

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-031

## 基因工程辅助萝卜硫苷在十字花科作物中的高效生物合成

刘晓悦, 王盼娣, 吴刚, 刘芳

(中国农业科学院油料作物研究所, 农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 农业农村部植物生态环境安全监督检验测试中心, 湖北 武汉 430062)

**摘要:** 植物次级代谢物萝卜硫苷 (glucoraphanin, GRA) 是一种由蛋氨酸衍生的硫代葡萄糖苷 (glucosinolate, GSL), 性质相对稳定, 其本身及水解后活性产物萝卜硫素 (sulforaphane, SFN) 在抵抗癌症、神经保护等方面发挥重要作用, 在食品营养和科学研究中受到广泛关注。本文将综述 GRA 的理化性质、来源、生物学功能、合成途径以及当前生产现状, 并进一步探讨未来 GRA 高效生物合成的潜力策略。GRA 合成路径复杂, 包括侧链延伸、核心结构形成以及侧链修饰三个阶段, 可经植物内源黑芥子酶 (myrosinase, MYR) 或肠道微生物转化为具有生物活性的 SFN 等物质。西蓝花等十字花科作物中 GRA 含量较高, 是当前 GRA 的主要来源作物, 但其存在种植周期较长、产量不稳、提取率低等问题, 开发经济且可再生的 GRA 新资源将极大地推进 GRA 开发应用。随着 GRA 生物合成及调控路径的明晰, 基因工程辅助 GRA 的高效生物合成展现出巨大的潜力, 也提示突破主流的单基因调控策略, 聚合多基因多维度协同提高 GRA 合成的潜力。本文聚焦基因工程辅助十字花科作物高效生产 GRA 这一目标, 系统地梳理了 GRA 合成各阶段的潜在候选基因并从富集部位角度指出了具高应用价值的底盘作物, 期为将来通过基因工程和分子育种技术调控植物中 GRA 的生物合成、实现 GRA 大规模可持续生产, 提供一定的思路和策略。

**关键词:** 萝卜硫苷 (GRA); 萝卜硫素 (SFN); 抗癌; 基因工程; 十字花科作物

**中图分类号:** Q812 **文献标志码:** A

## Efficient biosynthesis of glucoraphanin in Brassicaceae crops by genetic engineering

LIU Xiaoyue, WANG Pandi, WU Gang, LIU Fang

(Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Breeding of Oil Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Plant Ecological Environment Safety Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430062, Hubei, China)

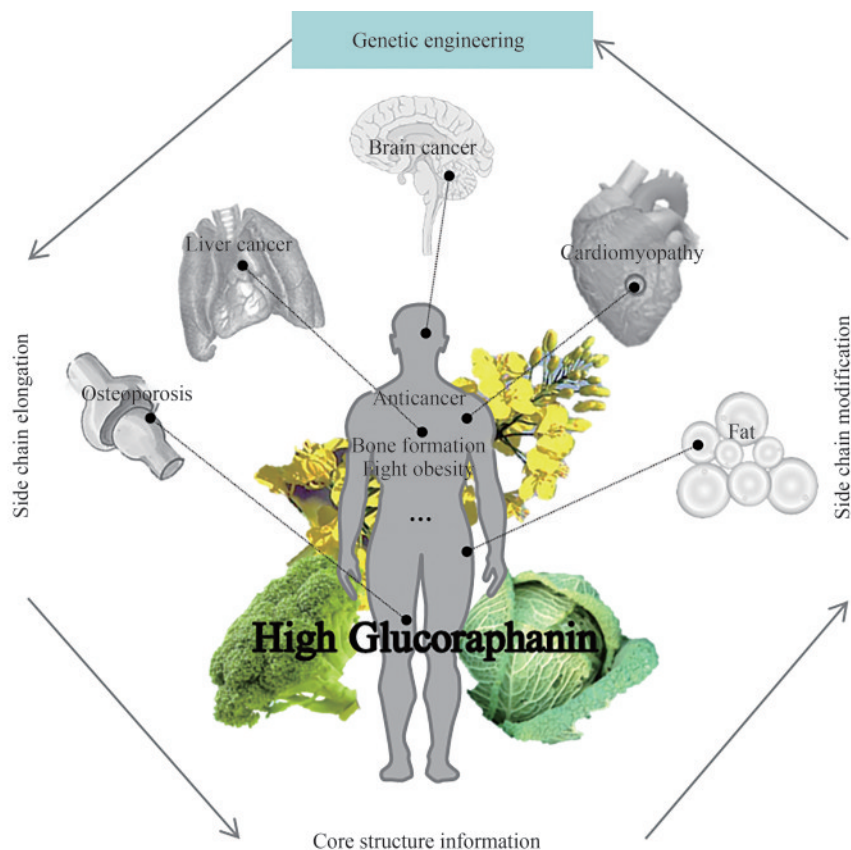
**Abstract:** Glucoraphanin (GRA), a secondary metabolite of plants, is a glucosinolate (GSL) derived from methionine. It is relatively stable in nature, and both GRA and its degradation product sulforaphane (SFN) play

收稿日期: 2024-03-28 修回日期: 2024-05-30

引用本文: 刘晓悦, 王盼娣, 吴刚, 刘芳. 基因工程辅助萝卜硫苷在十字花科作物中的高效生物合成[J]. 合成生物学, 2025, 6(1): 136-156

Citation: LIU Xiaoyue, WANG Pandi, WU Gang, LIU Fang. Efficient biosynthesis of glucoraphanin in Brassicaceae crops by genetic engineering[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(1): 136-156

important roles in anticancer, neuroprotection, and other broad biological functions and health-benefits, and in particular, SFN has been reported as the best natural product for anticancer. In this article, we review the physicochemical properties, sources, biological functions, synthetic pathways, current production status of GRA, and discuss the potential strategy for the efficient biological synthesis of GRA in the future. The synthesis pathway of GRA involves three stages: side chain elongation, core structure information, and side chain modification. GRA can be converted into SFN and other active compounds by plant myrosinase (MYR) and intestinal microorganisms. Brassicaceae crops such as broccoli have high levels of GRA, and are currently the main source of GRA. However, the cultivation cycle of GRA-rich plants is long, and its extraction yield is low. Therefore, the development of economical and renewable new resources of GRA will greatly advance its applications. With the elucidation of the biosynthesis and regulation pathways of GRA, its genetic engineering-assisted efficient biological synthesis shows great potential, suggesting that the possibility for developing strategies with the manipulation of multiple genes for regulated expression at different dimensions to synthesize GRA more efficiently compared to the current mainstream strategy through manipulating single genes. This review focuses on the genetic engineering-assisted efficient biosynthesis of GRA in Brassicaceae crops, systematically outlining potential genes for engineering at each stage of GRA synthesis and highlights chassis crop species from the perspective of enrichment organs, aiming to providing ideas and strategies for the future regulation of GRA biosynthesis in plants through transgenic technology and molecular breeding for large-scale sustainable production of GRA.



**Keywords:** glucoraphanin; sulforaphane; anti-cancer; genetic engineering; Brassicaceae crops

全国癌症患者数量不断攀升,严重影响个人乃至社会的精神及经济面貌,而适量食用十字花科蔬菜可显著降低患癌风险。研究发现,这主要得益于十字花科中的萝卜硫苷(4-methylsulfinylbut-3-enyl glucosinolate, glucoraphanin, GRA) [图1(a)]。蔬菜在食用过程中被咀嚼或机械破碎,细胞中的GRA释放,植物内源黑芥子酶(myrosinase, MYR)或肠道微生物将其转化为具生物活性的异硫氰酸盐(isothiocyanate, ITC)类代谢物,其中萝卜硫素(4-methylsulfinylbutyl glucosinolate, sulforaphane, SFN) [图1(b)]已被广泛报道为预防癌症的最佳天然产物<sup>[1]</sup>。GRA属植物次级代谢物硫代葡萄糖苷(芥子油苷,硫苷, glucosinolate, GSL)中的一种。植物中发现130多种天然GSL,根据前体氨基酸不同分为脂肪族GSL(aliphatic GSL,来源于蛋氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、吲哚族GSL(indolic GSL,来源于色氨酸)、芳香族GSL(aromatic GSL,来源于苯丙氨酸和酪氨酸)三类<sup>[2]</sup>,在不同植物中含量不同。GRA由蛋氨酸衍生而来,主要分布于十字花科植物<sup>[1]</sup>,其中西蓝花(*Brassica oleracea* var. *italica*)种子中含量较高<sup>[3]</sup>。广泛的临床实验发现,SFN可发挥抗氧化、抗炎、阻断细胞周期、诱导细胞凋亡等作用,每人每天摄入9.9~847  $\mu\text{mol}$  (中位剂量100  $\mu\text{mol}$ ) SFN或25~800  $\mu\text{mol}$  (中位剂量190  $\mu\text{mol}$ ) GRA就可在抗癌、神经保护、改善骨质疏松、抵抗肥胖等方面发挥积极作用<sup>[4]</sup>。保证GRA的摄入量具有巨大的促健康潜力,GRA衍生的功能性食品、补剂及治疗药品具有巨大的开发应用价值。

GRA原生植物资源生长周期长,产量不稳,无法满足现今对GRA逐渐增加的数量和质量要求<sup>[5]</sup>,有学者尝试化学合成法直接合成GRA,但操作烦琐、提纯困难且需要大量有毒有机溶剂,植物合成或半合成更具广泛的应用性和可操作性。在之前的尝试中,传统育种在一定程度上提高了作物GRA含量,但时间成本较高,现今基因工程以及合成生物学发展日新月异,为开发高产可持续的GRA来源提供了有利技术支持。GRA代谢路径复杂,植物底盘相较于单细胞系统微生物更有利于其高效表达。十字花科植物广泛参与我们的日常生活,涵盖常见的蔬菜、调味品、油料作物以及牲畜饲料饼粕作物,不仅为GRA原生植物,还具有完整的研究体系<sup>[6]</sup>,与其他植物相比具有更大的应用潜力和经济效益,是当今代谢工程培育高产GRA来源的重点底盘作物<sup>[7]</sup>。本文旨在对当前GRA相关研究进展进行归纳总结,从代谢路径出发,重点分析未来基因工程培育高含量GRA作物所面临的机遇和挑战,以期获得更加完善且系统的改进方法提供一定思路。

## 1 GRA理化性质、鉴定分离及纯化

GRA的化学结构如图1所示,由 $\beta$ -D-硫代葡萄糖基团、磺酰基团及蛋氨酸衍生的R基团(侧链)组成,除葡萄糖基团外,其余部分称为苜蓿素(aglucone)<sup>[2, 8]</sup>。GRA相对稳定,具水溶性。在植物材料中主要采取萃取法、制备型高效液相色谱技术(HPLC)和高速逆流色谱技术(HSCCC)提

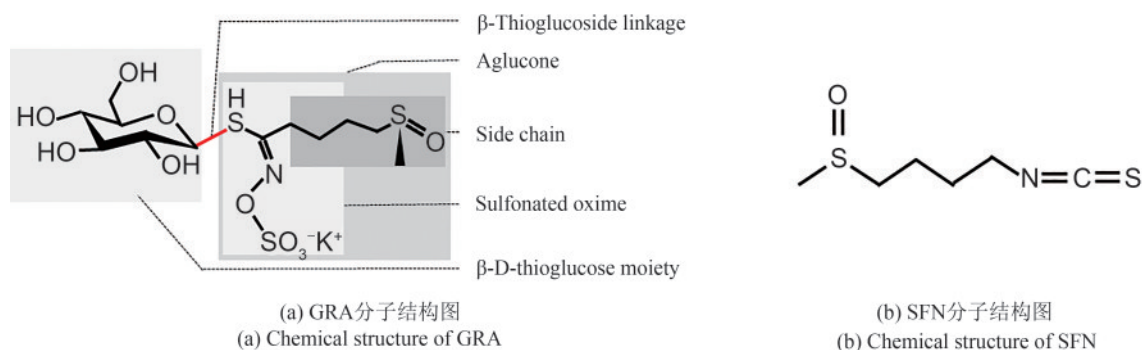


图1 萝卜硫苷及萝卜硫素分子结构图

(GRA—萝卜硫苷; SFN—萝卜硫素)

Fig. 1 Chemical structures of GRA and SFN

(GRA—glucoraphanin; SFN—sulforaphane)

取,其中以沸水或有机溶剂为萃取剂的传统固液萃取<sup>[1]</sup>由于操作简单、速度快、成本低而被广泛使用。为规避有机溶剂毒害并进一步提高提取效率,超临界二氧化碳( $\text{Sc-CO}_2$ )萃取技术<sup>[9]</sup>、超声波辅助提取(UAE)和微波辅助提取(MAE)<sup>[10]</sup>等环境友好型提取方法不断问世,UAE已被广泛用于科学研究和工业应用。GSL定性定量分析方法主要包括薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)、高效液相色谱以及超高效液相色谱(UHPLC)等。其中超高效液相色谱-质谱联用(UHPLC-MS/MS)可提供高通量筛选能力和验证性数据,在分析植物GSL及其他营养成分中占据重要地位,最终结构可通过核磁共振光谱来确认<sup>[11]</sup>。现在常用的GSL测定和定量方法是符合DIN EN ISO 9167-1:1995(NA 057-05-05 AA, 2012)的传统“硫代GSL萃取法”<sup>[12]</sup>。

## 2 GRA生物学功能及其生物利用度

### 2.1 生物学功能

GRA在机体中以SFN形式发挥其生物学功能,SFN被认为可用于化学预防的抗氧化剂和抗肿瘤化合物<sup>[13-14]</sup>,在抗癌<sup>[15-17]</sup>、神经保护<sup>[16, 18]</sup>等方面具有巨大潜力<sup>[19]</sup>(表1)。

癌症是一种多因素疾病,常因环境改变、基因组不稳定性、氧化损伤<sup>[46-47]</sup>、炎症等因素发生<sup>[48]</sup>。SFN可同时协调调控多种致癌靶点,在癌细胞发生、增殖及转移不同阶段对癌症进行干预,包括调节I相酶(直接抗氧化剂)、II相酶(间接抗氧化剂)以及端粒酶活性,作用细胞周期因子、细胞凋亡信号、脂质生成以及表观遗传等多种分子途径<sup>[15, 17, 49-52]</sup>(表1)。现已经证实SFN在抵抗脑癌、鼻咽癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、结肠癌、宫颈癌和前列腺癌等多种癌症中发挥作用<sup>[15]</sup>,是一种潜在的癌症预防和治疗药物。SFN是核转录因子-E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)最强激活剂之一,可保护神经元和小胶质细胞免受氧化应激<sup>[35]</sup>,有效缓解慢性神经退行性疾病<sup>[18]</sup>以及创伤性神经损伤所引起的神经性疾病。在母体怀孕期间,SFN还可通过清除DPPH自由基

实现对胎儿的神经保护<sup>[40]</sup>(表1)。SFN还被发现在预防肥胖及其并发症<sup>[43-44, 53]</sup>、改善心肌病<sup>[41]</sup>、骨质疏松<sup>[42]</sup>、牛皮癣<sup>[45]</sup>等疾病中发挥作用(表1)。

### 2.2 生物利用度

生物利用度是物质在活体中被吸收、转化和利用的程度。机体摄入GRA转化为SFN,被人体吸收后与谷胱甘肽结合,通过硫代尿酸途径(the mercapturic acid pathway)在肠细胞和肝脏中代谢,主要以N-乙酰半胱氨酸结合物(N-acetyl cysteine conjugate)的形式通过尿液排出<sup>[42, 54-55]</sup>。GRA在人体中的生物利用度主要取决于以下三个方面。

(1) 高含量>低含量 不同个体之间SFN的排泄比例(尿液中排泄的SFN和代谢物相对于摄入的SFN的量)具有较大差异,但单一个体其排泄比例相对恒定,摄入量越多机体吸收获得的SFN就越多。Sivapalan等<sup>[54]</sup>发现在食用Beneforte®品种(GRA含量是标准杂交种的2.5~3倍)西蓝花汤后其血浆中的SFN高出食用常规西蓝花的5倍。

(2) 上下胃肠道状况 在食用过程中由植物内源MYR代谢生成的SFN在上胃肠道被快速吸收,剩余GRA达下胃肠道被肠道菌群代谢后吸收,约20%的GRA能以SFN的形式被机体吸收<sup>[54, 56-57]</sup>。在固定GRA摄入量时,个体上下胃肠道健康状况决定生物利用度。

(3) MYR活性 植物MYR和肠道微生物独立水解GRA生成SFN的生物利用度分别为40%和10%<sup>[58]</sup>。当GRA粉末与含MYR的风干西蓝花芽结合食用时,回收率(24 h尿液中SFN代谢代谢物N-乙酰半胱氨酸结合物占摄入量比例)达摄入剂量的65%,是单独食用GRA粉末的近3倍<sup>[59]</sup>。人体肠道菌配合植物内源MYR将有效提高生物利用度。生物利用度的研究对充分发挥其健康益处至关重要,在无法规避个体间差异问题情况下,要达到所需目的,最简单的方法为提高GRA摄入量并辅助高效MYR。

## 3 GRA的合成及来源

GRA在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)

表1 GRA生物学功能  
Table 1 Biological functions of GRA

| 疾病     | 摄入方式       | 机制                                                                   | 效应                        | 参考文献    |
|--------|------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------|
| 抗癌     |            |                                                                      |                           |         |
| 脑癌     | 饲喂西蓝花芽提取物  | 调节 Kcap1/Nrf2/ARE 信号通路,激活细胞抗氧化防御过程                                   | 抑制肿瘤生长                    | [20]    |
| 鼻咽癌    | 添加纯品 SFN   | 抑制 EBV 早期裂解蛋白 Rta 表达,阻断 EBV 裂解周期                                     | 阻断 EBV 在激活                | [13]    |
|        |            | 上调肿瘤抑制因子 miRNA-124-3p 表达靶向抑制 STAT3 信号通路表达和磷酸化                        | 抑制癌增殖和转移                  | [21-22] |
| 肝癌     | 添加纯品 SFN   | 诱导 NRF2,重新连接中枢代谢调节调节氨基酸代谢支持谷胱甘肽产生,维持葡萄糖稳态                            | 抗氧化                       | [23]    |
| 肺癌     | 添加纯品 SFN   | 解聚微管、抑制 $\alpha$ -微管蛋白与脂肪酸合酶、乙酰 CoA 羧化酶、柠檬酸裂解酶相互作用                   | 抑制微管介导的线粒体自噬引起细胞凋亡        | [24]    |
|        |            | 降低细胞内脂肪酸以及线粒体磷酸含量                                                    | 抑制癌细胞增殖及肿瘤干细胞自我更新         | [25]    |
|        |            | 调节 Sonic Hedgehog 信号通路和 PHC3, 组蛋白修饰降低 miR-616-5p 水平                  | 抑制 95D 和 H1299 非小细胞肺癌细胞转移 | [26]    |
| 胃癌     | 添加纯品 SFN   | 上调 Bax/Bcl2 蛋白以及细胞色素 C、PARP-1 等信号蛋白表达,促进丝裂原蛋白激酶(MAPK)JNK 和 P-38 的磷酸化 | 促进癌细胞凋亡                   | [27]    |
|        |            | 下调 EGFR(上皮生长因子受体),p-ERK1/2 表达                                        | 抑制癌细胞转移                   |         |
| 胰腺癌    | 添加纯品 SFN   | 抑制 PI3K/AKT 和 MEK/ERK 通路,激活转录因子 FOXO                                 | 诱导细胞周期停滞                  | [28]    |
| 结肠癌    | 添加纯品 SFN   | 诱导产生过量活性氧 ROS,激活 Nrf2-AMPK 信号传导途径                                    | 抑制癌细胞生长                   | [29]    |
|        |            | 靶向降低癌细胞 HDAC3 活性                                                     | 表观修饰                      | [30]    |
|        |            | 调节免疫细胞产生的 TNF $\alpha$ 、IL-1b 和 IL-6 等炎症细胞因子                         | 抗炎活性                      | [31]    |
| 宫颈癌    | 添加纯品 SFN   | 激活 AMPK 信号通路                                                         | 抑制癌细胞生长                   | [14]    |
| 前列腺癌   | 添加纯品 SFN   | 激活 LATS2,阻断 Rad51/MDC1 修复 DNA 损伤                                     | 促进癌细胞凋亡                   | [32]    |
|        |            | 组蛋白 H3 和 H4 乙酰化,细胞周期停滞于 S 和 G2/M 期                                   | 表观修饰,抑制细胞周期               | [33]    |
| 神经保护   |            |                                                                      |                           |         |
| 帕金森病   | 添加纯品 SFN   | Nrf2 蛋白、Nrf2mRNA 和总谷胱甘肽水平的增加以及神经元组织凋亡的抑制                             | Nrf2 机制调节神经元与小胶质细胞        | [34]    |
| 阿尔兹海默病 | 添加纯品 SFN   | 激活 Nrf2 抗氧化反应元件(ARE),上调细胞对氧化应激的防御,减少神经元丢失                            | 抗氧化                       | [35-36] |
|        |            | 促进小胶质细胞从促炎的 M1 表型向抗炎的 M2 表型分化,减少神经炎症                                 | 抗炎活性                      | [37]    |
| 自闭症    | 摄入 SFN     | Nrf2 介导的 Trx1/TrxR1 系统的诱导逆转中性粒细胞损伤                                   | 调控细胞周期                    | [38]    |
| 脑内出血   | 饲喂 SFN     | SFN 激活 Nrf2ARE 信号通路,发挥抗氧化和抗炎作用,改善脑出血后的神经功能障碍                         | 抗氧化、抗炎                    | [39]    |
| 胎儿神经保护 | 食用西蓝花芽     | SFN 与酚类物质协调作用,清除自由基及金属络合作用                                           | 抗氧化                       | [40]    |
| 其他健康益处 |            |                                                                      |                           |         |
| 心肌病    | 饮用 SFN 水溶液 | 通过 PI3k/Akt/Nrf2 信号通路去除神代谢产生的过量自由基                                   | 抗氧化                       | [41]    |
|        |            | 防止神引起的心脏损伤、氧化应激、线粒体复合物功能障碍                                           | 抗氧化                       |         |
| 骨质疏松   | 膳食 ITC     | 诱导 NAD(P)H:醌氧化还原酶 1 的活性,抑制基质中金属蛋白酶 1 的产生                             | 抗氧化                       | [42]    |
| 肥胖及并发症 | 进食西蓝花等蔬菜   | 激活 Nrf2 或有效调节 AMP 激活蛋白激酶                                             | 抗氧化、抗炎                    | [43]    |
|        | 皮下注射 SFN   | 减少机体氧化应激以及炎症生物标志物,促进脂肪组织中的巨噬细胞极化为 M2 表型                              | 调控脂肪族纤维化相关的基因表达           | [44]    |
| 牛皮癣    | 腹腔注射 SFN   | 激活 KEAP1-NRF2 通路和减弱炎症信号传导                                            | 强抗氧化                      | [45]    |

中的合成路径已被详细阐明,分为以下三个阶段(图2):

① 侧链延伸阶段 Met经五步酶促反应生成二高蛋氨酸(dihomoMet, DHM)。蛋氨酸在胞质中经支链氨基酸氨基转移酶4(branched-chain aminotransferase 4, BCAT4)转氨生成2-氧代酸(2-oxo acid/ $\alpha$ -keto acid/2-keto acid)。2-氧代酸转运至叶绿体,经硫代烷基苹果酸合成酶(methylthioalkylmalate synthase, MAM)缩合,苹果酸异丙酯异构酶(isopropylmalate isomerase, IPMI)异构化以及苹果酸异丙酯脱氢酶(isopropylmalate dehydrogenase, IPMDH)脱羧三步连续反应生成增加一个亚甲基( $-\text{CH}_2-$ )的链延长2-氧代酸。以上三步连续反应构成一个碳链延长周期,链延长2-氧代酸可重新进入延长周期,以亚甲基为单位进一步延长直至循环满六次;也可被BCAT3转氨,生成高蛋氨酸(homoMet, HM)、二高蛋氨酸(DHM)或三高蛋氨酸(trihomoMet, THM)等物质转运至胞质<sup>[1, 7, 60]</sup>,继续反应生成不同GSL,其中仅DHM是GRA代谢通路的前体底物<sup>[61]</sup>。该阶段涉及胞质和叶绿体两个亚细胞结构,这种区室化代谢机制中间物需要胞质内转运蛋白胆汁酸转运体5(bile acid transporter 5, BAT5)辅助转运,该蛋白对蛋氨酸延伸产物展现出高于其他氨基酸延伸物的偏好性<sup>[62]</sup>。

MAM催化的缩合反应是GSL多样性的基础<sup>[63]</sup>。在拟南芥中鉴定出多个MAM基因,生化研究发现,MAM3参与所有GSL的合成且更倾向催化生成 $\text{C}_6 \sim \text{C}_8$ 长链GSL,MAM2仅催化第一轮延伸,生成源自HM的 $\text{C}_3$ GSL,MAM1催化生成 $\text{C}_3 \sim \text{C}_5$ 短链GSL,主要存在于积累源自DHM的GSL种质中<sup>[63-64]</sup>,其中MAM3拥有最广泛的底物特异性<sup>[64]</sup>。甘蓝不同于拟南芥,其GSL侧链长度由基因GSL-PRO和GSL-ELONG独立调节,二者分别负责 $\text{C}_3$ GSL和 $\text{C}_4$ GSL生成<sup>[65]</sup>(图2)。

② 核心结构形成阶段:DHM在胞质中经细胞色素P450单加氧酶CYP79家族氧化,CYP83家族共轭氧化,C-S裂解酶(SUPERROOT1, SUR1)裂解、糖基转移酶转移酶(UDP-glycosyltransferase 74, UGT74)糖基化、硫基转移酶(sulfotransferases,

ST5b/5c/SOT)硫酸化生成GRA前体4-甲硫基-丁基GSL(glucocerucin, ERU)<sup>[66-67]</sup>。细胞色素P450的CYP79家族和CYP83家族是该阶段的最关键酶,二者分别催化前体氨基酸转化为肟及后续肟代谢<sup>[7]</sup>。基于功能基因组学的CYP79家族鉴定已完成,其中CYP79F1/F2和CYP83A1在脂肪族GSL形成中发挥功能,CYP79F2仅参与催化长链脂肪族GSL的生成,CYP79F1参与所有脂肪族GSL的生成<sup>[68]</sup>,CYP79F1与CYP83A1展现出82%的共表达相关性<sup>[69]</sup>(图2)。

③ 侧链修饰阶段 GSL合成的最后阶段,黄素单加氧酶(flavin-monooxygenase, FMO<sub>GS-OX</sub>/AOP1)催化S-氧化将甲硫基烷基GSL(methylthioalkyl GSL)转化为甲亚硫基烷基GSL(methylsulfinylalkyl GSL)生成GRA。GRA可进一步经 $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶GSL-ALK/AOP2(alkenyl hydroxalkyl producing 2)和GSL-OH/AOP3(alkenyl hydroxalkyl producing 3)羟化生成生成3-丁烯基硫代葡萄糖苷(葡萄糖芜菁芥素, gluconapin, GNA)和2-羟基-3-丁烯基硫苷(progoitrin, PRO)<sup>[70]</sup>,其中PRO因其摄入过多致使机体甲状腺肿大,损害肝脏而得到广泛关注,有患者因连续数月进食1.0~1.5 kg生白菜,积累过多PRO而导致严重的甲状腺功能衰退症<sup>[6, 71-72]</sup>(图2)。

目前在拟南芥中已鉴定出7种FMO<sub>GS-OX</sub>并命名为FMO<sub>GS-OX1-7</sub>,除FMO<sub>GS-OX5</sub>专门识别长链底物外,其余6个均在短链和长链GSL氧化中发挥作用<sup>[72-73]</sup>。

生成的GRA被临时运送到邻近的S-细胞(专门富含硫的细胞)中储存,该细胞以细胞群的形式分布于维管束内胚层与韧皮部细胞之间,随植物体生长GRA被方向特异性转运蛋白GTR靶向转运特定组织和器官中积累<sup>[74-76]</sup>。故GRA含量在叶片、茎干、根、种子等各个器官中处于动态变化,但众多研究表明,最高含量更易在种子和芽中检测到(表2)。其中GTR1和GTR2是种子中积累所必需<sup>[77-80]</sup>。

GRA主要通过植物内源MYR途径和动物体肠道微生物途径两种机制代谢。MYR是一个植物酶家族,分为MA、MB、MC三个亚族,在植物特定黑芥子酶细胞(myrosin cell)中储存<sup>[57]</sup>。该酶能特异性水解S-连接的 $\beta$ -硫代葡萄糖苷键( $\beta$ -thioglucoside linkage),糖苷键不可逆断裂释放

葡萄糖及苷元，游离苷元重排生成SFN等ITC<sup>[57]</sup>。在特异性蛋白及阳离子参与下还可生成腈类

(nitriles)、硫代腈类(epithionitriles)、硫氰酸盐类(thiocyanates)<sup>[2, 46, 90]</sup>。修饰蛋白表硫特异蛋白

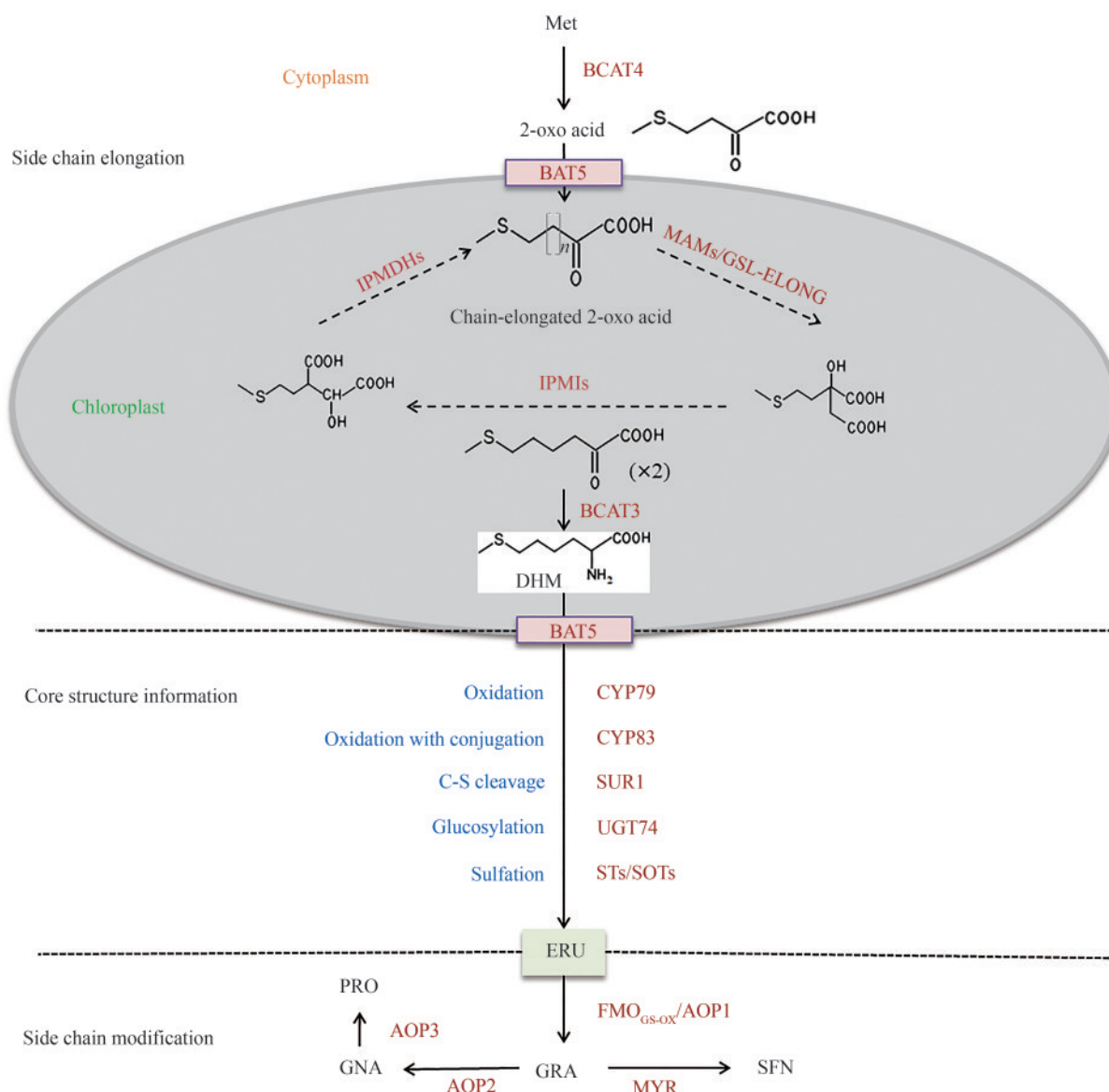


图2 GRA从头合成完整途径

(Met—蛋氨酸; BCAT4—支链氨基酸氨基转移酶4; BAT5—胆汁酸转运体5; MAMs—甲基硫烷基苹果酸合成酶; IPMDHs—苹果酸异丙酯异构酶; IPMDHs—苹果酸异丙酯脱氢酶; BCAT3—支链氨基酸氨基转移酶3; DHM—二高蛋氨酸; CYP79—细胞色素P450单加氧酶CYP79家族; CYP83—细胞色素P450单加氧酶CYP83家族; SUR1—C-S裂解酶; UGT74—糖基转移酶转移酶; STs/SOTs—硫基转移酶; ERU—4-甲硫基-丁基硫代葡萄糖苷; FMO<sub>GS-ox</sub>/AOP1—黄素单加氧酶; GRA—萝卜硫苷; AOP2— $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶; AOP3— $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶; GNA—3-丁烯基硫代葡萄糖苷, 葡萄糖芜菁素; PRO—2-羟基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷, 甲状腺素原; MYR—黑芥子酶; SFN—萝卜硫素)

Fig. 2 De novo synthesis pathway of GRA

(Met—methionine; BCAT4—branched-chain aminotransferase 4; BAT5—bile acid transporter 5; MAMs—methylthioalkylmalates synthases; IPMDHs—isopropylmalate isomerases; IPMDHs—isopropylmalate dehydrogenases; BCAT3—branched-chain aminotransferase 3; DHM—dihomoMet; CYP79—cytochrome P450 enzymes CYP79 family; CYP83—cytochrome P450 enzymes CYP83 family; SUR1—SUPERROOT1; UGT74—UDP-glycosyltransferase 74; STs/SOTs—sulfotransferases; ERU—glucoerucin; FMO<sub>GS-ox</sub>/AOP1—flavin-monooxygenase; GRA—glucoraphanin; AOP2—alkenyl hydroxalkyl producing 2; AOP3—alkenyl hydroxalkyl producing 3; GNA—gluconapin; PRO—progoitrin; MYR—myrosinase; SFN—sulforaphane)

表2 常见十字花科作物中 GRA/PRO 含量  
Table 2 GRA/PRO content in common Brassicaceae crops

| 俗名   | 拉丁名                                           | 种子     | 苗<br>(种子刚发芽) | 叶     | 芽     | 根    | 参考文献       |
|------|-----------------------------------------------|--------|--------------|-------|-------|------|------------|
| 西蓝花  | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>  | +/+++  | ++/+++       | ++/++ | +/+   | +/+  | [81-82]    |
| 萝卜   | <i>Raphanus sativus</i>                       | +/-    | +/-          | -/+   | +/+   | +/-  | [81,83]    |
| 白萝卜  | <i>xBrassicoraphanus</i>                      | +/+++  | -/++         | +/+   | +/++  | +/++ | [81,83]    |
| 甘蓝   | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> | ++/+++ | ++/+++       | ++/+  | ++/++ | +/++ | [81,84]    |
| 花椰菜  | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> | +/+    | +/+          | N/N   | +/+   | +/+  | [81]       |
| 大白菜  | <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>   | +/+++  | -/+++        | +/+   | +/+   | +/+  | [81,83]    |
| 羽衣甘蓝 | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> | +/++   | +/++         | ++/+  | +/++  | +/+  | [81,85]    |
| 芥菜   | <i>Brassica juncea</i>                        | -/-    | +/++         | -/N   | -/+   | -/+  | [81,86]    |
| 小白菜  | <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>    | +/+    | +/+          | N/N   | +/+   | +/++ | [81]       |
| 欧洲油菜 | <i>Brassica napus</i>                         | +/++   | +/+++        | +/++  | N/N   | N/N  | [11,87-89] |

注：N—无数据；- —GRA/PRO 微量,无法检测到或不存在；+ —GRA/PRO 含量低于 1 μmol/g DW；++ —GRA/PRO 含量超过 1 μmol/g DW；+++ —GRA/PRO 含量超过 10 μmol/g DW。DW—干重。  
Note: N—no data; - —GRA/PRO content could not be detected in trace amounts or absent; + —GRA/PRO content less than 1 μmol/g DW; ++ —GRA/PRO content over 1 μmol/g DW; +++ —GRA/PRO content over 10 μmol/g DW. DW—Dry weight.

(epithiospecifier protein, ESP) 存在时, 除生成 SFN 外, 部分游离苷元在 ESP 作用下重排生成副产物 SFN 腈, 降低 SFN 的产量<sup>[18, 42, 91-92]</sup>。MYR 与 GRA 在空间上分开的机制被称为“芥子油炸弹”, 可有效阻止机体过早形成不稳定 SFN 后失效<sup>[90]</sup>。不同植物 MYR 稳定性不同, 油菜籽 MYR 经 70 °C 加热 10 min 后失活, 其稳定性高于西蓝花、甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 等蔬菜的 MYR<sup>[93]</sup>。白萝卜 (*Raphanus sativus* Daikon) 根中分离出的 MYR 具有更高的稳定性, 其在 70~80 °C 加热时活性无明显损失, 90 °C 加热 10 min 活性降低 50%, 在 125 °C 时仍有 11% 的活性, 将 0.25% 的白萝卜冻干粉添加到冷冻西蓝花中就可支持 SFN 的生成<sup>[94]</sup>。在拟南芥中鉴定出 *TGG1~TGG6* 6 个编码 MYR 的基因<sup>[95]</sup>。哺乳动物自身无法产生 MYR, 其肠道共生菌群中存在类似 MYR 可水解 GRA<sup>[42, 96-97]</sup>, 例如, 肠道常见菌 *Enterococcus casseli-flavus* CP1 能代谢 40%~50% GRA<sup>[98]</sup>。频繁摄入芸薹属蔬菜能改变肠道菌群特征, 增加 GSL 代谢菌群比例<sup>[99]</sup>。

GRA 合成过程中转录因子发挥着重要作用, 其中 MYB 决定 GSL 的类型<sup>[100]</sup>。已鉴定拟南芥 *MYB28*、*MYB29*、*MYB76* 是脂肪族 GSL 生物合成过程中的正调控因子<sup>[101]</sup>, 研究发现, *AtMYB28* 可上调 *AtBCAT3* 和 *MAMI* 等脂肪族 GSL 合成基因

以及硫酸盐同化及 Met 合成相关基因的表达<sup>[101-102]</sup>。在高 GRA 西蓝花品种 Beneforte<sup>®</sup> 中, *MYB28* 在叶片中表达差异与 GRA 含量差异呈现出一致性<sup>[103]</sup>。在芥菜 (*Brassica juncea*) 中发现四个编码 MYB28 的基因 (*BjuMYB28-1*、*BjuMYB28-2*、*BjuMYB28-3*、*BjuMYB28-4*), 随繁殖期的开始, 表达水平均显著增加, 其中 *BjuMYB28-1*、*BjuMYB28-2* 在发育早期高表达<sup>[104]</sup>。*MYB28*、*MYB29* 在物种之间功能相对保守, 芸薹属的 55 个 MYB 转录因子在 R2R3 MYB DNA 结合结构域中具有保守的氨基酸序列<sup>[100, 102]</sup>。

4 GRA 生产现状

目前 GRA 的获得主要通过植物提取, 但 GRA 在不同作物、不同组织以及不同生长阶段含量均不同, 经济高效且可持续地获得 GRA 将有利于其开发和应用, 也是目前发展的瓶颈。化学直接合成法过程烦琐且需添加几种剧毒物质<sup>[105-106]</sup>, 因此改善现有植物源高效合成 GRA 是大势所趋。

4.1 传统育种

传统育种由于原理简单、易于操作, 一直沿

用至今。Kräling<sup>[107]</sup>通过三年时间对93个杂交油菜品系进行筛查,鉴定出5种具有不同GSL表达谱的稳定基因型。西蓝花双单倍体育种品系GD33 X与野生型 *Brassica villosa* Biv. 杂交筛选出融合了 *B. villosa* MYB28等位基因的高GRA (28  $\mu\text{mol/g}$

dry weight, DW) 商业化西蓝花品种 Beneforté®, 该品种 GRA 含量是传统标准杂交种的2.5~3倍<sup>[103]</sup>。Beneforté®是现存50个西蓝花种质 (GRA 0.8–21.7  $\mu\text{mol/g}$  DW)<sup>[108]</sup>中GRA含量最高者(表3)。

表3 GRA生产现状

Table 3 Current status of GRA production

|             | 涉及基因                  | 来源物种                                                                       | 受体物种                                                      | 器官       | 结果/( $\mu\text{mol/g}$ )           | 参考文献      |
|-------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------|------------------------------------|-----------|
| 传统育种        |                       |                                                                            |                                                           |          |                                    |           |
| 杂交育种        | MYB28                 | <i>Brassica villosa</i> × GD33 X                                           | Beneforté®                                                | 花茎<br>花蕾 | GRA 28 DW (2.5~3 倍)                | [103]     |
|             | GRS1/grs1             | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> × <i>Raphanus sativus</i> L. | <i>Raphanobrassica</i> grs1                               | 叶        | GRA 34.1 DW (2 倍)                  | [109]     |
| 微生物代谢工程     |                       |                                                                            |                                                           |          |                                    |           |
| 同工酶替代       | BCAT3                 | <i>Brassica rapa</i>                                                       | <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)                        | 菌液       | GRA 2~3 $\mu\text{g/L}$            | [110-111] |
|             | GSL-ELONG             | <i>Brassica oleracea</i>                                                   |                                                           |          |                                    |           |
|             | IPMI (LSU1 和 SSU3)    | <i>Arabidopsis thaliana</i>                                                |                                                           |          |                                    |           |
|             | IPMDH1                | <i>Arabidopsis thaliana</i>                                                |                                                           |          |                                    |           |
| 整合外源基因到染色体  | CYP79F1               | <i>Brassica oleracea</i>                                                   | <i>Escherichia coli</i> MG1655                            |          | GRA 0.675 $\mu\text{g/L}$          | [112]     |
|             | CYP83A1               | <i>Brassica rapa</i>                                                       |                                                           |          |                                    |           |
|             | EGT2                  | <i>Neurospora crassa</i>                                                   |                                                           |          |                                    |           |
|             | UGT74B1               | <i>Arabidopsis thaliana</i>                                                |                                                           |          |                                    |           |
|             | ST5c                  | <i>Brassica rapa</i>                                                       |                                                           |          |                                    |           |
|             | FMO <sub>GS-OXI</sub> | <i>Arabidopsis thaliana</i>                                                |                                                           |          |                                    |           |
| 植物代谢工程      |                       |                                                                            |                                                           |          |                                    |           |
| 过表达         | MAM1                  | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>                              | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>             | 茎叶混合物    | SFN 增加 1.7~3.4 倍 FW                | [5]       |
| 分子标记辅助回交育种  | braop2.2/braop2.3     | <i>Brassica rapa</i> “R-O-18” (ssp. <i>trilocularis</i> )                  | <i>Brassica rapa</i> “L58” (ssp. <i>parachinensis</i> )   | 叶        | GRA 增加 18 倍 DW                     | [113]     |
| 过表达 AOP1    | FMO <sub>GS-OX2</sub> | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>                              | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>             | 茎叶混合物    | SFN 增加 1.6~2.7 倍 FW                | [5]       |
| 抑制 GRA 代谢基因 | GSL-ALK 基因家族          | <i>Brassica napus</i>                                                      | <i>Brassica napus</i>                                     | 种子       | GRA 42.6                           | [114]     |
|             | AOP2                  | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> Bailey                     | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> Gailan-04 | 茎        | GRA 3.03 DW (3.09 倍)               | [115]     |
|             | AOP2 (GSL-ALK)        | <i>Brassica juncea</i>                                                     | <i>Brassica juncea</i>                                    | 种子       | GRA 24.1 DW                        | [116]     |
|             | BoaAOP2s              | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>                            | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>           | 叶        | GRA 0.082–0.289 FW (11.71~41.29 倍) | [117]     |
| 过表达转录因子     | BoMYB29               | <i>Brassica oleracea</i> Winspit                                           | <i>Brassica oleracea</i> DH AG1012                        | 叶        | GRA 2.542 FW                       | [118]     |
|             | csmyb28, csmyb29      | <i>Camelina sativa</i>                                                     | <i>Camelina sativa</i>                                    | 种子、根     | GSL 完全消失                           | [119]     |
| 增加 MYR      | Myrosianse gene       | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>                              | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>             | 茎叶混合物    | SFN 增加 3.7 倍 FW                    | [5]       |

|        |                                                     |                                               |                                               |       |                             | 续表    |
|--------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|-----------------------------|-------|
|        | 涉及基因                                                | 来源物种                                          | 受体物种                                          | 器官    | 结果/( $\mu\text{mol/g}$ )    | 参考文献  |
| 敲除转运蛋白 | <i>gtr2</i>                                         | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | 种子    | GSL 下降                      | [79]  |
|        | <i>BnaA06.GTR2</i>                                  | <i>Brassica napus</i>                         | <i>Brassica napus</i>                         | 种子    | GSLS 下降                     | [120] |
|        | <i>csgtr1 csgtr2</i>                                | <i>Camelina sativa</i>                        | <i>Camelina sativa</i>                        | 种子、根  | GSLS 减少, 种子中减少 0.85~0.88 倍  | [119] |
|        | <i>gtr1 gtr2</i>                                    | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | 种子、根  | GSL 种子中几乎消失, 根中显著积累         | [79]  |
|        | <i>Myrosinase-FMO<sub>GS-OX2</sub>-MAM1 (M-F-A)</i> | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i> | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i> | 茎叶混合物 | SFN 增加 1.8~5.5 倍 (FW)       | [5]   |
| 优化基因组合 | <i>BCAT3</i>                                        | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | <i>Nicotiana benthamiana</i>                  | 叶     | 2.05 $\pm$ 0.32(DW, 4.74 倍) | [121] |
|        | <i>dCGS</i>                                         |                                               |                                               |       |                             |       |
|        | <i>IPMI2</i>                                        |                                               |                                               |       |                             |       |
|        | <i>Aconitase</i>                                    |                                               |                                               |       |                             |       |
|        | <i>CGBP</i>                                         |                                               |                                               |       |                             |       |

注: *dCGS*—胱硫醚 $\gamma$ -合成酶(提高 Met 合成)基因; *CGBP*—GRA 合成途径完整代谢链基因。

Note: *dCGS*—cystathionine  $\gamma$ -synthase(improve synthesis Met); *CGBP*—the complete metabolic chain of genes involved in the GRA synthetic pathway

4.2 微生物代谢工程

现阶段利用微生物合成 SFN 具挑战性, 还需继续探索, 一是微生物作为单细胞生物阻碍 GRA 复杂代谢路径的重建, 二是部分植物酶在微生物中活性无法正常表达或不稳定, 三是微生物生产难以避免后续大型生物发酵设备以及复杂提纯技术巨大的资金消耗<sup>[122]</sup>。

DHM 区室化的合成方式限制 GRA 在单细胞微生物中的合成。即便有学者通过双质粒转化和同工酶替换成功在大肠杆菌中合成 GRA, 但仍存在传代不稳问题, Yang 等<sup>[111]</sup>以海藻 *Neurospora crassa* 的 *EGT2* 替代在大肠杆菌中无法稳定表达的 *SUR1*, 并整合该基因及植物 GRA 合成基因到大肠杆菌 *Escherichia coli* MG1655 染色体上, 可稳定产生 GRA, 但产量极低 (0.675  $\mu\text{g/L}$ )<sup>[112]</sup>, 无法实现量产 GRA。

4.3 植物代谢工程

蛋氨酸是 SFN 合成的底盘氨基酸, 有少量尝试对蛋氨酸合成相关基因进行调节以增加蛋氨酸进而增加 GRA 含量<sup>[121]</sup>, 但植物生长发育涉及复杂的氨基酸

合成、分配过程, 很难保证对上游代谢路径的调节不影响植物体整体性状, 故绝大部分学者选择调控由蛋氨酸开始的下游合成路径来提高 GRA 含量, 主要集中于过表达合成基因以及敲除代谢基因来促进 GRA 的合成和积累, 部分学者在烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 中异源表达完整 GRA 合成途径成功合成微量 GRA, 丰富了 GRA 的来源选择 (表3)。

传统育种方法受母体效应<sup>[123]</sup>、近交衰退敏感性降低现象 (重复的自花授粉或与密切相关的个体杂交导致植物遗传变异减弱)、耗时长等限制<sup>[124]</sup>, 微生物基因工程无法量产 GRA, 而随着拟南芥 GSL 生物合成综合基因图谱的梳理<sup>[125-126]</sup>, GRA 原生植物 *Brassica rapa*、*Brassica oleracea*、*Brassica nigra* 等基因组测序的完成<sup>[7]</sup>, 以及相关合成基因关联性、差异性分析的完善<sup>[83, 127-129]</sup>, 为植物代谢工程培育高产 GRA 提供了有力支持。十字花科作物营养丰富, 受众广泛, 研究体系成熟, 因此是当前最具潜力的改良平台。

5 影响 GRA 合成效率的调控因素

合成生物学和基因工程的发展使得根据特定

的营养和药物需求定制作物成为现实,也将支持高产 GRA 作物的培育。安全、经济、高效的底盘作物是植物代谢工程生产 GRA 的基础,基因元件则决定了 GRA 合成的效率,在考虑 GRA 合成三阶段相关基因的基础上,还要正确选用相关转录因子及转运蛋白,最终的基因拷贝数和种植模式也会影响最终产量。

## 5.1 高潜力底盘作物选择

### 5.1.1 营养组织富含 GRA 的作物

食用含 GRA 蔬菜是当前 GRA 参与大众生活发挥其促健康效应的主要方式,同时有研究发现在口服、局部和腹腔注射三种常见给药形式中,口服途径的中位有效剂量(产生生物反应的药剂剂量或浓度)最高<sup>[56]</sup>。GRA 在营养组织中富集有望作为功能类蔬菜或应用原料,是补充包括 GRA 在内各类营养物质和微量元素的良好选择。纵观 GRA 原生植物,十字花科涵盖日常生活中常见的蔬菜类型,品种丰富,大众认可度高,再加上成熟完整的研究和种植体系,有望成为高 GRA 蔬菜的最优底盘作物。当前已有商业化高 GRA 西蓝花的问世,其 GRA 含量是普通西蓝花的 2.5 倍。

### 5.1.2 种子富含 GRA 的作物

人群对于昂贵且短保质期的 GRA 蔬菜及提取物补剂的消费力及机体对 GRA 吸收利用效率等方面存在差异<sup>[130]</sup>,而种子较营养组织更容易储存,且 GRA 在种子中高度富集<sup>[89]</sup>,另有研究发现,向西蓝花悬浮液中添加油脂可以减缓储存过程中 SFN 的降解<sup>[10]</sup>,依此提出培育高 GRA 油料作物种子策略。富含 GRA 的种子或种子油或许是 GRA 及 SFN 良好的储存和利用形式。十字花科包含多种油料作物<sup>[131]</sup>,生化分析发现其种子油中存在 GRA,如油菜种子油中含有微量 GRA (0~1.53  $\mu\text{mol/g}$ ) 及 SFN<sup>[132]</sup>,市场对于种子油接受度较好,榨油后籽粕作为牲畜饲料的经济性均支持该策略的实施。

## 5.2 基因选择

通过过表达合成过程中某单基因能一定程度上提高 GRA 含量。但 GRA 的产生和积累是涉及从头合成、降解平衡、转运输送以及酶解的多基因

调控复杂网络<sup>[133]</sup>,结合现有成果,将不同阶段基因结合协同表达或许能突破单基因局限,实现更高的 GRA 含量。但需着重考虑中间产物或副产物对于植物的毒害作用以及相关基因在供受体作物、不同器官及发育阶段表达的差异性等效应的影响,因此基因选择格外重要。

### 5.2.1 侧链延伸

延伸阶段是 GRA 合成的初始阶段,区室化是该阶段的主要特征。缓解区室化造成的中间代谢物通量限制,最大化调动底物靶向合成 DHM 是改良该阶段高产 GRA 的主要目标。

Mikkelsen 等<sup>[69]</sup>在烟草中将基因 *BCAT4* 融合 *rubisco* 小亚基序列,使得原本在胞质中表达的 *BCAT4* 锚定在叶绿体上,生成的 2-氧代酸无需转运便可直接参与循环延伸,产生的 DHM 是非转基因系的近 50 倍。*BAT5* 是中间产物转运的关键,在 *Pro35S: amiBAT5* 细胞中脂肪族 GSL 水平降低了 75%~80%,且 DHM 主要下游产物完全消失<sup>[62]</sup>。Crocoll 等<sup>[134]</sup>在 Mikkelsen 研究的基础上优化基因组合,在烟草中将基因 *BCAT4* 与 *BAT5* 联用以提高代谢通量,使得 DHM 较 Mikkelsen 最高表达系增加近 9 倍。

MAM 决定生成何种 GSL,其一直是代谢工程改良的重点对象。Cao 等<sup>[5]</sup>过表达西蓝花的 *MAMI* 基因,所获得转基因系 SFN 含量较野生型增加 1.7~3.4 倍, SFN 含量与 *MAMI* 表达水平展现出正相关(表 3)。Zang 等<sup>[135]</sup>在大白菜 (*Brassica rapa*) 中表达拟南芥的 *MAMI*,使脂肪族 GSL 含量增加(表 3)。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和烟草中表达 *MAMI* 及其他相关基因可成功异源合成 GRA<sup>[69, 111, 134]</sup>(表 3)。

### 5.2.2 核心结构形成

核心结构的形成是通过五种生化反应、多种酶协调作用的结果,该阶段不同酶均含有多个成员,具有不同的底物特异性,在其中筛选调整更倾向于服务短链脂肪族 GSL 合成的成员是该阶段提高最终 GRA 产量的关键。

CYP79F1 及 CYP79F2 负责脂肪族 GSL 的合成,前者更倾向催化短链脂肪族 GSL。拟南芥 *CYP79F1* 敲除突变体中短链脂肪族 GSL 完全缺失,过表达含量增加<sup>[136-137]</sup>。将拟南芥的 *CYP79F1* 导

入大白菜中, 转基因系短链脂肪族 GSL 增加<sup>[135]</sup>。在 *CYP83A1* 突变的拟南芥中脂肪族 GSL 含量减低, GRA 含量降为野生水平的一半<sup>[138]</sup>。在大白菜中表达来自拟南芥的 *CYP83A1* 基因, 所有脂肪族 GSL 均增加<sup>[135]</sup>。在欧洲油菜 (*Brassica napus*) 中过表达其自身 *BnCYP83A1*, 脂肪族 GSL 增加为原来的 2 倍<sup>[139]</sup>。

*SURI* 功能缺失导致几乎所有 GSL 消失, 过表达对 GSL 图谱或植物形态物明显影响<sup>[8]</sup>, *BnUGT74B1* 的过表达转基因油菜展现出组织损伤和病理效应<sup>[139]</sup>, 故二者不适宜作为基因工程改良的对象。

### 5.2.3 侧链修饰

*FMO<sub>GS-OX</sub>* (*AOP1*) 表达量决定 GRA 的生成量, *AOP2* 的表达与否则决定 GRA 的积累量。在拟南芥中对 *FMO<sub>GS-OX</sub>* 过表达, GRA 含量较野生型增加 5 倍<sup>[140]</sup>, Cao 等<sup>[5]</sup> 将来自大白菜的 *FMO<sub>GS-OX2</sub>* 在西蓝花中表达, 最终 SFN 含量是野生型的 1.6~2.7 倍 (表 3)。且不同 *FMO<sub>GS-OX</sub>* 对相关刺激展现出相同的趋势但具有截然不同的敏感性, 其中 *FMO<sub>GS-OX4</sub>* 在不同条件下均可保持相对稳定的表达<sup>[73]</sup>。合成的 GRA 通过 GSL-ALK (*AOP2*) 和 GSL-OH (*AOP3*) 进一步生成抗营养物质 PRO, 尽可能减少 PRO 合成也是代谢工程培育高产 GRA 作物的目标之一。*GSL-ALK* (*AOP2*) 功能的去除可最大限度地积累 GRA 并减少 PRO, Liu 等<sup>[114]</sup> 通过 RNA 干扰 (RNAi) 沉默 *GSL-ALK*, 使得欧洲油菜中 GRA 含量显著增加, 且 PRO 降低 65%, 反义 *AOP2* 基因的导入使得甘蓝中 GRA 积累量增加 3.09 倍<sup>[115]</sup> (表 3)。

### 5.2.4 转录因子

GSL 代谢受到转录因子的调控。一般情况下, 一个转录因子可以调控多个基因, 因此通过调控转录因子也可调节 GRA 合成。研究发现, GSL 含量丰富的十字花科植物中相关 MYB 转录因子均有两个以上的拷贝<sup>[102]</sup>, 当 MYB28 在芥菜 (*Brassica juncea*) 和羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* Bailey) 中被沉默时, 仅脂肪族 GSL 生物合成基因被下调, 而在过表达 MYB28 的羽衣甘蓝中脂肪族 GSL 的合成得到促进<sup>[141]</sup>。Beneforté® 西蓝花也得益于野生型 *Brassica villosa* 的 MYB28v 等位基因的渗入<sup>[54]</sup>。在野生型拟南芥中过表达来自 *Brassica*

*oleracea* 的 *BoMYB29* 促进脂肪族 GSL 生物合成基因的表达和积累, 在没有检测到脂肪族 GSL 的 *myb28myb29* 突变体中表达 *BoMYB29*, 可恢复脂肪族 GSL 生物合成基因的表达积累<sup>[142]</sup>。Zuluaga 等<sup>[118]</sup> 在野生型 *Brassica oleracea* Winspit 中过表达 *BoMYB29* 基因, GRA 增加 (表 3)。Liu 等<sup>[127]</sup> 通过 DNA 多态性和基因表达分析发现来自 *Brassica napus* 的 *BnaA03g40190D* (*BnaA3.MYB28*) 候选基因可调节高叶/低种子 GSL 含量的分布。

### 5.2.5 运输

植物生殖器官中高含量的 GSL, 无关其自身合成, 而是得益于转运蛋白对 GSL 时空分布的调控作用<sup>[80, 95]</sup>, 转运蛋白的取舍为靶向富集 GRA 提供了着手点。研究发现, 在拟南芥中 GTR1 和 GTR2 仅参与脂肪族 GSL 在营养组织和种子之间的双向长距离运输<sup>[77-79]</sup>。Hölzl 等<sup>[119]</sup> 将来自 *Camelina sativa* 的 *CsGTR1* 和 *CsGTR2b* 靶向突变导致种子中 GSL 含量减少 80% (表 3)。Nour-Eldin 等<sup>[79]</sup> 在 *GTR1* 和 *GTR2* 双突变拟南芥中发现 GSL 在种子中全部消失, 而根中氨基酸衍生物显著增加 (表 3)。来自 *Brassica napus* 的脂肪族 GSL 转运蛋白 *BnaA06.GTR2* 功能的缺失导致种子中脂肪族 GSL 含量降低 76%, 且不影响产量相关性状<sup>[120]</sup> (表 3)。

### 5.2.6 黑芥子酶活性

MYR 含量及活性与 SFN 生成效率呈现正相关。植物内源 MYR 普遍在 25~40 °C、pH 5~7 展现出最高活性, 其中萝卜 MYR 具有最高的稳定性, 在 125 °C 下仍可发挥作用。除此之外, 选定某耐高温高活性的异源有 MYR 辅助植物应用也可实现较高的 GRA 生物利用率。真菌 *Aspergillus sydowii*、*Aspergillus niger* 及植物源乳酸菌 *Paracolobactrum aerogenoides*、*Lactobacillus* 等微生物中都含有 MYR<sup>[95, 143]</sup>。Wang 等<sup>[143]</sup> 将来自 *Rahnella inusitata* 的 *Rmyr* 基因在 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中异源表达, 纯化出的 MYR 在 40 °C、pH 7.0 时展现出最高活性。Ye 等<sup>[144]</sup> 在海洋泥细菌 *Shewanella baltica* Myr-37 中分离出一种新型的黑芥子酶 SMYR-37, 在 50 °C、pH 8.0 时表现出最高活性。在 *Yarrowia lipolytica* 20-8 中发现的内源 MYR, 可在纯化后重复使用 8~10 次, 仍具有较高的 GRA 水解活性<sup>[145]</sup>。MYR 种子特异性启动子的发现为消

除或靶向MYR提供了可能, Borgen<sup>[146]</sup>利用来自*Brassica napus*的种子特异性启动子*Myr1.Bn1*表达*ribonuclease-barnase*, 使得转基因系MINELESS中黑芥子酶细胞消融, 致使植物无法生成不稳定的SFN, 而是以GRA形式储存<sup>[147]</sup>。

合适的基因组合能突破单基因的局限, 更大程度地提高作物GRA及相关物质含量, GRA在非原生微生物以及烟草中合成就归功于此。Mirza等<sup>[148]</sup>在通过两个载体将来自拟南芥GRA碳链延伸阶段的五个基因组合转入大肠杆菌, 成功合成DHM。Yang等<sup>[111]</sup>用来自海藻*Neurospora crassa*的*EGT2*替代不能在大肠杆菌中稳定表达的植物源*SUR1*, 结合来自拟南芥、芸薹属的其余九个GRA合成基因, 通过两个质粒在大肠杆菌中稳定共表达, 成功合成微量GRA(表3)。Mikkelsen等<sup>[67, 69]</sup>在构建烟草GRA合成路径时, 通过十余次相关基因组合尝试最终确定DHM合成的必要及最优基因组合, 仅四个基因就可在烟草叶片中生成较高含量的DHM[(51.4±20.8) nmol/g FW]。在西蓝花中表达*Myrosinase-FMOGS-OX2-MAMI*三基因载体, 最优转基因系SFN含量是3个单基因表达系最高SFN含量的近2倍<sup>[5]</sup>(表3)。

### 5.3 种植模式

除去基因对GRA合成途径的决定性作用, 控制GRA积累的代谢调控网络还包括生物与非生物信号的级联反应, 硫、氮等土壤微量元素的积累以及采集收获方式等。合理的管理种植模式可在基因调控的基础上进一步增加转基因植物中GRA产量。

GRA合成受到各类激素协调作用, 不同激素对GRA合成基因的作用效果不同。茉莉酸(jasmonic acid, JA)、水杨酸(salicylic acid, SA)是常见的植物激素, JA能显著促进GSL的生物合成, 而SA在低浓度时正向调节GSL的积累, 在高浓度时负向调控GSL积累<sup>[149]</sup>。Guo等<sup>[150]</sup>发现在蓝光照射, 西蓝花芽中SA水平降低, 低浓度的SA上调GRA生物合成相关基因以及黑芥子酶活性, 促进GRA积累。

GRA富含硫和氮, 其生物合成需要保证这些

微量元素的正常供应, 其中硫的影响占主导地位。Aarabi等<sup>[151]</sup>发现, 在低硫条件下定位于细胞核的抑制基因*SDII*(sulfur deficiency induced 1)与*MYB28*相互作用形成*SDII-MYB28*复合体, 抑制脂肪族GSL生物合成基因的转录, 下调脂肪族GSL的生物合成。目前氮供应对GSL产量的影响研究较少, 脂肪族GSL合成基因根据氮源的不同而差异表达, 并在缺氮条件下下调。在拟南芥中研究发现, 在缺氮条件下*AOP2*表达下调, 这在一定程度上能够减少有毒物质的产生<sup>[100]</sup>。

为获得最佳的产量以及GRA含量需要根据作物习性选择适当的收获时期及储存方式。依据根茎蔬菜萝卜叶片和根部的GRA推测, 其在秋收中期(6~8周)和晚期收获为宜<sup>[152]</sup>, 在0~1.5℃条件下保存的萝卜在8周后其根系中的GSL含量未发生改变, 但其MYR活性显著降低。

## 6 结论与展望

癌症是全球人类死亡的重要原因之一。预计2040年全球癌症患者为2840万例, 较2020年增加47%<sup>[153]</sup>, 根据国家统计局的数据, 我国恶性肿瘤发病率及死亡率总体上升, 肺癌、胃癌、结直肠癌等癌症发病率及死亡率均较高, 由于人口老龄化, 我国医疗体系对癌症的控制仍面临巨大挑战<sup>[154]</sup>。科学证据表明植物代谢物SFN对多种癌症具有积极作用, 其中SFN可上调活性氧的Ⅱ相解毒酶, 激活Nrf2信号通路调节相关信号转导, 在肿瘤发生的各个阶段发挥抵抗炎症、调节免疫系统、抑制肿瘤细胞周期、促进凋亡等作用<sup>[15-17]</sup>。随着研究的深入, 其还展现出神经保护、抵抗肥胖等多方面的促健康效应。SFN以GRA形式存在于多种植物(尤其是十字花科作物)中, 细胞破碎后GRA由植物MYR或肠道微生物转化成SFN被人体吸收发挥作用。研究发现, 每周食用富含GRA的十字花科作物3~5份可将患癌风险降低30%~40%, 且摄入量与风险降低之间展现出部分正相关性<sup>[155]</sup>。尽管SFN的益处通过大众媒体广泛宣传, 但由于各种原因我国居民自主摄入的比例仍较低。最近一项关于中国不同年龄阶段饮食状况的研究发现, 无论年轻还是年老一代对蔬菜的

摄入量均较低,并随年龄的增长而下降<sup>[156]</sup>。

当前 GRA 生产现状已无法支持 SFN 逐渐广泛的研究及应用,原生植物产量不稳定,化学合生成生产操作烦琐,提纯困难,产率不稳(40%~80%),迫切需要开发一种稳定、独立、经济的供给方式。基于 GRA 合成路径的明确及多种原生植物基因组测序的完成,基因工程及合成生物学的发展,部分学者尝试摆脱耗时的传统育种法利用基因工程开发高 GRA 品种。

GRA 广泛存在于十字花科作物,涵盖日常生活中常见的蔬菜、调味品、油料及籽粕作物,相较于在不含内源 GRA 的微生物中创造高含量 GRA,在原生植物中提高 GRA 更具可行性。现有研究大多通过过表达单基因或敲除下游基因来提高十字花科作物营养组织中 GRA 含量,或失活靶向种子转运蛋白 GTR 来减少种子中大多数 GSL。其中 AOP2 的失活将 *Brassica juncea* 种子中 GRA 积累量提高到 43.11  $\mu\text{mol/g}$ (DW),是目前含量较高品系<sup>[79, 116]</sup>。考虑产品最终形式的市场接受度以及生物利用度,可将植物代谢工程生产 GRA 划分为以十字花科叶菜类主要底盘的高 GRA 营养组织/低种子策略和以油料作物为主的高 GRA 种子策略。

多基因联用较单基因作用更能调动载体代谢链,生成更高含量 GRA。根据不同靶标作物,结合明确的 GRA 合成代谢路径,在 GRA 合成的侧链延伸、核心结构形成、侧链修饰的各个阶段选定目标基因,合理搭配,增加上游底物加速下游转化;同时辅助转录因子调控,转运蛋白靶向转运,MYR 活性来实现目标作物目标器官中 GRA 含量的积累。

高含量 GRA 作物的获取,除丰富蔬菜价值外,还为后续药物及保健品的开发提供基础保障,而最近开发的水包油微胶囊技术 [Oil-in-Water(O/W)Emulsion]、纳米脂质体药物递送系统可有效缓解 SFN 在运用递送过程中的不稳定,保证 SFN 的持续释放<sup>[157-158]</sup>,为充分发挥 SFN 药用价值提供了技术支持,更好地造福大众。目前面市的高 GRA 蔬菜也仅为含量为 28  $\mu\text{mol/g}$ (DW)的西蓝花 Beneforté®,培育高 GRA 作物任重而道远。

## 参 考 文 献

- [1] THINH NGUYEN V P T, STEWART J, LOPEZ M, et al. Glucosinolates: natural occurrence, biosynthesis, accessibility, isolation, structures, and biological activities[J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4537.
- [2] BLAŽEVIĆ I, MONTAUT S, BURČUL F, et al. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants[J]. *Phytochemistry*, 2020, 169: 112100.
- [3] ASIF ALI M, KHAN N, KALEEM N, et al. Anticancer properties of sulforaphane: current insights at the molecular level[J]. *Frontiers in Oncology*, 2023, 13: 1168321.
- [4] YAGISHITA Y, FAHEY J W, DINKOVA-KOSTOVA A T, et al. Broccoli or sulforaphane: is it the source or dose that matters?[J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3593.
- [5] CAO H Y, LIU R N, ZHANG J H, et al. Improving sulforaphane content in transgenic broccoli plants by overexpressing *MAM1*, *FMO<sub>GS-OX2</sub>*, and *Myrosinase*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021, 146(3): 461-471.
- [6] ROSA E, HEANEY R, FENWICK G, et al. Glucosinolates in crop plants[M/OL]//JANICK J. *Horticultural reviews*, 1996, 18: 99-125[2024-02-01]. <https://doi.org/10.1002/9780470650622.ch3>.
- [7] MIAO H Y, ZENG W, WANG J S, et al. Improvement of glucosinolates by metabolic engineering in *Brassica* crops[J]. *aBIOTECH*, 2021, 2(3): 314-329.
- [8] QIN H, KING G J, BORPATRAGOHAIR P, et al. Developing multifunctional crops by engineering Brassicaceae glucosinolate pathways[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(4): 100565.
- [9] SUT S, BOSCHIERO I, SOLANA M, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Eruca sativa* using cosolvents: phytochemical composition by LC-MS analysis[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3240.
- [10] ZHANG S, YING D Y, CHENG L J, et al. Sulforaphane in broccoli-based matrices: effects of heat treatment and addition of oil[J]. *LWT*, 2020, 128: 109443.
- [11] YU X, MA F, ZHANG L X, et al. Extraction and quantification of sulforaphane and indole-3-carbinol from rapeseed tissues using QuEChERS coupled with UHPLC-MS/MS[J]. *Molecules*, 2020, 25(9): 2149.
- [12] FÖRSTER N, ULRICH C, SCHREINER M, et al. Development of a reliable extraction and quantification method for glucosinolates in *Moringa oleifera*[J]. *Food Chemistry*, 2015, 166: 456-464.
- [13] WU C C, CHUANG H Y, LIN C Y, et al. Inhibition of epstein-

- barr virus reactivation in nasopharyngeal carcinoma cells by dietary sulforaphane[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2013, 52(12): 946-958.
- [14] MAHN A, CASTILLO A. Potential of sulforaphane as a natural immune system enhancer: a review[J]. *Molecules*, 2021, 26(3): 752.
- [15] ELKASHTY O A, TRAN S D. Sulforaphane as a promising natural molecule for cancer prevention and treatment[J]. *Current Medical Science*, 2021, 41(2): 250-269.
- [16] OTOO R A, ALLEN A R. Sulforaphane's multifaceted potential: from neuroprotection to anticancer action[J]. *Molecules*, 2023, 28(19): 6902.
- [17] SINGH D, ARORA R, BHATIA A, et al. Molecular targets in cancer prevention by 4-(methylthio)butyl isothiocyanate - a comprehensive review[J]. *Life Sciences*, 2020, 241: 117061.
- [18] SCHEPICI G, BRAMANTI P, MAZZON E. Efficacy of sulforaphane in neurodegenerative diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8637.
- [19] GLADE M J, MEGUID M M. A Glance at... broccoli, glucoraphanin, and sulforaphane[J]. *Nutrition*, 2015, 31(9): 1175-1178.
- [20] BAENAS N, VEGA-GARCÍA A, MANJARREZ-MARMOLEJO J, et al. The preventive effects of broccoli bioactives against cancer: evidence from a validated rat glioma model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 168: 115720.
- [21] LI X Q, ZHAO Z L, LI M, et al. Sulforaphane promotes apoptosis, and inhibits proliferation and self-renewal of nasopharyngeal cancer cells by targeting STAT signal through miRNA-124-3p[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 103: 473-481.
- [22] CHEN L, CHAN L S, LUNG H L, et al. Crucifera sulforaphane (SFN) inhibits the growth of nasopharyngeal carcinoma through DNA methyltransferase 1 (DNMT1)/Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) axis[J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153058.
- [23] BERNUZZI F, MAERTENS A, SAHA S, et al. Sulforaphane rewires central metabolism to support antioxidant response and achieve glucose homeostasis[J]. *Redox Biology*, 2023, 67: 102878.
- [24] YAN Y T, ZHOU Y, LI J T, et al. Sulforaphane downregulated fatty acid synthase and inhibited microtubule-mediated mitophagy leading to apoptosis[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(10): 917.
- [25] WANG F P, SUN Y W, HUANG X Y, et al. Sulforaphane inhibits self-renewal of lung cancer stem cells through the modulation of sonic Hedgehog signaling pathway and polyhomeotic homolog 3[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 121.
- [26] WANG D X, ZOU Y J, ZHUANG X B, et al. Sulforaphane suppresses EMT and metastasis in human lung cancer through miR-616-5p-mediated GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathways[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, 38(2): 241-251.
- [27] MONDAL A, BISWAS R, RHEE Y H, et al. Sulforaphane promotes Bax/Bcl2, MAPK-dependent human gastric cancer AGS cells apoptosis and inhibits migration via EGFR, p-ERK1/2 down-regulation[J]. *General Physiology and Biophysics*, 2016, 35(1): 25-34.
- [28] ROY S K, SRIVASTAVA R K, SHANKAR S. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer[J]. *Journal of Molecular Signaling*, 2010, 5: 10.
- [29] CHEN X, JIANG Z D, ZHOU C C, et al. Activation of Nrf2 by sulforaphane inhibits high glucose-induced progression of pancreatic cancer via AMPK dependent signaling[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 50(3): 1201-1215.
- [30] RAJENDRAN P, KIDANE A I, YU T W, et al. HDAC turnover, CtIP acetylation and dysregulated DNA damage signaling in colon cancer cells treated with sulforaphane and related dietary isothiocyanates[J]. *Epigenetics*, 2013, 8(6): 612-623.
- [31] BESSLER H, DJALDETTI M. Broccoli and human health: immunomodulatory effect of sulforaphane in a model of colon cancer[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2018, 69(8): 946-953.
- [32] WANG S Y, WANG Y N, LIU X N, et al. SFN enhanced the radiosensitivity of cervical cancer cells via activating LATS2 and blocking Rad51/MDC1 recruitment to DNA damage site [J]. *Cancers*, 2022, 14(8): 1872.
- [33] RUTZ J, THALER S, MAXEINER S, et al. Sulforaphane reduces prostate cancer cell growth and proliferation *in vitro* by modulating the cdk-cyclin axis and expression of the CD44 variants 4, 5, and 7[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8724.
- [34] MORRONI F, SITA G, DJEMIL A, et al. Comparison of adaptive neuroprotective mechanisms of sulforaphane and its interconversion product erucin in *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(4): 856-865.
- [35] KRAFT A D, JOHNSON D A, JOHNSON J A. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by *tert*-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons

- against oxidative insult[J]. The Journal of Neuroscience, 2004, 24(5): 1101-1112.
- [36] TRIO P Z, FUJISAKI S, TANIGAWA S, et al. DNA microarray highlights Nrf2-mediated neuron protection targeted by wasabi-derived isothiocyanates in IMR-32 cells[J]. Gene Regulation and Systems Biology, 2016, 10: 73-83.
- [37] HERNANDEZ-RABAZA V, CABRERA-PASTOR A, TAORO-GONZALEZ L, et al. Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia[J]. Journal of Neuroinflammation, 2016, 13(1): 83.
- [38] ALSHEHRI S, AHMAD S F, ALBEKAIRI N A, et al. Thioredoxin 1 and thioredoxin reductase 1 redox system is dysregulated in neutrophils of subjects with autism: *in vitro* effects of environmental toxicant, methylmercury[J]. Toxics, 2023, 11(9): 739.
- [39] IMAI T, MATSUBARA H, HARA H. Potential therapeutic effects of Nrf2 activators on intracranial hemorrhage[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2021, 41(7): 1483-1500.
- [40] BOWEN-FORBES C, ARMSTRONG E, MOSES A, et al. Broccoli, kale, and radish sprouts: key phytochemical constituents and DPPH free radical scavenging activity[J]. Molecules, 2023, 28(11): 4266.
- [41] THANGAPANDIYAN S, HEMA T, MILTONPRABU S, et al. Sulforaphane ameliorate arsenic induced cardiotoxicity in rats: role of PI3k/Akt mediated Nrf2 signaling pathway[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2024, 38(1): e23576.
- [42] VANDUCHOVA A, ANZENBACHER P, ANZENBACHEROVA E. Isothiocyanate from broccoli, sulforaphane, and its properties[J]. Journal of Medicinal Food, 2019, 22(2): 121-126.
- [43] MTHEMBU S X H, MAZIBUKO-MBEJE S E, MOETLEDIWA M T, et al. Sulforaphane: a nutraceutical against diabetes-related complications[J]. Pharmacological Research, 2023, 196: 106918.
- [44] ZHANG Z Z, CHEN H L, PAN C, et al. Sulforaphane reduces adipose tissue fibrosis *via* promoting M2 macrophages polarization in HFD fed-mice[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Molecular Cell Research, 2024, 1871(2): 119626.
- [45] MA C J, GU C D, LIAN P P, et al. Sulforaphane alleviates psoriasis by enhancing antioxidant defense through KEAP1-NRF2 pathway activation and attenuating inflammatory signaling[J]. Cell Death & Disease, 2023, 14(11): 768.
- [46] FAHEY J W, TALALAY P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes[J]. Food and Chemical Toxicology, 1999, 37(9-10): 973-979.
- [47] ZHANG Y, TALALAY P, CHO C G, et al. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(6): 2399-2403.
- [48] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [49] ABDULL RAZIS A F, DE NICOLA G R, PAGNOTTA E, et al. 4-Methylsulfonyl-3-butenyl isothiocyanate derived from glucoraphasatin is a potent inducer of rat hepatic phase II enzymes and a potential chemopreventive agent[J]. Archives of Toxicology, 2012, 86(2): 183-194.
- [50] IPPOUSHI K, TAKEUCHI A, ITO H, et al. Antioxidative effects of daikon sprout (*Raphanus sativus* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in rats[J]. Food Chemistry, 2007, 102(1): 237-242.
- [51] JUGE N, MITHEN R F, TRAKA M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, 64(9): 1105-1127.
- [52] RUSSO M, SPAGNUOLO C, RUSSO G L, et al. Nrf2 targeting by sulforaphane: a potential therapy for cancer treatment[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(8): 1391-1405.
- [53] YANG H E, KANG M J, HUR G, et al. Sulforaphane suppresses adipocyte differentiation *via* induction of post-translational degradation of CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPβ)[J]. Nutrients, 2020, 12(3): 758.
- [54] SIVAPALAN T, MELCHINI A, SAHA S, et al. Bioavailability of glucoraphanin and sulforaphane from high-glucoraphanin broccoli[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(18): e1700911.
- [55] SHAPIRO T A, FAHEY J W, WADE K L, et al. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans[J]. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2001, 10(5): 501-508.
- [56] MANGLA B, JAVED S, SULTAN M H, et al. Sulforaphane: a review of its therapeutic potentials, advances in its nanodelivery, recent patents, and clinical trials[J]. Phytotherapy Research, 2021, 35(10): 5440-5458.
- [57] ANGELINO D, JEFFERY E. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: focus on glucoraphanin[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 67-76.

- [58] FAHEY J W, HOLTZCLAW W D, WEHAGE S L, et al. Sulforaphane bioavailability from glucoraphanin-rich broccoli: control by active endogenous myrosinase[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0140963.
- [59] CRAMER J M, TERAN-GARCIA M, JEFFERY E H. Enhancing sulforaphane absorption and excretion in healthy men through the combined consumption of fresh broccoli sprouts and a glucoraphanin-rich powder[J]. British Journal of Nutrition, 2012, 107(9): 1333-1338.
- [60] MAGRATH R, BANO F, MORGNER M, et al. Genetics of aliphatic glucosinolates. I. Side chain elongation in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*[J]. Heredity, 1994, 72(3): 290-299.
- [61] REDOVNIKOVIĆ I R, TEXTOR S, LISNIĆ B, et al. Expression pattern of the glucosinolate side chain biosynthetic genes *MAM1* and *MAM3* of *Arabidopsis thaliana* in different organs and developmental stages[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 53: 77-83.
- [62] GIGOLASHVILI T, YATUSEVICH R, ROLLWITZ I, et al. The plastidic bile acid transporter 5 is required for the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Cell, 2009, 21(6): 1813-1829.
- [63] KUMAR R, LEE S G, AUGUSTINE R, et al. Molecular basis of the evolution of methylthioalkylmalate synthase and the diversity of methionine-derived glucosinolates[J]. The Plant Cell, 2019, 31(7): 1633-1647.
- [64] PETERSEN A, HANSEN L G, MIRZA N, et al. Changing substrate specificity and iteration of amino acid chain elongation in glucosinolate biosynthesis through targeted mutagenesis of *Arabidopsis* methylthioalkylmalate synthase 1 [J]. Bioscience Reports, 2019, 39(7): BSR20190446.
- [65] LI G, RIAZ A, GOYAL S, et al. Inheritance of three major genes involved in the synthesis of aliphatic glucosinolates in *Brassica oleracea*[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, 126(4): 427-431.
- [66] DOUGLAS GRUBB C, ZIPP B J, LUDWIG-MÜLLER J, et al. *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis[J]. The Plant Journal, 2004, 40(6): 893-908.
- [67] MIKKELSEN M D, PETERSEN B L, OLSEN C E, et al. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates[J]. Amino Acids, 2002, 22(3): 279-295.
- [68] HANSEN C H, WITTSTOCK U, OLSEN C E, et al. Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (14): 11078-11085.
- [69] MIKKELSEN M D, OLSEN C E, HALKIER B A. Production of the cancer-preventive glucoraphanin in tobacco[J]. Molecular Plant, 2010, 3(4): 751-759.
- [70] PARKIN I, MAGRATH R, KEITH D, et al. Genetics of aliphatic glucosinolates. II. Hydroxylation of alkenyl glucosinolates in *Brassica napus*[J]. Heredity, 1994, 72(6): 594-598.
- [71] CHU M, SELTZER T F. Myxedema coma induced by ingestion of raw bok choy[J]. New England Journal of Medicine, 2010, 362(20): 1945-1946.
- [72] MITHEN R. Glucosinolates-biochemistry, genetics and biological activity[J]. Plant Growth Regulation, 2001, 34(1): 91-103.
- [73] KONG W W, LI J, YU Q Y, et al. Two novel flavin-containing monooxygenases involved in biosynthesis of aliphatic glucosinolates[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1292.
- [74] CHHAJED S, MISRA B B, TELLO N, et al. Chemodiversity of the glucosinolate-myrosinase system at the single cell type resolution[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 618.
- [75] LV Q Q, LI X F, FAN B F, et al. The cellular and subcellular organization of the glucosinolate-myrosinase system against herbivores and pathogens[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1577.
- [76] SCHUSTER J, KNILL T, REICHEL T, et al. Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2006, 18(10): 2664-2679.
- [77] ANDERSEN T G, NOUR-ELDIN H H, FULLER V L, et al. Integration of biosynthesis and long-distance transport establish organ-specific glucosinolate profiles in vegetative *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2013, 25(8): 3133-3145.
- [78] JØRGENSEN M E, NOUR-ELDIN H H, HALKIER B A. Transport of defense compounds from source to sink: lessons learned from glucosinolates[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(8): 508-514.
- [79] NOUR-ELDIN H H, ANDERSEN T G, BUROW M, et al. NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds[J]. Nature, 2012, 488(7412): 531-534.
- [80] BORPATRAGOHAIN P, ROSE T J, LIU L, et al. Remobilization and fate of sulphur in mustard[J]. Annals of Botany, 2019, 124(3): 471-480.
- [81] BHANDARI S R, JO J S, LEE J G. Comparison of

- glucosinolate profiles in different tissues of nine *Brassica* crops [J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 15827-15841.
- [82] LIU M P, ZHANG L H, SER S L, et al. Comparative phytonutrient analysis of broccoli by-products: the potentials for broccoli by-product utilization[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 900.
- [83] NUGROHO A B D, HAN N, PERVITASARI A N, et al. Differential expression of major genes involved in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in intergeneric *Baemoochae* (*Brassicaceae*) and its parents during development [J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 102(1-2): 171-184.
- [84] ROBIN A H K, HOSSAIN M R, PARK J I, et al. Glucosinolate profiles in cabbage genotypes influence the preferential feeding of diamondback moth (*Plutella xylostella*) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1244.
- [85] CÁMARA-MARTOS F, OBREGÓN-CANO S, MESA-PLATA O, et al. Quantification and *in vitro* bioaccessibility of glucosinolates and trace elements in *Brassicaceae* leafy vegetables[J]. *Food Chemistry*, 2021, 339: 127860.
- [86] ASSEFA A D, KIM S H, KO H C, et al. Leaf mustard (*Brassica juncea*) germplasm resources showed diverse characteristics in agro-morphological traits and glucosinolate levels[J]. *Foods*, 2023, 12(23): 4374.
- [87] MOCNIAK L E, ELKIN K R, DILLARD S L, et al. Building comprehensive glucosinolate profiles for *Brassica* varieties[J]. *Talanta*, 2023, 251: 123814.
- [88] PARK C H, KIM N S, PARK J S, et al. Effects of light-emitting diodes on the accumulation of glucosinolates and phenolic compounds in sprouting canola (*Brassica napus* L.) [J]. *Foods*, 2019, 8(2): 76.
- [89] VELASCO P, SOENGAS P, VILAR M, et al. Comparison of glucosinolate profiles in leaf and seed tissues of different *Brassica napus* crops[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2008, 133(4): 551-558.
- [90] WITTSTOCK U, BUROW M. Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance [J]. *The Arabidopsis Book*, 2010, 8: e0134.
- [91] SANGKRET S, PONGMALAI P, DEVAHASTIN S, et al. Enhanced production of sulforaphane by exogenous glucoraphanin hydrolysis catalyzed by myrosinase extracted from Chinese flowering cabbage (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 9882.
- [92] WITTSTOCK U, BUROW M. Tipping the scales: specifier proteins in glucosinolate hydrolysis[J]. *IUBMB Life*, 2007, 59(12): 744-751.
- [93] WU Y F, LV C Z, ZOU L G, et al. Approaches for enhancing the stability and formation of sulforaphane[J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128771.
- [94] DOSZ E B, JEFFERY E H. Modifying the processing and handling of frozen broccoli for increased sulforaphane formation[J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(9): H1459-H1463.
- [95] BASKAR V, GURURANI M A, YU J W, et al. Engineering glucosinolates in plants: current knowledge and potential uses [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 168(6): 1694-1717.
- [96] BOURANIS J A, BEAVER L M, WONG C P, et al. Sulforaphane and sulforaphane-nitrile metabolism in humans following broccoli sprout consumption: inter-individual variation, association with gut microbiome composition, and differential bioactivity[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2024, 68(4): e2300286.
- [97] LI F, HULLAR M A J, BERESFORD S A A, et al. Variation of glucoraphanin metabolism *in vivo* and *ex vivo* by human gut bacteria[J]. *British Journal of Nutrition*, 2011, 106(3): 408-416.
- [98] LUANG-IN V, NARBAD A, NUENO-PALOP C, et al. The metabolism of methylsulfinylalkyl- and methylthioalkyl-glucosinolates by a selection of human gut bacteria[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(4): 875-883.
- [99] PALOP M L, SMITHS J P, TEN BRINK B. Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 26(2): 219-229.
- [100] MITREITER S, GIGOLASHVILI T. Regulation of glucosinolate biosynthesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(1): 70-91.
- [101] SØNDERBY I E, HANSEN B G, BJARNHOLT N, et al. A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates[J]. *PLoS One*, 2007, 2(12): e1322.
- [102] SEO M S, KIM J S. Understanding of MYB transcription factors involved in glucosinolate biosynthesis in *Brassicaceae* [J]. *Molecules*, 2017, 22(9): 1549.
- [103] TRAKA M H, SAHA S, HUSEBY S, et al. Genetic regulation of glucoraphanin accumulation in Beneforté® broccoli[J]. *New Phytologist*, 2013, 198(4): 1085-1095.
- [104] AUGUSTINE R, MAJEE M, GERSHENZON J, et al. Four genes encoding MYB28, a major transcriptional regulator of the aliphatic glucosinolate pathway, are differentially expressed in the allopolyploid *Brassica juncea* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(16): 4907-4921.
- [105] ABDULL RAZIS A F, IORI R, IOANNIDES C. The natural chemopreventive phytochemical *R*-sulforaphane is a far more

- potent inducer of the carcinogen-detoxifying enzyme systems in rat liver and lung than the *S*-isomer[J]. *International Journal of Cancer*, 2011, 128(12): 2775-2782.
- [106] AZIZI NASER S, AMIRI-BESHELI B, SHARIFI-MEHR S. The isolation and determination of sulforaphane from broccoli tissues by reverse phase-high performance liquid chromatography[J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2011, 58(7): 906-910.
- [107] KRÄLING K, RÖBBELEN G, THIES W, et al. Variation of seed glucosinolates in lines of *Brassica napus*[J]. *Plant Breeding*, 1990, 105(1): 33-39.
- [108] KUSHAD M M, BROWN A F, KURILICH A C, et al. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(4): 1541-1548.
- [109] ENDO R, CHIKANO H, ITABASHI E, et al. Large insertion in radish *GRS1* enhances glucoraphanin content in intergeneric hybrids, *Raphanobrassica* (*Raphanus sativus* L.×*Brassica oleracea* var. *acephala*) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1132302.
- [110] LIU F X, YANG H, WANG L M, et al. Biosynthesis of the high-value plant secondary product benzyl isothiocyanate via functional expression of multiple heterologous enzymes in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(12): 1557-1565.
- [111] YANG H, LIU F X, LI Y, et al. Reconstructing biosynthetic pathway of the plant-derived cancer chemopreventive-precursor glucoraphanin in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 121-131.
- [112] YANG H, QIN J Y, WANG X W, et al. Production of plant-derived anticancer precursor glucoraphanin in chromosomally engineered *Escherichia coli*[J]. *Microbiological Research*, 2020, 238: 126484.
- [113] LIU Z Y, LIANG J L, ZHENG S N, et al. Enriching glucoraphanin in *Brassica rapa* through replacement of *BrAOP2.2/BrAOP2.3* with non-functional genes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1329.
- [114] LIU Z, HIRANI A H, MCVETTY P B E, et al. Reducing progoitrin and enriching glucoraphanin in *Braasica napus* seeds through silencing of the *GSL-ALK* gene family[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 79(1): 179-189.
- [115] QIAN H M, SUN B, MIAO H Y, et al. Variation of glucosinolates and quinone reductase activity among different varieties of Chinese kale and improvement of glucoraphanin by metabolic engineering[J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 321-326.
- [116] AUGUSTINE R, BISHT N C. Biofortification of oilseed *Brassica juncea* with the anti-cancer compound glucoraphanin by suppressing *GSL-ALK* gene family[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18005.
- [117] ZHENG H, HUANG W L, LI X X, et al. CRISPR/Cas9-mediated *BoaAOP2s* editing alters aliphatic glucosinolate side-chain metabolic flux and increases the glucoraphanin content in Chinese kale[J]. *Food Research International*, 2023, 170: 112995.
- [118] ZULUAGA D L, GRAHAM N S, KLINDER A, et al. Overexpression of the MYB29 transcription factor affects aliphatic glucosinolate synthesis in *Brassica oleracea*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2019, 101(1-2): 65-79.
- [119] HÖLZL G, REZAEVA B R, KUMLEHN J, et al. Ablation of glucosinolate accumulation in the oil crop *Camelina sativa* by targeted mutagenesis of genes encoding the transporters GTR1 and GTR2 and regulators of biosynthesis MYB28 and MYB29 [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(1): 189-201.
- [120] HE Y Z, YANG Z Q, TANG M Q, et al. Enhancing canola breeding by editing a glucosinolate transporter gene lacking natural variation[J]. *Plant Physiology*, 2022, 188(4): 1848-1851.
- [121] BARNUM C R, ENDELMAN B J, ORNELAS I J, et al. Optimization of heterologous glucoraphanin production in *planta*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(5): 1865-1873.
- [122] BARNUM C R, ENDELMAN B J, SHIH P M. Utilizing plant synthetic biology to improve human health and wellness[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 691462.
- [123] MAGRATH R, MITHEN R. Maternal effects on the expression of individual aliphatic glucosinolates in seeds and seedlings of *Brassica napus*[J]. *Plant Breeding*, 1993, 111(3): 249-252.
- [124] BELL L, WAGSTAFF C. Glucosinolates, myrosinase hydrolysis products, and flavonols found in rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(20): 4481-4492.
- [125] HARUN S, ABDULLAH-ZAWAWI M R, GOH H H, et al. A comprehensive gene inventory for glucosinolate biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(28): 7281-7297.
- [126] SØNDERBY I E, GEU-FLORES F, HALKIER B A. Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 283-290.
- [127] LIU S, HUANG H B, YI X Q, et al. Dissection of genetic architecture for glucosinolate accumulations in leaves and seeds of *Brassica napus* by genome-wide association study[J].

- Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(6): 1472-1484.
- [128] TANG Y S, ZHANG G R, JIANG X Y, et al. Genome-wide association study of glucosinolate metabolites (mGWAS) in *Brassica napus* L.[J]. Plants, 2023, 12(3): 639.
- [129] WEI D Y, CUI Y X, MEI J Q, et al. Genome-wide identification of loci affecting seed glucosinolate contents in *Brassica napus* L. [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2019, 61(5): 611-623.
- [130] BELL L, WAGSTAFF C. Enhancement of glucosinolate and isothiocyanate profiles in Brassicaceae crops: addressing challenges in breeding for cultivation, storage, and consumer-related traits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(43): 9379-9403.
- [131] BELL L, ORUNA-CONCHA M J, DE HARO-BAILON A. Editorial: nutritional quality and nutraceutical properties of Brassicaceae (Cruciferae)[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1292964.
- [132] SHEN J J, LIU Y J, WANG X L, et al. A comprehensive review of health-benefiting components in rapeseed oil[J]. Nutrients, 2023, 15(4): 999.
- [133] YI G E, ROBIN A H, YANG K, et al. Identification and expression analysis of glucosinolate biosynthetic genes and estimation of glucosinolate contents in edible organs of *Brassica oleracea* subspecies[J]. Molecules, 2015, 20(7): 13089-13111.
- [134] CROCOLL C, MIRZA N, REICHELT M, et al. Optimization of engineered production of the glucoraphanin precursor dihomomethionine in *Nicotiana benthamiana*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2016, 4: 14.
- [135] ZANG Y X, KIM J H, PARK Y D, et al. Metabolic engineering of aliphatic glucosinolates in Chinese cabbage plants expressing *Arabidopsis* MAM1, CYP79F1, and CYP83A1[J]. BMB Reports, 2008, 41(6): 472-478.
- [136] CHEN S X, GLAWISCHNIG E, JØRGENSEN K, et al. CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2003, 33(5): 923-937.
- [137] REINTANZ B, LEHNEN M, REICHELT M, et al. Bus, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates[J]. The Plant Cell, 2001, 13(2): 351-367.
- [138] NAUR P, PETERSEN B L, MIKKELSEN M D, et al. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2003, 133(1): 63-72.
- [139] ZHANG Y Y, HUAI D X, YANG Q Y, et al. Overexpression of three glucosinolate biosynthesis genes in *Brassica napus* identifies enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140491.
- [140] HANSEN B G, KLIEBENSTEIN D J, HALKIER B A. Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2007, 50(5): 902-910.
- [141] YIN L, CHEN H C, CAO B H, et al. Molecular characterization of MYB28 involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* Bailey)[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1083.
- [142] ARAKI R, HASUMI A, NISHIZAWA O I, et al. Novel bioresources for studies of *Brassica oleracea*: identification of a kale MYB transcription factor responsible for glucosinolate production[J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11(8): 1017-1027.
- [143] WANG L L, JIANG H, QIU Y J, et al. Biochemical characterization of a novel myrosinase rmyr from *Rahnella inusitata* for high-level preparation of sulforaphane and sulforaphane[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(7): 2303-2311.
- [144] YE Q W, FANG Y W, LI M J, et al. Characterization of a novel myrosinase with high activity from marine bacterium *Shewanella baltica* myr-37[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11258.
- [145] WANG L L, HAMOUDA H I, DONG Y Y, et al. High-level and reusable preparation of sulforaphane by yeast cells expressing myrosinase[J]. Food Chemistry, 2023, 18: 100668.
- [146] BORGES B H, THANGSTAD O P, AHUJA I, et al. Removing the mustard oil bomb from seeds: transgenic ablation of myrosin cells in oilseed rape (*Brassica napus*) produces MINELESS seeds[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(6): 1683-1697.
- [147] THANGSTAD O P, GILDE B, CHADCHAWAN S, et al. Cell specific, cross-species expression of myrosinases in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(4): 597-611.
- [148] MIRZA N, CROCOLL C, ERIK OLSEN C, et al. Engineering of methionine chain elongation part of glucoraphanin pathway in *E. coli*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 31-37.
- [149] GUO R F, SHEN W S, QIAN H M, et al. Jasmonic acid and glucose synergistically modulate the accumulation of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(18): 5707-5719.
- [150] GUO Y Y, GONG C Y, CAO B E, et al. Blue light enhances

- health-promoting sulforaphane accumulation in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts through inhibiting salicylic acid synthesis[J]. *Plants*, 2023, 12(17): 3151.
- [151] AARABI F, KUSAJIMA M, TOHGE T, et al. Sulfur deficiency-induced repressor proteins optimize glucosinolate biosynthesis in plants[J]. *Science Advances*, 2016, 2(10): e1601087.
- [152] JEON B W, OH M H, KIM H S, et al. Glucosinolate variation among organs, growth stages and seasons suggests its dominant accumulation in sexual over asexual-reproductive organs in white radish[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 291: 110617.
- [153] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [154] WANG Y A, YAN Q J, FAN C M, et al. Overview and countermeasures of cancer burden in China[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(11): 2515-2526.
- [155] JEFFERY E H, ARAYA M. Physiological effects of broccoli consumption[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2009, 8(1): 283-298.
- [156] GUO L J, HUANG F F, LIU M R, et al. Generational differences in food consumption among Chinese adults of different ages[J]. *Nutrients*, 2023, 15(20): 4451.
- [157] HEMATI H, HAGHIRALSADAT F, HEMATI M, et al. Design and evaluation of liposomal sulforaphane-loaded polyvinyl alcohol/polyethylene glycol (PVA/PEG) hydrogels as a novel drug delivery system for wound healing[J]. *Gels*, 2023, 9(9): 748.
- [158] ZAMBRANO V, BUSTOS R, AROZARENA Y, et al.

Optimization of a microencapsulation process using oil-in-water (O/W) emulsion to increase thermal stability of sulforaphane[J]. *Foods*, 2023, 12(20): 3869.



**通讯作者:** 刘芳(1979—),女,副研究员,硕士生导师。研究方向为基因工程与转基因安全评价。  
E-mail: liufang03@caas.cn



**通讯作者:** 吴刚(1976—),男,研究员,博士生导师。研究方向为基因工程与转基因安全评价。  
E-mail: wugang@caas.cn



**第一作者:** 刘晓悦(2000—),女,硕士研究生。研究方向为植物分子生物学与基因工程。  
E-mail: 17860395910@139.com