

植物次生代谢产物及相关酶的空间特异性分布研究进展

董乐萌^{1,2}, 魏建和^{1*}, 刘玉军², 杨成民¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 北京林业大学, 北京 100083)

摘要:植物体对于次生代谢产物的合成和积累具有非常精准的空间调控网络。次生代谢产物因为其特定的生物学功能和固有的细胞毒性而积累在特定的部位,催化其形成的酶类也特异地分布在不同的器官、组织、细胞及细胞器中。阐述了植物次生代谢产物的功能与其空间特异性分布之间的关系,进而对植物次生代谢相关酶与次生代谢产物空间特异性分布之间的关系,以及次生代谢途径相关酶类的器官、细胞及亚细胞定位的研究方法进行了论述。

关键词:植物次生代谢;生物合成;积累;空间特异性分布

中图分类号:R284 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)01-0153-03

Advances in studies on spatial-specific distributions of secondary metabolites and related enzymes in plants

DONG Le-meng^{1,2}, WEI Jian-he¹, LIU Yu-jun², YANG Cheng-min¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medicinal Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Key words: plant secondary metabolism; biosynthesis; accumulation; spatial-specific distribution

植物可产生超过大约 5×10^5 种的次生代谢产物^[1]。最初,次生代谢产物被定义成是植物体中一大类并非生长发育所必需的小分子有机化合物。然而经生态学家及药理学家研究发现这些化合物有许多功能,包括吸引传粉昆虫^[2],作为植物自身及植物间的信号物质^[3,4],抵抗病原菌及食草动物的侵害等^[5]。正因为其特定的生物学功能和固有的细胞毒性,许多次生代谢物质产生和积累在特定的器官、组织或细胞中^[6]。

1 植物次生代谢产物的功能与其空间特异性分布的关系

大多数的次生代谢产物都积聚在植物体的特定器官或特殊的组织结构中,如乳汁器(laticifer)、腺毛簇(glandular trichomes)、分泌细胞(secretory cell)等。特化的腺体结构是单萜类及黄酮类化合物产生的部位。如单萜类薄荷醇产生在薄荷叶子的腺毛簇中^[7,8]。Tattini等^[9]在研究光对黄酮类化合物积累部位的影响时发现一些种类的黄酮苷总是出现在阔叶欧女贞 *Phillyrea latifolia* L. 叶子的腺毛簇中^[9],并且具有抗紫外线辐射的作用。特化的组织细胞——乳汁器同样可以产生三萜及多萜类物质,如橡胶^[10]。次生代谢物质积聚在特殊的结构中可使其与一些敏感的代谢途径隔绝开,以避免自毒(autotoxicity)^[11]。这些特殊的结构大多是不能进行光合作用的,因此需要临近的细胞来供给碳和能量以完成次生代谢。除此之外,在长期的进化演变中,次生代谢产物之所以积聚在特定的器官、组织和细胞中有其非常

重要的生理生态意义。在植物的根、茎或叶中积累的生物碱对昆虫或植食动物具有拒食或趋避作用,对病毒、细菌或真菌等病原微生物具有抑制、阻断或毒杀作用。植物生物碱的合成代谢可对植食动物或昆虫的取食及微生物的攻击产生积极的应答^[12]。如昆虫对烟草叶的啃食能诱导烟碱在植物体内的大量合成和积累^[13]。黄酮类化合物对植物体本身同样具有多种生物学功能^[14],如很多积累在花中的黄酮类物质是植物组织红色、蓝色、及紫色花青素等色素成分,它们对于吸引传粉昆虫具有重要作用。植物对于病原菌、食草动物的防御有直接和间接两种方式。直接的防御方式就包括它的特殊物理结构,如毛簇或刺。间接的防御方式就是积累在特殊结构中的次生代谢物质可以作为植物抗毒素^[15],如在水稻中,14种双萜类植物抗毒素被鉴别出来,它们积累在叶子中并具有抗紫外线辐射及抗微生物的特性^[16];棉花植株各组织器官的色素腺内广泛存在着萜类化合物,包括棉酚、半棉酚酮等,萜类化合物可以抵抗烟芽夜蛾和红铃虫的侵害^[17];而在百脉根的幼芽上散发出一系列的挥发性萜类物质可以驱赶掠食性螨类^[18]。

2 植物次生代谢相关酶与次生代谢产物空间特异性分布关系

最重要的植物次生代谢产物可根据其生物合成的最初前体的不同分为三大类:由氨基酸合成的包括1个或多个氮原子的生物碱类;由5个碳的前体物质异戊烯焦磷酸(IPP)形成的萜类;以及由莽草酸途径或乙酸-丙二酸途径形

收稿日期:2008-07-18

基金项目:国家科技支撑计划重点项目(2006BAI09B01);国家中医药管理局科技专项(2004ZX06-3);北京市自然科学基金资助项目(6082020)

*通讯作者 魏建和(1970—),男,福建建阳人,研究员,博士,所长助理及海南分所所长,主要从事药用植物基因资源、分子育种、次生代谢分子机制及南药研究。Tel:(010)62818841 E-mail:wjianh@263.net

成的酚类^[11]。次生代谢产物因其特定的生物学功能和固有的细胞毒性而积累在特定的部位,同样催化其形成的酶类则根据植物类型以及代谢产物的类型也特异的分布在不同的器官、组织、细胞及亚细胞中。长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中,与单萜类吲哚生物碱合成相关的基因转录物及其酶类定位在叶子的表皮、乳细胞和异细胞 (idioblast) 中^[19,20],而在根中这些转录物和酶类定位在靠近尖端分生组织的前表皮和皮层中。在罂粟 *Papaver somniferum* L. 中,与苯基异喹啉生物碱合成相关的基因转录物出现在伴胞中,其蛋白在筛管中积累,而生物碱却在邻近的乳汁器中积累^[21,22]。合成酶类的分布与次生代谢物的合成部位密切相关,如萜类物质的合成根据其合成酶类的分布被划分在 3 个区域内:倍半萜和三萜主要在细胞质和内质网中合成;质粒是单萜、二萜及四萜的合成场所(包括叶绿素的异戊二烯部分,质体醌和维生素 E);线粒体或高尔基体是泛醌的合成场所^[10]。查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 和查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 是类黄酮 (酚类物质) 代谢途径中前两个酶,在拟南芥中二者主要分布根冠及根延长区的表皮和皮层细胞中,与类黄酮终产物积累的部位一致^[23]。

3 次生代谢途径相关酶类的器官、细胞及亚细胞定位研究方法

3.1 次生代谢途径相关酶类的器官特异性分布研究:

northern 杂交方法一直以来被用作研究基因表达的主要手段。Haralampidis 等^[24]用 northern 方法研究发现合成三萜皂苷元的最后一个关系酶 - 香树脂合成酶的基因只在燕麦的根部表达,而叶子、花和茎干中均没有表达。Samanani 等^[25]对原小檗碱生物合成相关的 9 个基因进行了 northern 杂交,发现这些基因在黄唐松草 *Thalictrum flavum* L. 的根茎中表达量最高,叶子中表达量最低,在根、叶柄和花芽中的表达量因基因而异。然而许多次生代谢物质在植物体内存在量很少,与其合成相关的基因表达丰度往往很低,northern 杂交不能检测到低丰度表达之间的微小差异。近年来出现的核酸定量 PCR 技术尤其是实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RQ-PCR) 技术,实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点成为了分子生物学研究中的重要工具^[26]。刘智等^[27]采用 RQ-PCR 技术研究了代表紫杉醇合成途径中不同步骤的 6 种关键酶基因在植株中的表达特征,结果显示,在针叶中,紫杉醇代谢途径上游步骤的关键酶基因表达水平较高,树皮中催化紫杉醇侧链连接的酶转录表达水平高,而树皮中不能检测到较高量的 6 种关键酶基因的表达。表明紫杉醇的骨架结构主要在针叶中合成,而树皮中转化这些前体物质生成紫杉醇的能力较强,树根中含有完整的紫杉醇代谢酶系。由于次生代谢合成相关酶类多属于膜定位蛋白,所以直接测定各器官的酶活性较为困难。然而随着技术手段的进步越来越多的酶被分离出来,并进行了酶活性测定,如 Hibi 等^[28]在白莨菪 *Hyoscyamus albus* L. 的根中检测到 *N*-甲基腐胺转移酶 (putrescine-*N*-

methyltransferase) 的活性,该酶是合成托烷生物碱的关键酶。Pasquali 等^[29]通过另外一种方法 Western 印迹,发现长春花中吲哚生物碱合成途径中的关键酶异胡豆苷合成酶 (strictosidine synthase) 在叶子和根中都有分布。

3.2 细胞特异的基因表达及酶的积聚:

原位杂交技术是在原位检测组织、细胞中存在的特定并且正在表达的核酸序列 (基因),其结果是转录水平上的。免疫细胞化学技术立足于细胞内的某些化学物质或结构成分能够作为抗原,诱导出相应特异性抗体,在此抗体上标记上标记物,用带有标记物的抗体孵育细胞涂片。结果抗体与涂片中的相应抗原特异结合,在镜下可观察到标记物的存在,借其存在的位置和数量得以认识抗原在细胞中的定位分布和量。检测酶的分布时其结果是在翻译成蛋白水平上的。原位杂交和免疫细胞化学试验表明,单萜吲哚生物碱生物合成途径相关基因主要在 4 种细胞类型 (上表皮细胞、下表皮细胞、乳汁器和异细胞) 中表达。Mahr-oug 等^[30]对 2 种方法的应用进行了详细的综述。通过比较 mRNA 的分布和其相应蛋白的分布,有时可以看到它们定位的微小差异。例如在栅栏薄壁细胞中,只通过原位杂交检测到了次番木鳖苷合成酶 (secolganin synthase, SL5) 基因的 mRNA,用免疫细胞化学却没有检测到该酶^[16],表明两项技术是相互补充的,有时 mRNA 并不会翻译成相应的蛋白,或者通过转运后在另一类型的细胞中翻译成相应蛋白。另外,组织化学分析也可以作为研究细胞特异性的一种手段。将 PMT 启动子与 - 葡萄糖苷酸酶 (-glucuronidase, GUS) 连接后在颠茄 *Atropa belladonna* L. 中进行转基因表达,发现 GUS 在根的中柱鞘细胞中特异表达^[31]。

3.3 次生代谢途径相关酶类的亚细胞定位研究:

免疫细胞化学方法、密度梯度离心和采用发光底物的细胞化学方法成为研究亚细胞定位的主要方法^[30]。经典的免疫细胞化学方法是得到特异的抗体进行免疫金标记试验。该方法需要得到高纯度的结合蛋白作为抗原得到多克隆抗体。Leivar 等^[32]在研究 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGR) 在拟南芥的子叶细胞中的定位时,通过采用大小金粒子的双标记,发现 HMGR 不仅定位在内质网上而且还存在于一种球形的多孔结构的粒子上,这种粒子定位于液泡和细胞质中。此外,Kuntz 等^[33]采用免疫细胞化学方法发现牻牛儿中牻牛儿焦磷酸合成酶 (geranyl pyrophosphate synthase, GGPPS) 定位在质粒上,该酶是萜类合成的关键酶。在长春花的叶子和悬浮培养的细胞中,通过采用密度梯度离心方法均发现生物碱合成途径中色氨酸脱羧酶 (tryptophan decarboxylase, TDC) 是定位在细胞质的^[34,35]。另外,发光底物细胞化学研究结果显示,生物碱合成途径中过氧化物酶 (peroxydase, PRX) 定位在液泡中^[36]。有时,不同的方法得出不同的结论,如采用密度梯度离心方法得出生物碱合成途径中的异胡豆苷合成酶 (strictosidine synthase, STR) 定位在细胞质中的结论^[34,35],而采用免疫细胞化学方法研究发现 STR 酶定位在液泡中^[37]。还有一些方法可以与上述方法互相补充来

研究亚细胞定位,如将待定位基因与绿色荧光蛋白基因融合,在植物细胞中瞬时表达后通过共聚焦显微镜观察绿色荧光进行精确定位。Leivar 等^[32]将构建好的 HMGR 与绿色荧光蛋白 (GFP) 的融合载体在拟南芥的子叶细胞中进行瞬时表达试验,发现 HMGR 与 GFP 的融合蛋白定位在内质网和球状多孔的粒子上,此结果与免疫金标记试验结果一致。

4 结语

次生代谢产物大多在特定的器官、组织或细胞中合成和积累,可根据不同的研究目的选择合适的研究手段来揭示其空间分布网络。研究发现次生代谢的合成与积累往往不在同一器官或细胞中进行,即使是同一合成途径中的酶也在不同的细胞中被发现,这肯定需要转运来最终完成次生代谢物质的合成,那么,转运机制目前仅有少数报道对此进行了阐述。明确次生代谢物质的合成和积累部位以及其在植物体内的转运情况对于揭示植物体次生代谢网络具有重大意义,并为代谢工程的发展奠定基础。而且许多次生代谢产物的生物学功能并没有完全被揭示,也有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Hadacek F. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives [J]. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 2002, 21(4): 273-322.
- [2] Pichersky E, Gershenzon J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 237-243.
- [3] Enyedi A J, Yalpani N, Silvennan P. Singnal molecules in systemic plant nesistance to pathogens and pests [J]. *Cell*, 1992, 70: 879-886.
- [4] Waller GR, Jurzysta M, Thorne R L Z. Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on weeds and wheat [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 1993, 34: 1-11.
- [5] Swain T. Secondary compounds as protective agents [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1997, 28: 479-501.
- [6] Samanani N, Park S U, Facchini P J. Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 915-926.
- [7] Fahn A. *Secretory Tissues in Plants* [M]. London: Academic Press, 1979.
- [8] Gershenzon J, Croteau R B. *Terpenoid Biosynthesis: The Basic Pathway and Formation of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes* [M]. Boca Ration, FL: CRC Press, 1993.
- [9] Tattini M, Gravano E, Pinell P, et al. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed toe excess solar radiation [J]. *New Phytol*, 2000, 148: 69-77.
- [10] McCarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1015-1026.
- [11] Buchanan B, Gruissem W, Jones R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* [M]. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- [12] 鲁守平, 隋新霞, 孙群, 等. 药用植物次生代谢的生物学作用及生态环境因子的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18: 1027-1032.
- [13] Baldwin I T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1449-1458.
- [14] 邹凤莲, 寿森炎, 叶帆芝, 等. 类黄酮化合物在植物胁迫反应中作用的研究进展 [J]. *细胞生物学杂志*, 2004, 26(1): 39-44.
- [15] Cheng A X, Lou Y G, Mao Y B, et al. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions [J]. *J Integrat Plant Biol*, 2007, 49(2): 179-186.
- [16] Prsic S, Xu M M, Wilderman P R, et al. Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 4228-4236.
- [17] 付佳, 王洋, 阎秀峰. 萜类化合物的生理生态功能及经济价值 [J]. *东北林业大学学报*, 2003, 31(6): 59-62.
- [18] Ozawa R, Arimura G, Takabayashi J, et al. Involvement of jasmonate and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 391-398.
- [19] Pierre, Vazquez F F A, Luca D V. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 887-900.
- [20] Irmeler S, Schroder G, Pierre B S, et al. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase [J]. *Plant J*, 2000, 24: 797-804.
- [21] Facchini P J, Luca D V. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1811-1821.
- [22] Bird D A, Franceschi V R, Facchini P J. Atale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 2626-2635.
- [23] Saslowsky D, Shirley B W. Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots [J]. *Plant J*, 2001, 27(1): 37-48.
- [24] Haralampidis K, Bryan G, Qi X, et al. A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phyto-protectants in monocots [J]. *PNAS*, 2001, 98(23): 13431-13436.
- [25] Samanani N, Park S U, Facchini P J. Cell type-specific localization of Transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 915-926.
- [26] Lorenzo C P, Albert C, Patricia B A, et al. Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 62: 683-695.
- [27] 刘智, 余龙江, 栗茂腾, 等. 紫杉醇及其前体在中国红豆杉植株中合成和积累部位探讨 [J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(3): 313-317.
- [28] Hibi N, Fujita T, Hatano M, et al. Putrescine-N-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus* [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100(2): 826-835.
- [29] Pasquali G, Goddijn O J M, De W A, et al. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 1121-1131.
- [30] Mahroug S, Burlat V, Pierre B S. Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6: 363-381.
- [31] Suzuki K, Yamada Y, Hashimoto T. Expression of *Atropa belladonna* putrescine-N-methyltransferase in root pericycle [J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40: 289-297.
- [32] Leivar P, Gonza lez V M, Castel S, et al. Subcellular localization of arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 1027-1032.
- [33] Kuntz M, Romer S, Suire C, et al. Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening [J]. *Plant J*, 1992, 2: 25-34.
- [34] De L V, Cutler A J. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 1987, 85: 1099-1102.
- [35] Stevens L H, Blom T J M, Verpoorte R. Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and strictosidine glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata* [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 573-576.
- [36] Sottomayor M, Ros B. Peroxidase from *Catharanthus roseus* (L.) G Don and the biosynthesis of alpha-3,4-anhydrovinblastine: a specific role for a multifunctional enzyme [J]. *Protoplasma*, 2003, 222: 97-105.
- [37] McKnight T D, Bergey D R, Burnett R J, et al. Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants [J]. *Planta*, 1991, 185: 148-152.