

• 药材与资源 •

粗茎秦艽裂环马钱苷合酶基因克隆与表达分析

肖鸿扬¹, 冯婧娴¹, 吴新荣¹, 李霞², 赵志礼^{1*}, 倪梁红^{1*}

1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

2. 上海市浦东食品药品检验所, 上海 201210

摘要:目的 克隆粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* 的裂环马钱苷合酶 (secologanin synthase, SLS) 基因 *GcSLS*, 分析其理化性质、系统进化关系、组织表达特性, 为进一步研究植物萜类化合物生物合成通路中的关键酶及其作用机制提供基础资料。**方法** 依据粗茎秦艽转录组数据, 注释、筛选并克隆 *GcSLS* 基因; 使用生物信息学工具分析其编码的氨基酸序列、结构域等, 预测其编码蛋白的理化性质; 使用 MEGA11 软件分析进化关系, 并利用荧光定量 PCR 检测 *GcSLS* 基因在不同组织中的相对表达水平。**结果** 从粗茎秦艽中成功克隆获得 *GcSLS* 基因, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列全长共计 1 566 bp, 编码 521 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为 59 590, 为碱性亲水稳定蛋白, 具有细胞色素 P450 的保守域并含有 1 处跨膜结构。荧光定量 PCR 结果显示, *GcSLS* 在粗茎秦艽根和花中的表达量显著高于在叶和茎中的表达量; 且该基因受茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 诱导后表达水平显著上调。**结论** 获得粗茎秦艽 *GcSLS* 序列基础信息, 分析序列特征及表达模式, 可为深入探究 *GcSLS* 在萜类化合物合成通路中的功能提供科学资料。

关键词: 粗茎秦艽; 裂环马钱苷合酶; 表达模式; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)09-3245-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.021

Cloning and expression pattern analysis of *GcSLS* gene in *Gentiana crassicaulis*XIAO Hongyang¹, FENG Jingxian¹, WU Jinrong¹, LI Xia², ZHAO Zhili¹, NI Lianghong¹

1. Department of Pharmacognosy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Shanghai Pudong Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201210, China

Abstract: Objective To clone secologanin synthase (SLS) gene from *Gentiana crassicaulis* (*GcSLS*) and carry out physical and chemical properties, system evolutionary relationships, organization expression characteristic analysis. **Methods** Based on the annotation results of transcriptome data, we cloned the *GcSLS* from *G. crassicaulis*, analyzed its amino acid coding sequences and predicted the protein domains, physical and chemical properties and structure features. MEGA 11 software was used for evolutionary analysis. Quantitative PCR was employed to detect the expression levels of *GcSLS* in different tissues. **Results** We successfully cloned the *GcSLS*, and the ORF of *GcSLS* was 1 566 bp in length, encoding a 521 aa protein with a molecular weight of 59 590. It was a hydrophilic protein with a transmembrane domain, P450 conserved domains and no signal peptides. The results of quantitative PCR showed that the expression of *GcSLS* in roots and flowers was significantly higher than that in leaves and stems, and the expression of *GcSLS* was significantly induced by methyl jasmonate (MeJA). **Conclusion** The basic information, sequence characteristics and expression pattern of *GcSLS* may provide scientific data for further investigation of the function of *GcSLS* in the synthesis pathway of terpenoids.

Key words: *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.; secologanin synthase; expression pattern; gene cloning; bioinformatics analysis

粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.
隶属于龙胆科龙胆属 *Gentiana* L. 秦艽组 Sect.

Cruciata, 在西藏、云南、四川、贵州、青海及甘肃
等省区均有分布, 多见于海拔 2 100~4 500 m 的高

收稿日期: 2024-12-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82073959); 西藏自治区藏医药管理局科研课题 (JJKT2020017)

作者简介: 肖鸿扬, 男, 硕士研究生。E-mail: xhya2tla@163.com

*通信作者: 赵志礼, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源与品种鉴定。E-mail: zhilzhao@sohu.com

倪梁红, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药资源与品种鉴定。E-mail: nlhtcm@126.com

山草甸、林下及林缘^[1]。粗茎秦艽是常用中药秦艽基原植物之一^[2]，其干燥根及花亦作为藏药“解吉那保”入药^[3]，具有重要的药用价值。课题组前期对该药用植物开展了民族植物学考察、植物分类学鉴定、物种扩散模式、物种内遗传多样性分析及道地药材初加工方法评价等工作^[4-10]。

龙胆苦苷和马钱苷酸为中药秦艽的指标性成分^[1]，都属于环烯醚萜类化合物。环烯醚萜类化合物属于萜类化合物中的单萜类成分，其结构一般都含有环戊烷与半缩醛，根据其环戊烷是否裂环，可分为环烯醚萜苷类及裂环环烯醚萜苷类。环烯醚萜类化合物具有多种药理作用，可保护神经系统、降糖、抗炎、抗肿瘤等^[11]。环烯醚萜类化合物的生物合成途径一般可分为前体合成、环烯醚萜类骨架合成、及后期化学修饰 3 个阶段。在第 3 阶段，萜类化合物骨架疏蚁二醛经羟基化、糖基化、甲基化、环氧化、酰基化等多种修饰反应^[12]，产生了植物体内多样的萜类化合物，如龙胆苦苷、獐牙菜苦苷等。参与修饰的酶主要分为 2 类：P450 酶和尿苷二磷酸糖基转移酶（uridine diphosphate glycosyltransferase, UGT）。2014 年，Karel 等^[13]以长春花 *Catharanthus roseus* L. 为研究对象，完善了萜类化合物合成途径后修饰阶段的几个步骤，马钱苷酸 O-甲基转移酶（loganic acid O-methyltransferase, LAMT）催化马钱苷酸甲基化生成马钱苷，然后由裂环马钱苷合酶（secologanin synthase, SLS）催化开环形成裂环马钱苷。粗茎秦艽转录组数据也已注释到 SLS^[14]，但尚未对其开展深入的研究。

SLS 属于 CYP450 酶，这类酶与一氧化碳的复合物在 450 nm 处有特征光吸收峰而得名 P450^[15]，在参与化合物的修饰过程中起主要的氧化和羟基化作用^[16]。2000 年，Irmiler 等^[17]首次将 SLS 鉴定并命名为 CYP72A1。SLS 含有被认为参与氧结合和激活的 I-螺旋基序^[18]，但缺乏靠近 N 端膜镶嵌的富含脯氨酸的基序（[P/I]Px[P/G]xP），该基序被认为对 P450 的结构至关重要^[19]，大多数植物 CYPs 蛋白通过该序列可锚定在内质网膜上。

近年来，萜类化合物合成途径中的许多酶已得到克隆和鉴定，但关于控制裂环阶段的 SLS 基因的相应研究报道仍然有限。本研究对粗茎秦艽 *GcSLS* 基因进行克隆，并对其编码蛋白的理化性质、结构、系统进化等进行生物信息学分析，采用实时荧光定

量 PCR（quantitative real-time PCR, qRT-PCR）检测不同组织表达特性，以期为深入认识龙胆苦苷等一大类活性成分的生源合成途径奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品 2023 年 8 月 1 日采集于云南省香格里拉市，采集号（赵志礼 202301），海拔 3 402 m；生境：草滩；地理坐标：N 27° 34.05′，E 99° 51.55′。3 个新鲜植株低温保鲜快速运至实验室，-80 °C 保存备用；另采凭证标本 1 份。所有标本均经上海中医药大学药学教研室赵志礼教授鉴定为粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk.，凭证标本（标本号：赵志礼 2023YN01）存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室。

1.2 仪器

PCR 扩增仪（Eppendorf Mastercycler X50s），基础电泳仪电源（伯乐 Powerpac Basic 公司），凝胶成像仪（伯乐 GelDoc XR+ 公司），QPCR 仪 QuantStudio™ 3 系统（Thermo Fisher 公司，美国），VD-650 型桌上垂直净化工作台（苏州智净净化设备有限公司），SHP-250 型生化培养箱（上海森信实验仪器有限公司），THZ-C 型恒温振荡器（太仓市豪诚实验仪器制造有限公司），-80 °C 医用低温保存箱（Haier）。

1.3 试剂

TransZol Up Plus RNA Kit 购于全式金生物技术股份有限公司（北京），DNA 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix（Dye Plus）P525 购于诺唯赞生物科技股份有限公司（南京），qPCR Mix（2×，SYBR Green I, low ROX）试剂盒，零背景 pTOPO 克隆试剂盒（粘末端，双抗性）均购于百生跃生物科技有限公司（上海），MightyScript 第一链 cDNA 合成试剂盒（BBI），TOP10 感受态细胞，DiaSpin 柱式 DNA 胶回收试剂盒均购于生工生物工程股份有限公司（上海），序列测定由生工生物完成。

2 方法

2.1 样品处理

取生长状态相近、形态良好的粗茎秦艽 3 株，洗净后分别切下根、茎、叶、花组织，进行编号，液氮速冻后于 -80 °C 冰箱冻存，用于粗茎秦艽序列扩增及表达研究。

取粗茎秦艽幼苗，喷施相同体积的 200 μmol/L 茉莉酸甲酯（methyl jasmonate, MeJA）激素，分别

在静置 0、3、6、12、24 h 后摘取叶片，标记后液氮速冻于-80 ℃冰箱冻存，用于分析 MeJA 激素对 *SLS* 基因表达的影响。

2.2 RNA 提取及 cDNA 合成

组织样品在液氮中充分研磨至粉末状，依据 TransZol Up Plus RNA Kit 说明书提取 RNA。RNA 定量后依据 MightyScript 第一链 cDNA 合成试剂盒说明书操作合成 cDNA，于-20 ℃中冻

存备用。

2.3 基因克隆

在 NCBI 上下载不同物种 *SLS* 基因序列，使用 TBtools 软件中的 blast 功能，比对粗茎秦艽转录组 CDS 数据，提取评分最高的序列。使用 NCBI 的在线 BLAST 功能以及 InterPro 的序列比对功能，确定为 *SLS* 基因。以粗茎秦艽 cDNA 为模板，根据基因序列设计特异性引物(*SLS*-F/R)进行扩增(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	引物序列 (5'-3')	扩增大小/bp
<i>SLS</i> -F/R	ATGGAGGTGGATCTGATCAAGAAAGC TCACTCAAGCTTCTTATAAATCACATGG	1 566
<i>SLSQ</i> -F/R	CCTGGATGGTGCTACGTGCCAACAA CTCTCCGGCGGTGATGGCTTTCAT	149
<i>TUB</i> -F/R	TGCGGCAATCAGATCGGAGCTAAGT TCCATAAGCACAGCACGAGGCACAA	167
<i>UBQ</i> -F/R	CTCTCACAGGCAAGACCATCACACT CACCACGGAGCCTCAGAACCAAGT	207

反应程序：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 60 s，共 36 个循环；最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 扩增产物经胶回收与 TOPO 载体连接转化大肠杆菌 *E. coli* TOP10，送上海生工生物公司测序。

2.4 GcSLS 基因生物信息学分析

使用在线网站工具 ProtParam 分析 *SLS* 基因编码蛋白的理化性质。使用在线网站 T-coffee 中的 Expresso 方式进行氨基酸的多序列比对，比对结果使用 Jalview 软件进行查看；使用 Signal P 和 TMHMM 分析预测蛋白的信号肽及跨膜结构域；使用 SOPMA 和 I-TASSER 分别分析预测蛋白质的二级、三级结构。使用 MEGA 11 软件采用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建植物 *SLS* 蛋白进化树。

2.5 GcSLS 基因的内参引物筛选及 qRT-PCR

对所提取的粗茎秦艽根、茎、叶、花组织的 RNA 进行定量后，反转录为 cDNA，依据 *GcSLS* 基因序列信息和转录组数据设计并实验考察 qRT-PCR 反应引物。根据预实验的扩增曲线及熔解曲线情况最终选取 β -微管蛋白基因(β -tubulin, β -*TUB*)以及多聚泛素蛋白基因(polyubiquitin, *UBQ*)为内参引物，考察 *SLS* 基因在不同部位的表达情况。

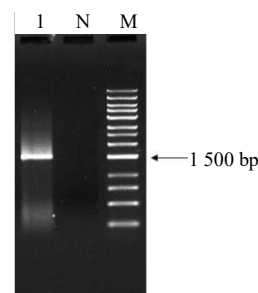
使用 QuantStudio™ 3 qPCR 仪进行荧光定量

PCR，反应体系如下：20 μ L 体系其中包括 10 μ L qPCR Mix，8 μ L dd H₂O，相应上、下游引物各 0.5 μ L，cDNA 模板 1 μ L。反应程序为 Hold Stage: 95.0 ℃、30 s；PCR Stage: 95.0 ℃、5 s，60.0 ℃、30 s，40 个循环；Melt Curve Stage: 95.0 ℃、15 s，60.0 ℃、30 s，95.0 ℃、1 s。结果使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因相对表达水平。

3 结果与分析

3.1 基因克隆

采用特异性引物 *SLS*-F/R 以粗茎秦艽 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测显示 1 条大约 1 500 bp 的条带(图 1)。使用胶回收试剂盒将扩增产物回收后，连接 TOPO 载体并转化



1-*GcSLS* PCR 产物，N-阴性对照，M-Marker。

1-PCR product of *GcSLS*, N-negative control, M-Marker.

图 1 *GcSLS* 扩增结果

Fig. 1 Amplification result of *GcSLS*

大肠杆菌,菌液涂于含有 Amp 抗性的 LB 固体培养基平板,37 ℃ 培养过夜。第 2 天挑取单菌落加入含 Amp 抗性的 LB 液体培养基,37 ℃、220 r/min 培养 12 h,使用 Taq 酶进行菌液 PCR 鉴定转化结果,挑选阳性菌株进行测序,结果显示该序列为粗茎秦艽裂环马钱苷合酶基因,将其命名为 *GcSLS*。

3.2 *GcSLS* 生物信息学分析

GcSLS 开放阅读框总长 1 566 bp, 编码 521 个氨基酸, 预测编码蛋白的相对分子质量为 59 590, 等电点为 9.06, 属于碱性蛋白; 总平均亲水系数为 -0.181, 不稳定系数为 33.49 (低于 40), 预测其为稳定的亲水蛋白 (图 2)。

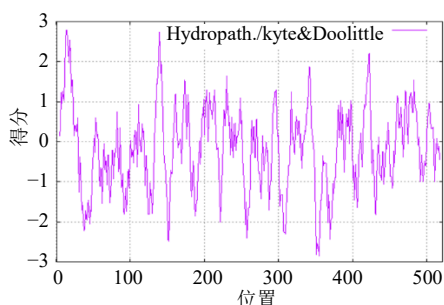


图 2 *GcSLS* 氨基酸亲疏水性预测

Fig. 2 Hydrophobicity prediction analysis of amino acid sequence of *GcSLS*

蛋白跨膜结构域在细胞转运、胞内信号转导、生长调节等方面具有重要作用, 信号肽是引导新合成的蛋白质分泌通路转移的短肽链, 序列长度多数含有 5~30 个氨基酸^[20]。跨膜结构域分析结果显示 *GcSLS* 蛋白具有 1 个跨膜结构域; SignalP 5.0 Serve 预测发现 *GcSLS* 蛋白不存在信号肽结构, 属于非分泌蛋白 (图 3)。DeepLoc-2.0 预测 *GcSLS* 蛋白位于内质网膜上, 概率为 0.860 4。

蛋白质的二级结构的预测可为研究蛋白质功能与结构关系提供参考依据^[21]。二级结构一般包括 α -螺旋 (α helix)、 β -折叠 (β turn)、无规则卷曲 (random coil)、延伸链 (extended strand), 分析结果显示相应占比分别为 50.48%、5.95%、32.44%、11.13% (图 4)。使用 I-TASSER 在线软件预测 *GcSLS* 蛋白三维结构, 分析可能的蛋白结合口袋 (protein binding pockets) 并在图中标出, 预测了活性位点残基 (第 330、334、388、392、461、473 位氨基酸) (图 5)。

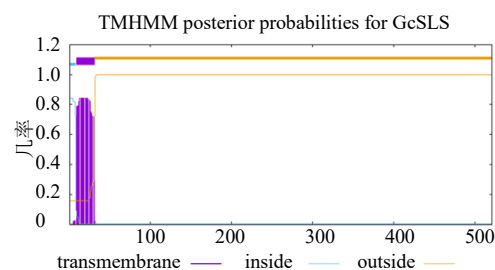


图 3 *GcSLS* 跨膜结构预测

Fig. 3 Prediction analysis of transmembrane domain of *GcSLS*

3.3 *GcSLS* 基因多序列比对及进化树分析

从 NCBI 网站下载多物种的 *SLS* 基因序列, 运用在线网站 T-coffee 中的 Expresso 方式进行氨基酸的多序列比对, 使用 Jalview 软件查看分析比对结果; 使用 MEGA11 软件, 以茶茺萸目为外类群, 对序列进行 CLUSTALW 比对整理后, 计算最合适的系统发育树构建模型, 用最大似然法构建系统发育树。结果显示, 龙胆目植物来源的 *SLS* 聚为一大支, *GcSLS* 与同为龙胆科的 2 种獐牙菜来源的 *SLS* 序列亲缘关系最为接近 (图 6), 具有与川西獐牙菜氨基酸序列 86.01%、日本獐牙菜 87.50% 的相似度。多序列比较结果显示 SLS 蛋白 CYP72 家族的底物识别位点 (substrate recognition sequence SRS)^[22], 以及电子传递通道残基 PERF 基序的 P450 结构特征^[23] (图 7)。

3.4 *GcSLS* 的内参引物筛选及表达特征分析

根据粗茎秦艽转录组数据, 使用 Primer Premier 6 设计并考察粗茎秦艽的 qRT-PCR 内参基因引物, 对 α/β 微管蛋白基因 (α -tubulin/ β -tubulin, α -TUB/ β -TUB)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、转录延伸因子基因 (transcription elongation factor 1- α , *EF-1a*)、翻译起始因子基因 (eukaryotic translation initiation factor, *EIF*)、多聚泛素蛋白基因 (polyubiquitin, *UBQ*) 共计 6 种植物常用内参基因进行 qRT-PCR 预实验, 综合考察这些基因在不同部位扩增曲线稳定性及熔解曲线峰的特异性情况。根据预实验结果, 筛去产生非特异性扩增结果及扩增稳定性较差的 *GAPDH*、*EF-1a* 等基因, 选取 β -TUB (图 8-A) 以及 *UBQ* (图 8-B) 为内参基因进行 qRT-PCR 实验, 检测 *GcSLS* 基因在不同组织部位的表达情况。以根中 *GcSLS* 基因的表达量均值作为参考进行归一

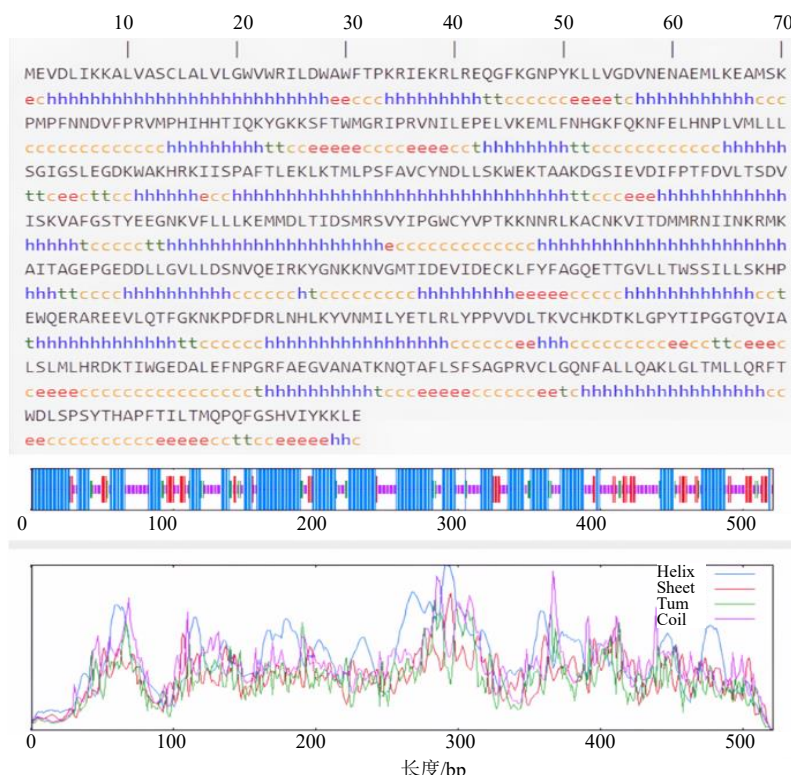


图 4 GcSLS 蛋白质二级结构预测

Fig. 4 Secondary structure prediction of GcSLS protein

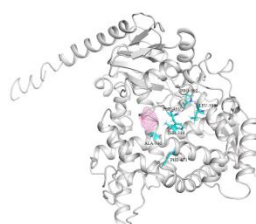


图 5 GcSLS 蛋白质三维结构预测

Fig. 5 Prediction of tertiary structure of GcSLS protein

化处理,结果显示 *GcSLS* 基因在粗茎秦艽根、叶和花中均有表达,在根中表达最高,在茎中几乎无表达。

选取 MeJA 激素初步考察 *SLS* 基因对影响植物代谢激素的响应情况。统一条件下,对粗茎秦艽幼苗进行喷洒,定时取样,以 0 h (未喷洒激素)为参考,同时设置空白对照组(不作激素处理)考察 24 h 内 *GcSLS* 基因表达变化情况。结果显示,在 3~6 h 内 *GcSLS* 基因表达上升,在 24 h 左右回归正常水平(图 8-C)。

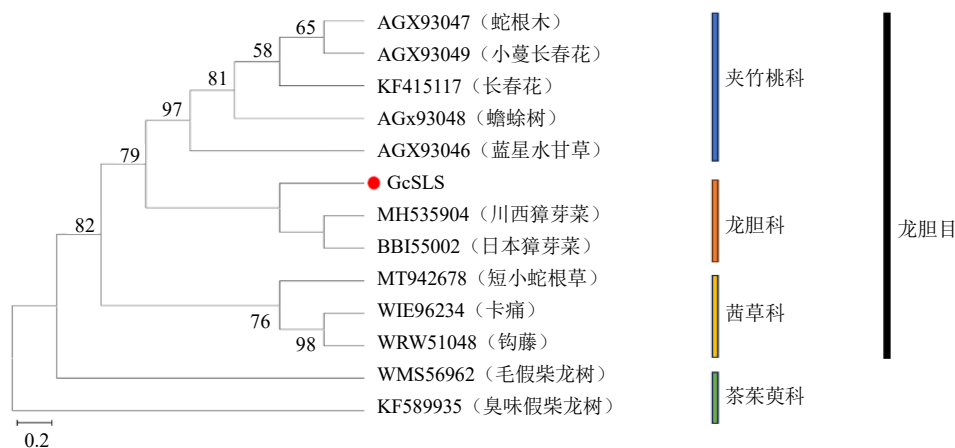
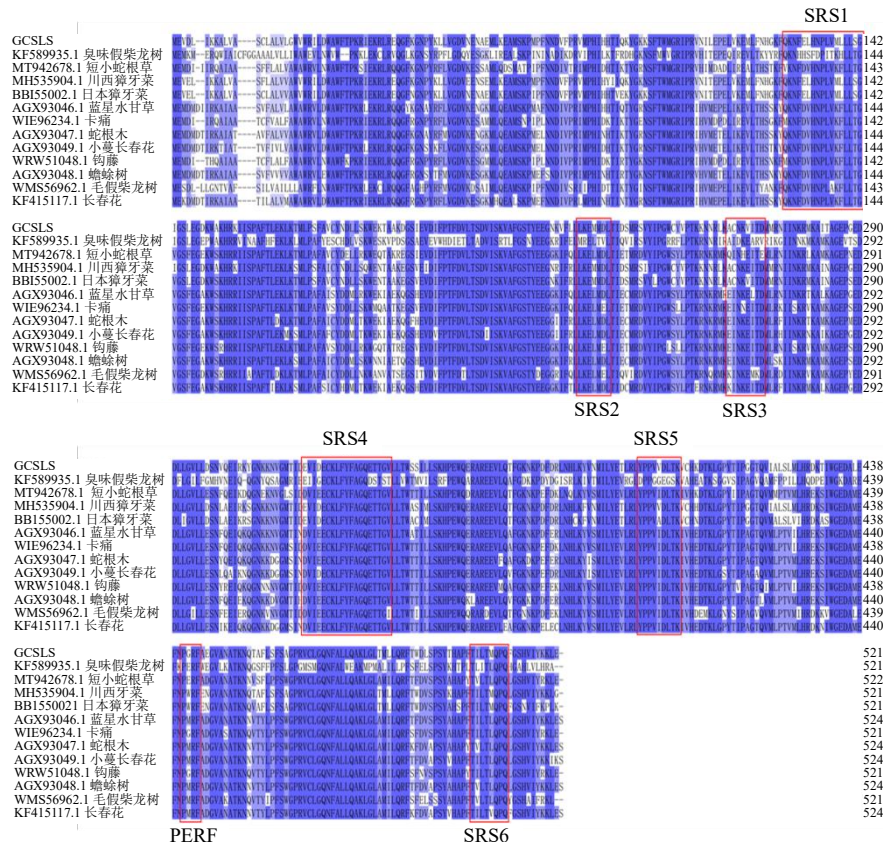


图 6 SLS 蛋白进化分析

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of GcSLS with various proteins

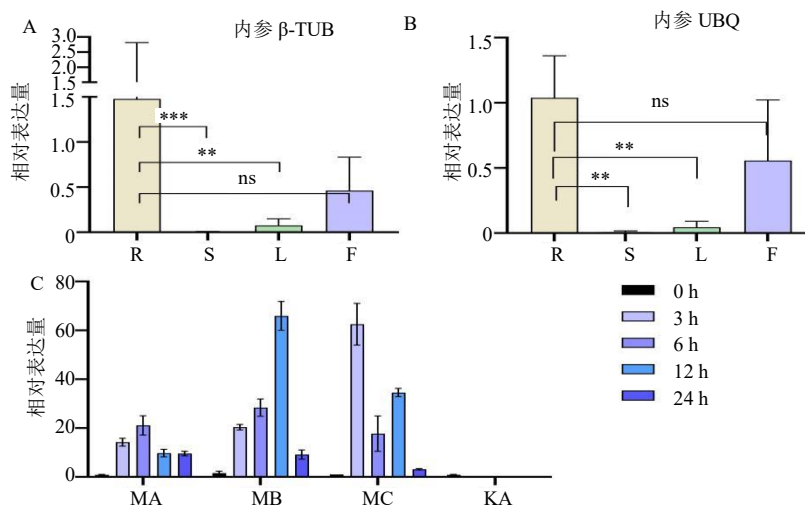


图中红框表示 SLS 序列中的 CYP72 特征结构。

Red boxes represent the characteristic structures of CYP72 in SLS sequences.

图 7 GcSLS 与其他植物 SLS 蛋白序列比对

Fig. 7 Sequence alignment of SLS proteins of GcSLS and other plants



A、B-不同部位相对表达模式，R-根，S-茎，L-叶，F-花；C-不同时间段 MeJA 激素诱导表达结果，MA、MB、MC-幼苗的 3 株生物学重复，KA-空白对照。*** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ ns 代表无显著差异。

A、B-Expression analysis of GcSLS in different tissues, R-root, S-stem, L-leaf, F-flower; C- expression results of MeJA under different times, MA, MB, MC-biological replicates, KA-negative control. *** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ ns means no significance.

图 8 SLS 基因表达模式分析

Fig. 8 Expression patterns of GcSLS

4 讨论

中药材临床应用的安全性、有效性及其质量标准的制定与完善, 其所含次生产物是重要的药效及深入研究的物质基础。龙胆科植物中广泛分布有环烯醚萜类成分, 它们具有多种药理活性。《中国药典》2020 年版中, 一些环烯醚萜类化合物常作为龙胆科植物基原药材鉴定的指标性成分。如秦艽(龙胆苦苷, 马钱苷酸)、龙胆(龙胆苦苷)、当药(当药苷, 獐牙菜苦苷)及青叶胆(獐牙菜苦苷)^[2]。深入研究环烯醚萜类成分的生物合成途径、植物体内生产及积累的规律性, 其理论研究意义与应用价值不言而喻。

环烯醚萜类生物合成途径中的具体步骤及关键酶等, 已有一定报道, 如对长春花 *Catharanthus roseus*^[13]、大叶秦艽 *Gentiana macrophylla* 等的相关研究^[24-26]。但环烯醚萜类生物合成酶促反应多样, 合成途径复杂, 尚有许多工作要做。其中涉及该途径中五元环开环步骤关键酶 SLS 的基因结构、酶学特征等基础性资料知之甚少。而龙胆科植物中的环烯醚萜成分常分为环烯醚萜类(iridoids)及裂环环烯醚萜类(secoiridoids), 前者如马钱苷(loganin)、马钱苷酸(loganic acid), 后者如龙胆苦苷、当药苷及獐牙菜苦苷等。显然, 2 大类成分的含量及之间的比例对药效学具有重要的影响。开展 SLS 基因结构分析及 SLS 酶促机理研究等相关基础性工作, 有助于深入了解环烯醚萜类及裂环环烯醚萜类合成的生物学意义, 并为药效物质基础的研究及药材指标性成分的确定、优良种质的评价及相关生物工程的开展提供基础资料。本工作基于粗茎秦艽转录组数据, 克隆出粗茎秦艽中的裂环马钱苷合酶基因, 并命名为 *GcSLS*, 进行了基础的生物信息学分析。序列比对确定了 *GcSLS* 基因的血红素结合域 FxxGxRxCxG、电子传递通道残基 PERF 和 K 螺旋中的 ExxR 残序等结构, 明确了 *GcSLS* 属于细胞色素 P450 超家族成员。系统发育分析显示, *GcSLS* 蛋白与同为龙胆科的两种獐牙菜 SLS 亲缘关系最近, 推测他们可能以相同的方式在通路中发挥功能。同时, 注意到裂环阶段的相关研究目前报道了两种反应途径: 一种在长春花中, 经由 LAMT 将马钱苷酸甲基化生成马钱苷, 然后由 SLS 催化开环形成裂环马钱苷; 另一种在喜树 *Camptotheca acuminata* 中, 马钱苷酸直接由裂环马钱苷酸合酶(secologanic acid synthase, SLAS)开环合成裂环马钱苷酸^[27],

有研究推测出现这种差别可能是在喜树中 *LAMT* 基因的退化造成的^[28]。

同一基原植物, 不同器官或部位药用功效可能有别, 可作为不同品种入药, 其为中药特色之一。就中药秦艽基原植物之一的粗茎秦艽而言, 仅根部入药, 地上部分不用。而传统藏医药学中, 来自于秦艽组植物的藏药材“解吉”, 其花入药, 根部多不用。本工作中, 同时也探讨了不同植物器官间 *GcSLS* 基因的表达量。*P450* 基因的表达调控主要在转录水平, 并具有组织器官的特异性^[29]。利用 qRT-PCR 方法, 首先设计验证在粗茎秦艽中能稳定表达的 2 种内参基因 β -*TUB* 以及 *UBQ*, 并对不同组织部位的表达情况进行检测。结果显示, *GcSLS* 在根中显著表达, 在茎中表达最少。下一步将开展不同器官表达量与裂环环烯醚萜类生物合成量的相关性 & 调控机制研究等基础性工作, 以期为同一基原不同药用部位的科学评价及扩大药用部位及自然资源的高效利用等提供科学资料。

MeJA 作为诱导因子, 是一种内源生长激素, 在植物次生代谢过程中起重要的调节作用^[30]。Matekalo 等^[31]的研究表明, *G8O*、*7DLGT*、*CPR1*、*8HGO*、*7DLH2*、*IO* 和 *SLS* 基因在 MeJA 的诱导下表达量显著增加, 说明 MeJA 可以通过调节环烯醚萜合成过程中多个关键酶基因的表达, 从而调节环烯醚萜类化合物的合成。对粗茎秦艽幼苗施加 MeJA 激素后, *GcSLS* 响应明显, 表达量于 3 h 起即有数十倍提升, 24 h 内激素的作用效果结束。在 *SLS* 基因由激素干扰产生表达变化的同时, 对各化合物之间的变化情况, 后续亦值得关注。

致谢: 上海中医药大学李尉涛博士后的前期相关工作打下了坚实的研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 39 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 67-68.
- [2] 中国药典[S]. 一部. 2020: 99, 100, 140, 204, 205, 282.
- [3] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 11-12.
- [4] Zhao Z L, Dorje G, Wang Z T. Identification of medicinal plants used as Tibetan traditional medicine Jie-ji [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1): 122-126.
- [5] Ni L H, Zhao Z L. A morphometric comparison of three closely related species of *Gentiana* (Gentianaceae), endemic to the region of the Qinghai-Tibet Plateau [J].

- Botany*, 2018, 96(3): 209-215.
- [6] Ni L H, Li W T, Zhao Z L, *et al.* Migration patterns of *Gentiana crassicaulis*, an alpine gentian endemic to the Himalaya-Hengduan Mountains [J]. *Ecol Evol*, 2022, 12(3): e8703.
- [7] Ni L H, Zhao Z L, Xu H X, *et al.* Chloroplast genome structures in *Gentiana* (Gentianaceae), based on three medicinal alpine plants used in Tibetan herbal medicine [J]. *Curr Genet*, 2017, 63(2): 241-252.
- [8] 宗粉粉, 赵志礼, 倪梁红, 等. 藏药解吉那保基原植物粗茎秦艽品种鉴定及种内遗传多样性分析 [J]. *药学报*, 2020, 55(8): 1941-1950.
- [9] 高娜娜, 倪梁红, 赵志礼, 等. 基于叶绿体全基因组序列的双峰法鉴定粗茎秦艽及其近缘物种 [J]. *药学报*, 2022, 57(8): 2520-2527.
- [10] 季文静, 张玉莹, 赵志礼, 等. 云南丽江产粗茎秦艽溯源及道地药材初加工方法评价 [J]. *药学报*, 2022, 57(2): 507-513.
- [11] 郑礼胜, 刘向前. 环烯醚萜类研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(4): 702-711.
- [12] 王凌健, 方欣, 杨长青, 等. 植物萜类次生代谢及其调控 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(12): 1030-1046.
- [13] Miettinen K, Dong L M, Navrot N, *et al.* The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3606.
- [14] 康恒, 赵志礼, 倪梁红, 等. 粗茎秦艽转录组及其环烯醚萜类生物合成相关基因分析与验证 [J]. *药学报*, 2021, 56(7): 2005-2014.
- [15] 马莹, 蔡媛, 马晓晶, 等. 药用植物活性成分生物合成中 P450 的研究进展 [J]. *药学报*, 2020, 55(7): 1573-1589.
- [16] Liu Q, Beyraghdar Kashkooli A, Manzano D, *et al.* Kaunilide synthase is a P450 with unusual hydroxylation and cyclization-elimination activity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4657.
- [17] Irmeler S, Schröder G, St-Pierre B, *et al.* Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: New enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase [J]. *Plant J*, 2000, 24(6): 797-804.
- [18] Durst F, Nelson D R. Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases [J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 1995, 12(3/4): 189-206.
- [19] Yamazaki S, Sato K, Suhara K, *et al.* Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s [J]. *J Biochem*, 1993, 114(5): 652-657.
- [20] 罗瑶, 净易尧, 胡本祥, 等. 远志细胞色素 P450 家族 PtCYP72A546 克隆、亚细胞定位与表达分析 [J]. *中草药*, 2024, 55(3): 919-927.
- [21] 李亚伟, 刘增才, 孙婷婷, 等. 暴马桑黄细胞色素 P450 家族 CYP5150AW6 基因克隆及表达分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(11): 3448-3455.
- [22] Miller J C, Hollatz A J, Schuler M A. P450 variations bifurcate the early terpene indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus* and *Camptotheca acuminata* [J]. *Phytochemistry*, 2021, 183: 112626.
- [23] 李翔宇, 王助乾, 孙春玉, 等. 植物细胞色素 P450s 及其在植物新陈代谢中的作用 [J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(13): 129-134.
- [24] 吴昕怡, 刘小莉. 环烯醚萜类成分生物合成途径及关键酶基因研究进展 [J]. *中国民族民间医药*, 2017, 26(8): 44-48.
- [25] 杨然, 方磊, 李佳, 等. 环烯醚萜苷类生物合成途径及相关酶的研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(10): 2482-2488.
- [26] 化文平, 岑文, 孔维维. 秦艽 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶基因(GmDXR)的克隆和表达分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(12): 1758-1763.
- [27] Kang M H, Fu R, Zhang P Y, *et al.* A chromosome-level *Camptotheca acuminata* genome assembly provides insights into the evolutionary origin of camptothecin biosynthesis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3531.
- [28] Rao P, Yaroslavsky M A, Miller J C, *et al.* Catalytic site constraints in the P450s mediating loganic acid (7DLH) and secologanic acid synthesis (SLAS) in *Camptotheca* [J]. *Biochemistry*, 2023, 62(18): 2763-2774.
- [29] 高世玺, 戎梅, 彭俊祥, 等. 白木香细胞色素 P450 基因 *AsCYP71D1* 的克隆及表达分析 [J]. *药学报*, 2023, 58(10): 3123-3129.
- [30] 李莹, 张广辉, 王前, 等. 茉莉酸甲酯对三七叶总黄酮含量及其应答基因表达量的影响 [J]. *中草药*, 2023, 54(2): 631-640.
- [31] Matekalo D, Skorić M, Nikolić T, *et al.* Organ-specific and genotype-dependent constitutive biosynthesis of secoiridoid glucosides in *Centaureum erythraea* Rafn, and its elicitation with methyl jasmonate [J]. *Phytochemistry*, 2018, 155: 69-82.

[责任编辑 时圣明]