

# 大叶秦艽中环烯醚萜积累与基因表达的相关性研究

郭彩虹<sup>1</sup>, 宜晓莹<sup>1</sup>, 高冰洁<sup>1</sup>, 寇禹航<sup>2</sup>, 陈千良<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>西北大学生命科学学院, 西安 710069; <sup>2</sup>西安市中医医院制剂科, 西安 710021;

<sup>3</sup>西北大学陕西省生物医药重点实验室, 西安 710069

**摘要:** 探讨陕西大叶秦艽中环烯醚萜积累和关键酶基因表达的相关性, 采用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (UPLC-Q-Exactive MS) 分析了环烯醚萜的含量, 运用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 测定环烯醚萜生物合成途径中关键酶基因的表达水平, SPSS 计算相关性。结果表明, 大部分环烯醚萜在根中含量最高, 11-*O*- $\beta$ -吡喃葡萄糖马钱苷酸酯在叶中含量最高, 断氧化马钱苷酸在花中含量最高。14 个酶基因在花部位表达高于其他部位, 马钱苷酸 *O*-甲基转移酶 (loganate *O*-methyltransferase, *LAMT*) 在叶中的表达量最高, 香叶醇 8-羟化酶 (genranol 8-hydroxylase, *G8O*) 在根中表达量最高。相关性分析表明, 7-去氧马钱苷元葡萄糖基转移酶 (7-deoxyloganetic acid glucosyltransferase, *7-DLGT*)、异戊烯基焦磷酸异构酶 (isopentenyl-diphosphate delta-isomerase, *IDI*)、裂环马钱苷合成酶 (secologanin synthase, *SLS*)、甲羟戊酸二磷酸脱羧酶 (mevalonate pyrophosphate decarboxylase, *MVD*)、7-去氧马钱苷酸 7-羟化酶 (7-deoxyloganic acid 7-hydroxylase, *7-DLH*) 基因与环烯醚萜的含量呈高度正相关。关键酶基因表达在环烯醚萜的合成中发挥重要作用, 是环烯醚萜积累调控的基础, 是道地陕西秦艽质量形成机制的重要组成部分。

**关键词:** 大叶秦艽; 环烯醚萜; 基因表达; 相关性

中图分类号: R284.1 文献标识码: A

## Correlation study between accumulation of iridoids and expression of relative genes in *Gentiana macrophylla*

GUO Cai-hong<sup>1</sup>, YI Xiao-ying<sup>1</sup>, GAO Bing-jie<sup>1</sup>, KOU Yu-hang<sup>2</sup>, CHEN Qian-liang<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China, <sup>2</sup>Preparation Department, Xi'an Hospital of

Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710021, China, <sup>3</sup>Biomedicine Key Laboratory of Shaanxi Province, Northwest

University, Xi'an 710069, China

**Abstract:** To research the correlation between the accumulation of iridoids and expression of key enzymes genes of *Gentiana macrophylla*, UPLC-Q-Exactive MS was used to detect iridoids content, and then quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to analyze the expression of key enzyme genes in iridoids biosynthesis. Correlation was calculated by SPSS. The results showed that most iridoids were mainly distributed in roots, while loganic acid 11-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl ester was

distributed in leaves and secologanin was distributed in flowers. The expression of genes was higher in flower parts than in other parts, the expression of loganate *O*-methyltransferase (*LAMT*) was the highest in leaves and the expression of Genranol 8-hydroxylase (*G8O*) was the highest in roots. Correlation analysis showed that the relative expression of 7-deoxyloganetic acid glucosyltransferase (*7-DLGT*), Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (*IDI*), secologanin synthase (*SLS*), mevalonate pyrophosphate decarboxylase (*MVD*) and 7-deoxyloganic acid 7-hydroxylase (*7-DLH*) genes were positively correlated with the contents of iridoids. The expression of the key enzyme genes play an important role in the synthesis of iridoids, which lay a foundation for the regulation of the accumulation of iridoids, and is also an important part of the mechanism of quality formation in the *G. macrophylla*.

**Key words:** *Gentiana macrophylla*; iridoid; gene expression; correlation

秦艽始载于《神农本草经》，功能祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热，用于治疗风湿痹痛、筋脉拘挛、骨蒸潮热等，具有抗炎镇痛、保肝、抗病毒、抗肿瘤、免疫抑制、抗氧化等药理作用<sup>[1-6]</sup>。2020版《中国药典》收载基原有大叶秦艽 *Gentiana macrophylla*、麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.、粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk、小秦艽 *G. dahurica* Fisch.。伴随着日益增长的中药材用量需求，大面积的过度采挖使得野生秦艽已列入国家三级重点保护植物名单<sup>[7]</sup>。大叶秦艽作为陕西道地药材，研究其质量形成机制是解决秦艽质量和资源问题的最佳途径。药材的质量评价是以有效成分为重点，而环烯醚萜类作为秦艽的主要有效成分，其合成和积累直接影响秦艽药材质量<sup>[8]</sup>。

环烯醚萜是秦艽的次生代谢产物，阐明秦艽环烯醚萜类生物合成途径才能揭示秦艽药材质量形成内在机制。环烯醚萜的生物合成途径分为3个阶段，分别为中间体的生成、环烯醚萜骨架构成、后修饰阶段。目前，国内外研究归纳了环烯醚萜类成分，了解了其生物合成途径和关键酶基因<sup>[9-12]</sup>，为研究开发环烯醚萜类药物奠定基础，尚未见环烯醚萜合成关键酶基因表达量与环烯醚萜含量相关性的文献报道。

本文以大叶秦艽为实验材料，通过 UPLC-Q-Exactive MS 研究不同组织中环烯醚萜的合成积累规律，在转录组数据中选择环烯醚萜合成途径的关键酶基因，分析其表达情况，对环烯醚萜积累与生物合成途径关键酶基因表达量进行相关性分析，探讨了秦艽中环烯醚萜的合成积累规律，为阐明秦艽药材质量形成提供了依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

三年生栽培大叶秦艽于 2021 年 7 月采自陕西省宝鸡市陇县八渡镇 (34°N, 106°E), 经西北大学教授鉴定为大叶秦艽 (*G. macrophylla*), 标本和留样保存于陕西省生物医药重点实验室。挑选 6 株生长良好的大叶秦艽作为 6 个生物学重复, 按根、茎、叶、花 4 个器官分割, 每个样品一部分置于烘箱烘干, 研钵研磨粉碎用于 UPLC-Q-Exactive MS 分析, 另一部分立即放入液氮中冷冻, 存放在 -80 °C 冰箱。

## 1.2 仪器与设备

UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (Thermo Fisher Scientific); OSAKA SODA CAPCELL PAK MG C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×2.0 mm, 5 μm; Shiseido); BT120G 电子天平 (Sartorius); KQ-500DE 超声波清洗机 (昆山舒美); Bioanalyzer 2100 (Agilent); QuantGene 9600 实时荧光定量仪 (BioTek); NanoDrop2000 超微量紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific)。

## 1.3 试剂

龙胆苦苷 (批号 B20763)、马钱苷酸 (批号 B20823)、獐牙菜苦苷 (批号 B21644)、6'-*O*-β-*D*-葡萄糖基龙胆苦苷 (批号 B21835)、獐牙菜苷 (批号 B21643) (纯度均大于 98%, 上海源叶生物科技有限公司)。

## 1.4 UPLC-Q-Exactive MS 分析

### 1.4.1 供试品溶液的制备

称取药材粉末 (过 3 号筛) 0.25 g, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇至刻度线下, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 冷却至室温, 用甲醇定容, 滤过, 取续滤液, 进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

### 1.4.2 对照品溶液的制备

精密称取适量马钱苷酸、獐牙菜苦苷、6'-*O*-β-*D*-葡萄糖基龙胆苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷对照品, 30% 甲醇溶解并定容, 制成对照品溶液, 浓度分别为 0.298 0、0.059 7、0.090 0、0.045 5、0.029 7 mg/mL。

### 1.4.3 色谱条件

色谱条件参考文献<sup>[13]</sup>并优化。色谱柱为 OSAKA SODA CAPCELL PAK MG C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm × 2.0 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水 (B), 梯度洗脱, 条件: (0~2 min, 5% A; 2~20 min, 5%→15% A; 20~38 min, 12%→40% A; 38~50 min, 40%→80% A; 50~56 min, 80%→5%

A) ; 体积流量 0.3 mL/min, 进样室温度 10 °C, 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。

#### 1.4.4 质谱条件

离子源为 HESI 源, 正负离子检测模式, 鞘气流速 4.58 L/min; 辅助气流速 7.97 L/min; 喷雾电压 3.44 kV; 毛细管温度 320 °C; 离子传输管温度 350 °C; 辅助气温度 350 °C; 扫描模式: Full MS/dd-MS<sup>2</sup>, Full MS 分辨率 70 000, dd-MS<sup>2</sup> 分辨率 17 500, 扫描范围 *m/z* 为 100~800。碰撞气体为氮气 (纯度 >99.99%), 碰撞能为 30 eV。

#### 1.5 内参基因的选择及引物设计

从课题组构建的秦艽转录组数据中选取 6 条植物常用内参基因序列, 包括泛素 (ubiquitin, *UBC*)、18S 核糖体 RNA (18S ribosomal RNA, *18S rRNA*)、β-肌动蛋白 (*β-Actin*)、微管蛋白 (tubulin, *TUA*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、转录延伸因子 (elongation factor, *EF-1α*)。使用 PrimerQuest Tool 设计候选内参基因的引物, 引物序列见表 1。

表 1 候选基因的 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of candidate genes in qRT-PCR

内参基因	引物序列 (5'→3')	产物长度
Internal reference gene	Primer sequence (5'→3')	Length of product (bp)
<i>GAPDH</i>	F: GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA	123
	R: GAGTCCTTCCACGATACCAAAG	
<i>UBC 13</i>	F: AGCAGCTCAAGGATCTATGC	111
	R: AAGTATCAGGAGGGCCAATAAC	
<i>β-Actin</i>	F: GAGGTATCCTGACCCTGAAGTA	104
	R: CACACGCAGCTCATTGTAGA	
<i>EF-1α</i>	F: CCGCTAACATCACCCTGAA	107
	R: CACGGAGACGTTCTTGATGT	
<i>TUA</i>	F: CGCCTGATCTCACAGGTTATT	107
	R: CTTGGGTATGGGACCAGATTAG	
<i>18S rRNA</i>	F: TGAGAAACGGCTACCACATC	104

R: ACTCAAAGAGCCCGGTATTG

## 1.6 环烯醚萜生物合成关键基因表达测定

### 1.6.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 Trizol 法分别提取秦艽根、茎、叶和花的 RNA，用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，超微量紫外可见分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。将 RNA 反转录成 cDNA，获得的 cDNA 于 -20 °C 冰箱保存备用。

### 1.6.2 qRT-PCR 条件

根据课题组构建的秦艽转录组数据，选取秦艽环烯醚萜类生物合成途径 16 个关键酶基因设计引物，序列见表 2，并在实时荧光定量 PCR 仪上进行表达分析。qRT-PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 2X SYBR Green Pro Taq HS Premix 10  $\mu$ L、cDNA 1  $\mu$ L、正向和反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L，蒸馏水补足至 20  $\mu$ L，每个样本重复 3 次。扩增程序: 95 °C 5 min, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。

### 1.6.3 数据处理

qRT-PCR 结束后得到基因的扩增循环数 (cycle threshold, Ct)，以秦艽根部为对照组，使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各部位表达差异倍数。

## 1.7 相关性分析

采用 SPSS 26.0 统计学软件分析环烯醚萜含量与基因表达量的相关性，计算 Spearman 相关系数，并使用 OmicStudio tools 制作热图。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	注释	序列
Gene	Annotation	Sequence
<i>HDS</i>	4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸合酶	F: TTGGTTGCTCTGCGTGTTG
	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	R: CCTTCTGATATTCGTCTTCTGTGTA
<i>HDR</i>	4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶	F: GATCTTATGCTAGTAATCGGAGGTT
	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	R: GCCAATTCTCTTCTCACTATCAATC
<i>IDI</i>	异戊烯基焦磷酸异构酶	F: TCTGGTGGATGCGAATGATAAC
	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	R: CGTTGCTGAAGAAGTAACTCGTA
<i>PMK</i>	磷酸甲羟戊酸激酶	F: GGTTCTTCAACAATCATCAATACGG

---

	Phosphomevalonate kinase	R: CTCAATCTCAGGCAATCGCAAT
<i>MVD</i>	甲基戊酸二磷酸脱羧酶	F: CTGTGTTGAGAAGTGGAATCGT
	Mevalonate pyrophosphate decarboxylase	R: AAGCAGTAAGGCAGCAGTCT
<i>GPPS</i>	香叶基焦磷酸合成酶	F: GTATTGGTTCAGAAGGATTAGTAGC
	Geranyl diphosphate synthase	R: AGCAGCAGTCTTGTGAATGTG
<i>GES</i>	香叶醇合成酶	F: TGGAGGCAATGAAGTTGATAGATAC
	Geranyl diphosphate diphosphatase	R: ACGCAGTGAAGTAGTGAGTAGAT
<i>G8O</i>	香叶醇 8-羟化酶	F: GCAACAAGCACGCTGGAAT
	Geraniol 8-hydroxylase	R: CACACCGCAAGTATGGCAAT
<i>8-HGO</i>	8-羟基香叶醇氧化还原酶	F: ATTGTTGGTCTTGGTGGTCTTG
	8-Hydroxygeraniol dehydrogenase	R: TGGCTTCCTTCTTCTTCCTATCA
<i>IS</i>	环烯醚萜合酶	F: ACATAATGAGTTGGTGGTGGAA
	Iridoid synthase	R: CTGCCTACGATGCCTGTGA
<i>IO</i>	环烯醚萜氧化酶	F: AGGTTCTGATACGCTTAC
	Iridoid oxidase	R: GGTCTCATTATCCTCTTATTC
<i>7-DLNGT</i>	7-去氧马钱苷葡萄糖基转移酶	F: AGGTCCATTCAGAGAACTTGTTG
	7-Deoxyloganetin glucosyltransferase	R: ACACCACCAGCACCATTAGT
<i>7-DLGT</i>	7-去氧马钱苷元葡萄糖基转移酶	F: GGAGTTAATGGAGGTGAGAA
	7-Deoxyloganetic acid glucosyltransferase	R: CGCTCTTGGCAACTATGT
<i>7-DLH</i>	7-去氧马钱苷酸 7-羟化酶	F: TTATGACTGTTGAACGGATG
	7-Deoxyloganic acid 7-hydroxylase	R: CCTCTTGCCATTGTCTGT
<i>LAMT</i>	马钱苷酸 O-甲基转移酶	F: GGAGTAGTCAGCGAGGAGAA
	Loganate methyltransferase	R: GTTCCATCACAGTAGGCAAGT
<i>SLS</i>	裂环马钱苷合成酶	F: GGTTGGAGATGTTAATGAGAATGC
	Secologanin synthase	R: CTGGATGGTATGGTGAATGTGAG

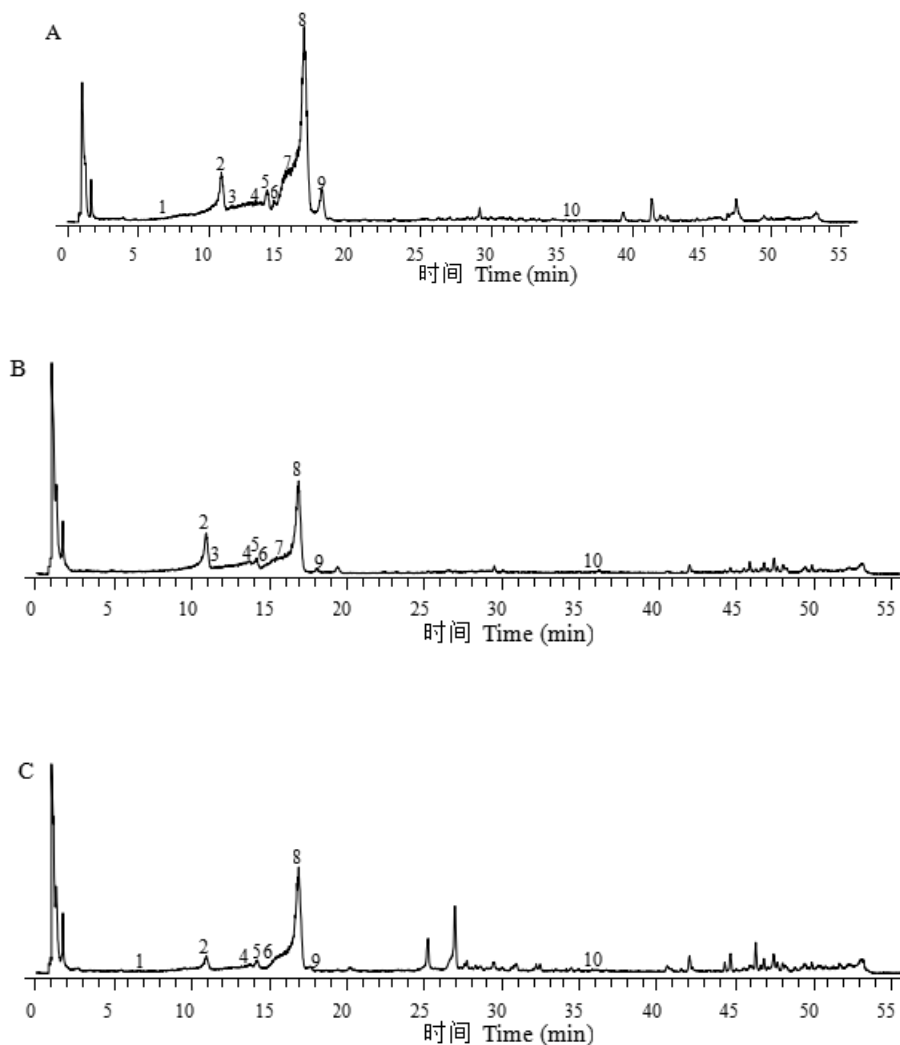
---

## 2 结果与分析

### 2.1 大叶秦艽不同部位 UPLC-Q-Exactive MS 图谱分析

UPLC-Q-Exactive MS 条件下, 分别测定正负离子模式下的总离子流图, 并通过母离子列表法进行二级碎片扫描。通过相关数据库的比对、参考文献的查询, 结合精确相对分子质量, 鉴定大叶秦艽根、茎、叶、花中 10 种环烯醚萜成分如图 1 所示。根、茎、花、叶中都含有的环烯醚萜有 7 种, 未在叶部位检测到莫诺苷、紫药苦苷; 11-*O*- $\beta$ -吡喃葡萄糖马钱苷酸酯只在根、叶中检测到。

环烯醚萜的保留时间、碎片离子见表 3。正负离子模式的主要区别在于目标离子不同, 以及在质谱中产生的离子类型和峰的差异, 含量高的环烯醚萜在正负离子模式下都可以检测到, 但负离子模式下成分分离更明显。



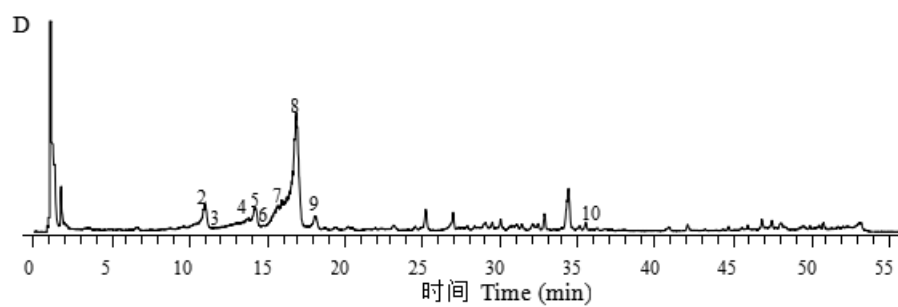


图 1 大叶秦艽负离子模式下根 (A)、茎 (B)、叶 (C)、花 (D) 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of roots(A), stems(B), leaves(C) and flowers(D) of *G. macrophylla* in negative mode



表 3 UPLC-Q-Exactive MS 对大叶秦艽中环烯醚萜鉴定

Table 3 Iridoids identified in *G. macrophylla* by UPLC-Q-Exactive MS

序号 No.	环烯醚萜 Iridoid	时间 $t_R$	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value	误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion	分子式 Molecular formula	部位 Organ	参考文献 Reference
11- <i>O</i> - $\beta$ -吡喃葡萄糖马钱苷酸酯									
1	Loganic acid	6.95	[M+HCOO] <sup>-</sup>	583.1870	-1.66	375.1304、313.1309、213.0761、169.0865、 113.0229、59.0122	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	R、L	13
11- <i>O</i> - $\beta$ -glucopyranosyl ester									
2	马钱苷酸 Loganic acid	10.98	[M-H] <sup>-</sup>	375.1299	0.61	213.0764、169.0861、151.0754、133.0647、 113.0231、95.0487、69.0329	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	R、S、L、F	14
3	莫诺苷 Morroniside	11.69	[M-Na] <sup>-</sup>	429.1366	-0.23	267.0845、235.0575、203.0521、185.0418、 110.6607、79.2134	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	R、S、F	15
4	断氧化马钱苷酸 Secologanoside	13.78	[M-H] <sup>-</sup>	389.1104	3.78	319.0093、2199.2400、183.0659、165.0549、 121.0645、69.0329、59.0122	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	R、S、L、F	16
5	獐牙菜苦苷 Swertiamarine	14.21	[M+HCOO] <sup>-</sup>	419.1201	1.43	302.6173、179.0552、149.0597、141.0181、 119.0336、113.0230、89.0228、59.0122	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	R、S、L、F	17

6	6'- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖基龙胆苦苷 6'- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -Glucosylgentiopicroside	14.71	[M+HCOO] <sup>-</sup>	563.1631	2.38	221.0665、193.0498、179.0552、161.0445、 131.0337、101.0229、89.0228	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	R、S、L、F	17
7	紫葳苦苷 Swertiapunimarin	15.66	[M+H] <sup>+</sup>	521.1862	-0.58	251.4391、197.0808、179.0703、151.0751、 127.0389、111.0801	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	R、S、F	16
8	龙胆苦苷 Gentiopicroside	16.79	[M+HCOO] <sup>-</sup>	401.1093	0.92	324.6015、219.0556、149.0597、121.0648、 113.0231、93.0333、89.0228	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	R、S、L、F	17
9	獐牙菜苷 Sweroside	18.10	[M+HCOO] <sup>-</sup>	403.1254	2.03	312.8494、205.4160、151.0749、125.0229、 89.0229、81.0329	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	R、S、L、F	17
10	Gentimacroside	36.72	[M-H] <sup>-</sup>	531.1522	2.64	315.0727、297.0625、189.0910、153.0182、 109.0280	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	R、S、L、F	18

注：R、S、L、F 分别代表根、茎、叶、花。

Note: R, S, L and F represent roots, stems, leaves, and flowers.

## 2.2 环烯醚萜成分的积累规律分析

以峰面积表示秦艽中环烯醚萜的含量，绘制出大叶秦艽不同部位的环烯醚萜相对含量图（见图2），由图可知，10种环烯醚萜中有7种在不同器官间具有显著性差异（ $P < 0.05$ ），大部分环烯醚萜在根中含量最高，11-*O*- $\beta$ -吡喃葡萄糖马钱苷酸酯在叶中含量最高，断氧化马钱苷酸在花中含量最高。

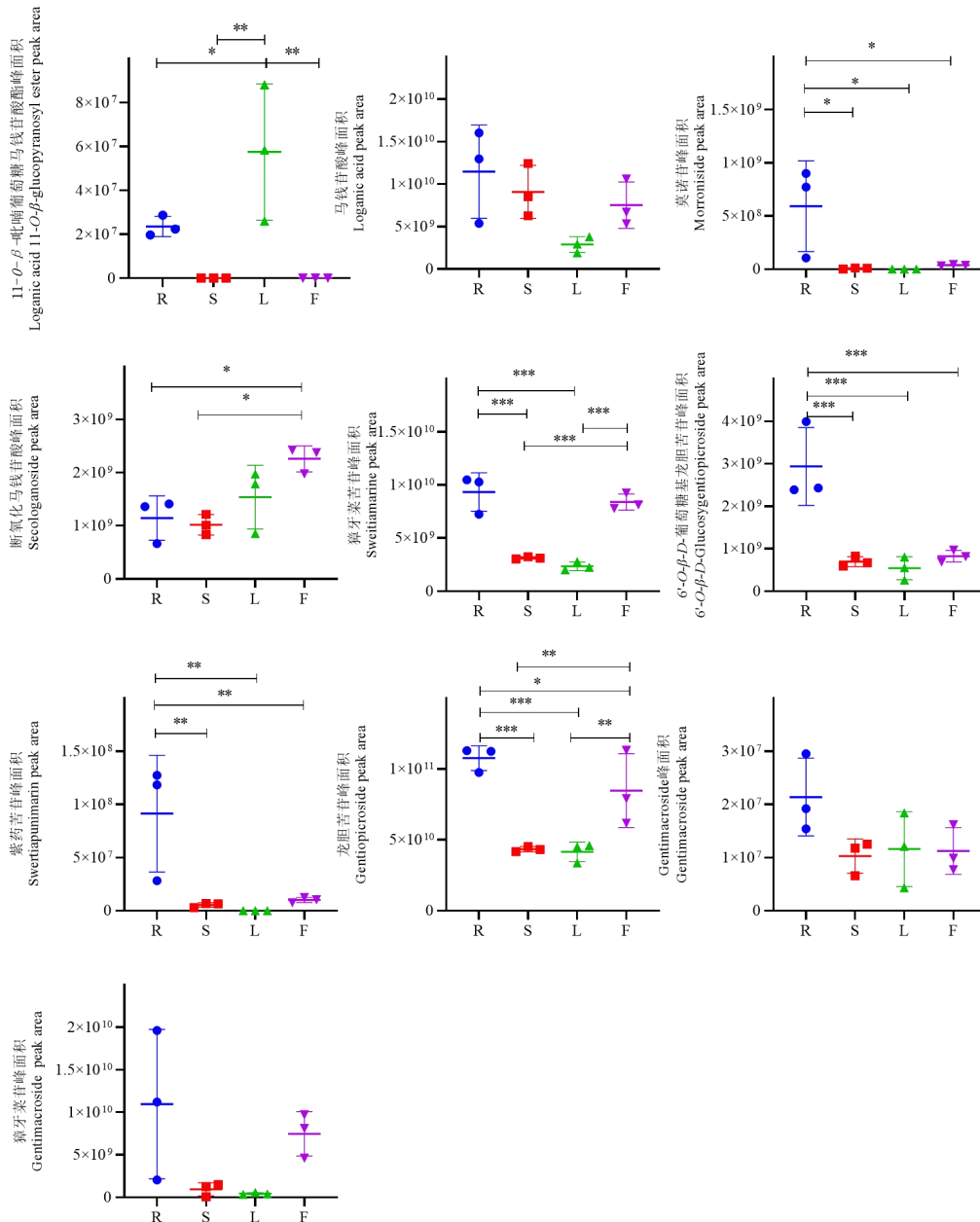


图2 环烯醚萜成分在根、茎、叶、花中的分布

Fig. 2 Distribution of iridoids components in roots, stems, leaves and flowers

注：R、S、L、F 分别代表根、茎、叶、花。与根相比，\* $P < 0.05$ ；\*\* $P < 0.01$ ；\*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: R, S, L and F represent roots, stems, leaves, and flowers, respectively. Compared with roots, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 2.3 秦艽中内参基因的筛选

如图 3 所示，6 个候选内参基因的 Ct 值分布在 10~37 之间。其中，*18S rRNA* 基因的 Ct 值最小，*GAPDH*、*β-Actin* 和 *EF-1α* 基因的 Ct 值偏高，秦艽各候选内参基因在不同器官中的表达水平差异较小。

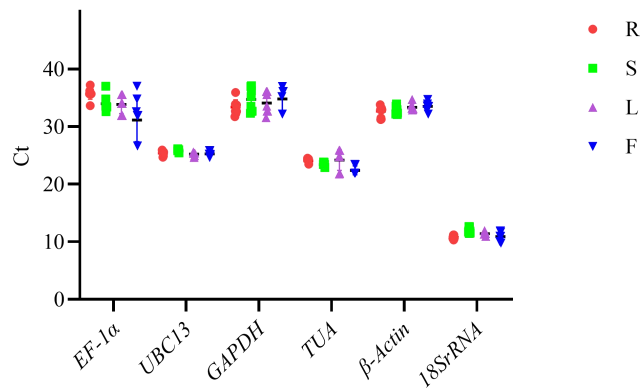


图 3 候选内参基因的 Ct 值

Fig. 3 Ct values of candidate reference genes

采用软件分析 6 个内参基因的表达稳定性。该软件计算平均表达稳定性值 (M) 基于平均两两变异之间的所有基因测试。M 值最低的基因表达最稳定，M 值最高的基因表达最不稳定。GeNorm 的结果显示 *UBC 13* (M=0.540) 和 *18S rRNA* (M=0.540) 两个基因的 M 值最小，表达稳定性最佳，*EF-1α* 表达最不稳定。NormFinder 的结果显示，*18S rRNA* 表达最稳定，*EF-1α* 表达最不稳定。BestKeeper 软件中稳定性好的前 3 个内参基因为 *UBC 13*、*18S rRNA* 和 *β-Actin* (见图 4)。

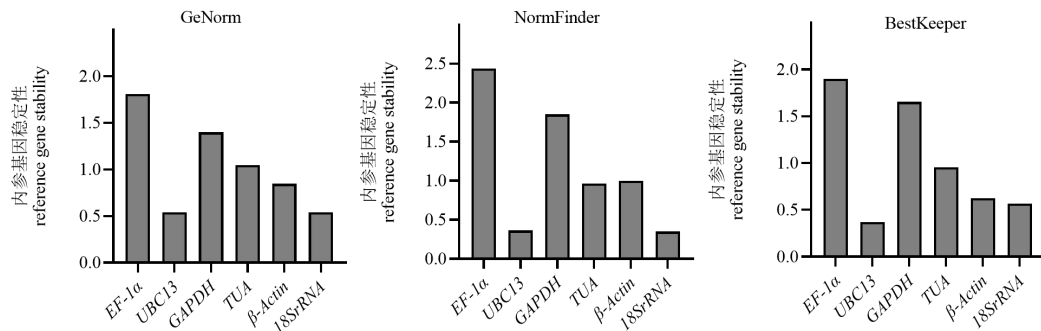


图 4 软件分析候选内参基因的表达稳定性

Fig. 4 Analysis of expression stability of candidate reference genes by software

如表 4 所示，综合 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 软件以及 $\Delta Ct$  值分析，并对其得出的排名进行几何平均数计算，6 个候选内参基因稳定性综合排名由高到低依次为，*UBC 13*>*18S rRNA*> *$\beta$ -Actin*>*TUA*>*GAPDH*>*EF-1 $\alpha$* ，最稳定的内参基因为 *UBC 13*。

表 4 候选内参基因表达稳定性综合排名

Table 4 The comprehensive ranking of expression stability of candidate reference genes

排名 Rank	分析方法 Analysis method				
	$\Delta Ct$	BestKeeper	Normfinder	GeNorm	结果 Result
1	<i>UBC 13</i>	<i>UBC 13</i>	<i>18S rRNA</i>	<i>UBC 13</i>	<i>UBC 13</i>
2	<i>18S rRNA</i>	<i>18S rRNA</i>	<i>UBC 13</i>	<i>18S rRNA</i>	<i>18S rRNA</i>
3	<i><math>\beta</math>-Actin</i>	<i><math>\beta</math>-Actin</i>	<i>TUA</i>	<i><math>\beta</math>-Actin</i>	<i><math>\beta</math>-Actin</i>
4	<i>TUA</i>	<i>TUA</i>	<i><math>\beta</math>-Actin</i>	<i>TUA</i>	<i>TUA</i>
5	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>
6	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>

#### 2.4 环烯醚萜合成途径酶基因表达分析

以 *UBC13* 为内参基因，考察 16 个上、中、下游关键酶基因在秦艽不同部位间的差异表达情况。以根作为对照组，横、纵坐标分别为秦艽各部位和表达差异倍数，绘制相对表达量的统计图见图 5。

参与环烯醚萜生物合成的 16 个基因中，共有 14 个基因在不同部位间具有显著差异性 ( $P < 0.05$ )。14 个酶基因在花部位表达高于其他部位，*LAMT* 在叶中的表达量最高，*G8O* 在根中表达量最高。

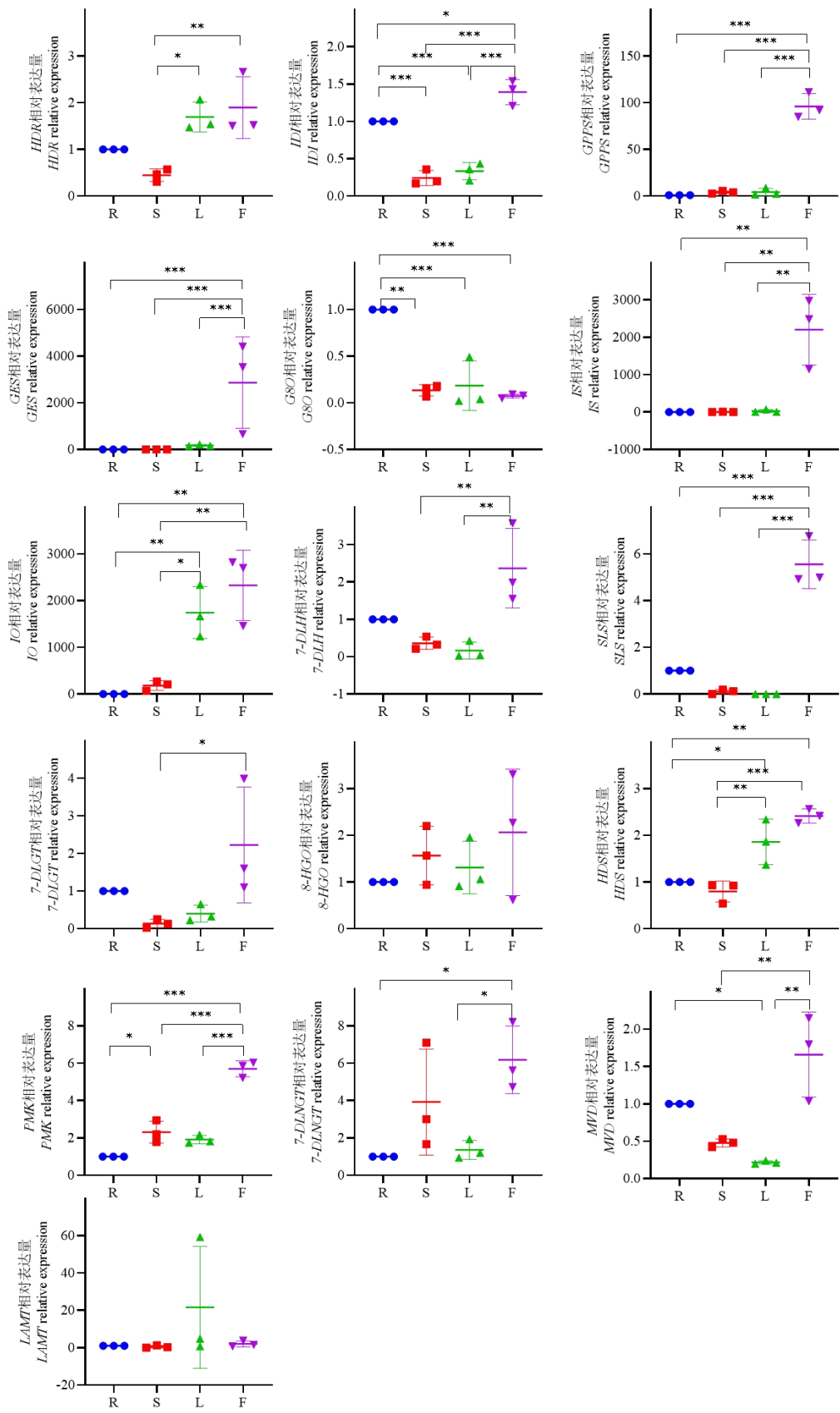


图5 环烯醚萜生物合成途径相关基因的表达

Fig. 5 Expression pattern of genes involved in iridoids biosynthesis pathway

注：R、S、L、F 分别代表根、茎、叶、花，与根相比，\* $P < 0.05$ ；\*\* $P < 0.01$ ；\*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: R, S, L and F represent roots, stems, leaves, and flowers, respectively. Compared with roots, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 2.5 环烯醚萜含量与基因表达相关性分析

如图 6 所示，横坐标为 16 个基因，纵坐标为 10 种环烯醚萜。由图可以看出环烯醚萜与 7-DLGT、IDI、SLS、7-DLH、MVD 呈高度正相关。

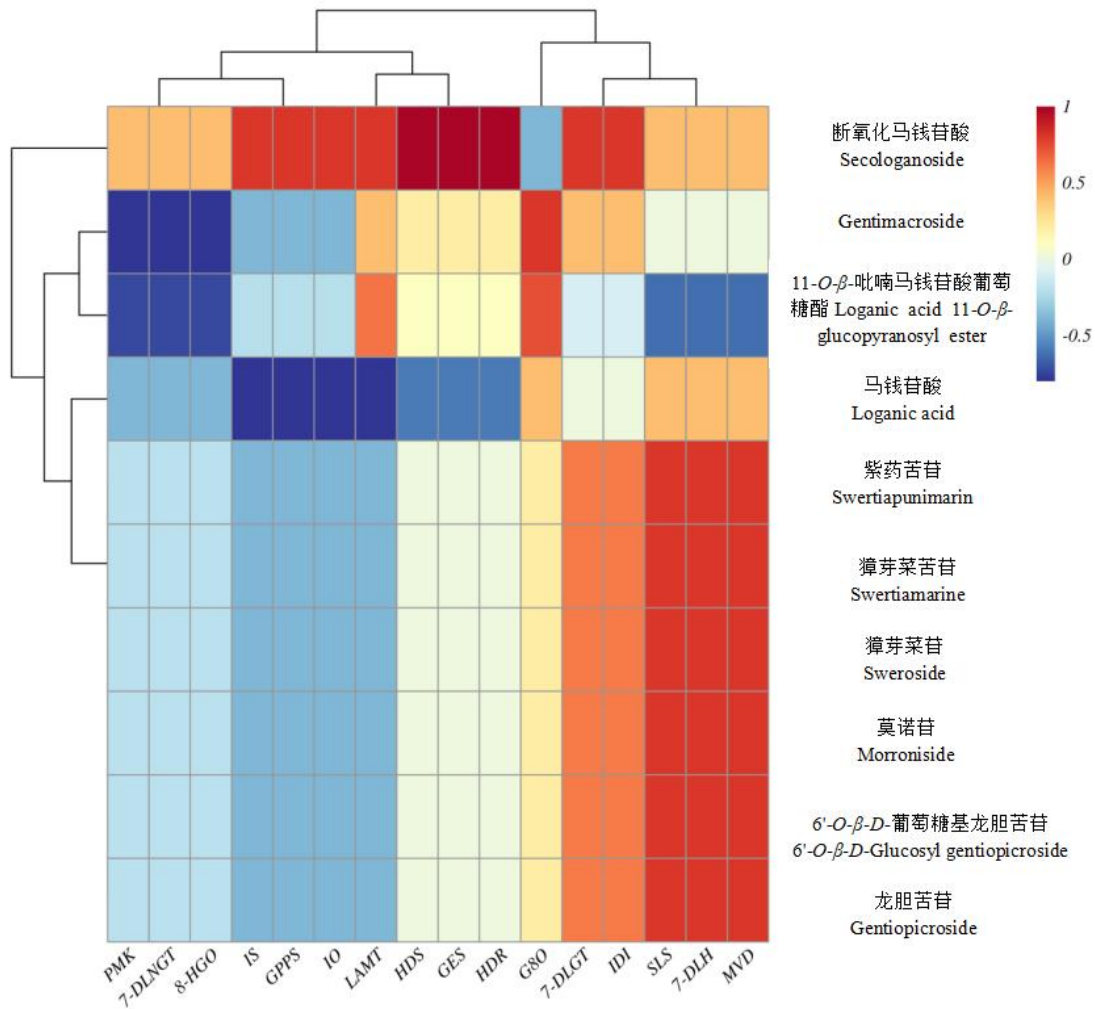


图 6 环烯醚萜含量和关键酶基因表达相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis between the content of iridoids and expression of key enzyme genes

### 3 讨论与结论

随着中医药的发展，中药材需求量不断增加，秦艽野生资源濒临枯竭，因此已逐步开展秦艽人工栽培生产，但其药材质量和产量都需提高。药用植物有效成分是中药发挥药效的物

质基础，也是药材质量的关键。环烯醚萜作为秦艽的主要有效成分，其合成和积累直接影响秦艽药材质量。因此，本研究通过分析环烯醚萜含量的积累以及环烯醚萜生物合成途径关键酶基因的表达，进一步探明秦艽药材质量形成机制。本研究采用 UPLC-Q-Exactive MS 分析了大叶秦艽根、茎、花、叶不同部位环烯醚萜含量的积累，共鉴定出 10 个环烯醚萜，大部分环烯醚萜在根中高度积累，与 Chen 等<sup>[19]</sup>分析粗茎秦艽中根部的环烯醚萜含量丰富一致，与 Liang 等<sup>[20]</sup>研究麻花秦艽根部主要活性成分为环烯醚萜一致，可见环烯醚萜主要集中在秦艽的根部。

在基因表达分析中，准确分析表达量的前提是筛选稳定的内参基因。本研究中，使用 NormFinder、GeNorm、Bestkeeper 这 3 个软件对候选内参基因稳定性进行评估，3 种软件得出的排名有所差别，这一差异是由于不同的分析软件其筛选的原理和重点不一样<sup>[21]</sup>。例如在草果种子<sup>[22]</sup>、冬虫夏草菌<sup>[23]</sup>、彩色马蹄莲<sup>[24]</sup>等的内参基因筛选中，各软件评估结果并不完全相同。综合多种分析方法考虑内参基因的排名和稳定值，得出 *UBC 13* 是秦艽不同器官基因表达分析的最佳内参基因。以 *UBC 13* 为内参分析相关基因的表达情况，参与环烯醚萜生物合成的 16 个基因中，14 个酶基因在花部位表达高于其他部位，*LAMT* 在叶中的表达量最高，*G8O* 在根中表达量最高，推测大叶秦艽环烯醚萜生物合成中最为活跃的器官是花，但在环烯醚萜含量分析中发现，环烯醚萜类化合物主要集中在秦艽的根部，因此在秦艽植物体中可能存在复杂的合成产物运输机制。在全萼秦艽<sup>[25]</sup>中基因相对表达量为地上部位（茎、叶、花）高于地下部位（根），与本实验大叶秦艽基因相对表达量在花中高于其他部位不同，推测是不同种秦艽造成基因表达差异。

已有研究表明，白芍在发育期间 *IDI* 基因的表达与单萜苷含量呈显著正相关<sup>[26]</sup>，广藿香中 *MVD* 基因的表达与广藿香酮含量呈显著正相关<sup>[27]</sup>。本研究中同一基因与不同的环烯醚萜含量的相关性具有差异，这可能是因为不同的环烯醚萜虽然具有相同的母核结构，但是官能团不同，合成途径有差异导致。根据环烯醚萜中环戊烷环是否裂环，可将环烯醚萜类化合物分为闭环环烯醚萜和裂环环烯醚萜。结果显示，本文实验所考察的基因表达与 11-*O*- $\beta$ -吡喃葡萄糖马钱苷酸酯和马钱苷酸这两个闭环环烯醚萜苷的相关性小于其余裂环环烯醚萜苷，表明基因表达与成分结构存在一定的关系。在所分析的全部 16 个基因中，*7-DLGT*、*IDI*、*SLS*、*MVD*、*7-DLH* 基因的表达相较于其他基因，与环烯醚萜的相关性更高，对环烯醚萜合成的调控作



用较强,提示促进这几个基因的表达水平更容易提高环烯醚萜的生物合成。在环烯醚萜的合成途径中,*MVD*、*IDI*为合成焦磷酸异戊烯酯(Isopentenyl diphosphate, IPP)的关键酶,*7-DLGT*、*7-DLH*、*SLS*为下游途径的关键酶,催化生成了裂环马钱子苷(secologanin)。综上所述,*MVD*、*IDI*、*7-DLGT*、*7-DLH*、*SLS*基因调控了秦艽中环烯醚萜类成分合成的功能,为将来通过调控基因表达实现环烯醚萜含量的增加提供理论依据,为提高秦艽药材质量提供了途径。

#### 参考文献

- 1 Nogva KH,Dromtorp MS,Nissen H,et al.Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR[J].Biotechniques,2003,34:804-813.
- 2 Yu FR,Yu FH,Li RD,et al.Inhibitory effects of the *Gentiana macrophylla*(Gentianaceae) extract on rheumatoid arthritis of rats[J].J Ethnopharmacol,2004,95:77-81.
- 3 Jaishree V,Badami S.Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin from *Enicostemma axillare* against *D*-galactosamine induced acute liver damage in rats[J].J Ethnopharmacol,2010,130:103-106.
- 4 Yang TL,Wang XL.Twenty-three cases of type I autoimmune hepatitis treated with *Gentiana macrophylla* turtle shell powder[J].Henan Tradit Chin Med(河南中医),2017,37:633-635.
- 5 Deng YT,Wang L,Yang Y,et al.In vitro inhibition and induction of human liver cytochrome P450 enzymes by gentiopicoside:potent effect on CYP2A6[J].Drug Metab Pharmacokinet,2013,28:339-344.
- 6 Li YQ,Zhao DH,Pan BR,et al.Effects of gentianoside against liver injury in rats[J].J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报),2001,22:1645-1649.
- 7 He WW,Wei FF,Lv R,et al.Current situation and sustainable utilization of *Gentianae Macrophyllae Radix*[J].Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2019,30:1754-1756.
- 8 Hao CQ,Leng XH,Li J,et al.Separation,purification and antibacterial activity of iridoid glycosides from *Gentiana macrophylla* Pall.[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2017,29:2104-2111.
- 9 Simkin AJ,Miettinen K,Claudel P,et al.Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma[J].Phytochemistry,2013,85:36-43.
- 10 Jiang Z,Yao XC.Exploration of biosynthetic pathways and key enzyme genes of iridoid components[J].Mod Hortic(现代园艺),2022,45:166-168.

- 11 Mizioroko HM. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 505: 131–143.
- 12 Wang CS, Dong HJ, Bao YT, et al. Rapid analysis of chemical constituents of *Gentiana Macrophylla* by UPLC-Q-Exactive Quadrupole and electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47: 3175-3180.
- 13 Pan Y, Zhao YL, Zhang J, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Gentiana*(Gentianaceae).[J]. Chem Biodivers, 2016, 13: 107-150.
- 14 Wei SH, Zhang PC, Feng XZ, et al. Qualitative and quantitative determination of ten iridoids and secoiridoids in *Gentiana straminea* Maxim. by LC-UV-ESI-MS[J]. J Nat Med, 2012, 66: 102-108.
- 15 Ahn SJ, Kim HJ, Lee A, et al. Determination of 12 herbal compounds for estimating the presence of *Angelica gigas* root, *Cornus* fruit, licorice root, *Pueraria* root, and *Schisandra* fruit in foods by LC-MS/MS.[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2020, 37: 1437-1448.
- 16 Karioti A, Chatzopoulou A, Bilia AR, et al. Novel Secoiridoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70: 1898-903.
- 17 Chen QL, Sun WJ, Tu GZ, et al. Chemical constituents of *Gentiana macrophylla* Pall. from Shaanxi[J]. Nat Prod Commun, 2006, 1: 527-530.
- 18 Jiang ZB, Liu HL, Liu XQ, et al. Chemical constituents of *Gentiana macrophylla* Pall[J]. Nat Prod Res, 2010, 24: 1365-1369.
- 19 Chen JK, Zeng R. Study on chemical composition of different parts of *Gentiana macrophylla* with rough stem based on UPLC-ESI-HRMSn metabolomics[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49: 2328-2335.
- 20 Liang XP, Ji S, Du SB, et al. Analysis of chemical constituents in different parts of *Gentiana straminea* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 139-148.
- 21 Yang PF, Shi HZ, Guo QS, et al. Screening and validation of RT-qPCR reference genes of *Viola yedoensis* under different light intensities.[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46: 5620-5626.
- 22 Yao LX, Pan CL, Yu LY, et al. Selection of qRT-PCR reference genes for *Amomum tsaoko* seeds during dormancy release[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46: 3832-3837.
- 23 Su QJ, Xia YX, Xie F, et al. Screening of the reference genes for qRT-PCR analysis of gene expression in *Ophiocordyceps sinensis*[J]. Mycosyst(菌物学报), 2021, 40: 1712-1722.

- 24 Zhou L,Zhang YC,Cai YM,et al.Screening of qRT-PCR reference genes in different varieties and tissues of *Zantedeschia hybrida*[J].Mol Plant Breed(分子植物育种),2020,18:3971-3979.
- 25 Kang H,Zhao ZL,Ni LH,et al.Transcriptome analysis and validation of key genes involved in biosynthesis of iridoids in *Gentiana ihassica*[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2021,46:4704-4711.
- 26 Xu P,Hu YJ,Zhan JH,et al.Study on the spatio-temporal pattern and correlation analysis of monoterpene glycosides content and their biosynthesis-related gene expression in *Paeonia lactiflora*[J].Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学),2023,40:1490-1498.
- 27 Kang DL,Hu WM,OuYang PY.Gene expression analysis of MVA pathway in pogpstemoncablin and its correlation with synthesis of main components[J].Guihaia(广西植物),2022,42:745-752.

收稿日期: 2024-04-15                      接受日期:

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473297); 陕西省自然科学基金(2014JM4136)

\*通信作者 E-mail:cql999999@126.com