

基于转录组测序的青风藤内青藤碱合成途径分析

曾茜垚^{1,2}, 乔克威¹, 李雨嫣¹, 周喜新¹, 杨 华^{1,2,3*}, 熊兴耀^{3*}

1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128

2. 湖南正清制药集团股份有限公司, 湖南 怀化 410000

3. 湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128

摘要: **目的** 探究控制青藤碱含量的表达基因、青藤碱合成途径中的控制位点以及表达路径。**方法** 利用 HPLC 法对 6 个种群共 49 株青风藤的根和茎分别进行了青藤碱含量的测定, 选定青藤碱含量差异倍数大的 2 个种群, 即陕西宝鸡与贵州遵义, 分别选取其中最具有代表性的青风藤植株, 并取其根和茎进行转录组测序, 命名为 HR/LR、HS/LS。**结果** 将 clean reads 进行拼接得到 355 201 个转录本, 其中包括 275 491 个 Unigene。在 HR/LR 和 HS/LS 中差异基因分别有 23 562 和 37 143 个。GO 分析显示这些差异基因功能明显富集在天冬氨酸型肽链内切酶活性与天冬氨酸肽酶活性上, 推测这些差异基因可能编码这 2 种酶。KEGG 富集结果表明 HR 与 LR 以及 HS 与 LS 2 组中的差异基因共同参与糖类代谢、蛋白质与细胞膜结合、维生素 C 合成。qRT-PCR 验证了异喹啉生物碱合成途径上游关键基因表达情况, 发现与青藤碱的积累呈正相关。**结论** 本研究初步了解了造成青藤碱含量差异的分子机制, 为深入了解青藤碱积累规律与合成途径提供了参考。

关键词: 青风藤; 青藤碱; 高效液相色谱法; 转录组测序; qRT-PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)22-5537-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.023

Analysis of sinomenine synthesis pathway based on transcriptome sequencing in *Sinomenii Caulis*

ZENG Xi-yao^{1,2}, QIAO Ke-wei¹, LI Yu-yan¹, ZHOU Xi-xin¹, YANG Hua^{1,2,3}, XIONG Xing-yao³

1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Hunan Zhengqin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Huaihua 410000, China

3. Horticulture and Landscape College of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: Objective In order to explore the expression of sinomenine content control genes, synthetic control sites and expression pathway. **Methods** In this study, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of sinomenine in the roots and stems of 49 *Sinomenii Caulis* in six populations. Two populations with large multiple differences in sinomenine content were selected, namely Shanxi Baoji and Guizhou Zunyi. The most representative of them were selected, and their roots and stems were taken for transcriptome sequencing and named as HR/LR and HS/LS. **Results** Sequencing results showed that 355 201 transcripts were obtained by splicing clean reads, including 275 491 Unigene transcripts. There were 23 562 and 37 143 differentially expressed genes in HR/LR and HS/LS, respectively. GO database analysis showed that the functions of these differentially expressed genes were significantly enriched in aspartic-type endopeptidase activity and aspartic-type peptidase activity, it is speculated that these two enzymes might be encoded. The results of KEGG enrichment explained that the differentially expressed genes were involved in carbohydrate metabolism, protein binding to cell membrane and vitamin C synthesis. The results of qRT-PCR verified the expression of upstream key genes of the isoquinoline alkaloid synthesis pathway and found that it was positively correlated with the accumulation of sinomenine. **Conclusion** This study provided a preliminary understanding of the molecular mechanism that caused the difference in sinomenine content, and provided a reference for further understanding of the accumulation rules and synthesis pathways of sinomenine.

Key words: *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils.; sinomenine; HPLC; transcriptome sequencing (RNA-seq); qRT-PCR

收稿日期: 2019-05-06

基金项目: 湖南省科技重大专项 (2015SK1001); 湖南省科技计划项目 (2015RS4059); 长沙市技术及产品开发重点项目 (kq1801015)

作者简介: 曾茜垚 (1994—), 女, 湖南怀化人, 硕士研究生, 主要研究方向为植物生物化学与分子生物学。Tel: 15608402903

*通信作者 杨 华 Tel: 13548956743 E-mail: yhua7710@126.com

熊兴耀 E-mail: xiongxingyao@caas.cn

青风藤, 又名清风藤、寻风藤、枫风藤、扶风藤等名,《中国药典》2015 年版规定, 青风藤原植物包括防己科防己属植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 及毛青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. var. *cinereum* Rehd. et Wils. 2 种, 其中药用部位为根和茎^[1-3]。青风藤性温、气平、味苦、脾经、归肝, 具有显著的祛风湿、通经络、利小便等功效。中医临床上, 青风藤单味药及其复方药用于治疗风湿性疾病已超过 1 000 多年历史^[2]。

据报道^[4-8], 青风藤生于林中、林缘、沟边或山地灌木丛中攀援于树上或石山上, 在我国大陆水平分布范围为北纬 23°24'~34°51', 东经 103°76'~121°75', 其分布地主要包括秦岭山脉、大巴山脉、雪峰山脉、大别山脉、武夷山脉、巫山山脉、南岭山脉、大娄山脉、罗霄山脉以及长江中下游的一些丘陵等山地。青风藤中发挥治疗作用的主要活性成分为青藤碱。近年来, 国内外研究学者发现青藤碱在抗炎、镇痛、镇静、降压、免疫抑制、抗心律失常等方面发挥作用^[9-13]。另外, 青藤碱盐酸盐制剂临床上用于治疗类风湿性关节炎以及心律失常的效果比较明显^[14-17]。瞿发林等^[18]对不同产地青风藤中青藤碱的含量进行比较, 发现不同产地青风藤中青藤碱含量差异显著。谢丽明等^[19]对青风藤植株的不同部位分别进行青藤碱含量测定, 发现青风藤不同部位青藤碱含量差异显著, 其中主要在根部积累, 茎部次之。

青藤碱属于异喹啉类生物碱, 异喹啉类生物碱有着一部分共同的生物合成途径, 都是以酪氨酸 (*L*-tyrosine) 为前体物质, 在酶的催化下生成 2 种酪氨酸的衍生物多巴胺 (dopamine) 和 4-羟基苯乙醛 (4-hydroxyphenylacetaldehyde), 经一系列酶的催化反应生成一个重要的中间产物 (*S*)-网状番荔枝碱 [(*S*)-Reticuline]^[20-24]。随后, (*S*)-网状番荔枝碱再经各种不同酶的一步催化生成各种不同的生物碱。由于国内外对青风藤中青藤碱的生物合成途径研究极少, 本研究利用高效液相色谱仪, 对不同地域青风藤根、茎中青藤碱的含量进行测定, 选取青藤碱含量差异明显的 2 种青风藤材料的根、茎, 进行转录组测序, 探索青藤碱的积累规律与合成途径, 为青风藤的开发利用奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

2015 年采集陕西宝鸡秦岭 (秦岭山脉), 贵州

遵义娄山关 (大娄山脉), 湖北襄阳大巴山 (大巴山脉), 安徽六安大别山 (大别山脉), 湖南怀化雪峰山 (雪峰山脉)、衡阳衡山 (罗霄山脉) 的带根的青风藤茎 (直径 0.3 cm 左右) 49 份, 经笔者鉴定为植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils.。按采集地将 49 份材料进行编号 (表 1)。

1.2 试剂

甲醇、乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、三乙胺和安捷伦 C₁₈ 色谱柱均购于北京全式金生物技术有限公司, RNA 提取试剂盒和 RNA 反转录试剂盒购于北京擎科生物技术有限公司, RNAseq 建库测序试剂

表 1 青风藤采集信息

Table 1 Material collection information of *S. acutum*

编号	采集地	经度	纬度
贵 1	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 2	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 5	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 6	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 7	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 12	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 21	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 22	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 26	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
贵 28	大娄山	104° ~110°	31° ~32°
陕 1	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 2	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 5	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 6	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 10	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 14	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 16	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 17	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 19	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 20	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
陕 21	秦岭	102° ~113°	34° ~45°
雪 1	雪峰山	110° ~112°	26° ~28°
雪 2	雪峰山	110° ~112°	26° ~28°
雪 5	雪峰山	110° ~112°	26° ~28°
雪 6	雪峰山	110° ~112°	26° ~28°
雪 10	雪峰山	110° ~112°	26° ~28°
雪 11	雪峰山	110° ~112°	26° ~28°
徽 3	大别山	112° ~117°	30° ~32°
徽 5	大别山	112° ~117°	30° ~32°
徽 6	大别山	112° ~117°	30° ~32°
徽 8	大别山	112° ~117°	30° ~32°
徽 9	大别山	112° ~117°	30° ~32°
徽 15	大别山	112° ~117°	30° ~32°
衡 1	罗霄山脉	112° ~114°	25° ~35°
衡 2	罗霄山脉	112° ~114°	25° ~35°
衡 3	罗霄山脉	112° ~114°	25° ~35°
衡 6	罗霄山脉	112° ~114°	25° ~35°
鄂 1	大巴山	104° ~110°	31° ~32°
鄂 3	大巴山	104° ~110°	31° ~32°
鄂 4	大巴山	104° ~110°	31° ~32°
鄂 5	大巴山	104° ~110°	31° ~32°
鄂 7	大巴山	104° ~110°	31° ~32°
鄂 8	大巴山	104° ~110°	31° ~32°
鄂 15	大巴山	104° ~110°	31° ~32°
鄂 16	大巴山	104° ~110°	31° ~32°

盒购自于北京诺禾致源科技股份有限公司, qRT-PCR 试剂盒 (Quant qRT-PCR kit) 购于北京天根生化科技有限公司, 青藤碱 (批号 201810003, 质量分数 98%) 对照品购于中国食品药品检定研究院。

2 方法

2.1 样品处理

将收集的材料于 2015 年按照以下方式栽培在湖南农业大学长安实验教学基地。大田翻耕后, 成 1.5 m 宽的畦, 畦高 20 cm; 再将畦分成长 2.0 m, 宽 1.5 m 的小块。每份资源占用 1 小块, 栽种 3 株。待新发嫩枝长至 0.5 m 长时, 采用竹木搭架, 并牵引其攀沿至架上。定期除草, 适时浇水、施肥。2018 年将种植 3 年的青风藤作为本实验用材料。

2.2 青藤碱含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备^[2] 精密称量适量青藤碱对照品粉末, 加甲醇配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备^[2] 分别取青风藤的根和茎, 用切片机进行切片, 放入烘箱 50 °C 进行烘干, 烘干后磨粉、用 3 号筛进行过筛处理, 按照《中国药典》2015 年版方法, 精密称定过筛后的青风藤粉末 0.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密量取 70% 乙醇溶液 20 mL 加入, 密塞, 置于万分之一电子天平称定质量并记录, 放入功率 250 W, 频率 20 kHz 的超声仪内进行超声处理 20 min, 冷却, 再称定质量, 损失部分的质量用 70% 乙醇补足, 摇匀, 用 0.45 μm 有机滤头进行滤过, 取滤液, 作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件^[2] 色谱条件与系统适用性实验以十八烷硅烷键合硅胶为填充剂; 以甲醇-磷酸盐缓冲液 (0.005 mol/L 的磷酸氢二钠溶液, 以 0.005 mol/L 的磷酸二氢钠调节 pH 值至 8.0, 再以 1% 三乙胺调节 pH 值至 9.0) (55:45) 为流动相; 以 262 nm 波长为检测波长。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 色谱图见图 1。

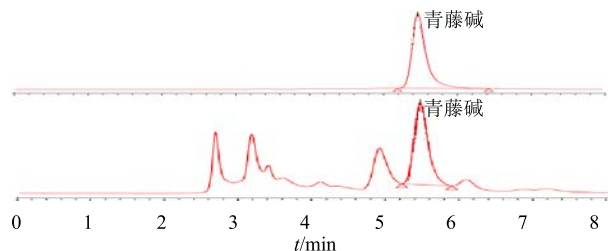


图 1 青藤碱对照品 (A) 和供试品 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of sinomenine reference (A) and sinomenine sample (B)

2.2.4 方法学考察 按照《中国药典》2015 年版方法考察精密度、重复性、稳定性及加样回收率, 均符合《中国药典》2015 年版规定。

2.2.5 青藤碱的测定 本品按干燥品计算。根据液相色谱仪检测得到的峰面积运用公式计算出每个样品中青藤碱的含量, 然后使用 Graphpad 进行作图分析。

青藤碱质量分数 = 对照品质量浓度 × 样品峰面积 × 20 mL / (对照品峰面积 × 50 mg)

2.3 青风藤根与茎材料的转录组测序

取青藤碱质量分数最高的陕西 20 号青风藤植株根和茎, 分别命名为 HR 与 HS; 取青藤碱质量分数最低的贵州 1 号青风藤植株的根和茎, 分别命名为 LR 与 LS, 每个取 3 个生物学重复, 对这 12 个样品进行总 RNA 提取与检测, 选取 1 μg RNA 进行建库, 建库中使用的建库试剂盒为 Illumina 的 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit。文库构建完成后对其进行质检, 质检合格后进行上机测序。由北京诺禾致源科技股份有限公司利用 Illumina 测序平台进行建库测序, 并完成信息分析。

2.4 异喹啉类生物碱生物合成途径关键基因表达水平的 qRT-PCR 验证

将用于转录组测序的 6 株青风藤材料的根和茎的总 RNA 备份中的 mRNA 逆转录成 cDNA, 将模板稀释 10 倍。根据 NR 蛋白库, Swissprot 蛋白库及 Estscan(3.0.3)软件预测的 CDS 序列, 利用 Prime5 设计特异引物, 以拼接注释得到的 Actin 作为内参 (表 2)。进行 qRT-PCR 扩增, 反应步骤参照 qRT-PCR 试剂盒。进行 3 次重复实验。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

3 结果与分析

3.1 不同地域青风藤中青藤碱含量

从秦岭山脉、大娄山脉、大巴山脉、罗霄山脉、大别山脉、雪峰山脉这 6 个地域取的 49 株青风藤的青藤碱含量如表 3 所示, 结果显示, 青风藤根部位的青藤碱含量普遍高于茎部位的含量; 每个地域含量同样存在显著性差异。其中, 茎部位青藤碱含量差异最大的为贵 1 号和陕 20 号, 平均质量分数分别为 0.47% 和 3.05% (图 2)。因此选取该 2 种青风藤材料用于后续转录组测序实验。

表 2 特异引物

Table 2 Specific primers

名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
AST	GCCGTCTTCAGTGACTGCGGTCTT	TGCATCTGCATCCAGGCTTCC
CNMT	AAAGCGTCTCAGATGGGGTT	TAGTAGAGTGAGTGCTCCATAACC
AOC	TCTGCCATTAGCGGGATCT	GGAATGTGCGTAACTCCAAAA
TYDC	CTGATTCTGCACCAATCCATC	AGCATCTTAGCAAGCCAGTCC
Actin	CCTCTTCCAGCCTTCCTTCAT	TCTCCTTGCTCATCCTGCAG

表 3 6 个地区青藤碱含量统计表

Table 3 Statistical table of sinomenine content in six regions

编号	青藤碱/%		编号	青藤碱/%	
	茎	根		茎	根
贵 1	0.16	0.47	雪 10	0.47	0.88
贵 2	0.23	0.51	雪 11	0.72	0.98
贵 5	0.43	0.56	徽 3	0.51	1.03
贵 6	0.21	0.68	徽 5	1.76	1.81
贵 7	0.37	0.50	徽 6	0.53	0.93
贵 12	0.44	0.53	徽 8	0.68	0.96
贵 21	0.41	0.88	徽 9	0.70	1.01
贵 22	0.41	0.67	徽 15	0.77	0.99
贵 26	1.05	1.31	衡 1	1.15	1.21
贵 28	0.44	0.84	衡 2	1.22	1.41
陕 1	1.93	2.21	衡 3	1.25	1.39
陕 2	1.78	1.88	衡 6	1.19	1.43
陕 5	1.85	1.93	衡 7	1.29	1.50
陕 6	1.63	2.05	衡 8	1.31	1.47
陕 10	2.03	2.56	衡 12	1.17	1.39
陕 14	1.90	2.31	衡 16	1.23	1.41
陕 16	1.93	2.37	鄂 1	1.31	1.55
陕 17	1.88	2.39	鄂 3	1.22	1.49
陕 19	2.39	2.93	鄂 4	1.23	1.52
陕 20	2.58	3.05	鄂 5	1.17	1.40
陕 21	1.69	1.99	鄂 7	1.30	1.64
雪 1	0.29	0.61	鄂 8	1.26	1.56
雪 2	0.56	0.72	鄂 15	1.31	1.55
雪 5	0.51	0.83	鄂 16	1.35	1.69
雪 6	0.62	0.91			

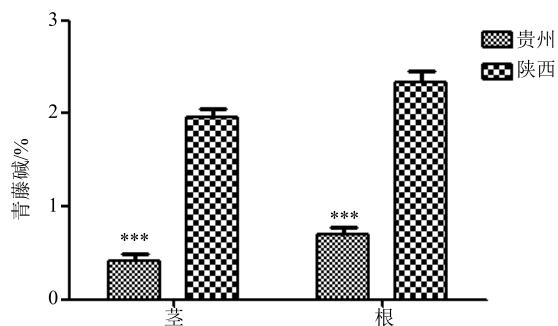


图 2 贵州产与陕西产青藤碱含量

Fig. 2 Statistical chart of sinomenine content in Guizhou and Shanxi

3.2 转录组测序

3.2.1 拼接转录本注释统计 青风藤基因组未进行鉴定, 需要对质控后的 clean reads 进行拼接以获取后续分析的参考序列。经测序共拼接得到 355 201 个转录本, 其中包括 275 491 个 Unigene, 其中 1 kb 以内的基因有 153 586 个, 1~2 kb 的基因有 74 324 个, 大于 2 kb 的基因有 47 581 个。对 Unigene 进行数据库注释, 分别注释到 GO^[25]、NR^[26]、SwissProt^[27]、KOG^[28]、KEGG^[29]、Pfam^[30]和 NT 7 大数据库, 统计注释到各数据库的 Unigene 个数。结果表明, 从 NR 数据库中注释到的基因数目 (166 232) 最多, 占总 Unigene 的 60.34%; 注释到 KOG 数据库的基因数目 (44 605) 最少, 占总 Unigene 的 16.19%; 注释到 NT、KO、SwissProt、GO 数据库的基因数目分别为 115 405、67 911、120 667、115 967 个。

3.2.2 差异表达水平分析 转录组数据分析 (图 3) 表明, HR 与 LR 相比, 2 倍差异表达且 P 值小于 0.05^[15] 的基因有 23 562 个, 其中表达上调的有 12 002 个, 表达下调的有 11 560 个。转录组数据分析 (图 4) 表明, HS 与 LS 相比, 2 倍差异表达且 P 值小于 0.05^[15] 的基因有 37 143 个, 其中

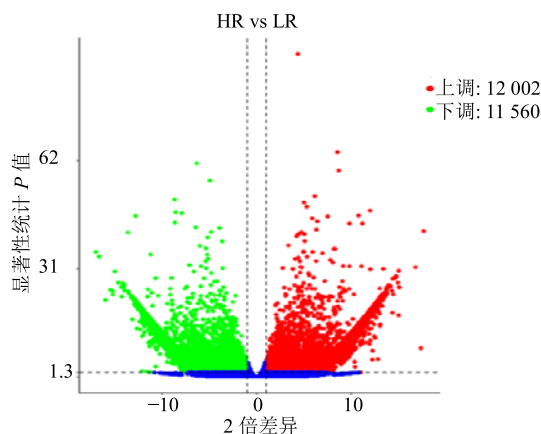


图 3 HR 与 LR 差异表达基因水平分析

Fig. 3 Level analysis of HR and LR differentially expressed genes

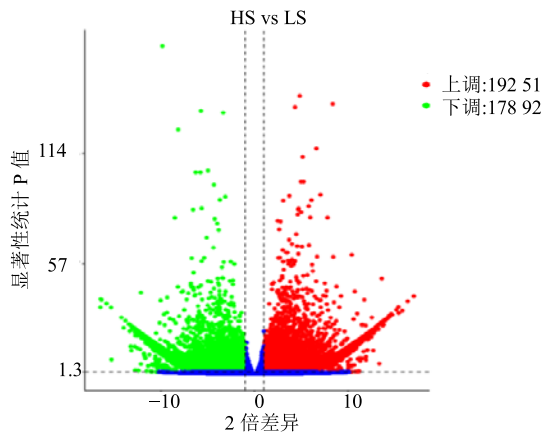


图 4 HS 与 LS 差异表达基因水平分析
Fig. 4 Level analysis of HS and LS differentially expressed genes

表达上调的共有 19 251 个，表达下调的共有 17 892 个。

3.2.3 差异表达基因 GO 富集分析 GO 分析(图 5)表明，HR 与 LR 相比，有 164 个差异表达基因可能具有天冬氨酸型肽链内切酶活性，其中差异基因表达上调有 81 个，差异基因表达下调的有 83 个；有 164 个差异表达基因可能具有天冬氨酸肽酶活性，其中差异基因表达上调的有 81 个，差异基因表达下调的有 83 个；有 79 个差异表达基因可能具有 tRNA 甲基转移酶活性，其中差异基因表达上调的有 43 个，差异基因表达下调的有 36 个。

HS 与 LS 相比(图 6)，有 227 个差异表达基因可能具有天冬氨酸型肽链内切酶活性，其中差异基因表达上调的有 127 个，差异基因表达下调的有 100 个；有 227 个差异表达基因可能具有天冬氨酸肽酶活性，其中差异基因表达上调的有 127 个，差异基因表达下调的有 100 个。

表 4 HR 与 LR 差异表达基因 KEGG 富集通路

Table 4 KEGG enrichment pathway of HR and LR differentially expressed genes

通路名称	通路 ID	富集因子	显著性统计	基因数
蛋白质消化和吸收	ko04974	0.311 828	0.000 828	29
糖基磷脂酰肌醇-锚定生物合成	ko00563	0.200 000	0.004 514	56
细胞色素 P450 对外源化合物代谢的影响	ko00980	0.196 154	0.009 626	51
N-聚糖生物合成	ko00510	0.170 575	0.009 626	80
果糖和甘露糖代谢	ko00051	0.161 172	0.019 085	88
甾类激素生物合成	ko00140	0.407 407	0.023 208	11
苯丙素的生物合成	ko00940	0.144 084	0.023 208	151
戊糖、葡萄糖醛酸转换	ko00040	0.167 939	0.024 943	66
异喹啉生物碱生物合成	ko00950	0.113 360	0.999 999	28

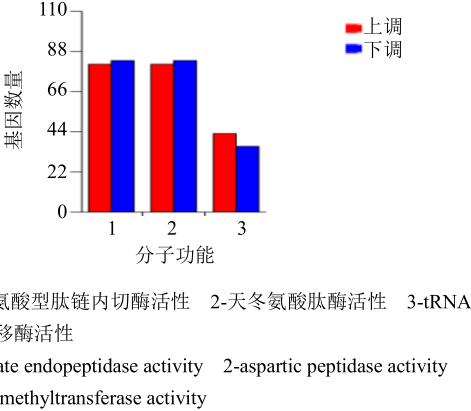


图 5 HR 与 LR 差异表达基因 GO 富集分析
Fig. 5 GO enrichment analysis of HR and LR differentially expressed genes

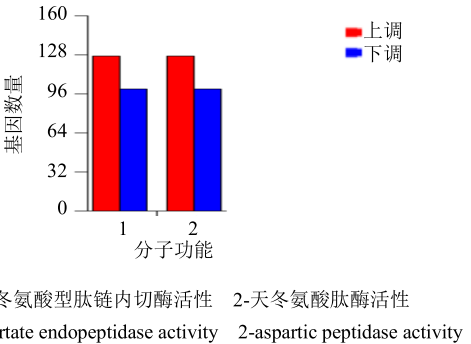


图 6 HS 与 LS 差异表达基因 GO 富集分析
Fig. 6 GO enrichment analysis of HS and LS differentially expressed genes

3.2.4 差异表达基因 KEGG 富集分析 KEGG 富集分析(表 4)表明，HR 与 LR 中的差异基因显著富集在 8 条代谢通路上，主要与植物体内生物分子合成与代谢相关，一共有 396 个差异基因参与。HS 与 LS 中的差异基因显著富集在 6 条代谢通路上(表 5)，其中 3 条与糖类代谢相关，共有 623 个差异基

表 5 HS 与 LS 差异表达基因 KEGG 富集通路

Table 5 KEGG enrichment pathway of HS and LS differentially expressed genes

通路名称	通路 ID	富集因子	显著性统计	基因数
糖基磷脂酰肌醇-锚定生物合成	ko00563	0.292 857	0.001 354	82
苯丙素的生物合成	ko00940	0.217 557	0.005 370	228
淀粉和蔗糖代谢	ko00500	0.204 041	0.007 520	313
戊糖、葡萄糖醛酸转换	ko00040	0.241 730	0.020 465	95
果糖和甘露糖代谢	ko00051	0.227 106	0.022 034	124
半乳糖代谢	ko00052	0.229 083	0.023 095	115
异喹啉生物碱生物合成	ko00950	0.182 186	0.778 182	45

因参与。其余 3 条与苯丙素的生物合成、蛋白与细胞膜结合以及维生素 C 的合成相关, 共有 405 个差异基因参与。

说明生长在 2 个不同地域的青风藤, 由于环境因素, 对其体内糖类代谢、维生素 C 合成、蛋白与细胞膜作用、细胞抗氧化可能有显著的影响。在 HR 与 LR 以及 HS 与 LS 2 组中富集在异喹啉类生物碱生物合成通路的差异基因个数分别为 28 和 45, 这条通路可能与青藤碱的合成相关。

3.3 异喹啉生物碱合成途径关键基因的鉴定与表达验证

通过在 KEGG 数据库中查询异喹啉生物碱生物合成途径, 发现富集在这条通路的差异基因主要集中在通路上游。鉴定了 4 个关键基因, 分别为 *ast*、*cnmt*、*aoc* 及 *tydc*, 他们编码 4 种酶, 分别为天冬氨酸转氨酶、乌药碱甲基转移酶、伯胺氧化酶、酪氨酸脱羧酶, 这 4 种酶参与异喹啉生物碱合成通路上游共有的合成步骤。从转录组测序基因定量数据可以看出在青藤碱含量高的陕 20 号材料中这些基因的表达量显著高于含量低的贵 1 号材料, 因此推测可能是由于上游通路的激活从而促进了青藤碱的合成。挑选这 4 个差异基因进行 qRT-PCR 验证(图 7~10), 结果与转录组测序结果基本一致, 这 4 个基因在贵 1 号的根组织与茎组织中表达量低, 而在陕 20 号中显著上调。结合 HPLC 色谱结果发现, 这 4 个基因在陕 20 号和贵 1 号 2 种材料根、茎中的表达水平与青藤碱含量呈正相关。

4 讨论

青藤碱属于青风藤的次生代谢产物, 通过生物碱合成途径作用而来。植物的次生代谢产物是植物在长期繁衍进化的过程中与环境相互作用的结果, 因此环境因素对次生代谢物的积累有着重大的影响^[31]。利用 HPLC 法, 对从秦岭山脉等 6 个山脉收集的 49 株青风藤分别进行青藤碱含量测定,

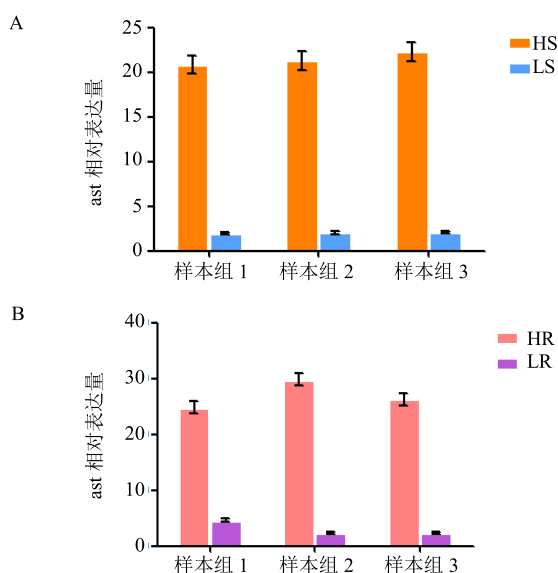


图 7 *ast* 基因在 HS/LS (A) 和 HR/LR (B) 中相对表达量
Fig. 7 Relative expression of *ast* gene in HS/LS (A) and HR/LR (B)

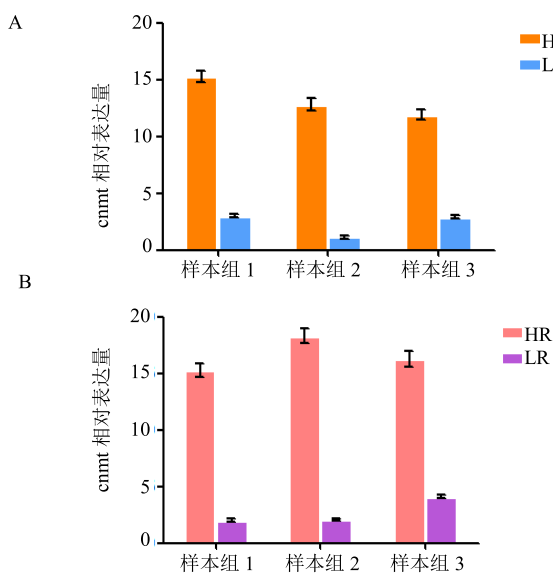


图 8 *cnmt* 基因在 HS/LS (A) 和 HR/LR (B) 中相对表达量
Fig. 8 Relative expression of *cnmt* gene in HS/LS (A) and HR/LR (B)

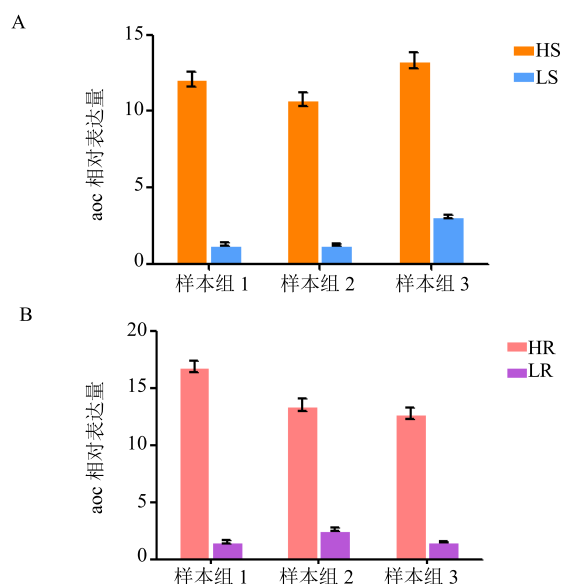


图 9 aoc 基因在 HS/LS (A) 和 HR/LR (B) 中相对表达量
Fig. 9 Relative expression of aoc gene in HS/LS (A) and HR/LR (B)

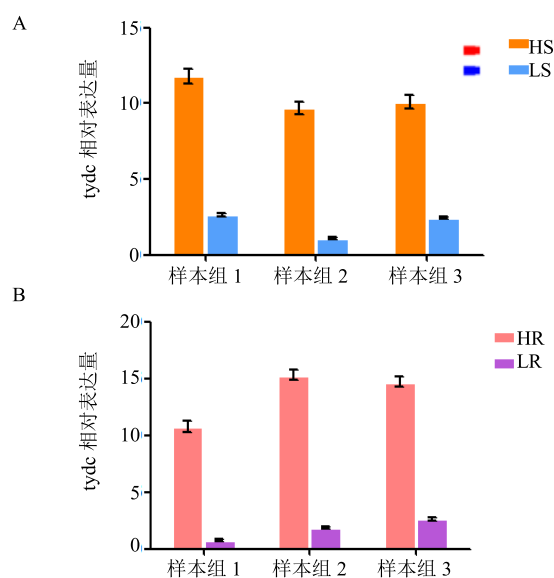


图 10 tydc 基因在 HS/LS (A) 和 HR/LR (B) 中相对表达量
Fig. 10 Relative expression of tydc gene in HS/LS (A) and HR/LR (B)

发现大娄山脉（贵州遵义）与秦岭山脉（陕西宝鸡）这 2 个种群青风藤中青藤碱含量差异达极显著水平，其中大娄山脉（贵州遵义）的贵 1 号与秦岭山脉（陕西宝鸡）的陕 20 号青藤碱含量差异显著水平最高。而本实验所选取的 6 个种群 49 株青风藤植株，虽最初来源的地区不同，但移栽到同一资源圃经过了 3 年时间的生长，期间温度、湿度等环境

因素都保持着绝对性的一致，因此推测造成青藤碱含量的差异是由于青藤碱生物合成途径中的某些关键基因的作用。利用 Illumina 测序平台，对贵 1 号青风藤植株的根、茎以及陕 20 号青风藤植株的根、茎进行转录组测序，对打断的 reads 进行拼接后，组装成 scaffold，通过数据库注释得到大量 Unigene 的信息。并对这些基因进行定量，比较差异基因并进行 GO、KEGG 富集分析。

测序数据分析表明，HR 与 LR 中的差异基因显著富集在苯丙素的生物合成通路，其次是果糖和甘露糖代谢通路、N-聚糖生物合成通路以及戊糖、葡萄糖醛酸转换通路；HS 与 LS 中的差异基因主要富集在淀粉和蔗糖代谢通路，其次是苯丙素的生物合成通路、果糖和甘露糖代谢通路以及半乳糖代谢通路。GO 分析表明差异基因主要的分子功能为天冬氨酸蛋白酶，推测生长在 2 个地区的青风藤中，体内的生化反应由作用于天冬氨酸的蛋白酶起主要影响。

青藤碱属于异喹啉类生物碱，因此在 KEGG 代谢通路中，笔者重点关注异喹啉生物碱生物合成通路，HR/LR 及 HS/LS 2 组中富集在异喹啉生物碱生物合成通路上的差异基因数分别为 28 个和 45 个。其中，2 组中大部分差异基因主要富集在异喹啉生物碱生物合成途径的上游，即从该合成途径的原料物质络氨酸到合成网状番茄枝碱这一过程。另外，在从络氨酸到合成去甲乌药碱这一物质之间的合成途径中，有 4 个关键酶的位置上存在差异表达基因表达上调情况，且上调显著。在 HS/LS 中异喹啉生物碱生物合成途径富集情况与 HR/LR 组基本一致。挑选了这条通路上游 4 个关键酶中的 4 个差异显著的基因在 2 组中进行表达验证，发现与测序结果趋势一致。在 HR、HS 中这 4 个基因显著上调。推测造成 2 种材料中青藤碱积累差异的原因是由于 HR 和 HS 中异喹啉类生物碱生物合成途径被激活，通路上游关键基因表达的上调促进了青藤碱的合成。但是这仅限于转录水平的解释，还需要从蛋白水平加以证实。由于没有青风藤参考基因组，无法对通路中的全部基因进行注释，因此对摸索下游完整的青藤碱合成途径带来了不小的难度。通路中的差异基因集中在通路上游，还需要后期进行 Denovo 全基因组测序结合质谱来进一步探索完整的青藤碱合成途径。

本研究初步明确青风藤中青藤碱在不同种群

的积累情况,通过转录组测序对青藤碱合成途径进行探索。qRT-PCR 验证了异喹啉生物碱合成途径上游关键基因表达情况,发现与青藤碱的积累呈正相关。推测不同种群青风藤中青藤碱含量的差异可能是通过 *ast*、*cnmt*、*aoc* 及 *tydc* 基因的表达激活异喹啉类生物碱生物合成途径造成的。初步了解了造成青藤碱含量差异性的分子机制,为深入探索青藤碱积累规律与合成途径提供了参考。

参考文献

- [1] 吴宗群,解建国,滕杰,等.青风藤治疗类风湿性关节炎的概况[J].时珍国医国药,2006,17(7):1301-1302.
- [2] 中国药典[S].一部.2015.
- [3] 王昌华,刘翔,赵纪峰,等.中药青风藤种质资源现状调查研究[J].中国药业,2012,21(14):104-105.
- [4] 杨华,熊兴耀,仇萍.中药青风藤种质资源研究进展[J].生物技术世界,2015(9):255-256.
- [5] 国家中医药管理局.中华本草:蒙药卷[M].上海:上海科学技术出版社,2004.
- [6] 江苏新医学院.中药大辞典.上册[M].上海:上海科学技术出版社,2002.
- [7] 邓来送,刘荣禄.实用中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,1993.
- [8] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所.中药志[M].北京:人民卫生出版社,1998.
- [9] 曾茜垚,杨华.青风藤药用成分、药理作用及栽培繁育研究进展[J].湖南生态科学学报,2018,5(1):46-51.
- [10] 曹吉慧,赵桂森,冯延江.青风藤的化学成分与药理作用[J].国外医药:植物药分册,2008,23(2):62-66.
- [11] 秦峰,蔡辉.青藤碱药理作用研究进展[J].现代中药研究与实践,2016(4):81-86.
- [12] Tong B, Yu J, Wang T, *et al.* Sinomenine suppresses collagen-induced arthritis by reciprocal modulation of regulatory T cells and Th17 cells in gut-associated lymphoid tissues[J]. *Mol Immunol*, 2015, 65(1): 94-103.
- [13] Mu H, Yao R B, Zhao L J, *et al.* Sinomenine decreases MyD88 expression and improves inflammation-induced joint damage progression and symptoms in rat adjuvant-induced arthritis[J]. *Inflammation*, 2013, 36(5): 1136-1144.
- [14] Zhang H C, Liu M X, Wang E P, *et al.* Effect of sinomenine on the expression of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes MyD88 and TRAF6[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 18928-18935.
- [15] 张莹,方勇飞,王勇,等.青藤碱对类风湿关节炎患者成纤维样滑膜细胞体外增殖及凋亡的影响[J].第三军医大学学报,2007,29(12):1179-1182.
- [16] 刘继红,李卫东,滕慧玲,等.青藤碱治疗类风湿性关节炎免疫作用和机制[J].药学学报,2005,40(2):127-131.
- [17] 詹剑,杨丽,易桂标,等.盐酸青藤碱对偏头痛大鼠中脑 PAG 区域 NF-KB、COX-2 和 5-HT 表达的影响[J].中成药,2015,37(10):2121-2126.
- [18] 瞿发林,董文桀,刘蓉,等.不同产地青风藤中青藤碱的含量比较[J].药物研究,2010,19(18):32-33.
- [19] 谢丽明,李荣贵,巴文强.青风藤植物不同部位中青藤碱的含量测定[J].中国中医药现代远程教育,2013,164(11):161-163.
- [20] Facchini P J, De Luca V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: Model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants[J]. *Plant J*, 2008, 54: 763-784.
- [21] Inui T, Tamura K, Fujii N, *et al.* Overexpression of *Coptis japonica* norcoclaurine 6-O-methyltransferase overcomes the rate-limiting step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in cultured *Eschscholzia californica* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(2): 252-262.
- [22] Liscombe D K, Facchini P J. Molecular cloning and characterization of tetrahydroprotoberberine *cis*-N-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 14741-14751.
- [23] Takemura T, Ikezawa N, Iwasa K, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 100-108.
- [24] De Luca V, St-Pierre B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 168-173.
- [25] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, *et al.* Gene ontology: Tool for the unification of biology [J]. *Nat Gene*, 2000, 25(1): 25-29.
- [26] Deng Y Y, Li J Q, Wu S F, *et al.* Integrated nr database in protein annotation system and its localization [J]. *Computer Engineer*, 2006, 32(5): 71-74.
- [27] Apweiler R, Bairoch A, Wu C H, *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase [J]. *Nucl Acids Res*, 2004, 32(19): D115-D119.
- [28] Koonin E V, Fedorova N D, Jackson J D, *et al.* A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(2): R7.
- [29] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, *et al.* The KEGG resource for deciphering the genome [J]. *Nucl Acids Res*, 2004, 32(16): D277-D280.
- [30] Finn R D, Bateman A, Clements J, *et al.* Pfam: The protein families database [J]. *Nucl Acids Res*, 2013, 27(11): D222-230.
- [31] 王玉明,李锦,张丽媛,等.药用植物次生代谢产物积累规律的研究概况[J].中南药学,2012,10(2):136-139.