



珠子参中 *HMGR* 基因对皂苷生物合成的影响

刘美佳, 于怡琳, 姜 森, 张 翔, 葛 锋*, 刘迪秋

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 昆明 650500)

摘 要: 该研究以珠子参愈伤组织为材料, 通过同源克隆方法获得了珠子参 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (*HMGR*) 基因 (*PjHMGR*, 登录号: MG712296) 的 cDNA 序列, 并对其进行生物信息学分析。基于 *PjHMGR* 序列构建了珠子参过表达载体 pCambia2300s-*PjHMGR*, 通过根瘤农杆菌转化法将其转化到珠子参细胞中, 成功获得 7 株阳性转 *PjHMGR* 基因细胞系; 通过实时荧光定量 PCR、比色法及皂化法等技术测定阳性细胞系 *PjHMGR* 基因的相对表达量、*HMGR* 酶活、皂苷和植物甾醇含量变化。结果显示: (1) 与野生型珠子参细胞系相比, 转 *PjHMGR* 基因珠子参阳性细胞系中, *PjHMGR* 基因的相对表达量、*HMGR* 酶活和皂苷含量均有不同程度的提高; 在效果最好的阳性细胞中, *PjHMGR* 基因的相对表达量、*HMGR* 酶活和皂苷含量分别为对照的 7.15、6.14 和 3.50 倍。(2) 在研究过程中, 发现转基因细胞系的植物甾醇含量也有所升高。研究认为, 将珠子参关键酶基因 *PjHMGR* 过表达载体导入珠子参愈伤组织细胞中, 可引起相关关键酶基因相对表达量和 *PjHMGR* 酶活性的增加, 从而调控珠子参总皂苷的合成, 对皂苷合成途径中关键酶基因进行调控将可能实现对皂苷生物合成的调节。

关键词: 珠子参; *HMGR*; 皂苷; 三萜; 过表达

中图分类号: Q785; Q786; Q942.6

文献标志码: A

Effect of *HMGR* Gene on the Biosynthesis of Saponins in *Panax japonicus*

LIU Meijia, YU Yilin, JIANG Sen, ZHANG Xiang, GE Feng*, LIU Diqu

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: The cDNA sequence of *PjHMGR* was cloned from *Panax japonicus* callus and bioinformatics analysis of it was conducted in the study. Overexpression vector pCambia2300s-*PjHMGR* was constructed and then transferred into the *P. japonicus* callus to obtain the transgenic cell lines successfully by the method of *Agrobacterium tumefaciens* transformation. The relative expression level of *PjHMGR*, the enzyme activity of *PjHMGR*, the contents of PJS and phytosterols in transgenic cell lines were determined by the fluorescence quantitative PCR, colorimetric method and saponification. The results showed that: (1) all of them in *PjHMGR* transgenic cells achieved enhancements to some extent compared with the control. Especially, the expression level of *PjHMGR*, the enzyme activity and PJS content of the best-performing positive cell line were 7.15 times, 6.14 times and 3.50 times of those in control, respectively. Meanwhile, the content of phytosterol in transgenic cell lines was also found to be enhanced. (2) The study considers that if the key enzyme genes (For example: the over-expressing vector of *PjHMGR* in the biosynthesis pathway, was transformed into *Panax japonicus* callus, which will increase the relative expression level of the key enzyme genes and the activity of the *PjHMGR* enzyme, thereby regulating the synthesis of the total saponins of *Panax japonicus*.) take part in the biosynthesis of saponin were regulated. The regulation

收稿日期: 2017-12-23; 修改稿收到日期: 2018-03-23

基金项目: 国家自然科学基金 (81560616)

作者简介: 刘美佳 (1991—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事现代分子生物学及基因工程研究。E-mail: 1003320190@qq.com

* 通信作者: 葛 锋, 博士, 教授, 主要从事药用植物和微生物的代谢工程研究。E-mail: panaxcordyceps@163.com

of the synthetic pathway of saponin will be realized.

Key words: *Panax japonicus*; HMGR; saponin; triterpenoid; overexpression

珠子参(*Panax japonicus*)为五加科(Araliaceae)人参属(*Panax*)植物,因根茎节间纤细,节膨大成球形念珠状而得名,其根茎入药。珠子参作为药材,始载于《滇南本草》,为历版《中国药典》收载品种。药用珠子参主产于云南,属名贵常用中药材,是彝族、纳西族、白族、藏族、傈族等少数民族的传统用药。珠子参性味苦、甘、微寒,归肝、肺、胃经,具有补肺养阴、祛瘀止痛、止血之功效,临床上应用于气阴两虚、烦热口渴、虚癆咳嗽、跌打损伤、关节疼痛、咳血、吐血、外伤出血等症状^[1-2]。

珠子参皂苷(*Panax japonicus* saponins)为珠子参的主要活性成分,主要由达玛烷型三萜皂苷和齐墩果烷型三萜皂苷构成。目前,已从珠子参根茎叶中分离出 40 多种皂苷成分,主要包括竹节参皂苷 IVa、IV 和 V,人参皂苷 R0、Re、Rd 和 Rb1 等^[3-5]。与珠子参同为人参属的人参(*Panax ginseng*)主要含达玛烷型皂苷,齐墩果烷型皂苷仅发现含量极微的人参皂苷 R0;而三七(*Panax notoginseng*)只含达玛烷型皂苷,不含齐墩果烷型皂苷^[6-7]。珠子参所含皂苷组分与同属人参、三七相比,在成分种类以及各组分含量上均存在明显差异,因其含有大量齐墩果烷型皂苷,导致临床上的用途比较特殊^[8]。现代药理学研究表明,珠子参皂苷具有抗炎镇痛、改善心肌缺血、增加脑血流量、抗肿瘤、免疫调节以及治疗白细胞减少症等功效^[9-10]。

药用植物三萜类皂苷主要由甲羟戊酸(MVA)途径合成,因此珠子参皂苷也通过 MVA 途径合成^[11-12]。近年来,与珠子参亲缘关系较近的人参、三七皂苷合成途径研究已取得重要进展,皂苷生物合成的上游、中游路径基本清楚,下游的皂苷骨架后修饰过程也在逐步获得解析^[13]。通过 MVA 途径合成珠子参皂苷的过程如下:首先,两分子乙酰辅酶 A(acetyl-coA)经过硫解反应缩合生成乙酰乙酰辅酶 A(acetoacetyl-coA),此反应需在乙酰辅酶 A 酰基转移酶(acetyl-coA acyltransferase, AACT)的催化下完成(其中乙酰乙酰辅酶 A 是由一分子乙酰辅酶 A 脱去一个乙酰跟另一分子乙酰辅酶 A 乙酰基结合从而生成的物质)。乙酰乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 及羟甲酰戊二酰辅酶 A 合成酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase, HMGS)的作用下合成 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)。

HMG-CoA 在关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)的催化作用下合成了甲羟戊酸(MVA),珠子参皂苷的合成正式进入到 MVA 途径, HMGR 也因此成为 MVA 途径的首个关键酶^[14]。随后,经过异戊烯基焦磷酸(IPP)、鲨烯合成酶(SS)、鲨烯环氧酶(SE)和法呢基焦磷酸(FPS)等一系列催化反应,生成 2, 3-氧化鲨烯,它是三萜皂苷及植物甾醇等的共同前体物质。2, 3-氧化鲨烯由达玛烯二醇合酶(DS)催化进入达玛烷型皂苷合成支路,同时,经由 β -香树脂合成酶(AS)催化,进入齐墩果烷型皂苷合成支路(图 1)。

近年来,对于珠子参皂苷的研究多集中于有益于人类健康及疾病防治的药理学领域,而珠子参皂苷生物合成途径相关基因的调控研究较少。已有研究表明 HMGR 是甲羟戊酸途径的第一个关键酶,通过调控 HMGR 基因的表达影响盾叶薯蓣皂苷的生物合成^[15];此外, Tansakul 等^[16]研究表明过表达人参皂苷合成途径中关键酶基因会导致人参皂苷积累量的变化。由于珠子参与人参、三七同属,因此对珠子参皂苷生物合成中关键酶基因进行调控也可能会影响皂苷的合成。本研究选取珠子参皂苷生物合成途径中关键酶基因 *PjHMGR* 为研究对象,在珠子参细胞中过表达该基因,明确 *PjHMGR* 的功能及其在皂苷合成过程中的地位,为获得高效、稳定的珠子参皂苷合成调控技术提供理论参考和依据。

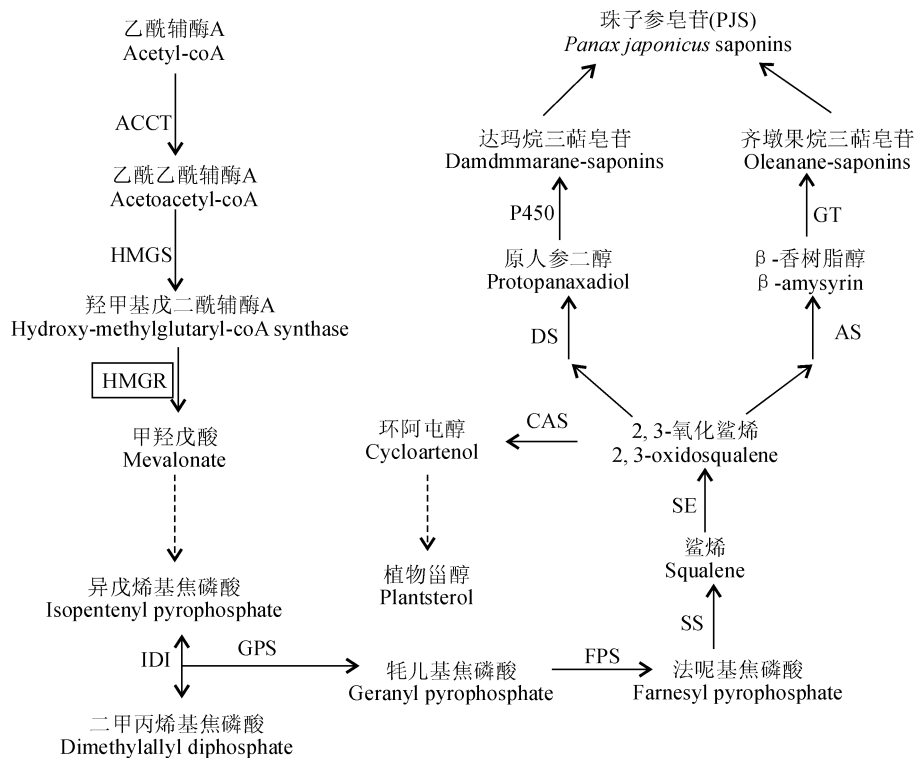
1 材料和方法

1.1 实验材料

珠子参药材来源于云南省玉龙县珠子参大棚,经云南大学虞泓教授鉴定为珠子参(*Panax japonicus*),本研究所用珠子参材料是本实验室诱导并培养的珠子参愈伤组织。研究所用农杆菌感受态细胞 EHA105、大肠杆菌感受态细胞 Trans 1-T1 和植物过表达载体 pCambia2300s 均由本实验室保存;克隆载体 pGEM-T 和 M-MVL 逆转录试剂盒均购买于 Promega 公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 珠子参 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 采用两步法提取珠子参总 RNA。首先通过改良的异硫氰酸胍法进行初提,随后通过酚和氯仿抽提以及



HMGR. 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶;FPS. 法呢基焦磷酸;SS. 鲨烯合成酶;SE. 鲨烯环氧化物;DS. 达玛烯二醇合成酶;
AS. 香树脂合成酶;CAS. 环阿屯醇合成酶;GT. 葡萄糖基转移酶;P450. 细胞色素P450

图1 珠子参皂苷及植物甾醇生物合成途径

HMGR. 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase; FPS. Farnesylpyrophosphate synthase; AS. Amysyrin synthase;
SS. Squalene synthase; SE. Squalene epoxidase; DS. Dammarenediol-II synthase; CAS. Cycloartenol synthase;
GT. Glucosyl transferase; P450. Cytochromes P450

Fig. 1 The synthesis pathway of *P. japonicus* saponins and plant sterols

DNA 酶消化处理纯化后,获得纯度较好的珠子参总 RNA^[17]。cDNA 第一链的合成利用 M-MVL 逆转录试剂盒完成,将获得的 cDNA 置于-20℃条件下保存备用。

1.2.2 *PjHMGR* 基因克隆 本研究首先根据 NCBI 公布的人参 *HMGR* 基因 (AGV26444.1) 设计特异性引物,以珠子参细胞 RNA 逆转录形成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增与测序,初步获得了珠子参 *HMGR* 基因序列。以获得的珠子参 *HMGR* 基因序列 ORF 为模板,设计特异引物 *PjHMGR*-*Bam*H I-F (5'-CGCGGATCCCACCGAATCCTC-CCACTAC-3') 和 *PjHMGR*-*Kpn*I-R (5'-CGGGG-TACCTGACATATCCCGGCTTGAC-3'), 再次 PCR 扩增及测序确认。克隆体系为: cDNA 模板 5.0 μL, 10× Buffer 5.0 μL, Ex taq 酶 0.5 μL, dNTPs 4.0 μL, 10 μmol/L 上下游引物 0.5 μL, Nuclease-free water (无核酸酶的水) 34.5 μL, 总体系为 50.0 μL。反应程序为 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 32 个循环; 结束

后 72℃ 延伸 7 min。利用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒,对所得目的基因片段进行提取与纯化,并与克隆载体 pGEM-T 连接,筛选阳性菌株并测序,最终获得了珠子参生物合成途径中关键酶基因 *PjHMGR* 的 cDNA 序列。菌液测序和引物合成均由上海生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.3 *PjHMGR* 基因过表达载体构建和阳性细胞系抗性初筛 通过 *Bam*H I 和 *Kpn*I 限制性内切酶构建过表达重组载体 pCAMBIA2300s-*PjHMGR*。通过热激转化法将重组载体转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,筛选阳性菌株。通过液氮冻融法将上述阳性菌种质粒转入 EHA105 农杆菌感受态细胞中,将上述农杆菌侵染普通的珠子参细胞获得 *PjHMGR* 转基因珠子参阳性株系。

提取生长状态良好的 *PjHMGR* 转基因珠子参阳性系基因组 DNA,以卡那霉素抗性基因 *npt* II 目的条带为模板,设计特异引物 *npt* II-F (5'-CTCT-GATGCCGCGGTGTT-3') 和 *npt* II-R (5'-CCCT-GATGCTCTTCGTCCA-3')。PCR 检测体系为:

DNA 模板 1.5 μL , $10\times$ Easy Taq Buffer 2.0 μL , dNTPs 1.5 μL , DNA Polymerase 5.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物 0.2 μL , Nuclease-free water 14.5 μL , 总体积为 20.0 μL 。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 32 个循环; 结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 反应的产物通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 转基因珠子参细胞系荧光定量分析和 HMGR 酶活测定 *PjHMGR* 基因表达水平通过荧光定量 PCR 检测。转基因珠子参阳性株系 RNA 提取和纯化与 1.2.1 方法一致。荧光定量和内参的特异性引物为 18s rRNA-F(5'-AACCATAAACGAT-GCCGACCAG -3'), 18s rRNA -F(5'-TTCAGCCTT-GCGACCATACTCC -3'), *qHMGR*-F(5'-TCCACAGC-CTACTGATGAT -3') 和 *qHMGR*-R(5'-GGGCAAACTAATGAGAACTAC -3')。整个反应通过 GoTaq[®] 2-Step RT-qPCR System (Promega, USA) 完成, 具体程序设置为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火反应 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 45 个循环; 结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 9 min。

通过改良的紫外分光光度计法测定转基因珠子参阳性株系酶活。采用 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 蔗糖, 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 氯化钠, 0.04 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸二氢钾, 0.03 mol $\cdot$ L⁻¹ EDTA 钠盐构成的 Buffer A 和加入 0.02 mol $\cdot$ L⁻¹ 二硫苏糖醇 (DTT) Buffer A 的 Buffer B 提取珠子参 *PjHMGR* 的可溶性微粒体蛋白。考马斯亮蓝法测定 *PjHMGR* 微粒体蛋白浓度, 在 340 nm 处用紫外分光光度计测定空白对照和上述转基因样品的吸光度, 并根据下列公式 [酶活 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) = ($\Delta_{340/\text{min}}$ 样品 - $\Delta_{340/\text{min}}$ 空白) / 12.44 $\times$ V $\times$ M] 计算 *PjHMGR* 酶活。

1.2.5 转基因珠子参细胞系皂苷和植物甾醇含量测定 准确称取珠子参皂苷标准品 10 mg, 用适量甲醇溶解。分别以吸光值、珠子参总皂苷含量为横纵坐标绘制珠子参皂苷标准曲线。用甲醇溶液溶解适量转基因珠子参细胞系粉末, 再以超声法提取珠子参总皂苷粗提物, HPD100 大孔树脂纯化珠子参总皂苷。以香草醛-高氯酸-冰乙酸显色反应为基础, 利用标准曲线测定上述转基因珠子参细胞系的总皂苷含量。

称取干燥至恒重的转基因珠子参细胞系 1.0 g, 以石油醚作为溶剂, 以氢氧化钾-乙醇溶液的皂化反应、正己烷萃取为基础, 通过索式提取方式获取转基因珠子参阳性细胞系植物甾醇提取物。根据乙酸

酐-浓硫酸显色反应测定植物甾醇含量, 并以吸光值、植物甾醇浓度为横纵坐标绘制标准曲线。利用标准曲线计算转基因样品植物甾醇含量。

1.2.6 统计分析 本实验所有数据均来源于 3 组独立重复实验, 计算标准差平均值, 进行 *t* 检验。

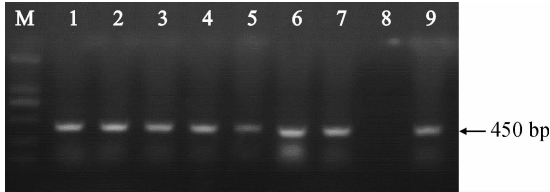
2 结果与分析

2.1 *PjHMGR* 转基因珠子参细胞系

本实验采用同源克隆法得到了珠子参 *HMGR* 基因的 ORF 全长序列, 命名为 *PjHMGR*, 提交到 NCBI 的 GenBank 数据库, 获得登录号为 MG712296, 该序列包含一个 1 716 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 571 个氨基酸。*PjHMGR* 基因编码蛋白序列与人参、三七、刺五加、常春藤的氨基酸序列比对结果显示: *PjHMGR* 基因编码蛋白与其他药用植物 *HMGR* 一样具有多个保守的结构域, 分别为 TTEGCLVA、GTVGGGT、DMAMGM-NM、EMPIGYVIP 和 2 个 KT 保守结构域。以上结果表明 *HMGR* 功能结构域在进化过程中具有较高的稳定性。通过农杆菌遗传转化操作, 本研究获得了 7 株具有抗性的转 *PjHMGR* 细胞系, 并依次编号为 H-1~H-7, 分别提取阳性细胞系的基因组 DNA, 以 *nptII*-F 和 *nptII*-R 为特异性引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 所有细胞系在大约 450 bp 处均有与预期大小一致的特异性条带 (图 2)。

2.2 *PjHMGR* 基因表达及 *HMGR* 活性分析

以上述 H-1~H-7 株系的 cDNA 为模板进行 *PjHMGR* 基因相对表达量分析。结果显示阳性细胞系中, *PjHMGR* 基因相对表达量与野生型相比均有不同程度提高。H-3 和 H-7 株系 *PjHMGR* 基因相对表达量增加最多, 约为野生型对照组的 7.15



M. DL2 000; 1~7. 转基因珠子参细胞系; 8. 阴性对照; 9. 阳性对照

图 2 *PjHMGR* 转基因珠子参细胞系的 *nptII*

基因的 PCR 检测

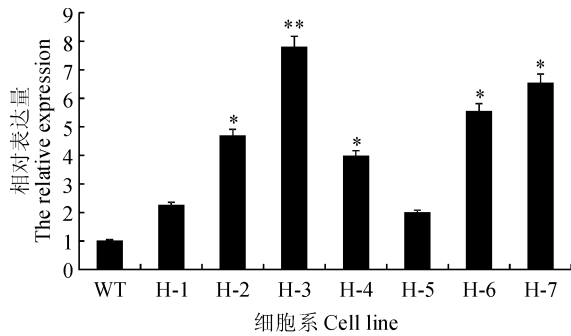
M. DL2 000; 1~7. The transgenic *P. japonicus* cell lines; 8. Negative control; 9. Positive control

Fig. 2 The PCR detection of *nptII* gene in transgenic *P. japonicus* cell lines of *PjHMGR*

倍,而 H-5 株系仅仅为对照组的 1.47 倍(图 3)。酶活分析表明,H-1~H-7 转基因珠子参阳性细胞系 HMGR 活性与野生型相比均有一定提高,并以 H-3 株系 *PjHMGR* 酶活最高,约为野生型株系的 6.14 倍(图 4)。各阳性细胞系 *PjHMGR* 基因表达量变化趋势基本与酶活变化具有较好对应关系。

2.3 皂苷及植物甾醇含量分析

H-1~H-7 中珠子参总皂苷含量与未转基因珠子参细胞系相比有明显提高。在整个实验组中,H-3 和 H-7 株系总皂苷含量约为野生型对照组的 3.5 倍,也明显高于其他阳性细胞系(图 5)。同时,转基因珠子参阳性细胞系中植物甾醇含量与野生型相比均有不同程度增加(图 5)。因此过表达 *PjHMGR* 不仅可以有效提高珠子参主要活性成分皂苷含量,也可以提高植物甾醇含量。



WT. 野生型珠子参细胞系; H-1~H-7. *PjHMGR* 转基因珠子参细胞系。下同

图 3 野生型和转 *PjHMGR* 基因珠子参细胞系的 *PjHMGR* 基因相对表达量
WT. The wild-type *P. japonicus* cell lines;
H-1—H-7. The transgenic *P. japonicus* cells of *PjHMGR*. The same as below

Fig. 3 Relative expression of *PjHMGR* in wild-type and transgenic *P. japonicus* cell lines

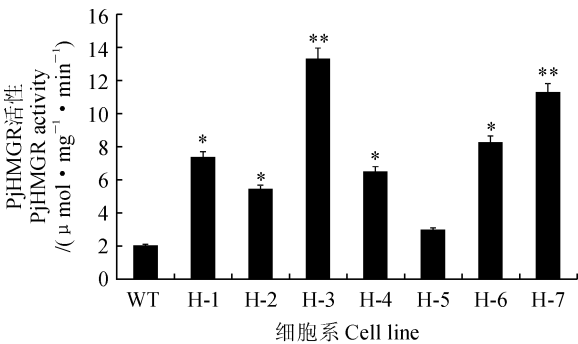


图 4 野生型和转 *PjHMGR* 基因珠子参细胞系的 HMGR 活性

Fig. 4 Enzyme activities of HMGR in the wild-type and the *PjHMGR* transgenic *P. japonicus* cell lines

3 讨论

人参属三大药材中,人参、三七备受关注且研究颇多,珠子参虽为中国传统名贵中药,却长期缺乏系统认识和研究。近年来,越来越多研究证明珠子参具有广泛而重要的药理学活性,对此相关基础研究逐步受到重视。三萜皂苷是珠子参主要生物活性成分,因此对其生物合成途径的研究尤为重要。从我们课题组前期对三七皂苷生物合成的研究中发现,在分子水平上影响人参属三萜皂苷合成的关键因素包括关键酶基因活性和转录因子活性。

目前,珠子参关键酶基因的克隆已取得了一些进展。Huang 等^[18]首次从珠子参细胞中克隆到关键酶基因 *PjAS*,该基因是控制皂苷合成流向齐墩果烷皂苷的第一个关键酶基因。此外,珠子参关键酶基因 *PjDS*、*PjSS*、*PjFPS* 也相继被克隆^[19]。HMGR 是植物三萜皂苷合成途径中第一个关键酶,但针对于该关键酶的研究主要集中于五加科其他物种,包括邢朝斌等^[20]克隆了长度为 1 713 bp、编码 570 个氨基酸的刺五加(*Acanthopanax senticosus*) *HMGR* 基因,与人参(*Panax ginseng*)的 *PgHMGR*(AD180346)

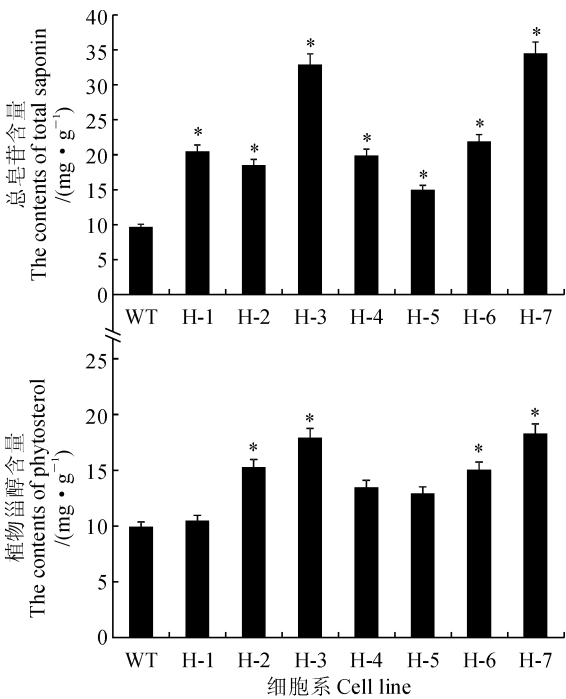


图 5 野生型和转 *PjHMGR* 基因珠子参细胞系的总皂苷和甾醇含量

Fig. 5 The content of total saponins and phytosterol of the wild-type and *PjHMGR* transgenic *P. japonicus* cell lines

具有 92.3% 的相似性;罗红梅等^[21]克隆了长度为 1 770 bp、编码 589 个氨基酸的人参(*Panax ginseng*) HMGR2(JX648390) 基因,与西洋参(*Panax quinquefolius*)的 *PqHMGR*(ACV65036)具有 99% 的相似性。我们课题组曾经从三七(*Panax notoginseng*)中克隆到编码 574 个氨基酸的 *PnHMGR*(KJ578757)基因,其与人参 *PgHMGR*(ADI80346.1)序列具有 97% 的相似性。本研究成功克隆了长度约为 1 716 bp,编码 571 个氨基酸的珠子参 *PjHMGR*(MG712296) 序列,与张萍等^[22]克隆 *PnHMGR*(KJ578757)具有 97% 的相似性,该结果表明本实验克隆的 *HMGR* 基因的完整性和准确性相对较高。

调控珠子参皂苷含量策略主要从两个层面展开。一是细胞水平上调控,即对珠子参植株进行寒冷、干旱等胁迫,使皂苷含量增加,该方法操作层面粗放,效果一般,难以实现对皂苷合成的稳定调控,只能影响“量”的变化而不能从根本上解决“质”的问题^[23]。二是从分子水平,即通过直接控制皂苷合成的关键酶基因以及相关转录因子基因的表达影响皂苷合成,进而形成定向、高效、可靠的皂苷合成调控手段。分子操作是控制皂苷合成的终极途径。本研究通过过表达珠子参 *HMGR* 基因直接促进珠子参皂苷的生物合成,提高皂苷含量。*HMGR* 是植物萜类合成途径中的第一个关键酶,它不仅是 MVA 途径的第一个限速酶,也是三萜化合物合成的重要调控点^[24]。国内外对 *HMGR* 基因的功能性研究已经取得了一些进展。将人参关键酶基因 *PgHMGR* 过表达载体转化到人参发根中,可引起人参皂苷含量

的增加,该转基因人参发根中皂苷含量与野生型相比平均提高了 2 倍以上^[25]。此外,将人参关键酶基因 *PgHMGR1* 过表达载体转化到拟南芥中,同样可提高拟南芥中皂苷的积累量^[26]。在青蒿素合成研究方面,*HMGR* 能够限制黄花蒿中青蒿素的生物合成,过表达 *HMGR* 基因可增加青蒿素的含量^[27]。刺五加的各个器官均可表达 *HMGR*,增加刺五加细胞中 *HMGR* 基因的表达量可以促进刺五加总皂苷的合成^[28]。前期研究表明,在三七细胞中同时过表达 *PnHMGR* 与 *PnSS*,三七皂苷的生物合成能力可提高约 4 倍,相对于仅过表达 1 个关键酶基因来说同时过表达 2 个关键酶基因对皂苷合成的影响确实明显^[29]。本研究还发现,皂苷合成被促进的同时,植物甾醇合成也被促进,其原因在于 *PjHMGR* 是三萜合成途径中比较上游的关键酶,植物甾醇与三萜皂苷的合成共享上游和中游路径,因此 *PjHMGR* 的表达增加,提高了整个代谢流的流量,流向三萜皂苷合成支路的代谢流增加的同时,植物甾醇合成支路的流量也随之增加,最终导致珠子参皂苷和植物甾醇的合成同时获得促进。

本研究实现了 *PjHMGR* 在珠子参细胞中的过表达,提高了珠子参皂苷的积累量,证明了 *PjHMGR* 确实是珠子参皂苷生物合成途径中能够显著影响三萜皂苷以及植物甾醇的合成的关键酶。接下来,将重点研究关键酶基因与重要转录因子的相互作用,力图把关键酶调控层面与转录因子调控层面结合起来,构建更为高效、科学的皂苷调控手段,全方位、多角度解析珠子参皂苷的合成机制。

参考文献:

- [1] FRANCIS G, KEREM Z, MAKKAR H P, *et al.* The biological action of saponins in animal system: a review[J]. *Br J Nutr*, 2002, **88**(6): 587-605.
- [2] HAN L K, ZHENG Y N, YOSHIKAWA M, *et al.* Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2005, **10**(1): 5-9.
- [3] MATSUDA H, MORIKAWA T, UEDA H, *et al.* Medicinal Foodstuffs XXVII: saponin constituents Gotu Kola (2) Structures of new ursane-type and oleanane-type triterpene oligoglycosides, centellasaponin B, C, and D, from *Centella asiatica* cultivated in Sri Lanka[J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, **49**(6): 1 368-1 371.
- [4] YOSHIZAKI K, DEVKOTA H P, FUJINO H, *et al.* Saponins composition of rhizomes, tap roots, and lateral roots of Satsuma-ninjin (*Panax japonicus*) [J]. *Chem Pharm Bull*, 2013, **61**(3): 344-355.
- [5] QI L W, WANG C Z, YUAN C S. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity[J]. *Phytochemistry*, 2011, **72**(8): 689-699.
- [6] ZHANG H J, WANG H F, LIU Y, *et al.* The haematopoietic effect of *Panax japonicus* on blood deficiency model mice[J]. *Ethnopharmacology*, 2014, **154**(3): 818-824.
- [7] ZUO R, YUAN D. Research on chemical constituents and biological activities of rhizoma of *Panax japonicus* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*. 2005, **16**(9): 838-841.
- [8] LUO H M, SUN C, SUN Y Z, *et al.* Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers[J]. *BMC Genomics*, 2011, **12**(5): S5.

[9] HUANG Z P, ZHANG L N. Chemical structures of water-soluble polysaccharides from rhizoma *Panax japonicas* [J]. *Carbohydrate Research*, 2009,**344**(9): 1 136-1 140.

[10] YAMAZHARA J, KUBOMURA Y, MIKI K, *et al.* Anti-ulcer action of *Panax japonicus* rhizome[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1987,**19**(1): 95-101.

[11] MATSUDA H, SAMUKAWA K, FUKUDA S, *et al.* Studies of *Panax japonicus* fibrinolysis[J]. *Planta Med*, 1989,**55**(1): 18-21.

[12] KIM Y K, KIM Y B, KIM J K, *et al.* Molecular cloning and characterization of mevalonic acid (MVA) pathway genes and triterpene accumulation in *Panax ginseng* [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2014,**57**(3): 289-295.

[13] 黄壮嘉,刘迪秋,葛 锋,等. 植物三萜皂苷生物合成中关键后修饰酶研究进展[J]. 西北植物学报 2014,**34**(10): 2 137-2 144.

[14] HUANG Z J, LIU D Q, GE F, *et al.* Advances in studies on key post-modification enzymes in triterpenoid saponins biosynthesis[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014,**34**(10): 2 137-2 144.

[15] CHAPPELL J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthesis pathway in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995,**46**(1): 521-547.

[16] SABAKE T, DIARRA J H, JIANBO W, *et al.* Ethylene treatment improves diosgenin accumulation in *in vitro* cultures of *Dioscorea zingiberensis* via up-regulation of CAS and HMGR gene expression[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2013,**16**(5): 1-10.

[17] TANSAKUL P, SHIBUYA M, KUSHIRO T, *et al.* Dam-marenediol-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis, in *Panax ginseng* [J]. *FEBS Lett.*, 2006,**580**(22): 5 143-5 149.

[18] AMIT R, YAMAZAKI M, TAMAZAKI H, *et al.* RNA-seq transcriptome analysis of *Panax japonicus*, and its comparison with other *Panax* species to identify potential genes involved in the saponins biosynthesis [J]. *Plant Science*, 2016, 7: 481-501.

[19] HUANG Z W, LIN J C, CHENG Z X *et al.* Production of oleanane-type sapogenin in transgenic rice via expression of β -amyrin synthase gene from *Panax japonicus* C. A. Mey[J]. *BMC Biotechnology*, 2015, **15**(1): 45.

[20] ZHANG L, HUANG Y. Molecular cloning and expression of SS gene from *Panax japonicus*[J]. *Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016, **12**(2): 524.

[21] 邢朝斌,吴 鹏,龙月红,等. 刺五加 HMGR 基因的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报 2012,**28**(6): 1 258-1 262.

[22] XING Z B, WU P, LONG Y H, *et al.* Cloning and expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2012,**28**(6): 1 258-1 262.

[23] 罗红梅,宋经元,李雪莹,等. 人参皂苷合成生物学关键元件 HMGR 基因克隆与表达分析[J]. 药学报,2013,**48**(2): 219-227.

[24] LUO H M, SONG J Y, LI X Y, *et al.* Cloning and expression analysis of a key device of HMGR gene involved in ginsenoside biosynthesis of *Panax ginseng* via synthetic biology approach[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013,**48**(2): 219-227.

[25] 张 萍,刘迪秋,葛 锋,等. 三七 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)基因的克隆和生物信息学分析[J]. 中草 2014,**45**(18): 2 684-2 690.

[26] ZHANG P, LIU D Q, GE F, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene from *Panax notoginseng* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014,**45**(18): 2 684-2 690.

[27] 刘 佳,全雪丽,姜明亮,等. 低温胁迫对人参皂苷生物合成途径基因家族表达特性的影响研究[J]. 中草药,2016, **47**(11): 1 956-1 961.

[28] LIU J, QUAN X L, JIANG M L, *et al.* Effect of cold stress on expression characteristic of gene families of ginsenoside biosynthesis pathway [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016,**47**(11): 1 956-1 961.

[29] KIM Y K, KIM Y B, KIM J K, *et al.* Molecular cloning and characterization of mevalonic acid (MVA) pathway genes and triterpene accumulation in *Panax ginseng* [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2014, 57: 289-295.

[30] KIM Y K, KIM J K, KIM Y B, *et at.* Enhanced accumulation of phytosterol and triterpene in the hairy root cultures of platycodon grandiflorum by overexpression of *Panax ginseng* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(8): 1 928-1 934.

[31] RAM M, KHANM A, JHA P, *et al.* HMG-CoA reductase limits artemisinin biosynthesis and accumulation in *Artemisia annua* L. plants[J]. *Acta Physiol. Plant*, 2010,**32**(5): 859-866.

[32] NAFIST, AKMALMOHD, RAMM, *et al.* Enhancement of artemisinin content by constitutive expression of the HMG-Co A reductase gene in high-yielding strain of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2011,**5**(1): 53-60.

[33] 李非非,杨 果,吴 鹏,等. 刺五加 HMGR 基因的表达及其对皂苷合成的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2015, **34**(3): 560-564.

[34] LI F F, YANG G, WU P, *et al.* Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a gene in *Eleutherococcus senticosus* and its influence on saponins synthesis[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015,**34**(3): 560-564.

[35] DENG B, ZHANG P, GE F, *et al.* Enhancement of triterpenoid saponins biosynthesis in *Panax notoginseng* cells by co-over-expressions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and squalene synthase genes[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 122: 38-46.

(编辑:宋亚珍)