

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201405011

张文娟, 曹小迎, 蒋继宏. 茉莉酸甲酯诱导大戟三萜类代谢的研究[J]. 广西植物, 2015, 35(4): 590—596

Zhang WJ, Cao XY, Jiang JH. Triterpene biosynthesis in *Euphorbia pekinensis* induced by methyl jasmonate[J]. *Guihaia*, 2015, 35(4): 590—596

# 茉莉酸甲酯诱导大戟三萜类代谢的研究

张文娟, 曹小迎, 蒋继宏\*

(江苏师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

**摘要:** 京大戟是多年生草本药用植物, 入药部分是其干燥根, 但可入药的京大戟资源由于生长缓慢以及环境污染的加剧而越发匮乏, 因此解决大戟资源日益紧张的问题是当今药用植物资源开发与利用方向的重要课题。京大戟含有三萜类、二萜类、黄酮类等丰富的活性成分, 一些常见药用植物的有效成分是三萜类化合物, 其在抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等方面具有很好的活性。对植物萜类物质代谢起重要作用的关键酶, 如 3-羟基, 3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(hmgr)、鲨烯合酶(sqsl)、法尼基焦磷酸合酶(fps)的基因克隆及活性研究取得了进展和突破, 但通过调控萜类物质代谢途径中关键酶基因的表达来诱导终产物合成的研究鲜有报道。通过研究大戟萜类物质代谢途径进而利用基因工程手段提升目的物质的产量来解决京大戟药源短缺问题具有重要意义。该研究以大戟愈伤组织为材料, 使用茉莉酸甲酯分别按时间梯度和浓度梯度进行诱导, 将诱导后的愈伤组织分为两部分: 一部分提取其总 RNA, 以 actin 为内参基因进行反转录, 实时定量 RT-PCR 分析大戟三萜类代谢途径中 hmgr、sqsl 与 fps 基因的相对表达差异; 另一部分用于提取其总三萜并使用分光光度法进行含量测定。实时定量 RT-PCR 分析结果表明, 茉莉酸甲酯可诱导 3 个基因的表达, 但其表达模式不一样。相应的京大戟愈伤组织中总三萜的含量明显提高, 最高可较未处理样品增加 27%。研究结果可为茉莉酸甲酯促进药用植物大戟三萜类物质积累的分子机制研究提供参考。

**关键词:** 京大戟; 茉莉酸甲酯; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 鲨烯合酶; 法尼基焦磷酸合酶; 实时定量 PCR; 总三萜

中图分类号: Q946.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)04-0590-07

## Triterpene biosynthesis in *Euphorbia pekinensis* induced by methyl jasmonate

ZHANG Wen-Juan, CAO Xiao-Ying, JIANG Ji-Hong\*

(Jiangsu Normal University, Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant, Xuzhou 221116, China)

**Abstract:** *Euphorbia pekinensis* is a perennial herb. The part of medicine is the dried root and is our traditional Chinese medicine. *E. pekinensis* have distributed in many provinces in China except for Tibet and Xinjiang. In recent years, medicine studies have showed that it can also be used on carbuncle swollen, sore-toxin, etc. So there are an increasing number of people who pay attention to it nowadays and later greatly exploit and unearth to it. But *E. pekinensis* with dried roots need many years cultivation and the deterioration of environmental pollution problem leads to the resources become more and more deficient. Therefore, many research workers faced the problem that how to relieve the resource tension of *E. pekinensis*. This is an important topic in development and utilization of the medicinal plant resources and it is also a huge challenge to science research personnel. Modern research shows that *E. pekinensis* mainly contains the active ingredient of three terpenoids, two terpenoids, flavonoids, alkaloids, organic acid,

收稿日期: 2014-09-26 修回日期: 2014-12-24

基金项目: 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX13-975)

作者简介: 张文娟(1990-), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究, (E-mail)xunzhou.2009@163.com。

\*通讯作者: 蒋继宏, 博士, 教授, 博士生导师, 生物学和生态学专业, (E-mail)jhjiang@jsnu.edu.cn。

ect. The effective components of some common medicinal plants are the three terpenoids and they have good activity in antiviral, antitumor, immune regulation and so on. So the terpenoids of *Euphorbia pekinensis* plays an important role in disease treatment. With the rapid development of molecular biology and the increasingly research in technology, the plant terpenoid metabolism pathway has been well studied. Now the key enzymes such as *hmgr*, *sqs* and *fps* play an important role in the metabolic flow. Now the researcher has made greatly progress in gene clone and activity research. But there are few reports in controlling the expression of the key enzyme of terpenoid metabolic pathway to induce the synthesis of terpenoids. Therefore, it is significantly important to study the metabolic pathway of the terpenoid synthesis in *E. pekinensis* and use the means of gene engineering and technology to greatly increase the output of target product in order to solve the problem of the shortage in medicinal resource of *E. pekinensis*. In this study, the callus of *E. pekinensis* was induced by methyl jasmonate with different concentrations in different treatment times. These treated calluses were respectively divided into two parts: one was used to extract total RNA, then reverse-transcribed to cDNA, transcript levels of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (*hmgr*), farnesyl pyrophosphate synthase (*fps*) and squalene synthase (*sqs*) were determined by quantitative real-time PCR using actin gene as internal reference. The other part was used to extract triterpenoids whose content was detected by spectrophotometry. The results of quantitative real-time PCR showed that methyl jasmonate could induce the expression of these three genes, but the expression patterns were different. The result of total triterpenoids detection showed that methyl jasmonate induced the accumulation of total triterpenoids up to 27% compared with untreated sample. These results would afford the reference for the research on the molecular mechanism that methyl jasmonate promotes the accumulation of total triterpenoids.

**Key words:** *Euphorbia pekinensis*; methyl jasmonate; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; squalene synthase; farnesyl pyrophosphate synthase; quantitative real-time PCR; total triterpenoids

近年来的研究表明,一些常见药用植物的有效成分主要是三萜类化合物,如人参中的人参皂甙,柴胡、甘草中的三萜皂苷,这些三萜类化合物在抗肿瘤、抗病毒、免疫调节与预防心脑血管系统疾病等方面具有活性,为当前治疗艾滋病和癌症等疾病提供新的中药来源。随着分子生物学技术的飞速发展及研究不断深入,植物萜类代谢途径已有研究,如植物含有 3 条以上的类异戊二烯生成途径,不同途径的差异主要在于它们生成的部位和异戊烯基磷酸生成机制不同。3 条生物合成途径分别为甲羟戊酸途径(MVA)、2-甲基赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径、泛醌途径。目前以前两个途径的研究较多。首先是甲羟戊酸途径(MVA),发生在细胞质中并且发现的较早,是经典的萜类物质生物合成途径,而发生在质体中的甲基赤藓醇-4-磷酸途径(MEP)或脱氧木酮糖-5-磷酸途径(DXP)则是后来才被发现。图 1 所示,这 3 条生物合成途径都产生萜类化合物,但其催化酶不一样,都是产生植物萜类化合物主要来源的两个通用的五碳前体,即异戊烯基焦磷酸(IPP)和其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶、鲨烯合酶与法尼基焦磷酸合成酶基因是三萜类物质代谢合成中的关键酶

基因,对萜类物质的生物合成起着至关重要的作用(Newman *et al.*, 1999; Eisen reich *et al.*, 1998)。

药用植物大戟(*Euphorbia pekinensis*)在分类学上属大戟科多年生草本植物,又名膨胀草、大戟、天平一枝香等,最初在《神农本草经》中被注释为药草,性味苦且有毒。现代研究表明大戟主要含有三萜类、二萜类、黄酮类、生物碱、有机酸、鞣制等成分,具有泻下、抗炎和利尿作用。现代临床主要用来治疗肾炎水肿,结核性胸膜炎、百日咳、晚期血吸虫病腹水等(Sarang *et al.*, 1999)。相对其他药用植物而言,大戟属植物分子生物学研究明显滞后。许多大戟属植物具有抗癌、抗细菌、抗病毒等活性,从这些植物中分离出了结构繁多的萜类化合物,研究发现大多活性成分为萜类物质。目前从大戟中分离到了大戟醇,甘遂醇等多种三萜类化合物,且大都有细胞毒活性(孔令义等, 1996; Kenneth *et al.*, 2001)。因此,研究大戟中三萜类代谢途径的 *hmgr*, *sqs* 与 *fps* 关键酶基因表达与三萜类物质的合成积累之间的关系具有重要意义。本研究用茉莉酸甲酯作为诱导剂对大戟的愈伤组织分别进行浓度梯度与时间梯度的诱导,分析三萜类代谢途径中关键酶基因的相对表达量与三萜类物质含量的变化并探索这些基因与三

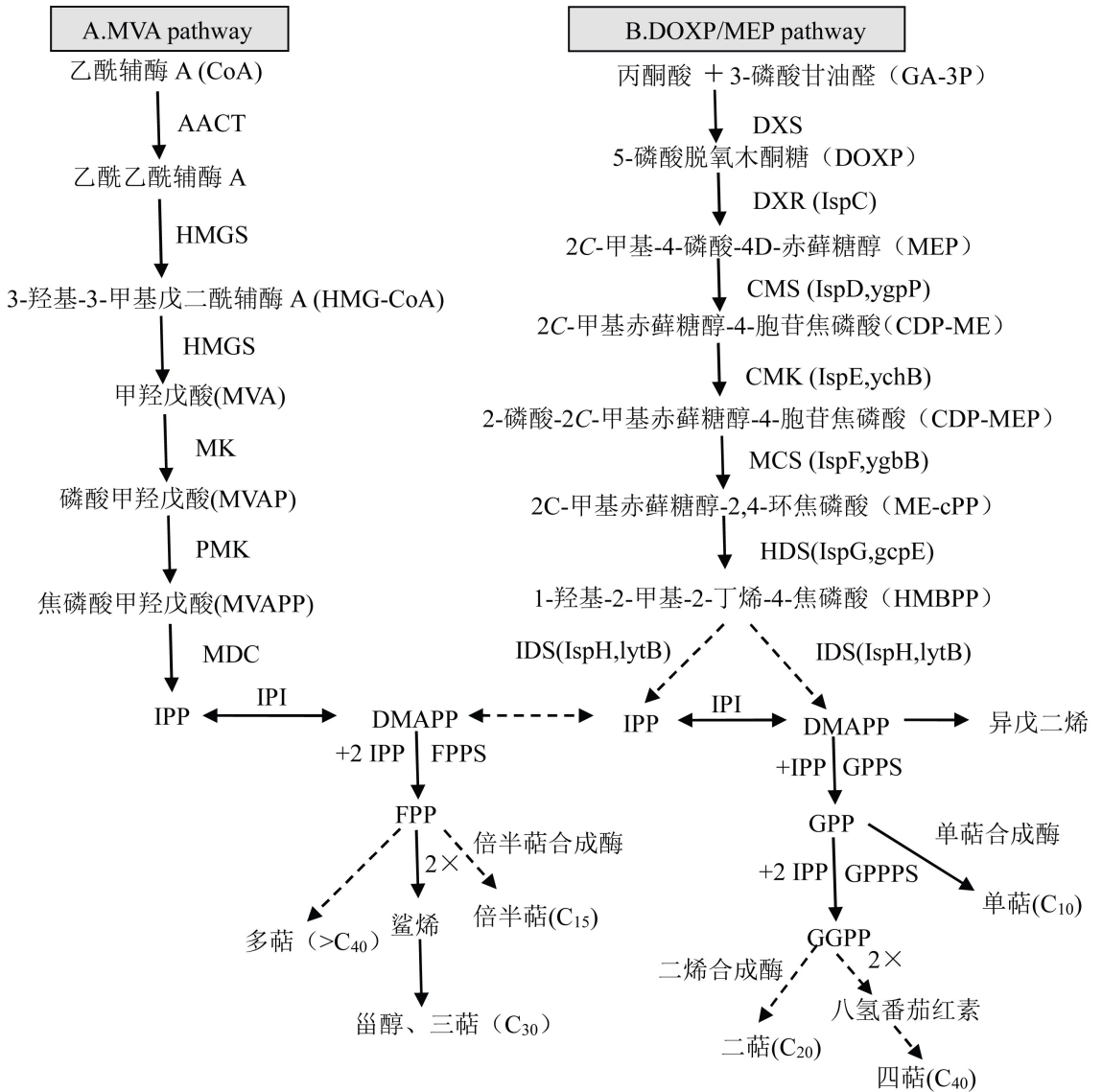


图 1 植物萜类物质生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of terpenoid

萜类代谢活性物质合成的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

大戟采自安徽黄山附近,人工种植于江苏师范大学药用植物试验基地,并提取 DNA,经过 ITS 测序鉴定。所用材料为从大戟茎诱导的经传代 5 次以上的愈伤组织,在含有  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 与  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的 MS 固体培养基上,  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  光照培养。

RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司; PrimeScript<sup>®</sup> 1st Strand cDNA

Synthesis Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司; SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 等购自唯赞生物。熊果酸对照品购自中国药品生物制品检定所。茉莉酸甲酯,焦碳酸二乙酯(DEPC),乙醇,冰乙酸,高氯酸,乙酸乙酯,甲醇和香草醛均为分析纯。

### 1.2 愈伤组织的液体培养与茉莉酸甲酯诱导

分别取  $100 \text{ mL}$  含有  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 与  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的 MS 液体培养基加入 12 个  $250 \text{ mL}$  的三角瓶中,将长到一定程度,颜色变为淡黄,组织疏松的愈伤组织剪碎,按一定量接入到三角瓶中,  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $130 \text{ rpm}$  光照摇床培养。7 d 后,茉莉酸甲酯以无水乙醇为助剂,过滤除菌,其中六瓶样品以  $0, 10, 50, 100, 150$  和  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度梯度进行

诱导培养 36 h, 另外六瓶样品都按茉莉酸甲酯终浓度为  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  加入诱导剂, 以 0、12、24、36、48、60 h 为时间梯度进行诱导。为消除无水乙醇的影响, 在阴性对照样品中加入相同量的无水乙醇,  $25^\circ\text{C}$ , 130 rpm 光照摇床培养。

### 1.3 RNA 的提取与反转录

使用滤纸将大戟愈伤组织过滤至研钵中, 加入液氮研磨成粉末, 总 RNA 的提取参见 RNAPrep pure 植物总 RNA 提取试剂盒, 提取的总 RNA 经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 分析其质量和浓度。反转录按 PrimeScript<sup>®</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明操作, 产物 cDNA 于  $-20^\circ\text{C}$  保存。

1.3.1 实时荧光定量 PCR 反应检测大戟 *hmgr*, *sqs* 与 *fps* 基因的表达差异 以 *actin* 为内参基因, 与目标基因各设 3 个平行反应管。引物由上海捷瑞生物有限公司合成, 序列见表 1。反应体系为  $20 \mu\text{L}$ , 其中  $10 \mu\text{L}$  SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix, 上下游引物, ROX Reference Dye1 各  $0.4 \mu\text{L}$ , cDNA  $1 \text{ ng}$ , 灭菌蒸馏水定容至  $20 \mu\text{L}$ 。反应条件为  $95^\circ\text{C}$  预变性 5 min,  $95^\circ\text{C}$  5 s,  $60^\circ\text{C}$  31 s, 40 个循环。融解曲线:  $95^\circ\text{C}$  15 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s,  $95^\circ\text{C}$  15 s。分析荧光定量 PCR 产物融解曲线。读取 Ct 值并根据  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  方法分析得出相关基因的表达水平(曹小迎, 2010)。

表 1 实时定量 PCR 所用引物

Table 1 Primer of RT-PCR

植物 Plant	扩增区域 Amplified region	引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
大戟	<i>actin</i>	Forward	CCCAGTATTGTTGGAAGA
<i>Euphorbia</i>		Reverse	TAGAAAGTATGATGCCAGAT
<i>pekinensis</i>	<i>hmgr</i>	Forward	GCTGGATGGGCGAGAGTA
		Reverse	GTGAACCGAACACGGGA
	<i>sqs</i>	Forward	GATACAAGCATCCCTACA
		Reverse	CTGATAACTTTTCCCAAG
	<i>fqs</i>	Forward	CTATTCATTTTACCTTCC
		Reverse	ATCTGTTCTATCTTACC

### 1.4 大戟总三萜的超声提取

1.4.1 标准品溶液的配制 熊果酸标准样品的配制: 称取在  $110^\circ\text{C}$  干燥后的熊果酸  $0.0050 \text{ g}$ , 加入容量瓶中, 用乙酸乙酯定容至刻度  $50 \text{ mL}$ , 即得浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准溶液。香草醛溶液的配制: 称取  $2.50 \text{ g}$  香草醛, 移入定量瓶中, 使用冰醋酸定容至  $25 \text{ mL}$ , 现配现用。

1.4.2 样品溶液的配制 各样品除用于总 RNA 提取外, 另一部分用灭菌干燥后的滤纸过滤除去液体培养基, 将愈伤组织块烘干粉碎, 取样品  $1.00 \text{ g}$ , 加入  $20 \text{ mL}$  95% 乙醇, 使用超声波清洗器在  $70^\circ\text{C}$  390 W 的条件下超声提取 32 min, 之后过滤将滤液收集, 此过程重复两次, 最后将两次得到的滤液合并, 置于旋转蒸发仪上设置  $40^\circ\text{C}$  减压蒸馏除去乙醇, 95% 乙醇复溶并用乙醇定容至  $25 \text{ mL}$ , 作为样品溶液待测备用 (Peixu *et al.*, 2013)。

1.4.3 标准曲线的绘制 准确量取标准溶液  $0.10$ 、 $0.20$ 、 $0.40$ 、 $0.60$ 、 $0.80$ 、 $1.00 \text{ mL}$ , 分别置于具塞试管中, 加热挥发溶剂, 然后加入  $0.60 \text{ mL}$  现配现用的 5% 香草醛-冰乙酸溶液与  $1.2 \text{ mL}$  的浓硫酸溶液, 置于  $70^\circ\text{C}$  恒温水浴锅中 30 min, 冷却至室温后加入冰乙酸至总体积为  $10.0 \text{ mL}$ , 摇匀后置于室温, 15 min 后在  $552 \text{ nm}$  波长下测定其吸光度。以熊果酸浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取

各样品总 RNA 的 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳可以清晰地观测到两条 rRNA 带, 如图 2 所示, 分别为 18S rRNA 与 28S rRNA。其中 28S rRNA 的亮度大约是 18S rRNA 的两倍, 说明了实验提取的 RNA 并未降解, 并且没有 DNA 的污染。进一步使用 Nanodrop 2000 检测其核酸浓度与质量, 各样品浓度都在  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  左右,  $A_{260} \cdot A_{280}$  的值为典型的 RNA 吸收值, 2.0 左右, 表明没有蛋白质, 有机物, 酚类等物质的污染, 提取的 RNA 较为纯净, 可用于检测基因表达量。

### 2.2 茉莉酸甲酯浓度梯度诱导的基因表达差异

用荧光定量 PCR 法检测各样品中三个基因的表达量, 结果如图 3 所示。在 MeJA 浓度梯度诱导大戟愈伤组织的样品中, *hmgr* 基因的表达量与对照组相比都呈现上调的现象, 并且随着浓度增加表达量增大, 特别是在从  $50 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围, 表达量急剧增加, 在  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度之后, 上调增长率减小。在  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的诱导下其基因表达量达到最大, 上调幅度达到诱导前的 9 倍。而大戟 *sqs* 基因的表达量依浓度梯度呈现出波动式的变化, 在浓度  $0 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围内, 基因表达量随 MeJA 浓度增加而增大, 在浓度达到  $100 \mu\text{mol} \cdot$

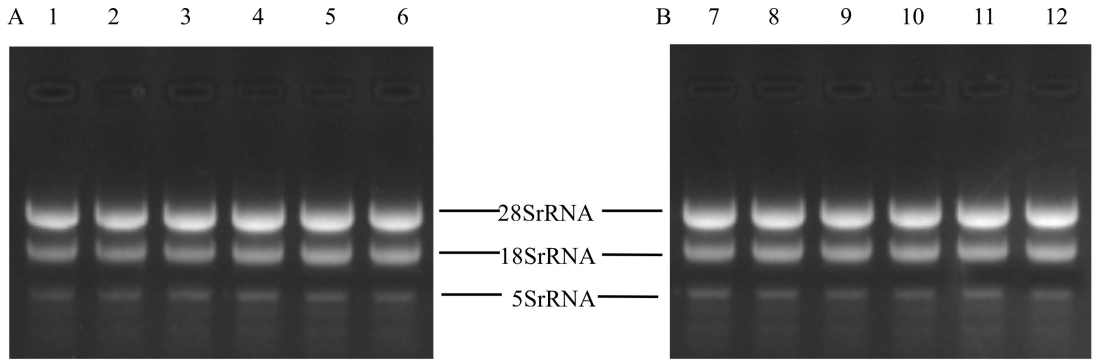


图 2 茉莉酸甲酯分别按浓度梯度(A)与时间梯度(B)诱导后大戟的总 RNA 提取结果 1.  $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 2.  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 3.  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 4.  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 5.  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 6.  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 7. 0 h; 8. 12 h; 9. 24 h; 10. 36 h; 11. 48 h; 12. 60 h。

Fig. 2 Results of the total RNA extraction of *Euphorbia pekinensis* in response to different concentrations of MeJA(A) and the addition of  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA at the indicated time point

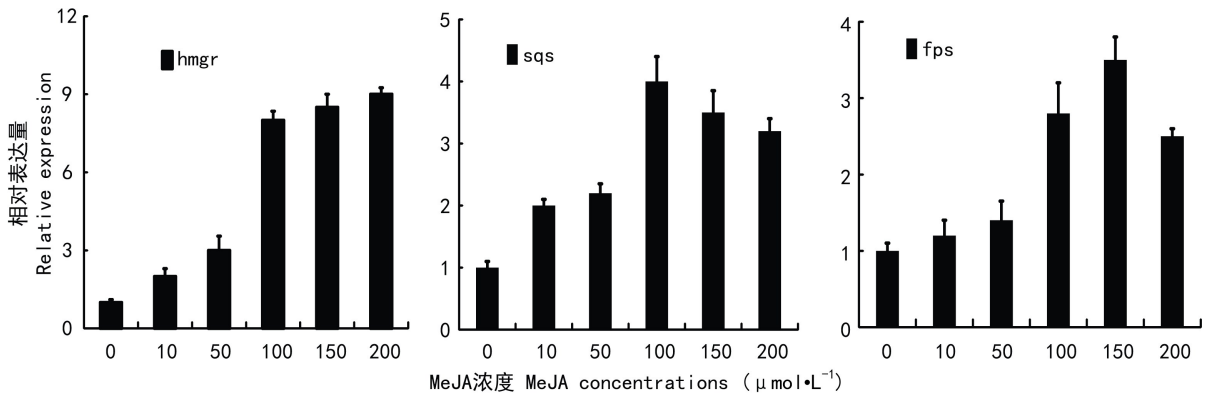


图 3 茉莉酸甲酯浓度梯度诱导后大戟的 *hmgr*、*sqs* 与 *fps* 基因的相对表达量

误差条表明 3 次重复荧光定量实验的标准方差。下同。

Fig. 3 Relative expressions of *hmgr*, *sqs* and *fps* genes of *Euphorbia pekinensis* in response to different concentrations of MeJA. The error bar represent standard deviation of means from three replicate quantitative real-time signal values. The same below.

$\text{L}^{-1}$ 后,基因表达量又有所降低,表明茉莉酸甲酯对 *sqs* 基因的影响并不是一直呈现正相关性,而是诱导剂达到一定浓度后对此基因表达量增加的影响变小,但都高于诱导前,在 MeJA 浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 *sqs* 基因表达量为未处理样品的 4 倍。 *fps* 基因的表达同样也呈现波动式的变化,在  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度内,诱导表达量缓慢上升,在  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度后,表达量急剧上升,但诱导剂浓度达到  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度后,对此基因表达量的影响突然减小。 *fps* 基因相对表达量最大值为对照组的 3.5 倍。

### 2.3 茉莉酸甲酯时间梯度诱导的基因表达差异

用荧光定量 PCR 检测茉莉酸甲酯时间梯度诱导的样品(图 4)。MeJA 诱导时间改变使大戟的 *hmgr*、*sqs* 与 *fps* 三个基因的表达量都发生变化,其中 *hmgr* 基因在诱导 36 h 后基因表达量最大,达 4

倍,随后表达量下降,并在 60 h 处理后基因相对表达量下调到诱导前的 2.2 倍。相比较, *sqs* 基因的表达量随着诱导时间延长基本呈现正相关,并在 48 h 达到最大,为诱导前的 3.8 倍,但在 60 h 诱导时间段出现下降。反映这两个基因对诱导剂的反应截然不同。大戟 *sqs* 基因受一定浓度的 MeJA 诱导更易出现表达上调的现象,且对诱导剂的反应也较敏感。相反,大戟 *fps* 基因对诱导剂的反应不很敏感,在处理 48 h 之前此基因的相对表达量变化很小,都未达到对照组的 2 倍,但在 48 h 诱导时间下,基因表达量达到对照组的 3.7 倍,出现最大值,60 h 的诱导基因表达量依然保持较高水平,高浓度的诱导剂处理时此基因表达量出现了显著的增加,所以此基因对茉莉酸甲酯的反应最不明显,但总体上都呈上调趋势。

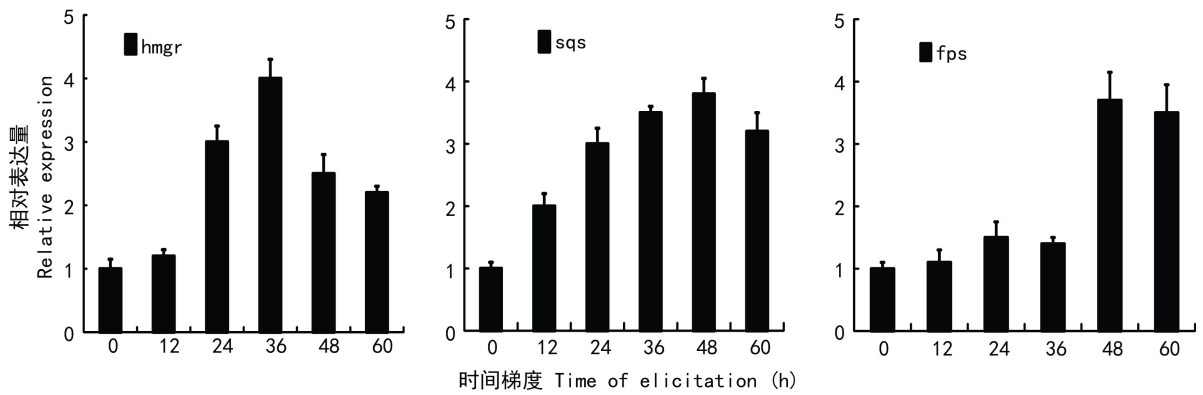


图4 浓度为  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的茉莉酸甲酯按时间梯度诱导后大戟的 *hmgr*, *sqs* 与 *fps* 基因的相对表达量  
Fig. 4 Relative expressions of *hmgr*, *sqs* and *fps* genes of *Euphorbia pekinensis* in response to the addition of  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA at the indicated time point

## 2.4 茉莉酸甲酯诱导下大戟总三萜含量变化

采用紫外分光光度法,以熊果酸为对照品,溶液在 552 nm 处具有最大吸光度,称取一系列不同浓度的标准溶液测定其吸光度,绘制标准曲线,此种方法操作简单、稳定性高。重复性好,可根据公式  $Y = m_1/m_2 \times 100\%$  (式中  $m_1$  为提取液中三萜化合物的总量  $g$ ;  $m_2$  为京大戟愈伤组织样品称样量;  $Y$  为京大戟三萜化合物的含量%) 计算出样品中三萜类化合物的含量(任亚硕等,2012)。茉莉酸甲酯诱导浓度梯度下大戟总三萜含量如图 5 所示,经 MeJA 诱导后大戟愈伤组织的总三萜含量较对照组明显增加,在  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  诱导浓度以内,随着 MeJA 浓度增加,总三萜含量增加较快,在大于  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  诱导浓度之后三萜含量增速变缓,在 MeJA 浓度大于  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时含量增加幅度又变大。

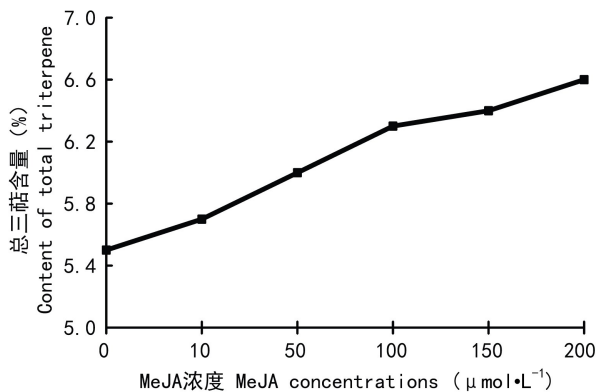


图5 MeJA 浓度梯度诱导后的大戟中总三萜含量  
Fig. 5 Content of total triterpene in response to different concentrations of MeJA

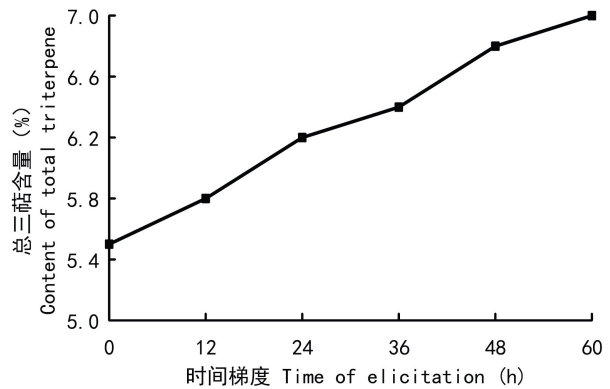


图6  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA 时间梯度诱导后的大戟中总三萜含量  
Fig. 6 Content of total triterpene in response to the addition of  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA at the indicated time point

茉莉酸甲酯诱导时间梯度下大戟总三萜含量如图 6 所示,与按浓度梯度处理下的大戟愈伤组织总三萜含量相似,时间梯度下总三萜含量明显上调并一直呈现上升趋势,在诱导 60 h 后三萜含量达到最大值,为未诱导前的 1.27 倍,上调幅度在诱导 36 h 后有所增加,但在 48 h 后又出现减小的现象。

## 3 讨论

次生代谢产物三萜类物质是药用植物的主要活性成分之一,广泛存在于各种植物中,三萜类化合物在双子叶中的比例较单子叶高。三萜类具有极高的药用价值和包括抗炎症、抗肿瘤、抗病毒等生理生化活性,近年来的临床研究表明,三萜类化合物能与抗癌药物协同作用于肿瘤细胞,甚至在分子水平上

调控癌细胞,致使其凋亡或从根本上抑制癌细胞的生成与增殖,从而起到一定的抗癌细胞作用(Lu *et al.*,2010)。*hmgr*,*sqs* 与 *fps* 是植物萜类物质合成途径的关键酶基因,*hmgr* 是甲羟戊酸途径中的第一个限速酶,催化 3-羟基,3-甲基戊二酰辅酶 A 生成甲羟戊酸,异戊烯焦磷酸(IPP)与其同分异构体物质二甲基丙烯基二磷酸(DMAPP)结合为 GPP,GPP 与 IPP 在 FPS(Rodríguez-Ortiz *et al.*,2009; Bomke *et al.*,2008)催化下首尾结合生成法尼基焦磷酸(FPP),以 FPP 为底物可以合成种类繁多的异戊二烯类化合物,如半萜、二萜、三萜、甾醇等(李莉等,2008);而 *sqs* 的作用就是催化 FPP 合成 SQ,通过鲨烯环氧酶作用生成 2,3-氧化鲨烯(刘春生,2006;陈建等,2004);通过 2,3-氧化鲨烯环化酶的催化,经几步氧化反应以及还原反应使产物官能化,最终得到三萜类以及甾醇(Fu *et al.*,2012)。

本研究得到使用茉莉酸甲酯按时间梯度与浓度梯度诱导大戟愈伤组织后的萜类代谢途径三个关键酶基因的相对表达量与总三萜的含量变化,发现诱导后基因表达量较对照都有所上调。诱导剂浓度梯度实验中,*hmgr*,*sqs* 与 *fps* 三个关键酶基因表达量变化比较,*hmgr* 对诱导剂的反应最为强烈,随诱导浓度增加基因表达量上升幅度较大,说明 MeJA 对 *hmgr* 的作用最为显著。时间梯度组中,MeJA 处理后基因表达量都增加,其中 *sqs* 基因表达量在处理 60 h 之前随着时间的延长呈现出正相关的趋势,但是在 60 h 后表达量略有下降,表明高浓度诱导剂反而影响基因表达量的增加,而其他两个基因的表达量随诱导时间变化波动较大,但总体上其基因的相对表达量都比对照组呈现上调趋势。相对应的三萜类化合物的含量也随着诱导剂浓度的增加及诱导时间的延长而增加,与关键酶基因的表达量呈正相关,推测茉莉酸甲酯能够通过诱导大戟中的相关基因的转录来影响三萜类代谢活性物质的合成。为了进一步阐明大戟中关键酶基因的调控和表达与其三萜类生物合成的关系将进行深入的研究与探讨。

## 参考文献:

Bomke C, Rojas MC, Gong F, *et al.* 2008. Isolation and characterization of the gibberellin biosynthetic gene cluster in *Sphaceloma manihoticola* [J]. *Appl Environ Microbiol*, **74**:5 325—5 339  
Cao XY (曹小迎). 2010. Triterpenoids constituents and key enzymes involved in triterpenoids biosynthesis pathway from the roots of *Euphorbia peginensis* Rupr(京大戟三萜成分及生物合

成途径中关键酶研究)[D]. Xuzhou(徐州):China University of Mining and Technology Press(中国矿业大学出版社):15—50  
Chen J(陈建), Zhao DG(赵德刚). 2004. The research progress of plant terpene biosynthesis enzymes and their coding genes(植物萜类生物合成相关酶类及其编码基因的研究进展)[J]. *Mol Plant Breed*(分子植物育种), **2**(6): 757—764  
Eisenreich W, Sch war z M, Cartayrade A, *et al.* 1998. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms[J]. *Chem Biol*, **5**:221  
Fu KG(福康高), Ren CG(任程广), Dai CC(戴传超). 2012. Signaling effects of nitric oxide, salicylic acid and reactive oxygen species on isoeuphpekinensin accumulation in *Euphorbia peginensis* suspension cells induced by an endophytic fungal elicitor(一氧化氮,水杨酸和活性氧信号影响由植物内生真菌诱导子诱导的京大戟悬浮细胞的异大戟素积累)[J]. *Plant Growth Regul*, **31**:490—497  
Kenneth JL, Thomas DS. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method methods[J]. *PubMed*, **25**:402—408  
Kong LY(孔令义), Min ZD(闵知大). 1996. The chemical component research of roots from *E. peginensis*(大戟根化学成分的研究)[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), **31**(7): 524—529  
Li L(李莉), Gao LY(高凌云), Dong Y(董越), *et al.* 2008. The research progress of biosynthesis enzyme gene of class two J enol isoamyl in plant(植物类异戊二烯生物合成相关酶基因研究进展)[J]. *J Zhejiang Norm Univ:Nat Sci Ed*(浙江师范大学学报·自然科学版), **31**(4): 461—466  
Liu CS(刘春生). 2006. ITS sequence and the correlation study of the formation and accumulation of B-tree ester alcohol synthase gene and glycyrrhizic acid (ITS 序列和 B-香树酯醇合成酶基因与甘草酸形成和积累的相关性研究)[D]. Beijing(北京):University of Chinese Medicine(北京中医药大学):55—60  
Lu D(陆丹), Liu JP(刘金平), Li PY(李萍亚). 2010. Research advances in triterpenes antitumor activities(三萜化合物抗肿瘤活性的研究进展)[J]. *Special Wild Economic Anim Plant Res*(特产研究), **1**:65—68  
Newman JD, Chappel J. 1999. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning with in the cytoplasmic pathway[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*:34—95  
Ren YS(任亚硕), Wu DL(吴德玲), Zhang W(张伟). 2012. Using the UV Spectrophotometry to test the total triterpenes of *Buddleja lindleyana* Fortune fruits(紫外分光光度法测定醉鱼草果实中总三萜含量)[J]. *J Anhui Trad Chin Med Coll*(安徽中医学院学报), **31**(5):78—80  
Rodríguez-Ortiz R, Limon MC, Avalos J. 2009. Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wildtype fusarium fujikuroi and carotenoid overproducing mutants[J]. *Appl Environ Microbiol*, **75**:405—413  
Sarang Bani, Surjeet Singh, Singh GB, *et al.* 1999. Antiinflammatory actions of *Euphorbia splendens* extract [J]. *Phytoth Res*, **11**(1):5—16  
Zhang PX(张培旭), Jin YR(金永日), Chen JF(陈家峰), *et al.* 2013. Ultrasonic-assisted nebulization extraction coupled with SPE and HPLC for the determination of triterpenoids in root of *Euphorbia peginensis* Rupr(使用与固相萃取和高效液相色谱法结合的超声雾化萃取法提取大戟根的三萜化合物)[J]. *Chromatographia*(色谱学), **76**:967—974