

TwHMGR 过表达对雷公藤甲素和雷公藤红素生物合成的影响

王家典^{1,2}, 赵瑜君², 张逸风^{1,2}, 胡添源¹, 卢 璠¹, 周家伟¹, 马宝伟¹,
张 睿¹, 高 伟^{1*}, 黄璐琦^{2*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

摘要: 雷公藤 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (*Tripterygium wilfordii* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase, *TwHMGR*, GenBank: ALU11310.1 3) 是 MVA 途径中的第一个限速酶, 是细胞质中萜类代谢途径中的重要调控位点。为探讨 *TwHMGR* 对雷公藤甲素和雷公藤红素生物合成的影响, 对其进行了过表达研究。利用 Gateway 技术将 *TwHMGR* 的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 构建到过表达载体中, 通过基因枪介导过表达载体转入雷公藤悬浮细胞。qRT-PCR 结果显示 *TwHMGR* 的基因相对表达量在过表达组显著提高, 是空载体组基因相对表达量的 1.75 倍; UPLC 结果显示雷公藤甲素及雷公藤红素含量在过表达组中分别提高为空载组的 163.93% 和 190.04%。本实验中 *TwHMGR* 在雷公藤悬浮细胞中成功过表达, 表现为基因相对表达量的上升和雷公藤甲素及雷公藤红素含量的上调, 证明了 *TwHMGR* 在雷公藤萜类成分生物合成途径上的正向调节作用, 为雷公藤重要活性萜类成分的合成生物学研究奠定了基础。

关键词: *TwHMGR*; 过表达; 雷公藤甲素; 雷公藤红素; 基因枪

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1225-08

The effects of *TwHMGR* overexpression on the biosynthesis of triptolide and celastrol in *Tripterygium wilfordii*

WANG Jia-dian^{1,2}, ZHAO Yu-jun², ZHANG Yi-feng^{1,2}, HU Tian-yuan¹, LU Yun¹,
ZHOU Jia-wei¹, MA Bao-wei¹, ZHANG Rui¹, GAO Wei^{1*}, HUANG Lu-qi^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: *Tripterygium wilfordii* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase (*TwHMGR*) is an important regulation site in terpenoids metabolic pathway in cytoplasm which is the first speed limit enzyme of MVA pathway. In order to investigate the effects of *TwHMGR* on the biosynthesis of triptolide and celastrol in *Tripterygium wilfordii*, the overexpression of *TwHMGR* (OE-*HMGR*) was studied in this paper. We cloned the full-length of *TwHMGR* to construct overexpression vector by Gateway technology then delivered the expression vector into *Tripterygium wilfordii* suspension cells by gene gun. qRT-PCR was used to detect the expression of *TwHMGR*: the expression of *TwHMGR* was increased to 1.75 folds over the control group (empty vector: pH7WG2D) in the overexpression group. The accumulation of triptolide and celastrol in the suspension cells of *Tripterygium wilfordii* was detected by UPLC, revealing that: the contents of triptolide and celastrol were

收稿日期: 2018-05-09; 修回日期: 2018-06-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773830); 北京市自然科学基金项目、北京市教育委员会科技发展计划重点项目 (KZ201710025022); 北京市属高校长城学者培养计划 (CIT&TCD20170324).

*通讯作者 Tel: 86-10-83916572, Fax: 86-10-83911627, E-mail: weigao@ccmu.edu.cn;

Tel: 86-10-64014411-2955, Fax: 86-10-64013996, E-mail: huangluqi01@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0431

increased to 163.93% and 190.04% of over the control group in the overexpression group. Based on these findings, the positive effect on the accumulation of active terpenoids, triptolide and celastrol in *Tripterygium wilfordii* was found and the results laid a foundation of the synthetic biology research on important active terpenoids in *Tripterygium wilfordii*.

Key words: *TwHMGR*; overexpression; triptolide; celastrol; gene gun

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 是传统中药雷公藤的植物来源, 具有清热解毒、祛风除湿、杀虫止痒、消肿散结等功效^[1, 2]。现代研究表明雷公藤可用于风湿性关节炎、肾小球肾炎、肾病综合征等疾病的治疗^[3]。雷公藤中含有多种活性化学成分, 其中二萜类化合物雷公藤甲素 (triptolide) 和三萜类化合物雷公藤红素 (celastrol) 是雷公藤中活性最强的有效成分^[4, 5]。雷公藤甲素可抑制多种肿瘤的增殖^[6], 从机制上来说, 雷公藤甲素直接与转录因子 2 (TFIIH) 的亚基结合, 抑制 RNA 聚合酶 II 介导的转录和可能的核苷酸切除修复^[7]。雷公藤红素已被证实为 HSP90 的新型抑制剂, 通过诱导 HSP90 的下游蛋白降解发挥作用^[8, 9]。此外, 研究表明, 雷公藤红素作为一种瘦素致敏剂, 将成为一种很有前景的肥胖治疗药^[10]。

萜类化合物在高等植物中的合成途径主要有两种, 一是位于细胞质中的甲羟戊酸 (MVA) 途径, 主要生成倍半萜和三萜类化合物; 二是发生于质体中的 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径, 主要生成单萜、二萜和四萜类化合物^[11]。以上两条途径在亚细胞空间上是隔离的, 但均生成萜类化合物的共同前体 IPP^[12, 13]。HMGR 存在于细胞质中的 MVA 途径中, 催化 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 生成甲羟戊酸 (MVA), 是细胞质中的萜类代谢途径中的重要调控位点, 也是 MVA 途径中的第一个限速酶^[14, 15]。研究发现加入 HMGR 酶的竞争抑制剂—洛伐他丁 (MEV) 后会导致人参不定根中的人参皂苷明显降低^[16]。缺失 HMGR1 基因会导致拟南芥植株矮小、早衰、雄性不育, 且甾醇含量比野生型植株明显降低^[17]。因此, HMGR 在 MVA 途径中的作用极为重要。

基因过表达是将某个基因大量表达的过程, 其基本原理是通过人工构建载体的方式在目的基因上游加入调控元件, 使基因可以在人为控制的条件下实现大量转录和翻译, 从而实现基因产物的过表达。过表达技术是用来研究基因功能, 提升代谢产物产量的一种极为有效的研究手段^[18]。基因枪技术, 又被称为生物弹道技术 (biolistic technology) 或微粒轰击技术 (particle bombardment technology), 其基本原

理就是采用一种微粒加速装置, 使裹着外源基因的微米级的金或钨颗粒获得足够的动能打入靶细胞或组织, 是向植物细胞中快速稳定转入外源基因的一种方法。

雷公藤植物生长周期长, 且植物中次生代谢物含量低, 利用传统化学提取方法获得活性成分面临成本高、产量低的问题^[19]。通过提高关键酶的基因表达, 有效地调控萜类产物的生物合成, 进而从整体上提高萜类化合物的前体以及目标萜类产物的总量是分子生药学常用的研究策略。本研究利用 Gateway 技术构建 HMGR 的过表达载体, 再使用基因枪将包裹着过表达载体的金属粒打入雷公藤悬浮细胞, 希望通过研究过表达 *TwHMGR* 基因后雷公藤甲素和雷公藤红素积累量的变化, 来探讨 *TwHMGR* 在雷公藤萜类化合物生物合成途径上的作用, 为以后从整体上提高目标萜类化合物的产量提供科学依据。

材料与amp;方法

植物材料 雷公藤悬浮细胞为本实验室在 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg·L⁻¹ KT 的 MS 液体培养基中, 25 °C、120 r·min⁻¹ 暗培养所得。

菌株和质粒 *E. coli* Trans5α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司、*TwHMGR* 模板质粒 (由课题组前期实验克隆得到, 经北京睿博兴科有限公司测序验证)。

试剂 Murashige&Skoog 基本培养基购自美国 PhytoTechnology Laboratories 公司、植物生长激素和抗生素购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司、pENTER/D-TOPO CLONING KIT 购自美国 Invitrogen 公司、Gateway[®] LR Clonase[®] II Enzyme Mix 购自美国 Invitrogen 公司、Gel Extraction Kit 购自美国 OMEGA 公司、Plasmid Mini Kit I 购自美国 OMEGA 公司、Plasmid Maxi Kit 购自美国 OMEGA 公司、植物总 RNA 提取试剂盒购自上海普洛麦格生物产品有限公司、Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司、KAPA SYBR[®] FAST Universal 2×qPCR Master Mix 购自美国 KAPA biosystems 公司、Trans2K Plus DNA Marker 和 Trans2K DNA Marker 购

自北京全式金公司、Phusion®超保真 DNA 聚合酶购自美国 NEB 公司、EasyTaq® DNA 聚合酶购自北京全式金公司、亚精胺盐酸盐购自美国 Sigma 公司。

***TwHMGR* 生物信息学分析** 使用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析了 *TwHMGR* 的核苷酸序列, 利用 NCBI ORF Finder 确定 *TwHMGR* 的开放阅读框, 用 BLAST 程序在 NCBI 数据库中进行同源性检索, 用 DNAMAN 8.0 软件对序列进行多重序列比对, 并在 MEGA 7.0 中通过 Clustal W 比对, 采用 neighbor-joining 方法构建系统进化树^[20]。

BP 反应构建入门载体 根据已知的 *TwHMGR*-ORF, 使用 Premier 5.0 设计相应引物, 并在正向引物前加 CACC 的粘性末端, *HMGR*-F: CACCATGGAGGCCCGCCGGAG, *HMGR*-R: CTAAGAAGAACCAGCAGCAGAAATATTG。PCR 反应体系为: 25 μL 2 \times Phusion HF, 2.5 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ *HMGR*-R, 2.5 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ *HMGR*-F, 1 μL *HMGR* 模板质粒, 19 μL ddH₂O, 总体系为 50 μL 。反应程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物切胶回收后, 按照 pENTR/D-TOPO® 载体说明书操作, 用于构建入门载体, 转化 *E. coli* Trans5 α 感受态细胞, 取阳性克隆进行测序, 测序成功后, 使用美国 OMEGA 公司的 Plasmid Mini Kit I 试剂盒, 按照说明书提取 *TwHMGR* 过表达的入门载体质粒。

LR 反应构建表达载体 入门载体质粒用于构建表达载体, PCR 反应体系为: OE-*HMGR* 质粒 300 ng, pH7WG2D 载体 300 ng, 1 μL LR 酶, 0.6 μL TE Buffer (PH 8.0)。反应程序: 25 $^{\circ}\text{C}$, 4 h。PCR 产物转化 *E. coli* Trans5 α 感受态细胞, 取阳性克隆进行测序, 测序成功后, 使用美国 OMEGA 公司的 Plasmid Maxi Kit I 试剂盒, 按照说明书提取 *TwHMGR* 过表达的载体质粒, 命名为 OE-*HMGR* 质粒。

目的基因转化雷公藤悬浮细胞 本实验使用基因枪瞬时转化法将含有目的片段的质粒打入雷公藤悬浮细胞, 过程如下: 将 MS 固体培养基 (含 0.8% 琼脂) 分装于直径为 35 mm 的小型培养皿中, 取实验室继代培养 3 代以上的雷公藤悬浮细胞继代于固体培养基中, 每皿继代 0.2 g 细胞, 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 7 天。以 OE-*HMGR* 质粒为例, 包埋体系如下: 5000 μg 金粉、100 μL 2.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl₂、40 μL 亚精胺稀释液 (6 μL 原液稀释到 40 μL)、20 μg 过表达质粒。按上述体系加入各试剂, 涡旋震荡 2~3 min, 静置后离心, 弃上清。分别用 70% 乙醇和 100% 乙醇清洗两次后, 向离心管中加入 100 μL 100% 乙醇, 轻弹管壁数次后, 在

低速的混合器上充分震荡 2~3 s, 置于冰中保存待用。按相同方法进行 pH7WG2D 空载质粒的包埋。氩气瓶气压 1300 psi, 使用 1100 psi 可裂膜, 轰击距离 3 cm, 按照 Biorad 公司 PDS-1000/He 型基因枪说明书进行操作, 每盘细胞打两枪, 每组做 5 个生物学重复。转化完成的雷公藤悬浮细胞于 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 7 天, 待检测。

表达载体成功转化悬浮细胞验证 细胞培养 7 天后, 每盘称取约 50 mg 表面浮有金粉的雷公藤悬浮细胞, 使用植物总 RNA 提取试剂盒, 按照说明书进行雷公藤悬浮细胞的总 RNA 提取。使用 Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒, 按说明书将总 RNA 反转录为 cDNA。由于 pH7WG2D 载体中, 包含 *hygromycin* (Hyg) 片段。因此, 以反转得到的 cDNA 为模板, 用 Hyg 特异引物 Hyg-F: ATCAGCTTGCATGCCGGTC, Hyg-R: ATCATACATGAGAATTAAGGGAGTCAC 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为: 25 μL 2 \times Phusion HF、2.5 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hyg-R、2.5 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hyg-F、1 μL 模板 cDNA、19 μL ddH₂O, 总体系 50 μL 。反应程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 5 min。

qRT-PCR 检测 *TwHMGR* 相对表达量 以逆转录获得的 cDNA 作为 qRT-PCR 的模板, 使用 Premier 5.0 设计相应引物, Q-*HMGR*-F: GGTTTCTTTGGCGTTGACTT, Q-*HMGR*-R: GACGACCTTGGGCTTGA; 以 β -actin 基因作为内参, β -actin-F: AGGAACCACC GATCCAGACA, β -actin-R: GGTGCCCTGAGGTCCT GTT。使用 KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix Kit 进行 qRT-PCR 反应, 反应体系: 10.0 μL 2 \times Fast qPCR Master Mix、0.4 μL 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正向引物、0.4 μL 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 反向引物、1.0 μL cDNA、8.2 μL PCR-grade water, 总体积 20.0 μL , 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 重复 45 个循环。使用 LightCycler® 480II 实时荧光定量 PCR 系统分析 *TwHMGR* 的基因相对表达量。设置 3 个技术重复, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算基因的相对表达量^[21]。同时使用空载组 cDNA 和过表达组 cDNA 分别为模板进行 *TwHMGR* 特异扩增, 直观反映基因相对表达量的变化。

雷公藤悬浮细胞中雷公藤甲素和雷公藤红素的含量测定 每盘细胞称取约 100 mg 表面浮有金粉的雷公藤悬浮细胞, 用液氮球磨机粉碎后使用 FDU-1110/FDU-2100 冷冻干燥机进行冷冻干燥。冷冻干燥后的样品精密称重 20 mg, 加入 80% 甲醇 1 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 以 40 kHz、100% 功率、25 $^{\circ}\text{C}$ 超声 30 min 后,

12000×g 离心 10 min 后取上清液过 0.22 μm PTFE 滤膜, 使用安捷伦 1290 型 UPLC 检测悬浮细胞中雷公藤甲素和雷公藤红素的含量。色谱条件: C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为纯乙腈, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸水。梯度洗脱条件: 0 min 70% A, 5 min 65% A, 8 min 65% A, 15 min 30% A, 21 min 10% A。洗脱速度: 0.4 mL·min⁻¹, 进样量: 5 μL, 柱温: 40 °C。雷公藤甲素的检测波长为 219.4 nm, 雷公藤红素的检测波长为 426.0 nm。以 80% 甲醇为溶剂, 配制雷公藤甲素和雷公藤红素的标准曲线, 浓度梯度设置为 1、2.5、3.5、10、25 μg·L⁻¹。

结果与分析

1 TwHMGR 系统进化分析

为了进一步探索 TwHMGR 与不同生物 (包括植物、动物、昆虫、真菌和细菌) 之间的进化关系, 基于不同的 HMGR 氨基酸序列构建了系统进化树。在进化过程中, 所有的 HMGR 都有共同的起源, TwHMGR 和其他高等植物的 HMGR 酶构成了一簇, 如图 1。

2 TwHMGR 过表达载体的构建

TwHMGR 特异性引物扩增得到 1 740 bp 的 OE-HMGR 片段, 电泳结果如图 2A 所示; 所构建的过表达载体示意图如图 2B 所示。

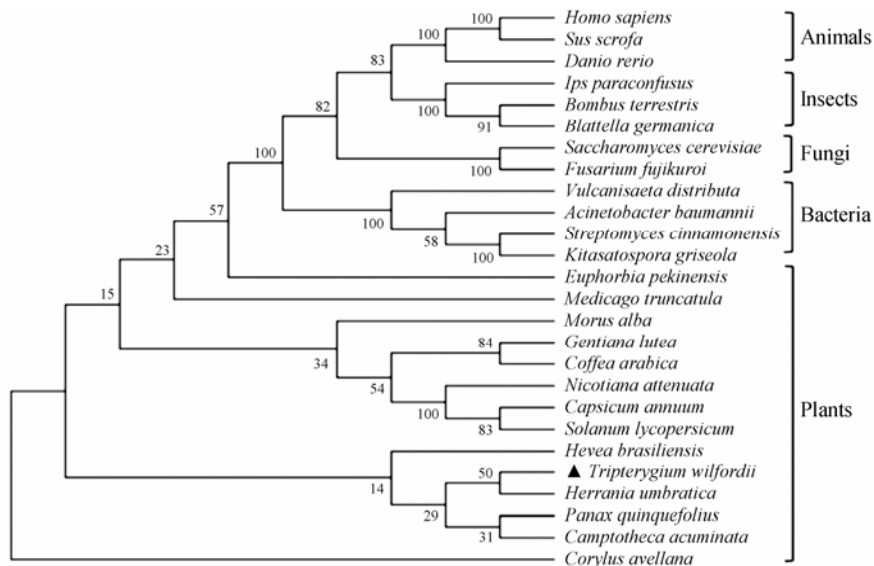


Figure 1 Phylogenetic analysis tree of HMGRs from plants, animals, insects, fungi and bacteria. ALU11310.1: *Tripterygium wilfordii*, AA085554.1: *Nicotiana attenuate*, Q9XEL8.1: *Capsicum annuum*, ABK56831.1: *Euphorbia pekinensis*, CAA38467.1: *Hevea brasiliensis*, ACV65036.1: *Panax quinquefolius*, AAB69727.1: *Camptotheca acuminata*, BAE92730.1: *Gentiana lutea*, ADR51242.1: *Coffea arabica*, ADX05300.1: *Acinetobacter baumannii*, ADN51044.1: *Vulcanisaeta distributa*, ADQ43: 377.1: *Streptomyces cinnamonensis*, BAB07821.1: *Kitasatospora griseola*, ABY20976.1: *Medicago truncatula*, AAD03789.1: *Morus alba*, ABP04052.1: *Corylus avellana*, XP_021282837.1: *Herrania umbratica*, AAB62581.1: *Solanum lycopersicum*, NP_000850.1: *Homo sapiens*, NP_001073446.2: *Danio rerio*, NP_001116460.1: *Sus scrofa*, NP_001295235.1: *Bombus terrestris*, AAD20975.2: *Ips paraconfusus*, P54960.1: *Blattella germanica*, AAB67527.1: *Saccharomyces cerevisiae*, S0DQM8.1: *Fusarium fujikuroi*

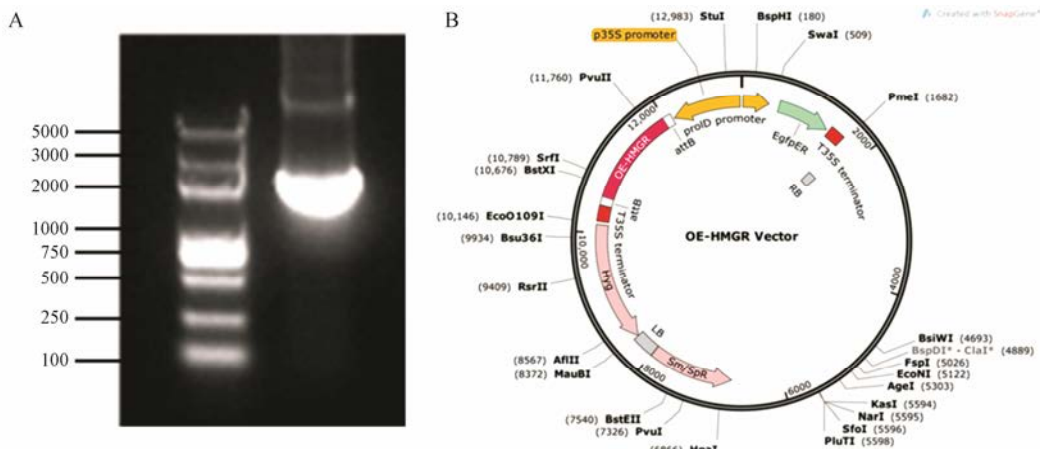


Figure 2 Overexpression fragment and vector. A: TwHMGR overexpression fragment of 1 740 bp; B: Overexpression vector include OE-HMGR and Hyg fragment

3 *TwHMGR* 全长基因序列分析

TwHMGR 的开放阅读框起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAG, 长 1 740 bp, 共编码 579 AA。
TwHMGR 氨基酸序列与其他植物 HMGR 氨基酸序

列进行比对后, 发现其均具有 HMG-CoA 结合基序 (EMPVGVYVQIP 和 TTEGCLVA) 和两个 NADP (H) 结合基序 (DAMGMNM 和 GTVGGG)^[22], 如图 3。

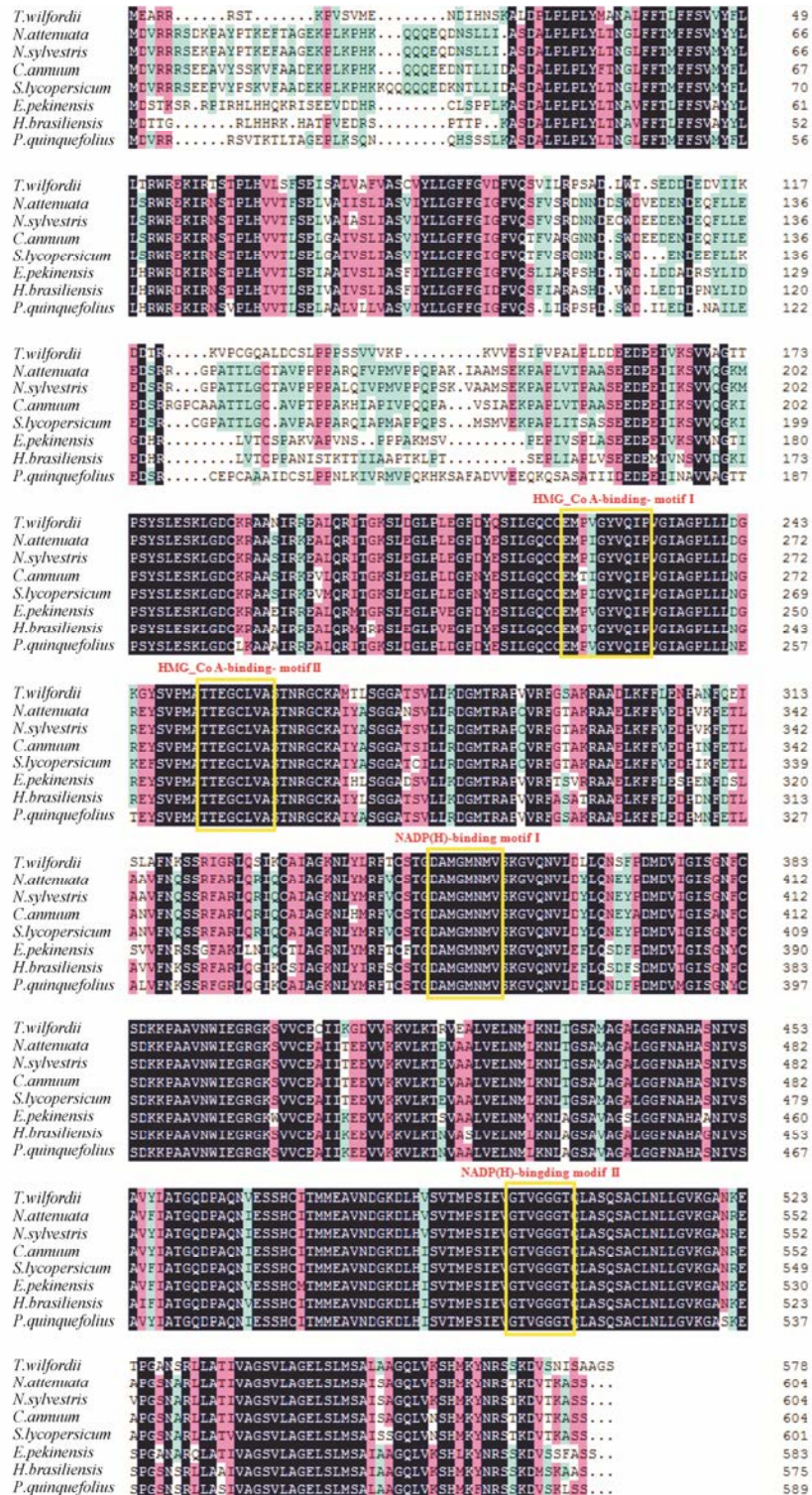


Figure 3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of HMGRs from plants. The conserved residues are shown in dark blue and homologous residues in pink, yellow boxes show the HMG-CoA-binding motifs and NADP (H)-binding motifs; ALU11310.1: *Tripterygium wilfordii*, AA085554.1: *Nicotiana attenuata*, Q01559.1: *Nicotiana sylvestris*, Q9XEL8.1: *Capsicum annuum*, AAB62581.1: *Solanum lycopersicum*, ABK56831.1: *Euphorbia pekinensis*, CAA38467.1: *Hevea brasiliensis*, ACV65036.1 3: *Panax quinquefolius*

4 过表达载体转化雷公藤悬浮细胞验证

空载组和过表达组的 cDNA 均可以扩增得到 1 787 bp 的 Hyg 片段, 琼脂糖凝胶电泳结果如图 4 所示, 说明载体成功转入雷公藤悬浮细胞。

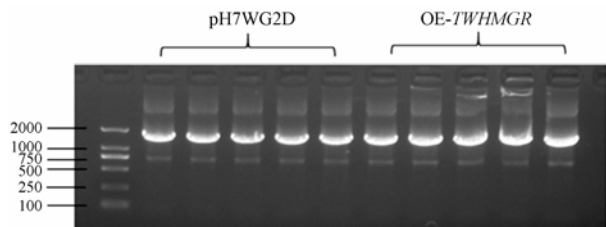


Figure 4 Verification of successful transformation of expression vector. Hyg fragments of 1 787 bp

5 *TwHMGR* 基因相对表达量检测

分别以空载组和过表达组的 cDNA 为模板, *TwHMGR* 特异引物扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 5A 所示, 以过表达组 cDNA 为模板扩增的目的基因条带较空载组亮, 而内参基因亮度差异不大。qRT-PCR 结果分析显示, 在过表达组中, *TwHMGR* 的表达量是空载组的 1.75 倍, 如图 5B 所示。

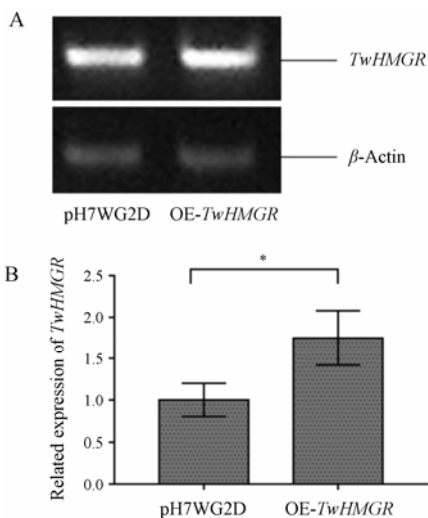


Figure 5 Gene expression analysis of *TwHMGR*. A: Gel electrophoresis of gene expression; B: qRT-PCR of gene relative expression. Single asterisks “*” indicates $P < 0.05$, $n = 5$

6 雷公藤甲素和雷公藤红素的含量检测

UPLC 检测样品和对照品中的雷公藤甲素和雷公藤红素如图 6 所示, 在 219.4 nm 检测波长下, 峰 1 为雷公藤甲素, 在 426.0 nm 检测波长下, 峰 2 为雷公藤红素。

相比于空载组, 过表达 *HMGR* 后, 雷公藤悬浮细胞中雷公藤甲素和雷公藤红素的含量都明显上升, 结

果如图 7 所示。雷公藤甲素在空载组中含量为 $(98.56 \pm 8.98) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 在过表达组为 $(161.56 \pm 1.57) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 雷公藤红素在空载组中含量为 $(124.07 \pm 7.23) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 在过表达组为 $(235.77 \pm 9.86) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

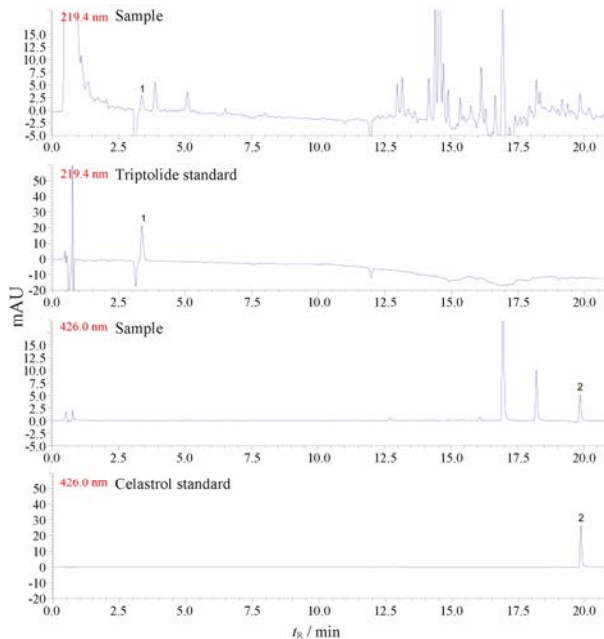


Figure 6 UPLC chromatograms of triptolide and celastrol standards and samples. Peak 1: Triptolide; Peak 2: Celastrol

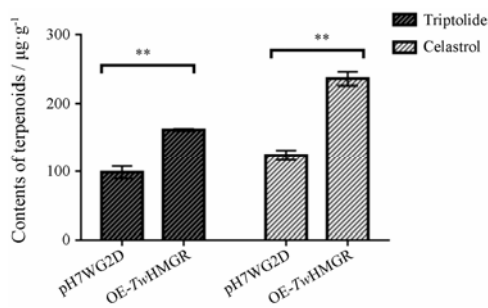


Figure 7 Contents of triptolide and celastrol in *Tripterygium wilfordii*. The data represent the average \pm standard. Double asterisks “**” indicate $P < 0.01$, $n = 5$

讨论

HMGR 是植物甲羟戊酸代谢途径上游的一个关键限速酶, 对控制代谢途径中碳源流向起到非常重要的作用, 该酶基因表达上调会明显促进植物类异戊二烯物质含量的增加^[23]。Schaller 等^[24]研究发现, 橡胶树 *HMGR1* 基因可使转基因烟草中总甾醇含量提高 6 倍, 中间代谢产物也在组织中有所累积; Wang 等^[25]研究发现, *HMGR* 转基因青蒿中的基因最高表达量是野生型的 2.8 倍, 青蒿素含量也有明显提高。本实验成功构建了 *TwHMGR* 的过表达载体, 并通过

基因枪将其转入雷公藤悬浮细胞中。实时荧光定量 PCR 的结果如预想的一样, 过表达组 *TwHMGR* 基因相对表达量相比于空载组升高了 0.75 倍。雷公藤甲素和雷公藤红素的含量较空载组分别上升了 0.64 和 0.90 倍。实验结果表明, 过表达 *TwHMGR* 对雷公藤甲素和雷公藤红素的生物合成有着明显的正向调控作用。

本实验中, 过表达 *TwHMGR* 后雷公藤甲素 (二萜, 由 MEP 途径合成) 和雷公藤红素 (三萜, 由 MVA 途径合成) 的含量均显著上升, 证实雷公藤萜类物质生物合成的两条途径并不是相互独立的, 而是互相联系的。过表达 MVA 途径限速酶 *HMGR*, 使 MVA 和 MEP 途径的产物产量均有所上调, 但 MVA 途径产物雷公藤红素上调量更高。

基因枪法转化雷公藤悬浮细胞, 相比于传统的农杆菌转化法大大缩短了实验周期, 是一种十分高效的基因转化方法, 可用于基因体内功能的快速验证。Zhang 等^[26]发现过表达 *TwDXR* 对合成途径上游某些基因的表达量具有负反馈调节作用, 而本实验只单独考察了 *TwHMGR* 的基因相对表达量变化, 下一步将对基因彼此间的调控作用再做研究。

References

- [1] Gao W, Liu MT, Cheng QQ, et al. Herbal textual research on *Tripterygium Wilfordii* [J]. World Chin Med (世界中医药), 2012, 7: 560–562.
- [2] Guan HY, Su P, Zhao YJ, et al. Cloning and protein expression of sterol-C-24-methyl transferase 2 in *Tripterygium wilfordii* [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2016, 51: 1799–1805.
- [3] Liu XM, Liu ZH, Zhang J, et al. Study progress on clinical application and side effects of *Tripterygium wilfordii* [J]. J Pharm Prac (药学实践杂志), 2015, 33: 110–113.
- [4] Lin JR, Lin B, Song HT. Research progress on *in vivo* pharmacokinetics of triptolide and celastrol [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 528–532.
- [5] Ma J, Dey M, Yang H, et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive compounds from *Tripterygium wilfordii* [J]. Phytochemistry, 2007, 68: 1172–1178.
- [6] Liu MX, Dong J, Yang YJ, et al. Preparation and toxicity of triptolide-loaded poly (*D,L*-lactic acid) nanoparticles [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2004, 39: 375–382.
- [7] Titov DV, Gilman B, He QL, et al. XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide [J]. Nat Chem Biol, 2011, 7: 182–188.
- [8] Zhang T, Li Y, Yu Y, et al. Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction [J]. J Biol Chem, 2009, 284: 35381–35389.
- [9] Zhang T, Hamza A, Cao X, et al. A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7: 162.
- [10] Liu J, Lee J, Salazar Hernandez M A, et al. Treatment of obesity with celastrol [J]. Cell, 2015, 161: 999–1011.
- [11] Chen Y, Xie QD, Tang YS, et al. Advances in plant terpene synthetic metabolic pathways and rate-limiting enzymes [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2018, 16: 2371–2379.
- [12] Laule O, Fürholz A, Chang HS, et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100: 6866–6871.
- [13] He YF, Gao W, Liu TS, et al. Research advances of diterpene synthase [J]. Acta Phar Sin (药理学报), 2011, 46: 1019–1025.
- [14] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2003, 46: 521–547.
- [15] Bach TJ. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis? [J]. Lipids, 1986, 21: 82–88.
- [16] Kim YJ, Yang DC. Functional analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase encoding genes in triterpene saponin-producing ginseng [J]. Plant Physiol, 2014, 165: 373–387.
- [17] Suzuki M, Kamide Y, Nagata N, et al. Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels [J]. J Health Soc Policy, 2004, 37: 750–761.
- [18] Guo J. The impact of the overexpression of genes *HMGR* and *DXR* in terpenes biosynthesis in *Tripterygium wilfordii* Hook. f (*HMGR* 与 *DXR* 基因过表达对雷公藤萜类物质生物合成的影响) [D]. Yangling: Northwest A&F University (西北农林科技大学), 2015.
- [19] Liu YJ, Su P, Wang XJ, et al. Cloning and expression analysis of squalene synthase gene in *Tripterygium wilfordii* [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2016, 51: 657–661.
- [20] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33: 1870–1874.
- [21] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT}

- method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [22] Luo HM, Song JY, Li XY, et al. Cloning and expression analysis of a key device of *HMGR* gene involved in ginsenoside biosynthesis of *Panax ginseng* via synthetic biology approach [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 219–227.
- [23] Schaller H, Grausem B, Benveniste P, et al. Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109: 761–770.
- [24] Wang Y, Jing F, Yu S, et al. Co-overexpression of the *HMGR* and *FPS* genes enhances artemisinin content in *Artemisia annua L* [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5: 3396–3403.
- [25] Chu W, Liu YY, Li YB, et al. Advances on plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (*HMGR*) genes [J]. *Curr Biotechnol*, 2018, 8: 93–102+185.
- [26] Zhang YF, Zhao YJ, Wang JD, et al. Overexpression and RNA interference of *TwDXR* regulate the accumulation of terpenoid active ingredients in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Biotechnol Lett*, 2018, 40: 419–425.