

头花蓼黄酮类化合物 O-甲基转移酶基因家族的鉴定及表达分析

骆江利¹, 刘畅¹, 曾宪法¹, 吴娜娜¹, 王小雪¹, 唐英², 蒲翔^{1,2*}

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 头花蓼 *Polygonum capitatum* 为贵州特色苗药, 临床常用于治疗胃肠道和泌尿系统感染, 研究发现其具有较好的抑菌抗炎作用, 其主要活性成分为黄酮类化合物。黄酮 O-甲基转移酶 (flavonoid O-methyltransferase, FOMT) 是黄酮类化合物氧甲基化修饰的关键酶, 为了解头花蓼 FOMT 蛋白功能及特性, 本研究以头花蓼根、茎、叶、花为材料, 采用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序技术进行转录组测序, 对获得的转录本进行注释分析, 并对头花蓼中 FOMT 基因家族进行全基因组的挖掘和鉴定。共获得 99 298 条 Unigenes, 其中 71 514 条被公共数据库成功注释。头花蓼的基因组中, 共鉴定得到 50 个 FOMT 基因, 系统发育树显示 FOMT 基因分为咖啡酰辅酶 A O-甲基转移酶 (caffeoyl CoA O-methyltransferase, CCoAOMT) 亚家族和咖啡酸 O-甲基转移酶 (caffeic acid O-methyltransferase, COMT) 亚家族两个亚类。基因序列特征分析显示 FOMT 编码氨基酸的数目介于 99~1 053 aa, 分子质量为 11 224.91~86 687.42 Da, 等电点为 4.79~9.45, 50 个 FOMT 家族成员均为疏水性蛋白, 亚细胞定位结果显示 54% 的 FOMT 亚家族 CCoAOMT 及 COMT 成员定位于细胞质, 28% 定位于叶绿体。FOMT 基因具有组织特异性, 在头花蓼花中高表达, 其次是茎, 在根中表达最低。本研究对头花蓼 FOMT 基因家族进行鉴定与分析, 为进一步深入研究 FOMT 功能和甲基化黄酮类化合物的生物合成提供理论依据。

关键词: 头花蓼; 转录组; 黄酮类化合物 O-甲基转移酶; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1467-11

Identification and expression analysis of flavonoid O-methyltransferase gene family in *Polygonum capitatum*

LUO Jiang-li¹, LIU Chang¹, ZENG Xian-fa¹, WU Na-na¹, WANG Xiao-xue¹,
TANG Ying², PU Xiang^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

2. School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Polygonum capitatum* is a characteristic Miao medicine in Guizhou, commonly used in clinical practice to treat gastrointestinal and urinary tract infections. Research has found that it has good antibacterial and anti-inflammatory effects, and its main active ingredient is flavonoids. Flavonoid O-methyltransferase (FOMT) is a key enzyme for oxymethylation modification of flavonoid compounds. In order to understand the function and properties of FOMT protein in *Polygonum capitatum*, the transcriptome was sequenced by Illumina HiSeq 4000 high throughput sequencing technology. Then, the obtained transcripts were annotated and analyzed, and the whole genome of the FOMT gene family in *Polygonum capitatum* was mined and identified. A total of 99 298 Unigenes were obtained, of which 71 514 were successfully annotated by the public database. In the genome of *Polygonum capitatum*, a total of 50 FOMT genes were identified. The phylogenetic tree showed that FOMT genes were divided into two subfamilies: caffeoyl CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) and caffeic acid O-methyltransferase

收稿日期: 2023-10-27; 修回日期: 2024-02-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060913); 贵阳市科技计划项目 (筑科合同 [2021] 43-11 号).

*通讯作者 Tel: 18153114415, E-mail: 314745595@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1204

(COMT). Gene sequence analysis showed that the number of FOMT encoded amino acids ranged from 99 to 1 053 aa, the molecular weight ranged from 11 224.91 to 86 687.42 Da, and the isoelectric point ranged from 4.79 to 9.45. The 50 FOMT family members were hydrophobic proteins. Subcellular localization results showed that 54% of FOMT subfamily CCoAOMT and COMT members were located in cytoplasm and 28% were located in chloroplasts. The FOMT gene was tissue specific and highly expressed in the flowers of *Polygonum capitatum*, followed by the stems, and the least expressed in the roots. In this study, the FOMT gene family of *Polygonum capitatum* was identified and analyzed to provide theoretical basis for further study of FOMT function and biosynthesis of methylated flavonoids.

Key words: *Polygonum capitatum*; transcriptome; flavonoid *O*-methyltransferase; bioinformatics; expression analysis

头花蓼 (*Polygonum capitatum* Buch-Ham. ex D. Don) 为蓼科蓼属多年生草本植物, 药地上部分或全草, 是少数民族常用药材, 特别是苗族医最为常用。头花蓼味苦、辛, 性凉, 归肾、膀胱经, 具有清热利湿、活血散瘀、利尿通淋功能, 主治痢疾、肾盂肾炎、膀胱炎、尿路结石、盆腔炎、前列腺炎、风湿痛、跌打损伤等^[1]。现代研究表明, 头花蓼中主要药效成分为黄酮类化合物, 具有抗炎、抗菌、抗氧化等作用, 且针对泌尿系统疾病有独特疗效^[2]。根据文献报道和课题组前期对头花蓼黄酮类化合物的研究表明, 头花蓼黄酮类成分包括槲皮素、槲皮苷、杨梅苷、芦丁、陆地棉苷、5,7-二羟基色原酮、山柰酚、木犀草素、2"-*O*-没食子酰基槲皮苷等主要化合物, 还包括槲皮素-3-*O*-(2"-*O*-没食子酰基)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、槲皮素-3-*O*-(3"-*O*-没食子酰基)- α -*L*-吡喃鼠李糖苷、7-*O*-(6'-没食子酰基)- β -*D*-葡萄糖基-5-羟基色原酮、槲皮素-3-*O*-(6"-*O*-反式阿魏酰基)- β -*D*-吡喃半乳糖苷等多种黄酮类化合物^[3-8]。然而目前对于头花蓼中有关黄酮类化合物生物合成、调控机制及调控黄酮类化合物合成的转录因子功能鉴定等方面研究较少。

黄酮类化合物在植物的发育、生长和成熟过程中起关键作用, 可以帮助植物应对各种生物和非生物的压力。例如, 黄酮类化合物的积累可以增强植物对紫外线的耐受性^[9], 提高植物抗氧化能力和耐冷性^[10], 并有助于其抵御病毒、真菌、细菌和食草动物的伤害, 促使植物适应陆地环境^[11]。此外, 黄酮类化合物还能与花青素色素相结合改变花的颜色^[12]。黄酮类化合物也具有广泛的生物活性, 如抗氧化、抗炎、镇痛、抗癌、免疫调节、心血管保护、预防慢性疾病等, 具有广阔的食品和药物开发前景^[13-16]。黄酮类化合物应用前景广泛, 但由于膳食类黄酮的不稳定性和低生物利用度, 限制其开发利用。

植物中的黄酮类化合物可以通过甲基化、糖基化、酰基化、羟基化和异戊烯基化等多种修饰方式, 实现其

结构和功能的多样性^[17]。在植物中, 通过甲基化修饰的黄酮类化合物参与多种生理过程, 如细胞壁形成、逆境应答等^[18]。甲基化修饰包括 *O*-甲基化、*C*-甲基化、*S*-甲基化和 *N*-甲基化, 其中 *O*-甲基化是由 *O*-甲基转移酶 (*O*-methyltransferase, OMT) 催化的, 利用 *S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸作为甲基供体, 产生 *O*-甲基化黄酮类化合物和 *S*-腺苷-*L*-高半胱氨酸^[18-22]。*O*-甲基化黄酮类化合物具有更好的稳定性和跨膜能力, 在不同类植物中广泛分布, 包括苔藓、蕨类和双子叶植物^[23]。目前, 黄酮 *O*-甲基转移酶 (flavonoid *O*-methyltransferase, FOMT) 在黄芩^[24] (*Scutellaria baicalensis*)、薄荷^[25] (*Mentha canadensis*) 及艾叶^[26] (*Ambrosia artemisiifolia*) 等药用植物中已有报道, 黄芩根中 II 型 OMT 和 I 型 OMT 对其 4'-脱氧黄酮具有催化活性, 通过在表达 SbPFOMT 的酵母培养基中添加相应的羟基化 4'-脱氧黄酮, 可以半生物合成具有较高生物活性的 4'-脱氧黄酮^[24]。

O-甲基化黄酮类化合物具有多种药用功能, 并且 *O*-甲基化修饰可以增强部分黄酮类化合物的药用活性。例如, 对于位于 8-OH 位置的 *O*-甲基化修饰, 可以增强黄酮类化合物的促胰岛素分泌活性, 进而提高其抗糖尿病功能^[27]。此外, *O*-甲基化修饰还能提高黄酮类化合物的抗氧化活性和抗炎能力。例如, 异鼠李素 (3'-*O*-甲基化槲皮素) 具有抑制促炎物质分泌和减少活性氧含量的能力, 具有强大的抗氧化作用^[28]。另外, *O*-甲基化黄酮类化合物还可以影响多种耐药蛋白的活性, 提高生物体对有毒化合物的防御能力^[29]。黄酮类化合物的生物利用度对其在人体内发挥药理作用非常重要, *O*-甲基化修饰可以增强其亲脂性, 保护酚羟基, 增加代谢稳定性, 从而显著提高生物利用度^[17]。

头花蓼作为一种民族药, 具有重要的应用价值, 但其研究主要集中在化学成分与药理作用, 其基因功能研究基础十分薄弱。因此, 课题组利用 Illumina HiSeq 测序平台对头花蓼根、茎、叶、花进行转录组测序, 以期获得与其黄酮类化合物生物合成相关的基因信息, 并

在头花蓼全基因组水平上鉴定分析黄酮 *O*-甲基转移酶基因家族成员, 通过对头花蓼 FOMT 基因家族成员理化性质、系统进化、保守基序等进行系统分析, 基于转录组数据和 qRT-PCR 对其表达模式进行分析, 以期到头花蓼黄酮类化合物生物合成研究奠定基础。

材料与amp;方法

材料 苗药头花蓼于 2022 年 5 月采于贵州省花溪区 (26°23'20"N, 106°36'50"E), 经贵州中医药大学魏升华教授鉴定为苗药头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don。分别取头花蓼根 (PCR1、PCR2、PCR3)、茎 (PCS1、PCS2、PCS3)、叶 (PCL1、PCL2、PCL3)、花 (PCF1、PCF2、PCF3) 四个组织部位, 称取各样品 100 mg 用锡箔纸包裹置于液氮中速冻, 冻存于 -80 °C 冰箱备用, 用于 RNA 的提取及转录组测序。

试剂 FastKing 一步法除基因 cDNA 第一链合成预混试剂 (批号: X0319)、RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (批号: X0429)、Talent 荧光定量检测试剂盒 (批号: X0324) 和 DNA Marker 标准分子量 DL2000 (批号: Y2030), 天根生化 (北京) 科技有限公司。

仪器 ChemiDoc 凝胶成像系统和 CFX 96 Touch 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), DYY-7C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司), Sorvall Legend Micro 17R 高速冷冻离心机 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。

RNA 的提取及测序 采用 Trizol 试剂分离提取头花蓼根、茎、叶、花四个组织部位总 RNA, 每个部位生物学重复 3 次。用 Oligotex mRNA 试剂盒对 RNA 进行纯化。利用 Agilent 2100 检测 RNA 样品的浓度和完整性, 12 个苗药头花蓼 RNA 样品均满足转录组测序的建库要求, 采用 Illumina HiSeq 4000 平台进行转录组测序。

数据过滤及组装 对转录组测序得到原始测序数据 (raw reads) 进行数据过滤, 以确保得到高质量测序数据 (clean reads)。使用 fastp 软件过滤掉质量低、含有接头和未知碱基 N 含量大于 10% 的测序数据 (reads), 利用 Trinity 软件对样本高质量测序数据进行组装, 再使用 tgiel 进行聚类、去冗最后得到 Unigenes。

Unigenes 注释分类和基因表达量计算 使用 DIAMOND BLASTX 软件将 Unigene 序列与 KEGG、NR、Swiss-Prot、GO、COG/KOG、TrEMBL 数据库比对, 预测完 Unigene 的氨基酸序列之后使用 HMMER 软件与 Pfam 数据库比对, 获得 Unigene 的注释信息。结合 RSEM (RNA-Seq by expectation maximization) 进行表达量水平估计, 并采用 FPKM (fragments per kilobase

of transcript per million fragments mapped) 值表示对应基因的表达丰度。

FOMT 基因全基因组的鉴定、系统发育树构建 从头花蓼转录组数据库中调取黄酮类化合物生物合成通路上 *O*-甲基转移酶基因家族序列, 共鉴定到 50 个黄酮 *O*-甲基转移酶家族成员。利用 National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 进行同源比对和保守结构域分析, 并将 50 个 FOMT 家族成员的蛋白序列与其他植物的 FOMT 成员进行序列比对, 构建系统进化树。应用 MEGA 比对工具采取 NJ (neighbour-join) 方法, 其中 bootstrap 值设置 1 000, 其余设定均采用默认值。

FOMT 基因家族成员蛋白质特征分析及亚细胞定位 利用 TBtools 软件预测头花蓼中含有的 50 个 FOMT 蛋白的理论等电点、不稳定系数及分子质量等基本理化性质。使用在线生物信息学工具 WOLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 对获取的 50 个 FOMT 蛋白进行亚细胞定位预测。

FOMT 基因保守结构域和基因结构分析 利用 MEME 在线网站 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析 50 个 FOMT 的蛋白质保守基序, 目标保守基序设为 10, 其余为默认值, 利用 TBtools 对头花蓼 FOMT 家族的基因进行可视化分析。

FOMT 基因家族成员的基因表达分析 利用 qRT-PCR 检测 OMT15 (*O*-methyltransferase 15, Cluster-53319.2)、OMT1 (*O*-methyltransferase 1, Cluster-48392.0)、OMT3 (*O*-methyltransferase 3, Cluster-48474.2)、COMT1 (caffeic acid *O*-methyltransferase 1, Cluster-31061.0) 基因的表达量, 实验样品为头花蓼根、茎、叶、花组织, 每个样品设置 3 次生物学重复。利用天根试剂盒提取本研究所植物总 RNA, 用 NanoDrop 2000 分光光度计检测所提取总 RNA 的 A260/A280 的比值和浓度及用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。将符合要求的总 RNA 利用反转录试剂盒合成 cDNA。cDNA 反应体系: 模板 4 μL, 5×Fatking-RT Supermix 4 μL, RNase-Free ddH₂O 12 μL, 反转录程序: 42 °C 15 min, 95 °C 3 min。

利用 Primer 6 软件设计 OMT15、OMT1、OMT3、COMT1 基因的引物, 引物见表 1。以 cDNA 为模板, 利用荧光定量 PCR 仪进行反应, 通过三步法, 分别扩增内参基因 GAPDH 和目的基因的 cDNA 核酸序列。反应体系: RNase-Free ddH₂O 7.4 μL, 2×Talent qPCR PreMix 10 μL, 正反引物各 0.8 μL, cDNA 模板 1 μL。反应程序: 扩增条件为 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 5 s, 56 °C

Table 1 Primer sequences of *O*-methyltransferase genes from *Polygonum capitatum*

| Gene | Forward primer sequence (5'-3') | Reverse primer sequence (3'-5') |
|--|---------------------------------|---------------------------------|
| Reference gene | TGACCTCCCCGTCCTTCCT | CCTGACGAGTGGTGCCGAAA |
| Caffeic acid <i>O</i> -methyltransferase 1 (COMT1) | GGATGTCGGGTCTGGATTGAA | TGGTGATGATGGTGAAGTCGG |
| <i>O</i> -Methyltransferase 3 (OMT3) | GAGCAAAGACCAAGCAAATGAGTT | TTATGAGGGTGGATAGGAAGAGCA |
| <i>O</i> -Methyltransferase 15 (OMT15) | GGTTTCTCCCGATCAAGCACA | ATCGCCATCCCATGTTTCACA |
| <i>O</i> -Methyltransferase 1 (OMT1) | CAAGCAAAGAGGAAAAGGGAGGAG | GATCTGTGAGAGGGAGATGGGAGAG |

退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 设置 39 个循环, 分析荧光值变化曲线及熔解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算表达水平。

结果

1 转录组测序与序列组装

利用 Illumina HiSeq 4000 测序平台对苗药头花蓼根 (PCR1、PCR2、PCR3)、茎 (PCS1、PCS2、PCS3)、叶 (PCL1、PCL2、PCL3)、花 (PCF1、PCF2、PCF3) 四个组织部位样品进行转录组测序, 共获得 94.2 Gb 高质量测序数据, 其根、茎、叶、花四个组织部位 Q_{30} 平均值分别为 91.23%、91.19%、91.96%、91.07%, 平均每个组织样品的 GC 含量分别占总碱基数的 46.00%、47.47%、47.32%、46.80% (表 2)。利用 Trinity 对高质量测序数据进行序列组装, 共获得 99 298 条 Unigenes, 总长度为 160 783 247 核苷酸 (nucleotide, nt), 平均长度为 1 619 nt, N_{50} 为 2 487 nt, 组装完整性较高。长度大于 2 000 nt 的 Unigenes 最多, 有 30 341 条, 占 Unigenes 总数的 30.56%, 长度分布在 400~500 nt 的 Unigenes 有 8 567 条, 长度分布在 300~400 nt 的 Unigenes 有 7 342 条, 占 Unigenes 总数的 7.39%。

Table 2 Transcriptome data output quality

| Sample | Clean reads | Clean base (G) | Q20 /% | Q30 /% | GC content /% |
|--------|-------------|----------------|--------|--------|---------------|
| PCF1 | 50 746 002 | 7.61 | 96.35 | 90.30 | 47.22 |
| PCF2 | 55 220 864 | 8.28 | 97.04 | 91.75 | 46.79 |
| PCF3 | 54 470 322 | 8.17 | 96.78 | 91.17 | 46.38 |
| PCL1 | 49 588 182 | 7.44 | 97.31 | 92.39 | 47.45 |
| PCL2 | 51 333 872 | 7.70 | 96.68 | 91.05 | 47.49 |
| PCL3 | 56 569 986 | 8.49 | 97.32 | 92.43 | 47.02 |
| PCR1 | 58 183 540 | 8.73 | 96.96 | 91.54 | 46.01 |
| PCR2 | 50 990 118 | 7.65 | 96.62 | 90.85 | 46.28 |
| PCR3 | 50 306 640 | 7.55 | 96.82 | 91.29 | 45.72 |
| PCS1 | 49 956 202 | 7.49 | 96.96 | 91.62 | 47.17 |
| PCS2 | 51 281 644 | 7.69 | 96.79 | 91.26 | 47.38 |
| PCS3 | 49 321 588 | 7.40 | 96.49 | 90.69 | 47.86 |

2 序列比对及功能注释

对 99 298 条 Unigenes 进行 GO、KEGG、KOG、Pfam、SwissProt、TrEMBL、NR 等七大数据库比对。结果表明共有 71 514 条 Unigenes 被注释到数据库中, 占全部 Unigenes 的 72.02%, 其中 TrEMB 数据库中注释到的 Unigenes 最多, 有 67 503 条, 占总 Unigenes 的

67.98%, 其次是 NR 数据库, 注释到 67 027 条 Unigenes (67.50%), GO、KEGG、KOG、Pfam 和 SwissProt 数据库, 分别注释到 59 367 (59.79%)、53 448 (53.83%)、45 870 (46.19%)、53 763 (54.14%) 和 53 027 (53.40%) 条 Unigenes。基于同源基因的物种对 Unigenes 注释, 在相似序列匹配度较高的物种中, 甜菜 *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* 所占比例最高 (7 557 条), 其次为藜麦 *Chenopodium quinoa* Willd. (7 138 条)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (5 033 条)、菠菜 *Spinacia oleracea* L. (4 425 条)、栓皮栎 *Quercus suber* L. (3 347 条)、胡桃 *Juglans regia* L. (1 407 条)、橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg. (1 064 条)、可可 *Theobroma cacao* L. (1 040 条)、枣 *Ziziphus jujuba* Mill. (983 条)、麻风树 *Jatropha curcas* L. (978 条), 其他匹配物种的 Unigenes 为 26 142 条。

3 基因功能注释

对苗药头花蓼转录组数据进行 KOG 数据库功能注释和分类, 共有 51 138 条 Unigenes 被注释到 25 种 KOG 分类中, 有 9 240 条 Unigenes 被注释到“一般功能预测”, 是注释最多 Unigenes 的类群, 占总数的 18.07%, 其次是“信号转导机制”4 959 条, “翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣”4 957 条, “翻译、核糖体结构和生物发生”2 978 条, 注释到“细胞内运输、分泌和囊泡运输”类群的 Unigenes 有 2 777 条, 2 726 条 Unigenes 注释到“转录”, 2 465 条 Unigenes 注释到“碳水化合物运输和代谢”, 2 190 条 Unigenes 注释到“能量生产和转换”, 2 158 条 Unigenes 注释到“RNA 加工和修饰”, 1 999 条 Unigenes 注释到“脂质运输和代谢”, 1 930 条 Unigenes 注释到“氨基酸运输和代谢”(图 1)。

利用 GO 数据库对 Unigenes 进行功能注释, 59 367 条 Unigenes 被注释到细胞组成、分子功能和生物过程 3 大类。在细胞组成中 Unigenes 主要聚集在细胞解剖实体和含蛋白质的复合物部分 2 个类群, 分别注释了 50 512 和 9 557 条, 分子功能中聚集最多的 2 个类群是结合蛋白和细胞过程, 分别注释到 35 398 和 30 217 条 Unigenes, 在生物过程中聚集最多的 2 个类群是细胞过程和代谢过程, 分别注释了 39 467 和 31 656 条 Unigenes (图 2)。

通过 KEGG 数据库对头花蓼 Unigenes 进行注释,

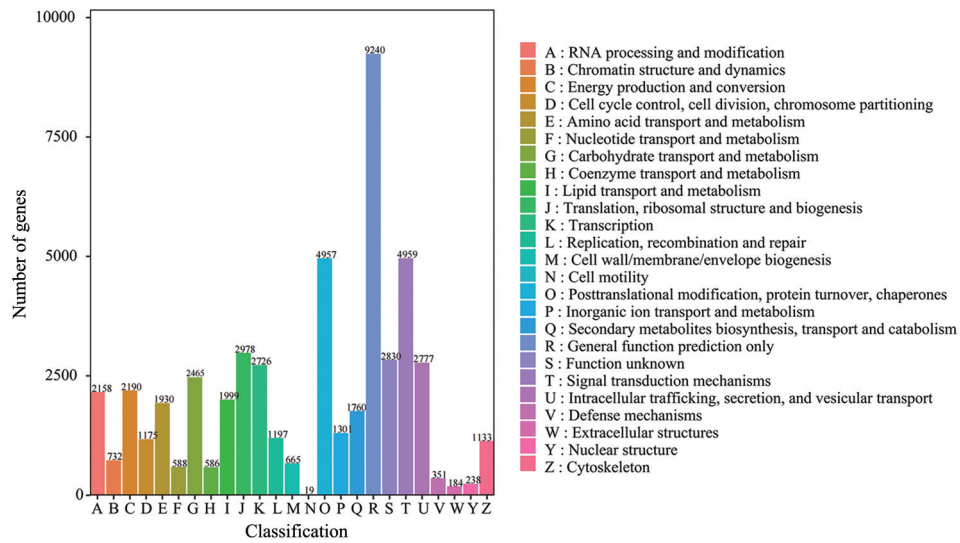


Figure 1 KOG functional classifications of *Polygonum capitatum* transcriptome

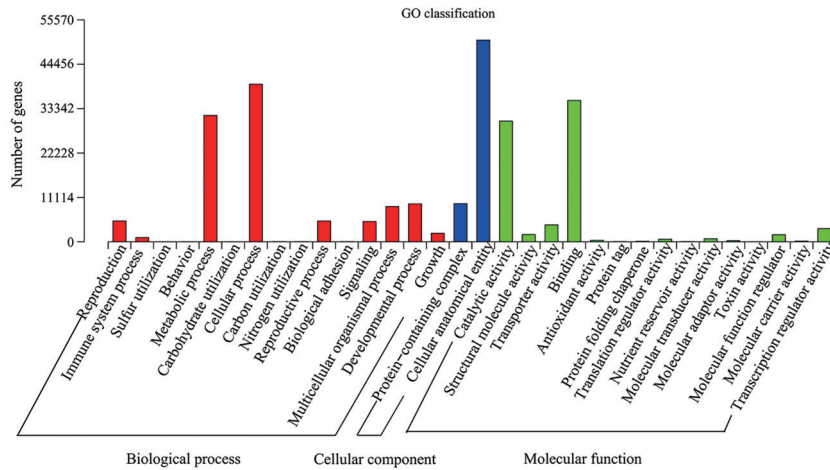


Figure 2 GO functional classifications of *Polygonum capitatum* transcriptome

共注释到 145 个 KEGG 标准代谢通路, 主要涉及糖酵解/糖异生、糖醛酸转化途径、果糖和甘露糖代谢、半乳糖代谢、抗坏血酸和醛酸代谢等通路 (图 3)。

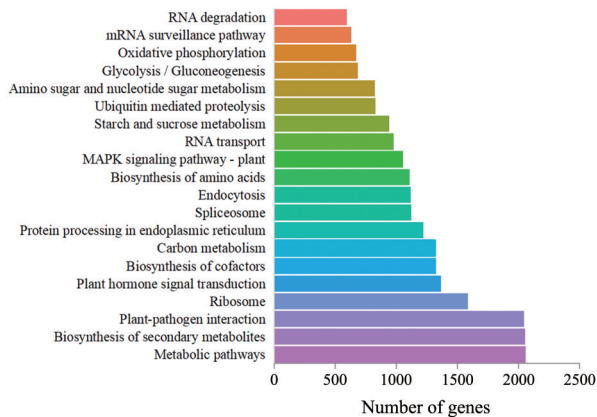


Figure 3 KEGG functional classifications of *Polygonum capitatum* transcriptome

4 头花蓼 FOMT 基因家族全基因组鉴定

从头花蓼基因组数据库筛选并鉴定黄酮 O-甲基转移酶基因, 去除可变剪切导致的重复转录本和结构域确认, 最终获得 50 个 FOMT 家族成员。为研究头花蓼 FOMT 基因家族的进化关系, 本研究选取其他植物的 FOMT 基因与头花蓼 FOMT 进行系统进化树构建。如图 4 所示, 进化树主要由两大进化枝构成, 包括咖啡酰辅酶 A O-甲基转移酶 (caffeoyl CoA O-methyltransferase, CCoAOMT) 亚家族和咖啡酸 O-甲基转移酶 (COMT) 亚家族。根据 FOMT 催化位点具有相对特异性的特点, COMT 亚家族成员与已报道的 FOMT 的聚类结果可预测其催化位点。根据 COMT 亚家族进化分枝和聚类结果, 可将其进一步分为咖啡酸 3-O-甲基转移酶 (caffeic acid 3-O-methyltransferase, CAMT)、黄酮 3', 5'-O-甲基转移酶 (flavonoid 3', 5'-methyltransferase,

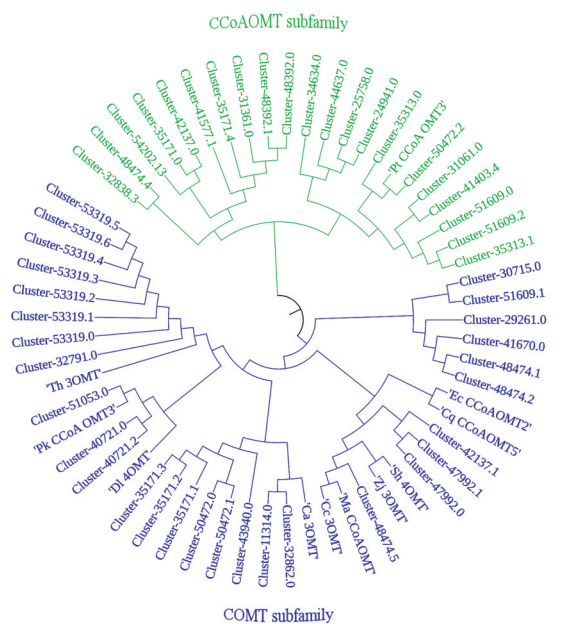


Figure 4 Phylogenetic tree of FOMT (flavonoid *O*-methyltransferase) gene family of *Polygonum capitatum*. CCoAOMT: Caffeoyl CoA *O*-methyltransferase; COMT: Caffeic acid *O*-methyltransferase

FAOMT)、黄酮 3'-*O*-甲基转移酶 (flavone 3'-*O*-methyltransferase, OsMT) 及未归类基因。

5 头花蓼 FOMT 基因家族蛋白理化性质和亚细胞定位预测

将转录组数据中的核酸序列翻译为氨基酸序列，

使用 TBtools 对 FOMT 蛋白质序列进行理化性质分析。结果如表 3 所示, 50 个 FOMT 家族成员编码氨基酸的数量介于 99 (CAMT, Cluster-41670.0)~1 053 (OMT, Cluster-34634.0) 个氨基酸, 蛋白分子质量在 11 224.91 Da (CAMT, Cluster-41670.0)~86 687.42 Da (OMT, Cluster-34634.0)。此外, 其理论等电点为 4.79~9.45, 42 个酸性蛋白, 8 个碱性蛋白, 对 FOMT 家族成员进行蛋白稳定系数的预测结果表明, 不稳定系数在 13.08~53.36 之内, 其中有 9 个不稳定系数值大于 40 属于不稳定蛋白, 41 个家族成员蛋白的亲水性平均值为负值, 为亲水性蛋白, 9 个为疏水性蛋白。亚细胞定位结果显示 54% 的 FOMT 亚家族 CCoAOMT 及 COMT 成员定位于细胞质, 28% 定位于叶绿体。

6 FOMT 基因保守结构域和基因结构分析

结合系统发育树、基因结构图和基序分析, 可以进一步了解黄酮类化合物 *O*-甲基基因家族成员之间的基因结构和进化关系。分析结果表明, 位于 N 端的 motifs 变异相对较大, 位于 C 端的 motifs 相对保守。氧甲基家族蛋白包含 10 个保守的基序 (motif1 到 motif10) 头花蓼 *O*-甲基基因家族中保守基序的数量从 1 个到 10 个, 其中基序 8、基序 10、基序 9 和基序 4 在所有基因中出现的频率最高。头花蓼 *O*-甲基基因家族氨基酸序列较短, 包含 AdoMet_MTases superfamily、dimerization、RVT_2 superfamily、Retrotran_gag_2 superfamily、dimerization2 superfamily 等结构域 (图 5)。

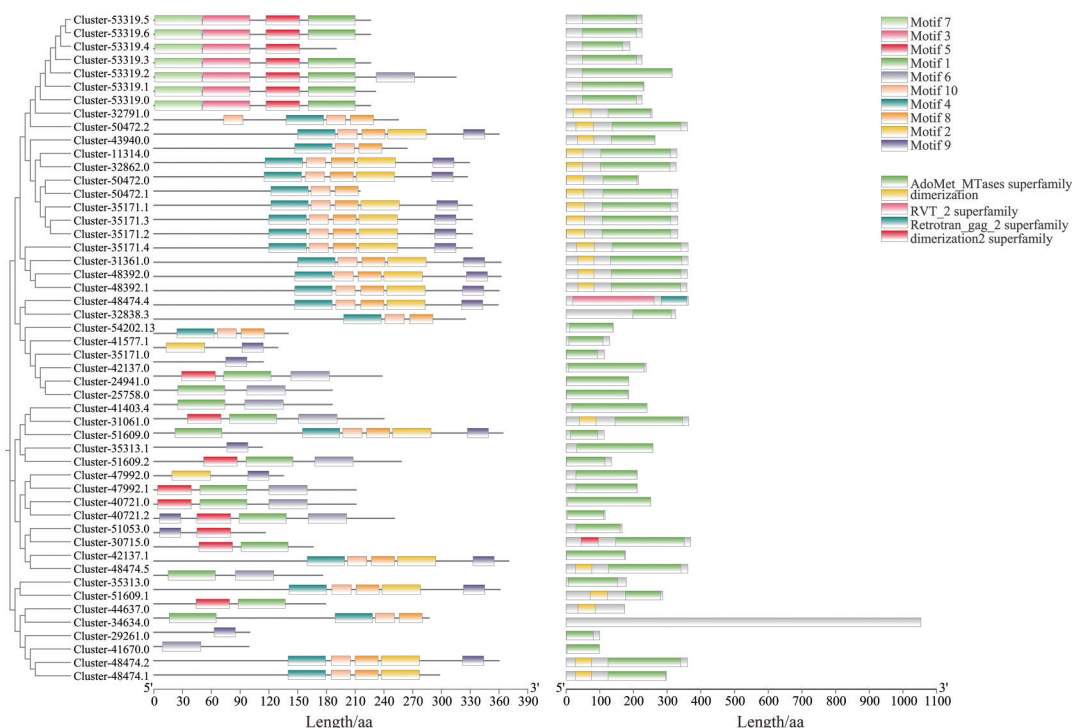


Figure 5 Gene structure, and distribution of conserved motifs of FOMT proteins in *Polygonum capitatum*

Table 3 Information and characteristics of the FOMT gene family in the flavonoid synthesis of *Polygonum capitatum*. GRAVY: Grand average of hydropathicity

| Sequence ID | Amino acid length | Molecular mass/Da | pI | Instability index | Aliphatic index | GRAVY | Subcellular localization |
|------------------|-------------------|-------------------|------|-------------------|-----------------|--------|--------------------------|
| Cluster-35313.0 | 179 | 19 833.92 | 5.15 | 31.29 | 102.96 | -0.082 | Cyto |
| Cluster-41670.0 | 99 | 11 224.91 | 6.54 | 35.89 | 100.40 | -0.204 | Cyto |
| Cluster-41403.4 | 240 | 27 104.36 | 5.47 | 29.87 | 99.58 | -0.130 | Cyto |
| Cluster-47992.0 | 211 | 23 446.92 | 5.40 | 32.30 | 101.18 | -0.094 | Mito |
| Cluster-47992.1 | 211 | 23 541.11 | 6.06 | 33.26 | 106.21 | -0.027 | Mito |
| Cluster-51053.0 | 166 | 18 736.58 | 6.17 | 36.27 | 102.77 | -0.096 | Cyto |
| Cluster-35313.1 | 258 | 29 104.57 | 5.68 | 40.65 | 97.13 | -0.286 | Cyto |
| Cluster-40721.0 | 251 | 28 279.38 | 5.11 | 38.21 | 96.73 | -0.233 | Cyto |
| Cluster-40721.2 | 116 | 12 988.70 | 4.79 | 35.26 | 86.64 | -0.352 | Nucl |
| Cluster-24941.0 | 186 | 20 908.23 | 5.32 | 35.66 | 105.91 | -0.046 | Cyto |
| Cluster-25758.0 | 186 | 20 712.06 | 5.40 | 37.64 | 96.02 | -0.05 | Cyto |
| Cluster-42137.0 | 238 | 26 973.94 | 5.13 | 35.59 | 96.68 | -0.199 | Cyto |
| Cluster-42137.1 | 176 | 19 798.85 | 5.23 | 28.17 | 99.15 | -0.060 | Cyto |
| Cluster-53319.0 | 226 | 25 715.71 | 9.26 | 52.71 | 97.48 | -0.133 | Cyto |
| Cluster-53319.1 | 231 | 25 973.99 | 9.43 | 50.56 | 99.61 | -0.195 | Chlo |
| Cluster-53319.2 | 315 | 35 566.94 | 8.92 | 46.04 | 98.98 | -0.178 | Chlo |
| Cluster-53319.3 | 226 | 25 715.71 | 9.26 | 52.71 | 97.48 | -0.133 | Chlo |
| Cluster-53319.4 | 190 | 21 487.03 | 9.45 | 53.36 | 102.58 | -0.057 | Chlo |
| Cluster-53319.5 | 226 | 25 715.71 | 9.26 | 52.71 | 97.48 | -0.133 | Chlo |
| Cluster-53319.6 | 226 | 25 715.71 | 9.26 | 52.71 | 97.48 | -0.133 | Chlo |
| Cluster-51609.0 | 113 | 12 993.20 | 5.28 | 17.56 | 92.30 | 0.109 | Cyto |
| Cluster-51609.2 | 135 | 15 303.66 | 5.43 | 13.08 | 83.70 | -0.083 | Cyto |
| Cluster-29261.0 | 100 | 11 542.34 | 5.71 | 21.95 | 74.10 | -0.358 | Chlo |
| Cluster-41577.1 | 129 | 14 737.15 | 5.26 | 13.82 | 76.36 | -0.056 | Cyto |
| Cluster-51609.1 | 287 | 31 481.80 | 4.95 | 38.17 | 86.66 | -0.205 | Vacu |
| Cluster-54202.13 | 139 | 15 601.97 | 5.56 | 24.19 | 82.73 | -0.097 | Cyto |
| Cluster-35171.3 | 332 | 36 900.56 | 5.95 | 34.05 | 82.47 | -0.108 | Cyto |
| Cluster-30715.0 | 370 | 40 719.21 | 5.53 | 24.86 | 93.49 | 0.090 | Cysk |
| Cluster-32791.0 | 255 | 28 080.95 | 5.37 | 38.45 | 82.20 | -0.129 | Nucl |
| Cluster-50472.0 | 215 | 23 058.91 | 5.59 | 30.34 | 106.14 | 0.322 | Chlo |
| Cluster-50472.1 | 332 | 36 038.95 | 5.33 | 33.88 | 104.85 | 0.178 | Chlo |
| Cluster-50472.2 | 360 | 39 170.30 | 5.41 | 28.56 | 103.17 | 0.109 | Chlo |
| Cluster-35171.0 | 114 | 12 909.08 | 6.49 | 27.57 | 88.07 | -0.059 | Cyto |
| Cluster-31061.0 | 364 | 39 677.06 | 5.39 | 36.20 | 93.76 | 0.019 | Cyto |
| Cluster-35171.1 | 332 | 36 770.29 | 5.80 | 33.61 | 83.73 | -0.039 | Cyto |
| Cluster-35171.2 | 332 | 36 983.60 | 5.31 | 34.54 | 82.80 | -0.067 | Cyto |
| Cluster-35171.4 | 362 | 40 000.87 | 5.59 | 34.63 | 81.35 | -0.068 | Cyto |
| Cluster-43940.0 | 264 | 29 379.75 | 5.24 | 32.09 | 92.31 | -0.026 | Cyto |
| Cluster-44637.0 | 174 | 18 870.36 | 5.21 | 35.80 | 92.59 | -0.118 | Cysk |
| Cluster-11314.0 | 329 | 36 335.64 | 6.00 | 32.00 | 95.44 | -0.040 | Cyto |
| Cluster-32862.0 | 327 | 35 800.19 | 5.65 | 31.69 | 91.22 | -0.033 | Cyto |
| Cluster-48392.0 | 360 | 39 295.89 | 5.22 | 32.91 | 92.64 | 0.014 | Cyto |
| Cluster-48392.1 | 359 | 39 971.85 | 5.58 | 41.14 | 86.07 | -0.068 | Cyto |
| Cluster-31361.0 | 362 | 39 923.72 | 5.33 | 31.01 | 90.25 | -0.094 | Cysk |
| Cluster-48474.2 | 360 | 40 593.88 | 5.31 | 30.45 | 97.81 | -0.077 | Chlo |
| Cluster-48474.1 | 298 | 33 122.75 | 6.34 | 28.31 | 107.05 | 0.160 | Chlo, Cyto |
| Cluster-48474.4 | 363 | 42 584.50 | 9.38 | 23.44 | 83.72 | -0.415 | Cyto |
| Cluster-48474.5 | 361 | 40 478.83 | 5.62 | 34.73 | 96.70 | -0.034 | Chlo |
| Cluster-34634.0 | 1 053 | 86 687.42 | 5.07 | 35.93 | 26.40 | 0.706 | Cyto |
| Cluster-32838.3 | 325 | 34 785.52 | 5.25 | 36.43 | 88.55 | -0.106 | Chlo |

7 FOMT 家族基因表达模式分析

由图 6 可知, FOMT 基因家族在头花蓼组织中的表达量不同, 将鉴定到的 FOMT 基因分别在头花蓼的根、茎、叶、花 4 个不同组织的表达量进行归一化和热图分析, 结果显示, FOMT 基因在头花蓼花中高表达, 在

根中表达最低。OMT15 (Cluster-53319.6)、COMT1 (Cluster-29261.0)、COMT1 (Cluster-41577.1)、OMT1 (Cluster-43940.0)、OMT1 (Cluster-44637.0) 只在花中有表达, 具有明显的组织表达特异性。COMT1 (Cluster-35171.0) 在茎中表达量显著高于其他组织, 表明

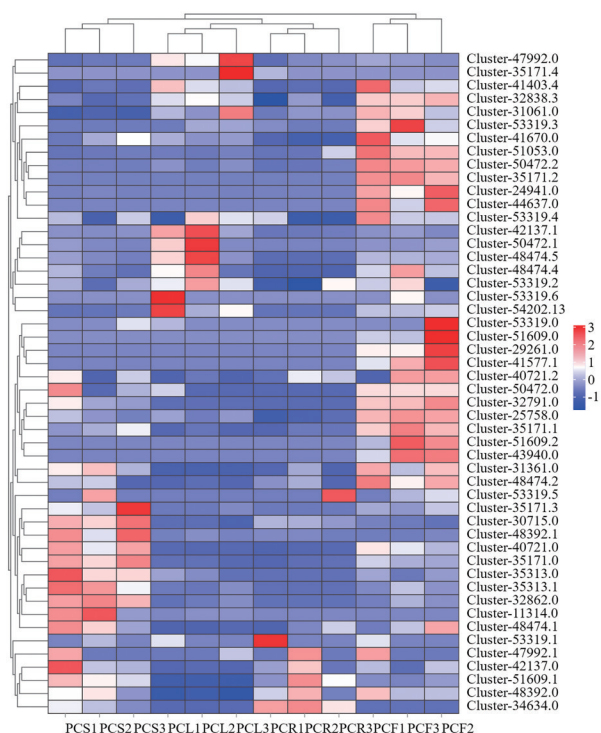


Figure 6 Expression pattern of FOMT gene in *Polygonum capitatum*

COMT1 (Cluster-35171.0) 在茎发育中发挥着重要作用。

8 头花蓼 FOMT 基因家族成员的基因表达分析

为进一步研究黄酮类化合物生物合成通路中 FOMT 家族基因在头花蓼根、茎、叶、花中的表达模式,利用 qRT-PCR 检测 *O*-甲基转移酶家族 OMT15 (Cluster-53319.2)、OMT1 (Cluster-48392.0)、OMT3 (Cluster-48474.2)、COMT1 (Cluster-31061.0) 基因表达量。结果表明,OMT15、OMT1、OMT3、COMT1 的表达量变

化趋势与转录组数据基本相同,表明转录组数据中头花蓼 FOMT 基因表达量具有可靠性。同时,OMT15 和 COMT1 基因在叶中表达量较高,OMT3 和 OMT1 基因在花中表达量较高,表明 OMT15、OMT1、OMT3、COMT1 基因在不同组织中表达量存在差异 (图 7)。

讨论

随着高通量测序技术的迅猛发展,以及多种生物信息学分析平台的加入,许多研究无需参考基因组的数据便可对目标物种进行分子生物学方面的研究,已成为药用植物基因信息挖掘的重要研究手段。课题组利用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序平台对头花蓼的根、茎、叶、花进行转录组测序,得到 99 298 条 Unigenes。近年来,头花蓼的研究多集中于化学组成和药理活性,其生物合成与调控机制尚未见报道。这些信息为挖掘头花蓼生物合成和调控的关键基因和功能提供了重要信息资源。

黄酮类化合物是植物中重要的次生代谢产物,其基本结构为 C6-C3-C6,基本母核是 2-苯基色原酮。目前已经鉴定出超过 10 000 种黄酮类化合物^[18]。甲基化是黄酮类化合物重要的修饰方式之一,与未经修饰的黄酮类化合物相比,黄酮类化合物的甲基化导致其药理和生化性质发生显著变化。根据蛋白分子量和阳离子依赖性,植物中的 *O*-甲基转移酶家族可以分为两个亚家族:咖啡酸 *O*-甲基转移酶和咖啡酰辅酶 A *O*-甲基转移酶^[30]。COMT 亚家族成员可增强酶活性,催化过程不需要阳离子参与,蛋白亚基的分子量一般在 38~43 kDa 之间,CCoAOMT 亚家族成员蛋白亚基的分子量在 23~29 kDa 之间^[31,32]。头花蓼中 COMT 亚家族成员蛋白亚基的分子量在 30~42 kDa 之间。CCoAOMT

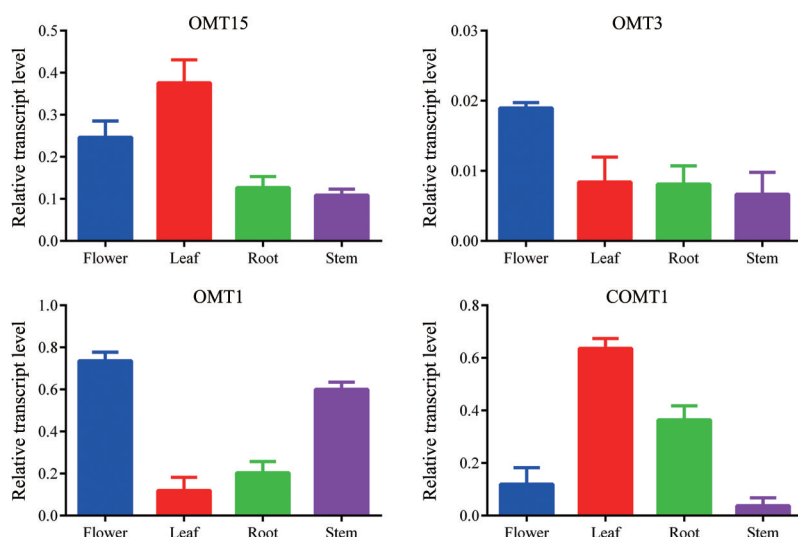


Figure 7 The expression levels of the FOMT genes in different tissues

的分子量约 11~29 kDa, 其分子量较低, 推测其催化过程需要 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等二价阳离子参与, 二价阳离子具有稳定蛋白质结构及参与底物与酶结合的作用^[33]。与其他植物 O-甲基转移酶蛋白质分子量相比, 头花蓼中 O-甲基转移酶蛋白质分子量相差较大, 说明黄酮 O-甲基转移酶基因家族数量在不同种植物间存在差异性。头花蓼 50 种 FOMT 中 41 种是亲水蛋白, 9 种是疏水蛋白, 与其他植物 OMT 家族蛋白理化性质一致, 研究发现, 异源表达时亲水蛋白比疏水蛋白不易形成包涵体, 蛋白质溶解性和活性显著增加。随着头花蓼基因组测序的开展, 后续有望进一步明确 O-甲基转移酶染色体定位和启动子相关元件, 进而为揭示基因功能及其生物学作用奠定基础。

甲氧基化黄酮类化合物的结构多样性由甲氧基的位置和数量共同决定, 甲氧基在很大程度上受到羟基分布的限制, 许多黄酮类化合物 OMT 将甲基转移到黄酮类化合物的特定羟基上^[34], 例如, 玉米^[35]ZmOMT1 能够特异性催化 3'-OH、3',5'-OH 位点, 柑橘^[36]CrOMT2 能够特异性催化 3'-OH、5'-OH 或 7-OH 位点, 与木犀草素和槲皮素底物相比, CrOMT2 催化的两种产物在体外对人胃癌细胞产生了更强的抑制作用^[37], 欧洲云杉^[38]PaOMT3 在 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 等金属离子的催化下, 对槲皮素的 3'-OH、3',5'-OH 位点活性有正向影响, 水稻^[39]ROMT15 表现出不同的底物特异性, 木犀草素和槲皮素的甲基化位置在 3'-OH, 杨梅素在 3'-OH, 5'-OH 上甲基化。植物类黄酮的 O-甲基化修饰在 A 环和 B 环上均会发生, 且多发生于 B 环的 3'和 4'号羟基位点和 A 环的 6、7、8 号羟基位点^[26]。推测头花蓼 OMT1、OMT3、OMT15 催化位点可能在 3'-OH, 且以槲皮素为底物的可能性很高。

黄酮类化合物是头花蓼中一种重要的次生代谢产物, 探究 FOMT 在头花蓼中不同部位的表达量, 能够更进一步明确候选关键基因, 进而进行功能验证。基于转录组测序分析, 发现 FOMT 在不同部位表达差异性较大, 其中以花、叶中表达量最高, 说明 FOMT 在头花蓼的不同组织及生长发育的不同时期发挥重要作用。槲皮素是头花蓼黄酮类化合物中重要的一种组分, 具有抗菌^[40]、抗炎^[41]、抗氧化^[42]等生物学活性。通过 O-甲基化修饰, 槲皮素的结构稳定性、蛋白亲和力和转运能力都得到提高, 同时水溶性降低, 这些改变是提高其药用价值的关键^[42]。研究表明, 3-O-甲基槲皮素具有显著的抗病毒、抗炎、抗氧化和调节免疫功能等生物学活性, 并能抑制过氧化物的生成, 3-O-甲基槲皮素比槲皮素具有更强的抗氧化活性^[43,44]。有学者对头花蓼不同部位的槲皮素含量研究, 结果表明槲皮素含量以叶的

含量最高, 其次是花、茎^[45], 与 FOMT 高表达部位一致, 因此 FOMT 可能参与头花蓼中槲皮素氧甲基化生物合成, 在头花蓼抗菌、抗炎中发挥重要作用, 其具体功能还有待于后续深入研究。

本研究通过对头花蓼进行转录组学研究, 建立了头花蓼的转录组数据库, 大大丰富了头花蓼的基因资源。这为进一步研究头花蓼次生代谢合成及调控提供了基础数据, 并为揭示头花蓼次生代谢合成机制奠定了基础。研究筛选并鉴定了 50 个 FOMT 基因, 并对其进行了生物信息学分析, 包括系统发育、基因序列特征、亚细胞定位预测、基因结构分析和表达模式的分析和验证。这些分析能初步了解头花蓼 FOMT 基因家族的基因数量、功能分类和表达趋势, 为进一步深入研究 FOMT 功能和氧甲基化黄酮类化合物的生物合成提供了理论依据。

作者贡献: 骆江利负责实验工作、数据分析、论文撰写与修改, 刘畅参与实验及数据分析, 曾宪法参与样品采集, 吴娜娜参与稿件修改, 王小雪、唐英参与数据分析, 蒲翔负责实验设计、论文指导和稿件修改。

利益冲突: 所有作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Liu YL, Sui Y, Hu CX, et al. Summary of the pharmacological activities of Miao medicine *Polygonum capitatum* [J]. *J Guizhou Univ Tradit Chin Med* (贵州中医药大学学报), 2021, 43: 81-84.
- [2] Zeng XF, Liu C, Yang XY, et al. Research progress on chemical constituents pharmacological effects and clinical applications of *Polygonum capitatum* and prediction analysis on potential Q-Marker [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54: 3378-3390.
- [3] Yu M, Li ZM, Li N, et al. Chemical constituents of the aerial parts of *Polygonum capitatum* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2008, 25: 633-635.
- [4] Liu ZJ, Qi J, Zhu DN, et al. Chemical constituents from *Polygonum capitatum* and their antioxidation activities *in vitro* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2008, 31: 995-998.
- [5] Chen XB, Liu XY, Chen GY, et al. Study on chemical constituents of *Polygonum capitatum* [J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2011, 39: 14025-14026.
- [6] Zhang LJ, Wang YL, Wang Z, et al. Study on the chemical constituents of the active fraction of *Polygonum capitatum* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2012, 35: 1425-1428.
- [7] Jing WG, Zhao Y, Zhang KX, et al. Study on the chemical constituents from aqueous extract of *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26: 47-50.
- [8] Liu Y, Hu J, Xie YM, et al. Determination of seven components

- in *Polygonum capitatum* by UPLC-MRM-MS [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 73-76, 88.
- [9] Rainer SH, Gottfried W. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels [J]. Phytochemistry, 2003, 64: 243-255.
- [10] Li P, Li YJ, Zhang FJ, et al. The arabidopsis UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and UGT79B3, contribute to cold, salt and drought stress tolerance *via* modulating anthocyanin accumulation [J]. Plant J, 2017, 89: 85-103.
- [11] Mathesius U. Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms [J]. Plants (Basel), 2018, 7: 30.
- [12] Chatham LA, Howard JE, Juvik JA. A natural colorant system from corn: flavone-anthocyanin copigmentation for altered hues and improved shelf life [J]. Food Chem, 2020, 25: 125734.
- [13] Santos CMM, Silva AMS. The antioxidant activity of prenyl flavonoids [J]. Molecules, 2020, 25: 696.
- [14] Jennings A, Welch AA, Spector T, et al. Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women [J]. J Nutr, 2014, 2: 202-208.
- [15] Xin HL, Zhai XF, Zheng X, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of total flavone of *Cunninghamia lanceolata* [J]. Molecules, 2012, 17: 8842-8850.
- [16] Nageen B, Sarfraz I, Rasul A, et al. Eupatilin: a natural pharmacologically active flavone compound with its wide range applications [J]. J Asian Nat Prod Res, 2020, 22: 1-16.
- [17] Walle T. Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption [J]. Mol Pharm, 2007, 4: 826-832.
- [18] Koirala N, Thuan NH, Ghimire GP, et al. Methylation of flavonoids: chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production [J]. Enzyme Microb Technol, 2016, 86: 103-116.
- [19] Chen JH, Li XM, Yang WY, et al. Research progress of plant *O*-methoxy flavonoids and *O*-methyltransferases [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 1-19.
- [20] Wollenweber E, Wehde R, Dörr M, et al. *C*-Methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae [J]. Phytochemistry, 2000, 55: 965-970.
- [21] Chen S, Luo Y, Shi YL, et al. Research advances in tea methyltransferase [J]. J Tea Commun (茶叶通讯), 2016, 43: 3-8.
- [22] Ibrahim RK, Bruneau A, Bantignies B. Plant *O*-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification [J]. Plant Mol Biol, 1998, 36: 1-10.
- [23] Sun B, Wang P, Wang R, et al. Molecular cloning and characterization of a meta/para-*O*-methyltransferase from *Lycoris aurea* [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 1911.
- [24] Tang YJ, Li Y, Li DS, et al. Advance on the study of *S*-adenosyl-*L*-methionine [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2007, (2): 76-81.
- [25] Berim A, Gang DR. The roles of a flavone-6-hydroxylase and 7-*O*-demethylation in the flavone biosynthetic network of sweet basil [J]. J Biol Chem, 2013, 288: 1795-1805.
- [26] Peng SN, Li YK, Luo DD, et al. Identification and expression analysis of flavonoid *O*-methyltransferases gene family in *Artemisia argyi* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 1069-1078.
- [27] 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.
- [28] Berim A, Gang DR. Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis [J]. Phytochem Rev, 2016, 15: 363-390.
- [29] Ahmed QU, Sarian MN, Mat So'ad SZ, et al. Methylation and acetylation enhanced the antidiabetic activity of some selected flavonoids: *in vitro*, molecular modelling and structure activity relationship-based study [J]. Biomolecules, 2018, 8: 149.
- [30] Lu S, Zhuge Y, Hao T, et al. Systematic analysis reveals *O*-methyltransferase gene family members involved in flavonoid biosynthesis in grape [J]. Plant Physiol Biochem, 2022, 15: 33-45.
- [31] Green AR, Lewis KM, Barr JT, et al. Determination of the structure and catalytic mechanism of *Sorghum bicolor* caffeic acid *O*-methyltransferase and the structural impact of three brown midrib12 mutations [J]. Plant Physiol, 2014, 165: 1440-1456.
- [32] Chatterjee D, Kudlinzki D, Linhard V, et al. Structure and biophysical characterization of the *S*-adenosylmethionine-dependent *O*-methyltransferase PaMTH1, a putative enzyme accumulating during senescence of *Podospora anserina* [J]. J Biol Chem, 2015, 290: 16415-16430.
- [33] Walgren, AR, Walle U, Walle T. Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55: 1721-1727.
- [34] Cho MH, Park HL, Park JH, et al. Characterization of a regiospecific flavonoid 3'/5'-*O*-methyltransferase from tomato and its application in flavonoid biotransformation [J]. Korean Soc, 2012, 55: 749-755.
- [35] Zhou JM, Fukushi Y, Wollenweber E, et al. Characterization of two *O*-methyltransferase-like genes in barley and maize [J]. Pharm Biol, 2008, 46: 26-34.
- [36] Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36: 829-837.
- [37] Kim BG, Kim DH, Sung SH, et al. Two *O*-methyltransferases from *Picea abies*: characterization and molecular basis of different reactivity [J]. Planta, 2010, 232: 837-844.
- [38] Lee YJ, Kim BG, Chong Y, et al. Cation dependent *O*-methyltransferases from rice [J]. Planta, 2008, 227: 641-647.
- [39] Xue YY, Liu CX, Zhou Y, et al. Spectrum-effect relationship of anti-inflammatory effect of different part from *Polygonum capitatum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 5134-5141.
- [40] Yun CY. Study on Extraction and Identification of Active

- Components from Miao Medicine *Polygonum capitatum* (苗药头花蓼活性成分的提取及鉴定研究) [D]. Guizhou: Guizhou Normal University, 2018.
- [41] Li XB. The Study on Extraction, Purification and Anti-Oxidative Character of Total Polyphenols from *Polygonum capitatum* (头花蓼总多酚提取、纯化工艺以及抗氧化作用的研究) [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2017.
- [42] Kim S, Jin CY, Kim C, et al. Isorhamnetin alleviates lipopoly saccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF-kappaB, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 43: 682-692.
- [43] Kim, JY, Lim HJ, Ryu JH. *In vitro* anti-inflammatory activity of 3-O-methyl-flavones isolated from *Siegesbeckia glabrescens* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 1511-1514.
- [44] Zhang Q, Yang W, Liu J, et al. Identification of six flavonoids as novel cellular antioxidants and their structure-activity relationship [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4150897.
- [45] Zuo AP, Long HX. Study on the content of quercetin in different parts of *Polygonum capitatum* [J]. *Intern Med (内科)*, 2010, 5: 258-259.