

·化学合成·

本文引用:陈林,崔培梧,鲁耀邦,廖彦,张志丽,张书航,黄绍国,易刚强.茉莉酸甲酯对茯苓三萜生物合成的调控研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(6):606-610.

茉莉酸甲酯对茯苓三萜生物合成的调控研究

陈林^{1,2},崔培梧^{1,2},鲁耀邦^{1,2},廖彦^{1,2},张志丽^{1,2},张书航^{1,2},黄绍国^{1,2},易刚强^{1,2*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙 412008;2.湖南中医药大学中药药性与药效实验室,湖南长沙 410208)

〔摘要〕目的 探索茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)对茯苓三萜生物合成的调控效应及其机制。方法 从MeJA添加量、添加时间角度考察MeJA对茯苓三萜生物合成的调控效应,确定最佳调控策略,在此基础上采用荧光定量PCR(Real time PCR, RT-PCR)技术分析MeJA对茯苓甲羟戊酸途径法尼基焦磷酸合成酶基因(*fps*)和鲨烯合酶基因(*sqs*)基因表达水平的影响,揭示其调控机制。结果 MeJA可显著促进茯苓三萜的生物合成,最佳添加策略为发酵4 d添加150 μmol/L的MeJA,此时茯苓三萜得率可达20.95 mg/L,为空白组的1.55倍、吐温-80组的1.32倍;RT-PCR结果显示MeJA可使*fps*、*sqs*基因表达水平显著上调,分别为吐温-80对照组的1.17倍、788.70倍。结论 MeJA通过显著上调*sqs*基因表达实现茯苓三萜生物合成的过程强化,为一种有效的促进茯苓三萜合成的外源调控因子。

〔关键词〕茯苓;三萜;生物合成;发酵调控;茉莉酸甲酯

〔中图分类号〕R284.4

〔文献标识码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.06.007

Study on Regulation of Triterpenoids Biosynthesis in *Wolfiporia cocos* Submerged Fermentation System by Methyl Jasmonate

CHEN Lin^{1,2}, CUI Peiwu^{1,2}, LU Yaobang^{1,2}, LIAO Yan^{1,2}, ZHANG Zhili^{1,2}, ZHANG Shuhang^{1,2},
HUANG Shaoguo^{1,2}, YI Gangqiang^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. TCM Potency & Efficacy Laboratory, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the regulation effects and its molecular mechanism of methyl jasmonate (MeJA) on triterpenoid biosynthesis in submerged fermentation system of *WolfiPoria cocos*. Methods The effects of addition amount and feeding time of MeJA on *Poria cocos* triterpenoid biosynthesis were discussed, respectively. Besides, to illustrate regulation mechanism of MeJA, real time PCR (RT-PCR) was employed to analysis the expression level of *fps* and *sqs* in mevalonate (MVA) pathway of *WolfiPoria cocos*. Results The optimal regulation strategy was adding 150 μmol/L MeJA on 4th day. Under this condition, the maximum content can reach up to 20.95 mg/L, which was 1.55 times of blank group, 1.32 times of Tween-80 group. RT-PCR results showed that *fps* and *sqs* gene expression level both increased significantly, which were 1.17 times, 788.70 times of that in Tween-80 group, respectively. Conclusion MeJA, as an effective exogenous regulatory factor for increasing triterpenoid biosynthesis level of *WolfiPoria cocos*, could efficiently improve triterpenoid biosynthesis level in *WolfiPoria cocos* submerged fermentation system.

〔Keywords〕 *WolfiPoria cocos*; triterpenoids; biosynthesis; regulation of fermentation; methyl jasmonate

〔收稿日期〕2016-12-29

〔基金项目〕湖南省发改委科研计划(湘发改高技[2014]1199号);湖南省中医药科研计划重点项目(201621);湖南省教育厅科研计划(16C1219);湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(ZYFT201404);湖南中医药大学研究性学习和创新性实验计划(201616);湖湘中药资源保护与利用协同创新中心开放基金(00175-12);湖南中医药大学生物工程重点学科共同资助。

〔作者简介〕陈林,女,在读硕士研究生,研究方向为药用菌物次级代谢产物的合成及其过程调控。

〔通讯作者〕*易刚强,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail: ygg8228@163.com。

茯苓 [*Wolfiporia cocos* (Schwein.) Ryvarden & Gilb. (Basidiomycota, Polyporaceae)] 俗称茯菟, 其性甘味平, 入心、肺、脾、肾经, 具有渗湿利水、健脾和胃、宁心安神、强精益髓之功效, 为我国名贵大品种菌类中药, 始载于《五十二病方》, 在《神农本草经》被列为上品^[1-4]。目前超过 80% 的中药方剂都配伍了茯苓, 如四君子汤、茯苓半夏汤、茯苓补心汤、天王补心丹、五苓散等^[5]; 此外以茯苓为原料配伍的中成药也有 300 多种^[6], 这使得市场对茯苓资源的需求日益扩大。

研究表明三萜为茯苓的主要活性成分之一, 具有抗癌、抗炎、降糖等多种活性^[7-9], 且发酵菌丝体中茯苓三萜含量明显优于茯苓菌核^[10], 这进一步证实了采用发酵法生产茯苓活性成分的可行性。在真菌中, 三萜类化合物主要由甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA) 合成^[11], 而茉莉酸甲酯 (methyl Jasmonate, MeJA) 作为良好的次级代谢调节因子, 可通过上调 MVA 途径 *hmgS*、*hmgR*、*mvd*、*fps*、*sqs* 等关键酶基因表达水平而实现灵芝酸的强化合成^[12], 因此, 拟探索 MeJA 对液态发酵体系茯苓三萜生物合成的过程调控效应。实验将从 MeJA 浓度、添加时间方面系统考察 MeJA 对茯苓三萜生物合成的影响, 并采用荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 技术分析 MeJA 干预对茯苓 MVA 途径关键酶基因 *sqs* (编码鲨烯合酶)、*fps* (编码法尼基焦磷酸酶) 的表达影响, 进而揭示 MeJA 对茯苓三萜合成过程的调控机制。

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂与仪器

Poria cocos 5.0078, 购于中国科学院微生物研究所菌种保藏中心, 现保藏于湖南中医药大学中药药性与药效实验室。

熊果酸 (批号: 110742-201220, 质量分数 $\geq 98\%$, 中国食品药品检定研究院); RNA 反转录试剂盒 (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad Laboratories); Real-time PCR 扩增试剂盒 (iTaQ™ Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad Laboratories); Trizol (15596026, Invitrogen); 茉莉酸甲酯 (392707, 质量分数 $\geq 95\%$, Sigma); 其余试剂如葡萄糖、蛋白胨、酵母浸膏、硫酸镁、磷酸二氢钾等均为国产分析纯。

生化培养箱 (ZSD-1270, 上海智诚分析仪器制造有限公司); 紫外-可见分光光度计 (UV-1800, 日本岛津公司); 高速冷冻离心机 (GL-26M, 长沙平凡仪器仪表有限公司); PCR 仪 (Mastercycler gradient, Eppendorf); 核酸蛋白分析仪 (BioPhotometer, Eppendorf); 荧光定量 PCR 仪 (CFX96 Real-time system, Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 取保藏的茯苓菌种, 转接至马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 平板上, 在 28 °C 下培养 10 d, 然后转接至不含琼脂的马铃薯葡萄糖培养基中, 装液量为 100 mL/250 mL, 于 28 °C、180 r/min 振荡培养 7 d, 作为二级菌种。

1.2.2 基础发酵培养 基础发酵培养基为葡萄糖 (2%)、蛋白胨 (0.5%)、酵母浸膏 (0.4%)、 KH_2PO_4 (0.1%)、 MgSO_4 (0.05%)、初始 pH 5.5。培养条件: 250 mL 三角瓶装液量 90 mL, 接种 10 mL 二级种子, 于 28 °C、180 r/min 振荡培养 19 d, 培养结束后测定生物量和茯苓三萜含量。

1.2.3 MeJA 对茯苓三萜合成过程的干预 以基础发酵培养基组为空白对照, 以添加 0.2 mL/L 吐温-80 的基础培养基组为助溶剂对照, 考察 MeJA 不同浓度 (100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$) 和不同添加时间 (0、2、4、6、8 d) 对茯苓菌生长和茯苓三萜合成的影响, 进而确定最佳的 MeJA 调控工艺。

1.2.4 相关分析方法 生物量 (DCW) 测定: 取 20 mL 发酵液, 用干燥至恒重的滤纸抽滤, 菌体经蒸馏水洗涤抽滤 3 次后, 于 60 °C 烘箱干燥至恒重, 称量后计算菌体干重。

茯苓三萜 (PA) 含量测定: 取 0.1 g 于 60 °C 烘箱干燥至恒重并研磨均匀的茯苓菌丝体粉末, 加入 6 mL 异丙醇静置提取 24 h, 于 8 000 $\times g$ 离心 10 min, 所得上清液即为茯苓三萜。以熊果酸为标准品, 采用香草醛-高氯酸显色法^[10]测定茯苓菌丝体中茯苓三萜的含量。

茯苓三萜生物合成途径关键酶基因表达水平的分析: 以单因素筛选出的 MeJA 最佳添加条件进行培养, 并以吐温-80 组为空白对照, 滤纸过滤收集发酵菌丝体, DEPC 水冲洗数次后取 100 mg 进行液氮研磨, 参照 Trizol 试剂说明书提取茯苓菌总 RNA, 然后采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测样品完整性, 并采

用核酸蛋白分析其纯度和浓度。以所得 RNA 为模板,逆转录成 cDNA,用于茯苓三萜生物合成途径关键酶基因 *sqs* 和 *fps* 的实时定量 PCR。逆转录体系: 5 μ iScript reaction mix 4 μ L,iScript 逆转录酶 1 μ L、模板 RNA 2 μ L、Rnase-free ddH₂O 13 μ L; 逆转录反应条件:25 $^{\circ}$ C 5 min,42 $^{\circ}$ C 30 min,85 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。RT-PCR 反应体系:2 \times i-TaqTM Universal SYBR[®] Green Supermix 5 μ L、上下游引物各 1 μ L (见表1)、模板 1 μ L、Rnase-free ddH₂O 2 μ L。RT-PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,59 $^{\circ}$ C 20 s,39 个循环。实验设置 3 个生物学重复。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法^[13]进行相对定量分析,其中 $\Delta\Delta$ Ct=[(Ct_{gene}- Ct_{18s})_{实验组}-(Ct_{gene}- Ct_{18s})_{对照组}]。

2 结果与分析

2.1 MeJA 添加量对茯苓菌细胞生长和三萜生物合成的影响

MeJA 是茉莉属 (*Jasminum*) 中素馨花中香精油的重要组成成分,水溶性很差,因此若将其用于水相培养基必须加入助溶剂。本研究选取吐温-80 作为 MeJA 的助溶剂,在发酵 0 d 分别考察了 100、150、200、250、300 μ mol/L MeJA 对茯苓菌细胞生长和茯苓三萜合成的影响,结果如图 1 所示。与空白组相比,助溶剂对照组(按 2 mL/L 比例添加吐温-80)的生物量显著提高,但对胞内三萜合成的增强效应不明显,推测应该为吐温-80 强化茯苓菌液态发酵体系溶氧传递效率所致^[14];MeJA 调控组细胞生长量增幅不再明显,但茯苓三萜浓度显著提高,在 150 μ mol/L MeJA 调控条件下可获得最大胞内三萜得率,为 20.77 mg/L,是空白组的 2.18 倍、吐温-80 组的 1.80 倍;300 μ mol/L MeJA 调控条件下生物量虽然可达最大值 3.67 g/L,但茯苓三萜得率较低。因此,150 μ mol/L MeJA 为最佳的调节浓度。

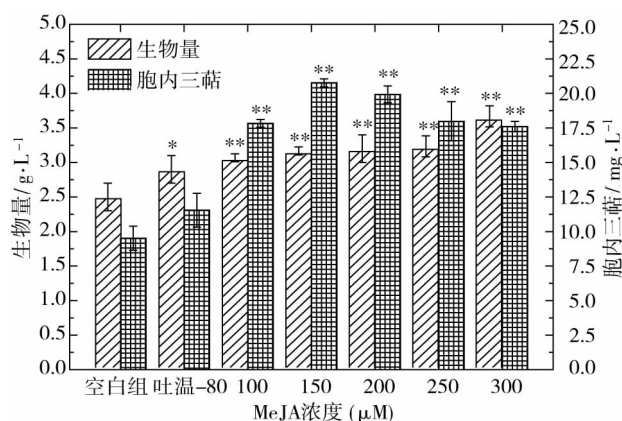
2.2 MeJA 添加时间对茯苓菌细胞生长和三萜生物合成的影响

三萜为茯苓菌的次级代谢产物,与茯苓菌细胞生长阶段和生长环境都有很大关系,因此外源调控因子的添加时间也是影响其调控效应的重要因素。本研究分别考察了在发酵 0、2、4、6、8 d 添加 150 μ mol/L MeJA 对茯苓三萜合成的调控效应,结果显示(图 2)在发酵 4 d 添加 MeJA 对茯苓三萜合

表 1 用于 RT-PCR 分析的相关引物

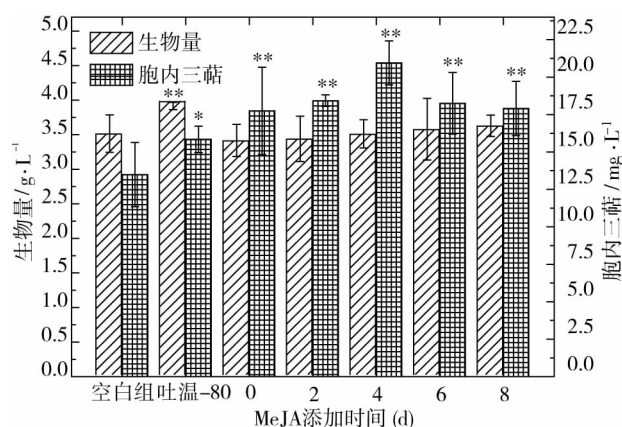
引物名称	引物序列(5'-3')
<i>18s</i> -F	GCCGTTCTTAGTTCGTGGAT
<i>18s</i> -R	CGCTGGCTCTGTCACTGTAG
<i>sqs</i> -F	GATGTTGTCCGATAGATGGG
<i>sqs</i> -R	AGGAAAAGGCTTGAAGGAAC
<i>fps</i> -F	GCCGTTCTTAGTTCGTGGAT
<i>fps</i> -R	TCGCTGGCTCTGTCACTGTAG

成的诱导效应最好,可达 20.95 mg/L,分别是空白组的 1.55 倍、吐温-80 组的 1.32 倍;而此时的茯苓菌丝生物量却低于吐温-80 调控组,进一步说明茯苓三萜的合成与茯苓菌丝生长对营养条件及环境需求存在差异。



注:与空白组相对应指标比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 MeJA 添加量对茯苓菌菌体生长和三萜合成的影响



注:与空白组相对应指标比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 MeJA 添加时间对茯苓菌菌体生长和三萜合成的影响

2.3 MeJA 对茯苓菌 MVA 途径关键酶基因表达水平的影响

研究表明,茯苓三萜由 MVA 途径合成^[11],MVA 途径中法尼基焦磷酸合成酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPS) 催化异戊烯基焦磷酸和二甲基丙烯

焦磷酸合成法尼基焦磷酸,接着在鲨烯合酶(squalene synthase, SQS)的催化下合成鲨烯,进而转化为茯苓三萜。由上述实验结果可知在发酵4 d添加150 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 可获得最大的茯苓三萜积累水平,因此,为探索 MeJA 的调控机制,采用 RT-PCR 技术分析了 MeJA 调控组和吐温-80 组茯苓菌 MVA 途径关键酶 *fps* 和 *sqs* 的表达水平差异。提取的 RNA 质量及纯度、浓度分析分别见图 3、表 2。电泳图显示 5、18、28S RNA 的条带均非常清晰,且无弥散现象,同时 28S RNA 片段亮度是 18S RNA 片段的 2 倍,说明 RNA 完整性良好;RNA 质量分析显示 OD260/OD280 在 1.8 左右,意味着 RNA 纯度良好,符合 RT-PCR 的要求,因此可以以此 RNA 为模板进行 RT-PCR 分析。RT-PCR 分析结果如图 4 所示,MeJA 组的 *fps*、*sqs* 表达水平分别是吐温-80 组的 1.17 倍及 788.70 倍,意味着 *sqs* 在茯苓三萜生物合成途径中发挥着非常关键的调控作用,因此可被认为茯苓三萜生物合成途径的关键调控节点。

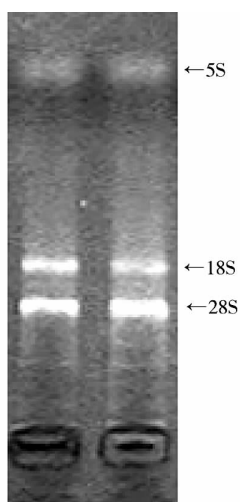


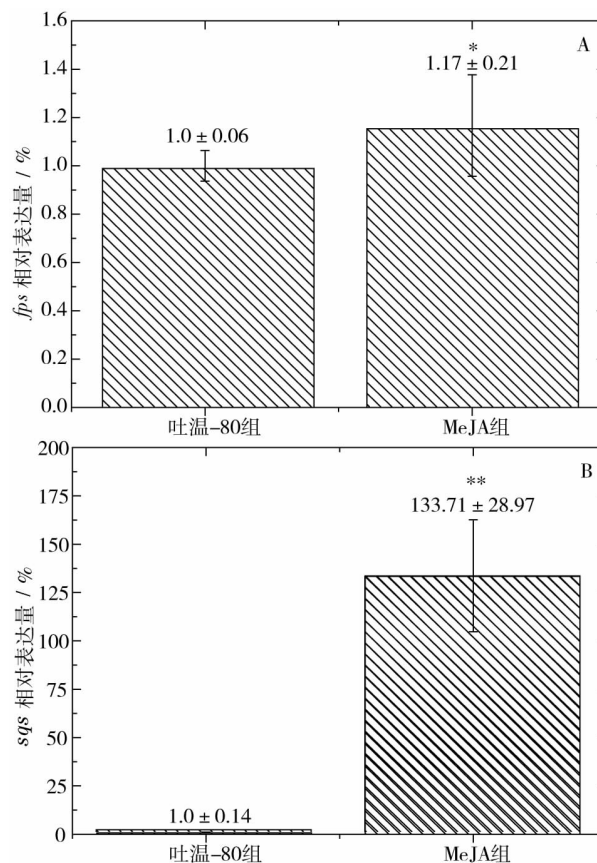
图 3 茯苓菌丝体 RNA 电泳图

表 2 茯苓菌丝体 RNA 的质量分析

样品	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
吐温-80 组 RNA	1.74	7.3
MeJA 组 RNA	1.85	29.7

3 结论

MeJA 被认为调控次级代谢产物合成的重要外源调控因子,已被成功应用于灵芝^[12]、白木香^[15]、软紫草^[16]等多种植物、真菌次级代谢产物的强化合成研究,但在茯苓三萜生物合成的过程强化领域的应



注:与空白组相对应指标比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 MeJA 对茯苓菌 *fps* (A)、*sqs* (B) 表达水平的影响

用还鲜见报道。本研究从 MeJA 添加量、添加时间角度考察了其对茯苓三萜生物合成的调控效应,结果显示在茯苓菌发酵 4 d 添加 150 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 可使得茯苓三萜的积累水平达到 20.95 mg/L,为空白组的 1.55 倍、吐温-80 组的 1.32 倍,取得了较好的调控效果。为揭示该调控机制,采用 RT-PCR 技术分析了 MeJA 调控条件下茯苓 MVA 途径关键酶 *fps* 和 *sqs* 的表达水平,显示 MeJA 可显著提高 *sqs* 表达水平,为吐温-80 组的 788.70 倍,意味着鲨烯合酶基因的表达水平在茯苓三萜生物合成途径发挥着关键调控作用,因此可作为后续理性调控的关键节点。这些结果将为实现茯苓三萜合成的理性强化提供必要基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2015:241-242.
- [2] 张建逵,窦德强,王冰,等.茯苓类药材的本草考证[J].时珍国医国药,2014,25(5):1181-1183.
- [3] 刘鸿高,王元忠.云南不同产地茯苓总三萜含量测定[J].中国食用菌,2012,31(1):33-34.

- [4] Wu LF, Wang KF, Mao X, et al. Screening and analysis of the potential bioactive components of *Poria cocos* (Schw.) Wolf by HPLC and HPLC-MS (n) with the aid of chemometrics [J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 21020227.
- [5] 董远文.茯苓中三萜的分离纯化及含量测定研究[D].武汉:湖北中医药大学,2014:1.
- [6] 赵英博,徐 斌,管俊峰,等.不同产地茯苓中茯苓酸含量的比较研究[J].*中国中医药信息杂志*,2009,16(7):41-42.
- [7] Rios JL. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos*[J]. *Planta Medica*, 2011, 77(7): 681-691.
- [8] Wang W, Dong H, Yan R, et al. Comparative study of lanostane-type triterpene acids in different parts of *Poria cocos* (Schw.) Wolf by UHPLC-Fourier transform MS and UHPLC-triple quadruple MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 102: 203-214.
- [9] Dong H, Wu P, Yan R, et al. Enrichment and separation of antitumor triterpene acids from the epidermis of *Poria cocos* by pH-zone-refining counter-current chromatography and conventional high-speed counter-current chromatography [J]. *Journal of Separation Science*,2015, 38(11): 1977-1982.
- [10] Shu SH, Chen B, Zhou MC, et al. De novo sequencing and transcriptome analysis of *Wolfiporia cocos* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids [J]. *PLoS One*, 2013,8(8): e71350.
- [11] Wang J, Li Y, Liu D. Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase gene involved in triterpenoids biosynthesis from *Poria cocos* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(12): 22188-22202.
- [12] Ren A, Qin L, Shi L, et al. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17): 6785-6790.
- [13] 张倡辉,郝 娟,罗 军,等.干扰 TIP47 基因对奶山羊乳腺上皮细胞脂滴形成及相关基因表达的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2016,24(12): 1-8.
- [14] 崔培梧,胡亚强,钟瑜萍,等.氧载体对茯苓菌液态深层发酵的影响[J].*中药材*,2015,38(6):1157-1160.
- [15] 徐艳红,杨 欣,梁 良,等.茉莉酸甲酯诱导的白木香 cDNA 文库的构建及初步鉴定[J].*中草药*,2014,45(1):102-106.
- [16] Hao H, Lei CY, Dong QL, et al. Effects of exogenous methyl jasmonate on the biosynthesis of shikonin derivatives in callus tissues of *Arnebia euchroma* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 173(8): 2198-2210.

(本文编辑 苏 维)