

微生物来源的 蛇孢菌素抗肿瘤 活性的体外实验 研究

In Vitro Anti-tumor Effect of Ophiobolin from Microorganism

ZHU Jing-tong, FAN Yu-ling, LU Xin-hua, DONG Yue-sheng,
ZHENG Zhi-hui, ZHANG Hua, HE Jian-gong
(New Drug Research & Development Center of North China
Pharmaceutical Group Corporation, National Microbial Medicine
Engineering & Research Center, Shijiazhuang 050015, China)

朱京童/范玉玲/路新华/董悦生/

郑智慧/张 华/贺建功

(华北制药集团新药研究开发中心,微生物药物
国家研究工程中心,石家庄 050015)

【摘要】背景与目的:探讨微生物来源的3个化合物表蛇孢菌素 K、蛇孢菌素 K 和蛇孢菌素 G 的体外抗肿瘤作用。材料与方法:利用噻唑蓝(MTT)比色法检测3个化合物对人结肠癌细胞 Hct-15、Hct-116,乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7,肺癌细胞 A549 和白血病细胞 K562 共6株细胞的体外细胞毒性,并测定其半数抑制浓度值(IC₅₀)。利用组织蛋白酶 B 评价3个化合物对肿瘤浸润和转移的抑制活性。结果:表蛇孢菌素 K、蛇孢菌素 K 和蛇孢菌素 G 对上述6株细胞均有抑制作用,与阴性对照组相比较,其差异均具有统计学意义(P < 0.05)。表蛇孢菌素 K 对上述6株肿瘤细胞的 IC₅₀ 值依次为:5.70、3.60、28.00、8.40、2.00 和 3.10 μg/ml。蛇孢菌素 K 对6株肿瘤细胞的 IC₅₀ 值依次为:1.40、0.81、4.26、3.70、0.91 和 1.10 μg/ml。蛇孢菌素 G 对6株肿瘤细胞的 IC₅₀ 值依次为:4.1、4.6、26.10、17.10、6.70 和 6.10 μg/ml。3种蛇孢菌素对组织蛋白酶 B 的 IC₅₀ 值分别为 46、26 和 23 μg/ml。结论:表蛇孢菌素 K、蛇孢菌素 K 和蛇孢菌素 G 均具有体外抗肿瘤活性,其中蛇孢菌素 K 体外活性高于表蛇孢菌素 K 和蛇孢菌素 G。

【关键词】蛇孢菌素;组织蛋白酶 B;抗肿瘤作用

中图分类号:R730.53

文献标识码:A

文章编号:1004-616X(2007)05-0388-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the *in vitro* anti-tumor effect of 6-epi- ophiobolin K, ophiobolin K and ophiobolin G from microorganisms. MATERIALS AND METHODS: The effects of the three compounds on the proliferation of six human tumor cell lines were investigated by MTT method with IC₅₀, and the inhibitory activities of the three compounds against cathepsin B were assayed for evaluation of anti-tumor invasiveness and metastasis *in vitro*. RESULTS: Compared with negative control, 6-epi-ophiobolin K, ophiobolin K and ophiobolin G showed significant inhibitory activities to Hct-15, Hct-116, MDA-MB-231, MCF-7, A549 and K562 cell lines. 6-epi-ophiobolin K to the above tumor cell lines demons trated IC₅₀ of 5.70, 3.60, 28.00, 8.40, 2.00 and 3.10 μg/ml, respectively. Ophiobolin K showed IC₅₀ of 1.40, 0.81, 4.26, 3.70, 0.91 and 1.10 μg/ml, respectively, while Ophiobolin G revealed IC₅₀ of 4.10, 4.60, 26.10, 17.10, 6.70 and 6.10 μg/ml, respectively. All three compounds have moderate inhibitory activities to athepsin B with the IC₅₀ of 46, 26 and 23 μg/ml, respectively. CONCLUSION: The three compounds all had anti-proliferative effects on tumor cell lines.

【KEY WORDS】 ophiobolin; cathepsin B; anti-tumor

每年全世界因癌症死亡的人数高达 500 万,因此抗癌药物的研发一直是研究的热点^[1]。微生物分布广、种类多、易变异,微生物次级代谢产物具有多样性和新颖性的特点^[2],从微生物代谢产物中寻找抗肿瘤活性化合

物具有重要意义。我们用 MTT 比色法对 4 000 个微生物次级代谢产物的提取物进行筛选,从中筛选出具有抗肿瘤活性的阳性菌株。对阳性菌株放大,培养得到的发酵液通过溶剂萃取、硅胶层析和 HPLC 制备等手段,在活

收稿日期:2006-11-08;修订日期:2007-03-30

基金项目:国家科技部创新药物筛选技术平台研究资助项目(2002AA2AZ343)

作者简介:朱京童(1977-),女,河北石家庄人,工程师,学士,研究方向:微生物来源创新药物的筛选。Tel: 0311-85992995, E-mail: zhujiangtong2003@yahoo.com.cn

性跟踪的基础上得到单一活性化合物,并鉴定出化合物表蛇孢菌素 K(6-epi-ophiobolin K)、蛇孢菌素 K(ophiobolin K)及蛇孢菌素 G(ophiobolin G)的结构(见图1)。我们测定了此3个化合物对不同肿瘤细胞株的体外毒性,并用组织蛋白酶 B(cathepsin B, CB)模型评价它们对肿瘤浸润和转移的活性,以期为进一步开发和利用蛇孢菌素提供理论依据。

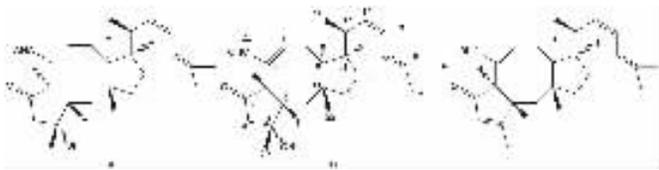


图1 表蛇孢菌素 K(A)、蛇孢菌素 K(B)、蛇孢菌素 G(C)的结构
Figure 1 Structures of 6-epi-ophiobolin K(A), ophiobolin K(B) and ophiobolin G(C)

1 材料与方法

1.1 蛇孢菌素和肿瘤细胞株 表蛇孢菌素 K, 蛇孢菌素 K 和 G 均由本室微生物次生代谢产物得到。3 种蛇孢菌素均为无色粉末, 均易溶于甲醇、丙酮和氯仿, 紫外吸收分别为 241 nm、239 nm 和 238 nm。分子量分别为 384.3、384.3 和 366.3。分子式分别为 $C_{25}H_{38}O_5$ 、 $C_{25}H_{38}O_3$ 和 $C_{25}H_{36}O_{20}$ 。

人结肠癌细胞株 Hct-15、Hct-116, 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MCF-7, 人肺癌细胞株 A549, 人白血病细胞株 K562 均来源于美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。6 株肿瘤细胞均培养于含 100 U/ml 青霉素和链霉素、10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO_2 及饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养, 2~3 d 传代一次。

1.2 主要试剂和仪器 RPMI 1640、SDS(GIBCO 公司)、胰蛋白酶、伊红(北京欣经科)、新生牛血清(杭州四季青); 噻唑蓝 (MTT)、组织蛋白酶 B 及底物 Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcou-marin hydrochloride(SIGMA 公司); 青霉素、链霉素(华北制药股份公司)。 CO_2 培养箱(美国 Formasontifu 公司); 酶联免疫检测仪(美国 BIO-RAD 公司产品, WALLAC 1420); 超净工作台(苏州净化设备厂); 离心机(贺利氏); 光学显微镜(重庆光学仪器厂 XDS-1B); 96 孔培养板(美国 Corning)。

1.3 MTT 法测定细胞增殖抑制率 取对数生长期的肿瘤细胞, 用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬, 配成单细胞悬液, 以每孔 6×10^4 /ml 接种于 96 孔培养板中, 每孔 200 μ l。同时加入待测药液, 药液起始终浓度 100 μ g/ml, 后 3 倍梯度稀释成 8 个不同浓度组, 每组加入 2 μ l。阴性对照用等体积培养液代替, 阳

性对照为顺铂(DDP)10 μ l 每孔, 终浓度 25 μ g/ml。每组平行设 3 个复孔, 置 5% CO_2 、37 °C 培养 72 h 后弃上清, 每孔再加入 MTT 液 (5 mg/ml) 20 μ l, 继续孵育 5 h 后每孔加入 10% SDS 液 100 μ l 溶解, 37 °C 湿盒过夜, 待结晶完全溶解^[3], 用酶联仪检测各孔光吸收 (OD₅₇₀) 值。并计算肿瘤细胞抑制率。

肿瘤细胞抑制率 (CI) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 \times 100%。

以同一样品的不同浓度对肿瘤细胞生长抑制率作图可得到剂量反应曲线, 从中求出样品的半数抑制浓度 IC₅₀^[4]。

1.4 药物敏感实验判断标准 MTT 法检测肿瘤细胞代谢活性变化, 并计算其抑制率, CI \geq 50% 为高度敏感, 30% \leq CI < 50% 为中度敏感, CI < 30% 为低度敏感, 如果出现负值, 表示药物刺激细胞生长^[5]。

1.5 伊红染色法测细胞形态 Hct-15 细胞与蛇孢菌素反应步骤同 1.3, 72 h 后, 弃上清, 10% 甲醛 30 μ l 每孔固定 30 min。蒸馏水洗 2 遍, 0.2% 伊红染液 50 μ l 每孔染色 10 min, 蒸馏水洗 3 遍。加 50 μ l 每孔超纯水, 光镜下观察细胞形态, 拍照。

1.6 组织蛋白酶 B 活性测定方法 活性测定方法由本室建立^[6], 原理是组织蛋白酶 B 可以水解特定的荧光标记多肽底物, 通过荧光值的变化计算抑制剂对酶的抑制活性。活性测定反应在 96 孔板中进行, 3 种蛇孢菌素样品用 DMSO 溶解, 起始浓度 100 μ g/ml, 后 3 倍梯度稀释成 8 个不同浓度组, 每孔加入 1 μ l, 与 70 μ l 的组织蛋白酶 B 酶液结合; 对照孔以 DMSO 代替样品溶液, 空白孔以 DMSO 代替样品溶液并以缓冲液代替酶液, 在 37 °C 保温 15 min, 并测定荧光 F1(激发光 Ex355nm/ 发射光 Em460nm); 各孔加入 30 μ l 荧光底物液 Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcou-marin hydrochloride, 并在 37 °C 保温 1 h, 测荧光 F2。

$$\text{样品抑制率} = \frac{[F2 - F1]_{\text{对照}} - [F2 - F1]_{\text{样品}}}{[F2 - F1]_{\text{对照}} - [F2 - F1]_{\text{空白}}} \times 100\%$$

以同一样品的不同浓度抑制率作图得到剂量反应曲线, 从中求出样品的半数抑制浓度 IC₅₀。

1.7 统计学方法 统计软件为美国 BIO-RAD 公司 Microplate Manager 4.0。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间用 *t* 检验, 多组间用数据单因素方差分析。

2 结果

2.1 表蛇孢菌素 K 对不同肿瘤细胞增殖的影响

表 1 结果显示, 表蛇孢菌素 K 对 Hct-15、Hct-116、MDA-MB-231、MCF-7、A549、K562 细胞的增殖均有很强

的抑制作用,且细胞抑制率呈浓度依赖关系(r 均 < 0.980 , P 均 < 0.01)。观察 Hct-15(Y)与表蛇孢菌素 K(X)浓度效应关系得到: $Y = 0.6531 - 0.282 \log X$

($r = 0.981$, $P < 0.001$)。表蛇孢菌素 K 对上述 6 株肿瘤细胞的 IC_{50} 值依次为: 5.70、3.60、28.00、8.40、2.00 和 3.10 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 1 表蛇孢菌素 K 对 6 株肿瘤细胞增殖作用的影响

Table 1 The effect of 6-epi-ophiobolin K on the proliferation of six tumor cell lines ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Hct-15	Hct-116	MDA-MB-231	MCF-7	A549	K562
Negative	-	0.932 \pm 0.014	0.732 \pm 0.015	0.840 \pm 0.014	0.876 \pm 0.003	1.018 \pm 0.012	1.032 \pm 0.012
DDP	25	0.110 \pm 0.021	0.088 \pm 0.012	0.132 \pm 0.003	0.146 \pm 0.003	0.168 \pm 0.003	0.217 \pm 0.008
6-epi-ophiobolin K	100	0.084 \pm 0.018*	0.011 \pm 0.009*	0.058 \pm 0.0128	0.061 \pm 0.011*	0.019 \pm 0.011*	0.021 \pm 0.008*
	33	0.286 \pm 0.015*	0.016 \pm 0.004*	0.362 \pm 0.010*	0.216 \pm 0.008*	0.027 \pm 0.014*	0.126 \pm 0.012*
	11	0.391 \pm 0.009*	0.021 \pm 0.008*	0.547 \pm 0.005*	0.412 \pm 0.004*	0.217 \pm 0.009*	0.312 \pm 0.014*
	3.7	0.401 \pm 0.012*	0.329 \pm 0.014*	0.587 \pm 0.004*	0.523 \pm 0.012*	0.319 \pm 0.014*	0.487 \pm 0.016*
	1.23	0.550 \pm 0.021*	0.397 \pm 0.018*	0.626 \pm 0.007*	0.625 \pm 0.018*	0.491 \pm 0.008*	0.596 \pm 0.008*
	0.4	0.761 \pm 0.015*	0.444 \pm 0.005*	0.685 \pm 0.021*	0.721 \pm 0.021*	0.964 \pm 0.005*	0.723 \pm 0.021*
	0.137	0.997 \pm 0.014	0.596 \pm 0.013*	0.683 \pm 0.016*	0.810 \pm 0.014*	1.097 \pm 0.003	0.854 \pm 0.011*
0.045	1.011 \pm 0.008	0.740 \pm 0.004	0.686 \pm 0.020*	0.878 \pm 0.008	1.068 \pm 0.007	0.932 \pm 0.004*	

Compared with negative control, * $P < 0.01$.

2.2 蛇孢菌素 K 对不同肿瘤细胞增殖的影响

表 2 结果显示,蛇孢菌素 K 对 Hct-15、Hct-116、MDA-MB-231、MCF-7、A549、K562 细胞的增殖均有很强的抑制作用,且细胞抑制率呈浓度依赖关系(r 均 < 0.983 ,

P 均 < 0.01)。观察 Hct-15(Y)与蛇孢菌素 K(X)浓度效应关系得到: $Y = 0.5391 - 0.292 \log X$ ($r = 0.985$, $P < 0.001$)。蛇孢菌素 K 对上述 6 株肿瘤细胞的 IC_{50} 值依次为: 1.40、0.18、4.26、3.70、0.91 和 1.10 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 2 蛇孢菌素 K 对 6 株肿瘤细胞增殖作用的影响

Table 2 The effect of ophiobolin K on the proliferation of six tumor cell lines ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Hct-15	Hct-116	MDA-MB-231	MCF-7	A549	K562
Negative	-	0.932 \pm 0.014	0.732 \pm 0.015	0.840 \pm 0.014	0.876 \pm 0.003	1.018 \pm 0.012	1.032 \pm 0.012
DDP	25	0.110 \pm 0.021	0.088 \pm 0.012	0.132 \pm 0.003	0.146 \pm 0.003	0.168 \pm 0.003	0.217 \pm 0.008
6-epi-ophiobolin K	100	0.043 \pm 0.011*	0.010 \pm 0.009*	0.010 \pm 0.009*	0.023 \pm 0.008*	0.022 \pm 0.004*	0.045 \pm 0.003*
	33	0.075 \pm 0.021*	0.011 \pm 0.004*	0.313 \pm 0.004*	0.165 \pm 0.011*	0.023 \pm 0.009*	0.161 \pm 0.008*
	11	0.205 \pm 0.015*	0.016 \pm 0.008*	0.368 \pm 0.013*	0.258 \pm 0.012*	0.113 \pm 0.008*	0.298 \pm 0.011*
	3.7	0.348 \pm 0.021*	0.263 \pm 0.014*	0.521 \pm 0.010*	0.453 \pm 0.003*	0.255 \pm 0.014*	0.368 \pm 0.012*
	1.23	0.363 \pm 0.010*	0.359 \pm 0.018*	0.609 \pm 0.010*	0.532 \pm 0.021*	0.365 \pm 0.018*	0.476 \pm 0.021*
	0.4	0.472 \pm 0.008*	0.405 \pm 0.005*	0.636 \pm 0.005*	0.638 \pm 0.014*	0.569 \pm 0.005*	0.595 \pm 0.003*
	0.137	0.842 \pm 0.012*	0.468 \pm 0.013*	0.661 \pm 0.008*	0.728 \pm 0.008*	0.859 \pm 0.013*	0.813 \pm 0.005*
0.045	0.994 \pm 0.011	0.617 \pm 0.004*	0.665 \pm 0.008*	0.864 \pm 0.005*	1.002 \pm 0.004	0.932 \pm 0.008*	

Compared with negative control, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$.

2.3 蛇孢菌素 G 对不同肿瘤细胞增殖的影响

表 3 结果显示,蛇孢菌素 G 对 Hct-15、Hct-116、MDA-MB-231、MCF-7、A549、K562 细胞的增殖均有很强的

抑制作用。且细胞抑制率呈浓度依赖关系(r 均 < 0.981 , P 均 < 0.01)。观察 Hct-15(Y)与蛇孢菌素 G(X)浓度效应关系得到: $Y = 0.6886 - 0.3108 \log X$ ($r = 0.983$,

表 3 蛇孢菌素 G 对 6 株肿瘤细胞增殖作用的影响

Table 3 The effect of ophiobolin G on the proliferation of six tumor cell lines ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Hct-15	Hct-116	MDA-MB-231	MCF-7	A549	K562
Negative	-	0.932 \pm 0.014	0.732 \pm 0.015	0.840 \pm 0.014	0.876 \pm 0.003	1.018 \pm 0.012	1.032 \pm 0.012
DDP	25	0.110 \pm 0.021	0.088 \pm 0.012	0.132 \pm 0.003	0.146 \pm 0.003	0.168 \pm 0.003	0.217 \pm 0.008
6-epi-ophiobolin K	100	0.040 \pm 0.013*	0.023 \pm 0.009*	0.067 \pm 0.011*	0.164 \pm 0.008*	0.025 \pm 0.003*	0.089 \pm 0.008*
	33	0.283 \pm 0.012*	0.091 \pm 0.004*	0.368 \pm 0.018*	0.321 \pm 0.011*	0.106 \pm 0.014*	0.231 \pm 0.009*
	11	0.329 \pm 0.009*	0.375 \pm 0.008*	0.455 \pm 0.021*	0.465 \pm 0.012*	0.277 \pm 0.007*	0.487 \pm 0.011*
	3.7	0.364 \pm 0.008*	0.396 \pm 0.014*	0.614 \pm 0.014*	0.578 \pm 0.021*	0.405 \pm 0.005*	0.586 \pm 0.008*
	1.23	0.516 \pm 0.024*	0.471 \pm 0.018*	0.652 \pm 0.011*	0.658 \pm 0.008*	0.653 \pm 0.009*	0.692 \pm 0.003*
	0.4	0.926 \pm 0.009*	0.633 \pm 0.005*	0.680 \pm 0.009*	0.769 \pm 0.011*	1.083 \pm 0.004	0.786 \pm 0.005*
	0.137	1.003 \pm 0.012	0.786 \pm 0.013	0.697 \pm 0.004*	0.869 \pm 0.008*	1.102 \pm 0.009	0.932 \pm 0.012*
0.045	1.028 \pm 0.022	0.814 \pm 0.004	0.683 \pm 0.008*	0.881 \pm 0.003	1.103 \pm 0.018	1.041 \pm 0.021	

Compared with negative control, * $P < 0.01$; ** $P < 0.05$.

$P < 0.001$)。蛇孢菌素 G 对上述 6 株肿瘤细胞的 IC_{50} 值依次为 4.10、4.60、26.10、17.10、2.7 和 6.1 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.4 蛇孢菌素作用后 Hct-15 细胞的变化 正常细胞贴壁后呈梭形,形态完整,边缘清晰。蛇孢菌素作用后细胞破碎,胞浆溢出,边界不清,见图 2。

2.5 组织蛋白酶 B 模型 表 4 为组织蛋白酶 B 检测 3 个化合物的抑制率比较,应用统计软件计算 3 个化合物 IC_{50} 值分别为 46、26 和 23 $\mu\text{g/ml}$ 。

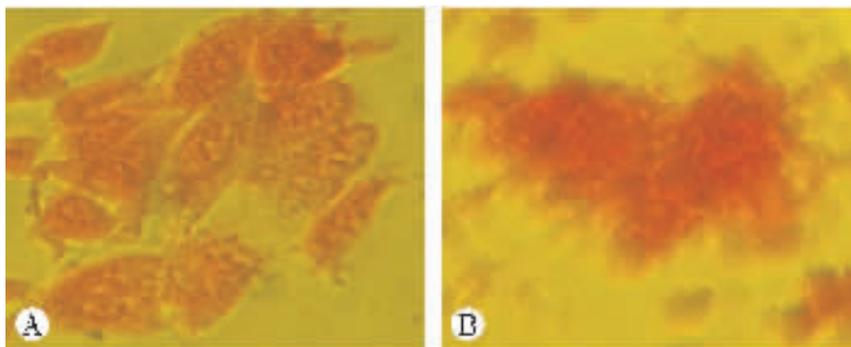


图 2 蛇孢菌素作用前后 HCT-15 细胞的形态变化。A:对照组;B:加样组
Figure 2 The morphologic change of HCT-15 before and after treatment with ophiobolin. A:control;B:sample

3 讨论

蛇孢菌素 (ophiobolin) 是一族具有三环或四环结构的二倍半萜类化合物,具有杀线虫、抗真菌、抗细菌和细胞毒等多种生物活性^[7]。Singh 等^[8]报道蛇孢菌素 K 具有杀线虫的作用,而表蛇孢菌素 K 没有活性。我们以 6 种肿瘤细胞为研究对象采用 MTT 比色法对 3 个化合物进行细胞毒性实验,结果表明表蛇孢菌素 K,蛇孢菌素 K 和 G 均具有细胞毒性,且均呈剂量效应依赖关系。除蛇孢菌素 G 外,其 IC_{50} 均低于 10 $\mu\text{g/ml}$,与阴性对照比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。其 100 $\mu\text{g/ml}$ 抑制效应均达到 80% 以上 (见表 1~3),符合被认为有研究价值的要求^[3]。文献表明,肿瘤药物敏感实验的体外实验结果与体内化疗疗效总符合率高达 85%^[5]。

3 个化合物对乳腺癌细胞的体外细胞抑制率均低于结肠癌、肺癌和白血病细胞,对肺癌细胞的体外细胞毒活性均略高于其它细胞。而蛇孢菌素 K 的体外细胞毒活性略高于表蛇孢菌素 K 和蛇孢菌素 G,可能和化合物的空间构型有关。3 个化合物对肿瘤细胞的具体作用机制有待作进一步研究。

组织蛋白酶 B 是一种溶酶体蛋白水解酶,可以破坏胶原纤维及组织基底膜层,参与肿瘤的浸润和转移。在结肠癌演变过程中,尤其在浸润和转移中发挥重要作用。所以组织蛋白酶 B 成为抗癌及肿瘤转移新药的作

表 4 组织蛋白酶 B 中 3 个化合物的抑制率 (%)

Table 4 The inhibition rate of the three compounds to the cathepsin B (%)

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	6-epi-ophiobolin K	Epi-ophiobolin K	Ophiobolin G
100	64.32	92.64	96.11
33	46.12	78.34	78.88
11	29.13	44.23	46.72
3.7	21.23	32.14	34.26
1.23	12.41	20.56	22.45
0.4	5.62	11.35	16.48
0.137	2.31	6.11	9.84
0.045	0.27	2.89	8.78

用靶点。表蛇孢菌素 K、蛇孢菌素 K 和蛇孢菌素 G 对组织蛋白酶 B 的 IC_{50} 值分别为 46、26 和 23 $\mu\text{g/ml}$ 。表明这 3 种蛇孢菌素体外不仅对肿瘤细胞增殖有活性,而且可能对肿瘤浸润和转移有抑制作用。

参考文献:

- [1] 林汝仙,王升启. 抗肿瘤药物靶标的研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2005,32(3):186-190.
- [2] Berdy J. Bioactive microbial metabolites [J]. *J Antibiot.* 2005,58(1):1-26.
- [3] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版西安公司,2003:135,186.
- [4] 张均田. 现代药理实验方法[上][M]. 北京:北京大学和中国协和医科大学联合出版社,1998:819.
- [5] 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 北京:北京大学和中国协和医科大学联合出版社,1991:418.
- [6] Halangk W, lerch MM, brandt-nedelev B, et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis[J]. *J Clin Invest.* 2000, 106(6):773-781.
- [7] Au TK, Chick WS, Leung PC. The biology of ophiobolins[J]. *Life Sci.* 2000,67(7):733-742.
- [8] Singh SB, Smith JL, Sabnis GS. Structure and Conformation of Ophiobolin K and 6-Epiophiobolin K from *Aspergillus ustus* as a Nematocidal Agent[J]. *Tetrahedron.* 1991, 47(34):6931-6938.

