

基于转录组测序的铁皮石斛植物甾醇生物合成相关基因分析

林江波, 王伟英, 邹晖, 戴艺民*

(福建省农业科学院亚热带农业研究所, 福建 漳州 363005)

摘要: 为了解铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)植物甾醇的生物合成途径, 利用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序技术对茎和叶进行转录组测序, 比较植物甾醇生物合成关键酶基因的表达。结果表明, 共获得 43 085 条 Unigenes, 其中 24 459 条在 Nr、Swiss-prot、KOG 和 KEGG 数据库获得注释, 7 333 条获得共同注释。KEGG 代谢途径分析表明, 铁皮石斛植物甾醇生物合成分为 3 个阶段, 共有 50 个 Unigenes (30 种酶) 参与。表达分析表明, *DXR* 和 *HMED* 的表达量明显高于 *MK* 和 *MVD*; 成熟期茎、叶 *SMT1* 的表达量比生长期高, *SMT2* 则生长期高于成熟期; 同一时期, *SMT1* 和 *SMT2* 在叶的表达量都比茎高。这为铁皮石斛植物甾醇的开发利用和调控植物甾醇生物合成研究提供了科学依据。

关键词: 铁皮石斛; 高通量测序; 植物甾醇; 基因; 表达; 代谢

doi: 10.11926/jtsb.4025

Analysis of Related Genes in Phytosterol Biosynthesis in *Dendrobium officinale* Based on Transcriptome Sequencing Technology

LIN Jiang-bo, WANG Wei-ying, ZOU Hui, DAI Yi-min*

(Subtropical Agriculture Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou 363005, Fujian, China)

Abstract: In order to understand the biosynthetic pathway of phytosterol in *Dendrobium officinale*, the transcriptome sequence of stems and leaves at two growth stages was analyzed by using Illumina HiSeq 4000 high-throughput sequencing method, and the expressions of key enzyme genes for phytosterols synthesis were compared. The results showed that a total of 43 085 Unigenes were obtained by transcriptome sequencing, of which 24 459 Unigenes were annotated in Nr, Swiss-prot, KOG and KEGG databases, and 7 333 were commonly annotated. KEGG metabolic pathway analysis showed that phytosterol biosynthesis of *D. officinale* could be divided into three stages with 50 Unigenes (30 enzymes) involved. The expressions of *DXR* and *HMED* were significantly higher in stems and leaves than that of *MK* and *MVD*. The expression of *SMT1* at mature stage was higher than that at growth stage, while the expression of *SMT2* was the opposite. The expressions of *SMT1* and *SMT2* were higher in leaves than that in stems at the same stage. These would be lay a foundation for the development and utilization of phytosterol and regulating phytosterol biosynthesis in *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; High-throughput sequencing; Phytosterol; Gene; Expression; Metabolism

植物甾醇不仅是生物膜的重要组成成分, 还是一类无色无味的甾体类活性成分, 不溶于水, 溶于有机溶剂, 属于三萜类化合物, 含有 28~29 个 C 原

子, 主要骨架是 4 个环的环戊烷多氢菲, C-3 羟基是活性基团^[1-2], 与羧酸形成植物甾醇酯, 具有更好的水溶性和生理活性。植物甾醇以游离或结合甾

收稿日期: 2018-12-03 接受日期: 2019-03-04

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2018J01119)资助

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No. 2018J01119).

作者简介: 林江波(1976~), 男, 硕士, 副研究员, 从事农业生物技术研究。E-mail: 345953257@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: dymtcn@163.com

醇的方式广泛存在于植物体中,除常见的豆甾醇、 β -谷甾醇、菜油甾醇和菜籽甾醇外,已经报道了超过 250 种的衍生物,如甾体皂苷、甾体糖苷生物碱、植物甾酮和油菜素内酯等^[3]。植物甾醇不仅具有抗氧化和延缓衰老的功能^[4-5],还对多种肿瘤的发生和发展具有预防和治疗作用^[6-9]。

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)是兰科(Orchidaceae)石斛属多年生药食两用植物,具有增强免疫力、抗肿瘤、降血糖、抗氧化和抗疲劳等生理活性^[10-11]。铁皮石斛有效成分种类多样,除了石斛类多糖和生物碱外,还有萜类、芪类、甾酮类、倍半萜类、甾体类及香豆素等^[12]。杨柳等^[13]利用正己烷蒸馏法提取的铁皮石斛干燥茎挥发性成分中含有 22,23-二氢豆甾醇、 γ -谷甾醇、豆甾醇和油菜甾醇,相对含量分别为 11.093%、4.126%、3.138% 和 1.648%,4 种甾醇占挥发性成分的 20.005%。陈晓梅等^[14]从固体培养铁皮石斛原球茎甲醇提取物中分离鉴定到豆甾醇和 β -谷甾醇。仝晶晶等^[15]分析了 6 个产地铁皮石斛干燥茎的豆甾醇和 β -谷甾醇含量,产于云南省普洱市景谷县的豆甾醇含量最高,为 86.399 $\mu\text{g g}^{-1}$,产于浙江省乐清市双峰乡的 β -谷甾醇含量最高,为 344.683 $\mu\text{g g}^{-1}$ 。

转录组(RNA-seq)测序能够获取植物特定组织或器官在特定时期的基因表达信息,有利于挖掘药用植物次生代谢产物合成调控关键酶基因。吴超等^[16]对铁皮石斛叶片进行转录组测序,KEGG 注释结果表明有 1 006 个 Unigenes 与次生代谢物的生物合成有关。Guo 等^[17]对铁皮石斛茎转录组数据分析表明,有 69 个 Unigenes 参与生物碱骨架的生物合成。Zhang 等^[18]对铁皮石斛生长期和成熟期进行转录组测序,KEGG 注释结果表明有 430 个糖基转移酶,89 个纤维素合酶,135 个 Unigenes 参与果糖和甘露糖代谢。

本研究以 2 个生长阶段的铁皮石斛茎、叶为材料,利用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序技术进行转录组测序,以期获得与植物甾醇合成相关的基因信息,分析铁皮石斛植物甾醇代谢途径,为铁皮石斛植物甾醇的代谢调控研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)原种采自福建

省龙岩市连城县冠豸山崖壁,经过茎段扩繁后种植于福建省农业科学院亚热带农业研究所资源圃,分别于生长期(2016 年 8 月 15 日)和成熟期(2016 年 12 月 15 日)随机采集 3 株新鲜茎、叶,分别标记为 T1 (生长期茎)、T2 (生长期叶)、T3 (成熟期茎)和 T4 (成熟期叶),经液氮速冻后用干冰寄到广州基迪奥生物科技有限公司进行 RNA 提取、转录组测序和 Unigene 功能注释。

1.2 植物甾醇生物合成途径分析

依据植物甾醇生物合成途径,结合转录组数据 GO 功能分类结果,分析植物甾醇生物合成途径的相关 Unigenes。

1.3 植物甾醇生物合成关键酶基因表达分析

用标准化后的 Reads Per Kilobase per Million mapped reads (RPKM)值来表示样品的表达量,分析植物甾醇生物合成关键酶基因在铁皮石斛不同生育期的表达模式。

2 结果和分析

2.1 转录组测序和数据组装

铁皮石斛 4 个样品的原始数据(NCBI SRA 号:SRP181716)经过滤除杂处理后,分别获得 22 809 182、19 492 544、21 587 660 和 21 058 784 reads,分别包含有 3 388 594 751、2 884 066 418、3 171 710 203 和 3 132 109 020 个核苷酸序列信息。将获得的高质量核苷酸序列进行 *de novo* 拼接,共获得长度大于 200 bp 的 Unigenes 片段 43 085 条,N50 为 1 628 bp,平均长度 902 bp,最长 Unigene 片段为 20 526 bp,长度在 200~299 bp 的片段最多,有 13 280 条,其次是 300~399 bp,有 5 558 条, $\geq 3 000$ bp 的有 1 701 条(图 1)。

通过 BLAST 比对和 ESTscan 预测 Unigene 片段的编码区(CDS),结果表明,有 25 928 条 Unigenes 片段含有 CDS (分别获得 24 266 和 1 662 条),占 Unigenes 片段的 60.18%,其中 CDS 长度大于 1 000 bp 的 Unigenes 片段有 7 550 条,占总数的 17.52% (图 2)。

2.2 基因功能注释和分类

将 43 085 条 Unigenes 片段在 Nr、Swiss-prot、KOG 和 KEGG 数据库搜索比对序列相似性,共有

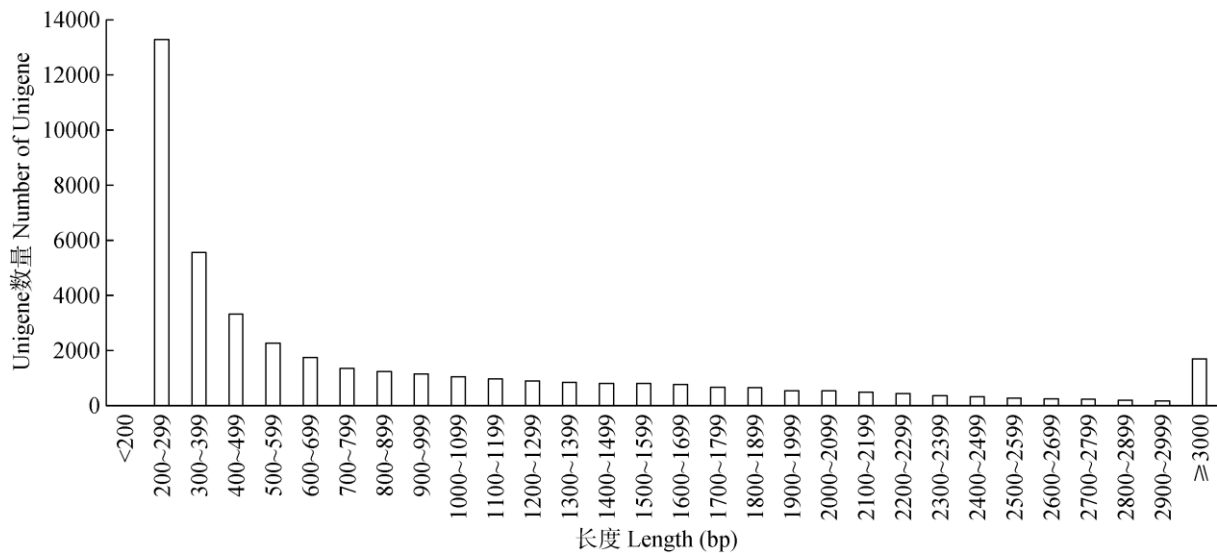


图 1 Unigene 长度分布

Fig. 1 Length distribution of Unigenes

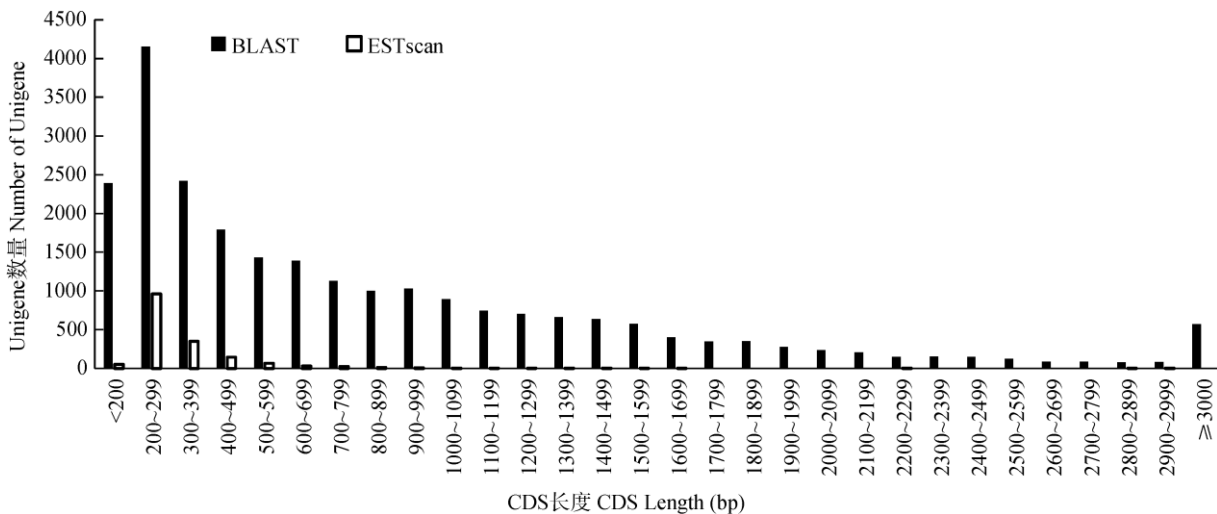


图 2 CDS 长度分布

Fig. 2 CDS length distribution

24 459 条获得注释, 占总数 56.77%: 其中, 在 Nr 数据库注释的有 23 460 条, 占 54.45%, Swiss-prot 数据库有 18 514 条, 占 42.97%; KOG 数据库有 15 522 条, 占 36.03%; KEGG 数据库有 8 972 条, 占 20.82%; 在 4 个数据库都得到注释的有 7 333 条, 占 17.02%。

通过 GO 功能数据库比对分析, 共有 13 710 条 Unigenes 得到注释和功能分类, 分为 3 大类 49 个功能(表 1), 生物过程含 20 个功能, 涉及 31 519 条 Unigenes, 其中代谢过程和细胞过程分别涉及 7 617 和 7 200 条; 细胞组分含 17 个功能, 涉及 24 983 条

Unigenes, 其中细胞和细胞组份分别涉及 6 008 和 6 006 条; 分子功能含 12 个功能, 涉及 14 948 条 Unigenes, 其中, 催化活性有 6 967 条, 结合的有 6 448 条。

KEGG 注释的 8 972 条 Unigenes 中有 7 890 条获得 Pathway 注释(表 2), 分为 5 大类 19 条代谢途径。遗传信息处理含有 4 条代谢途径, 其中翻译的 Unigenes 数最多, 为 929 条; 环境信息处理含有信号转导和膜运输 2 条代谢途径; 细胞过程和有机系统各含有 1 条代谢途径; 代谢含有 11 条代谢途径, 以碳水化合物代谢最多, 1 118 条。

表 1 铁皮石斛 Unigene GO 功能分类

Table 1 GO functional classification of *Dendrobium officinale* Unigenes

类别 Type	分类 Classification	数量 Number
生物过程 Biological process	繁殖 Reproduction	485
	细胞凋亡 Cell killing	2
	免疫系统进程 Immune system process	139
	代谢过程 Metabolic process	7 617
	细胞过程 Cellular process	7 200
	繁殖过程 Reproductive process	481
	生物黏附 Biological adhesion	33
	信号转导 Signaling	497
	多细胞生物过程 Multicellular organismal process	691
	发育过程 Developmental process	999
	生长 Growth	114
	细胞移动 Locomotion	2
	单一有机体过程 Single organism process	5 385
	节律过程 Rhythmic process	21
	应激反应 Response to stimulus	1 969
	定位 Localization	1 943
	多有机体过程 Multi-organism process	291
	生物调节 Biological regulation	2 131
	细胞组分及来源 Cellular component organization or biogenesis	1 509
	解毒 Detoxification	10
分子功能 Molecular function	蛋白结合转录因子活性 Transcription factor of protein binding activity	34
	核酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity	161
	催化活性 Catalytic activity	6 967
	信号转导活性 Signal transducer activity	60
	结构分子活性 Structural molecule activity	355
	转运活性 Transporter activity	660
	结合 Binding	6 448
	电子载体活性 Electron carrier activity	24
	抗氧化活性 Antioxidant activity	86
	翻译调节活性 Translation regulator activity	3
	分子传感器活性 Molecular transducer activity	55
	分子功能调节器 Molecular function regulator	95
	细胞组分 Cellular component	胞外区 Extracellular region
细胞 Cell		6 008
类核 Nucleoid		8
膜 Membrane		2 712
病毒体 Virion		42
细胞连接 Cell junction		230
胞外基质 Extracellular matrix		2
膜封闭腔 Membrane-enclosed lumen		81
大分子复合物 Macromolecular complex		1 247
细胞器 Organelle		4 913
胞外基质组分 Extracellular matrix component		1
胞外区部分 Extracellular region part		3
细胞器部分 Organelle part		1 735
病毒体部分 Virion part		42
膜部分 Membrane part		1 802
细胞部分 Cell part		6 006
超分子纤维 Super-molecular fiber		3

表 2 KEGG 注释的代谢途径

Table 2 Metabolism pathway annotated by KEGG

类别 Type	途径 Pathway	数量 Number
遗传信息处理 Genetic information process	翻译 Translation	929
	折叠、排列与降解 Folding, sorting and degradation	644
	复制与修复 Replication and repair	332
	转录 Transcription	311
环境信息处理 Environmental information process	信号转导 Signal transduction	283
	膜运输 Membrane transport	44
细胞过程 Cell process	运输与代谢 Transport and catabolism	456
有机系统 Organ system	环境适应性 Environmental adaptation	220
代谢 Metabolism	核苷酸代谢 Nucleotide metabolism	308
	能量代谢 Energy metabolism	416
	碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism	1 118
	次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites	251
	脂肪代谢 Lipid metabolism	536
	全局性 Global and overview	685
	其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids	223
	氨基酸代谢 Amino acid metabolism	588
	萜类和多酚代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides	164
	辅酶因子和维生素代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	237
多糖生物合成与代谢 Glycan biosynthesis and metabolism	145	

2.3 植物甾醇生物合成途径

KEGG 注释结果表明, 共有 50 个 Unigenes (30 种酶) 参与铁皮石斛植物甾醇的生物合成(表 3)。植物甾醇生物合成途径可分为萜类化合物骨架生物合成、倍半萜类和三萜类生物合成和甾族化合物合成 3 条代谢途径。

根据 Pathway 分析结果预测铁皮石斛植物甾醇生物合成路径(图 3), 萜类化合物骨架生物合成有

甲羟戊酸途径(MVA)和丙酮酸途径(DEP)两种, MVA 途径从乙酰 CoA 到生成法尼基焦磷酸共 7 步 7 个酶 (10 个 Unigenes) 参与; DEP 途径从丙酮酸和甘油醛-3-磷酸到生成法尼基焦磷酸共 11 步 10 个酶 (15 个 Unigenes) 参与。倍半萜类和三萜类生物合成从法尼基焦磷酸到 2,3-氧化鲨烯共 3 步 2 个酶 (4 个 Unigenes) 参与。甾族化合物生物合成从 2,3-氧化鲨烯到菜仔甾醇和豆甾醇生成共 16 步 12 个酶 (22 个 Unigenes) 参与。

表 3 KEGG 注释的铁皮石斛植物甾醇生物合成相关的 Unigene 数量

Table 3 Unigene number annotated by KEGG related to phytosterol biosynthesis in *Dendrobium officinale*

代谢途径 Metabolic pathway	编号 No.	酶 enzyme	数量 Number
萜类化合物骨架 生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	K00626	乙酰辅酶 A 乙酰转移酶(atoB) Acetyl-CoA C-acetyltransferase	1
	K01641	羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶(HMGS) Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	2
	K00021	羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR) Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)	3
	K00869	甲羟戊酸激酶(MK) Mevalonate kinase	1
	K00938	磷酸甲羟戊酸激酶(PMK) Phosphomevalonate kinase	1
	K01597	二磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD) Diphosphomevalonate decarboxylase	1
	K00787	法呢基焦磷酸合酶(FPPS) Farnesyl diphosphate synthase	1
	K01662	1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(DXS) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	2
	K00099	1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	1

续表(Continued)

代谢途径 Metabolic pathway	编号 No.	酶 Enzyme	数量 Number
萜类化合物骨架 生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	K00991	2-甲基-D-赤藓糖醇 4-磷酸胞苷酰转移酶(CMC) 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	2
	K00919	4-二磷酸胞苷基-2-甲基-D-赤藓糖醇激酶(CMK) 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	1
	K01770	2-甲基-D-赤藓糖醇 2,4-环二磷酸合酶(MCS) 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	1
	K03526	(E)-4-羟基-3-甲基丁烯-2-烯基二磷酸合酶(HMED) (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase	1
	K03527	4-羟基-3-甲基丁烯-2-烯基二磷酸还原酶(HDR) 4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase	1
	K01823	异戊烯基二磷酸 Δ -异构酶(IDI) Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	3
倍半萜类和三萜类生物 合成 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	K14066	香叶基二磷酸合酶(GPPS) Geranyl diphosphate synthase	2
	K00801	法呢酰二磷酸法呢酰基转移酶(SQS) Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	2
	K00511	角鲨烯单加氧酶(SE) Squalene monooxygenase	2
	K01853	环阿屯醇合酶(CAS) Cycloartenol synthase	1
	K00559	甾醇 24-C 甲基转移酶(SMT1) Sterol 24-C-methyltransferase	4
	K14423	4,4-二甲基-9 β ,19-环丙基甾醇-4 α 甲基氧化酶(SMO1) 4,4-Dimethyl-9 β ,19-cyclopropylsterol-4 α -methyl oxidase	2
	K08246	环桉树醇环异构酶(EC) Cyclooleucenol cycloisomerase	1
	K05917	甾醇 14 脱甲基酶(CYP51) Sterol 14-demethylase	2
	K01824	胆甾烯醇 Δ 异构酶(EBP) Cholestenol Δ -isomerase	1
	K08242	24-亚甲基甾醇 C 甲基转移酶(SMT2) 24-Methylenesterol C-methyltransferase	3
	K14424	4 α -甲基- Δ 7-甾醇-4 α 甲基氧化酶(SMO2) 4 α -Methyl- Δ 7-sterol-4 α -methyl oxidase	1
	K00227	Δ 7-甾醇 5 去饱和酶(STE1) Δ 7-Sterol 5-desaturase	1
	K00213	7-脱氢胆固醇还原酶(DWF5) 7-Dehydrocholesterol reductase	1
	K09828	Δ 24 甾醇还原酶(DWF1) Δ 24-Sterol reductase	3
K09832	甾醇 22 去饱和酶(CYP71) Sterol 22-desaturase	2	

2.4 植物甾醇生物合成相关酶基因表达分析

选择 *MK*、*MVD*、*DXR*、*HMED*、*CAS*、*SMT1* 和 *SMT2* 等 7 种关键酶基因, 采用 RPKM 值分析他们在铁皮石斛生长期和成熟期茎、叶中的表达量。从图 4 可以看出, *MVA* 途径的 *MK* 和 *MVD* 表达量比 *DEP* 途径的 *DXR* 和 *HMED* 表达量低。*CAS* 在生长期和成熟期的表达量差异不大, 但在茎的表达量比叶片稍高。*SMT1* 在成熟期茎、叶的表达量比生长期茎、叶高, *SMT2* 则生长期表达量高于成熟期; 同一时期, *SMT1* 和 *SMT2* 在叶片表达量都比茎高。

3 结论和讨论

本研究通过 Illumina HiSeq 4000 测序平台对铁皮石斛 2 个生育期的茎、叶进行转录组测序, 经过 *de novo* 拼接后获得 43 085 条大于 200 bp 的 Unigenes 片段, 其中 24 459 条在 Nr、Swiss-prot、KOG 和 KEGG 数据库获得注释。根据 KEGG 注释结果, 铁皮石斛植物甾醇生物合成成分成 3 个阶段, 共有 50 个 Unigenes (30 种酶) 参与。

植物甾醇合成第一阶段是法尼基焦磷酸的合

成, 有 *MVA* 和 *DEP* 两种途径。通过比较两种途径的 2 个关键酶基因的 RPKM 值, *DEP* 途径的 *DXR* 和 *HMED* 表达明显高于 *MVA* 途径的 *MK* 和 *MED*, 说明铁皮石斛合成法尼基焦磷酸存在两种途径, 但 *DEP* 途径强于 *MVA* 途径, 这可能与铁皮石斛是兼性景天酸途径植物^[19]有关。

植物甾醇根据侧链 C-24 位上烷基分为甲基甾醇和乙基甾醇, 通过甾醇 C-24 甲基转移酶(*SMT*) 在 C-24 位上分别通过 1 次和 2 次增加甲基的步骤完成^[20-21]。*SMT1* 把 1 个甲基从 S-腺苷甲硫氨酸 (*SAT*) 转移到环阿屯醇的 C-24 位上, 形成 C-24 甲基烯基环阿屯醇; *SMT2* 则催化在 C-24 甲基烯基环阿屯醇的衍生物 24-亚甲基胆甾烯醇的 C-24 甲基上再添 1 个甲基, 形成乙基甾醇^[22-23], 因此, *SMT1* 是甲基甾醇和乙基甾醇合成限速酶, *SMT2* 是乙基甾醇合成限速酶。在烟草植株中过表达 *SMT1*, 菜油甾醇和谷甾醇分别提高 80% 和 50%, 而环阿屯醇和胆固醇含量分别下降 53% 和 34%。过表达 *SMT2* 显著降低了胆固醇和 C-24 甲基甾醇含量, 而谷甾醇含量显著提高^[24-25]。本研究发现相同生育期铁皮石斛的 *SMT1* 和 *SMT2* 在叶片中的表达量都明显高于

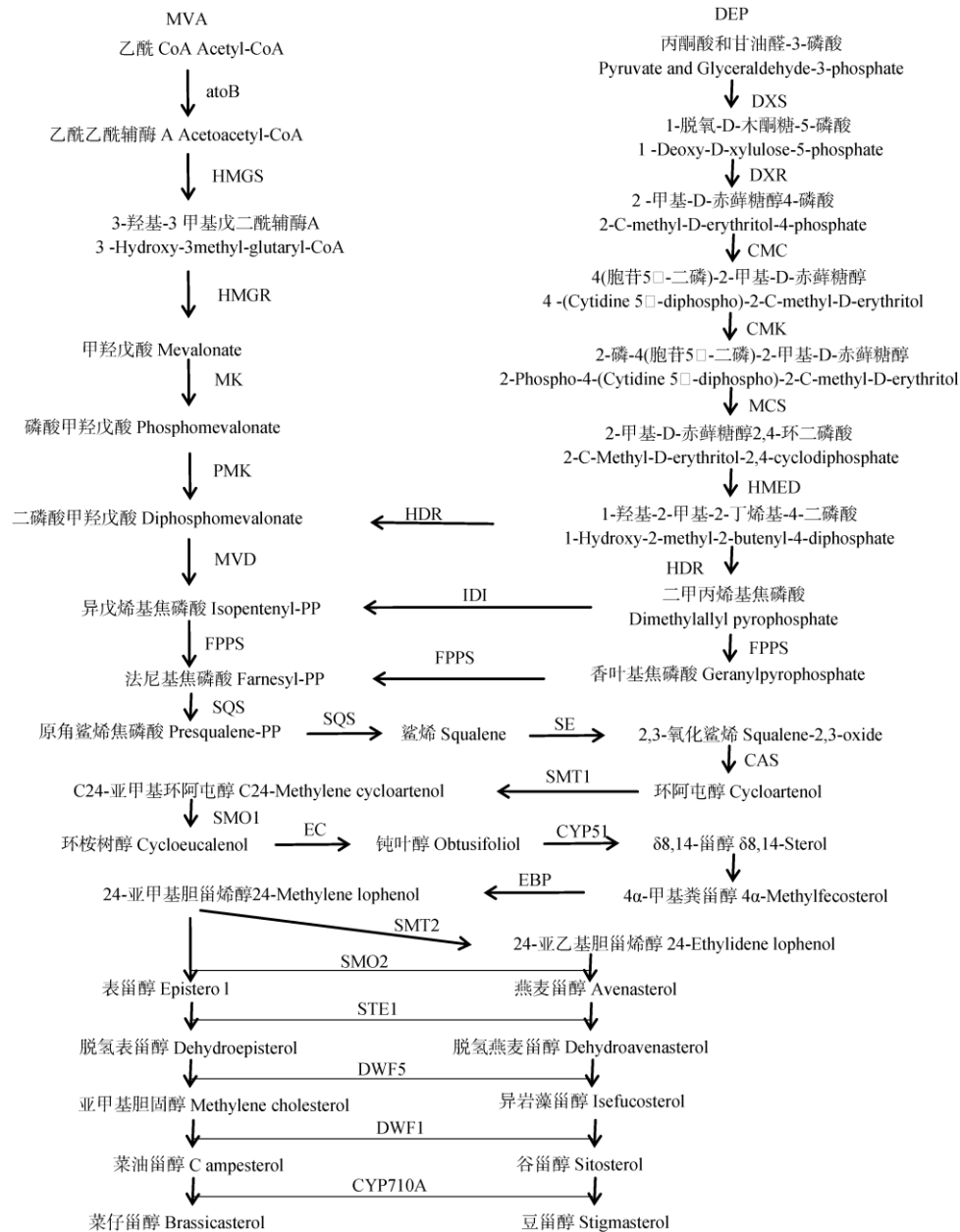


图 3 铁皮石斛植物甾醇生物合成途径

Fig. 3 Biosynthetic pathway of phytosterol in *Dendrobium officinale*

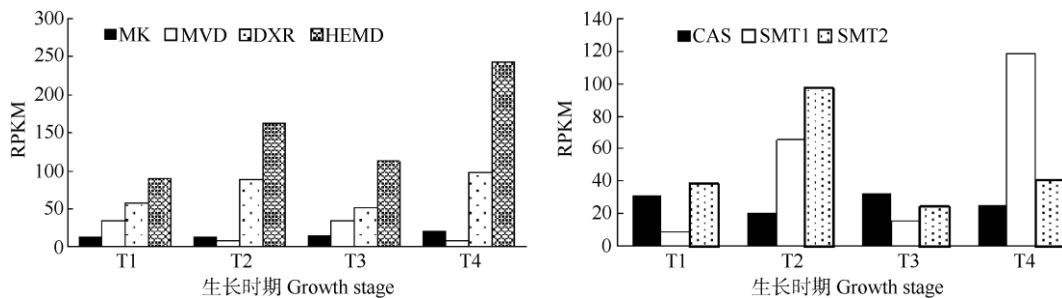


图 4 铁皮石斛 7 个植物甾醇生物合成相关基因的表达模式。T1: 生长期茎; T2: 生长期叶; T3: 成熟期茎; T4: 成熟期叶。

Fig. 4 Expression patterns of seven genes related to phytosterol biosynthesis in *Dendrobium officinale*. T1: Stem at growth stage; T2: Leaf at growth stage; T3: Stem at mature stage; T4: Leaf at mature stage.

茎,推测叶片中植物甾醇的合成比茎高。8月份的叶 *SMT2* 表达量明显高于 *SMT1*,12月份则相反,推测8月份叶片合成乙基甾醇多,而12月份则合成甲基甾醇多,这有待于对铁皮石斛 *SMT1* 和 *SMT2* 功能的进一步鉴定,分析不同生长阶段植物甾醇组分和含量。

参考文献

- [1] ZHANG X C, HAN Z H. Sterols biosynthesis and their physiological role in plants [J]. *Plant Physiol Commun*, 2001, 37(5): 452–457. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2001.05.033.
张喜春, 韩振海. 植物体内甾醇的合成和生理作用 [J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37(5): 452–457. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2001.05.033.
- [2] DAI G H, WANG M. Property and function of phytosterol and its application in food [J]. *J Kaifeng Inst Educ*, 2016, 36(2): 261–262. doi: 10.3969/j.issn.1008-9640.2016.02.122.
代广辉, 王敏. 植物甾醇性质、功能及其在食品中的应用 [J]. *开封教育学院学报*, 2016, 36(2): 261–262. doi: 10.3969/j.issn.1008-9640.2016.02.122.
- [3] NES W D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols [J]. *Chem Rev*, 2011, 111(10): 6423–6451. doi: 10.1021/cr200021m.
- [4] WU S M, WU M C, MA L. Antioxidant effect of phytosterols in high grade rapeseed cooking oil (I): Antioxidant effect at normal temperature [J]. *China Oils Fats*, 2003, 28(4): 52–54. doi: 10.3321/j.issn:1003-7969.2003.04.017.
吴时敏, 吴谋成, 马莉. 植物甾醇在菜籽高级烹调油中的抗氧化作用(I): 常温下抗氧化作用的研究 [J]. *中国油脂*, 2003, 28(4): 52–54. doi: 10.3321/j.issn:1003-7969.2003.04.017.
- [5] RUDKOWSKA I. Plant sterols and stanols for healthy ageing [J]. *Maturitas*, 2010, 66(2): 158–162. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.12.015.
- [6] CAO M, OUYANG L. Study on development of anti-tumor effect of phytosterols [J]. *Pract Pharm Clin Remed*, 2015, 18(9): 1104–1107. doi: 10.14053/j.cnki.ppcr.201509026.
曹玫, 欧阳露. 植物甾醇的抗肿瘤作用及其机制研究进展 [J]. *实用药物与临床*, 2015, 18(9): 1104–1107. doi: 10.14053/j.cnki.ppcr.201509026.
- [7] ZHOU L Y, XU C, WANG L Q, et al. Effect of β -sitosterol on proliferation and apoptosis of lung cancer cell line A549 [J]. *Int J Lab Med*, 2016, 37(7): 865–867. doi: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.001.
周玲玉, 徐彩, 王乐琴, 等. β -谷甾醇对人肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(7): 865–867. doi: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.001.
- [8] CHENG X A, ZHOU X W, ZHANG S M, et al. Effects of phytosterol on growth inhibiting and apoptosis induction of melanoma cells [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2014, 41(10): 94–97. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.10.023.
程杏安, 周晓武, 张淑明, 等. 植物甾醇对黑色素瘤细胞的生长抑制及凋亡诱导作用 [J]. *广东农业科学*, 2014, 41(10): 94–97. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.10.023.
- [9] ZHANG S, YUE W, WANG L, et al. Inhibitive effect of stigmasterol from *hedyotis diffusa* willd. on hepatoma cells *in vitro* & *in vivo* and its influence on transplanted H22 tumor cell's multiplication cycle, apoptosis [J]. *Progr Mod Biomed*, 2008, 8(11): 2016–2018. doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2008.11.017.
张硕, 岳旺, 王蕾, 等. 白花蛇舌草甾醇对肝癌细胞的体内外抑制作用及其增殖周期、凋亡的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(11): 2016–2018. doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2008.11.017.
- [10] LIAO J J, LI W J, LI J J, et al. Advances in the of constituents and pharmacological effects of *Dendrobium candidum* Wall. ex. Lind. [J]. *J Guangdong Ind Techn Coll*, 2015, 14(3): 16–19,26. doi: 10.3969/j.issn.1672-1950.2015.03.004.
廖俊杰, 李文静, 李进进, 等. 铁皮石斛有效成分与功效研究进展 [J]. *广东轻工职业技术学院学报*, 2015, 14(3): 16–19,26. doi: 10.3969/j.issn.1672-1950.2015.03.004.
- [11] CHEN S L, WU Z G, JIANG W, et al. Isolation and purification of three acidic polysaccharides from *Dendrobium officinale* and their antioxidant activities *in vitro* [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2016, 57(6): 838–844. doi: 10.16178/j.issn.0528-9017.20160613.
陈松林, 吴志刚, 姜武, 等. 铁皮石斛 3 种酸性多糖的分离纯化及体外抗氧化活性 [J]. *浙江农业科学*, 2016, 57(6): 838–844. doi: 10.16178/j.issn.0528-9017.20160613.
- [12] SUN H, HU Q, JIN H, et al. Research advances in chemical constituents and pharmacological activities of *Dendrobii officinalis* caulis [J]. *Chin J Exp Trad Med Form*, 2017, 23(11): 225–2348. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110225.
孙恒, 胡强, 金航, 等. 铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(11): 225–234. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110225.
- [13] YANG L, LIU S J, HU J M, et al. Determination of volatile components from stem of *Dendrobium officinale* by GC-MS [J]. *Mod Chin Med*, 2013, 15(5): 362–364. doi: 10.3969/j.issn.1673-4890.2013.05.003.
杨柳, 刘守金, 胡江苗, 等. GC-MS 法检测铁皮石斛茎中挥发性成分 [J]. *中国现代中药*, 2013, 15(5): 362–364. doi: 10.3969/j.issn.1673-4890.2013.05.003.
- [14] CHEN X M, YANG J S, GUO S X, et al. Studies on the chemical constituents of solid cultured *Dendrobium officinale* protocorms [J].

- Mod Chin Med, 2014, 16(4): 265–268. doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.2014.04.001.
- 陈晓梅, 杨峻山, 郭顺星, 等. 固体培养铁皮石斛原球茎化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(4): 265–268. doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.2014.04.001.
- [15] TONG J J, YU H, ZENG W B, et al. Study on functional components of *Dendrobium officinale* from different culturing areas [J]. J Yunnan Univ Trad Chin Med, 2017, 40(5): 81–84. doi: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.05.018.
- 全晶晶, 虞泓, 曾文波, 等. 6个不同产地铁皮石斛功效成分的分析研究 [J]. 云南中医学院学报, 2017, 40(5): 81–84. doi: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.05.018.
- [16] WU C, PENG J, XIANG L, et al. Sequencing and analysis of the transcriptome of *Dendrobium officinale* [J]. Mol Plant Breed, 2016, 14(12): 3334–3346. doi: 10.13271/j.mpb.014.003334.
- 吴超, 彭娟, 向林, 等. 基于高通量测序的铁皮石斛叶片转录组分析 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(12): 3334–3346. doi: 10.13271/j.mpb.014.003334.
- [17] GUO X, LI Y, LI C F, et al. Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers [J]. Gene, 2013, 527(1): 131–138. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.073.
- [18] ZHANG J X, HE C M, WU K L, et al. Transcriptome analysis of *Dendrobium officinale* and its application to the identification of genes associated with polysaccharide synthesis [J/OL]. Front Plant Sci, 2016, 7: 5. doi: 10.3389/fpls.2016.00005.
- [19] SU W H, ZHANG G F. The photosynthesis pathway in leaves of *Dendrobium officinale* [J]. Acta Phytoecol Sin, 2003, 27(5): 631–637. doi: 10.17521/cjpe.2003.0091.
- 苏文华, 张光飞. 铁皮石斛叶片光合作用的碳代谢途径 [J]. 植物生态学报, 2003, 27(5): 631–637. doi: 10.17521/cjpe.2003.0091.
- [20] DIENER A C, LI H X, ZHOU W X, et al. *STEROL METHYLTRANSFERASE 1* controls the level of cholesterol in plants [J]. Plant Cell, 2000, 12(6): 853–870. doi: 10.1105/tpc.12.6.853.
- [21] SCHAEFFER A, BRONNER R, BENVENISTE P, et al. The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by *STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1* [J]. Plant J, 2001, 25(6): 605–615. doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.00994.x.
- [22] BENVENISTE P. Biosynthesis and accumulation of sterols [J]. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 429–457. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141616.
- [23] GREBENOK R J, GALBRAITH D W, PENNA D D. Characterization of *Zea mays* endosperm C-24 sterol methyltransferase: One of two types of sterol methyltransferase in higher plants [J]. Plant Mol Biol, 1997, 34(6): 891–896. doi: 10.1023/A:1005818210641.
- [24] SITBON F, JONSSON L. Sterol composition and growth of transgenic tobacco plants expressing type-1 and type-2 sterol methyltransferases [J]. Planta, 2001, 212(4): 568–572. doi: 10.1007/s004250000417.
- [25] HOLMBERG N, HARKER M, GIBBARD C L, et al. Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed [J]. Plant Physiol, 2002, 130(1): 303–311. doi: 10.1104/pp.004226.