

• 药材与资源 •

北柴胡不同部位柴胡皂苷含量与其关键酶基因表达量的相关性研究

赵 钰, 杨林林, 韩 梅*, 杨利民*

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 筛选适宜北柴胡 *Bupleurum chinense* 表达分析的内参基因, 并分析不同部位中柴胡皂苷含量与其关键酶基因表达的关系。方法 以北柴胡根、茎、叶、果为实验材料, 利用实时荧光定量 PCR 技术, 选取 Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α 5 个常用的内参基因作为候选, 以筛选到的最适内参基因为参考分析北柴胡基因 ACAT、FPS、HMGR、IPPI、PMD、PMK、SE、SS、 β -AS、UGT1、UGT3、UGT6、UGT8、UGT10、P450-7、P450-12 的组织表达模式, 用 HPLC 法检测柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d 的含量, 并用 SPSS 软件进行相关性分析。结果 以 5 个候选基因 (EF-1 α 、Cyclophilin、Actin、 β -tubulin、 α -tubulin) 中稳定性最好的 EF-1 α 为内参基因, 测定北柴胡 16 个关键酶基因表达量, 表明 ACAT、PMK、IPPI、SS、SE、UGT1、UGT3、UGT6、UGT8 均在地上部分 (茎、叶、果) 表达量最高, HMGR、 β -AS、P450-7、P450-12 在根中表达量高于地上部分, PMD、FPS、UGT10 则组织差异性不明显。以 HPLC 法检测柴胡皂苷含量在根中远高于地上部分 (茎、叶、果)。相关性分析结果显示, 16 个关键酶基因间上游 ACAT、HMGR、PMD、SE 等多与下游 P450-7、P450-12、UGT3、UGT6、UGT8 等表现出了显著正相关 ($P < 0.05$), 表明关键酶基因相互间密切相关, 共同调控柴胡皂苷合成。16 个关键酶基因与柴胡皂苷含量的相关性分析结果显示: HMGR、P450-7、P450-12 与 3 种皂苷总和呈极显著正相关 ($P < 0.01$), β -AS 与 3 种皂苷总和呈显著正相关 ($P < 0.05$), 且 HMGR、 β -AS、P450-7、P450-12 与单体皂苷 a、c、d 含量均呈显著正相关 ($P < 0.05$), 这 4 个基因对于皂苷合成积累有重要影响。结论 柴胡皂苷合成途径中 HMGR、 β -AS、P450-7、P450-12 基因表达与柴胡皂苷合成积累具有一致性, 在调控皂苷合成方面有重要作用。

关键词: 北柴胡; 柴胡皂苷; 关键酶基因; Actin; α -tubulin; β -tubulin; Cyclophilin; EF-1 α

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)10-2433-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.026

Correlation between content of saikosaponin and expression of key enzyme genes in different parts of *Bupleurum chinense*

ZHAO Yu, YANG Lin-lin, HAN Mei, YANG Li-min

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

Abstract: Objective To select reference genes suitable for the expression analysis of *Bupleurum chinense*, and analyze the relationship between the content of saikosaponin and the gene expression of key enzymes in different tissues of *B. chinense*. **Methods** The roots, stems, leaves and fruits of *B. chinense* were used as test materials, and five commonly used internal reference genes of Actin, α -tubulin, β -tubulin, Cyclophilin and EF-1 α were selected as candidates by real-time quantitative PCR. Based on the selected internal reference genes, tissue expression pattern of ACAT, FPS, HMGR, IPPI, PMD, PMK, SE, SS, β -AS, UGT1, UGT3, UGT6, UGT8, UGT10, P450-7 and P450-12 genes in *B. chinense* was analyzed. The content of saikosaponin a, saikosaponin c and saikosaponin d were determined by HPLC, and correlation analysis was performed by SPSS. **Results** The EF-1 α gene with the best stability in the five candidate genes (EF-1 α , Cyclophilin, Actin, β -tubulin, α -tubulin) was selected as the internal reference gene. The expression levels of 16 key enzymes in the roots of *B. chinense* were measured. The results showed that ACAT, PMK, IPPI, SS, SE, UGT1, UGT3, UGT6, and UGT8 were the highest in the aboveground parts, the levels of HMGR, β -AS, P450-7 and P450-12 were higher in the roots than those in the aboveground parts, but PMD, FPS and UGT10 were not significantly different in the tissues. The content of saponins in the root was much higher than that in the aerial parts (stem, leaf and fruit) by HPLC. The results of correlation analysis showed that

收稿日期: 2018-12-13

基金项目: 国家中药材产业技术体系项目 (CARS-21)

作者简介: 赵 钰 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生态学。E-mail: 1461598723@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。E-mail: ylmh777@126.com

韩 梅 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为资源植物生态与质量调控研究。E-mail: hanmei77@sohu.com

16 key enzyme genes in the upstream ACAT, HMGR, PMD, SE and so on were significantly correlated with downstream P450-7, P450-12, UGT3, UGT6 and UGT8 ($P < 0.05$). It showed that the key enzyme genes were closely related to each other and regulated the synthesis of saikosaponin in common. The correlation analysis between the 16 key enzyme genes and the content of saikosaponin showed: HMGR, P450-7, p450-12 and the total of three saponins were significantly positively correlated ($P < 0.01$), and β -AS was significantly correlated with the total content of three saponins ($P < 0.05$), and HMGR, P450-7, P450-12, and β -AS were significantly correlated with the monomer saponins a, c, d ($P < 0.05$). These four genes jointly regulated the synthesis of saikosaponin and had an important effect on the accumulation of saponin. **Conclusion** The HMGR, β -AS, P450-7 and P450-12 genes in the saikosaponin synthesis pathway have a consistent distribution in saikosaponin synthesis and play an important role in the regulation of saponin synthesis.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; saikosaponin; key enzyme genes; Actin; α -tubulin; β -tubulin; Cyclophilin; EF-1 α

北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 是伞形科柴胡属多年生草本植物,《中国药典》2015 年版规定北柴胡或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonnerifolium* Willd. 的干燥根为药材柴胡的基原^[1], 为有发表退热、升举阳气之功效, 常用于解热、抗抑郁、保肝利胆等^[2]。北柴胡的主要药效成分是柴胡皂苷, 在根中含量较高, 地上部分含量极低, 属于齐墩果烷型皂苷^[3], 其中含量较高的有柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d,《中国药典》2015 年版中对柴胡质量的要求为柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 总含量不少于 0.3%。

中药材质量最重要的本质是药效成分含量^[4], 阐明药效成分的合成途径对于实现药材质量的调控, 提高药材资源的开发利用有重要意义。近年来柴胡皂苷合成途径已有初步研究, 植物体内前体物质 3-异戊二烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP) 主要经甲羟戊酸 (MVA) 途径合成, 乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 (ACAT) 催化 2 分子的乙酰辅酶 A (CoA) 合成乙酰乙酰 CoA, 然后在 3-羟基-3-甲基戊二酰乙酰辅酶 A 合成酶 (HMGS) 的作用下再与乙酰 CoA 缩合生成 3-羟基-3-甲基戊二酰乙酰辅酶 A (HMG-CoA), 之后 HMG-CoA 由 3-羟基-3-甲基戊二酰乙酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 催化生成 MVA^[5-6]。MVA 经磷酸甲羟戊酸激酶 (PMK)、二磷酸羟戊酸脱羧酶 (PMD) 等作用形成前体物质 IPP, IPP 在异戊烯基焦磷酸异构酶 (IPPI) 的作用下生成 DMAPP, 此过程中 ACAT、HMGR、PMD、PMK、IPPI 起重要作用。而后 IPP 和 DMAPP 在牻牛儿基焦磷酸合成酶 (GPS) 的催化下缩合生成牻牛儿基焦磷酸 (GPP), GPP 在法尼基焦磷酸合成酶 (FPS) 作用下转化成为法尼基焦磷酸 (FPP)^[7], 2 分子 FPP 由鲨烯合成酶 (SS) 催化生成鲨烯, 再由鲨烯环氧酶 (SE) 作用生成 2,3-氧化鲨烯, 其中 FPS、SS、SE 有重要作用。2,3-氧化鲨烯由 β -香树素合成酶 (β -AS) 合成 β -香树素, 在细胞色素

P450 (CYP450)、糖基转移酶 (UGT) 等修饰后形成齐墩果烷型柴胡皂苷^[8-9], 此过程中 β -AS、P450、UGT 有重要作用。深入开展这些关键酶基因的表达量与北柴胡皂苷含量的相关性研究, 从分子角度诠释皂苷合成途径的调控机制, 是药用柴胡目前研究的重点问题。

实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 已经成为基因组技术的常用方法之一, 其具有灵敏性高、特异性强等优点常用于分析植物的基因表达^[10]。qRT-PCR 的结果会受到 RNA 质量或反转录结果的影响, 需要内参基因作为参照标准。内参基因应该选取在不同的细胞和生理状态下均稳定表达的基因, 适合的内参基因对荧光 PCR 结果分析的准确性和可信度有重要作用^[10], 因此需要选择适合该植物的内参基因。

本研究以北柴胡为实验材料, 选取 Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α 5 个常用内参基因作为候选基因, 筛选最适合北柴胡 qRT-PCR 的内参基因, 在柴胡皂苷合成途径中选择 16 种关键酶基因 (ACAT、FPS、HMGR、IPPI、PMD、PMK、SE、SS、 β -AS、UGT1、UGT3、UGT6、UGT8、UGT10、P450-7、P450-12) 测定在北柴胡根、茎、叶、果中的基因表达量, 通过 HPLC 法测定根、茎、叶、果中柴胡皂苷 a、c、d 的含量。综合分析各关键酶基因表达量的相关性, 以及皂苷含量与关键酶基因表达量的关系, 为北柴胡药材质量调控研究提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品于 2017 年 9 月 3 日取自吉林省长春市吉林农业大学药园, 经吉林农业大学杨利民教授鉴定为北柴胡 *B. chinense* DC.。将完整北柴胡植株装入自封袋, 并放入有冰袋的泡沫箱中带回实验室, 洗净除去泥沙, 用滤纸吸干水分, 将根、茎、叶、果

分离切段混合均匀, 装入冻存管立刻放进液氮中速冻, 随后保存于 -80°C 冰箱中。将剩余北柴胡不同部位在烘箱中 50°C 烘干, 粉碎机磨成粉末保存, 用于北柴胡皂苷含量的测定。

1.2 试剂与仪器

1260 型 Agilent 高效液相色谱仪 (美国 Agilent); SMART-N 纯水机仪 (上海康雷分析仪器有限公司); SB-800 型超声波清洗仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); AUY220 型电子天平 (日本岛津公司); 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒生产自北京百泰克生物技术有限公司; PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、TB GreenTM Premix Ex TaqTM 荧光染料, Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Aligent 公司); MDF-382E 型超低温冰箱、SIM-F140 型制冰机 (日本 SANYO 公司); NanoDrop 2000 型核酸/蛋白定量仪 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 北柴胡内参基因筛选

2.1.1 北柴胡不同部位总 RNA 提取及 cDNA 合成 取 -80°C 保存的北柴胡根、茎、叶、果样品 50~100 mg 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, 用核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度, 并使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒将总 RNA 反转录合成 cDNA, 于 -20°C 保存备用。

2.1.2 内参基因引物设计 参考植物内参基因筛选方面的相关文献, 选择 5 个常用内参基因作为候选基因 (Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、EF-1 α 、Cyclophilin), 根据 Sui 等^[11]已发表的序列用 Primer 5.0 设计引物, 通过 qRT-PCR 检测 5 个候选基因在北柴胡根、茎、叶、果中的表达模式, 筛选其中最合适北柴胡的内参基因。基因特异性引物序列见表 1。

表 1 候选基因引物序列

Table 1 Candidate gene primer sequences

内参基因	序列 (5'→3')
Actin	GGATTCTCGCAGCTTCCATTC; TGCCCGATGGTCAAGTTATC
α -tubulin	TGTTATGCTCACTTGGCAGC; AGATAGCCTGCCCTCAGACA
β -tubulin	ATGTTTCAGGCGCAAGGCTT; TCTGCAACCGGGTCATTTCAT
EF-1 α	GAAGGTGACAACATGATTGAGAGG; TGAAGAGGGAGACGAAGAGGTT
Cyclophilin	AATTCAGGACCGGGAACAAA; CACTACCTGCCCAAACACCA

2.1.3 qRT-PCR 本实验在 Aligent Mx3000P 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系: TB GreenTM Premix ex TaqTM 荧光染料 10 μL , ddH₂O 7 μL , 引物各 1 μL , cDNA 1 μL , 共 20 μL 。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)。每个处理设置 3 个重复, 并以 ddH₂O 代替模板设置阴性对照。

2.1.4 内参基因稳定性评价 分析对比各候选基因在北柴胡不同部位的 C_t 值, 得出各内参基因在北柴胡不同部位的相对基因表达量。在此基础上使用 Delta CT^[12]、BestKeeper^[13]、NormFinder^[14]、geNorm^[15] 4 种软件评价各内参基因的稳定性, 并使用 Ref Finder 综合评估这 4 种软件的结果, 从而筛选出 5 个候选基因中最适合北柴胡不同部位基因表达分析的内参基因。

2.2 柴胡皂苷合成中关键酶基因表达量测定

通过 qRT-PCR 方法, 以 “2.1” 项筛选出的最

适候选基因为内参, 以北柴胡根中表达量为对照, 参考文献方法^[11,16-21], 选择柴胡皂苷合成途径中 16 个关键酶基因 (ACAT、FPS、HMGR、IPPI、PMD、PMK、SE、SS、 β -AS、UGT1、UGT3、UGT6、UGT8、UGT10、P450-7、P450-12) 为目的基因, 测定北柴胡不同部位的基因表达量。反应体系: TB GreenTM Premix Ex TaqTM 荧光染料 10 μL , ddH₂O 7 μL , 引物各 1 μL , cDNA 1 μL , 共 20 μL , 每个反应重复 4 次。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)。目的基因引物序列见表 2。

2.3 北柴胡不同部位中柴胡皂苷含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品柴胡皂苷 a、c、d 10 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇约 7 mL, 振摇使之溶解, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得柴胡皂苷 a、c、d 对照品溶液 (质量浓度为 1 mg/mL)。

表 2 目的基因引物序列

Table 2 Objective gene primer sequences

目的基因	序列(5'→3')	目的基因	序列(5'→3')
ACAT	AGCCCTGAAGGCAGTAATAGA; ACCGATCCCAATGTCATAAA	β-AS	ATGGTATGGGAAC TGGGTGT; ACGCCTTTACGAATGCTTTGA
HMGR	TATAACTGGCGATGTGGTGAAG; GTGGCTATGAAGATTGCAGAAAC	P450-7	GGCATT TTTGGTGT TTAGACG; TCTACAGAATCGGCCTTGA
PMD	TGAATGGGGAGGGAATG; CTGCGTTGAGAAGTGGAATC	P450-12	AATGGGCGATTGTGAAGGGAG; TACGACACGTCAACGAGGCAGA
PMK	AATCCACTGCCAACTTTTCC; GGCTACCCTTACACCGTTTACT	UGT1	AGGGTTTGTCAAGTGGGAAGG; CCTCCTTCTTCCATTGCCTTAG
IPPI	AGGTGACATTCCCTTTGGTG; AGAAGCTTCCTCTGTGCAGC	UGT3	GTTCTTTCTTGGACTGCTGA; TAACACTACGATGCGGTGAAT
FPS	CTCACACACGCAGAGGTCAA; TGGGGATATGGTTGCGAAG	UGT6	CAAAAGATAAAGCCTCACCCC; CATGACTGCAAGACTCCCAAT
SS	GATCCTGCCAATTTCCG; CACGCCTCATTTTCACTACTC	UGT8	GCGACATCCAAGCACCG; GCGAACAATCTCCTCCCACT
SE	ACCTAACAAAACAGGACGGC; CATACGGATGTAGCAGGAAGAA	UGT10	TTGGGTGGGGGCTTGCTAATA; CACTGCTATGTGATTGAGAAC

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取北柴胡根、茎、叶、果粉末各 0.4 g, 加入体积分数 5% 的氨水甲醇溶液, 超声 30 min, 滤过至三角瓶中, 剩余残渣再次加入 5% 氨水甲醇溶液超声 30 min 并滤过, 共重复 3 次, 合并滤液。将柴胡皂苷提取液置于旋转蒸发仪中 40 °C 蒸发浓缩, 最后以甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 制得供试品溶液。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(B)-水(A), 梯度洗脱(0~5 min, 30% A; 5~

10 min, 30%~35% A; 10~20 min, 35%~50% A; 20~25 min, 50%~52% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 200 nm; 进样量 20 μL。

2.3.4 标准曲线的建立 取柴胡皂苷 a、c、d 混合对照品溶液, 依次按比例 1/50、1/20、1/10、1/5、2/5、3/5、4/5、1/1 进行稀释, 得到系列混合对照品溶液。按照“2.3.3”项色谱条件, 依次进样 20 μL, 以峰面积为纵坐标(Y), 溶液质量浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线, 结果线性关系良好, 回归方程见表 3。

表 3 柴胡皂苷 a、c、d 的线性回归分析

Table 3 Regression analysis of saikosaponin a, c, and d

化合物	回归方程	r^2	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
柴胡皂苷 a	$Y=10.186 X+18.554$	0.999 2	5~200
柴胡皂苷 c	$Y=10.906 X+18.08$	0.999 2	5~200
柴胡皂苷 d	$Y=12.594 X+14.128$	0.999 3	5~200

2.3.5 北柴胡皂苷含量测定 分别取北柴胡根、茎、叶、果的供试品 3 份, 按照“2.3.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.3.3”项色谱条件进样 20 μL, 通过回归方程计算其中柴胡皂苷 a、c、d 的含量。

3 结果与分析

3.1 北柴胡不同部位 qRT-PCR 内参基因筛选

利用 qRT-PCR 从 5 种常用的内参基因中筛选出北柴胡的最适内参基因, 5 个内参基因的 C_t 值大

小和波动范围反映出各基因在不同部位的稳定性, 结果见图 1。不同组织中 C_t 值波动最大的是 α-tubulin, 为在 21.63~30.30, 4 者中最不稳定。β-tubulin 的 C_t 值波动范围最小, 集中在 31.66~36.06, 但 C_t 值最高, 不是最合适作内参基因。Cyclophilin 的 C_t 值为最低在 18.32~25.75, 但经检测 Cyclophilin 熔解曲线不是特异性单峰, 不适合做为内参基因。Actin 和 EF-1α 在不同部位中表达

较稳定, Actin 的 C_t 值在 21.53~28.63, EF-1 α 的 C_t 值在 20.68~27.51, EF-1 α 的 C_t 值要低于 Actin, 可能是适合的内参基因。还应对各候选基因稳定性进行评价, 最终确定北柴胡不同部位相对定量分析的最适内参基因。

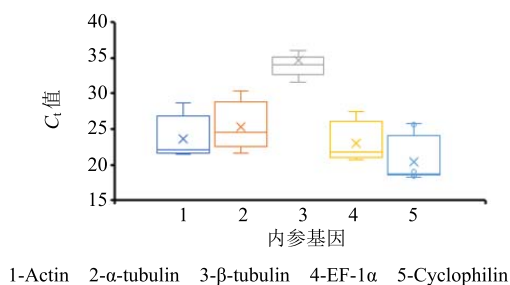


图 1 根、茎、叶、果中各内参基因的平均 C_t 值

Fig. 1 Average C_t value of each reference gene in root, stem, leaf, and fruit

表 4 北柴胡不同部位各候选内参基因表达稳定性排序

Table 4 Stability of candidate gene expression in different parts of *B. chinense*

方法	排序 (评分)
Delta CT	EF-1 α (1.167) > Cyclophilin (1.219) > Actin (1.298) > α -tubulin (1.463) > β -tubulin (2.320)
BestKeeper	β -tubulin (0.928) > EF-1 α (2.260) > α -tubulin (2.392) > Actin (2.475) > Cyclophilin (2.636)
Normfinder	EF-1 α (0.367) > Cyclophilin (0.746) > α -tubulin (0.882) > Actin (0.883) > β -tubulin (2.219)
Genorm	Cyclophilin (0.416) > Actin (0.416) > EF-1 α (0.647) > α -tubulin (0.943) > β -tubulin (1.494)
综合排序	EF-1 α (1.565) > Cyclophilin (2.115) > Actin (2.632) > β -tubulin (3.344) > α -tubulin (3.464)

Cyclophilin > Actin > β -tubulin > α -tubulin, 其中 EF-1 α 稳定性最高。结合上述 qRT-PCR 内参基因筛选实验结果, 选择 EF-1 α 作为最适合北柴胡 qRT-PCR 的内参基因。

3.3 柴胡皂苷合成关键酶基因表达分析

通过 qRT-PCR 技术, 以上述筛选到的 EF-1 α 基因为内参, 检测北柴胡根、茎、叶、果中柴胡皂苷合成途径 16 个关键酶基因的相对表达量。各基因表达量如图 2 所示, ACAT、SE、UGT3 在果中表达量极高, 茎中次之, 叶、根中较低, 具有组织特异性, PMD、PMK、IPPI、SS、UGT1、UGT6 在各部位中表达量均较高, 且无明显的组织特异性, HMGR、 β -AS、P450-7、P450-12 在根中有极高表达量, 在茎、叶、果中表达量极低或不表达, 这可能是根中皂苷含量高于其他组织的原因, 并且在皂苷合成途径中有重要作用。此外, FPS 在根、果中表达较高, 叶中较低, 在茎中表达量最低。

3.2 内参基因稳定性评价

对 5 个内参基因稳定性进行评价, 通过在线评估 (<http://150.216.56.64/referencegene.php>) 综合分析 4 种软件 Delta CT、BestKeeper、NormFinder、Genorm 的结果 (表 4), 评分越低越稳定。Delta CT 分析表明 EF-1 α 是稳定性最高的内参基因, Cyclophilin 是较为稳定的内参基因; BestKeeper 分析表明 β -tubulin 是最稳定的内参基因, EF-1 α 是较稳定的内参基因; Normfinder 分析表明 EF-1 α 是最稳定的内参基因, Cyclophilin 是较稳定的内参基因; Genorm 分析表明 Cyclophilin 是最稳定的内参基因, Actin 是较稳定的内参基因。Delta CT、Normfinder、Genorm 分析中 β -tubulin 均是最不稳定的内参基因。4 种软件分析结果不完全一致, 可能是计算方法所致, 因此需要用 RefFinder 综合评价分析, 各候选基因稳定性综合排序为 EF-1 α >

UGT8 在果中表达最高, 茎中最低。UGT10 在茎中表达量很低, 根、叶、果中则较高于茎且表达量相近。

使用 Heml 软件制作北柴胡不同部位 16 个基因表达量的聚类热图如图 3 所示, 清晰地展现了北柴胡中各关键酶基因表达量的组织差异, 聚类分析可以看出北柴胡根、茎、叶、果的柴胡皂苷基因表达量分为 4 支, 其组织表达差异明显, 可能是造成北柴胡不同部位中柴胡皂苷含量分配不均的重要原因之一。

使用 SPSS 19.0 对柴胡皂苷合成中 16 个关键酶基因表达量之间进行 Pearson 相关性分析 (表 5), 结果发现, ACAT 与 UGT3、SE 与 UGT3、UGT6 与 IPPI、UGT8 与 PMD、UGT3 与 UGT8 两基因之间呈显著正相关 ($P < 0.05$), 表明这些基因的表达可能会相互影响, 协同调控柴胡皂苷合成。ACAT 与 PMD、PMK 与 IPPI、PMD 与 SE 两基因之间呈

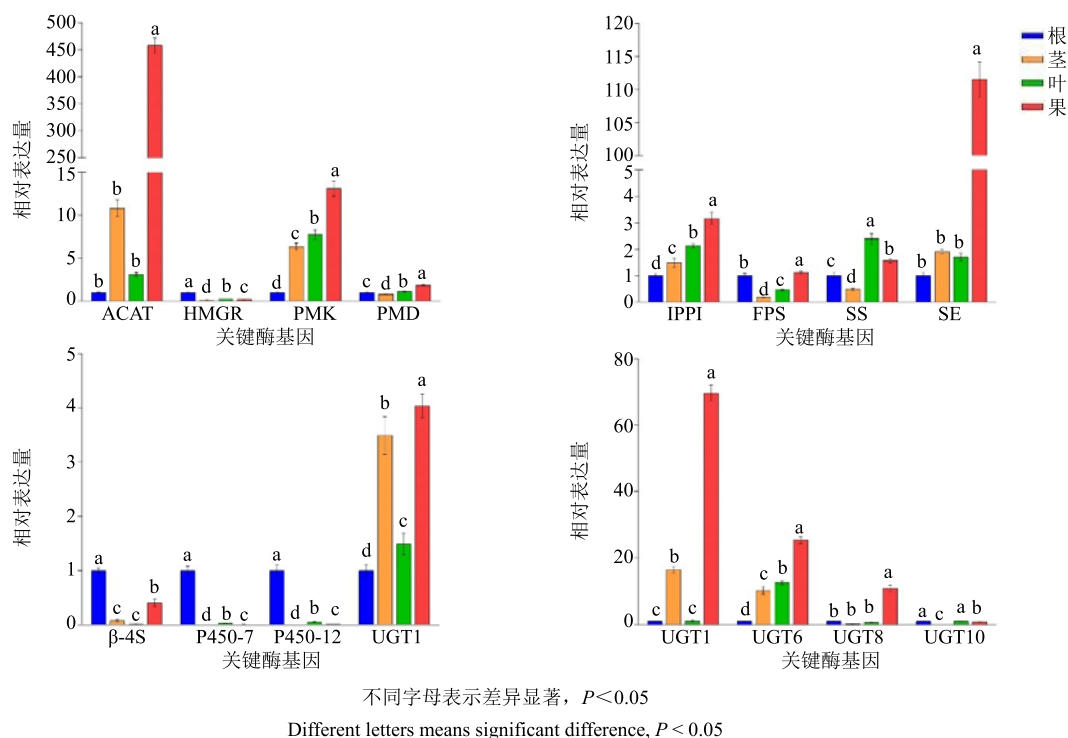
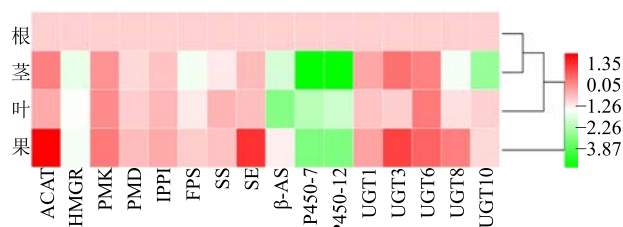
图 2 关键酶基因 qRT-PCR 表达分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Fluorescence quantitative PCR expression analysis of key enzyme genes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 3 关键酶基因表达热图

Fig. 3 Expression heat map of key enzyme genes

显著正相关 ($P < 0.05$), 这 5 个基因处于皂苷合成途径的上游和中游, 说明它们在皂苷合成中有共同作用并调控皂苷的合成积累。ACAT 与 SE、ACAT 与 UGT8、HMGR 与 P450-7、HMGR 与 P450-12、PMK 与 UGT6、PMK 与 UGT8、SE 与 UGT8、P450-7 与 P450-12 两基因之间呈极显著相关 ($P < 0.01$), 表明这几组基因之间紧密相关作用一致, 可能是调控皂苷合成中起关键作用的基因。

表 5 关键酶基因相关性分析

Table 5 Correlation analysis of key enzyme genes

基因	相关系数															
	ACAT	HMGR	PMK	PMD	IPPI	FPS	SS	SE	β-AS	P450-7	P450-12	UGT1	UGT3	UGT6	UGT8	UGT10
ACAT	1.000	-0.327	0.816	0.955*	0.869	0.630	0.155	1.000**	0.037	-0.354	-0.366	0.701	0.978*	0.871	0.997**	0.133
HMGR	-0.327	1.000	-0.786	-0.227	-0.628	0.503	-0.193	-0.320	0.920	0.997**	0.998**	-0.718	-0.432	-0.725	-0.259	0.505
PMK	0.816	-0.786	1.000	0.781	0.970*	0.138	0.387	0.814	-0.541	-0.814	-0.818	0.767	0.832	0.995**	0.782	-0.064
PMD	0.955*	-0.227	0.781	1.000	0.892	0.726	0.411	0.959*	0.078	-0.275	-0.280	0.484	0.876	0.834	0.970*	0.407
IPPI	0.869	-0.628	0.970*	0.892	1.000	0.341	0.517	0.870	-0.382	-0.672	-0.673	0.633	0.837	0.979*	0.854	0.174
FPS	0.630	0.503	0.138	0.726	0.341	1.000	0.177	0.638	0.731	0.462	0.457	-0.043	0.494	0.230	0.690	0.678
SS	0.155	-0.193	0.387	0.411	0.517	0.177	1.000	0.165	-0.303	-0.269	-0.248	-0.293	0.004	0.359	0.184	0.718
SE	1.000**	-0.320	0.814	0.959*	0.870	0.638	0.165	1.000	0.041	-0.348	-0.360	0.692	0.976*	0.869	0.997**	0.146
β-AS	0.037	0.920	-0.541	0.078	-0.382	0.731	-0.303	0.041	1.000	0.918	0.911	-0.403	-0.053	-0.453	0.100	0.445
P450-7	-0.354	0.997**	-0.814	-0.275	-0.672	0.462	-0.269	-0.348	0.918	1.000	1.000**	-0.693	-0.444	-0.754	-0.290	0.433
P450-12	-0.366	0.998**	-0.818	-0.280	-0.673	0.457	-0.248	-0.360	0.911	1.000**	1.000	-0.711	-0.459	-0.760	-0.301	0.449
UGT1	0.701	-0.718	0.767	0.484	0.633	-0.043	-0.293	0.692	-0.403	-0.693	-0.711	1.000	0.830	0.774	0.642	-0.601
UGT3	0.978*	-0.432	0.832	0.876	0.837	0.494	0.004	0.976*	-0.053	-0.444	-0.459	0.830	1.000	0.880	0.960*	-0.075
UGT6	0.871	-0.725	0.995**	0.834	0.979*	0.230	0.359	0.869	-0.453	-0.754	-0.760	0.774	0.880	1.000	0.841	-0.027
UGT8	0.997**	-0.259	0.782	0.970*	0.854	0.690	0.184	0.997**	0.100	-0.290	-0.301	0.642	0.960*	0.841	1.000	0.207
UGT10	0.133	0.505	-0.064	0.407	0.174	0.678	0.718	0.146	0.445	0.433	0.449	-0.601	-0.075	-0.027	0.207	1.000

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 表示相关性显著, 下同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ means correlation is significant, same as below

3.4 北柴胡不同部位柴胡皂苷含量

通过 HPLC 法检测不同部位柴胡皂苷 a、c、d 含量结果见表 6，与其他部位相比，柴胡皂苷 a、c、d 均在根中含量最高，3 种皂苷总量在根中最高可达到 11.564 mg/g，其中柴胡皂苷 a、d 含量占比极高。在果中，柴胡皂苷 c、d 及其总含量相对高于茎、叶，而柴胡皂苷 a 难以检测到。叶中柴胡皂苷 a、d 含量高于茎，柴胡皂苷 c 低于茎，3 种柴胡皂苷总含量表现为叶稍高于茎，茎中皂苷含量最低。在不同部位中柴胡皂苷含量表现为根>果>叶>茎。

3.5 柴胡皂苷含量与关键酶基因表达量相关性分析

使用 SPSS 19.0 对北柴胡皂苷含量与关键酶基

表 6 北柴胡不同部位中 3 种皂苷含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Content of three saponins in different tissues of *B. chinense* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

部位	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 c	柴胡皂苷 d	总和
根	5.596	1.231	4.737	11.564
茎	0.032	0.062	0.009	0.103
叶	0.077	0.019	0.104	0.200
果	未检出	0.238	0.600	0.838

表 7 柴胡皂苷含量与关键酶基因相关性

Table 7 Correlation between content of saikosaponin and key enzyme genes

柴胡皂苷	ACAT	HMGR	PMK	PMD	IPPI	FPS	SS	SE	β-AS	P450-7	P450-12	UGT1	UGT3	UGT6	UGT8	UGT10
柴胡皂苷 c	-0.186	0.981*	-0.711	-0.128	-0.560	0.587	-0.305	-0.181	0.975*	0.983*	0.980*	-0.569	-0.275	-0.637	-0.122	0.433
柴胡皂苷 a	-0.354	0.995**	-0.817	-0.280	-0.677	0.457	-0.286	-0.349	0.920	1.000**	0.999**	-0.683	-0.441	-0.756	-0.290	0.418
柴胡皂苷 d	-0.184	0.986*	-0.703	-0.111	-0.544	0.603	-0.259	-0.178	0.973*	0.984*	0.982*	-0.593	-0.282	-0.629	-0.117	0.475
总和	-0.270	0.994**	-0.763	-0.197	-0.614	0.531	-0.278	-0.264	0.950*	0.996**	0.994**	-0.638	-0.362	-0.696	-0.205	0.444

4 讨论

柴胡是我国传统的大宗中药材，其药效成分含量是柴胡药材品质的保证。本研究测定北柴胡根、茎、叶、果中柴胡皂苷含量，结果表明根和叶中柴胡皂苷 a、d 含量均高于 c，茎中柴胡皂苷 c 含量最高，果中柴胡皂苷 d 含量最高。3 种柴胡皂苷总含量在根部最高，地上部分含有柴胡皂苷但含量远低于根，这说明柴胡皂苷的主要合成与积累部位是在根部，再次验证了柴胡以根入药的传统用药历史^[22]。

作为北柴胡的主要药效成分，柴胡皂苷的合成机制受到广泛关注^[23-24]。目前柴胡皂苷合成途径中的关键酶基因已有相关研究，董乐萌等^[5]对合成皂苷途径的关键酶基因 HMGR、IPPI、FPS 首次进行

因表达量进行 Pearson 相关性分析，见表 7。结果表明 HMGR、P450-7、P450-12、β-AS 与柴胡皂苷 c 呈显著相关 ($P < 0.05$)，说明这 4 个基因在柴胡皂苷 c 的合成中有重要作用。HMGR、P450-7、P450-12 与柴胡皂苷 a 呈极显著相关 ($P < 0.01$)，说明 HMGR、P450-7、P450-12 对柴胡皂苷 a 的合成积累有重要作用。HMGR、P450-7、P450-12、β-AS 与柴胡皂苷 d 成显著相关 ($P < 0.05$)，说明这 4 个基因对柴胡皂苷 d 的合成有重要影响。HMGR、P450-7、P450-12 与 3 种皂苷总含量呈极显著相关 ($P < 0.01$)，β-AS 与 3 种皂苷总含量呈显著相关 ($P < 0.05$)，说明北柴胡 HMGR、P450-7、P450-12、β-AS 基因对于调控柴胡皂苷合成有重要作用。以上 4 个基因均对柴胡皂苷含量表现出相关性，它们在皂苷合成途径中的作用机制值得继续深入研究。其他基因对皂苷含量没有表现出显著的相关性，可能是因为其时空表达模式受到自身转录调控因子或者外部环境变化的影响，虽然在柴胡皂苷合成途径中有一定作用，但未表现出明显相关性。说明柴胡皂苷的生物合成是复杂多变的，其分子机制亟待阐明，以期实现对药材质量的调控。

克隆和序列分析，为进一步克隆全序列及了解调控柴胡皂苷的生物合成奠定了基础。隋春等^[6]首次克隆了北柴胡鲨烯合酶基因 (SS) 及其 cDNA。北柴胡细胞色素 P450 基因、北柴胡糖基转移酶基因 BcUGT1、BcUGT3 和 BcUGT6、BcUGT8、P450 相关基因 CYP716y1 等与北柴胡皂苷合成相关基因均被相继克隆分析^[25-28]。

为提高北柴胡 qRT-PCR 分析结果的准确性，本研究筛选常用的 5 个候选内参基因，结合在线分析与 qRT-PCR 的 C_t 值波动范围，选取其中稳定性最好的北柴胡 EF-1α 基因为内参基因。检测柴胡皂苷合成途径中 16 个关键酶基因在不同部位的表达量，结果表明 HMGR、β-AS、P450-7、

P450-12 在根中有较高表达量,而在茎、叶、果中表达量极低或不表达,组织差异明显,这 4 个基因可能是导致柴胡皂苷在不同部位含量差异显著的关键基因。对 16 个关键酶基因表达量进行相关性分析表明, HMGR、P450-7、P450-12 基因表达量两两之间均呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 它们在柴胡皂苷合成途径中可能有共同作用且相互影响,协同调控柴胡皂苷的合成。将 16 个关键酶基因表达量与柴胡皂苷含量进行相关性分析表明,与皂苷含量相关性最高的是 HMGR、 β -AS、P450-7、P450-12 基因的表达量,这 4 个基因与柴胡皂苷含量有重要关联,协同调控柴胡皂苷合成。本研究发现柴胡皂苷合成途径中 4 个关键酶基因 HMGR、 β -AS、P450-7、P450-12 与柴胡皂苷合成积累有密切关系,这为后续深入研究关键酶在植物体的作用机制及相关基因调控提供一定的理论参考,实现对北柴胡药材质量向更优质方向的调控。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 谭玲玲, 陈莹, 蔡霞, 等. 北柴胡的生物学及化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 155-157.
- [3] 黄涵笠, 王满哈, 付航, 等. 柴胡属药用植物资源研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 2989-2996.
- [4] 杨利民, 张永刚, 林红梅, 等. 中药材质量形成理论与控制技术研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 119-124.
- [5] 董乐萌, 刘玉军, 魏建和. 柴胡皂苷合成途径中三个关键酶基因片段的克隆与序列分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(5): 56-60.
- [6] 隋春, 魏建和, 战晴晴, 等. 北柴胡鲨烯合酶基因及其编码区 cDNA 克隆与序列分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 283-290.
- [7] Jung J D, Park H W, Hahn Y, *et al.* Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(3): 224-230.
- [8] Zhao C L, Cui X M, Chen Y P, *et al.* Key enzymes of triterpenoid saponin biosynthesis and the induction of their activities and gene expressions in plants [J]. *Nat Prod Commun*, 2010, 5(7): 1147-1158.
- [9] 袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. 植物学报, 2012, 47(4): 427-436.
- [10] 余马, 刘丹, 舒晓燕, 等. 基于实时荧光定量 PCR 分析的北柴胡内参基因的筛选及验证 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3820-3825.
- [11] Sui C, Zhang J, Wei J, *et al.* Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 539.
- [12] Silver N, Best S, Jiang J, *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2006, 7: 33.
- [13] Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(6): 509-515.
- [14] Andersen C L, Jensen J L, Orntoft T F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [15] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): H34-H39.
- [16] 陶韵文, 徐洁森, 魏建和, 等. 北柴胡糖基转移酶基因 BcUGT1 的表达分析及其原核表达与蛋白纯化 [J]. 药学学报, 2013, 48(8): 1345-1352.
- [17] 陶韵文, 徐洁森, 孙晶, 等. 北柴胡糖基转移酶基因 BcUGT3, BcUGT6 的表达分析及其原核表达 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 185-191.
- [18] 徐洁森, 魏建和, 陶韵文, 等. 北柴胡糖基转移酶基因 BcUGT8 的克隆、序列分析及其原核表达载体构建 [J]. 中草药, 2013, 44(17): 2453-2459.
- [19] 徐洁森, 魏建和, 赵立子, 等. 北柴胡细胞色素 P450 酶基因的克隆及其植物过量表达载体的构建 [J]. 生物技术通讯, 2012, 23(4): 537-541.
- [20] Dong L, Sui C, Liu Y, *et al.* Validation and application of reference genes for quantitative gene expression analyses in various tissues of *Bupleurum chinense* [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(8): 5017-5023.
- [21] Sui C, Chen M, Xu J, *et al.* Comparison of root transcriptomes and expressions of genes involved in main medicinal secondary metabolites from *Bupleurum chinense* and *Bupleurum scorzonnerifolium*, the two Chinese official *Radix Bupleuri* source species [J]. *Physiol Plant*, 2015, 153(2): 230-242.
- [22] 翟昌明, 王雪茜, 程发峰, 等. 柴胡功效的历史演变与入药品种及药用部位的相互关系 [J]. 世界中医药,

- 2016, 11(5): 906-909.
- [23] 刘政波, 孙印石, 王建华, 等. HPLC 法测定三岛柴胡不同部位柴胡皂苷 a、c、d 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 225-227.
- [24] 黄涵签, 王潇晗, 付航, 等. 柴胡属药用植物资源研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 2989-2996.
- [25] 徐洁森. 北柴胡皂苷合成相关 P450、UGT 基因的筛选、克隆及遗传转化初步研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [26] 隋春, 战晴晴, 魏建和, 等. 北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA 克隆及其序列分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1178-1184.
- [27] 徐洁森, 魏建和, 陶韵文, 等. 植物细胞色素 P450 在三萜皂苷生物合成中的功能研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1635-1640.
- [28] 隋春, 徐洁森, 赵立子, 等. 北柴胡 UGT 基因的克隆及其过量表达和 RNAi 转基因载体的构建 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 558-563.