

## • 药材与资源 •

## 生态因子对人参皂苷合成及其关键酶基因表达的影响

杨林林, 张涛, 杨利民\*, 韩梅

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

**摘要:** **目的** 研究生态因子和人参皂苷合成关键酶表达对人参皂苷合成、积累的影响。**方法** 以人工栽培的 4 年生人参为研究对象, 用实时荧光定量 PCR 法对在不同生长期根组织中 8 个关键酶基因 (HMGR、FPS、SS、SE、DS、 $\beta$ -AS、CYP82D47、CYP716A47) 表达量进行测定; 采用 HPLC 法测定根中 8 种单体皂苷 (人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rf、Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd) 的量; 以小型气象站对人参样地气象数据进行采集; 采用 SPSS 软件进行相关性分析。**结果** 人参皂苷合成关键酶基因在人参皂苷积累的重要时期 (开花期至果熟期) 的表达高于果后参根生长期和枯萎期, 人参皂苷合成关键酶基因的表达相互影响, 协同增减, 人参根组织中关键酶基因的表达对人参皂苷积累多表现出了正相关关系; 人参根中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、Re、Rc 量较高, 8 种单体皂苷量动态变化趋势并不相同; 温度、光合有效辐射、土壤水势是影响根部人参皂苷合成的重要生态因子, 温度与人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rd 显著负相关 ( $P < 0.05$ ), 光合有效辐射对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的生成有显著的促进作用 ( $P < 0.05$ ), 土壤水势与人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 显著负相关 ( $P < 0.05$ ); 灰色关联度分析结果表明温度、光合有效辐射、相对湿度是影响人参皂苷量的主导生态因子, 人参皂苷合成关键酶基因的表达是次要因子, 在生态因子主导下人参皂苷合成关键酶基因调控人参皂苷的合成与积累。生态因子与关键酶基因的表达共同调控了人参皂苷的合成, 对人参皂苷的积累有重要影响。**结论** 明确了人参皂苷合成关键酶基因表达和人参皂苷量在人参中的动态变化, 为人参皂苷合成生理生态机制的明晰及对人参药材质量的调控提供了理论依据。

**关键词:** 人参; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rf; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 人参皂苷 Rb<sub>2</sub>; 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>; 人参皂苷 Rc; 人参皂苷 Rd; 生态因子; 相关性; 灰色关联度

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)20-4296-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.026

**Effects of ecological factors on ginsenosides synthesis and its key enzyme genes expression**

YANG Lin-lin, ZHANG Tao, YANG Li-min, HAN Mei

College of Chinese Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Abstract: Objective** To explore the effect of ecological factors and the expression of key enzyme genes on the synthesis and accumulation of ginsenosides. **Methods** Cultivated four-year-old ginseng were used as test materials, the expression of key enzyme genes (HMGR, FPS, SS, SE, DS,  $\beta$ -AS, CYP82D47, CYP716A47) in the biosynthesis of ginsenosides of roots in different growth periods was determined by real-time quantitative PCR, determination of the content of eight ginsenosides (ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re, Rf, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd) in roots by HPLC, the meteorological data were collected by a small weather station, correlation analysis was performed with SPSS. **Results** The expression of key enzyme genes in the period of flowering to fruit ripening was higher than the root growing after fruit period and the withering period, the expression of key enzyme genes involved in the synthesis of ginsenosides was influenced by each other, and the expression of key enzyme genes in ginseng roots showed a positive correlation with the accumulation of ginsenosides; The contents of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Re, and Rc were higher in the roots of ginseng, eight kinds of monomer ginsenosides content dynamic changes trend is different; Temperature, photosynthetically active radiation, soil water potential are important ecological factors for ginsenosides synthesis in roots, temperature was significantly negatively correlated with ginsenoside Rb<sub>1</sub> and Rd ( $P < 0.05$ ), PAR can significantly promote the formation of ginsenoside Rg<sub>1</sub> ( $P < 0.05$ ), soil water potential was significantly negatively correlated with ginsenoside Rb<sub>1</sub> ( $P < 0.05$ ); Grey correlation analysis results showed that the major ecological factors that influenced ginsenosides content in ginseng roots were temperature, PAR and relative humidity, the grey correlation between the expression of the key enzyme genes with the content of ginsenosides is less than ecological factors with

收稿日期: 2017-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270371); 国家中药材产业技术体系 (CARS-21); 吉林省重大科技成果转化项目 (20170307009YY)

作者简介: 杨林林 (1992—), 男, 博士研究生, 研究方向为植物生态学和分子生物学。E-mail: 731522990@qq.com

\*通信作者 杨利民 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源生态与药材质量调控研究。E-mail: ylmh777@126.com

the content of ginsenosides, under the guidance of ecological factors, the expression of the key enzyme genes regulate the synthesis and accumulation of ginsenosides. **Conclusion** The dynamic changes of the expression of key enzyme genes and the content of ginsenosides in ginseng were determined, it provides a theoretical basis for elucidating the physiological and ecological mechanism of ginsenoside synthesis and the quality control of *Radix Ginseng*.

**Key words:** *Panax ginseng* C. A. Mey.; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Re; ginsenoside Rf; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; ginsenoside Rb<sub>2</sub>; ginsenoside Rb<sub>3</sub>; ginsenoside Rc; ginsenoside Rd; ecological factors; correlation coefficient; grey correlation

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 为五加科人参属多年生草本宿根植物, 药材人参是其干燥根及根茎<sup>[1]</sup>, 其有效成分人参皂苷属于三萜类化合物<sup>[2]</sup>, 根据其苷元的差异可以分为齐墩果烷型人参皂苷和达玛烷型人参皂苷。达玛烷型人参皂苷根据 C-6 位上是否有羟基被分为原人参二醇型皂苷 (protopanaxadiol, PPD, 主要有人参皂苷 Ra<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、Rc、Rd 等) 和原人参三醇型皂苷 (protopanaxatriol, PPT, 主要有人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rf、Rg<sub>2</sub> 等)<sup>[3-5]</sup>。

人参药材中药效成分人参皂苷的形成受植物体内合成通路中关键酶基因表达的调控, 而植物生长所处的环境又影响着关键酶基因的表达<sup>[6]</sup>。人参皂苷生物合成途径的分子调控机制已经取得较大进展, 其生物合成途径包括多部酶促反应<sup>[7-8]</sup>, 关键酶有 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)<sup>[9]</sup>、法尼基焦磷酸合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPS)<sup>[10]</sup>、鲨烯合成酶 (squalene synthase, SS)<sup>[11]</sup>、鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE)<sup>[12]</sup>、达玛烷二醇合成酶 (dammarenyldiol synthase, DS)<sup>[13]</sup>、β-香树素合成酶 (β-amyrin synthase, β-AS)<sup>[14]</sup>、细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450)<sup>[15]</sup>、糖基转移酶 (glycosyltransferase, GT) 等<sup>[16-17]</sup>。虽然已经从人参皂苷合成途径中发掘出来多个关键酶基因, 但这些基因的表达对皂苷合成的调控机制尚不清晰, 有关生态因子对人参皂苷合成关键酶基因表达影响的研究还比较少。

本实验以 4 年生人参根组织部位为材料, 并选择已经得到功能验证的 8 个人参皂苷合成关键酶基因 (HMGR、FPS、SS、SE、DS、β-AS、CYP82D47、CYP716A47), 使用荧光定量 PCR 仪对其在人参不同生长时期中的相对表达量进行测定, 用高效液相色谱仪测定了人参根中 8 种单体人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rf、Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub>、Rc、Rd 在不同生长时期的量变化, 用小型气象站采集人参样地气象数据 (温度、光合有效辐射、土壤水势、降雨量、空气相对湿度), 分析了生态因子对人参皂苷积累及其关键酶基因表

达的影响, 以期明确人参皂苷生物合成的生理生态机制, 为指导人参栽培和人参药材质量的提高提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

4 年生人参于 2016 年 5 月末至 9 月末取自吉林省抚松县松江河林业局板石河林场人参产业技术与示范抚松基地 (N: 42°07'33.80", E: 127°11.25"), 田间取样采用 5 点取样法, 每个生长时期均采集固定田垄的人参样品 10 株, 经吉林农业大学韩梅教授鉴定均为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey., 品种为“大马牙”。采集时间和生长时期分别为 5 月 30 日 (展叶期)、6 月 12 日 (开花初期)、6 月 22 日 (盛花期)、7 月 3 日 (绿果初期)、7 月 13 日 (绿果期)、8 月 5 日 (红果期)、8 月 18 日 (果熟期)、8 月 31 日 (果后参根生长期 I)、9 月 13 日 (果后参根生长期 II)、9 月 29 日 (枯萎期)。采集后根据人参生长状况、鲜质量大小等条件筛选得到各生长时期个体差异较小、无病虫害、长势良好的 4 株人参用于下一步实验, 实验所用部位为人参根组织。

### 1.2 试剂与仪器

多糖、多酚植物总 RNA 提取试剂盒、BioTeke super RT Kit cDNA 合成试剂盒购于长春百金有限公司, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 荧光染料等购于长春海灵科贸有限公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯, Fisher Scientific), 甲醇 (萃取剂)、其他试剂均为国产分析纯。小型气象站 (HOBO<sup>®</sup>, 美国); ProFlex<sup>™</sup> 梯度 PCR 扩增仪 (Applied Biosystems 公司, 美国); Mx3000P 荧光定量 PCR 仪 (美国 Aligent 公司); MDF-382E 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司); Heraeus Fresco 21 微量离心机 (美国 Thermo 公司); NanoDrop 2000 核酸/蛋白定量仪 (美国 Thermo 公司); SIM-F140 制冰机 (日本 Sanyo 公司); 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); SMART-N 纯水机仪 (上海康雷分析仪器有限公司); DL-820E 智能超声波清洗器 (上海之信仪器有限公司); AU220 电子天平 (日本岛津公司)。

1.3 方法

1.3.1 气象数据的采集 于 2016 年 5 月 30 日将 HOBO® 小型气象站安装于吉林省抚松县松江河采样地进行 24 h 数据采集, 每 0.5 h 收集数据 1 次, 包括温度、降雨量、光合有效辐射、水势、相对湿度等。

1.3.2 人参样品的处理 将参地采集的新鲜人参置于冰盒中保鲜, 带回实验室后小心用净水冲刷除去泥沙, 用吸水纸轻轻吸去人参外表的水分, 拍照记录后将根组织分别切成小块并分装于冻存管, 使用液氮对样品进行快速冷冻, 贮存于-78 °C 超低温冷藏箱以用于后续实验。将剩余清洗干净的人参根组织置于烘箱中低温烘干至恒定质量, 用粉碎机磨成

细粉, 用于人参皂苷测定。

1.3.3 人参根组织总 RNA 的提取 取人参根组织样品在液氮中研磨成细粉, 根据多糖、多酚植物总 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取总 RNA, 采用 NanoDrop 2000 检测仪测定 RNA 浓度, 并对提取得到的总 RNA 完整性进行检测。采用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA, 并于-20 °C 保存备用。

1.3.4 引物设计 根据 GenBank 中已公布的 HMGR、FPS、SS、SE、DS、β-AS、CYP82D47、CYP716A47、Cyclophilin 基因的 cDNA 序列, 设计荧光定量 PCR 特异引物, 其序列见表 1。

表 1 相对定量荧光 PCR 引物  
Table 1 Primers of relative quantitative PCR

基因	登录号	序列 (5'→3')	扩增长度/bp
HMGR	KJ939263	TTGCGGGTCCATTGCTGCT; CTCTGGTCATCCCATCTTTTA	152
FPS	DQ087959	CAAGAAGCATTTCGACAA; CTCTCCTACAAGGGTGGTGA	118
SS	KJ939264	GGACTTGTTGGATTAGGGTTG; ACTGCCTTGGCTGAGTTTTTC	142
SE	KJ939265	GGACTTAACTGAGCAAGAGCCG; AGGGGTAAGAAAGCCTGGTG	168
DS	KJ939266	ACCGCCGTTGAGATTAGATG; ATAGGGCAATGATAAGGGGAG	175
β-AS	KJ939267	AAAGCTCTGCAGACAACCATG; ATCTGGGATCCTTGCAAGGTG	135
CYP82D47	JN604545	CTCCACCGAGACCCGATAA; GCAGAGTAGCCAGCACCAAGT	186
CYP716A47	JN604536	TCACCTTCGTTCTCAACTATC; TCTTCTCAAATCCTCCCAAT	125
Cyclophilin	KF699321	CAGGCAAAGAAAAAGTCAAGTG; AAAGAGACCCATTACAATACGC	110

1.3.5 人参皂苷合成相关关键酶基因相对表达量的测定 分别以不同生长时期的 4 年生人参根组织 cDNA 为模板, 根据表 1 中各基因的引物序列, 分别对人参 HMGR、FPS、SS、SE、DS、β-AS、CYP82D47、CYP716A47 基因进行 RT-PCR 扩增, 重复 3 次, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析结果。RT-PCR 反应的内参基因为人参亲环蛋白 Cyclophilin 基因<sup>[18]</sup>, 不同时期表达量以 5 月 30 号人参根中表达量为对照。RT-PCR 反应体系: 灭菌水 7.5 μL, SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL, 引物各 0.5 μL, 50×ROX Reference Dye II 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, 总计 20 μL。RT-PCR 反应程序: 94 °C 预变性 30 s; 45 个循环 (94 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s)。

1.3.6 人参根中 8 种单体皂苷测定 精密称取不同生长时期的人参样品 1.000 g, 加入 30 mL 甲醇超声提取 30 min, 重复提取 3 次后合并滤液, 使用旋转蒸发仪 50 °C 挥干甲醇, 用甲醇溶解人参皂苷并定容至 10 mL 量瓶, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后取供

试液样品 20 μL 进样检测。色谱条件<sup>[19]</sup>: 依利特 Hypersil ODS2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 梯度洗脱条件见表 2, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 柱温 25 °C。测定 8 种单体皂苷的峰面积, 以峰面积为横坐标 (X), 质量分数为纵坐标 (Y), 根据文献报道方法<sup>[19]</sup>绘制线性方程 (人参皂苷 Rg<sub>1</sub>: Y=351.833 31 X+3.955 187 1, R<sup>2</sup>=0.999 50; 人参皂苷 Re: Y=356.394 27 X+11.971 065, R<sup>2</sup>=0.998 71; 人参皂苷 Rf: Y=413.163 128 X+4.721 636 1, R<sup>2</sup>=0.999 52; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>: Y=301.401 75 X+3.551 696 8; R<sup>2</sup>=0.999 59; 人参皂苷 Rc: Y=346.032 171 X+1.727 593 6, R<sup>2</sup>=0.999 50; 人参皂苷 Rb<sub>2</sub>: Y=356.164 732 X-0.409 059 8, R<sup>2</sup>=0.999 69; 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>: Y=368.156 592 X+1.874 801 6, R<sup>2</sup>=0.999 55; 人参皂苷 Rd: Y=443.806 238 X+5.075 217 1, R<sup>2</sup>=0.999 44), 并计算各成分质量分数。

1.3.7 数据分析 将获得的数据采用 SPSS 19.0 软件进行处理及 Pearson 相关性分析, 采用 DPS 7.05

表 2 梯度洗脱条件

时间/min	乙腈体积分数/%	水体积分数/%
0	19	81
24	22	78
26	26	74
30	32	68
50	34	66
50.1	80	20
65	80	20

表 3 采样地各生长时期生态因子

Table 3 Ecological factors at different growth stages in sample plot

生长期	温度/°C	光合有效辐射/ $\mu\text{e}$	水势	降雨量/mm	相对湿度
展叶期	14.852	525.303	-0.178	19.717	0.649
开花期	15.536	400.737	-0.185	49.461	0.784
盛花期	16.456	344.278	-0.138	69.465	0.824
绿果初期	18.675	476.737	-0.101	26.405	0.704
绿果期	20.198	402.559	-0.128	31.277	0.827
绿果末期	21.659	363.965	-0.150	53.674	0.851
红果期	22.116	479.881	-0.263	10.002	0.823
果熟期	19.701	376.512	-0.289	65.394	0.856
果后参根生长期 I	15.143	306.020	-0.290	106.323	0.869
果后参根生长期 II	13.798	316.317	-0.289	22.937	0.867
枯萎期	12.396	292.578	-0.288	5.250	0.780

均光合有效辐射较高的时期是展叶期、绿果初期和红果期，其日均光合有效辐射分布达到了 525.303、476.737、479.881  $\mu\text{e}$ ；土壤水势较高的时期是绿果初期，而从果熟期开始土壤水势一直保持在一个较低的水平；采样地降雨量差异很大，果后参根生长期 I 降雨量为 106.323 mm，是整个生长时期降水最丰富的时期，而整个枯萎期降雨量仅 5.250 mm；相对湿度在大部分时期都高于 0.780，只有在展叶期和绿果初期相对湿度分别为 0.649 和 0.704。

## 2.2 根组织总 RNA 提取结果

将提取的人参根组织的总 RNA 进行浓度和纯度检测，不同时期人参根组织总 RNA  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.80~2.10，质量浓度在 111~328 ng/ $\mu\text{L}$ ，表明总 RNA 的质量较高，可用于下一步实验。

## 2.3 关键酶基因表达量的测定

利用实时荧光定量 PCR 方法，以人参 Cyclophilin 作为内参基因，检测 4 年生人参根组织中 HMGR、FPS、SS、SE、DS、 $\beta$ -AS、CYP82D47、CYP716A47 基因在人参不同生长时期的表达量，结果见图 1。4 年生人参根中 HMGR 基因的表达量在不同生长时期存在明显差异。人参 HMGR 基因在根中表达量先降低至较低的水平，然后有所升高，

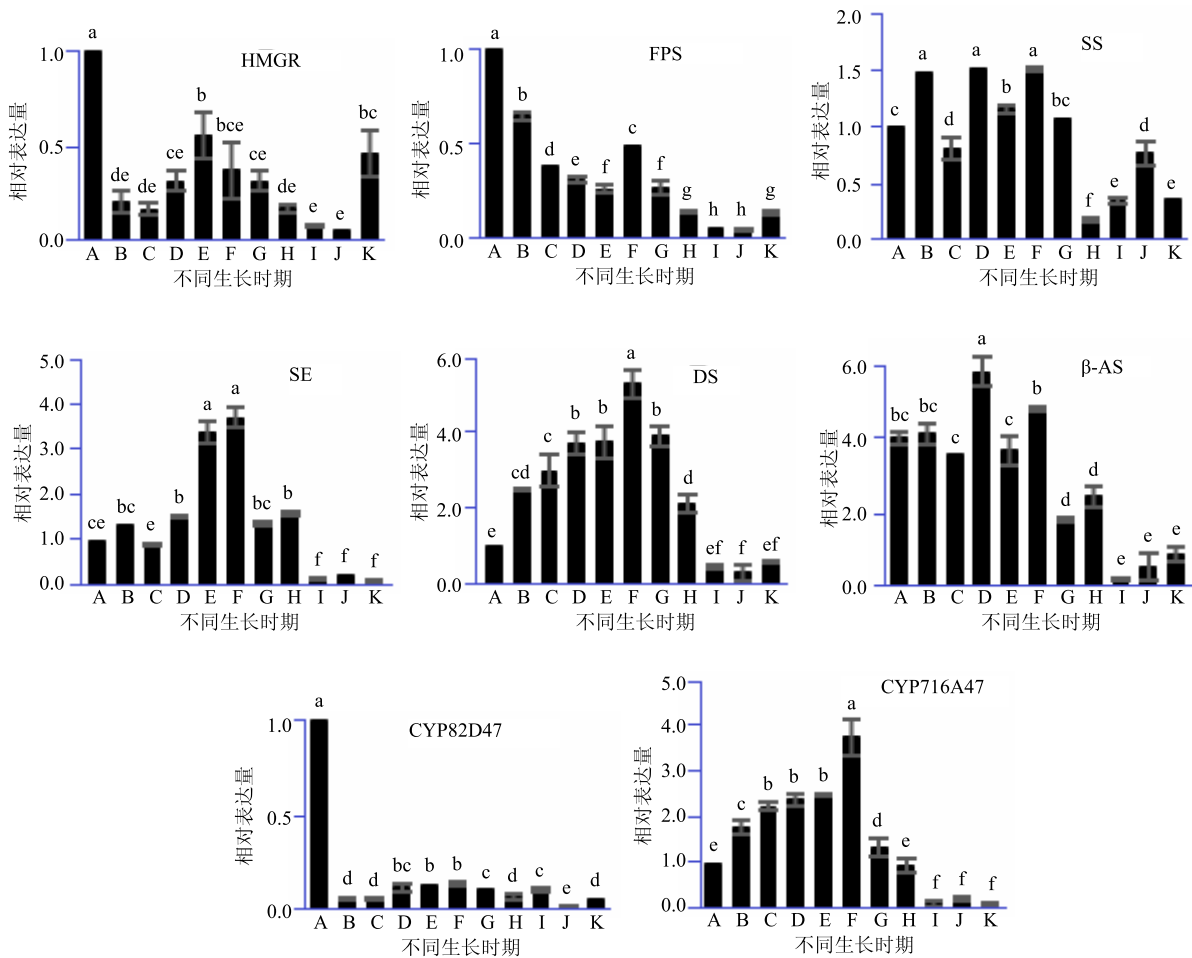
进行灰色关联度计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 人参采样地气象数据

将小型人工气象站采集的气象数据统计平均值，人参采样地各生长时期生态因子差异见表 3，该样地生态因子在不同生长时期变化明显。人参整个生长阶段采样地最低温度为 -4.820  $^{\circ}\text{C}$ ，最高温度 32.760  $^{\circ}\text{C}$ 。8 月 5 日红果期平均温度最高为 22.116  $^{\circ}\text{C}$ ，枯萎期平均温度最低为 12.396  $^{\circ}\text{C}$ ；日

从 7 月 13 日绿果期到 9 月 13 日果后参根生长期 II 不断降低，在果后参根生长期表达能力相对较弱，但在 9 月 29 日枯萎期表达量有所回升。在不同生长时期中人参 FPS 基因在根中的表达为一直降低的趋势，虽然在 7 月 24 日绿果末期有所回升，但整体的表达量仍在降低，果后参根生长期表达量仅为展叶期的十分之一左右。人参 SS 基因在根中的表达量从 5 月 30 日展叶期到 8 月 5 日红果期变化不大，到 8 月 18 日果熟期降低为最低值，果熟期表达量仅有表达量最高时期（开花初期、绿果初期、绿果末期）的八分之一，而果后参根生长期其表达量有所回升。人参 SE 基因在根中表达量从 5 月 30 日展叶期开始逐渐升高，在 7 月 24 日绿果末期达到最大值，表达量是展叶期的 3.6 倍，而后逐渐降低，在 8 月 31 日果后参根生长期 I 之后人参根中 SE 基因几乎不表达。人参 DS 基因在根中表达量呈先增高后降低的趋势，在 7 月 24 日绿果末期表达量最高达到展叶期的 5 倍，而果后参根生长期表达量只有展叶期的一半。人参  $\beta$ -AS 基因在根中的表达量是 7 月 3 日绿果初期最高，从 7 月 3 日绿果初期开始直到 8 月 31 日果后参根生长期 I 呈不断降低的趋势，在果后期人参  $\beta$ -AS 基因的表达处于较低水平。人参 CYP82D47 基因在根中表达并不活跃，整个生长时



A-展叶期 B-开花期 C-盛花期 D-绿果初期 E-绿果期 F-绿果末期 G-红果期 H-果熟期 I-果后参根生长期 I J-果后参根生长期 II K-枯萎期, 不同字母代表差异显著,  $P < 0.05$ , 下同

A-leaf-expansion period B-flowering period C-full flowering period D-initial green fruiting period E-green fruit period F-end of green fruit period G-red fruit period H-fruit mature period I-root growth period after fruit mature I J-root growth period after fruit mature II K-withering period, different letters means  $P < 0.05$ , same as below

图 1 关键酶基因荧光定量 PCR 表达分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Expression analysis of key enzyme genes by real-time PCR ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

期根中的表达都处于一个非常低的水平。推测人参 CYP82D47 基因可能存在组织特异性, 根部并非人参 CYP82D47 基因表达的活跃部位。人参 CYP716A47 基因与人参 CYP82D47 基因虽然同属于细胞色素超基因家族, 但是它的表达模式与 CYP82D47 基因完全不同, 人参 CYP716A47 基因在根中表达有明显的先增高后降低的趋势, 从 5 月 30 日展叶期开始增高, 在 7 月 24 日绿果末期表达量达到峰值, 是展叶期的 3.7 倍, 从绿果期开始不断降低直到果后参根生长期根中几乎不表达。

#### 2.4 人参皂苷的测定结果

4 年生人参根中 8 种单体人参皂苷量变化如图 2 所示, 人参根中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、Re、Rc 量较高,

而质量分数最低的是人参皂苷 Rb<sub>3</sub>。8 种单体皂苷在人参的整个生长时期变化趋势并不相同: 人参根中人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 量整体是缓慢降低的趋势, 最大值在展叶期和开花期约 0.844 0%, 最小值在果后参根生长期和枯萎期约 0.420 9%; 人参根中人参皂苷 Re 变化不大, 人参皂苷 Re 量在 0.5% 左右浮动, 其最小值出现在盛花期仅 0.384 5%; 人参皂苷 Rf 量在 0.1%~0.2%, 整体变化不大; 在人参生长前期, 从 5 月 30 日展叶期至 7 月 13 日绿果期, 人参根中人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的量缓慢降低, 最低时量为 0.403 9%。人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 在根中的量在 8 月 5 日红果期最高, 达到 0.966 4%, 之后随着人参营养生长的开始, 根中人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 缓慢降低到 0.530 5% 左右; 人参皂苷 Rc 变化趋势呈先降低再

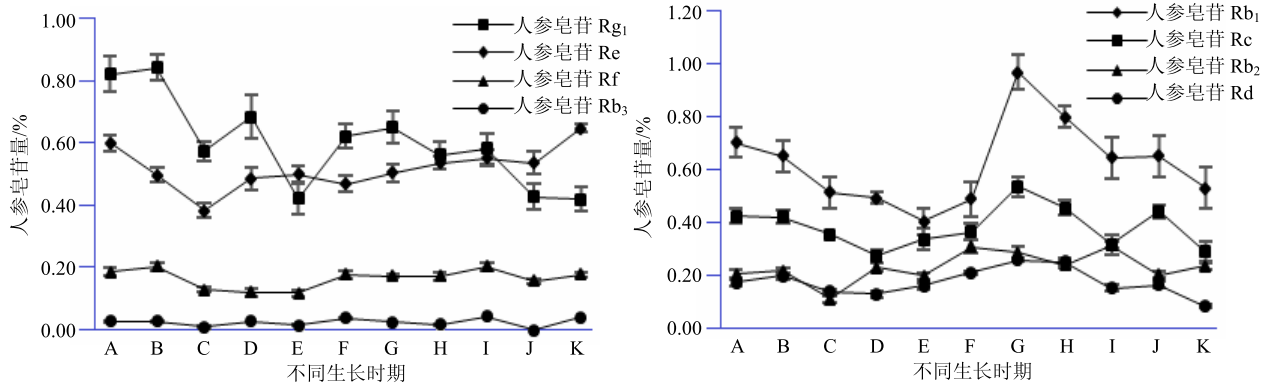


图 2 不同生长时期人参根中人参皂苷量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Content of ginsenosides in ginseng roots at different growth time ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

增加的趋势,在 8 月 5 日红果期达到最大 0.536 2%, 随后人参皂苷 Rc 量逐渐降低; 人参根中人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 量在整个生长时期中变化不大, 在 0.111 3%~0.315 5%浮动; 人参根中人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 量不高, 人参生长的前期人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 在 0.2%左右, 而到了果后参根生长期根中人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 量显著增加, 在 8 月 31 日果后参根生长期 I 可以达到 0.315 5%; 人参根中人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 含量仅 0.02%左右, 处于极低水平; 人参根中人参皂苷 Rd 量在 0.082 6%~0.257 7% 浮动, 从 7 月 3 日绿果期开始一直到 8 月 5 日红果期, 人参根中人参皂苷 Rd 量逐渐增加, 在 8 月 5 日红果期达到最大值 (0.257 7%), 随后人参皂苷 Rd 在根中的量逐渐降低, 在 9 月 29 日枯萎期降到最低 (0.082 6%)。

### 2.5 人参根中关键酶基因表达与生态因子和人参皂苷量的相关性分析

人参不同生长时期生态因子与人参根中人参皂苷量相关性分析结果见表 4, 温度与人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rd 的量显著负相关 ( $P < 0.05$ ), 与三醇型人参皂苷和单体人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>3</sub> 关系不大, 除此之外温度与其他皂苷的量均为负相关, 但未达到显著水平; 光合有效辐射对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的生成有显著的促进作用 ( $P < 0.05$ ), 而与其他皂苷的相关性并未达到显著水平, 因为光合有效辐射并未直接作用于根部, 对人参根部皂苷的形成起间接作用; 土壤水势与人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 显著负相关 ( $P < 0.05$ ), 土壤水势对大多数皂苷并未达到显著影响, 但对于人参皂苷的合成起了抑制作用, 说明适当的降低土壤水势, 适宜的干旱可提高人参中次生代谢产物人参皂苷的合成; 降雨和空气相对湿度并不直接作用到根部, 因此它们对根部人参皂苷的合成并没有显著影响。

表 4 不同生长时期生态因子与根中皂苷量的相关性

Table 4 Correlation of ecological factors with ginsenosides in roots at different growth time

人参皂苷	相关系数				
	温度	光合有效辐射	水势	降雨	相对湿度
Rg <sub>1</sub>	0.207	0.666*	0.334	0.075	-0.584
Re	-0.457	-0.056	-0.583	-0.363	-0.281
Rf	-0.423	-0.119	-0.575	0.239	0.058
Rb <sub>1</sub>	-0.757*	0.316	-0.605*	-0.092	0.065
Rc	-0.620	0.339	-0.377	-0.190	0.172
Rb <sub>2</sub>	-0.472	-0.022	-0.370	0.152	0.233
Rb <sub>3</sub>	0.026	-0.023	-0.068	0.168	-0.183
Rd	-0.719*	0.363	-0.166	0.123	0.291

\*相关性显著,  $P < 0.05$ , \*\*相关性极显著  $P < 0.01$ , 下同

\*correlation is significant ( $P < 0.05$ ); \*\*correlation is very significant ( $P < 0.01$ ), same as below

人参根中关键酶基因表达量与人参皂苷量相关性分析结果见表 5, 人参 FPS 基因的表达与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的量呈极显著正相关 ( $P < 0.01$ ), FPS 基因是人参皂苷生物合成途径中的关键元件之一, 提高 FPS 基因表达量可有效提高人参皂苷量; 人参 SS、SE 基因位于人参皂苷合成途径的中游, 因此与人参皂苷量并未表现出显著的相关性; 人参 DS 基因根部的表达显著抑制了根部人参皂苷 Re 的合成 ( $P < 0.05$ ), 前人研究发现 DS 基因可促进达玛烷二醇的合成, 而人参皂苷 Re 是三醇型人参皂苷, 因此推测 DS 基因对三醇型人参皂苷的合成有抑制作用, 对二醇型人参皂苷的合成有促进作用; 人参 CYP82D47 和 CYP716A47 基因位于人参皂苷生物合成途径的下游, 但是它们各自发挥着不同的功能, CYP82D47 基因对人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 的合成表现出

了正向影响, CYP716A47 基因则显著抑制了人参皂苷 Re 的合成 ( $P < 0.05$ ), 且对人参皂苷 Rf、Rb<sub>1</sub> 的合成也有抑制作用。总体来说人参皂苷的生物合成是受多个关键酶共同调控的结果, 正因为这样 8 个人参皂苷合成关键酶基因并未均表现出与皂苷量的显著相关性关系。人参不同生长时期生态因子与人参根中关键酶基因表达量的相关性分析结果见表 6, 温度、光合有效辐射、土壤水势对 8 种关键酶基因的表达起促进作用: 温度对 SS 基因的表达有显著的促进关系 ( $P < 0.05$ ); 光合有效辐射可显著提高 FPS、CYP82D47 基因的表达量 ( $P < 0.05$ ); 土壤水势对人参根部关键酶基因的表达促进作用最明显, HMGR、SS、 $\beta$ -AS、CYP716A47 基因的表达与土壤水势表现出了极显著的相关性 ( $P < 0.01$ ), DS 基因的表达与土壤水势有显著的相关性 ( $P < 0.05$ ), 说明提高土壤水势对人参根部关键酶基因的表达有显著的促进作用, 适当提高含水量可能是提

高人参药材质量的重要手段之一。降雨、相对湿度则与 8 种关键酶基因的表达表现出了负相关的关系: 降雨对人参根中 8 种关键酶基因的表达仅表现出了微弱的抑制作用, 空气相对湿度的提高显著抑制 FPS、CYP82D47 基因的表达 ( $P < 0.05$ ), 降雨、相对湿度并不直接作用于人参根组织, 因此它们对人参根部关键酶基因表达的影响较小。

### 2.6 人参根中关键酶基因表达与生态因子和人参皂苷灰色关联分析

人参药材质量的形成与生态因子和关键酶基因表达之间关系密切, 但许多因素之间的关系并不明朗, 用灰色关联分析系统中主行为因子与相关行为因子的关系的密切程度, 从而判断引起植物发展的主要因素和次要因素, 其结论可靠<sup>[20]</sup>, 符合本研究要求。以灰色关联度评价各生态因子与关键酶基因表达对人参药效成分量的影响, 结果显示出一定的规律。

表 5 不同生长时期根中关键酶基因表达与皂苷量相关性

Table 5 Correlation of gene expression and ginsenosides in roots at different growth time

人参皂苷	相关系数							
	HMGR	FPS	SS	SE	DS	$\beta$ -AS	CYP82D47	CYP716A47
Rg <sub>1</sub>	0.541	0.790**	0.499	0.039	0.182	0.541	0.512	0.234
Re	-0.481	-0.034	-0.448	-0.417	-0.667*	-0.481	0.361	-0.699*
Rf	-0.380	0.208	-0.230	-0.315	-0.395	-0.380	0.205	-0.422
Rb <sub>1</sub>	-0.383	0.003	-0.278	-0.337	-0.181	-0.383	0.130	-0.445
Rc	-0.196	0.156	-0.025	-0.002	0.043	-0.196	0.135	-0.144
Rb <sub>2</sub>	-0.221	-0.213	-0.012	0.154	0.111	-0.221	-0.081	-0.058
Rb <sub>3</sub>	0.013	0.108	0.024	0.023	0.040	0.013	0.117	0.004
Rd	0.077	0.126	0.113	0.384	0.395	0.077	0.010	0.205

表 6 不同生长时期生态因子与根中关键酶基因表达的相关性

Table 6 Correlation of ecological factors with gene expression in roots at different growth time

基因	相关系数				
	温度	光合有效辐射	水势	降雨	相对湿度
HMGR	0.631	0.599	0.906**	-0.106	-0.529
FPS	0.480	0.659*	0.527	-0.183	-0.717*
SS	0.670*	0.536	0.770**	-0.285	-0.363
SE	0.241	0.276	0.599	-0.015	0.099
DS	0.297	0.368	0.658*	-0.052	0.052
$\beta$ -AS	0.631	0.599	0.906**	-0.106	-0.529
CYP82D47	0.182	0.632*	0.204	-0.226	-0.734*
CYP716A47	0.568	0.304	0.832**	0.040	-0.053

表 7 分析了生态因子与人参根中人参皂苷灰色关联度, 光合有效辐射与温度是影响人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 量的主导因子, 灰色关联度分别达 0.796 3 和 0.731 2; 相对湿度和光合有效辐射是影响人参皂苷 Re 量的主导因子, 灰色关联度分别达 0.821 9 和 0.739 9; 相对湿度是影响人参皂苷 Rf 量的主导因子, 灰色关联度达 0.779 7; 相对湿度、光和有效辐射和土壤水势是影响人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 量的主导因子, 灰色关联度分别为 0.731 6、0.704 8 和 0.695 6; 光合有效辐射、温度和相对湿度是影响人参皂苷 Rc 量的主导因子, 灰色关联度分别为 0.783 3、0.750 1 和 0.741 5; 温度和相对湿度是影响人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 量的主导因子, 灰色关联度分别为 0.773 2、0.763 5; 生态因子与人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 量的灰色关联度并不高 (0.488 4~0.573 7), 可能对人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 的合成并不占主导地位; 温度、光合有效辐射和相对湿度是影响人参

皂苷 Rd 量的主导因子, 灰色关联度分别为 0.745 0、0.701 0 和 0.695 7。

表 8 分析结果显示根中人参 SS 基因的表达对

表 7 生态因子与根中人参皂苷灰色关联度

Table 7 Grey correlation degrees between ecological factors and ginsenosides in ginseng roots

人参皂苷	灰色关联度				
	温度	光合有效辐射	水势	降雨	相对湿度
Rg <sub>1</sub>	0.731 2	0.796 3	0.542 0	0.512 3	0.697 6
Re	0.686 2	0.739 9	0.665 5	0.474 6	0.821 9
Rf	0.658 7	0.690 9	0.660 5	0.559 8	0.779 7
Rb <sub>1</sub>	0.673 8	0.704 8	0.695 6	0.516 9	0.731 6
Rc	0.750 1	0.783 3	0.643 2	0.534 3	0.741 5
Rb <sub>2</sub>	0.773 2	0.712 5	0.706 8	0.541 1	0.763 5
Rb <sub>3</sub>	0.551 4	0.571 7	0.573 7	0.488 4	0.568 9
Rd	0.745 0	0.701 0	0.634 5	0.606 4	0.695 7

表 8 根中关键酶基因表达与人参皂苷灰色关联度

Table 8 Grey correlation degrees between gene expression and ginsenosides in roots

人参皂苷	灰色关联度							
	HMGR	FPS	SS	SE	DS	β-AS	CYP82D47	CYP716A47
Rg <sub>1</sub>	0.500 1	0.543 6	0.705 1	0.508 1	0.487 3	0.581 3	0.485 6	0.466 5
Re	0.590 7	0.495 6	0.690 9	0.575 9	0.467 1	0.481 9	0.501 7	0.455 1
Rf	0.531 6	0.507 0	0.679 5	0.519 6	0.450 5	0.487 6	0.504 4	0.462 5
Rb <sub>1</sub>	0.460 2	0.469 3	0.631 8	0.500 9	0.501 5	0.440 8	0.508 2	0.412 3
Rc	0.474 3	0.494 1	0.684 6	0.512 4	0.504 0	0.479 2	0.528 5	0.443 6
Rb <sub>2</sub>	0.564 4	0.512 9	0.653 8	0.579 1	0.498 7	0.472 8	0.496 2	0.459 1
Rb <sub>3</sub>	0.569 5	0.532 8	0.585 5	0.547 9	0.498 4	0.520 1	0.514 6	0.527 0
Rd	0.480 6	0.525 9	0.664 6	0.520 8	0.521 1	0.496 1	0.522 5	0.468 1

人参皂苷量有重要影响, 关联值高于其他基因, 其在根中表达对人参皂苷量的影响要高于其他基因, 但人参 SS 基因的表达与人参皂苷量的灰色关联度值小于生态因子。关键酶基因的表达与人参皂苷灰色关联度小于生态因子, 说明生态因子在影响人参皂苷合成中的主导地位。

### 3 讨论

人参皂苷合成关键酶基因的表达调控了人参皂苷体内生物合成的流向, 而生态因子作为外部因素对人参皂苷的合成也有重要影响。本实验测定了 4 年生人参不同生长期根组织中 8 种单体人参皂苷量以及相关关键酶基因的表达量, 并对人参样地气象数据进行采集, 综合分析了生态因子和人参皂苷合成关键酶基因表达量与人参皂苷量的关系。

温度是影响人参皂苷量的关键生态因子之一<sup>[21]</sup>, 人参喜阴, 过高的温度对人参根组织中的人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rd 有显著影响, 适当的降低温度可有效提高根中的皂苷量。温度对人参根组织中关键酶基因的表达均表现出了促进作用, 但仅对 SS 基因的表达的影响达到显著正相关水平。

光照也是影响植物次生代谢产物的合成与积累的生态因子之一<sup>[22]</sup>, 本研究发现光合有效辐射对根中人参皂苷的积累和关键酶基因表达均表现出了促进作用。适当强度的光照是有效提高人参皂苷积累的手段<sup>[23]</sup>, 但是光照过高可能会造成叶片损伤<sup>[24]</sup>, 应根据实际生产采用适当的遮阴棚来平衡人参不同组织部位对光照的需求。

适度的干旱胁迫能够刺激植物次生代谢产物的



合成与积累<sup>[25]</sup>, 金航等<sup>[26]</sup>研究了三七生长发育过程中各发育阶段气象条件的差异发现降雨量过大不利于三七中皂苷的积累, 唐晓敏<sup>[27]</sup>发现适当的干旱胁迫可提高甘草中甘草酸合成过程中 $\beta$ -AS 和 SE 基因的表达量而使甘草酸量增加。由于本实验所采集人参均为遮荫棚栽培, 降雨对人参皂苷的积累呈较弱的相关关系, 这存在一定的必然性。土壤水势是影响人参皂苷积累以及相关关键酶基因表达的关键水分因子, 土壤水势的作用较为复杂, 人参样地土壤水势直接影响到根组织中皂苷量, 并表现出了抑制效果, 但土壤水势却显著提高了根组织中关键酶基因的表达, 可能是因为这些关键酶基因表达后合成的代谢产物并未最终流向人参皂苷的合成, 这就需要更加深入地研究人参皂苷合成通路中代谢产物的流向, 才能找出影响人参皂苷积累关键因素。

空气相对湿度并未直接作用于根组织, 对人参根组织的影响较小, 此外空气相对湿度对人参根组织中关键酶基因的表达影响不大, 仅对个别基因的表达有显著影响。

人参皂苷合成关键酶基因的表达影响着人参皂苷合成途径中各物质流向, 但目前尚未明确人参皂苷代谢途径究竟如何进行, 人参皂苷合成关键酶基因的表达相互影响, 协同增减, 在根组织中均表现出了高度的相关性, 人参根组织中关键酶基因的表达对人参皂苷积累多表现出了正相关, 人参生长从展叶期开始到果熟期人参皂苷合成关键酶基因表达较为活跃, 而这也正是人参皂苷合成与积累的重要时期。灰色关联度分析结果表明温度、光合有效辐射、相对湿度是影响人参根中人参皂苷量的主导生态因子, 人参皂苷合成关键酶基因的表达与人参皂苷量关联值小于生态因子, 说明在生态因子主导下, 人参皂苷合成关键酶基因调控人参皂苷的合成与积累。随着人参生长发育的进行, 生态因子与关键酶基因的表达共同调控了人参皂苷的合成, 对人参皂苷的积累有重要影响。深入开展人参皂苷合成的生理生态机制研究, 是实现人参药材质量调控的重要手段。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈萍, 权宜淑, 梁俊. 人参与西洋参研究进展 [J]. 基层中药杂志, 2000, 14(1): 58-61.
- [3] 徐静, 贾力, 赵余庆. 人参的化学成分与人参产品的质量评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 199-203.
- [4] Liu G Y, Li X W, Wang N B, *et al.* Three new dammarane-type triterpene saponins from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(10): 865-873.
- [5] 寻晓红. 人参皂甙的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(15): 43-44.
- [6] 焦晓林, 高微微. 环境因子对药用植物三萜皂苷合成影响的研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 398-402.
- [7] 杨金玲, 高丽丽, 朱平. 人参皂苷生物合成研究进展 [J]. 药学学报, 2013, 48(2): 170-178.
- [8] 许晓双, 张福生, 秦雪梅. 三萜皂苷生物合成途径及关键酶的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(11): 2440-2448.
- [9] Abe I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes [J]. *Nat Prod Rep*, 2007, 24(6): 1311-1331.
- [10] Kim O T, Kim S H, Ohyama K, *et al.* Up regulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthase [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 403-411.
- [11] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, *et al.* Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976-984.
- [12] Han J Y, In J G, Kwon Y S, *et al.* Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 36-46.
- [13] Han J Y, Kwon Y S, Yang D C, *et al.* Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarediol synthase gene in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(12): 1653-1662.
- [14] 赵寿经, 侯春喜, 徐立新, 等. 抑制齐墩果烷型人参皂苷合成支路对达玛烷型人参皂苷生产能力的影响 [J]. 吉林大学学报: 工学版, 2011, 41(3): 865-868.
- [15] Han J Y, Kim H J, Kwon Y S. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 52(12): 2062-2073.
- [16] 明乾良, 韩婷, 黄芳, 等. 人参皂苷生物合成途径及其相关酶的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1913-1917.
- [17] 牛云云, 罗红梅, 黄林芳, 等. 细胞色素 P450 在人参皂苷生物合成途径中的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(1): 1177-1183.
- [18] Liu J, Wang Q, Sun M, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Panax ginseng* at different stages of growth and in different

- organs [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112110-e112177.
- [19] 林红梅, 张永刚, 李岳桦, 等. 不同产地人参中 8 种人参单体皂苷含量比较 [J]. 特产研究, 2013, 35(4): 63-66.
- [20] 李 情, 梁宗锁, 董娟娥, 等. 丹参品质与主导气候因子的灰色关联度分析 [J]. 生态学报, 2010, 30(10): 2569-2575.
- [21] 谢彩香, 索凤梅, 贾光林, 等. 人参皂苷与生态因子的相关性 [J]. 生态学报, 2011, 31(24): 7551-7563.
- [22] 贾光林, 黄林芳, 索凤梅, 等. 人参药材中人参皂苷与生态因子的相关性及其人参生态区划 [J]. 植物生态学报, 2012, 36(4): 302-312.
- [23] 徐克章, 张美善, 武志海, 等. 人参不同生育期叶片光合作用变化的研究 [J]. 作物学报, 2006, 32(10): 1519-1524.
- [24] 张治安, 徐克章, 任跃英, 等. 光照条件对参株碳水化合物和人参皂甙含量的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 1994, 16(3): 15-17.
- [25] 王红星, 乔传英, 古红梅. 影响植物次生代谢产物形成的因素 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(35): 11376-11377.
- [26] 金 航, 崔秀明, 朱 艳, 等. 气象条件对三七药材道地性的影响 [J]. 西南农业学报, 2005, 18(6): 825-828.
- [27] 唐晓敏. 水分和盐分处理对甘草药材质量的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.