

白芍单萜苷成分与生物合成相关基因的时空表达特性及其相关性研究

徐攀^{1,2}, 胡轶娟^{1,2}, 占靓卉^{1,2}, 吴晓俊^{1,2}, 楼柯浪^{1,2}, 陈如兵^{1,2}, 梁卫青^{1,2}, 浦锦宝^{1,2*} (1.浙江省中医药研究院药用资源研究中心, 杭州 310007; 2.浙江省中药新药研发重点实验室, 杭州 310007)

摘要: 目的 揭示白芍不同发育时期不同组织部位中单萜苷含量及其生物合成基因的表达差异和两者之间的相关性。方法 通过 HPLC 测定白芍叶、花、果、根及根中不同部位(韧皮部、木质部、须根和根皮)在不同发育时期氧化芍药苷、白芍内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷含量。采用 RT-PCR 对筛选出来的 8 个白芍单萜苷生物合成相关基因进行相对含量测定。应用 R 语言分析 4 种单萜苷含量与各生物合成相关基因表达量的相关性。结果 芍药苷和苯甲酰芍药苷主要分布于根中, 而氧化芍药苷和白芍内酯苷主要分布于花中。氧化芍药苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷主要分布于木质部中, 白芍内酯苷主要在韧皮部和须根。4 种单萜苷成分在根中花期和果期含量均较低, 在黄枯期中最高, 展叶期次之。单萜苷含量与其关键酶基因表达量相关性分析结果表明, *HMGR2* 和 *IDI* 基因与芍药苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷含量呈高度正相关。结论 白芍单萜苷及其生物合成相关基因存在时空特异表达模式, 甲羟戊酸途径是白芍中生物合成萜类骨架的主要途径。

关键词: 白芍; 单萜苷; 生物合成; 时空表达差异; 相关性分析

中图分类号: R284.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)11-1490-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221072

引用本文: 徐攀, 胡轶娟, 占靓卉, 等. 白芍单萜苷成分与生物合成相关基因的时空表达特性及其相关性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(11): 1490-1498.

Study on the Spatio-temporal Expression Pattern and Their Correlation of Monoterpene Glycosides Content and the Biosynthesis-related Gene in *Paeonia Lactiflora* Pall.

XU Pan^{1,2}, HU Yijuan^{1,2}, ZHAN Lianghui^{1,2}, WU Xiaojun^{1,2}, LOU Kelang^{1,2}, CHEN Rubing^{1,2}, LIANG Weiqing^{1,2}, PU Jinbao^{1,2*} (1.Center for Medicinal Resources Research, Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 2.Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the expression pattern of monoterpene glycosides contents and their biosynthesis-related genes in different tissues of *Paeonia lactiflora* Pall. at different developmental stages, investigate the correlation between them. **METHODS** The content of oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin and benzoylpaeoniflorin in root, leaf, flower, fruit and different tissues(phloem, xylem, fibril and velamen) of the root was determined by HPLC. RT-PCR was used to analyze the candidate genes related to biosynthesis of monoterpene glycosides. The correlation between the contents of four monoterpene glycosides and the expression levels of biosynthesis related genes was comprehensively analyzed by R language. **RESULTS** Paeoniflorin and benzoylpaeoniflorin were mainly distributed in roots, while oxypaeoniflorin and albiflorin were mainly distributed in flowers. Oxypaeoniflorin, paeoniflorin and benzoylpaeoniflorin were mainly distributed in xylem, while albiflorin was mainly distributed in phloem and fibrous roots. The contents of the four monoterpene glycosides in root were low in flowering and fruit stage, and the highest in withered stage, followed by leaf spreading stage. The correlation analysis between monoterpene glycosides content and the expression level of key enzyme genes showed that *HMGR2* and *IDI* genes were closely positively correlated with the contents of paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin and paeoniflorin. **CONCLUSION** Monoterpene glycosides and their biosynthesis related genes in *P. lactiflora* showed spatio-temporal expression patterns, and mevalonate pathway is the main pathway for biosynthesis of terpenoid skeleton in *P. lactiflora*.

KEYWORDS: *Paeonia lactiflora* Pall.; monoterpene glycosides; biosynthesis; spatio-temporal expression pattern; correlation analysis

白芍来源于毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)的干燥根^[1], 主产于浙江、安徽、山东、四川等省, 具有镇痛、抗炎、抗抑郁、保肝等多种药理作用^[2-6], 临床上常用于治疗血虚萎黄、

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQ19H280006); 中央本级重大增减支项目(2060302); 国家中医药管理局全国中药资源普查项目(GZY-KJS-2018-004); 磐安县中药产业“揭榜挂帅”项目(PZYF202102)

作者简介: 徐攀, 女, 博士, 副研究员 E-mail: xpan840520@163.com *通信作者: 浦锦宝, 男, 硕士, 研究员 E-mail: pjb0225@163.com

月经不调, 自汗, 盗汗, 肋痛, 腹痛, 四肢挛痛, 头痛眩晕^[7]。单萜苷为白芍主要有效成分之一, 而芍药苷是白芍中单萜苷类化合物中发现最早且含量最高的成分^[8]。随着对白芍的深入研究, 人们后续发现了一系列同类化合物, 如苯甲酰芍药苷、白芍内酯苷、氧化芍药苷、没食子酸芍药苷等^[9-10]。芍药苷等单萜苷主要从白芍等大宗药材中提取, 近年来需求量剧增。由于白芍栽培年限较长, 需达到 3 年或 4 年才能采收, 并且种植采收加工等环节基本上采用劳动密集型的传统生产方式, 机械化程度低, 随着劳动力成本增加, 其生产成本也不断增加, 从药材中提取所得的单萜苷远不能满足市场需求。因此, 对白芍单萜苷生物合成途径进行研究, 利用基因工程和代谢工程等手段生产单萜苷势在必行。但是, 目前关于白芍单萜苷生物合成基因表达的研究较少。

白芍单萜苷的生物合成受到萜类生物合成途径的调控, 即甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径^[11]和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸/甲基赤藓糖醇-4-磷酸(1-deoxyd-xxylose-5-phosphate/methylerythritid-4-phosphate, DXP/MEP)途径^[12]。其生物合成途径通常分为 3 个阶段, 分别为前体异戊烯基焦磷酸的形成、单萜苷骨架的形成和单萜苷及其衍生物结构多样性的后修饰^[13]。近几十年的研究表明, 大多数参与萜类生物合成途径的酶已被鉴定和表征, 包括 DXP/MEP 途径中 *DXS*、*DXR*、*IspD*、*IspE*、*IspF*、*HDS*、*HDR*、*IDI*, MVA 途径中的 *ACCT*、*PMK*、*HMGR*、*HMGS*、*MVK*^[14-15]等。整个生物合成过程中, 仅有 MVA 和 MEP 上游途径中的部分关键酶基因被克隆, 而中下游反应过程及参与的酶(如 *TPS*、*CYP450s* 和 *UGTs* 等)未见报道。通过比较转录组学分析, 笔者所在课题组已在白芍不同器官(根、叶、花、果)中共挖掘出 115 个与单萜苷生物合成相关的候选基因, 还挖掘了 127 个 *UGTs* 基因, 其中 16 个与单萜苷生物合成相关^[16]。

研究表明^[17-18]萜类化合物的合成和积累在植物体内存在时空特异性。为了解白芍生长发育过程中单萜苷类化合物含量及其生物合成途径相关基因的表达差异, 笔者在文献调查和已挖掘单萜苷生物合成候选基因的基础上, 测定了白芍不同组织部位以及根不同发育时期的单萜苷成分含量及其生物合成途径中关键酶基因的表达水平。综合分析生物合成相关各基因表达量的相关性, 及单萜苷含量与生物合成相关基因表达量的关系,

揭示单萜苷及其生物合成相关基因的时空表达特性。这对白芍中单萜苷类成分的生物合成调控和单萜苷类成分的开发利用具有重要意义。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(四元泵, 二极管阵列检测器, 自动进样器)(美国 Agilent 公司); BP 211D 电子天平(德国 Sartorius 公司); XB-70 型雪花制冰机(GRANT 公司); Veriti PCR 仪(ABI 公司); Centrifuge 5430R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Nano Drop 超微量核酸蛋白分析仪(美国 Thermo 公司); 组织球磨仪(美国 QIAGEN 公司); 移液器(德国 Eppendorf 公司); DHG-9240A 型电热恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Merck 公司); 高纯水(自制)。DEPC 水(上海捷瑞生物工程有限公司, 批号: 3BU00180); 异戊醇、氯仿、 β -巯基乙醇和无水乙醇(分析醇, 成都市科龙化工试剂厂)。对照品氧化芍药苷(纯度>98%)、芍药苷(纯度>99.88%)、芍药内酯苷(纯度>98%)和苯甲酰芍药苷(纯度>98%)均购自北京中科质检生物技术有限公司, 批号分别为 21031103, 21031402, 21031601, 21031504。多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(批号: DP441)离心柱型, FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组)(批号: KR116)和 SuperReal 荧光定量预混试剂增强版试剂盒(SYBR Green)(批号: W9308)均购自北京天根生化科技有限公司; 引物(Primers)(上海生工生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 材料采集

本实验所采用的材料为白芍, 由浙江省中医药研究院药用资源研究中心梁卫青副研究员进行鉴定。分别于展叶期(4 月 5 日)、花期(5 月 5 日)、果期(7 月 13 日)和黄枯期(11 月 27 日)采挖 3 年生的白芍完整植株, 并将根分为须根、根皮、韧皮部和木质部; 叶、花于花期采集, 果于果期采集。每个样品 3 个生物学重复, 部分液氮速冻后置 -80 °C 保存, 剩余样品 50 °C 烘干后粉碎, 备用。

2.2 HPLC 测定白芍中单萜苷成分含量

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称定白芍不同组织部位粉末各约 0.1 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 50%稀乙醇 35 mL, 超声处理(功率 240 W, 频率 45 kHz)30 min, 再次加入稀乙醇至刻度线, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称定 4 个单萜苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 121.0 μg 氧化芍药苷、35.2 μg 芍药内酯苷、72.2 μg 芍药苷和 31.2 μg 苯甲酰芍药苷的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 参考已建立的方法^[19]同时测定 4 种单萜苷成分的含量, 具体如下: 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以乙腈(A)-0.1%磷酸(B)溶液为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 10%→15%A; 5~20 min, 15%→20%A; 20~40 min, 20%→60%A), 在波长 230, 270 nm 处进行检测, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样体积 10 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下, 4 种单萜苷成分均能与相邻色谱峰达到较好的分离, 色谱图见图 1。

2.3 单萜苷生物合成相关基因表达量的测定

2.3.1 总 RNA 提取 取白芍样品约 50 mg 迅速研磨, 参照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取, 采用超微量核酸蛋白分析仪和琼脂糖凝胶电泳检查总 RNA 质量。

2.3.2 合成 cDNA 第一链 参照 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒说明书合成第一链, 其过程为总 RNA 8 μL , 5 $\times$ gDNA Buffer 2 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min 后置于冰上急冷, 然后再加入如下反应液: 10 $\times$ King RT Buffer 2 μL , FastKing RT Enzyme Mix 1 μL , FQ-RT Primer Mix 2 μL , RNase-Free ddH₂O 5 μL , 孵育条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 即得 cDNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3.3 Real-Time PCR 以 *Pl-actin* 为内参, 选择白芍单萜苷生物合成途径中 8 个基因(*ACCT*、*HMGR2*、*HMGR7*、*DXR*、*DXS2*、*IDI*、*CYP71A1*、*UGT73C3*)为目的基因, 测定基因表达量。其中 *ACCT*、*HMGR2*、*HMGR7* 为萜类生物合成第一阶段 MVA 途径中的关键酶, *DXR*、*DXS2* 为第一阶段 MEP/DXP 途径中的关键酶基因, *IDI* 为催化第一阶段(无论 MVA 还是 MEP 途径)产物 IPP 和 DMAPP 成为活化异戊二烯单元的酶基因, *CYP71A1* 和 *UGT73C3* 为单萜苷生物合成第三阶段相关的酶

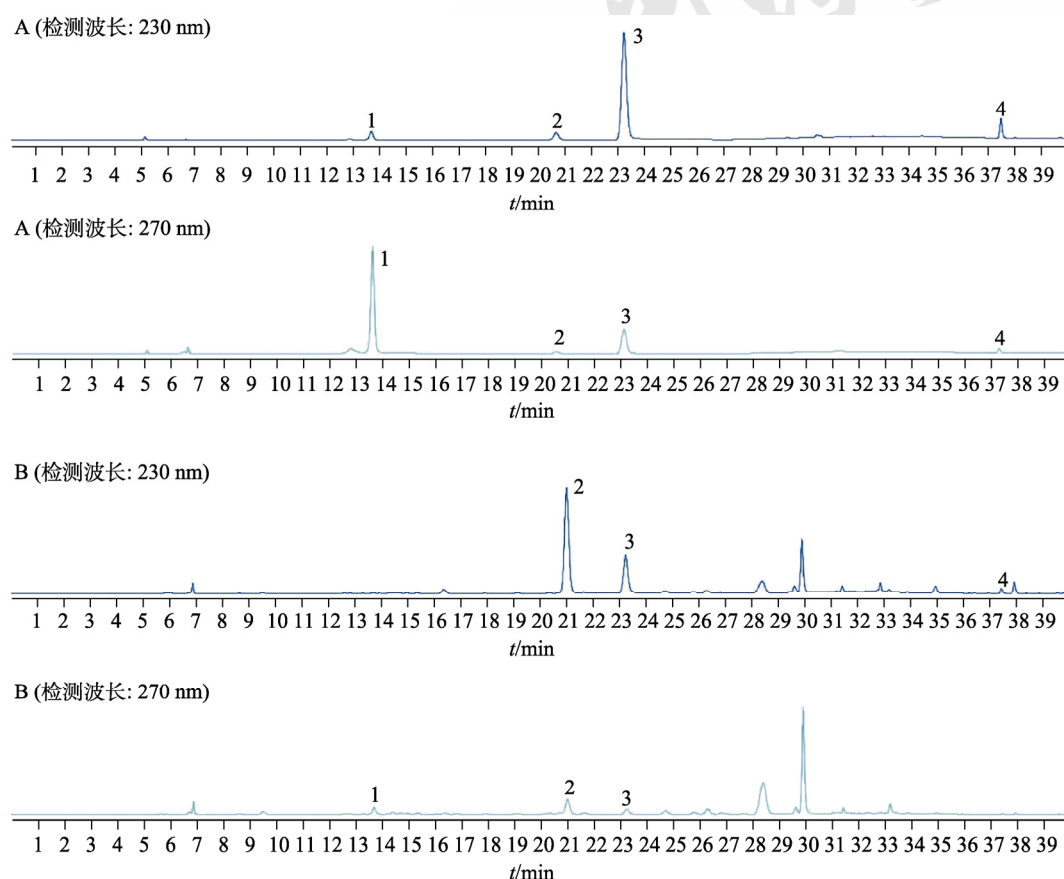


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液(230 nm 和 270 nm); B-供试品溶液(230 nm 和 270 nm); 1-氧化芍药苷; 2-芍药内酯苷; 3-芍药苷; 4-苯甲酰芍药苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standard solution(230 nm and 270 nm); B-sample solution(230 nm and 270 nm); 1-oxypaeoniflorin; 2-albiflorin; 3-paeoniflorin; 4-benzoylpaeoniflorin.

基因。按照 SuperReal 荧光定量预混试剂增强版试剂盒进行, 反应体系: $2\times$ SuperReal PreMix Plus $10\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物 $0.6\ \mu\text{L}$, cDNA 模板 $2\ \mu\text{L}$, $50\times$ ROX Reference Dye $2\ \mu\text{L}$, RNase-Free ddH₂O $4.8\ \mu\text{L}$, 共 $20\ \mu\text{L}$ 。所有反应均做 3 个复孔。反应程序: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $15\ \text{min}$; $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $10\ \text{s}$, $61\ ^\circ\text{C}$ 退火 $20\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $30\ \text{s}$, 共 45 个循环。目的基因引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of target genes

目的基因	序列(5'→3')
<i>ACCT</i>	F-ACCTGTCAGCACAGAGTATCCAGTTG R-TGTCCGAGTCGAGAGCCCTTTC
<i>HMGR2</i>	F-CCACATCTCAGTTACCATGCCTTCC R-ACCTTTACACCCAGCAAGTTCAG
<i>HMGR7</i>	F-CGTTGCCATAGTTGCCTTTGTAGC R-CGTGTGGAGTGCCGAGAATGAG
<i>IDI</i>	F-ATGTGCATCCAAACCCAGACGAAG R-TGTCCACAACCAATCTGAACCAAGG
<i>DXR</i>	F-AACTTTGCCTCGCCTAGACCTTTG R-GAACCCAGTCATAGTCCCTCCAG
<i>DXS2</i>	F-AGGAAGGGTGCTAAAGGAGGGAAG R-AGCCACGGTTATTGAGATGCCAAG
<i>CYP71A1</i>	F-TTGCTCCTCGTGAATCAACTGC R-TCTCTCTGGGATGAACTCCAAGGG
<i>UGT73C3</i>	F-GGTACTCCAGGTCTCCGATGC R-TTTGCGAGATGGGCTTCAAGGTC
<i>Pl-actin</i>	F-TTGTGCTGGATTCTGGTGATGGTG R-AGACGGAGGATAGCGTGAGGAAG

2.4 统计学分析

选用相对定量法, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因表达量^[20]。对单萜苷成分含量及其生物合成相关基因表达量进行单因素方差分析。应用 R 语言对各单萜苷生物合成相关基因表达量进行 Pearson 相关性分析, 并用 Cytospace 构建可视化网络图。

3 结果与分析

3.1 单萜苷成分在根、叶、花、果中的器官特异性积累规律分析

HPLC 检测白芍根、叶、花、果中的 4 种单萜苷成分的含量, 结果见图 2。白芍内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷在根、叶、花、果中均有分布, 而氧化芍药苷仅见于根和花。芍药苷和苯甲酰芍药苷在根中含量最高, 氧化芍药苷和白芍内酯苷在花中含量最高。表明 4 种单萜苷类化合物在白芍植株中存在器官偏好性。

3.2 根中不同组织单萜苷成分的时空特异性积累规律分析

由“3.1”可知, 根为 4 种单萜苷成分的主要分布器官, 白芍的主要药用部位为去除根皮和须根后的主根。为进一步了解白芍根中单萜苷成分的时空分布情况, 取不同时期根的根皮、木质部、韧

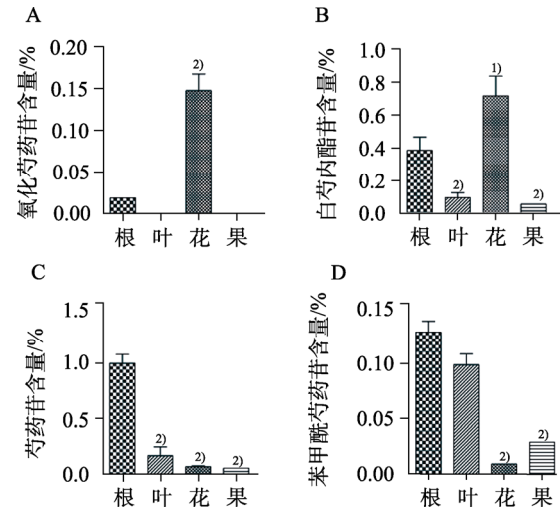


图 2 单萜苷成分在根、叶、花、果中的器官特异性分布 A-氧化芍药苷; B-芍药内酯苷; C-芍药苷; D-苯甲酰芍药苷; 与根比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Organ-specific distribution of monoterpene glycosides in roots, leaves, flowers and fruits

A-oxypaeoniflorin; B-albiflorin; C-paeoniflorin; D-benzoylpaeoniflorin; Compared with root group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

皮部和须根, 分别检测单萜苷成分含量。氧化芍药苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷主要分布于木质部中, 白芍内酯苷主要在韧皮部和须根, 见图 3。4 种单萜苷成分在花期和果期含量均较低, 在黄桔期中最高, 展叶期次之。这可能是因为花期和果期植株较多的生长物质和能量用于生殖生长, 不利于次生代谢产物在根中的表达和积累; 进入黄桔期后, 整个植株地上部分枯萎后次生代谢产物的合成、代谢和累积均集中在根部。因此, 生产上通常会在花期进行摘蕾打顶及在黄桔期对白芍进行采收, 以提高药材中的单萜苷成分含量。

3.3 单萜苷生物合成基因的时空特异性表达规律分析

3.3.1 根、叶、花、果中单萜苷生物合成基因的器官特异性表达 以根中各基因表达量为参照绘制聚类热图, 清晰地展现了白芍中单萜苷生物合成关键酶基因表达量的器官差异, 4 个器官可分为 3 支, 见图 4A。基因 *DXS2*、*HMGR7* 和 *IDI* 器官表达差异明显, 可能是造成白芍不同器官中单萜苷含量差异的重要原因之一。同时对 8 个关键酶基因表达量之间进行 Pearson 相关性分析, 发现 *CYP71A1* 与 *DXR*、*HMGR7* 与 *UGT73C3*、*HMGR7* 与 *DXR*、*CYP71A1* 与 *HMGR2*、*ACCT* 与 *HMGR7*、*ACCT* 与 *DXS2*、*ACCT* 与 *UGT73C3*、*DXR* 与 *UGT73C3*、*HMGR7* 与 *DXS2* 基因之间呈显著正相

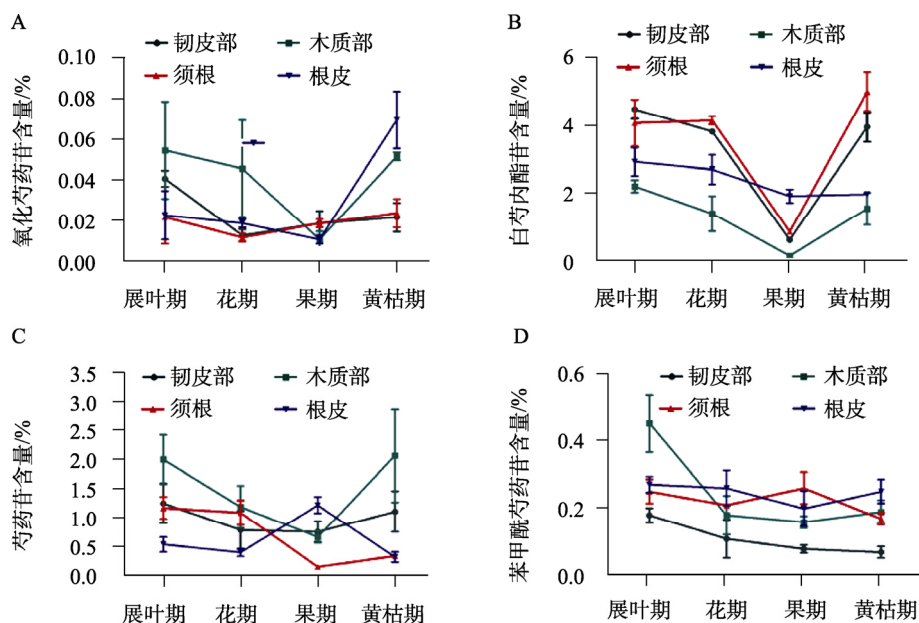


图3 不同时期白芍根中各部位单萜苷类成分含量比较

A-氧化芍药苷; B-芍药内酯苷; C-芍药苷; D-苯甲酰芍药苷。

Fig. 3 Comparison of contents of monoterpene glycosides in different tissues of *P. lactiflora* root at different stages

A-oxypaeoniflorin; B-albiflorin; C-paeoniflorin; D-benzoylpaeoniflorin.

关($R>0.6$), 表明这些基因的表达可能会相互影响、协同调控单萜苷的合成, 见图 4B。进一步研究发现, *HMGR7*、*ACCT*、*DXR*、*UGT73C3* 等基因在上述多个两两关系对中出现, 表明上述基因之间具有紧密相关作用, 可能是调控白芍单萜苷合成的关键基因。

3.3.2 根中不同部位单萜苷生物合成相关基因时空表达分析 为了阐明根中不同部位各生物合成基因的时空表达情况, 绘制聚类热图, 见图 5A。由图可知, 除了在果期仅 *HMGR2* 和 *HMGR7* 的表

达量高于其他基因外, 其余 3 个时期 *HMGR2*、*HMGR7* 和 *IDI* 在根中不同部位的表达量均高于其他基因, 聚为一类。说明上述基因在各时期根中各部位均为高表达, 提示其与根中单萜苷类成分的高累积具有紧密关系, 其所在的 MVA 萜类骨架生物合成途径应是白芍根中合成单萜苷类成分的主要途径。

将根中各部位单萜苷生物合成基因在不同生长时期表达量制成折线图, 观察其表达变化趋势, 结果见图 5B。 *ACCT*、*DXR* 和 *IDI* 基因在根中各

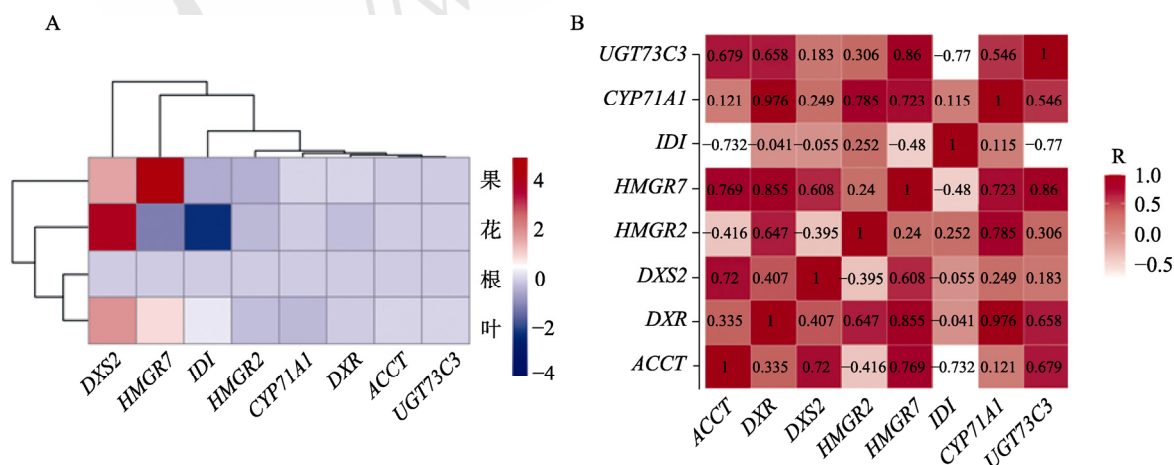


图4 根、叶、花、果4个器官中单萜苷生物合成基因表达比较分析

A-单萜苷生物合成基因表达热图; B-各基因间相关性分析热图; R-相关系数。

Fig. 4 Comparative analysis of gene expression of monoterpene glycosides biosynthesis in root, leaf, flower and fruit

A-heatmap of monoterpene glycoside biosynthesis gene expression; B-heatmap of correlation analysis between genes; R-correlation coefficient.

部位的变化趋势与 *UGT73C3* 基因在须根、根皮和木质部中的表达趋势一致，均在花期略微下降，果期上升后，黄枯期又略微下降。根各部位中 *DXR* 和 *IDI* 基因的表达规律一致，均为花期略微下降后，果期和黄枯期逐渐上升。*HMGR7* 基因在根皮、韧皮部和木质部中的表达趋势一致，均为展叶期最高，花期降至最低，果期上升后，黄枯期再次

降低；而 *HMGR2* 在须根、根皮和木质部中的表达趋势则和 *HMGR7* 则相反，表明 *HMGR2* 和 *HMGR7* 2 个基因的功能可能存在差异。*CYP71A1* 基因在须根中的趋势与在木质部和韧皮部中相反，为先上升至果期达到最高点后又下降。*DXS2* 基因在须根和韧皮部中的表达趋势相类似，而根皮和木质部的表达趋势则与之相反。

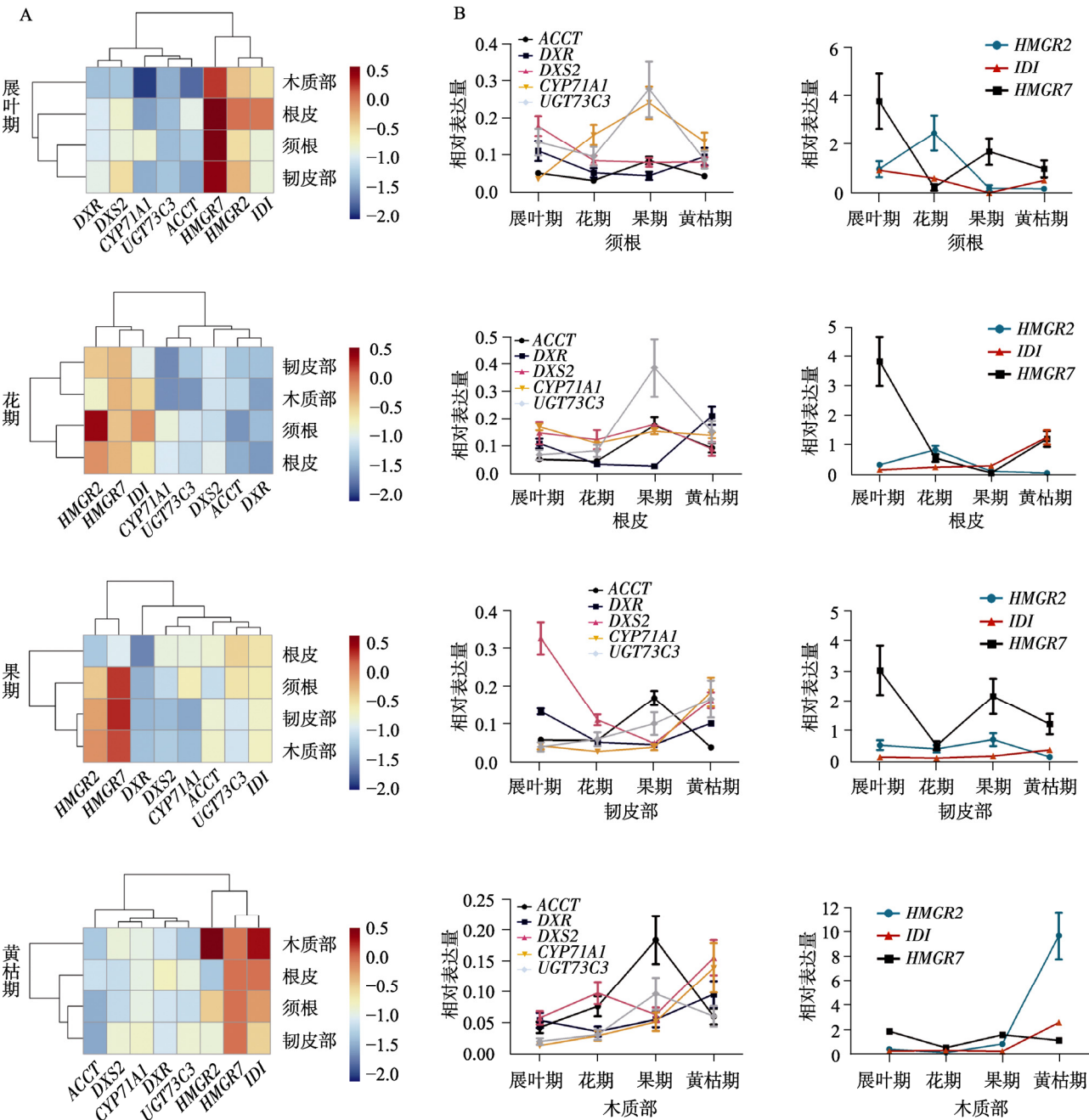


图 5 不同时期白芍根各部位单萜苷生物合成基因表达分析
A-聚类热图；B-折线图。

Fig. 5 Expression analysis of monoterpene glycosides biosynthesis genes in different tissues of *P. lactiflora* root at different stages

A-hierarchical clustering heatmap; B-line chart.

3.4 白芍单萜苷含量与生物合成基因表达量相关性分析

对根、叶、花、果 4 个器官以及根中 4 个部位的白芍单萜苷含量与关键酶基因表达量分别进行相关性聚类分析, 结果见图 6A 和 6C。由图 6A 可见, 芍药苷和苯甲酰芍药苷聚为一类, 白芍内酯苷和氧化芍药苷聚为一类, 说明芍药苷和苯甲酰芍药苷、白芍内酯苷和氧化芍药苷的生物合成模式分别相似。关键酶基因也分为 2 类, *HMGR2*、*ACCT*、*IDI* 和 *UGT73C3* 聚为一类, 与芍药苷、苯甲酰芍药苷的合成呈高度正相关($R>0.60$), 提示上述基因协调共同促进芍药苷和苯甲酰芍药苷的生物合成。其余 4 个基因聚为另一类, 其中 *CYP71A1* 作为单萜苷生物合成下游的酶基因, 与 4 种单萜苷均呈负相关或不相关。可能是因为该基因功能为单萜苷的氧化, 处于单萜苷的后修饰或者降解阶段^[21]。

图 6A 中还可可见 *DXR* 与 *DXS2* 基因与 4 种单

萜苷中的大多数呈负相关, 说明 DXP/MEP 途径并不是白芍中合成萜类骨架的主要途径, 从反面证明了“3.3.2”项下 MVA 途径为合成萜类骨架的主要途径这一结果。此外, *HMGR7* 基因表达量与白芍内酯苷和氧化芍药苷含量高度负相关, 这一现象与 *HMGR2* 基因的表达模式刚好相反, 提示 *HMGR2* 和 *HMGR7* 虽然属于同一基因家族, 但其功能并不相同。这一结果也与“3.3.2”项下所得结果相一致。

根中 4 个部位的单萜苷含量与关键酶基因表达量相关性聚类分析结果则与根、叶、花、果 4 个器官的分析结果略有不同, 结果见图 6C。具体表现为芍药苷和氧化芍药苷的表达模式比较接近, 聚为一类; 其余 2 个单萜苷分别单独聚为一类。*CYP71A1*、*ACCT* 和 *UGT73C3* 聚为一类, 与 4 种单萜苷含量基本呈负相关; 其余基因聚为一类, 与单萜苷含量基本呈正相关。

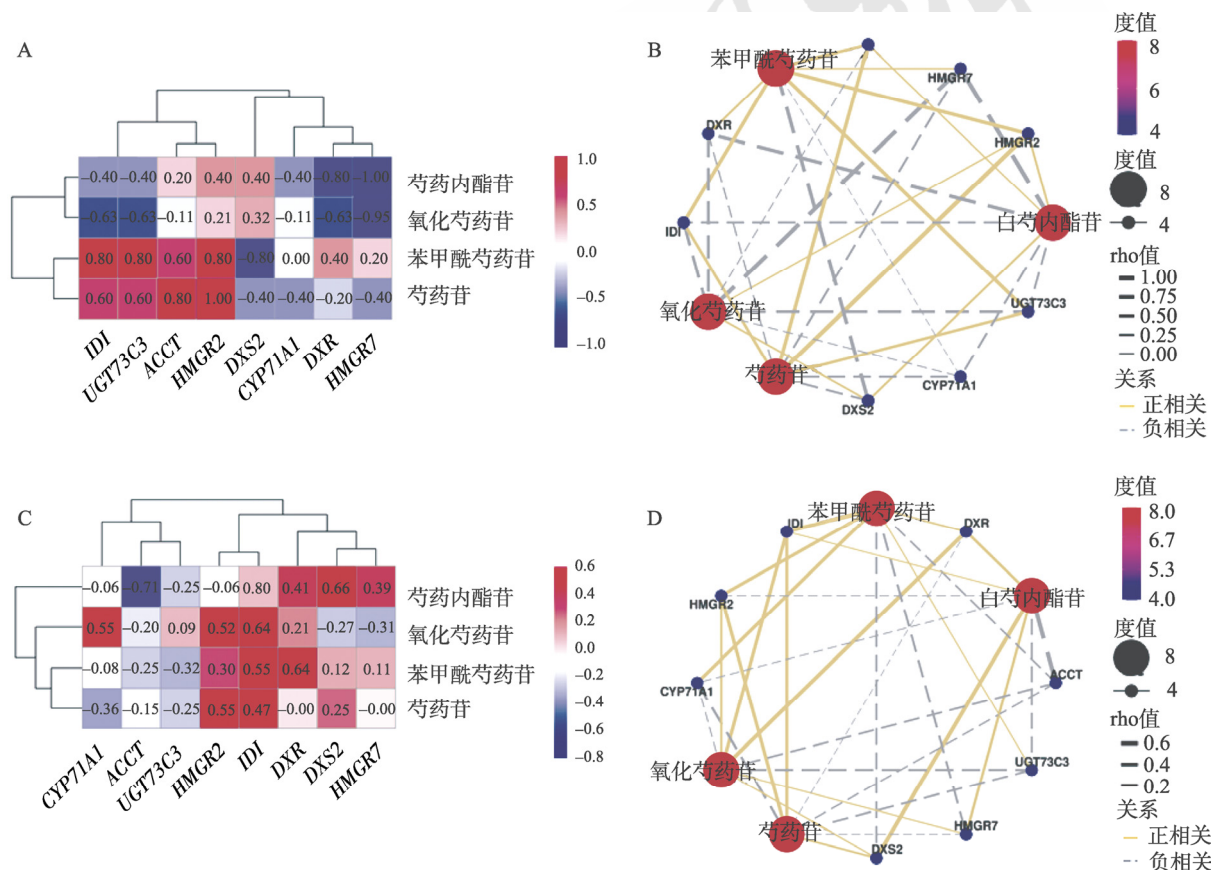


图 6 白芍单萜苷含量与生物合成基因表达相关性分析

A、C—相关性聚类热图；B、D—相关性网络图。红色的圆形节点表示单萜苷成分，蓝色的圆形节点表示基因，边表示节点之间的相关性，每条边的宽度表示相关系数的大小。黄色实线的边表示基因与化合物之间正相关，灰色虚线的边表示基因与化合物之间呈负相关。

Fig. 6 Correlation analysis of monoterpene glycosides contents and related-biosynthesis gene expression in *P. lactiflora*

A, C—hierarchical clustering heatmap; B, D—correlation network diagram. The red circular nodes represent monoterpene glycosides, the blue circular nodes represent genes, the edges represent the correlation between nodes, and the width of each edge represents the magnitude of the correlation coefficient. The edges of the solid yellow line indicate a positive correlation between the gene and the compound, and the edges of the dashed gray line indicate a negative correlation between the gene and the compound.

应用 Cytospace 3.5 软件构建了白芍单萜苷含量与其生物合成基因相关性分析的可视化网络图,结果见图 6B 和图 6D。重点关注与 4 个单萜苷呈密切正相关的基因,在根、叶、花、果 4 个器官中,未见与白芍内酯苷和氧化芍药苷高度正相关的基因;与芍药苷和苯甲酰芍药苷最相关的是萜类骨架生物合成 MVA 途径中的 *ACCT*、*HMGR2* 基因,催化萜类第一阶段产物 IPP 和 DMAPP 形成活化异戊二烯单元的 *IDI* 基因,以及连接萜类和糖形成糖苷键的 *UGT73C3* 基因。在根 4 个部位中,与芍药苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷最相关的是 *HMGR2* 和 *IDI* 基因,与白芍内酯苷最相关的是萜类骨架合成 MEP/DXP 途径中的 *DXS2*、*DXR* 基因和 MEP 途径中的 *HMGR7* 基因。综上所述,*HMGR2* 和 *IDI* 基因与芍药苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷含量呈高度正相关。

4 讨论

对白芍不同器官单萜苷成分含量进行测定后,发现单萜苷在根中高度积累,且不同单萜苷在根中的主要分布部位不尽相同,这意味着萜类生物合成途径中的某些基因可能在根中高表达,也可能在其他器官中合成并运输到根中积累。单萜苷含量及其生物合成相关基因表达量的相关性分析结果也证明了两之间具有一定的相关性,相关系数分别在-1~1, -0.71~0.66,表明可能存在转运等其他因素的影响。单萜苷的器官特异性积累模式有助于探索单萜苷生物合成和转运的分子机制。目前,作为次生代谢产物生物合成的重要补充,大量研究表明植物积累过程中存在一种基于转运蛋白的转运机制^[22-24]。由于负责芍药苷等单萜苷的转运蛋白及其转运机制尚不清晰,因此本研究仅从单萜类成分生物合成相关基因的表达高低探究与单萜苷含量的关系。对单萜类化合物的特异性转运蛋白的鉴定和转运机制的研究将在今后工作中进一步开展。

4 个器官以及根中 4 个部位的相关性分析结果存在差异,分析原因可能在于对根中 4 个部位的单萜苷含量和生物合成关键酶基因进行相关性分析时,包含了不同生长期单萜苷类和关键酶基因的变化,即除了空间差异还包括了时间差异,而在根、叶、花、果 4 个器官中则只有空间差异。此外,单萜苷的时空分布除了与关键酶生物合成相关外,不同组织之间的转运也是重要的影响因

素。单萜苷类成分的中间体可能在其他多个部位合成后转运到根部进行下一阶段的合成,或可能其他部位完成全部合成后转运,或可能需要多个组织部位共同合作才能完成全过程的生物合成。尽管转运过程中相关酶、基因、调控因子以及具体生物学过程有待进一步研究和确认,但其他次生代谢产物的合成研究也验证了上述假设的可能性,如:黄连素可在黄连的根组织中生物合成,然后转移到根状茎并被细胞质膜定位的 *CjMDR1* 摄取并累积在根状茎中^[25]。

结果中还可可见各单萜苷成分与同一关键酶基因的相关系数存在较大的差异。这可能是由于 4 种单萜苷成分都具有共同的母核结构,各成分间虽然具有一定的组织偏好性,但彼此可相互转化,从而造成这种差异。如芍药内酯苷的 C=O 双键断裂,经环化反应形成芍药苷;而芍药苷其中 1 个 C=O 键断裂,经内酯化形成芍药内酯苷。结果中还可可见部分基因与单萜苷成分负相关,究其原因主要在于部分关键酶基因如 *CYP71A1*、*HMGR7* 和 *UGT73C3* 的选择主要根据前期的比较转录组测序和功能注释结果,是否为真正的白芍单萜苷生物合成基因有待进一步的功能验证。

综上所述,4 种单萜苷的器官和组织分布特征为芍药苷和苯甲酰芍药苷主要分布于根中,而氧化芍药苷、白芍内酯苷主要分布于花中;氧化芍药苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷主要分布于木质部中,白芍内酯苷主要在韧皮部和须根。4 种单萜苷成分在花期和果期时的根中含量均较低,在黄枯期时最高,展叶期次之。单萜苷含量与其关键酶基因表达量相关性分析结果表明,*HMGR2* 和 *IDI* 基因与芍药苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷的含量呈高度正相关。白芍单萜苷及其生物合成相关基因存在时空特异表达模式,MVA 途径是白芍单萜苷骨架合成的主要途径。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 108-109.
- [2] WU L, WANG L L, FEI W T, et al. Analgesic effect of paeoniflorin and albiflorin on acetic acid induced writhing mice and the expression of β -EP and PGE₂[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2018, 33(3): 915-918.
- [3] WANG Q, LI L T, MA Y B, et al. Comparative study on chemical composition and pharmacological action of Radix paeoniae alba and Radix paeoniae rubra and predictive analysis of quality markers[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂

- 志), 2021, 30(12): 1093-1098.
- [4] FAN G H, ZHU T Y, WANG R, et al. Oxypaeoniflorin prevents acute lung injury induced by lipopolysaccharide through the PTEN/AKT pathway in a Sirt1-dependent manner[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021(2021): 6878026.
 - [5] WEI S Z, MA X, NIU M, et al. Mechanism of paeoniflorin in the treatment of bile duct ligation-induced cholestatic liver injury using integrated metabolomics and network pharmacology[J]. *Front Pharmacol*, 2020(11): 586806.
 - [6] LI C, HUANG B S, ZHANG Y W. Chinese herbal medicine for the treatment of depression: Effects on the neuroendocrine-immune network[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(1): 65.
 - [7] LI Q L, HU S Q, HUANG L C, et al. Evaluating the therapeutic mechanisms of selected active compounds in *Cornus officinalis* and *Paeonia lactiflora* in rheumatoid arthritis via network pharmacology analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 648037.
 - [8] LU B W, AN F X, CAO L J, et al. Comparative transcriptomics characterized the distinct biosynthetic abilities of terpenoid and paeoniflorin biosynthesis in herbaceous peony strains[J]. *PeerJ*, 2020(8): e8895.
 - [9] LIANG W, LIN Q, WANG B, et al. Quality comparison of *Paeoniae Radix Alba* from genuine producing areas and non-genuine producing areas[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2020, 37(24): 3000-3003.
 - [10] SHEN M L, ZHANG Q Y, QIN L P, et al. Single standard substance for the simultaneous determination of eleven components in the extract of *Paeoniae Radix Alba* (root of *Paeonia lactiflora* Pall.)[J]. *J Anal Methods Chem*, 2021(2021): 8860776.
 - [11] CORDOBA E, SALMI M, LEÓN P. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants[J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(10): 2933-2943.
 - [12] HUNTER W N. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(30): 21573-21577.
 - [13] MIETTINEN K, IÑIGO S, KREFT L, et al. The TriForC database: A comprehensive up-to-date resource of plant triterpene biosynthesis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D586-D594.
 - [14] GHOSH S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes[J]. *Front Plant Sci*, 2017(8): 1886.
 - [15] MEECH R, HU D G, MCKINNON R A, et al. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily: New members, new functions, and novel paradigms[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1153-1222.
 - [16] XU P, LI Q, LIANG W, et al. A tissue-specific profile of miRNAs and their targets related to paeoniaflorin and monoterpenoids biosynthesis in *Paeonia lactiflora* Pall by transcriptome smallRNA and degradome sequencing[J]. *PlosOne*, 2023, 18(1): e0279992.
 - [17] MENG Y J, YU D L, XUE J, et al. A transcriptome-wide, organ-specific regulatory map of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 18864.
 - [18] MAO J P, HUANG L W, CHEN M Y, et al. Integrated analysis of the transcriptome and metabolome reveals genes involved in terpenoid and flavonoid biosynthesis in the loblolly pine (*Pinus taeda* L.)[J]. *Front Plant Sci*, 2021(12): 729161.
 - [19] WU Z, WU Y, WANG L, et al. Effect of different drying methods on six chemical components of *Paeoniae Radix Alba* [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2016, 28(11): 1764-1770.
 - [20] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
 - [21] WEITZEL C, SIMONSEN H T. Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono- and sesquiterpenes[J]. *Phytochem Rev*, 2015, 14(1): 7-24.
 - [22] ZHAO Y C, LIU T T, LUO J, et al. Integration of a decrescent transcriptome and metabolomics dataset of *Peucedanum praeruptorum* to investigate the CYP450 and MDR genes involved in coumarins biosynthesis and transport[J]. *Front Plant Sci*, 2015(6): 996.
 - [23] LANE T S, REMPE C S, DAVITT J, et al. Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology[J]. *BMC Biotechnol*, 2016, 16(1): 47.
 - [24] MARTINOIA E. Vacuolar transporters-companions on a longtime journey[J]. *Plant Physiol*, 2018, 176(2): 1384-1407.
 - [25] LU S F. *Quality Biology of Medicinal Plants*[M]. Beijing: Science Press, 2019.

收稿日期: 2022-03-29

(本文责编: 沈倩)