

不同生长期穿心莲活性成分及关键酶基因差异表达研究

陈娟, 谷巍*, 段金廛*, 宿树兰, 邵婧, 孙红梅, 耿超

南京中医药大学药学院, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要:目的 对主产地广东遂溪、福建漳浦及引种栽培地区江苏南京、淮安的不同生长期穿心莲 *Andrographis paniculata* 活性成分及关键酶基因表达情况进行分析, 研究穿心莲活性成分积累动态, 探讨其最佳采收期及分子机制。方法 用 HPLC 法测定穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯量, 并用实时荧光定量 PCR 技术从 mRNA 水平比较研究不同生长期穿心莲关键酶 ent-柯巴基焦磷酸合酶 (CPS) 基因的表达情况。结果 不同产地穿心莲生长过程基本一致, 在营养生长期生长迅速, 进入生殖生长后生长趋于平缓。4 个产地穿心莲样品中活性成分变化趋势相近, 穿心莲内酯量均在始花期达到最高, 脱水穿心莲内酯量变化较平缓; 穿心莲 CPS 基因的相对表达量在蕾期至始花期相对较高, 与穿心莲内酯量呈显著正相关。4 个产地穿心莲的穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯之和均达到《中国药典》2010 年版标准。结论 穿心莲最佳采收期应以物候期为评判依据, 其最佳采收期为始花期。

关键词: 穿心莲; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯; ent-柯巴基焦磷酸合酶; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)21-3149-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.020

Study on active components of *Andrographis paniculata* at various growth periods and differential expression of key enzyme gene

CHEN Juan, GU Wei, DUAN Jin-ao, SU Shu-lan, SHAO Jing, SUN Hong-mei, GENG Chao

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To study the dynamic changes of the active components from *Andrographis paniculata* at various growth periods grown in Suixi in Guangdong province, Zhangpu in Fujian province as well as introduced and cultivated in Nanjing and Huai'an in Jiangsu province, and to investigate the expression level of the key enzyme gene at the same time in order to obtain the accumulation trend of the active contents from *A. paniculata* and explore a reasonable harvest and its molecular mechanism. **Methods** The contents of andrographolide and dehydroandrographolide were analyzed by HPLC. The expression of key enzyme gene, ent-copalyl diphosphate synthase (CPS) was measured at mRNA level with QRT-PCR. **Results** The growth periods of *A. paniculata* were similar in different areas. It grew fast at vegetative stage while slowly at reproductive stage. The contents of active ingredients in *A. paniculata* from four areas showed the same change tendency. The content of andrographolide reached the highest level at flowering period. At the same time, the changes of dehydroandrographolide was flattening out. The expression of CPS reached its maximum at bud to flowering period. There was a significant positive correlation between the content of andrographolide and the expression of CPS. **Conclusion** The optimal harvest time of *A. paniculata* should be judged on phenological period and the best harvest period is flowering period.

Key words: *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees; andrographolide; dehydroandrographolide; ent-copalyl diphosphate synthase; real-time quantitative PCR

穿心莲为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的全草, 有“天然抗生素”之称^[1], 原产印度、斯里兰卡等国, 我国于 20 世纪

70 年代在广东、福建一带大量引种栽培^[2]。穿心莲的活性成分主要是穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯^[3], 为二萜内酯类化合物, 具有清热解毒、凉血消肿之功

收稿日期: 2014-06-16

基金项目: 国家“十二五”科技支撑项目 (2012BAI29B02); 江苏省青蓝工程 (2012); 江苏省中药优势学科 II 期建设 (ysxk-2014); 国家自然科学基金重点项目中药道地性及其形成的环境机制研究 (81130070); 道地药材国家重点实验室培育基地建设项目

作者简介: 陈娟, 硕士研究生, 研究方向为分子生药学、药用植物生理生态学。Tel: 18905239948 E-mail: juanchen29@126.com

*通信作者 谷巍, 教授。Tel: 13951879869 E-mail: guwei9926@126.com

段金廛, 教授。E-mail: DUANJA@163.com

效^[4]。ent-柯巴基焦磷酸合酶(ent-copalyl diphosphate synthase, CPS)是穿心莲二萜化合物合成途径中的重要调控位点^[5],其表达水平决定了下游萜类化合物的组成和质量分数^[6]。随着抗生素滥用及不良反应的增加,穿心莲作为中药抗生素,需求量不断增加,引种范围不断扩大,由于各引种地区采收期标准不一,其质量存在很大差异,对药材的品质、产量以及资源的合理保护与开发利用都有着影响。本实验对主产地广东遂溪、福建漳浦及引种栽培地区江苏南京、淮安的不同生长期穿心莲活性成分积累动态及关键酶基因表达情况结合物候期进行分析,研究不同环境生态条件下穿心莲最佳采收期及其分子机制,为穿心莲的规范化生产、合理采收和质量控制提供科学指导。

1 材料

1.1 样品

实验地点设在穿心莲主产地广东遂溪(穿心莲 GAP 基地)、福建漳浦及引种地江苏南京及淮安,引种地穿心莲种子来源于广西贵港,按照 GAP 管理制度进行种植管理。样品由南京中医药大学谷巍教授鉴定为穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees。在 7~10 月分别于穿心莲叶期、蕾期、始花期、盛花期、果期^[7]不同生长期采集样品,分析其不同生长期药效成分的量;另采收部分新鲜样品保存于液氮(-196 ℃)中,备用,以分析其 CPS 基因表达量。

1.2 仪器与试剂

Agilent 2695 高效液相色谱仪; Light Cycler 480

荧光定量 PCR 仪(Roche 公司); Allegra 21R 台式高速冷冻离心机; Hofer MV-25 紫外透射仪。

脱水穿心莲内酯(批号 110854-201308)、穿心莲内酯(批号 110797-201108)对照品均由中国食品药品检定研究院提供; TRIZOL Reagent (Ambion 公司); RT mix (Vazyme 公司); qPCR Master Mix (TaKaRa 公司); DEPC (Sigma 公司); SDS (Amresco 公司); Agarose (上海基因公司); 甲醇(色谱纯); 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 不同生长期穿心莲生长特性^[8]

在引种地区江苏南京,根据穿心莲的生长情况,于穿心莲各生长期采集样品,采摘后 2 h 内分别测定样品鲜质量、株高、叶片数、分叉数,取其平均值。采用《中国药典》2010 年版方法测定植株含水量。

2.2 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的测定^[3]

2.2.1 色谱条件 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水(60:40)为流动相,体积流量 0.8 mL/min,柱温 25 ℃;检测波长 226 nm(用于检测穿心莲内酯), 254 nm(用于检测脱水穿心莲内酯),进样量 10 μL,色谱图见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别称取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯对照品适量,用甲醇配制成 0.2 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 将穿心莲样品干燥粉碎,过 40 目筛,称取 0.2 g 样品,加甲醇 5 mL 超声提取 0.5 h,用甲醇补足质量,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,即得。

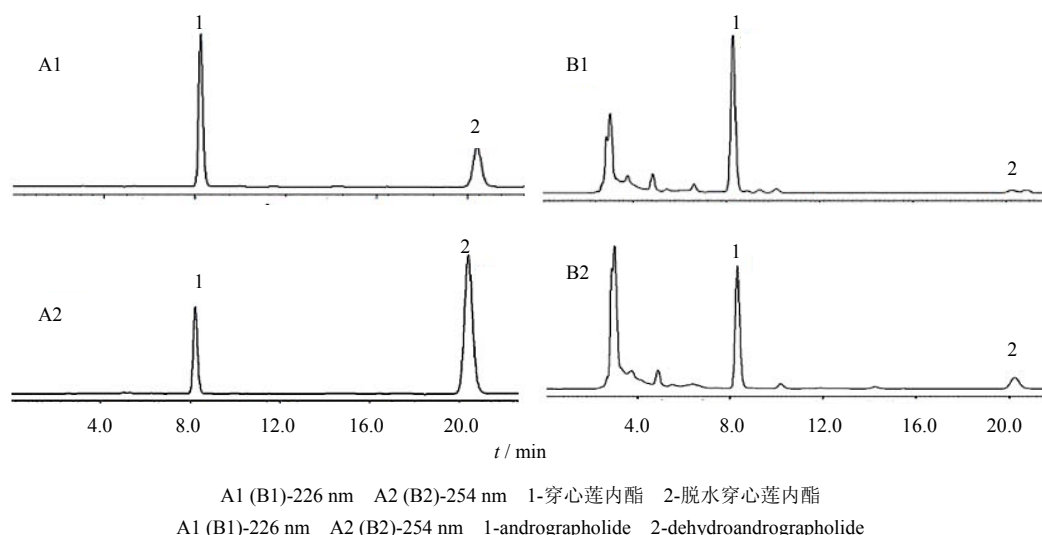


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substances (A) and samples (B)

2.2.4 样品测定 分别吸取对照品溶液 10 μL , 供试品溶液 10 μL , 进样, 按外标法测定穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的量。

2.3 实时荧光定量 PCR^[9]

2.3.1 RNA 提取和 cDNA 合成 在引种地区江苏南京, 于穿心莲各生长期收集叶片保存于液氮中。RNA 提取按照 TIANGEN 公司总 RNA 提取试剂盒操作步骤进行, 取 2 μg 总 RNA 以 Oligo dT18 为引物进行反转录。反转录采用 2 步进行: 第 1 步, 4 $\times$ gDNA wiper Mix 2 μL , 模板 (RNA) 250 ng, 加 RNase free ddH₂O 至 10 μL , 混匀, 42 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 第 2 步, 5 $\times$ qRT SuperMixII 2 μL , 第 1 步反应液 8 μL 。反应条件: 25 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 42 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。

2.3.2 荧光定量 PCR 采用实时荧光定量 PCR 仪, 以 β -actin 为内参基因, 检测样品中 CPS 基因的相对表达量。以不同生长期穿心莲叶片 cDNA 为模板, 运用设计的引物进行 PCR 扩增, actin-F 和 actin-R 及 QRT-PCR 引物见表 1。QRT-PCR 反应体系: cDNA 2 μL , 引物各 0.4 μL , 4 $\times$ qPCR Master Mix 10 μL , ddH₂O 7.2 μL , 总体积 20 μL 。PCR 反应结束后分析

荧光值变化曲线以及融解曲线。

2.4 相关性分析

使用 SPSS 软件对不同生长期穿心莲中 CPS 基因表达量与药效成分穿心莲内酯的量进行相关性分析。

3 结果与分析

3.1 穿心莲不同生长期生物量变化

4 个产地穿心莲的物候期有所差异, 江苏淮安的穿心莲其生长期相对较长, 于 9 月中旬出现花蕾, 果实成熟期相对较晚 (10 月下旬), 其茎较长, 质脆, 生物量相对较高; 广东的穿心莲一般于 8 月底出现花蕾; 福建的在 9 月下旬结果。表 2 为引种地江苏南京的穿心莲不同生长期的生物量变化, 穿心莲幼苗生长缓慢, 在 6~8 月, 其株高增长较快, 叶片数快速增长, 生长较快, 为快速生长期。在 8 月中旬, 穿心莲出现花蕾, 此后, 植株生长缓慢, 进入生殖生长期。

3.2 穿心莲不同生长期穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的变化

4 个产地穿心莲不同生长期的穿心莲内酯量变化趋势一致, 其量均在始花期前快速增长, 到始花期达到最大值, 此后呈下降趋势。南京、淮安、遂溪、漳浦样品中, 始花期穿心莲内酯量比叶期分别高了 30.16%、20.06%、24.36%、19.04%, 见表 3。

4 个产地样品中脱水穿心莲内酯在不同生长期变化较平缓 (表 4), 其量总体为下降趋势。

3.3 穿心莲不同生长期 CPS mRNA 表达分析

实验结果显示, 穿心莲 CPS 基因的相对表达量在穿心莲蕾期前呈快速上升趋势, 在蕾期至始花期趋于平缓, 之后缓慢下降 (图 2)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列
CPS-F	CACCATCTCCGCCTGTCT
CPS-R	ACCACCACTCACGCCACT
actin-F	TTCACCACTACAGCAGAGCG
actin-R	AAGGACCTCAGGGCATCG

表 2 南京产穿心莲不同生长期生物量

Table 2 Biomass of *A. paniculata* from Nanjing at different growth periods

采收期	株高 / cm	叶片数 / 片	分叉数	鲜质量 / (g·株 ⁻¹)	含水量 / %
叶期	30.2 $\pm$ 0.2	96 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	35.22 $\pm$ 0.65	72.62 $\pm$ 0.11
蕾期	46.0 $\pm$ 0.3	118 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	59.29 $\pm$ 0.84	79.96 $\pm$ 0.11
始花期	51.5 $\pm$ 0.4	129 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	63.08 $\pm$ 0.42	72.80 $\pm$ 0.08
盛花期	52.6 $\pm$ 0.1	134 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	65.61 $\pm$ 0.44	72.50 $\pm$ 0.04
果期	52.8 $\pm$ 0.2	126 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	66.30 $\pm$ 0.03	68.08 $\pm$ 0.05

表 3 不同产地不同生长期穿心莲中穿心莲内酯的量

Table 3 Contents of andrographolide in *A. paniculata* from different habitats at different growth periods

产地	穿心莲内酯 / %				
	叶期	蕾期	始花期	盛花期	果期
江苏南京	2.510 $\pm$ 0.049	3.026 $\pm$ 0.013	3.267 $\pm$ 0.046	2.889 $\pm$ 0.018	2.638 $\pm$ 0.043
江苏淮安	2.770 $\pm$ 0.022	3.137 $\pm$ 0.012	3.381 $\pm$ 0.042	3.054 $\pm$ 0.015	2.190 $\pm$ 0.033
广东遂溪	2.471 $\pm$ 0.015	2.593 $\pm$ 0.013	3.073 $\pm$ 0.036	2.745 $\pm$ 0.027	2.275 $\pm$ 0.031
福建漳浦	2.658 $\pm$ 0.011	2.753 $\pm$ 0.019	3.164 $\pm$ 0.007	2.708 $\pm$ 0.027	2.420 $\pm$ 0.057

表4 不同产地不同生长期穿心莲中脱水穿心莲内酯的量

Table 4 Contents of dehydroandrographolide in *A. paniculata* from different habitats at different growth periods

产地	脱水穿心莲内酯 / %				
	叶期	蕾期	始花期	盛花期	果期
江苏南京	0.286±0.002	0.265±0.002	0.225±0.004	0.192±0.003	0.165±0.004
江苏淮安	0.303±0.002	0.269±0.003	0.265±0.002	0.206±0.001	0.163±0.003
广东遂溪	0.281±0.001	0.256±0.002	0.231±0.004	0.224±0.002	0.154±0.002
福建漳浦	0.262±0.002	0.222±0.003	0.216±0.003	0.184±0.005	0.163±0.001

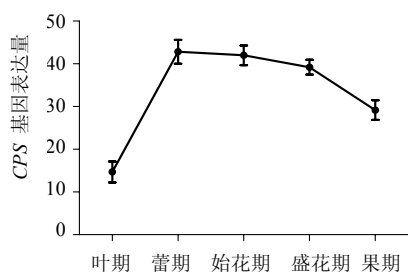


图2 不同生长期穿心莲 CPS 基因表达量

Fig. 2 CPS expression on mRNA at different growth periods of *A. paniculata*

3.4 相关性分析

使用 SPSS 统计软件对南京地区穿心莲样品中穿心莲内酯量与 CPS 基因表达量进行相关性分析,其相关性为 0.909 ($P<0.05$),表明 CPS 基因表达量与穿心莲内酯量呈显著正相关。

4 讨论

不同生长环境、不同采收季节等因素都有可能影响中药材成分量。中医药传统理论中以季节作为中药材采收期依据缺乏对不同地区物候期的考虑,本实验各产地穿心莲生长物候期不完全一致,各地栽培环境条件亦不相同,研究结果表明其最佳采收期为始花期,最佳采收期的确定应以植物物候期作为依据,与药材产量、活性成分量相结合。

中药材有效成分的形成与积累除受环境条件的影响还受遗传因子的调控。焦磷酸香叶基香叶酯 (GGPP) 环合形成 ent-焦磷酸古巴酯 (ent-CDP) 是穿心莲内酯生物合成的关键步骤,而催化这步反应的 CPS 是穿心莲内酯类成分合成的关键限速酶^[5],对 CPS 基因不同生长期表达量与穿心莲内酯量积累动态的相关性分析进一步证实了 CPS 基因是穿心莲内酯类成分合成途径中的重要调控点,也为最佳采收期的确定提供分子水平的佐证。CPS 基因在蕾期前快速增长,表明这段时期为穿心莲生长旺盛

期,也是次生代谢产物合成的高峰期;开花后 CPS 基因 mRNA 表达水平下降,这可能是穿心莲植株趋于衰老、代谢能力衰退所致^[10]。

《中国药典》2010 年版穿心莲活性成分标准为穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯之和不得低于 0.8%。本实验所有样品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯之和均达到标准,引种地江苏南京及江苏淮安穿心莲活性成分量也均高于《中国药典》2010 年版规定,有效成分的积累动态与广东、福建基本一致,且生物量也较高,表明穿心莲可以在江苏引种种植。

参考文献

- [1] 靳鑫,时圣明,张东方,等.穿心莲化学成分的研究[J].中草药,2014,45(2):164-169.
- [2] William J S, Stephan R T, Vera S B, et al. *Andrographis paniculata* extract (HMPL-004) for active ulcerative colitis open [J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(1): 90-98.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] Lim J C W, Chan T K, Ng D S W, et al. Andrographolide and its analogues: versatile bioactive molecules for combating inflammation and cancer [J]. *Clin Exper Pharm Physiol*, 2012, 39(3): 300-310.
- [5] 姚攀,陈慧芝,李竹君,等.穿心莲 ent-柯巴基焦磷酸合酶基因的克隆与生物信息学分析[J].生物技术通报,2012(10):156-162.
- [6] 王凌健,方欣,杨长青,等.植物萜类次生代谢及其调控[J].中国科学,2013,43(12):1030-1046.
- [7] 陈荣,杨跃生,吴鸿.不同采收期紫锥菊产量及菊苣酸动态变化研究[J].中草药,2012,43(6):1186-1190.
- [8] 张燕,王文全,郭兰萍,等.不同采收期金银花的产量和质量研究[J].中草药,2013,44(18):2611-2614.
- [9] 李竹君,郭健雄,李永文,等.穿心莲实时定量 PCR 分析中内参基因的选择[J].广州中医药大学学报,2013,30(2):240-244.
- [10] 谷巍,吴启南,巢建国,等.建泽泻法呢基焦磷酸合酶分子克隆、分布表达及生物信息学研究[J].药学报,2011,46(5):605-612.