

藏药穹代尔中内生真菌的分离及其次级代谢物的生物活性研究

周格格,杨中锋*,孙景云

兰州理工大学生命科学与工程学院,兰州 730050

摘要:从藏药穹代尔(攀茎钩藤, *Uncaria scandens*)的内生真菌中筛选对单胺氧化酶及乙酰胆碱酯酶具有抑制活性的提取物,并对高活性提取物进行化学成分的鉴定。采用组织切块法分离内生菌,发酵、萃取、甲醇回流提取法得到待测提取物,酶标法测定酶活性,波谱解析法鉴定结构。从穹代尔组织中共分离到 9 株内生真菌,检测发现 3 株内生真菌发酵提取物具有一定乙酰胆碱酯酶抑制活性,其抑制率在 50% 以上。通过分子生物学方法及形态学分析对活性菌株 QDE-6 进行了菌种鉴定,鉴定为黑曲霉属(*Aspergillus* sp.)真菌。从内生真菌 QDE-6 的次级代谢产物中分离鉴定了 5 个化合物,分别是 Aspergiketone(1)、Gliotoxin(2)、Pseurotin A₂(3)、Brevianamide F(4)、Pseurotin A₁(5)。相比其他化合物,化合物 3 抑制率为 51.67%,具有较高的抗单胺氧化酶活性,化合物 4 抑制率为 42.76%,具有较高的抗乙酰胆碱酯酶活性。可作为进一步研究藏药穹代尔中内生真菌及开发药物的基础。

关键词:攀茎钩藤;内生真菌;次级代谢产物;单胺氧化酶抑制剂;乙酰胆碱酯酶抑制剂

中图分类号:R284.1;Q931.6

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.11.013

Isolation of Endophytic Fungi from *Uncaria scandens* and the Biological Activity of Their Secondary Metabolites

ZHOU Ge-ge, YANG Zhong-duo*, SUN Jing-yun

Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

Abstract: To isolate endophytic fungus from *Uncaria scandens* and test monoamine oxidase (MAO) inhibitory and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity of extracts from endophytic fungus. And the chemical constituents of compounds with high inhibitory activity were identified. Endophytic fungus were isolated by issue-culture method. The extracts were obtained by fermentation, extraction, methanol refluxing etc. The MAO inhibitory and the AChE inhibitory activity of extracts were tested by colorimetric method in 96-well microplates. The structures of compounds were identified by various chromatography methods. 9 strains of endophytic fungus were isolated from *Uncaria scandens*. Three extracts showed anti-AChE activity with inhibitory rate more than 50%. The active strain QDE-6 was identified through molecular biological characterization and morphological methods, it is *Aspergillus* sp.. 5 compounds were isolated from endophytic fungi QDE-6 and identified as Aspergiketone(1), Gliotoxin(2), Pseurotin A₂(3), Brevianamide F(4), Pseurotin A₁(5). The inhibitory rate of compound 3 was 51.67%, which showed higher anti-MAO activity than other compounds. The AChE activity with inhibitory rate of compound 4 was 42.76%, it is higher than other compounds, these can be used as basis for further study on endophytic fungus in *Uncaria scandens* and the development of drugs.

Key words: *Uncaria scandens* endophytic fungi; secondary metabolites; monoamine oxidase inhibitors; acetylcholinesterase inhibitors

内生真菌(Endophytic fungi)是指在生活史的某段时期生活于植物组织内部,对宿主没有造成明显病害症状的真菌^[1]。内生菌可以对植物次生代谢

产物进行转化^[2],已从其次级代谢物中分离出多种生物活性物质,包括抗菌、抗肿瘤、抗氧化等生物活性^[3],已经成为一类具有高度开发价值的新型生物资源,可作为筛选单胺氧化酶及乙酰胆碱酯酶抑制剂的新资源。单胺氧化酶抑制剂是治疗和改善抑郁症以及帕金森病的有效药物,乙酰胆碱酯酶抑制剂是治疗阿尔茨海默症的主要药物,但是现有的药物

收稿日期:2017-11-01 接受日期:2018-07-02

基金项目:国家自然科学基金(21762027);甘肃省科技支撑计划(1604FKCA084)

* 通信作者 Tel:86-013919323820; E-mail: yangzhongduo@126.com

大多存在严重的副作用。因而进一步开展寻找药用植物中新结构类型的 MAO 和 AChE 抑制剂的研究,具有重要意义。藏药作为我国丰富的民族药物资源,由于生长环境的独特性,赋予了藏药不可替代的疗效和医用价值,尤其对某些特殊的疑难病证具有特定的疗效^[4]。攀茎钩藤(*Uncaria scandens*)为茜草科钩藤属植物,产于广东、海南、广西、云南四川及西藏,生于山地疏林。现代研究医药发现,钩藤属植物除具有传统的药理作用外,还具有显著的神经保护作用^[5]。本文对藏药穹代尔,基源植物为攀茎钩藤(*Uncaria scandens*)的内生真菌进行分离,并检测其代谢产物对单胺氧化酶、乙酰胆碱酯酶的抑制作用,并对高活性代谢物的化学成分分离鉴定,旨在得到高活性的化合物。

1 实验材料

1.1 药材及材料

穹代尔购自西宁八一药材市场,由兰州理工大学生命科学与工程学院杨林副教授鉴定为攀茎钩藤(*Uncaria scandens*)的枝叶。健康雌性 Wistar 大鼠一只,体重 200 ~ 230 g,兰州大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(甘)2013-0002。

1.2 培养基

分离、纯化培养基 PDA 培养基配方如下:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,自来水 1000 mL。

发酵培养基 PDB 培养基配方如下:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,自来水 1000 mL。

2 实验方法

2.1 待测样品的制备

2.1.1 内生真菌的分离和纯化

取穹代尔干药材剪成小段用无菌水冲洗干净,采用组织切块法将表面消毒好的植物组织处理,进行组织培养。挑取切口处新长出的菌丝于 PDA 培养基上进行反复的分离、纯化并斜面保存。

2.1.2 次级代谢物提取物的制备

对分离得到的内生真菌进行活化,于 PDB 液体培养基(500 mL 的锥形瓶装液量为 250 mL),28 ℃、160 rpm 培养 10 天。菌液用乙酸乙酯(v:v=1:1)进行萃取;用甲醇回流提取干燥粉碎后的菌丝体 2 次,每次 2 小时,减压蒸馏即得菌液提取物和菌丝提取物,将所得样品用 PBS 溶解配制成 1 mg·mL⁻¹ 的溶液,备用^[6]。

2.2 单胺氧化酶活性测定^[7]

单胺氧化酶的制备方法与文献^[6]所述方法一致,采用酶标法测定活性。对于提取物称取 1 mg,50 μL 的无水乙醇溶解,pH7.6 的磷酸缓冲盐稀释,得浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的待测样品,备用。对于单体化合物,配置成 300 μg·mL⁻¹ 待测样品备用。根据下式计算抑制率:抑制率(%)=[(空白组-空白本底)-(样品-样品本底)]/(空白组-空白本底)×100%。

所用样品平行做 3 次,取其平均值,磷酸异丙烟肼为阳性对照。

2.3 乙酰胆碱酯酶活性测定

采用改进的 Ellman 方法^[8]在 96 孔酶标板上测定样品的乙酰胆碱酯酶抑制活性。样品配制方法同上。根据下式计算抑制率:抑制率(%)=[(空白组-完全抑制组)-(样品-样品本底)]/(空白组-完全抑制组)×100%。

所用样品平行做 3 次,取其平均值,石杉碱甲为阳性对照。

2.4 菌株 QDE-6 的分子生物学鉴定

2.4.1 实验菌株

QDE-6 从药用植物攀茎钩藤(*Uncaria scandens*)中分离获得。

2.4.2 菌种的鉴定

通过平板划线法接菌于 PDA 培养基平板上。进行分子鉴定:基于菌种 ITS1-5.8S-ITS2 核糖体 RNA 的 DNA 序列的分析基因区域,GenBank 搜索 DNA 序列相似性。

2.5 菌株 QDE-6 次级代谢产物化学成分研究

2.5.1 菌株 QDE-6 次级代谢产物的提取

活化菌种。配制 PDB 液体培养基 40 L,采用无菌操作将发酵种子接入已冷却至室温的培养基中,28 ℃ 培养 20 天。菌液用乙酸乙酯(体积比 1:1)进行萃取,得提取物 13 g。

2.5.2 菌株 QDE-6 菌液粗提物化学成分的分离纯化

2.5.2.1 粗分:用 HPD-100 型大孔树脂对 13 g 的 QDE-6 菌液次级代谢提取物进行柱层析粗分,以水 10%、30%、50%、70%、90% 和 100% 乙醇梯度洗脱,TLC 检测合并样品得到 6 个组分:QDE-6-A ~ F。

2.5.2.2 组分 QDE-6-B 的分离:将组分 QDE-6-B (3.44 g)经硅胶柱层析分离,用石油醚-二乙(50:1~2:1)进行梯度洗脱,得到 8 个组分(组分 QDE-6-B-1 ~ QDE-6-B-8)。组分 QDE-6-B-5 (20 mg)经

Sephadex LH-20 柱色谱分离,以甲醇:氯仿(体积比 1:1)洗脱,得到化合物 **1**(4 mg,标记为化合物 QDE-6-B-1)。

2.5.2.3 组分 QDE-6-C 的分离:将组分 QDE-6-C (2.76 g)用 MCI 柱层析粗分,以水 10%、30%、50%、70%、80%、90% 和 100% 甲醇梯度洗脱,TLC 检测合并样品得到 6 个组分:QDE-6-C-1~6。组分 QDE-6-C-4 用甲醇重结晶,即得化合物 **2**(30 mg,标记为化合物 QDE-6-C-1)。组分 QDE-6-C-3 (260 mg)通过 HPLC 法进行纯化,以甲醇-水体系洗脱,分得单体化合物 **3**(5 mg;高效液相条件为:40% 甲醇, $v = 2 \text{ mL/min}$, $t_R = 48 \text{ min}$)、化合物 **4**(4 mg, $t_R = 18 \text{ min}$)和化合物 **5**(2 mg, $t_R = 22 \text{ min}$)。

3 结果与分析

3.1 结果

3.1.1 穹代尔中分离的内生真菌及编号

从穹代尔组织中共分离到 9 株内生真菌,记为 QDE-1~9,实验表明药用植物组织中存在丰富的内生真菌资源。

3.1.2 内生真菌提取物对乙酰胆碱酯酶、单胺氧化酶的抑制作用

通过酶标法测定了所有内生真菌提取物对乙酰胆碱酯酶和单胺氧化酶的抑制活性,结果表明 3 株内生真菌发酵提取物具有乙酰胆碱酯酶抑制活,分别为 QDE-1、QDE-6、QDE-7,其抑制率大于 50%;而所有内生菌提取物均未表现出良好的单胺氧化酶的抑制活性。

3.1.3 菌株 QDE-6 分子生物学鉴定

根据菌落特性及形态特征进行分子生物学鉴定。该菌株的 18S rRNA ITS1 区序列与 NCBI 中核苷酸序列 Blast 比对,与黑曲霉属真菌相似度达 98% (GenBank No. KT224826. 1),初步鉴定菌株 QDE-6 为黑曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 真菌。

3.1.4 单体化合物的结构鉴定

通过硅胶柱色谱、高效液相色谱等方法,共从 QDE-6 内生真菌的菌液粗提取物中分离得到了 5 个纯的单体化合物,并通过 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、ESI-MS 等波谱解析技术,参考相关文献,鉴定了其结构。

化合物 1 无色块状结晶(甲醇); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz), δ 1.03 (3H, s), 1.54 (3H, s), 1.75 (3H, s), δ 2.06 (1H, dd, $J = 15.4, 5.4 \text{ Hz}$), 1.60 (1H, dd, $J = 15.4, 5.4 \text{ Hz}$), 1.84 (1H, m), 1.23

(1H, m), 2.67 (1H, d, $J = 12.0 \text{ Hz}$), 1.51 (1H, m), 4.69 (1H, s, brs), 4.74 (1H, s, brs), δ 3.75 (1H, d, $J = 9.4 \text{ Hz}$), 2.56 (1H, brs), 5.18 (1H, d, $J = 9.4 \text{ Hz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz), δ : 210.0, 146.5, 134.9, 118.3, 111.2, 73.6, 73.3, 55.5, 52.4, 39.3, 35.5, 28.8, 26.1, 21.7, 18.5。以上数据与文献^[9]一致,故该化合物鉴定为 Aspergiketone。

化合物 2 白色针状结晶(甲醇); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz), δ 3.21 (3H, s), 4.43 (1H, dd, $J = 12.7, 6.1 \text{ Hz}$), 4.26 (1H, dd, $J = 12.7, 9.5 \text{ Hz}$), 3.55 (1H, dd, $J = 9.5, 6.1 \text{ Hz}$), 4.82 (1H, s), 4.82 (1H, s), 5.81 (1H, s), 5.99 (1H, br d, $J = 5.1 \text{ Hz}$), 5.95 (1H, brd, $J = 10.1, 5.1 \text{ Hz}$), 5.79 (1H, brd, $J = 10.1 \text{ Hz}$), 3.76 (1H, brd, $J = 18 \text{ Hz}$), 2.96 (1H, br d, $J = 18 \text{ Hz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz), δ : 166.0, 75.6, 60.7, 165.3, 69.7, 73.1, 130.1, 123.3, 120.2, 130.8, 36.6, 27.5。以上数据与文献^[10]一致,故该化合物鉴定为 Gliotoxin。

化合物 3 白色粉末; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz), δ 9.99 (1H, s), 4.18 (1H, d, $J = 9.9 \text{ Hz}$), 4.51 (1H, t, $J = 5.5 \text{ Hz}$), 4.57 (1H, ddd, $J = 5.5, 8.4, 11.0 \text{ Hz}$), 5.42 (1H, dd, $J = 8.5, 11.0 \text{ Hz}$), 5.47 (1H, dd, $J = 7.0, 11.0 \text{ Hz}$), δ 2.08 (1H, m), 2.08 (1H, m), 0.93 (3H, dd, $J = 7.3, 7.7 \text{ Hz}$), 1.66 (3H, s), 8.28 (1H, d, $J = 7.3 \text{ Hz}$), 7.55 (1H, dd, $J = 7.7, 8.0 \text{ Hz}$), 7.69 (1H, t, $J = 7.3 \text{ Hz}$), 7.55 (1H, dd, $J = 7.7, 8.0 \text{ Hz}$), 8.28 (1H, d, $J = 7.3 \text{ Hz}$), 3.20 (3H, s), 6.35 (1H, d, $J = 9.9 \text{ Hz}$), 5.87 (1H, d, $J = 5.5 \text{ Hz}$), 5.09 (1H, d, $J = 5.5 \text{ Hz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz), δ : 188.1, 112.3, 201.2, 87.1, 167.3, 94.8, 74.4, 71.9, 68.0, 128.7, 134.1, 20.8, 14.2, 5.7, 195.9, 133.7, 130.3, 128.5, 134.0, 128.4, 130.3, 51.6。以上数据与文献^[11]一致,故该化合物鉴定为 Pseurotin A₂。

化合物 4 黄色粉末; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 7.09 (1H, s), 7.57 (1H, d, $J = 7.8 \text{ Hz}$), 7.00 (1H, dd, $J = 7.8, 1.2 \text{ Hz}$), 7.08 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8 \text{ Hz}$), 7.29 (1H, brd, $J = 7.8 \text{ Hz}$), 3.32 (1H, m), 3.27 (1H, m), 4.41 (1H, dt, $J = 4.8, 1.8 \text{ Hz}$), 3.99 (1H, ddd, $J = 10.8, 6.6, 1.8 \text{ Hz}$), 3.45 (1H, m), 3.26 (1H, m), 1.74 (1H, m), 1.67 (1H, m), 1.96 (1H, m), 0.94 (1H, m); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD), δ : 125.5, 109.4, 128.6, 119.8, 119.9,

122.5, 111.2, 137.9, 29.2, 57.2, 170.6, 60.0, 167.4, 45.9, 22.4, 29.1。以上数据与文献^[12]一致,故该化合物鉴定为 Brevianamide F。

化合物 5 白色粉末; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz), δ 9.94 (1H, s), 4.62 (1H, d, *J* = 6.2 Hz), 4.36 (1H, t, *J* = 5.2 Hz), 4.45 (1H, ddd, *J* = 5.5, 7.7, 10.6 Hz), 5.39 (1H, dd, *J* = 8.1, 11.0 Hz), 5.42 (1H, dd, *J* = 7.0, 11.0 Hz), 1.95 (1H, m), 2.01 (1H, m), 0.86 (3H, dd, *J* = 7.3, 7.7 Hz), 1.66 (3H, s), 8.10 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.52 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.63 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.52 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 8.10 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 3.12 (3H, s), 6.07 (1H, d, *J* = 6.2 Hz), 5.75 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), 4.96 (1H, d, *J* = 5.1 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz), δ: 187.6, 111.3, 200.0, 88.2, 167.7, 97.1, 75.7, 72.8, 68.3, 129.0, 133.8, 20.7, 14.2, 5.7, 194.8, 134.7, 129.7, 128.4, 133.2, 128.4, 129.7, 51.5。以上数据与文献^[11]一致,故该化合物鉴定为 Pseurotin A₁。

3.1.5 化合物的生物活性

分别测定单体化合物抗单胺氧化酶和抗乙酰胆碱酯酶活性,其中化合物 **3** 单胺氧化酶抑制率最高为 51.67%,其他 5 个化合物只有较弱的抗单胺氧化酶抑制活性。化合物 **4** 乙酰胆碱酯酶抑制率为 42.76%,其他 5 个化合物只有较弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

4 讨论

本实验对所消毒材料冲洗后的无菌水进行涂板培养,没有长菌,证明表面消毒较彻底,分离到的为内生真菌而不是表面的附生菌。本研究共分离出 9 株内生真菌,其中 QDE-6-L 菌液萃取物抑酶活性最强,通过多种色谱和现代分离化合物的手段分离纯化化合物,并通过 NMR 数据进行结构鉴定,最终确定出了此中 5 个化合物,分别是 Aspergiketone (**1**)、Gliotoxin (**2**)、Pseurotin A₂ (**3**)、Brevianamide F (**4**)、Pseurotin A₁ (**5**)。

Liu 等^[13]从海岸盐渍中分离得到一株曲霉属内生真菌,并从其次级代谢产物中分离得到了一个新的倍半萜衍生物 Aspergiketone (即化合物 **1**),对该化合物进行生物活性研究,发现 Aspergiketone 具有明显的细胞毒性。而我们对其抗乙酰胆碱酯酶和抗单胺氧化酶活性进行了测定,发现其无活性。Kweon 等^[14]研究发现 Gliotoxin (即化合物 **2**)能够调

节激活人类肝星状细胞的凋亡。Pahl 等^[15]研究发现 Gliotoxin 抑制转录因子 NF-κB。Wichmann 等^[16]研究发现真菌毒素 Gliotoxin 对人体血液中多种细胞具有广泛的效应而不是普遍认为的由白介素 4 发挥生理作用。Ishikawa 等^[17]研究发现 Pseurotin A₁ (即化合物 **5**)对免疫球蛋白 E 具有很强的抑制活性,可推断出 Pseurotin A₁ 和 Pseurotin A₂ (即化合物 **3**)具有相关方面的活性。我们检测了这两个化合物的抗 AChE 和抗 MAO 活性,发现也无活性,而其他方面的生物活性有待进一步研究。Noviendri 等^[18]从假霉样真菌属海洋共生真菌中也分离得到单体化合物 Brevianamide F (即化合物 **4**),但均对其生物活性没有进一步研究,我们对 Brevianamide F 的乙酰胆碱酯酶和单胺氧化酶抑制活性进行了测定,发现无活性,其他方面的生物活性有待进一步研究。

参考文献

- Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves [M]. New York: Springer, 1991:179-197.
- Liu Y (刘颖), Wei XY (魏希颖). The microbial transformation of endophyte on plant secondary metabolites [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:300-303.
- Zhao QH (赵秋红), Yang ZD (杨中铎), Shu ZM (舒宗美), et al. Isolation of endophytic fungi from medicinal plants and study on the biological activity of secondary metabolites [J]. *China Food* (中国食品工业), 2014:70-72.
- Cao MZ (曹明泽), Kong XJ (孔小军), Wang L (王磊), et al. Research saturation of Tibetan medicine [J]. *Progress in Vet Med*, 2015(8):105-109.
- Wei FF (韦芳芳), Zeng CQ (曾常青), Zhao YH (赵宇红). Advance in studies on neuroprotective mechanism of *Uncaria Ramulus Cum Uncis* [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2014, 39:2603-2607.
- Yang ZD (杨中铎), Zhou JY (周静怡). Isolation of endophytic fungi from *pinellia ternata* and study on antibacterial activity of secondary metabolites [C]. Wuhan: The 9th National Symposium on Microbiology Young Scholars (第九届全国微生物学青年学者学术研讨会), 2012.
- Ding HE (丁海娥), Yang ZD (杨中铎), Shu ZM (舒宗美), et al. Isolation of endophytic fungi from medicinal plants and study on the biological activity of secondary metabolites [J]. *Acta Chin Med Pharm* (中医药学报), 2013, 6:16-19.
- Orhan I, Sener B, Choudhary MI, et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish

- medicinal plants [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 91 (1): 57-60.
- 9 Liu D, Huang Y, Li C, Ma L, *et al.* A new sesquiterpenoid derivative from the coastal saline soil fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *Rec Nat Prod*, 2016, 10: 708-713.
 - 10 Kaouadji M, Steiman R, Seiglemurandi F, *et al.* Gliotoxin: uncommon 1H couplings and revised 1H- and 13C-nmr assignments [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53: 717-719.
 - 11 Wang FZ, Li DH, Zhu TJ, *et al.* Pseurotin A1 and A2, two new 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-diones from the holothurian-derived fungus *Aspergillus fumigatus* WFZ-25 [J]. *Cheminform*, 2011, 42(24): 72-76.
 - 12 Asiri IAM, Badr J M, Youssef DTA. Penicillivincine, antimigratory diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Penicillium vinaceum* [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 13: 53-58.
 - 13 Liu D, Huang Y, Li C, Ma L, *et al.* A new sesquiterpenoid derivative from the coastal saline soil fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *Rec Nat Prod*, 2016, 10: 708-713.
 - 14 Kweon YO, Paik YH, Schnabl B, *et al.* Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(1): 38-46.
 - 15 Pahl HL, Krauss B, Schulzeosthoff K, *et al.* The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB [J]. *J Exp Med*, 1996, 183: 1829-1840.
 - 16 Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells [J]. *Environ Toxicol*, 2010, 17: 211-218.
 - 17 Ishikawa M, Ninomiya T, Akabane H, *et al.* Pseurotin A and its analogues as inhibitors of immunoglobulin E production [J]. *Bicorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 1457-1460.
 - 18 Novindri D. 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C, fumitremorgin C, and brevianamide F, antibacterial diketopiperazine alkaloids from the marine-derived fungus *Pseudallescheria sp.* [J]. *Nat Prod Sci*, 2007, 13: 251-254.

(上接第 1927 页)

- 13 Hu YM(胡燕梅), Guo YG(郭云贵), Fang ZM(方申明). Effects of five kinds of natural organic matter on proliferation and differentiation of *Cymbidium hybridum* protocorm-like body [J]. *J Jiangsu Sci-Tech Univ: Nat Sci* (江苏科技大学学报: 自科版), 2016, 30: 384-389.
- 14 Gong ZH(巩振辉), Shen SX(申书兴). Plant tissue culture: second edition (植物组织培养: 第二版) [M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2013: 41.
- 15 Mao TF(毛堂芬), Liu ZY(刘作易), Jin JX(金家兴), *et al.* Studies on the seedling growth of *Dendrobium loddigesii* rolfe *in vitro* [J]. *Seed* (种子), 2005, 24(6): 21-22.
- 16 Sim GE, Chong JG, Loh CS. Induction of *in vitro* flowering in *Dendrobium madame thong-in* (orchidaceae) seedlings is associated with increase in endogenous N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine (iP) and N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenosine (iPA) levels [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 1281-1289.
- 17 Xu L(徐玲), Chen ZH(陈自宏), Yang XN(杨晓娜), *et al.* Effect of different organic appendices on protocorm multiplication and seedlings rooting and growth-promoting of *Dendrobium officinale* [J]. *J Yunnan Agric Univ* (云南农业大学学报), 2016, 2: 250-256.
- 18 Zhu Y(诸燕), Zhang AL(张爱莲), He BW(何伯伟), *et al.* Quantitative variation of total alkaloids contents in *Dendrobium officinale* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 2388-2391.
- 19 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the people's republic of China; Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 265-266.
- 20 Zhu Y(诸燕), Si JP(斯金平), Guo BL(郭宝林), *et al.* Quantitative variation of polysaccharides content in cultivated *Dendrobium candidum* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 427-430.