

• 药材与资源 •

生态因子及关键酶基因表达对秋季黄芩采收期主要药效成分合成的影响

张 甜, 程 林, 杨林林, 林红梅, 杨利民*, 韩 梅*

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要:目的 研究黄芩秋季采收期药效成分的动态变化及生态因子和关键酶表达对其的影响。方法 以人工栽培的一年生黄芩为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法测定秋季连续时间黄芩根组织中 9 种关键酶基因 (PAL、C4H、4CL、CHS、CHI、FNS、F6H、UBGAT、GUS) 的表达量; 采用 HPLC 法测定黄芩根中 4 种主要黄酮类化合物 (黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素) 的含量; 以生态气象站对黄芩样地气象数据进行采集; 采用 SPSS 统计软件和 DPS 统计软件进行数据分析。结果 4 种黄酮类化合物含量在一年生黄芩秋季呈缓慢下降的趋势, 因此黄芩秋季最佳采收时间应在 9 月初; 灰色关联度分析结果表明影响 4 种黄酮类药效成分较大的生态因子为土壤含水量、最高空气温度、空气湿度、光合有效辐射; C4H、UBGAT 基因的表达对黄芩秋季根部黄酮类化合物的积累具有重要影响; 最大降雨强度可能通过对关键酶基因表达的影响来间接影响黄芩药效成分的积累。结论 明确了一年生黄芩秋季采收期 4 种主要黄酮类药效成分的动态变化和黄酮类化合物关键酶基因的表达, 为黄芩黄酮类化合物合成生理生态机制的明晰和黄芩药材质量的提高提供了理论依据。

关键词: 黄芩; 黄酮类化合物; 关键酶基因表达; 生态因子; 药材质量; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0936-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.022

Effects of ecological factors and gene expression of key enzymes on synthesis of major medicinal ingredients of *Scutellaria baicalensis* in autumn

ZHANG Tian, CHENG Lin, YANG Lin-lin, LIN Hong-mei, YANG Li-min, HAN Mei

College of Chinese materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: **Objective** To study the dynamic changes of the pharmacodynamic components of *Scutellaria baicalensis* in the harvest period and the effects of ecological factors and key enzyme expression on it. **Methods** The artificial cultivated annual *S. baicalensis* was studied and the expression of nine key enzyme genes (PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, FNS, F6H, UBGAT, and GUS) in the roots of *S. baicalensis* were determined by real-time quantitative PCR. The content of four main flavonoids (baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin) in the roots was determined by HPLC. The meteorological data of *S. baicalensis* were collected by the ecological meteorological station. SPSS statistical software and DPS statistical software were used for data analysis. **Results** The content of flavonoids of four monomers of annual *S. baicalensis* decreased slowly in autumn, so the best harvest time of *S. baicalensis* was in early September. The results of grey correlation analysis showed that the ecological factors affecting the four flavonoids were SWC, Max Ta, RH, and PAR. The expression of C4H and UBGAT genes had an important effect on the accumulation of flavonoids in the roots of *S. baicalensis* in autumn. Maximum rainfall intensity may indirectly affect the accumulation of the pharmacodynamic components of *S. baicalensis* by affecting the gene expression of key enzymes. **Conclusion** The dynamic changes of four main flavonoids of annual *S. baicalensis* in autumn and the expression of key enzyme genes of *S. baicalensis* annual are clarified, providing the theoretical basis for the clarification of the physiological and ecological mechanism of the biosynthesis of *S. baicalensis* and the improvement of the quality of *S. baicalensis*.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; flavonoids; key enzyme gene expression; ecological factors; medicinal materials quality; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为唇形科多年生草本植物, 中药黄芩是其干燥根^[1], 具有清热

燥湿、泻火解毒和止血安胎的功效^[2]。黄芩的主要药效成分是黄酮类化合物, 其中黄芩苷、汉黄芩苷、

收稿日期: 2018-09-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31570327); 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20170101029JC)

作者简介: 张 甜 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生态学。Tel: 15843016349 E-mail: 1258555166@qq.com

*通信作者 韩 梅 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为药用植物生理与分子生态学。E-mail: 2432273234@qq.com

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研究。E-mail: ylmh777@126.com

黄芩素和汉黄芩素等是主要活性成分,也是黄芩及其制剂的主要质量控制指标^[3-5]。

影响药材质量的因素是十分复杂的,除环境因素外,遗传也是造成药材活性成分含量差异的主要因素^[6]。目前黄芩苷等活性成分的生物合成途径已取得较大进展^[7],其生物合成途径包括多步酶促反应,关键酶有苯丙氨酸解氨酶(PAL)、桂皮酸-4-羟化酶(C4H)、香豆酰辅酶A连接酶(4CL)、查耳酮合成酶(CHS)、查耳酮异构酶(CHI)、黄酮合成酶(FNS)、黄酮类-6-羟化酶(F6H)、黄芩素-7-O-葡萄糖醛基转移酶(UGAT)和 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)等。虽然已经从黄酮类化合物生物合成途径中发掘出多个关键酶基因,但这些基因的表达对黄酮类合成的调控机制尚不清晰,有关生态因子对黄酮类化合物合成关键酶基因表达影响的研究还比较少。中药材的药效成分质量除了受遗传因子的调控和环境条件的影响外,采收期也是十分重要的因素^[8-9],研究表明,从药效成分含量方面考虑,黄芩的最佳采收期为秋季^[10-12],从植物学来说秋季更适宜采收黄芩^[13],而秋季药效成分的系统变化情况还未见研究报道。

本研究以一年生黄芩根组织部位为材料,并选择已经得到功能验证的9种黄酮类化合物合成关键酶基因(PAL、C4H、4CL、CHS、CHI、FNS、F6H、UGAT、GUS),对黄芩秋季连续时间的表达量进行测定,测定了黄芩根中的4种单体黄酮类化合物(黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素)在不同生长时间的含量变化、采集了黄芩样地气象数据,包括光合有效辐射(PAR)、降雨量、最大降雨强度、空气湿度(RH)、土壤含水量(SWC)、土壤温度、空气温度(Ta)、最大空气温度(Max Ta)、最低空气温度(Min Ta),分析了生态因子对黄芩黄酮类化合物积累及其关键酶基因表达的影响,为指导黄芩秋季采收和黄芩药材质量的提高提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

试验点设在吉林省长春市吉林农业大学药用植物园(N: 43°48'24", E: 125°24'59"),供试黄芩种子源自吉林农业大学药用植物园,经吉林农业大学中药材学院韩梅教授鉴定为唇形科黄芩属黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi, 于2016年9月23日播种,播种密度行距20 cm,株距5 cm,样地长35 m,宽10 m,样地面积350 m²,生长期间田间管理

水平相同。2017年9月1日—10月31日取样,平均每5天取样1次,采样原则为“五点取样法”,即在种植地块选择5个区域进行取样,每个区域取1株完整样品。将供试黄芩样品置于冰盒中保鲜,带回实验室后迅速洗净,吸水纸吸干,部分根组织切成小块置于冻存管,使用液氮对样品进行快速冷冻,贮存于-80℃超低温冷藏箱以用于后续实验,剩余样品置于烘箱中60℃烘干至恒定质量,用粉碎机磨成细粉,过60目筛,以备用。

1.2 试剂与仪器

多糖多酚植物总RNA提取试剂盒、Bioteke Super RT Kit cDNA合成试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司); NanoPhotometer P330 核酸/蛋白定量仪(Implen公司,德国)、ProFlex™ Base 梯度PCR扩增仪(Applied Biosystems公司,美国)、Stratagene Mx3000P 荧光定量PCR仪、1260型高效液相色谱仪(Agilent公司,美国)、ENVIDATA-Thies 科研级生态气象站(北京澳作生态仪器有限公司);对照品黄芩苷(批号919D022,质量分数≥98%)、汉黄芩苷(批号823B022,质量分数≥98%)、黄芩素(批号1209A024,质量分数≥98%)和汉黄芩素(批号1025A022,质量分数≥98%)购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇(色谱纯,Fisher Scientific公司),磷酸(色谱纯)、乙醇(分析纯)购于北京化工厂。

2 方法

2.1 黄芩采样地气象数据的采集

于2016年5月9日将ENVIDATA-Thies 科研级生态气象站安装于吉林省吉林农业大学药用植物园观测自然条件下黄芩采样地环境因子变化,进行24 h数据的采集,每0.5 h自动收集数据1次,包括PAR、降雨量、最大降雨强度、RH、SWC、土壤温度、Ta、Max Ta、Min Ta,并对实验数据进行统计分析。

2.2 黄芩根部次生代谢关键酶基因表达量的测定

取黄芩根组织样品在液氮中研磨成细粉,根据多糖多酚植物总RNA提取试剂盒的操作步骤提取总RNA,采用NanoPhotometer P330 核酸/蛋白定量仪测定总RNA浓度,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。根据Bioteke Super RT Kit cDNA合成试剂盒的操作步骤将总RNA逆转录合成cDNA。以cDNA为模板,根据各基因的引物序列^[13-14]分别对黄芩PAL、C4H、4CL、CHS、CHI、FNS、F6H、UGAT、GUS基因进行RT-PCR扩增,重复4次。

qRT-PCR 反应的内参基因为 18 S rRNA, 运用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。RT-PCR 反应体系: 灭菌水 8 μL , SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μL , 引物各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , 总计 20 μL 。qRT-PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 40 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s)。

2.3 黄芩根部主要药效成分的测定^[14]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷 12.24 mg, 汉黄芩苷 2.86 mg, 黄芩素 1.43 mg, 汉黄芩素 1.28 mg, 乙醇超声溶解并分别定容至 10、10、10、25 mL, 配制质量浓度分别为 1.20、0.28、0.14、0.05 mg/mL 的对照品溶液, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取不同生长时段的黄芩样品 0.100 g, 加入 5 mL 70% 乙醇超声提取 30 min, 重复提取 3 次后合并滤液, 70% 乙醇定容至 25 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过得检测溶液。

2.3.3 色谱条件^[15] Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, DAD 检测器, 流动相为甲醇 (A) -0.4% 磷酸水 (B) 溶液, 梯度洗脱, 洗脱梯度程序: 0~18 min, 48%~65% A; 18~25 min, 65% A; 25~26 min, 65%~100% A; 26~32 min, 100% A。进样量 10 μL , 检测波长 284 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 分析时间 32 min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 分离色谱图见图 1。

2.3.4 线性关系考察 分别吸取各对照品溶液适量, 稀释, 得系列质量浓度的对照品溶液。精密吸取 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 按“2.3.3”项色谱条件进行测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归处理, 得各黄酮类化合物单体回归方程: 黄芩苷 $Y=2\,626.76 X-$

96.09, $R^2=0.999\,7$, 进样质量浓度在 55~578 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系; 汉黄芩苷 $Y=2\,578.67 X-35.09$, $R^2=0.999\,5$, 进样质量浓度在 11~134 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系; 黄芩素 $Y=4\,517.88 X-1.91$, $R^2=0.999\,6$, 进样质量浓度在 5~67 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系; 汉黄芩素 $Y=4\,434.29 X-4.67$, $R^2=0.999\,3$, 进样质量浓度在 2~21 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 样品的测定 取各供试品溶液根据以上方法检测并计算供试品溶液中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量。

2.4 数据处理

测定数据应用 SPSS 22.0 统计软件进行 Pearson 相关性分析, DPS v7.05 统计软件进行灰色关联度分析, Microsoft Excel 2010 软件绘图制表。

3 结果与分析

3.1 黄芩采样地气象数据

将科研级生态气象站采集的气象数据统计平均值, 对取样地一年生黄芩物候期进行观察, 根据黄芩生长发育特点将果熟期和枯萎期分别确定为 8 月 26 日~10 月 5 日、10 月 6 日~11 月 5 日。黄芩采样地各生长时段生态因子差异见表 1, 该样地生态因子在不同时间段变化明显。整体 PAR 呈下降趋势, 9 月 2 日~9 月 5 日、10 月 7 日~10 月 11 日较低。果熟期平均 PAR [107.875 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$] 约是枯萎期 [54.339 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$] 的 2 倍。降雨主要集中在果熟期, 采样阶段降雨量平均为 0.496 mm, 果熟期为 0.786 mm, 8 月 28 日、9 月 5 日~9 月 11 日、9 月 22 日~9 月 27 日降雨量比较多, 枯萎期降雨很少, 平均降雨量仅为 0.060 mm。整体 RH 呈“M”型曲线, 缓慢下降, 降幅较小, 果熟期平均 62.980%, 枯萎期平均 54.552%, 9 月 26 日~10 月 7 日较低。SWC 整体缓慢平稳下降, 果熟期平均 30.903%, 枯萎期平均 27.596%。土壤温度整体呈下降趋势, 最高平均温度 21.391 $^{\circ}\text{C}$, 最低平均温度 7.686 $^{\circ}\text{C}$ 。空气温度整体呈匀速下降趋势, 果熟期平均温度 (15.399 $^{\circ}\text{C}$) 约是枯萎期 (7.272 $^{\circ}\text{C}$) 的 2 倍。

3.2 黄芩根部次生代谢关键酶基因表达量的测定

利用 qRT-PCR 方法, 以 18 S rRNA 作为内参基因, 检测一年生黄芩根组织中 PAL、C4H、4CL、CHS、CHI、FNS、F6H、UBGAT、GUS 基因在黄芩不同生长时间的表达量, 结果见图 2。

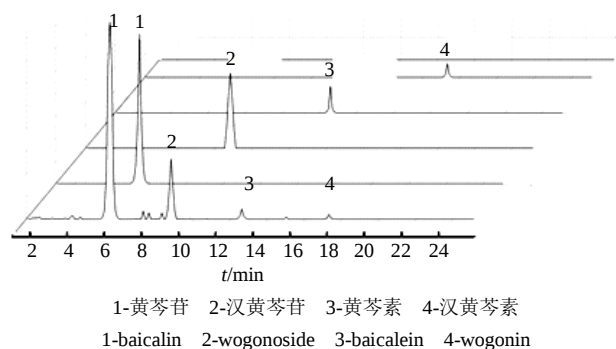


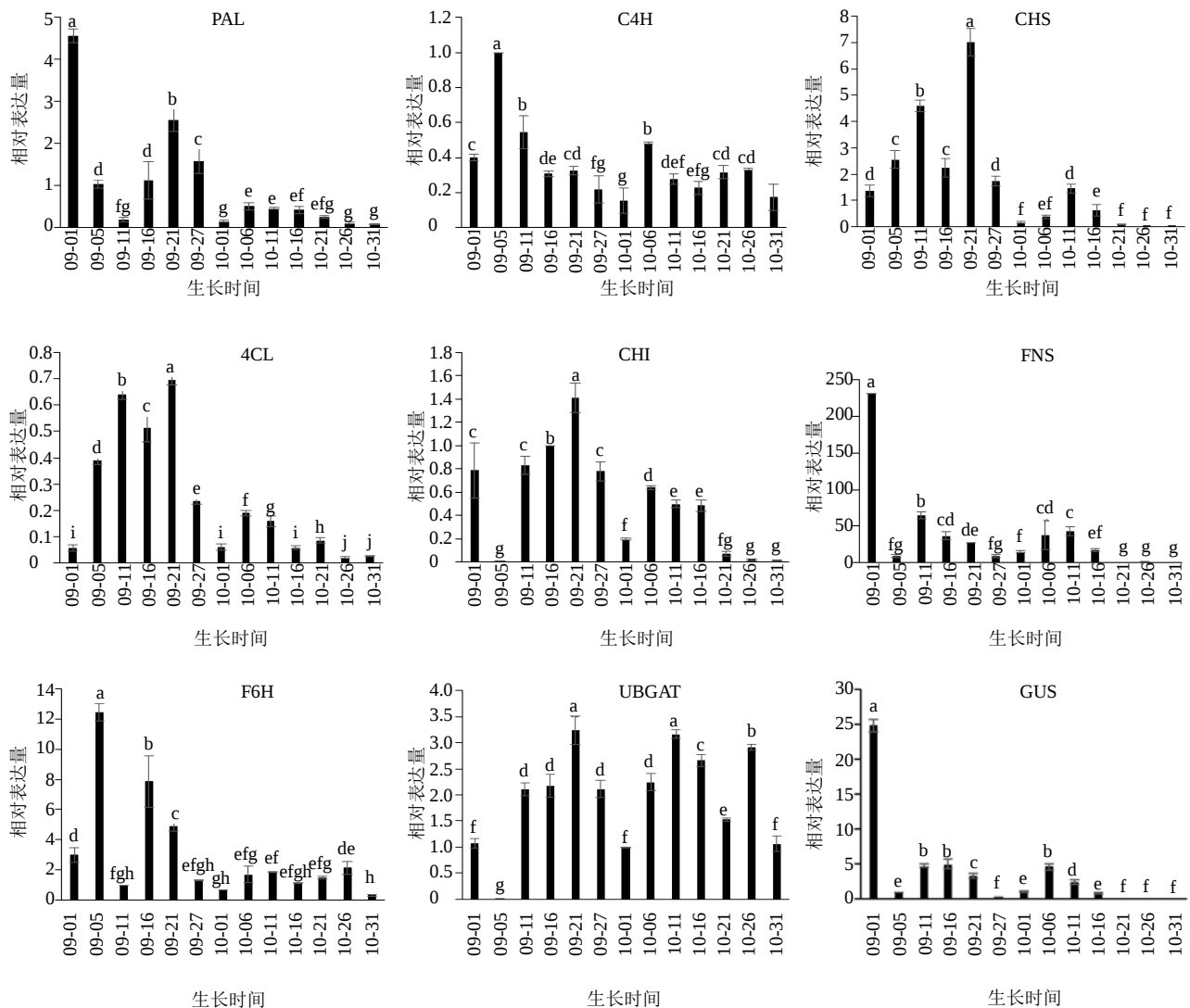
图 1 对照品和黄芩样品的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of standards and samples

表 1 采样地不同生长时间生态因子

Table 1 Ecological factors at different growth time in sampling site

生长时间	PAR/($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	降雨量/mm	最大降雨强度/($\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$)	RH/%	SWC/%	土壤温度/ $^{\circ}\text{C}$	Ta/ $^{\circ}\text{C}$	Max Ta/ $^{\circ}\text{C}$	Min Ta/ $^{\circ}\text{C}$
08-28—09-01	142.420	0.434	0.914	57.440	34.009	18.699	15.507	26.2	4.8
09-02—09-05	99.246	2.160	62.290	75.589	31.850	21.391	18.980	27.7	10.2
09-06—09-11	118.651	1.841	12.363	70.427	31.561	20.076	18.071	27.8	11.1
09-12—09-16	109.828	0.009	0.071	69.585	31.235	18.343	15.851	26.0	8.5
09-17—09-21	111.090	0.124	2.159	68.922	30.657	19.017	17.458	25.6	11.2
09-22—09-27	87.593	1.298	8.676	66.889	30.028	16.645	15.260	26.0	4.6
09-28—10-01	88.330	0.084	1.311	40.521	28.947	13.465	11.626	20.1	2.0
10-02—10-06	99.302	0.008	0.125	49.431	28.256	11.846	9.910	22.1	-0.1
10-07—10-11	40.503	0.014	0.437	66.869	28.148	13.177	11.340	21.6	2.6
10-12—10-16	69.513	0.107	3.643	54.872	27.720	10.756	6.131	13.3	-1.2
10-17—10-21	62.129	0.070	1.444	51.533	27.517	10.527	7.296	18.7	1.3
10-22—10-26	47.415	0.076	1.046	46.244	27.207	7.686	5.058	16.3	-1.1
10-27—10-31	44.236	0.040	1.179	52.351	27.188	8.750	4.890	15.8	-1.4



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同
Different letters means significant difference, $P < 0.05$, same as below

图 2 关键酶基因荧光定量 PCR 表达分析

Fig. 2 Fluorescence quantitative PCR expression analysis of key enzyme genes

一年生黄芩根中关键酶基因的表达量在不同生长时间存在明显差异。不同生长时间黄芩 PAL 基因在根中的表达量 9 月 1 日最高, 9 月 1 日~11 日快速下降, 9 月 11 日表达量约为 9 月 1 日表达量的 4.19%, 9 月 16~21 日有所回升, 之后整体呈下降趋势, 10 月 31 日表达量最低。黄芩 C4H 基因在根中的表达量 9 月 5 日突然升高至最高, 之后除 10 月 6 日表达量有所回升, 整体表达量呈缓慢下降的趋势。在不同生长时段 4CL、CHS 基因的表达量 9 月 1~21 日呈上升的趋势, 9 月 21 日表达量最高, 9 月 21 日~10 月 1 日表达量迅速下降, 之后虽然 10 月初期有所回升, 但整体上是呈缓慢下降的趋势。在不同生长时段黄芩 CHI 基因的表达量整体呈先升高, 再下降的趋势, 9 月 21 日表达量达到最大值, 10 月 31 日表达量最低, 期间 9 月 5 日、10 月 1 日表达能力相对较弱。FNS 基因在根中的表达量 9 月 1 日很高, 9 月 5 日突然降到很低, 9 月 11 日有所回升, 之后虽然 10 月初期有所回升, 但整体上呈缓慢下降的趋势。黄芩 F6H 基因的表达量 9 月 5 日、9 月 16 日、9 月 21 日较高, 其余时间呈缓慢下降的趋势, 10 月 31 日表达量最低, 10 月 31 日表达量大约是 9 月 1 日表达量的 11.02%。在不同生长时段黄芩 UBGAT 基因在根中的表达量从 9 月 1~21 日呈上升趋势, 9 月 21 日表达量最高, 但期间 9 月 5 日表达量很低, 之后变化幅度变化较大。黄芩 GUS 基因的表达量 9 月 1 日最高, 9 月 5 日突然降低, 之后虽然 9 月 16 日、10 月 6 日有所上升, 但整体趋势是缓慢下降的, 10 月 31 日几乎不表达。

3.3 黄芩根部主要药效成分的测定结果

一年生黄芩根中 4 种单体黄酮类化合物变化如

图 3 所示, 一年生黄芩根中 4 种主要单体黄酮类化合物含量由大到小分别为黄芩苷>汉黄芩苷>黄芩素>汉黄芩素。4 种单体总黄酮在黄芩的不同生长时间变化趋势并不相同: 一年生黄芩根中黄芩苷含量整体上呈下降的趋势, 9 月 1 日黄芩苷含量最高, 从 9 月 1 日~10 月 6 日的果熟期下降较快, 期间 10 月 1 日已降到《中国药典》2015 年版规定含量(不少于 9%)以下(8.92%), 之后到了枯萎期, 虽然 10 月 6~21 日有所上升, 但整体上还是呈缓慢下降的趋势, 10 月 31 日黄芩苷含量达到最低, 10 月 31 日黄芩苷含量约是 9 月 1 日黄芩苷含量的 53.94%。黄芩根中汉黄芩苷含量在不同生长时间变化不大, 质量分数在 1.50%~2.70%浮动, 虽然 9 月 27 日有所上升, 但整体上是呈非常缓慢地下降。一年生黄芩根中黄芩素含量 9 月 1~21 日缓慢上升, 9 月 21 日黄芩素含量最高, 9 月 27 日突然下降, 之后虽然 10 月 1 日有所回升, 但整体上呈缓慢下降的趋势, 10 月 26 日黄芩素含量最低, 10 月 26 日黄芩素含量约是 9 月 21 日黄芩素含量的 14.60%。汉黄芩素含量 9 月 1 日~10 月 11 日缓慢上升, 期间只在 9 月 27 日有所下降, 10 月 11 日汉黄芩素含量达到最大值, 为 0.38%, 之后缓慢下降, 10 月 26 日降到最低, 为 0.05%。

3.4 黄芩根部关键酶基因表达与生态因子和主要药效成分的相关性分析

黄芩不同生长时间生态因子与黄芩根部关键酶基因表达量的相关性分析结果见表 2, 从表 2 中可知, PAR 与 PAL 基因的表达有极显著的促进关系($P<0.01$), PAR 也可以显著提高 CHI、FNS、GUS 的表达量($P<0.05$), 说明适当增加光照可能是提高黄芩药材质量的有效方式之一。C4H 基因的表达

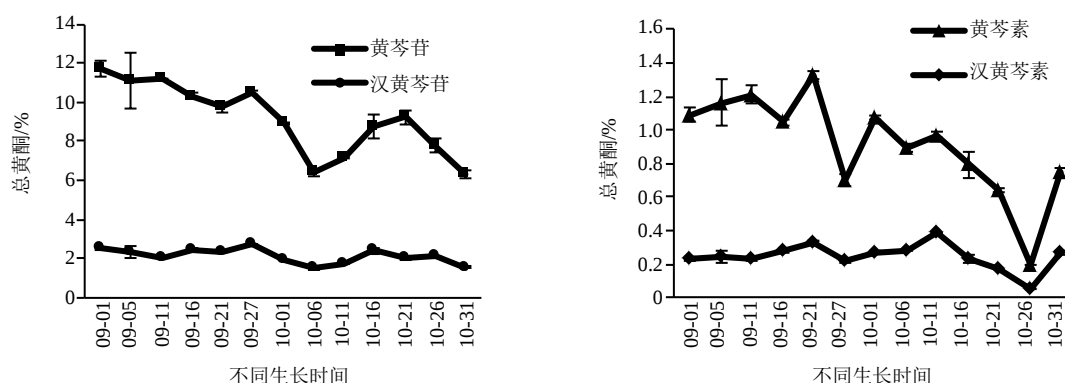


图 3 不同生长时间黄芩根中主要药效成分含量

Fig. 3 Content of main medicinal ingredients in roots of *S. baicalensis* at different growth time

表 2 不同生长时间生态因子与黄芩根部关键酶基因表达的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of ecological factors and gene expression of key enzymes in roots of *S. baicalensis* at different growth time

关键酶	相关系数								
	PAR	降雨量	最大降雨强度	RH	SWC	土壤温度	Ta	Max Ta	Min Ta
PAL	0.685**	0.065	-0.011	0.286	0.757**	0.545	0.507	0.513	0.385
C4H	0.374	0.726**	0.873**	0.514	0.477	0.559*	0.533	0.537	0.528
4CL	0.544	0.436	0.274	0.757**	0.523	0.757**	0.777**	0.718**	0.905**
CHS	0.530	0.376	0.207	0.712**	0.545	0.732**	0.745**	0.649*	0.866**
CHI	0.634*	-0.018	-0.288	0.487	0.520	0.573*	0.593*	0.559*	0.585*
FNS	0.648*	0.039	-0.145	0.093	0.705**	0.403	0.350	0.398	0.203
F6H	0.349	0.431	0.752**	0.619*	0.516	0.618*	0.584*	0.531	0.616*
UBGAT	-0.238	-0.437	-0.581*	0.045	-0.330	-0.242	-0.182	-0.193	-0.088
GUS	0.679*	-0.007	-0.145	0.068	0.713**	0.398	0.344	0.401	0.200

*相关性显著, $P < 0.05$; **相关性极显著, $P < 0.01$; 下同

* correlation was significant ($P < 0.05$); ** correlation was very significant ($P < 0.01$); same as below

与降雨量表现出了极显著的相关性 ($P < 0.01$), 最大降雨强度与 C4H、F6H 呈极显著相关 ($P < 0.01$), 与 UBGAT 呈显著负相关 ($P < 0.05$), 可以看出强降雨对关键酶基因的表达具有有效的促进作用。RH 与 4CL、CHS 基因的表达有极显著的相关性 ($P < 0.01$), 与 F6H 基因的表达也具有显著的相关性 ($P < 0.05$), 另外, SWC 对 PAL、FNS、GUS 基因的表达具有极显著的促进作用 ($P < 0.01$), 因此适当提高空气湿度和土壤中的含水量也可能是提高黄芩药材质量的重要手段之一。土壤温度与 4CL、CHS 基因的表达表现出了极显著的相关性, 与 C4H、CHI、F6H 基因的表达相关性显著 ($P < 0.05$), 说明土壤温度对可能黄芩质量提高的影响重大。Ta 与 4CL、CHS 基因的表达具有极显著的相关性 ($P < 0.01$), 与 CHI、F6H 基因的表达相关性显著, 最高、低空气温度对该 4 个基因也具有显著的相关性。

黄芩不同生长时间生态因子与黄芩根部主要药效成分相关性分析结果见表 3, 从本研究结果显示生态因子与黄酮类化合物均具有显著的相关性, 说明这些生态因子与黄芩药效成分的积累关系密切。PAR 与空气温度对黄芩苷、黄芩素的合成与积累均表现出了显著正相关, 因此适当地增强光照,

提高温度可有效提高黄芩根部药效成分质量; 降雨、RH 对黄芩苷的合成有显著的促进作用 ($P < 0.05$), 而对其他药效成分并未达到显著水平, 降雨、RH 未直接作用于根部, 因此对黄芩药效成分的合成并影响较小; 最大降雨强度对 4 种黄酮类化合物并没有显著相关, 说明最大降雨强度对黄芩药效成分的合成影响不大。SWC 与黄芩苷的合成呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 与汉黄芩苷、黄芩素的合成呈显著相关 ($P < 0.05$), 说明适当提高土壤含水量对黄芩根部药效成分的合成具有重要作用; 土壤温度与黄芩苷、黄芩素呈极显著相关 ($P < 0.01$), 与汉黄芩苷呈显著相关 ($P < 0.05$), 因此土壤温度与黄芩药材质量的高低密切相关。

黄芩根中关键酶基因表达量与 4 种主要药效成分相关性分析结果见表 4, 黄芩根部 PAL 基因与黄芩苷、汉黄芩苷呈显著相关 ($P < 0.05$), 因此 PAL 基因是黄芩根部黄酮类化合物生物合成途径中的关键元件之一。黄芩素与 CHS 基因的表达量呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 与 4CL、CHI 基因的表达量呈显著相关 ($P < 0.05$), 从表中还可看出 4CL、CHS、CHI 基因对黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素的合成也具有较强的正向影响, 说明黄芩生物合成途径中游 4CL、CHS、CHI 基因表达量的提高可有效

表 3 不同生长时间黄芩根部主要药效成分与生态因子的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of main medicinal ingredients and ecological factors in roots of *S. baicalensis* at different growth time

成分	相关系数								
	PAR	降雨量	最大降雨强度	RH	SWC	土壤温度	Ta	Max Ta	Min Ta
黄芩苷	0.742**	0.632*	0.418	0.553*	0.852**	0.821**	0.769**	0.701**	0.743**
汉黄芩苷	0.498	0.359	0.230	0.462	0.596*	0.555*	0.505	0.414	0.476
黄芩素	0.678*	0.319	0.280	0.545	0.675*	0.800**	0.782**	0.668*	0.749**
汉黄芩素	0.159	-0.097	-0.020	0.387	0.188	0.362	0.378	0.308	0.311

表 4 不同生长时间黄芩根部关键酶基因表达与主要药效成分的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of key enzyme gene expression in roots of *S. baicalensis* at different growth time and main medicinal components

成分	相关系数								
	PAL	C4H	4CL	CHS	CHI	FNS	F6H	UBGAT	GUS
黄芩苷	0.572*	0.402	0.482	0.497	0.377	0.454	0.458	-0.315	0.446
汉黄芩苷	0.573*	0.111	0.302	0.357	0.421	0.260	0.401	-0.015	0.277
黄芩素	0.398	0.337	0.668*	0.687**	0.568*	0.358	0.385	-0.191	0.345
汉黄芩素	0.156	-0.033	0.351	0.379	0.446	0.116	0.122	0.086	0.095

提高黄芩药效成分质量。黄芩 FNS、F6H、UBGAT 和 GUS 基因位于黄芩生物合成途径中的下游,但是它们各自发挥着不同的功能,UBGAT 基因对 4 种主要药效成分的合成表现出抑制作用,FNS、F6H、GUS 基因对 4 种主要药效成分的合成则表现出正向影响,因此基因 UBGAT 表达量的降低、FNS、F6H、GUS 基因表达量的提高对黄芩药效成分的积累也具有积极影响。

3.5 黄芩根部关键酶基因表达与生态因子和主要药效成分的灰色关联度分析

黄芩不同生长时间生态因子与黄芩根关键酶基因表达量的灰色关联度分析结果见表 5,从表中可以看出,生态因子与关键酶基因表达量的灰

色关联值均较高,说明这些生态因子与关键酶基因的表达关系密切。最大降雨强度是影响 PAL 基因的主导因子,灰色关联度达到 0.600 1; Max Ta 和 SWC 与 C4H 基因关联度最高,Min Ta、Ta 和最大降雨强度均与 4CL、CHS 及 CHI 关联度最高;最大降雨强度、Ta 和 Max Ta 是影响 FNS 基因的主导因子,灰色关联度分别为 0.613 2、0.558 6 和 0.551 5;影响 F6H 基因的前 3 位生态因子大小次序为 Ta>降雨量>土壤温度,而 UBGAT 基因的主导因子为 RH、SWC,灰色关联度分别为 0.671 2 和 0.666 8;对 GUS 基因影响最大的前 4 位生态因子大小次序为 PAR>最大降雨强度>Ta>Max Ta。

表 5 不同生长时间生态因子与黄芩根部关键酶基因表达的灰色关联度分析

Table 5 Grey correlation analysis of ecological factors of different growth time and gene expression of key enzymes in roots of *S. baicalensis*

关键酶	相关系数								
	PAR	降雨量	最大降雨强度	RH	SWC	土壤温度	Ta	Max Ta	Min Ta
PAL	0.486 0	0.488 8	0.600 1	0.437 7	0.440 5	0.451 5	0.485 5	0.455 7	0.454 1
C4H	0.638 6	0.441 1	0.494 2	0.645 2	0.670 6	0.647 8	0.638 2	0.685 3	0.503 5
4CL	0.547 2	0.551 2	0.605 4	0.538 2	0.512 7	0.583 7	0.616 5	0.533 2	0.706 0
CHS	0.533 1	0.572 2	0.598 5	0.540 3	0.516 3	0.589 3	0.609 5	0.543 9	0.609 9
CHI	0.548 1	0.455 6	0.594 0	0.514 6	0.522 7	0.540 6	0.567 8	0.522 8	0.561 2
FNS	0.509 5	0.479 9	0.613 2	0.536 0	0.533 2	0.525 4	0.558 6	0.551 5	0.443 4
F6H	0.521 9	0.546 8	0.507 0	0.540 4	0.497 4	0.540 5	0.569 0	0.533 6	0.523 1
UBGAT	0.641 9	0.374 9	0.516 0	0.671 2	0.666 8	0.630 7	0.589 3	0.646 0	0.447 9
GUS	0.579 0	0.512 9	0.566 8	0.524 9	0.524 6	0.548 8	0.557 9	0.556 7	0.488 9

黄芩不同生长时间生态因子与黄芩根部主要药效成分灰色关联度分析结果见表 6, RH、SWC、土壤温度、Max Ta 是影响黄芩根部黄芩苷和黄芩素积累的主导因子;汉黄芩苷与 SWC、Max Ta 和 RH 关联度最高,灰色关联度分别达 0.792 4、0.746 6、0.691 5;影响汉黄芩素含量的前 3 位生态因子大小次序为 SWC>PAR>RH,表明 SWC、PAR 和 RH 的适当提高对汉黄芩素的积累具有积极作用。灰色关联度分析表明,影响黄芩苷、汉黄芩苷积累较大的生态因子大小次序为 SWC>Max Ta>RH,影响黄芩素

积累的前 3 位生态因子为 Max Ta>土壤温度>RH,影响汉黄芩素积累较大的生态因子为 SWC>PAR>RH,因此影响黄芩根部药效成分积累较大的生态因子为 SWC、Max Ta、RH、PAR。

黄芩根中关键酶基因表达量与 4 种主要药效成分灰色关联度分析结果见表 7,从表 7 中可知,C4H 基因和 UBGAT 基因与黄芩药效成分含量的灰色关联度值高于其他基因,结果表明 C4H、UBGAT 基因的表达对黄芩秋季采收期根部黄酮类化合物的积累具有重要影响。

表 6 不同生长时间黄芩根部主要药效成分与生态因子的灰色关联度分析

Table 6 Grey relational degree analysis of main medicinal ingredients and ecological factors in roots of *S. baicalensis* at different growth time

成分	相关系数								
	PAR	降雨量	最大降雨强度	RH	SWC	土壤温度	Ta	Max Ta	Min Ta
黄芩苷	0.627 5	0.271 4	0.506 5	0.742 3	0.794 1	0.712 6	0.620 0	0.763 2	0.382 1
汉黄芩苷	0.580 8	0.276 9	0.487 6	0.691 5	0.792 4	0.658 1	0.598 9	0.746 6	0.380 4
黄芩素	0.646 1	0.298 5	0.500 9	0.677 5	0.675 6	0.679 2	0.634 1	0.710 1	0.350 5
汉黄芩素	0.641 0	0.328 2	0.489 3	0.634 6	0.646 5	0.582 5	0.533 5	0.580 4	0.318 7

表 7 不同生长时间黄芩根部关键酶基因表达与主要药效成分的灰色关联度分析

Table 7 Grey correlation analysis of key enzyme gene expression in roots of *S. baicalensis* at different growth time and major medicinal components

成分	相关系数								
	PAL	C4H	4CL	CHS	CHI	FNS	F6H	UBGAT	GUS
黄芩苷	0.510 3	0.653 8	0.492 9	0.509 1	0.519 2	0.478 4	0.508 2	0.606 4	0.501 2
汉黄芩苷	0.521 8	0.637 6	0.478 9	0.498 4	0.503 8	0.463 6	0.508 6	0.618 2	0.480 5
黄芩素	0.507 2	0.612 9	0.511 6	0.523 2	0.555 5	0.554 9	0.508 4	0.600 9	0.514 4
汉黄芩素	0.523 9	0.573 7	0.488 0	0.504 9	0.534 2	0.510 2	0.503 2	0.673 0	0.499 7

4 讨论

次生代谢产物的合成与积累是植物长期生存选择的结果,与环境密切相关^[15-16],而黄芩黄酮类化合物合成关键酶基因的表达调控了黄酮类化合物体内生物合成的流向,对黄酮类化合物的合成也具有重要影响。本实验测定了一年生黄芩秋季不同生长时间根组织中 4 种黄酮类化合物含量以及相关关键酶基因的表达量,并对黄芩样地气象数据进行采集,分析生态因子和黄酮类化合物生物合成关键酶基因表达量与黄酮类化合物的关系。

光照的增加可以诱导药用植物黄酮类化合物的增加^[17-20],本研究发现 PAR 对 PAL、CHI、FNS 和 GUS 基因呈显著相关,对黄芩苷和汉黄芩苷的积累也具有显著影响,这一结果与陈顺钦等^[17]的光诱导对黄芩悬浮细胞中有效成分的积累和相关基因(PAL、UBGAT)的表达有促进作用的结果相似,因此在黄芩栽培过程中,适当地增加光照可有效促进黄芩药效成分的积累。

水分也是植物生长发育重要的生态因子^[21-23],本研究发现降雨仅对个别基因的表达和黄芩苷有显著影响,并未直接作用于根组织,对根组织的影响较小。最大降雨强度对 C4H、F6H 基因呈极显著正相关,对 UBGAT 呈显著负相关,对药效成分的积累相关性不显著,灰色关联度分析同样显示其对

关键酶基因的表达影响很大,但对药效成分影响不明显,因此最大降雨强度可能通过对关键酶基因表达的影响来间接影响黄芩药效成分的积累。SWC 和 RH 对黄酮类次生代谢途径中关键酶基因的表达和药效成分的积累影响均很大,因此适当提高土壤含水量和空气湿度能够促进黄芩药效成分的积累。灰色关联度分析结果显示,影响黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素的水分因子大小次序为 SWC>RH>最大降雨强度>降雨量,影响黄芩素的水分因子大小次序为 RH>SWC>最大降雨强度>降雨,因此,SWC 和 RH 是影响黄芩药效成分积累的关键水分因子。

适宜的温度可以促进植物药效成分的积累^[24-25],本研究发现土壤温度、Ta、Max Ta、Min Ta 对黄芩根部关键酶基因表达和药效成分的积累均具有显著作用,这与刘金花^[26]研究结果相似,其中土壤温度为关键温度因子。因此,黄芩对温度这一生态因子敏感度很大,温度的过高或过低均不利于药效成分的合成与积累,这可能是由于温度的改变使植物自身生长受到了影响,使得次生代谢产物合成受到了一定的阻碍,当温度达到一定程度时,植物为了维持自身代谢活动,在一定程度上又刺激其代谢产物的合成^[27]。

中药材质量的形成最终都来源于植物体内的各种生理生化代谢活动,要达到药材质量稳定可控

的目的,需要对植物次生代谢活动的途径、规律及其影响因素进行系统研究^[13]。黄芩药效成分的积累受植物体内合成通路中关键酶基因表达的调控,而生长所处的环境又影响着关键酶基因的表达。本研究材料为一年生黄芩,而常用中药黄芩为二年生甚至三年生^[28-30],因此在接下来的工作中还需要继续对多年生黄芩黄酮类次生代谢途径的生理生态机制进行研究与探讨。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 付国辉, 马香芹. 黄芩的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国当代医药, 2015, 22(22): 18-20.
- [3] 雷 桅, 税晓容, 胡 侃. 黄芩苷生物合成途径与生物技术研究进展 [J]. 北方园艺, 2014(22): 185-189.
- [4] Shen J, He C N, Liu H T, et al. Simultaneous determination of 15 flavonoids from different parts of *Scutellaria baicalensis* and its chemometrics analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(1): 20-27.
- [5] 庞力贤, 张文岭, 吕维红. 黄芩药材质量影响因素的研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(2): 195-197.
- [6] Yuan Q J, Zhang Z Y, Hu J, et al. Impacts of recent cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) [J]. *BMC Genetics*, 2010, 11(1): 29.
- [7] Wang W, Chen J K, Zhou T S. CHS and UBGAT Expression and baicalin accumulation in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi during cultivation seasons [J]. 复旦学报(自然科学版), 2006, 45(5): 674-678.
- [8] 安 瑜, 王旭鹏, 赵建军. 宁夏六盘山栽培黄芩适宜采收期研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 161-164.
- [9] 靳维荣, 石俊英, 张小伟. 不同采收期黄芩中六种黄酮类成分的动态研究 [J]. 山东中医杂志, 2008, 1(4): 268-271.
- [10] 张 媛, 宋双红, 王喆之. 栽培黄芩中黄酮类成分的动态积累研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1478-1480.
- [11] 雷燕妮, 张小斌. 不同采收季节黄芩苷含量比较 [J]. 浙江农业科学, 2013(8): 964-965.
- [12] 缪晓素, 宋国虎, 刘容秀, 等. 不同栽培年限及采收期对黄芩药材有效成分含量的影响研究 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(8): 836-839.
- [13] Cheng L, Han M, Yang L, et al. Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi. under drought stress [J]. *Industrial Crops Prod*, 2018, 122: 473-482.
- [14] 程 林. 干旱胁迫黄芩生理生态变化及其黄芩苷生物合成的分子生态机制 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [15] 苏文华, 张光飞, 李秀华, 等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关系 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1415-1418.
- [16] 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.
- [17] 陈顺钦, 袁 媛, 罗毓健, 等. 光照对黄芩黄酮类活性成分积累及其相关基因表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 682-685.
- [18] 颜永刚, 王红艳, 邓 翀, 等. 生长年限、海拔和光照对大黄中 8 种成分量的影响研究 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2285-2291.
- [19] 邵玺文, 韩 梅, 韩忠明, 等. 不同生境条件下黄芩光合日变化与环境因子的关系 [J]. 生态学报, 2009, 29(3): 1470-1477.
- [20] 曾 燕, 郭兰萍, 王继永, 等. 植物黄酮类化合物的化学生态学功能及中药材定向栽培的构想 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(8): 776-790.
- [21] 邵玺文, 韩 梅, 韩忠明, 等. 水分供给量对黄芩生长与光合特性的影响 [J]. 生态学报, 2006, (10): 3214-3220.
- [22] Ji-Chao H U, Cao W X, Zhang J B, et al. Quantifying responses of winter wheat physiological processes to soil water stress for use in growth simulation modeling [J]. *Pedosphere*, 2004, 14(4): 509-518.
- [23] 张永刚, 韩 梅, 姜 雪, 等. 黄芩对干旱复水的生理生态响应 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22): 3845-3850.
- [24] 杨金艳, 杨万勤, 王开运, 等. 木本植物对 CO₂ 浓度和温度升高的相互作用的响应 [J]. 植物生态学报, 2003, 27(3): 304-310.
- [25] Jarvi M P, Burton A J. Acclimation and soil moisture constrain sugar maple root respiration in experimentally warmed soil [J]. *Tree Physiol*, 2013, 33(9): 949-959.
- [26] 刘金花. 环境因子对黄芩植株代谢的影响 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [27] Yang D, Ma P, Liang X, et al. PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Physiol Plantarum*, 2012, 146(2): 173-183.
- [28] 邵玺文. 黄芩高产栽培及质量调控生理生态机制研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2008.
- [29] 李 帅. 黄芩种子及药材最佳采收期研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [30] 李 化. 黄芩采收规律及其数学模型的研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2008.