

雷公藤 *MCT* 基因 RNAi 对雷公藤萜类活性成分生物合成的影响

宋雅迪¹, 赵瑜君², 陈 上¹, 胡添源¹, 张 睿¹, 王家典¹, 卢 鋈¹,
王秀娟^{1,3*}, 高 伟^{1,3*}, 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, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700; 3. 首都医科大学中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069)

摘要: *MCT* 是萜类生物合成 MEP 途径上重要的关键酶, 本研究利用 Gateway 克隆重组技术构建 *TwMCT* 基因的 RNAi 表达载体, 得到了大小为 484 bp 的载体片段。通过基因枪技术将 *TwMCT* RNAi 载体转入到雷公藤悬浮细胞。采用 UPLC 测定雷公藤萜类活性成分的含量, 结果显示细胞中雷公藤甲素和雷公藤红素的含量相对于对照组 pK7GWIWG2D 分别下降了 23.4% 和 42.8%。同时利用 qRT-PCR 检测 *TwMCT* 基因及萜类合成途径上主要基因的表达量, 结果表明, 相对于对照组 pK7GWIWG2D, *TwMCT* 表达量下降了 29.2%, *TwDXR*、*TwGGPS*、*TwHMGR* 和 *TwHMGS* 的相对表达量分别下降了 36.3%、31.3%、62.2% 和 29.1%, 但 *TwDXS* 的表达量上调了 114.2%, 而 *TwFPS* 没有显著性变化。本研究在体内验证了干扰 *TwMCT* 的表达对雷公藤萜类活性成分雷公藤甲素和雷公藤红素的积累有显著抑制作用, 为进一步探究 *MCT* 基因对雷公藤萜类成分生物合成的调控机制奠定基础。

关键词: 雷公藤; *TwMCT*; RNAi; 雷公藤甲素; 雷公藤红素

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1209-06

Effect on biosynthesis of terpenoid active components through RNA interference with *MCT* gene in *Tripterygium wilfordii*

SONG Ya-di¹, ZHAO Yu-jun², CHEN Shang¹, HU Tian-yuan¹, ZHANG Rui¹,
WANG Jia-dian¹, LU Yun¹, WANG Xiu-juan^{1,3*}, GAO Wei^{1,3*}, HUANG Lu-qi²

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Beijing Key Lab of TCM Collateral Disease Theory Research, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: *MCT* is an important key enzyme in the terpenoid biosynthesis in MEP pathway. In this study, Gateway technology was used to construct RNAi vector of *TwMCT*, and a vector fragment with a size of 484 bp was obtained. The *TwMCT* RNAi vector was transferred into the suspension cells of *Tripterygium wilfordii* by gene gun. Accumulation of terpenoids was assayed by UPLC, and the result showed that the content of triptolide and celastrol in cells decreased by 23.4% and 42.8%, respectively, compared with the control group pK7GWIWG2D. Moreover, the gene expression of *TwMCT* and major genes in terpenoid biosynthesis pathway was detected by qRT-PCR, which demonstrated that the expression of *TwMCT* reduced by 29.2% relative to that

收稿日期: 2018-05-02; 修回日期: 2018-05-09.

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 to W.G.).

*通讯作者 Tel: 86-10-83911671, Fax: 86-10-83911627, E-mail: wxj0517@sina.com;

Tel: 86-10-83916572, Fax: 86-10-83911627, E-mail: weigao@ccmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0397

of the control group pK7GWIWG2D, and the relative expression of *TwDXR*, *TwGGPS*, *TwHMGR* and *TwHMGS* diminished by 36.3%, 31.3%, 62.2%, and 29.1%, respectively, but the expression of *TwDXS* was up-regulated by 114.2%, and there was no significant change in *TwFPS*. Thus, it was verified *in vivo* that interference with *TwMCT* expression significantly inhibited the accumulation of triptolide and celastrol in *Tripterygium wilfordii*, laying a foundation for further exploring the regulation mechanism of *MCT* gene on the terpenoid biosynthesis in *Tripterygium wilfordii*.

Key words: *Tripterygium wilfordii*; *TwMCT*; RNAi; triptolide; celastrol

中药雷公藤来源于卫矛科雷公藤属植物雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f., *Tw*) 的干燥根或根的木质部, 具有祛风除湿、活血通络等功效^[1]。雷公藤主要有效化学成分是萜类, 如二萜类雷公藤甲素 (triptolide)、三萜类雷公藤红素 (celastrol)、雷公藤内酯甲等。现代药理研究表明, 雷公藤甲素有良好的抗肿瘤作用, 如肺癌^[2]、乳腺癌^[3]等, 还可用于治疗类风湿性关节炎^[4]等。雷公藤红素可以减轻体重^[5], 改善糖代谢^[6]等。

Gateway[®]克隆技术主要运用 BP 和 LR 位点特异性重组反应, 使噬菌体 λ 能够整合进细菌染色体中或者整合后再从中分离^[7], 这种方法可以利用一种入门载体进而高通量地产生各种表达载体。现在也已研发出用于研究植物基因功能的高通量 Gateway 载体^[8]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种序列特异的基因沉默手段, 能高效、特异阻断基因的表达, 广泛应用于肿瘤基因治疗^[9, 10]的研究。现在也越来越成为基因功能研究^[11-13]及调节化合物生物合成研究的有力工具。

基因枪技术的基本原理就是将采用外源基因包被在钨粉或金粉颗粒表面, 然后在高压冲击的作用下, 将加速的粒子打入靶细胞或组织内。该技术操作简单, 能迅速、方便地转移基因, 而且可以获得持续时间较长的瞬时表达^[14]。

萜类化合物在植物体内是由位于细胞质的甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和位于质体的 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径合成。其中 2-C-甲基-D-赤藓醇-4 磷酸脱氢酰转移酶 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate cytidylyltransferase, MCT) 是 MEP 途径中重要的关键酶, 其催化 MEP 生成 4-(5-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇 [4-(cytidine 5-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol, CDP-ME], 在合成萜类化合物的过程中发挥重要作用。Tong 等^[15]克隆得到了雷公藤 *MCT* (*TwMCT*) 基因, 但该基因的表达与对雷公藤甲素和雷公藤红素生物合成的影响目前尚未阐明。本研究

利用 Gateway 技术构建了 *TwMCT* 的 RNAi 载体, 并将该载体通过基因枪技术转入到雷公藤悬浮细胞中, 测定转入载体的悬浮细胞中雷公藤甲素和雷公藤红素的含量, 同时确定 *TwMCT* 以及萜类生物合成途径上其他重要基因的表达情况, 以此在体内验证干扰 *TwMCT* 的表达对雷公藤萜类活性成分雷公藤甲素和雷公藤红素积累有抑制作用, 为进一步探究 *MCT* 基因调控雷公藤萜类生物合成的机制奠定基础。

材料与amp;方法

植物材料 本实验所用的雷公藤悬浮细胞培养于含有 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)+0.1 mg·L⁻¹ 激动素 (KT)+0.5 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸 (IBA) 的 MS 液体培养基中, 并于 25 °C、120 r·min⁻¹ 黑暗条件下振荡培养。细胞由首都医科大学中药资源与分子生药实验室继代保存。

药品与试剂 pENTR™/D-TOPO[®] Cloning Kit, LR Clonase™ II Enzyme Mix, 载体 pK7GWIWG2D (美国 Invitrogen 公司); 大肠杆菌 Trans5 α (*E. coli* Trans5 α) 感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司); Plasmid Maxi Kit 试剂盒 (美国 OMEGA 公司); Phusion 超保真聚合酶 (美国 New England Biolabs 公司); KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Kit (美国 KAPA Biosystems 公司); 总 RNA 提取试剂盒 (北京普洛麦格生物技术有限公司); 快速质粒小提试剂盒, Fast Quant RT kit (with gDNase) 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司)。

仪器设备 基因枪 (PDS-1000/He, 美国 Bio-Rad 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (qRT-PCR, QuantStudio 5, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 超高效液相色谱仪 (UPLC, 1290 Infinity II, 美国 Agilent 公司); T3 超高效液相色谱柱 (1.8 μ m, 2.1 mm \times 100 mm, 美国 Waters 公司); 引物合成及测序服务由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。

***TwMCT* 基因的 RNAi 片段扩增** 根据 *TwMCT* 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计该序列

RNAi 片段的特异性引物 MCTi F/R (表 1), 以 *TwMCT* 基因质粒为模板, 根据 Phusion 超保真聚合酶说明书进行 PCR 扩增反应。反应程序: 98 °C 预变性 30 s, 35 个循环 (98 °C 变性 10 s, 56 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min), 最后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保温。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

Table 1 The primers used for vector construction, verification and qRT-PCR

Primer name	Primer Sequence (5'-3')
MCTi-F	CACCTCTCGCGCATTTGCTTATGTG
MCTi-R	TCGGTGATGTACACGGGATG
M13-F	TGTAACACGACGGCCAGT
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC
Kan-F	ATCAGCTTGCATGCCGGTC
Kan-R	ATACATGAGAATTAAGGGAGTCAC
qEf-F	CCAAGGGTGAAAGCAAGGAGAGC
qEf-R	CACTGGTGGTTTTGAGGCTGGTATCT
qMCT-F	CTTGTGAATAGGGAAGGTCTC
qMCT-R	CTCCAGCAGCAACTGAAAT
qDXR-F	AATCTCCTTGTTCCGGTTCCA
qDXR-R	GCTGGTTGAGGCTGCTGA
qDXS-F	GGCGACTACTGGGTCTTCTT
qDXS-R	TGTCTTTGCGTATCATCATCCT
qFPS-F	GGGTGTATTTGCGGAGT
qFPS-R	CGGCAGAATCTAATGGAG
qGGPS-F	GGCAAGAGGGTTCGTCCAG
qGGPS-R	AAAGTAGTGCATCACCAGCAAG
qHMGR-F	GCCTTTGCTGCTGGACGACTA
qHMGR-R	CCGCTGCTCTTCTGGCTGAC
qHMGS-F	CTGGAGGTAGGGAGCGAGAC
qHMGS-R	CCATAGCAGGCATTGGTTGA

入门载体的构建 按照 pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit 试剂盒的指导^[16], 将所扩增的条带位置正确的 PCR 产物与入门载体 pENTR SD/D-TOPO 相连接, 也称 BP 反应。再将连接后的产物转化到 *E. coli* Trans5 α 感受态细胞中, 在含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素 (kanamycin, Kan) 的 LB 固体培养基的平板上进行筛选。待长出圆形单一克隆菌落后, 使用入门载体上的通用引物 M13 F/R (表 1) 进行 PCR 检测, 将得到的条带位置正确的菌液进行测序, 检测入门载体的构建是否成功。

***TwMCT* RNAi 载体的构建** 利用快速质粒小提试剂盒提取测序结果正确的入门载体的质粒, 根据 Gateway LR Clonase™ II Enzyme Mix 试剂盒说明书, 在 LR Clone II 重组酶的作用下, 将入门载体与 pK7GWIWG2D 载体进行重组反应, 也称 LR 反应。再将重组反应后的产物转化到 *E. coli* Trans5 α 感受态

细胞中, 在含有 50 mg·L⁻¹ 壮观霉素 (spectinomycin, Spe) 的 LB 固体培养基的平板上进行筛选。待长出圆形单一克隆菌落后, 利用引物 MCTi F/R 进行 PCR 检测, 将得到的条带位置正确的菌液进行测序, 检测 *TwMCT* RNAi 载体的构建是否成功。

雷公藤悬浮细胞的培养 将实验室继代保存的雷公藤悬浮细胞转移到添加了 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ KT 的 MS 固体培养基中, 25 °C、120 r·min⁻¹ 黑暗条件下预培养 7 d。每 3 mL MS 固体培养基对应培养 200 mg 雷公藤悬浮细胞。

***TwMCT* RNAi 载体的转入** 利用 Plasmid Maxi Kit 试剂盒提取 pK7GWIWG2D 载体和测序结果正确的 *TwMCT* RNAi 载体的质粒。以 pK7GWIWG2D 载体作为空载对照, 利用基因枪^[17]将空载质粒和 *TwMCT* RNAi 载体的质粒分别转化到预培养 7 d 后的雷公藤悬浮细胞中, 转入后的细胞继续在相同条件下培养 7 d。每种质粒设置 5 个生物学重复。

***TwMCT* RNAi 载体成功转入悬浮细胞的验证** 利用总 RNA 提取试剂盒, 分别提取继续培养 7 d 后的雷公藤悬浮细胞的总 RNA, 按照 FastQuant RT kit (with gDNase) 试剂盒的指导, 将总 RNA 反转录成第一链 cDNA。利用引物 Kan F/R (表 1), 进行 PCR 反应, 反应条件与雷公藤 MCT 基因的 RNAi 片段扩增程序相同, 检测 cDNA 中是否含有 Kan 抗性标记基因片段, 以期来验证 *TwMCT* RNAi 载体是否成功转入到雷公藤悬浮细胞中。

雷公藤甲素和雷公藤红素的提取与含量测定 剩余的雷公藤悬浮细胞经液氮速冻后冷冻干燥 48 h。冷冻干燥后的每个样品准确称量 20 mg, 分别置于装有 1 mL 80% (v/v) 甲醇的离心管中, 于 4 °C 浸泡过夜。之后在 40 kHz、25 °C 条件下超声提取 1 h, 然后将离心管于 13000 ×g 下离心 10 min, 上清液过 0.22 μ m 滤膜后利用 T3 柱子和 UPLC 仪器检测雷公藤甲素和雷公藤红素的含量。进样量是 5 μ L, 流动相 A 是 100% 乙腈, 流动相 B 是 0.1% (v/v) 甲酸水。梯度洗脱过程: 0~5 min, 70%~65% A; 5~8 min, 65% A; 8~15 min, 65%~30% A; 15~21 min, 30%~10% A, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C。每个样品重复进样 3 次。

***TwMCT* 基因表达量的检测** 以 cDNA 为模板, 引物 qMCT F/R (表 1), 参照 KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Kit 试剂盒说明书, 利用 qRT-PCR 仪器来检测目的 *TwMCT* 的表达情况。以 *Efa1* 作为内参基因, 其引物为 qEf F/R (表 1)。反应体系: 10 μ L 2×qPCR Master Mix, 0.4 μ L 50×ROX reference Dye low, 0.4 μ L

引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $1 \mu\text{L}$ cDNA, 加 ddH_2O 补足至 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 初始 95°C 进行 3 min , 扩增循环 40 次: 95°C 变性 3 s , 60°C 退火延伸 30 s , 与此同时采集荧光图像, 然后添加熔解曲线: 95°C 1 s , 60°C 20 s , 在 $0.1^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 升温过程中采集荧光图像, 95°C 1 s 。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算各基因的相对表达量^[18]。每个样品重复 3 次。

雷公藤萜类生物合成途径上主要基因表达量的检测 萜类生物合成途径上主要生物合成酶有 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR)、法尼基二磷酸合酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPS)、香叶基香叶基二磷酸合酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPS)、羟甲基戊二酰-CoA 还原酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, HMGR)、羟甲基戊二酰 CoA 合酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, HMGS)。以 cDNA 为模板, *Efa1* 为内参基因, 检测雷公藤 *DXS* (*TwDXS*)、雷公藤 *DXR* (*TwDXR*)、雷公藤 *FPS* (*TwFPS*)、雷公藤 *GGPS* (*TwGGPS*)、雷公藤 *HMGR* (*TwHMGR*) 和雷公藤 *HMGS* (*TwHMGS*) 基因的表达量, 相关引物见表 1。参照 KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Kit 试剂盒说明书, 利用 qRT-PCR 仪器来检测萜类途径上 *TwDXS*、*TwDXR*、*TwFPS*、*TwGGPS*、*TwHMGR* 和 *TwHMGS* 的表达情况。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算各基因的相对表达量。每个样品重复 3 次。

结果与分析

1 *TwMCT* RNAi 载体构建的检测

利用特异性引物 MCTi F/R 对在 LB+Spe 培养基中培养的菌液进行 PCR 检测, 电泳检测结果见图 1。得到的 *TwMCT* RNAi 片段大小为 484 bp 。提取阳性菌液的质粒, 进行测序, 结果与 *TwMCT* 序列一致。表明 *TwMCT* RNAi 载体构建成功。

2 *TwMCT* RNAi 载体成功转入悬浮细胞的检测

分别以反转录得到的 pK7GWIWG2D 组和 *TwMCT*

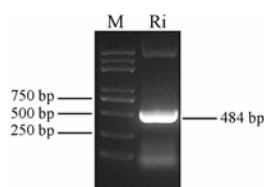


Figure 1 PCR analysis of the expression vector construction. M: Trans 2K Plus Marker; Ri: *TwMCT* RNAi

RNAi 组的 cDNA 为模板, 利用引物 Kan F/R 进行 PCR 检测, 结果见图 2。所得到的产物大小为 1350 bp , 为抗性基因 Kan 片段, 表明对照 pK7GWIWG2D 载体和 *TwMCT* RNAi 载体已成功转入到雷公藤悬浮细胞中。

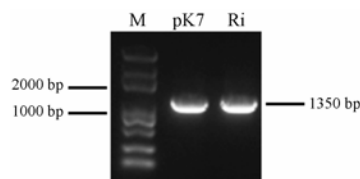


Figure 2 Verification of successful expression vector transformation. M: Trans 2K Plus Marker; pK7: pK7GWIWG2D; Ri: *TwMCT* RNAi

3 雷公藤悬浮细胞中雷公藤甲素和雷公藤红素的含量

在 *TwMCT* 表达被干扰的情况下, 雷公藤悬浮细胞中的雷公藤甲素和雷公藤红素的含量变化见图 3。雷公藤甲素的含量在对照组 pK7GWIWG2D 中是 $39.0 \pm 5.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 在 *TwMCT* RNAi 组中是 $29.9 \pm 1.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。雷公藤红素的含量在对照组中是 $50.2 \pm 11.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 在 RNAi 组中是 $28.7 \pm 5.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 且均具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

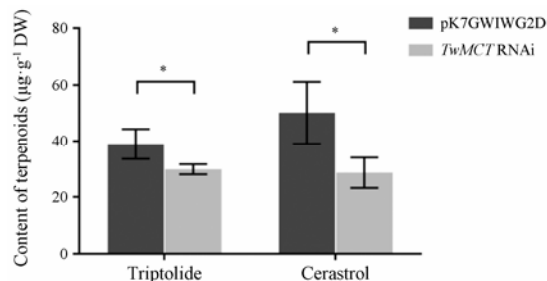


Figure 3 Contents of triptolide and celastrol in *Tripterygium wilfordii* suspension cells. The data represent the means \pm SD of five biological replicates and three technical replicates; DW means dry weight. A single asterisk indicates $^*P < 0.05, n = 5$

4 *TwMCT* 基因的干扰表达情况分析

利用 qRT-PCR 仪器对 *TwMCT* 干扰后的表达量进行检测, 计算基因相对表达量, 结果见图 4。*TwMCT* RNAi 的基因表达量相对于对照组 pK7GWIWG2D 显著下降了 29.2% 。

5 雷公藤萜类生物合成途径上主要基因的表达情况分析

在 *TwMCT* 表达被干扰的情况下, 萜类合成相关基因表达量变化见图 5。相对于对照组 pK7GWIWG2D, *TwDXS* 的表达量上调了 114.2% , *TwDXR*、*TwGGPS*、*TwHMGR* 和 *TwHMGS* 的相对表达量分别下降了

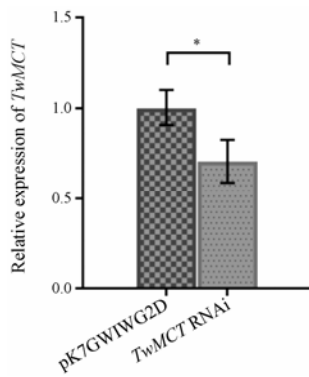


Figure 4 Relative expression of *TwMCT*. Values represent means \pm SD of five biological replicates and three technical replicates. * $P < 0.05$, $n = 5$

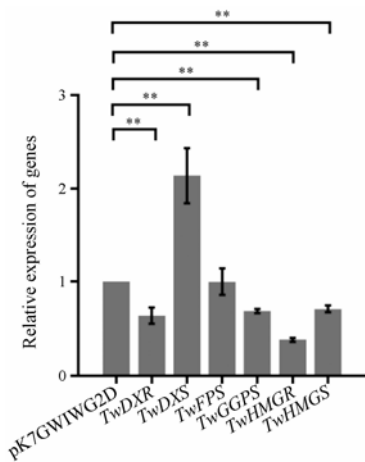


Figure 5 Relative expression analysis of genes in the terpenoid biosynthetic pathway. Values represent means \pm SD of five biological replicates and three technical replicates. ** $P < 0.01$, $n = 5$

36.3%、31.3%、62.2%、29.1%，但 *TwFPS* 相对于对照组没有显著性变化。

讨论

在植物萜类合成 MEP 途径中, DXS 催化丙酮酸 (pyruvate) 和甘油醛-3-磷酸 (*D*-glyceraldehyde-3-phosphate, G3P) 生成 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸 (1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate, DXP), DXP 经 DXR 催化生成 MEP, MEP 经 MCT 催化生成 CDP-ME, 再经过酶催化反应后生成 (isopentenyl pyrophosphate, IPP), IPP 和其同分异构体二甲基丙烯基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 经一系列反应后在 GGPS 催化下生成香叶基香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP), GGPP 再经过一系列反应生成雷公藤甲素。IPP 可以通过质体包膜转移, 连接 MVA 和 MEP 途径^[19]。在 MVA 途径中, HMGS

催化乙酰乙酰 CoA (acetoacetyl-CoA) 生成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA (3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA, HMG-CoA), HMGR 催化 HMG-CoA 生成 MVA, MVA 经过一系列催化后可得到 IPP, IPP 和 DMAPP 经一系列反应后在 FPS 催化下生成法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP), FPP 经过一系列反应生成雷公藤红素。本研究中, 建立了 *TwMCT* RNAi 表达载体, 主要考察雷公藤萜类活性成分生物合成的关键基因 *TwMCT* 干扰后的表达变化, 发现干扰 *TwMCT* 表达后, 经 MEP 途径生成的雷公藤甲素和经 MVA 途径生成的雷公藤红素含量均显著下降, *TwMCT* 表达量明显下调, 由此验证干扰 *TwMCT* 的表达对雷公藤萜类活性成分雷公藤甲素和雷公藤红素的积累有显著抑制作用。分析雷公藤萜类生物合成途径上游主要基因的表达情况后发现, MEP 途径上 *TwDXR* 和 *TwGGPS*、MVA 途径上 *TwHMGR* 和 *TwHMGS* 表达量均显著下调, 提示在干扰 MEP 途径上的 *TwMCT* 表达后, 萜类途径上游部分基因表达也发生相应的变化, 从而导致经 MVA 途径合成的雷公藤红素含量下降, 这可能归因于基因间的共同作用^[20], 但 *TwDXS* 的表达量显著上调, 这可能是由基因表达的负反馈调节所引起的^[21], 而 *TwFPS* 没有显著性变化的现象可能与基因沉默有关^[22]。

目前雷公藤甲素和雷公藤红素生物合成途径下游的关键基因尚未完全解析清楚, 而雷公藤甲素和雷公藤红素合成所受抑制程度的不同, 说明 *TwMCT* 对雷公藤二萜类和三萜类合成的前体物质 IPP 和 DMAPP 生物合成的影响可能是一致的, 但下游不同萜类对前体物质的竞争能力不同, 导致二者的累积程度不同, 上游途径中 *TwMCT* 表达被干扰后对下游途径的基因是否有影响也有待进一步探究。目前已经从青蒿^[23]、银杏^[24]、罗芙木^[25]等中克隆得到了编码 MCT 的基因, 本实验不仅可为进一步探讨 *TwMCT* 基因对雷公藤萜类活性成分生物合成的调控机制奠定基础, 还可为研究其他植物中 MCT 的作用, 探究雷公藤萜类生物合成途径上其他关键酶^[26, 27]对雷公藤萜类活性成分生物合成的影响提供参考。

References

- [1] Gao W, Liu M, Cheng QQ, et al. Herbal textual research on *Tripterygium Wilfordii* [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2012, 560-562.
- [2] Reno TA, Kim JY, Raz DJ. Triptolide inhibits lung cancer

- cell migration, invasion, and metastasis [J]. *Ann Thorac Surg*, 2015, 100: 1817–1824, 1824–1825.
- [3] Shao HM, Ma JH, Guo TH, et al. Triptolide induces apoptosis of breast cancer cells via a mechanism associated with the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8: 505–508.
- [4] Marcus DM. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook. F with methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73: e56–e56.
- [5] Liu J, Lee J, Salazar Hernandez MA, et al. Treatment of obesity with celastrol [J]. *Cell*, 2015, 161: 999–1011.
- [6] Ma X, Xu L, Alberobello AT, et al. Celastrol protects against obesity and metabolic dysfunction through activation of a HSF1-PGC1 α transcriptional axis [J]. *Cell Metab*, 2015, 22: 695–708.
- [7] Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination [J]. *Genome Res*, 2000, 10: 1788–1795.
- [8] Guo SS, Zhang M, Shan WX. Construction of a Gateway technology-based plant expression vector [J]. *J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed)* (西北农林科技大学学报 (自然科学版)), 2010, 2010: 161–166.
- [9] Fei LN, Wang QZ, Xu RA. Combinatorial RNAi and its application in cancer gene therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 573–579.
- [10] Chang L, Gong F, Cui Y. RNAi-mediated A disintegrin and metalloproteinase 9 gene silencing inhibits the tumor growth of non-small lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12: 1197–1204.
- [11] Asano T, Kobayashi K, Kashihara E, et al. Suppression of camptothecin biosynthetic genes results in metabolic modification of secondary products in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 128–139.
- [12] Cheng QQ, Su P, Hu YT, et al. RNA interference-mediated repression of *SmCPS* (copolydiphosphate synthase) expression in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* causes a decrease of tanshinones and sheds light on the functional role of *SmCPS* [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 363–369.
- [13] 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.
- [14] He BL, Sun EJ, Huang W. The particle gun and its application advancement in gene therapy [J]. *J Biol (生物学杂志)*, 2007, 24: 49–52.
- [15] Tong YR, Su P, Zhang M, et al. Cloning and expression analysis of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase gene in *Tripterygium wilfordii* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2015, 40: 4378–4383.
- [16] Zhao R, Rong QX, Liu YZ, et al. Construction of RNAi vectors for *SmNAC1* transcription factors of *Salvia miltiorrhiza* using Gateway cloning technology [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2014, 39: 1569–1573.
- [17] Zhu JC, Bu DH, Yu XZ, et al. Instructions of biolistic PDS-1000/He gene gun [J]. *Shaanxi J Agric Sci (陕西农业科学)*, 2003, (1): 81–82.
- [18] Rao X, Huang X, Zhou Z, et al. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis [J]. *Comput Stand Interfaces*, 2013, 3: 165–165.
- [19] Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ. A *raison d'etre* for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? [J]. *Prog Lipid Res*, 2012, 51: 95–148.
- [20] Singh S, Pal S, Shanker K, et al. Sterol partitioning by HMGR and DXR for routing intermediates toward withanolide biosynthesis [J]. *Physiol Plant*, 2014, 152: 617.
- [21] Xi W, Yu H. *MOTHER OF FT AND TFL1* regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 1733.
- [22] Linn F, Heidmann L, Saedler H. Epigenetic changes in the expression of the maize *Al* gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation [J]. *Mol Gen Genet*, 1990, 222: 329–336.
- [23] Zhang M, Xiang LE, Wang H, et al. Molecular cloning and characterization of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase gene from *Artemisia annua* L. [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1334–1339.
- [24] Yuan HH. Cloning of *MECT*, *MECPs* Gene Promoters from *Ginkgo biloba* L. and Construction of Plant Expression Vector (银杏 *MECT*, *MECPs* 基因启动子克隆及植物表达载体构建) [D]. Wuhan: Wuhan Institute of Technology, 2013.
- [25] Zheng Y. Cloning of *MCT*, *HDS* and *SGD* Genes from *Rauvolfia verticillata* and Establishment of Genetic Transformation System (萝芙木 *MCT*、*HDS*、*SGD* 基因的克隆与遗传转化体系的建立) [D]. Chongqing: Southwest University, 2011.
- [26] Liu YJ, Su P, Wang XJ, et al. Cloning and expression analysis of squalene synthase gene in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 657–661.
- [27] Cheng QQ, Tong YR, Wang ZH, et al. Molecular cloning and functional identification of a cDNA encoding 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7: 208–214.