

## 三七 *PnoHsp70* 基因家族鉴定及其响应热胁迫表达分析

陈玉溪, 林娴婧, 于辉, 唐婷\*

(湖南科技大学生命科学与健康学院, 湖南湘潭 411100)

**摘要:** 目的 鉴定三七 *PnoHsp70* 基因家族, 并分析其蛋白序列特征、进化关系、功能特性和表达模式。方法 采用生物信息学方法对三七 *PnoHsp70* 基因家族进行全基因组鉴定, 实时荧光定量 PCR 技术分析其在不同组织和不同时期热处理后的表达。结果 三七含有 20 个 *PnoHsp70* 基因, 分布在 8 条染色体上。*PnoHsp70* 分为 4 个亚族, 同亚族成员的基因结构相似, 启动子含植物激素、低温、高温和干旱响应元件。*PnoHsp70* 基因存在组织特异性表达, *PnoHsp70-6* 等 11 个基因在早期快速响应热胁迫, *PnoHsp70-19* 和 *PnoHsp70-20* 在中期短暂响应热胁迫, *PnoHsp70-3* 等 3 个基因在后期持续响应热胁迫。结论 本研究对三七 *PnoHsp70* 基因家族进行了全基因组鉴定, 初步筛选了 16 个响应热胁迫不同阶段的 *PnoHsp70* 基因。

**关键词:** 三七; *PnoHsp70* 基因家族; 热胁迫; 生物信息学

**中图分类号:** R282.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2026)01-0333-09

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.01.048

三七是我国五加科人参属植物, 具散瘀止血、消肿定痛之功, 用于治疗冠心病、血栓等症<sup>[1]</sup>。三七喜阴凉、畏高温, 主要分布于西南中高海拔地区<sup>[2-3]</sup>, 而全球变暖导致极端高温频发, 显著抑制其生长与药用皂苷合成, 给产业带来重大损失<sup>[4-5]</sup>, 故急需挖掘耐热基因资源, 并明确其对高温胁迫的响应机制。Hsp70 是植物最保守的一类热激蛋白, 由 N-段的 ATP 酶结构域 (amino-terminal ATPase domain, NBD)、底物结合结构域 (substrate binding domain, SBD) 及 C 端“盖子”构成<sup>[6]</sup>, 分为组成型和诱导型, 通过修复变性蛋白、维持细胞稳态增强耐热性<sup>[7-9]</sup>。早期研究表明, Hsp70 表达量与耐热呈正相关, 如在烟草 *Nicotiana tabacum* 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中过表达 *Hsp70* 基因均可提高耐热性<sup>[10-11]</sup>。目前的相关研究大多集中于分子机制方面, 如在拟南芥中 HSP70-3 通过抑制 PLD<sup>8</sup> 活性, 介导微管重组来调节耐热性<sup>[12]</sup>; 番茄 *Solanum lycopersicum* HSP70 与 BAG9 互作稳定光系统, 增强耐热性<sup>[13]</sup>; 苹果 *Malus pumila* 叶绿体 Hsp70 与 EF-Tu 互作防聚集, 提高耐热性<sup>[14]</sup>。然而, 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员、进化关系及高温响应机制尚未见报道。

本研究通过生物信息学手段鉴定三七 *PnoHsp70*

基因家族成员, 分析其基因结构、保守基序、顺式作用元件和进化关系, 实时荧光定量 PCR 检测它们在不同组织和热处理前后的表达, 探索其参与高温胁迫的潜在作用, 筛选关键耐热候选基因, 为解析功能及耐热育种提供理论依据。

### 1 材料与方法

1.1 材料 三七种子采自云南省文山州的三七种植基地, 种植在含土壤 (25% 泥炭、25% 腐殖质和 50% 红土) 的苗盘中, 种植距离 10 cm×10 cm, 置于 22 °C、12 h 光照/12 h 黑暗光周期的人工气候室。幼苗每周浇水 2 次, 生长 1 年后进行基因表达分析。

1.2 三七 *PnoHSP70* 基因家族基因序列获得与鉴定 三七基因组及注释数据下载于云南农业大学草药组学数据 (<http://herbalplant.ynau.edu.cn/>)。从 Pfam 数据库中下载 Hsp70 (PF00012) 的种子文件, 利用 HMMER 3.0 程序包中的 hmmbuild 命令, 将获取的种子文件转化成隐马尔可夫模型 (hidden markov model, HMM), 接着使用程序包中的 hmmsearch 命令, 在三七基因组蛋白质序列中检索含有该模型的蛋白。蛋白序列通过 NCBI 网站中的 CD Search 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 和 SMART 数据

收稿日期: 2025-08-15

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2025JJ70103)

作者简介: 陈玉溪, 女, 硕士在读, 研究方向为植物逆境生理学。E-mail: cyx007517@163.com

\* 通信作者: 唐婷, 女, 博士, 副教授, 研究方向为植物逆境生理学。E-mail: tangting@hnust.edu.cn

库 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行检验, 筛选含有完整 Hsp70 蛋白结构者。

采用 DNAMAN9 软件, 对三七 *PnoHsp70* 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的长度和蛋白质的长度、分子量、等电点等理化性质进行预测。再通过 WOLF PSORT 在线工具预测三七 *PnoHsp70* 蛋白的亚细胞定位。

1.3 三七 *PnoHsp70* 基因家族蛋白多重序列比对与系统进化树绘制 拟南芥 Hsp70 家族蛋白序列来自 TAIR (<http://www.Arabidopsis.org/>), 水稻 (*Oryza sativa*) Hsp70 家族蛋白序列来自 Rice Genome Annotation Project Database (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)。采用 DNAMAN9 软件对 Hsp70 蛋白序列进行多序列比对, MEGAX 基于邻接法分别构建三七 *PnoHsp70* 蛋白系统进化树及三七、水稻、拟南芥 Hsp70 蛋白系统进化树, Bootstrap 校验重复 1 000 次, iTOL 在线工具 (<https://itol.embl.de/>) 进行优化。

1.4 三七 *PnoHsp70* 基因家族基因结构与保守基序分析 采用 Gene Structure Display Server 网站 (GSDS, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 分析 Hsp70 基因的内含子、外显子与上下游非翻译序列, InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 网站分析三七 *PnoHsp70* 蛋白保守结构域, MEME 网站 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 挖掘 Hsp70 蛋白保守基序, 分布位点选择 Any Number of Repetitions (anr), 基序数量设置为 10, 其他参数使用默认值。

1.5 三七 *PnoHsp70* 基因家族染色体定位、物种内共线性与选择压力分析 根据三七基因组注释信息, 采用 TBtools 绘制染色定位图, MCScanX 软件进行三七 *PnoHsp70* 基因家族的物种内共线性分析。再采用 KaKs\_Calculator2.0 中的选择自然梯度法 (natural gradient descent, NG) 计算同源基因对的非同义替换率 (non-synonymous, Ka)、同义替换率 (synonymous, Ks) 比值, 进行选择压分析。

1.6 三七 *PnoHsp70* 基因家族启动子顺式元件分析 采用 TBtools 提取三七 *PnoHsp70* 基因的起始密码子前 1 500 bp 序列作为启动子, 上传到 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子顺式元件。

1.7 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员的基因表达模式 采集 3 株生长状态一致的一年生三七幼苗作为

对照组, 取根、茎、叶, 液氮冷冻保存, 用于组织特异性表达分析; 采集 12 株三七幼苗, 置于植物光照培养箱, 40 ℃ 分别处理 2、6、12、24 h, 每个处理时间设置 3 株重复, 取叶片, 液氮冷冻保存, 用于热处理后表达分析。将冷冻样品用液氮研磨后, 采用 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, BioRT 高灵敏 cDNA 第一链合成试剂盒进行逆转录, 以 cDNA 为模板, 利用 BioEasy Master Mix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。内参基因选用 *PnoActin2*, 引物设计通过 Primer Premier 6 软件完成, 序列见表 1。qRT-PCR 体系为 20 μL, 程序为 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 57 ℃ 30 s, 40 个循环, 每次实验设置 3 个重复, 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的基因相对表达量。最后, 采用 TBtools 中的 HeatMap 插件绘制组织特异性表达热图, Origin 软件绘制热处理后的基因表达图。

## 2 结果

2.1 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员鉴定与蛋白理化性质分析 采用 Hsp70 蛋白的 HMM 模型筛选得到 20 个 *PnoHsp70* 基因家族成员, 根据它们在染色体上的位置排序, 从上向下依次命名为 *PnoHsp70-1~PnoHsp70-20*, 见表 2。

理化性质预测结果显示, 三七 *PnoHsp70* 基因家族中的基因编码氨基酸数量为 551~1 072 aa。*PnoHsp70* 蛋白的相对分子质量的差异与蛋白质大小类似, 除相对分子质量最大的 *PnoHsp70-9* (118.84 kDa) 和最小的 *PnoHsp70-2* (55.97 kDa) 外, 其余蛋白相对分子质量为 68.22~75.70 kDa; 等电点为 4.81~7.80, 其中有 2 个碱性蛋白和 18 个酸性蛋白。通过 WOLF PSORT 网站预测三七 *PnoHsp70* 家族蛋白的亚细胞定位, 发现其在细胞质、内质网、叶绿体、线粒体中均有分布, 以细胞质中三七 *PnoHsp70* 家族成员最多, 占总数的 60%, 见表 2。

2.2 三七 *PnoHsp70* 基因家族二级结构分析 三七 20 个 *PnoHsp70* 蛋白的氨基酸序列均含有  $\alpha$ -螺旋、延伸链和随机卷曲, 未检测到  $\beta$ -转角结构, 见表 3。各 *Hsp70* 基因编码蛋白质二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量为 34.64%~47.01%, 延伸链含量为 17.44%~23.09%, 随机卷曲含量为 35.54%~43.79%, 表明  $\alpha$ -螺旋和随机卷曲是 *PnoHsp70* 蛋白的主要二级结构元件。值得注意的是, 所有蛋白均缺乏  $\beta$ -转角结构, 这一特征可能与 *Hsp70* 家族蛋白特有的三维构象有关。

表1 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员的qRT-PCR引物序列信息

基因	Gene ID	正向(5'→3')	反向(5'→3')
<i>PnoHsp70-1</i>	Pno01G004689	ACACACAGCAGGACCATACACCTTGATT	CTCCACAGGCTCCATACACTTC
<i>PnoHsp70-2</i>	Pno01G005870	CTCATCACTGCTCAGACCACATT	ACACTTCTCAACAGGCTCCATACAC
<i>PnoHsp70-3</i>	Pno01G008668	CTCAAGGAAGTGGAGGCTGTGT	GCTCGTCATGTGAATCATCGTCTT
<i>PnoHsp70-4</i>	Pno02G004433	CGAACAGCAGAGAAGGCTAACGATT	GGCACCCAGAACGATCAGCAGTTAT
<i>PnoHsp70-5</i>	Pno02G004209	TCAAGGATGCCGTGTTACAGTTC	GCAACATTCACTGAGCATAACAC
<i>PnoHsp70-6</i>	Pno03G014823	ACTTCAATGACTCTCAGCGACAGG	AAGCAATGGCGGCAGCAGTT
<i>PnoHsp70-7</i>	Pno03G014828	ACTGCTGCTGCCATCGCTTAT	AACATCAAGACTACCACCAAGA
<i>PnoHsp70-8</i>	Pno03G015010	CTGAAGATGAGGAGCACGAGAAAGAA	TTGCCATCCAGCCACTCCATTG
<i>PnoHsp70-9</i>	Pno03G015232	TGCTGCCATCGCTTACGGCTTT	CACATTCCTCTGACTGCTGCCTGAA
<i>PnoHsp70-10</i>	Pno03G015569	AGGATGCCATTGAGAAGTCGATACA	CCATACCAAGGACCACCAACGAT
<i>PnoHsp70-11</i>	Pno05G004184	CTGAGTGGTGAACCCAATGAGAAGG	ACACTCATTACACCTCCAGCAGTCT
<i>PnoHsp70-12</i>	Pno05G004191	CACCGACACCGAGCGATTGAT	TTGTCCTCAGCACCAGCCAGTA
<i>PnoHsp70-13</i>	Pno06G004175	GATGGTGCAAGAACCGAGAAAGTAT	TGACCGCTGTTCTCATGTTGTAAGC
<i>PnoHsp70-14</i>	Pno06G005697	TGACAAGAACAGGATGGAGGATGCT	GCGATTAGGACCACCAACGATTC
<i>PnoHsp70-15</i>	Pno07G003074	AAGAGACAGGCGGTGGTAATC	CCTCCTCATCAACCTCAGACATCTT
<i>PnoHsp70-16</i>	Pno09G001864	TTCATCCACTGCTCAGACCACAATT	ACACTTCTCAACAGGCTCCATACAC
<i>PnoHsp70-17</i>	Pno12G008300	TCACTATTGTTCATCTGGAGGTCT	GTAGGCAGTTGTGTCAGCATTGTT
<i>PnoHsp70-18</i>	Pno12G014184	TGATTCGAGAGGACAGCAACAA	CCACTGAGGCAGCAGTAGGTT
<i>PnoHsp70-19</i>	Pno93G000011	CGCTGTTGTCAGTGTCCCTGCTTA	TCGCCACCTTCTGTCCAAACC
<i>PnoHsp70-20</i>	Pno556G000001	AGCCAGGAGGAGATTGAGCGTAT	TTGTCAGCCAGCTGTCCCTGTC
<i>PnoActin2</i>	KF815706.2	CCATGCAATCCCTCGGTTGG	TAGCAGAGCTGCTTTGGCA

表2 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员特征

基因	染色体定位	氨基酸数量/aa	分子质量/kDa	理论等电点	不稳定系数	脂肪指数	亲水系数总平均值	亚细胞定位
<i>PnoHsp70-1</i>	1	653	71.67	4.97	34.37	82.30	-0.42	Cy
<i>PnoHsp70-2</i>	1	511	55.97	5.44	29.69	86.24	-0.28	Cy
<i>PnoHsp70-3</i>	1	666	73.34	4.88	33.08	86.98	-0.46	ER
<i>PnoHsp70-4</i>	2	679	73.28	5.74	38.41	87.08	-0.34	Mt
<i>PnoHsp70-5</i>	2	669	73.67	4.87	29.53	86.88	-0.45	ER
<i>PnoHsp70-6</i>	3	650	71.18	4.97	36.18	82.38	-0.43	Cy
<i>PnoHsp70-7</i>	3	617	68.22	6.17	35.92	88.04	-0.32	Cy
<i>PnoHsp70-8</i>	3	625	68.85	5.83	36.22	86.46	-0.32	Cy
<i>PnoHsp70-9</i>	3	1 072	118.84	7.80	33.32	83.77	-0.38	Cy
<i>PnoHsp70-10</i>	3	648	70.91	4.84	34.71	82.62	-0.40	Cy
<i>PnoHsp70-11</i>	5	649	71.09	4.84	34.10	81.76	-0.41	Cy
<i>PnoHsp70-12</i>	5	648	70.97	4.92	34.12	82.64	-0.43	Cy
<i>PnoHsp70-13</i>	6	651	71.18	4.84	33.83	81.35	-0.41	Cy
<i>PnoHsp70-14</i>	6	624	69.09	7.49	32.61	78.12	-0.42	Cy
<i>PnoHsp70-15</i>	7	708	75.66	5.12	27.13	86.61	-0.33	Cp
<i>PnoHsp70-16</i>	9	648	71.16	4.81	33.24	83.38	-0.41	Cy
<i>PnoHsp70-17</i>	12	673	72.27	6.17	38.39	84.81	-0.35	Mt
<i>PnoHsp70-18</i>	12	708	75.70	5.25	29.70	86.19	-0.32	Cp
<i>PnoHsp70-19</i>	-	668	73.62	4.84	29.69	87.01	-0.44	ER
<i>PnoHsp70-20</i>	-	659	72.64	4.87	29.14	88.19	-0.42	ER

注: Cy 为细胞质, ER 为内质网, Cp 为叶绿体, Mt 为线粒体。

**2.3 三七 *PnoHsp70* 基因家族进化树构建与基因结构分析** 为了研究三七 *PnoHsp70* 基因的进化关系与生物学功能, 对已报道的 32 个水稻 *Hsp70* 蛋白、18 个拟南芥 *Hsp70* 蛋白与三七 *PnoHsp70* 蛋白进行

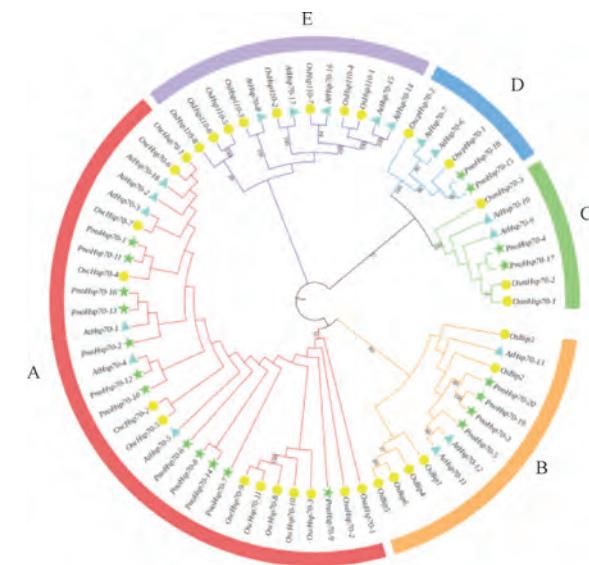
多序列对比, 构建系统进化树, 见图 1。由此可知, *Hsp70* 基因家族共分为 5 个亚族 (A~E), 其中 A 亚族中 *PnoHsp70* 基因数量最多, 有 12 个; B 亚族数量次之, 有 4 个; C/D 亚族中 *PnoHsp70* 基

表 3 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员二级结构组成

基因	α-螺旋/%	延伸链/%	β-转角/%	无规则卷曲/%
<i>PnoHsp70-1</i>	41.81	18.68	0	39.51
<i>PnoHsp70-2</i>	34.64	23.09	0	42.27
<i>PnoHsp70-3</i>	44.29	17.87	0	37.84
<i>PnoHsp70-4</i>	40.06	17.82	0	42.12
<i>PnoHsp70-5</i>	44.39	17.94	0	37.67
<i>PnoHsp70-6</i>	42.15	18.46	0	39.38
<i>PnoHsp70-7</i>	43.11	19.45	0	37.44
<i>PnoHsp70-8</i>	42.88	19.68	0	37.44
<i>PnoHsp70-9</i>	47.01	17.44	0	35.54
<i>PnoHsp70-10</i>	41.51	18.83	0	39.66
<i>PnoHsp70-11</i>	41.29	18.49	0	40.22
<i>PnoHsp70-12</i>	42.75	18.67	0	38.58
<i>PnoHsp70-13</i>	41.63	18.13	0	40.25
<i>PnoHsp70-14</i>	39.26	19.39	0	41.35
<i>PnoHsp70-15</i>	41.95	17.80	0	40.25
<i>PnoHsp70-16</i>	41.51	18.67	0	39.81
<i>PnoHsp70-17</i>	41.01	17.98	0	41.01
<i>PnoHsp70-18</i>	38.42	17.80	0	43.79
<i>PnoHsp70-19</i>	44.01	17.96	0	38.02
<i>PnoHsp70-20</i>	45.07	17.91	0	37.03

因数量最少，各有 2 个；E 组是 Hsp110 亚家族，其成员在结构上与 Hsp70 相似，属于 Hsp70 家族，但没有发现 *PnoHsp70* 蛋白。与三七 *PnoHsp70* 基因家族系统进化树类似，A、B、C、D 亚族中 *PnoHsp70* 基因家族成员分别位于细胞的细胞质、内质网、叶绿体、线粒体。三七 *PnoHsp70* 基因家族成员与水稻和拟南芥 *Hsp70* 基因家族成员的相似程度较高。进一步分析发现，三七 *PnoHsp70*、拟南芥的 *Hsp70* 基因家族间存在一对直系同源基因，即 *AtHsp70-4/PnoHsp70-12*，三七 *PnoHsp70* 基因家族中存在 6 对旁系同源基因，分别为 *PnoHsp70-4/PnoHsp70-17*、*PnoHsp70-8/PnoHsp70-14*、*PnoHsp70-19/PnoHsp70-3*、*PnoHsp70-15/PnoHsp70-18*、*PnoHsp70-16/PnoHsp70-13*、*PnoHsp70-1/PnoHsp70-11*。在进化关系上比较相近的一类 *Hsp70* 基因在结构和功能上均比较相似，可以利用拟南芥同源基因的研究结果，以推测三七 *PnoHsp70* 基因的生物学功能。

采用 MEME 在线工具分析 10 个三七 *PnoHsp70* 基因家族蛋白的保守基序，其长度为 21~50 aa。通过 InterPro 网站分析，发现 Motif 1、2、3、6、7 属于 NBD，Motif 4 属于 SBD，Motif 8 为 NBD 与 SBD 之间的链接区域 (Coil)，见图 2A。通过分析三七 *PnoHsp70* 保持基序的分布图，发现相同组中



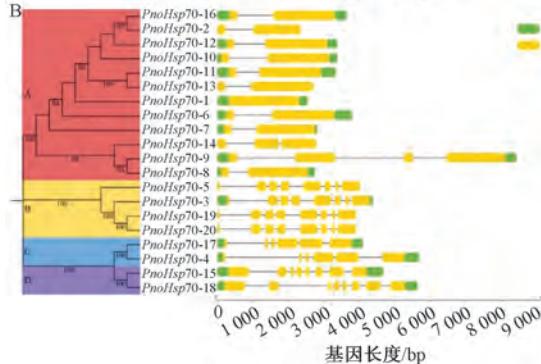
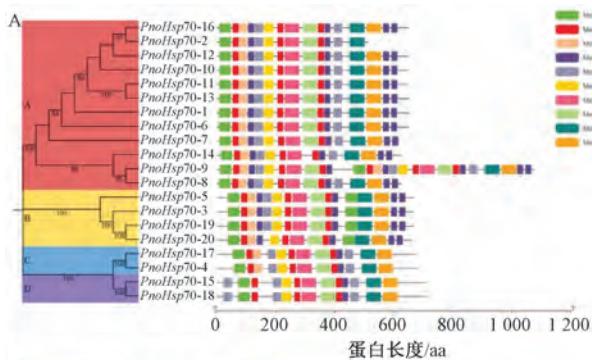
注：Pno 为三七，At 为拟南芥，Os 为水稻。自展值 0~100。

图 1 三七与拟南芥、水稻的 *Hsp70* 基因家族系统发育进化树

的 *PnoHsp70* 蛋白具有高度相似的保守基序，例如 C 组中的 *PnoHsp70-4* 和 *PnoHsp70-17*，保守基序的分布顺序、位置、数量完全一致。4 组 *PnoHsp70* 基因组间的差异性和组内的相似性说明其结构可能在 *PnoHsp70* 蛋白的亚细胞定位方面起到一定的决定作用。

利用 GSDS 网站对三七中 *PnoHsp70* 蛋白进行基因结构分析，发现三七 *PnoHsp70* 基因含有内含子、外显子的数量差异很大，见图 2B。A 组中的三七 *PnoHsp70* 基因外显子、内含子最少，分别介于 1~4、0~3 个之间。在 A 组中，含外显子和内含子个数最多均为 *PnoHsp70-9*，最少均为 *PnoHsp70-1*。而 B 组和 D 组中的三七 *PnoHsp70* 基因外显子、内含子最多，分别为 8、7 个，同样 C 组中的三七 *PnoHsp70* 基因都具有 6 个外显子、5 个内含子。A 组中的基因大都是 0~1 个短外显子加上 1~2 个长外显子组成的。除 A 组外，其余 3 组中基因的内含子、外显子数目都相同，且基因结构非常相似。

2.4 三七 *PnoHsp70* 基因家族氨基酸序列分析 由图 3 可知，与其他物种相同，三七的 *PnoHsp70* 家族蛋白也有 3 个结构域，即 NBD、SBD 和 C-端结构域 (C-terminal domain, CTD)，其中 NBD 和 SBD 是高度保守的区域，而 CTD 区域的保守性极低。三七 *PnoHsp70* 蛋白序列中都含有 Hsp70 家族 3 段完整的签名序列，分别为 GIDLGTTYSVC、FDLGGGTFDVS、VLVGGSTRIPK，说明这 20 个蛋



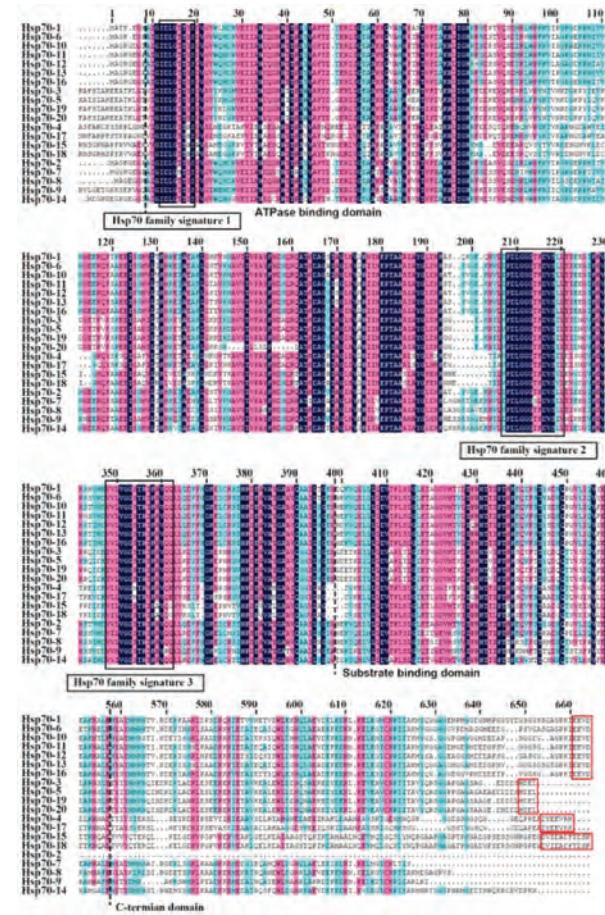
注: Motif 为保守基序, UTR 为非翻译区, CDS 为编码区序列。

图 2 三七 *PnoHsp70* 家族成员保守基序和基因结构

白属于 Hsp70 家族。进一步分析发现, 大多数预测定位在细胞质中的 *PnoHsp70* 家族蛋白羧基末端都存在一段高度保守的序列 EEVD, 如 *PnoHsp70-1*、*PnoHsp70-6*、*PnoHsp70-10*、*PnoHsp70-11*、*PnoHsp70-12*、*PnoHsp70-13* 和 *PnoHsp70-16*。同样, 在内质网定位的 *PnoHsp70* 蛋白羧基段存在高度保守的序列 HDEL, 定位于线粒体和叶绿体的三七 *PnoHsp70* 羧基段的高度保守序列为 PEADYEEV (R/K) K 和 DVIDADFTDSK。但还有部分定位于细胞质的蛋白羧基端没有发现高度保守的短肽段, 如 *PnoHsp70-2*、*PnoHsp70-7*、*PnoHsp70-8*、*PnoHsp70-9* 和 *PnoHsp70-14*。

**2.5 三七 *PnoHsp70* 基因家族染色体定位与选择压分析** 在鉴定出的 20 个 *PnoHsp70* 基因中, 只有 18 个不均匀分布在 8 条染色体上, 并均位于末端。其中, 3 号染色体上分布最多, 有 5 个 *PnoHsp70* 基因, 而 1 号染色体上有 3 个, 7、9 号染色体各有 1 个, 其余染色体上各有 2 个, 见图 4。

*PnoHsp70s* 基因组内共线性结果显示, 共有 3 对基因存在共线性关系, 属于片段复制; 存在 1 个 *PnoHsp70* 基因同时和多个 *PnoHsp70* 基因存在共线性关系的情况, 例如 *PnoHsp70-11* 同时与 *PnoHsp70-6* 和 *PnoHsp70-13*, 见图 5。另外, 这 3 对基因  $Ka/Ks$  值均小于 1, 最大值为 0.263 59



注: 黑色框内为 MAPK 保守结构域, 红色框内为羧基端高度保守序列; 胞质型标志性基序为 EEVD, 内质网型 HSPC 末端标志性基序为 KDEL, 线粒体为 DYEEV (R/K) K, 叶绿体为 DVIDADFTDSK。

图 3 三七 20 个 *PnoHsp70* 成员氨基酸

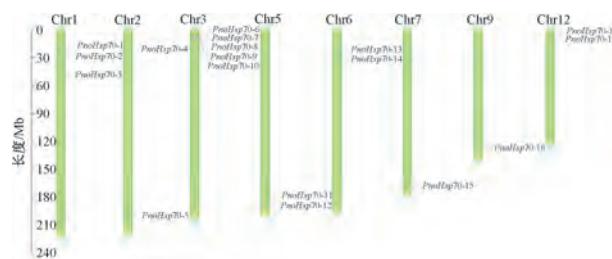


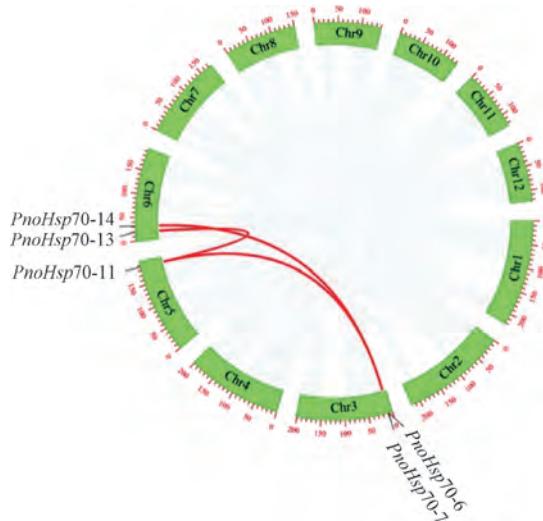
图 4 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员染色体定位

(*PnoHsp70-7&PnoHsp70-14*), 最小值为 0.034 86 (*PnoHsp70-11&PnoHsp70-13*), 见表 4。

**2.6 三七 *PnoHsp70* 基因家族启动子顺式作用元件分析** 由图 6 可知, 三七 20 个 *PnoHsp70* 基因含有 11 种不同的顺式作用元件, 分为激素响应元件和胁迫响应元件。在三七 *PnoHsp70* 基因家族启动子序列预测到了多个激素响应元件, 包括生长素 (auxin)、赤霉素 (gibberellins, GAs)、脱落酸 (abscisic Acid, ABA)、茉莉酸甲酯 (methyl

表4 三七 *PnoHsp70* 同源基因对 Ka/Ks 分析结果

序列对	非同义替换率 (Ka)	同义替换率 (Ks)	Ka/Ks 比值	纯化选择	复制类型
<i>PnoHsp70-6</i> & <i>PnoHsp70-11</i>	0.067 25	1.632 31	0.041 20	是	片段复制
<i>PnoHsp70-7</i> & <i>PnoHsp70-14</i>	0.168 51	0.639 29	0.263 59	是	片段复制
<i>PnoHsp70-11</i> & <i>PnoHsp70-13</i>	0.016 08	0.461 25	0.034 86	是	片段复制

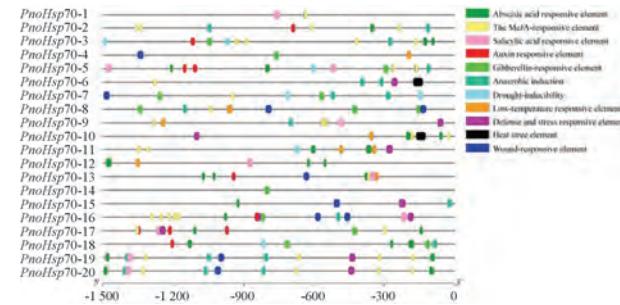


注：染色体上的刻度条表示染色体长度 (Mb)，红线连接的基因具有共线关系。

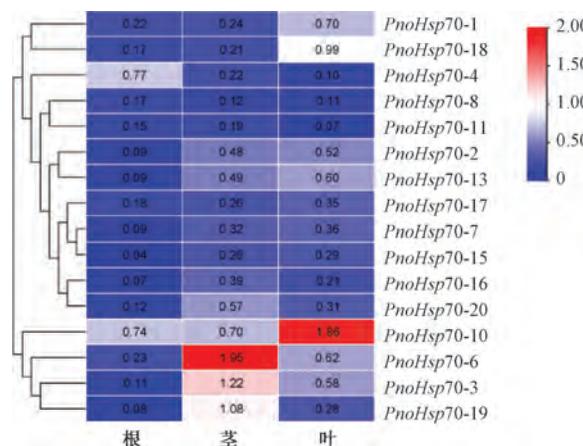
图5 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员共线性关系

jasmonate, MeJA) 和水杨酸 (salicylic acid, SA)。其中，15个 *PnoHsp70* 启动子序列含有 MeJA 作用元件，13个 *PnoHsp70* 启动子序列含有 ABA 作用元件，9个 *PnoHsp70* 启动子序列含有 SA 作用元件，含有生长素和赤霉素响应元件的 *PnoHSP70* 分别有 6、9 个。同时，在三七 *PnoHsp70* 基因家族启动子序列中还预测到了厌氧诱导相关响应元件 ARE、低温胁迫相关响应元件 LTR、干旱相关应答元件 MBS、热胁迫相关应答元件 HSE，以及防御和胁迫响应元件 (TC-rich repeats) 和创伤响应元件 (WUN-motif)。在 4 个基因的启动子区域都发现了低温响应元件 (LTR)，但只在 *PnoHsp70-6*、*PnoHsp70-10* 基因的启动子区域发现了热响应元件 (HSE)；*PnoHsp70-14* 的启动子区域只有 1 个赤霉素响应元件 (P-box)，推测可能为特异性响应赤霉素；*PnoHsp70-16* 顺式作用元件丰富度最高，共有 8 种，能响应大多数激素。总之，三七 *PnoHsp70* 基因家族启动子中含有响应 5 种激素和 6 种胁迫的元件，在三七抵抗逆境和生长发育过程中起到至关重要的作用。

2.7 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员组织特异性表达 为挖掘三七 *PnoHsp70* 基因家族潜在的生理功能，利用 qRT-PCR 技术进一步分析其在根、茎、

图6 三七 20 个 *PnoHsp70* 基因启动子中的顺式作用元件

叶中的表达情况。由图 7 可知，三七 *PnoHsp70* 家族基因除 *PnoHsp70-5*, 9, 12, 14 无表达外，其他 16 个基因表达存在组织特异性；在根中，大多数表达较低，其中最高的为 *PnoHsp70-4* 和 *PnoHsp70-10*；在茎中，优势表达基因有 *PnoHsp70-6*、*PnoHsp70-3* 和 *PnoHsp70-19*；在叶中，优势表达基因数量较少，其中 *PnoHsp70-10* 最高，提示 *PnoHsp70-10*、*PnoHsp70-6*、*PnoHsp70-3* 基因可能具有重要的生理功能。



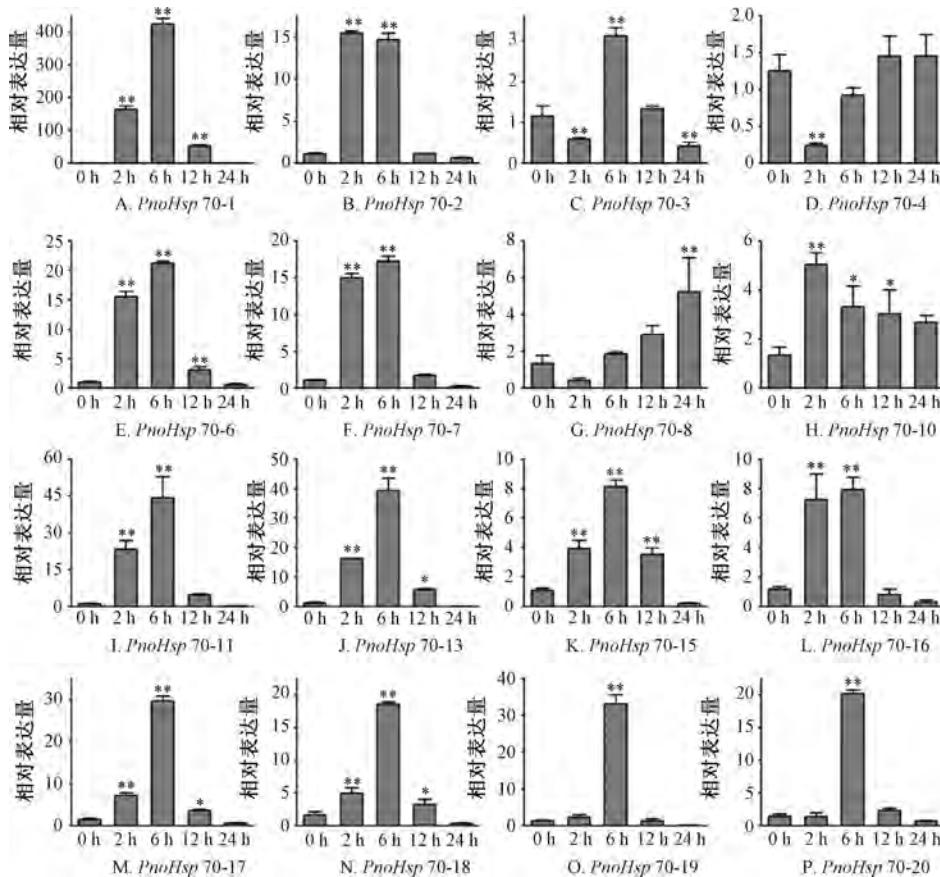
注：红色表示表达上调，蓝色表示表达下调，数值表示表达量。

图7 三七 *PnoHsp70* 基因家族组织表达

2.8 热胁迫三七 *PnoHsp70* 基因家族成员表达分析 在热处理期间，16个 *PnoHsp70* 基因表达存在较大差异，主要呈现 3 种表达模式，见图 8。早期快速响应模式下，A 亚族 8 个基因 (*PnoHsp70-8* 除外)、C 亚族 2 个基因和 D 亚族 *PnoHsp70-17* 在热处理 2 h 后基因表达量迅速上升 ( $P<0.01$ )，其中 *PnoHsp70-2*、*PnoHsp70-10* 和 *PnoHsp70-16* 达到峰值并持续到 6 h，其他成员在热处理 6 h 后达到峰值，

随后呈下降趋势。中期短暂响应模式下, B 亚族 *PnoHsp70-19*、*PnoHsp70-20* 基因表达量只在热处理 6 h 后达到峰值 ( $P<0.01$ ), 其他处理时期保持在对照水平。后期持续响应模式下, *PnoHsp70-3*、

*PnoHsp70-4*、*PnoHsp70-8* 在热处理 2 h 后基因表达量先短暂下降, 随着处理时间延长呈逐渐上升的趋势; 其余基因在热处理不同时期均未检测到明显的表达, 可能不参与植物抵御高温胁迫。



注: 与 0 h 比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。

图 8 三七 *PnoHsp70* 基因家族成员在热胁迫下的相对表达 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

### 3 讨论

为探索 Hsp70 在三七耐热过程中的功能, 本研究首次对三七 *PnoHsp70* 基因家族进行了全基因组鉴定并进行生信与热胁迫表达分析。三七 *PnoHsp70* 基因家族共含 20 个成员, 根据亚细胞定位分析, 多数定位在细胞质, 少数定位在内质网, 线粒体和叶绿体, 这与大豆 *Glycine max* 和沉香 *Aquilaria sinensis* 的情况相似<sup>[15-16]</sup>。细胞质中 Hsp 会重新定位到细胞核中, 以保护细胞免受热胁迫对细胞核造成的损害<sup>[17]</sup>, 故推测 *PnoHsp70* 蛋白可能主要在细胞质中发挥关键作用, 防御热损伤, 提高植物耐热性。

三七 *PnoHsp70* 基因家族共有 4 个亚族, 同一亚族所含保守基序的类型, 数目和顺序相似, 表明这部分基因具有一个通用的调控框架使其能够有效

应对环境胁迫<sup>[18]</sup>, 但不同亚族之间的保守基序存在显著差异, 提示 *PnoHsp70* 基因在进化过程中发生了功能多样性演变。本研究发现, 20 个 *PnoHsp70* 基因的外显子-内含子结构存在较大的差异, 意味着三七 *PnoHsp70* 基因家族在生物学过程可能发挥不同的功能。内含子的数量通常与转录调控有关, 较少的基因能迅速激活而响应各种胁迫<sup>[19-20]</sup>, 而 *PnoHsp70* A 亚族成员所含的外显子、内含子数目相比其他亚族成员更少, 推测这部分 *PnoHsp70* 基因可能有助于增强三七对高温环境的适应能力。

基因复制在植物进化过程中扩张基因家族、增加遗传新异性、提高抗逆性等方面具有重要作用<sup>[21]</sup>。本研究发现, 大部分 *PnoHsp70* 基因不均匀地分散在染色体的末端, 表明其进化过程可能存在

负责基因复制、分化的复杂基因排列<sup>[22]</sup>。片段复制是指基因组中大片段DNA的重复<sup>[23]</sup>，三七基因组中有3对PnoHsp70基因属于该类型，可能是家族扩张的主要原因，此外三者Ka/Ks值均小于1，表明三七PnoHsp70基因家族在进化过程中经历了明显的纯化选择<sup>[24]</sup>，其中PnoHsp70-7、PnoHsp70-14的最小，说明这2个基因分化速度最慢，导致两者保守基序的结构一致。因此，推测三七PnoHsp70基因复制和分化事件可能导致其进化出新的耐热分子机制。

顺式作用元件在启动子区域的基因调控和表达中发挥着重要作用<sup>[25]</sup>，三七PnoHsp70基因启动子区主要包括激素响应、胁迫响应等多种顺式作用元件，说明该基因家族参与植物的胁迫反应、生长调控、激素信号转导途径，其中A亚族中PnoHsp70-6、PnoHsp70-10启动子区含有HSE。此外，分析PnoHsp70基因家族在热胁迫下的表达情况时发现，大多数A亚族成员，如PnoHsp70-6、PnoHsp70-10在早期快速响应热胁迫，可能与其基因结构、亚细胞定位、启动子区含HSE等密切相关；其他PnoHsp70基因在中期和后期不同程度地响应热胁迫，这与莴苣、拟南芥、水稻等植物在高温下的表达模式相似<sup>[26-28]</sup>，推测三七PnoHsp70基因家族在响应热胁迫的不同时期中可能存在功能分工。

#### 4 结论

本研究在三七中分析鉴定了20个PnoHsp70基因，分为4个亚族，同一亚族成员在进化上保守，基因结构相似，参与植物激素和逆境胁迫的响应，PnoHsp70-10等具有明显的组织特异性，对高温胁迫的响应存在3种表达模式。上述结果可为进一步研究三七PnoHsp70基因家族在热胁迫中的生物学功能提供理论依据，但其具体机制还需后续深入探索。

#### 参考文献：

- [ 1 ] 王景旭, 黄直俊, 梁传新, 等. 三七人工栽培研究现状与展望[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(S2): 8-12.
- [ 2 ] 邹石龙. 三七种植现状及其种植技巧分析[J]. 农业与技术, 2018, 38(4): 119.
- [ 3 ] 阙祖亮, 庞丹清, 陈 勇, 等. 三七的种植及采收加工现状[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 41-45.
- [ 4 ] Liu H J, Su Y W, Fan Y X, et al. Exogenous leucine alleviates heat stress and improves saponin synthesis in *Panax notoginseng* by improving antioxidant capacity and maintaining metabolic homeostasis[J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1175878.
- [ 5 ] Zhou J, Kulkarni M G, Huang L Q, et al. Effects of temperature, light, nutrients and smoke-water on seed germination and seedling growth of *Astragalus membranaceus*, *Panax notoginseng* and *Magnolia officinalis*-highly traded Chinese medicinal plants[J]. *S Afr J Bot*, 2012, 79: 62-70.
- [ 6 ] Couturier M, Buccellato M, Costanzo S, et al. High affinity binding between Hsp70 and the C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein requires an Hsp40 co-chaperone [J]. *J Mol Recognit*, 2010, 23(3): 301-315.
- [ 7 ] Rosenzweig R, Nillegoda N B, Mayer M P, et al. The Hsp70 chaperone network[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(11): 665-680.
- [ 8 ] Usman M G, Rafii M Y, Martini M Y, et al. Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2017, 33(1): 26-39.
- [ 9 ] Liu J, Pang X, Cheng Y, et al. The Hsp70 gene family in *Solanum tuberosum*: genome-wide identification, phylogeny, and expression patterns[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16628.
- [ 10 ] Cho E K, Choi Y J. A nuclear-localized HSP70 confers thermoprotective activity and drought-stress tolerance on plants[J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(4): 597-606.
- [ 11 ] Guo M, Liu J H, Ma X, et al. Genome-wide analysis of the Hsp70 family genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) and functional identification of *CaHsp70-2* involvement in heat stress[J]. *Plant Sci*, 2016, 252: 246-256.
- [ 12 ] Song P, Jia Q R, Xiao X K, et al. HSP70-3 interacts with phospholipase D<sup>δ</sup> and participates in heat stress defense[J]. *Plant Physiol*, 2021, 185(3): 1148-1165.
- [ 13 ] Xu T, Zhou H, Feng J, et al. Involvement of HSP70 in BAG9-mediated thermotolerance in *Solanum lycopersicum*[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 207: 108353.
- [ 14 ] Che R M, Liu Y R, Yan S Q, et al. Elongation factor MdEF-Tu coordinates with heat shock protein MdHsp70 to enhance apple thermotolerance[J]. *Plant J*, 2024, 117(4): 1250-1263.
- [ 15 ] Zhang L, Zhao H K, Dong Q L, et al. Genome-wide analysis and expression profiling under heat and drought treatments of HSP70 gene family in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 773.
- [ 16 ] Yu C C, Rong M, Liu Y, et al. Genome-wide identification and characterization of HSP70 gene family in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 13(1): 8.
- [ 17 ] Kose S, Furuta M, Imamoto N. Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage[J]. *Cell*, 2012, 149(3): 578-589.
- [ 18 ] Anaraki Z E, Tafreshi S A H, Shariati M. Transient silencing of heat shock proteins showed remarkable roles for HSP70 during adaptation to stress in plants[J]. *Environ Exp Bot*, 2018, 155: 142-157.
- [ 19 ] Jin Z W, Chandrasekaran U, Liu A Z. Genome-wide analysis of the Dof transcription factors in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. *Genes Genom*, 2014, 36(4): 527-537.
- [ 20 ] Jeffares D C, Penkett C J, Bähler J. Rapidly regulated genes are intron poor[J]. *Trends Genet*, 2008, 24(10): 375-378.

- [21] Alam P, Al Balawi T, Manzoor M A, et al. Genome-wide analysis of HSP70 gene family in *Beta vulgaris* and *in-silico* expression under environmental stress[J]. *BMC Plant Biol*, 2025, 25(1): 214.
- [22] Unel N M, Baloglu M C, Altunoglu Y Ç. Comprehensive investigation of cucumber heat shock proteins under abiotic stress conditions: a multi-omics survey[J]. *J Biotechnol*, 2023, 374: 49-69.
- [23] Xu Y M, Liu Y, Yi Y J et al. Genome-wide identification and characterization of HSP70 gene family in Tausch's goatgrass (*Aegilops tauschii*) [J]. *Genes (Basel)*, 2024, 16(1): 19.
- [24] Magadum S, Banerjee U, Murugan P, et al. Gene duplication as a major force in evolution[J]. *J Genet*, 2013, 92(1): 155-161.
- [25] Mishra A, Tanna B. Halophytes: Potential resources for salt stress tolerance genes and promoters[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 829.
- [26] Wang Q, Sun W J, Duan Y P, et al. Genome-wide identification and expression analysis of HSP70 gene family under high-temperature stress in lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 26(1): 102.
- [27] Lin B L, Wang J S, Liu H C, et al. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6(3): 201-208.
- [28] Ye S F, Yu S W, Shu L B, et al. Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice[J]. *Chin. Sci. Bull*, 2012, 57(4): 336-347.

## 渴络欣胶囊联合常规治疗对糖尿病肾病患者的有效性和安全性

蔡梦洁<sup>1</sup>, 韩煦<sup>1</sup>, 陈清光<sup>1</sup>, 康后生<sup>2</sup>, 李伟<sup>3</sup>, 陆灏<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021; 2. 川北医学院附属医院, 四川 南充 637000; 3. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250000)

**摘要:** 目的 探讨渴络欣胶囊联合常规治疗对糖尿病肾病患者的有效性和安全性。方法 采用回顾性队列研究, 采集3家医院患者的临床数据, 分为对照组(常规治疗)和暴露组(渴络欣胶囊联合常规治疗), 每组2 062例, 分析蛋白尿改善事件发生率、肾脏复合终点事件、实验室指标(eGFR、Cr、BUN、UA、UACR、 $\alpha$ 1-MG、HbA1c、TC、TG、LDL-C、HDL-C)、安全性指标变化。结果 暴露组蛋白尿改善事件发生率是对照组的6.029倍(95% CI 4.560~7.972), 校正后HR为5.725(95% CI 4.245~7.721); 2组肾脏复合终点事件风险比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ,  $HR=0.895$ , 95% CI 0.748~1.072)。给药2个月(1个疗程)后, 暴露组Cr、BUN、UA、UACR、 $\alpha$ 1-MG低于对照组( $P<0.05$ ); 2组eGFR、HbA1c、TC、TG、LDL-C、HDL-C比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。2组肝功能、血常规总体上正常, 渴络欣胶囊主要不良反应为腹泻。结论 渴络欣胶囊可安全有效地改善糖尿病肾病患者微量白蛋白尿水平。

**关键词:** 渴络欣胶囊; 常规治疗; 糖尿病肾病; 微量白蛋白尿; 回顾性队列研究

**中图分类号:** R287 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)01-0341-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.01.049

糖尿病肾病是最常见的糖尿病并发症之一<sup>[1]</sup>, 也是终末期肾病最主要的原因<sup>[2]</sup>, 给患者带来了巨大的经济负担, 严重影响其生活质量。研究表明, 在糖尿病肾病早期积极干预微量白蛋白尿时可减缓病情发展, 甚至逆转<sup>[2]</sup>。目前已证明, 血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI类)或血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(ARB类)、钠-葡萄糖协同转运蛋白2

抑制剂(SGLT-2)、胰高糖素样肽-1(GLP-1)、非奈利酮等药物均可改善微量蛋白尿。

中成药作为糖尿病肾病的辅助疗法, 具有良好的临床效益, 而且不良反应少<sup>[3]</sup>。渴络欣胶囊来源于中国中医科学院广安门医院首席研究员林兰教授的临床经验方, 联合常规治疗可进一步缓解微量蛋白尿<sup>[4]</sup>和临床症状, 保护肾功能<sup>[5-6]</sup>, 改善糖脂

收稿日期: 2025-06-27

基金项目: 国家自然科学基金(82104786, 82405250, 82474398); 浦东新区卫生健康委员会2024年度联合攻关项目(PW2024D-12); 上海市中医临床重点实验室项目(20DZ2272200)

作者简介: 蔡梦洁(1994—), 女, 博士, 主治医师, 从事中医药防治糖尿病及其并发症研究。E-mail: 18817772006@139.com

\*通信作者: 陆灏(1969—), 男, 博士生导师, 主任医师, 从事中医药内分泌研究。E-mail: tangniaobing107@163.com