DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20230109

·论　　著·

赤芝中新颖杂萜-三萜杂聚体的分离纯化及其改善C2C12细胞胰岛素抵抗作用

张娇娇，彭云丽，程永现*

（深圳大学医学部药学院，广东 深圳 518000）

【摘要】目的 赤芝（*Ganoderma lucidum*）在民间被用于糖尿病治疗，但缺乏数据支撑，需探索其化学成分及其是否具有抗糖尿病作用以利于临床推广。**方法** 采用多种分离技术，如MCI gel CHP 20P、RP-18、Sephadex LH-20、硅胶柱色谱、制备薄层色谱（Preparative Thin-Layer Chromatography，PTLC）和高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）等，对云南产赤芝的低极性成分进行研究，利用一维（One Dimensional，1D）和二维（Two Dimensional，2D）核磁共振波谱（Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy，NMR）等方法鉴定化合物结构，在C2C12细胞胰岛素抵抗体外模型中研究其活性。**结果** 从云南2个产地赤芝中分离鉴定8个杂萜-三萜杂聚体类新化合物，ganolucinins D-K（**1-8**），其中化合物**7**和**8**可上调胰岛素受体底物1（Insulin Receptor Substrate 1，IRS1）和蛋白激酶B（Protein Kinase B，PKB/Akt）磷酸化，**8**可促进C2C12细胞葡萄糖摄取。**结论** 赤芝中可能存在一系列杂萜-三萜杂聚体类化合物，其中化合物**8**具有改善胰岛素抵抗潜力，可能是灵芝抗糖尿病的药效物质之一。

【关键词】赤芝；杂萜；杂聚体；糖尿病/胰岛素抵抗

中图分类号：R93　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-8965（2023）01-0061-17

Meroterpenoid-triterpenoid hybrids from *Ganoderma lucidum* and their biological activity against insulin resistance in C2C12 cells

Zhang Jiaojiao, Peng Yunli, Cheng Yongxian*

(School of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

【Abstract】Objective *Ganoderma lucidum* is served for folk treatment of diabetes, however, due to the lack of supportive data, the exploration of its chemical composition and effects on anti-diabetes is needed for clinical promotion. **Methods** A variety of separation methods were used, such as MCI gel CHP 20P, RP-18, Sephadex LH-20 and silica gel column chromatography, PTLC and HPLC, to investigate the low-polarity components of *Ganoderma lucidum* produced in Yunnan province. 1D and 2D NMR were used to elucidate the structures of the compounds, and their activities were examined in the insulin resistance model of C2C12 cells *in vitro*. **Results** Eight new meroterpenoid-triterpenoid hybrids, ganolucinins D-K (**1-8**), were isolated and identified from *Ganoderma lucidum* cultivited in two different areas in Yunnan province. Compounds **7** and **8** upregulate the phosphorylation of IRS1 and Akt, and compound **8** could promote glucose uptake in C2C12 cells. **Conclusion** A

收稿日期：2022-12-05；**修回日期：**2023-02-23

基金项目：国家自然科学基金项目（82030115）；NSFC-云南联合基金项目（U1702287）；国家杰出青年科学基金项目（81525026）；深圳市基础研究项目（JCYJ20200109113803838）

通信作者：程永现（1972-），男，河南鹤壁人，博士生导师，主要从事中药科学原理研究与新药转化工作。E-mail：yxcheng@szu.edu.cn

series of meroterpenoid-triterpenoid hybrids might exist in *Ganoderma lucidum*, and compound **8** has the potential for ameliorating insulin resistance and might be an effective substance of *Ganoderma lucidum* for anti-diabetes.

【**Keywords**】*Ganoderma lucidum*; Meroterpenoids; Hybrid; Diabetes/Insulin resistance

灵芝是九大仙草之一，被广泛用于多种疾病的预防和治疗。由于灵芝的药理作用比较广泛，加上商业宣传过度，甚至引起了大众对灵芝功能的怀疑。实际上，灵芝含有多糖，多糖具有调节免疫力作用，通过调节免疫实现对多种疾病的干预是可能的[1]。此外，灵芝中含有结构和作用多样的三萜类化合物，其也是灵芝可对多种适应症具有干预效果的直接原因。尽管灵芝研究热度高涨，但过去人们对灵芝化学物质的认识却一直停留在多糖和三萜层次[1, 2]，2000年后灵芝中的杂萜被发现[3]，但之后的十余年间未引起业界关注[4, 5]。2013年，本团队发表了灵芝中结构新颖的旋转门形状的杂萜分子[6]，成为灵芝杂萜成分研究的拐点，从此推动了灵芝杂萜的研究进程。在灵芝杂萜系统研究过程中，我们调查发现在云南民间人们曾将灵芝用于糖尿病患者，效果显著，但并未进一步在人群中推广，因此阐明灵芝是否具有确切的抗糖尿病作用，其药效物质是什么就显得重要，若能有确切的数据或证据，势必对揭秘灵芝抗糖尿病科学内涵及助推其临床应用起到积极作用。由于灵芝中三萜已经被广泛研究，并没有大量数据证明三萜与抗糖尿病的关系，因此基于我们对灵芝杂萜研究的长期积累，本研究尝试探索杂萜是否可发挥抗糖尿病作用，将以胰岛素抵抗体外模型为载体进行。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

紫外光谱和圆二色光谱（Circulardichroism，CD）均通过Chirascan仪器测定；比旋光度使用Anton Paar MCP-100全自动数字旋光仪或Jasco P-1020全自动数字旋光仪测定；核磁共振图谱（1D和2D NMR）通过Bruker Avance 500 MHz或Bruker Avance 600 MHz测定（δ单位为ppm，J单位为Hz，内标为Tetramethyl silane，TMS）；高分辨质谱（High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectroscopy，HRESIMS）使用Shimazu LC-20AD AB SCIEX triple TOF X500R MS或Shimazu LC-20AD AB SCIEX triple TOF 6600+ MS或通过Agilent 6210 ESI/TOF MS仪器进行测定；柱层析用硅胶（200~300目）来自青岛海洋化工厂、薄层层析用硅胶GF_{254}来自青岛海洋化工厂；Sephadex LH-20（25~100 μm）来自Amersham Pharmacia公司；MCI gel CHP 20P（75~150 μm）来自Mitsubishi Chemical Industries公司；RP-18（40~60 μm）来自日本Daiso公司；高效液相色谱仪使用品牌及型号为Agilent 1260或创新通恒LC-3000或赛谱锐思；半制备色谱柱为YMC-Pack ODS-A（250 mm×10 mm，i.d.，5 μm）；制备柱为Thermo-Hypersil Gold-C18（250 mm×21.2 mm，i.d.，5 μm）；手性分析色谱柱为Daicel Chiralpak IC（250 mm× 4.6 mm，i.d.，5 μm）和i-Amylose-1 column（LC，250 mm×4.6 mm，i.d.，5 μm）。C2C12小鼠成肌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。二氧化碳培养箱来自Thermo；倒置显微镜来自明美；离心机来自Eppendorf；超纯水机来自Techcomp Limited；酶标仪来自BioTek；蛋白凝胶电泳装置和蛋白成像系统来自BIO-RAD。DMEM（Dulbecco′s Modified Eagle Medium）高糖培养基来自BI；胎牛血清、磷酸盐缓冲液和胰蛋白酶来自Gibco；胰岛素、棕榈酸和二甲基亚砜（DMSO）来自Sigma；CCK-8（Cell Counting Kit-8）试剂盒、RIPA（Radio Immunoprecipitation Assay）裂解液（强）和100 mM苯甲磺酰氟（Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride，PMSF）来自Beyotime；葡萄糖氧化酶法试剂盒来自APPLYGEN；蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂来自Roche；显影液来自Millipore。

1.2 真菌材料

云南大姚县产赤芝（*Ganoderma lucidum*）干燥子实体（30.0 kg），2018年4月于云南省大姚县购买。真菌材料经中国科学院昆明植物研究所杨祝良研究员鉴定，凭证标本编号为CHYX-0615，标本于深圳大学医学部药学院保存。

云南保山产赤芝（*G. lucidum*）干燥子实体（27.8 kg），2018年4月于云南省保山腾冲市滇滩镇胜利村购买。真菌材料由中国科学院微生物研究所李泰辉研究员鉴定，凭证标本编号为CHYX-0619，标本于深圳大学医学部药学院保存。

1.3 提取与分离

云南大姚县产赤芝干燥子实体（30.0 kg）粉末，于室温采用95%乙醇渗漉（240 L），得粗提物2.1 kg。于温水中混悬该粗提物并加入乙酸乙酯

（1/1）萃取（3次），得乙酸乙酯萃取部位1.1 kg。萃取物行MCI gel CHP 20P柱梯度洗脱，洗脱剂为甲醇/水，40%~100%，薄层硅胶色谱监测合并相同部分，得13个流分。

Fr.12（181.0 g）行硅胶柱，石油醚/丙酮（10/1~1/1）梯度洗脱，得Fr.12.1~Fr.12.4。其中，Fr.12.3（63.0 g）经Sephadex LH-20，甲醇洗脱，得Fr.12.3.1~Fr.12.3.4。Fr.12.3.1（50.8 g）经RP-18柱梯度洗脱，甲醇/水，70%~100%，后再行Sephadex LH-20，甲醇洗脱，得Fr.12.3.1.1和Fr.12.3.1.2。Fr.12.3.1.2（22.8 g）经MCI gel CHP 20P（甲醇/水，70%~100%）柱梯度洗脱，得Fr.12.3.1.2.1~Fr.12.3.1.2.3。Fr.12.3.1.2.3（6.8 g）先经Sephadex LH-20，甲醇洗脱，再行硅胶柱层析，石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱（20/1~1/4），得Fr.12.3.1.2.3.1~Fr.12.3.1.2.3.5。其中，Fr.12.3.1.2.3.2（1.4 g）行Sephadex LH-20柱层析，甲醇洗脱，得Fr.12.3.1.2.3.2.1和Fr.12.3.1.2.3.2.2。Fr.12.3.1.2.3.2.1（582.0 mg）经制备HPLC，甲醇/水（80%~100%）梯度洗脱，得Fr.12.3.1.2.3.2.1.1~Fr.12.3.1.2.3.2.1.5。其中，Fr.12.3.1.2.3.2.1.1（43.0 mg）经半制备HPLC分离纯化，乙腈/水，90%，流速：3 mL/min，得Fr.12.3.1.2.3.2.1.1.1和Fr.12.3.1.2.3.2.1.1.2。第一小段（10.8 mg）再经手性分析（HPLC，正己烷/乙醇，90%，流速：1 mL/min）分离，得化合物**7**（2.3 mg，t_R=68.9 min）和**8**（3.1 mg，t_R=77.1 min）。Fr.12.3.1.2.3.3（584.0 mg）先行Sephadex LH-20柱层析，甲醇洗脱，再行制备HPLC，甲醇/水（80%~100%）梯度洗脱，得Fr.12.3.1.2.3.3.1 - Fr.12.3.1.2.3.3.3。其中，Fr.12.3.1.2.3.3.3（33.0 mg）行半制备HPLC纯化，乙腈/水，91%，流速：3 mL/min，得Fr.12.3.1.2.3.3.3.1~Fr.12.3.1.2.3.3.3.9。Fr.12.3.1.2.3.3.3.7（5.3 mg）再经手性HPLC分离（正己烷/乙醇，94%，流速：1 mL/min），得化合物**1**（3.7 mg，t_R=24.4 min）。Fr.13.2.1.3（3.3 g）行Sephadex LH-20（甲醇）柱层析，得Fr.13.2.1.3.1和Fr.13.2.1.3.2。Fr.13.2.1.3.2（1.9 g）行制备HPLC，甲醇/水（水中含0.05%TFA，97%，流速：10 mL/min）洗脱，得Fr.13.2.1.3.2.1~Fr.13.2.1.3.2.7）。其中，Fr.13.2.1.3.2.3（210.0 mg）经PTLC（石油醚/乙酸乙酯=2/1）分离，得Fr.13.2.1.3.2.3.1~Fr.13.2.1.3.2.3.9。其中，Fr.13.2.1.3.2.3.4（23.0 mg）行Sephadex LH-20（甲醇）柱层析，得Fr.13.2.1.3.2.3.4.1和Fr.13.2.1.3.2.3.4.2。Fr.13.2.1.3.2.3.4.2（15.0 mg）行半制备HPLC分离，甲醇/水，水中含0.05%TFA，93%，流速：3 mL/min，得化合物**2**（2.1 mg，t_R=33.8 min）。

云南保山腾冲产赤芝干燥子实体（27.8 kg）粉末，于室温采用95%乙醇渗漉（300 L），得粗提物1.0 kg。于温水中混悬该粗提物并加入乙酸乙酯（1/1）萃取（3次），得乙酸乙酯萃部位885.0 g。萃取物行MCI gel CHP 20P柱梯度洗脱（甲醇/水，40%~100%），得到10个流分。

Fr.9（74.0 g）经抽滤得甲醇溶解部分49.2 g，后行硅胶柱，石油醚/丙酮（10/1~2/1）梯度洗脱，得4.5 g，再行Sephadex LH-20，甲醇洗脱，得1.7 g，又经真空液相色谱（Vacuum Liquid Chromatography，VLC），石油醚/丙酮（8/1~3/1）梯度洗脱，得Fr.9.1和Fr.9.2。Fr.9.1（780.0 mg）经制备HPLC（甲醇/水，80%~100%），得到Fr.9.1.1~Fr.9.1.7。其中，Fr.9.1.5（24.0 mg）行半制备HPLC（乙腈/水，90%，流速：3 mL/min），得化合物**4**（2.2 mg，t_R = 25.5 min）。Fr.9.1.6（51.0 mg）行半制备HPLC（乙腈/水，90%，流速：3 mL/min），得化合物**5**（3.3 mg，t_R=30.5 min）。Fr.10（72.1 g）行Sephadex LH-20（甲醇洗脱），得Fr.10.1~Fr.10.3。Fr.10.2（46.7 g）先行硅胶柱色谱，石油醚/丙酮（10/1）洗脱，得23.0 g，再行Sephadex LH-20（甲醇洗脱），得Fr.10.2.1和Fr.10.2.2。Fr.10.2.1（12.1 g）经RP-18柱，甲醇/水（70%~100%）梯度洗脱，得Fr.10.2.1.1和Fr.10.2.1.2。Fr.10.2.1.1（3.4 g）经VLC，氯仿/丙酮（100/1~5/1）梯度洗脱，得Fr.10.2.1.1.1~Fr.10.2.1.1.4。Fr.10.2.1.1.3（670.0 mg）经半制备HPLC（甲醇/水，91%，流速：3 mL/min），得Fr.10.2.1.1.3.1~Fr.10.2.1.1.3.7。其中，Fr.10.2.1.1.3.2（46.0 mg）经PTLC分离，石油醚/异丙醇（7/1）为展开剂，得Fr.10.2.1.1.3.2.1和Fr.10.2.1.1.3.2.2。Fr.10.2.1.1.3.2.2（19.0 mg）（R_f = 0.4）行半制备HPLC纯化，甲醇/水，93%，流速：3 mL/min，得化合物**6**（1.1 mg，t_R=15.4 min）。Fr.10.2.1.1.3.4（51.0 mg）行半制备HPLC，乙腈/水，95%，流速：3 mL/min，得化合物**3**（2.6 mg，t_R=22.2 min）。

1.4 胰岛素抵抗活性检测

1.4.1 细胞培养

C2C12骨骼肌细胞于高糖DMEM培养基进行培养（培养基含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素）。于37℃、含5%二氧化碳环境

中，在DMEM中（含有2%马血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素）孵育4天进行诱导分化。当细胞分化为细长的肌管时，将其暴露在0.35 mM棕榈酸钠（Sodium Palmitate，PA）中18 h以建立胰岛素抵抗（Insulin Resistance，IR）模型。

1.4.2 细胞活力实验

将C2C12（5×10^{5}个细胞/mL）接种到96孔板中，培养过夜后，用化合物或DMSO处理细胞24 h。然后将CCK-8溶液添加到每个孔中，并在37℃下培养1 h。测量每个孔的吸光度（450 nm）。

1.4.3 Western blot实验

在IR模型中用不同的化合物处理细胞18 h后，向孔板中加入含有PMSF、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的RIPA强裂解液提取总蛋白。用10%的SDS-PAGE（Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis）分离蛋白质样品，并转移到PVDF（Polyvinylidene Fluoride）膜上。用5%的牛血清蛋白封闭膜，用一抗在4℃过夜孵育，然后在室温下孵育HRP（Horseradish Peroxidase）标记的二抗。使用ECL（Enhanced Chemiluminescence）化学发光显影液进行显影，使用蛋白成像系统曝光、拍照。

1.4.4 葡萄糖摄取实验

C2C12细胞在低糖DMEM中孵育2 h，然后置于高糖DMEM中，添加100 nM胰岛素和化合物，18 h后，加入胰岛素（1 μmol/L），培养1 h，用葡萄糖氧化酶法试剂盒测定上清液的葡萄糖含量。

1.4.5 统计学分析

实验数据结果用mean ± SEM（Standard Error of Mean）表示，使用Graphpad prism 8和Student's t-test进行统计分析。*P≤0.05，**P≤0.01，***P≤0.001和****P≤0.0001。

2 结果与讨论

2.1 结构鉴定

化合物**1**（见图1），黄色胶状物。根据其高分辨质谱、^{13}C NMR和DEPT谱（Distortionless Enhancement by Polarization Transfer）推断其分子式为$C_{51}H_{74}O_7$（不饱和度为15）。其^{1}H NMR显示出1组ABX系统信号{δ_H 6.51（1H，d，J = 2.9 Hz，H-3′），6.64（1H，dd，J = 8.6，2.9 Hz，H-5′），6.79（1H，d，J = 8.6 Hz，H-6′）}。^{13}C NMR和DEPT谱表明该化合物含有51个碳，分析发现为10个甲基，13个sp^{3}杂化的亚甲基（其中1个连氧，δ_C 66.5），14个次甲基（9个sp^{2}杂化，5个sp^{3}杂化，2个连氧次甲基，δ_C 77.7和δ_C 79.0）和14个不连质子的碳（其中含有1个酯羰基δ_C 174.1和2个sp^{3}杂化的连氧季碳，δ_C 80.9和δ_C 73.2）。这些数据与ganolucinin C[7]相似，不同的是，ganolucinin C中的C-3位酮羰基在**1**中被还原成羟基，ganolucinin C中的$\Delta^{8'(9')}$双键在**1**中被打开，C-9′位与C-1′位形成了醚键，形成了苯并吡喃环系，同时C-8′位与C-7′位形成了一个新的双键$\Delta^{7'(8')}$，这些不同主要通过2D NMR和不饱和度确定。从HMBC（Heteronuclear Multiple Bond Correlation）图谱中观察到的H_3-28（δ_H 0.89），H_3-29（δ_H 1.01）/C-3（δ_C 79.0）相关可推断C-3位酮羰基的还原，从^{1}H-^{1}H COSY（Chemical Shift Correlated Spectroscopy）图谱中观察到的H-7′（δ_H 6.44）/H-8′（δ_H 5.77）相关和从HMBC图谱（见图2）中观察到的H-7′/C-1′（δ_C 147.1），C-3′（δ_C 113.2），C-9′（δ_C 80.9），H-8′/C-2′（δ_C 120.9），C-9′，C-10′（δ_C 38.2），C-21′（δ_C 174.1）和H_2-10′，H_2-11′/C-9′相关，以及化合物的不饱和度分析（ganolucinin C不饱和度为15，化合物**1**中酮羰基被还原，若未形成苯并吡喃环，则不饱和度应为14，因此证明形成了苯并吡喃环）证实了解析结构的准确。灵芝中三萜成分的骨架均为羊毛甾醇[8]，通过ROESY（Rotating-Frame Overhauser Effect Spectroscopy）谱分析发现，Ha-2/H_3-19，H_3-28、H-5/H-3，H_3-29、Ha-12/H_3-30/Hb-15，H-17、Hb-12/H_3-19，H_3-18、H-17/H_3-21和Ha-15/H_3-18有相关，推断H-3、H-5、H-17、CH_3-21、CH_3-29和CH_3-30为α构型，CH_3-18、CH_3-19和CH_3-28为β构型。同时，H-12′（δ_H 5.12）/H_3-20′（δ_H 1.60）相关表明$\Delta^{12'(13')}$双键为Z构型。因此，综合上述信息，可以确定化合物**1**的结构，并命名为ganolucinin D。

化合物**2**，黄色胶状物。根据其高分辨质谱、^{13}C NMR和DEPT谱推断其分子式为$C_{51}H_{72}O_8$（不饱和度为16）。其^{1}H NMR中观察到1组ABX信号{δ_H 7.16（1H，d，J = 3.0 Hz，H-3′），7.05（1H，dd，J = 8.9，3.0 Hz，H-5′），6.84（1H，d，J = 8.9 Hz，H-6′）}。通过其^{13}C NMR和DEPT谱可知其同样含有51个碳，为10个甲基，13个sp^{3}杂化的亚甲基（其中1个连氧，δ_C 71.2），12个次甲基（4个sp^{3}杂化，8个sp^{2}杂化，1个连氧，δ_C 76.7），以及16个不

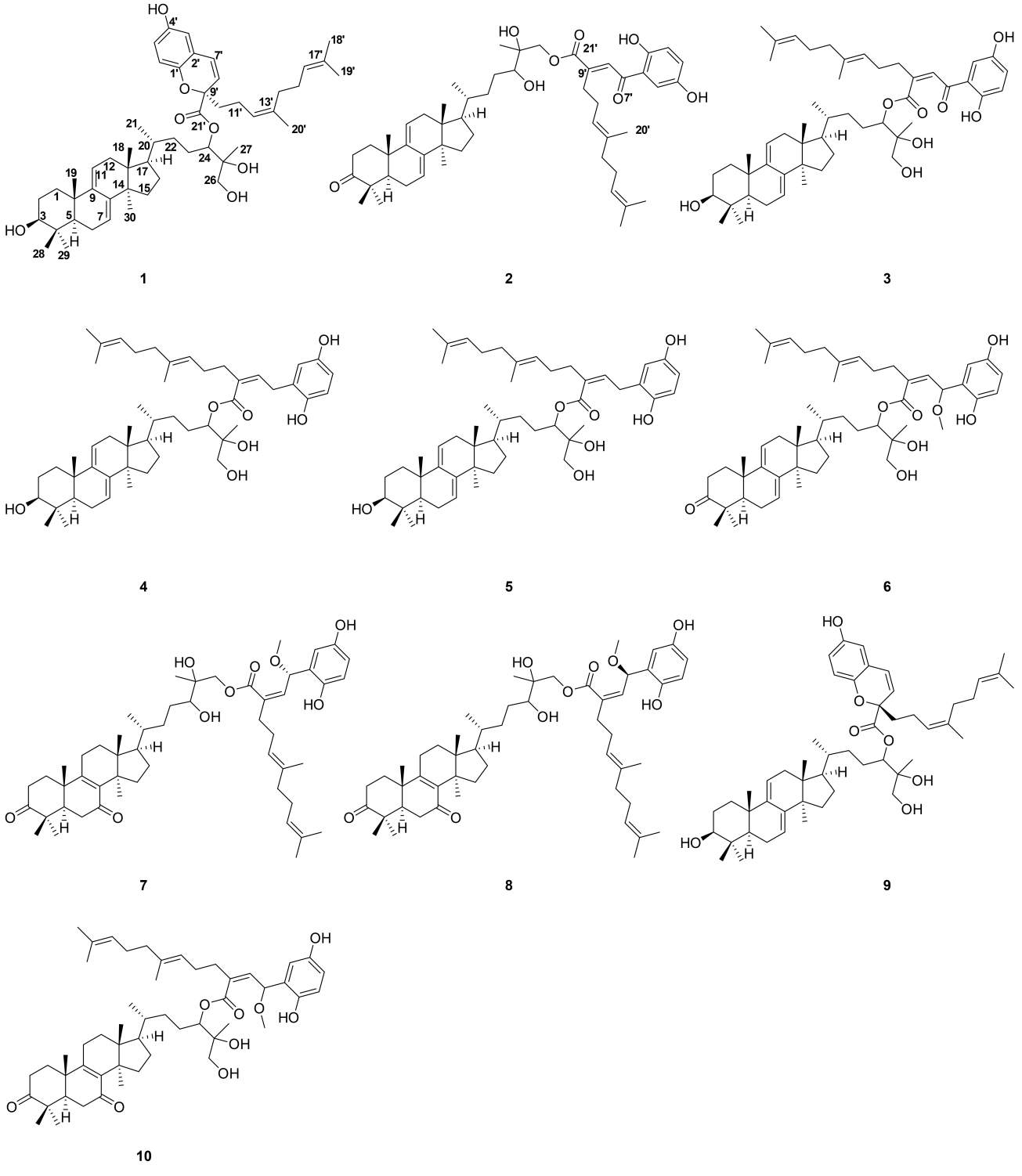
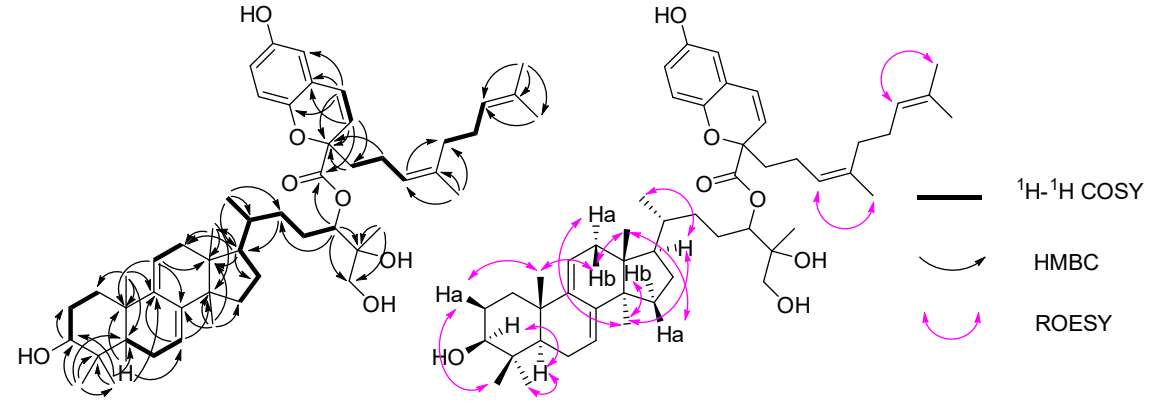


图1　化合物1–10结构

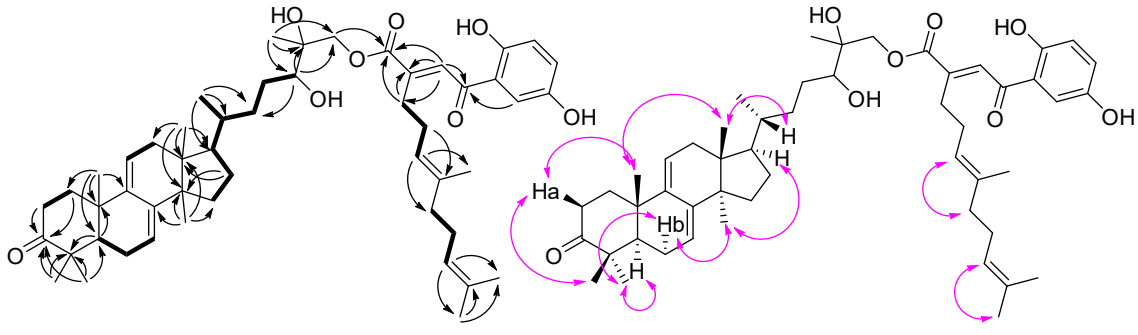
连质子的碳（其中2个酮羰基δ_C 198.7和δ_C 219.2，1个酯羰基δ_C 168.3和1个sp^3杂化的连氧季碳δ_C 74.8）。这些数据与ganoleuconin M[9]非常相似，仅有的区别在于ganoleuconin M中的C–7′位次甲基在化合物**2**中被氧化成酮羰基，这主要通过2D NMR确定。化合物**2**的HMBC谱显示出H–3′（δ_H 7.16），H–8′（δ_H 7.77）/C–7′（δ_C 198.7）相关，可证明C–7′被氧化成酮羰基。化合物**2**的ROESY谱可观察到Ha–2/H_3–19，H_3–28、H–5，Hb–6/H_3–29、H_3–30/Hb–6，H–17（δ_H 1.66）、H_3–18/H_3–19，H–20（δ_H 1.47）相关，结合其骨架特征，可推断H–5、H–17、CH_3–21、CH_3–29和CH_3–30为α构型，CH_3–18、CH_3–19和CH_3–28为β构型。此外，H–8′位的化学位移（δ_H 7.77）提示$\Delta^{8'(9')}$双键为*E*构型[10]。同

时，其ROESY图谱中H-12′（δ_H 5.07）/H_2-14′（δ_H 1.82）相关提示$\Delta^{12'(13')}$双键也为*E*构型。综合上述信息，可以确定**2**的结构，并命名为ganolucinin E。

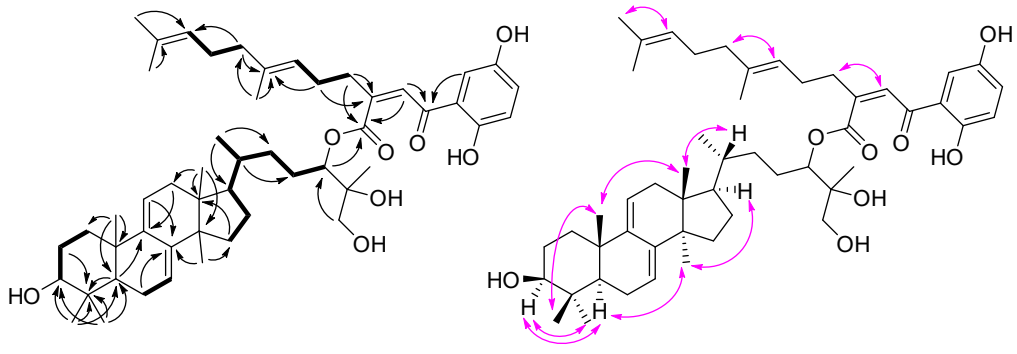
化合物**3**，黄色胶状物。根据其高分辨质谱、^{13}C NMR和DEPT谱可知其分子式为$C_{51}H_{74}O_8$（不饱和度为15）。化合物**3**的^{1}H NMR芳香区中同样存在1组ABX信号{δ_H 7.12（1H，d，*J* = 3.0 Hz，H-3′），7.02（1H，dd，*J* = 8.9，3.0 Hz，H-5′），6.82（1H，d，*J* = 8.9 Hz，H-6′）}。通过分析其^{13}C NMR和DEPT谱发现其含有51个碳，为10个甲基，13个sp^3杂化的亚甲基（其中1个连氧，δ_C 68.1），13个次甲基（5个sp^3杂化，8个sp^2杂化，2个连氧，δ_C 79.6和79.8）和15个不连质子的碳（包括1个酮羰基δ_C 199.0和1个酯羰基δ_C 168.6）。该化合物的数据与ganolucinin C[7]的数据非常相似，不同之处是ganolucinin C中C-3位为酮羰基，而在化合物**3**中C-3位连接一个羟基，并且ganolucinin C中的C-7′位为亚甲基，而在化合物**3**中C-7′为酮羰基。其HMBC谱中观察到的H_3-28，H_3-29/C-3（δ_C79.6）和H-8′，H-3′/C-7′（δ_C199.0）相关，可以证明这些变化。该化合物ROESY谱可观察到H-3/H-5，H_3-29、H-5/H_3-29/H-17和H_3-28/H_3-19/H_3-18/H-



1



2



3

图2　化合物**1**–**3**的^{1}H–^{1}H COSY、关键HMBC和ROESY相关

20相关，结合灵芝三萜化合物骨架可推断H-3、H-5、H-17、CH_3-21、CH_3-29和CH_3-30为α构型，CH_3-18、CH_3-19和CH_3-28为β构型。此外，从ROESY图谱中显示出的H-8′/H_2-10′和H-12′/H_2-14′相关可推断$\Delta^{8'(9')}$双键和$\Delta^{12'(13')}$双键分别为*Z*和*E*构型。综合上述信息，该化合物得以命名为ganolucinin F。

化合物**4**，黄色胶状物。根据其高分辨质谱、^{13}C NMR和DEPT谱推断其分子式为$C_{51}H_{76}O_7$（不饱和度为14）。该化合物^{1}H NMR谱的芳香区中存在1个典型的ABX自旋耦合系统{δ_H 6.61（1H，d，*J* = 3.0 Hz，H-3′），6.63（1H，m，H-5′），6.76（1H，d，*J* = 8.2 Hz，H-6′）}。通过其^{13}C NMR和DEPT谱可知其含有51个碳，为10个甲基，14个sp^3杂化的亚甲基（其中1个连氧，δ_C 66.7），13个次甲基（5个sp^3杂化，8个sp^2杂化，2个连氧，δ_C 79.0和76.8）和14个不连质子的碳（其中有1个酯羰基δ_C 171.1）。该化合物的核磁共振波谱数据与ganolucinin C[7]也非常相似，仅有的区别是ganolucinin C中的C-3位酮羰基在化合物**4**中被还原成羟基。该化合物HMBC图谱（见图3）中H_3-28和H_3-29/C-3（δ_C 79.0）相关可以证明这一区别。ROESY图谱中显示出H-8′/H_2-10′相关，表明$\Delta^{8'(9')}$双键为*Z*构型，H-12′/H_2-14′相关表明$\Delta^{12'(13')}$双键为*E*构型。此外，该化合物ROESY图谱中显示出H-3/H-5/H_3-30/H-17、Ha-12/H_3-30和Hb-12/H_3-19/H_3-18/H-20相关，结合羊毛甾醇骨架的特征可推断H-3、H-5、H-17、CH_3-21、CH_3-29和CH_3-30为α构型，CH_3-18、CH_3-19和CH_3-28为β构型。综上，将该化合物命名为ganolucinin G。

化合物**5**，黄色胶状物。通过分析其高分辨质谱、^{13}C NMR和DEPT谱推断分子式为$C_{51}H_{76}O_7$（不饱和度为14）。其^{1}H NMR谱存在1组ABX信号{δ_H 6.61（1H，d，*J* = 3.0 Hz，H-3′），6.63（1H，m，H-5′），6.72（1H，d，*J* = 8.6 Hz，H-6′）}。通过其^{13}C NMR和DEPT谱可知其含有51个碳，分析发现为10个甲基，14个sp^3杂化的亚甲基（其中1个连氧，δ_C 66.7），13个次甲基（5个sp^3杂化，8个sp^2杂化，2个连氧，δ_C 77.7和78.9）和14个不连质子的碳（其中有1个酯羰基δ_C 171.2）。对比发现**5**有与**4**非常相似的数据，仔细分析化合物**5**和**4**的^{1}H和^{13}C NMR数据可知，这两个化合物的区别仅在C-24位的化学位移，因此推断**5**和**4**的仅在C-24位构型上存在不同，因此将该化合物命名为ganolucinin H，也即*epi*-ganolucinin G。

化合物**6**，黄色胶状物。通过分析其高分辨质谱和NMR数据可知其具有分子式$C_{52}H_{76}O_8$（不饱和度为15）。**6**的^{1}H NMR谱同样存在1组ABX信号{δ_H 6.51（1H，d，*J* = 2.9 Hz，H-3′），6.69（1H，dd，*J* = 8.7，2.9 Hz，H-5′），6.76（1H，d，*J* = 8.7 Hz，H-6′）}。分析其^{13}C NMR和DEPT谱可知其含有52个碳，为11个甲基（其中1个连氧，δ_C 56.7），13个sp^3杂化的亚甲基（其中1个连氧，δ_C 66.8），13个次甲基（5个sp^3杂化，8个sp^2杂化，2个连氧，δ_C 77.3和79.7）和15个不连质子的碳（其中含有1个酮羰基δ_C 216.9和1个酯羰基δ_C 168.7）。这些数据与ganolucinin C[7]相似，区别仅在于ganolucinin C中的C-7′为1个亚甲基，而在**6**中C-7′的一个氢原子被1个甲氧基取代，这一区别可从**6**的HMBC相关-OC<u>H</u>$_3$（δ_H 3.42）/C-7′（δ_C 79.7）推

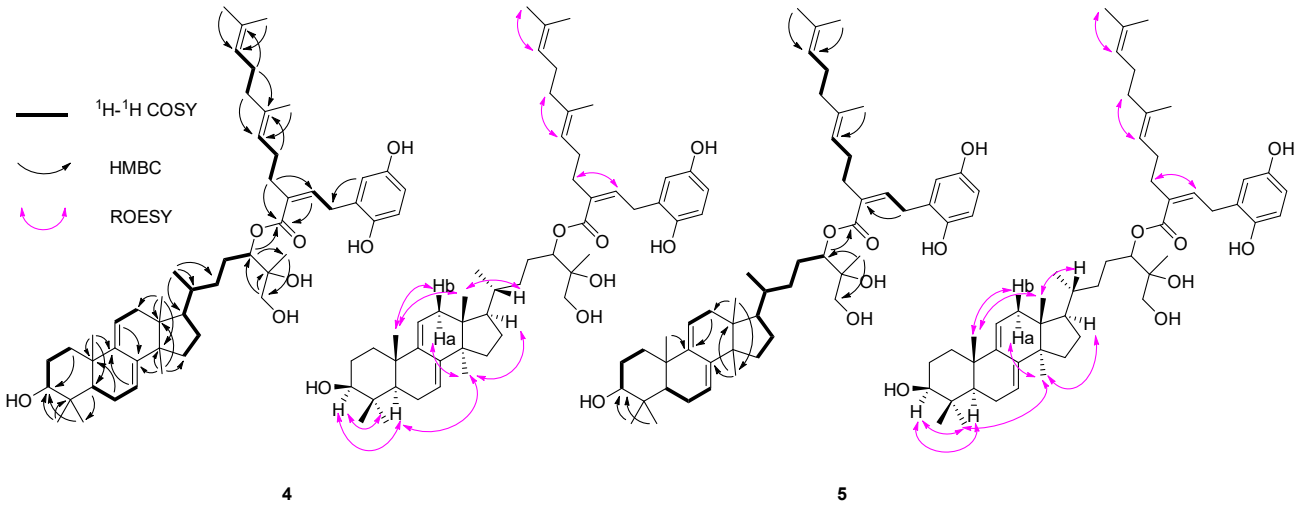


图3 化合物**4**和**5**的^{1}H-^{1}H COSY、关键HMBC和ROESY相关

断（见图4）。ROESY图谱中显示出H-8′/H_2-10′相关，表明$\Delta^{8'(9')}$双键为*Z*构型，H-12′/H_2-14′相关表明$\Delta^{12'(13')}$双键为*E*构型。此外，Ha-2/H_3-19，H_3-29、H-5/H_3-28、Ha-15，H_3-19，H-20/H_3-18、Hb-15/H_3-30和H-17/H_3-21相关表明H-5、H-17、CH_3-21、CH_3-29和CH_3-30为α构型，CH_3-18、CH_3-19和CH_3-28为β构型。综合上述信息，命名该化合物为ganolucinin I。

化合物**7**，黄色胶状物。通过分析其高分辨质谱、^{13}C NMR和DEPT谱推断分子式为$C_{52}H_{76}O_9$（不饱和度为15）。**7**的^{1}H NMR谱中显示存在1组ABX信号{δ_H 6.74（1H，d，*J* = 3.1 Hz，H-3′），6.67（1H，dd，*J* = 8.6，3.1 Hz，H-5′），6.75（1H，d，*J* = 8.6 Hz，H-6′）}。其^{13}C NMR和DEPT谱可观察

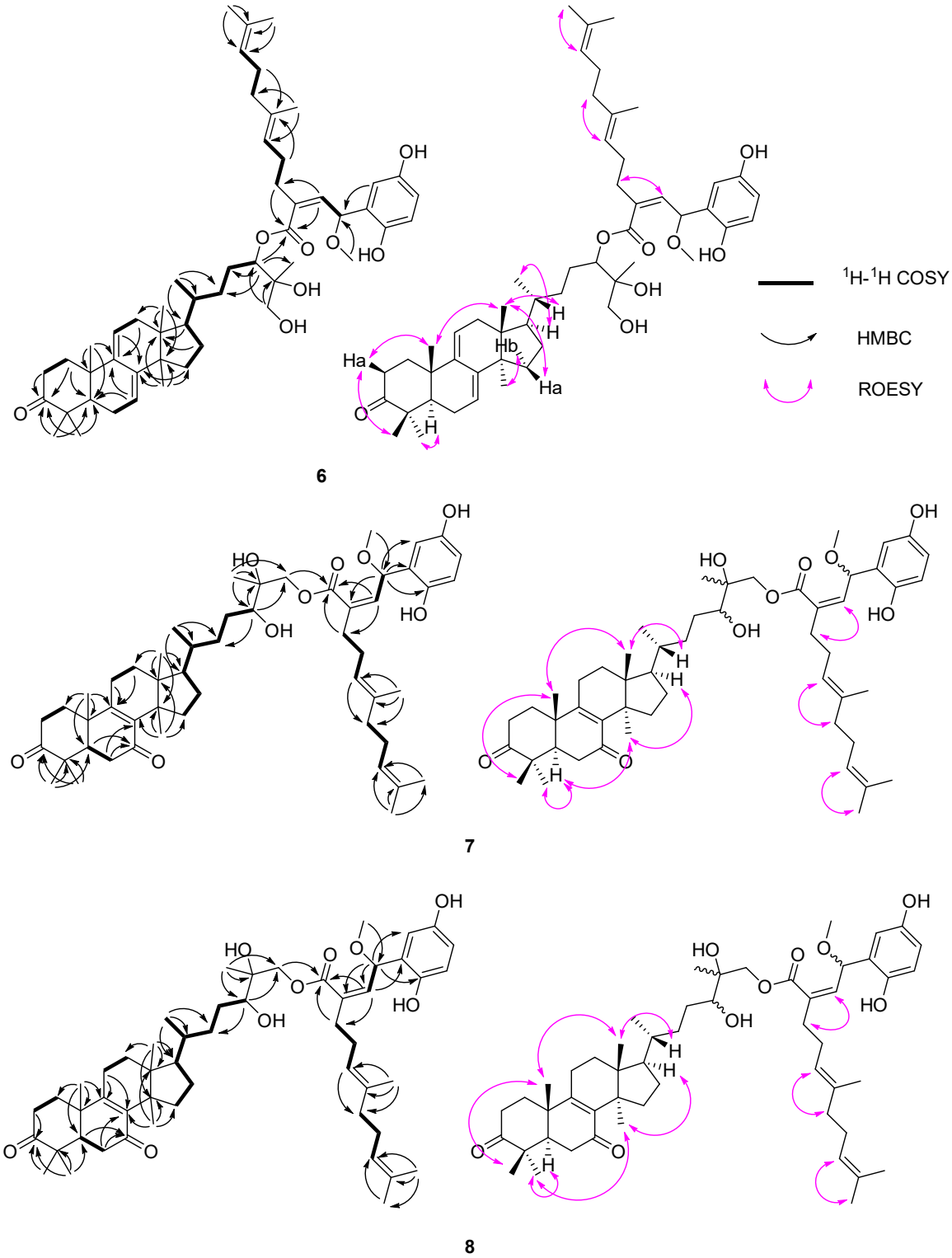


图4　化合物**6**–**8**的^{1}H–^{1}H COSY、关键HMBC和ROESY相关

到52个碳信号，为11个甲基（其中1个连氧，δ_C 56.6），14个sp^3杂化的亚甲基（其中1个连氧，δ_C 68.9），11个次甲基（5个sp^3杂化，6个sp^2杂化，2个连氧，δ_C 77.2和δ_C 78.4）和16个不连质子的碳（包括2个酮羰基δ_C 198.2和δ_C 214.7，1个酯羰基δ_C 168.7，和1个sp^3杂化的连氧季碳δ_C 74.1）。该化合物的核磁数据与ganoleuconin P[9]的核磁共振波谱数据相似，不同之处仅在于ganoleuconin P中的C-7′位次甲基在**7**中连接了一个甲氧基，成为sp^3杂化的连氧次甲基，这些不同可从其HMBC相关H-7′（δ_H 5.62）/C-1′（δ_C 148.7），C-2′（δ_C 124.8），C-3′（δ_C 114.1），C-9′（δ_C 133.4）和-OC$\underline{H}_3$（δ_H 3.38）/C-7′（δ_C 78.4）推断。**7**的ROESY图谱显示出H-5/H_3-29，H_3-30、H-17（δ_H 1.48）/H_3-30、H_3-18/H_3-19，H-20（δ_H 1.43）和H_3-19/H_3-28相关，可以推断H-5、H-17、CH_3-21、CH_3-29和CH_3-30为α构型，CH_3-18、CH_3-19和CH_3-28为β构型。同时，H-8′（δ_H 5.99）/H_2-10′（δ_H 2.37）和H-12′（δ_H 5.02）/H_2-14′（δ_H 1.91）相关提示$\Delta^{8'(9')}$双键为*Z*构型，而$\Delta^{12'(13')}$双键*E*构型。综合上述信息，命名该化合物为ganolucinin J。

化合物**8**，黄色胶状物。通过分析其高分辨质谱、^{13}C NMR和DEPT谱推断分子式为$C_{52}H_{76}O_9$（不饱和度为15）。经仔细对比化合物**7**和**8**的核磁共振波谱数据发现，这两个化合物具有相同的平面结构，不同之处是，化合物**8**中Ha-26位的化学位移比化合物**7**中向高场移动了0.06 ppm，且**8**中H_3-27和C-27位的化学位移比在7中均向低场移动。同时，**8**中H-7′位的化学位移比在**7**中向低场移动0.04 ppm，C-7′位的化学位移比在**7**中向高场移动0.06 ppm，C-8′位的化学位移比在**7**中向低场移动0.06 ppm。这些不同之处表明化合物**7**和**8**仅在C-25位和C-7′位构型不同。因此，综合上述信息，命名该化合物为ganolucinin K。

灵芝三萜由其生物合成途径决定了其骨架特征和光学纯的特性，以往大量的研究表明三萜基本上均是光学纯的化合物，而灵芝属来源的芳香杂萜除个别外，基本上都是非光学纯的，对映体以不同比例（大多情况下近似1）存在[5, 11]。在这些灵芝杂萜与三萜杂聚体中，化合物**1**、**6**、**7**和**8**的杂萜部分均含有手性中心，并且，**1**、**7**和**8**均经手性HPLC纯化得到。在使用手性HPLC纯化获得**1**时，同时获得了**9**，基于上述关于灵芝中三萜和杂萜存在形式的基本规律来看，**1**和**9**应该互为C-9′位差向异构体；同样，纯化获得**7**和**8**时同时获得了**10**，表明**7**和**8**应是C-7′的互为差向体，而由于**10**得量太少，仅能从^{1}H NMR推断**10**与**8**的构型相同，但杂萜部分与三萜部分通过C-25位羟基成酯键偶联，同样化合物**9**的得量也较少，其是化合物**1**的C-9′位差向异构体可从上述规律和^{1}H NMR特征得出结论。

值得一提的是，从平面结构来看，所有化合物均含有一个三萜结构单元，对于三萜，环系上手性中心的立体构型是容易确定的，而对于侧链上的构型确实具有挑战。侧链上C-20的构型由于有经典的^{1}H NMR差异，因此可以确定其绝对构型[12, 13]，而C-24位如果有羟基取代，理论上如果存在游离的羟基且样品量允许，是可以通过Mosher′s方法确定绝对构型的。C-25位如果形成手性，目前基本上除了单晶X-ray衍射外，还缺乏有效手段，即便是功能强大的核磁共振波谱数据量子计算及圆二色光谱量子计算。当然基于红外光谱的振动圆二色光谱（Vibrational Circular Dichroism，VCD）是有可能解决上述构型确定中面临的挑战的，但该方法往往因灵敏度问题对样品的量等的要求较高。本研究中由于样品成胶状性质并因得量较低，制约了通过衍生化培养单晶的可能，由于VCD测定对样品的要求较高，也难以适合此类化合物进一步测试。尽管C-24位没能继续通过Mosher′s方法研究其构型问题，但基于生源关系这些化合物的三萜部分C-24位可能具有与文献一致的构型。对于杂萜部分，化合物**1**和**9**的C-9′及化合物**6**-**8**的C-7′，其立体构型是难以确定的，但本次研究中获得的均是光学纯化合物。此外，通过查阅文献可知此前已有7个杂萜-三萜杂聚体类化合物[7]从赤芝中获得，结合本研究的结果，可推测尽管此类化合物产量较低，但赤芝中可产生一系列此类化合物。

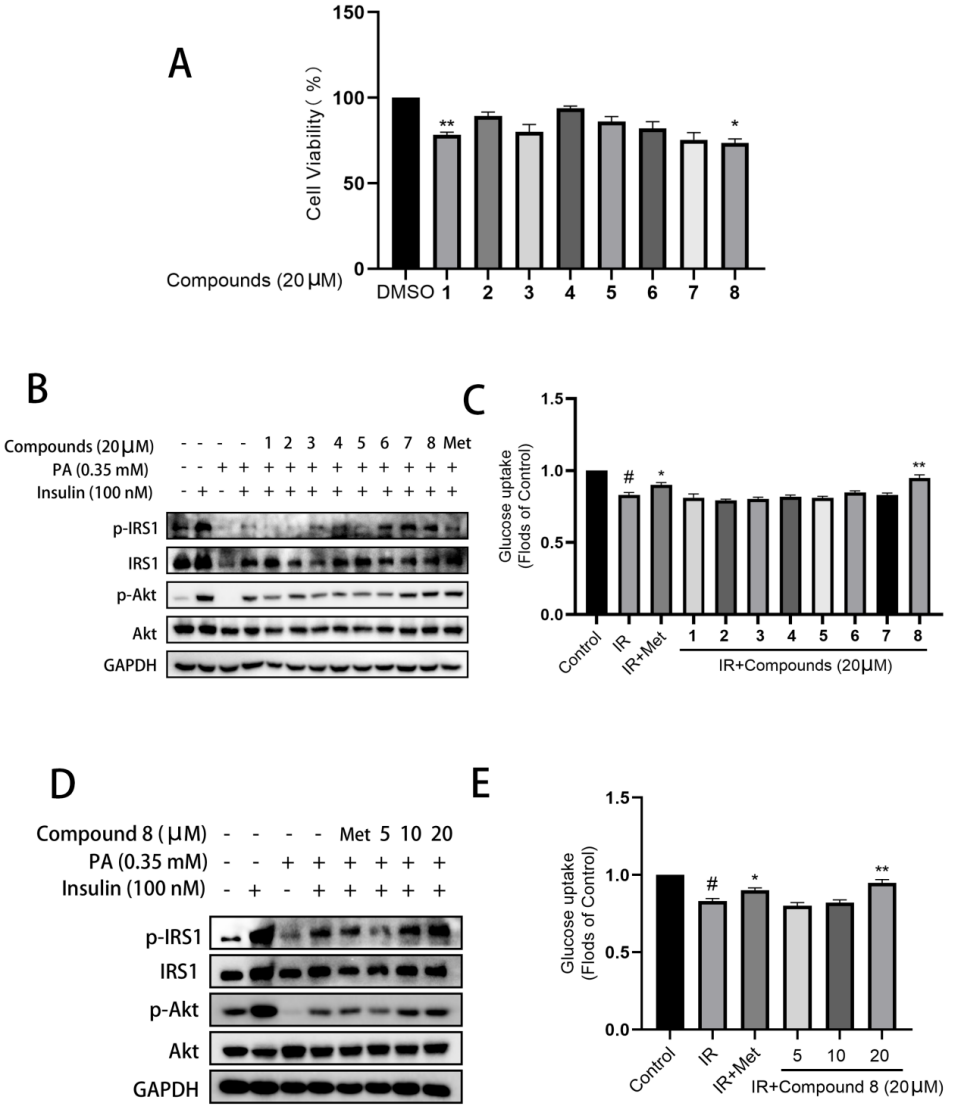
2.2 胰岛素抵抗活性检测

民间将灵芝用于糖尿病治疗，在前期研究中，我们发现一些灵芝杂萜化合物表现出明显的改善胰岛素抵抗活性，如(+)-spiroganodermaine G、(+)-lucidumone J、(−)-ganodercin Q、(+)-ganodercin R、(+)-ganodercin W、(+)-dayaolingzhiol M、ganodercin A和ganodercin D等[10, 14-17]。这些灵芝杂萜结构分属于几种不同的骨架，其中包括多个类似此类杂萜-三萜杂聚体中杂萜部分的长链杂萜，而从这些结果

推测，杂萜-三萜杂聚体也很可能具有改善胰岛素抵抗的活性。鉴于此，我们对化合物**1**–**8**进行了改善胰岛素抵抗（Insulin Resistance，IR）活性检测，以验证和延伸我们的研究，同时也为了探索更多类似物是否在改善胰岛素抵抗活性中具有共性和规律。C2C12细胞经不同化合物在20 μM处理24 h后，细胞活力CCK-8实验显示，除化合物**1**和化合物**8**外，其余化合物均无明显的细胞毒性（见图5A）。将C2C12小鼠成肌细胞用2%马血清培养4天后分化为肌管细胞，除正常对照组外，用0.35 mM棕榈酸诱导18 h建立胰岛素抵抗模型，然后给化合物干预18 h，显微镜下细胞状态良好。在PA诱导的IR模型中，磷酸化IRS1和磷酸化Akt的表达低于对照细胞。经化合物**7**和**8**干预后，磷酸化IRS1和磷酸化Akt的表达上调（见图5B~C）。当细胞分化为肌管细胞时，用100 nM胰岛素处理18 h建立IR模型，在IR细胞模型中，胰岛素刺激的葡萄糖摄取量低于对照组，所有实验组细胞状态良好，未见明显死亡，而化合物**8**提高了IR细胞的葡萄糖摄取能力。进一步的实验表明，化合物**8**以浓度依赖的方式上调磷酸化IRS1和磷酸化Akt的表达，改善IR细胞的葡萄糖摄取能力（见图5D~E）。

2.3 化合物理化数据

化合物**1**：yellow gum；UV (MeOH) λ_{max} (log ε)



（A）CCK-8法测定20 μM化合物作用于C2C12细胞24 h的细胞活力；（B）在IR模型中，化合物浓度为20 μM，蛋白免疫印迹法检测p-IRS1和p-Akt表达；（C）在IR模型中，化合物在胰岛素刺激的C2C12细胞模型中促进葡萄糖摄取作用；（D~E）化合物**8**剂量依赖地上调p-IRS1和p-Akt的表达，促进胰岛素刺激的C2C12细胞进行葡萄糖摄取。以二甲双胍（Metformin，Met）为阳性对照。与Control比较，$^{\#}P$<0.05；与insulin treatment比较，*P<0.05，**P<0.01。

图5 化合物改善胰岛素抵抗活性

331 (3.36)，235 (4.43) nm；$[\alpha]^{20}_{D}$ +65.2 (*c* 0.07，MeOH)；CD (MeOH) $\Delta\varepsilon_{218}$ −2.42，$\Delta\varepsilon_{227}$ +3.58，$\Delta\varepsilon_{331}$ +1.84；HRESIMS *m/z* 797.5347 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{51}H_{73}O_7$，797.5362)；^{1}H和^{13}C NMR数据见表1。

化合物**2**：yellow gum；UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 386 (3.40)，235 (4.33) nm；$[\alpha]^{20}_{D}$ +19.0 (*c* 0.04，MeOH)；CD (MeOH) $\Delta\varepsilon_{210}$ −0.89，$\Delta\varepsilon_{225}$ +3.02；HRESIMS *m/z* 811.5147 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{51}H_{71}O_8$，811.5154)；^{1}H和^{13}C NMR数据见表1。

化合物**3**：yellow gum；UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 371 (3.28)，252 (4.06)，243 (4.16)，235 (4.17)，203 (4.22) nm；$[\alpha]^{25}_{D}$ +13.6 (*c* 1.45，MeOH)；CD (MeOH) $\Delta\varepsilon_{235}$ +1.00，$\Delta\varepsilon_{346}$ +0.11；HRESIMS *m/z* 815.5500 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{51}H_{75}O_8$，815.5457)；^{1}H和^{13}C NMR数据见表1。

化合物**4**：yellow gum；UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 297 (3.33)，243 (4.02)，235 (4.04)，202 (4.19) nm；$[\alpha]^{25}_{D}$ +35.7 (*c* 1.58，MeOH)；CD (MeOH) $\Delta\varepsilon_{208}$ +

表1 化合物**1**–**3**的^{1}H (600 MHz)和^{13}C NMR (150 MHz)数据（氘代甲醇）

No.	**1**[a]		**2**[b]		**3**	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	Ha: 2.01 overlap	35.7	Ha: 2.36 m	37.9	Ha: 2.04 m	37.1
	Hb: 1.44 overlap		Hb: 1.73 m		Hb: 1.46 m	
2	Ha: 1.72 overlap	28.0[c]	Ha: 2.86 m	35.8	Ha: 1.72 m	28.5
	Hb: 1.66 m		Hb: 2.30 m		Hb: 1.67 m	
3	3.25 dd (11.5, 4.2)	79.0		219.2	3.16 dd (11.2, 4.7)	79.6[k]
4		38.7		49.2		39.8
5	1.10 dd (11.2, 4.4)	49.1	1.52 m	52.3[h]	1.09 dd (11.2, 4.7)	50.7
6	2.11 m	23..0	Ha: 2.24 overlap	24.7	2.10 m	24.1
			Hb: 2.09 m			
7	5.48 br d (5.9)	120.7	5.55 br d (7.1)	121.4	5.51 d (5.6)	121.6
8		142.6		144.2		144.0
9		145.9		146.0		147.4
10		37.4		38.4		38.6
11	5.31 br d (6.0)	116.2[d]	5.31 br d (5.9)	118.6	5.37 br d (6.0)	117.5
12	Ha: 2.20 dd (17.9, 5.4)	37.8	Ha: 2.24 overlap	39.1	Ha: 2.23 m	39.1
	Hb: 2.08 br d (17.9)		Hb: 2.14 dd (17.6, 6.1)		Hb: 2.10 m	
13		43.7		44.9		44.9
14		50.3		51.5		51.5
15	Ha: 1.62 m	31.5	Ha: 1.68 m	32.6	Ha: 1.65 overlap	32.7
	Hb: 1.39 m		Hb: 1.41 overlap		Hb: 1.38 m	
16	Ha: 1.72 overlap	27.8[e]	Ha: 2.05 m	28.9	Ha: 1.96 m	28.9
	Hb: 1.28 m		Hb: 1.41 overlap		Hb: 1.36 m	
17	1.54 m	50.9	1.66 m	52.4[h]	1.59 overlap	52.4
18	0.57 s	15.8[e]	0.63 s	16.2[i]	0.60 s	16.4[l]
19	0.99 s	22.7	1.23 s	22.4	1.01 s	23.3
20	1.35 overlap	36.5	1.47 m	37.9	1.29 m	37.8

续表

No.	1[a]		2[b]		3	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
21	0.91 d (6.4)	18.5	0.96 s	19.3	0.89 ovelap	19.0
22	Ha: 1.44 overlap	33.0	Ha: 1.86 overlap	34.8	Ha: 1.53 m	34.3
	Hb: 0.94 m		Hb: 1.05 m		Hb: 0.96 m	
23	Ha: 1.92 m	25.3	Ha: 1.86 overlap	28.5[j]	Ha: 1.87 m	26.9
	Hb: 1.35 overlap		Hb: 1.22 m		Hb: 1.23 m	
24	4.68 dd (10.4, 1.2)	77.7	3.47 br d (9.6)	76.7	4.94 dd (9.9, 2.2)	79.8[k]
25		73.2		74.8		74.9
26	Ha: 3.15 d (12.2)	66.5	4.25 s	71.2	Ha: 3.36 br d (12.3)	68.1
	Hb: 3.08 d (12.2)				Hb: 3.31 overlap	
27	0.82 s	17.5	1.21 s	19.3	0.94 s	19.2
28	0.89 s	15.7[e]	1.14 s	22.9	0.88 s	16.5[l]
29	1.01 s	28.1	1.06 s	25.9	0.99 s	28.8
30	0.87 s	25.7[f]	0.90 s	26.0	0.89 overlap	26.1
1′		147.1		157.2		156.9
2′		120.9		121.4		120.7
3′	6.51 d (2.9)	113.2	7.16 d (3.0)	116.1	7.12 d (3.0)	116.7
4′		150.0		150.9		150.9
5′	6.64 dd (8.6, 2.9)	116.3[d]	7.05 dd (8.9, 3.0)	126.7	7.02 dd (8.9, 3.0)	126.3
6′	6.79 d (8.6)	116.7	6.84 d (8.9)	119.9	6.82 d (8.9)	119.6
7′	6.44 d (9.7)	125.5[g]		198.7		199.0
8′	5.77 d (9.7)	125.3[g]	7.77 s	133.8	6.89 s	132.3
9′		80.9		145.0		143.7
10′	Ha: 2.01 overlap	38.2	2.67 t (7.5)	29.3	2.51 t (7.4)	35.0
	Hb: 1.97 overlap					
11′	2.27 m	22.4	2.24 m	28.6[j]	2.35 dd (14.1, 7.4)	27.8
12′	5.12 t (6.5)	122.7	5.07 t (7.5)	124.0	5.22 t (6.6)	123.8
13′		136.4		137.7		138.1
14′	1.97 overlap	39.7	1.82 m	40.7	2.04 m	40.8
15′	2.05 m	26.6	1.96 m	27.6	2.10 m	27.8
16′	5.08 t (6.9)	124.2	5.01 t (7.1)	125.4	5.11 t (6.9)	125.4
17′		131.4		132.1		132.2
18′	1.68 s	25.6[f]	1.64 s	25.9	1.65 overlap	25.9
19′	1.60 overlap	17.7	1.55 overlap	17.8	1.59 overlap	17.8
20′	1.60 overlap	16.1	1.55 overlap	16.3[i]	1.68 s	16.4[l]
21′		174.1		168.3		168.6

[a] Recorded in $CDCl_3$.

[b] ^1H NMR recorded at 500 MHz.

[c,d,e,f,g,h,i,j,k,l] Signals with the same symbol might be interchangeable.

1.25，$\Delta\varepsilon_{237}$ +1.78；HRESIMS *m/z* 799.5502 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{51}H_{75}O_7$，799.5518)；^1H 和 ^{13}C NMR 数据见表2。

化合物**5**：yellow gum；UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 297 (3.37)，243 (4.10)，234 (4.14)，203 (4.28) nm；$[\alpha]^{25}_D$ +19.0 (*c* 1.27，MeOH)；CD (MeOH) $\Delta\varepsilon_{202}$ −2.39，$\Delta\varepsilon_{242}$ +1.72；HRESIMS *m/z* 801.5679 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{51}H_{77}O_7$，801.5664)；^1H 和 ^{13}C NMR 数据见表2。

化合物**6**：yellow gum；UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 303 (3.48)，242 (4.23)，235 (4.26)，203 (4.32) nm；$[\alpha]^{25}_D$ +28.4 (*c* 0.32，MeOH)；CD (MeOH) $\Delta\varepsilon_{220}$ −8.54，$\Delta\varepsilon_{255}$ +2.50，$\Delta\varepsilon_{309}$ +0.66；HRESIMS *m/z* 827.5469 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{52}H_{75}O_8$，827.5467)；^1H 和 ^{13}C NMR数据见表2。

化合物**7**：yellow gum；UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 300 (3.52) nm；$[\alpha]^{20}_D$ +44.7 (*c* 0.05，MeOH)；CD (MeOH) $\Delta\varepsilon_{214}$ +13.83，$\Delta\varepsilon_{254}$ −4.43，$\Delta\varepsilon_{320}$ +1.48；HRESIMS *m/z* 843.5392 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{52}H_{75}O_9$，843.5417)；^1H 和 ^{13}C NMR数据见表3。

化合物**8**：yellow gum；UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 299 (3.44) nm；$[\alpha]^{20}_D$ −16.9 (*c* 0.16，MeOH)；CD (MeOH) $\Delta\varepsilon_{242}$ −6.52，$\Delta\varepsilon_{327}$ +0.76；HRESIMS *m/z* 843.5397 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{52}H_{75}O_9$，843.5417)；^1H 和 ^{13}C NMR数据见表3。

表2 化合物**4**–**6**的 ^1H (600 MHz)和 ^{13}C NMR(150 MHz)数据（氘代氯仿）

No.	**4**		**5**		**6**	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	Ha: 1.85 m	24.8	Ha: 1.84 m	25.3	Ha: 2.28 m	36.6
	Hb: 1.71 m		Hb: 1.72 m		Hb: 1.75 m	
2	Ha: 1.71 m	27.7[a]	Ha: 1.72 m	27.7[e]	Ha: 2.77 dt (14.6, 5.7)	34.8
	Hb: 1.64 m		Hb: 1.64 m		Hb: 2.35 m	
3	3.24 br d (8.0)	79.0	3.25 dd (11.6, 4.2)	78.9		216.9
4		38.7		38.7		47.6
5	1.09 m	49.1	1.08 m	49.1	1.51 m	50.7[h]
6	2.08 m	23.0	2.09 m	23.0	Ha: 2.20 m	23.6
					Hb: 2.03 m	
7	5.47 d (5.8)	120.3	5.46 d (6.0)	120.3	5.49 d (6.5)	119.8
8		142.5		142.6		142.9
9		145.9		145.9		144.4
10		37.4		37.3		37.2
11	5.31 br d (6.0)	116.2	5.31 br d (6.0)	116.2	5.37 br d (6.2)	117.3
12	Ha: 2.17 m	37.8	Ha: 2.20 m	37.8	Ha: 2.23 m	37.7
	Hb: 2.06 m		Hb: 2.05 m		Hb: 2.10 m	
13		43.8		43.8		43.7
14		50.3		50.3		50.2
15	Ha: 1.60 overlap	31.5	Ha: 1.56 overlap	31.5	Ha: 1.54 m	31.5
	Hb: 1.37 m		Hb: 1.36 m		Hb: 1.33 m	
16	Ha: 1.93 m	27.9[a]	Ha: 1.92 m	27.9[e]	Ha: 1.83 m	27.7[i]
	Hb: 1.25 m		Hb: 1.25 m		Hb: 1.16 m	
17	1.53 m	50.8	1.56 overlap	50.8	1.51 m	50.8[h]
18	0.56 s	15.7[b]	0.55 s	15.6[f]	0.50 s	15.6
19	0.98 s	22.7	0.98 s	22.7	1.19 s	22.0
20	1.43 m	34.8	1.40 m	34.8	1.30 m	36.3
21	0.91 d (6.4)	18.4	0.92 d (6.5)	18.5	0.86 d (6.4)	18.4
22	Ha: 1.43 m	32.7	Ha: 1.43 m	33.2	Ha: 1.40 m	33.3
	Hb: 1.09 m		Hb: 1.08 m		Hb: 0.99 m	
23	Ha: 2.00 m	26.6	Ha: 1.99 m	26.6	Ha: 1.99 m	25.1

续表

No.	4		5		6	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
	Hb: 1.71 m		Hb: 1.72 m		Hb: 1.47 m	
24	4.98 dd (10.6, 1.4)	76.8[d]	4.93 dd (10.1, 1.7)	77.7	4.76 dd (10.5, 1.4)	77.3
25		73.3		73.3		73.3
26	Ha: 3.49 overlap	66.7	Ha: 3.47 overlap	66.7	Ha: 3.37 dd (12.1, 3.8)	66.8
	Hb: 3.22 dd (11.4, 3.5)		Hb: 3.31 dd (10.9, 4.8)		Hb: 3.22 m	
27	1.13 s	18.2	1.12 s	18.1	1.07 s	17.7[j]
28	0.88 s	25.7[c]	0.88 s	25.8[g]	1.09 s	25.3
29	1.00 s	28.1	1.00 s	28.1	1.13 s	22.5
30	0.87 s	15.8[b]	0.87 s	15.8[f]	0.83 s	18.4
1′		149.2		149.2		149.1
2′		124.0		124.0		123.9
3′	6.61 d (3.0)	115.0	6.61 d (3.0)	115.0	6.51 d (2.9)	114.5
4′		148.9		148.9		149.0
5′	6.63 m	117.0	6.63 m	117.0	6.69 dd (8.7, 2.9)	116.6
6′	6.76 d (8.2)	117.0	6.72 d (8.6)	117.0	6.76 d (8.7)	118.1
7′	3.63 m	31.7	3.62 m	31.7	5.12 d (9.1)	79.7
8′	6.00 t (8.7)	141.0	5.99 t (8.7)	140.8	6.89 d (9.1)	139.0
9′		130.9		131.0		134.5
10′	2.27 t-like (7.6)	34.2	2.26 m	34.2	2.54 t (7.9)	27.8[i]
11′	2.13 dd (14.9, 7.2)	27.8[a]	2.12 dd (14.2, 7.4)	27.8[e]	2.12 m	27.7[i]
12′	5.03 m	122.4	5.04 m	122.4	5.16 t (6.7)	122.6
13′		136.6		136.5		136.7
14′	1.93 m	39.6	1.92 m	39.6	1.99 m	39.7
15′	2.00 m	35.7	1.99 m	35.7	2.07 m	26.6
16′	5.06 m	124.2	5.04 m	124.2	5.10 t (6.9)	124.1
17′		131.4		131.0		131.6
18′	1.67 s	25.6[c]	1.67 s	25.6[g]	1.69 s	25.7
19′	1.59 s	17.7	1.59 s	17.7	1.61 overlap	17.6[j]
20′	1.55 s	16.1	1.55 s	16.1	1.61 overlap	16.1
21′		171.1		171.2		168.7
$-OCH_3$					3.42 s	56.7

[a,b,c,e,f,g,h,i,j] Signals with the same symbol might be interchangeable.

[d] Signal was recorded from HMBC spectrum.

表3 化合物7和8的^{1}H (500 MHz)和^{13}C NMR (150 MHz)数据（氘代氯仿）

No.	7		8	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	Ha: 2.14 overlap	35.3	Ha: 2.15 overlap	35.3
	Hb: 1.81 overlap		Hb: 1.82 overlap	
2	Ha: 2.70 ddd (15.9, 12.2, 6.8)	34.3[a]	Ha: 2.70 ddd (15.9, 12.3, 6.7)	34.4[d]
	Hb: 2.46 ddd (15.9, 6.0, 3.2)		Hb: 2.46 ddd (15.9, 6.0, 3.2)	
3		214.7		214.7
4		47.2		47.2
5	2.14 overlap	50.4	2.15 overlap	50.4
6	Ha: 2.54 m	37.1	Ha: 2.54 m	37.1

续表

No.	7		8	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
	Hb: 2.37 overlap		Hb: 2.37 overlap	
7		198.2		198.3
8		139.5		139.5
9		162.9		163.0
10		39.4		39.4
11	2.32 overlap	23.8	2.32 overlap	23.8
12	Ha: 2.32 overlap	30.1	Ha: 2.32 overlap	30.1
	Hb: 1.81 overlap		Hb: 1.82 overlap	
13		44.9		44.9
14		47.7		47.8
15	Ha: 2.09 m	31.9	Ha: 2.09 m	31.9
	Hb: 1.71 overlap		Hb: 1.71 overlap	
16	Ha: 1.96 m	28.6	Ha: 1.95 m	28.6
	Hb: 1.38 m		Hb: 1.36 m	
17	1.48 m	49.0	1.47 m	48.9
18	0.68 s	15.9[b]	0.68 s	15.9[e]
19	1.34 s	17.9[c]	1.34 s	17.9[f]
20	1.43 m	36.6	1.42 m	36.5
21	0.93 d (5.4)	18.9	0.93 d (6.3)	18.9
22	Ha: 1.76 m	33.4	Ha: 1.76 m	33.5
	Hb: 1.03 m		Hb: 1.03 m	
23	Ha: 1.71 overlap	28.0	Ha: 1.71 overlap	27.9
	Hb: 1.23 m		Hb: 1.21 m	
24	3.42 t-like (7.4)	77.2	3.41 dd (10.0, 3.6)	77.2
25		74.1		74.0
26	Ha: 4.44 d (11.5)	68.9	Ha: 4.38 d (11.5)	69.0
	Hb: 4.17 d (11.5)		Hb: 4.18 d (11.5)	
27	1.21 s	20.4	1.24 s	20.9
28	1.12 s	21.4	1.12 s	21.4
29	1.10 s	25.3	1.10 s	25.3
30	0.94 s	24.9	0.94 s	24.9
1′		148.7		148.7
2′		124.8		125.0
3′	6.74 d (3.1)	114.1	6.74 d (3.0)	114.1
4′		149.2		149.2
5′	6.67 dd (8.6, 3.1)	116.2	6.67 dd (8.6, 3.0)	116.3
6′	6.75 d (8.6)	118.1	6.76 d (8.6)	118.1
7′	5.62 d (9.2)	78.4	5.66 d (9.2)	77.8
8′	5.99 d (9.2)	139.0	6.00 d (9.2)	139.6
9′		133.4		133.1
10′	2.37 overlap	34.4[a]	2.37 overlap	34.2[d]
11′	2.14 overlap	27.0	2.15 overlap	27.1
12′	5.02 t (7.2)	122.2	5.02 t (6.8)	122.2
13′		136.8		136.8
14′	1.91 m	39.6	1.91 m	39.6

续表

No.	7		8	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
15′	1.99 m	26.6	1.99 m	26.6
16′	5.05 t (6.8)	124.2	5.05 t (6.9)	124.2
17′		131.4		131.4
18′	1.67 s	25.7	1.67 s	25.7
19′	1.58 s	17.7[c]	1.59 s	17.7[f]
20′	1.52 s	16.1[b]	1.52 s	16.1[e]
21′		168.7		168.6
$-OCH_3$	3.38 s	56.6	3.37 s	56.6

[a,b,c,d,e,f] Signals with the same symbol might be interchangeable.

3 结论

灵芝中三萜有大量研究，灵芝中杂萜研究主要集中于近10年，而杂萜-三萜杂聚体目前的数量还不是很多。本文报道了从赤芝中获得的8个杂萜-三萜杂聚体，以及它们改善胰岛素抵抗的体外活性。该结果不仅提示赤芝中可能含有一系列此类化合物，且灵芝民间抗糖尿病有其物质基础，并可能与杂萜-三萜杂聚体有关。化合物**7**和**8**能够上调IRS1和Akt磷酸化，同时，化合物**8**促进C2C12细胞葡萄糖摄取，一方面表明它们具有成为抗糖尿病先导化合物可能，同时随着有机合成手段的介入，其构型及构型对于活性的影响也将被进一步阐明，此外，本研究提示将杂萜-三萜杂聚体作为灵芝抗糖尿病质量标志物也许值得进一步重视。

参 考 文 献

[1] LUO H, TAN D, PENG B, et al. The pharmacological rationales and molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* polysaccharides for the therapeutic applications of multiple diseases[J]. Am J Chinese Med, 2022, 53(1): 53-90.

[2] HSU K D, CHENG K C. From nutraceutical to clinical trial: frontiers in *Ganoderma* development[J]. Appl Microbiol Biot, 2018, 102(21): 9037-9051.

[3] MOTHANA R A A, JANSEN R, JULICH W D, et al. Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*[J]. J Nat Prod, 2000, 63(3): 416-418.

[4] GERIS R, SIMPSON T J. Meroterpenoids produced by fungi[J]. Nat Prod Rep, 2009, 26(8): 1063-1094.

[5] JIANG M, WU Z, LIU L, et al. The chemistry and biology of fungal meroterpenoids (2009-2019) [J]. Org Biomol Chem, 2021, 19(8): 1644-1704.

[6] YAN Y M, AI J, ZHOU L L, et al. Lingzhiols, unprecedented rotary door-shaped meroterpenoids as potent and selective inhibitors of p-Smad3 from *Ganoderma lucidum*[J]. Org Lett, 2013, 15(21): 5488-5491.

[7] CHEN B S, TIAN J, ZHANG J J, et al. Triterpenes and meroterpenes from *Ganoderma lucidum* with inhibitory activity against HMGs reductase, aldose reductase and α-glucosidase[J]. Fitoterapia, 2017, 120: 6-16.

[8] LI G H, LI Y, MEI X L, et al. Study progress on triterpenoids in *Ganoderma lucidum*[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2015, 46(12): 1858-1862.

[9] WANG K, BAO L, XIONG W P, et al. Lanostane triterpenes from the tibetan medicinal mushroom *Ganoderma leucocontextum* and their inhibitory effects on HMG-CoA reductase and α-glucosidase[J]. J Nat Prod, 2015, 78(8): 1977-1989.

[10] QIN F Y, ZHANG J J, WANG D W, et al. Direct determination of *E* and *Z* configurations for double bond in bioactive meroterpenoids from *Ganoderma* mushrooms by diagnostic ^{1}H NMR chemical shifts and structure revisions of previous analogues[J]. J Funct Foods, 2021, 87: 104758.

[11] BABY S, JOHNSON A J, GOVINDAN B. Secondary metabolites from *Ganoderma*[J]. Phytochemistry, 2015, 114: 66-101.

[12] MIJARES A, CARGILL D I, GLASEL J A, et al. C-20 epimers of 20-hydroxycholesterol[J]. J Org Chem, 1967, 32(3): 810-812.

[13] NES W R, VARKEY T E, CRUMP D R, et al. (*Z*)-17(20)-Dehydrocholesterol. A new sterol with C-21 and C-22 spatially fixed[J]. J Org Chem, 1976, 41(21): 3429-

3433.

[14] ZHANG J J, WANG D W, PENG Y L, et al. Spiroganodermaines A-G from *Ganoderma* species and their activities against insulinresistance and renal fibrosis [J]. Phytochemistry, 2022, 202: 113324.

[15] ZHANG J J, WANG D W, PENG Y L, et al. Structural characterization of minor optically pure and impure meroterpenoid-type compounds in *Ganoderma lucidum* and structure revision of spirolingzhine D[J]. Tetrahedron, 2022, 125: 133039.

[16] ZHANG J J, WANG D W, CAI D, et al. Meroterpenoids from *Ganoderma lucidum* mushrooms and their biological roles in insulin resistance and triple negative breast cancer [J]. Front Chem, 2021, 9: 772740.

[17] QIN F Y, WANG D W, XU T, et al. Meroterpenoids containing benzopyran or benzofuran motif from *Ganoderma cochlear*[J]. Phytochemistry, 2022, 199: 113184.

（上接第14页）

[51] FINDLOW J, BAYLISS C D, BEERNINK P T, et al. Broad vaccine protection against *Neisseria meningitidis* using factor H binding protein[J]. Vaccine, 2020, 38(49): 7716-7727.

[52] OLAYA-ABRIL A, PRADOS-ROSALES R, MCCONNELL M J, et al. Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by Streptococcus pneumoniae[J]. J Proteomics, 2014, 106: 46-60.

[53] PRADOS-ROSALES R, CARREÑO L J, BATISTA-GONZALEZ A, et al. Mycobacterial membrane vesicles administered systemically in mice induce a protective immune response to surface compartments of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. mBio, 2014, 5(5): e01921-14.

[54] GROGAN J, ROOS K. Serogroup B *Meningococcus* outbreaks, prevalence, and the case for standard vaccination[J]. Curr Infect Dis Rep, 2017, 19(9): 30.

[55] HUANG W, WANG S, YAO Y, et al. Employing *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles as an antigen delivery platform elicits protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infection[J]. Sci Rep, 2016, 6: 37242.

[56] SALVERDA M L, MEINDERTS S M, HAMSTRA H J, et al. Surface display of a borrelial lipoprotein on meningococcal outer membrane vesicles[J]. Vaccine, 2016, 34(8): 1025-1033.

[57] BITTO N J, KAPARAKIS-LIASKOS M. The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): 1287.

[58] YUAN J, YANG J, HU Z, et al. Safe staphylococcal platform for the development of multivalent nanoscale vesicles against viral infections[J]. Nano Lett, 2018, 18 (2): 725-733.

[59] CHEN G, BAI Y, LI Z, et al. Bacterial extracellular vesicle-coated multi-antigenic nanovaccines protect against drug-resistant *Staphylococcus aureus* infection by modulating antigen processing and presentation pathways [J]. Theranostics, 2020, 10(16): 7131-7149.

[60] GAO F, XU L, YANG B, et al. Kill the real with the fake: Eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* using nanoparticle coated with its extracellular vesicle membrane as active-targeting drug carrier[J]. ACS Infect Dis, 2019, 5(2): 218-227.

[61] CAO Z, LIU J. Bacteria and bacterial derivatives as drug carriers for cancer therapy[J]. J Control Release, 2020, 326: 396-407.

[62] ZHANG Y, FANG Z, LI R, et al. Design of outer membrane vesicles as cancer vaccines: A new toolkit for cancer therapy[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(9): 1314.

[63] KIM O Y, PARK H T, DINH N T H, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response[J]. Nat Commun, 2017, 8 (1): 626.

[64] CHANDRA D, SELVANESAN B C, YUAN Z, et al. 32-Phosphorus selectively delivered by listeria to pancreatic cancer demonstrates a strong therapeutic effect[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 20729-20740.