

重金属 Cd 胁迫下三七主要药效成分与其合成关键酶 DS 和 P450 基因表达相关性研究

朱美霖^{1,2}, 曾宪彩^{1,3}, 蒋艳雪^{1,3}, 范晓婷^{1,3}, 晁思宏^{1,3}, 曹红斌^{1,3*}, 张文生^{1,3}

1. 北京师范大学 中药资源保护与利用北京市重点实验室, 北京 100875

2. 宁夏医科大学 基础医学院医用化学系, 宁夏 银川 750004

3. 北京师范大学 资源药物教育部工程研究中心, 北京 100875

摘要: 目的 研究外源性镉 (Cd) 对三七主要药效成分合成中关键酶 2,3-氧化鲨烯被达玛烯二醇合成酶 (DS) 和细胞色素 P450 单加氧酶 (P450) 基因表达的影响。方法 设置 9 个 Cd 的质量分数梯度 (0.0、0.1、0.3、0.6、1.0、3.0、6.0、10.0、30.0 mg/kg) 分别对三七进行胁迫实验, 两年后采集成熟三七, 通过 qRT-PCR 检测手段对其根部 DS 及 P450 基因进行表达量测定, 并以 GAPDH 基因作为内参基因进行 DS 及 P450 基因相对表达量的计算, 通过相关性分析计算 DS 和 P450 基因表达与三七主要药效成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁ 以及总皂苷的相关性。结果 Cd 在低质量分数下能促进 DS 的表达, 高质量分数下抑制 DS 的表达; 随着 Cd 质量分数的增加, 对 P450 表达的抑制作用更加明显; 而 DS 和 P450 基因表达与三七主要药效成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁ 以及总皂苷无显著相关性 ($P > 0.5$)。结论 重金属 Cd 对三七药效成分中关键酶 DS 和 P450 基因表达影响不同, 对同一种酶, Cd 质量分数不同其影响也不同。但主要药效成分并未因此受明显影响。

关键词: 镉; 三七; 关键酶; 基因表达; 药效成分

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)24-4428-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.022

Effect on the expression of key enzymes DS and P450 genes in the medicinal composition synthesis of *Panax notoginseng* under Cadmium stress

ZHU Mei-lin^{1,2}, ZENG Xian-cai^{1,3}, JIANG Yan-xue^{1,3}, FAN Xiao-ting^{1,3}, CHAO Si-hong^{1,3}, CAO Hong-bin^{1,3}, ZHANG Wen-sheng^{1,3}

1. Beijing Area Major Laboratory of Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

2. College of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

3. College of Resource Science & Technology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: Objective To learn the effect on the expression of key enzymes DS and P450 genes in the medicinal composition synthesis of *Panax notoginseng* under exogenous Cadmium (Cd). **Methods** Nine treatments of Cd (0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0, and 30.0 mg·kg⁻¹) was added to the cultivated soil of *Panax notoginseng*, respectively. Two years later, mature *Panax notoginseng* was sampled. The expression of DS and P450 genes in root was detected using qRT-PCR method, and GAPDH gene was taken as the reference genes to calculate the relative expression of DS and P450 genes. The correlation between expression of key enzymes genes and main medicinal composition (notoginsenoside R₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₁, and total saponins) was determined by correlation analysis. **Results** Cd increased DS expression in low concentration, and inhibited in high levels, while with the adding Cd increasing, the P450 expression decreased significantly. However, the expression of DS and P450 genes didn't show good correlation with notoginsenoside R₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₁, and total saponins ($P > 0.5$). **Conclusion** Cd can affect the expression of DS and P450 genes in different ways and for the same gene, the expression is also various in different Cd levels. However, the main medicinal composition content wasn't influenced consequently.

Key words: Cadmium; *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; key enzymes; gene expression; medicinal composition

收稿日期: 2016-05-19

作者简介: 朱美霖(1987—), 女, 讲师, 研究方向为天然药物重金属安全性评价。Tel: (0951)6980120 E-mail: jay70281@163.com

*通信作者 曹红斌, 教授, 博士生导师。Tel: (010)62200669 E-mail: caohongbin@bnu.edu.cn

三七为五加科 (Araliaceae) 人参属 *Panax* L. 植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根, 是我国传统的名贵中药。三七的主要药效成分为达玛烷型四环三萜皂苷类物质, 而植物体内达玛烷型四环三萜皂苷的合成前体均为 2,3-氧化鲨烯, 合成路径为 2,3-氧化鲨烯被达玛烯二醇合成酶 (DS) 催化作用下生成达玛烯二醇, 再通过细胞色素 P450 单加氧酶 (P450) 催化生成原人参二醇 (达玛烷型皂苷三萜皂苷元), P450 继续作用生成原人参三醇, 最后原人参二醇或原人参三醇糖基转移酶 (GT) 的催化作用下, 生成多样的达玛烷四环三萜类皂苷。在此过程中, DS 和 P450 是从 2,3-氧化鲨烯合成达玛烷四环三萜类皂苷的关键酶^[1-2]。

三七的主要产地位于云南及广西等地, 这些地区矿产资源丰富, 丰富的矿业活动导致三七重金属污染严重^[3]。大量文献表明, 三七中镉 (Cd) 污染严重^[4-6]。目前, 多数研究集中在三七根及不同组织 Cd 的超标率以及 Cd 对三七生长及主要药效成分影响^[7]的研究, 也有学者研究了 Cd 胁迫下三七的生理响应及富集特性以及 Cd 污染下摄取三七所引起的健康风险^[5], 而尚无关于 Cd 对三七主要药效合成中关键酶影响的研究。因此, 本实验研究 Cd 对三七药效成分合成中关键酶基因表达的影响, 以期进一步揭示 Cd 对三七药效成分影响的机制。

1 材料

1.1 试剂

PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara 公司, 日本), SybrGreen qPCR Master Mix (2X) (上海睿安生物有限公司)。

1.2 仪器

荧光定量 PCR 仪 (ABI7500 FAST, 美国), 高速冷冻离心机 (Allegra25R, Beckman), 分析天平 (Mettler Toledo AG 204, 瑞士), 紫外分光光度计 (Nanodrop 2000, 美国), 凝胶成像系统 (Gcldoc2000, Biorad 公司), 微波炉 (Panasonic, 日本)。

2 方法

2.1 盆栽实验及样品采集

盆栽实验于 2012 年 1 月在文山苗乡三七科技有限公司砚山实验基地 (东经: 104.3927°, 北纬: 24.7197°) 进行, 设计 Cd 胁迫的梯度试验, 土壤 Cd 质量分数分别为 0.0、0.1、0.3、0.6、1.0、3.0、6.0、10.0、30.0 mg/kg, 4 次重复, 实验方法参见文献报道^[6]。同年 10 月, 采集二年生三七根, 用清水洗净,

吸干水分并用陶瓷刀切成小块, 分装标记, 快速置于液氮罐中冻存。

2.2 引物合成

查找 genbank 数据库, 得到三七的 DS 和 P450 基因的序列号分别为 DS (GU997680.1) 和 P450 (GU997675.1), 并以三七 GAPDH 基因 (AY345228.1) 作为内参基因, 使用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物, GAPDH 基因的上游引物为 5'-CATCAGCCAAAGACTGGAGAG-3', 下游引物为 5'-TCGCCAACCTGACAGTTAGAT-3'; DS 基因上游引物为 5'-GAAAACGAACAAGTGAACACTACGA-3', 下游引物为 5'-GCAATGATAAGGGGAGGTGTAT-3'; P450 基因上游引物为 5'-GAAGCCATTGCAGTCTCTGC-3', 下游引物为 5'-CGGAGTTCCCGGTAAGTTG-3'。

2.3 三七根总 RNA 提取

在研钵中预先加入少许液氮, 取小块三七根组织 (约 1.0 g) 直接放入研钵中, 并迅速加入液氮并研磨直至粉末, 迅速转移 100 mg 到 1.5 mL RNase-free 离心管中, 加入 1 mL Trizol 提取液, 颠倒混合混匀后, 室温静置 10 min, 使其充分裂解。加入 200 μ L 氯仿, 剧烈振荡 30 s, 混合均匀后静置 5 min。4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 转速为 12 000 r/min, 转移上清液至另一 1.5 mL RNase-free 离心管中。加入 0.5 mL 异丙醇, 轻轻混匀后, 于冰浴静置 20~30 min。4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 转速为 12 000 r/min, 弃上清液。加入 1 mL 75% 乙醇, 洗涤沉淀 2 次。4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 转速为 7 500 \times g, 弃上清液。室温放置晾干, 加入 25 μ L Rnase-free H₂O 溶解, -80 $^{\circ}$ C 保存, 备用。用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 150 V 电压下 15 min, 紫外透射光下观察并拍照。用紫外分光光度计测定 260 和 280 nm 吸光度 (A), 并计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 值。

2.4 cDNA 合成

操作按照 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明进行, 具体步骤为 (1) cDNA 第一链合成: 在无 RNase 污染的冰浴无菌离心管 (2 mL) 中依次加入以下试剂, 5 \times gDNA Eraser Buffer 2.0 μ L; gDNA Eraser, 1.0 μ L; Total RNA 1.0 μ L; RNase Free dH₂O 10 μ L, 轻轻混匀, 稍离心, 42 $^{\circ}$ C 反应 2 min 后, -20 $^{\circ}$ C 保存, 备用。(2) 反转录反应: 依次向另一 2 mL 无菌离心管加入以下试剂, 5 \times PrimeScript[®] Buffer 24.0 μ L, PrimeScript[®] RT Enzyme Mix I 1.0 μ L, RT Primer Mix 1.0 μ L, 取 (1) 的反应液 10.0 μ L, RNase Free dH₂O

20 μL , 轻轻混匀, 并稍离心, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 90 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

2.5 qRT-PCR 反应

操作按照 SybrGreen qPCR Master Mix (2X) 试剂盒说明进行, 依次加入 2X SybrGreen qPCR Master Mix 12.5 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 F, 0.5 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 R 0.5 μL ; ddH₂O 9.5 μL , Template (cDNA) 2 μL , 最后加入 ddH₂O 形成 25 μL 反应体系。把加好样品的 96 孔板放在 ABI 7500 FAST 型 qRT-PCR 仪中, PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 40 s, 40 个循环。

2.6 数据处理

使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法对目的基因的相对表达量进行计算。对照组浓度的各个关键酶基因表达量为 1, 而不同质量分数 Cd 下 DS 基因和 P450 基因相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 的计算值。

采用 Microsoft Excel 2010 软件进行计算, 得

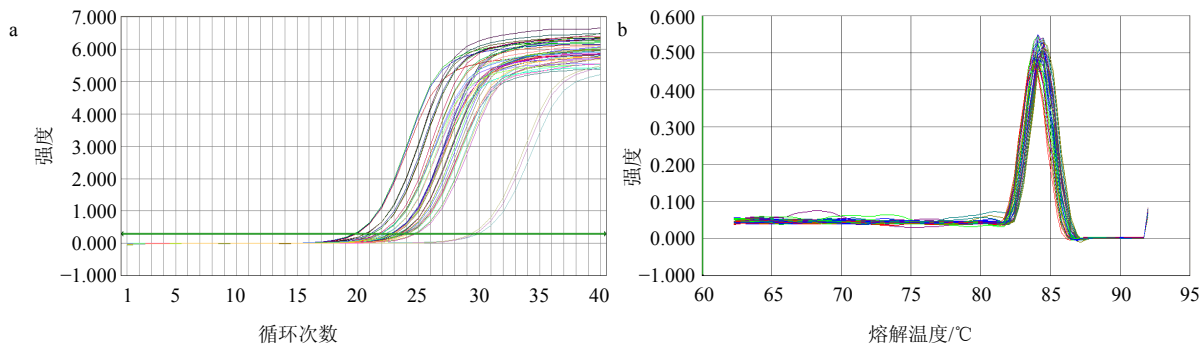


图 2 DS 基因的扩增曲线 (a) 和熔解曲线 (b)

Fig. 2 Amplification plot (a) and melting curve (b) of DS gene

3.3 Cd 对三七主要药效成分合成中关键酶 DS 和 P450 基因表达的影响

Cd 对 2 种关键酶基因表达的影响不同。DS 基因表达量随着 Cd 质量分数的增加呈现先增加后降低的趋势, 并且在添加质量分数为 1 mg/kg 时达到最大值 2.25, 并且与对照组 (0 mg/kg) 相比, 表现为显著性增加 ($P < 0.05$); 添加质量分数为 6、10、30 mg/kg 的 Cd 时 DS 基因表达相比于最高表达量时表现出显著性降低的趋势。结果表明, 低质量分数 Cd 可以促进 DS 基因的表达, 而高质量分数 Cd 抑制 DS 基因的表达。

P450 基因表达量随着 Cd 质量分数的增加而呈现出整体降低的趋势, 在低质量分数 (0.1 mg/kg 和 0.3 mg/kg) Cd 胁迫时, P450 基因表达量虽有波动, 但是并没有表现出显著性差异; 从 0.6 mg/kg 开始, 与对照组相比 P450 关键酶表现出显著下降

到数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 空白对照组间是否存在显著性差异利用 SPSS18.0 统计软件中的单因素方差分析 (ANOVA) 考察 ($P < 0.05$ 表示存在显著性差异, $P < 0.01$ 表示存在极显著性差异)。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 电泳结果

三七根部总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果显示, 18 S 和 28 S 条带清晰, RNA 提取效果较好, 可用于进一步实验。紫外法测得 A_{260}/A_{280} 值 1.99~2.08, 数值均在 2.0 附近, 表明提取的 RNA 纯度较高。

3.2 扩增曲线和溶解曲线

内参基因及目的基因的扩增曲线及熔解曲线图如图 1 所示, 样品扩增曲线表明, GAPDH 和 2 种关键酶基因均在三七根部样品中有表达。熔解曲线说明各个样品内参基因和目的基因均有单一的熔解温度 (GAPDH 为 85.2 $^{\circ}\text{C}$, DS 为 84.8 $^{\circ}\text{C}$, P450 为 83.7 $^{\circ}\text{C}$), 表明引物特异性良好。

的趋势 ($P < 0.05$), 并且质量分数越高, 表达量越低, 在添加 Cd 为 30 mg/kg 时, 表达量为 0.034, 与对照相比表现出极显著降低趋势 ($P < 0.01$)。因此, Cd 在低质量分数时对 P450 基因表达量基本无影响, 在高质量分数时 (图 2) 强烈抑制其表达。

3.4 Cd 胁迫下 DS 和 P450 基因表达与三七主要药效成分的关系

本实验室前期研究中^[7], 得到不同质量分数 Cd 胁迫下三七主要药效成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁ 以及总皂苷的量。通过相关性分析, 得到 DS 基因表达量与主要药效成分相关性分别为 0.318、0.444、0.619、0.478, P 值均大于 0.05, 无显著相关; P450 基因表达量与主要药效成分相关性分别为 -0.027、0.601、0.394 和 0.384, P 值均大于 0.05, 也无显著相关性。

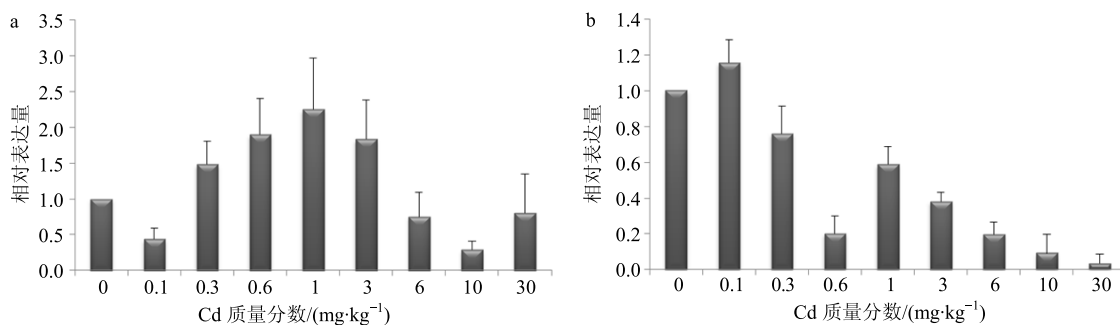


图 2 添加不同质量分数 Cd 下 DS (a) 和 P450 (b) 酶基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of DS (a) and P450 (b) under adding different mass percent of Cd

4 讨论

目前, 外源性胁迫通过影响关键酶基因的表达而对次生代谢产物合成产生影响的研究主要集中在一些诱导分子上, 如水杨酸类和茉莉酸类。如茉莉酸甲酯和茉莉酸乙酯诱导三七细胞中鲨烯合成酶(SS)和鲨烯环氧酶(SE)基因的表达, 提高三七总皂苷的累积量^[8]; 茉莉酸甲酯可以诱导 DS 基因表达上调, 进一步提高三七总皂苷的累积^[9]; 茉莉酸甲酯诱导甘草根部中 SS 基因表达, 并促进甘草酸累积^[10]。而关于重金属或矿质元素作为诱导因素的研究较少, 仅有梁新华等^[11]用不同浓度硼(B)、锰(Mn)、锌(Zn)和钼(Mo)的溶液刺激甘草幼苗, 结果发现高浓度下 B 和 Mn 胁迫对甘草酸合成关键酶 SS 基因表达有抑制作用, 而一定浓度 Zn 和 Mo 胁迫对 SS 基因的表达有促进作用。这些研究结果均可以看作是外源性诱导对次生代谢产物合成中关键酶产生影响进而影响次生代谢产物的合成, 但是生物类诱导分子与重金属的作用方式不同, 并且重金属对植物有整体的毒害效应, 因此生物类诱导分子的作用并不能等同于重金属的作用。需要进一步研究重金属与关键酶的作用机制, 才能更深层次探讨不同外源性环境因子对次生代谢产物累积的作用机制。

本研究中 DS 和 P450 两个关键酶基因与三七中主要药效成分并无显著相关性。一方面可能是因为药效成分的合成受到很多因素影响, 是多种酶共同作用的结果; 另一方面, DS 和 P450 可能并不是影响药效成分合成的最主要的关键酶。这 2 种酶均位于 2,3-氧化鲨烯合成之后, 尚缺乏对三七中 2,3-氧化鲨烯合成之前的关键酶, 如 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMGR)、SS、SE 等的研究。Seo 等^[12]研究将 SS 基因导入刺五加愈伤组织细胞

中, 发现三萜皂苷和植物甾醇显著提高。因此, 可以在后续实验中对其他关键酶进行研究, 找到影响药效成分合成的主要关键酶, 并通过基因调控, 提高药效成分量, 在 Cd 污染环境仍然能够获得优质药材。目前 Cd 浓度胁迫对三七的主要药效成分影响不是很大, 在种植三七时, 应重点关注 Cd 量对人体健康所造成的危害, 保证三七的用药安全。

外源性土壤 Cd 对三七主要药效成分合成中关键酶 DS 和 P450 基因表达有影响, 在低质量分数时有促进表达或无明显作用, 高质量分数有明显抑制表达的作用。但是外源性 Cd 胁迫下, DS 和 P450 基因表达与三七主要药效成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁ 以及总皂苷并未表现出显著性相关。需要在今后的实验中, 进一步探讨药效成分合成路径中其他关键酶的作用。

参考文献

- [1] 赵云生, 万德光, 陈新, 等. 五环三萜皂苷生物合成与调控的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 327-330.
- [2] 赵灿, 郭丽娜, 彭玉帅, 等. 三七总皂苷生物合成的关键酶及其调控研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2954-2965.
- [3] 李航, 朱长生, 谭显龙, 等. 云南金顶超大型铅锌矿床岩(矿)石中镉的分布及富集特征 [J]. 矿物学报, 2007, 27(z1): 381-382.
- [4] 韩小丽, 张小波, 郭兰萍, 等. 中药材重金属污染现状的统计分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2041-2048.
- [5] Zhu M, Jiang Y, Cui B, et al. Cadmium accumulation in *Panax notoginseng*: levels, affecting factors and the non-carcinogenic health risk [J]. *Enviro Geochem Health*, 2016, 38(2): 423-435.
- [6] 冯光泉, 刘云芝, 张文斌, 等. 三七植物体中重金属残留特征研究 [J]. 中成药, 2006, 28(12): 1796-1798.
- [7] 朱美霖, 陈中坚, 姜阳, 等. 外源土壤 Cd 胁迫对三

- 七富集及其药效成分的影响 [J]. 中成药, 2014, 36(2): 342-347.
- [8] Hu F, Zhong J. Jasmonic acid mediates gene transcription of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax notoginseng* treated with chemically synthesized 2-hydroxyethyl jasmonate [J]. *Process Biochem*, 2008, 43(1): 113-118.
- [9] 牛云云, 朱孝轩, 罗红梅, 等. 三萜皂苷合成生物学元件的初步开发: 三七鲨烯环氧酶编码基因克隆及表达模式分析 [J]. 药学报, 2013, 41(2): 211-218.
- [10] 卢虹玉, 刘敬梅, 张海超, 等. 乌拉尔甘草转鲨烯合成酶基因毛状根系研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1890-1893.
- [11] 梁新华, 栾维江, 梁军, 等. 硼等 4 种元素对甘草酸生物合成关键酶基因表达的 RT-PCR 分析 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2351-2353.
- [12] Seo J, Jeong J, Shin C, *et al.* Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(8): 869-877.