

北柴胡和狭叶柴胡中黄酮类成分及其关键酶基因表达的组织差异分析

杨林林, 赵 钰, 韩 梅*, 杨利民*

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘 要: 目的 研究北柴胡 *Bupleurum chinense*、狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* 不同组织中黄酮类成分含量及其关键酶基因表达量的关系。方法 以北柴胡及狭叶柴胡的根、茎、叶、果实为实验材料, 采用 HPLC 法测定不同组织中黄酮类成分(芦丁、槲皮素、山柰素、异鼠李素)的含量, 用紫外分光光度法测定总黄酮含量, 用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测黄酮类成分关键酶基因 IFS、F3H、DFR 表达量, 用 SPSS 软件进行相关性分析。结果 北柴胡、狭叶柴胡地上部分(茎、叶、果实)黄酮类成分含量显著高于根, 其中黄酮类成分主要为芦丁, 芦丁在北柴胡叶中含量最高可达 106.961 mg/g; 北柴胡、狭叶柴胡中总黄酮分布有明显的组织差异, 含量由高到低为叶 ≥ 果实 > 茎 > 根; 北柴胡 IFS、F3H、DFR 基因地上部分表达量远高于根, 其中 IFS 基因表达量与芦丁含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), F3H 基因和 DFR 基因的组织表达量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 而狭叶柴胡各组织 IFS、F3H、DFR 基因表达均处于较低水平。结论 北柴胡、狭叶柴胡黄酮类成分组织含量与关键酶基因的组织表达有一定的一致性, 关键酶基因的组织差异表达调控了黄酮类成分在不同组织中的合成与积累。

关键词: 北柴胡; 狭叶柴胡; 芦丁; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素; 基因表达量; 相关性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0188-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.028

Analysis of tissues difference of flavonoids and key enzyme genes expression in *Bupleurum chinense* and *B. scorzonifolium*

YANG Lin-lin, ZHAO Yu, HAN Mei, YANG Li-min

College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between the content of flavonoids and the key enzyme genes expression in different tissues of *Bupleurum chinense* and *B. scorzonifolium*. **Methods** The roots, stems, leaves, and fruits of *B. chinense* and *B. scorzonifolium* were used as test materials, determination of flavonoids (rutin, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin) in different tissues by HPLC, determination of total flavonoids by UV spectrophotometry, the tissues expression of key enzyme genes (IFS, F3H, and DFR) in flavonoids synthesis was determined by real-time quantitative PCR, correlation analysis was performed with SPSS. **Results** The content of flavonoids in the aerial parts (stems, leaves, and fruits) of *B. chinense* and *B. scorzonifolium* was significantly higher than that in roots, the content of flavonoids was mainly rutin, and the content of rutin in the leaves of *B. chinense* leaves was up to 106.961 mg/g; The distribution of total flavonoids in *B. chinense* and *B. scorzonifolium* was obviously different, the content was from high to low: leaves ≥ fruit > stem > root; The expression of *B. chinense* IFS, F3H, and DFR gene in the aerial parts was much higher than that in roots, IFS gene was significantly positive correlated with rutin ($P < 0.05$), F3H gene was significantly positive correlated with DFR gene ($P < 0.05$), but the expression of IFS, F3H, and DFR gene in each tissues of *B. scorzonifolium* was at lower level. **Conclusion** The content of flavonoids in different parts of *B. chinense* and *B. scorzonifolium* was consistent with the expression of flavonoids synthesis key enzyme genes, the differential expression of key enzyme genes regulates the synthesis and accumulation of flavonoids in different tissues.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; *Bupleurum scorzonifolium* Willd.; rutin; quercetin; kaempferin; isorhamnetin; gene expression levels; correlation coefficient

北柴胡 *Bupleurum chinense* DC.、狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 是伞形科柴胡属多年生草本植物^[1-2]。《中国药典》2015 年版中规定北柴胡、狭

叶柴胡的干燥根为药材柴胡^[3], 用于治疗炎症、解热、疟疾等已有 2 000 年以上历史^[4]。柴胡多以根入药, 然而多篇报道表明柴胡地上部分黄酮类成

收稿日期: 2018-09-06

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-21)

作者简介: 杨林林 (1992—), 男, 博士研究生, 研究方向为植物生态学和分子生物学。E-mail: 731522990@qq.com

*通信作者 杨利民 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源生态与药材质量调控。E-mail: ylmh777@126.com

韩 梅 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为资源植物生态与质量调控研究。E-mail: hanmei77@sohu.com

分含量丰富^[5-6], 黄酮类成分在植物生长发育过程中扮演重要角色, 保护植物免受紫外线、细菌、真菌等的伤害^[7], 还可使植物呈现不同的花色^[8]。同时, 黄酮类成分对肿瘤、心血管等疾病的治疗和预防都发挥重要作用^[9]。但入药过程中柴胡地上部分常被舍去, 地上部分未被充分利用, 无疑造成了药用植物资源的浪费。

黄酮类化合物独特的生物活性备受研究者关注, 药用植物黄酮类成分代谢合成途径及功能基因的研究已取得较大进展, 但是北柴胡、狭叶柴胡中黄酮类成分生物合成途径的研究还比较滞后, 少见柴胡属植物中黄酮类生物合成途径功能基因的报道。Sui 等^[10]对北柴胡、狭叶柴胡的根组织进行了转录组测序 (NCBI 登录号: GSE51187), 从中发现了多个参与次级代谢产物合成的基因, 本研究在此转录组数据库中选择了北柴胡、狭叶柴胡中 3 个参与黄酮类化合物合成的同源关键酶基因。其中异黄酮合成酶 (isoflavone synthase, IFS) 催化二氢黄酮类化合物的芳香基团由 C-2 位向 C-3 位转移生成异黄酮类化合物^[11]; 黄烷酮-3 β -羟化酶 (flavanone 3- β -hydroxylase, F3H) 可催化二氢黄酮类化合物 C-3 位羟基化生成二氢黄酮醇类化合物^[12], 二氢黄酮醇还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 是植物花青素和鞣质合成的重要调控分支点^[13-14]。对黄酮类化合物合成关键酶基因进行表达分析, 同时与黄酮类成分含量相关联, 可为研究柴胡中黄酮类成分积累和调控机制提供基础。

本研究以北柴胡及狭叶柴胡根、茎、叶、果实为实验材料, 用高效液相色谱法测定不同组织中 4 种黄酮类成分 (芦丁、槲皮素、山柰素、异鼠李素) 的含量, 紫外分光光度法测定其中总黄酮含量, 使用实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR) 仪分别测定北柴胡、狭叶柴胡不同组织中 3 个同源的黄酮类化合物合成关键酶基因 (IFS、F3H、DFR) 表达量, 初步研究了 3 个黄酮类化合物合成关键酶基因与黄酮类化合物含量的关系。以期通过对北柴胡、狭叶柴胡中黄酮类化合物生物合成途径的研究, 推动柴胡次生代谢工程的发展, 为柴胡资源的充分利用、提高药材品质、质量控制等提供技术支撑。

1 材料与设备

1.1 材料

北柴胡于 2017 年 9 月 3 日采集于吉林农业大学药园, 野生狭叶柴胡于 2017 年 9 月 5 日采集自

吉林省白城市洮北区平台镇西北方向约 2.71 km (N45° 74', E122° 64') 草甸草原, 分别随机采集北柴胡、狭叶柴胡各 10 株, 经吉林农业大学中药材学院杨利民教授鉴定为北柴胡 *B. chinense* DC.、狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 正品。将采集的新鲜样本置于冰盒中保鲜, 带回实验后小心用净水冲刷泥沙, 用滤纸吸干水分后将北柴胡及狭叶柴胡分解为根、茎、叶、果实 4 部分, 将北柴胡、狭叶柴胡不同组织用灭菌后的小刀切成小块, 北柴胡、狭叶柴胡不同组织部位的小块混合均匀后分装于冻存管中, 立即置于液氮中速冻, 贮存于 -80 °C 超低温冷藏箱以用于后续实验。将剩余清洗干净的北柴胡、狭叶柴胡组织 (根、茎、叶、果实) 置于烘箱中低温烘干至恒定质量, 用粉碎机磨成细粉, 用于 4 种黄酮类成分及总黄酮含量测定。

1.2 试剂

对照品芦丁 (质量分数 91.9%, 批号 100080-201610) 和槲皮素 (质量分数 99.1%, 批号 100081-201610) 购于中国食品药品检定研究院; 对照品山柰素 (质量分数 98%, 批号 B1704064) 和异鼠李素 (质量分数 98%, 批号 K1624010) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯, Fisher Scientific 公司); 甲醇 (萃取剂) 等其他试剂均为国产分析纯; 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒购于长春百金有限公司; PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] GC 荧光染料等购于长春海灵科贸有限公司。

1.3 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); SMART-N 纯水机仪 (上海康雷分析仪器有限公司); SB-800 超声波清洗仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); AUY220 电子天平 (日本岛津公司); UV-1700 紫外分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); Mx3000P 荧光定量 PCR 仪 (美国 Aligent); MDF-382E 超低温冰箱 (日本 SANYO 公司); Heraeus Fresco 21 微量离心机 (美国 Thermo 公司); NanoDrop 2000 核酸/蛋白定量仪 (美国 Thermo 公司); SIM-F140 制冰机 (日本 Sanyo 公司)。

2 方法

2.1 HPLC 法测定黄酮类成分含量

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取芦丁、槲皮素、山柰素对照品 10 mg, 精密称量, 小心置于 10 mL

量瓶中。由于异鼠李素溶解度较低,另精密称取异鼠李素对照品 10 mg,小心置于 100 mL 量瓶中。分别加甲醇定容至刻度,摇匀,即得各对照品母液(芦丁、槲皮素、山柰素质量浓度为 1 mg/mL,异鼠李素质量浓度为 0.1 mg/mL)。分别精密量取芦丁、槲皮素、山柰素对照品母液各 1 mL,异鼠李素对照品母液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得到混合对照品溶液(芦丁、槲皮素、山柰素质量浓度为 0.1 mg/mL,异鼠李素质量浓度为 0.05 mg/mL)。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取北柴胡或狭叶柴胡根、茎、叶、果实粉末 2.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入体积分数 70% 甲醇 40 mL,超声(功率 800 W,频率 40 kHz)处理 30 min,滤过,重复提取 3 次后合并滤液置于蒸发皿中,50 ℃ 水浴挥干,残渣用 70% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,过 0.22 μm 滤膜后即得供试品溶液。由于北柴胡、狭叶柴胡地上部分芦丁含量极高,需进一步稀释 10~25 倍得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 参考韦英杰等^[5]的方法。依利特 Hypersil ODS2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相 0.1% 磷酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱,条件:0~15 min, 5%~20% B; 15~30 min, 20%~25% B; 30~60 min, 25%~45% B; 60~70 min, 45%~50% B。体积流量 1.0 mL/min,检测波长 360 nm,柱温 35 ℃。

2.1.4 标准曲线的绘制 取黄酮类化合物芦丁、槲皮素、山柰素、异鼠李素混合对照品溶液,依次稀释得到浓度分别为初始浓度 1/50、1/20、1/10、1/5、2/5、3/5、4/5、1/1 的黄酮类化合物混合对照品溶液。按照“2.1.3”项色谱条件,依次进样 20 μL,以峰面积为纵坐标(Y),溶液质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,结果线性关系良好,回归方程见表 1。

2.1.5 4 种黄酮类化合物含量测定 分别取北柴胡或狭叶柴胡根、茎、叶、果实的供试样品 3 份,按照“2.1.2”项方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项色谱条件进样 20 μL,通过回归方程计算其中 4 种黄酮类化合物的含量。

2.2 紫外分光光度法测定样品中总黄酮含量

2.2.1 对照品溶液的配制 取芦丁对照品 10 mg,精密称量,小心置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得芦丁对照品溶液(芦丁质量浓

表 1 芦丁、槲皮素、山柰素、异鼠李素的线性回归分析
Table 1 Regression analysis of rutin, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin

化合物	回归方程	r^2	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
芦丁	$Y=34.662X-36.254$	0.999 1	2~100
槲皮素	$Y=80.856X-55.956$	0.999 9	2~100
山柰素	$Y=85.832X-96.255$	0.999 9	2~100
异鼠李素	$Y=80.575X-105.09$	0.999 2	1~50

度为 1 mg/mL)。

2.2.2 供试品溶液的制备 按“2.1.2”项的方法制备。

2.2.3 标准曲线的绘制 参考周亚福等^[15]的方法。分别精密量取芦丁对照品溶液 0、0.02、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60、2.40 mL 于 10 mL 量瓶中,加 60% 乙醇溶液定容至 4 mL,各加 5% 亚硝酸钠溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,再各加 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,各加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,用 60% 乙醇溶液定容至 10 mL,摇匀,放置 15 min,以蒸馏水做空白对照,在 510 nm 处检测吸光度(A)值。以 A 值为纵坐标(Y),总黄酮质量为横坐标(X),绘制标准曲线,结果在 0.02~2.40 mg,总黄酮质量与 A 值线性关系良好,回归方程为 $Y=0.772X-0.0082$, $r^2=0.9995$ 。

2.2.4 样品总黄酮含量测定 分别取北柴胡或狭叶柴胡根、茎、叶、果实的样品 3 份,按照“2.2.2”项方法制备供试样品溶液,取 1 mL 供试品溶液按“2.2.3”项方法操作,通过回归方程计算其中总黄酮的含量。

2.3 qRT-PCR 法测定各基因的表达量

2.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 分别取北柴胡或狭叶柴胡根、茎、叶、果实组织样品 50~200 mg 在液氮中研磨成粉,按照长春百金公司的总 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取总 RNA,采用 NanoDrop 2000 检测仪测定不同组织总 RNA 浓度。采用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA,于 -20 ℃ 保存备用。

2.3.2 qRT-PCR 法 利用 qRT-PCR 的方法检测北柴胡、狭叶柴胡中黄酮类成分合成关键酶基因的组织表达模式。北柴胡以延伸因子 EF1α 基因为内参^[16],狭叶柴胡以微管蛋白 β-tubulin 基因为内参。qRT-PCR 法分别检测北柴胡、狭叶柴胡不同组织(根、茎、叶、果实)中 IFS、F3H、DFR 基因表达量(转录

组数据库中北柴胡及狭叶柴胡同源 IFS 基因编号分别为 HHH_rep_c6754、ZZZ_rep_c363; 同源 F3H 基因编号分别为 ZZZ_rep_c8447、HHH_c9371; 同源 DFR 基因编号分别为 HHH_rep_c2965、ZZZ_rep_c2235)。每个反应重复 3 次, 各基因以根中的表达量作为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析结果。

反应体系: 灭菌水 7.5 μL , SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μL , 引物各 0.5 μL , 50 $\times$ ROX Reference Dye II 0.5 μL , cDNA 模板 1 μL , 总计 20 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 45 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s)。所用各引物序列见表 2。

表 2 qRT-PCR 引物

Table 2 Primers of relative quantitative PCR

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	扩增长度/bp
IFS	ACAACGGCGGAACATACG	ACACTGCTTGCCACTCACC	176
F3H	AAGAAGTGGAGCAAGGGAAAG	CGGAGACATTGGTGGAGAAA	165
DFR	ATGTTGCTACACCGTGGTTAC	AAATCGAAAGATCCCTCCTC	132
EF1 α	GAAGGTGACAACATGATTGAGAGG	TGAAGAGGGAGACGAAGAGGTT	128
β -tubulin	ATGTTCAAGCGCAAGGCTT	TCTGCAACCGGGTCATTTCAT	101

3 结果与分析

3.1 不同组织中 4 种黄酮类化合物含量

HPLC 法测定北柴胡及狭叶柴胡根、茎、叶、果实中 4 种黄酮类成分含量结果如表 3 所示, 整体上北柴胡根、叶、果实中 4 种黄酮类成分含量高于狭叶柴胡, 芦丁在 4 种黄酮类成分中占比极高, 占 4 种成分总量的 95% 以上, 槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量极低, 在北柴胡、狭叶柴胡的根和茎中难以检测到槲皮素和异鼠李素。芦丁在北柴胡不同组织中的分布规律为叶 > 果实 > 茎 > 根, 芦丁在北柴胡不同组织中的分布以叶中含量最高, 达 106.961 mg/g; 芦丁在狭叶柴

胡不同组织中的分布为果实中含量最高, 达 27.047 mg/g。

3.2 不同组织中总黄酮含量

紫外分光光度法测定北柴胡及狭叶柴胡根、茎、叶、果实中总黄酮含量结果如图 1 所示, 北柴胡中总黄酮含量组织分布由高到低为叶 > 果实 > 茎 > 根, 北柴胡叶中总黄酮含量丰富, 达 118.826 mg/g, 北柴胡根中质量分数仅 5.705 mg/g; 狭叶柴胡中总黄酮含量组织分布由高到低为叶 $\approx$ 果实 > 茎 > 根, 在狭叶柴胡叶和果实中总黄酮质量分数分别为 35.884 mg/g 和 37.594 mg/g。比较北柴胡、狭叶柴胡不同组织中总黄酮含量, 可知北柴胡全草总

表 3 北柴胡、狭叶柴胡不同组织中 4 种黄酮类成分含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Contents of four flavonoids in different tissues of *B. chinense* and *B. scorzonrifolium* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药材	部位	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
		芦丁	槲皮素	山柰素	异鼠李素
北柴胡	根	0.179	—	0.009	—
	茎	2.639	—	0.008	—
	叶	106.961	0.265	0.034	0.071
	果实	47.525	0.386	0.011	0.042
狭叶柴胡	根	0.080	—	—	—
	茎	4.974	—	—	—
	叶	18.756	0.008	0.017	0.007
	果实	27.047	0.111	0.010	—

“—” 表示该成分未检出

“—” means that the component is not detected

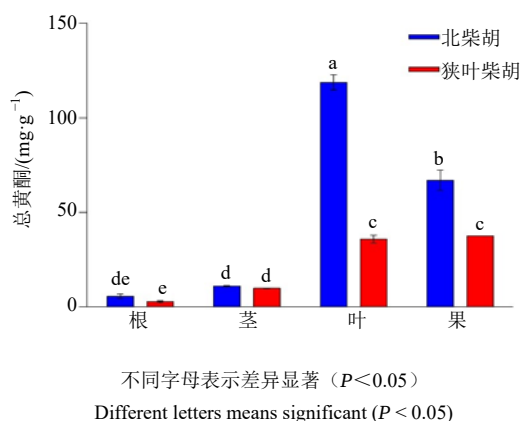


图 1 北柴胡、狭叶柴胡不同组织中总黄酮含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 1 Total flavonoids contents in different tissues of *B. chinense* and *B. scorzonrifolium* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

黄酮含量高于狭叶柴胡, 外部环境和内在遗传因素差异共同作用下造成了药材的异种异质。北柴胡、狭叶柴胡地上部分, 尤其是叶和果实, 存在丰富的黄酮类成分资源, 应对其进行合理开发利用, 减少药用植物资源的浪费。

3.3 不同组织中黄酮类成分合成关键酶基因表达量

采用 qRT-PCR 方法, 检测北柴胡根、茎、叶、果实组织中参与黄酮类成分合成的关键酶基因 IFS、F3H、DFR 的相对表达量, 结果 (图 2) 发现北柴胡 IFS、F3H、DFR 基因主要在地下部分表达, 根组织中表达量极低。北柴胡 IFS 基因在叶中表达量最高, 其次是茎和果实, 北柴胡 IFS 基因在地下部分的表达量是地上部分根中的数百倍; 北柴胡 F3H、DFR 基因有相似的组织表达模式, 表达量高低均为果实 > 茎 > 叶 > 根, 北柴胡 F3H、DFR 基因在果实中的表达量是根中的近 2 000 倍。北柴胡 IFS、F3H、DFR 基因的表达表现出了明显的组织特异性, 其在地上部分的特异性表达直接影响了北柴胡中黄酮类成分的组织分布, 由于根组织中北柴胡

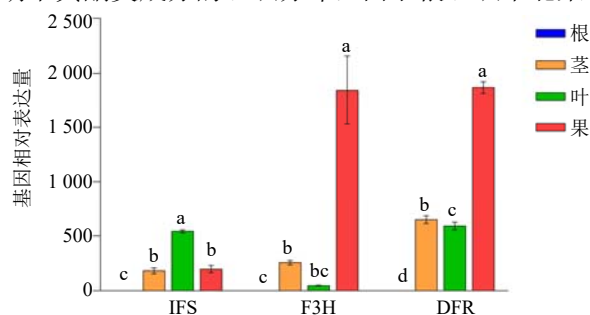


图 2 北柴胡关键酶基因 qRT-PCR 表达分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Expression analysis of *B. chinense* key enzyme genes by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

黄酮类成分合成基因的沉默, 导致根组织中极少合成或者不合成黄酮类成分。

采用 qRT-PCR 方法, 检测狭叶柴胡根、茎、叶、果实组织中参与黄酮类成分合成的关键酶基因 IFS、F3H、DFR 的相对表达量, 结果见图 3。狭叶柴胡 IFS、F3H、DFR 基因的组织表达与北柴胡存在较大差异, 其中狭叶柴胡 IFS、DFR 基因有相似的组织表达模式, 狭叶柴胡叶中 IFS、DFR 基因的表达显著高于根、茎、果实, 但叶中表达量仅为根中的 2 倍左右, 而在北柴胡中 IFS、DFR 基因叶中的表达量可达根中的数百倍; 狭叶柴胡 F3H 基因在不同组织中表达量高低为根 > 果实 > 叶 > 茎。狭叶柴胡中 3 个黄酮类成分基因的表达并未表现出地上部分显著高于地下部分, 可能是因为狭叶柴胡处于果实后生长期, 其组织中黄酮类成分已经积累到一定程度, 因此相关基因表达处于较低水平, 其组织内不再进行相关次级代谢产物的合成。

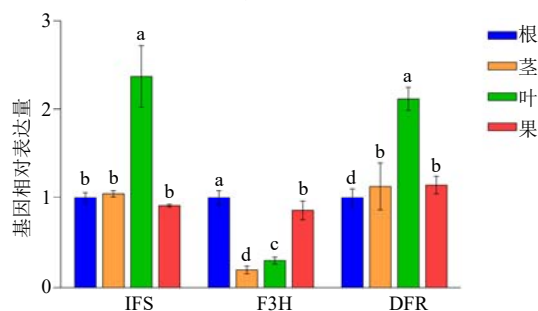


图 3 狭叶柴胡关键酶基因 qRT-PCR 表达分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Expression analysis of *B. scorzonrifolium* key enzyme genes by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 黄酮类成分含量与关键酶基因表达相关性分析

对北柴胡不同组织中黄酮类成分含量及其关键酶基因表达量进行 Pearson 相关性分析, 结果见表 4。芦丁含量与总黄酮含量极显著相关 ($P < 0.01$), 说明芦丁是总黄酮中的主要成分, 芦丁作为北柴胡中的主要黄酮类化合物, 可能在北柴胡生长发育过程中发挥着重要的生理功能, 对北柴胡抵御紫外线、抗菌、抗氧化等生物过程发挥着积极作用^[17]。北柴胡 IFS 基因的表达与芦丁含量表现出显著正相关 ($P < 0.05$), 说明北柴胡 IFS 基因对植物组织中芦丁的合成与积累有重要影响。北柴胡 F3H 基因表达和 DFR 基因表达呈显著正相关 ($P < 0.05$), 它们在北柴胡中可能存在协同调控来共同影响黄酮类化合物合成, 北柴胡 F3H、DFR 基因并未与黄酮类成分

表 4 北柴胡基因表达量与黄酮类成分含量相关性分析

Table 4 Correlation of gene expression and flavonoids in different tissues of *B. chinense*

成分或基因	芦丁	总黄酮	IFS	F3H	DFR
芦丁	1.000	0.995**	0.959*	0.067	0.266
总黄酮	0.995**	1.000	0.912	0.166	0.360
IFS	0.959*	0.912	1.000	-0.100	0.169
F3H	0.067	0.166	-0.100	1.000	0.954*
DFR	0.266	0.360	0.169	0.954*	1.000

*相关性显著 ($P < 0.05$), **相关性极显著 ($P < 0.01$), 下同*Correlation is significant ($P < 0.05$), **Correlation is very significant ($P < 0.01$), same as below

均表现出高度的相关性, 这是由于它们位于黄酮类成分合成途径的中游, 最终植物体内各种单体黄酮类化合物还需要多个关键酶基因的调控。对狭叶柴胡不同组织中黄酮类成分含量及其关键酶基因表达量进行 Pearson 相关性分析, 结果见表 5。与北柴胡相同的是, 芦丁也是狭叶柴胡组织中的主要黄酮类成分 ($P < 0.05$)。狭叶柴胡 IFS 基因与 DFR 基因表达显著正相关 ($P < 0.05$), 但狭叶

柴胡 3 个黄酮类成分关键酶基因的表达未与黄酮类成分含量的相关性达到显著水平, 推测可能是由于采样时狭叶柴胡处于果实后生长期, 其体内黄酮类成分已经积累到一定程度, 狭叶柴胡 IFS、F3H、DFR 基因表达不再活跃, 而基因的表达对次级代谢产物最终的形成往往具有滞后性, 因此在本研究中各关键酶基因的表达与黄酮类成分含量没有达到显著相关。

表 5 狭叶柴胡基因表达量与黄酮类成分含量相关性分析

Table 5 Correlation of gene expression and flavonoids in different tissues of *B. scorzonrifolium*

成分或基因	芦丁	总黄酮	IFS	F3H	DFR
芦丁	1.000	0.972*	0.256	-0.005	0.407
总黄酮	0.972*	1.000	0.476	-0.141	0.610
IFS	0.256	0.476	1.000	-0.524	0.986*
F3H	-0.005	-0.141	-0.524	1.000	-0.537
DFR	0.407	0.610	0.986*	-0.537	1.000

4 讨论

柴胡属药材因地上部分含有丰富的黄酮类化合物而被广大学者关注, 黄酮类成分在植物提高自身保护和生存竞争能力、协调与环境关系上发挥着重要作用, 同时也为人类医药健康事业发展提供了潜在的资源。本研究对北柴胡、狭叶柴胡中 4 种黄酮类成分及总黄酮含量进行了测定, 发现北柴胡、狭叶柴胡中黄酮类成分主要是芦丁, 在北柴胡叶中芦丁含量高达 106.961 mg/g, 芦丁在北柴胡、狭叶柴胡叶和果实中含量较高, 根中含量极低, 这与前人的研究结果一致^[5,18-21]。而北柴胡、狭叶柴胡不同组织中槲皮素、山柰素、异鼠李素含量极低, 甚至在根、茎中检测不到。目前《中国药典》2015 年版中仅规定以北柴胡、狭叶柴胡的干燥根入药, 但我国少数地区还以狭叶柴胡全草入药^[22], 因此进行北柴胡、狭叶柴胡不同组织器官中要药效成分差异的物质基础研究, 根据不同需求对北柴胡、狭叶柴胡的地上部分和地下部分分别药用, 可提高药材资源的利用率, 实现药材的进一步合理开发利用。

药材的主要药效成分多为次级代谢产物, 清晰地认识以次生代谢产物为主体的药效成分的形成积累规律是实现药材质量控制的重要基础, 也是目前药材质量控制技术研究的瓶颈^[23]。关于植物中黄酮类化合物途径的关键酶基因研究已取得较大进展, 各催化黄酮类成分合成的关键酶基因已逐渐发掘并明确其功能, 但是在柴胡属植物中少见关于黄酮类成分合成关键酶基因的报道, 过去人们主要关注柴胡属植物中皂苷类成分的分子合成机制, 而随着柴胡属植物不同组织器官中次级代谢产物成分、化学结构的相关报道, 柴胡属植物地上部分丰富的黄酮类成分也逐渐受到关注, 但是关于它们的生物合成机制研究还较少。本实验研究了柴胡属两种植物(北柴胡、狭叶柴胡)中 3 个黄酮类成分合成关键酶基因 (IFS、F3H、DFR) 的组织表达模式, 发现北柴胡 IFS、F3H、DFR 基因主要在地下部分表达, 它们的组织表达模式与黄酮类化合物的组织分布具有一致性, 其中北柴胡 IFS 基因表达与芦丁含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 说明黄酮类化合物的

组织差异表达一定程度上造成了其合成的次生代谢产物的组织差异,而黄酮类次生代谢产物在植物中可起到抵御逆境、抗菌、抗病毒等作用,与外部环境直接接触的地上部分可能受外界环境(紫外线等)影响从而上调了黄酮类化合物合成的关键酶基因的表达,因而得以适应环境。在狭叶柴胡中研究发现 IFS、F3H、DFR 基因的表达均处于较低水平,可能是因为采样时狭叶柴胡处于果实后生长期,其体内黄酮类化合物产量足以保证其适应环境,因而相关基因的表达下调。次生代谢产物在植物提高自身保护和生存竞争能力、协调与环境关系上发挥着重要作用,综合北柴胡、狭叶柴胡中黄酮类化合物关键酶基因的组织表达情况,其表达的上调、下调可能受外部环境的影响,植物体内受到外部环境信号的调控,从而增强、减弱植物体内次生代谢产物的合成与积累^[23]。深入开展阐明北柴胡、狭叶柴胡中次生代谢化合物合成与积累的基因表达机制,从分子角度阐释北柴胡、狭叶柴胡次生代谢产物的组织差异成因,以及外部环境如何对植物体内次生代谢产物的合成产生影响,是实现药材质量资源充分利用、不同组织差别对待的基础,通过认识规律阐明机制推动药材质量控制技术的创新,最终实现药材质量“安全、可控、稳定、一致”的目标。

参考文献

- [1] Kuang H, Sun S, Yang B, et al. New megastigmane sesquiterpene and indole alkaloid glucosides from the aerial parts of *Bupleurum chinense* DC [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(1): 35-38.
- [2] 黄涵签,王潇晗,付航,等. 柴胡属药用植物资源研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2989-2996.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] Yang Z Y, Chao Z, Huo K K, et al. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(6): 416-423.
- [5] 韦英杰,王莱,宁青,等. HPLC 法同时测定柴胡与春柴胡中皂苷类及黄酮类成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(5): 879-883.
- [6] 谭玲玲,侯晓敏,胡正海. 狭叶柴胡营养器官中柴胡皂苷和黄酮类化合物的积累部位及含量比较 [J]. *西北植物学报*, 2014, 34(2): 276-281.
- [7] 潘俊倩,佟曦然,郭宝林. 光对植物黄酮类化合物的影响研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(21): 3897-3903.
- [8] 冯欢,易姝利,左佳琦,等. 基因工程及花色素合成途径在花色改良中的研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33(2): 445-451.
- [9] 汤立建,赵良才,李庆林,等. 黄芩黄酮类成分抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(1): 21-23.
- [10] Sui C, Chen M, Xu J, et al. Comparison of root transcriptomes and expressions of genes involved in main medicinal secondary metabolites from *Bupleurum chinense* and *Bupleurum scorzonnerifolium*, the two Chinese official Radix Bupleuri source species [J]. *Physiol Plant*, 2015, 153(2): 230-242.
- [11] Misra P, Pandey A, Tewari S K, et al. Characterization of isoflavone synthase gene from *Psoralea corylifolia*: A medicinal plant [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(7): 747-755.
- [12] Xiong S, Tian N, Long J, et al. Molecular cloning and characterization of a flavanone 3-Hydroxylase gene from *Artemisia annua* L [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 105: 29-36.
- [13] Schijlen E G, Ric D V C, van Tunen A J, et al. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(19): 2631-2648.
- [14] Dick C A, Buenrostro J, Butler T, et al. Arctic mustard flower color polymorphism controlled by petal-specific downregulation at the threshold of the anthocyanin biosynthetic pathway [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18230.
- [15] 周亚福,毛少利,李思锋,等. 柴胡属 5 种植物总皂苷和总黄酮含量的测定 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(5): 1241-1243.
- [16] Dong L, Sui C, Liu Y, et al. Validation and application of reference genes for quantitative gene expression analyses in various tissues of *Bupleurum chinense* [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(8): 5017-5023.
- [17] 梅青刚,袁伟成,王淳. 黄酮醇类化合物的合成研究进展 [J]. *有机化学*, 2015, 35(1): 70-84.
- [18] 谭玲玲,蔡霞,胡正海. 北柴胡各器官中总黄酮动态变化研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(2): 286-287.
- [19] 谭玲玲,蔡霞,胡正海. 狭叶柴胡中黄酮类化合物含量及其动态变化研究 [J]. *南方农业学报*, 2012, 43(2): 223-226.
- [20] 梅赞,杨杰,范慧佳,等. 4 种柴胡地上部分黄酮类成分的含量测定 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(10): 932-935.
- [21] 段英姿,客绍英. 不同引种柴胡不同生长期地上部总黄酮含量比较研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(5): 394-398.
- [22] 杨利民,张永刚,林红梅,等. 中药材质量形成理论与控制技术研究进展 [J]. *吉林农业大学学报*, 2012, 34(2): 119-124.
- [23] 孔垂华,徐涛,胡飞,等. 环境胁迫下植物的化感作用及其诱导机制 [J]. *生态学报*, 2000, 20(5): 849-854.