

新多环特特拉姆酸大环内酰胺 3-Hydroxycombamide I 的发现

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 从链霉菌 S001 的重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 中分离获得 1 个新多环特特拉姆酸大环内酰胺(PoTeMs)类化合物 3-hydroxycombamide I (**2**), 通过一维、二维核磁共振波谱(NMR)和高分辨质谱(HRMS)数据分析确定其化学结构。化合物 **2** 的 C-3 位羟基推测为宿主链霉菌 S001 所含羟基化酶催化形成。分别采用滤纸片法和噻唑蓝(MTT)比色法测定了化合物 **2** 的抗菌和细胞毒活性, 结果显示化合物 **2** 无明显活性。此外, 化合物 **2** 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时对鼠伤寒沙门菌III型分泌系统(T3SS)无抑制活性。结果显示 PoTeMs 的 C-3 位羟基化修饰可能发生在多环体系氧化修饰之后。

关键词 天然产物; 生物转化; 链霉菌; 多环特特拉姆酸大环内酰胺

Discovery of a New Polycyclic Tetramate Macrolactam
3-Hydroxycombamide IYan, 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 3-Hydroxycombamide I (**2**), a new polycyclic tetramate macrolactam (PoTeM) bearing a 5/5/6 cyclization pattern was isolated from the recombinant strain S001-*cbm-OX4-ikaD*, which is derived from *Streptomyces* sp. S001 by integration of the modified combamides biosynthetic gene cluster. The chemical structure of **2** was determined by analysis of 1D and 2D-NMR and HRMS data. The hydroxylation of compound **2** at C-3 was deduced to be catalyzed by a hydroxylase of *Streptomyces* sp. S001. The antibacterial and cytotoxic activity of compound **2** was evaluated by filter paper disc diffusion and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, respectively. The effect of compound **2** on inhibition of the T3SS (type III secretion system) of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium was also investigated. However, compound **2** was inactivity in all assays. The results indicated that the hydroxylation at C-3 may occurs after the oxidative modifications of the polycyclic system in the biosynthesis of PoTeMs.

Keywords natural products; biotransformations; *Streptomyces*; polycyclic tetramate macrolactams

多环特特拉姆酸大环内酰胺(polycyclic tetramate macrolactam, PoTeM)是具有特特拉姆酸(tetramic acid)结构单元及多环体系的大环内酰胺类化合物, 具有抗菌、抗真菌、抗原虫、抗溃疡、抗肿瘤和抑制鼠伤寒沙门氏菌III型分泌系统等多种生物活性^[1-3]。PoTeMs 生物合成基因簇在系统发育不同的细菌中广泛存在^[4], 通常包含负责多烯骨架合成的聚酮/非核糖体肽合酶(PKS/NRPS)^[5], 负责 5/6/5、5/5/6 和 5/5 等多环体系合成的多

个氧化还原酶^[6-8], 负责多环体系区域氧化后修饰的细胞色素 P450 酶(CYPs)^[3,9-10]和专一性负责鸟氨酸 β 位羟基化修饰的羟基化酶^[11-12]。PoTeMs 基因簇的简洁性和保守性, 使基于组合生物合成策略的结构改造研究得以有效开展^[3,12-14]。

前期, 从链霉菌 S10 中定向发现了含有氧化后修饰的新 5/5 双环 PoTeMs 类化合物 combamides, 并推测其生物合成基因簇(*cbm*)中的细胞色素 P450 酶 CbmD 可能

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

Received October 2, 2021; revised January 14, 2022; published online January 20, 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。

参与 C-16 和 C-30 位的氧化后修饰^[3]. 近期, 基于负责 PoTeMs 氧化后修饰的 CYPs 具有不同的区域选择性和反应类型多样性, 利用组合生物合成策略开展了 combamides 的氧化修饰改造研究. 选择 3 个与 CbmD 催化功能可能不同的 P450 酶基因 *ikaD*、*sgr810* 和 *ftdF*, 以及 2 个在进化分支上与 *cbmD* 相距较远的 P450 酶基因 *sshg_05717* 和 *mg1D*, 替换 *cbm* 基因簇中的 P450 酶基因 *cbmD*, 并引入产酶溶杆菌 C3 中负责 HSAF 5/5/6 三环体系中六元环形成的醇脱氢酶基因 *OX4*, 构建了一系列杂合 *cbm* 基因簇. 通过对上述杂合 *cbm* 基因簇异源表达产物的分离鉴定, 获得了多个氧化后修饰改变的 combamides 新结构(图 1)^[13]. 尽管重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 和 SR111-*cbm-OX4-ikaD* 含有同一杂合 *cbm* 基因簇, 但是两者的代谢谱图比对显示, 重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 代谢产生了 1 个额外差异产物, 由于产量过低此前未能分离鉴定. 本研究通过对重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 进行 20 L 琼脂平板扩大发酵和产物提取分离, 获得了 1 个新 PoTeM 类化合物 3-hydroxycombamide I (2). 活性评价显示化合物 2 无明显抗菌、细胞毒和抗鼠伤寒沙门菌 III 型分泌系统活性.

1 结果与讨论

前期, 构建了可能编码氧化修饰改变的新 5/5/6 三环 combamides 杂合基因簇 *cbm-OX4-ikaD*, 并将其分别导入链霉菌 S001 和 SR111 中, 获得重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 和 SR111-*cbm-OX4-ikaD*(辅助材料, 图 S1). 通

过对重组菌株差异代谢产物的 HPLC 分析, 发现除已分离鉴定的差异产物 combamide I (1) 外, 重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 代谢产生了额外差异产物 2(图 2A), 且化合物 2 具有特征的三环 PoTeM 紫外吸收(图 2B). LC-MS 分析显示化合物 2 的相对分子量比化合物 1 大 16 个单位, 提示化合物 2 可能为化合物 1 的氧化修饰产物(图 2B). 为了明确化合物 2 的化学结构, 我们采用 YMG 琼脂培养基对重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 进行了 20 L 扩大发酵培养, 通过葡聚糖凝胶、中压反相和半制备高压液相色谱柱层析分离, 获得了化合物 2(大约 0.3 mg/L).

化合物 2 为白色粉末状固体; 熔点 90 °C; $[\alpha]_D^{25} + 82.8$ (c 0.10, CH₃OH-CH₂Cl₂, $V:V=1:1$); UV-vis (CH₃CN) $\lambda_{\max}$: 220, 324 nm; IR ν : 3348, 2924, 1657, 1597, 1458, 1260, 1045, 801 cm⁻¹; 高分辨质谱(HR-ESIMS)测得化合物 2 的分子式为 C₂₉H₄₀O₇N₂ (m/z 529.2921 [M+H]⁺, calcd for C₂₉H₄₁O₇N₂ 529.2914). 1D NMR 和 2D NMR 数据分析表明化合物 2 与 combamide I 的化学结构十分相似(表 1 和辅助材料中表 S1)^[13], 不同之处仅在于化合物 2 的 C-3 位含有羟基取代. HMBC 数据显示 H-3 与 C-1、H-5 与 C-7、H-8 与 C-7/C-10、H-9 与 C-7/C-11、H-10 与 C-22、H-13 和 C-14/C-19、H-15 与 C-13/C-14/C-17/C-18、H-17 与 C-16/C-19/C-30、H-18 与 C-14、H-20 与 C-12/C-19、H-21 与 C-11/C-19、H-24 与 C-23、H-30 与 C-15/C-16、H-31 与 C-16/C-30 相关. ¹H-¹H COSY 数据显示 H-3/H-4/H-5/H-6、H-8/H-9/H-10/H-11/H-12/H-19/

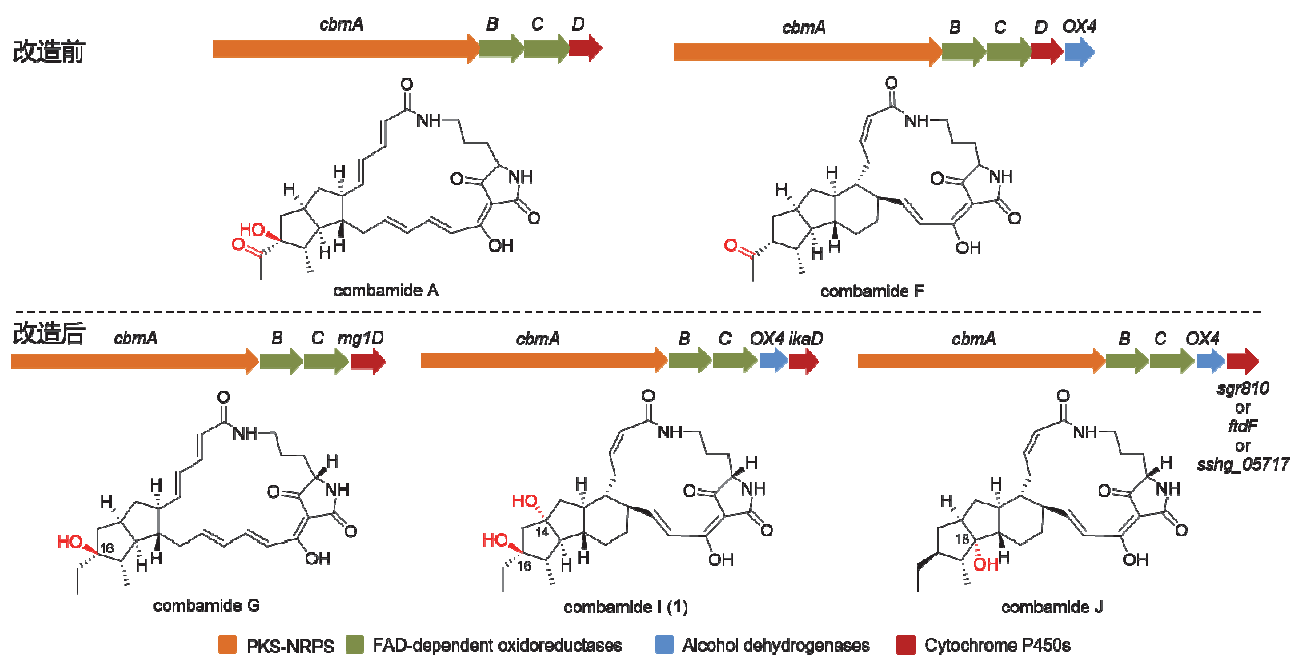


图 1 Combamides 氧化后修饰的组合生物合成改造

Figure 1 Combinatorial biosynthesis of oxidative modified combamides

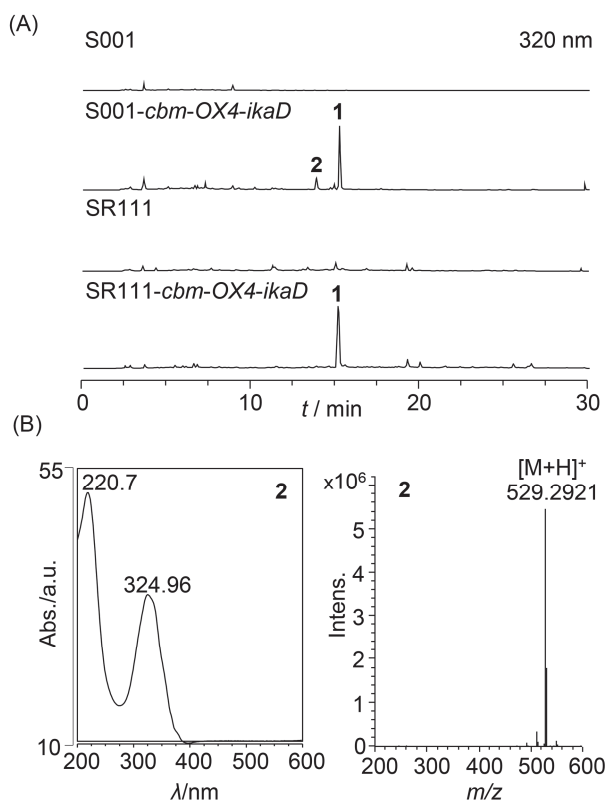


图2 (A)重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 和 SR111-*cbm-OX4-ikaD* 的代谢产物的高效液相色谱图; (B)化合物 2 的紫外吸收光谱图和高分辨质谱图

Figure 2 (A) HPLC profiles of the metabolites from the recombinant strains S001-*cbm-OX4-ikaD* and SR111-*cbm-OX4-ikaD*, respectively; (B) UV and HRMS spectra of 2

H-18/H-17/H-29、H-12/H-13、H-11/H-22/H-23/H-24、H-20/H-21/H-22、H-30/H-31 相关, 进一步确定了化合物 2 的平面结构(图 3)。 ^1H NMR 数据显示化合物 2 中双键 H8/H9 的耦合常数为 11.1 Hz, 表明该双键为 *Z* 构型(表 1)。基于化合物 1 为化合物 2 的生物合成前体, 确定了化合物 2 中 C-23/C-24 双键的构型与化合物 1 一致, 为 *E* 构型^[13]。NOESY 信号显示 H-11/H-19/Ha-13 和 H-17/H-19 相关, 表明它们在三环体系的同一侧; H-12/Me-29/H-18 和 Hb-13/Me-31 相关, 表明它们在三环体系的另一侧。根据前期报道的 C-2-H-2-C-3-H-3 二面角与 H2/H3

耦合常数的关系^[1,15], H-2 为宽单峰, 表明其与 H-3 同侧, 且 H-2 为 *L*-鸟氨酸 α 碳相连的氢, 确定了 C-3 位的绝对构型为 *S*。最后, 基于化合物 2 的绝对构型应与化合物 1 保持一致, 明确了其绝对构型为 2*S*, 3*S*, 11*R*, 12*S*, 14*S*, 16*S*, 17*S*, 18*S*, 19*S*, 22*R*, 命名为 3-hydroxycombamide I。

采用滤纸片法测定了化合物 2 对革兰氏阳性细菌(金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 和耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* MC² 155)、革兰氏阴性细菌(鼠伤寒沙门菌 *Salmonella typhimurium* UK-1 χ 8956 和大肠杆菌 *E. coli* DH5 α)、酵母菌(白色念珠菌 *Candida albicans* SC5314)和丝状真菌(梨干腐烂菌 *Valsa ambiens*)的抑菌活性, 结果显示化合物 2 在 20 μg 时无抑菌活性(辅助材料, 图 S2A)。此外, 测定了化合物 2 对鼠伤寒沙门菌 III 型分泌系统毒性蛋白分泌的抑制活性, 结果显示化合物 2 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时无抑制活性(图 S2B)。采用噻唑蓝(MTT)法测定了化合物 2 对子宫颈癌 HeLa 细胞、人结肠癌 HCT116 和 SW480 细胞的抑制活性, 结果显示化合物 2 无明显细胞毒性(表 2)。

基于 PoTeM 类化合物生物合成的保守性, 推测了 3-hydroxycombamide I (2) 可能的生物合成途径。即聚酮/非核糖体肽合酶 CbmA 催化多烯前体合成, 氧化还原酶 CbmC 催化外侧五元环形成, 氧化还原酶 CbmB 催化内侧五元环形成, 环化酶 OX4 催化六元环形成, 细胞色素 P450 酶 IkaD 催化 C-14 和 C-16 位的羟基化。由于重组菌株 SR111-*cbm-OX4-ikaD* 仅产生化合物 1, 因此我们推测化合物 2 的 C-3 位羟基可能由宿主菌 S001 自身的羟基化酶催化形成^[16]。本研究结果提示 PoTeMs 的 C-3 位羟基化修饰可能发生在多环体系氧化修饰之后。

2 结论

从重组菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 的 YMG 琼脂平板发酵产物中分离鉴定了 1 个新 PoTeM 类化合物 3-hydroxycombamide I (2), 并提出了可能的生物合成途径。其中, 宿主菌 S001 中所含的羟基化酶推测催化异源表达产物 combamide I (1) 的 C-3 位羟基化修饰形成 3-hydroxycombamide I (2)。此外, 测定了化合物 2 的抗

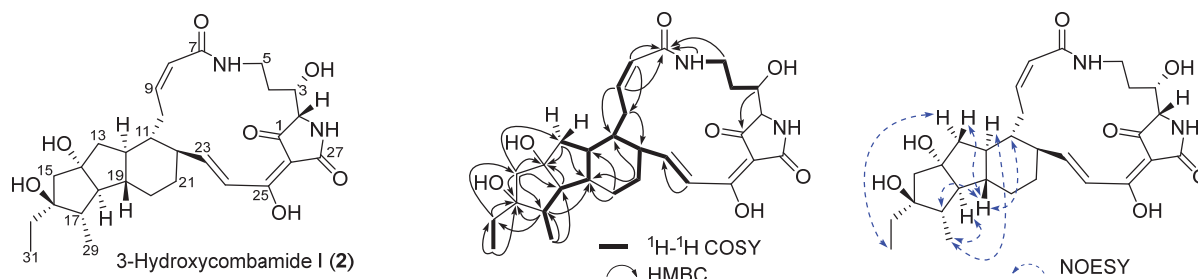


图3 化合物 2 的化学结构和关键 ^1H - ^1H COSY、HMBC 和 NOESY 相关信号
Figure 3 Chemical structure and key ^1H - ^1H COSY, HMBC and NOESY correlations of 2

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

Position	^1H NMR	^{13}C NMR	Position	^1H NMR	^{13}C NMR
1		193.0s	17	1.41~1.36 (m)	48.9d
2	3.69 (br s)	67.4d	18	1.60 (t, $J=9.0$)	66.8d
3	3.79 (d, $J=6.6$)	70.4d	19	1.06~0.96 (m)	53.3d
4	1.45~1.39 (m)	31.1t	20	1.90~1.85 (m)	30.1t
	1.17~1.12 (m)			1.21~1.17 (m)	
5	3.30~3.24 (m)	36.2t	21	1.66~1.60 (m)	32.2t
	2.62~2.52 (m)			1.31~1.21 (m)	
6	7.93 (t, $J=5.0$)		22	1.96~1.89 (m)	45.2d
7		165.4s	23	6.40~6.35 (m)	146.5d
8	5.76 (br d, $J=10.7$)	124.2d	24	7.15~7.02 (m)	126.0d
9	5.96 (td, $J=11.1, 2.3$)	138.7d	25		
	3.49~3.41 (m)		26		
10	1.88~1.80 (m)	28.4t	27		176.0s
11	1.24~1.18 (m)	43.8d	28		
12	1.93~1.85 (m)	46.6d	29	0.92 (d, $J=6.7$)	13.5q
13	1.86~1.76 (m)	44.6t		1.51~1.44 (m)	
	1.24~1.11 (m)		30	1.27~1.18 (m)	29.7t
14		87.2s	31	0.84 (t, $J=7.2$)	9.0q
15	1.82~1.76 (m)	50.3t			
	1.53 (d, $J=13.6$)				
16		85.9s			

表 2 化合物 2 的细胞毒性(IC_{50} , $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Table 2 Cytotoxic activity of compound 2 (IC_{50} , $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Compound	HeLa	HCT116	SW480
2	>20	>20	>20
多柔比星	0.83 ± 0.19	0.85 ± 0.27	1.05 ± 0.13

菌、细胞毒和抗鼠伤寒沙门菌III型分泌系统活性, 结果显示化合物 2 在上述测试条件下无明显活性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振仪为 Bruker DRX-600; 质谱仪为 Bruker LTQ-Orbitrap XL; 显微红外光谱仪为 Thermo Scientific 的 NICOLET iN10; 高效液相色谱系统(HPLC)为 Thermo Scientific 的 DIONEX UltiMate 3000; 中压液相色谱仪为 Buchi C-615; 旋转蒸发仪为 Buchi R-100; 反相硅胶填料 RP18 购买自 Merck 公司; 凝胶填料 Sephadex LH-20 购买自 GE Healthcare 公司; 各种溶剂为分析纯或色谱纯。

3.2 实验方法

3.2.1 重组菌株的构建

分别以含有 *cbmA* 基因的 fosmid XIV-12H、含有 *cbmB* 和 *cbmC* 基因的 *Streptomyces* sp. S10 基因组 DNA 和含有 *OX4* 基因的产酶溶杆菌 C3 基因组 DNA 为模板,

通过 PCR 扩增和酶切连接获得质粒 pUC-*cbmA*, pUC-*cbmB*, pUC-*cbmC* 和 pUC-*OX4*。质粒 pMV-*ikaD* 为人工合成。通过 BioBrick 策略将 *cbmA*、*cbmB*、*cbmC*、*OX4* 和 *ikaD* 基因片段进行逐级连接, 最终获得异源表达质粒 pSET5035-*cbm-OX4-ikaD*(辅助材料, 图 S1A), 具体构建过程见前期研究^[13]。将异源表达质粒电转化至 S17-1 感受态细胞中, 经供体菌 S17-1 将质粒分别转移至受体菌 *Streptomyces* sp. SR111 和 *Streptomyces* sp. S001 中, 接合子经 PCR 验证获得重组菌株 SR111-*cbm-OX4-ikaD* 和 S001-*cbm-OX4-ikaD*(辅助材料, 图 S1B)。

3.2.2 菌株发酵提取和化合物 2 的分离纯化

采用 YMG 琼脂培养基(酵母提取物 4 g/L, 麦芽提取物 10 g/L, 葡萄糖 4 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4)对菌株 S001-*cbm-OX4-ikaD* 进行了 20 L 扩大培养(30 °C, 11 d)。发酵培养基连同菌体切成小块, 经提取液乙酸乙酯-甲醇-冰乙酸($V:V:V=80:15:5$)室温过夜浸泡提取 3 次, 合并三次浸提液减压浓缩至 300 mL; 采用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯相减压浓缩至干。乙酸乙酯萃取物经石油醚-甲醇($V:V=1:5$)萃取 2 次, 合并甲醇相减压浓缩至干。甲醇相萃取物经葡聚糖凝胶色谱柱层析(Sephadex LH-20, 100 g, 甲醇洗脱)分离得到组分 I。组分 I 经中压液相柱层析(RP-18, 40 g, 体积分数为 30%, 35%, 38%的乙腈各洗脱 200 mL, 体积分数为

40%的乙腈洗脱 240 mL)分离得到组分 Ia. 组分 Ia 经半制备 HPLC (Agilent ZORBAX SB-C18, 150 mm×9.4 mm, 5 μ m, 体积分数为 37%的乙腈-水, 4 mL/min, UV 320 nm)制备得化合物 **2** (5.6 mg, t_R =5.92 min).

3.2.3 抗菌活性测定

采用滤纸片法和琼脂块法分别测定了化合物 **2** 的抗细菌/酵母和抗丝状真菌活性. 将活化后的金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC25923、耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* MC² 155、鼠伤寒沙门菌 *Salmonella typhimurium* UK-1 χ 8956、大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和白色念珠菌 *Candida albican* SC5314 分别转接至新鲜 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养(220 r/min)至 OD₆₀₀ 约为 0.5. 上述细菌和酵母菌液分别与尚未凝固的 LB 和 YPD 琼脂培养基混匀制成细菌和酵母菌指示菌平板. 将带有梨干腐烂菌(*Valsa ambiens*)菌丝的琼脂小块(直径约 5 mm)置于 PDA 琼脂平板中心制成丝状真菌指示菌平板. 将载药滤纸片(化合物 **2** 为 20 μ g/滤纸片, 直径 5 mm)均匀贴于指示菌平板表面, 细菌和酵母菌平板 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 h, 丝状真菌平板 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 1 至 2 d, 观察抑菌圈直径. 抗细菌活性测定的阳性对照为卡那霉素(5 μ g/滤纸片), 抗酵母和抗丝状真菌活性测定的阳性对照为两性霉素 B (10 μ g/滤纸片), 阴性对照为 DMSO.

3.2.4 细胞毒活性测定

采用 MTT 法测定了化合物 **2** 对 3 株肿瘤细胞(人宫颈癌 HeLa 细胞、人结肠癌 HCT116 和 SW480 细胞)的抑制活性^[17]. 阴性对照为 DMSO, 阳性对照为多柔比星. 同一浓度样品设 3 个平行, 通过酶标仪(570 nm)检测 OD (optical density)值, 利用 Prism 5.0 软件计算 IC₅₀ 值.

3.2.5 抗鼠伤寒沙门菌 III 型分泌系统活性测定

通过变温诱导毒性蛋白分泌法测定了化合物 **2** 对鼠伤寒沙门菌 UK-1 χ 8956 III 型分泌系统的抑制活性^[18]. 将活化后的鼠伤寒沙门菌培养液按体积比 1:10 转接到新鲜 LB 液体培养基中, 同时加入终浓度 100 mmol/L 的化合物 **2**, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养(220 r/min) 7 h; 培养后的菌液 4 $^{\circ}$ C 离心后取上清(700 μ L)与三氯乙酸溶液(150 μ L)混

匀后冰上放置 30 min, 4 $^{\circ}$ C 离心收集胞外蛋白沉淀; 所得沉淀经预冷丙酮(400 μ L)温和震荡后冰上放置 10 min, 4 $^{\circ}$ C 离心后 SDS-PAGE 电泳检测蛋白沉淀. 阴性对照为等体积 DMSO, 阳性对照为 Csn-B (100 mmol/L).

辅助材料(Supporting Information) 重组菌株的构建示意图, 化合物 **2** 的抗菌和抗鼠伤寒沙门菌 III 型分泌系统活性测定结果, 化合物 **2** 的一维和二维核磁共振谱图和红外谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Cao, S.; Blodgett, J.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4652.
- [2] Zhang, G.; Zhang, W.; Saha, S.; Zhang, C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 1727.
- [3] Liu, Y.; Wang, H.; Song, R.; Chen, J.; Li, T.; Li, Y.; Du, L.; Shen, Y. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 3504.
- [4] Blodgett, J.; Oh, D.; Cao, S.; Currie, C.; Kolter, R.; Clardy, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 11692.
- [5] Yu, F.; Zaleta-Rivera, K.; Zhu, X.; Huffman, J.; Millet, J.; Harris, S.; Yuen, G.; Li, X.; Du, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 64.
- [6] Li, Y.; Wang, H.; Liu, Y.; Jiao, Y.; Li, S.; Shen, Y.; Du, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 6221.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Qi, Y.; Ding, E.; Blodgett, J. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 357.
- [10] 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.
- [11] Li, Y.; Huffman, J.; Li, Y.; Du, L.; Shen, Y. *MedChemComm* **2012**, *3*, 982.
- [12] Greunke, C.; Antosch, J.; Gulder, T. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5334.
- [13] Yan, Y.; Wang, H.; Song, Y.; Zhu, D.; Shen, Y.; Li, Y. *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10*, 2434.
- [14] Jin, H.; Zhang, W.; Zhang, G.; Zhang, L.; Liu, W.; Zhang, C. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 1731.
- [15] Zhang, W.; Zhang, G.; Zhang, L.; Liu, W.; Jiang, X.; Jin, H.; Liu, Z.; Zhang, H.; Zhou, A.; Zhang, C. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 6839.
- [16] 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.)
- [17] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
- [18] Li, J.; Lv, C.; Sun, W.; Li, Z.; Han, X.; Li, Y.; Shen, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2191.

(Lu, Y.)