

基于转录组学和代谢组学联合分析草珊瑚萜类化合物生物合成的组织特异性分布

吴迪, 张燕燕, 林楠, 魏艺聪*

福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

吴迪, 张燕燕, 林楠, 魏艺聪. 基于转录组学和代谢组学联合分析草珊瑚萜类化合物生物合成的组织特异性分布[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 542-561.

WU Di, ZHANG Yanyan, LIN Nan, WEI Yicong. Tissue specific distribution of terpenoid biosynthesis in *Sarcandra glabra* based on transcriptome and metabolome analysis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 542-561.

摘 要: 本研究旨在探究草珊瑚叶和根中萜类化合物的组织特异性分布差异, 解析其药效品质差异形成的分子机制。采用液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)和 Illumina HiSeq™ 高通量测序技术获得草珊瑚[*Sarcandra glabra* (thunb) naka]叶和根的代谢组学和转录组学数据。代谢组学结果表明参与叶和根中萜类合成的差异代谢物有 50 个, 包括法尼西基半胱氨酸、甘油醛-3-磷酸、甲羟戊酸-5-磷酸等。转录学结果表明差异代谢酶基因有 57 条, 包括 *ACTC*、*HMGCR*、*MVK*、*DXS* 与 *KS* 等, 并预测了 *MYB*、*C2H2*、*AP2/ERF-ERF* 等 7 个转录因子参与调控草珊瑚不同组织部位中萜类的合成和积累差异。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)结果显示, 随机选取的 8 个参与萜类合成的酶基因在草珊瑚不同组织部位中的表达趋势与转录组学测序结果一致。本研究有助于阐明草珊瑚叶和根临床疗效差异形成的分子机制, 同时为草珊瑚的资源开发利用奠定基础。

关键词: 草珊瑚; 萜类; 代谢组学; 转录组学

资助项目: 福建省自然科学基金(2020J013)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2020J013).

*Corresponding author. E-mail: 2007047@fjtcu.edu.cn

Received: 2023-05-17; Accepted: 2023-08-07; Published online: 2023-08-15

Tissue specific distribution of terpenoid biosynthesis in *Sarcandra glabra* based on transcriptome and metabolome analysis

WU Di, ZHANG Yanyan, LIN Nan, WEI Yicong*

College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

Abstract: The leaves and roots of *Sarcandra glabra* (thunb) nakai have different therapeutic effects in some clinical applications. In order to explore the tissue specific distribution differences of terpenoids in the leaves and roots of *S. glabra*, and to analyze the molecular mechanism of the formation of their pharmacodynamic quality differences. In this study, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and Illumina HiSeq™ high-throughput sequencing techniques were respectively used to obtain the metabolome and transcriptome data of the leaves and roots of *S. glabra*. The metabolomics analysis showed that there were 50 differential terpenoids metabolites between the leaves and roots, including farnesylcysteine, D-glyceraldehyde 3-phosphate, and (R)-5-phosphomevalonate. The transcriptomics analysis indicated that there were 57 differentially expressed metabolic enzyme coding genes, including *ACTC*, *HMGCR*, *MVK*, *DXS*, and *KS*. Moreover, there were seven transcription factors, including *MYB*, *C2H2*, *AP2/ERF-ERF*, which were predicted to participate in regulating the differences in terpenoid synthesis and accumulation between the leaves and roots of *S. glabra*. qRT-PCR results demonstrated that the expression changes of eight randomly selected enzyme genes involved in terpene synthesis between the leaves and roots of *S. glabra*, which were consistent with the transcriptome sequencing results. This study will help to elucidate the molecular mechanisms underlying the clinical efficacy differences between the leaves and roots of *S. glabra*, and facilitate the extraction, utilization, and resource development of *S. glabra*.

Keywords: *Sarcandra glabra* (thunb) nakai; terpenoids; transcriptome; metabolome

草珊瑚[*Sarcandra glabra* (thunb) nakai]是一种传统的药用植物,源于金粟兰科草珊瑚属植物草珊瑚的干燥全株,别名肿节风、接骨金粟兰、九节茶、满山香和节骨茶等^[1-2]。其性温、味苦辛、归心和肝经^[3],具有清热凉血、活血祛风、消肿止痛和抗菌消炎的功效^[4],《药典》中规定草珊瑚的药用部位为全草部分,而在苗药中记载了草珊瑚不同部位的临床应用也不同,其中根主要用于治疗痢疾、胃痛、肝风、跌打肿痛、风湿关节炎和口腔炎;叶主要用于

治疗骨折、头晕、夏季湿病、风湿骨痛和急性胃肠炎^[5]。现代药理研究表明,草珊瑚具有抗肿瘤、抗炎抗菌、抗胃溃疡、抗疲劳、抗氧化、祛痰平喘和降血脂等多种生物活性^[6-8],其主要化学成分包括倍半萜、倍半萜二聚体、倍半萜三聚体、二萜、香豆素、酚酸类、黄酮和挥发油等^[9-13],萜类化合物为草珊瑚的主要化学成分,具有抑制微生物、抗肿瘤、抗氧化、抗炎镇痛、抗菌抗病毒、调节免疫和抗血小板减少等生物活性^[14-16]。草珊瑚已广泛用于食品药

品、保健品、化妆品和日用化工等方面,因其广泛的应用受到了广大研究者的关注。

萜类化合物是广泛分布在自然界中的一类次生代谢产物,它是由甲戊二羟酸衍生且分子骨架以异戊二烯单元(C5 单元)为基本结构单元的化合物及其衍生物^[17]。根据碳原子数目的不同可以分为单萜、倍半萜、二萜、三萜和多萜。植物萜类主要通过两个途径独立合成,即位于细胞质中的甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)和位于质体中的脱氧木酮糖-5-磷酸途径(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway, DXP)或甲基赤藓醇 4-磷酸途径(methylerythritol 4-phosphate pathway, MEP)^[18]。两条途径通过共同中间体异戊烯基二磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)交汇并互相应用,IPP 与异戊烯基焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI)结合生成二甲丙烯焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)^[19]。MVA 途径中的焦磷酸法尼酯(farnesyl pyrophosphate, FPP)以及 MEP 途径中的香叶基二磷酸(geranyl diphosphate, GPP)和香叶基香叶基双磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)被萜类合酶(terpene synthase, TPS)催化合成相应萜类化合物的前体^[20],最后通过各种修饰酶的甲基化、羟基化、糖基化等骨架修饰作用形成结构和功能各不相同的萜类化合物。

近年来,多组学技术的进步特别是代谢组学和转录组学,为阐明植物中复杂的次生代谢生物合成和候选基因提供了有效方法^[21-22]。例如, Yue 等^[23]通过转录组学和代谢组学技术研究了葡萄果实不同发育过程中单萜类化合物的变化; Wang 等^[24]利用转录组和代谢组分析了两种基因型的菊芋的代谢谱和相关基因的表达模式; Wang 等^[25]通过转录组和靶向代谢组分析了不同发育阶段茶叶的质量变化。目前,对草珊瑚的研究工作多集中在生物活性物质单体的提

取分离纯化和药理作用等方面,但关于草珊瑚不同组织中萜类相关成分差异积累的分子机制尚不明确。因此,本研究通过代谢组学解析草珊瑚不同组织部位中萜类化合物组分与含量的差异,对差异药效活性代谢物的合成和动态积累进行深入分析,通过转录组学挖掘叶和根中萜类合成的关键差异基因及转录因子,从基因表达的角度分析草珊瑚叶和根的萜类差异积累规律,研究结果不仅为有效指导药材采收,合理利用药用资源提供方向,同时也为草珊瑚品质形成的机制和候选基因选择与筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究试验材料为草珊瑚的叶和根,样品采自福建省三明市尤溪县草珊瑚种植基地(东经 117°48'30", 北纬 25°50'36"), 每组样品设置 6 个生物学重复,编号为 L1-L6, R1-R6, 采摘后用去离子水清洗,并用锡箔纸包好后迅速放于液氮中,放置-80 °C 低温保存,用于后续转录组学和代谢组学分析。

1.2 方法

1.2.1 代谢物提取

分别称取 50 mg 样本,加入 1 000 μ L 浓度为 20 mg/L 的内标提取液(甲醇:乙腈:水体积比为 2:2:1),涡旋混匀 30 s;研磨仪处理 10 min 之后再冰浴超声 10 min; -20 °C 静置 1 h;将样本于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min;取上清液 500 μ L 于 EP 管中后在真空浓缩器中干燥;干燥后再加入 160 μ L 含乙腈、水的提取液(体积比=1:1)复溶;涡旋 30 s,冰水浴超声 10 min;将样本 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min;取出上清液 120 μ L 于 2 mL 进样瓶,之后每组样本分别取 10 μ L 上机检测。

1.2.2 质谱参数设置和数据采集

代谢组学分析的液质联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 系统由沃特世 Acquity I-Class PLUS 超高效液相色谱串联沃特世 Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪组成, 所使用色谱柱为购自沃特世的 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (18 μm , 21 mm $\times$ 100 mm)。正离子模式: 流动相 A: 0.1%甲酸水溶液; 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈; 负离子模式: 流动相 A: 0.1%甲酸水溶液; 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈, 进样体积为 1 μL 。

沃特世 Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪进行一级、二级质谱数据采集, 质谱条件如下: ESI 离子源喷雾电压: 2 000 V (正离子模式) 或 -1 500 V (负离子模式); 锥电压: 30 V; 离子源温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气温度 500 $^{\circ}\text{C}$; 反吹气流量: 50 L/h; 脱溶剂气流量: 800 L/h。

使用 MassLynx V42 采集原始数据后通过 Progenesis QI 软件进行峰提取、峰比对等数据处理, 进一步利用 Progenesis QI 软件在线 METLIN 数据库和 Biomark 自建库进行鉴定, 理论碎片鉴定和质量偏差均在 100 ppm 以内。

用总峰面积归一化原始峰面积信息后, 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和斯皮尔曼相关性分析 (spearman correlation analysis, r) 判断组内样品和质控样品的重复性。利用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、人类小分子代谢物组数据库 (human metabolome database, HMDB) 和脂质映射结构数据库 (lipid maps structure database, LMSD) 对鉴定出的化合物进行分类和功能注释。采用 t 检验计算各化合物的差异显著性 P 值 (P -value), 使用多重交叉验证计算模型的变量投影重要性指标 (variable

importance in projection, VIP)。采用正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 模型的差异表达倍数 (fold change, FC), 结合 P 值、VIP 值筛选差异代谢物, 设置阈值为 $\text{FC} > 2$ 或 < 0.5 , $P < 0.05$, $\text{VIP} > 1$ 。进一步在 KEGG 途径富集差异代谢物。

1.2.3 总 RNA 提取和文库构建

使用总 RNA 提取试剂盒提取草珊瑚叶和根总 RNA, 通过 Nano Drop 2000 分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度, Agilent 2100/Lab Chip GX 检测 RNA 的完整性。样品检测合格后将样品送至北京百迈客生物科技有限公司进行文库构建。使用 Illumina Nova Seq6000 测序平台进行 PE150 模式测序。

1.2.4 转录组数据筛选和组装

测序后得到 raw reads 后去除含有接头、低质量、N 的比例大于 10% 以及质量值 Q10 的碱基数占整条 read 的 50% 以上的 reads, 得到高质量的 clean reads。

使用 Trinity 软件将 clean reads 打断为较短的片段, 将这些小片段延伸成较长的片段后, 通过片段之间的重叠得到片段集合, 在各个片段集合中分别识别转录本序列。

1.2.5 差异基因表达水平分析及功能分析

采用每百万碱基测序的转录本序列每千碱基序列片段数 (fragments per kilobase of transcript million fragments, FPKM) 值计算统计转录本的表达量。利用 DESeq2 软件进行差异分析, 差异基因 (differentially express genes, DEGs) 筛选标准 $\text{FC} > 2$ 且错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.01 。其中 FC 表示叶与根间表达量的比值, FDR 表示差异的显著性。之后将筛选出的 DEGs 比对到 KEGG 数据库进行功能注释, 分析预测其功能和代谢途径。

1.2.6 代谢组学和转录组学联合分析

基于基因表达量和代谢物含量数据,对差异代谢物和差异基因进行 KEGG 通路注释,获得共同合成途径信息,进一步分析草珊瑚萜类化合物在叶和根中差异性积累的调控机制。

1.2.7 转录因子(transcription factors, TF)分析

根据转录组测序结果,对基因所属的转录因子家族进行分类统计,之后将编码的序列通过植物转录因子数据库 plantTFDB (<http://planttfdbgao-lab.org>)进行预测分析,得到转录因子与差异基因之间的调控关系,进一步通过 cytoscape 软件绘制两者之间调控关系图。

1.2.8 qRT-PCR 验证

随机挑选 8 个差异基因进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析。扩增条件如下: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 20 s, 共 40 个循环。用于确定反应特异性的溶解曲线程序如下: 60 °C 15 s, 95 °C 15 s。使用 primer 5.0 软件设计的特异性引物,内参基因 CAC 和目的基因 *DXS*、*ACAT*、*GGPS*、*FDPS*、*MVK*、*KAO*、*FDFT1* 引物如表 1 所示。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算特定基因的相对表达,并对每个基因进行 3 次生物重复分析。数据结果以平均值±标准

偏差表示,采用 SPSS 2.00 软件进行方差分析,*代表 $P<0.05$,差异显著;**代表 $P<0.01$,差异非常显著。

2 结果与分析

2.1 代谢物分析

基于 LC-QTOF 检测平台和北京百迈客科技有限公司所建数据库,对草珊瑚叶和根分别设置 6 个生物学重复,共 12 个样品进行代谢组定性定量分析,共检测出 16 593 个峰,其中注释到 4 718 个代谢物。其中脂质和类脂分子、有机酸及其衍生物、苯丙烷和聚酮、有机杂环化合物占比较大,分别为 471、260、237、230 个。

2.2 差异代谢物分析

对所有样品进行主成分分析,结果表明叶和根每组 6 个生物学重复均能较好地聚集在一起,代谢产物第一、第二主成分均分离明显,说明同一样本不同重复间的代谢数据保持高度的一致性且样品组间代谢组存在差异。

为了探究草珊瑚叶和根中的差异积累产物,基于 OPLS-DA 分析获得 VIP 值和 P 值及 FC 来进一步筛选差异代谢物($VIP\geq 1$, $P<0.05$, $FC>2$

表 1 本文所用的 qRT-PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers used in this study

Gene ID	Gene name	Primer sequences (5'→3')	Primer sequences (5'→3')
Reference gene	CAC	TCCGACAAATTGGAGGTTGC	TGCTGCTGACAACAATCACG
TRINITY_DN1176_c0_g1	DXS	TGTGTTACGATTATGGCTTAC	CTGAGGAGGATTTCGGTAGACTT
TRINITY_DN31876_c0_g1	ACAT	GGCTTGATGCTTCTAGTGTT	TGGACGACTTACAGGTTGAATC
TRINITY_DN489_c0_g1	GGPS	GGCTTCCACCACATCGTCTC	CCAACACCACATCGTCAGTCT
TRINITY_DN2505_c0_g1	FDPS	AACCCATCTACATCAGTTCATCAC	CCATTGCCGAGAATCATCAGT
TRINITY_DN3368_c0_g1	MVK	GAGGAACACGAAGGCATTAGT	CCGTATTGGAGAGGTCATCAG
TRINITY_DN4552_c0_g1	DXS	GCCTTGAACGGACTCTTAGAC	AGGTGGAGAGCATCCTTGTT
TRINITY_DN10662_c0_g1	KAO	AGTTCAGGTATGGTTTCAGAAATGT	GGCACATCCTACTTCCTAATCC
TRINITY_DN16228_c0_g1	FDFT1	CCGAATGCCACACTAATGCTA	CACAACAATCACAACCGAACTG

或 <0.5)。共筛选出 782 个差异代谢物, 包括 429 个上调代谢物、353 个下调代谢物。将上述差异代谢物比对到 HMDB 数据库进行差异代谢物的分类, 结果如图 1 所示。草珊瑚叶和根中差异代谢物多分布在脂质及类脂分子上, 占总数的 27.5%; 其次为有机酸及其衍生物, 占比为 16.1%; 苯丙烷和聚酮类, 占比为 14%; 有机杂环化合物, 占比为 13%。

2.3 萜类相关差异代谢物筛选

通过差异代谢物 HMDB 分类和 KEGG 通路富集分析可知, 草珊瑚叶和根的萜类相关差异代谢物主要存在于萜类骨架合成途径、单萜合成途径、二萜合成途径及三萜合成途

径等, 筛选出的萜类相关差异代谢物如表 2 所示, 包括萜类骨架合成途径中的代谢物法尼基半胱氨酸(farnesylcysteine)、甘油醛-3-磷酸(D-glyceraldehyde 3-phosphate)、甲羟戊酸-5-磷酸[(R)-5-phosphomevalonate], 单萜类包括假紫罗兰酮(pseudoionone)、侧柏酮(thujone)、异戊薄荷酯(menthyl isovalerate)等代谢物, 二萜类包括赤霉素甲 3 (gibberellin A3)、鼠尾草(sageone)、鼠尾草酚(salviol)等代谢物, 三萜类代谢物包括竹节香附素 A (raddeanin A)、羊毛甾醇(lanosterol)等。其中, 赤霉素甲 4 (gibberellin A4)、西红花苷(crocin 3)、诺加霉素(nogalamycin)等 14 种代谢物在根中含量较高; 另外, 柳杉酚(sugiol)、

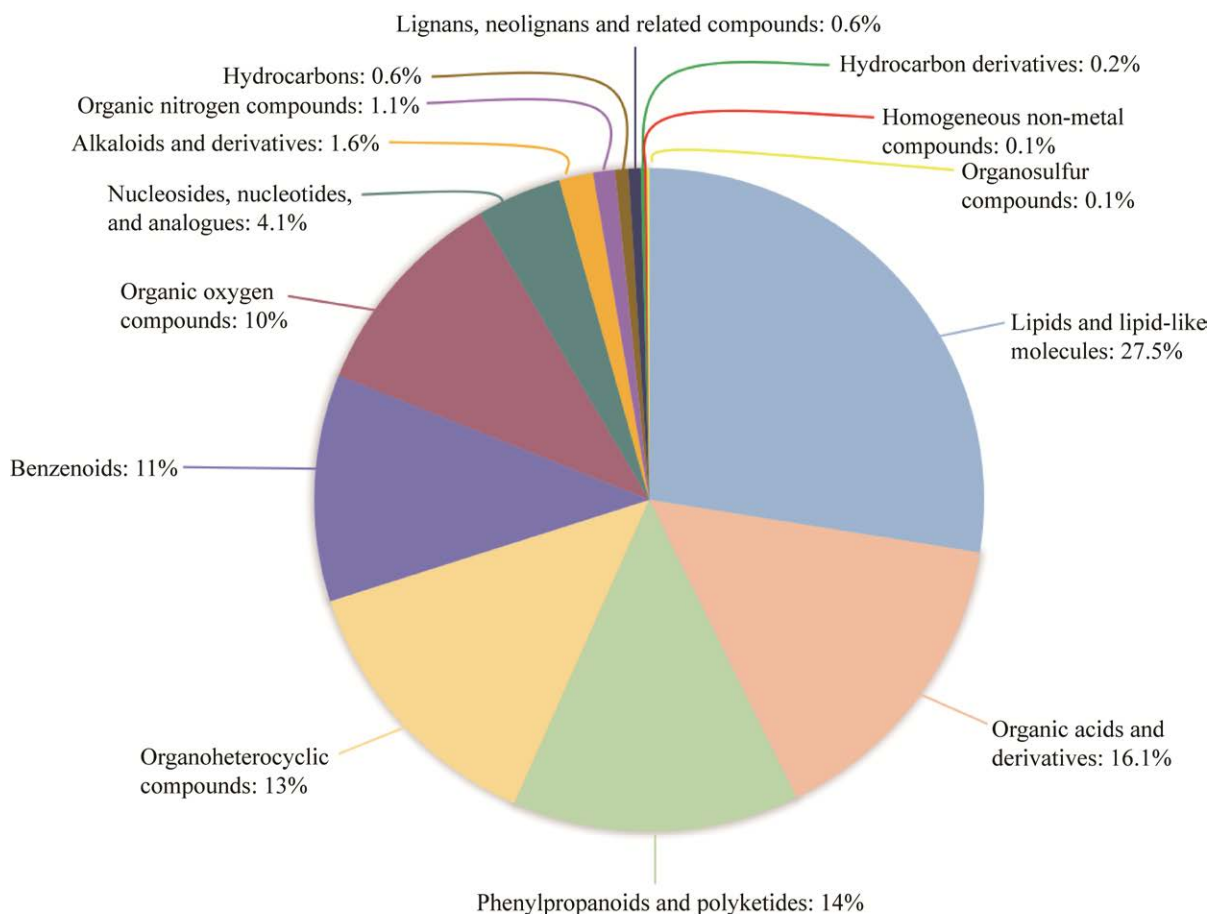


图 1 草珊瑚叶和根中差异代谢物 HMDB 化合物分类

Figure 1 Classification of differential metabolites in the leaves and roots of *Sarcandra glabra*.

表 2 草珊瑚叶和根中萜类相关差异代谢物

Table 2 Terpene related differential metabolites in leaves and roots of *Sarcandra glabra*

No.	Metabolite	Formula	Fold change (roots/leaves)	VIP	P-value
1	Farnesylcysteine	C ₁₈ H ₃₁ NO ₂ S	0.26	1.28	0.00
2	(R)-5-phosphomevalonate	C ₆ H ₁₃ O ₇ P	8.01	1.28	0.00
3	D-glyceraldehyde 3-phosphate	C ₃ H ₇ O ₆ P	0.77	1.12	0.00
4	P-cymene	C ₁₀ H ₁₄	0.01	1.21	0.00
5	Sabinol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.03	1.31	0.00
6	Thymol methyl ether	C ₁₁ H ₁₆ O	0.03	1.32	0.00
7	Pseudoionone	C ₁₃ H ₂₀ O	0.03	1.35	0.00
8	2-methyl-6-methylene-2E,7-octadien-1-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.18	1.16	0.00
9	(-)-beta-pinene	C ₁₀ H ₁₆	0.44	1.33	0.00
10	Thujone	C ₁₀ H ₁₆ O	0.43	1.07	0.00
11	4-isopropylbenzyl alcohol	C ₁₀ H ₁₄ O	0.05	1.12	0.01
12	2,2,4,4-tetramethyl-6-(1-oxobutyl)-1,3,5-cyclohexanetrione	C ₁₄ H ₂₀ O ₄	0.27	1.24	0.00
13	(S)-4-(4-methylphenyl)-2-pentanone	C ₁₂ H ₁₆ O	80.75	1.10	0.01
14	Menthyl isovalerate	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	0.40	1.34	0.00
15	(1R,2R,4R)-dihydrocarveol	C ₁₀ H ₁₈ O	5.49	1.32	0.00
16	(E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene	C ₁₁ H ₁₈	18.85	1.27	0.00
17	Enzacamene	C ₁₈ H ₂₂ O	0.20	1.36	0.00
18	4-isopropylphenylacetaldehyde	C ₁₁ H ₁₄ O	0.18	1.31	0.00
19	(4R,7S)-7-isopropyl-4-methyloxepan-2-one	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.05	1.09	0.01
20	Gibberellin A29-catabolite	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	8.38	1.31	0.00
21	Gibberellin A4	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	31.17	1.32	0.00
22	Gibberellin A8-catabolite	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	7.47	1.37	0.00
23	Docetaxel	C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄	2.45	1.30	0.00
24	Demethylphylloquinol	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	5.29E-11	1.24	0.00
25	Crocin 3	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄	12.63	1.37	0.00
26	Musabablisiane C	C ₂₈ H ₄₀ O ₁₂	2.14	1.11	0.01
27	Sageone	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	4.89	1.14	0.00
28	Sugiol	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	0.01	1.32	0.00
29	Ent-copalyl diphosphate	C ₂₀ H ₃₆ O ₇ P ₂	7.49	1.29	0.00
30	Salviol	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	0.18	1.36	0.00
31	Crocin dialdehyde	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	0.39	1.10	0.01
32	(3S,5R,6S)-5,6-epoxy-3-hydroxy-5,6-dihydro-12'-apo-beta-caroten-12'-al	C ₂₅ H ₃₄ O ₃	0.23	1.26	0.00
33	Gibberellin A3	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	0.69	1.01	0.01
34	Lanosterol	C ₃₀ H ₅₀ O	6.77E-05	1.18	0.00
35	Ganoderic acid F	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	0.14	1.21	0.00
36	Pulchrenoside A	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	2.75E-03	1.25	0.00
37	Raddeanin A	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	0.04	1.01	0.02
38	Lucidenic acid E	C ₂₉ H ₄₀ O ₈	0.32	1.17	0.00
39	Ardisiacrispin A	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₂	0.02	1.20	0.00

(待续)

(续表 2)				
No.	Metabolite	Formula	Fold change (roots/leaves)	VIP P-value
40	Alisol A 24-acetate	C ₃₂ H ₅₂ O ₆	643.04	1.23 0.00
41	Staphyloxanthin	C ₅₁ H ₇₈ O ₈	0.04	1.33 0.00
42	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	0.24	1.13 0.01
43	Nogalamycin	C ₃₉ H ₄₉ NO ₁₆	5.66	1.19 0.00
44	Pseudoginsenoside RT3	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	0.04	1.03 0.02
45	Ginsenoside Rh2	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	0.02	1.18 0.00
46	Glabrolide	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	0.20	1.17 0.00
47	Ganoderic acid C2	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	0.03	1.27 0.00
48	Neoxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	0.04	1.28 0.00
49	Phoenicoxanthin	C ₄₀ H ₅₂ O ₃	0.03	1.32 0.00
50	Canthaxanthin	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	0.05	1.14 0.01

鼠尾草酚(salviol)、角鲨烯(squalene)等 36 种代谢物在叶中含量更高, 差异代谢物热图如图 2 所示。

2.4 转录组测序质量分析

RNA 质量检测结果表明, RNA 完整性好, 总体满足建库标准需求, 可进一步进行转录组测序。通过 Illumina Nova Seq6000 测序平台对草珊瑚叶和根进行转录组测序, 各样品 Phred 值大于 20 的碱基比例(Q20)在 98.39%–98.56% 之间, Phred 值大于 30 的碱基比例(Q30)在 94.99%–95.40%之间, G+C 含量均在 45%左右。经过 Trinity 组装共得到 54 790 条 unigenes, 其中长度在 1 000 bp 以上的 unigenes 有 9 536 条, 如表 3 所示, 说明本研究样品测序组装结果合格, 能够为后续分析提供良好的数据支持。

2.5 差异基因表达分析以及 KEGG 富集分析

以 FC≥2 且 FDR<0.01 作为标准筛选差异表达基因。结果发现, 叶和根中共检测到 7 833 条差异表达基因, 其中 4 121 条基因表现为上调, 3 712 条基因表现为下调。

将上述差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析, 共富集到 132 条通路上, 富集最多的通

路为 RNA 转运(RNA transport)、mRNA 监测途径(mRNA surveillance pathway)、苯丙烷生物合成(phenylpropanoid biosynthesis)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis), 萜类相关途径包括: 萜类骨架生物合成(terpenoid backbone biosynthesis)、单萜生物合成(monoterpenoid biosynthesis)、二萜生物合成(diterpenoid biosynthesis)、倍半萜和三萜合成(sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis)、泛醌和其他萜类醌生物合成(ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis)。

2.6 萜类合成途径相关差异表达基因筛选

进一步筛选萜类合成途径相关差异表达基因, 共筛选出 57 条差异表达基因, 如表 4 所示, 其中萜类骨架合成途径中有 21 条, 包括 HMGCR、AACT、MVK、DXS 和 GGPS 等; 二萜合成途径中有 15 条, 包括 KAO、KS、GA2 ox 和 GA3 等; 倍半萜和三萜生物合成途径中有 14 条, 包括 FDFT1、SQLE 等; 单萜合成途径中有 7 条。将差异表达基因进行聚类热图分析, 如图 3 所示, 共有 17 条基因表现为根比叶高表达, 40 条基因表现为叶比根高表达。

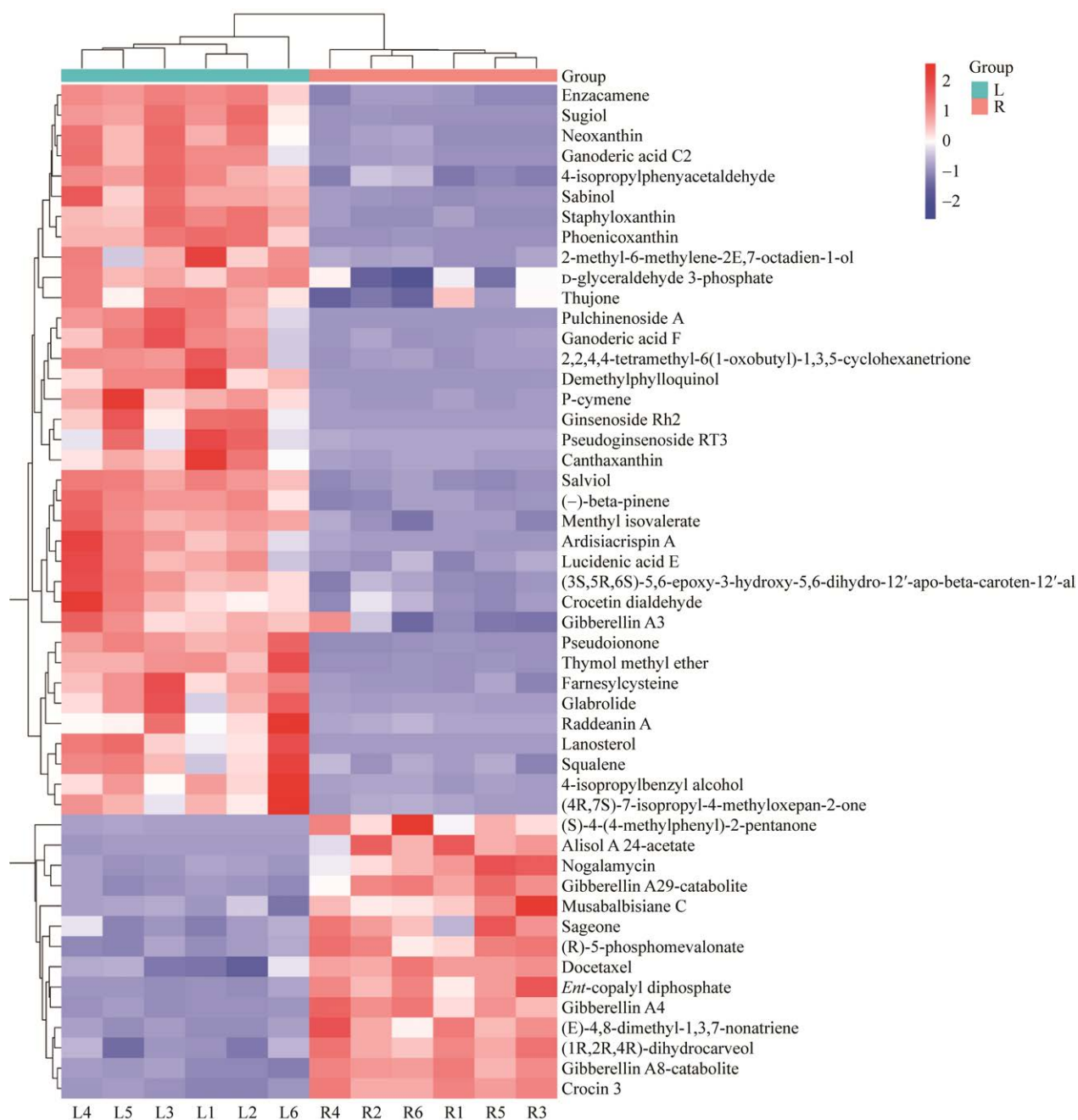


图2 草珊瑚叶和根中萜类相关差异代谢物热图

Figure 2 Heat map of terpenoid related differential metabolites in the leaves and roots of *Sarcandra glabra*. L1–L6: Leaves1–Leaves6; R1–R6: Root1–Root6; Red represents high expression level, blue represents low expression level.

2.7 转录组和代谢组联合分析

为了更好地了解草珊瑚叶和根中代谢物和基因在萜类积累中的关系，将差异代谢物和差异基因进行 KEGG 通路富集分析，如图 4 所

示，对与萜类合成途径相关的转录物和代谢物进行了详细的综合分析。在 KEGG 通路图中共富集了 8 种萜类差异代谢物，包括：甘油醛-3-磷酸(D-glyceraldehyde 3-phosphate)、角鲨烯

表 3 草珊瑚转录组测序结果
Table 3 Transcriptome sequencing results of *Sarcandra glabra*

Unigene length	Unigene	
	Number	Percentage (%)
300–500	25 872	4 722
500–1 000	9 981	1 822
1 000–2 000	9 536	1 740
2 000+	9 401	1 716
Total number	54 790	
Total length	60 066 256	
N50 length	1 951	
Mean length	1 096 299 617	

(squalene)、 β -蒎烯[(-)-beta-pinene]、6-羟基-3,7-二甲基辛酸内酯[(4R,7S)-7-isopropyl-4-methyloxepan-2-one]、法尼西基半胱氨(farnesylcysteine)、赤霉素 A3 (gibberallin A3)、甲羟戊酸-5-焦磷酸 (mevalonate-5p)、碳酸丙烯酯(ent-copalyl-pp)。11 条差异基因, 包括: *ACAT*、*HMGCR*、*MVK*、*DXS*、*IDI*、*FDPS*、*FDFT1*、*FLDH*、*KS*、*GA3* 和 *KAO*。整合通路结果显示, 萜类合成差异代谢物和差异基因在草珊瑚叶和根中表现出不同的积累模式, 部分差异基因表现出与下游代谢

表 4 草珊瑚叶和根中萜类相关差异表达基因
Table 4 Differentially expressed genes related to terpenoids in the leaves and roots of *Sarcandra glabra*

Pathways	Enzyme name (abbreviation)	KO ID	Number of unigenes
Terpenoid backbone biosynthesis	Isopentenyl diphosphate isomerase (IDI)	K01823	1
	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)	K01662	3
	Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)	K00021	5
	Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPS)	K13789	3
	Isoprene synthase (ISPS)	K12742	1
	Farnesyl diphosphate synthase (FDPS)	K00787	2
	Protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase (ICMT, STE14)	K00587	1
	Acetyl-CoA C-acetyltransferase (AACT)	K00626	1
	Mevalonate kinase (MVK)	K00869	1
	Geranylgeranyl diphosphate (CHIP, bchP)	K10960	1
	Polycis-polyprenyl diphosphate synthase (DHDDS, RER2, SRT1)	K11778	1
	NAD ⁺ -dependent farnesol dehydrogenase (FLDH)	K15891	1
	(-)-alpha-terpineol synthase	K18108	3
	(E)-8-carboxylinalool synthase (CYP76F14)	K23810	1
Monoterpenoid biosynthesis	8-hydroxygeraniol dehydrogenase (10HGO)	K23232	2
	(+)-neomenthol dehydrogenase	K15095	1
	Ent-kaurenoic acid hydroxylase (KAO)	K04123	2
	Ent-kaurene synthase (KS)	K04121	3
Diterpenoid biosynthesis	Momilactone-A synthase (MAS)	K13070	7
	Gibberellin 2-oxidase (GA2 ox)	K04125	1
	Ent-kaurene oxidase (GA3)	K04122	1
	(13E)-labda-7,13-dien-15-ol synthase	K16086	1
	(-)-germacrene D synthase (GERD)	K15803	11
	Farnesyl-diphosphate Farnesyltransferase (FDFT1)	K00801	1
Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	Squalene monooxygenase (SQLE, ERG1)	K00511	1
	(3S,6E)-nerolidol synthase (NES1)	K14175	1

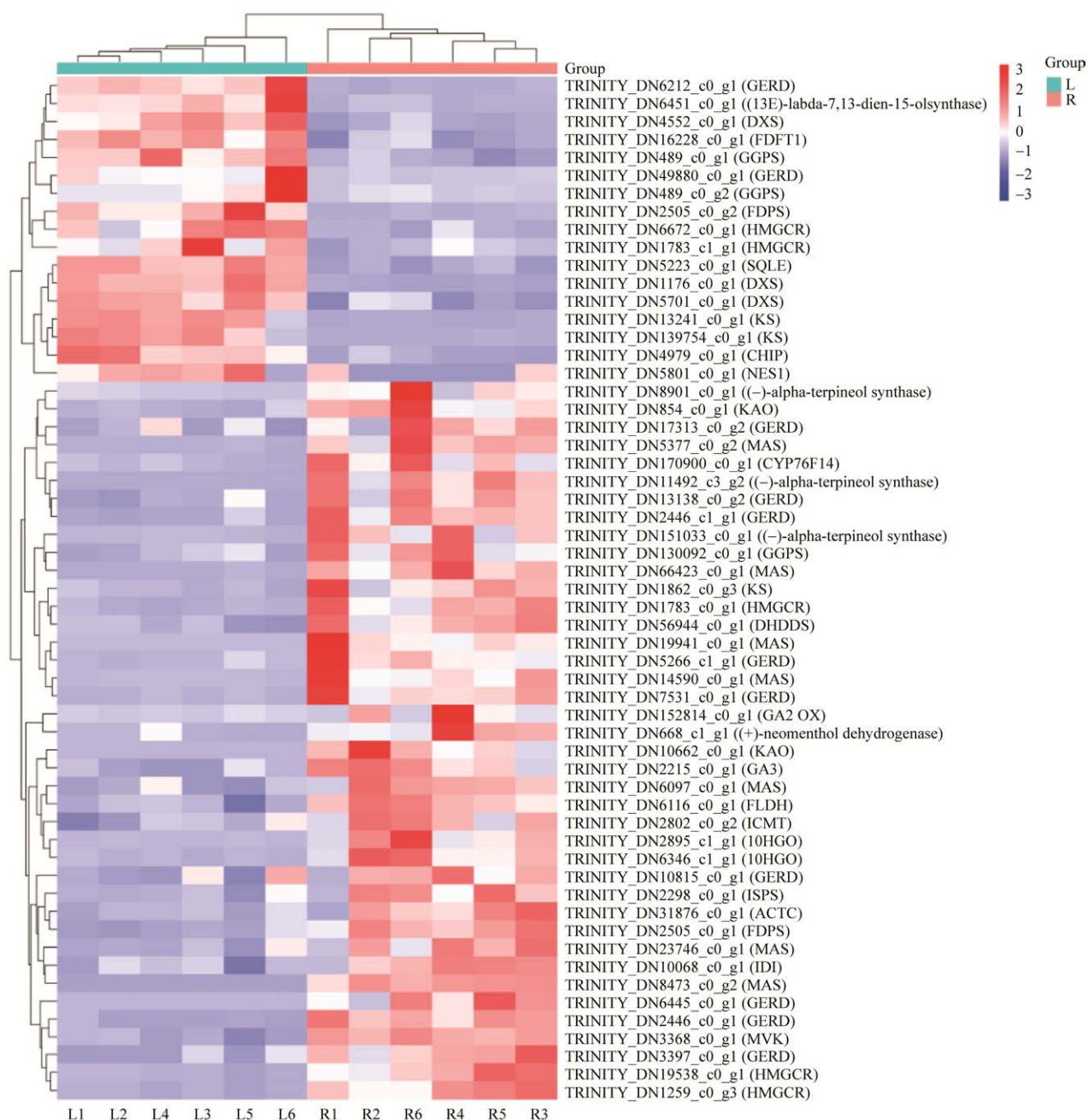
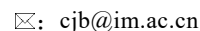


图3 草珊瑚叶和根中差异表达基因热图

Figure 3 Heat map of differentially expressed genes in the leaves and roots of *Sarcandra glabra*. L1–L6: Leaves1–Leaves6; R1–R6: Root1–Root6; Red represents high expression level, blue represents low expression level.

产物相同的变化趋势。在萜类骨架合成途径中, 代谢物甲羟戊酸-5-焦磷酸(mevalonate-5p)表现为在根中的含量高于叶中, 差异基因 *ACAT*、*HMGCR*、*MVK* 的调控趋势与其一致,

而甘油醛-3-磷酸(D-glyceraldehyde 3-phosphate)表现为在叶中含量高于根中, 差异基因 *DXS* 调控趋势与之一致; 在单萜合成途径中, β -蒎烯[(-)-beta-pinene]、6-羟基-3,7-二甲基辛酸内酯



[(4R,7S)-7-isopropyl-4-methyloxe pan-2-one] 表现为在叶中的含量更高, 差异基因 *FDPS* 的调控趋势与之一致; 二萜合成途径下游代谢物赤霉素 A3 (gibberallin A3) 表现为在叶中的含量高于根中, 差异基因 *KS*、*KAO* 调控趋势与其一致; 除此之外, 三萜合成途径中, 角鲨烯 (squalene) 在叶和根中的积累模式表现为在叶中的含量更高, 而差异基因 *FDFT1* 表现为在根中上调, 推测 *FDFT1* 对角鲨烯 (squalene) 起到负向调控作用。因此, 推测这些差异基因可能是调控草珊瑚不同组织部位中萜类代谢物差异积累的关键基因。

2.8 转录因子分析

在植物中, TF 通过促进或抑制 RNA 聚合酶复合物与启动子之间的相互作用从而调节特定基因或一组基因的表达。草珊瑚叶和根的转录组数据中共有 928 条 unigenes 被注释为 TF, 它们被分为 68 个 TF 家族。其中排名前 10 的转录因子家族主要包括: *C2H2*、*AP2/ERF-ERF*、*bHLH* 和 *NAC* 等, 结果如表 5 所示。

进一步对这 68 个 TF 家族的 unigenes 进行富集分析, 发现共有 7 个转录因子家族参与调控草珊瑚萜类合成途径, 其中 *AP2/ERF-ERF* 家族的 unigenes 可以调控 *DXS*、*GGPS*、*FDPS* 和

FLDH; *MYB* 家族的 unigenes 可以调控 *DXS*、*FDPS*、*FLDH*、*GERD* 和 *GGPS*; *BBR-BPC* 家族的 unigenes 可以调控 *DXS*、*FDPS*、*FLDH* 和 *GERD*; *C2H2* 家族的 unigenes 可以调控 *DXS*、*FLDH*; *MADS-M-type* 家族的 unigenes 可以调控 *DXS*、*FDPS*、*FLDH* 和 *GERD*; *MADS-MIKC* 家族的 unigenes 可以调控 *DXS*、*FDPS*、*FLDH* 和 *GERD*; *Trihelix* 家族的 unigenes 可以调控 *GGPS*, 调控关系如图 5 所示。

2.9 qRT-PCR 验证

在鉴定出的候选基因中随机选取 8 个基因进行 qRT-PCR 验证, 结果表明, 如图 6 所示, *DXS* (TRINITY_DN1176_c0_g1、TRINITY_DN4552_c0_g1)、*FDFT1* (TRINITY_DN16228_c0_g1) 和 *GGPS* (TRINITY_DN489_c0_g1) 在叶中比在根中具有更高的表达水平, *KAO* (TRINITY_DN10662_c0_g1)、*MVK* (TRINITY_DN3368_c0_g1)、*FDPS* (TRINITY_DN2505_c0_g1) 和 *ACTC* (TRINITY_DN31876_c0_g1) 在根中比在叶中具有更高的表达水平。通过 qRT-PCR 定量的所有基因在叶和根中的表达模式与测序结果一致。

3 讨论与结论

草珊瑚是一味传统的中药材, 具有清热解毒、祛风活血、消肿止痛和抗菌消炎的功效, 萜类化合物是其主要药效成分之一。为了探究草珊瑚不同组织部位中的萜类物质差异积累情况, 本研究使用 LC-QTOF 技术对草珊瑚叶和根中代谢物进行定性定量分析, 结果表明, 在叶和根中检测到法尼西基半胱氨酸 (farnesylcysteine)、甘油醛-3-磷酸 (D-glyceraldehyde 3-phosphate)、甲羟戊酸-5-磷酸 [(R)-5-phosphomevalonate]、假紫罗兰酮 (pseudoionone)、侧柏酮 (thujone) 和异戊酸薄荷酯 (menthyl isovalerate) 等 50 种萜类相

表 5 排名前 10 的转录因子家族

Table 5 The top 10 transcription factor families

TF family	Numbers
<i>C2H2</i>	78
<i>AP2/ERF-ERF</i>	67
<i>bHLH</i>	51
<i>NAC</i>	47
<i>MYB</i>	47
<i>MYB-related</i>	44
<i>C3H</i>	44
<i>bZIP</i>	43
<i>WRKY</i>	38
<i>GRAS</i>	28

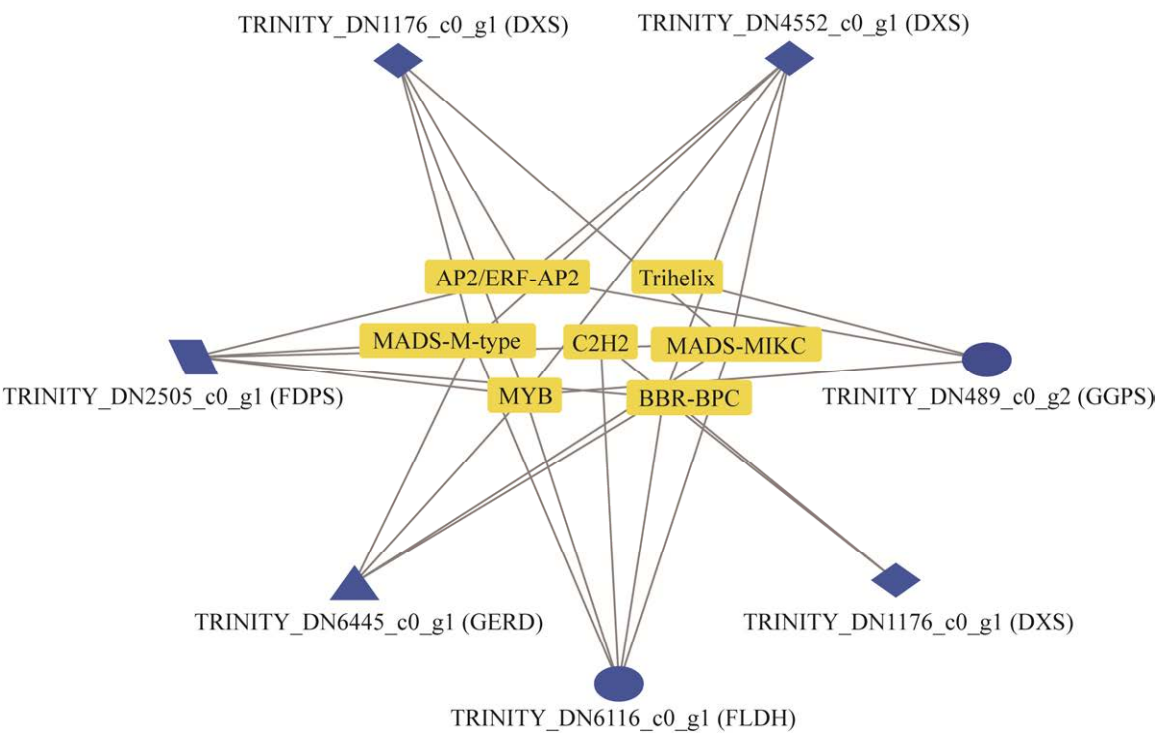


图 5 草珊瑚萜类相关转录因子与酶基因调控关系图
Figure 5 Relationship between terpenoid related transcription factors and enzyme gene regulation in *Sarcandra glabra*.

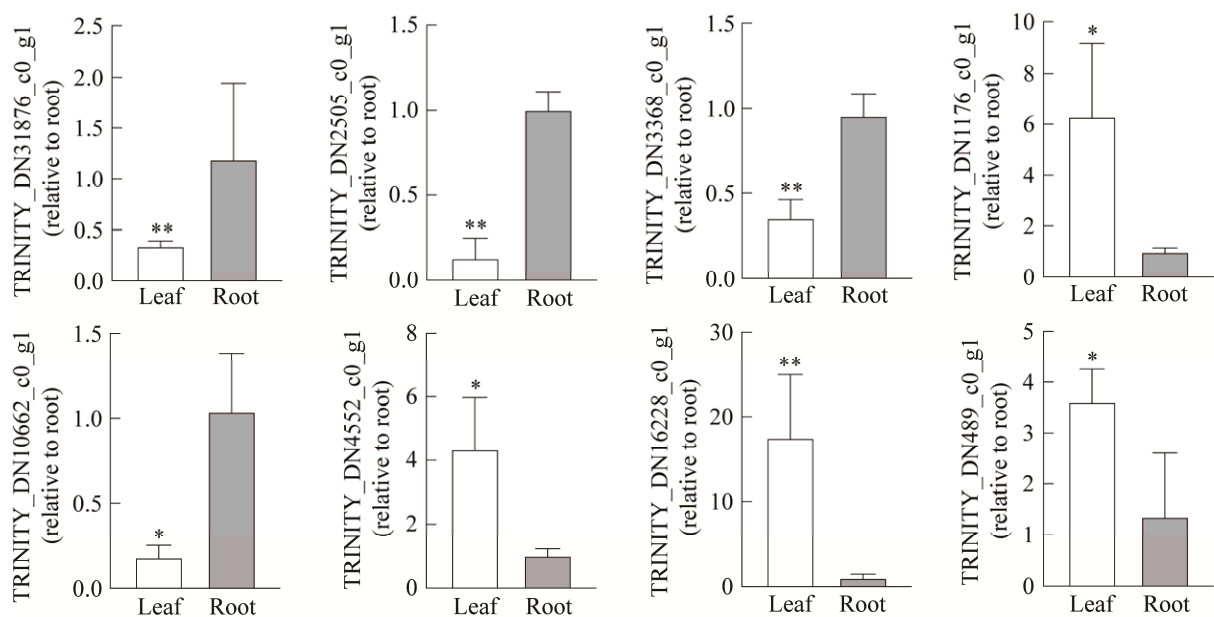


图 6 草珊瑚萜类代谢途径关键基因的 qRT-PCR 验证
Figure 6 qRT-PCR validation of key genes in the terpenoid metabolism pathway of *Sarcandra glabra*.
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

关差异代谢物。其中西红花苷(crocin)、多西紫杉醇(docetaxel)、24-乙酰泽泻醇 A (alisol A 24-acetate)在根中含量更高,根据文献报道,西红花苷(crocin)具有一定的抗炎作用,它可以通过与蛋白激酶 p-I κ B kinase (IKK)的相互作用阻断 NF- κ B 信号的激活,从而有效抑制 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的产生,是一种治疗类风湿性关节炎的潜在药物^[26],此外,西红花苷还可以通过调节原肌球蛋白 4 (tropomyosin 4, TPM4)基因表达来抑制胃癌细胞 AGS 细胞的增殖^[27];多西紫杉醇(docetaxel)能够激活 p53 表达,引起细胞凋亡性死亡,显著抑制口腔癌细胞的增殖^[28];24-乙酰泽泻醇 A (alisol A 24-acetate)通过 AMPK/mTOR 通路抑制活性氧和炎症反应,显著减轻了关节软骨的严重程度和基质降解,改善骨关节炎^[29],还可以有效地防止去卵巢小鼠的骨丢失改善骨质疏松^[30],此外,还能够有效改善肝脏脂肪变性,对非酒精性脂肪肝有治疗作用^[31]。因此,以上代谢物在根中的含量及生物活性可能影响临床上治疗骨折、风湿性关节炎、胃痛、肝炎和口腔炎方面的功效。另外,柳杉酚(sugiol)、竹节香附素 A (raddeanin A)、人参皂苷 Rh2 (ginsenoside Rh2)在叶中的含量更高。柳杉酚(sugiol)有显著的骨保护作用,可以改善绝经后女性骨小梁微观结构,有效降低骨折的风险^[32];竹节香附素 A (raddeanin A)通过诱导细胞凋亡和增加活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生抑制肺癌细胞的增殖^[33],同时,还能有效抑制人结肠癌 HCT-116 细胞增殖,又能诱导该细胞的凋亡^[34];人参皂苷 Rh2 (ginsenoside Rh2)能通过靶向 miR-150-3p/SRCIN/Wnt 轴抑制结肠癌生长^[35],还可通过激活 Akt 和 Erk 通路促进神经分化,对神经退行性疾病起到治疗作用^[36]。因此,以上代谢物在叶中的含量及生物活性可

能影响叶在临床上治疗骨折、肺炎、急性胃肠炎、头晕和风湿骨痛方面的功效。综上所述,以上萜类相关差异代谢物均有各自生物活性,而代谢物在不同组织部位的差异积累对药效品质具有一定的影响,通过对不同组织部位的精准利用有助于后续药效价值的提高,因此,本研究对草珊瑚叶和根中萜类成分差异积累情况的分析对其药效的精准利用具有一定的指导意义。

迄今为止,关于草珊瑚的分子遗传学研究尚不完整,限制了草珊瑚萜类合成代谢相关酶基因的挖掘,因此,本研究通过转录组测序获取草珊瑚酶单基因簇信息,并筛选其不同组织部位中的萜类相关差异基因,获得 26 类共 57 条差异基因。ACAT 是 MVA 途径中一个重要的酶,它能够催化乙酰辅酶 A 合成乙酰乙酰辅酶 A^[37],乙酰乙酰辅酶 A 首先在 HMGS 的催化下生成 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A,之后又被 HMGR 催化成 MVA。其中 HMGR 是 MVA 途径中的关键限速酶,是萜类代谢过程中的重要调控点^[38-39]。Wei 等^[40]和 Zheng 等^[41]研究发现 HMGR 在萜类化合物合成中起着至关重要的作用,而且对下游萜类代谢物的类型和产量起到调控作用。此外, MVK 也是 MVA 途径中的关键限速酶之一, MVK 对于萜类物质的合成起到限制和控制的作用^[42]。MVA 在 MVK 的催化下生成甲羟戊酸-5-焦磷酸(mevalonate-5p)。在本研究中, ACAT、HMGR 和 MVK 均表现为在根中的表达量高于叶中,其下游代谢产物甲羟戊酸-5-焦磷酸(mevalonate-5p)的表达趋势与之相同。DXS 为 MEP 途径中合成 MEP 的第一个关键限速酶^[43],在 MEP 途径中起着至关重要的调控作用。已有研究表明, DXS 表达水平的高低,直接影响植物次生代谢产物的积累^[44]。Jadaun 等^[45]研究发现, DXS 的过度表达增强了

玫瑰香味天竺葵和黄花中萜类二次代谢产物的积累。本研究中, *DXS* 的表达水平与差异代谢物甘油醛-3-磷酸(D-glyceraldehyde 3-phosphate)的表达水平均表现为在叶中的含量高于根中。说明这些关键酶基因在萜类上游合成阶段起到重要作用, 对草珊瑚萜类合成及次生代谢产物有重要的影响。FPP 是各种萜类物质合成的重要前体物质, *FDPS* 是 FPP 合成最重要的酶^[46]。本研究中, *FDPS* 与其下游产物法尼西基半胱氨酸(farnesylcysteine)和单萜类下游代谢物 β -蒎烯[(-)-beta-pinene]、6-羟基-3,7-二甲基辛酸内酯[(4R,7S)-7-isopropyl-4-methyloxepan-2-one]具有相同的变化趋势均表现为在叶中高表达。角鲨烯(squalene)是三萜合成的前体物质, 而 *FDFT1* 是催化 FPP 转化成角鲨烯(squalene)的关键酶, 在本研究中 *FDFT1* 表现为在根中高表达, 而角鲨烯(squalene)表现为在叶中含量更高, 推测 *FDFT1* 负向调控角鲨烯(squalene)的积累。在二萜下游合成途径中共有 3 种关键酶基因参与代谢, 包括 *KS*、*GA3* 和 *KAO*, 其下游代谢产物碳酸丙烯酯(ent-copalyl-pp)与 *GA3*、*KAO* 在叶和根中表达量变化趋势一致, 均表现为在根中的含量高于叶中。而代谢物赤霉素 A3 (gibberallin A3) 与 *KS* 在叶和根中表达量变化趋势一致, 均表现为在叶中的含量高于根中。Yang 等^[47]发现 *KS* 中单氨基酸的变异可导致茶叶二萜生物合成途径的发散演变。综上所述, 推测以上几种酶基因为草珊瑚萜类合成途径中的关键酶, 影响草珊瑚叶和根中萜类化合物的含量差异, 进一步使叶和根之间药效不同。

转录因子能够通过激活与次生代谢产物合成相关的酶的级联表达参与药效活性成分积累的调控。目前对萜类合成途径上游关键酶基因研究较多, 但对其转录调控机制研究还比较

少。本研究预测结果显示 *AP2/ERF-ERF*、*MYB*、*BBR-BPC*、*C2H2*、*MADS-M-type*、*MADS-MIKC* 和 *Trihelix* 这 7 个关键转录因子参与调控草珊瑚萜类合成途径, 并对酶基因 *DXS*、*FDPS*、*FLDH*、*GERD*、*GGPS* 和 *GERD* 具有调控作用。据有关文献报道, *MYB* 转录因子蛋白是一个大型的植物转录因子家族, *SmMYB98* 能够参与丹参酮的积累, 降低赤霉素的合成, 改变毛状根的体系结构, 同时促进丹参酮的合成^[48]; 拟南芥中 *AtMYB62* 的过表达可抑制早期赤霉素生物合成基因的表达, 来调节赤霉素的生物合成^[49]; *AP2/EREBP* 转录因子家族在二萜合成过程中发挥着一定的作用^[50], *SmERF128* 积极调节鼠尾草中二萜化合物含量, 它的过表达提高了 *CPS*、*KS*、*CYP450* 的表达水平^[51]; 薰衣草中 *AP2-EREBP*、*MADS* 等转录因子可能与单萜芳樟醇和乙酸芳樟酯释放相关, 推测两种转录因子调控不同的品种释放不同的单萜物质^[52]; *C2H2* 可能参与了由蓝色和红色两种不同光质量处理的玉米芽中萜类化合物的差异性积累^[53]。因此, 推测以上 7 种转录因子可能是参与调控草珊瑚萜类合成过程的关键酶基因, 在其叶和根之间萜类化合物差异积累过程中发挥着重要作用。

qRT-PCR 验证结果表明, 随机选取的草珊瑚不同组织中萜类合成途径的关键酶基因表达趋势与测序结果一致, 证明测序结果真实可靠。综上所述, 为了分析草珊瑚萜类化合物生物合成的组织特异性调控机制, 本研究对草珊瑚叶和根进行了代谢组学和转录组学分析, 鉴定了不同组织部位中萜类差异代谢物, 挖掘了与萜类差异积累密切相关的关键酶基因及转录因子。研究结果将有助于为探究草珊瑚叶和根表达特异性、解释不同药用部位疗效差异原因以及后续合理提取利用提供理论依据。

REFERENCES

- [1] 陈芳有, 陈志超, 罗永明. 草珊瑚化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(4): 872-879. CHEN FY, CHEN ZC, LUO YM. Research progress on chemical constituents and biological activities of *Sarcandra glabra*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(4): 872-879 (in Chinese).
- [2] 王超, 朱丽萍, 杨敬芝, 李创军, 张东明. 草珊瑚醋酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 714-717. WANG C, ZHU LP, YANG JZ, LI CJ, ZHANG DM. Chemical constituents from *Sarcandra glabra*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(6): 714-717 (in Chinese).
- [3] 王忠伟, 黄安香, 杨守禄, 邬能英, 柏文恋, 李丹. 草珊瑚活性成分提取及含量测定方法研究[J]. 贵州林业科技, 2022, 50(1): 14-18, 44. WANG ZW, HUANG AX, YANG SL, WU NY, BAI WL, LI D. Study on methods of extraction and content determination of active constituents of *Sarcandra glabra*[J]. Guizhou Forestry Science and Technology, 2022, 50(1): 14-18, 44 (in Chinese).
- [4] 徐艳琴, 刘小丽, 黄小方, 葛菲. 草珊瑚的研究现状与展望[J]. 中草药, 2011, 42(12): 2552-2559. XU YQ, LIU XL, HUANG XF, GE F. Status and prospect of studies on *Sarcandra glabra*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(12): 2552-2559 (in Chinese).
- [5] 贾敏如, 张艺. 中国民族药辞典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016. JIA MR, ZHANG Y. Dictionary of Chinese Ethnic Medicine[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2016 (in Chinese).
- [6] FENG Q, SI Y, ZHU LL, WANG F, FANG JQ, PAN C, GAO XD, LIU W. Anti-inflammatory effects of a SERP 30 polysaccharide from the residue of *Sarcandra glabra* against lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 293: 115262.
- [7] LIU W, GONG XQ, LUO JH, JIANG LL, LU WS, PAN C, YAO WB, GAO XD, TIAN H. A purified acidic polysaccharide from *Sarcandra glabra* as vaccine adjuvant to enhance anti-tumor effect of cancer vaccine[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 263: 117967.
- [8] LIU W, ZHENG Y, ZHANG ZZ, YAO WB, GAO XD. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of *Sarcandra glabra* polysaccharide in type 2 diabetic mice[J]. Food Function, 2014, 5(11): 2850-2860.
- [9] LIU X, YANG J, FU J, XU PL, XIE TG, BAI LP, JIANG ZH, ZHU GY. Monoterpene-flavonoid conjugates from *Sarcandra glabra* and their autophagy modulating activities[J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 112: 104830.
- [10] WANG YY, LI QR, CHI J, LI JX, KONG LY, LUO J. Sesquiterpenoids from the leaves of *Sarcandra glabra*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2022, 20(3): 215-220.
- [11] 葛楚源, 陈文列, 李钻芳, 廖乃顺, 黄云梅, 梁一池, 刘献祥. 草珊瑚植物叶、茎显微结构与黄酮组织化学定位研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(4): 438-441. GE CY, CHEN WL, LI ZF, LIAO NS, HUANG YM, LIANG YC, LIU XX. Microstructure and histochemical localization of flavonoids in leaves and stem in *Sarcandra glabra*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(4): 438-441 (in Chinese).
- [12] LIU CP, LIU JX, GUJY, LIU F, LI JH, BIN YANG, YUAN ZHENG, JIE LI, WU SH, WU QH, XIAN ZHANG, LI LM, YANG HL, WANG L, LI X. Combination effect of three main constituents from *Sarcandra glabra* inhibits oxidative stress in the mice following acute lung injury: a role of MAPK-NF- κ B pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 11: 580064.
- [13] LI H, WANG ZC, SUN XY, PAN C, GAO XD, LIU W. Chemical and rheological properties of proteoglycans from *Sarcandra glabra* (thunb.) nakai[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 641-650.
- [14] YAERMAIMAITI S, WANG P, LUO J, LI RJ, KONG LY. Sesquiterpenoids from the seeds of *Sarcandra glabra* and the potential anti-inflammatory effects[J]. Fitoterapia, 2016, 111: 7-11.
- [15] LI YT, LI SF, LEI C, YOU JQ, HUANG JC, HOU AJ. Dimeric sesquiterpenoids and anti-inflammatory constituents of *Sarcandra glabra*[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 124: 105821.
- [16] JIN L, GUAN X, LIU W, ZHANG X, YAN W, YAO WB, GAO XD. Characterization and antioxidant activity of a polysaccharide extracted from *Sarcandra glabra*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(1): 524-532.
- [17] GERSHENZON J, CROTEAU RB. Terpenoid

- biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes[M]// Lipid Metabolism in Plants. Boca Raton: CRC Press, 2018: 339-388.
- [18] THOLL D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2015, 148: 63-106.
- [19] BERGMAN ME, DAVIS B, PHILLIPS MA. Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action[J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3961.
- [20] 马转转, 庞潇卿, 谌容, 裴晓林, 王秋岩, 谢恬, 殷晓浦. 萜类化合物生物合成途径中关键酶的研究进展[J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 14(6): 608-615.
- MA ZZ, PANG XQ, CHEN R, PEI XL, WANG QY, XIE T, YIN XP. Research advances of key enzymes in the biosynthesis pathways of isoprenoids[J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2015, 14(6): 608-615 (in Chinese).
- [21] 慧芳, 刘秀岩, 李宗谕, 刘福顺, 杨世海. 转录组测序技术在药用植物研究中的应用[J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6149-6155.
- HUI F, LIU XY, LI ZY, LIU FS, YANG SH. Application of transcriptome sequencing in study of medicinal plants[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(24): 6149-6155 (in Chinese).
- [22] 李妍, 徐兴祥. 高通量测序技术的研究进展[J]. *中国医学工程*, 2019, 27(3): 32-37.
- LI Y, XU XX. Research progress of high-throughput sequencing technology[J]. *China Medical Engineering*, 2019, 27(3): 32-37 (in Chinese).
- [23] YUE XF, JU YL, ZHANG HJ, WANG ZH, XU HD, ZHANG ZW. Integrated transcriptomic and metabolomic analysis reveals the changes in monoterpene compounds during the development of Muscat Hamburg (*Vitis vinifera* L.) grape berries[J]. *Food Research International*, 2022, 162: 112065.
- [24] WANG G, WANG Y, LI J, ZHOU ZJ, YANG SP, WANG LH, PENG JW, JIAO HJ, SUN XM. Analysis of floral differences in terpenoids between two genotypes of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) by HS-SPME-GC/MS-based on the metabolome and transcriptome[J]. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2022, 31: 100403.
- [25] WANG ZH, ZHANG GQ, ZHANG ZW, LI ZH. Target metabolome and transcriptome analysis reveal molecular mechanism associated with changes of tea quality at different development stages[J]. *Molecular Biotechnology*, 2023, 65(1): 52-60.
- [26] LI LJ, ZHANG HS, JIN SL, LIU C. Effects of crocin on inflammatory activities in human fibroblast-like synoviocytes and collagen-induced arthritis in mice[J]. *Immunologic Research*, 2018, 66(3): 406-413.
- [27] LUO YS, YU PJ, ZHAO JH, GUO QJ, FAN BH, DIAO YZ, JIN YL, WU J, ZHANG CW. Inhibitory effect of crocin against gastric carcinoma via regulating *TPM4* gene[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2021, 14: 111-122.
- [28] SWAIN S, SAMAL S, MEHER R, DUBEY D, MIR S, NAYAK B, SAHU M, NAIK P, RATH G. *In-silico* and *in-vitro* evaluation of docetaxel and berberine as potential p53 modulating apoptotic inducers in oral squamous cell carcinoma[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2022, 12(12): 530.
- [29] XU GS, HE ZS, LIU YP. Alisol A 24-acetate ameliorates osteoarthritis progression by inhibiting reactive oxygen species and inflammatory response through the AMPK/mTOR pathway[J]. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2023, 11(5): e848.
- [30] HWANG YH, KANG KY, LEE SJ, NAM SJ, SON YJ, YEE ST. The protective effects of alisol A 24-acetate from *Alisma canaliculatum* on ovariectomy induced bone loss *in vivo*[J]. *Molecules*, 2016, 21(1): 74.
- [31] ZENG L, TANG WJ, YIN JJ, FENG LJ, LI YB, YAO XR, ZHOU BJ. Alisol A 24-acetate prevents hepatic steatosis and metabolic disorders in HepG2 cells[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 40(3/4): 453-464.
- [32] KHAN MF, DEV K, LAHIRI S, DIXIT M, TRIVEDI R, SINGH D, MAURYA R. Osteogenic activity of natural diterpenoids isolated from *Cupressus sempervirens* fruits in calvarial derived osteoblast cells *via* differentiation and mineralization[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(14): 1794-1800.
- [33] JIN WG, LU SC, WANG XL, SHU YS, SHI HC. Raddeanin A suppresses lung cancer cell proliferation *via* induction of apoptosis and increased production of ROS[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 2020, 66(7): 174-179.
- [34] 王宇, 姜修博, 韩豆, 朱志铭, 宋长琴, 赵昂, 张琪, 刘昌辉, 马博. 竹节香附素 A 对人结肠癌细胞 HCT-116 增殖、凋亡、迁移及侵袭活性的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(2): 123-130.

- WANG Y, JIANG XB, HAN D, ZHU ZM, SONG CQ, ZHAO A, ZHAMG Q, LIU CH, MA B. Effects of raddeanin A on proliferation, apoptosis, migration and invasion of human carcinoma colon cell line HCT-116[J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2018, 29(2): 123-130 (in Chinese).
- [35] LI SP, HAN WF, HE QC, WANG Y, JIN G, ZHANG YC. Ginsenoside Rh2 suppresses colon cancer growth by targeting the miR-150-3p/SRCIN1/Wnt axis[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2023, 55(4): 633-648.
- [36] 何俊桓, 徐浩仁, 文献学, 童美玲, 陈晓勇, 李姝祺, 李彬, 唐根云. 人参皂苷 Rh2 通过激活 Akt 和 Erk 通路促进神经分化[J]. *人参研究*, 2023, 35(1): 2-6.
- HE JH, XU HR, WEN XX, TONG ML, CHEN XY, LI SQ, LI B, TANG GY. Ginsenoside Rh2 promotes neural differentiation by activating Akt and Erk pathways[J]. *Ginseng Research*, 2023, 35(1): 2-6 (in Chinese).
- [37] 张健, 潘媛, 王钰, 陈大霞. 不同年份桔梗转录组学分析及桔梗皂苷生物合成关键基因挖掘[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(6): 1386-1392.
- ZHANG J, PAN Y, WANG Y, CHEN DX. Transcriptome analysis of *Platycodon grandiflorum* at different growth years and discovery of key genes for platycodin biosynthesis[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(6): 1386-1392 (in Chinese).
- [38] LIAO P, WANG H, HEMMERLIN A, NAGEGOWDA DA, BACH TJ, WANG MF, CHYE ML. Past achievements, current status and future perspectives of studies on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGS) in the mevalonate (MVA) pathway[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(7): 1005-1022.
- [39] 郑婷, 魏灵珠, 程建徽, 向江, 吴江. 植物 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)研究进展[J]. *植物生理学报*, 2022, 58(6): 1037-1044.
- ZHENG T, WEI LZ, CHENG JH, XIANG J, WU J. Research progress of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(6): 1037-1044 (in Chinese).
- [40] WEI H, XU C, MOVAHEDI A, SUN WB, LI DW, ZHUGE Q. Characterization and function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *Populus trichocarpa*: overexpression of *PtHMGR* enhances terpenoids in transgenic poplar[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1476.
- [41] ZHENG T, GUANLB, YU K, HAIDER MS, NASIM M, LIU ZJ, LI T, ZHANG KK, JIU ST, JIA HF, FANG JG. Expressional diversity of grapevine 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (VvHMGR) in different grapes genotypes[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 1-13.
- [42] 王鹏杰, 陈丹, 曹红利, 姚雪倩, 陈笛, 杨国一, 郑知临, 叶乃兴. 茶树甲羟戊酸激酶基因 CsMVK 克隆及表达特性分析[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(10): 1741-1747.
- WANG PJ, CHEN D, CAO HL, YAO XQ, CHEN D, YANG GY, ZHENG ZL, YE NX. Cloning and expression of mevalonate kinase gene *CsMVK* in tea plant[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(10): 1741-1747 (in Chinese).
- [43] TIAN SK, WANG DD, YANG L, ZHANG ZX, LIU Y. A systematic review of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase in terpenoid biosynthesis in plants[J]. *Plant Growth Regulation*, 2022, 96(2): 221-235.
- [44] LI R, CHEN PZ, ZHU LZ, WU F, CHEN Y, ZHU PH, JI KS. Characterization and function of the 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate synthase (*DXS*) gene related to terpenoid synthesis in *Pinus massoniana*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(2): 848.
- [45] JADAUN JS, SANGWAN NS, NARNOLIYA LK, SINGH N, BANSAL S, MISHRA B, SANGWAN RS. Over-expression of *DXS* gene enhances terpenoidal secondary metabolite accumulation in rose-scented *Geranium* and *Withania somnifera*: active involvement of plastid isoprenogenic pathway in their biosynthesis[J]. *Physiologia Plantarum*, 2017, 159(4): 381-400.
- [46] 杨国, 李鸿慧, 金叶飞, 董丽佳, 莫亿伟, 罗洁. 基于转录组分析白术倍半萜生物合成的相关基因[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(12): 1827-1838.
- YANG G, LI HH, JIN YF, DONG LJ, MO YW, LUO J. Analysis of genes related to biosynthesis of sesquiterpene in *Atractylodes macrocephala* by transcriptome[J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, 55(12): 1827-1838 (in Chinese).
- [47] YANG M, LIUGH, YAMAMURA Y, CHEN F, FU JY. Divergent evolution of the diterpene biosynthesis pathway in tea plants (*Camellia sinensis*) caused by single amino acid variation of *ent*-kaurene synthase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020,

- 68(37): 9930-9939.
- [48] HAO XL, PU ZQ, CAO G, YOU DW, ZHOU Y, DENG CP, SHI M, NILE SH, WANG Y, ZHOU W, KAI GY. Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by *SmMYB98* in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. Journal of Advanced Research, 2020, 23: 1-12.
- [49] DEVAIAH BN, MADHUVANTHI R, KARTHIKEYAN AS, RAGHOTHAMA KG. Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the *MYB62* transcription factor in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2009, 2(1): 43-58.
- [50] LI YG, MOU FJ, LI KZ. *De novo* RNA sequencing and analysis reveal the putative genes involved in diterpenoid biosynthesis in *Aconitum vilmorinianum* roots[J]. 3 Biotech, 2021, 11(2): 1-12.
- [51] ZHANG Y, JI AJ, XU ZC, LUO HM, SONG JY. The *AP2/ERF* transcription factor *SmERF128* positively regulates diterpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 100(1/2): 83-93.
- [52] LI H, LI JR, DONG YM, HAO HP, LING ZY, BAI HT, WANG HF, CUI HX, SHI L. Time-series transcriptome provides insights into the gene regulation network involved in the volatile terpenoid metabolism during the flower development of lavender[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 1-17.
- [53] XIANG N, HUJG, ZHANG B, CHENG YY, WANG SY, GUO XB. Effect of light qualities on volatiles metabolism in maize (*Zea mays* L.) sprouts[J]. Food Research International, 2022, 156: 111340.

(本文责编 陈宏宇)