 g 提高至 1.0 g 时, emestrin 的产量也

接近翻倍。同时,对于加入还原型谷胱甘肽量相同,但培养时间不同的样品,培养时间延长,其产量也随之提高。培养10天时菌丝体已长满整个培养基表面,因此,此次实验考察时间最长为15天。综合考虑 emestrin 的产量、发酵时间和发酵成本,确定最佳的培养方案为每50 g大米培养基中加入1.5 g还原型谷胱甘肽,培养15天,可以得到30.82 mg的 emestrin,相较于原始发酵培养方案提升了11.71倍(表1,图4)。

Table 1 The effect of adding reduced glutathione on the production of emestrin. ^aThe production of emestrin in 50 g of rice medium. ^bCompare to the blank-controlled trial with the same fermentation time

t/d	GSH/g	Production/mg ^a	Multiple ^b
6	0	0.80 ± 0.18	1.00
6	0.5	3.75 ± 0.70	4.70
6	1	8.66 ± 0.94	10.86
6	1.5	10.04 ± 0.86	12.58
10	0	2.21 ± 0.31	1.00
10	0.5	6.87 ± 0.84	3.11
10	1	11.41 ± 1.68	5.17
10	1.5	17.16 ± 1.71	7.77
15	0	2.63 ± 0.05	1.00
15	0.5	9.05 ± 1.66	3.44
15	1	19.48 ± 0.72	7.40
15	1.5	30.82 ± 2.49	11.71

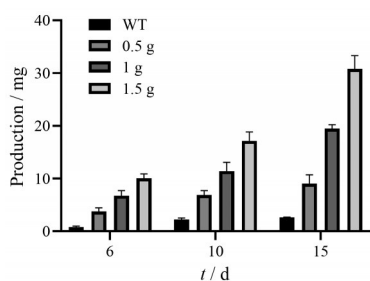


Figure 4 The production of emestrin in 50 g of rice medium by adding 0, 0.5, 1, and 1.5 g of reduced glutathione and fermenting 6, 10, and 15 days, respectively ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

讨论

通过在大米固体培养基中添加L-苯丙氨酸、异香草酸和还原型谷胱甘肽三种生物合成前体物质,本实验首次发现还原型谷胱甘肽的加入能显著提升含有二硫桥的多硫代二酮哌嗪化合物 emestrin 的产量。同时通过对添加还原型谷胱甘肽的量、发酵时间和发酵成本的考虑,本实验也得到了一个较合理的培养方案,即在每50 g大米培养基中添加1.5 g还原性谷胱甘肽、发酵时间为15天,能从中获得30.82 mg的 emestrin,使其产量提高了11.71倍。本实验为 emestrin 的高效制备提供了一个较为便捷且经济的方法,也为以 emestrin 为基本骨架并具有显著细胞毒性的同类化合物,如

secoemestrin C (四硫键)^[7]、MPC1001 (二硫键)^[25]、MPC1001B (二硫键)^[25]、MPC1001C (二硫键)^[25]、MPC1001D (三硫键)^[25]、MPC1001E (四硫键)^[25] 和 emestrin J (二硫键)^[26] 等的产量提高提供了思路。

目前对ETPs化合物的生物合成研究发现,多硫桥的形成均与谷胱甘肽有关。如在 *gli G* 催化下,还原型谷胱甘肽在具有显著细胞毒性的 gliotoxin 结构形成中发挥引入硫原子的角色,以便形成硫桥^[27]; *sir G* 基因及 *ata IMG* 基因分别在化合物 sirodesmin PL 和 acetylaranotin 硫桥形成中也发挥类似作用^[28,29]。Gliovirin 及其类似物中含有不规则的硫桥即 α, β 位硫桥,生物合成分析该硫桥中的硫元素也来自还原型谷胱甘肽,其在 *glv 10* 基因的作用下引入硫原子^[30,31]。因此,本实验采用在培养基中直接添加还原型谷胱甘肽,也对其他含有硫桥的多硫代二酮哌嗪类化合物的产量提升具有重要的借鉴意义。

作者贡献: 陈明华、司书毅和陈渝川构思并设计了整体实验;陈渝川进行论文的整体实验和数据分析;肖同美、苏冰洁和闫壁滢参与了产物分离和数据分析工作;余利岩提供了实验所需菌株;陈明华和陈渝川撰写论文。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Welch TR, Williams RM. Epidithiodioxopiperazines. occurrence, synthesis and biogenesis [J]. Nat Prod Rep, 2014, 31: 1376-1404.
- [2] Meng LH, Wang CY, Mandi A, et al. Three diketopiperazine alkaloids with spirocyclic skeletons and one bithiodiketopiperazine derivative from the mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231 [J]. Org Lett, 2016, 18: 5304-5307.
- [3] Funabashi Y, Horiguchi T, Iinuma S, et al. TAN-1496 A, C and E, diketopiperazine antibiotics with inhibitory activity against mammalian DNA topoisomerase I [J]. J Antibiot, 1994, 47: 1202-1218.
- [4] Michel KH, Channey MO, Jones ND, et al. Epipolythiopiperazine dione antibiotics from *Penicillium turbatum* [J]. J Antibiot, 1974, 27: 57-64.
- [5] Sun Y, Takada K, Takemoto Y, et al. Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp., and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities [J]. J Nat Prod, 2012, 75: 111-114.
- [6] Wang L, Jiang Q, Chen S, et al. Natural epidithiodiketopiperazine alkaloids as potential anticancer agents: Recent mechanisms of action, structural modification, and synthetic strategies [J]. Bioorg Chem, 2023, 137: 106642.
- [7] Wang J, Chen M, Wang M, et al. The novel ER stress inducer Sec C triggers apoptosis by sulfating ER cysteine residues and

- degrading YAP via ER stress in pancreatic cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 210-227.
- [8] Seya H, Nakajima S, Kawai KI, et al. Structure and absolute configuration of emestrin, a new macrocyclic epidithiodioxopiperazine from *Emericell striata* [J]. *J Chem Soc Chem Commun*, 1985, (10): 657-658.
- [9] Jiang CS, Guo YW. Epipolythiodioxopiperazines from fungi: chemistry and bioactivities [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11: 728-745.
- [10] Waring PM, Eichner RD, Palni UT, et al. The isolation and identification of a new metabolite from *Aspergillus fumigatus* related to gliotoxin [J]. *Tetrahedron Lett*, 1986, 27: 735-738.
- [11] Nursid M, Chasanah E, Murwantoko M, et al. Isolation and identification of emestrin from *Emericella nidulans* and investigation of its anticancer properties [J]. *Microbiol Indones*, 2011, 5: 160-169.
- [12] Chang S, Cai ML, Xiao TM, et al. Prenylemestrins A and B: two unexpected epipolythiodioxopiperazines with a thioethanothio bridge from *Emericella* sp. isolated by genomic analysis [J]. *Org Lett*, 2022, 24: 5941-5945.
- [13] Herath KB, Jayasuriya H, John G, et al. Isolation and structures of novel fungal metabolites as chemokine receptor (CCR2) antagonists [J]. *J Antibiot*, 2005, 58: 686-694.
- [14] Abou El-Kassem LT, Hawas UW, F Ahmed E, et al. Induction of apoptosis by emestrin from the plant endophytic fungus *Emericella nidulans* ATCC 38163 in Huh-7 human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Nat Prod Res*, 2023. DOI: 10.1080/14786419.2023.2176489.
- [15] Li Y, Dai J, Jiang Z, et al. Breeding of new thiopeptide antibiotic 166A high-yield producing strain by MPMS composite mutagenesis with plasma and UV [J]. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2022, 47: 514-520.
- [16] Zhang XB, Shi QN, Yang ZQ, et al. Application of microwave radiation technology in the field of pharmaceutical preparations [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 303-309.
- [17] Yang C, Wang L, Yu J, et al. Mutation screening for high-yield strains of a water-soluble fungicide from *Streptomyces lavendulae* X33 [J]. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2021, 46: 121-127.
- [18] Wang L, Wang H, Chen J, et al. Coordinating caffeic acid and salvianic acid A pathways for efficient production of rosmarinic acid in *Escherichia coli* [J]. *Metab Eng*, 2023, 76: 29-38.
- [19] Dai JG, Zhu WH, Wu YQ, et al. Effects of precursors and fungal elicitors on the production of ginkgolide B by *Ginkgo biloba* suspension culture cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2000, 35: 151-155.
- [20] Hu Z, Xu J, Zhou T, et al. Methyl jasmonate stimulates the synthesis and accumulation of asperosaponin VI in the roots of *Dipsacus asper* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 2302-2307.
- [21] Yuan YM, Xing XH, Zhang C. Design and construction of microbial cell factories from mutation breeding to whole genome customization [J]. *Syn Biol J (合成生物学)*, 2020, 1: 656-673.
- [22] Hou J, Yin Y, Tian S, et al. Overexpressing of chalcone isomerase (*CHI*) gene enhances flavonoid accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 319-327.
- [23] Zhang Z, Wang D, Yang L, et al. Ferulate 5-hydroxylase gene (F5H) regulation of glycyrrhizic acid biosynthesis determined by gene overexpression and knockout [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1719-1726.
- [24] Li T, Zhao X, Gao W, et al. Screening of quantitative preparation quality markers of Zhibao Sanbian Wan [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1770-1779.
- [25] Onodera H, Hasegawa A, Tsumagari N, et al. MPC1001 and its analogues: new antitumor agents from the fungus species [J]. *Org Lett*, 2004, 6: 4101-4104.
- [26] Li Y, Yue Q, Krausert NM, et al. Emestrins: anti-cryptococcus epipolythiodioxopiperazines from *Podospora australis* [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 2357-2363.
- [27] Amatov T, Jahn U. Gliotoxin: nature's way of making the epidithio bridge [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53: 3312-3314.
- [28] Guo CJ, Yeh HH, Chiang YM, et al. Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 7205-7213.
- [29] Urquhart AS, Elliott CE, Zeng W, et al. Constitutive expression of transcription factor SirZ blocks pathogenicity in *Leptosphaeria maculans* independently of sirodesmin production [J]. *PLoS One*, 2021, 16: e0252333.
- [30] Zhu M, Zhang X, Huang X, et al. Irregularly bridged epipolythiodioxopiperazines and related analogues: Sources, structures, and biological activities [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83: 2045-2053.
- [31] Huber EM. Epipolythiodioxopiperazine-based natural products: building blocks, biosynthesis and biological activities [J]. *Chem-biochem*, 2022, 23: e202200341.