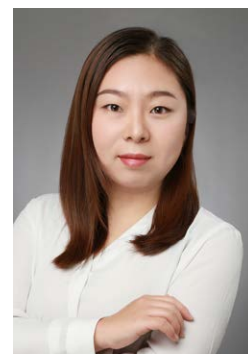


• 天然产物生物合成途径的解析 •

高伟 教授、博士研究生导师。首都医科大学附属世纪坛医院常务副院长，首都医科大学学术委员会委员，教育部青年长江学者，美国Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) 访问学者。全国百篇优秀博士学位论文、国家自然科学基金优秀青年基金和科技部“863计划”青年科学家项目获得者；入选国家“万人计划”领军人才、青年拔尖人才、科技部中青年科技创新领军人才、北京市“高创计划”领军人才。主要从事中药资源与分子生药学研究，在中药活性成分及天然药物基因功能鉴定、生源途径解析及合成生物学研究领域取得了创新性成果。获得国家级科研奖5项、省部级科研奖9项、授权发明专利20项。兼任中华中医药学会青年委员会主任委员、中国中西医结合学会分子生药学会秘书长、中国植物学会药用植物及植物药专业委员会副秘书长等。



吴晓毅 首都医科大学中医药学院讲师，北京市优秀人才青年骨干项目获得者。主要从事中药质量标准及活性成分生物合成调控研究，在中药质量评价及中药活性成分生物合成途径调控和解析方面取得了一系列成果，主持及参与国家级及省部级课题10余项，以第一作者在*Journal of Chromatography A*等国内外核心期刊上发表研究论文30余篇，获省部级科研奖2项、授权国家发明专利10余项。兼任中华中医药学会青年委员会委员、中国中西医结合学会分子生药学专业委员会青年委员、北京中医药学会中药资源与鉴定专业委员会委员。



异戊烯基焦磷酸转运对雷公藤甲素生物合成的影响

夏梦¹，张逸风¹，高海云¹，刘远¹，吴晓毅¹，高伟^{1,2}

1 首都医科大学 中医药学院，北京 100069

2 首都医科大学 药学院，北京 100069

夏梦，张逸风，高海云，等. 异戊烯基焦磷酸转运对雷公藤甲素生物合成的影响. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2039-2049.

Xia M, Zhang YF, Gao HY, et al. Effect of isopentenyl pyrophosphate translocation on the biosynthesis of triptolide. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2039-2049.

摘要: 雷公藤甲素是一种具有显著抗炎、抗肿瘤和免疫抑制活性的天然产物，市场需求量大，临床应用前景广阔。文中以雷公藤悬浮细胞为实验材料，通过对不同培养时期（7 d、14 d）的细胞外源性添加 D,L-甘油醛（DLG）以阻断异戊烯基焦磷酸（IPP）转运，分析诱导前后的细胞活性及生物量、雷公藤甲素累积量及其生物合成上游途径关键酶基因的变化规律，探究 IPP 转运在雷公藤甲素生物合成过程中的时空特点及其影响机制。通过实验结果

Received: November 25, 2020; **Accepted:** February 18, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81803650).

Corresponding authors: Xiaoyi Wu. Tel: +86-10-83911633; E-mail: wuxiaoyi@ccmu.edu.cn

Wei Gao. Tel: +86-10-83911538; E-mail: weigao@ccmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81803650) 资助。

可知: IPP 转运参与雷公藤甲素的生物合成; 在细胞培养早期, IPP 转运主要经由质体 (MEP 途径) 转运到细胞质 (MVA 途径) 中, 而细胞培养晚期则相反; 阻断 IPP 转运, 可反馈调节雷公藤甲素生物合成上游途径关键酶基因的表达, 进而影响雷公藤甲素的累积。上述研究填补了雷公藤甲素生物合成过程中 IPP 转运特点和机制方面的空白, 为雷公藤甲素合成生物学关键技术的开发奠定了理论基础, 具有重要的现实意义。

关键词: 雷公藤甲素, 生物合成, 异戊烯基焦磷酸 (IPP), 交互作用, 分子机制

Effect of isopentenyl pyrophosphate translocation on the biosynthesis of triptolide

Meng Xia¹, Yifeng Zhang¹, Haiyun Gao¹, Yuan liu¹, Xiaoyi Wu¹, and Wei Gao^{1,2}

¹ School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

² School of Pharmaceutical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Triptolide has wide clinical applications due to its anti-inflammatory, anti-tumor and immunosuppressive activities. In this study, we investigated the effect of blocking isopentenyl pyrophosphate (IPP) translocation on the biosynthesis of triptolide by exogenously adding D,L-glyceraldehyde (DLG) to the suspension cells of *Tripterygium wilfordii* at different stages (7 d, 14 d). Subsequently, the cell viability, biomass accumulation, triptolide contents, as well as the profiles of the key enzyme genes involved in the upstream pathway of triptolide biosynthesis, were analyzed. The results showed that IPP translocation is involved in the biosynthesis of triptolide. IPP is mainly translocated from the plastid (containing the MEP pathway) to the cytoplasm (containing the MVA pathway) in the early stage of the culture, but reversed in the late stage. Blocking the translocation of IPP affected the expression of key enzyme genes involved in the upstream pathway of triptolide, which in turn affected the accumulation of triptolide. Understanding the characteristics and mechanism of IPP translocation provides a theoretical basis for further promoting triptolide biosynthesis through synthetic biology.

Keywords: triptolide, biological synthesis, isopentenyl pyrophosphate (IPP), crosstalk, molecular mechanisms

雷公藤甲素 (Triptolide, $C_{20}H_{24}O_6$) 为松香烷内酯型二萜化合物, 具有 3 个环氧基团及 1 个 α,β -不饱和五元内酯环, 最早从植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中分离获得, 具有显著的抗炎和免疫抑制作用^[1-3]。目前, 以其为主要成分开发的药品如雷公藤片、雷公藤内酯软膏等已广泛用于自身免疫性疾病的治疗。而随着雷公藤甲素药理研究的深入, 发现雷公藤甲素及其相关衍生物还具有明显的抑制前列腺癌和胰腺癌等肿瘤细胞的活性^[4-8], 故扩大雷公藤甲素的来源对于新药开发具有一定的现实意义和临床价值。然而, 由于雷公藤甲素在植物中的分离率仅为 0.001%–0.004%, 且其化学合成方法存在反应路线长、收率低以及反应条件苛刻等弊端^[9], 难以获得理想的产量。因此, 研究影响雷公藤甲素生物合成的多方面因素, 对于今后有针对

性地利用生物技术手段合成雷公藤甲素, 扩大其来源, 具有一定的应用前景和意义。

现代研究表明, 雷公藤甲素等萜类次生代谢产物生物合成的关键前体物质异戊烯基焦磷酸 (Isopentenyl pyrophosphate, IPP) 既可经由质体中的 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 (2-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, MEP) 途径合成, 也可通过细胞质中的甲戊二羟酸 (Mevalonic acid pathway, MVA) 途径生成^[10], 且 IPP 可透过磷脂双分子层, 在细胞质和质体间自由转运, 使两条途径相互联系、互相干扰^[11-12], 如图 1 所示。尽管两条途径均可产生 IPP, 且 IPP 可在两途径间自由转运, 但研究发现, 在不同次生代谢产物生物合成过程中, MVA 和 MEP 途径提供 IPP 的数量与其化学结构和性质密切相关, IPP 自由转运的发生时间与转运方

向也存在一定的差异^[12-16],例如:固醇和甾醇类化合物的生成合成由两条途径同时参与;柠檬苦素类似物的生物合成则仅受 MVA 途径影响;两条途径均参与紫杉醇的生物合成,其中 MEP 途径占主导,且两条途径之间 IPP 转运主要发生在红豆杉悬浮细胞生长后期,其方向是从细胞质到质体。

目前,关于雷公藤甲素生物合成的研究多集中于功能基因挖掘、关键酶基因调控等方面^[17-21],尚未见到 IPP 转运影响雷公藤生物合成的相关研究。雷公藤甲素生物合成过程中是否存在 IPP 自由转运,且两条途径之间 IPP 自由转运的时空特点及机制等关键科学问题仍亟待解决。因此,本研究以此为切入点,根据 D,L-甘油醛 (D,L-glyceraldehyde, DLG) 可阻断暗反应中碳的同化作用,且本身比长链糖更容易进入质体这一性质,选择其作为 IPP 转运的阻断剂^[22]。同时,结合雷公藤悬浮细胞的生长特点,分别选择不同培养时期 (7 d、14 d) 的细胞作为实验材料,分析 DLG 诱导前后不同时期细胞的活性及生物量、雷公藤甲素累积量及雷公藤甲素生物合成上游途径关键酶基因的变化规律,旨在探明雷公藤甲素生物合成过程中是否存在 IPP 的自由转运,且该转运过程是否存在一定的时间性和方向性,并通过相关性分析,从分子层面阐释 IPP 转运影响雷公藤甲素生物合成的机理,以期填补雷公藤甲素生物合成过程中 IPP 转运机制方面的空白。此研究的开展为雷公藤甲素生物合成途径的解析及其合成生物学关键技术的开发奠定了一定的理论基础,具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

雷公藤悬浮细胞由首都医科大学中药资源与分子生药学实验室继代保存。Murashige & Skoog (MS) 基本培养基购自美国 PhytoTechnology Laboratories 公司;激动素(Kinetin, KT)、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 和吲哚-3-丁酸 (IBA) 均购自

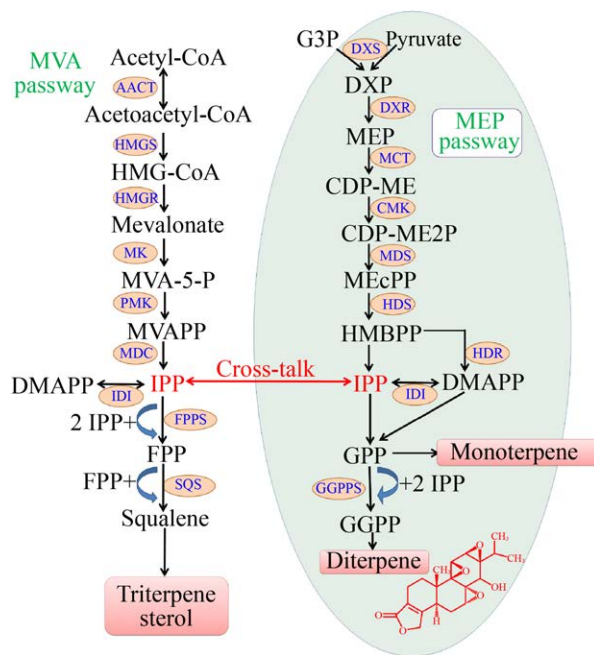


图1 萜类次生代谢产物生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of terpenoids. AACT: acetoacetyl-CoA thiolase; HMGS: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; HMGR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; MK: mevalonic acid kinase; PMK: phosphor-mevalonic acid kinase; MDC: mevalonic acid diphosphate decarboxylase; DXS: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; MCT: 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate cytidylyltransferase; CMK: 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase; MDS: 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase; HDS: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphate synthase; HDR: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphate reductase; IDI: dimethylallyl diphosphate isomerase; GGPPS: geranylgeranyl diphosphate synthase; FPPS: farnesyl diphosphate synthase; SQS: squalene synthase.

美国 Sigma 公司; D,L-甘油醛 (D,L-glyceraldehyde, DLG) 购自 J&K Scientific®公司;氯化三苯四氮唑 (TTC) 购自 Coolaber 公司;雷公藤甲素购自上海源叶生物科技有限公司;甲硝唑购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇均为色谱纯试剂,购自美国 Fisher 公司;甲酸购自北京化工厂;KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Kit 试剂盒购自美国 KAPA Biosystems 公司;总 RNA 提取试剂盒购自北京普洛麦格生物技术有限公司;Fast Quant

RT kit (with gDNase) 试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。Agilent1290/6490 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱联用仪 (UPLC-QQQ-MS, 美国 Agilent Technologies 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (qRT-PCR 仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司, Quant Studio5)。

1.2 方法

1.2.1 雷公藤悬浮细胞培养

选取 2.0 g 生长良好、质地疏松、生长状况基本一致的雷公藤悬浮细胞, 接种于 40 mL 含 0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L IBA+0.1 mg/L KT 的 MS 液体培养基中, 在 25 °C、黑暗、120 r/min 的条件下进行悬浮培养, 每 25 d 继代 1 次。

1.2.2 抑制剂 DLG 外源性诱导雷公藤悬浮细胞

精密称取一定量的 DLG 溶解于 DMSO 中, 浓度为 400 mmol/L, 过 0.22 μ m 微孔滤膜后作为母液备用。分别在雷公藤悬浮细胞培养 7 d 和 14 d, 向实验组加入 100 μ L DLG 母液使其终浓度达到 1 mmol/L, 向空白对照组 (CK) 加入等体积 DMSO, 继续悬浮培养。诱导后 0 h、24 h、72 h、120 h 和 168 h 取样, 除部分直接进行细胞活性和基因表达量测定外, 其余样品于 -80 °C 条件下冻存备用。每组 3 个生物学重复。

1.2.3 细胞活性及细胞生物量测定

细胞活性测定: 取 0.2 g 新鲜雷公藤悬浮细胞, 加入 2.5 mL TTC 溶液 (0.2 g TTC 溶于 50 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液), 于室温反应 14 h, 去除 TTC 溶液, 用蒸馏水清洗 3 次, 随后收集细胞, 加入 5 mL 甲醇, 60 °C 恒温水浴 50 min, 室温静置至细胞完全无色, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 在 485 nm 处测定其吸光值。

细胞生物量测定: 取 1.2.1 中冻存在 -80 °C 下的雷公藤悬浮细胞, 冷冻干燥 24 h 后精确称重。

1.2.4 雷公藤甲素含量测定

供试品溶液制备: 精确称取一定量经冷冻干

燥后的雷公藤悬浮细胞, 置于 15 mL 离心管中, 按质量体积比 1:30 加入 80% 甲醇, 称重, 浸泡过夜后, 超声提取 1 h, 补足失重。提取液过 0.22 μ m 微孔滤膜, 备用。

标准品溶液制备: 精确称取一定量的雷公藤甲素标准品, 甲醇溶解, 得浓度为 9.20 μ g/mL 标准品储备液。精确称取一定量甲硝唑标准品, 甲醇定容, 得浓度为 29.00 μ g/mL 甲硝唑内标储备液, 将雷公藤甲素标准品储备液和甲硝唑内标储备液置于 4 °C 冰箱中保存备用。

雷公藤甲素 UPLC-QQQ-MS 含量测定: 精确量取一定量的雷公藤甲素标准品储备液, 倍比稀释, 制成一系列浓度分别为 9.20 μ g/mL、2.30 μ g/mL、1.15 μ g/mL、0.575 μ g/mL、0.287 5 μ g/mL 的标准品溶液。在供试品和标准品溶液中添加一定量的甲硝唑内标储备液, 使其浓度为 4.83 μ g/mL, 按照以下色谱和质谱条件, 进样测定。以标准品峰面积 (Y_i) 与内标峰面积 (Y_s) 的比值 (Y_i/Y_s) 和其对应的标准品浓度 (X) 作线性回归, 绘制标准曲线, 并根据所绘制的标准曲线计算供试品中雷公藤甲素含量。

色谱条件: Waters HSS T3 C18 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m); 流动相 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0–2 min 60% A, 2–8 min 60%–35% A, 8–10 min 35%–20% A, 10–13 min 20%–10% A, 13–16 min 10% A); 柱温 40 °C; 流速 0.3 mL/min; 进样量为 5 μ L。质谱条件: 电喷雾离子源 ESI, 正离子状态下采用多反应监测模式 (MRM); 干燥气体为 N₂, 温度 200 °C, 气体流速 14 L/min; 雾化气体为 N₂, 压力为 137.9 kPa; 鞘气气体为 N₂, 温度 400 °C, 气体流速 11 L/min; 毛细管电压为 3 000 V, 雷公藤甲素及内标物甲硝唑的质谱分析条件参数分别为 361.1 \rightarrow 128.0 (50 eV, 定量离子)、105.0 (50 eV) 和 172.0 \rightarrow 127.9 (15 eV, 定量离子)、82.0 (15 eV)。

1.2.5 雷公藤甲素生物合成途径上关键酶基因表达分析

利用总 RNA 提取试剂盒提取雷公藤悬浮细胞 RNA, 并使用 FastQuant RT kit (with gDNase) 试剂盒, 将其反转录成 cDNA。以 β -actin 为内参基因, 按照引物设计原则分别设计出适合 *TwDXR*、*TwHDR*、*TwHMGR*、*TwHMGS* 和 β -actin 实时定量扩增的引物序列, 见表 1。根据 KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Kit 试剂盒说明书配制 qRT-PCR 反应体系和条件, 反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。技术重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算各基因相对表达量。

1.2.6 数据分析

采用 SPSS 软件对细胞活性、生物量和雷公藤甲素含量测定结果进行独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果与分析

2.1 DLG 对不同培养时期的雷公藤悬浮细胞活性及生物量的影响

培养 7 d 的雷公藤悬浮细胞经 DLG 诱导后, 各时间点的细胞活性和生物量较 CK 组均无显著

变化 (图 2A、图 2C)。与此明显不同的是, 培养 14 d 的雷公藤悬浮细胞在诱导后 24 h 和 72 h 时间点, 其细胞活性分别较 CK 组下降了 21.9% 和 52.2%, 且存在显著性差异 (图 2B), 而随着细胞活性的下降, 诱导后 72 h、120 h 和 168 h 三个时间点的细胞生物量也较 CK 组显著下降 (图 2D)。由此发现, 在雷公藤悬浮细胞培养早期 (7 d), DLG 外源性诱导对细胞活性和生物量无显著影响, 但随着细胞培养时间的延长, 在细胞培养后期 (14 d), DLG 外源性诱导则对细胞活性和生物量有着不同程度的抑制作用。

结合雷公藤悬浮细胞生长规律, 分析出现这一结果可能与以下两方面原因有关: 一方面, 从细胞自身而言, 培养时间的延长使得细胞呼吸所产生的 CO_2 更多地溶解于培养基中, 易造成细胞悬浮液 pH 值下降, 细胞生长环境变差, 故培养 14 d 的细胞整体活性较培养 7 d 的细胞有所下降。另一方面, 外源性抑制剂 DLG 的加入, 使得细胞开启自身防御系统, 合成一系列初生生长非必需的次生代谢产物, 这些次生代谢产物的生成, 不仅需要消耗部分细胞生物量, 也会释放到培养基中进一步加重细胞生长环境的恶化, 直接导致细胞活性显著下降的现象。与此同时, 细胞活性的下降既在一定程度上影响了细胞生物量的累积, 也造成了悬浮细胞对外源性刺激变得更为敏感, 导致更多的细胞生物量被消耗以合成一系列用于自身防御的次生代谢产物。因此, 培养 14 d 的细胞经诱导后, 其细胞生物量也显著下降。

2.2 DLG 对雷公藤甲素生物合成的影响

2.2.1 DLG 对细胞培养不同时期雷公藤甲素累积量的影响

培养 7 d 的雷公藤悬浮细胞经 DLG 诱导后, 各时间点的雷公藤甲素累积量均显著高于 CK 组。其中, 诱导后 24 h, 诱导组雷公藤甲素的含量较 CK 组增加 4 倍, 但随着诱导时间的延长, 两组间的差异逐渐减小, 诱导组雷公藤甲素的含量仅较

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The primers used for qRT-PCR

| Primer name | Primer sequence (5'-3') |
|------------------|---------------------------|
| <i>TwHMGS</i> -F | CTGGAGGTAGGGAGCGAGAC |
| <i>TwHMGS</i> -R | CCATAGCAGGCATTGGTTGA |
| <i>TwHMGR</i> -F | GGCTTCAAAGTGTTTCATTGTT |
| <i>TwHMGR</i> -R | TTCATCCCCATTGCGTCA |
| <i>TwDXR</i> -F | TCAAGGATTGCCAGAGGG |
| <i>TwDXR</i> -R | ATGAATGATAGACTGCGGATG |
| <i>TwHDR</i> -F | AATGTTACTGTGAGACTGGCGG |
| <i>TwHDR</i> -R | GTTGGATTGTGTATGATTTCGTTGG |
| β -actin-F | AGGAACCACCGATCCAGACA |
| β -actin-R | GGTGCCCTGAGGTCCTGTT |

TwHMGS: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase; *TwHMGR*: HMG-CoA reductase; *TwDXR*: 1-deoxy-dxylulose-5-phosphate reductoisomerase; *TwHDR*: 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase.

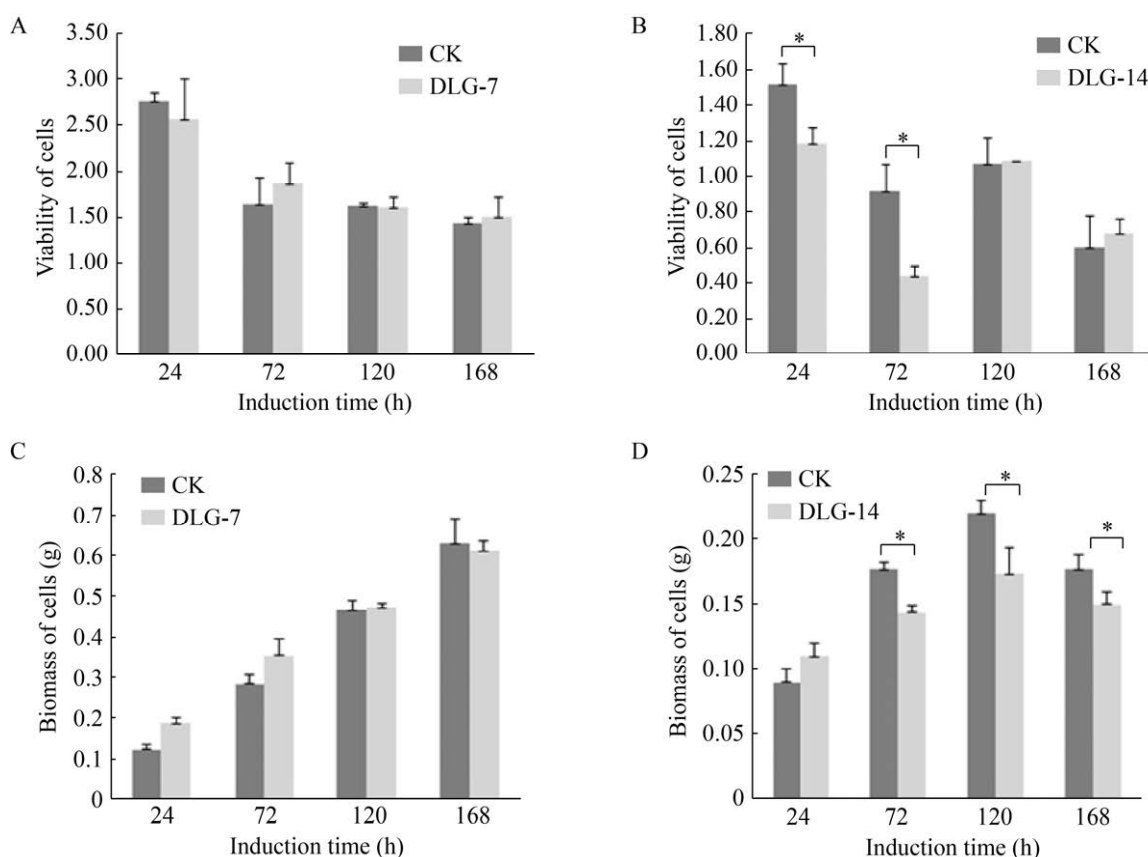


图2 添加DLG对培养7 d、14 d雷公藤悬浮细胞细胞活性、生物量的影响

Fig. 2 Effects of adding D,L-glyceraldehyde (DLG) on cell viability and biomass accumulation of *T. wilfordii* suspension cells incubated for 7 d (A and C) and 14 d (B and D). Error bars: SD, $n=3$; *: $P<0.05$.

CK组增加2倍(图3A)。与之相反,培养14 d的雷公藤悬浮细胞经DLG诱导后24 h,雷公藤甲素累积量较CK组降低了72.1%,而后各时间点雷公藤甲素累积量逐渐上升,但与CK组无显著差异(图3B)。以上结果说明,在雷公藤悬浮细胞培养的不同时期,当对IPP转运进行阻断时,雷公藤甲素的累积量均发生不同程度的改变。

结合雷公藤甲素等二萜类次生代谢产物主要经由MEP途径合成这一科学观点,进一步对比分析不同细胞培养时期的数据。由于雷公藤甲素含量的变化与其关键前体物质IPP的累积量有一定的相关性,故在MVA和MEP途径间IPP转运被阻断的情况下,MEP途径合成的IPP对雷公藤甲

素的累积起决定作用。因此,对于培养7 d的雷公藤悬浮细胞而言,诱导后雷公藤甲素含量的增加可能与以下两方面原因有关:一是“开源”,即DLG外源性诱导刺激MEP途径自身合成较多的IPP;二是“节流”,即从质体(MEP途径)输出到细胞质(MVA途径)的IPP减少。

然而,对于培养14 d的雷公藤悬浮细胞而言,经DLG诱导后,雷公藤甲素的含量出现先下降后上升的趋势,推测MEP途径中IPP的累积量也有着同样的变化规律。如果外源性诱导可刺激MEP途径自身合成较多的IPP,那么造成诱导后24 h内雷公藤甲素含量下降的原因是:从细胞质(MVA途径)输入到质体(MEP途径)的IPP有所

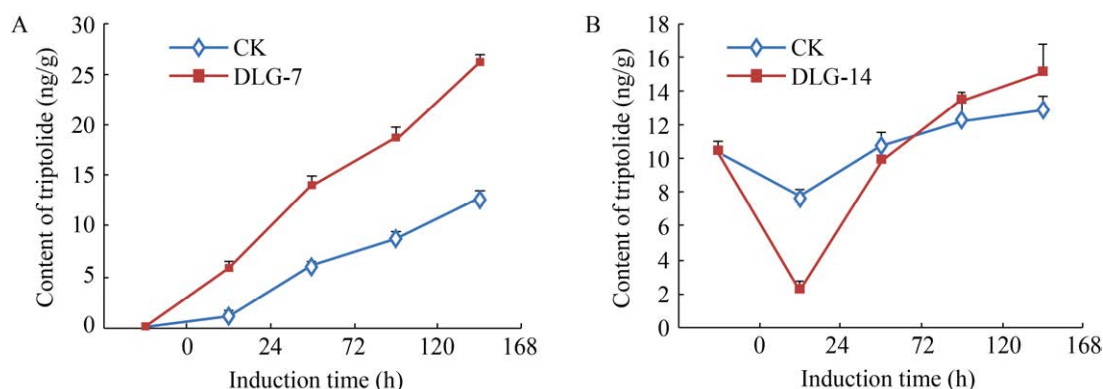


图3 DLG对培养7 d、14 d雷公藤悬浮细胞内雷公藤甲素含量的影响

Fig. 3 Effects of DLG on contents of triptolide of *T. wilfordii* suspension cells incubated for 7 d (A) and 14 d (B). Error bars: SD, $n=3$; *: $P<0.05$.

减少,但随着诱导时间的延长,MEP途径中自身生成IPP逐渐增多。由此推断,在雷公藤甲素生物合成过程中存在IPP转运,且该过程具有一定的时空特点。

2.2.2 DLG对雷公藤甲素生物合成途径上关键酶基因表达量的影响

为深入探究IPP转运影响雷公藤甲素生物合成的分子机制,探明外源性诱导剂DLG是否促进MEP途径生成IPP,进一步分析雷公藤甲素生物合成途径上部分关键酶基因在DLG外源性诱导作用下的动态变化规律。分别选择*TwHMGS*和*TwHMGR*以及*TwDXR*和*TwHDR*作为MVA和MEP途径上的关键酶基因进行基因表达量的分析。若外源性使用DLG能够刺激MEP途径生成IPP,那么对于不同培养时期的雷公藤悬浮细胞而言,诱导后MEP途径上游*TwDXR*和*TwHDR*基因表达量的趋势应该一致。实验结果显示,培养7 d的雷公藤悬浮细胞经DLG诱导后,MVA和MEP途径上游的关键酶基因表达量普遍低于CK组,但*TwDXR*经诱导后72 h和168 h两个时间点除外。与之相反,对于培养14 d的雷公藤悬浮细胞而言,除*TwHMGS*诱导后120 h、168 h和*TwDXR*诱导后168 h三个时间点的基因表达量较CK组降低,*TwHDR*诱导后168 h的基因表达量与CK

组相近外,其余时间点各基因表达量均明显低于CK组,见图4、图5。由上述结果可知,在雷公藤悬浮细胞培养不同时期,当IPP转运被阻断后,MVA和MEP途径上游关键酶基因表达量的变化趋势不同,说明DLG不诱导MEP途径合成IPP,故在后续分析中,仅考虑DLG阻断IPP转运对雷公藤甲素累积的影响。

2.2.3 IPP转运、雷公藤甲素累积及其生物合成关键酶基因表达量的相关性分析

结合2.2.1和2.2.2的数据结果,分析IPP转运、雷公藤甲素累积及其生物合成途径上关键酶基因表达三者之间的相关性。在细胞培养早期(7 d)阻断IPP转运时,可阻断IPP流向MVA途径,造成MEP途径上的IPP短时间内大量堆积,使雷公藤甲素的累积量迅速升高。与此同时,为保证细胞内环境的稳定与平衡,降低IPP大量堆积造成的影响,MEP途径上游的关键酶基因出现负反馈调节,其表达量下降,进而减少了雷公藤甲素的累积,直接反映的结果就是诱导组与CK组雷公藤甲素的累积量差值逐渐变小。与之相反,细胞培养晚期(14 d)则阻断了IPP流向MEP途径,使雷公藤甲素的累积量迅速下降,但随着MEP途径上游的关键酶基因正反馈调节的出现,诱导组雷公藤甲素的累积量逐渐升高。由此可以

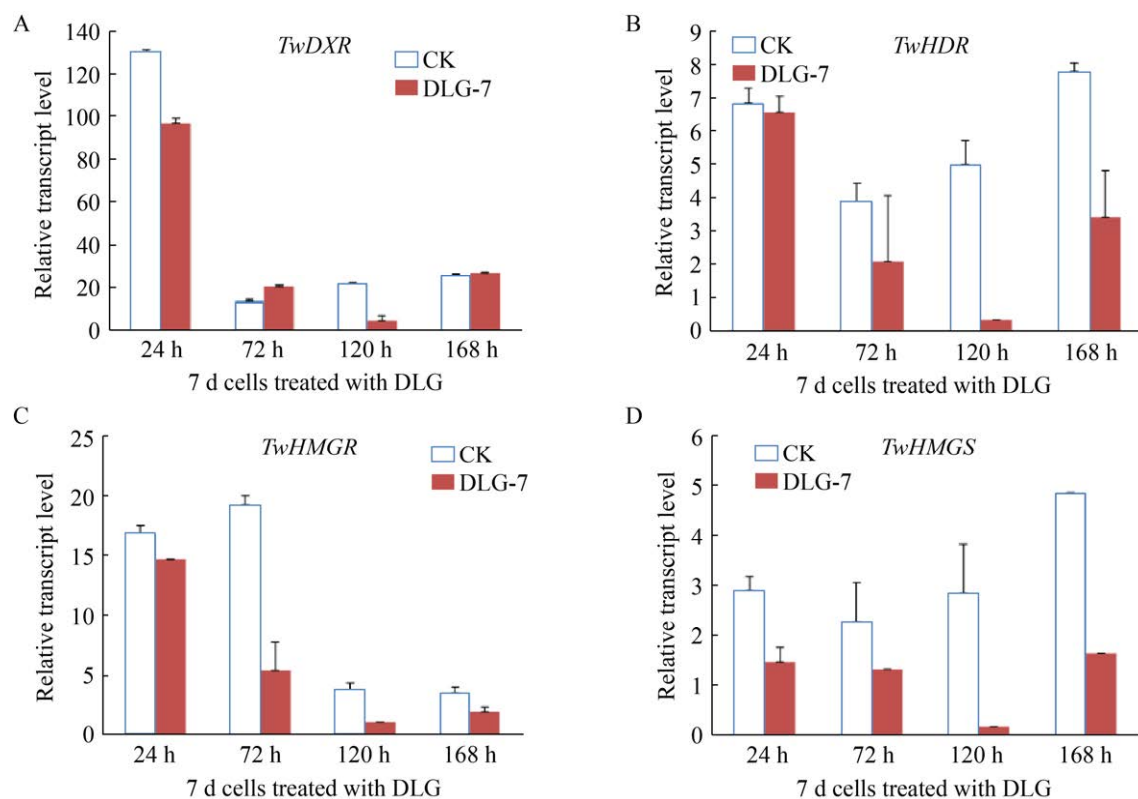


图4 DLG对培养7 d雷公藤悬浮细胞基因表达量的影响

Fig. 4 Effects of DLG on relative transcript level of *TwDXR* (A), *TwHDR* (B), *TwHMGR* (C), and *TwHMGS* (D) *T. wilfordii* suspension cells incubated for 7 d.

从内部分子机制佐证 IPP 转运存在于雷公藤甲素的生物合成过程中。由上述分析可推断雷公藤甲素生物合成过程中 IPP 转运的时空特点是：培养 7 d 的雷公藤悬浮细胞，IPP 转运的方向主要是从质体输出到细胞质，而培养 14 d 的雷公藤悬浮细胞，IPP 转运的方向则是从细胞质输入到质体。

3 讨论与结论

对于外源性诱导子而言，其浓度的选择会直接影响实验结果的准确性和可信度。一般来说，当诱导子活性作用发挥最好，且不会破坏细胞正常生长的浓度即为外源性诱导的最适浓度。为确定本研究所用 DLG 的适宜浓度，对相关文献进行了归纳总结。根据文献报道，DLG 外源性诱导植

物悬浮细胞的浓度通常为 1 mmol/L^[23-24]，因此文中也选择该浓度作为实验浓度。

通过本研究结果可知：在雷公藤甲素生物合成过程中，MVA 与 MEP 途径间存在 IPP 转运。若单纯考虑这一交互作用，当阻断 IPP 转运后，MVA 和 MEP 途径上的关键酶基因表达应该呈相反的趋势，这与本研究结果不一致。这可能是由于 MVA 和 MEP 途径上还存在其他前体物质，如 FPP 和 GPP 的转运^[10]，当 IPP 转运被阻断时，可能导致 FPP 和 GPP 在两条途径间的转运交流发生改变，代偿性地减少 IPP 转运被阻断造成的影响，故可能导致两途径上关键酶基因的表达呈现一致的现象，但具体原因还需通过后续深入的研究进一步分析。

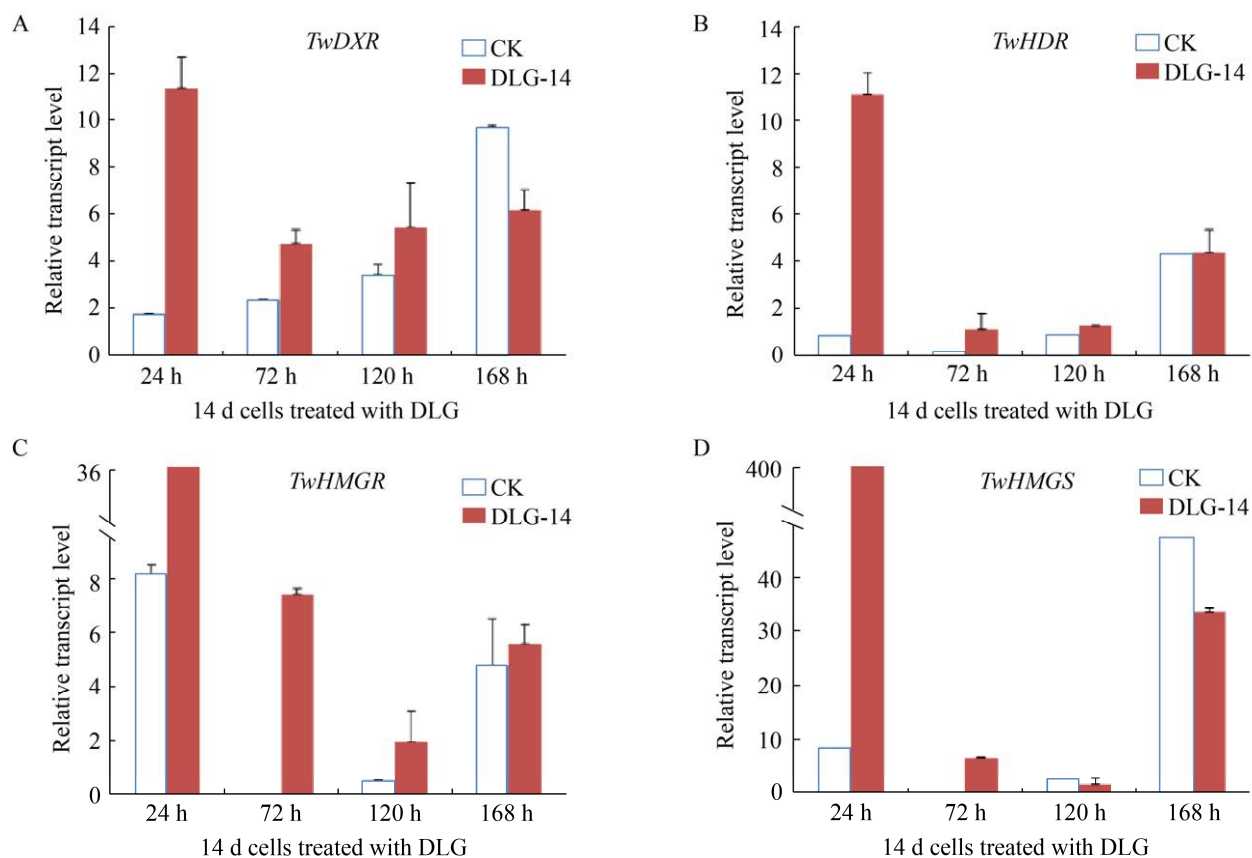


图5 DLG对培养14 d雷公藤悬浮细胞基因表达量的影响

Fig. 5 Effects of DLG on relative transcript level of *TwDXR* (A), *TwHDR* (B), *TwHMGR* (C) and *TwHMGS* (D) in *T. wilfordii* suspension cells incubated for 14 d.

在雷公藤甲素生物合成过程中, IPP 转运呈现一定的时空特点, 且当它被阻断的时候, 雷公藤甲素的累积量及 MVA 和 MEP 途径上的关键酶基因表达量均发生了一定程度的改变, 由此可推断雷公藤甲素的生物合成与 MVA 和 MEP 途径均有一定的相关性。为寻找 MVA 和 MEP 途径参与雷公藤甲素生物合成的直接证据, 进一步探索性地使用 MVA 途径上关键酶基因 HMGR 的专一竞争性抑制剂为美伐他汀 (MEV) 以及 MEP 途径上关键酶基因 DXR 的专一竞争性抑制剂磷铵霉素钠 (FOS) 外源性诱导刺激雷公藤悬浮细胞从而阻断 MVA 或 MEP 途径^[23]。当采用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ MEV 诱导后, 雷公藤甲素的累积量下降了 28.9%,

当采用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ FOS 诱导后, 雷公藤甲素的累积量下降了 55.4%, 由此说明 MVA 和 MEP 途径共同参与雷公藤甲素的生物合成。结合本文的实验结果, 可得出结论: MVA 和 MEP 途径共同参与雷公藤甲素的生物合成, 且二者间存在交互作用 (Crosstalk)。

本研究既能直接明确雷公藤甲素生物合成过程中 IPP 转运的时空特点及其相关分子机制, 解析 MVA 和 MEP 途径共同参与雷公藤甲素生物合成的模式, 完善雷公藤甲素生物合成的理论基础; 同时也能间接挖掘提高雷公藤甲素累积量的新思路和新方法, 为雷公藤甲素生物合成技术的开发和实现提供一定的科学依据。

REFERENCES

- [1] Lv QW, Zhang W, Shi Q, et al. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F. with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): a randomised, controlled clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2015, 74(6): 1078-1086.
- [2] He LG, Liang ZY, Zhao FQ, et al. Modulation of IL-37 expression by triptolide and triptonide in THP-1 cells. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12: 515-518.
- [3] Li RJ, Lu KY, Wang Y, et al. Triptolide attenuates pressure overload-induced myocardial remodeling in mice via the inhibition of NLRP3 inflammasome expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(1): 69-75.
- [4] Chen ZY, Veena SW, Sulagna B, et al. Triptolide sensitizes pancreatic cancer cells to TRAIL-induced activation of the Death Receptor pathway. *Cancer Lett*, 2014, 348(1/2): 156-166.
- [5] Yuan SQ, Wang LP, Chen XX, et al. Triptolide inhibits the migration and invasion of human prostate cancer cells via caveolin-1/CD147/MMPs pathway. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1776-1782.
- [6] Li XG, Lu QL, Xie W, et al. Anti-tumor effects of triptolide on angiogenesis and cell apoptosis in osteosarcoma cells by inducing autophagy via repressing Wnt/ β -catenin signaling. *Biomed Pharmacother*, 2018, 496(2): 443-449.
- [7] Rohit C, Veena SW, Satish P, et al. A preclinical evaluation of minnelide as a therapeutic agent against pancreatic cancer. *Sci Transl Med*, 2012, 4(156): 156ra139.
- [8] Wang PY, Zeng WJ, Liu J, et al. TRC4, an improved triptolide derivative, specifically targets to truncated form of retinoid X receptor- α in cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 2017, 124: 19-28.
- [9] Xu HT, Tang HY, Feng HJ, et al. Metal-mediate reactions based formal synthesis of triptonide and triptolide. *Tetrahedron Lett*, 2014, 55(51): 7118-7120.
- [10] Vranová E, Coman D, Grussem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 665-700.
- [11] Isabel MP, Erika K, Claudia H, et al. Metabolic cross-talk between pathways of terpenoid backbone biosynthesis in spike lavender. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 95: 113-120.
- [12] Hemmerlin A, Hoeffler JF, Meyer O, et al. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 26666-26676.
- [13] Opitz S, Nes WD, Gershenzon J. Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings. *Phytochemistry*, 2014, 98: 110-119.
- [14] Aarthy T, Mulani FA, Pandreka A, et al. Tracing the biosynthetic origin of limonoids and their functional groups through stable isotope labeling and inhibition in neem tree (*Azadirachta indica*) cell suspension. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 230.
- [15] Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, et al. Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. *J Biotechnol*, 2003, 101(2): 157-163.
- [16] Wang YD, Yuan YJ, Lu M, et al. Inhibitor studies of isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of the yew *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2003, 37(Pt 1): 39-43.
- [17] Johan AR, Kenneth TK, Morten TN, et al. Expanding the landscape of diterpene structural diversity through stereochemically controlled combinatorial biosynthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 128(6): 2182-2186.
- [18] Nikolaj LH, Allison MH, Britta H, et al. The terpene synthase gene family in *Tripterygium wilfordii* harbors a labdane-type diterpene synthase among the monoterpene synthase TPS-b subfamily. *Plant J*, 2017, 89(3): 429-441.

-
- [19] Tong YR, Zhang M, Su P, et al. Cloning and functional characterization of an isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Tripterygium wilfordii*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63(6): 863-869.
- [20] Tong YR, Su P, Zhao YJ, et al. Molecular cloning and characterization of DXS and DXR genes in terpenoid biosynthetic pathway from *Tripterygium wilfordii*. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 25516-25535.
- [21] Liu YJ, Zhao YJ, Zhang M, et al. Cloning and characterisation of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in *Tripterygium wilfordii*. *Molecules*, 2014, 19: 19696-19707.
- [22] Lipko A, Swiezewska E. Isoprenoid generating systems in plants — A handy toolbox how to assess contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthetic process. *Prog Lipid Res*, 2016, 63: 70-92.
- [23] Yang D, Du X, Liang X, et al. Different roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in cell growth and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *PLoS One*, 2012, 7(11): 46797.
- [24] Wang YD, Yuan YJ, Wu JC. Translocation of isopentenyl pyrophosphate for Taxol biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Plant Cell Tiss Org*, 2003, 74: 283-288.

(本文责编 郝丽芳)