

天麻蜜环菌粉正己烷提取物的分离和抗神经性炎活性研究

程 鹏¹, 耿 燕^{1*}, 许泓瑜¹, 陆震鸣¹, 史劲松¹, 许正宏^{1,2}¹江南大学药学院; ²江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: 为了探究天麻蜜环菌粉正己烷提取物抗炎作用的物质基础及抗炎机制, 本文首先对天麻蜜环菌粉正己烷提取物进行薄层层析和中低压柱层析分离, 获得了具有显著抗炎活性的组分 5 (Fr. 5), 进一步通过硅胶柱分离, 得到主成分较为集中的组分 5-1 (Fr. 5-1), 液质联用 (LC-MS) 及高效液相色谱分析推测 Fr. 5-1 的主成分为大豆黄素; 其次, 通过脂多糖 (LPS) 诱导小胶质细胞 (BV2) 炎症模型考察 Fr. 5-1 不同剂量 (10、30、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对炎症因子一氧化氮 (NO) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 表达的影响, 发现中高剂量 (30、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 Fr. 5-1 能显著抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症因子 NO 及 TNF- α 的分泌。研究表明天麻蜜环菌粉提取物 Fr. 5-1 具有抗炎活性, 其机制可能是通过抑制炎症因子的表达和分泌。

关键词: 天麻蜜环菌粉; 抗炎; BV2 细胞; Fr. 5-1

中图分类号: R285

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.9.012

Isolation and Anti-inflammatory Activity of n-Hexane Extract from *Armillariamellea*

CHENG Peng¹, GENG Yan^{1*}, XU Hong-yu¹, LU Zhen-ming¹, SHI Jing-song¹, XU Zheng-hong^{1,2}¹School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University;²The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In order to explore the material basis and anti-inflammatory mechanism of n-hexane extract of *Armillariamellea*, firstly, we identified fraction Fr. 5 by TLC and column chromatography separation in low pressure. Then this fraction was chromatographed on a silica gel column to get Fr. 5-1. The main component of Fr. 5-1 may be compound Daidzein by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and HPLC analysis. Fr. 5-1 (30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly inhibited LPS induced NO and TNF- α secretion in microglia cells (BV2). Therefore, the result demonstrated that Fr. 5-1 from *A. mellea* had anti-inflammation activity in LPS activated microglia through inhibition of inflammatory mediators.

Key words: *Armillariamellea*; anti-inflammatory; BV2 cells; Fr. 5-1

蜜环菌 (*Armillariamellea*), 隶属于口蘑科 (Tricholomataceae) 蜜环菌属 [*Armillaria* (Fr.: Fr.) Staude], 又名榛蘑、蜜环蕈、青冈蕈, 是一种药食兼用真菌。中国已经报道了 15 种, 其中特有种 9 个, 主要分布在黑龙江、吉林、河南、山西、青海、云南、内蒙古、西藏及台湾等省区^[1]。天麻是一种中国传统名贵中药, 寄生在天麻上并为其提供营养的蜜环菌为天麻蜜环菌^[2]。蜜环菌含有特征性化学成分原伊鲁烷 (protoilludane) 型倍半萜醇的芳香酸酯类, 以

及二萜、三萜、多糖、腺苷类等多种类型次生代谢产物^[3]。研究发现蜜环菌提取物具有降血糖^[4]、延缓衰老^[5]、抗阿尔茨海默症^[6]、免疫调节^[7]、护肝^[8]、抗肿瘤^[9]等多种作用。

神经胶质细胞激活通常被认为神经退行性疾病, 例如阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病和帕金森氏病中导致神经元死亡的一个重要原因, 激活的神经胶质细胞会释放多种炎性细胞因子 (NO、TNF- α 、IL-1 β 等), 促进神经炎症的产生^[10,11]。小胶质细胞是其中起主要免疫作用的细胞, 其在神经性炎症的发生发展过程中扮演关键角色。LPS 诱导 BV2 细胞是一个成熟的体外神经性炎症评价模型, 被广泛用于天然药物抗神经性炎症的筛选。天麻蜜环菌应用于

收稿日期: 2017-04-05 接受日期: 2017-05-15

基金项目: 国家自然科学基金 (31401931, 31201020); 江苏省六大人才高峰项目 (2015-SWYY-006)

* 通信作者 E-mail: gengyanjnu@163.com

眩晕、癫痫、惊风等与神经性炎症相关疾病的治疗,其药理学机制并不明晰,而对神经性炎症的抑制作用可能是其中的一个重要机制^[12]。

本实验室前期已对天麻蜜环菌菌粉进行初步的活性评价,发现正己烷提取物具有显著的抗炎活性^[13],但是其中有抗炎活性的物质和抗炎机制还需要进一步研究。因此本实验以抗炎活性为导向,进一步分离天麻蜜环菌粉正己烷提取物,对其抗炎活性显著的组分 Fr. 5-1 进行成分分析,并建立了 LPS 诱导 BV2 细胞炎症模型,以探究其抗炎作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

天麻蜜环菌液态发酵菌粉由江苏神华药业有限公司提供;蜜环菌粉采用乙醇浸提,正己烷-水以体积比 1:1 萃取得到正己烷提取物。小鼠小胶质细胞(ATCC 来源)BV2 购自上海复祥生物科技有限公司;10 cm 细胞培养皿、96 孔板、6 孔板等购自 Thermo 公司。

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司;双抗溶液(100X)、胰蛋白酶、亚硝酸钠购自碧云天;二甲基亚砜(DMSO)、磷酸缓冲溶液(PBS)、噻唑蓝(MTT)、脂多糖(LPS)、格里斯试剂(Griess)购自美国 Sigma 公司;ELISA 试剂盒购自美国 e-Bioscience 公司;TRIZOL, FastStart Universal SYBR Green Master 购自美国 Roche 公司;大豆黄素标准品购自美国 Sigma 公司;其余试剂为分析纯,购自国药集团化学有限公司。

1.2 仪器

EL204 电子天平,博特勒托利多公司制造;SpectraMax M2 酶标仪,德国 Eppendorf 公司;CO₂ 培养箱,Thermo 公司制造;倒置显微镜,Nikon 公司制造;PCR 扩增仪,Bio-Rad 公司制造;旋转蒸发仪,德国 Heidolph 公司制造;中低压柱层析仪,美国 Grace 公司制造;分析型高效液相(HPLC),Dionex 公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 正己烷提取物的中低压柱层析分离

本实验利用 Grace 公司的中低压柱层析色谱仪采用湿法上样对样品进行分离。实验所用硅胶柱为 Grace 15 g 预装柱,系统为 Reveleris 全息快速色谱系统,检测器为系统自带蒸发光散射检测器和紫外检测器。根据文献报道与全波长扫描结果,选用紫外检测波长为:254 nm 和 280 nm。根据薄层色谱

Rf 值确定流动相洗脱条件为石油醚和乙酸乙酯梯度洗脱,对依次出峰的六个组分进行手动收集,然后将收集的组分通过旋转蒸发仪浓缩并称重。

1.3.2 Fr. 5 的硅胶柱分离纯化

用石油醚-乙酸乙酯做洗脱相,选取粒径更小的 300~400 目硅胶分离,Fr. 5 与硅胶 1:5 上样,碘缸显色法检测收集组分并用旋转蒸发仪浓缩称重。

1.3.3 Fr. 5-1 的 LC-MS 分析并与标品比对

将 Fr. 5-1 溶于甲醇中,配成 0.5 mg/mL 的进样样。送至江南大学国家重点实验室进行 LC-MS 的检测。用大豆黄素作为标品,通过 HPLC 内标法和外标法进行比对 Fr. 5-1 的主要成分,HPLC 分析方法:使用 UltiMate3000 戴安高效液相色谱仪,Waters Xbridge C₁₈ 柱子(5 μm, 4.6 × 250 mm),流动相为水(A)-甲醇(B),检测波长 254 nm,流动相梯度洗脱程序:0~15 min,5%~47%B;15~45 min,47%~52%B;45~50 min,52%~5%B;50~60 min,5%B。

1.3.4 BV2 细胞培养

根据 BV2 细胞的生长状态,选择含有 10% 胎牛血清(FBS)及 1% 抗生素(100 U/mL 青霉素;100 μg/mL 链霉素)的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 湿润环境的培养箱中培养细胞,细胞长至 80%~90% 时传代接种,选取对数生长期的细胞进行实验。

1.3.5 Fr. 5 对 BV2 细胞活力的影响

噻唑蓝(MTT)能与活细胞中的琥珀酸脱氢酶反应生成蓝紫色甲臜,而不与死细胞反应。采用 MTT 法检测提取物对 BV2 细胞株活力的影响。

将适量细胞铺于 96 孔板培养过夜,待细胞密度长至 80% 左右时弃旧培养基,加入含不同浓度(3、10、30、100、300 μg/mL) Fr. 5 的培养基预作用 2 h,预作用结束后再加入 LPS(1 μg/mL)^[14] 与 Fr. 5 共作用细胞 24 h,对照组不加入任何药物。药物作用 24 h 后收集每孔的细胞培养液用于 NO 检测(1.3.6),每孔细胞中加入含 0.5 mg/mL MTT 的培养基 100 μL,避光孵育 4 h,4 h 后弃含 MTT 的培养基,每孔加 150 μL DMSO,孵育 15 min,确认蓝紫色结晶全部溶解后用酶标仪检测 570 nm 处的 OD 值。根据 MTT 法的检测原理,细胞存活率可用以下公式表示:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{药物组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100\%$$

1.3.6 Fr. 5 对 LPS 诱导 BV2 细胞分泌 NO 水平的影响

炎症状态下,机体会合成大量 NO,过量的 NO

不仅具有细胞毒性,还会加剧炎症反应,造成机体炎症性损伤。本文采用格里斯法(Griess)检测细胞分泌 NO 的量,评价提取物的抗炎活性。

将 1.3.5 中从每孔取出的细胞培养液转移至新的 96 孔板,每孔加 100 μL ,并向每孔中加入等体积 Griess 试剂,避光孵育 10 min 后用酶标仪检测其在 540 nm 处的 OD 值,再根据 NO 标准曲线计算出细胞所分泌的 NO 量。

利用已知浓度的 NaNO_2 溶液获取 NO 标准曲线,用 DMEM 培养基配 0 到 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 NaNO_2 溶液,取上述不同浓度溶液 100 μL 于 96 孔板中,再加入等体积 Griess 试剂,反应 10-15 min 后在酶标仪 540 nm 处读取吸光度值。以吸光度为横坐标,对应的 NaNO_2 的摩尔浓度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.7 Fr. 5-1 对 BV2 细胞活力和 LPS 诱导 BV2 细胞分泌 NO 水平的影响

吸取 100 mg/mL Fr. 5-1 溶于 DMEM 培养基稀释 1000 倍配成 100 $\mu\text{g/mL}$,依次梯度稀释三倍配成 30 $\mu\text{g/mL}$,10 $\mu\text{g/mL}$,参照 1.3.5 和 1.3.6 的方法,分别检测不同浓度(10、30、100 $\mu\text{g/mL}$)的 Fr. 5-1 对 BV2 细胞活力和 LPS 诱导 BV2 细胞分泌 NO 水平的影响。

1.3.8 酶联免疫法检测炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌量

将适量细胞铺于 96 孔板培养过夜,待细胞密度长至 80% 左右时弃旧培养基,先加入含不同浓度(10、30、100 $\mu\text{g/mL}$) Fr. 5-1 的培养基预作用细胞 2 h,然后加入 LPS 与 Fr. 5-1 共作用细胞 24 h,收集细胞培养液,根据 ELISA 试剂盒说明书检测细胞所分泌炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 的量。

1.3.9 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测相关基因表达情况

采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,将 RNA 逆转录

为 cDNA,采用 SYBR Green 进行荧光定量 PCR 反应,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[14]对 $\text{TNF-}\alpha$ 基因的表达水平进行相对定量,计算各相关基因的表达倍数,相关基因引物如表 1 所示。

表 1 炎症相关基因引物序列

Table 1 The sequences of inflammation primers

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>TNF-α</i>	5'-CCCTCAGACTCAGATCATCTTCT-3' 5'-TGCTACGACGTGGGCTACAG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3' 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTACT-3'

1.3.10 数据分析

数据结果以平均值 \pm 标准差表示,单因素数据采用单向方差分析法分析(One-Way ANOVA),多因素数据采用双向方差分析法(Two-Way ANOVA)。显著性差异表示为:与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,^{###} $P < 0.001$;与 LPS 诱导组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。

2 结果与讨论

2.1 正己烷提取物中低压柱层析分离

通过中低压柱层析将正己烷提取物分离,依次收集到六个组分(图 1),对收得的六个组分进行细胞活力和炎症因子 NO 的检测,发现 Fr. 2, Fr. 3, Fr. 5, Fr. 6 四个组分在浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 以内具有较好细胞活力(图 2),同时具有一定的抗炎效果,实验选取抗炎效果最好的 Fr. 5 进一步进行研究。

2.2 Fr. 5-1 的 LC-MS 分析及与大豆黄素的 HPLC 比对

对 Fr. 5 过硅胶柱进一步分离纯化得到 Fr. 5-1,

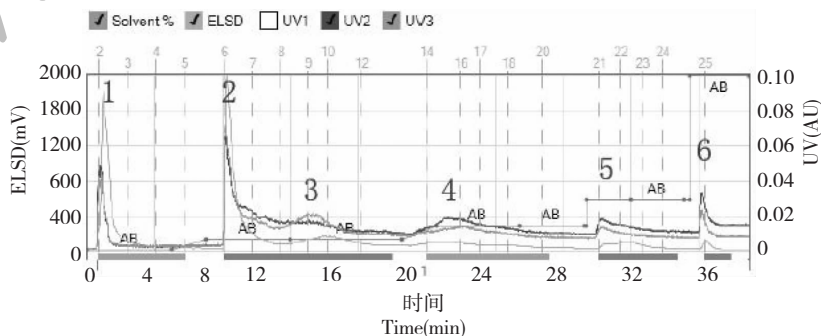


图 1 天麻蜜环正己烷提取物中低压柱层析分离图

Fig. 1 Medium and low pressure column chromatography separation of *A. mellea* Hex extract

得率为 44.5%, HPLC 分析结果显示主成分相对明确(图 3a), 分析主成分的分子量在 254.1, 参考实验室之前鉴定蜜环菌所含化合物, 与大豆黄素分子量相同; 故通过内标法和外标法将 Fr. 5-1 与大豆黄素标准品比对, 结果显示 Fr. 5-1 主成分出峰时间与其相同(图 3), 推测 Fr. 5-1 的主成分为大豆黄素。

2.3 Fr. 5-1 对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO 分泌的影响

对 Fr. 5-1 进行细胞活力检测, 浓度在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均有良好细胞活力(图 4a); 检测 Fr. 5-1 对 LPS 诱导 BV2 细胞产生 NO 的影响, 结果表明 Fr. 5-1 能显著抑制 LPS 诱导 BV2 细胞 NO 的产生(图 4b)。

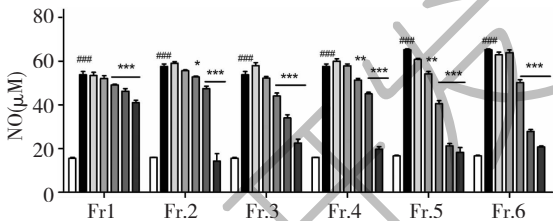
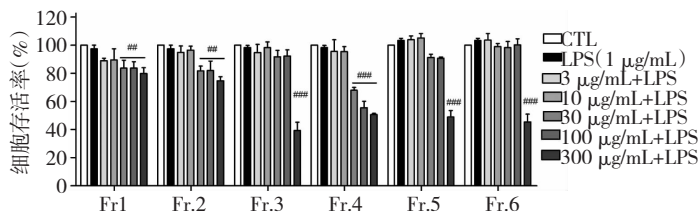


图 2 硅胶分离所得组分对 BV2 细胞活力及其对 LPS 诱导细胞分泌 NO 的影响

Fig. 2 Effect of fractions on cell viability and the production of NO by LPS induced BV2 cell lines

注:与对照组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与 LPS 诱导组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Note: Compared with control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; compared with LPS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

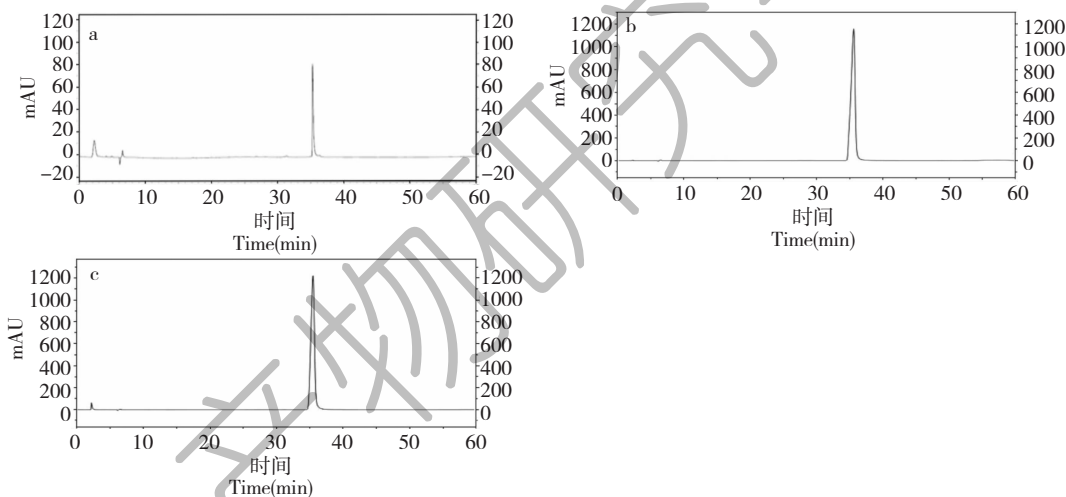


图 3 Fr. 5-1 (a)、大豆黄素标准品 (b) 及大豆黄素 + Fr. 5-1 (c) 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of Fr. 5-1 (a), daidzein (b) and Fr. 5-1 + daidzein (c)

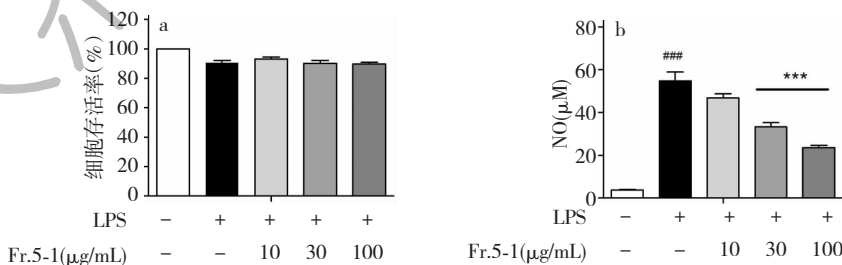


图 4 Fr. 5-1 对 LPS 诱导 BV2 细胞活力和分泌炎症因子 NO 的影响

Fig. 4 Effect of Fr. 5-1 on cell viability and the production of NO by LPS induced BV2 cell lines

注:与对照组比, ### $P < 0.001$;与 LPS 诱导组比, *** $P < 0.001$

Note: Compared with control, ### $P < 0.001$; compared with LPS group, *** $P < 0.001$

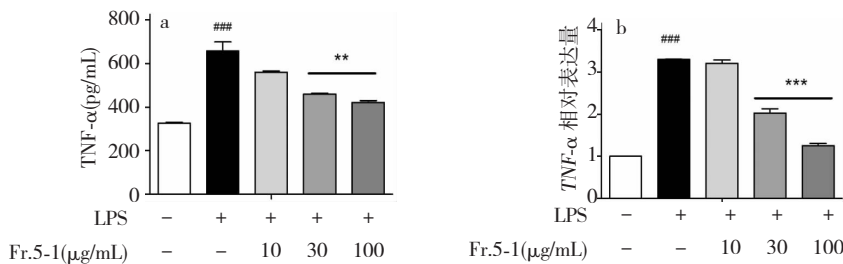


图5 Fr. 5-1 对 LPS 诱导 BV2 细胞分泌炎症因子 $TNF-\alpha$ mRNA 相对表达量及分泌量的影响

Fig. 5 Effect of Fr. 5-1 on the mRNA relative expression and the production of $TNF-\alpha$

注:与对照组比,^{###} $P < 0.001$;与 LPS 诱导组比,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$

Note: Compared with control, ^{###} $P < 0.001$; compared with LPS group, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

2.4 Fr. 5-1 对 LPS 诱导的 BV2 细胞 $TNF-\alpha$ 分泌的影响

根据 1.3.8 和 1.3.9 的方法检测了 Fr. 5-1 对 LPS 诱导细胞产生的炎症因子的抑制作用,由图 5 可知 Fr. 5-1 中高剂量(30、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均能显著抑制 LPS 诱导产生的 $TNF-\alpha$ 的表达及分泌。

3 讨论与结论

本研究以 LPS 诱导 BV2 细胞炎症模型,基于抗炎活性为导向筛选天麻蜜环菌正己烷提取物中活性组分。通过中低压柱层析分离得到具有良好抗炎活性组分 Fr. 5,进一步硅胶柱分离纯化得到主体成分明确的 Fr. 5-1,LC-MS 分析 Fr. 5-1 发现其主要成分为大豆黄素,近年有研究发现大豆黄素具有抗炎活性,如能通过抑制星形胶质细胞炎症反应改善阿尔兹海默症^[15],故推测大豆黄素是 Fr. 5-1 主要抗炎活性物质,但不排除存在少量其他活性物质。进一步研究 Fr. 5-1 对抑制 LPS 诱导 BV2 细胞分泌炎症因子的影响,发现在浓度梯度(10、30、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的中高浓度具有良好抑制效果,能有效减少炎症因子 NO 和 $TNF-\alpha$ 的表达和分泌。综上所述,实验结果表明天麻蜜环菌正己烷提取物具有较好的抗炎效果,可能是由于其能有效抑制炎症因子的分泌,而其背后的机制可能与减弱了 $NF-\kappa B$ 核移位,降低炎症因子转录水平有关^[16]。因此我们将加强组分的进一步纯化,鉴定其活性化合物的结构,并且进行其体内抗炎活性研究,期望对筛选抗炎药物有所贡献。

参考文献

1 Zhao J (赵俊), Dai YC (戴玉成), Qin GF (秦国夫). The new species of *Armillariamellea* in China. *Mycosystema* (菌物学报), 2008, 27: 156-170.

2 Zou R (邹容). The studies of gene genealogy and the pharmaceutical components of the genus *Armillaria* with specific reference to Symbiotic species on *Gastrodiaelata*. Guiyang: Guizhou University (贵州大学), PhD. 2005.

3 Wang R (王锐), Zhang SY (张诗悦), Mu Q (穆青), et al. Research progress in chemical constituents and biological activities of *Armillariamellea*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 11: 1992-1999.

4 Xu BK, Zhang Y. The prevention and treatment of polysaccharide from the rhizomorph of *Armillariamellea* on diabetic cataract in rat. *J Agric Sci Technol*, 2014, 15: 1086-1088.

5 Yu L (虞磊), Shen YS (沈业寿), Wu JM (吴建民), et al. Anti-aging effects of polysaccharides from rhizomorph of *Armillariamellea*. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2006, 28: 994-996.

6 Yin YX (殷银霞), Qiu JQ (邱家权), Wu YH (吴玉泓), et al. The protection mechanism of polysaccharide containing serum on PC12 cell injury induced by hydrogen peroxide. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2014, 25 (1): 74-76.

7 Sun YX, Liang HT, Zhang XT, et al. Structural elucidation and immunological activity of apolysaccharide from the fruiting body of *Armillariamellea*. *Biores Technol*, 2009, 100: 1860-1863.

8 Shen MH (沈明花), Jin MH (金梅花). The protective effect of polysaccharide on acute liver injury in mice. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2014, 25(3): 91-93.

9 Wu J, Zhou J, Lang Y, et al. A polysaccharide from *Armillariamellea* exhibition strong *in vitro* anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms. *Int J Med Mushrooms*, 2012, 51: 663-667.

10 Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis-A matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol*, 2015, 27: 184-193.

11 Cao X, Kong XQ, Zhou Y, et al. Glutathione S-transferase P1 suppresses iNOS protein stability in RAW264.7 macrophage-

- like cells after LPS stimulation. *Free Radical Res*, 2015, 12: 1438-1448.
- 12 Schott JM. Infection, inflammation and Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 2015, 12: 1503-1504.
- 13 Geng Y, Zhu SL, Lu ZM, *et al.* Anti-inflammatory activity of mycelial extracts from medicinal mushrooms. *Int J Med Mushrooms*, 2014, 16: 319-325.
- 14 Mrvová N, Skandik M, Kuniakova M, *et al.* Modulation of BV2 microglia functions by novel quercetinpivaloyl ester. *Neurochem. Res*, 2015, 90: 246-254.
- 15 Liua MH, Lina YS, Sheub SY, *et al.* Anti-inflammatory effects of daidzein on primary astroglial cell culture. *Nutr-Neurosci*, 2009, 12: 123-134.
- 16 Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, *et al.* Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediat Inflamm*, 2007, 6: 1-10.

(上接第 1516 页)

- 9 Fujimoto H, Fujimaki T, Okuyama E, *et al.* Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47: 1426-1432.
- 10 Waser M, Lackner B, Zusrader J, *et al.* An efficient regioselective synthesis of endocrocin and structural related natural anthraquinones starting from emodin. *Tetrahedr Lett*, 2005, 46: 2377-2380.
- 11 Li XF (李雪峰), Jin HZ (金慧子), Yang M (杨明), *et al.* A new methyl orsellinate glycoside from the aerial parts of *Rhododendron primulaeflorum*. *Chin J Nat Medicines* (中国天然药物), 2008, 5: 336-338.
- 12 Irma SR, Blas LH, Rachel M. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1396-1399.
- 13 Carvalho MR, Barbosa LCD, de Queiroz JH, *et al.* Novel lactones from *Aspergillus versicolor*. *Tetrahedr Lett*, 2001, 42: 809-811.
- 14 Chai YJ, Cui CB, Li CW, *et al.* Activation of the dormant secondary metabolite production by introducing gentamicin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Mar Drugs*, 2012, 10: 559-582.
- 15 Kimura Y, Tani K, Kojima A, *et al.* Cyclo-(L-tryptophyl-L-phenylalanyl), a plant growth regulator produced by the fungus *Penicillium* sp. *Phytochemistry*, 1996, 41: 665-669.
- 16 Song XQ, Zhang X, Han QJ, *et al.* Xanthone derivatives from *Aspergillus sydowii*, an endophytic fungus from the liverwort *Scapaniaciliata* S. Lac and their immunosuppressive activities. *Phytochem Lett*, 2013, 6: 318-321.
- 17 Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I. Studies on rhubarb (*Rheum rhizoma*). V. Isolation and characterization of chromone and chromanone derivatives. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32: 3493-3500.