

## 山茱萸转录因子 CobHLH7 基因的克隆及分析

杨萌萌<sup>1,2</sup>, 周爽<sup>1,2</sup>, 李志红<sup>1,2</sup>, 徐静雅<sup>1,2</sup>, 胥华伟<sup>1,2</sup>, 侯典云<sup>1,2\*</sup>

1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471003

2. 洛阳市道地药材繁育与创新利用工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023

**摘要:** 目的 克隆山茱萸转录因子 CobHLH7 的 cDNA 序列。方法 以转录组数据中 unigene c15204\_g1 序列为参考, 在其开放阅读框两端设计特异引物, 提取山茱萸果实总 RNA, 并反转录成 cDNA, 以此为模板, 经 RT-PCR 扩增、连接 pMD19-T 克隆载体并测序, 获得 CobHLH7 的 cDNA 序列。通过 Protparam、ProtScale、SOPMA 等软件, 对其进行生物信息学分析。结果 CobHLH7 的 cDNA 长度为 941 bp, 编码 266 个氨基酸, 其相对分子质量为 29 220, 等电点为 6.32。经 SOPMA 在线软件预测, 该蛋白为不稳定蛋白, 其高级结构以  $\alpha$ -螺旋和无规卷曲为主, 含有少量的  $\beta$ -转角和延伸带。多序列比对和亲缘关系比较显示, CobHLH7 氨基酸序列与马铃薯和模式植物烟草的 bHLH 类转录因子亚家族的 ILR3 同源性较高。结论 在首次对山茱萸叶片和果实转录组测序的基础上, 对筛选并预测的可能与环烯醚萜苷合成相关的转录因子 CobHLH7 进行克隆与生物信息学分析, 为进一步研究其功能奠定基础。

**关键词:** 山茱萸; CobHLH7; 转录因子; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1442-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.028

## Cloning and bioinformatics analysis of transcription factor CobHLH7 in *Cornus officinalis*

YANG Meng-meng<sup>1,2</sup>, ZHOU Shuang<sup>1,2</sup>, LI Zhi-hong<sup>1,2</sup>, XU Jing-ya<sup>1,2</sup>, XU Hua-wei<sup>1,2</sup>, HOU Dian-yun<sup>1,2</sup>

1. College of Agricultural, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

2. The Luoyang Engineering Research Center of Breeding and Utilization of Dao-di Herbs, Luoyang 471023, China

**Abstract: Objective** *Cornus officinalis* is a commonly used medicinal material in our country. In the study, the CobHLH7 was cloned and analyzed, which might be closely related to the iridoid glycosides synthesis, based on the transcriptome sequencing of *Cornus officinalis* fruits. **Methods** The special primers were designed from the both sides of open reading frame of unigene c15204\_g1. The total RNA was extracted and reversed transcribed into cDNA. The transcription factor CobHLH7 was cloned through RT-PCR method, and the pMD19-T cloning vector were used for sequencing. A series of bioinformatics analysis of CobHLH7 was performed by software Protparam, ProtScale, and SOPMA etc. **Results** The cDNA of CobHLH7 gene was 941bp in length, encoding 266 amino acids with a molecular weight of 29 220 and isoelectric point of 6.32. The analysis of bioinformatics through SOPMA showed that the protein was a neutral unstable protein. Its advanced structure mainly was alpha helix and random coil, and the content of beta turn and extended strand were less. Multiple sequence alignments and phylogenetic trees showed that CobHLH7 protein has high homology with ILR3 of *Solanum tuberosum*, ILR3-like of model organism *Nicotiana attenuate*. **Conclusion** For the first time, the CobHLH7 cDNA sequence was cloned and analyzed successfully from *C. officinalis*, which would lay the foundation for studying its biological functions deeply.

**Key words:** *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; CobHLH7; transcription factor; gene cloning; sequence analysis

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 富含多糖、环烯醚萜苷类、鞣质和酯类等活性物质<sup>[1-4]</sup>, 具

补益肝肾、收涩固脱的功效, 用于眩晕耳鸣、腰膝酸痛、大汗虚脱等症<sup>[5]</sup>。

现代药理学研究表明, 山茱萸提取物能够有效

收稿日期: 2018-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1404829); 西藏自治区重点科技计划项目 (2015-ZD-NM-0)

作者简介: 杨萌萌 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源评价与利用。Tel: 18204668669 E-mail: 577308188@qq.com

\*通信作者 侯典云, 硕士生导师, 主要从事中药资源评价与利用研究。E-mail: dianyun518@163.com

抑制肺癌细胞的增殖和转移<sup>[6]</sup>, 山茱萸多糖在很大程度上也可以改善机体的免疫机制, 进而抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[7]</sup>。山茱萸环烯醚萜总苷能够预防链脲佐菌素 (STZ) 引起的糖尿病肾病<sup>[8-9]</sup>, 减轻炎症症状<sup>[10]</sup>, 尤其马钱子苷及其衍生物治疗糖尿病、肾病效果更为显著<sup>[11]</sup>。山茱萸在治疗记忆缺陷<sup>[12]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[13]</sup>和开发新型药物方面也具有广阔发展前景。此外, 山茱萸籽栲胶 (即鞣酸) 作为制革行业中鞣质的一大来源也备受关注<sup>[14]</sup>。

碱性-螺旋-环-螺旋 (basic Helix-Loop-Helix, bHLH) 类转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, 广泛参与调控植物的生长发育<sup>[15]</sup>、抗性<sup>[16]</sup>、信号转导及次生代谢<sup>[17]</sup>等过程。如拟南芥中参与其生殖生长发育的 bHLH 转录因子 HEC1-3<sup>[18]</sup>, 调控赤霉素和茉莉酸信号途径的 MYC2<sup>[19]</sup>; 水稻中参与调控生长抑制的 RERJ1<sup>[20]</sup>; 黄花蒿中调控青蒿素生物合成途径的 AabHLH1<sup>[21]</sup>; 长春花中的转录因子 CrMYC1-5<sup>[22-23]</sup>和 BIS1<sup>[24]</sup>主要参与生物碱合成途径。目前研究表明<sup>[24]</sup>长春花中生物碱合成整条途径的转录因子已找到, 为其后续生物学研究提供了丰富的理论基础。另外, 有研究表明, ILR3 (IAA\_Ieu Resistant3) 也属于 bHLH 型转录因子, 在拟南芥中已有报道<sup>[25-26]</sup>。

为研究转录因子 bHLH 在山茱萸生长代谢中的功能, 本研究在对山茱萸果实和叶片进行转录组测序的基础上, 经相关生物信息学分析, 获得 unigene c15204\_g1<sup>[27]</sup>。以此序列为模板设计引物, 经 RT-PCR 等技术克隆了山茱萸 bHLH 转录因子基因获得其 cDNA 序列, 命名为 CobHLH7, 并进行生物信息学分析, 为深入研究其功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取洛阳市隋唐植物园无病虫害山茱萸果实为实验材料, 快速剥离果肉放于 2 mL 离心管中, 液氮冻干后-80 °C 超低温冰箱储存备用。

RN35-EASYspinPlus 多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒、反转录试剂盒 PC17-TRUE script1stStrand cDNA Synthesis Kit、2×Taq PCR MASTER MIX、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒及零背景 CV14-pTOPO-TA 克隆试剂盒均购于北京艾德莱生物科技有限公司; 转化使用大肠杆菌 DH-5 $\alpha$  (北京艾德莱生物科技有限公司), 实验中所需引物由北京赛百盛生物技术公司合成。

### 1.2 山茱萸总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 条链的合成

按照 RN35-EASYspinPlus 多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒说明, 取山茱萸果实总 RNA, 经 NanoDrop 2000 检测 RNA 提取质量和纯度, 并用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。利用反转录试剂盒 PC17-TRUE script 合成 cDNA 第 1 链。

### 1.3 引物设计

以山茱萸转录组测序获得的 bHLH 转录因子候选基因 unigene c15204\_g1 为参考序列, 利用 Primer Premier5.0 软件在序列的开放阅读框 2 端设计扩增完整编码区的引物。设计得到 RT-PCR 特异性引物序列为 CobHLH7F: 5'-CCACTTTTCTCTCTCCCAA-3' 和 CobHLH7R: 5'-CCATCATTTCAGGCTTAGGC-3'。

### 1.4 CobHLH7 基因克隆及测序

RT-PCR 基因扩增体系为 25  $\mu$ L, 包括模板 cDNA 1.5  $\mu$ L, 2×Taq PCR Mastermix 12.5  $\mu$ L, 正、反向引物 (2.5  $\mu$ mol/L) 各 1.0  $\mu$ L, 加 RNase free H<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。反应程序为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 32 个循环, 72 °C 补充延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 纯化回收目的条带, 按照零背景 CV14-pTOPO-TA 克隆试剂盒连接到 pMD19-T 克隆载体上, 然后将连接产物转化感受态细胞 DH-5 $\alpha$ , 涂于含有 (质量浓度 100  $\mu$ g/mL) Amp 的 LB 培养基上 37 °C 过夜培养 12 h, 菌落 PCR 筛选阳性菌摇菌后送于上海美吉生物医药科技有限公司测序。

### 1.5 CoBHLH7 基因的生物信息学分析

应用 DNASTAR 分析 CoBHLH7 基因的碱基组成, ExPASy (<http://www.expasy.org/tools>) 在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/ProtParam>) 分析氨基酸组成、等电点和相对分子质量等; ProtScale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) 对山茱萸 CobHLH7 基因编码蛋白的亲水性和疏水性进行分析。通过在线软件 SOPMA 和 SWISS-MODEL 分别预测蛋白的二级和三级结构。DNAMAN 8.0 软件进行多序列比对, 通过 MEGA 7.0 软件采用邻位连接法构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 山茱萸总 RNA 提取

取山茱萸果肉于预冷的研钵中液氮研磨至粉末, 根据 RNA 提取试剂盒 RN35-PLANT pure 说明提取其总 RNA, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测结果显

示条带清晰, 无降解。NanoDrop 微量分光光度计检测  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  分别为 1.95 和 2.10, 说明 RNA 提取纯度高, 无蛋白质、糖和酚类物质污染, 可以满足后续反转录和基因克隆的需要。

## 2.2 CobHLH7 的基因克隆与测序

利用 Primer Premier 5.0 软件, 在 unigene c15204\_g1 的 ORF 两端设计扩增完整编码区的引物。经 RT-PCR 扩增和 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 获得长度为 940 bp 左右的亮带, 切胶回收该亮带, 通过 CV14-Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit 连接到 pMD19-T 克隆载体上, 转化 DH-5 $\alpha$  感受态细胞, 经菌落 PCR 鉴定, 挑取阳性克隆测序。

测序结果去除引物序列, 拼接分析获得大小为 941 bp 的片段, 经与山茱萸的转录组序列比对, 命名为 CobHLH7。

## 2.3 CobHLH7 基因及编码蛋白基本特征分析

通过软件 DNASTar-Editseq 分析结果表明, CobHLH7 的 cDNA 序列 A、T、C、G 4 种碱基所占比例分别为 26.03%、25.61%、22.32% 和 26.03%。ExPASy 的在线软件 Protparatam 和 ProtScale 分析可知, CobHLH7 由 20 种 (266 个) 氨基酸组成, 相对分子质量为 29 220, 等电点为 6.32。在组成此蛋白的氨基酸中丝氨酸含量最高, 占总含量的 9.0%, 酪氨酸含量最低为 0.8%。该蛋白不稳定系数为 46.68, 属于不稳定蛋白。根据氨基酸亲水性/疏水性曲线可以看出氨基酸分值最低 (-2.956) 即亲水性最强的位置在多肽链第 151 位, 分值最高 (1.844) 即疏水性最强的位置在多肽链第 188 位。多肽链平均疏水性 (GRAVY) 为 -0.714, 表现为亲水性 (图 1)。

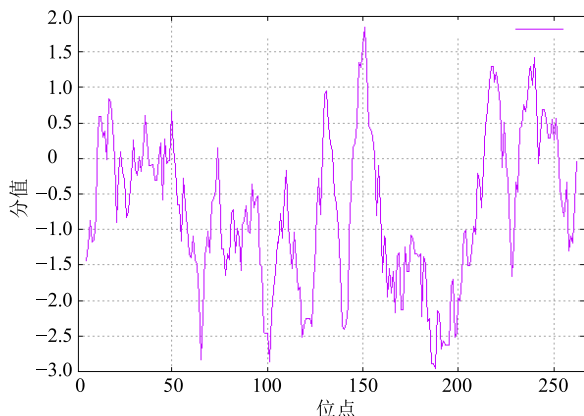


图 1 CobHLH7 蛋白的亲水性/疏水性曲线

Fig. 1 Hydrophilicity/hydrophobicity curve of CobHLH7 protein

## 2.4 CobHLH7 编码蛋白的高级结构预测分析

根据 SOPMA 在线软件对 CobHLH7 蛋白的结构预测结果表明, CobHLH7 蛋白的二级结构中  $\alpha$ -螺旋 (alpha helix)、 $\beta$ -转角 (beta turn)、延伸带 (extended strand) 和无规卷曲 (random coil) 所占比例分别为 37.95%、3.01%、7.14%、52.26%。通过 SWISS-MODEL 预测的结果显示, CobHLH7 的三维结构由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规卷曲和延伸带构成, 与 bHLH 转录因子螺旋-环-螺旋的结构一致 (图 2)。

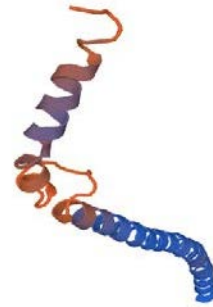


图 2 CobHLH7 编码蛋白的三维结构预测

Fig. 2 3D structure prediction of CobHLH7 protein

## 2.5 CobHLH7 序列的多重比对与亲缘关系分析

通过 NCBI 数据库中的 Blastx 搜索与 CobHLH7 相似的蛋白序列, 用 DNAMAN 软件将 CobHLH7 与搜索到的木薯 *Manihot esculenta* Crantz ILR3 (XP021595307)、花生 *Arachis ipaensis* Linn. ILR3 (XP016188681)、蔓花生 *Arachis duranensis* Krap. et Greg ILR3 (XP015953562)、马铃薯 *Solanum tuberosum* L. ILR3 (XP006360098)、笋瓜 *Cucurbita maxima* Duch. ex Lam. ILR3-like (XP022985260)、葡萄 *Vitis vinifera* L. ILR3 (XP002282727)、南瓜 *Cucurbita moschata* Duch ILR3-like (XP022932170)、烟草 *Nicotiana attenuate* L. ILR3-like (NP001312372) 进行多重比对, 结果显示, 山茱萸 CobHLH7 与其他物种的 bHLH 类转录因子氨基酸均具有较高的保守性, 可以确定为 bHLH 类转录因子 (图 3)。

基于 CobHLH7 序列, 通过 NCBI 在线 Blastx 比对和序列相似性分析, 利用 MEGA7.0 软件, 通过邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统进化树, bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。结果表明, 山茱萸 CobHLH7 基因与马铃薯的 ILR3 (XP006360098)、烟草的 ILR3-like (NP001312372) 亲缘关系较近, 与葡萄的 ILR3 (XP002282727) 花

山茱萸 (bHLH7)	G P N	FD GLIEDIS	P GN	SAPTS	S	.FVQAL	GSS	SL	49
烟草 (NP001312372)	V P N	YD G.FEESA	P SN	SATAS	N	.FVQNL	GSR	SA	48
木薯 (XP021595307)	V P N	ME GLIDDDIP	P AN	SVPVT	S	.FVQNT	GPS	GL	49
花生 (XP016188681)	A R S	FD ALIDDDIP	H AT	AAPSS	N	.FSNAI	GSS	GV	40
蔓花生 (XP015953562)	A R S	FD ALIDDDIP	H AT	AAPSS	N	.FSNAI	GSS	GV	49
马铃薯 (XP006360098)	V P N	YD G.FEDSS	P SN	SASAS	N	.FVQNL	GSR	SS	48
笋瓜 (XP022985260)	V P T	FD ALMDDIP	A AN	SAPTA	S	.SMPTL	ASS	ST	49
南瓜 (XP002282727)	V P A	YE GLIEDIP	P SN	ANTNS	A	TPVQAL	TSA	SG	50
南瓜 (XP022932170)	V P T	FD ALMDDIP	A AN	SAPTA	S	.SMPTL	ASS	ST	49
Consensus	m s e t n w l y	v d f	g f w	n r v e					
山茱萸 (bHLH7)	VD SFGD	GI TSS	EAVGAQCEDMQHG	PSACHEGRRVGLTIN	FNDK				99
烟草 (NP001312372)	VD SIGE	YP NGS	.....	.....	.....				67
木薯 (XP021595307)	ID PFGD	AQ SSC	.....	.....	.....				68
花生 (XP016188681)	ID SLGD	GI SGS	.....	.....	.....				68
蔓花生 (XP015953562)	ID SLGD	GI SGS	.....	.....	.....				68
马铃薯 (XP006360098)	ID SIGE	YP SGS	.....	.....	.....				67
笋瓜 (XP022985260)	IE SLFE	GL PGS	RTKFC	.....	.....				73
南瓜 (XP002282727)	ID SFGD	GI TGS	.....	.....	.....				69
南瓜 (XP022932170)	IE SLFE	GL PGS	.....	.....	.....				68
Consensus	g	sd ke	kkcr						
山茱萸 (bHLH7)	RT S SCGPS	L R	M SI	SA V	149				
烟草 (NP001312372)	.A V SCAPT	Q R	T AL	SA V	116				
木薯 (XP021595307)	.G S LCSAS	L R	L SI	AA I	117				
花生 (XP016188681)	.G S SCAPS	L R	V SI	AA I	117				
蔓花生 (XP015953562)	.G S SCAPS	L R	V SI	AA I	117				
马铃薯 (XP006360098)	.A V SCAPT	L K	M AL	SA V	116				
笋瓜 (XP022985260)	RV T TSCAS	L R	L AI	AA I	123				
南瓜 (XP002282727)	.V S SCGAS	L R	M SI	SS I	118				
南瓜 (XP022932170)	.V T TSCAS	L R	L AI	AA I	117				
Consensus	r e	sskacrek	rrd lndkf	eig	lepgrppktdk	il			
山茱萸 (bHLH7)	M T	G AOK	SN QD	A N	R T D	199			
烟草 (NP001312372)	M T	G AOK	LN QE	A N	K A E	166			
木薯 (XP021595307)	M T	G AOK	SS QE	A N	R A D	167			
花生 (XP016188681)	M T	G AOK	MG QE	A N	R A E	167			
蔓花生 (XP015953562)	M T	G AOK	MG QE	S N	R A E	167			
马铃薯 (XP006360098)	M T	D AOK	LN QE	V T	R A E	166			
笋瓜 (XP022985260)	I A	G AKM	TS SE	A N	R M E	173			
南瓜 (XP002282727)	M T	G SQK	SS QE	A N	R A E	168			
南瓜 (XP022932170)	I A	G AKM	TS SE	A N	R M E	167			
Consensus	davr v qlr e	lkdsn l	kikelk	ek	elrdekq lk ek k				
山茱萸 (bHLH7)	TMNT	G LP	..A	AA	GQ	VE N	IIS	V	247
烟草 (NP001312372)	TMNA	G LP	..A	AA	PH	VP S	IMS	V	214
木薯 (XP021595307)	AVNA	S LP	PPA	AT	TQ	AP N	FIS	V	217
花生 (XP016188681)	SMSA	S MA	PTA	AA	PQ	VP N	IIS	M	217
蔓花生 (XP015953562)	SMSA	S MA	PTA	AA	PQ	VP N	IIS	V	217
马铃薯 (XP006360098)	TTSA	S LP	..A	SA	AH	FP S	IMS	V	214
笋瓜 (XP022985260)	DMNS	G LP	..A	AT	AQ	AA N	FIS	V	221
南瓜 (XP002282727)	AMNA	S LP	VPS	AA	AQ	AG N	FIG	V	218
南瓜 (XP022932170)	DMNS	G LP	..A	PT	AQ	AA N	FTS	V	215
Consensus	leqqk	qp f p	ip	fa	gq g	klvp	ypg	amwqf	
山茱萸 (bHLH7)									265
烟草 (NP001312372)									232
木薯 (XP021595307)									235
花生 (XP016188681)									235
蔓花生 (XP015953562)									235
马铃薯 (XP006360098)									232
笋瓜 (XP022985260)									239
南瓜 (XP002282727)									236
南瓜 (XP022932170)									233
Consensus	mppaavdtsqdhv	lppv							

图 3 CobHLH7 多重比较分析

Fig. 3 Alignment of deduce amino acid sequence of CobHLH

生的 ILR3 (XP016188681)、蔓花生的 ILR3 (XP015953562) 亲缘关系较远; 与木薯的 ILR3 (XP021595307)、笋瓜的 ILR3-like (XP022985260)、南瓜的 ILR3-like (XP022932170) 亲缘关系则最远 (图 4)。

### 3 讨论

本研究在首次对山茱萸叶片和果实进行转录组测序的基础上, 获得了 40 个 bHLH 转录因子片段, 利用 RT-PCR 技术克隆获得其中一条 bHLH 转录因子的 cDNA 序列, 命名为 CobHLH7。该基因 ORF 长 801 bp, 编码 266 个氨基酸, 其结构分析符合 bHLH 类转录因子结构特征。氨基酸序列比对分析显示, 山茱萸 CobHLH7 与马铃薯 ILR3、烟草 ILR3 等的氨基酸序列相似度较高, 初步推测山茱萸

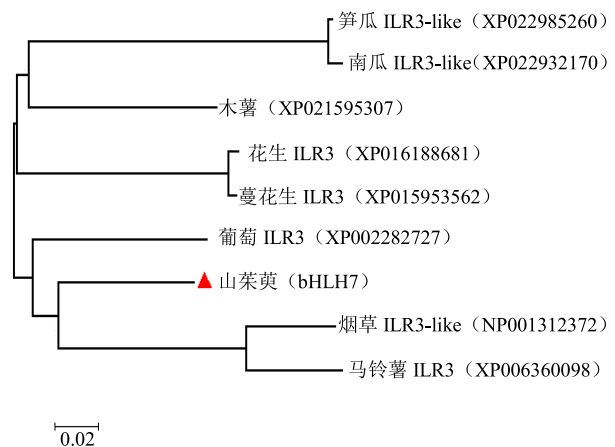


图 4 CobHLH7 与其他物种的亲缘关系

Fig. 4 Phylogenetic relationship analysis of CobHLH7

CobHLH7 与马铃薯 ILR3、烟草 ILR3 等以上物种的 bHLH 类转录因子具有相似的功能, 值得进一步深入研究。

作为在植物中广泛存在的一类转录因子, bHLH 在植物的生长发育、胁迫应答及次生代谢过程中起着重要作用, 如参与拟南芥绒毡层的分化和发育<sup>[28]</sup>, bHLH115 在拟南芥缺铁时能够正向调控缺铁反应<sup>[29]</sup>, bHLH34、bHLH104 和 bHLH105 (IAA-LEUCINE RESISTANT3) 作为同源或异源二聚体来调节 Fe 稳态<sup>[30]</sup>。此外, bHLH 转录因子在黄酮类花青素及生物碱类尼古丁等化合物的合成中亦发挥着重要作用<sup>[31]</sup>。

目前, 关于山茱萸次生代谢产物合成的分子机制研究匮乏, 山茱萸基因组数据也较少, 本研究基于山茱萸转录组测序, 成功克隆 CobHLH7 基因, 并进行了相应的生物信息学分析, 为深入研究其功能奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] Lin M H, Liu H K, Huang W J, *et al.* Evaluation of the potential hypoglycemic and beta-cell protective constituents isolated from corni fructus to tackle insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(14): 7743-7751.
- [2] Ma W, Wang K J, Cheng C S, *et al.* Bioactive compounds from *Cornus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 840-845.
- [3] Park J Y, Han A R, Kil Y S, *et al.* A new secoiridoid glycoside from the fruits of *Cornus officinalis* (Cornaceae) [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(13): 1504-1510.
- [4] 李红, 任莹莹, 司俊玲, 等. 山茱萸籽多糖的提取工艺研究 [J]. *食品工业*, 2013, 34(7): 46-49.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] 贾羲, 苏成福, 董诚明. 山茱萸提取物抗肿瘤作用及机制探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(20): 117-121.
- [7] 邹品文, 赵春景, 李攀, 等. 山茱萸多糖的抗肿瘤作用及其免疫机制 [J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(1): 20-22.
- [8] Jiang W L, Zhang S M, Tang X X, *et al.* Protective roles of cornuside in acute myocardial ischemia and reperfusion injury in rats [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18: 266-271.
- [9] Jiang W L, Zhang S P, Jentsen T. Effects of loganin on experimental diabetic nephropathy [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19: 217-222.
- [10] 郭洁, 张晓双, 刘继平. 山茱萸环烯醚萜总苷对晚期糖基化终末产物诱导的肾系膜炎症反应的调节 [J]. *中成药*, 2013, 35(10): 2067-2072.
- [11] Ma W, Wang K J, Cheng C S, *et al.* Bioactive compounds from *Comus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 840-845.
- [12] Hwang E S, Kim H B, Lee S, *et al.* Loganin enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments [J]. *Physiol Behav*, 2017, 171(1): 243-248.
- [13] Lee K Y, Sung S H, Kim S H, *et al.* Cognitive-enhancing activity of loganin isolated from *Cornus officinalis* in scopolamine-induced amnesic mice [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(5): 677-683.
- [14] 周力, 马齐兵, 陈哲, 等. 山茱萸籽栲胶制备工艺的研究 [J]. *食品工业*, 2016, 37(8): 35-40.
- [15] Dong Y, Wang C P, Han X, *et al.* A novel bHLH transcription factor *PebHLH35* from *Populus euphratica* confers drought through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in *Arabidopsis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 453-458.
- [16] Anjum S A, Wang L, Farooq M, *et al.* Methyl jasmonate-induced alteration in lipid peroxidation, antioxidative defence system and yield in soybean under drought [J]. *J Agron Crop Sci*, 2011, 197(4): 296-301.
- [17] Xu M, Dong J, Zhu M. NO mediates fungal elicitor puerarin in kudzu suspension cell biosynthesis by salicylic acid (SA) or jasmonic acid (JA) signaling pathways [J]. *Sci Sin Vit*, 2006, 36(1): 66-75.
- [18] Gremski K, Ditta G, Yanofsky M F, *et al.* The HECATE genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 2007, 134: 3593-3601.
- [19] Hong G J, Xue X Y, Mao Y B, *et al.* Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression [J]. *Plant Cell*, 2011, 24(6): 2635-2648.
- [20] Kiribuchi K, Sugimoto M, Takeda M, *et al.* RERJ1 a jasmonic acid-responsive gene from rice, encodes a basic helix-loop-helix protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325: 857-863.
- [21] Ji Y P, Xiao J W, Shen Y L, *et al.* Cloning and characterization of AabHLH, a bHLH transcription factor that positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(9): 1592-1604.

- [22] Pre M, Siberil Y, Memelink J, *et al.* Isolation by the yeast one-hybrid System of cDNAs encoding transcription factor that bind to the G-Box element of the strictosidine synthase gene promoter from *Catharanthus roseus* [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(392): 2587-2588.
- [23] Zhang H T, Hedhili S, Montiel G, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant J*, 2011, 67(1): 61-71.
- [24] van Moerkercke A, Steensma P, Schwezer F, *et al.* The bHLH transcription factor BIS1 controls the iridoid branch of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *PNAS*, 2015, 112(26): 8130-8135.
- [25] 刘芳朋. 小麦转录因子基因 TabHLH1 的分子特征和生物学功能 [D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [26] Zhang J, Liu B, Li M, *et al.* The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(3): 787-805.
- [27] Hou D Y, Shi L C, Yang M M, *et al.* *De novo* transcriptomic analysis of leaf and fruit tissue of *Cornus officinalis* using Illumina platform [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192610.
- [28] Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, *et al.* Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by Dysfunctional Tapetum1 (DYT1) encoding a putative bHLH transcription factor [J]. *Development*, 2006, 133(16): 3085-3095.
- [29] Liang G, Zhang H, Li X, *et al.* bHLH transcription factor bHLH115 regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(7): 1743-1755.
- [30] LI X, Zhang H, Ai Q, *et al.* Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 2016, 170(4): 2478-2493.
- [31] 张凯伦, 罗祖良, 郭玉华, 等. bHLH 转录因子调控药用植物萜类化合物生物合成的研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2017, 19(1): 142-147.