

新多环大环内酰胺 Clifednamide K 的发现

罗洁^a 颜雅倩^a 王浩鑫^b 李瑶瑶^{*,a}^(a) 山东大学药学院 天然产物化学生物学教育部重点实验室 济南 250012)^(b) 山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东青岛 266237)

摘要 利用组合生物合成策略构建了人工杂合多环特特拉姆酸大环内酰胺(PoTeM)基因簇,并从异源表达重组菌株 SR111-*cbmA-OXI-cfiC* 中分离得到 2 个 PoTeM 类化合物 preikarugamycin (**1**)和 clifednamide K (**2**). 通过核磁共振和高分辨质谱分析确定化合物 **1** 为 ikarugamycin 生物合成中间体,化合物 **2** 为结构新颖的 5/6 双环 PoTeM. 采用滤纸片法测定了化合物 **1** 和 **2** 的抗细菌和抗真菌活性,结果显示二者在 20 μg 载药量下均无抗菌活性. 采用噻唑蓝比色法(MTT)测定了化合物 **1** 和 **2** 的细胞毒活性,结果显示化合物 **1** 对人肝癌细胞 HepG-2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 具有较强细胞毒活性,半抑制浓度(IC₅₀)分别为 3.34 和 2.72 $\mu\text{mol/L}$,化合物 **2** 对测试细胞株无明显细胞毒活性.

关键词 天然产物; 生物活性; 多环大环内酰胺; 异源表达

Discovery of a New Polycyclic Tetramate Macrolactam
Clifednamide KLuo, Jie^a Yan, Yaqian^a Wang, Haoxin^b Li, Yaoyao^{*,a}^(a) Key Laboratory of Chemical Biology, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012)^(b) State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao, Shandong 266237)

Abstract The artificial hybrid polycyclic tetramate macrolactam (PoTeM) gene cluster was constructed through combinatory biosynthesis approach and two PoTeMs, preikarugamycin (**1**) and clifednamide K (**2**), were isolated from the recombinant strain SR111-*cbmA-OXI-cfiC*. The chemical structures of **1** and **2** were determined to be the biosynthetic intermediate of ikarugamycin and a new 5/6 dicyclic PoTeM, respectively, by analysis of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) data and high resolution mass spectrometry (HRMS). The antibacterial activity of compounds **1** and **2** was tested by filter paper disc diffusion assay. The results showed that they were inactive at 20 $\mu\text{g}/\text{disc}$. The cytotoxicity of compounds **1** and **2** was evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric method. Compound **1** showed potent antiproliferative activity against human liver (HepG-2) and breast cancer cell lines (MCF-7) with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of 3.34 and 2.72 $\mu\text{mol/L}$, respectively, while compound **2** showed no cytotoxicity for the tested cell lines.

Keywords natural product; biological activity; polycyclic tetramate macrolactam; heterologous expression

多环大环内酰胺类化合物是来源于海绵和细菌的含氮天然产物,因其具有特特拉姆酸结构单元以及多环体系,又被称作多环特特拉姆酸大环内酰胺(Polycyclic tetramate macrolactam, PoTeM),该类化合物具有抗细菌、抗真菌、抗虫和细胞毒等多种生物活性^[1-2]. PoTeMs 根据其多环体系不同可分为 5/5 双环、5/6 双环、5/5/6 三环和 5/6/5 三环等结构类型^[2]. 值得注意的是, PoTeMs

的外侧五元环有两种成环方式,如 5/5 双环化合物 alteramide B 为 C(8)/C(12)成环^[3], 5/6/5 三环化合物 clifednamides 为 C(9)/C(13)成环(图 1)^[4]. 尽管 PoTeMs 具有复杂多样的化学结构,但是其生物合成基因簇却相对简洁,主要包括负责通用多烯前体合成的杂合聚酮-非核糖体肽合酶(iPKS-NRPS)基因、负责多环体系形成的 2~4 个氧化还原酶基因、负责氧化后修饰的细胞色

* Corresponding author. E-mail: liyaoyao@sdu.edu.cn

Received September 26, 2021; revised December 24, 2021; published online January 10, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773598), the Young Scholars Program of Shandong University (No. 2016WLJH31) and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT_17R68).

国家自然科学基金(No. 81773598)、山东大学青年学者计划(No. 2016WLJH31)和长江学者和创新团队发展计划(No. IRT_17R68)资助项目.

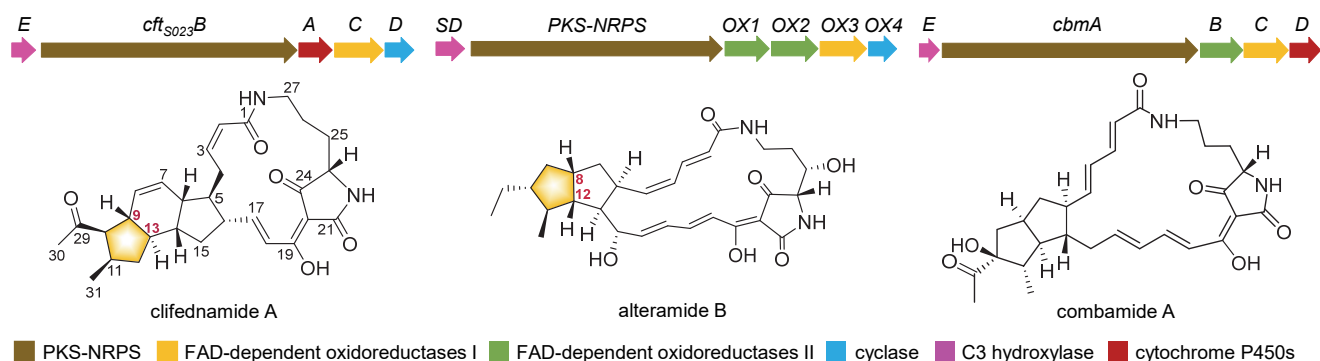


图1 Clifednamide A、alteramide B 和 combamide A 的生物合成基因簇及化学结构

Figure 1 Biosynthetic gene clusters and chemical structures of clifednamide A, alteramide B and combamide A

素 P450 酶基因和 C(25)位羟基化修饰基因^[2,5-7]。基于 PoTeMs 生物合成基因的简洁性和保守性, 研究者们已经通过组合生物合成策略实现了 PoTeMs 的多环体系和氧化后修饰改造^[1,8-11], 但是尚无改造获得具有全新多环体系 PoTeMs 的研究报道。

前期研究表明 clifednamides 生物合成途径中的氧化还原酶 CftC 可能首先催化多烯前体的 C(10)和 C(11)之间形成碳碳键, 该中间体再经 CftC 的催化或是通过自发的 Diels-Alder 反应形成 5/6 双环^[12]; 热稳定抗真菌因子(HSAF)生物合成途径中的氧化还原酶 OX1 可能以 5 元单环化合物为底物合成 5-5 双环化合物 alteramide B(图 1)^[5]。为了探究 OX1 是否能够识别并环化 CftC 的催化产物及可能的中间体形成具有全新多环体系的 PoTeMs, 我们利用组合生物合成策略将 combamides 基因簇中负责多烯前体合成的 *cbmA* 基因(图 1)^[1]、clifednamides 基因簇中的 *cftC* 基因和 HSAF 基因簇中的 *OX1* 基因组装, 并将构建后的人工杂合 PoTeM 基因簇导入链霉菌 S001 和链霉菌 SR111 中进行异源表达(图 2)。遗憾的是, 未能获得具有全新多环体系的 PoTeMs。不过, 本研究通过对 2 株重组菌株的代谢产物分析和差异产物分离, 获得了 2 个 PoTeM 类化合物。其中, 已知化合物 1 为 ikarugamycin 生物合成前体, 化合物 2 为化合物 1 的 C(31)位羟基化后的产物。生物活性评价显示化合物 1 和 2 均无抗菌活性; 化合物 1 对人肝癌细胞 HepG-2 和乳腺癌细胞 MCF-7 具有较强的细胞毒活性, 化合物 2 对测试细胞株无明显活性。

1 结果与讨论

1.1 代谢产物的分离及化合物 1 的结构鉴定

采用 BioBrick 组装策略将负责多烯前体形成的 *cbmA* 基因、*cftC* 基因和 *OX1* 基因组装得到杂合 PoTeM 基因簇(图 2), 并分别接合转移至链霉菌 S001 和 SR111

中获得重组菌株 S001-*cbmA*-*OX1*-*cftC* 和 SR111-*cbmA*-*OX1*-*cftC*。通过对 2 株重组菌株代谢产物的高效液相色谱(HPLC)检测, 发现重组菌株 SR111-*cbmA*-*OX1*-*cftC* 代谢产生差异峰 1 和 2, 而重组菌株 S001-*cbmA*-*OX1*-*cftC* 仅代谢产生差异峰 1(图 2), 化合物 1 和 2 均具有双环 PoTeMs 的特征紫外吸收。为了明确化合物 1 和 2 的化学结构, 对重组菌株 SR111-*cbmA*-*OX1*-*cftC* 进行了 5 L 固体琼脂平板发酵和目标化合物追踪分离。化合物 1 为淡黄色粉末, 高分辨质谱确定化合物 1 的分子式为 $C_{29}H_{36}O_4N_2$ (calcd. for $C_{29}H_{37}O_4N_2$ $[M+H]^+$ 477.2753, found 477.2748), 通过核磁共振波谱数据比对确定其与 2014 年 Zhang 等^[13]报道的 ikarugamycin 生物合成前体结构一致, 并根据 2018 年报道的 hydroikarugamycin 晶体结构及其 C(19)和 C(24)位的碳化学位移明确了化合物 1 的 C(19)位为烯醇式(图 3)^[14]。

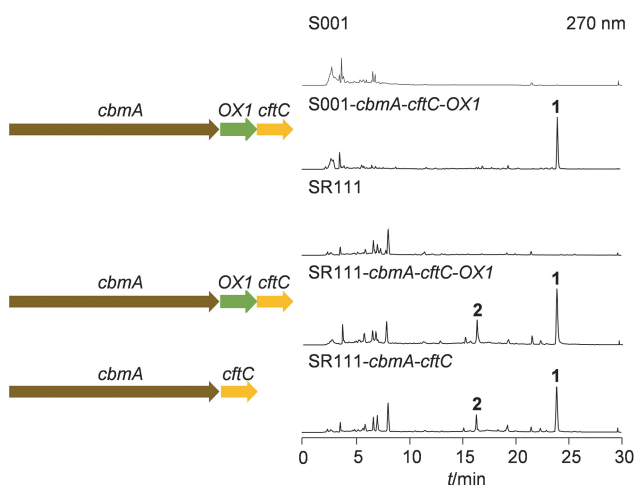


图2 重组菌株 S001-*cbmA*-*OX1*-*cftC*、SR111-*cbmA*-*OX1*-*cftC* 和 SR111-*cbmA*-*cftC* 代谢产物的高效液相色谱图

Figure 2 HPLC profiles of metabolites of the recombinant strains S001-*cbmA*-*OX1*-*cftC*, SR111-*cbmA*-*OX1*-*cftC* and SR111-*cbmA*-*cftC*

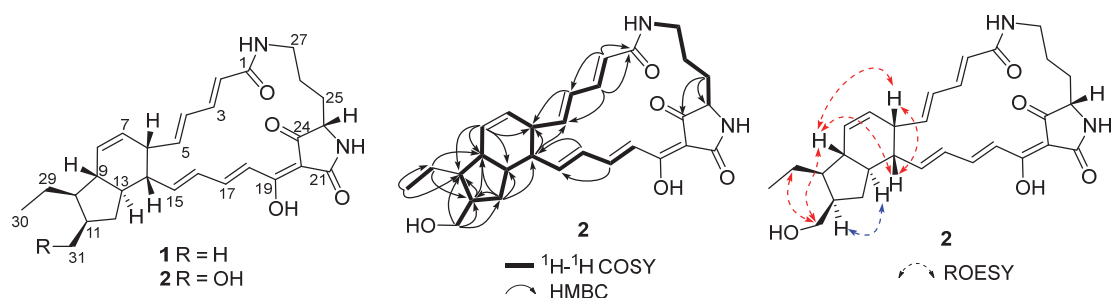


图3 化合物 **1** 和 **2** 的化学结构以及化合物 **2** 的关键 ^1H - ^1H COSY、HMBC 和 ROESY 相关信号
Figure 3 Chemical structures of **1** and **2**, and the key ^1H - ^1H COSY, HMBC and ROESY correlations of **2**

1.2 新化合物 clifednamide K (**2**) 的结构鉴定

化合物 **2** 为淡黄色粉末。高分辨质谱确定其分子式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{N}_2$ (calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 493.2702, found 493.2696), 其相对分子质量比化合物 **1** 大 16, 推测化合物 **2** 可能为化合物 **1** 的氧化修饰产物。1D 和 2D NMR 数据显示化合物 **2** 与 **1** 结构十分相似, 均具有 5/6 双环体系(图3)。不同之处在于化合物 **2** 的 C(31) 位为羟甲基(δ_{H} 4.01/3.76, δ_{C} 63.5), 并通过 Me(30)与 C(10)、H(31)与 C(10)、C(11)和 C(12)的 HMBC 相关信号确证。此外, ^1H - ^1H COSY 数据显示 H(2)/H(3)/H(4)/H(5)/H(6)/H(7)/H(8)、H(6)/H(14)、H(9)/H(10)/H(11)/H(12)/H(13)/H(14)/H(15)/H(16)/H(17)/H(18)、H(9)/H(13)、H(11)/H(31)、H(23)/H(25)/H(26)/H(27)/H(28)和 H(29)/H(31)相关; HMBC 数据显示 H(2)与 C(1)/C(4)、H(3)与 C(1)/C(5)、H(4)与 C(6)、H(8)与 C(6)/C(9)/C(10)/C(13)、

H(10)与 C(12)、H(11)与 C(9)/C(10)/C(31)、H(12)与 C(9)/C(11)/C(13)/C(14)/C(31)、H(14)与 C(5)/C(6)、H(16)与 C(14)、H(17)与 C(15)、H(25)与 C(23)/C(24)、H(29)与 C(9)/C(10)/C(11)/C(30)、H(30)与 C(10)/C(29)、H(31)与 C(10)/C(11)/C(12)相关, 进一步明确了化合物 **2** 的平面结构。 ^1H NMR 数据显示化合物 **2** 中 C(7)=C(8)双键的偶合常数为 9.6 Hz, C(2)=C(3)、C(4)=C(5)和 C(17)=C(18)的偶合常数为 15.0 Hz, C(15)=C(16)双键的偶合常数为 16.0 Hz, 表明化合物 **2** 中的双键构型分别为 2*E*, 4*E*, 7*Z*, 15*E* 和 17*E*(表 1)。ROESY 数据显示 H(6)/H(9)/H(14)和 H(9)/H(31)/H(29)相关, 表明它们在双环同侧; 同时 H(11)与 H(13)的相关信号显示它们在双环的另一侧。基于化合物 **2** 与化合物 **1** 具有一致的相对构型, 且化合物 **2** 推测为化合物 **1** 经宿主菌羟基化酶修饰产生, 最终确定化合物 **2** 的绝对构型为 6*S*, 9*R*, 10*S*, 11*R*, 13*S*,

表 1 化合物 **2** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据(600/150 MHz)
Table 1 ^1H NMR and ^{13}C NMR data for compound **2** (600/150 MHz)

Position	δ (J/Hz)		Position	δ (J/Hz)	
	^1H NMR	^{13}C NMR		^1H NMR	^{13}C NMR
1		166.6 (C)	18	7.97 (d, 15.0)	—
2	6.53 (d, 15.0)	126.3 (CH)	19		—
3	7.64 (dd, 15.0, 10.2)	138.9 (CH)	20		102.6 (C)
4	6.30 (dd, 15.0, 10.2)	132.0 (CH)	21		—
5	5.71 (dd, 15.0, 10.2)	141.0 (CH)	22		
6	3.33 (br s)	46.0 (CH)	23	4.09~4.06 (m)	61.4 (CH)
7	5.58 (dt, 9.6, 3.6)	129.1 (CH)	24		197.3 (C)
8	6.00 (d, 9.6)	130.7 (CH)	25	2.22~2.13 (m)	28.0 (CH ₂)
9	1.87~1.82 (m)	49.4 (CH)		2.07~1.99 (m)	
10	1.58~1.51 (m)	47.1 (CH)	26	1.63~1.58 (m)	23.5 (CH ₂)
11	2.56~2.51 (m)	41.4 (CH)		1.47~1.42 (m)	
12	2.26~2.17 (m)	33.1 (CH ₂)	27	4.14~4.09 (m)	39.0 (CH ₂)
	1.42~1.37 (m)			2.86 (t, 12.0)	
13	1.54~1.49 (m)	43.2 (CH)	28	8.47 (d, 8.4)	
14	2.64~2.58 (m)	45.5 (CH)	29	1.70~1.60 (m)	21.6 (CH ₂)
15	6.04 (dd, 16.0, 5.1)	142.5 (CH)	30	1.04 (t, 7.2)	14.0 (CH ₃)
16	6.28 (dd, 16.0, 9.5)	133.8 (CH)	31	4.01 (dd, 10.2, 5.4)	63.5 (CH ₂)
17	7.53 (dd, 15.0, 9.5)	141.8 (CH)		3.76 (dd, 10.2, 7.8)	

“—” Undetected carbon signals due to the poor solubility of compound **2**.

14R,23S(图 3).

1.3 化合物 1 和 2 的生物活性

采用滤纸片法测定了化合物 1 和 2 对大肠杆菌 DH5 α 、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CMCC63501、白色念珠菌(*Candida albican*) SC 5314 和梨树腐烂病原菌(*Valsa ambiens*)的抗菌活性,结果显示化合物 1 和 2 在 20 μg 载样量下均无明显抗菌活性. 采用噻唑蓝(MTT)比色法测定了化合物 1 和 2 对人肝癌细胞 HepG-2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞毒活性,结果显示化合物 1 对测试细胞株具有较强的细胞毒性,半抑制浓度(IC₅₀)分别为 3.34 和 2.72 $\mu\text{mol/L}$,而化合物 2 无明显细胞毒性(表 2).

表 2 化合物 1 和 2 的细胞毒活性[IC₅₀/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)]
Table 2 Cytotoxicity [IC₅₀/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)] of compounds 1 and 2

Compd.	HepG-2	MCF-7
1	3.34 $\pm$ 0.05	2.73 $\pm$ 0.07
2	> 20	> 20
Doxorubicin	0.93 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.09

2 结论

利用组合生物合成策略构建了人工杂合 PoTeM 基因簇,并将其接合转移至 2 个异源表达宿主菌,获得重组菌株 S001-*cbmA-OX1-cftC* 和 SR111-*cbmA-OX1-cftC*. 通过对重组菌株 SR111-*cbmA-OX1-cftC* 的扩大发酵和异源表达产物的定向分离,发现了 1 个已知化合物 1 和 1 个新 PoTeM 类化合物 clifednamide K (2). 由于化合物 1 和 2 均为 5/6 双环 PoTeMs,推测其仅由聚酮-非核糖体肽合酶 CbmA 和氧化还原酶 CftC 催化合成,氧化还原酶 OX1 未发挥功能. 为了证实上述推论,构建了仅含有 *cbmA* 和 *cftC* 基因的重组菌株 SR111-*cbmA-cftC*. 正如我们预期,该菌株仍能代谢产生化合物 1 和 2. OX1 在重组菌株中未发挥功能,可能是由于其既无法识别 CbmA 合成的多烯前体,也无法作用于 CftC 催化产生的 5/6 双环产物及可能的中间体. 由于人工杂合 PoTeM 基因簇中不含羟基化酶基因,推测化合物 2 的 C(31)位羟基由链霉菌 SR111 自身的羟基化酶催化形成. 抗菌和细胞毒性活性评价显示化合物 1 和 2 在 20 μg 载样量下无抗菌活性,化合物 1 对人肝癌细胞 HepG-2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 有较强细胞毒活性,化合物 2 对上述细胞株无明显活性.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker 公司的 AVANCE NEO 600MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司的 BioESI-Q-TOF 高分辨质谱仪,

Thermo 公司 NICOLET iN10 显微红外光谱仪, Thermo Scientific 公司的 DIONEX UltiMate 3000 高效液相色谱系统, Buchi 公司的 R-100 旋转蒸发仪. 各种溶剂为分析纯或色谱纯.

3.2 实验方法

3.2.1 重组菌株 S001-*cbmA-OX1-cftC*、SR111-*cbmA-OX1-cftC* 和 SR111-*cbmA-cftC* 的构建

链霉菌 S001 是本实验室从青岛崂山土样分离获得的一株链霉菌,具有代谢产物背景干净和接合转移效率较高的特点^[15]. 链霉菌 SR111 是本实验室从厦门集美潮间带分离的链霉菌 LZ35 的遗传改造菌株,即连续敲除了 7 个聚酮基因簇和 1 个非核糖体肽基因簇^[16]. 本研究采用上述两株链霉菌作为异源表达宿主菌.

以产酶溶杆菌(*Lysobacter enzymogenes*) C3 和北里孢菌(*Kitasatospora* sp.) S023 的基因组 DNA 为模板,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增分别获得引入 *NdeI* 和 *SpeI* 酶切位点的 *OX1* 和 *cftC* 基因片段(引物分别为 OX1-F/OX1-R 和 cftC-F/cftC-R). 载体 pUC-*kasOp** 采用 *NdeI* 和 *SpeI* 双酶切后,分别与 *NdeI* 和 *SpeI* 双酶切的 *OX1* 和 *cftC* 片段连接得到质粒 pUC-*kasOp*-OX1* 和 pUC-*kasOp*-cftC*. 质粒 pUC-*kasOp*-OX1* 经 *MfeI* 和 *SpeI* 双酶切获得 *kasOp*-OX1*; 质粒 pUC-*kasOp*-cftC* 经 *XbaI* 和 *PstI* 双酶切获得 *kasOp*-cftC*, 二者共同与 *MfeI* 和 *PstI* 双酶切后的 pSET5035 载体片段连接获得质粒 pSET5035-*OX1-cftC*. 质粒 pSET5035-*OX1-cftC* 经 *XbaI* 和 *PstI* 双酶切获得 *kasOp*-OX1-kasOp*-cftC*; 质粒 pUC-EE-*cbmA* 经 *MfeI* 和 *SpeI* 双酶切获得 *ermEp*-cbmA*^[8], 二者共同与 *MfeI* 和 *PstI* 双酶切后的 pSET5035 载体片段连接获得异源表达质粒 pSET5035-*cbmA-OX1-cftC*. 同时,将 *MfeI* 和 *PstI* 双酶切后的 pSET5035 载体片段与 *ermEp*-cbmA* 和 *kasOp*-cftC* 连接获得异源表达质粒 pSET5035-*cbmA-cftC*. 通过接合转移将质粒 pSET5035-*cbmA-OX1-cftC* 分别导入链霉菌 S001 和链霉菌 SR111 获得重组菌株 S001-*cbmA-OX1-cftC* 和 SR111-*cbmA-OX1-cftC*; 将 pSET5035-*cbmA-cftC* 导入链霉菌 SR111 中获得重组菌株 SR111-*cbmA-cftC*. 上述重组菌株经 PCR 筛选验证(引物为 InS10-verF 和 InS10-verR).

3.2.2 菌株发酵提取和产物分离

采用 M4 固体琼脂培养基(可溶性淀粉 25 g, 大豆粉 15 g, 酵母提取物 2.0 g, 琼脂 15 g, pH 7.2)对重组菌株 SR111-*cbmA-OX1-cftC* 进行了 5 L 扩大发酵(30 $^{\circ}\text{C}$, 13 天). 菌体连同培养基切成小块后用乙酸乙酯/甲醇/冰乙酸(*V:V:V*=80:15:5)浸泡提取三次,合并浸提液减压浓缩至干得粗提物. 随后,粗提物采用等体积乙酸乙酯和水萃取 3 次,乙酸乙酯相减压浓缩后再经等比例石

油醚和甲醇(体积分数为 95%)萃取, 甲醇相减压浓缩至干。甲醇相产物通过丙酮溶解析出沉淀的方式获得含有目标化合物的黄色沉淀, 沉淀经二甲亚砜(DMSO)溶解后通过半制备高效液相色谱(YMC-Pack Pro C18, 5 μm , 10 mm $\times$ 250 mm, 4 mL/min, UV 270 nm, 流动相梯度: 0~11 min 为体积分数为 49%的乙腈, 12~19 min 为纯乙腈)制备获得化合物 **1** (t_{R} =18.8 min, 10.0 mg)和 **2** (t_{R} =9.9 min, 5.4 mg)。

Preikarugamycin (**1**): UV-Vis (CH₃CN) λ_{max} : 269, 364 nm; HRMS calcd for C₂₉H₃₇O₄N₂ [M+H]⁺ 477.2753, found 477.2748.

Clifednamide K (**2**): m.p. 208 °C; [α]_D²⁰ +192.3 [c 0.05, *V*(CH₂Cl₂): *V*(CH₃OH)=9:1]; UV-Vis (CH₃CN) λ_{max} : 270, 364 nm; IR (film) ν : 3329, 2964, 2856, 1654, 1622, 1463, 1260, 1026, 866, 796 cm⁻¹; HRMS calcd for C₂₉H₃₇O₅N₂ [M+H]⁺ 493.2702, found 493.2696.

3.2.3 抗菌活性测试

将大肠杆菌 DH5 α 、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CMCC63501 和白色念珠菌(*Candida albican*) SC 5314 分别接种于 LB 液体培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 7.2), 置于摇床(37 °C, 200 r/min)培养至 OD₆₀₀ 约为 1。活化后的大肠杆菌和枯草杆菌按体积比 1%加入 LB 琼脂培养基混匀后制成细菌指示菌平板; 白色念珠菌按体积比 1%加入 YPD 琼脂培养基(酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.2, 115 °C 高压灭菌 15 min)混匀后制成酵母指示菌平板。取活化后的梨树腐烂病病原菌的菌块(0.5 cm $\times$ 0.5 cm)置于 PDA 固体琼脂平板中央, 30 °C 倒置培养 2~3 d 制成丝状真菌指示菌平板。随后, 分别将含有化合物 **1** 和 **2** 的滤纸片(20 μg , 0.5 cm $\times$ 0.5 cm)贴于指示菌平板表面。卡那霉素(5 μg)和制霉菌素(5 μg)分别为抗细菌和抗真菌活性测定的阳性对照, DMSO 为阴性对照。细菌和酵母菌 37 °C 培养过夜, 丝状真菌 30 °C 培养 1~2 d, 观察抑菌圈大小。

3.2.4 细胞毒活性测定

将人肝癌细胞 HepG-2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 分别接种于 96 孔板(细胞密度为 3 $\times$ 10³~4 $\times$ 10³ 个/孔), 将

96 孔板置于细胞培养箱(CO₂ 体积分数为 5%, 37 °C)中待细胞贴壁后, 分别加入指定浓度的化合物 **1** 和 **2**、阴性对照(等体积 DMSO)和阳性对照(多柔比星), 同一浓度设置 3 个平行。细胞加药培养 48 h 后, 每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL)继续培养 4 h, 随后吸去上清液并加入 150 μL DMSO, 利用酶标仪检测各孔 OD 值(570 nm)。实验重复三次, 使用软件 Prism 9.0 计算 IC₅₀ 值。

辅助材料(Supporting Information) 实验所用菌株、质粒和引物信息和重组质粒的构建示意图, 以及化合物 **1** 和 **2** 的 UV、HRMS、核磁谱图和红外谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Liu, Y.; Wang, H.; Song, R.; Chen, J.; Li, T.; Li, Y.; Du, L.; Shen, Y. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 3504.
- [2] Zhang, G.; Zhang, W.; Saha, S.; Zhang, C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 1727.
- [3] Ding, Y.; Li, Y.; Li, Z.; Zhang, J.; Lu, C.; Wang, H.; Shen, Y.; Du, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1860*, 2097.
- [4] Cao, S.; Blodgett, J. A.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4652.
- [5] Li, Y.; Wang, H.; Liu, Y.; Jiao, Y.; Li, S.; Shen, Y.; Du, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 6221.
- [6] Saha, S.; Zhang, W.; Zhang, G.; Zhu, Y.; Chen, Y.; Liu, W.; Yuan, C.; Zhang, Q.; Zhang, H.; Zhang, L.; Zhang, W.; Zhang, C. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1607.
- [7] Yu, H.; Jiang, S.; Bu, X.; Wang, J.; Weng, J.; Yang, X.; He, K.; Zhang, Z.; Ao, P.; Xu, J.; Xu, M. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40689.
- [8] Yan, Y.; Wang, H.; Song, Y.; Zhu, D.; Shen, Y.; Li, Y. *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10*, 2434.
- [9] Jin, H.; Zhang, W.; Zhang, G.; Zhang, L.; Liu, W.; Zhang, C. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 1731.
- [10] Greunke, C.; Antosch, J.; Gulder, T. A. M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5334.
- [11] Li, Y.; Huffman, J.; Li, Y.; Du, L.; Shen, Y. *MedChemComm* **2012**, *3*, 982.
- [12] Jiao, Y.; Liu, Y.; Wang, H.; Zhu, D.; Shen, Y.; Li, Y. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 2803.
- [13] Zhang, G.; Zhang, W.; Zhang, Q.; Shi, T.; Ma, L.; Zhu, Y.; Li, S.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Shi, R.; Zhang, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 4840.
- [14] Zhang, W.; Zhang, G.; Zhang, L.; Liu, W.; Jiang, X.; Jin, H.; Liu, Z.; Zhang, H.; Zhou, A.; Zhang, C. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 6839.
- [15] Jiao, Y.; Yan, Y.; Liu, Y.; Zhu, D.; Shen, Y.; Li, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2020**, *40*, 1779 (in Chinese). (焦玉杰, 颜雅倩, 刘焱, 朱德裕, 沈月毛, 李瑶瑶, 有机化学, **2020**, *40*, 1779.)
- [16] Shi, P.; Li, Y.; Zhu, J.; Shen, Y.; Wang, H. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 1924.

(Zhao, C.)