

白木香 *AsCYP131* 基因的克隆及表达分析

黄 兴^{1,2}, 梅文莉², 王 昊², 黄圣卓², 陈 欣², 刘寿柏^{1*}, 戴好富^{2*}

1. 海南大学热带农林学院/热带特色林木花卉遗传与种质创新教育部重点实验室, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室/海南省沉香工程技术研究中心/沉香国际联合研究中心, 海南海口 571101

摘 要: 白木香果实中含有一类四环三萜化合物葫芦素, 其具有抗炎、保肝和抗肿瘤等活性。细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP) 是葫芦素生物合成途径中的关键酶。白木香中参与葫芦素合成的 *P450* 基因尚未得到深入研究, 本研究基于白木香转录组数据, 克隆了 1 个 *P450* 基因 (*AsCYP131*)。该基因的开放阅读框 (ORF) 长度为 1491 bp, 编码 496 个氨基酸, 蛋白分子质量为 55.39 kDa, 理论等电点 (pI) 为 7.65, 亲水性平均系数为 -0.053, 不稳定系数为 47.16, 属于不稳定蛋白, 包含 40 个潜在磷酸化位点, 二级结构以 α 螺旋和无规则卷曲为主。多重序列比对和系统进化树分析结果显示, *AsCYP131* 基因编码的蛋白与已报道参与葫芦素生物合成的 CsCYP、CmCYP 和 ClCYP 聚为一支, C 端的功能结构域序列表现出显著的一致性。通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 *AsCYP131* 在白木香不同组织中的表达水平, 结果表明, *AsCYP131* 在根、茎、叶、花、果实、种子中的表达水平存在差异, 在果实中的相对表达量最高。本研究为进一步揭示 *AsCYP131* 基因在葫芦素生物合成中的功能提供参考依据。

关键词: 白木香; P450 酶; *AsCYP131*; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: S567.19 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of the Gene *AsCYP131* in *Aquilaria sinensis*

HUANG Xing^{1,2}, MEI Wenli², WANG Hao², HUANG Shengzhuo², CHEN Xin², LIU Shoubai^{1*}, DAI Haofu^{2*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Genetics and Germplasm Innovation of Tropical Special Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Natural Products Research and Development of Li Folk Medicine of Hainan Province / Hainan Engineering Research Center of Agarwood / International Joint Research Center of Agarwood, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: The fruit of *Aquilaria sinensis* contains a class of tetracyclic triterpenoids known as cucurbitacins, which exhibit anti-inflammatory, hepatoprotective, and antitumor activities. Cytochrome P450s (CYP) are key enzymes in the biosynthesis pathway of cucurbitacins. The *P450* genes for cucurbitacin synthesis in *A. sinensis* have not been extensively studied. In this study, a *P450* gene (*AsCYP131*) was cloned based on *A. sinensis* transcriptome data. The complete open reading frame (ORF) of *AsCYP131* gene was 1491 bp, encoding a protein of 496 amino acids with a molecular weight of 55.39 kDa. The theoretical isoelectric point (pI) of the protein was 7.65, with an average hydrophilicity coefficient of -0.053, and an instability index of 47.16, classifying it as an unstable protein. The protein contained 40 potential phosphorylation sites, and its secondary structure was predominantly composed of α -helix and random coil. The results of multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that the protein encoded by the *AsCYP131* gene clustered into a single unit with CsCYP, CmCYP, and ClCYP, which have been reported to be involved in the bio-

收稿日期 2024-12-02; 接受日期 2024-12-28

基金项目 海南省科技人才创新项目 (No. KJRC2023C25); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系 (No. CARS-21); 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队项目 (No. CATASCXTD202406)。

作者简介 黄 兴 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 刘寿柏 (LIU Shoubai), E-mail: liushoubai@hainanu.edu.cn; 戴好富 (DAI Haofu), E-mail: daihaofu@itbb.org.cn。

synthesis of cucurbitacins. The sequence of the functional structural domains at the C-terminal showed high consistency. At the same time, the expression levels of *AsCYP131* in different tissues of *A. sinensis* detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The results indicated differential expression levels of *AsCYP131* across various tissues, including roots, stems, leaves, flowers, fruits, and seeds, with the highest relative expression observed in fruits. This study would serve as a valuable reference for the subsequent validation of the functional role of the *AsCYP131* gene in cucurbitacin biosynthesis.

Keywords: *Aquilaria sinensis*; P450; *AsCYP131*; bioinformatics; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.05.006

白木香[*Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.]又称土沉香、女儿香,为瑞香科(Thymelaeaceae)沉香属(*Aquilaria*)植物,分布于广东、海南和广西等热带、亚热带地区^[1]。白木香在受到自然因素(雷劈、风折、虫蛀等)或人为因素(砍伤、打洞、接菌等)胁迫后会产生沉香^[2-4]。沉香是中国、日本、印度等国家的传统名贵药材,具有“药中黄金”的美誉,具行气止痛、温中止呕、纳气平喘等功效^[5]。目前的研究主要集中于沉香,而对白木香果实等部位的研究相对较少,因此,探索果实等非药用部位的化学成分及其药用价值,将有效提高白木香整株资源的利用。白木香植物的主要化学成分包括三萜、二萜、木脂素类、甾体类、生物碱类、苯丙素类、色酮类和简单酚类等^[6]。葫芦素是一类四环三萜化合物,主要分布于葫芦科等植物中,具有广泛的药理活性,包括抗炎^[7]、保肝^[8]和抗肿瘤活性^[9-11]等。民间利用含葫芦素类化合物的植物资源,用于清热解毒和利湿退黄等^[12]。目前,葫芦素已被开发为药物,以葫芦素片的形式广泛使用。临床上,葫芦素片常用于慢性肝炎以及原发性肝癌的辅助治疗^[13]。本研究团队早期首次发现白木香的果实中含有葫芦素^[14],白木香可能成为生产葫芦素的新兴植物资源。

细胞色素 P450 酶(cytochrome P450, CYP)是一类分布广泛的含血红色素的单加氧酶,可参与羟基化、环氧化、脱卤素等反应^[15]。在葫芦素的合成途径中,2,3-环氧角鲨烯经过葫芦二烯醇合酶催化形成葫芦二烯醇,之后多个步骤需要 P450 酶的催化反应完成,羟基化是最典型的催化反应,如 P450 酶参与 C-2、C-20 和 C-25 处的羟基化^[16]。黄瓜全基因组序列揭示了 1 条参与葫芦素生物合成相关的苦味(*Bi*)基因簇^[17],并鉴定出 7 个参与葫芦素 C 生物合成的 P450 基因^[18]。在甜瓜和西瓜基因组中也发现了 *Bi* 基因簇,分别

鉴定出 6 个和 8 个可能参与葫芦素 B 和葫芦素 E 生物合成的 P450 基因。分布在 *Bi* 基因簇上编码 C-25 或 2 β 羟化酶的 P450 基因在葫芦科不同物种中均存在共线关系,甚至在不同物种的转录排列和方向上表现为相同的顺序^[16],表明 *Bi* 基因簇上的 P450 基因在植物进化的过程中可能高度保守。本研究团队前期在白木香基因组中定位了一条 *Bi* 基因簇,在该基因簇中初步鉴定出 5 个 P450 基因,与葫芦科物种中参与葫芦素生物合成的关键 P450 基因之间存在共线关系^[19]。此前的研究主要集中在葫芦科物种上,而能够产生葫芦素的其他物种中的 P450 基因尚未深入研究。因此,挖掘和验证白木香中与葫芦素生物合成相关的 P450 基因,有助于深入研究各类葫芦素的生物合成途径,为葫芦素的生产提供重要的遗传资源或种质资源。

本研究基于白木香转录组数据^[20],从前期筛选出的 5 个 P450 基因中克隆了 *AsCYP131* 基因,并对其编码的蛋白进行基本理化性质、磷酸化位点、蛋白结构特征等生物信息学分析。同时,采用 RT-qPCR 技术对 *AsCYP131* 基因进行组织差异表达分析,为进一步研究 *AsCYP131* 基因在白木香中葫芦素的生物合成途径中的作用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所用白木香(*A. sinensis*)种植于中国热带农业科学院热带生物技术研究试验基地。分别于不同时期采集 3 年生白木香植株的根、茎、叶、花、果实、种子等组织样品,液氮速冻后立即提取 RNA,用于基因克隆及基因表达分析。

1.1.2 主要试剂 Plant Total RNA Isolation Kit、General Plasmid Mini Kit 购自成都福际生物技术有限公司;FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一

链合成试剂盒、2×Taq PCR MasterMix II、DNA 纯化回收试剂盒、氨苄青霉素钠盐、SuperReal 荧光定量预混试剂购自天根生化科技(北京)有限公司; PrimeSTAR Max Premix 高保真酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司; DNA Marker VII 购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司; LB 培养基按常规配方配制。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 分别取白木香的根、茎、叶、花、果实、种子样品各 100 mg 加入液氮迅速研磨成粉, 使用 Plant Total RNA Isolation Kit (FOREGENE) RNA 提取试剂盒提取 RNA, 通过 1% 普通琼脂糖凝胶电泳检测完整性、使用生物核酸定量检测仪 Nanodrop One™ (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) 检测浓度。使用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成试剂盒反转录得到 cDNA, -20 °C 保存备用。

1.2.2 基因克隆 基于白木香转录组注释拼接的 *AsCYP131* 基因序列, 使用 Integrated DNA Technologies IDT (idtdna.com) 在线软件设计高特异性引物(表 1), 以特异性引物 *AsCYP131*-F/R 进行 PCR 扩增得到目的基因片段。扩增反应体系(20 μL): 2×Taq PCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 40 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 回收符合目的条带大小且明亮的单一片段, 连接于 pMD19-T 载体, 将其转入 DH5α 感受态细胞中, 并涂至含氨苄抗性的 LB 固体培养基中过夜培养, 筛选阳性单克隆, 进行 Sanger 一代测序以确定其核苷酸序列, 测序正确的菌液以 1:100 的比例扩大培养, 培养 16 h 后进行质粒提取, 质粒保存于 -20 °C。

1.2.3 生物信息学分析 在 NCBI Reference proteins 和 Ensembl Genome Browser 数据库中 BLAST 搜索与 *AsCYP131* 同源的 P450 氨基酸序列; 使用 MEGA11 通过邻位相连法 (neighbor-joining, NT) 构建进化树。使用 DNAMAN 8.0 软件进行氨基酸序列分析; 使用 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 在线软件预测 *AsCYP131* 的相对分子量、等电点和氨基酸数量等基本性质; 使用 NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 在线软件

进行蛋白磷酸化位点分析; 分别采用 WOLF SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 和 AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) 在线软件进行蛋白二级结构预测及蛋白三级结构模型构建。

1.2.4 *AsCYP131* 基因的组织表达分析 采用 RT-qPCR 技术检测 *AsCYP131* 基因在白木香的根、茎、叶、花、果实和种子中的表达水平。根据 *AsCYP131* 基因序列, 以白木香 *GADPH* 为内参基因, 使用 Integrated DNA Technologies 软件设计荧光定量特异性引物(表 1)。使用 MX3005P 实时荧光定量 PCR 仪, 采取 SYBR green 嵌合荧光法检测 *AsCYP131* 基因表达量。反应体系为: cDNA 模板 1 μL, 上、下游引物各 0.6 μL, 2×Real Universal PreMix 10 μL, ddH₂O 0.84 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 5 s, 57 °C 复性 15 s, 循环 40 次。每个反应 3 次重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 *AsCYP131* 基因的相对表达量。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>AsCYP131</i> -F	ATGATTCTATACAACTCTGCTCTTCC
<i>AsCYP131</i> -R	TCAACCTTCTTGGACCATGGC
<i>AsCYP131</i> -qF	CTCTTTCTGGAGCTGACGTTTA
<i>AsCYP131</i> -qR	AGCGAACAGATCTCCGATTATG
<i>AsGADPH</i> -F	CTGGTATGGCATTCCGTGTA
<i>AsGADPH</i> -R	AACCACATCCTCTTCGGTGTA

2 结果与分析

2.1 *AsCYP131* 基因克隆

根据白木香的转录组数据, *AsCYP131* 基因的 ORF 长度为 1491 bp, 编码 496 个氨基酸。基于该基因的 ORF 设计特异性引物 *AsCYP131*-F/R (表 1), 以白木香嫩叶的 cDNA 为模板, 对该基因进行 PCR 扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检测得到长度约 1491 bp 大小的条带(图 1), 回收条带并进行测序, 测序结果与转录本序列一致。

2.2 *AsCYP131* 序列同源比对及系统发育进化分析

将 *AsCYP131* 编码的氨基酸序列与黄瓜 (*Cucumis sativus*)、甜瓜 (*Cu. melo*)、西瓜

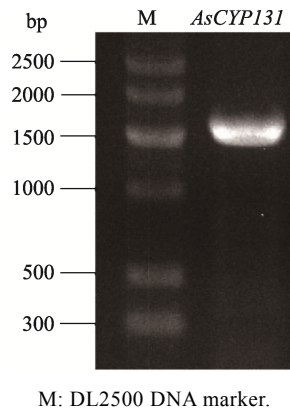


图1 *AsCYP131* 基因 ORF 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of *AsCYP131* gene ORF

(*Citrullus lanatus*)、西葫芦 (*Cucurbita pepo*)、南瓜 (*Cu. moschata*)、笋瓜 (*Cu. maxima*)、长果黄麻 (*Corchorus olitorius*)、可可 (*Theobroma cacao*)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 等 9 种植物的 P450 同源氨基酸序列进行比对分析。结果显示 (图 2), 这 10 个蛋白的 C 端氨基酸相对保守, 均存在 P450 羟化酶特征性保守结构域

heme-binding (PFGXGRRXCPG) 以及其他保守结构域 K-helix (EXLR)、I-helix (A/GGXD/ETS/T) 和 PXR (FXPERF), 符合 P450 家族蛋白结构特征。将 *AsCYP131* 与其他植物中同源性较高的 P450 氨基酸序列进行系统发育树构建, 发现 *AsCYP131* 与已知具有羟基化功能的葫芦科植物黄瓜 *CsCYP*、甜瓜 *CmCYP* 和西瓜 *CiCYP* 聚为一类 (图 3)。

2.3 *AsCYP131* 蛋白理化性质及磷酸化位点分析

通过 Expanse Prepare 软件预测表明 *AsCYP131* 蛋白的分子式为 $C_{1724}H_{2611}N_{473}O_{539}S_{14}$, 氨基酸数量为 496 个, 相对分子量为 55.39 kDa; 包含 20 种氨基酸, 其中亮氨酸 (Leu, 14.3%) 含量最高, 共 52 个带负电残基 (Asp+Glu) 和 53 个带正电残基 (Arg+Lys); 蛋白的理论 pI 值为 7.65, 不稳定系数为 47.16, 属于不稳定蛋白, 脂酸系数为 99.72, 亲水性系数为 -0.053, 预测为亲水性蛋白 (图 4A)。利用 Net Phos-3.1 软件预测分析其氨基酸序列发现, 其共有 40 个潜在的磷

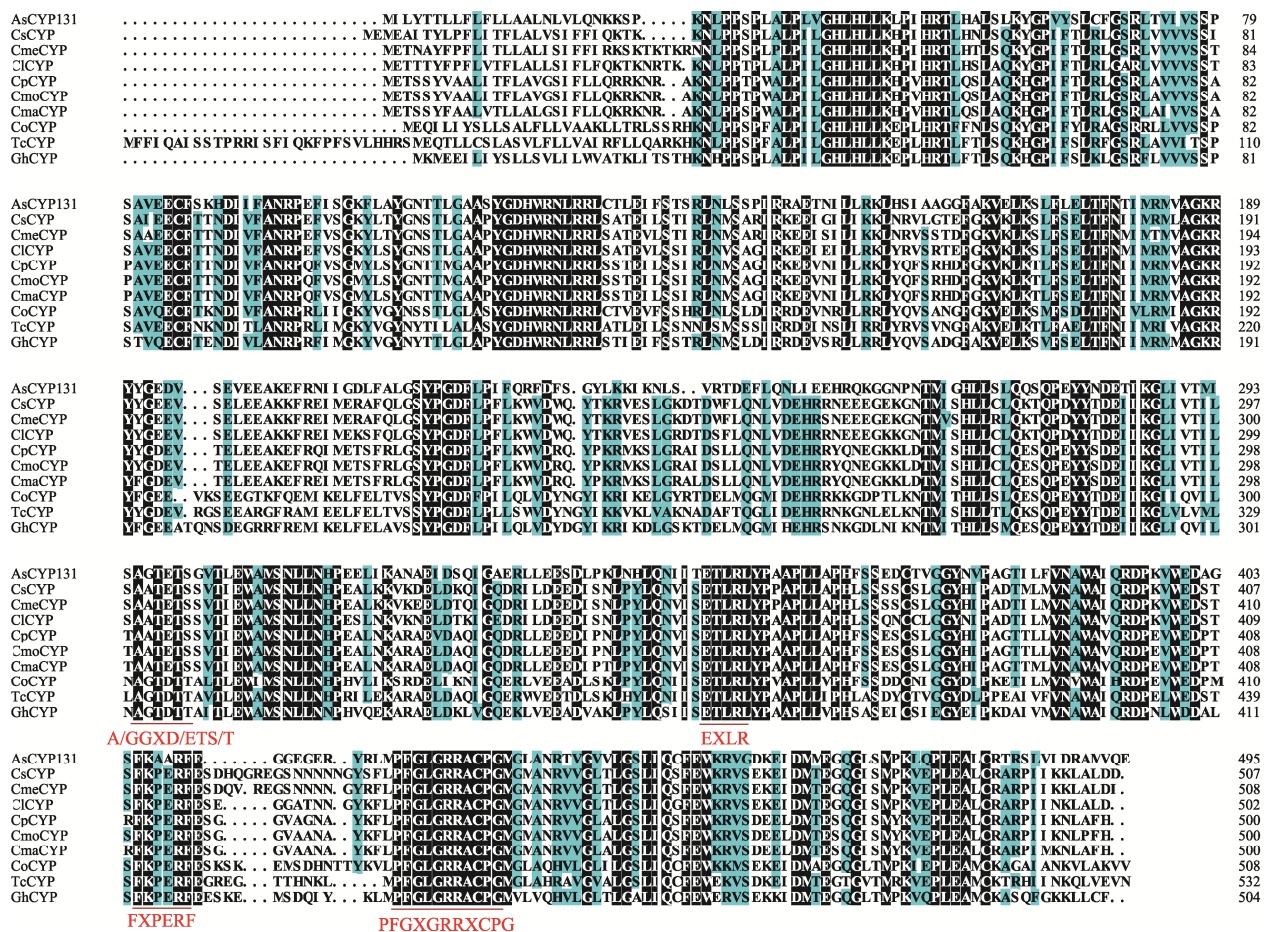


图2 *AsCYP131* 基因的氨基酸同源序列比对

Fig. 2 Amino acid homologous sequence alignment of *AsCYP131* gene

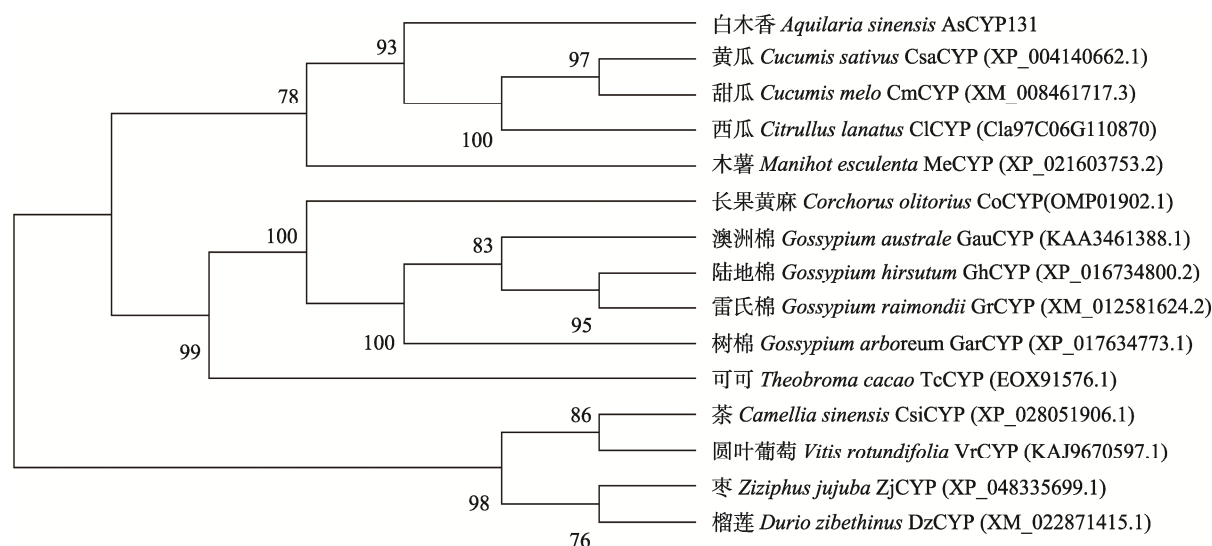
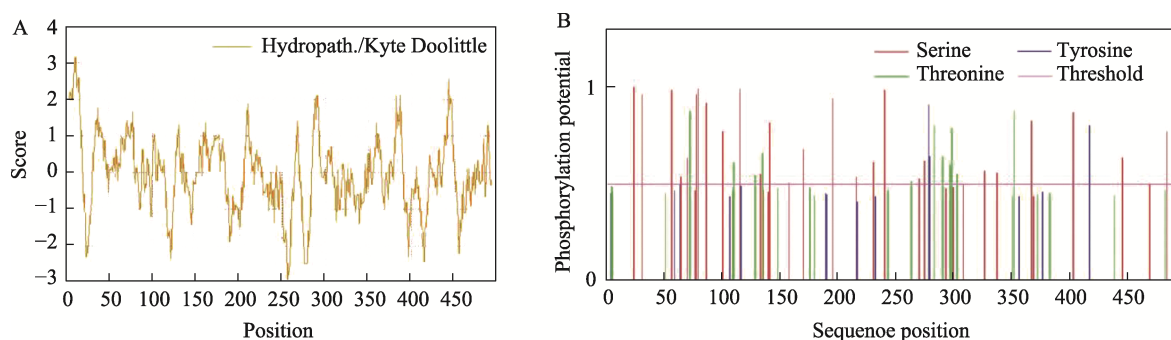


图 3 AsCYP131 与其他物种 P450 氨基酸序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of AsCYP131 and P450 amino acid sequences of other species



A: AsCYP131 蛋白亲/疏水性预测; B: AsCYP131 蛋白磷酸位点预测。

A: AsCYP131 hydrophilic/hydrophobic prediction; B: AsCYP131 phosphoric acid site prediction.

图 4 AsCYP131 蛋白的理化性质及磷酸位点预测

Fig. 4 Physicochemical properties and phosphate site prediction of AsCYP131 protein

酸化位点, 其中苏氨酸磷酸化位点 11 个, 丝氨酸磷酸化位点 26 个, 酪氨酸磷酸化位点 3 个(图 4B)。

2.4 AsCYP131 蛋白结构预测

通过 NCBI 的 CD-Search 工具分析 AsCYP131 蛋白的保守结构域, 结果显示该蛋白具有 P450 酶特征性的 heme-binding 保守结构域(图 5A), 并被预测为 CYP81 亚家族成员, 归类为 CYP71 家族^[21]。通过 SOPMA 软件预测 AsCYP131 的二级结构发现, 该蛋白由 39.52%的 α -螺旋、13.31%的延伸链和 47.18%的无规则卷曲组成(图 5B)。通过 AlphaFold Protein Structure Database 软件进行蛋白三级结构模型构建, 获得 AsCYP131 蛋白的预测模型(图 5C), 预测结果与其蛋白二级结构预测保持一致, 具有较多的 α -螺旋和无规则卷曲。

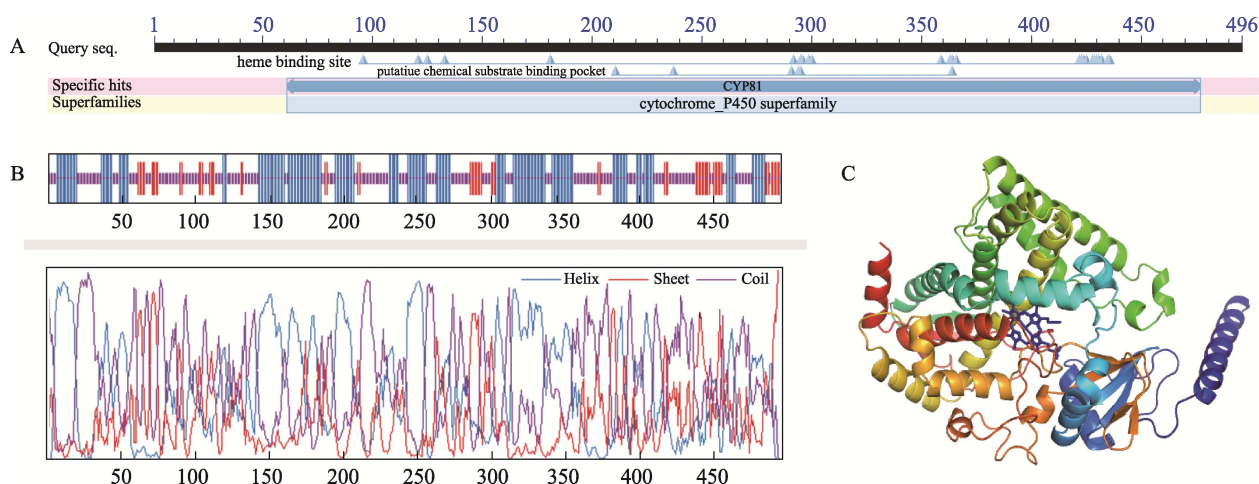
2.5 AsCYP131 基因表达分析

RT-qPCR 检测结果显示, AsCYP131 基因在白

木香不同组织中的表达呈现显著的组织特异性。AsCYP131 基因在果实中的相对表达量最高, 是根部表达量的 2.48 倍, 分别是叶、花和种子表达量的 1.78、1.88 和 1.99 倍; 在茎中的表达量显著低于其他组织, 而叶和花中的表达量相对接近(图 6)。此基因表达模式与白木香果实中含有葫芦素, 而根、茎、叶、花和种子中未分离获得葫芦素^[14]结果一致, 推测 AsCYP131 基因在葫芦素生物合成过程中发挥重要作用。

3 讨论

P450 作为植物代谢网络中的关键酶, 在植物的初生和次生代谢过程中发挥着重要作用^[22]。然而, 由于 P450 基因家族的庞大、物种间的同源性较低以及其在内质网膜上的定位, 导致 P450 的筛选和功能研究成为植物次生代谢研究中的难点^[23]。

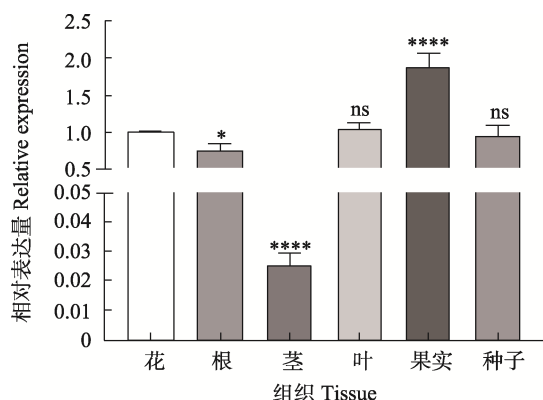


A: *AsCYP131* 蛋白结构域; B: *AsCYP131* 蛋白二级结构, 蓝色代表 α -螺旋, 红色代表延伸链, 紫色代表无规则卷曲; C: *AsCYP131* 蛋白三级结构。

A: Domain of *AsCYP131* protein; B: Protein secondary structure of *AsCYP131*, Blue represents alpha helix, Red represents extended strand, Purple represents random coil; C: Protein tertiary structure of *AsCYP131*.

图 5 *AsCYP131* 蛋白结构预测

Fig. 5 *AsCYP131* protein structure prediction



ns 表示差异不显著 ($P>0.05$), * 表示差异显著 ($P<0.05$), **** 表示差异极显著 ($P<0.0001$).

ns indicates no significant ($P>0.05$), * indicates significant difference ($P<0.05$), **** indicates extremely significant difference ($P<0.0001$).

图 6 白木香不同组织中 *AsCYP131* 表达量差异

Fig. 6 Differences of *AsCYP131* expression in different tissues of *A. sinensis*

药用植物中具有良好活性的次生代谢产物多为结构复杂且修饰程度较高的天然产物, P450 在这些化合物的结构修饰过程中发挥了关键作用, P450 的氧化修饰主要包括引入羟基、酮基、羧基和环氧基团等, 尤其是羟基的引入为其他基团的进一步修饰创造了条件^[24]。ZHOU 等^[16]从黄瓜、甜瓜和西瓜中分别挖掘出与葫芦素 C、葫芦素 B 和葫芦素 E 合成相关的 *P450* 基因, 其中黄瓜 *CsCYP* 参与了葫芦素 C 合成途径中 C-25 位的羟基化, 甜瓜 *CmCYP* 和西瓜 *CiCYP* 则参与葫芦素 B、E 合成途径中 C-2 位的羟基化。为研究白木香中与

葫芦素合成相关的 *P450* 基因, 本研究筛选并成功克隆了 *AsCYP131* 基因, 该基因的核苷酸序列为 1491 bp, 编码了 496 个氨基酸。通过氨基酸序列比对结果显示, *AsCYP131* 具有 P450 特征性保守结构域 heme-binding (PFGXGRRXCPG), 包括其他保守性较高的功能结构域 K-helix (EXLR)、I-helix (A/GGXD/ETS/T) 和 PXXR (FXPERF), 表明该蛋白可能具有较强的底物结合能力和催化活性。进一步的聚类分析发现, *AsCYP131* 的氨基酸序列与已知参与葫芦素合成的 *CsCYP*、*CmCYP* 和 *CiCYP* 聚类于同一分支, 具有较高的同源性, 推测 *AsCYP131* 可能具有类似的羟基化功能。

参与生物合成的基因在不同组织中的表达水平影响植物次生代谢产物的含量。TAN 等^[25]分析了猕猴桃不同组织中类黄酮含量差异的机制, 发现所筛选的 *AaF3H-1*、*AaF3'5'H-1* 和其他 9 种基因在叶片和叶柄中的表达水平高于果实, 其表达模式与山奈酚、异鼠李素和槲皮苷这 3 种主要类黄酮含量的变化一致, 说明这 11 个基因参与类黄酮类化合物的生物合成。PEI 等^[26]的研究表明糖基化修饰基因 *SbUGAT4* 在根部的表达水平与黄芩苷在黄芩根部的含量成正相关。杨琳等^[27]分析了五指毛桃不同组织中补骨脂素合成酶基因(*PS*)表达水平与补骨脂素含量的关系, 结果表明 *PS* 基因在根与叶中的表达水平显著高于茎和果实, 其表达模式与补骨脂素含量的变化一致。本研究

通过 RT-qPCR 检测发现, *AsCYP13I* 在不同组织中的表达水平存在显著差异, 其中在果实中的表达量最高, 至少是其他部位表达量的 1.7 倍。结合早期研究发现白木香果实中含有葫芦素, 而根、茎、叶、花和种子中未分离获得葫芦素^[14], *AsCYP13I* 基因在果实中的高表达, 很可能为葫芦素的生物合成提供了关键的酶催化途径, 为葫芦素在果实中积累提供了分子基础。此结果进一步增强了 *AsCYP13I* 基因参与葫芦素生物合成的可信性。

综上所述, 本研究完成了 *AsCYP13I* 基因的克隆、生物信息学分析和表达模式分析, 为后续对白木香葫芦素类化合物合成的研究提供了 1 个候选基因。目前本研究尚缺乏足够的实验证据, 后续将通过体外酶促反应和烟草瞬时转染等方法, 进一步验证该基因的功能。

参考文献

- [1] 戴好富, 梅文莉. 世界沉香产业[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 32.
DAI H F, MEI W L. The word agarwood industry[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 32. (in Chinese)
- [2] 戴好富. 沉香的现代研究[M]. 北京: 科学出版社, 2017: 1-30.
DAI H F. Research progress of agarwood[M]. Beijing: Science Press, 2017: 1-30. (in Chinese)
- [3] LI W, CHEN H Q, WANG H, MEI W L, DAI H F. Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: chemistry, biological activities and biosynthesis[J]. Natural Product Reports, 2021, 38(3): 528-565.
- [4] NAEF R. The volatile and semi-volatile constituent of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2011, 26(2): 73-89.
- [5] 李琳, 张国强, 石晓峰. 沉香的药理研究及临床应用进展[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(11): 199-204.
LI L, ZHANG G Q, SHI X F. Research progress on the pharmacology and clinical application of agarwood[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2019, 15(11): 199-204. (in Chinese)
- [6] 李薇, 梅文莉, 左文健, 王昊, 戴好富. 白木香的化学成分与生物活性研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2014, 22(2): 201-212.
LI W, MEI W L, ZUO W J, WANG H, DAI H F. Research progress on the chemical composition and biological activities of *Aquilaria sinensis*[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2014, 22(2): 201-212. (in Chinese)
- [7] LI Z J, SHIN J M, CHOI D K, LIM S K, YOON T J, LEE Y H, SOHN K C, IM M, LEE Y, SEO Y J, KIM C D, LEE J H. Inhibitory effect of cucurbitacin B on imiquimod-induced skin inflammation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 459(4): 673-678.
- [8] WU Y L, ZHANG Y J, YAO Y L, LI Z M, HAN X, LIAN L H, ZHAO Y Q, NAN J X. Cucurbitacin E ameliorates hepatic fibrosis *in vivo* and *in vitro* through activation of AMPK and blocking mTOR-dependent signaling pathway[J]. Toxicology Letters, 2016, 258: 147-158.
- [9] SARI-HASSOUN M, CLEMENT M J, HAMDI I, BOLLOT G, BAUVAIS C, JOSHI V, TOMA F, BURGO A, CAILLERET M, ROSALES-HERNÁNDEZ M C, PÉREZ M E, CHABANE-SARI D, CURMI P A. Cucurbitacin I elicits the formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates by stimulation of the RhoA/ROCK pathway and inhibition of LIM-kinase[J]. Biochemical Pharmacology, 2016, 102: 45-63.
- [10] SINHA S, KHAN S, SHUKLA S, LAKRA A D, KUMAR S, DAS G, MAURYA R, MEERAN S M. Cucurbitacin B inhibits breast cancer metastasis and angiogenesis through VEGF-mediated suppression of FAK/MMP-9 signaling axis[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2016, 77(Part A): 41-56.
- [11] GUO H, KUANG S, SONG Q L, LIU M, SUN X X, YU Q. Cucurbitacin I inhibits STAT3, but enhances STAT1 signaling in human cancer cells *in vitro* through disrupting actin filaments[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2018, 39(3): 425-437.
- [12] KAUSHIK U, AERI V, MIR S R. Cucurbitacins: an insight into medicinal leads from nature[J]. Pharmacognosy Reviews, 2015, 9(17): 12.
- [13] 王静, 刘静, 曲红卫, 慕建宁, 卢占斌. 葫芦素片对移植性宫颈癌荷瘤小鼠的肿瘤作用机制研究[J]. 山东中医药大学学报, 2018, 42(6): 544-548.
WANG J, LIU J, QU H W, MU J N, LU Z B. Effect of cucurbitacin tablets on transplanted cervical cancer-bearing mice and its mechanism[J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 42(6): 544-548. (in Chinese)
- [14] MEI W L, LIN F, ZUO W J, WANG H, DAI H F. Cucurbitacins from fruits of *Aquilaria sinensis*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2012, 10(3): 234-237.
- [15] COON M J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2005, 45: 1-25.
- [16] ZHOU Y, MA Y S, ZENG J G, DUAN L X, XUE X F, WANG H S, LIN T, LIU Z Q, ZENG K W, ZHONG Y,

- ZHANG S, HU Q, LIU M, ZHANG H M, REED J, MOSES T, LIU X Y, HUANG P, QING Z X, LIU X B, TU P F, KUANG H H, ZHANG Z H, OSBOURN A, RO D K, SHANG Y, HUANG S W. Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in Cucurbitaceae[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(12): 16183.
- [17] HUANG S W, LI R Q, ZHANG Z H, LI L, GU X F, FAN W, LUCAS W J, WANG X W, XIE B Y, NI P X, REN Y Y, ZHU H M, LI J, LIN K, JIN W W, FEI Z J, LI G C, STAUB J, KILIAN A, VAN DER VOSSEN E A G, WU Y, GUO J, HE J, JIA Z, REN Y, TIAN G, LU Y, RUAN J, QIAN W B, WANG M W, HUANG Q F, LI B, XUAN Z, CAO J J, ASAN, WU Z G, ZHANG J B, CAI Q, BAI Y Q, ZHAO B, HAN Y, LI Y, LI X F, WANG S H, SHI Q X, LIU S Q, CHO W K, KIM J Y, XU Y, HELLER-USZYNSKA K, MIAO H, CHENG Z C, ZHANG S P, WU J, YANG Y H, KANG H, LI M, LIANG H, REN X L, SHI Z B, WEN M, JIAN M, YANG H, ZHANG G J, YANG Z, CHEN R, LIU S F, LI J W, MA L J, LIU H, ZHOU Y, ZHAO J, FANG X D, LI G Q, FANG L, LI Y R, LIU D Y, ZHENG H K, ZHANG Y, QIN N, LI Z, YANG G H, YANG S, BOLUND L, KRISTIANSEN K, ZHENG H, LI S C, ZHANG X Q, YANG H M, WANG J, SUN R F, ZHANG B X, JIANG S Z, WANG J, DU Y C, LI S G. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L.[J]. *Nature Genetics*, 2009, 41(12): 1275-1281.
- [18] SHANG Y, MA Y S, ZHOU Y, ZHANG H M, DUAN L X, CHEN H M, ZENG J G, ZHOU Q, WANG S H, GU W J, LIU M, REN J W, GU X F, ZHANG S P, WANG Y, YASUKAWA K, BOUWMEESTER H J, QI X Q, ZHANG Z H, LUCAS W J, HUANG S W. Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1084-1088.
- [19] DING X P, YANG Z, WANG H, ZENG J, DAI H F, MEI W L. *Aquilaria sinensis*: an upstart resource for cucurbitacin production offers insights into the origin of plant bitter (*Bi*) gene clusters[J]. *Plants*, 2024, 13(2): 260.
- [20] DING X P, MEI W L, LIN Q, WANG H, WANG J, PENG S Q, LI H L, ZHU J H, LI W, WANG P, CHEN H Q, DONG W H, GUO D, CAI C H, HUANG S Z, CUI P, DAI H F. Genome sequence of the agarwood tree *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng: the first chromosome-level draft genome in the Thymelaeaceae family[J]. *GigaScience*, 2020, 9(3): g10013.
- [21] XU J, WANG X Y, GUO W Z. The cytochrome P450 superfamily: key players in plant development and defense[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(9): 1673-1686.
- [22] MIZUTANI M, OHTA D. Diversification of *P450* genes during land plant evolution[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 291-315.
- [23] 马莹, 蔡媛, 马晓晶, 崔光红, 唐金富, 曾雯, 张水寒, 郭娟, 黄璐琦. 药用植物活性成分生物合成中 P450 的研究进展[J]. *药学报*, 2020, 55(7): 1573-1589.
- MA Y, CAI Y, MA X J, CUI G H, TANG J F, ZENG W, ZHANG S H, GUO J, HUANG L Q. Research progress of P450 in the biosynthesis of bioactive compound of medicinal plants[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, 55(7): 1573-1589. (in Chinese)
- [24] 马永硕. 黄瓜中苦味素的生物合成、调控及转运机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- MA Y S. Biosynthesis, regulation and transportation of bitterness in cucumber[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2017. (in Chinese)
- [25] TAN C H, WANG Z G, IRFAN M, LIU C J. Analysis of flavonoids biosynthesis-related genes expression reveals the mechanism of difference of flavonoid content in different tissues of *Actinidia arguta*[J]. *Brazilian Journal of Botany*, 2021, 44(3): 513-523.
- [26] PEI T L, YAN M X, LI T, LI X Q, YIN Y J, CUI M Y, FANG Y M, LIU J, KONG Y, XU P, ZHAO Q. Characterization of UDP-glycosyltransferase family members reveals how major flavonoid glycoside accumulates in the roots of *Scutellaria baicalensis*[J]. *BioMed Central Genomics*, 2022, 23(1): 169.
- [27] 杨琳, 杨帆, 张杭颖, 黄勃诚, 邱清华, 张君诚. 五指毛桃不同部位补骨脂素合成酶基因的表达及其代谢产物含量[J]. *热带作物学报*, 2024, 45(4): 674-681.
- YANG L, YANG F, ZHANG H Y, HUANG B C, QIU Q H, ZHANG J C. Expression of psoralen synthase gene and effect of its product synthesis in different parts of *Ficus hirta* Vahl[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2024, 45(4): 674-681. (in Chinese)