

环境因子对植物黄酮类化合物生物合成的影响

□徐文燕 高微微* 何春年

(中国医学科学院
中国协和医科大学 药用植物研究所 北京 100094)

摘 要:黄酮类化合物是一类具有多种生物及药理活性的植物次生代谢产物,其合成过程受到苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、黄烷酮醇还原酶(DFR)、异黄酮合成酶(IFS)等系列酶的调控,而这些酶的活性及其分子合成水平又受到光照、温度、水分、矿物质等环境因素的影响。本文列出了黄酮类化合物生物合成途径及其关键酶,并对环境因子影响黄酮生物合成及其分子机制的研究进展进行综述和评价。

关键词:黄酮 生物合成 环境 光照 温度 矿质营养 水分

黄酮类化合物(flavonoids)是一类重要的次生代谢产物,在植物体内起到抗紫外线灼伤,抵抗病菌入侵,吸引昆虫授粉以及启动微生物与植物建立共生关系等作用^[1],现代药理学研究表明,此类成分还具有保肝、抗炎、抗菌、抗病毒、保护心血管和雌性激素样作用等多种药理活性,是当前植物领域和医药领域中的研究热点。研究黄酮类物质的生物合成途径以及环境对其生物合成的影响作用,探索增加其在植物中含量的有效方法,对于提高植物抗逆性和维护人类健康都具有重要意义。除遗传和生物因素外,影响植物中黄酮类成分合成的主要因素有光照、温度、CO₂ 浓度、矿质营养和土壤水分等。近年来,随着分子生物学和生物技术工程的快速发展,人们已经开始从分子角度阐

明环境因素对此类成分生物合成的影响机制,从而为此类成分的调控奠定了理论基础。

一、黄酮类成分的生物合成途径

黄酮类成分的生物合成起始于苯丙烷代谢途径^[2],先以丙二酰辅酶A和4-香豆酰-辅酶A为底物经查尔酮合成酶(CHS)催化形成查尔酮(chalcone),然后再通过查尔酮异构酶(CHI)、查尔酮还原酶(CHR)、异黄酮合成酶(IFS)、黄烷酮醇还原酶(DFR)等多个酶催化的酶促反应合成黄酮(flavone)、黄烷酮(flavanone)、黄酮醇(flavonol)、异黄酮(isoflavone)、二氢异黄酮(isoflavanone)、花青素(anthocyanin)等不同类型的黄酮类成分,见图1。20世纪80年代末,黄酮合成上游的关键酶CHS、CHI的基因相继克隆出来^[3];Kim等(2000)^[4]克隆出异黄酮合成关键酶

收稿日期:2006-06-17

修回日期:2006-11-18

* 联系人:高微微,博士,研究员,研究方向:药用植物分子生态学与病害防治研究。E-mail:gaovv118@sina.com Tel & Fax:010-62899737。

IFS 的基因。分子生物学技术为发现和调控黄酮生物合成途径提供了新的方法。

二、环境对黄酮类成分合成的影响

1. 光照

光照条件以及适当光照强度影响黄酮类成分在植物组织中的含量和分布。Massimiliano 等^[5]对欧洲女贞 (*Ligustrum vulgare*) 的研究结果显示,太阳照射可以使槲皮苷 (quercetin 3-O-rutinoside)、槲草素-7-O-葡萄糖苷 (luteolin 7-O-glucoside) 和松果菊苷 (echinacoside) 含量迅速增加。王华田等^[6]报道,光照强度为 42% 自然光强时,银杏叶黄酮含量最高,高于或低于这一光强时含量均降低。Agati Giovanni 等^[7]采用微量荧光标记法和荧光显微图像技术对阔叶欧女贞 (*Phillyrea latifolia* L.) 的叶片进行了研究,发现完全曝露在光下的叶片,从表皮区到内层海绵组织都有黄酮类成分的积累,而给予 15% 遮阴条件的叶片只在表皮区有此类成分积累。在不同光质中,虽然红光和蓝光对黄酮类成分合成也有促进作用,但是紫外光对此类成分合成的促进效果最显著。Gao 等^[8]报道,增加紫外辐射可以使玉米叶片中总黄酮含量明显增加。Natividad Chaves 等^[9]对岩玫瑰 (*Cistus ladanifer*) 的研究表明,紫外辐射充足的夏季与紫外辐射相对较少的春季相比,植株中总黄酮的含量可以高出 2~3 倍。

我国学者研究发现适当延长光照时间也可以增加黄酮类物质的含量。李卫东等^[10]报道大豆出苗期间大豆异黄酮含量随日照时数增加而增加。曾明等^[11]测定了不同采收期葛根中异黄酮的含量,发现日照时数与葛根素的积

累呈显著正相关。汪海峰等^[12]对不同海拔地区的银杏叶黄酮苷含量进行调查时发现,高海拔地区较长的日照时间是促进银杏叶黄酮苷积累的一个重要因素。

基因工程技术的运用使得光照对黄酮类物质合成影响的部分分子机制得以阐述。L. Rhonda Feinbaum 等^[13]将拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 CHS 启动子融

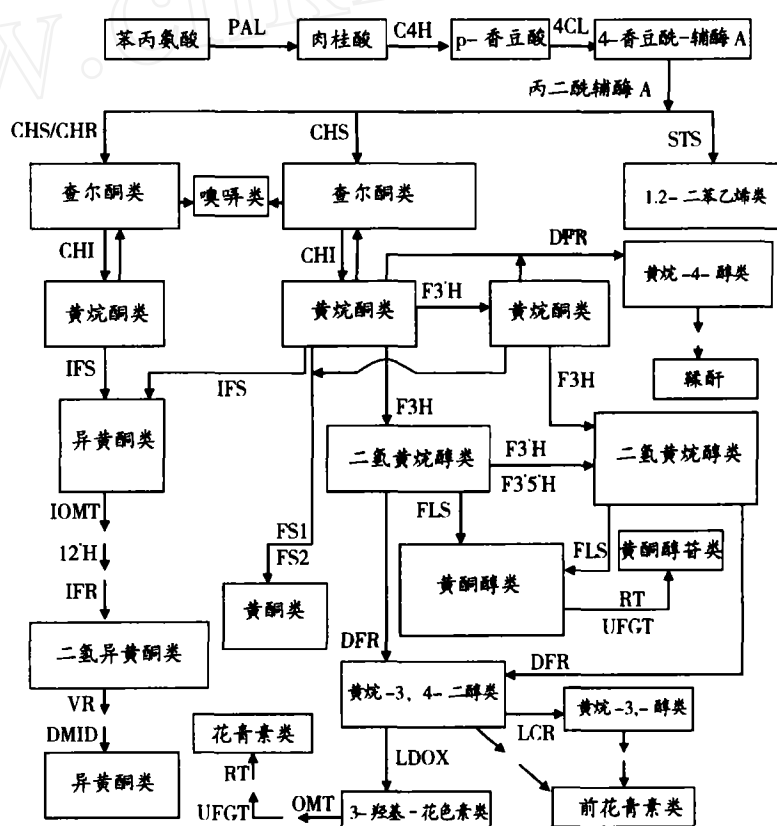


图1 黄酮类化合物生物合成途径及相关酶^[2]

PAL: 苯丙氨酸解氨酶, C4H: 肉桂酸-4-羟化酶, 4CL: 4-香豆酸-辅酶 A 连接酶, CHS: 查尔酮合成酶, CHR: 查尔酮还原酶, CHI: 查尔酮异构酶, IFS: 异黄酮合成酶, IFR: 异黄酮还原酶, 12'H: isoflavone 2'-hydroxylase, OMT: O-methyltransferase VR: vestitone reductase, FSI 和 FSII: 黄酮合成酶, DFR: 黄酮醇还原酶, F3H: flavanone 3-hydroxylase, FLS: 黄酮醇合成酶, LCR: leucoanthocyanidin reductase, F3'H: flavonoi 3' hydroxylase, UFGT: UDPG-flavonoid glucosyl transferase, RT: rhamnosyl transferase, F3'5'H: flavonoid 3'5' hydroxylase, LDOX: leucoanthocyanidin dioxygenase, STS: stilbene synthase, DMID: 7, 2'-dihydroxy 4'-methoxyisoflavanol dehydratase, IOMT: isoflavone O-methyltransferase.

合到 β -葡萄糖酸酶标记基因中,发现转基因的拟南芥中,CHS的一些基因片段表达水平与光照强度呈正相关。Fritz Kreuzaler 等^[14]研究发现紫外辐射可以诱导欧芹(*Petroselinum hortense*)细胞中 CHSmRNA 量瞬时快速增加。Suneetha Alokam 等^[15]报道,在红光/远红光比例分别为 1.9 和 0.7 的不同生态环境中,前者长须银柴胡(*Stellaria longipes*)花青素含量普遍大于后者,主要原因是 CHS 的活性增加。

2. 温度

较低的平均温度有利于黄酮类物质的积累,主要原因是低温可以使黄酮类成分合成途径中相关酶的活性大幅度增加。C. R. Caldwell 等^[16]对矮大豆的研究结果显示,温度从 18℃ 升到 28℃ 时异黄酮含量可减少 90%。Antonio Leyva 等^[17]对转基因拟南芥的研究表明,低温时 PAL 基因的启动子能够在光合作用细胞中被优先赋予活性。J. Peter Christie 等^[18]报道,将玉米幼苗置于 10℃ 的低温环境中,4CL、CHI 的基因转录水平在前 6h 大幅度增加,PAL、CHS 的基因转录水平在 12h 后急剧增加。另外,有些学者认为,增加昼夜温差也可以促进黄酮的生物合成,这可能与碳的代谢有关。

3. CO₂ 的浓度

初生代谢产物是次生代谢产物合成的能量和原料来源。C. R. Caldwell 等^[16]报道,适当增加 CO₂ 浓度可以减少升温对大豆异黄酮合成的负面影响;Mark Estiarte 等^[19]报道,小麦种植在 550 μ mmol⁻¹ CO₂ 的环境中与种植在 370 μ mmol⁻¹ CO₂ 的环境中相比,异红草素(isoorientin)含量增加了 14%。由于没有 CO₂ 浓度与黄酮合成直接相关的研究证据,推测可能是较高的 CO₂ 浓度有利于初生代谢产物的积累,增加黄酮合成的前体物质,从而有利于黄酮的合成。

4. 矿质营养

氮、磷肥是作物生长所必需的大量元素,有研究表明,适量限制氮、磷肥的施用有利于黄酮类物质的积累。T. Strisse 等^[20]报道,高氮降低苹果叶片中总黄酮含量的机制在于使 PAL 的活性下调,从而影响下游黄酮的合成。A. J. Stewart 等^[21]对不同施肥状态下的番茄进行了检测,结果显示,限制氮肥后,黄酮醇含量在

番茄叶片中显著增加,限制磷肥后黄酮醇含量在果实发育初期显著增加。

有关 Zn²⁺、B³⁺、Cu²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺ 等微量元素对黄酮合成的影响的研究多是以离体培养的植物组织为对象。姜玲等^[2]报道,银杏愈伤组织中黄酮醇糖苷的含量随 Zn、B 浓度的增加而增加,随 Mn 浓度的增加而减少。SHANG Fu-de 等^[23]在红豆杉(*Taxus chinensis*)愈伤组织培养中发现,Cu²⁺ 可以通过增强 PAL 的活性促进黄酮醇苷的合成,适量的 Ca²⁺ 作为 UV-A、UV-B 和蓝光的传导信号,可以诱导 CHS 合成。另外,有关稀土元素的研究表明,Ce³⁺ 和 La³⁺ 均可提高水母雪莲细胞中黄酮含量^[24];适当浓度的 Ce⁴⁺ 可促进悬浮培养的南方红豆杉细胞 PAL 的活性,增加总黄酮含量^[25]。上述研究结果提示,在自然环境条件下,微量元素缺乏有可能影响黄酮的生物合成。

5. 土壤水分

适度干旱能够增加植物中黄酮类物质的含量。孙君明等^[26]对我国 7 个省份的大豆进行异黄酮含量测定,结果显示随着自南向北、自东向西降水量逐渐减少,异黄酮含量逐渐增加。I. Hernandez 等^[25]报道,地中海植物克鲁鱼西氏蔷薇(*Cistus clusii*)在夏季干旱期,叶片中表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate)、表儿茶素(epicatechin)和表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate)的含量增加。而 P. R. Jeyaramraja 等^[28]对茶树的研究表明,土壤干旱不会引起 PAL 活性增加。S. Saher 等^[29]对荷兰石竹(*carnation*)芽组织进行研究,发现超含水组织与正常组织相比,PAL 活性明显下降。目前,关于土壤水分对黄酮类物质影响的报道不尽一致,干旱对 PAL 的影响尚不完全清楚,笔者推测水分的胁迫程度及不同植物之间可能存在较大的差异。

三、结 语

近年来,有关环境对黄酮类成分的影响及分子机制方面的研究有了较大进展,已经明确紫外辐射、高光强、低温、高 CO₂ 浓度、适度干旱以及合理的施肥等因素均可以促进此类成分的合成。其中,光照和温度是

两大影响因素,可以直接影响到合成途径中关键酶的活性,对植株中黄酮的含量有明显的调节作用; CO_2 浓度只是一个间接影响因素,主要是通过影响黄酮类物质前体的数量来影响其合成,并且 CO_2 的同化速率还会受到光照和水分的影响^[5];矿质营养虽然可以影响酶的活性,但在植物的不同部位会表现出不同的影响效果,并且此方面的研究工作多以离体的植物组织为对象,更适合指导黄酮的工业化生产;土壤水分对黄酮类物质生物合成的影响效果和机制还需进一步研究。

目前,环境对黄酮类成分的研究工作多集中在单一环境因素方面,而对于多种环境因素的综合作用,以及合成途径下游黄酮的调控机制方面研究较为薄弱,具体表现在:(1)各种环境因素中,对光照影响机制的研究相对较多,水分及矿质营养等方面的研究较少;有关多种环境因素综合作用方面的研究涉及极少;(2)环境作用机制方面的研究多集中在PAL、CHS两种酶的活性和基因表达,其它下游黄酮合成酶及分子机制的研究较少;(3)合成途径中各个酶之间相互协同或抑制方面的研究较少。另外,我国在黄酮合成分子水平上研究工作开展的较少,与世界先进水平有较大距离。因此,针对上述问题,加强相关的基础性研究应是今后的主要研究方向。

由于黄酮类物质在参与癌症、免疫缺陷以及更年期综合症等疑难疾病的控制中起到重要作用,对黄酮类成分的需求量不断增加,应用植物组织培养、发酵工程以及生态调控技术生产并提高植物中黄酮含量,已成为目前植物学及药学领域中重点研究内容之一。随着分子生物学技术的发展,黄酮生物合成酶的基因克隆和转基因技术日趋成熟,我们可以期待赋予或提高植物合成特定黄酮的功能,并通过基因和环境因子的共同调控达到提高目标产物含量的目的。对于开发新原料、改善药材质量以及增强植物自身的抗逆性等方面都具有重要的意义。

参考文献

- 1 Parr A J, Bolwell G P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agri*, 2000, 80(7): 985 - 1012.
- 2 Brenda Winkel - Shirley. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol*, 2001, 126: 485 - 493.
- 3 Van Tunen A J, Koes R E, Spelt C E, et al. Cloning of the two chalcone flavone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *BMBO J*, 1988, 7(6): 1257 - 1263.
- 4 Kim B G, Kim S Y, Song H S, et al. Cloning and expression of the isolavone synthase (IFS - Tp) from *Trifolium pratense*. *Mol Cell*, 2003, 15(3): 201 - 206.
- 5 Massimiliano Tattini, Carlotta Galardi, Patrizia Pinelli, et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress; *New Phytol*, 2004, 163(3): 547 - 561.
- 6 王华田, 谢宝东, 姜岳忠, 等. 光照强度对银杏叶片发育及黄酮和内酯含量的影响. *江西农业大学学报*, 2002, 24(5): 618 - 622.
- 7 Agati G, Galardi C, Gravano E, et al. Flavonoid distribution in tissues of *Phillyrea latifolia* L. leaves as estimated by microspectrofluorometry and multispectral fluorescence microimaging. *Photochem Photobiol*, 2002, 76(3): 350 - 360.
- 8 Gao W, Zheng Y, Slusser J R, et al. Effects of supplementary ultraviolet - B irradiance on maize yield and qualities; a field experiment. *Photochem Photobiol*, 2004, 80: 127 - 131.
- 9 Natividad Chaves, J Carlos Escudero, Carlos Gutierrez - Merino. Role of Ecological Variables in the Seasonal Variation of Flavonoid Content of *Cistus ladanifer* Exudate. *Annu Rev Phytopathol*, 1998, 36: 311 - 327.
- 10 李卫东, 梁慧珍, 卢为国, 等. 大豆籽粒异黄酮含量与生态因子相关关系的研究. *中国农业科学*, 2004, 37(10): 1458 - 1463.
- 11 曾明, 张汉明, 郑水庆, 等. 野葛中活性成分的动态研究. *第二军医大学学报*, 1997, 18(2): 150 - 152.
- 12 汪海峰, 鞠兴荣, 何广斌, 等. 不同海拔高度和生长季节对银杏叶中黄酮苷含量的影响. *林产化学与工业*, 2002, 22(4): 47 - 50.
- 13 Rhonda L Feinbaum, Gisela Storz, Frederick M Ausubel. High intensity and blue light regulated expression of chimeric chalcone synthase genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants; *Mol Gen Genet*, 1991, 226(3): 449 - 456.
- 14 Fritz Kreuzaler, Hermann Ragg, Erich Fautz, et al. UV - induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(9): 2591 - 2593.
- 15 Suneetha Alokam, Yujing Li, Wenze Li, et al. Photoregulation of phenylalanine ammonia - lyase (PAL) and chalcone synthase (CHS) in the accumulation of anthocyanin in alpine and prairie ecotypes of

- Stellaria longipes* under varied R/FR. *Physiol Plant*, 2002, 116 (4): 531.
- 16 Caldwell CR, Britz SJ, Mirecki RM. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(4): 1125 - 1129.
 - 17 Antonio Leyva, José Antonio Jarillo, Julio Salinas, et al. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol*, 1995, 108: 39 - 46.
 - 18 Peter J Christie, Mark R Alfenito, Virginia Walbot, et al. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 1994, 194(4): 541 - 549.
 - 19 Marc Estiarte, Josep Penuelas, Bruce A Kimball, et al. Free-air CO₂ enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. *Physiol Plant*, 1999, 105(3): 423.
 - 20 Strissel T, Halbwirth H, Hoyer U, et al. Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavonoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. *Plant Biol (Stuttg)*, 2005, 7(6): 677 - 685.
 - 21 Stewart AJ, Chapman W, Jenkins GI, et al. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ*, 2001, 24(11): 1189.
 - 22 姜玲, 章文才, 魏泽兰. 微量元素对银杏愈伤组织细胞生长和黄酮醇糖苷含量的影响. *湖北农业科学*, 1999, (5): 45 - 47.
 - 23 SHANG Fu-de, Ma Yun-feng. The effect of different concentrations of La³⁺ and Cu²⁺ on flavonoid production in solid and liquid culture of *Ginkgo biloba*. *Acta Bot Boreal - Occident Sin*, 2003, 23(9): 1577 - 1580.
 - 24 袁晓凡, 王谦, 赵兵, 等. 稀土元素对水母雪莲细胞生长及黄酮类化合物合成的影响. *过程工程学报*, 2004, 4(4): 325 - 329.
 - 25 葛志强, 李景川, 元英进, 等. Ce⁴⁺对悬浮培养南方红豆杉细胞DNA含量和PAL活性的影响. *稀土*, 2000, 21(5): 35 - 37.
 - 26 孙明君, 丁安林. 地理环境对大豆种子中异黄酮积累的影响趋势. *大豆科学*, 1997, 16(4): 298 - 303.
 - 27 Hernandez I, Alegre L, Munne-Bosch S. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiol*, 2004, 24(11): 1303 - 1311.
 - 28 Jeyaramraja P R, Pius P K, Raj Kumar R, et al. Soil moisture stress-induced alterations in bioconstituents determining tea quality. *J Sci Food Agri*, 2003, 83(12): 1187 - 1191.
 - 29 Saher S, Piqueras A, Hellin E, et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiol Plant*, 2004, 120(1): 152 - 161.

The Influences of Environmental Factors on Flavonoid Biosynthesis

Xu WanYen Gao Weiwei He Chunnian

(Institute of Medicinal Plant Development,

Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094)

Flavonoids are an important kind of secondary metabolites of the plant. They exert beneficial effects on plants' growth and human health. Their biosynthesis is under the control of a series of enzymes, such as phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase, chalcone isomerase, dihydroflavonol 4-reductase, isoflavone synthase. The activities and gene expression levels of these enzymes are affected by light, temperature, water and mineral, etc. This paper summarizes flavonoid biosynthesis, the key enzymes, the influences of environmental factors and the corresponding mechanism, and also puts forward some suggestions for future research aiming at existing problems, with the purpose of offering reference to control the flavonoid biosynthesis and the exploitation.

Keywords: flavonoids, biosynthesis, environment, light, temperature, mineral, water

(责任编辑:张述庆, 责任编审:林耕, 责任译审:邹春申)