

逆境胁迫下红花 *CYP450s* 基因的表达与幼叶总黄酮含量的相关性分析

孙国庆¹, 刘建雨^{2#}, 吴发明¹, 张庆宇², 马鑫彤², 张馨月², 洪瑛琪², 姚娜², 杨建文^{1*}, 刘秀明^{2*}

1. 遵义医科大学, 贵州 遵义 563000

2. 吉林农业大学生命科学学院, 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 克隆细胞色素 P450s (*CYP450s*) 家族成员的 2 个基因, 探究红花 *Carthamus tinctorius* 幼叶在逆境胁迫下 *CYP450s* 基因的表达与红花总黄酮含量变化关系。方法 以吉红 1 号为材料, 对 *CYP450s* 家族的 2 个基因 *CYP81E8*、*CYP71A1* 进行基因克隆表达及分析。研究了茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)、干旱 (PEG-6000)、光及暗处理 4 种逆境胁迫对红花总黄酮含量的影响, 分析了 *CtCYP81E8* 和 *CtCYP71A1* 基因的表达与叶片总黄酮含量之间的相关性。结果 *CtCYP81E8* 编码区序列为 1014 bp, 编码 337 个氨基酸; *CtCYP71A1* 编码区序列为 1287 bp, 编码 428 个氨基酸。2 个基因在不同胁迫条件下的表达量及总黄酮含量的变化表明: MeJA 处理后, 与野生型相比, 叶片中的总黄酮含量均有不同程度的增加。*CtCYP81E8*、*CtCYP71A1* 的表达量与总黄酮的积累量呈正相关; 当采用 PEG-6000 处理后, *CtCYP81E8* 处于正调控, 而 *CtCYP71A1* 处于负调控状态, 红花的叶片中总黄酮含量均显著增加; 光胁迫下, 在一定时间内总黄酮含量与 *CtCYP71A1* 基因表达量呈正相关, 与 *CtCYP81E8* 基因表达量呈负相关, 暗胁迫下, 总黄酮含量与 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因表达趋势一致, 都在一定时间内呈正相关。结论 成功克隆了红花 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因。qRT-PCR 分析表明, *CtCYP81E8*、*CtCYP71A1* 基因可能在红花幼叶期对逆境胁迫的适应中发挥重要作用, 为红花 *CYP450s* 家族基因在红花黄酮代谢合成的功能研究提供理论依据。

关键词: 红花; *CYP450s* 基因; 黄酮; 逆境胁迫; 基因表达; 茉莉酸甲酯

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)01-0222-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.025

Correlation analysis between expression of *CYP450s* gene in *Carthamus tinctorius* and total flavonoids content in young leaves under stress

SUN Guo-qing¹, LIU Jian-yu², WU Fa-ming¹, ZHANG Qing-yu¹, MA Xin-tong², ZHANG Xin-yue², HONG Ying-qi², YAO Na², YANG Jian-wen¹, LIU Xiu-ming²

1. Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

2. Engineering Research Center for Bioreactor and Drug Development, Ministry of Education, College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective Two genes of members of the *CYP450s* family were cloned to explore the relationship between the expression of *CYP450s* genes and the changes in total flavonoids in young leaves of Honghua *Carthamus tinctorius* under stress. **Methods** Using Jihong No. 1 as the material, the two genes *CYP81E8* and *CYP71A1* of the *CYP450s* family were cloned, expressed and analyzed. The effects of methyl jasmonate, drought (PEG-6000), light and dark treatments on the content of total flavonoids in *C. tinctorius* were studied, and the correlation between the expression of *CtCYP81E8* and *CtCYP71A1* genes and the content of total flavonoids in leaves was analyzed. **Results** The *CtCYP81E8* coding region sequence was 1014 bp, encoding 337 amino acids; the *CtCYP71A1* coding region sequence was 1287 bp, encoding 428 amino acids. The expression of the two genes under different stress conditions and the changes in total flavonoid content indicated that the total flavonoid content in the leaves increased to varying degrees after treatment with methyl jasmonate compared with the wild type. The expression of *CtCYP81E8* and *CtCYP71A1* was

收稿日期: 2021-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31771868); 国家自然科学基金资助项目 (81760679); 吉林省科技厅项目 (20190201172JC); 吉林省科技厅项目 (20190201175JC); 吉林农业大学生创新创业训练计划项目; 贵州省中医药管理局项目

作者简介: 孙国庆 (1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事医院药学研究。E-mail: 747167737@qq.com

***通信作者:** 刘秀明 (1981—), 女, 高级实验师, 从事生物反应器与代谢调控研究。E-mail: xiuming1211@163.com

杨建文 (1968—), 男, 主任药师, 从事医院药学研究。E-mail: yjw67315@163.com

#共同第一作者: 刘建雨 (1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事植物次生代谢调控研究。E-mail: 2524465081@qq.com

positively correlated with the accumulation of total flavonoids; when treated with PEG-6000, *CtCYP81E8* was under positive regulation, while *CtCYP71A1* was under negative regulation, and the total flavonoid content in the leaves of *C. tinctorius* increased significantly; Under light stress, the total flavonoid content was positively correlated with *CtCYP71A1* gene expression in a certain period of time, and negatively correlated with *CtCYP81E8* gene expression. Under dark stress, the total flavonoid content was consistent with *CtCYP81E8* and *CtCYP71A1* gene expression trends, and both showed a positive correlation within a certain period of time. **Conclusion** The *CtCYP81E8* and *CtCYP71A1* genes of *C. tinctorius* were successfully cloned. qRT-PCR analysis showed that *CtCYP81E8* and *CtCYP71A1* genes may play an important role in the adaptation of *C. tinctorius* young leaves to adversity stress. This study provides a theoretical basis for the study of CYP450s family genes in flavonoid metabolism and synthesis of *C. tinctorius*.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; CYP450s gene; flavonoids; adversity stress; gene expression; methyl jasmonate

红花 *Carthamus tinctorius* L., 别名红蓝花、刺红花, 为菊科、红花属植物, 干燥的管状花, 橙红色, 花管狭细, 具有特异的香味, 主产于河南、湖南、四川、新疆、西藏等地。红花作为一种重要的药用植物, 喜温暖、干燥的气候, 抗寒性强, 耐贫瘠, 是我国传统的中草药, 有活血化瘀、散湿去肿的功效^[1]。红花中的黄酮属于低分子的天然植物成分, 是一种酚类物质, 又被称为生物黄酮或植物黄酮, 属于植物次级代谢产物^[2], 它广泛存在于各种各样的植物和大型真菌中, 到目前为止, 已经有数百种不同类型的黄酮类化合物在植物中被发现, 人工合成的黄酮类化合物也不断问世^[3]。红花黄酮类化合物的药理作用非常广泛, 其中包括抗氧化、抗炎、舒张血管、抑制血小板聚集和调节血脂等作用。研究表明类黄酮中的羟基红花黄 A 是红花黄酮类化合物的主要活性元素, 具有抗氧化及心肌保护作用^[4], 近年来黄酮类化合物在心血管保护方面主要具有减少氧化应激、减少炎症信号分子表达、扩张血管及降压作用、抑制血小板聚集、影响脂质代谢 5 个方面的重要作用^[5]。此外, 研究发现黄酮类化合物的合成与积累量取决于其合成途径中的关键酶^[6], 它们在植物次生代谢物合成途径中往往位于代谢支路分叉口或次生代谢物合成途径的下游, 能进一步决定代谢的流向^[7-8]。红花在生长发育过程中, 还会受到自然界各种逆境胁迫的影响, 如强光、干旱、黑暗等, 由于黄酮是一类重要的次生代谢产物, 其合成、积累与植株的生长环境密切相关并参与植物的抗逆过程, 是植物抵抗外界不利环境的重要保护物质。目前, 国内外对黄酮类化合物的研究在提取、测定方面已有较多报道, 但关于红花中不同胁迫条件下的黄酮含量变化与关键酶基因表达间的关系研究较少。

细胞色素 P450s (CYP450s) 是一类超基因家族编码的单加氧酶, 主要存在于动植物体内及微生物体

内, 在生物防御方面具有重要作用^[9]。研究报道, CYP450s 是高等植物中最大的酶蛋白家族, 催化内源性物质如脂类、黄酮类、萜类、生物碱类等的生物合成代谢^[10-11]。因其多种生物学功能被人们称为万能的生物催化剂^[12]。CYP 亚家族成员在植物花瓣中能够催化 w 末端的连续氧化反应, 从而影响其次生代谢产物的合成及信号传导, 在调控植物生长发育及次生代谢方面起着重要作用^[13-15]。数据表明, 类黄酮的生物合成是通过多酶复合物进行的, 其中 CYP450s 家族是重要组成部分, 但与类黄酮生物合成相关的 CYP450s 基因的调控机制尚不明确^[16]。

CYP71A 与 CYP81E 同属于 CYP450s 家族的不同亚家族, 两者都为细胞色素单加氧酶, 苜蓿中有表征过 CYP81E 亚家族 3 位成员 CYP81E7、CYP81E8 和 CYP81E9, 以异黄酮为底物, 影响类黄酮类化合物生物素的含量变化^[17]; 在功能上, CYP71A 催化氨基酸生成的次生代谢产物, 与植物的防御和抗逆境胁迫相关^[18]。

为探究红花幼苗期总黄酮含量变化情况及逆境胁迫下的应答反应机制, 本研究以吉红一号为材料, 研究茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)、干旱 [聚乙二醇 6000 (PEG6000)]、光照和黑暗 4 种非生物逆境胁迫处理对红花幼叶中总黄酮含量的影响, 同时利用 qRT-PCR 技术, 分析黄酮合成途径中 *CtCYP81E8* 与 *CtCYP71A1* 基因在逆境胁迫下的表达量变化, 从分子水平上探讨总黄酮含量与 CYP450s 家族基因表达的相关性, 为 *CtCYP81E8* 与 *CtCYP71A1* 基因在红花黄酮代谢调控中的研究奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品经吉林农业大学刘秀明高级实验师鉴定为红花 *C. tinctorius* L. 品种吉红 1 号, 于吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程中心人工气候室种植。

1.2 主要试剂

对照品芦丁(批号 SR8250, 质量分数 98%) 购自北京索莱宝科技有限公司, RNAiso PLUS 试剂、反转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司。PEG6000、MeJA 购自北京索莱宝科技有限公司。

2 方法

2.1 红花的栽培、处理及样品采集

供试材料吉红 1 号种植于吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心。选取叶幼嫩时期(种子萌发后约 20 d)长势一致的植株, 分别用 300 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 溶液、20% PEG6000 溶液、光处理(800 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照时长 12~60 h)、暗处理(暗培养时长 12~60 h), 对照组[光强度为 600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]为正常培养。采集胁迫处理条件下的叶片各 6 份, 3 份置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱烘干至恒定质量, 用于提取总黄酮, 另 3 份迅速装入采集袋, 用锡箔纸包装后冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$, 用于提取 RNA。采集野生型红花的 4 个时期(花蕾期、初花期、盛花期、衰落期)花瓣, 锡箔纸包好, 经液氮处理后保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 RNA 提取及反转录 cDNA

利用 RNAiso PLUS 试剂提取红花 4 个花期花瓣总 RNA, 然后通过反转录试剂盒将验证后未降解且浓度适宜的 RNA 反转录成 cDNA, 反转录成功的 cDNA 用于后续的基因克隆及表达分析。并保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.3 *CtCYP81E* 和 *CtCYP71A* 亚家族基因的表达分析

根据红花基因组测序结果, 注释到红花 *CYP450s* 家族中的 2 个亚家族成员 *CYP81E* 和 *CYP71A*, *CYP81E* 亚家族包含 15 个基因, 分别命名为 *CtCYP81E1*~*15*, *CYP71A* 亚家族包含 19 个基因, 分别命名为 *CtCYP71A1*~*19*, 通过 qRT-PCR 分析基因的表达情况。利用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) 试剂盒, 使用 Mx3000P TM Real Time PCR 仪, 操作系统为 Stratagen (Mx3000P) 检测基因表达量的变化。2 步法 PCR 扩增标准程序为 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 40 个循环; 熔解曲线为 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s。荧光定量 PCR 反应结束后, 收集样品内参基因和 *CtCYP81E* 和 *CtCYP71A* 基因亚家族的 C_t 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, *CtCYP81E* 基因亚家族以红花的花蕾期作为基数 1 进行表达差异的数据分析, *CtCYP71A* 基因亚家族以红花的初花期作为基数 1 进行表达差异的数据分析。

2.4 *CtCYP81E8* 和 *CtCYP71A1* 基因的克隆

通过与红花黄色素积累量进行比较, 发现 *CtCYP81E* 亚家族第 8 条基因、*CtCYP71A* 亚家族第 1 条基因的表达量在盛花期最高, 且与红花黄色素积累量趋势一致, 因此将其命名为 *CtCYP81E8*、*CtCYP71A1* 并做后续的基因克隆, 设计 *CtCYP81E8* 特异性引物进行基因克隆。上游引物为 *CtCYP81E8*f: 5'-ATGATGAGGATGATTAGTGG-3', 下游引物为 *CtCYP81E8*r: 5'-TCAAAGATGCGATAATAGATT-3', 设计 *CtCYP71A1* 特异性引物进行基因克隆, 上游引物为 *CtCYP71A1*f: 5'-AATAGGATCCATGCTCATTCACTTTGGTAGT-3', 下游引物为 *CtCYP71A1*r: 5'-AATAGAAATTCTCACCGAGCACTTAAGTTGAC-3'; 以红花盛花期花瓣 cDNA 为模板进行编码区序列的扩增, 设计 55~65 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度梯度, *CtCYP81E8* 扩增体系最适合的退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$, *CtCYP71A1* 扩增体系最适合的退火温度为 62 $^{\circ}\text{C}$, PCR 程序设置为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55~65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 8 min, 30 个循环。PCR 产物胶回收后连接 pEASY-T1 克隆载体进行测序。

2.5 *CtCYP81E8* 和 *CtCYP71A1* 对 MeJA、PEG-6000 干旱、光及暗胁迫的响应

配制 MeJA 原浓度为 300 mmol/L, 稀释 1000 倍成终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$, 将其喷洒在 3 周龄红花幼叶上, 采样时间设置为 2、4、6、8、12 h; 配制 20% PEG6000, 浇灌在钵钵中, 采样时间为 12~72 h, 每 12 小时为一时间梯度; 将暗处理一组放置在暗箱内避光处理, 光及暗胁迫采样时间为 12~60 h, 待胁迫完成后剪取新鲜样品冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$, 利用 RNAiso PLUS 试剂提取红花幼叶在 4 种胁迫条件下的 RNA, 通过反转录试剂盒将验证后未降解且浓度适宜的 RNA 反转录成 cDNA, 反转录成功的 cDNA 用于 qRT-PCR 分析 *CtCYP81E8* 和 *CtCYP71A1* 基因表达量的变化。

2.6 不同胁迫条件下红花总黄酮的提取和测定

提取不同胁迫条件下幼叶的总黄酮, 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 研磨成粉末过 40 目筛, 称取 0.5 g 粉状物, 加入 65%乙醇 10 mL, 超声波(600 W, 50 $^{\circ}\text{C}$) 50 min 后离心。吸取上清液, 每个样品 3 次重复, 利用选定的最佳吸收峰波长, 进行吸光度的测定。并基于 AlCl_3 比色法制备芦丁标准曲线。准确称取 0.010 0 g 芦丁对照品, 加入 30%的乙醇溶液, 充分溶解后,

定容至 100 mL, 即为芦丁对照品溶液, 质量浓度为 0.1 mg/mL。在 5 个 10 mL 量瓶中, 将芦丁对照品溶液分别准确吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 分别加入 30% 的乙醇, 将各溶液体积补充至 5 mL, 再加入 0.3 mL 浓度为 5% 的亚硝酸钠溶液, 充分混匀, 静置 5 min, 加入 0.3 mL 浓度为 10% 硝酸铝溶液, 充分混匀, 静置 5 min, 加入 4 mL 浓度为 4% 的氢氧化钠溶液, 充分混匀, 加入 30% 的乙醇定容, 充分混匀, 静置 10 min。将静置后的溶液置于 340 nm 的波长下扫描。绘制标准曲线并进行样品测定。总黄酮含量以芦丁当量计算, 以芦丁量为横坐标 (X), 吸光度值为纵坐标 (Y), 芦丁的线性关系为 $Y=8.7X+0.1771$, $R^2=0.9975$ 。

3 结果与分析

3.1 RNA 提取及反转录 cDNA

红花花瓣 RNA 提取如图 1 所示。通过 Nanodrop 检测发现, 提取的 RNA 质量浓度在 1000 ng/ μ L 左右。利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, 由图 1 可以看到 28、18、5 S 3 条清晰带, 说明 RNA 提取质量较好, 无降解现象, 可以满足后续实验需要。

3.2 CYP81E、CYP71A 亚家族基因的相对表达量分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 对红花花蕾期、初花期、盛花期、衰落期 4 个不同发育时期进行表达差异的数据分析, 并对 CYP81E 亚家族的 15 条基因 (图 2-A)

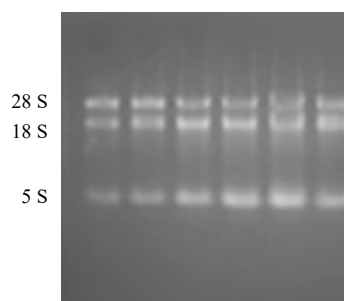


图 1 红花花瓣总 RNA 提取电泳图

Fig. 1 Total RNA of petal from *C. tinctorius*

及 CYP71A 亚家族的 19 条基因 (图 2-B) 做柱形图分析, 通过与红花黄色素积累量进行比较, 发现 CYP81E8 基因的表达与红花黄色素积累量变化趋势一致 (图 2-C), 而 CYP71A1 在盛花期表达量最高 (图 2-D)。因此选择 *CtCYP81E8*、*CtCYP71A1* 基因做后续克隆及功能鉴定。

3.3 CtCYP81E8 和 CtCYP71A1 基因的克隆

以红花盛花期花瓣 cDNA 为模板, 使用高保真酶进行梯度 PCR, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果 *CtCYP81E8* 基因在 1014 bp 位置扩增出目的片段 (图 3-A), 因 58 $^{\circ}$ C 时未出现引物二聚体, 将最终的退火温度定为 58 $^{\circ}$ C; 而 *CtCYP71A1* 基因在 1287 bp 位置扩增出目的片段 (图 3-B), 最终退火温度为

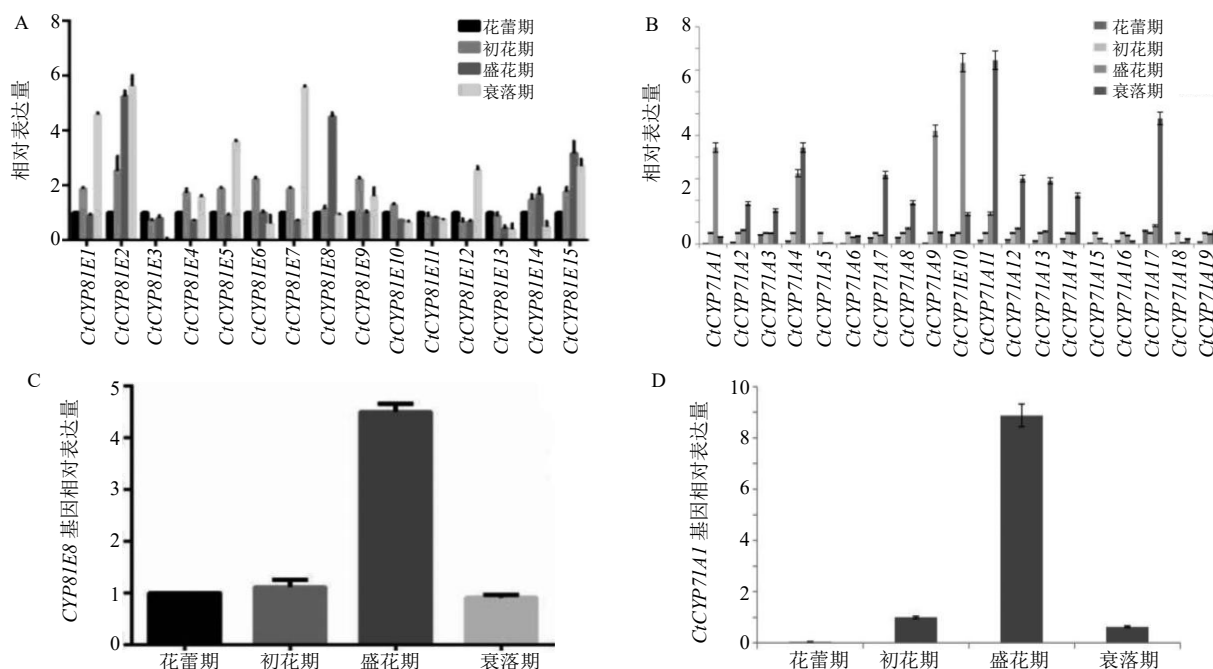
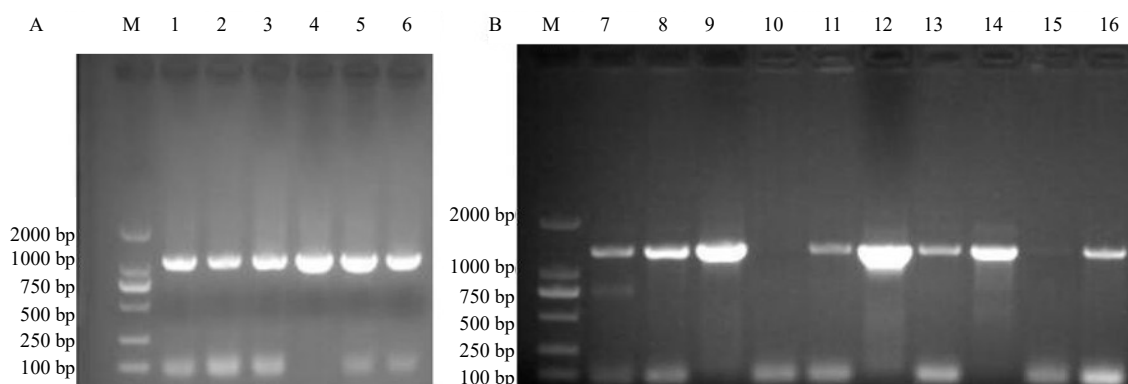


图 2 CYP81E (A, C)、CYP71A (B, D) 亚家族基因的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of CYP81E (A, C) and CYP71A (B, D) subfamily genes



M-Marker 1~6-PCR 退火温度为 55~60 °C 7~16-PCR 退火温度为 55~64 °C
M-Marker 1~6-PCR annealing temperature is 55~60 °C 7~16-PCR annealing temperature is 55~64 °C

图 3 *CtCYP81E8* (A) 和 *CtCYP71A1* (B) 基因的梯度 PCR 电泳图

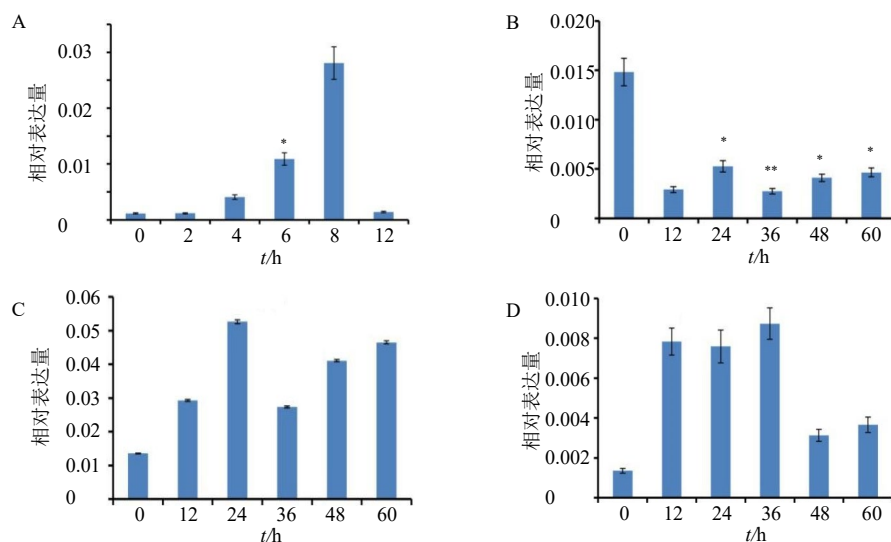
Fig. 3 Gradient PCR electropherogram of *CtCYP71A1* (A) and *CtCYP81E8* (B) genes

62 °C，将带有目的基因的 PCR 产物连接到 pEASY-T1 克隆载体上，并转化大肠杆菌感受态，挑取单克隆后进行菌液 PCR 电泳及双酶切验证，将鉴定正确的菌液送去测序，测序结果与原序列吻合，说明 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 构建成功。

3.4 *CtCYP81E8* 对 MeJA、PEG6000 干旱、光胁迫及暗胁迫的响应

利用 qRT-PCR 对 MeJA 胁迫条件下的基因表达量进行分析，结果显示(图 4-A)与对照组 (0 h) 相比，*CtCYP81E8* 基因的表达呈现上升趋势，其中 2~8 h 呈明显上升趋势，在 8 h 时，基因的表达量达到

最大，12 h 时，表达量显著降低；PEG6000 干旱胁迫条件下，*CtCYP81E8* 基因的表达与对照组存在显著差异，在整个胁迫过程中始终保持高表达状态(图 4-C)，且该基因在胁迫处理 24 h 后基因表达量最高，说明该基因有可能为响应 PEG6000 干旱胁迫的基因；在强光照条件下，处理 12~60 h 的基因表达水平相较于野生型均有所下调，且在 36 h 下调最为显著(图 4-B)；暗处理后的该基因表达水平相对于光照处理反而在 36 h 表达量达到最大，12~36 h 表达量均为上升状态，36 h 后突然急剧下降，但整体表达水平相较于野生型均有所上调(图 4-D)。



对照组 (0 h) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, vs control group at 0 h, same as below

图 4 MeJA (A)、光 (B)、PEG6000 干旱 (C) 及暗 (D) 胁迫下 *CtCYP81E8* 基因的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *CtCYP81E8* gene under methyl jasmonate (A), light (B), drought (C) and dark (D) treatments

3.5 *CtCYP71A1* 对 MeJA、PEG6000 干旱、光及暗胁迫的响应

MeJA 胁迫处理 2~12 h 后, 与对照组相比, *CtCYP71A1* 基因在 4 h 时表达量达到最大, 2~4 h 时表达量随之增加, 自 6 h 之后基因表达水平与野生型相比呈持平状态, 整体表达水平呈先升高, 后

降低的趋势 (图 5-A); 20% PEG6000 胁迫处理后, 该基因表达水平平均呈下降趋势, 且在 24 h 表达量达到最低 (图 5-C); 在光 (图 5-B) 及暗 (图 5-D) 胁迫条件下, 该基因的表达量趋于一致, 均在 36 h 表达量最高, 且都高于对照组, 并且 12、24、48、60 h 相较于野生型变化趋势均不明显。

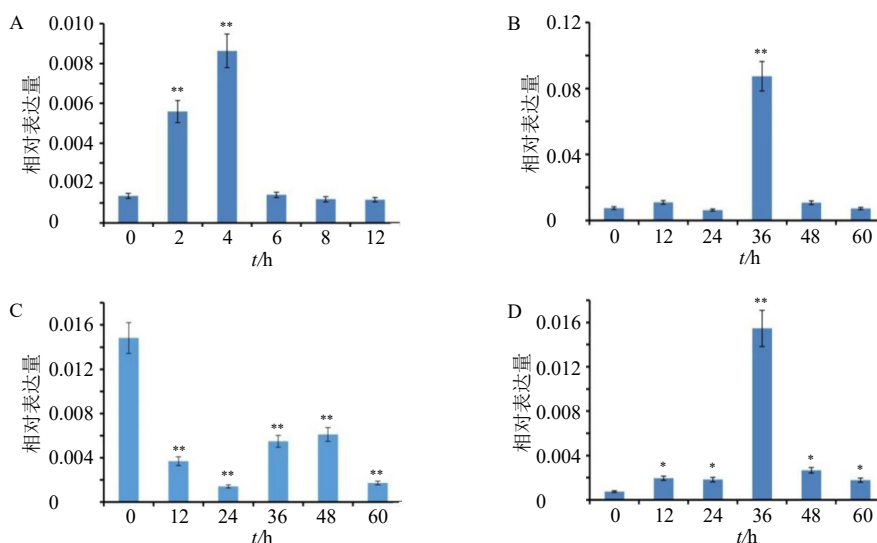


图 5 MeJA (A)、光 (B)、PEG-6000 干旱 (C) 及暗 (D) 胁迫下 *CtCYP81E8* 基因的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *CtCYP81E8* gene under methyl jasmonate (A), light (B), drought (C) and dark (D) treatments

3.6 逆境胁迫对红花幼叶期总黄酮含量的影响

图 6 表明, 幼叶期红花总黄酮在 MeJA 胁迫处理 2~12 h 后, 随着胁迫时间的加长, 总黄酮含量逐渐增加, 在 8 h 时达到最大。与对照相比差异显著; 叶中总黄酮含量在 12 h 下降, 但仍高于野生型。这与 *CtCYP81E8* 基因的表达水平趋于一致, 说明该基因可能参与调控黄酮类化合物的合成; PEG-6000 干旱胁迫处理 12~60 h 后, 叶中总黄酮含量在 12~24 h 与其他时期相比达到极

显著差异, 总黄酮含量与 *CtCYP81E8* 基因表达量呈正相关, 与 *CtCYP71A1* 基因表达量呈负相关; 光处理 12~60 h 后, 总黄酮含量相较于野生型呈正调控与 *CtCYP71A1* 基因表达量呈正相关, 与 *CtCYP81E8* 基因表达量呈负相关; 暗处理条件 12~48 h 条件下, 总黄酮含量与 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因表达趋势一致, 与对照组相比, 皆呈上升趋势, *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因均在处理 36 h 时表达量最高。

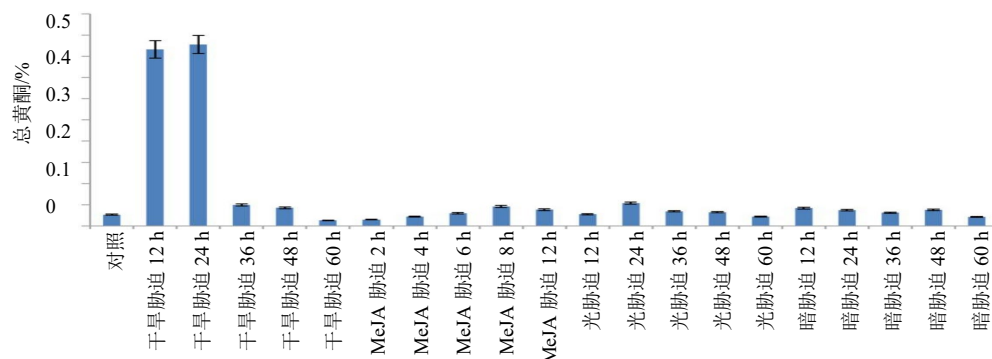


图 6 逆境胁迫对红花幼叶期总黄酮含量的影响

Fig. 6 Influence of stress on content of total flavonoids of *C. tinctorius* young stage

4 讨论

植物在极端温度和干旱等逆境胁迫下,主要通过影响细胞的膜结构从而产生氧化胁迫^[19],由于黄酮本身具有很强的抗氧化作用,因此黄酮在植物组织中的积累可以增强其对于非生物胁迫的耐受性。Kirakosyan 等^[20]通过对山楂树进行冷处理及干旱处理后,发现处理后叶片中的金丝桃苷中黄酮含量显著提升。Li 等^[21]研究表明,黄酮能提高植物的耐受性,降低紫外辐射对细胞的损伤。董新纯等^[22]通过 UV-B 胁迫苦荞实验,发现叶片类黄酮含量提高,但高幅照度和长时间 UV-B 处理则使后期类黄酮含量下降,说明黄酮类化合物在植物对逆境胁迫的应答中具有重要作用。

本研究中黄酮可能以不同的抗逆机制参与 4 种胁迫,从而引起其含量在胁迫过程中出现不同的变化趋势, *CYP450s* 家族中的 2 个基因在逆境胁迫下均有所表达且表达模式存在较大差异。红花幼叶在茉莉酸甲酯胁迫下,在 8 h 叶中总黄酮含量达到最高值,与对照组相比差异显著,叶中总黄酮含量在 12 h 下降, *CtCYP81E8* 基因与 *CtCYP71A1* 基因的表达趋势为先升高,后降低,此现象可能与外界刺激诱导黄酮合成中间产物并与合成花青素等色素有关^[23]。在 PEG-6000 干旱胁迫下,红花幼叶中基因表达量的变化相较其他胁迫有明显变化趋势。PEG-6000 干旱胁迫可诱导黄酮的合成与积累,叶中总黄酮含量在 12~24 h 与其他时期相比达到极显著差异,其原因可能是嫩叶期,红花的叶向根或茎中输送黄酮类化合物合成前体,且输送通道中存在的相关氧化酶催化黄酮合成,从而引起叶中总黄酮含量的显著变化^[24-27]。总黄酮含量在 24 h 达最大,随着干旱胁迫时间的延长,而后略有降低,这与 *CtCYP81E8* 基因的表达趋势一致,表明长期干旱胁迫下植物体内的活性氧动态平衡受到破坏,抗氧化酶活性呈现先升高后降低的趋势^[28],与 *CtCYP71A1* 基因的表达呈负相关,原因可能是随着黄酮的合成,大量的产物对酶产生了一定的反馈抑制而引起相关性降低^[29]。王强^[30]关于濒危植物长叶榿光合生理生态特性及次生代谢产物研究表明,采用光处理后的长叶榿不同营养器官黄酮类化合物在不同时期存在显著差异。在光处理 24~48 h 时,叶片的总黄酮含量相比于野生型含量略有提升, *CtCYP81E8* 基因的荧光定量结果显示 24 h 高表达, *CtCYP71A1* 基因的荧光定量结果显示 36 h 高表达,说明 2 条氧化酶

基因在植物抵抗光辐射过程中,可能参与黄酮类化合物的合成。王龙飞^[31]在研究胡枝子花青素中发现,光辐射胁迫下,花青素大量积累,且胁迫时间越长胁迫强度越大,花青素含量越高,说明光辐射下部分黄酮合成前体物可能被诱导用于花青素支路代谢。暗处理 12~48 h 下,总黄酮含量与 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因表达趋势一致,与野生型相比,皆呈上升趋势, *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因表达量在胁迫 36 h 时达到最高,总黄酮含量在暗处理下差异不明显,在 12 h 略高于其他时期,可能是由于暗处理下, *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因的活性在黄酮类物质代谢中未有明显提高^[32-35]。

植物黄酮合成途径由多条代谢支路交错连接而成,包含多个酶基因,这些酶基因的表达高度依赖于组织类型和对内部或外部信号的响应^[36]。朱东春^[37]研究发现,鬼针草 *CYP450* 酶活性对总黄酮具有影响。本研究发现,4 种胁迫处理后 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因表达量的增加与黄酮含量升高在一定时间段呈正相关,二者积极响应胁迫刺激。逆境胁迫下这 2 个基因与黄酮含量均显示不同的变化趋势,表明在红花幼叶期红花黄酮含量的变化与基因表达水平有着直接关系^[38]。

本研究成功克隆了红花 *CYP450* 家族中的 2 个亚家族基因 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1*,分析其在逆境胁迫下的表达与红花幼叶总黄酮含量的相关性。结果表明, *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因在不同胁迫处理下的表达与总黄酮含量均呈现一定的正相关或负相关,推测 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因可能在红花的叶期响应 4 种逆境胁迫,参与红花黄酮化合物的生物合成。该研究一方面为研究红花应对环境胁迫的生理机制提供理论依据,另一方面为研究 *CtCYP81E8* 及 *CtCYP71A1* 基因的功能鉴定奠定基础,为深入研究 *CYP450* 家族基因在红花黄酮代谢调控中的作用机制提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 瞿城,乐世俊,林航,等.红花化学成分研究[J].中草药,2015,46(13):1872-1877.
- [2] 马晓丽.生物类黄酮的研究进展[J].山西职工医学院学报,2005,15(2):70-71.
- [3] 杨青,郭彩清,油继辉,等.黄酮类物质的生理功能及应用发展动态[J].贵州农业科学,2007,35(2):

- 143-146.
- [4] Bacchetti T, Morresi C, Bellachioma L, *et al.* Antioxidant and pro-oxidant properties of *Carthamus tinctorius*, hydroxy safflor yellow A, and safflor yellow A [J]. *Antioxidants* (Basel), 2020, 9(2): E119.
- [5] 李旭光, 方莲花, 杜冠华. 黄酮类化合物的心血管保护作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(6): 741-744.
- [6] Ahmad N, Liu J Y, Tian X, *et al.* Overexpression of a novel cytochrome P450 promotes flavonoid biosynthesis and osmotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Genes* (Basel), 2019, 10(10): E756.
- [7] Zhao Q, Cui M Y, Levsh O, *et al.* Two CYP82D enzymes function as flavone hydroxylases in the biosynthesis of root-specific 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(1): 135-148.
- [8] Wang S, Wang R S, Liu T, *et al.* CYP76B74 catalyzes the 3"-hydroxylation of geranylhydroquinone in shikonin biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2019, 179(2): 402-414.
- [9] Nelson D R, Koymans L, Kamataki T, *et al.* P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature [J]. *Pharmacogenetics*, 1996, 6(1): 1-42.
- [10] Eminoğlu A, Aktürk Dizman Y, Güzel Ş, *et al.* Molecular and in silico cloning, identification, and preharvest period expression analysis of a putative cytochrome P450 monooxygenase gene from *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (tea) [J]. *Türk Biyoloji Dergisi*, 2018, 42(1): 1-11.
- [11] 戴素明, 周程爱, 谢丙炎, 等. 细胞色素 P450 表达在植物防御反应中的作用 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004, 22(S1): 184-187.
- [12] Gu M Y, Wang M Z, Guo J, *et al.* Crystal structure of CYP76AH1 in 4-PI-bound state from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(4): 813-819.
- [13] Greule A, Stok J E, De Voss J J, *et al.* Unrivalled diversity: The many roles and reactions of bacterial cytochromes P450 in secondary metabolism [J]. *Nat Prod Rep*, 2018, 35(8): 757-791.
- [14] 李晓娜, 肖厚贞, 万三连, 等. 巴西橡胶树 HbCYP450 基因克隆与表达分析 [J]. 热带作物学报, 2017, 38(11): 2100-2105.
- [15] 梁会超, 胡宗风, 梁兰, 等. 过表达 HMGR 催化结构域以优化酵母工程菌原人参二醇代谢途径的研究 [J]. 药学研究, 2016, 35(8): 444-448.
- [16] 武安泉, 王俊生, 张玉玺, 等. 小麦 Cyp450 基因的电子克隆与生物信息学分析 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(18): 38-44.
- [17] 钟巍然, 柴友荣, 张凯, 等. 苯丙烷代谢途径中细胞色素 P450 的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(13): 5285-5289.
- [18] Liu C J, Huhman D, Sumner L W, *et al.* Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome p450 81E enzymes from *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2003, 36(4): 471-484.
- [19] Foyer C H, Lelandais M, Kunert K J. Photooxidative stress in plants [J]. *Physiol Plant*, 1994, 92(4): 696-717.
- [20] Kirakosyan A, Seymour E, Kaufman P B, *et al.* Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(14): 3973-3976.
- [21] Li J H, Tian C F, Xia Y H, *et al.* Production of plant-specific flavones baicalein and scutellarein in an engineered *E. coli* from available phenylalanine and tyrosine [J]. *Metab Eng*, 2019, 52: 124-133.
- [22] 董新纯, 赵世杰, 郭珊珊, 等. 增强 UV-B 条件下类黄酮与苦荞逆境伤害和抗氧化酶的关系 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2006, 37(2): 157-162.
- [23] Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 194-211.
- [24] Martin V J, Pitera D J, Withers S T, *et al.* Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796-802.
- [25] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, *et al.* High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [26] Facchini P J, Bohlmann J, Covello P S, *et al.* Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites [J]. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(3): 127-131.
- [27] Wang L, Yu R S, Yang W L, *et al.* Effects of paclitaxel loaded-drug micelles on cell proliferation and apoptosis of human lung cancer A549 cells [J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50(10): 1240-1245.
- [28] 朱友春, 田世龙, 王东晖, 等. 不同生育期苦荞黄酮含量与营养成分变化研究 [J]. 甘肃农业科技, 2010(6): 24-27.
- [29] 陈丽培, 刘瑞霞, 杨玉珍, 等. 干旱胁迫对刺槐、皂荚叶片渗透调节物质含量及保护酶活性的影响 [J]. 河南农业科学, 2017, 46(10): 122-127.
- [30] 王强. 濒危植物长叶榧光合生理生态特性及次生代谢产物研究 [D]. 上海: 上海师范大学, 2013.
- [31] 王龙飞. UV-B 辐射及干旱胁迫对三种胡枝子叶片光合特性及花青素含量的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [32] Gu M Y, Wang M Z, Guo J, *et al.* Crystal structure of

- CYP76AH1 in 4-PI-bound state from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(4): 813-819.
- [33] Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 194-211.
- [34] Han J Y, Kim H J, Kwon Y S, *et al.* The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12): 2062-2073.
- [35] 崔琳琳, 周一鸣, 季红斌, 等. 不同光质对苦荞萌发过程中的黄酮类化合物及其抗氧化活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(6): 104-108.
- [36] 翟锐. 早酥梨与其红皮芽变类黄酮生物合成途径研究及相关基因分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [37] 朱冬春. Cocktail 探针药物法评价鬼针草总黄酮对 CYP450 酶活性的影响 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
- [38] Teoh K H, Polichuk D R, Reed D W, *et al.* *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(5): 1411-1416.

[责任编辑 时圣明]