

## 紫金牛中一个新颖底物杂泛性 *O*-甲基转移酶

刘琦<sup>1#</sup>, 闫锐琪<sup>1#</sup>, 谢冰寒<sup>1</sup>, 隋颂扬<sup>2</sup>, 解可波<sup>2</sup>, 戴均贵<sup>2\*</sup>, 杨林<sup>1\*</sup>

(1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 中国医学科学院酶与天然药物生物催化重点实验室, 国家卫生健康委员会天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** *O*-甲基转移酶 (*O*-methyltransferases, OMTs) 是许多天然产物生物合成途径中的关键后修饰酶之一, *O*-甲基化不仅可降低化合物的化学反应活性, 而且能显著改善其溶解性、稳定性等理化性质和生物活性等。本研究根据紫金牛转录组测序结果, 首次从紫金牛中克隆获得 1 条 OMT 基因 (命名为 *AjOMT1*), 并成功进行了大肠杆菌异源表达, 体外酶催化活性结果表明重组 *AjOMT1* 能高效催化槲皮素发生 *O*-甲基化反应。底物谱考察结果表明, *AjOMT1* 能催化黄酮类、芪类、香豆素类、生物碱类、苯丙素类等不同结构类型的化合物进行甲基化反应, 具有非常宽泛的底物谱; *AjOMT1* 偏好于具邻二酚羟基的化合物, 并表现出位置选择性。本研究结果表明, *AjOMT1* 可用作 *O*-甲基化工具酶实现不同类型化合物的 *O*-甲基化、获取多样化的活性甲基化产物, 可为药物发现提供新方法, 并可为天然产物合成生物学研究提供普适性元件。

**关键词:** 紫金牛; *O*-甲基转移酶; *O*-甲基化; 底物杂泛性; 位置选择性

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1372-11

## A novel *O*-methyltransferase with substrate promiscuity from *Ardisia japonica*

LIU Qi<sup>1#</sup>, YAN Rui-qi<sup>1#</sup>, XIE Bing-han<sup>1</sup>, SUI Song-yang<sup>2</sup>, XIE Ke-bo<sup>2</sup>, DAI Jun-gui<sup>2\*</sup>, YANG Lin<sup>1\*</sup>

(1. College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, CAMS Key Laboratory of Enzymes and Natural Drug Biocatalysis, NHC Key Laboratory of Natural Drug Biosynthesis, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract:** *O*-methyltransferases (OMTs) are one of the key tailoring enzymes in the biosynthesis of many natural products, *O*-methylation can not only reduce the reactivity of natural products, but also alter their solubility, stability and biological activities. Based on the transcriptome data of *Ardisia japonica*, a full-length cDNA sequence of candidate OMT (termed as *AjOMT1*) was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) for the first time. *In vitro* enzyme catalytic activity assay showed that the recombinant *AjOMT1* could effectively catalyze quercetin to form *O*-methylated products. Most importantly, *AjOMT1* showed unprecedented substrate promiscuity towards structurally various compounds including flavonoids, stilbenes, coumarins, alkaloids and phenylpropanoids, especially preferring to the compounds with adjacent phenolic hydroxyl groups, and showed regio-selectivity. These results suggested that *AjOMT1* could be used as the tool enzyme to conduct *O*-methylation of different types of compounds to produce diverse active

收稿日期: 2022-10-10; 修回日期: 2022-11-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573317).

#共同第一作者.

\*通讯作者 E-mail: 15116995486@163.com; jgdai@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1102

methylated products, and provide a new method for drug discovery, even universal part for synthetic biology of natural products.

**Key words:** *Ardisia japonica*; *O*-methyltransferase; *O*-methylation; substrate promiscuity; regio-selectivity

甲基转移酶 (methyltransferases, MTs) 是一类广泛分布于生物体中的重要酶, 在基因的表达调控和许多天然产物的生物合成中起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>。甲基转移酶通常以 *S*-腺苷甲硫氨酸 (*S*-adenosyl-*L*-methionine, SAM) 作为甲基供体, 催化生物体内蛋白质等大分子及小分子化合物的甲基化反应, 形成相应的甲基化产物。甲基化是天然产物最基本、最主要的后修饰反应之一, 在丰富天然产物分子多样性方面起着重要作用。根据甲基受体分子中与甲基直接相连原子的不同, 将 MTs 分为 *O*、*C*、*N*、*S*-甲基转移酶, 其中 *O*-甲基转移酶 (OMTs) 是甲基转移酶家族中数量最多的一类, 约占总数的 54%<sup>[1]</sup>。*O*-甲基化修饰可提高天然产物的结构稳定性、在人体内的转运能力、蛋白的亲合力和生物利用度, 降低其水溶性等, 从而增强其药理活性<sup>[2-5]</sup>。研究证实, 一些 *O*-甲基化天然产物具有更强的抗癌、抗炎、抗氧化等功能<sup>[6-8]</sup>。

紫金牛 (*Ardisia japonica*) 为紫金牛科紫金牛属植物, 分布于陕西及长江流域以南各省区, 是我国民间常用中草药, 具有止咳、祛痰、凝血、抗病毒等药理活性<sup>[9]</sup>。迄今为止, 从紫金牛中分离得到多个具有显著药理活性的 *O*-甲基取代化合物, 如岩白菜素、三甲氧基异岩白菜素<sup>[10]</sup>、ardimerin<sup>[9]</sup>、ardisananone A、maesanin、ardisananone B<sup>[11]</sup>等均具有 1~3 个不等的 *O*-甲基基团。此外, 印度学者从同属植物 *A. floribunda* 中分离得到 5,6,2',3',4'-五甲氧基黄酮和 5,6,3',4'-四甲氧基黄酮<sup>[12]</sup>。上述化合物提示紫金牛属植物中可能存在着多个新颖的 OMTs, 但至今尚无紫金牛属植物甲基转移酶的报道。因此, 为了寻找新颖催化特点、宽泛底物谱的 OMTs, 获得 *O*-甲基化工具酶用于活性化合物的酶-化学法合成与结构优化, 本研究对紫金牛中的甲基转移酶进行挖掘并对其催化特性进行深入研究。通过转录组分析, 从紫金牛中成功克隆并鉴定了 1 个新颖 *O*-甲基转移酶 (命名为 AjOMT1), 并对 AjOMT1 的底物谱进行了系统性研究。

## 材料与方法

**材料** 实验所用新鲜植物材料采自福建省厦门市, 经本研究作者之一杨林鉴定为紫金牛 (*A. japonica*)。样品冲洗干净, 经液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱。

**菌株和质粒** *E. coli* Trans1-T1 感受态细胞、

*E. coli* Transetta (DE3) 感受态细胞、pET-28a (+) 表达载体 (Sigma 公司)。

**试剂** 底物槲皮素、山柰酚、杨梅素、染料木素、芹菜素、黄芩素、香橙素、圣草酚、根皮素、5,7-二羟基香豆素、6,7-二羟基香豆素、咖啡酸、白藜芦醇、白皮杉醇、3,5,3',4'-四羟基联苜、去甲乌药碱、去亚甲基小檗碱 (北京伊诺凯科技有限公司); SAM、色谱甲醇、色谱甲酸、色谱乙腈 (Sigma 公司); 咪唑、碳酸钠、碳酸氢钠、十二水合磷酸氢二钠、氯化钠 (上海生工公司), 其他试剂均为市售分析纯; 镍柱填料 Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE 公司); KOD-Plus-Neo DNA polymerase (Toyobo 公司); E. Z. N. A. TM Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek 公司); TransScript II First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 反转录试剂盒 (北京全式金生物技术公司); SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司); 限制性内切酶 *Sal* I、*Nde* I (Takara 公司); ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme 公司); 2× Es Taq Master Mix (北京康为世纪生物科技有限公司); 质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司)。

**仪器** Agilent 1260 高效液相色谱仪 (Agilent Technologies 公司) 用于 HPLC (high performance liquid chromatography) 分析; LCQ-Fleet Ion Trap MS (Thermo Scientific 公司) 用于 LC/MS (liquid chromatograph mass spectrometer) 分析; 分析柱 Shiseido CAPCELL PAK ADME column (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)、半制备柱 Shiseido CAPCELL PAK CR 色谱柱 (250 mm × 10 mm I.D., 5 μm, 日本 Shiseido 公司); Mercury-400 核磁共振仪 (Varian 公司)。

**测序与生物信息学分析** 转录组测序由华大基因公司完成; 基因测序与引物合成分别由上海生工公司、擎科公司完成; 利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 在线分析 *AjOMT* 基因的开放阅读框和同源性; 利用 ExPASy-ProtParam tool 序列信息分析蛋白的理化性质; 利用软件 TMHMM 2.0 进行蛋白质跨膜结构分析; 系统进化分析通过 MEGA 7.0 完成; 引物设计通过 Primer Design 软件完成。

**总 RNA 提取及 cDNA 合成** 以紫金牛植株上新鲜幼叶为总 RNA 提取的材料。按照 E. Z. N. A. TM Plant RNA Kit 操作说明进行总 RNA 提取, 用 1% 非变

性琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。使用 *TransScript II First-Strand cDNA Synthesis Super Mix* 反转录试剂盒进行反转录,得到cDNA。

**候选基因的克隆** 分析紫金牛转录组测序数据,发现了1条具有完整开放阅读框的 *AjOMT* 基因,依据该序列设计带有酶切位点的特异性引物 [FP: 5'-GTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCAACAAATG - GTGAGAAC-3', RP: 5'-GGCCGCAAGCTTGTCGATTA GCTAACGCGACGGCAGATAG-3']; 下划线的序列是与 pET-28a (+) 表达载体重复的序列。以获得的紫金牛 cDNA 为模板,结合所设计合成的引物,使用 KOD-Plus-Neo 高保真酶进行目的基因的 PCR 扩增,扩增体系为: 10× KOD Plus Buffer 5 μL、dNTPs (2 mmol·L<sup>-1</sup>) 5 μL、MgSO<sub>4</sub> (25 mmol·L<sup>-1</sup>) 3 μL、正向和反向引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 1 μL、cDNA 1 μL、KOD-Plus-Neo 1 μL、双蒸水补足至 50 μL。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 98 °C、10 s, 55 °C、30 s, 68 °C、50 s 进行 35 个循环,程序循环结束后 68 °C 延伸反应 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,切胶回收。将回收后的 PCR 产物连入原核表达载体 pET-28a (+),转化 *Trans1-T1* 感受态细胞,涂布于含卡那霉素的 LB 固体培养基上于 37 °C 过夜培养,挑选阳性菌落抽提质粒进行测序验证。

**AjOMT1 的异源表达和蛋白纯化** 经测序验证后的 pET-28a-*AjOMT1* 质粒转入 *Transetta* (DE3) 表达感受态宿主细胞,挑选阳性菌落接种到含卡那霉素和氯霉素的新鲜液体 LB 培养基中,在 37 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 下过夜活化。将活化后的菌液按 1:100 比例加入含卡那霉素和氯霉素的新鲜 LB 液体培养基中,在 37 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 下培养至菌液 A<sub>600</sub> 为 0.6,加入异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (isopropylthio-β-D-galactoside, IPTG) 至终浓度为 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>,于 16 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 下诱导重组蛋白进行原核表达,18 h 后,于 4 °C、8 000 ×g 下离心收集菌体。于结合缓冲液 [20 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.4 磷酸缓冲液 (PBS)、500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、25 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑] 中超声破碎提取,将细胞破碎后离心得到的上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后,上样至预先平衡好的镍柱。先用结合缓冲液洗脱除去杂蛋白,后依次以含 50、100、250、500 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑的洗脱缓冲液 (20 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.4 PBS、500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl) 洗脱目的蛋白。目的蛋白经超滤管 (30 kDa) 离心浓缩脱盐后,于脱盐缓冲液 (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、1 mmol·L<sup>-1</sup> 二硫苏糖醇、1% 甘油, pH 7.4) 中 -80 °C 保存备用。

**重组 AjOMT1 体外催化活性测定** 以 SAM 为甲基供体,槲皮素 (1) 为甲基受体,考察重组 AjOMT1 的体外催化活性。反应体系为: 槲皮素 (40 mmol·L<sup>-1</sup>)

1 μL、SAM (40 mmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL、MgCl<sub>2</sub> (40 mmol·L<sup>-1</sup>) 2.5 μL、纯化蛋白 200 μg、Tris-HCl buffer (pH 7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup>) 补足至 100 μL。在 37 °C 下反应 6 h,用 100 μL 冷甲醇终止反应,15 000 ×g 下离心 30 min,上清液用于 HPLC 和 LC/MS 检测。流动相为乙腈 (A 相) 和含 0.1% 体积分数甲酸的水 (B 相),使用如下梯度洗脱方法: 15%~100% A 30 min 梯度洗脱,流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。进样体积为 10 μL,紫外检测波长为 254 nm。质谱分析条件: 电喷雾离子源 (ESI),扫描模式为正、负离子同时扫描并自动触发多级质谱,参数为: 鞘气流速,20 (arbitrary units); 辅助气流速,5 (arbitrary units); 喷雾电压,5 000 V; 毛细管温度,350 °C; 碰撞诱导解离 (CID) 电压,35 V。

**重组 AjOMT1 酶学性质研究** 以 SAM 为甲基供体,槲皮素 (1) 为甲基受体,考察不同 pH 缓冲液、反应温度、二价金属离子条件下对 AjOMT1 纯酶催化甲基化反应活性的影响。除加入纯化蛋白的量为 50 μg、反应时间为 30 min 外,反应体系和反应条件同上。考察不同 pH 缓冲液对酶催化反应活性影响时,将反应体系中的缓冲液置换成相应不同 pH 的缓冲液 [pH 5.0~6.0, 50 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; pH 6.0~7.0, 50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液; pH 7.0~9.0, 50 mmol·L<sup>-1</sup> 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液; pH 9.0~11.0, 50 mmol·L<sup>-1</sup> 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液]; 考察温度对酶催化反应活性影响时,将反应体系 (用 pH 8.0 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液补足至 100 μL) 放入不同温度 (20、30、40、50、60 °C) 下进行反应; 考察不同金属离子对酶催化反应活性影响时,将反应体系中 MgCl<sub>2</sub> 换成不同的二价金属离子 (BaCl<sub>2</sub>、SnCl<sub>2</sub>、SrCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>、NiSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>), 以终浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的金属离子螯合剂 EDTA 作为对照,反应体系用 pH 8.0 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液补足至 100 μL,在 40 °C 下反应。分别加入两倍体积的冷甲醇终止反应,于 15 000 ×g 离心 30 min 后取上清液用于 HPLC-UV 检测。每组反应设置 3 个平行,底物的转化率通过 HPLC 谱图中峰面积的比值来估算,酶的催化效率以对应条件下底物的转化率表示。

AjOMT1 催化槲皮素 (1) 生成甲基化产物的表现米氏常数 ( $K_m$ ) 与酶最大反应速率 ( $V_{max}$ ) 的测定 (每组设置 3 个平行): 酶促反应的总体积为 100 μL,固定 SAM 终浓度 800 μmol·L<sup>-1</sup>, Mg<sup>2+</sup> 终浓度为 1 000 μmol·L<sup>-1</sup>, 底物槲皮素浓度梯度分别设置为 40、100、200、400、800、1 000、2 000、3 000、4 000 μmol·L<sup>-1</sup>, 反应缓冲液为 pH 8.0 的 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液, 10 μg AjOMT1,

40 °C下反应 10 min。反应后处理及分析条件同上。

**重组 AjOMT1 催化受体底物谱考察** 除槲皮素 (1) 外, 同时选取 16 种不同类型的化合物, 对 AjOMT1 底物杂泛性进行系统探究。底物分别为: 黄酮类化合物 [山柰酚 (2)、杨梅素 (3)、染料木素 (4)、芹菜素 (5)、黄芩素 (6)、香橙素 (7)、圣草酚 (8)、根皮素 (9)]、香豆素类化合物 [5,7-二羟基香豆素 (10)、6,7-二羟基香豆素 (11)]、苯丙素类化合物 [咖啡酸 (12)]、芪类化合物 [白藜芦醇 (13)、白皮杉醇 (14)、3,5,3',4'-四羟基联苜 (15)]、苜基异喹啉生物碱类 [去甲乌药碱 (16)、去亚甲基小檗碱 (17)]。反应体系为: 底物 (40 mmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL、SAM (40 mmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL、MgCl<sub>2</sub> (40 mmol·L<sup>-1</sup>) 2.5 μL、纯化蛋白 150 μg、Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup>) 补足至 100 μL。在 37 °C 下水浴反应 6 h, 反应后处理同上。流动相使用乙腈 (A 相) 和含 0.1% 体积分数甲酸的水 (B 相), 不同底物反应后的分析条件为: 底物 1~11 和 13, 15%~100% A 30 min 梯度洗脱; 底物 12, 20%~30% A 30 min 梯度洗脱; 底物 14 和 15, 5%~100% A 30 min 梯度洗脱; 底物 16 和 17, 10%~100% A 30 min 梯度洗脱。流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积均为 10 μL。

**产物的酶法合成、分离与结构鉴定** 利用 AjOMT1 的纯酶液进行放大酶促反应并制备代表性底物的甲基化产物。反应体积为 150 mL, 包括: 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> SAM、0.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、280 mg 纯酶、50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 底物加入量因底物不同在 10~25 mg 不等。于 40 °C 水浴振荡反应 12 h, 后用 2 倍体积的乙酸乙酯萃取 5 次, 将有机相减压浓缩至干, 用 1~2 mL 甲醇溶解, 0.45 μm 滤膜过滤, 乙腈/水作为流动相进行反相半制备 HPLC 分离, 产物经 MS、<sup>1</sup>H NMR (nuclear magnetic resonance) 和 <sup>13</sup>C NMR 分析确定结构, 如引入甲基的数目及位置等。

## 结果与分析

### 1 AjOMT1 的克隆与系统进化树分析

分析挖掘紫金牛转录组测序结果, 获得一条具有完整开放阅读框的 *OMT* 基因, 以紫金牛幼叶的 cDNA 为模板, 利用带有 pET-28a (+) 同源臂的 PCR 引物, 通过 RT-PCR 扩增目的基因全长并将 PCR 产物连接到 pET-28a (+) 载体上, 测序结果经过 NCBI 的 BLAST 比对分析, 确定该扩增产物为具有完整开放阅读框的 *OMT* 基因, 命名为 *AjOMT1* (GenBank accession number OP621325), 其序列长度为 735 bp, 编码 245 个氨基酸。

将紫金牛候选甲基转移酶 AjOMT1 氨基酸序列与植物中已报道的甲基转移酶的进行 OMT 系统进化树

的构建与聚类分析 (图 1)。从图 1 可看出, 来源于植物的 29 个 OMT 氨基酸序列被划分为 2 个主支, 从上到下分别为 Type I OMT (即咖啡酸氧甲基转移酶, caffeic acid *O*-methyltransferase, COMT)、Type II OMT (即咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶, caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase, CCOMT)。AjOMT1 与柑橘 (*Citrus reticulata*) 的 CrOMT1 蛋白系统进化关系非常接近, 氨基酸序列一致性为 71%, 同属于 Type II OMT。CrOMT1 具有催化含有邻二酚羟基黄酮形成多 *O*-甲基化产物的特性<sup>[13]</sup>, 因此, 推测 AjOMT1 可能具有催化天然产物 *O*-甲基化的活性。

### 2 AjOMT1 的原核表达与重组 AjOMT1 体外催化活性测定

将成功构建的 *AjOMT1* 与 pET-28a (+) 重组质粒转化到 *Transetta* (DE3) 表达感受态宿主细胞中, 通过诱导表达及蛋白纯化获得了纯度较高的重组 AjOMT1, SDS-PAGE 分析显示, 在 27 kDa 附近出现目标蛋白条带, 提示 *AjOMT1* 成功表达 (图 2)。

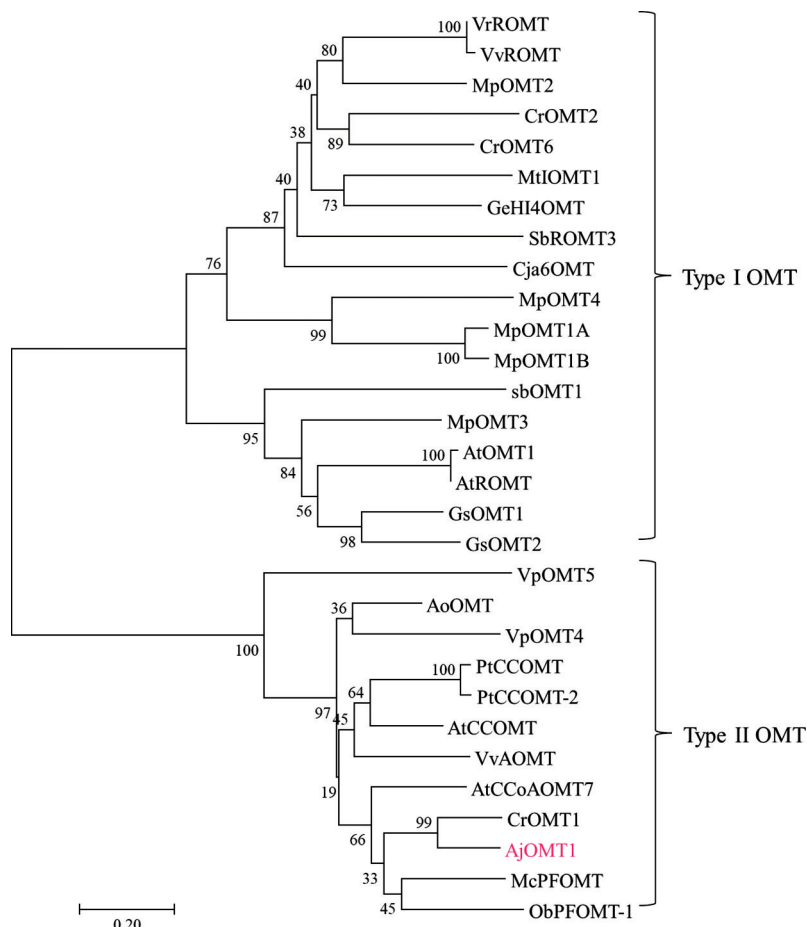
以 SAM 为甲基供体, Mg<sup>2+</sup> 为辅助因子, 以槲皮素 (1) 为甲基受体进行体外酶促反应 (图 3)。HPLC-UV/MS 分析显示, 重组 AjOMT1 可高效催化槲皮素 (1) 产生两个新的产物峰 1a (转化率为 95.5%)、1b (转化率为 2.7%) (图 3A、B), 且较底物的保留时间长。一级质谱显示 1a 分子质量较底物的分子质量增加 14 amu (图 3C), 推测 1a 为底物 1 的单甲基化产物。为了进一步确定 1a 的结构及 AjOMT1 的催化特点, 通过放大反应制备获得了 1a, 并经 NMR 分析鉴定产物 1a 结构为槲皮素 3'-甲醚。产物 1b 的分子质量较底物的分子质量增加 28 amu (图 3D), 表明 1b 为底物 1 的双甲基化产物 (因产率低未能制备)。以上结果表明, AjOMT1 对槲皮素 (1) 具有较强的位置选择性 3'-*O*-甲基化能力。

### 3 重组 AjOMT1 酶学性质研究

进一步以槲皮素 (1) 作为甲基化受体底物对 AjOMT1 的酶学性质及酶动力学进行了系统研究 (图 4)。AjOMT1 在 pH 6.0~9.0 均具有甲基化活性, pH 8.0 时活性最强 (图 4A); AjOMT1 在反应温度 20~40 °C 时随温度的升高活性逐渐增强, 40 °C 时活性最强 (图 4B); 在二价金属离子中, Mg<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Sn<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 可促进 AjOMT1 催化槲皮素 (1) 甲基化反应活性, 其中以 Mg<sup>2+</sup> 最强, 而 Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 则完全抑制其活性 (图 4C)。酶动力学考察结果显示, AjOMT1 对槲皮素 (1) 甲基化的  $K_m$  值为 355.7 μmol·L<sup>-1</sup>,  $V_{max}$  值为 390.9 nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> (图 4D)。

### 4 重组 AjOMT1 酶底物杂泛性研究

为考察 AjOMT1 体外酶底物杂泛性, 选取了多种

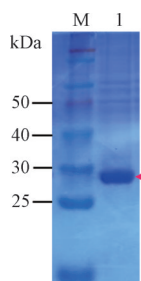


**Figure 1** Phylogenetic analysis of AjOMT1 (in magenta) with the previously characterized *O*-methyltransferases (OMTs) at the protein level. The evolution history was inferred base on the neighbor-joining method using the software MEGA 7.0. The bootstrap values are 1 000 replicates, and the scale bar represents 0.2 amino acid substitutions per site. the GenBank accession numbers of OMTs used for analysis are as follows: VrROMT (JX673941, *Vitis riparia*); VvROMT (NM\_001281115, *V. vinifera*); MpOMT2 (AY337459, *Mentha × piperita*); CrOMT2 (AY127568, *Citrus reticulata*); CrOMT6 (AY343490, *C. reticulata*); MtIOMT1 (AY942159, *Medicago truncatula*); GeHI4'OMT (AB091684, *Glycyrrhiza echinata*); SbROMT3 (JX673942, *Sorghum bicolor*); Cja6OMT (D29811, *Coptis japonica*); MpOMT4 (AY337461, *M. × piperita*); MpOMT1A (AY337457, *M. × piperita*); MpOMT1B (AY337458, *M. × piperita*); SbOMT1 (EF189707, *S. bicolor*); MpOMT3 (AY337460, *M. × piperita*); AtOMT1 (U70424, *Arabidopsis thaliana*); AtROMT (AY062837, *A. thaliana*); GsOMT1 (MT512039, *Gloriosa superba*); GsOMT2 (MT512043, *G. superba*); VpOMT5 (JF344741, *Vanilla planifolia*); AoOMT (XP\_020252875, *Asparagus officinalis*); VpOMT4 (JF344740, *V. planifolia*); PtCCOMT (XP\_002312473, *Populus trichocarpa*); PtCCOMT-2 (AFZ78549, *P. tomentosa*); AtCCOMT (NP\_564916, *A. thaliana*); VvAOMT (FJ460168, *V. vinifera*); AtCCoAOMT7 (AEE85172, *A. thaliana*); CrOMT1 (KI536925, *C. reticulata*); McPFOMT (3C3Y\_A, *Mesembryanthemum crystallinum*); ObPFOMT-1 (KC354401, *Ocimum basilicum*)

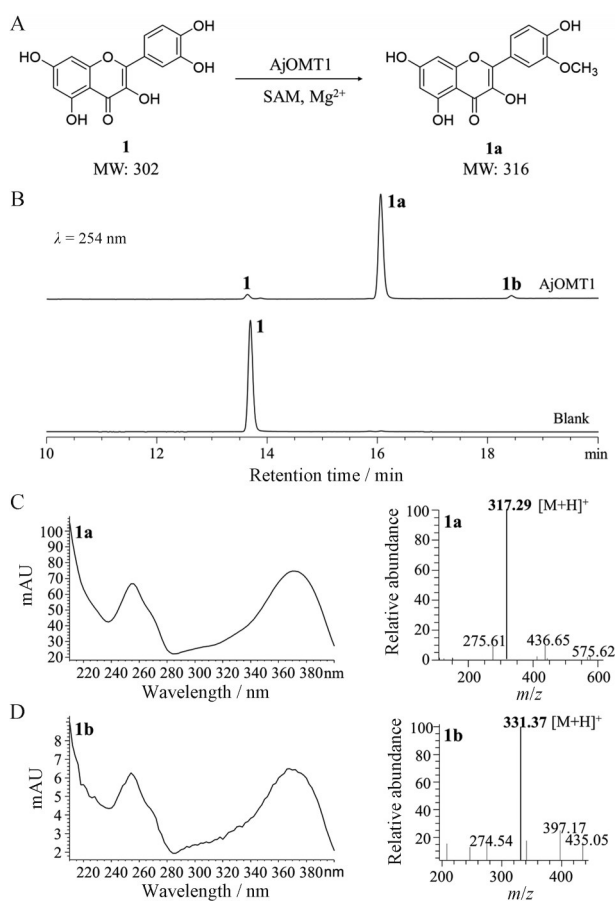
不同结构类型的 17 种化合物 (图 5A), 包括黄酮类 (1~9)、香豆素类 (10、11)、苯丙素类化合物 (12)、芪类 (13~15)、生物碱类 (16、17) 对重组 AjOMT1 催化底物谱进行系统性的研究和评价。重组 AjOMT1 在体外底物筛选中表现出很强的甲基化能力, 在本研究筛选范围内, 能对 17 个化合物中的 14 个包括 5 种结构类型的化合物进行 *O*-甲基化反应 (图 5B), 具有较强的底物杂泛性。该酶不仅能催化底物产生 1~2 个不同位点的 mono-*O*-甲基化产物, 甚至能催化有些底物产生 di-*O*-甲基化产物 (1、3、6、8、14、17)、tri-*O*-甲基化产物

(3、8)。AjOMT1 表现出较高的催化效率, 对 8 个化合物 (1、3、6、11、14~17) 的 *O*-甲基化活性大于 50%, 这些化合物的类型包括黄酮类 (1、3、6)、香豆素类 (11)、芪类 (14、15)、生物碱类 (16、17)。另外对黄酮类 (8) 和苯丙素类 (12) 化合物表现出中等强度的催化活性 (图 6、7)。

为进一步明确及系统性评价 AjOMT1 催化功能及催化特点, 通过放大酶促反应对部分甲基化产物进行合成、分离和纯化, 并通过质谱和核磁分析确定了产物的结构, 尤其是甲基化位置。通过比对相同骨架结构

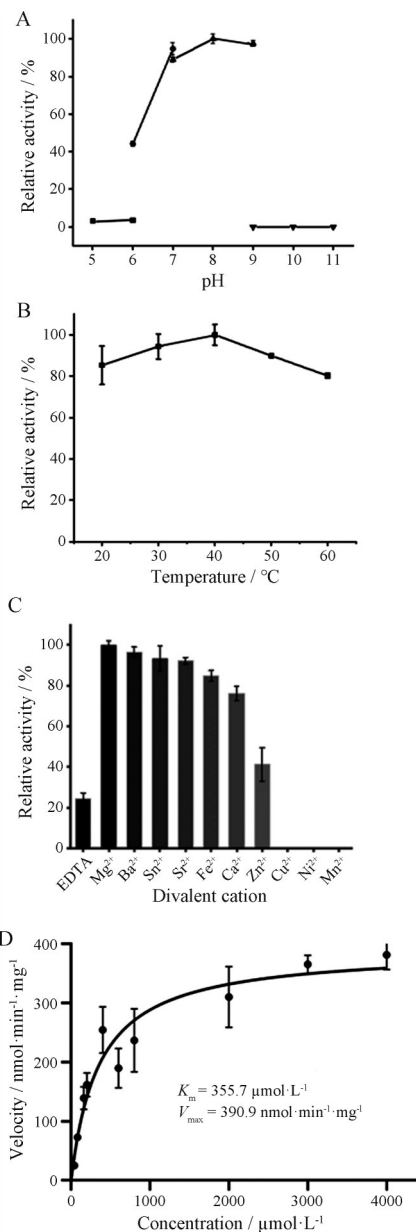


**Figure 2** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of purified recombinant AjOMT1 protein. Lane M: Protein Marker; Lane 1: His-tagged AjOMT1 (indicated with an arrow; predicted molecular weight, 27.6 kDa)



**Figure 3** *O*-methylation of quercetin (**1**) catalyzed by recombinant AjOMT1. A: AjOMT1 catalyzed the main *O*-methylated product of **1**; B: High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of **1** and the enzymatic products **1a**, **1b**; C: Ultraviolet (UV) and typical positive ion mass spectrometer (MS) spectra for **1a**; D: UV and typical positive ion MS spectra for **1b**. SAM: *S*-Adenosyl-*L*-methionine

化合物的羟基位置和参照制备的甲基化产物的甲基位点, 可看出重组 AjOMT1 对于含有邻二酚羟基的化合物具有较强的催化活性, 而对具有间位酚羟基的化合物则催化活性较弱 (**2**、**4**、**5** 和 **13**) 或不具有催化活性

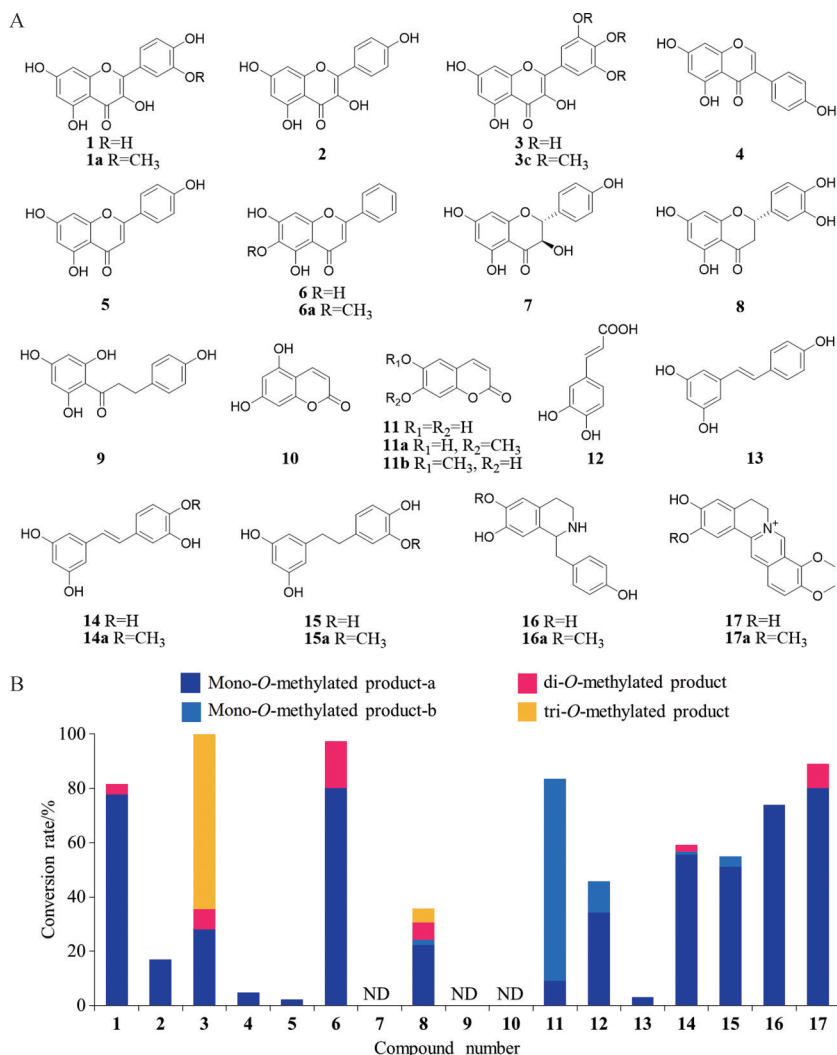


**Figure 4** Effects of various pH (A), temperature (B) and divalent metal ions (C) on the activity of AjOMT1. Nonlinear regression (D) of the Michaelis-Menten equation for AjOMT1. Quercetin (**1**) was used as the methylation acceptor, SAM was used as the methylation donor

(**7**、**9** 和 **10**)。AjOMT1 催化杨梅素 (**3**) 形成 tri-*O*-甲基化的主产物杨梅素 3',4',5'-三甲醚 (**3c**), 进一步证明 AjOMT1 具有催化含有邻二酚羟基的化合物形成多 *O*-甲基化产物的特性。除化合物 **16** 为底物时其甲基化产物仅有 1 个外, AjOMT1 可催化其他含有邻二酚羟基的化合物生成 2~4 个甲基化产物, 但以一种甲基化产物为主, 表明该酶促反应具有位置选择性。

## 5 结构鉴定

槲皮素 3'-甲醚 (isorhamnetin, **1a**, 2.0 mg): ESI-



**Figure 5** Probing the substrate catalytic promiscuity of AjOMT1. A: Structures of the substrates and part of corresponding methylated products prepared from the scale-up enzymatic reactions identified by MS, NMR spectroscopic data analysis; B: Conversion rates of different substrates with AjOMT1. ND: Not detected

MS ( $m/z$ ) 317.29 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.56 (1H, brs, H-2'), 7.46 (1H, brd,  $J$  = 8.4 Hz, H-6'), 6.91 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5'), 6.41 (1H, brs, H-8), 6.19 (1H, brs, H-6), 3.83 (3H, s, CH<sub>3</sub>O); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  175.8 (C-4), 164.0 (C-7), 160.6 (C-5), 156.3 (C-9), 148.7 (C-2), 147.4 (C-3'), 146.0 (C-4'), 135.5 (C-3), 122.2 (C-1'), 121.4 (C-6'), 115.6 (C-5'), 111.6 (C-2'), 102.3 (C-10), 98.7 (C-6), 93.8 (C-8), 55.7 (CH<sub>3</sub>O)<sup>[14]</sup>.

杨梅素 3',4',5'-三甲醚 (ferrugin, **3c**, 2.2 mg): ESI-MS ( $m/z$ ) 361.49 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.31 (2H, brs, H-2',6'), 6.51 (1H, brs, H-8), 6.27 (1H, brs, H-6), 3.89 (3H, s, 4'-CH<sub>3</sub>O), 3.86 (6H, s, 3'-CH<sub>3</sub>O, 5'-CH<sub>3</sub>O); <sup>13</sup>C NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 100 MHz)  $\delta$  177.6 (C-4), 167.2 (C-7), 162.2 (C-5), 158.1 (C-9), 151.7 (C-3',5'), 147.4 (C-2), 138.6 (C-4'), 138.3 (C-3), 128.0 (C-1'),

108.8 (C-2', 6'), 105.1 (C-10), 98.5 (C-6), 94.4 (C-8), 60.8 (4'-CH<sub>3</sub>O), 56.4 (3'-CH<sub>3</sub>O, 5'-CH<sub>3</sub>O)<sup>[15]</sup>.

千层纸素 A (oroxylin A, **6a**, 3.6 mg): ESI-MS ( $m/z$ ) 285.39 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.05 (2H, brd,  $J$  = 8.0 Hz, H-2',6'), 6.58 (3H, m, H-3',5'), 6.94 (1H, s, H-3), 6.62 (1H, s, H-8), 3.75 (3H, s, CH<sub>3</sub>O); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  182.0 (C-4), 163.4 (C-2), 157.6 (C-7), 152.8 (C-5), 152.7 (C-9), 131.9 (C-4'), 131.7 (C-1'), 130.8 (C-6), 129.1 (C-3',5'), 126.4 (C-2',6'), 104.6 (C-3), 104.4 (C-10), 94.6 (C-8), 59.8 (CH<sub>3</sub>O)<sup>[16]</sup>.

异东茛菪亭 (isoscopoletin, **11a**, 3.7 mg): ESI-MS ( $m/z$ ) 193.13 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.60 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz, H-4), 6.97 (1H, s, H-5), 6.83 (1H, s, H-8), 6.29 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz, H-3), 3.98 (3H, s, CH<sub>3</sub>O); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  161.6 (C-2), 150.2

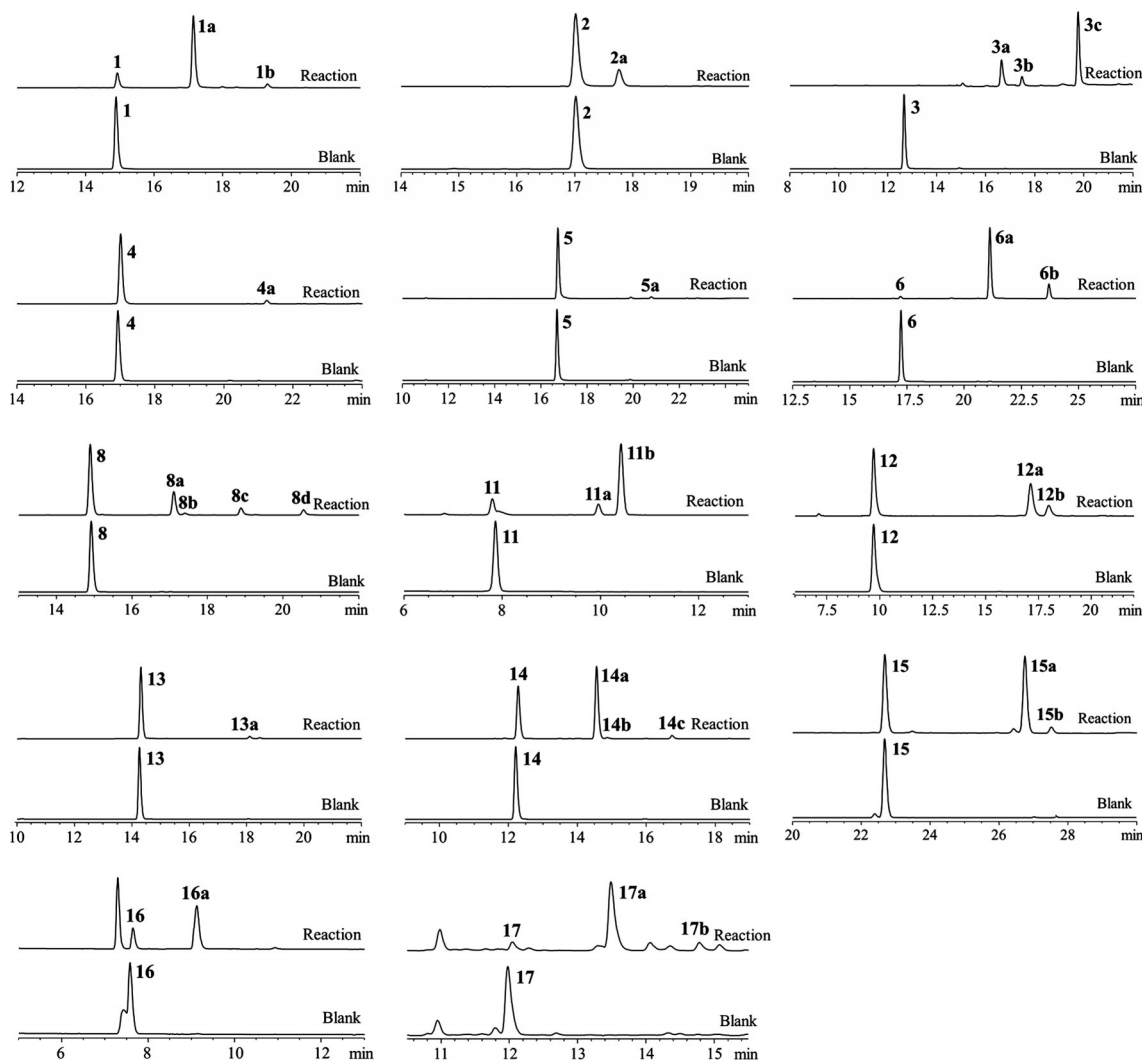


Figure 6 HPLC chromatograms of methylation of selected substrates by AjOMT1 *in vitro*

(C-9), 149.4 (C-7), 143.5 (C-4), 142.8 (C-6), 114.1 (C-3), 112.4 (C-10), 111.2 (C-5), 99.5 (C-8), 56.6 (CH<sub>3</sub>O)<sup>[17]</sup>.

东莨菪亭 (scopoletin, **11b**, 11.4 mg): ESI-MS (*m/z*) 193.12 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.91 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-4), 7.21 (1H, s, H-5), 6.78 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-3), 3.81 (3H, s, CH<sub>3</sub>O); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  160.7 (C-2), 151.1 (C-9), 149.5 (C-7), 145.2 (C-6), 144.5 (C-4), 111.7 (C-3), 110.5 (C-10), 109.6 (C-5), 102.8 (C-8), 56.0 (CH<sub>3</sub>O)<sup>[18]</sup>.

丹叶大黄素 (rhapontigenin, **14a**, 12.4 mg): ESI-MS (*m/z*) 259.29 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.22 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.02 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H- $\alpha$ ), 7.01 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.92 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H- $\beta$ ), 6.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.54 (2H, *J* = 2.0 Hz, H-2, 6), 6.28 (1H, t, *J* = 2.0 Hz, H-4), 3.89 (3H, s, CH<sub>3</sub>O); <sup>13</sup>C NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  159.6 (C-3, 5), 148.6 (C-3'), 147.5 (C-4'), 140.8 (C-1),

130.4 (C-1'), 129.4 (C- $\beta$ ), 127.0 (C- $\alpha$ ), 121.2 (C-6'), 115.9 (C-5'), 110.1 (C-2'), 105.6 (C-2, 6), 102.7 (C-4), 56.2 (CH<sub>3</sub>O)<sup>[19]</sup>.

3'-甲氧基-3,5,4'-三羟基联苯 (tristin, **15a**, 8.1 mg): ESI-MS (*m/z*) 261.21 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  6.72 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.65 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.58 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.06 (2H, *J* = 2.0 Hz, H-2, 6), 6.02 (1H, t, *J* = 2.0 Hz, H-4), 3.72 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.65 (4H, m, H- $\alpha$ ,  $\beta$ ); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  158.2 (C-3, 5), 147.3 (C-3'), 144.5 (C-4'), 143.7 (C-1), 132.5 (C-1'), 120.4 (C-6'), 115.2 (C-5'), 112.6 (C-2'), 106.4 (C-2, 6), 100.1 (C-4), 55.5 (CH<sub>3</sub>O), 37.6 (C- $\alpha$ ), 36.6 (C- $\beta$ )<sup>[20]</sup>.

乌药碱 (coclaurine, **16a**, 4.0 mg): ESI-MS (*m/z*) 286.23 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  9.47 (1H, s, OH), 8.98 (1H, s, OH), 7.09 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2', 6'), 6.73 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3', 5'), 6.72 (1H, s,

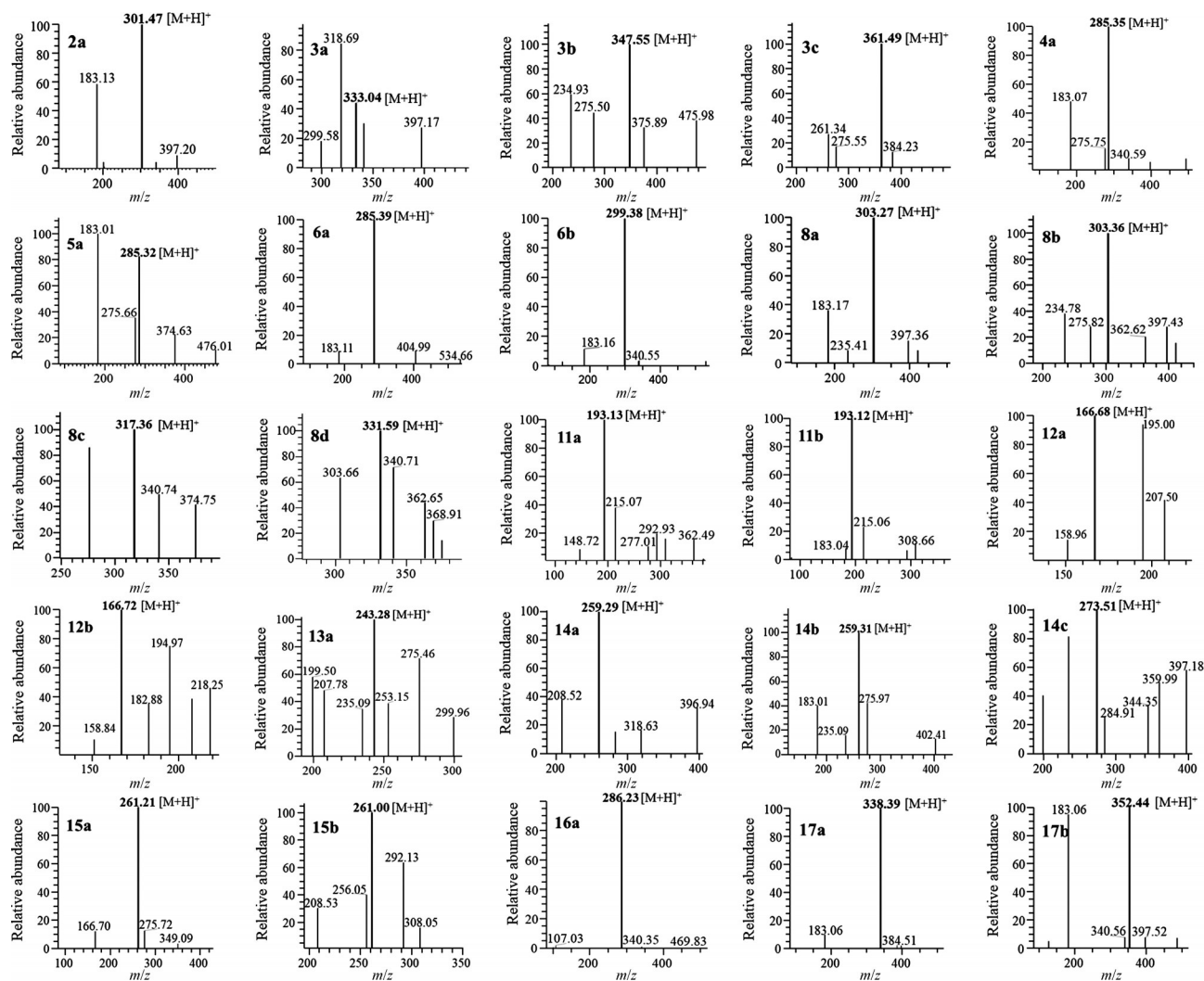


Figure 7 Typical positive ion MS spectra of methylated products catalyzed by AjOMT1 *in vitro*

H-5), 6.54 (1H, s, H-8), 4.52 (1H, m, H-9), 3.74 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.3-2.8 (6H, CH<sub>2</sub>×3); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ 156.5 (C-4'), 147.3 (C-6), 145.0 (C-7), 130.6 (C-2',6'), 125.8 (C-1'), 124.5 (C-1a), 119.7 (C-4a), 115.5 (C-3',5'), 111.9 (C-5), 113.4 (C-8), 63.1 (C-1), 55.6 (CH<sub>3</sub>O), 55.2 (C-3), 44.1 (C-9), 24.5 (C-4)<sup>[21]</sup>.

药根碱 (jatrorrhizine, **17a**, 12.7 mg): ESI-MS (*m/z*) 338.39 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ 9.72 (1H, s, H-8), 8.75 (1H, s, H-13), 8.09 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-11), 7.99 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-12), 7.65 (1H, s, H-1), 6.86 (1H, s, H-4), 4.90 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-6), 4.20 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.10 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 4.02 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.20 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-5); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ 151.8 (C-9), 151.7 (C-2), 149.6 (C-3), 146.1 (C-8), 145.7 (C-10), 140.2 (C-13a), 135.4 (C-4a), 130.3 (C-12a), 128.1 (C-12), 124.3 (C-11), 123.2 (C-1a), 120.9 (C-13), 119.4 (C-8a), 115.9 (C-4), 110.0

(C-1), 62.5 (9-OCH<sub>3</sub>), 57.6 (10-OCH<sub>3</sub>), 57.4 (2-OCH<sub>3</sub>), 56.9 (C-6), 27.6 (C-5)<sup>[22]</sup>.

## 讨论

OMTs 是含有甲氧基的天然产物生物合成途径中关键的后修饰酶。植物 OMTs 通常划分为 Type I OMT、Type II OMT 两种类型，目前已报道的植物 OMTs 大多属于 Type I OMT。Type II OMT 具有高效催化含有邻二酚羟基的化合物形成甲基化产物的特性<sup>[23]</sup>，系统进化分析表明，AjOMT1 属于 Type II OMT，体外底物谱的筛选进一步证明 AjOMT1 具有 Type II OMT 典型的催化功能。另外，AjOMT1 能催化底物形成 di-*O*-甲基或 tri-*O*-甲基产物的功能进一步支持与其系统进化关系非常近的 CrOMT1 在多甲基黄酮类化合物形成过程中具有重要作用<sup>[13]</sup>。值得一提的是，部分 Type I OMTs 同样具有催化含有邻二酚羟基化合物甲基化的功能，如来源于柑橘 (*C. reticulata*) 的黄酮类

OMT (CrOMT2)<sup>[24]</sup>、日本黄连 (*Coptis japonica*) 的苜基异喹啉生物碱类 OMT (Cja6OMT)<sup>[25]</sup>、嘉兰 (*Gloriosa superba*) 的生物碱类 OMT (GsOMT1)<sup>[26]</sup>等 (图 1)。

绝大多数报道的植物 OMTs 的底物谱较窄, 仅能对一种结构类型的化合物甲基化, 如黄酮类 OMTs (研究最为广泛和深入)、苜基异喹啉类 OMTs、芪类 OMTs 等。目前, 仅有少数植物 OMTs 能催化 2~4 类不同结构类型的化合物进行甲基化, 如唐松草属 *Thalictrum tuberosum* 的 OMTs 能催化苯丙素类、苜基异喹啉类; 欧洲赤松 (*Pinus sylvestris*) OMT 能催化芪类、苯丙素类、黄酮类; 冰叶日中花 OMT (*Mesembryanthemum crystallinum*) 能催化咖啡酸酯类、黄酮类。并且, 大多数底物谱较为宽泛的 OMTs 受体分子均具有邻二酚羟基 (邻苯二酚) 的结构<sup>[27]</sup>。AjOMT1 具有比所有已报道植物 OMTs 更为宽泛的底物谱, 可催化黄酮类、香豆素类、苯丙素类化合物、芪类、苜基异喹啉生物碱类共 5 种结构类型的化合物进行甲基化。尽管 AjOMT1 与苜基异喹啉类 OMTs 如 Cja6OMT、GsOMT1 在系统进化上差异较大, 但三者均能催化去甲乌药碱甲基化形成乌药碱, 表现出相似的催化活性。目前, 尚未从紫金牛药材中分离得到香豆素类、苯丙素类、芪类、苜基异喹啉生物碱类化合物, 但 AjOMT1 对上述类型化合物具有高效的甲基化活性。AjOMT1 的天然底物目前还难以确认, 由于其具有较强的底物杂泛性, 可开发为 *O*-甲基化的工具酶, 为 *O*-甲基化天然产物的合成提供了新颖、绿色、高效的酶催化方法, 亦可为天然产物合成生物学研究提供普适性甲基化元件。

**作者贡献:** 杨林、戴均贵设计实验; 刘琦、闫锐琪、隋颂扬进行生物信息学分析、蛋白表达纯化、底物杂泛性研究; 闫锐琪、谢冰寒进行酶学性质研究; 刘琦、闫锐琪分析数据; 刘琦、闫锐琪、解可波、杨林、戴均贵撰写文章手稿。

**利益冲突:** 本文不存在利益冲突。

## References

- [1] Liscombe DK, Louie GV, Noel JP. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases [J]. Nat Prod Rep, 2012, 29: 1238-1250.
- [2] Walle T. Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption [J]. Mol Pharmaceut, 2007, 4: 826-832.
- [3] Roberta B, Crisante F, Ginnasi MC. A convenient and safe *O*-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC) [J]. Molecules, 2011, 16: 1418-1425.
- [4] Cao H, Jing XH, Wu DH, et al. Methylation of genistein and kaempferol improves their affinities for proteins [J]. Int J Food Sci Nutr, 2013, 64: 437-443.
- [5] Liu XY, Luo LL, Ma Y, et al. Biopathway construction of plant natural products [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 3285-3299.
- [6] Kim SY, Jin CY, Kim CH, et al. Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF- $\kappa$ B, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation [J]. Int J Mol Med, 2019, 43: 682-692.
- [7] Rasquel-Oliveira FS, Manchope MF, Staurengo-Ferrari L, et al. Hesperidin methyl chalcone interacts with NF $\kappa$ B Ser276 and inhibits zymosan-induced joint pain and inflammation, and RAW264.7 macrophage activation [J]. Inflammopharmacology, 2020, 28: 979-992.
- [8] Li XP, Yu MX, Kuang TR, et al. Research progress on the antitumor effect of flavonoid derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 913-923.
- [9] Dat NT, Bae K, Wamiru A, et al. A dimeric lactone from *Ardisia japonica* with inhibitory activity for HIV-1 and HIV-2 ribonuclease H [J]. J Nat Prod, 2007, 70: 839-841.
- [10] Piacente S, Pizza C, De Tommasi N. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity [J]. J Nat Prod, 1996, 59: 565-569.
- [11] Fukuyama Y, Kiriya Y, Okino J, et al. Naturally occurring 5-lipoxygenase inhibitor. II. Structures and syntheses of ardisianones A and B, and maesinin, alkenyl-1, 4-benzoquinones from the rhizome of *Ardisia japonica* [J]. Chem Pharm Bull, 1993, 41: 561-565.
- [12] Mei L, Deng Y. Research progress on chemical components of *Ardisia* plants [J]. Asia-Pacific Trad Med (亚太传统医学), 2015, 11: 54-55.
- [13] Liu XJ, Zhao CN, Gong Q, et al. Characterization of a caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase like enzyme involved in biosynthesis of polymethoxylated flavones in *Citrus reticulata* [J]. J Exp Bot, 2020, 71: 3066-3079.
- [14] Docampo-Palacios ML, Alvarez-Hernández A, Adiji O, et al. Glucuronidation of methylated quercetin derivatives: chemical and biochemical approaches [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68: 14790-14807.
- [15] Cimanga K, Bruyne TD, Apers S, et al. Complement-inhibiting constituents of *Bridelia ferruginea* stem bark [J]. Plant Med, 1999, 65: 213-217.
- [16] Xiao LH, Wang HY, Song SJ, et al. Isolation and identification of the chemical constituents of roots of *Scutellaria amoena* C. H. Wright [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2003, 20: 181-183, 193.
- [17] Bendjedou H, Maggi F, Bennaceur M, et al. A new ionone derivative from *Lycium intricatum* Boiss. (Solanaceae) [J]. Nat Prod Res, 2022, 36: 687-694.
- [18] Urbagarova BM, Shults EE, Taraskin VV, et al. Chromones and coumarins from *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. growing in Buryatia and Mongolia and their cytotoxicity [J]. J

- Ethnopharmacol, 2020, 261: 112517.
- [19] Silayo A, Ngadjui BT, Abegaz BM, et al. Homoisoflavonoids and stilbenes from the bulbs of *Scilla nervosa* subsp. *rigidifolia* [J]. Phytochemistry, 1999, 52: 947-955.
- [20] Majumder PL, Pal (née Ray) S. Cumulatin and tristin, two bibenzyl derivatives from the orchids *Dendrobium cumulatum* and *Bulbophyllum triste* [J]. Phytochemistry, 1993, 32: 1561-1565.
- [21] Song FQ, Sun Y, Han LM, et al. Separation of coclaurine from *Ziziphi Spinosa* Semen and discussion on its antidepressant mechanism by network pharmacology [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2019, 42: 636-642.
- [22] Tang Y, Li SL, Li SN, et al. Screening and isolating potential  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Rhizoma Coptidis* by ultrafiltration LC-PDA-ESI/MS combined with high-speed countercurrent chromatography and reverse phase medium-pressure liquid chromatography [J]. Med Chem Res, 2017, 26: 3384-3394.
- [23] Cui MY, Lu AR, Li JX, et al. Two types of *O*-methyltransferase are involved in biosynthesis of anticancer methoxylated 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Plant Biotechnol J, 2022, 20: 129-142.
- [24] Liu XJ, Wang Y, Chen YZ, et al. Characterization of a flavonoid 3'/5'/7-*O*-methyltransferase from *Citrus reticulata* and evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of its methylated products [J]. Molecules, 2020, 25: 858.
- [25] Inui T, Tamura K, Fujii N, et al. Overexpression of *Coptis japonica* norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase overcomes the rate-limiting step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in cultured *Eschscholzia californica* [J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48: 252-262.
- [26] Nett RS, Lau W, Sattely ES. Discovery and engineering of colchicine alkaloid biosynthesis [J]. Nature, 2020, 584: 148-153.
- [27] Lam KC, Ibrahim RK, Behdad B, et al. Structure, function, and evolution of plant *O*-methyltransferases [J]. Genome, 2007, 50: 1001-1013.