

表观遗传修饰剂线性脲酸对桦褐孔菌三萜合成的影响

赵艳霞, 周蓉, 孙梦妮, 袁雯雯, 郑维发*

江苏师范大学 生命科学学院, 江苏 徐州 221116

摘要: 目的 三萜类化合物是药用真菌桦褐孔菌产生的主要次生代谢产物之一, 但在实验室培养条件下积累量较少。旨在研究组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 活性抑制剂线性脲酸 (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) 对桦褐孔菌三萜合成的调控。方法 液体摇瓶发酵法培养桦褐孔菌, 并在培养液中添加 SAHA。采用荧光定量 PCR 测定三萜合成相关基因转录水平, 香草醛-高氯酸法测定细胞内和发酵液中三萜的含量。结果 SAHA 的添加提高了桦褐孔菌体内编码 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶、甲羟戊酸激酶、二磷酸酯脱羧酶、角鲨烯合成酶和羊毛甾醇合成酶等基因的表达水平。SAHA 显著提高了桦褐孔菌菌丝体内和发酵液中三萜的积累量。SAHA 诱导下桦褐孔菌菌丝体内三萜积累量达 (66.4 ± 5.24) mg/g, 明显高于对照组 $[(22.7 \pm 3.3)$ mg/g], 并且胞外三萜的含量由对照组的 (30.5 ± 2.7) mg/L 提高至 (49.3 ± 3.8) mg/L。此外, 经 SAHA 处理后桦褐孔菌胞内三萜清除自由基的能力显著提高。结论 SAHA 可以作为调节因子激发桦褐孔菌液体培养条件下三萜类化合物的积累。

关键词: 桦褐孔菌; 三萜; 组蛋白去乙酰化酶; 线性脲酸; 自由基

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)07-2137-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.024

Effect of epigenetic modifier SAHA on production of triterpenoids in *Inonotus obliquus*

ZHAO Yan-xia, ZHOU Rong, SUN Meng-ni, YUAN Wen-wen, ZHENG Wei-fa

School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China

Abstract: Objective Triterpenoids are one of the major classes of bioactive secondary metabolites produced by medicinal basidiomycete *Inonotus obliquus*. However, the accumulation of triterpenoids is less under lab culture conditions. The purpose of this study was to investigate the regulation of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on the biosynthesis of triterpenoids in *I. obliquus*. **Methods** *I. obliquus* was cultured by liquid shake flask in the presence of SAHA. For determining the effects of SAHA on biosynthesis of triterpenoids by *I. obliquus*, the mRNA expression level of genes encoding 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA synthase (HMGS), 3-hydroxy-3-methyl glutary-CoA reductase (HMGR), mevalonate kinase (MK), diphosphomevalonate decarboxylase (DPMD), squalene synthase (SS) and lanosterol synthase (LS) by real-time PCR. For assaying the triterpenoids contents in *I. obliquus* under submerged culture conditions, Vanillin- Perchloric Acid Method was used to determine the production of total triterpenoids either in mycelia or in the culture broth. **Results** The results showed that the addition of SAHA enhanced the expression levels of *hmgs*, *hmgr*, *mk*, *dpmd*, *ss* and *ls* in *I. obliquus*. Consistent with the increase of gene expression, the accumulation of total triterpenoids was increased to (66.4 ± 5.24) mg/g for mycelial triterpenoids and (49.3 ± 3.8) mg/L for extracellular triterpenoids, which was obviously higher than (22.7 ± 3.3) mg/g mycelial triterpenoids and (30.5 ± 2.7) mg/L extracellular triterpenoids found in the control cultures. Furthermore, SAHA treatment enhanced the capacity of mycelial triterpenoids to scavenge free radicals. **Conclusion** In summary, SAHA can be used as a regulator to stimulate the accumulation of triterpenoids of *I. obliquus* under submerged culture conditions.

Key words: *Inonotus obliquus*; triterpenoids; histone deacetylase; suberoylanilide hydroxamic acid; free radical

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31470173); 国家自然科学基金项目 (31400431); 江苏师范大学研究生创新计划项目 (2021XKT0752)

作者简介: 赵艳霞 (1980—), 女, 河北衡水, 副教授, 博士, 主要从事药用真菌次级代谢产物研究。

Tel: (0516)83403179 E-mail: zhaoyx0318@126.com

*通信作者: 郑维发 (1962—), 男, 安徽南陵, 教授, 博士, 主要从事药用真菌次级代谢产物的代谢调控研究。

Tel: (0516)83403179 E-mail: yyzw@jsnu.edu.cn

桦褐孔菌属于药用担子真菌,可以合成黑色素^[1]、多酚^[2]和三萜^[3]等次级代谢产物。三萜类化合物具有抑制肿瘤、抗菌、抗病毒和镇痛等作用^[3-4],对癌肉瘤 Walker-256 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞和疱疹病毒具有显著的抑制作用^[5]。桦褐孔菌合成的三萜类化合物主要有 3-羊毛甾-8,24-二烯-21-醛、羊毛甾醇、3 β -羟基-羊毛甾-8,24-二烯-21-醛、白桦脂醇、桦褐孔菌醇、栓菌酸、3 β ,21-二羟基-羊毛甾-8,24-二烯、齐墩果酸、乌苏酸、白桦脂酸、桦褐孔菌素 A、桦褐孔菌萜 D、3 β -乙酰氧基-11 α ,12 α -环氧-齐墩果烷-28,13 β -内酯等^[6],该类化合物对肺癌人类肺泡基底上皮 A549 细胞、结肠直肠癌 HT29 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞和小鼠白血病 L1210 细胞等肿瘤细胞具有毒性^[7],对小鼠乳腺癌 4T1 细胞株和 MCF-7 细胞的具有毒性^[8]。然而,桦褐孔菌在自然界中生长缓慢,不能作为三萜类化合物的主要来源。其在实验室培养条件下生长繁殖速度比较快,但是次级代谢产物合成基因处于沉默或者低表达状态^[9],导致实验室培养条件下三萜类化合物积累量较低。

生物体三萜类化合物主要通过甲戊二羧酸途径合成^[10]。其中 3-羟基-3-甲基戊二单酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR)是催化异戊二烯生物合成,角鲨烯合成酶(squalene synthase, SS)催化从异戊二烯途径到甾醇和三萜生物合成^[10]。羊毛甾醇合成酶(lanosterol synthase, LS)催化 2,3-氧杂质量烯环化形成羊毛甾烷^[9]。目前本实验室对 *I. obliquus* ATCC 22881 的全基因组进行了测序,结合 Narimene 等^[9]发表的文章,发现 *I. obliquus* L. 中编码 3-羟基-3-甲基戊二单酰辅酶 A 合成酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS)、HMGR、甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase, MK)、二磷酸酯脱羧酶(diphosphomevalonate decarboxylase, DPMD)、SS 和 LS 等基因参与三萜类化合物的合成。生物体内基因表达水平受表观遗传调控。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)对染色体的结构修饰、基因表达调控和次级代谢产物积累发挥着重要的作用^[11-12]。组蛋白的乙酰化有利于 DNA 与组蛋白八聚体的解离,核小体结构松弛,从而使各种转录因子和协同转录因子能与 DNA 结合位点特异性结合,激活基因的转录。在细胞核内,组蛋白乙酰化与组蛋白去乙酰化过程处于动态平衡,并由组蛋白乙酰化转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)共同调控。HAT 将乙酰

辅酶 A 的乙酰基转移到组蛋白氨基末端特定的赖氨酸残基上,HDAC 使组蛋白去乙酰化,与带负电荷的 DNA 紧密结合,染色质致密卷曲,基因的转录受到抑制^[13]。研究表明,HDAC 可以调节黄曲霉中黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 的积累^[12],稻瘟病菌和亚洲镰刀菌中 hda1 型组蛋白去乙酰酶的缺失能增加代谢物的产生^[14]。线性脲酸(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)是 HDAC 的抑制剂,SAHA 通过结合到酶的活性位点抑制 HDAC 的活性。据报道,SAHA 可以改变 *Botryosphaeria mamane* 次级代谢产物的组成^[15],SAHA 的处理可以增加 *Beauveria Felina* 中抗炎环肽的合成^[16]。然而,组蛋白乙酰化修饰是否影响桦褐孔菌三萜类化合物合成相关基因的转录尚不确定。本实验中研究了 SAHA 对桦褐孔菌三萜类化合物积累量和相关合成基因的影响。研究结果将为提高药用真菌次级代谢产物合成基因的表达水平从而提高次级代谢产物的产量奠定基础。

1 材料

1.1 供试菌株

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus* ATCC22881)购自美国典型培养物保藏中心,现保存于江苏省药用植物生物技术重点实验室。桦褐孔菌液体培养基配方:葡萄糖(2%)、蛋白胨(0.35%)、酵母提取物(2%)、KH₂PO₄(0.01%)、MgSO₄·7H₂O(0.05%)。培养温度为 26 °C,摇床转速为 140 r/min。SAHA(批号 149647-78-9)购买于 Sigma 公司。

1.2 仪器

酶标仪(SYNERGY2,美国 BioTek 公司),实时荧光定量 PCR(StepOnePlus,美国 Applied Biosystems 公司),离心机(Eppendorf 5418,德国 Eppendorf 有限公司),闪式提取器(ZHBE-50T,河南金鼎科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 桦褐孔菌的培养

将桦褐孔菌接种在 PDA 培养基中,于 26 °C 培养 7 d,然后转接到含有 80 mL 培养液的 250 mL 的三角瓶中进行培养。在无菌条件下收集菌丝体,匀浆后接种到含有 150 mL 培养液的 500 mL 的三角瓶中培养 2 d 后,向培养液中添加 SAHA,使培养液中 SAHA 的浓度为 200 μ mol/L。以未添加 SAHA 的桦褐孔菌培养物为对照组。每天取样备用。

2.2 基因表达水平的测定

采用荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测

桦褐孔菌合成三萜类化合物相关基因的表达水平。菌丝体经液氮研磨后利用 Trizol (Takara 公司, 日本) 法提取 RNA, 采用 DnaseI 去除基因组 DNA 的污染 (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, 美国)。然后利用反转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA (Takara 公司, 日本)。使用 SYBR® Green Supermix (Roche) 进行 qRT-PCR, 相关引物见表 1。以 β -肌动蛋白基因作为内参基因, 以未添加 SAHA 的培养物中靶基因的表达值为对照, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平^[17]。实验过程中每组样品均做 3 个生物重复。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列 (5'-3')	目的
qhmgS F	AGACCTTCGTAGCAGTTGCC	hmgs 转录水平
qhmgS R	TGTAGAACGAGGAAGCGCAG	
qhmgr F	GAGCCAACGAATGATGACGC	hmgr 转录水平
qhmgr R	AGCGCGGAAAGCAAAGAAAAG	
qmk F	CTTCCAGTCTGAGGGTGCAG	mk 转录水平
qmk R	ACGAGGAGATCCGAGGTTCA	
qdpmd F	TCCGTTGACGACTACCTCT	dpmd 转录水平
qdpmd R	TGTACGAGGCGATATGCACG	
qss1F	CGAATTCGACTGCGTCGTTC	ss1 转录水平
qss1 R	AAGCCAGGGCACTTCCTTAC	
qss2 F	CGAATTCGACTGCGTCGTTC	ss2 转录水平
qss2 R	AAGCCAGGGCACTTCCTTAC	
qls1 F	TGTGCGATACCACCTCTTCG	ls1 转录水平
qls1 R	TACCATTGGGGCAATCCAC	
qls2 F	CATACCGCTCTCCTGGACAC	qls2 转录水平
qls2 R	TGAAATCTCGGCGCTTCAGT	
qaactin F	ATGGATCACTTTTCAGAG	qaactin 转录水平
qaactin R	TCAACTAACCCGTCTGGG	

2.3 三萜类化合物的提取和测定

利用双水相超声法提取桦褐孔菌菌丝体内三萜, 提取条件为: 异丙醇体积浓度 40%, 硫酸铵质量浓度 0.125 g/mL, 料液比 0.9 : 1, 超声时间为 35 min^[18]。胞外三萜的提取: 收集不同培养条件下桦褐孔菌的培养液, 将入醋酸乙酯进行萃取, 重复萃取 3 次。收集醋酸乙酯相, 浓缩后定容。以在野生型桦褐孔菌中分离纯化到的肌醇为对照品, 利用香草醛-高氯酸法^[19]测定桦褐孔菌在不同培养条件下三萜类化合物的积累量。

2.4 三萜抗氧化活性的测定

利用分光光度计法测定桦褐孔菌胞内三萜清除超氧阴离子、羟自由基和 DPPH 的能力。3 mmol/L

的邻苯三酚用于测定桦褐孔菌三萜类化合物清除超氧阴离子的能力^[20], 5 mmol/L 的 1,10-二氮杂菲用于检测清除羟自由基的能力^[21], 0.1 mmol/L 的 1,1-二苯基-2-苦基肼用于清除 DPPH 自由基的活性研究^[22]。

2.5 统计分析

利用 SPSS 13.0 对实验数据进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对照组和样品组之间的比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示组间存在差异, $P < 0.01$ 表示组间存在显著性差异。

3 结果与分析

3.1 三萜类化合物合成基因的表达水平

桦褐孔菌中编码 HMGS、HMGR、MK、DPMD、SS 和 LS 等基因参与羊毛甾烷型三萜的合成^[9], 其含有 1 个编码 3-羟基-3-甲基戊二单酰辅酶 A 合成酶的基因 (*hmgs*, GenBank: MK825554), 1 个编码 3-羟基-3-甲基戊二单酰辅酶 A 还原酶的基因 (*hmgr*, GenBank: MK825555)、1 个编码甲羟戊酸激酶的基因 (*mk*, GenBank: MK825557)、1 个编码二磷酸酯脱羧酶的基因 (*dpmd*, GenBank: MK825558)、2 个编码角鲨烯合成酶的基因 (*ss1*, GenBank: MK825564; *ss2*, GenBank: MK825565) 和两个编码羊毛甾醇合成酶的基因 (*ls1*, GenBank: MK825567; *ls2*, GenBank: MK825568)。本实验研究了 SAHA 对编码 HMGS、HMGR、MK、DPMD、SS 和 LS 基因的表达水平的影响。分别以对照组不同时间点的基因表达水平为 1, 计算 SAHA 处理组基因的表达水平。由图 1 可以发现, SAHA 的添加激发了 *hmgs*、*hmgr*、*mk*、*dpmd*、*ss* 和 *ls* 的表达水平, 其中 *hmgs*、*dpmd*、*ss1* 和 *ls1* 在培养的 144 h 时达最高表达水平, 分别为 16.34、6.36、11.08 和 2.65, *hmgr*、*ss2* 和 *ls2* 在培养的 168 h 时达最高表达水平, 分别为 10.13、7.73 和 4.08, *mk* 在培养的 192 h 达最高表达水平为 6.51。

3.2 三萜类化合物的积累

SAHA 显著提高了桦褐孔菌细胞内和发酵液中三萜类化合物的积累。桦褐孔菌在添加 SAHA 后的 24 h 至 96 h 中菌丝体内三萜的含量没有显著性差异, 在培养的 120 h 开始, 添加 SAHA 组桦褐孔菌菌丝体中三萜的积累量随着培养时间的延长逐渐升高, 培养至 192 h 时, 对照组菌丝体内三萜的积累量为 (22.7 ± 3.3) mg/g, 极显著的低于 SAHA 添加组中三萜的积累水平 (66.4 ± 5.24) mg/g ($P < 0.001$, 图 2-A)。在添加 SAHA 24 h 后, 桦褐孔菌细胞外

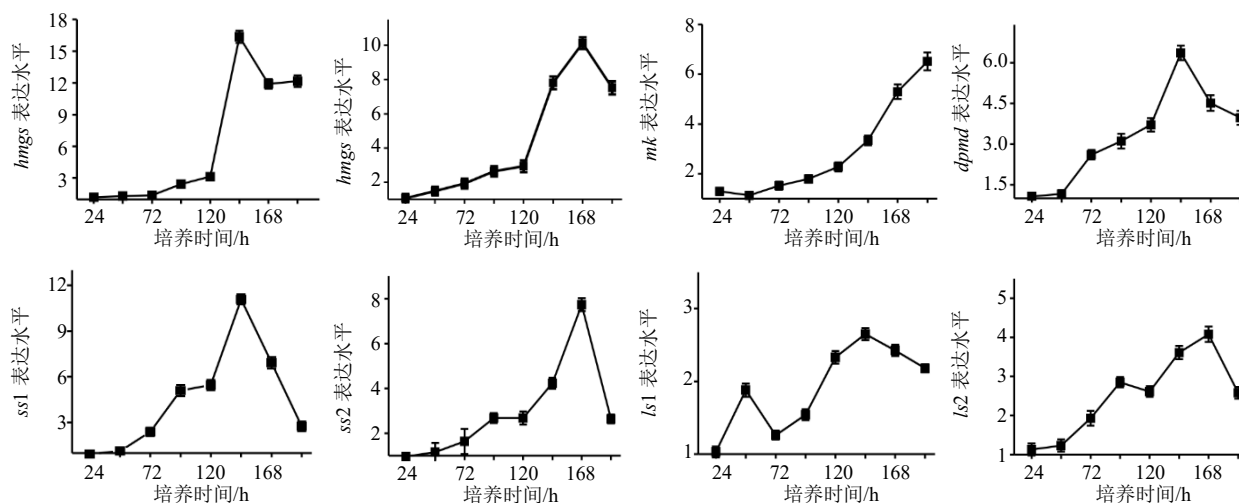


图1 桦褐孔菌培养过程中 SAHA 的添加对 *hmgs*、*hmgr*、*mk*、*dpmd*、*ss* 和 *ls* 表达水平的影响

Fig. 1 Effect of SAHA-addition on expression levels of *hmgs*, *hmgr*, *mk*, *dpmd*, *ss* and *ls* in cultures of *I. obliquus*

三萜的含量明显提高至 (11.3 ± 0.8) mg/L, 并随着培养时间的延长, 发酵液中三萜的积累水平逐渐升高, 培养至 192 h 时, 三萜的积累量高达 (49.3 ± 3.8) mg/L, 极其明显的高于正常培养条件下发酵液中三萜的积累量 (30.5 ± 2.7) mg/L ($P < 0.001$, 图 2-B)。并且经 5-AC 处理后的桦褐孔菌胞内多酚清除 DPPH 自由基、超氧阴离子和羟自由基的能力均显著性的高于正常培养条件下多酚的清除能力 (图 3), 推测是由于桦褐孔菌胞内三萜类化合物的组成

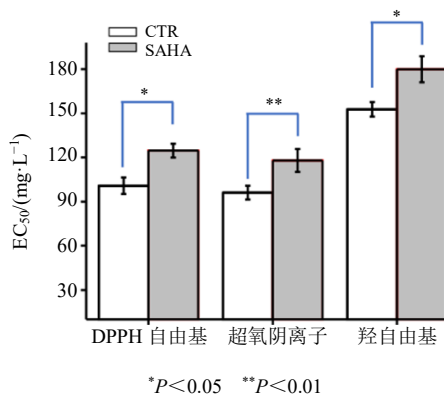


图3 桦褐孔菌胞内三萜清除自由基的能力

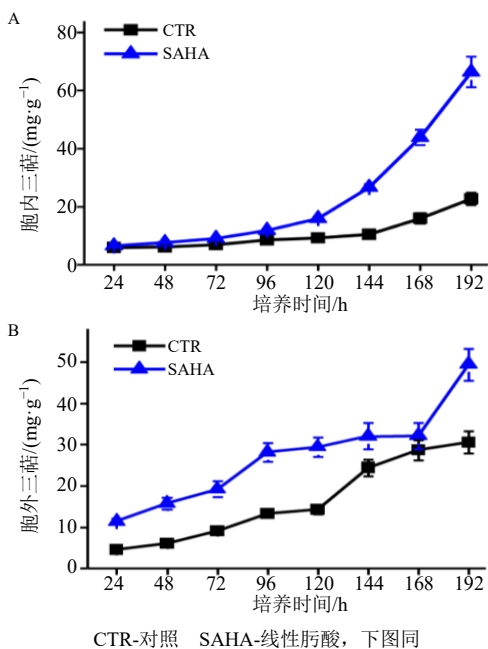
Fig. 3 Scavenging capacities of intracellular triterpenoid from *I. obliquus*

成分的含量和种类的变化引起其清除自由基能力的变化。可见, SAHA 的添加不仅促进了三萜类化合物的合成, 而且提高了该类化合物的抗氧化活性。

4 讨论

真菌是天然产物的主要来源, 然而, 实验室培养条件下参与次级代谢产物合成相关的基因均处于沉默或低表达状态^[9]。表观遗传修饰作为激发剂可以激活基因表达水平从而提高次级代谢产物的产量, 诱导新化合物的形成^[23]。本研究发现, 在液体发酵培养桦褐孔菌的过程中, SAHA 的添加提高了参与三萜合成的基因 *hmgs*、*hmgr*、*mk*、*dpmd*、*ss* 和 *ls* 等的表达水平, 促进桦褐孔菌菌丝体内和发酵液中三萜类化合物的合成, 并且菌丝体内三萜类化合物抗氧化能力显著性的提高。

生物体内组蛋白乙酰化状态是动态的, 同时受



CTR-对照 SAHA-线性脲酸, 下图同

CTR-control SAHA-suberoylanilide hydroxamic acid, same as below

图2 SAHA 对桦褐孔菌内 (A)、外 (B) 三萜积累的影响
Fig. 2 Effects of SAHA on accumulation of triterpenoid in *I. obliquus*

组蛋白乙酰转移酶和组蛋白去乙酰化酶控制。组蛋白的低乙酰化与异染色质形成和基因沉默相关,组蛋白高乙酰化与常染色质形成和基因激活有关^[24-25]。利用 HDAC 的抑制剂调节真菌次级代谢产物的合成被认为是开发新的真菌天然产物的有效途径。如 SAHA 可以调控乳突葡萄球菌代谢产物的生成并能诱导新化合物的合成^[15],诱导白僵菌产生具有抗炎活性的环缩肽^[16]以及诱导曼陀罗内生真菌镰刀菌酸的合成^[26]、芋枝孢霉 *Cladosporium colocasiae* 中新型乙酰甾醇的合成^[27]。桦褐孔菌胞内三萜类化合物抗氧化活性的增强,说明桦褐孔菌胞内三萜类化合物组成成分的含量和种类发生了变化,为此将深入研究表观遗传修饰剂对桦褐孔菌三萜类化合物组成成分的影响,确定桦褐孔菌体内抗氧化活性较强的物质组成,为进一步研究表观遗传修饰剂提高桦褐孔菌次级代谢产物的分子机制奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Langfelder K, Streibel M, Jahn B, et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi [J]. *Fungal Genet Biol*, 2003, 38(2): 143-158.
- [2] Lee I K, Kim Y S, Jang Y W, et al. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(24): 6678-6681.
- [3] Taji S, Yamada T, Tanaka R. Three new lanostane triterpenoids, inonotsutriols A, B, and C, from *Inonotus obliquus* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2008, 91(8): 1513-1524.
- [4] Zheng W F, Zhang M M, Zhao Y X, et al. Analysis of antioxidant metabolites by solvent extraction from sclerotia of *Inonotus obliquus* (Chaga) [J]. *Phytochem Anal*, 2011, 22(2): 95-102.
- [5] Taji S, Yamada T, Wada S, et al. Lanostane-type triterpenoids from the sclerotia of *Inonotus obliquus* possessing anti-tumor promoting activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2008, 43(11): 2373-2379.
- [6] 张仕瑾, 谢运飞, 谭玉柱, 等. 桦褐孔菌三萜类化学成分研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(16): 2355-2360.
- [7] Zhao F Q, Mai Q Q, Ma J H, et al. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities [J]. *Fitoterapia*, 2015, 101: 34-40.
- [8] Zhao F Q, Xia G Y, Chen L X, et al. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(4): 721-730.
- [9] Fradj, Santos G D, Montigny D, et al. RNA-seq de novo assembly and differential transcriptome analysis of chaga (*Inonotus obliquus*) cultured with different betulin sources and the regulation of genes involved in terpenoid biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4334.
- [10] Zhao M W, Liang W Q, Zhang D B, et al. Cloning and characterization of squalene synthase (*SQS*) gene from *Ganoderma lucidum* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(7): 1106-1112.
- [11] Guzman-Chavez F, Salo O, Samol M, et al. Deregulation of secondary metabolism in a histone deacetylase mutant of *Penicillium chrysogenum* [J]. *Microbiologyopen*, 2018, 7(5): e00598.
- [12] Lan H H, Wu L H, Sun R L, et al. The HosA histone deacetylase regulates aflatoxin biosynthesis through direct regulation of aflatoxin cluster genes [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2019, 32(9): 1210-1228.
- [13] Hyndman K A, Knepper M A. Dynamic regulation of lysine acetylation: The balance between acetyltransferase and deacetylase activities [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(4): F842-F846.
- [14] Maeda K, Izawa M, Nakajima Y, et al. Increased metabolite production by deletion of an HDA1-type histone deacetylase in the phytopathogenic fungi, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*) and *Fusarium asiaticum* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2017, 65(5): 446-452.
- [15] Triastuti A, Vansteelandt M, Barakat F, et al. How histone deacetylase inhibitors alter the secondary metabolites of *Botryosphaeria mamane*, an endophytic fungus isolated from *Bixa orellana* [J]. *Chem Biodivers*, 2019, 16(4): e1800485.
- [16] Chung Y M, El-Shazly M, Chuang D W, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria felina* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(7): 1260-1266.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] 赵艳霞, 刘峰, 魏娟娟, 等. 双水相超声法提取桦褐孔菌三萜 [J]. *菌物学报*, 2014, 33(1): 129-137.
- [19] Zhang Y, Wu X Q, Ren Y P, et al. Safety evaluation of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42(11): 1867-1875.
- [20] Wang S Y, Wu J H, Cheng S S, et al. Antioxidant activity of extracts from *Calocedrus formosana* leaf, bark, and

- heartwood [J]. *J Wood Sci*, 2004, 50(5): 422-426.
- [21] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe²⁺氧化法检测 H₂O₂/Fe²⁺产生的羟自由基 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(6): 553-555.
- [22] Wang S Y, Wu J H, Cheng S S, *et al.* Antioxidant activity of extracts from *Calocedrus formosana* leaf, bark, and heartwood [J]. *J Wood Sci*, 2004, 50(5): 422-426.
- [23] de Groote M L, Verschure P J, Rots M G. Epigenetic Editing: Targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(21): 10596-10613.
- [24] Shwab E K, Bok J W, Tribus M, *et al.* Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus* [J]. *Eukaryot Cell*, 2007, 6(9): 1656-1664.
- [25] Elías-Villalobos A, Helmlinger D, Ibeas J I. Histone deacetylases: Revealing the molecular base of dimorphism in pathogenic fungi [J]. *Microb Cell*, 2015, 2(12): 491-493.
- [26] Chen H J, Awakawa T, Sun J Y, *et al.* Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. [J]. *Nat Prod Bioprospecting*, 2013, 3(1): 20-23.
- [27] Liu D Z, Liang B W, Li X F, *et al.* Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel acetylenic sterols from *Cladosporium colocasiae* sterols [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 87: 35-38.

[责任编辑 时圣明]