

白桦三萜的合成和调控

尹静¹, 詹亚光^{1,*}, 肖佳雷²

¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; ²黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086

Synthesis and Regulation of Triterpene from *Betula platyphylla* Suk.

YIN Jing¹, ZHAN Ya-Guang^{1,*}, XIAO Jia-Lei²

¹College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

摘要:白桦树叶和树皮中含有次生代谢产物白桦三萜,其中白桦树外皮中含有丰富的羽扇豆烷型的三萜白桦酯醇和白桦酯酸,这两种天然产物具有抑制人免疫缺陷病毒复制和选择性杀死癌细胞等药理活性,并显示出与以往药物不同的作用机制,疗效高而毒性低,被认为是具有一定开发潜力的抗癌、抗艾滋病类先锋药物。本文就天然药物成分白桦三萜组成、分布的组织特异性、药理活性、代谢途径、环境调控和白桦三萜生物合成关键酶基因克隆的研究进展作一介绍。

关键词:白桦三萜;组织特异性;代谢调控;关键酶基因

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)属桦木科桦木属,为落叶乔木,是我国东北地区多种地带性植被的先锋树种,因其生长迅速,适应性强,材质优良而成为重要的经济树种。早在《本草纲目》中就有记载,桦树皮可用于黄疸、乳痛、疥疮等疾病的治疗,此外,在民间还用于治疗慢性痢疾及清热解毒、止咳、平喘、消炎、杀菌等(Marston 和 Hostetman 1987; Steele 等 1999),但其药用成分研究开发甚少。自从 Fujioka 等(1994)和 Pisha 等(1995)先后报道了白桦酯酸可以抑制H9淋巴细胞中HIV病毒复制和选择性地抑制黑色素瘤细胞的生长以来,白桦三萜类物质(triterpenes of *Betula platyphylla*, TBP)药理作用也越来越受到国内外学者的广泛重视,大量研究表明,其药理活性多样,且显示出了与以往药物不同的作用机制(Sun等2002; Valentin等2002)疗效高而毒性低,具有抗肿瘤、抗艾滋病及抗菌、抗病毒、降脂、利胆和保肝等作用(Soler 等 1996; Zhukova 等 2005; Kovalenko 等 2007),作为有潜力的新型药物制剂,具有广阔的应用前景。

1 白桦三萜的组成及其分布的组织特异性

白桦三萜的主要成分是白桦树外皮中的白桦酯醇(betulin, lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol, C₃₀H₅₀O₂)、白桦酯酸(betulinic acid, 3 β -hydroxy-lup-20(29)-ene-28-oic acid, C₃₀H₄₈O₃)及树叶中桦叶烯三醇(betulafole-nentriol)、桦叶烯四醇(betulafolienetetraol)等,都是

重要的天然次生代谢产物。白桦酯醇、白桦酯酸为羽扇豆烷型的五环三萜,广泛分布于桦木属植物及其它许多属植物中。白桦酯醇又称桦木脑、桦木醇,溶于乙醇、乙醚、氯仿和苯,微溶于冷水、石油醚等,含1 mol乙醇的溶剂化物为针状结晶,干燥后,170~180 °C (10.67 Pa)升华。白桦酯酸约占白桦树外皮干重的0.025%左右,是白桦酯醇经两步合成的,与白桦酯醇有类似的药理活性(Sun 等 2002)。桦叶烯三醇、桦叶烯四醇为达玛烷型四环三萜物质,主要分布在白桦树叶中,约占树叶干重0.25%。另有少量树种的根皮也有分布,而树干部的树皮中则没有,且不同白桦树种叶中的达玛烷型三萜结构也存在差异。由于与人参皂苷的苷元结构相似,所以表现出一些特殊的生物活性,如桦叶烯三醇与人参皂苷的苷元的差别仅在于C-3羟基的构型不同,也是治疗癌症和心血管疾病及提高机体免疫功能的候选药物。

白桦树外皮含有不同类型的三萜化合物,主要类型是羽扇醇,在白桦树外皮干重的10%~40%,含量多少取决于白桦树品种、生长条件、树龄和生

收稿 2008-10-09 修定 2009-03-30

资助 黑龙江省科技攻关项目(GA06B301-4-3)和中国博士后基金(20080430873)。

* 通讯作者(E-mail: yaguangzhan@126.com; Tel: 0452-82191752)。

长季节。有报道,每公斤白桦树外皮中含三萜系化合物 434.4 g, 其中白桦酯醇为 423.2 g。同时有人以树径分别为 16.6、22.3、33.1 cm 的白桦树研究桦木内皮与外皮的化学组成及其含量与树径的关系, 结果认为, 不同树木径级内、外皮的化学组成及其含量(其中包括三萜系化合物的数量和组成)无明显波动(崔艳霞和郑志方 1994)。也有研究发现, 白桦植株中还含有齐墩果烷型又称 β -香树脂烷(β -amyrane)型的齐墩果酸、环阿屯烷型的 β -谷甾醇等三萜类物质。另外, 由白桦组织培养的无菌苗茎段和叶柄诱导的愈伤组织中也具有一定含量的三萜物质(Zhang 等 2003; 王博 2008), 这为通过细胞培养技术或生物反应器生产白桦三萜物质, 提供了要线索。

除桦木属植物白桦外, 白桦酯醇和白桦酯酸也广泛分布在干草根皮、草药酸枣仁、槲榔树皮、菊科植物云木香的根、槐花等, 另外在蜂胶、花粉、马兰、大枣、葡萄干等也有分布, 在这些植物中的发现印证了它们的一些特殊功效, 如抗炎活性、抗衰老功效。含白桦酯醇的植物虽然很多, 但含量超过10%的很少, 从白桦树皮中提取白桦酯醇, 得率可达35%, 纯度在95%以上, 是很好的植物资源。

2 白桦三萜的合成代谢途径和关键酶

三萜类物质是以乙酰辅酶 A 原料经甲羟戊酸途径(mevalonic pathway, MVA, 又称 cytosolic pathway)在细胞质中合成的(Newman 和 Chappell 1999)。甲羟戊酸是在第一个限速酶 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 a 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, HMGR)的作用下生成的(Rosa 等 2007), 经 MVA 途径形成异戊烯基焦磷酸酯(isopentenyl diphosphate, IPP)和其双键异构体二甲基烯丙基焦磷酸酯(dimethylallyl diphosphate, DMAPP), 进一步缩合形成倍半萜、三萜和甾体。而单萜(monoterpene)、二萜(diterpene)是以丙酮酸(pyruvate)和磷酸甘油醛(glyceraldehydes-3-phosphate)为原料, 经丙酮酸/磷酸甘油醛途径(pyruvate/glyceraldehyde-3-phosphate pathway, DXP 途径)合成的。倍半萜生物合成的 IPP 既可来源于 MVA 途径, 也可来源于 DXP 途径, 或者同时来源两条途径。在三萜类化合物生物合成的两条途径中, 最后都是由 5 个碳原子的 IPP 和其双键异构

体 DMAPP 缩合而成各种萜类的前体。IPP 是“活化”的异戊二烯单元, 是所有萜类生物合成的中心前体。在烯丙基转移酶(prenyl transferase)的催化作用下, IPP 与其异构体 DMAPP 经头尾缩合生成具 C10 骨架的香叶基焦磷酸(geranyl diphosphate, GPP); GPP 加上第 2 个 IPP 单元形成具 C15 骨架的法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP) (Lange 等 1999), 最后 2 个倍半萜缩合形成共同的三萜前体-2,3-氧化角鲨烯(2,3-oxidosqualene, 2,3-OSC), 在不同三萜合酶作用下, 如羽扇醇合酶(lupeol synthases, LUS)作用下合成羽扇醇、白桦酯醇、白桦酯酸; 在环阿齐醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)作用下合成固醇、甾酮类三萜; 在达玛烷烯二醇合酶(dammarenediol synthases, DS)作用下合成达玛烯二醇; 在 β -香树脂醇合酶(β -amyrin synthase, β -AS)作用下合成齐墩果酸类、香树脂醇或干草皂苷等三萜物质(Hiroaki 等 2001, 2004; Zhang 等 2003)。白桦酯醇是白桦酯酸的合成前体, 两者的差别仅在于 C28 位是 CH_2OH 而不是 COOH 。其合成过程和化学结构如图 1。

萜类次生代谢的特征之一就是种属和组织特异性, 许多单萜、倍半萜和三萜成分往往来源于特定的种属、特定的物种, 而这些化合物在某一植物体内仅存在于某一类器官、组织、细胞或细胞器中, 并受到独立的调控(Lange 等 2000; Hiroaki 等 2001, 2004; Dudareva 等 1996), 这与生物合成关键酶的定位有关。如 Hiroaki (2001)发现, 甘草中甘草皂苷(齐墩果烷类三萜皂苷)是植物根中产生的, 仅在增厚的根和匍匐枝的木质部合成, 大豆皂苷(齐墩果烷类三萜皂苷)大体分布在甘草的种子和枝根中。甘草中的白桦酯酸主要分布在粗根的软木层。干草悬浮培养细胞不具备生产甘草皂苷的能力, 但能够产生甾醇类、大豆皂苷和白桦酯酸三萜化合物。这种现象与其相应的组织中的三萜基因表达是相吻合的。另外, 人们也发现三萜基因的表达具有时序性, 以三年生的甘草为材料, 采用 Northern 杂交的方法对粗根中 OSC 表达水平的季节性变化进行确认。5 月份 β -AS 表达水平最高, 此时也是甘草迅速生长的时期; 6 月、7 月、9 月份 β -AS 的表达水平也很高, 此时地上部分也正在成长; 8 月份 β -AS 表达水平非常低, 此时许多叶已脱落, 这可能与正所处环境的高温多雨有关。冬季地上部

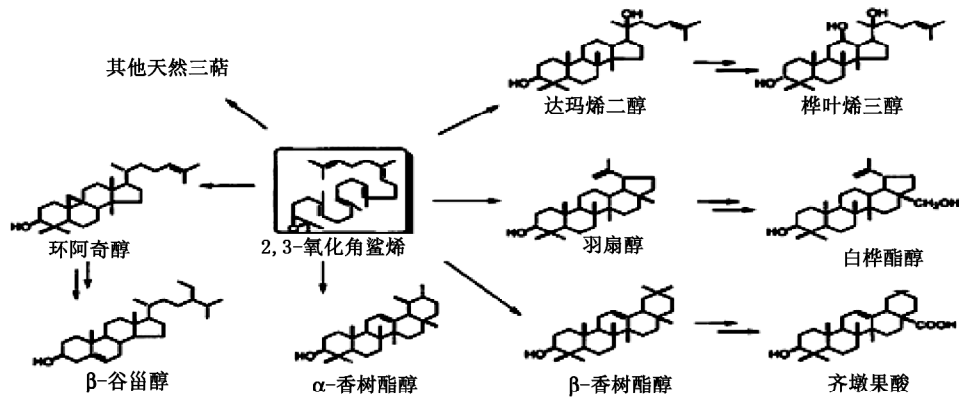


图1 高等植物中氧化鲨烯环化酶及白桦树中的三萜化合物(Zhang等2003)

分停止生长, β -AS不再表达。而CAS基因的表达却无组织或时间表达的特异性, 暗示其可能是一个持家基因(housekeeping gene)。白桦三萜基因CAS、 β -AS和LUS在悬浮细胞中能够被检测到(Zhang等2003)。

3 环境对三萜合成及其关键基因表达的调控

范桂枝等(2007)以13种八年生白桦为试材, 研究不同部位及种源间白桦酯醇含量的结果表明, 在白桦不同部位的含量分布差异显著, 依次分别为: 外皮>枝皮>内皮>芽>叶>根>花粉; 13种八年生白桦种源树皮内白桦酯醇的含量为132.45~257.11 mg·g⁻¹ (DW), 且种源间差异呈极显著水平, 东北地区的小北湖和凉水两个白桦种源的含量最高, 达到257.11和240.36 mg·g⁻¹ (DW), 而采自辽宁、内蒙和宁夏的白桦种源的含量最低, 分别为139.24、136.26和132.45 mg·g⁻¹ (DW)。并认为白桦酯醇的含量不仅受自身种源及遗传背景的影响, 同时也受到其所处地理位置和气候因素的影响, 即属于基因与环境互作的表现性状。关于环境因子对植株和细胞中单萜和二萜类物质的合成和关键基因的表达研究已有较多报道(Diane等2002; 鲁守平等2006; 王海斌等2007; Baltazar等2007), 但关于三萜物质的研究起步较晚。Hiroaki等(2001, 2004)以干草悬浮细胞为材料, 研究表明茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和GA₃对3种OSC酶的调节效应是不同的。在培养的细胞中添加MeJA, 可以促进 β -AS表达和大豆皂苷的合成, 但LUS表达水平下降, 而赤霉素(gibberellic acid, GA₃)对LUS表达影响不大。CAS基因对MeJA和GA₃的反应不明显。

最近, 我校森林生物工程研究室(詹亚光等

2002; 王博等2008)以白桦无菌苗茎段为外植体在IS固体培养基上诱导愈伤组织, 研究白桦细胞中三萜物质的积累的结果表明, 白桦愈伤组织具有合成三萜物质的能力, 但含量较低, 仅为0.8~1.5 mg·g⁻¹ (DW)。为了提高三萜物质的含量, 还研究了环境因子, 包括光强、光质、光照时间、碳源和激素等因素对三萜物质的积累调节效应, 结果表明, 培养基中添加不同浓度(10~50 g·L⁻¹)葡萄糖和果糖的白桦愈伤组织中三萜物质含量先上升后下降, 而添加蔗糖的则呈直线上升, 其中以30 g·L⁻¹蔗糖的最高, 总三萜积累量达到4.04 mg·g⁻¹ (DW)。相对蓝光、黄光而言, 白光更有利于三萜积累, 强光照高于弱光照和黑暗, 白桦愈伤组织中三萜物质含量在0~9 d呈上升趋势, 9~18 d呈下降趋势, 18~21 d略微回升, 于第9天达到最大值。白桦愈伤组织进行悬浮培养发现, B5和NT培养基比MS、1/2MS、WPM(木本植物培养基)和IS更有利于三萜积累, 含量可达11.2633 mg·g⁻¹ (DW)和11.9671 mg·g⁻¹ (DW); 激素0.6 mg·L⁻¹ TDZ+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA和0.2 mg·L⁻¹ TDA+0.4 mg·L⁻¹ 6-BA配比可使三萜含量达到11.136 mg·g⁻¹ (DW)和14.2264 mg·g⁻¹ (DW); 紧密型愈伤组织三萜含量高于松散型的, 三萜含量达到14.3075 mg·g⁻¹ (DW) (王博等2008)。这些研究为采用细胞工程手段提高白桦三萜类化合物含量建立了基础。

4 三萜基因克隆

萜类生物的合成可分为3个阶段, 中间体的生成、萜类化合物的合成以及最后的修饰。相应的酶可分为3类, 包括生成IPP和DMAPP以前的酶, 如MVP途径的HMGR; 生成萜类的各种环化酶, 它

们的作用是生成 IPP、DMAPP 后, 催化其形成各种不同分子量大小的形式各异的萜类化合物和中间体, 是萜类生物合成关键酶; 第三类酶催化形成的产物进行复杂的结构修饰, 主要包括羟基化、甲基化、异构化、加成和还原等过程。其中关于前两类酶研究及其基因克隆的报道已取得显著进展。自 1992 年开始有植物合成酶基因克隆的报道, 迄今为止, 已有 30 种以上的植物萜类合酶的 cDNA 被克隆, 其中已经从马铃薯(Korth 等 1997)、棉花(Loguercio 等 1999)、番茄(Rodriguez-Concepcion 和 Gmisse 1999)中克隆 HMGR; 从绿薄荷的油腺细胞中分离 GPP, 并克隆其基因(Burke 等 1999), 从拟南芥中克隆了编码 FPP 合成酶的 cDNA 等(Homann 等 1996)。另外, 包括烟草(Facchini 和 Chappell 1992)、番茄(Colby 等 1998)、红豆杉(Wildung 和 Croteau 1996)、冷杉(Bohlmann 和 Croteau 1999)、天仙子(Back 和 Chappell 1995)、棉花(Chen 等 1995)、蓖麻(Hill 等 1996)等植物的单萜、倍半萜、二萜环化酶。

三萜化合物是以 2,3-OSC 为共同的三萜前体, 在不同的三萜合酶, 其中包括 LUS、DS、CAS 和 β -AS 和多功能三萜合酶作用下合成的。一些三萜合成酶能催化生成若干种三萜产物, 这种多功能的三萜合成酶是植物中乌苏烷和齐墩果烷往往同时存在的根本原因。最近, 关于三萜基因的克隆也陆续见到报道, 其中包括十种植物的 33 个三萜基因(Mohammad 等 2007), 它们是 5 个编码 β -AS 的基因, 分别为人参的 *PNY*、*PNY2* (Kushiro 等 1999), 豌豆的 *PSY* (Morita 等 2000), 甘草的 *GgbAS1* (Hiroaki 等 2001), 白桦的 *BPY* (Zhang 等 2003); 6 个编码 LUS 合酶基因, 包括来自拟南芥的 *LUP1*、橄榄的 *OEW* (Kushiro 等 1999)、蒲公英的 *TRW*、干草的 *GgLUS* (Hiroaki 等 2004)、白桦的 *BPW* (Zhang 等 2003); 3 个编码 CAS 合酶的基因, 来自白桦的 *BPX*、*BPX2* (Zhang 等 2003)、甘草的 *GgCAS* (Hiroaki 等 2000), 以及编码多功能三萜合酶的丝瓜 *LcIMSI*, 拟南芥的 *YuPH12R.43* (Kushiro 等 1999)、豌豆 *PSM* (Morita 等 2000) 以及闭鞘姜和莲属多功能三萜基因。三萜基因 *GgbAS1*、*GgLUS* 和 *GgCAS* 来自干草悬浮培养细胞, 另外 *BPX*、*BPX2*、*BPW* 和 *BPY* 4 个三萜基因也是由东京大学的 Zhang 等(2003)以日本白桦无菌苗叶柄诱导愈伤, 进行悬浮细胞培养, 以 MS

培养基悬浮培养 10 d 的细胞为 cDNA 来源, 用 PCR 方法克隆的, *BPX*、*BPX2*、*BPW* 和 *BPY* 的 cDNA 片段长度分别为 2 274、2 304、2 268 和 2 340 bp, 均包含完整的开放阅读框(open reading frames, ORF)。

萜类合酶在植物中有以下几个特点: 首先一种植物中有多种萜类合酶基因, 如 Steele 等(1999)从愈伤组织诱导的冷杉的茎构建的 cDNA 文库中得到了 11 个防御相关的萜类合酶基因的克隆, 白桦和甘草悬浮培养细胞中也被检测出具有 *CAS*、*LUS* 和 β -*AS* 三萜合酶基因的表达(Zhang 等 2003)。其次有表达的时空特异性, 在特定的细胞和组织中表达, 并受到独立的调控(Lange 等 2000; Hiroaki 等 2004; Schuhly 等 1999), 这与生物合成关键酶的定位密切相关。有研究表明, 白桦三萜的合成也具有明显的种属和植株分布部位的特异性, 如白桦酯醇和白桦酯酸主要集中在树外皮, 而桦木烯二醇也仅分布在桦树叶中, 另外, 在甘草植株中也发现, 三萜基因 β -*AS* 和 *LUS* 在 5~7 和 9~10 月份有表达, 而高温多雨的 8 月份基因表达受抑制(Hiroaki 等 2004)。大多数萜类合酶基因都是在植物材料高表达其 mRNA 时得到的。如烟草、棉花、莨菪、等植物的倍半萜合成酶及干草、白桦的三萜合酶都是通过诱导培养细胞表达而获得, cDNA 文库也由这些诱导细胞来构建, 所以构建经诱导的细胞 cDNA 文库能富集萜类合酶基因。再次, 萜类合酶在植物中一般表达量较低, 难于分离纯化。由于萜类合酶基因的表达和有效调控在植物的特异细胞中(Crock 等 1997; Lange 等 2000; Mohammad 等 2007)进行, 或者在一定的生长发育阶段和短暂的防御反应发生期间, 因此, 大多数基因的克隆都采用富集含量的植物材料来分离 mRNA。

植物萜类合成酶基因的克隆主要有两种策略。(1)酶纯化基础上的反向推测基因的方法: 通过分离纯化蛋白质, 测定并获得氨基酸序列信息, 设计合成与氨基酸序列相对应的核苷酸序列, 以合成的核苷酸片段制备探针。采用探针筛选 cDNA 文库, 分离克隆酶的基因。(2)序列相似基础上的 PCR 方法: 根据萜类合成酶的共有序列片段设计简并引物, 进行 PCR 扩增, 得到相关酶的特异探针。再利用探针筛选 cDNA 文库, 分离克隆酶的基因。由于植物萜类合成酶的纯化常常十分困难, 因此, 基

因序列相似基础上的克隆技术发展较快,在裸子植物和被子植物的许多萜类合成酶的基因克隆中广泛应用。

5 结束语

据世界卫生组织国际癌症研究中心统计(<http://tech.sina.com.cn/ae/2003-04-08/0944176269.shtml>),根据目前癌症的发病趋势,2020年全世界癌症发病率将比现在增加50%,全球每年新增癌症患者人数将达到1 500万人。而仅2007年全世界新增加艾滋病患者就达500万人(<http://bbs.163.com/bbs/society/39966523.html>)。同时市场上用于治疗癌症和艾滋病药物的需求量,在以每年20%的速度递增。临床上应用的长春花碱、喜树碱等药物对细胞毒性作用广,专一性差,白桦三萜对肿瘤细胞毒性是正常细胞2~10倍,可高效的、有选择的抑制肿瘤生长。但因其结构复杂,化学合成产量低,成本高,一株三十年生白桦树含三萜也不足0.5 kg,因此严重制约临床应用。致使如何有效利用白桦树植株或组织为材料,来提高白桦三萜化合物的积累,成为人们需要亟待解决的问题。另一方面,白桦三萜物质大多都为醇溶或酯溶性,不易溶于水,这也是其未能大规模应用的一个原因。目前为止,各国科学家大多致力于白桦酯醇和白桦酯酸的药理活性及作用机制研究,在最近开始对其化学结构进行改造,以开发其更具活性的衍生物和提高其水溶性。

关于这一领域的研究,以下几点可以考虑:(1)采用环境调控促进三萜物质高效合成。利用各种生物和非生物诱导子促进三萜合成,如在白桦植株、细胞或组织发育的不同时期进行各种激素、碳源、光、温调控及进行各种诱导子处理等,建立调控白桦三萜高效合成的技术体系。(2)加入三萜合成前体物质,进行微生物的生物转化。大规模植物细胞培养技术因具有不受地区、季节、资源的影响,不破坏环境,通过自动化控制细胞生长和合理调节代谢过程来降低成本和提高生产率等优点,已成为植物药品的新来源。尤其是目前已检测到白桦悬浮培养细胞中具有三萜合成的能力,可通过各种培养条件的优化以筛选出高产三萜的白桦悬浮细胞系或细胞株,为通过生物反应器和微生物转化等技术和工艺进行大规模白桦三萜的生产奠定了基础。(3)采用化学方法对白桦三萜进行改造。以白桦酯酸或酯醇为母体,设计开发新的衍生物以改

善其本身作为临床用药的某些弱点,如水溶性差等。如在三萜类化合物的分子上结合上若干糖基,其形成的分子同时具有亲脂性的苷元结构和亲水性的糖基。这种结构有类似于表面活性剂的结构,其水溶液振摇后能产生持久的泡沫,且不影响其生物活性。即把三萜类物质的糖苷化合物制成皂苷。(4)克隆高效表达基因和进行分子调控。明确三萜高效和限速合成基因,采用cDNA文库筛选和PCR同源性方法,克隆三萜基因,并进行特定植株或细胞的转化,促进其高效表达。另外,通过MVA途径其它非三萜合成基因表达沉默或miRNA方法抑制其表达,关闭有毒次生物的合成或改变代谢流的方向,从而大量合成有用的三萜物质。

可以预见,随着医药工程和现代生物技术的不断进步,人们以白桦为材料,尤其是白桦细胞,通过基因工程和细胞工程方法进行白桦三萜的高效生产与合成,将这一极具潜力的抗癌和艾滋病类药物应用于生产实际和临床,定会更加有效,更好地满足人类的需求。

参考文献

- 崔艳霞,郑志方(1994).白桦皮化学组成的研究.东北林业大学学报, 22: 53~58
- 范桂枝,詹亚光,王博,邱磊,刘桂丰,王会仁(2007).白桦不同部位及种源间白桦酯醇含量的差异分析.林产化学与工业, 27: 103~106
- 鲁守平,隋新霞,孙群,孙常启,王海斌,熊君,方长甸,邱龙,吴文祥,何海斌(2006).药用植物次生代谢的生物学作用及生态环境因子的影响.天然产物研究与开发, 8: 1027~1032
- 王博,范桂枝,詹亚光(2008).不同培养基类型和植物生长调节剂配比对白桦愈伤组织中三萜积累的影响.林业科学, 144 (10): 153~158
- 王海斌,熊君,方长甸,邱龙,吴文祥,何海斌,林文雄(2007).氮素胁迫下强、弱化感水稻萜类代谢途径中关键酶基因差异表达的FQ-PCR分析.作物学报, 33 (8): 1329~1334
- 詹亚光,杨传平(2002).白桦愈伤组织高效诱导和不定芽分化.植物生理学通讯, 38 (2): 132~137
- Back K, Chappell J (1995). Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase from *Hyoscyamus muticus* and its molecular comparison to related terpene cyclases. J Biol Chem, 270: 7375~7381
- Baltazar A, Espina-Lucero J, Ramos-Torres I, Gouzález-Aguilar G (2007). Effect of methyl jasmonate on properties of intact tomato fruit monitored with destructive and nondestructive tests. J Food Engineer, 80: 1086~1095
- Bohlmann J, Croteau R (1999). Diversity and variability of terpenoid defences in conifers: molecular genetics, biochemistry and evolution of the terpene synthase gene family in grand fir (*Abies grandis*). Novartis Found Symp, 223: 132~140

- Burke CC, Wildung MR, Croteau R (1999). Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 13062~13070
- Chen XY, Chen Y, Heinstein P, Davisson VJ (1995). Cloning, expression, and characterization of (+)- δ -cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 324: 255~261
- Colby SM, Crock J, Dowdle-Rizzo B, Lemaux PG, Croteau R (1998). Germacrene C synthase from *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 2216~2221
- Crock J, Wildung M, Croteau R (1997). Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha \times piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone E-beta-farnesene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 2833~2840
- Diane M, Dorothea T, Jonathan G, Jorg B (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of norway spruce stems. *Plant Physiol*, 129: 1003~1018
- Dudareva N, Cseke L, Blanc VM, Pichersky E (1996). Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of *S*-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell*, 8: 1137~1140
- Facchini PJ, Chappell J (1992). Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 11088~11095
- Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas L M, Jiang JB, Janzen WP, Chen IS, Lee KH (1994). Anti-AIDS agents. 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod (Lloydia)*, 57: 243~247
- Hill AM, Cane DE, Mau CJ, West CA (1996). High level expression of *Ricinus communis* casbene synthase in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 336: 28~33
- Hiroaki H, Pengyu H, Ar K, Kenichiro I, Noboru H, Yasumasa I, Tetsuo K, Masaaki S, Yutaka E (2001). Cloning and characterization of a cDNA encoding b-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice. *Biol Pharm Bull*, 24: 912~916
- Hiroaki H, Pengyu H, Satoko T, Megumi O, Kenichiro I, Masaaki S, Yutaka E (2004). Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. *Biol Pharm Bull*, 27: 1086~1092
- Homann V, Mende K, Arntz C, Ilardi V, Macino G, Morelli G, Böse G, Tudzynski B (1996). The isoprenoid pathway: cloning and characterization of fungal FPPS genes. *Curr Genet*, 30: 232~240
- Korth KL, Stermer BA, Bhattacharyya MK (1997). HMG-CoA reductase gene families that differentially accumulate transcripts in potato tubers are developmentally expressed in floral tissues. *Plant Mol Biol*, 33: 545~560
- Kovalenko LP, Balakshin VV, Presnova GA, Chistyakov AN, Shipaeva EV, Alekseeva SV, Durnev AD (2007). Immunotoxicity and allergenic properties of betulin-containing birch bark dry extract. *Pharmaceutical Chem J*, 41: 18~20
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (1999). Beta-amyrin synthase—cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Tetrahedron Lett*, 40: 5553~5556
- Lange BM, Wildung MR, Stauber EJ, Sanchez C, Pouchnik D, Croteau R (2000). Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2934~2940
- Loguercio LL, Scott HC, Trolinder NL, Wilkins TA (1999). Hmg-CoA reductase gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): unique structural features and differential expression of hmg-potentially associated with synthesis of specific isoprenoids in developing embryos. *Plant Cell Physiol*, 40: 750~756
- Marston A, Hostettman K (1987). Antifungal, molluscicidal and cytotoxic compounds from plants used in traditional medicine. In: Hostettmann K, Lea PJ (eds). *Biologically Active Natural Products*. Oxford: Oxford University Press, 65~83
- Mohammad B, Hirotsuke O, Etsuko T, Kazuhiko K, Shigeyuki B, Kensaku T (2007). Triterpene synthases from the Okinawan mangrove tribe, Rhizophoraceae. *FEBS J*, 274: 5028~5042
- Morita M, Shibuya M, Kushiro T, Masuda K, Ebizuka Y, Eur J (2000). Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). *Biochemistry*, 267: 3453~3460
- Newman JD, Chappell J (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 34: 95~106
- Pisha EH, Chai IL, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM, Wani MC (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med*, 1: 1046~1051
- Rodriguez-Concepcion M, Grissem W (1999). Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. *Plant Physiol*, 119: 41~47
- Rosa EC, Mari RH, Juan AV, Fran GA, Llobell EM, Santiago G (2007). Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity. *Fungal Genet Biol*, 44: 269~283
- Schuhly W, Heilmann J, Calls I, Sticher O (1999). New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joozeiro* L. *J Planter Med*, 65: 740~750
- Soler F, Poujade C, Evers M, Carry JC, Henin Y, Bausseau A, Huet T, Pauwels R, Clercq E, Mayaux JF (1996). Betulinic acid

- derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiencyvirus type 1 entry. *J Med Chem*, 39: 1069~1083
- Steele JC, Warhurst IC, Kirby GC (1999). In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother Res*, 13: 115~121
- Sun IC, Chen CH, Kashiwada Y, Wu JH, Wang HK, Lee KH (2002). Anti-AIDS agents 49. synthesis, anti-HIV, and anti-fusion activities of IC9564 analogues based on betulinic acid. *J Med Chem*, 45: 4271~4275
- Valentina Z, Rosanna S, Sabina C (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines but not on normal cells. *Cancer Lett*, 175: 17~22
- Wildung MR, Croteau R (1996). A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem*, 271: 9201~9211
- Zhang H, Shibuya M, Yokota S, Ebizuka Y (2003). Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants. *Biol Pharm Bull*, 26: 642~650
- Zhukova NA, Semenov DE, Sorokina IV, Tolstikova TG, Pozdnyakova SV, Grek OR (2005). Effect of betulonic acid and its derivative [3-oxo-20(29)-lupene-28-oyl]-3-Aminopropionic acid on liver structure in mice with RLS lymphoma. *Biol Pharm Bull*, 9: 348~351