

大黄藤中黄藤素生物合成途径关键酶基因的筛选

周兴乾, 耿应敏, 张体操, 郑兰平*

(云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: 黄藤素是大黄藤的主要功效成分, 是典型的小檗碱类异喹啉类生物碱, 具有广泛的抗炎、抗菌活性。本研究运用代谢组学与转录组学研究, 筛选了与黄藤素合成显著相关的差异表达基因 (DEGs), 并对其中 8 个 DEGs 进行了实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证。代谢组学研究共检测到 106 种生物碱, 其中包含 23 种异喹啉类生物碱。黄藤素在根与叶的对比组中位居差异代谢物差异倍数前十位, 其在根中的相对含量约是叶中的 47.5 倍。通过转录组学研究, 共 188 条基因注释到异喹啉类生物碱的生物合成途径上, 其中 36 条基因具有显著差异, 根与叶的对比组包含 33 条 DEGs, 30 条 DEGs 在黄藤素的生物合成途径上。最后, 通过代谢组学与转录组学关联分析, 筛选到 4 条基因序列的表达模式与黄藤素具有显著相关性。qRT-PCR 实验结果表明 8 个 DEGs 的表达趋势均与转录组结果一致。本研究不仅丰富了大黄藤的组学数据, 也为黄藤素的生物合成研究奠定了基础, 并进一步为其他异喹啉类生物碱生物合成途径上关键酶基因的解析提供了参考。

关键词: 大黄藤; 多组学; 生物合成途径; 黄藤素; 异喹啉类生物碱

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)06-1873-10

Screening of key enzyme genes on the palmatine biosynthetic pathway in *Fibraurea recisa*

ZHOU Xing-qian, GENG Ying-min, ZHANG Ti-cao, ZHENG Lan-ping*

(College of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: Palmatine, the main effective ingredient of *Fibraurea recisa*, is a typical berberine isoquinoline alkaloid with extensive anti-inflammatory and antibacterial activities. In this work, the studies of metabolomics and transcriptomics were utilized to detect differentially expressed genes (DEGs) that are significantly associated with the synthesis of palmatine. In addition, eight of these DEGs were verified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). A total of 106 alkaloids were detected in the metabolomics study, including 23 isoquinoline alkaloids. Palmatine ranked in the top ten of differential metabolites in the group of root vs leaf, and its relative content in root was about 47.5 times higher than that in leaf. In the transcriptomics study, a total of 188 genes were annotated to the pathway of isoquinoline alkaloid biosynthesis. Among them, there were 36 DEGs were significantly different. In the comparison group of root and leaf, a total of 33 DEGs were significantly different, and 30 DEGs were annotated on the biosynthetic pathway of palmatine. Finally, the results of the correlation analysis between metabolomics and transcriptomics showed that the expression patterns of four gene sequences were screened to be significantly correlated with palmatine. The results of qRT-PCR experiments showed that the expression trends of eight DEGs were consistent with the results of transcriptomic. This study not only enriched the omics data of

收稿日期: 2023-11-15; 修回日期: 2024-01-17.

基金项目: 云南省应用基础研究中医联合专项 (202101AZ070001-056); 云南省基础研究项目 (202301AT070254); 云南省南药可持续利用重点实验室开放课题 (202005AG070157).

*通讯作者 E-mail: casperlp@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1292

F. recisa, but also established the foundation for the study of the synthetic biology of palmatine. It further provided a reference for the analysis of the key enzyme genes on the biosynthetic pathway of other isoquinoline alkaloids.

Key words: *Fibraurea recisa*; multi-omics; biosynthetic pathway; palmatine; isoquinoline alkaloid

大黄藤为防己科植物天仙藤 *Fibraurea recisa* Pierre 的干燥藤茎, 又名黄藤、藤黄连、金锁匙、土黄连等^[1], 多生长于海拔 180~1 000 m 阴湿而肥沃的热带、亚热带密林中, 常攀援高大藤本植物^[2]。其首载于《本草纲目》, 于 1974 年收载于《云南省药品标准》, 后被 1977 年版《中华人民共和国药典》收录^[2-4]。现收载于 2020 版《中华人民共和国药典》, 其味苦, 性寒, 归心、肝经, 具有清热解毒、泻火通便的功效^[5], 对多种感染性疾病具有防治作用^[6]。现代药理学研究认为大黄藤的主要功效成分为异喹啉类生物碱(又称苜基异喹啉类生物碱, benzyloisoquinoline alkaloid, BIA), 包括黄藤素(又称巴马汀, palmatine)、药根碱(jatrorrhizine)、小檗碱(berberine)、黄藤素甲(fibranine)、黄藤素乙(ibraminine)等。其中黄藤素是大黄藤中最重要的生物碱, 在大黄藤的根及茎中, 黄藤素含量高达 3%, 且黄藤素具有广泛的抗炎、抗菌活性^[7]。以单一黄藤素为原料, 已被开发为黄藤素片, 并被中国药典收录, 用以治疗妇科炎症、菌痢、肠炎、呼吸道及泌尿道感染、外科感染、眼结膜炎等症^[5]。

近年来, 大黄藤野生资源逐渐匮乏, 不得不走向人工种植的方向, 但人工种植通常需要 4~5 年才可采收^[8], 大黄藤作为黄藤素的主要来源植物, 这严重影响了黄藤素的产量。而黄藤素的化学合成方面, 又存在产率低、使用剧毒试剂、副产物影响产品纯度及对实验设备要求较高等劣势^[9]。

随着现代生物学技术的发展, 通过挖掘中药活性成分生物合成途径中的关键酶, 并利用合成生物学技术来设计构建模式微生物和模式植物中新的代谢途径, 从而达到异源生产重要化合物的目的, 被认为是一种崭新的、极具潜力的药用化合物获取方法^[10]。目前, 虽然黄藤素的生物合成通路已注释, 但其合成途径上的关键酶基因表达调控的分子机制研究还未见报道。本研究通过多组学方法, 筛选了大黄藤中异喹啉类生物碱合成通路上与黄藤素合成相关的关键酶基因, 可为后续关键基因的鉴定及功能验证研究指明方向, 为黄藤素的异源生产研究奠定基础。

材料与方法

植物样品 大黄藤样品于 2021 年 9 月采自云南省屏边苗族自治县玉屏镇卡口村委会附近林下(东经

103.75°, 北纬 23.03°), 为两年生健康植株。材料经由云南中医药大学李学芳正高级工程师鉴定确认。采摘后, 取其根、茎、叶分为 3 组, 立即液氮速冻, 而后储存于 -80 °C 冰箱备用。

代谢物提取 将 9 个大黄藤样品分别冷冻干燥, 研磨至粉末状。称取 100 mg 粉末加入甲醇提取液中, 4 °C 过夜后离心, 吸取上清液并过滤样品, 保存于进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 分析^[11]。

UPLC 条件 色谱柱: Agilent SB-C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 水相 A 为含 0.1% 甲醇的超纯水, 有机相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈; 洗脱梯度: 0~9 min 为 5%~95% B; 9~10 min 为 95% B; 10~11.1 min 为 95%~5% B; 11.1~14 min 为 5% B; 流速 0.35 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C; 进样量 4 μL^[11]。

MS/MS 条件 涡轮喷雾离子源温度 550 °C; 离子喷雾电压 (IS) 正离子模式 5 500 V, 负离子模式 -4 500 V; 离子源气体 I (GSI), 气体 II (GSII) 和帘气 (CUR) 分别设置为 50、60 和 25.0 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa)。QQQ 扫描使用 MRM 模式, 通过进一步的 DP 和 CE 优化, 完成各个 MRM 离子对的 DP 和 CE。根据每个时期内洗脱的代谢物, 在每个时期监测一组特定的 MRM 离子对^[11,12]。

代谢组学分析 检测完成后, 对代谢物数据运用主成分分析 (PCA) 判别组间差异, 运用正交偏最小二乘法-判别分析法 (OPLS-DA) 进行代谢物差异分析, 以 VIP ≥ 0.9 且 FC (fold change) ≥ 2 (或 FC ≤ 0.5) 为条件筛选差异代谢物, 并对筛选的差异代谢物进行 KEGG 富集分析。

总 RNA 提取与转录组测序 用 RNA 试剂盒 (MagZol™ Reagent Plus Kit) 提取 9 个样本总 RNA, 使用 PacBio 测序仪进行全长转录组测序, 最终得到一致性转录本序列 (consensus transcripts)。得到二代测序数据后去除接头序列、低质量测序序列, 得到 clean data 后使用二代测序数据对三代转录本进行纠错, 并对纠错后的转录本使用 CD-HIT 去冗余^[13], 再比对到 KEGG、Nr、Swiss-prot、Trembl、KOG、GO 和 Pfam 等数据库, 得到注释结果^[14]。计算 FPKM, 得到基因表达定量数据后, 进行基因差异和富集分析。最后将转录组数据与代谢组数据进行 KEGG 联合分析, 筛选与黄藤素合成相关的显著差异表达基因 (differentially

expressed genes, DEGs)。最后, 将与黄藤素合成相关的差异代谢物的相对定量数据和 DEGs 的表达定量数据进行相关性网络分析, Pearson 相关系数阈值设置为 0.80, 同时设置 $P < 0.05$ 。

实时荧光定量 PCR 验证实验及分析 在与黄藤素合成显著相关的 DEGs 中, 随机挑选了 8 条序列, 设计了特异性引物, 并以 *GAPDH* 为内参基因 (表 1), 进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证。每个样品中每个基因的检测设置 3 个复孔, 共进行了 3 次生物学重复。将 3 次生物学重复得到的数据利用公式 $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其相对表达量, 并绘制箱线图。

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
<i>BBE_27675-F</i>	ACCCACTTACAACAAACCTTCGG
<i>BBE_27675-R</i>	TCCTCTCTGCAACACAAAATCG
<i>TDC_35849-F</i>	GGATTGCTGTGTCTTTGGGTTA
<i>TDC_35849-R</i>	CGAATGTGGGTTTGAAGGTTAG
<i>AspAT_21163-F</i>	AGCTCGATCCATGTCTTCGTG
<i>AspAT_21163-R</i>	TCCTGCTCTCCGCTTCTCTCA
<i>6OMT_39928-F</i>	TCGGATGAGTGCATGGTTCCTA
<i>6OMT_39928-R</i>	AGTTCTGGTTCATCTCTGGGTGCT
<i>BBE_28224-F</i>	GAGATTGCTAGAAAATGGGGTGA
<i>BBE_28224-R</i>	AATGGAGGAATGCTCTGTGGATG
<i>BBE_30738-F</i>	TTAGGCTCAGAAGTGGCGGC
<i>BBE_30738-R</i>	CCCAATGAATCGGTGGTTGC
<i>6OMT_40488-F</i>	GAAATAGACCCAAAAGAAGCAGAG
<i>6OMT_40488-R</i>	GCTCGTTTAGAGTCATCGGTCC
<i>6OMT_42512-F</i>	GAGTCATACAAAATGCATGGTCCA
<i>6OMT_42512-R</i>	ATGGGAATGCTTGTAAGTATGCCT
<i>GAPDH-F</i>	AAGGGTGGTGCTAAGAAGGTTGTAA
<i>GAPDH-R</i>	TCTGTGTGGCAGTGATAGAGTGGA

结果与分析

1 代谢组结果及主成分分析

在大黄藤的根、茎、叶中一共检测到 954 种代谢物, 酚酸类物质数量占比最多, 其次是脂质、其他类, 生物碱位居第 4 位。共有 106 种生物碱, 包含 23 种异喹啉类生物碱 (图 1A)。主成分分析 (PCA) 结果显示代谢物在大黄藤根、茎、叶之间明显分离, 表明在大黄藤的根、茎、叶之间存在显著差异代谢物, 其中第一主成分的贡献率为 40.39%, 第二主成分的贡献率为 23.13%; Mix 质控样本紧密聚集, 且有部分重叠, 表明结果可信且可重复性高 (图 1B)。

2 差异代谢物筛选

通过正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 进行模拟验证后, 结合以变量重要性投影 (VIP ≥ 0.9) 且差异倍数 (FC ≥ 2 或 FC ≤ 0.5) 为条件筛选差异代谢物。在根与叶的对比组有 509 个差异代谢物, 364 个在叶中

上调, 145 个下调, 差异的异喹啉类生物碱有 16 个, 11 个在叶中上调, 5 个下调; 在根与茎的对比组有 381 个差异代谢物, 261 个在茎中上调, 120 个下调, 差异的异喹啉类生物碱有 9 个, 4 个在茎中上调, 5 个下调; 在茎与叶的对比组有 415 个差异代谢物, 275 个在叶中上调, 140 个下调, 差异的异喹啉类生物碱有 9 个, 均在叶中上调 (图 1C、D)。

本研究筛选了大黄藤根、茎、叶两两对比的差异代谢物中分别位于前十的物质。差异代谢物前十结果表明, 叶相较于根, 上调的差异代谢物主要是黄酮, 下调的主要是生物碱; 茎相较于根, 上调的差异代谢物主要是黄酮类, 下调的主要是酚酸类; 叶相较于茎, 上调的差异代谢物主要是生物碱, 下调的主要是黄酮。对于异喹啉类生物碱, 在根与叶的对比组中, 大黄藤的主要功效成分——黄藤素在叶中显著下调, 其在根中的相对含量约为叶中的 47.5 倍 (图 1E); 在茎与叶的对比组中, 原千金藤那布任碱 (prosthephanaberrine) 在叶中显著上调。在不同组织部位中, 化合物含量的差异往往源于基因表达的差异, 黄藤素作为大黄藤中最重要的生物碱, 在大黄藤的根和叶中具有显著差异, 因此可以进一步进行转录组学分析, 挖掘造成此差异的关键基因。

3 差异代谢物 KEGG 富集分析

利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行注释, 并筛选显著富集通路。根与叶的对比组中有 334 种物质被注释到 79 条代谢通路中, 其中差异代谢物 173 种, 富集结果表明这些代谢物主要富集在亚油酸代谢 (linoleic acid metabolism)、 α -亚麻酸代谢 (α -linolenic acid metabolism)、苯丙氨酸代谢 (phenylalanine metabolism) 等能量代谢途径中, 异喹啉类生物碱的生物合成 (isoquinoline alkaloid biosynthesis) 途径也有被富集到。根与茎的对比组中有 332 种物质被注释到 70 条代谢通路中, 其中差异代谢物 95 种, 主要富集到了黄酮和黄酮醇的生物合成 (flavone and flavonol biosynthesis) 和精氨酸的生物合成 (arginine biosynthesis) 途径中; 茎与叶的对比组中有 334 种物质被注释到 77 条代谢通路中, 其中差异代谢物 139 种, 主要富集到了亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢途径中。

大黄藤中最重要的成分——黄藤素在根与叶的对比组具有显著差异, 且在 KEGG 数据库中被注释到了异喹啉类生物碱的生物合成途径。在根与叶的对比组, 此通路上共有 9 个显著差异代谢物, 以根为对照, 在叶中上调的有碎叶紫堇碱 (cheilanthifoline)、金黄紫堇碱 (scoulerine)、四氢巴马汀 (tetrahydropalmatine)、四氢小檗碱 (canadine)、多巴胺 (dopamine) 和木兰花

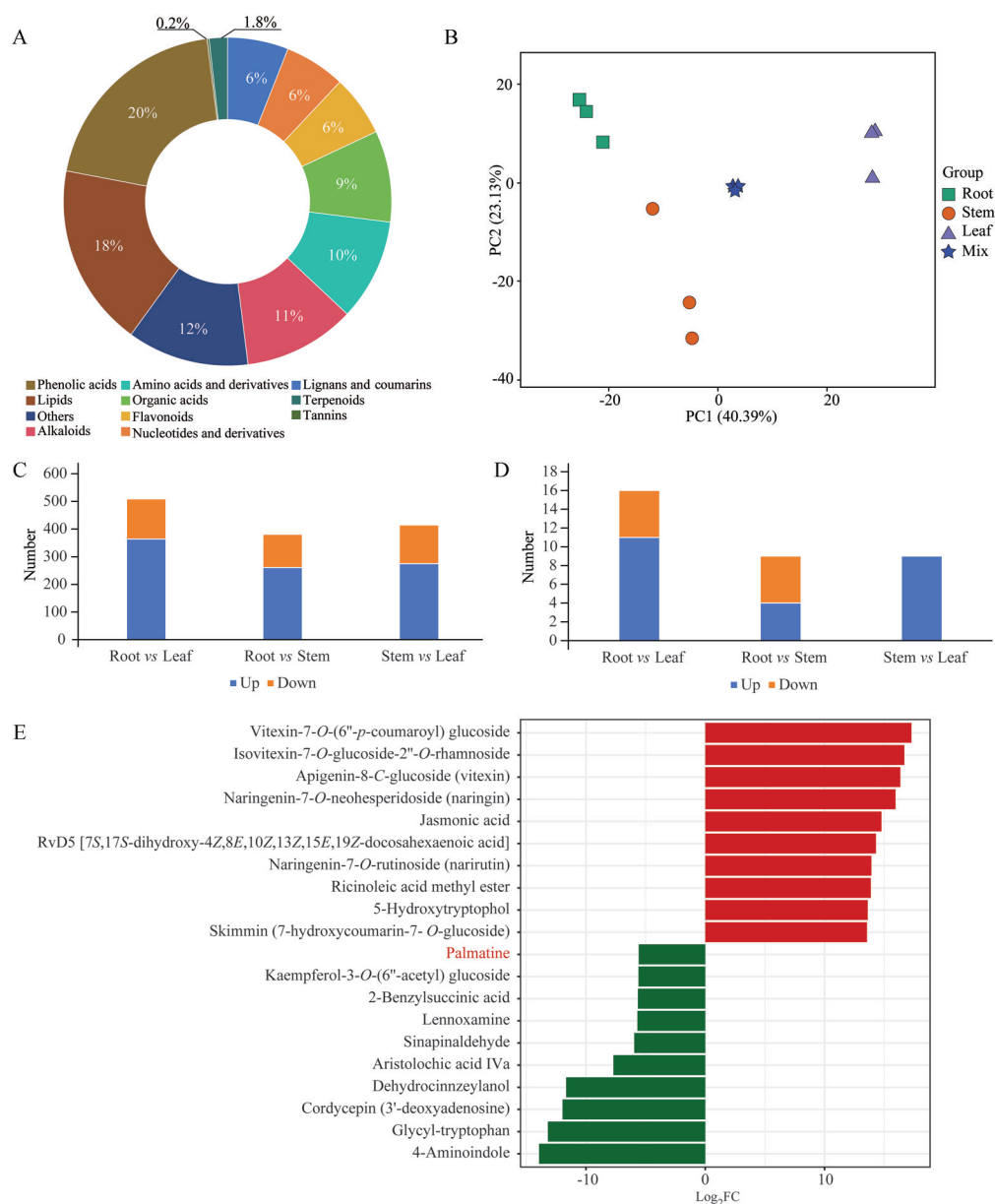


Figure 1 Metabolomics analysis. A: Metabolites composition of overall sample; B: PCA plot of metabolites of overall sample; C: Number of differential metabolites; D: Number of differential isoquinoline alkaloids; E: Differential metabolites of top ten in the group of root vs leaf

碱 (magnoflorine); 在叶中下调的有黄藤素、原儿茶醛 (protocatechualdehyde) 和 *L*-酪氨酸 (*L*-tyrosine)。其中, *L*-酪氨酸、多巴胺、金黄紫堇碱、四氢巴马汀和黄藤素位于黄藤素生物合成途径上。此外, 在根与茎的对比组中, 位于黄藤素生物合成途径上且具有显著差异的还有去甲乌药碱 (norcochlorine)。

4 转录组测序结果及数据统计

经 Pacbio 测序共得到 553 543 条 polymerase reads, 拆分后得到 24 720 823 条 subread, 经自我纠错后得到 800 890 条 CCS 序列, 全长序列 (full-length, FL) 652 771 条, 全长非嵌合序列 (full-length non-concatemer, FLNC) 652 029 条, 具有 polyA 的 FLNC 序列 651 560 条,

经聚类后得到 consensus transcript 序列 50 294 条。所得数据经二代测序数据校正并去冗余后, 得到 33 613 条 isoforms 序列, 数据量大小为 69 523 220 bp, 大部分 isoforms 序列长度大于 1 000 bp, 表明其完整性较高, 可对其进行功能注释。

5 转录组功能注释

去冗余后得到的 33 613 条 isoforms 序列, 在 KEGG、Nr、Swiss-prot、TrEMBL、KOG、GO 和 Pfam 共 7 个公共数据库中分别注释 27 245、32 707、26 932、32 634、22 471、29 973 和 29 661 条, 其中至少在一个数据库中被注释的序列有 32 980 条, 占比 98.12% (图 2A)。

在 KEGG 注释结果中, 27 245 条序列被注释到了

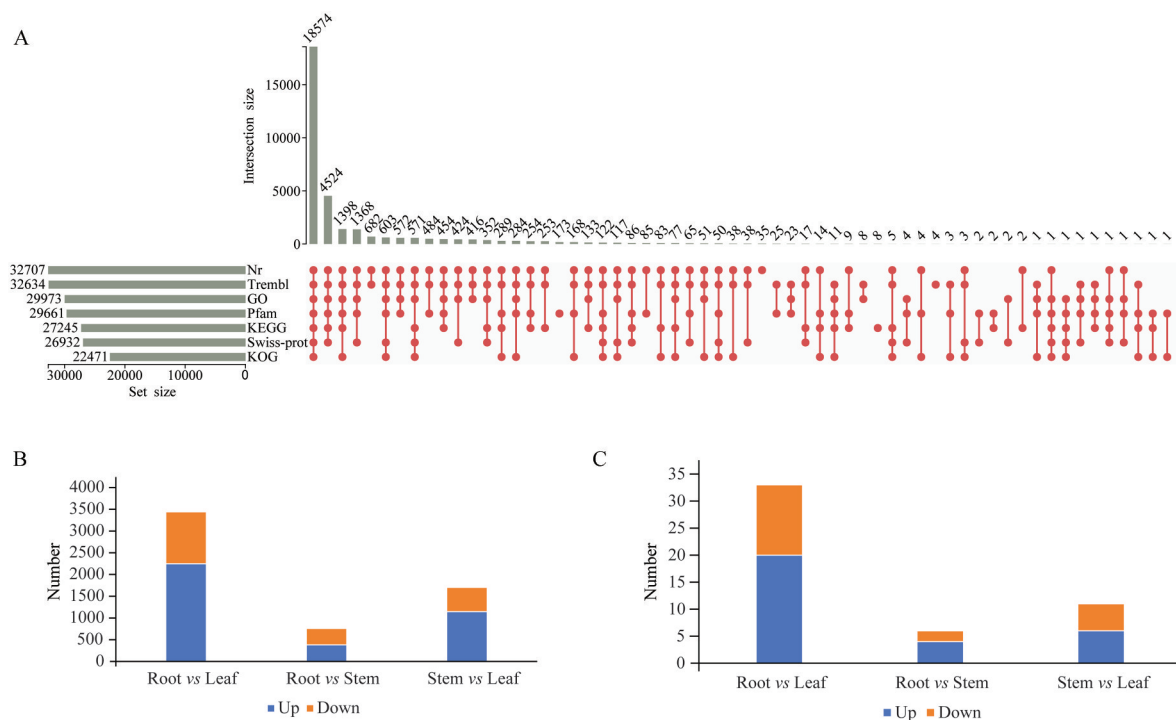


Figure 2 Transcriptomics analysis. A: Upset diagram of gene annotation; B: Number of differentially expressed genes; C: Number of differentially expressed genes on the pathway of isoquinoline alkaloid biosynthesis

146条 pathway, 共188条序列被注释到异喹啉类生物碱的生物合成上。Nr 注释表明罂粟科的博落回 (*Macleaya cordata*) 的转录本与 大黄藤的转录本相似程度最高, 同源序列共 7 626 条, 占比 23.32%; 其次是莲科的莲 (*Nelumbo nucifera*), 4 828 条同源序列占比 14.76%。GO 功能分析显示被注释到的 29 973 条序列在生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 这 3 类均有富集, 在生物过程功能分类上的基因数目最多, 大部分体现在细胞过程 (cellular process)、代谢过程 (metabolic process) 及刺激反应 (response to stimulus)。

6 差异表达基因筛选及富集分析

通过计算 FPKM 衡量基因的表达水平后, 依据 $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ 且错误发现率 $\text{FDR} < 0.05$ 为标准筛选 DEGs。根与叶的对比组中有 3 440 条 DEGs, 其中 2 248 条 DEGs 在叶中上调, 1 192 条 DEGs 在叶中下调; 根与茎的对比组中有 758 条 DEGs, 其中 383 条 DEGs 在茎中上调, 375 条 DEGs 在茎中下调; 茎与叶的对比组中有 1 704 条 DEGs, 其中 1 146 条 DEGs 在叶中上调, 558 条 DEGs 在叶中下调。被注释到异喹啉类生物碱的生物合成途径上的 DEGs 共 36 条, 根与叶的对比组有 33 条 DEGs, 20 条 DEGs 在叶中上调, 13 条 DEGs 在叶中下调; 根与茎的对比组有 6 条 DEGs, 4 条

DEGs 在茎中上调, 2 条 DEGs 在茎中下调; 茎与叶的对比组有 11 条 DEGs, 6 条 DEGs 在叶中上调, 5 条 DEGs 在叶中下调 (图 2B、C)。

利用 KEGG 数据库对 DEGs 进行注释及富集分析的结果表明, 根与叶对照组的 DEGs 主要富集在代谢途径 (metabolic pathways)、次生代谢物的生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites)、淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism) 及异喹啉类生物碱的生物合成等生物合成途径。根与茎对照组的 DEGs 主要富集在角质、栓质和蜡质的生物合成 (cutin, suberine and wax biosynthesis)、苯噁唑类化合物的生物合成 (benzoxazinoid biosynthesis) 及光合作用 (photosynthesis) 等生物合成途径; 茎与叶对照组的 DEGs 主要富集在代谢途径、氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 及次生代谢物的生物合成等生物合成途径。

7 代谢组与转录组联合分析

根据差异代谢物, 以及差异基因的 KEGG 富集分析结果, 找到转录组和代谢组共同富集到的 KEGG pathway, 并绘制气泡图。富集结果表明, 在根与叶的对比组中, 较为显著富集的通路有亚油酸代谢、苯丙氨酸代谢及异喹啉类生物碱的生物合成; 根与茎的对比组中, 较为显著富集的通路有苯丙酮的生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)、次生代谢物的生物合成及 α -亚麻酸代谢; 茎与叶的对比组中, 较为显著富集

的通路有亚油酸代谢和 α -亚麻酸代谢(图3)。

在根与叶的对比组中显著富集的异喹啉类生物碱的生物合成途径上共有33条DEGs(表2)。从KEGG pathway看,有3条可待因3-O-去甲基酶基因(*codeine*

3-O-demethylase, *CODM*)序列不在黄藤素生物合成途径上,其他与黄藤素合成相关的酶基因序列包括4条天冬氨酸转氨酶基因(*aspartate aminotransferase, AspAT*), 2条多酚氧化酶基因(*polyphenol oxidase, PPO*), 3条酪

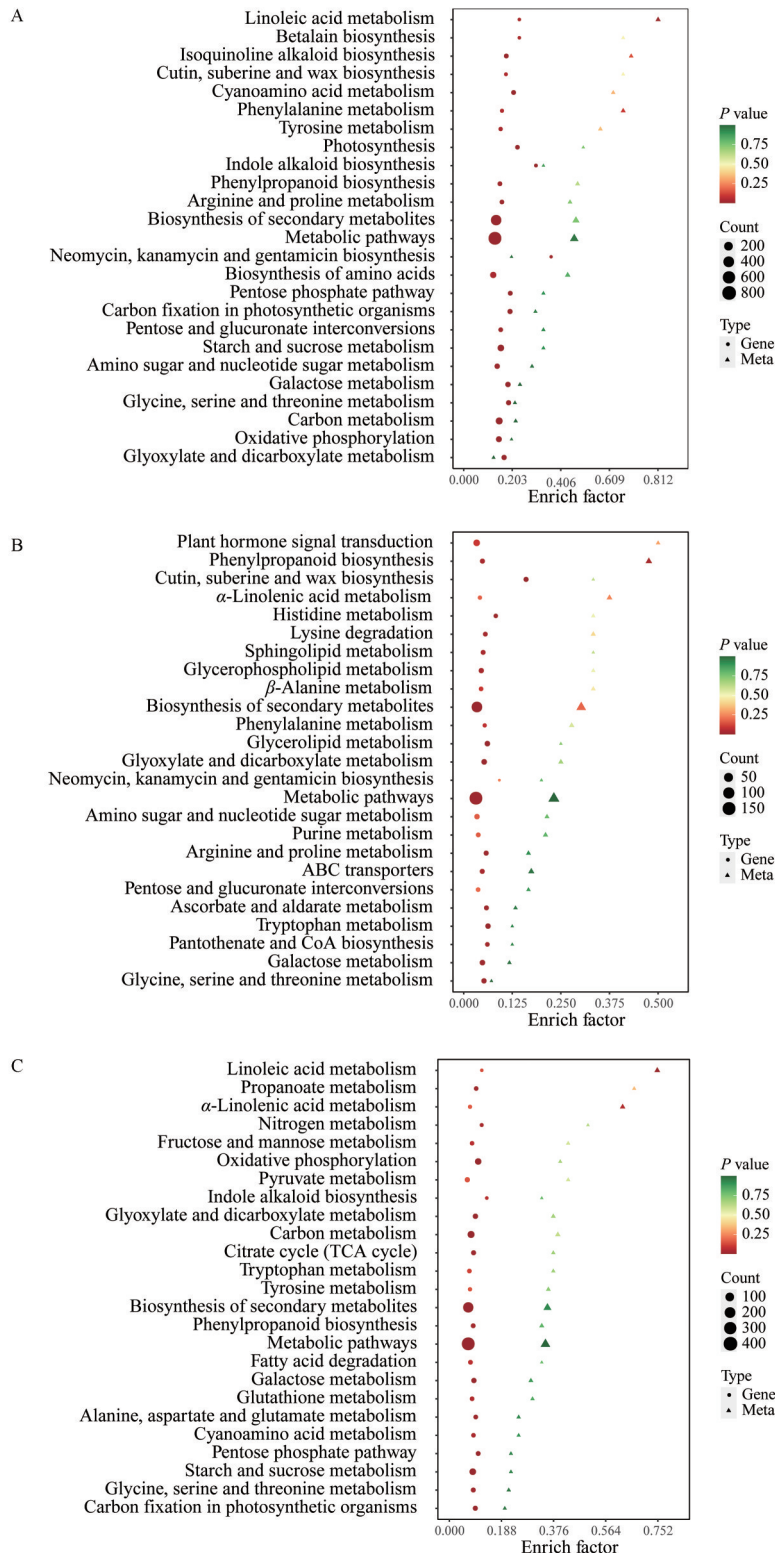


Figure 3 KEGG enrichment analysis of differential metabolites in associated with differentially expressed genes in the root, stem and leaf of *Fibraurea recisa*. A: Root vs leaf; B: Root vs stem; C: Stem vs leaf

氨酸酶基因 (tyrosinase, *TYR*), 3 条色氨酸脱羧酶基因 (*L*-tryptophan decarboxylase, *TDC*), 1 条伯胺氧化酶基因 (primary-amine oxidase, *PrAO*), 8 条 (*S*)-去甲乌药碱合成酶基因 ((*S*)-norcoclaurine synthase, *NCS*), 3 条 (*S*)-去甲乌药碱 6-*O*-甲基转移酶基因 (norcoclaurine-6-*O*-methyltransferase, *6OMT*), 1 条 (*S*)-乌药碱-*N*-甲基转移酶基因 ((*S*)-coclaurine *N*-methyltransferase, *CNMT*), 1 条 3'-羟基-*N*-甲基乌药碱-4'-*O*-甲基转移酶基因 (3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine 4'-*O*-methyltransferase, *4'OMT*), 3 条小檗碱桥酶基因 (berberine bridge enzyme, *BBE*), 以及 1 条四氢原小檗碱氧化酶基因 (tetrahydroprotoberberine oxidase, *STOX*)。

Table 2 Number of significantly differentially expressed genes on the biosynthetic pathway of isoquinoline alkaloids

Gene name	Abbreviation	Number of unigenes annotated
Aspartate aminotransferase	<i>AspAT</i>	4
Polyphenol oxidase	<i>PPO</i>	2
Tyrosinase	<i>TYR</i>	3
<i>L</i> -Tryptophan decarboxylase	<i>TDC</i>	3
Primary-amine oxidase	<i>PrAO</i>	1
(<i>S</i>)-Norcoclaurine synthase	<i>NCS</i>	8
Norcoclaurine-6- <i>O</i> -methyltransferase	<i>6OMT</i>	3
(<i>S</i>)-Coclaurine <i>N</i> -methyltransferase	<i>CNMT</i>	1
3'-Hydroxy- <i>N</i> -methylcoclaurine 4'- <i>O</i> -methyltransferase	<i>4'OMT</i>	1
Berberine bridge enzyme	<i>BBE</i>	3
Tetrahydroprotoberberine oxidase	<i>STOX</i>	1
Codeine 3- <i>O</i> -demethylase	<i>CODM</i>	3

根与叶的代谢组学对比组中, 在黄藤素生物合成途径上显著差异代谢物共 5 个, 包括 *L*-酪氨酸、多巴胺、金黄紫堇碱、四氢巴马汀和黄藤素。将这 5 个差异代谢物的相对定量数据与上述在黄藤素生物合成途径上 30 个 DEGs 的表达定量数据汇总 (图 4A), 再进行相关性网络分析。结果显示共有 10 条 DEGs 的表达模式与 5 个差异代谢物具有显著相关性, DEGs 包括 2 条 *AspAT*, 2 条 *TYR*, 1 条 *PPO*, 3 条 *NCS*, 1 条 *6OMT*, 1 条 *CNMT*。4 条 DEGs 与黄藤素显著相关, 4 条 DEGs 与四氢巴马汀显著相关, 4 条 DEGs 与金黄紫堇碱显著相关, 1 条 DEGs 与多巴胺显著相关, 1 条 DEGs 与 *L*-酪氨酸显著相关 (图 4B)。

8 关键基因 qRT-PCR 验证

qRT-PCR 实验结果显示, 基因 *BBE_27675*、*TDC_35849*、*AspAT_21163* 和 *6OMT_39928* 在叶中表达量高, 基因 *BBE_28224*、*BBE_30738*、*6OMT_40488* 和 *6OMT_42512* 在根中表达量高。上述基因表达趋势均与转录组 FPKM 值结果一致, 说明该转录组学数据基因表达

定量较准确, 筛选出的关键基因可供后续实验使用 (图 5)。

讨论

异喹啉类生物碱的生理活性极强, 一直是国内外研究开发利用的热点, 是寻找有开发应用前景的先导化合物和生物活性成分的源泉。其主要药理作用包括抗炎抗菌、镇痛镇咳、抗心律失常、保护心脑血管、调节免疫作用以及抗癌等, 且不良反应较小^[15]。黄藤素作为一种典型的小檗碱类异喹啉类生物碱, 具有广泛的抗炎、抗菌活性, 近年来又发现其具有抗糖尿病和抗氧化等多种功效, 具有较高的临床应用价值^[7]。黄藤素是大黄藤的主要活性成分, 然而近年来, 大黄藤药用资源逐渐匮乏, 化学合成黄藤素又存在得率较低或黄藤素纯度低, 及对实验设备的要求较高等劣势^[9,16]。中药活性成分是植物长期演化过程中特有基因共同调控的产物, 由系列关键酶通过系列催化反应所合成, 并存在特定生物合成途径。通过发掘药用植物基因资源, 解析其生源途径并在微生物中人工创建代谢途径, 进而利用合成生物学策略生产或改造药用活性成分, 将是一种极具潜力的药用活性成分获取方法^[17]。药用活性成分的积累往往与基因表达相关, 通过比较组学分析, 筛选具有显著差异表达的基因, 能有效缩小候选基因范围, 并获得可能对药用活性成分合成具有较强调控作用的候选基因^[18]。

黄藤素属于小檗碱类异喹啉类生物碱, 其生物合成途径与小檗碱的生物合成途径前半段一致。据文献^[19]记载, 二者的生物合成皆始于 *L*-酪氨酸, 经过酪氨酸转氨酶 (*TyrAT*) 催化生成 4-羟基苯丙酮酸 (4-hydroxyphenylpyruvate), 又经由 4-羟基苯丙酮酸脱羧酶 (4HPPDC) 催化生成 4-羟基苯乙醛 (4-hydroxyphenylacetaldehyde), 另一边 *L*-酪氨酸经酪氨酸脱羧酶 (*TYDC*) 生成酪氨 (tyramine), 后经多酚氧化酶 (*PPO*) 催化为多巴胺。多巴胺作为异喹啉部分的前体, 而 4-羟基苯乙醛作为苯基组成, 二者在 (*S*)-去甲乌药碱合成酶 (*NCS*) 的催化下缩合形成 (*S*)-去甲乌药碱 [(*S*)-norcoclaurine]^[20]。(*S*)-去甲乌药碱经过 (*S*)-去甲乌药碱 6-*O*-甲基转移酶 (*6OMT*) 可催化为 (*S*)-乌药碱 [(*S*)-coclaurine], 在 (*S*)-乌药碱-*N*-甲基转移酶 (*CNMT*) 催化下可进一步生成 (*S*)-*N*-甲基乌药碱 [(*S*)-*N*-methylcoclaurine], (*S*)-*N*-甲基乌药碱经 (*S*)-*N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶 (*CYP80B1*) 催化成 (*S*)-3'-羟基-*N*-甲基乌药碱 [(*S*)-3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine], 接着经 3'-羟基-*N*-甲基乌药碱-4'-*O*-甲基转移酶 (*4'OMT*) 形成 (*S*)-牛心果碱 [(*S*)-reticuline]。(*S*)-牛心果碱是包括吗啡、血根

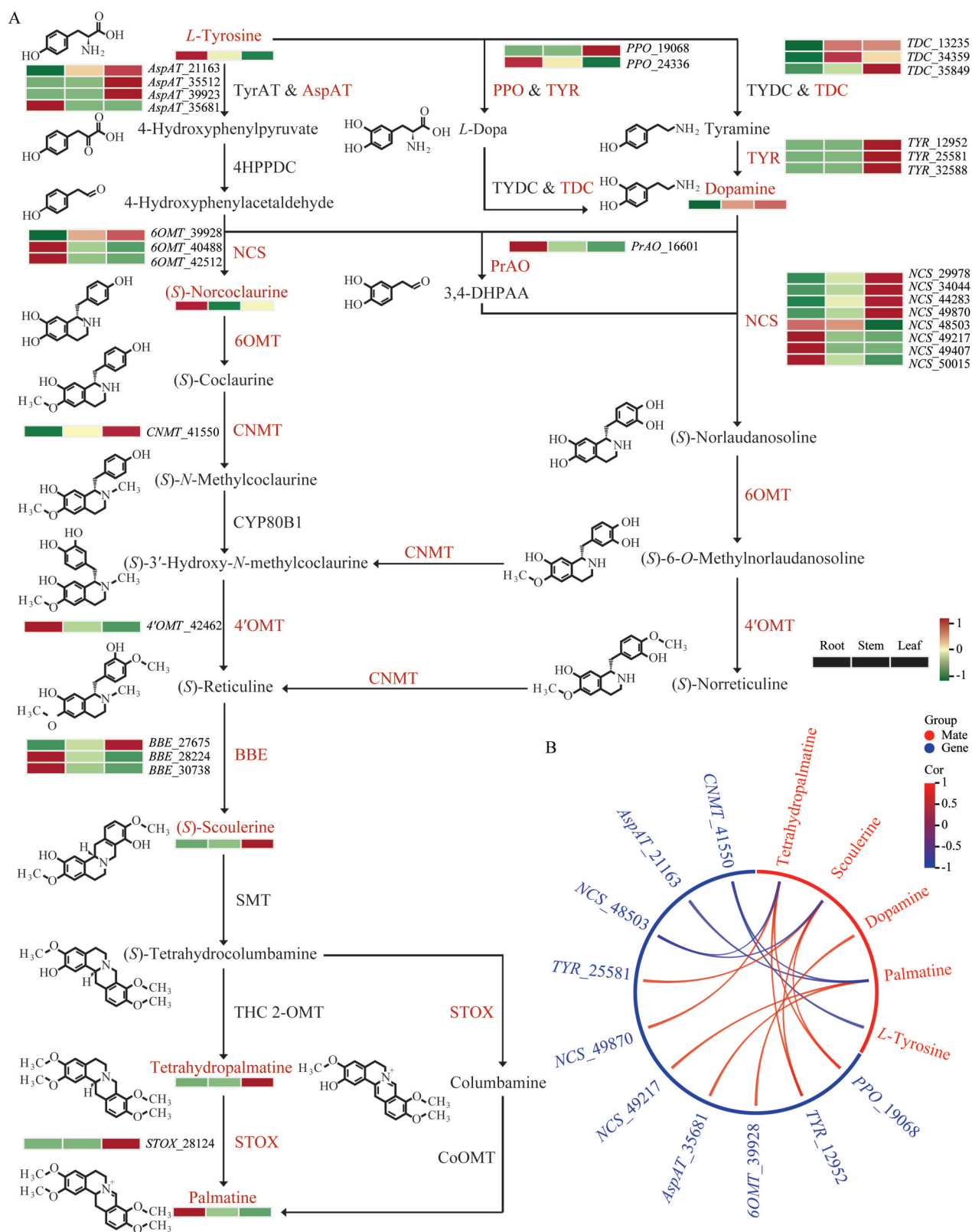


Figure 4 Biosynthesis pathway of palmatine. A: Quantitative data on differential metabolites and differentially expressed genes (DEGs). TyrAT: Tyrosine aminotransferase; TYDC: Tyrosine decarboxylase; 4HPPDC: 4-Hydroxyphenylpyruvate decarboxylase; CYP80B1: *N*-Methylcoclaurine 3'-monooxygenase; SMT: (*S*)-Scoulerine 9-*O*-methyltransferase; The2OMT: Tetrahydrocolumbamine 2-*O*-methyltransferase; CoOMT: Columbamine *O*-methyltransferase; B: Correlation network diagram of differential metabolites and DEGs. The red line indicates a positive correlation and the blue line indicates a negative correlation

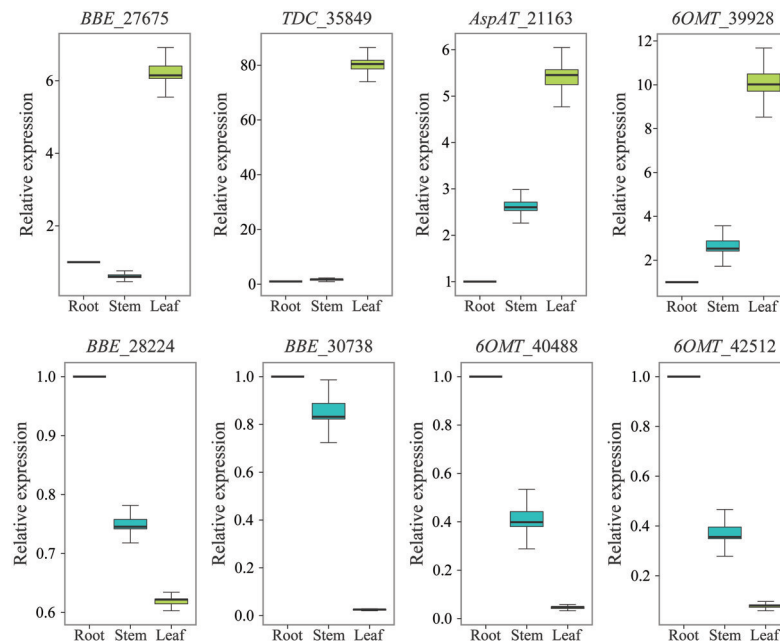


Figure 5 The results of qRT-PCR

碱、小檗碱等多种重要异喹啉类生物碱的关键中间产物^[21]。(S)-牛心果碱经小檗碱桥酶 (BBE) 催化为金黄紫堇碱 [(S)-scoulerine], 接着经 (S)-金黄紫堇碱-9-O-甲基转移酶 (SMT) 催化为 (S)-四氢非洲防己碱 [(S)-tetrahydrocolumbamine]^[21]。(S)-四氢非洲防己碱可由两条路径合成黄藤素, 一条为经过四氢非洲防己碱 2-O-甲基转移酶 (Thc2OMT) 催化生成四氢巴马汀, 再经过四氢小檗碱氧化酶 (STOX) 催化生成黄藤素; 另一条途径为 (S)-四氢非洲防己碱先由四氢小檗碱氧化酶 (STOX) 催化为非洲防己碱 (columbamine), 再由非洲防己碱 O-甲基转移酶 (CoOMT) 催化为黄藤素^[22]。(S)-去甲乌药碱合成酶 (NCS)、(S)-去甲乌药碱 6-O-甲基转移酶 (6OMT) 及小檗碱桥酶 (BBE) 被认为是异喹啉类生物碱合成途径上的限速酶^[23,24]。(S)-牛心果碱是多种重要异喹啉类生物碱合成途径上的关键中间体, (S)-牛心果碱通过异构、偶联、重排、甲基化、去甲基化等反应, 几乎可以形成所有骨架类型的异喹啉类生物碱^[25]。因此, 与 (S)-牛心果碱合成直接相关的 4'OMT 也极为重要。综上, 编码 NCS、6OMT、BBE 和 4'OMT 的基因均是大黄藤中黄藤素生物合成途径上的重要基因。

除此之外, AspAT、TYR、TDC 及 PrAO 在 KEGG pathway 中也位于黄藤素生物合成途径上。AspAT 是 TyrAT 的同工酶, 能将 L-酪氨酸催化为 4-羟基苯丙酮酸; TYR 是 PPO 的同工酶, TDC 是 TYDC 的同工酶, 在 TYR 和 TDC 的作用下, 能将 L-酪氨酸催化为多巴胺。PrAO 则能将多巴胺催化为 3,4-二羟基苯乙醛 (3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde), 3,4-二羟基苯乙醛又能

与多巴胺缩合形成 (S)-四氢维洛林 [(S)-norlaudanosoline], 经系列催化反应后生成关键中间体——(S)-牛心果碱, 是合成 (S)-牛心果碱的另一条途径。通过此途径, 多巴胺可经系列催化反应直接合成 (S)-牛心果碱, 而不必依赖于同 4-羟基苯乙醛结合后再合成 (S)-牛心果碱。由于以往对于异喹啉类生物碱生物合成途径的描述较少提及 AspAT、TYR、TDC、PrAO 等酶, 而本研究发现编码这些酶的基因是黄藤素合成途径上的显著差异表达基因, 因此, 它们应对黄藤素的合成具有一定的调控作用, 有进一步研究的价值。

本研究结果显示, 异喹啉类生物碱合成的源头—L-酪氨酸在根中含量最高, 其次为茎, 叶中含量最低。而后, 去甲乌药碱是异喹啉类生物碱合成途径上的第一个中间体化合物^[24], 其合成对下游生物碱的含量具有一定影响, 去甲乌药碱在根相比于茎中体现显著差异, 而在根相比于叶中差异较小。合成去甲乌药碱的 NCS 基因在根和叶中都有高表达, 可以推断根和叶可同时合成去甲乌药碱。此外, 合成多巴胺的 DEGs 主要在叶中高表达, 同时多巴胺也主要在叶中特异性积累, 多巴胺作为合成去甲乌药碱的底物, 其在根中含量较低, 可能会成为根中去甲乌药碱合成的限制因素。合成去甲乌药碱后经过系列催化反应生成的金黄紫堇碱在叶中特异性积累, 继而进入了小檗碱类和原小檗碱类异喹啉类生物碱的合成过程 (图 4A)。大黄藤中的原小檗碱类异喹啉类生物碱, 包括四氢巴马汀、四氢小檗碱均在叶中特异性积累, 而属于小檗碱类异喹啉类生物碱的黄藤素和药根碱则均在根中特异性积累,

造成这两类异喹啉类生物碱在不同组织部位特异性积累的具体机制还将有待进一步研究。

本研究运用多组学联合的方法,初步分析了大黄藤主要功效成分—黄藤素的生物合成途径,挖掘到了黄藤素生物合成途径中的关键酶,为黄藤素合成的工程菌株构建提供了可选择的生物元件。由于黄藤素是典型的小檗碱类异喹啉类生物碱,其上游合成途径为所有异喹啉类生物碱共有,且黄藤素的化学结构与小檗碱、药根碱、四氢巴马汀等异喹啉类生物碱的化学结构极为相似,对黄藤素生物合成途径上关键酶的解析,也为其他异喹啉类生物碱的合成生物学研究提供了参考。

作者贡献: 周兴乾负责样本采集、实验操作、文章撰写和图片绘制; 耿应敏协助样本采集及论文格式修改; 张体操对论文内容给予了指导和修改; 郑兰平负责论文设计、样本采集、指导论文写作并对论文最终审核。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Qi YF, Gao L, Fu DH, et al. Review of *Fibraurea recisa* [J]. Yunnan J Tradit Chin Med (云南中医中药杂志), 2005, 26: 56-57.
- [2] Lv N, Zhao YW, Ji LW, et al. Review of *Fibraurea recisa* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 199-202.
- [3] Zhu ZY, Zhao Y, Wei QH. The Annals of National Medicine in Yunnan, Vol 4 (云南民族药志第四卷) [M]. Kunming: The Nationalities Publishing House of Yunnan, 2012: 53-54.
- [4] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol I (中华人民共和国药典一部) [S]. Beijing: Chinese Medical Science Press, 1977: 545.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol I (中华人民共和国药典一部) [S]. Beijing: Chinese Medical Science Press, 2020: 320, 1601.
- [6] Liu RM, Zhao SX, Zhu RH. A note on the identification of fibralactone from the root of *Fibrauria recisa* Pierre [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1981, 16: 479-480.
- [7] Zhao W, Lu RB, Liu W, et al. Research progress on fibriuretinin [J]. China Anim Husb Veter Med (中国畜牧兽医), 2014, 41: 267-271.
- [8] Yang T, Jin H, Zhang JY, et al. Standardized cultivation techniques of *Fibrauria recisa* [J]. Yunnan Agric Sci Technol (云南农业科技), 2012, (1): 33-35.
- [9] Yuan MW, Li ZH, Chen YK, et al. Synthetic process optimization of palmatine hydrochloride [J]. J Yunnan Univ Natlities (云南民族大学学报), 2017, 26: 451-454.
- [10] Huang LQ, Gao W, Zhou YJ. Application of synthetic biology to sustainable utilization of Chinese material medica resources [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 37-43.
- [11] Chen W, Gong L, Guo Z, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics [J]. Mol Plant, 2013, 6: 1769-1780.
- [12] Dai J, Liu BW, Liu XF, et al. Efficacy research of stems and leaves of *Fritillaria cirrhosa* based on similarity of chemical components [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 4942-4953.
- [13] Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. Bioinformatics, 2006, 22: 1658-1659.
- [14] Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. Nat Methods, 2015, 12: 59-60.
- [15] Deng J, Gao YY. Recent developments in isoquinoline alkaloids isolation and analysis [J]. Chem Ind Times (化工时刊), 2010, 24: 45-50.
- [16] Zhao H, Liu D, Zhu J, et al. Synthesis method of palmatine [J]. J Shenyang Univ Chem Technol (沈阳化工大学学报), 2017, 31: 143-146.
- [17] Tong YR, Zhang YF, Shen SY, et al. "Synthetic biology" innovation of active natural products of traditional Chinese medicine and new drug discovery—Professor Gao Wei [J]. J Capit Med Univ (首都医科大学学报), 2020, 41: 783-787.
- [18] Ma Y, Zhao YJ, Ma XJ, et al. Biosynthetic pathway of active components in traditional Chinese medicine and its application [J]. Sci Sin Vitae (中国科学: 生命科学), 2022, 52: 894-907.
- [19] Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, et al. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98: 369.
- [20] Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 735.
- [21] Zhang Y, Zhang J, Ge HX. Progress in the biosynthetic pathway of benzyloquinoline alkaloids in *Coptis chinensis* and the application of synthetic biology [J]. Pharm Biotechnol (药物生物技术), 2019, 26: 165-171.
- [22] Wang AQ, Yuan QJ, Guo N, et al. Research progress on medicinal resources of *Coptis* and its isoquinoline alkaloids [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 3504-3513.
- [23] Wang L, Shi LL, Zhang YX, et al. Biosynthesis and regulation of the secondary metabolites in plants [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 2007, 25: 500-508.
- [24] Li QS. Screening of Candidate Functional Genes for the Biosynthetic Pathway of Tetrandrine and Functional Study of Norco-claurine-6-O-Methyltransferase (粉防己碱生物合成途径候选功能基因筛选及去甲乌药碱-6-O-甲基转移酶的功能研究) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.
- [25] Lin Z, Hu ZW, Qu XD, et al. Advances and challenges in microbial production of benzyloquinoline alkaloids [J]. Synth Biol J (合成生物学), 2021, 2: 716-733.