



不同发育阶段对黄芩生长及活性成分积累的影响

胡国强^{1,2}, 袁媛^{1*}, 伍翀¹, 蒋超¹, 汪周勇¹, 林淑芳¹, 吴志刚¹

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:分析黄芩生长发育及其活性成分积累的关键物候期。方法:将从山东莱芜收集的黄芩种子分别在北京房山和山东莱芜进行播种,选择萌芽期、展叶期、花果中期、花果末期、枯黄期收集黄芩的地上部和地下部,测定其主根长度、根鲜重、根径、茎长度。利用 HPLC 测定根中黄芩苷、黄芩素的含量;利用紫外分光光度法测定总黄酮含量。利用 RT-PCR 方法分析根组织中苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL1, PAL2, PAL3)、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate-4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL)、查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、葡萄糖苷酸酶(glucuronidase, GUS)和黄芩素 7-O-葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronate: baicalein 7-O-glucuronosyltransferase, UBGAT)的转录水平。结果:从幼苗期至展叶期,黄芩地上部生长较快,而根部的生长主要集中在花果中期至枯黄期。黄芩整个生长发育阶段总黄酮含量的变化不显著,黄芩苷含量逐渐上升,黄芩素含量逐渐下降。黄芩苷生物合成的关键酶基因 PAL, 4CL 在枯黄期表达水平最高;CHS 转录水平则在花果中期-花果后期呈现显著上升的趋势,而后在枯黄期下降。结论:结合黄芩活性成分及关键酶基因的表达分析,展叶期和枯黄期可能是影响黄芩生长发育和活性成分含量的主要物候期。

[关键词] 物候期;活性成分;基因表达

黄芩是一种常用中药材,其主要活性成分为黄酮类化合物,包括黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等^[1]。植物的生长发育过程与其所处的环境、季节等因素密切相关,通过对 19 个产地野生黄芩黄酮类化合物含量与其所在地区气候因子的相关性进行分析,发现温度和水分是影响黄芩活性成分积累的关键因素^[2]。因此不同产地栽培黄芩的最佳采收期可能会存在一定差异。

目前普遍认为影响药材化学质量的因素是十分复杂的。除环境因素外,遗传也是造成不同产地药材活性成分含量差异的主要因素^[3]。因此本文选择同一地点采集的种子,分别种植在 2 个不同产地,拟利用具有相似遗传特征的黄芩材料,分析不同发育阶段对黄芩生长状况、活性成分含量及基因表达水平的影响,为进一步开展黄芩规范化种植提供理论依据。

1 材料

黄芩种子收集于山东莱芜市岳圣天然药物研究开发中心基地,分别于 2010 年 4 月 15 日播种于北京房山,2010 年 4 月 2 日播种于山东莱芜。选择萌芽期(B)(北京,6 月 5 日;山东,5 月 15 日)、展叶期

(E)(北京,7 月 14 日;山东,7 月 9 日)、花果中期(F)(北京,7 月 14 日;山东,7 月 9 日)、花果末期(S)(北京,11 月 5 日;山东,10 月 17 日)、枯黄期(W)(北京,11 月 26 日;山东,11 月 24 日)分别收集黄芩的地上部和地下部。其中萌芽期为 8~10 对叶时期;展叶期为 10 对以上叶、且未开花的时期;花果中期为开花且结果的时期;花果末期为花期结束且结果末期的时期;枯黄期为种子成熟期结束且地上部枯黄的时期。采样方法为“五点法”采样,即在种植地块选择 5 个区域进行取样,每个区域取完整植株 1 株。重复种植 3 个地块,共取样 15 株。分别测定每个植株的主根长度、根鲜重、根径、茎长度。两地的环境情况见表 1,土壤含水量通过计算土壤烘干后质量差值的百分比而得。以取样地当日温度与湿度为准,地理位置通过 GPS 定位测定。

多功能酶标仪(Varioskan flash)、酶标仪专用测量板(有机系)、水浴锅。Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Millennium 32 工作站。Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。对照品黄芩苷(0867-200205, 纯度≥98%)、黄芩素(110766-200416, 纯度≥98%)均购自中国食品药品检定研究院,色谱纯甲醇、乙腈,分析纯甲酸,高纯水(实验室自制)。Trizol 购自 Invitrogen 公司, cDNA 合成试剂盒购自 TaKaRa 公司。

[稿件编号] 20120413003

[基金项目] 北京市科技新星项目(2008B82);中国博士后科学基金项目

[通信作者] *袁媛,副研究员, E-mail: yuyuan0732@gmail.com



表 1 种植地基本环境情况

Table 1 Environment factors in planting regions

地点	发育阶段	土壤含水量/%	温度/℃	湿度/%	海拔/m	经度	纬度
山东莱芜	萌芽期	3.52	20.0	40	292.3	117°47'08.8"	36°19'11.5"
	展叶期	8.04	25.8	62			
	花果中期	8.04	25.8	62			
	花果末期	9.11	15.1	79			
	枯黄期	12.45	10.9	32			
北京房山	萌芽期	11.27	27.3	36	49.9	116°03'19.9"	39°41'27.4"
	展叶期	10.22	24.6	83			
	花果中期	10.22	24.6	83			
	花果末期	5.15	14.1	51			
	枯黄期	11.42	8.3	21			

注:展叶期和花果中期同时取样,发育阶段依据黄芩生长的形态特征而定。

2 方法

2.1 黄芩苷、黄芩素、总黄酮含量的测定 干燥根组织粉碎后,过 80 目,精密定量称取 100 mg,加入分析纯 70% 的甲醇 10 mL,超声提取 30 min,取出后称定重量并补足失重。用 0.45 μm 滤膜过滤后检测溶液。采用 HPLC 法测定样品中黄芩苷、黄芩素含量。Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相为乙腈-水-甲酸 (23: 77: 1.0) A; 乙腈-水-甲酸 (80: 20: 1.0) (B) 梯度洗脱,梯度洗脱程序为: 0 ~ 15 min, 100% A; 15 ~ 25 min, 100% ~ 87% A; 25 ~ 40 min, 87% ~ 52% A; 40 ~ 60 min, 52% ~ 0% A。检测波长 280 nm; 分析时间 60 min; 柱温 30 ℃。采用紫外分光光度法测定总黄酮含量,精密量取样品溶液 0.50 mL,置于 10 mL 量瓶中,加入 70% 甲醇至 5 mL。加 5% 亚硝酸钠溶液 0.50 mL,摇匀,放置 6 min; 再加入 10% 硝酸铝溶液 0.50 mL,摇匀,放置 6 min; 加入 5% 氢氧化钠溶液 2.50 mL,加水至刻度,摇匀,放置 15 min。以不加样品的对照品溶液作为空白。取 250 μL 的反应溶液于酶标测量板中,使用多功能酶标仪的紫外分光光度计在 280 nm 波长处扫描。

2.2 引物设计 利用 RT-PCR 方法分析根组织中苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL1, PAL2, PAL3)、肉桂酸-4-羟基化酶 (cinnamate-4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL)、查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS)、葡萄糖苷酸酶 (glucuronidase, GUS) 和黄芩素 7-O-葡萄糖醛酸基转移酶 (UDP-glucuronate: baicalein 7-O-glucuronosyltransferase, UBGAT)

的转录水平。根据 GenBank 数据库中的基因序列设计引物,引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成,序列见表 2。

表 2 基因序列引物

Table 2 Primers in the experiment

引物	序列 (5'-3')	GenBank 序列号
SbPAL1-F	GCGAATAGTGTTCATGATGAGGAT	HM062775
SbPAL1-R	CAATGGCTGCCTTTCCAGTT	
SbPAL2-F	GATTCTGCGTCCAACCTCAGTGA	HM062776
SbPAL21-R	GCGTCGGCATTATCCCTG	
SbPAL3-F	GGCCACCAAGATGATCGA	HM062777
SbPAL3-R	CAATGGCCAATCTTGCATTG	
SbC4H-F	GCCGATTCCTGTATCACTATC	HM062778
SbC4H-R	ATGATTAATAATGATCTTGGCTTT	
Sb4CL-F	ATAATCAAATACAAAGGGTTCCA	AB166767
Sb4CL-R	ACCTGTTTGGATATAAAATTGCTT	
SbCHS-F	GCAGTCCACTTATGCTGATTAC	AB008748
SbCHS-R	GTGAAGTTGTCTTCTCCTTC	
SbUBGAT-F	AGCCAAGGAAGCCATAGTCAAC	EF512580
SbUBGAT-R	CCGAAACAAAGGAAGACGACA	
SbGUS-F	AGAGCAGTGTGAAGATAAGC	AB040072
SbGUS-R	CATAGTAGGTCCAGGCAAG	
Sb18S-F	CGTTGACTACGTCCCTGCCCTT	FJ527609
Sb18S-R	GTTCACCTACGGAAACCTTGTACGAC	

2.3 总 RNA 提取与 cDNA 合成 用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取山东产地黄芩根组织总 RNA,利用紫外分光光度仪测定总 RNA 的 A_{260 nm}, A_{280 nm}。选择 A_{260 nm}/A_{280 nm} 为 1.8 ~ 2.0 的总 RNA 进行反转录,反转录反应按 cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa 公司)说明书进行。

2.4 半定量 RT-PCR 取上述反转录产物 1 μL,分

别加入表1中各基因正向引物 $0.5 \mu\text{L}$ ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 反向引物 $0.5 \mu\text{L}$ ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), dNTP $1 \mu\text{L}$, $10 \times \text{Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, Ex *Taq* 酶 $0.5 \mu\text{L}$, 灭菌 H_2O $19 \mu\text{L}$ 。反应条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s , 30 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 充分延伸 10 min 。采用上述体系扩增相关基因的表达情况, 以 18S rRNA 基因片段为内标, 在目标 PCR 产物长度位置出现条带为相关酶基因有表达。以凝胶成像仪上扫描的各目标基因与 18S rRNA 的光

吸收比值差异来表示目标基因在样本中的表达量。

3 结果与分析

3.1 生长发育变化分析 从萌芽期至展叶期, 黄芩地上部生长较快。在山东和北京 2 个产地, 展叶期黄芩茎长度分别是萌芽期的 3.8, 6.8 倍。而根部的生长主要集中在花果中期至枯黄期。在山东, 北京 2 个产地, 花果末期黄芩根鲜重分别是花果中期的 22.9, 13.9 倍; 主根直径分别是 2.9, 2.6 倍; 主根长度分别是 1.7, 1.8 倍(图 1)。

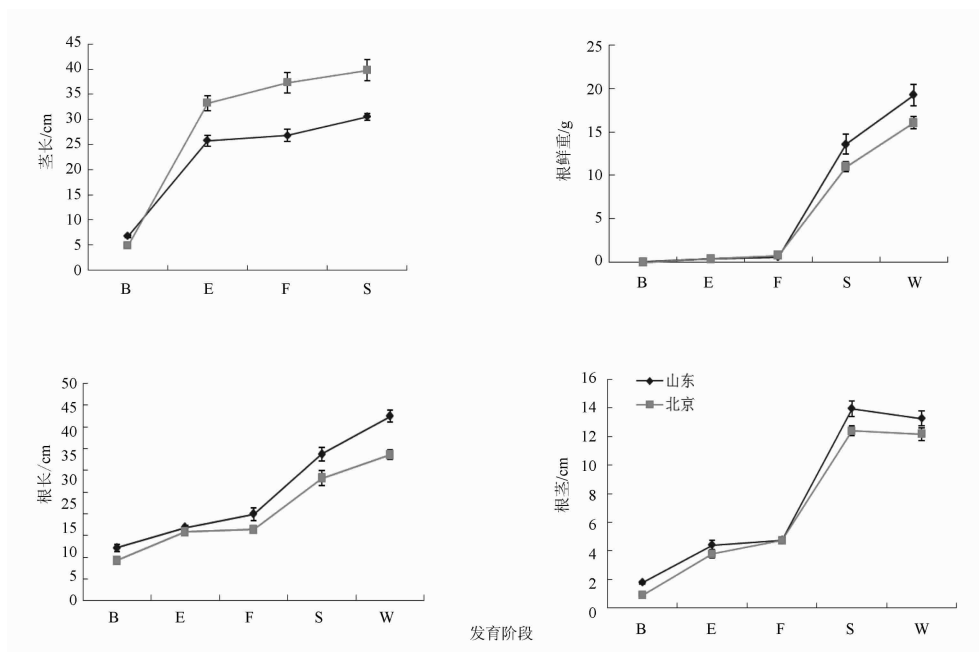


图1 黄芩生长发育变化

Fig. 1 Growth of *Scutellaria baicalensis*

3.2 黄芩活性成分含量变化 黄芩整个生长发育阶段总黄酮含量的变化不明显, 黄芩苷含量逐渐上升, 黄芩素含量逐渐下降。在山东和北京 2 个产地, 枯黄期黄芩根中黄芩苷的含量分别是萌芽期的 1.3, 1.4 倍, 且北京展叶期黄芩苷的含量显著高于萌芽期和花果中期。在花果中期后, 2 个产地黄芩素含量均显著下降, 在山东和北京 2 个产地, 花果末期黄芩根中黄芩素的含量分别是花果中期的 0.5, 0.4 倍。山东地区总黄酮的含量在花果末期显著低于其他各时期, 而北京地区在萌芽期后总黄酮含量逐渐上升(图 2)。

3.3 基因表达分析 与展叶期相比, PAL1 在花果中期呈现下降的趋势; PAL1, PAL2 和 PAL3 的转录

水平在花果中期-枯黄期呈现逐渐上升的趋势。4CL 转录水平在花果后期-枯黄期呈现逐渐上升的趋势, CHS 转录水平则在花果中期-花果后期呈现显著上升的趋势, 而 C4H 无显著变化。UBGAT 在花果中期-枯黄期呈现显著上升的趋势(图 3)。

4 讨论

4.1 发育阶段对黄芩生长的影响 北京和山东均为黄芩栽培的主要产区, 本文研究结果表明, 这 2 个产地一年生黄芩的生长发育状况的变化趋势基本相同。从萌芽期至展叶期, 黄芩地上部生长较快; 花果中期后开始进入根的快速生长期。另一方面, 北京和山东 2 个产地栽培黄芩的生长状况也存在一定的差异。主要表现在花果中期后, 北京产地黄芩茎长

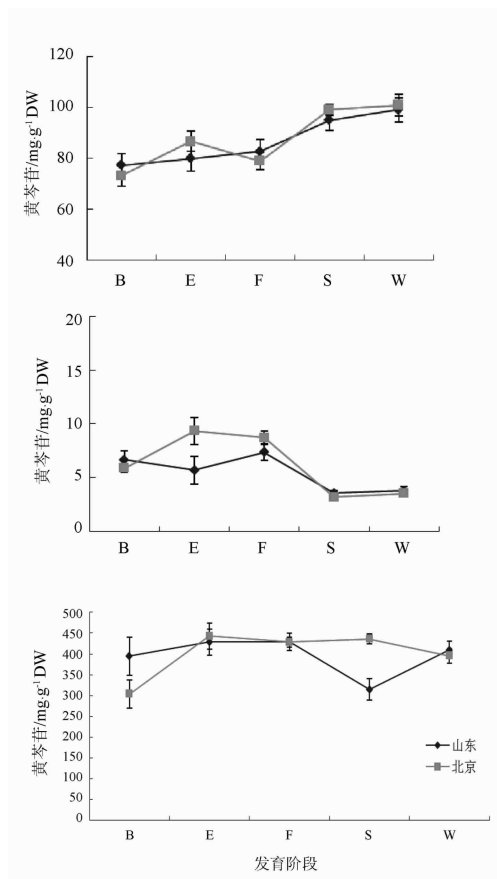


图 2 黄芩苷、黄芩素、总黄酮含量变化
Fig. 2 The content of active compounds and total flavonoids

度显著高于山东产地,而主根长度显著低于山东产地。气候变化对植物的生长发育会造成一定的影响^[4]。影响根冠比的环境因素主要有水分、矿质营养、光照和温度^[5]。高温不利于植物叶片的光合作用,影响地上部分的生长。在花果中期、花果末期和枯黄期,山东产地温度均高于北京,暗示温度可能是影响产地间黄芩药材生物量差异的主要因素。

4.2 发育阶段对黄芩活性成分积累的影响 北京和山东 2 个产地黄芩苷含量均随着植物生长发育逐渐上升、黄芩素含量则逐渐下降。北京地区在萌芽期后总黄酮含量逐渐上升,并一直处于平稳水平。山东地区黄芩总黄酮的含量在花果末期降低,但在枯黄期总黄酮的含量又回升。任玉珍等采用 HPLC 分析不同时期采收的桑叶药材中芦丁及绿原酸的含量,其结果显示 10 月下旬初霜后的桑叶中芦丁及绿原酸含量相对较高^[6]。方阵等^[7] 研究表明,产自山东地区的黄芩根中黄芩苷的含量在 10 月份最高,李化等^[8] 研究表明北京地区黄芩根中黄

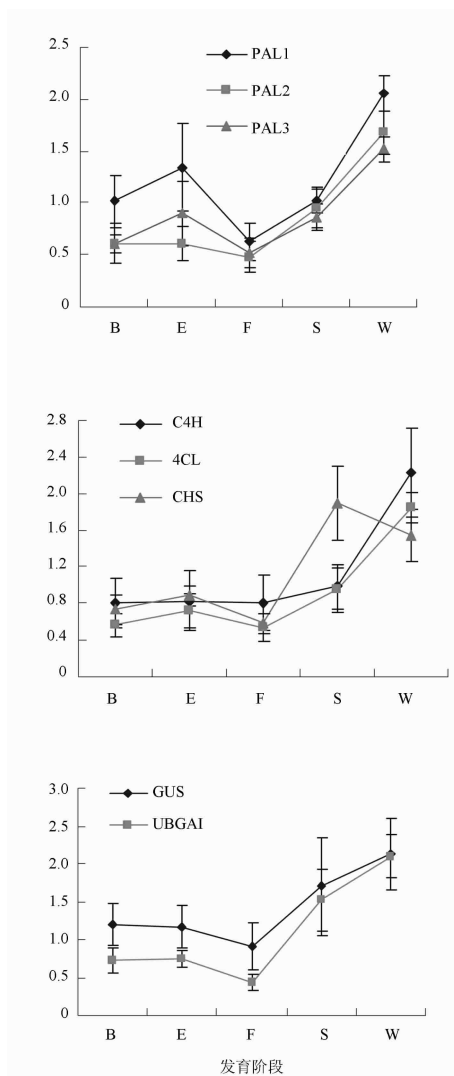


图 3 黄芩苷生物合成途径关键酶基因转录水平变化
Fig. 3 The transcription level of key enzyme gene of baicalin biosynthesis

芩素的含量在展叶期达到最高值。本研究结果显示在黄芩生长的展叶期和枯黄期,其活性成分含量会产生较大的变化,这 2 个时期可能是黄芩活性成分积累的关键节点,这与以前的报道是一致的^[2]。在黄芩的花果末期和枯黄期,黄芩素含量显著降低,由于黄芩素在植物体内作为抗氧化剂参与清除活性氧^[9],而在这 2 个时期,温度也急剧降低,黄芩植物的生长开始衰落。在低温下,黄芩体内抗氧化酶 SOD, POD 等的活性要明显高于适温下的活性,表明黄芩植株有一定的抗低温能力,并且可能是通过次生代谢产物来起作用的^[10]。因此推测在植物的衰老期,黄芩素可能参与了黄芩体内清除活性氧的过程。



在花果末期山东地区黄芩总黄酮的含量显著低于其他各时期,且低于北京地区同一时期总黄酮的含量,而且在展叶期北京产地黄芩中黄芩素的含量显著高于山东产地。对比两地之间的环境因子可以发现,在展叶期和花果末期,山东产地的温度均高于北京。而受控试验条件下,高温可以抑制黄芩活性成分的积累^[11],因此推测温度也可能是影响黄芩药材活性成分差异的主要因素。

4.3 发育阶段对黄酮生物合成途径关键酶基因转录水平的影响 *PAL, CHS, 4CL* 是黄酮生物合成途径中的关键酶基因^[12-13]。本文研究结果表明,随着黄芩的生长, *SbPAL, Sb4CL, SbUBGAT* 的转录水平逐渐增加,且黄芩苷含量也逐渐增加,暗示黄芩苷含量的积累可能与黄酮生物合成途径上游关键酶基因的转录水平有密切联系。Wanner 等^[14]报道了拟南芥 *PAL* 基因家族在植物生长发育和对不良环境的响应中发挥不同的作用。Leyva 等^[15]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。Lindermayr 等^[16]研究发现 *4CL* 基因家族既参与植物的生长和发育,也对外界环境因子产生响应。Christie 等^[17]将玉米幼苗置于 10℃ 的低温环境中, *PAL, 4CL* 的基因转录水平有大幅度增加。在不同温度处理下黄芩根部黄酮类物质含量与 *CHS* 具有显著性负相关,即 *CHS* 在黄芩植株中大量积累的时候,黄酮类物质含量相对较低^[10]。而山东地区栽培黄芩在花果中期后其根中 *CHS* 表达量显著增高,推测可能与其气候变化有关,从而抑制了该阶段山东地区栽培黄芩中总黄酮的积累。

本文通过分析北京、山东产地的黄芩在不同生长发育阶段的生长状况、活性成分及其基因表达水平,对比不同发育阶段、不同地区之间环境因子的变化,推测温度可能是影响黄芩生长的主要因素之一,而展叶期和枯黄期是黄芩生长发育和活性成分积累的关键物候期,但其影响的程度和作用机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 徐国钧,何宏贤,徐璐珊. 中国药材学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:398.
[2] Yuan Y, Hao J D, Yang B, et al. Climate change affected the best producing area of Chinese herbal medicine *Scutellaria ba-*

icalensis Georgi [J]. J Trad Med,2010, 3s:241.
[3] Yuan Qing jun, Zhang Zhi yong, Hu Juan, et al. Impacts of recent cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) [J]. BMC Genetics, 2010, 11:29.
[4] Linares J C, Tiscar P A. Climate change impacts and vulnerability of the southern populations of *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* [J]. Tree Physiol,2010,30(7):795.
[5] 赵成刚. 根冠比与烟草品质的关系[J]. 科技资讯,2006,18:133.
[6] 任玉珍,王龙虎,梁焕,等. 不同采收期桑叶药材的质量比较[J]. 中国现代药,2006,8(5):8.
[7] 方阵,杨金兵,王康才. 黄芩生长特性与有效成分积累[J]. 中药材,2002,25(2):84.
[8] 李化,黄璐琦,杨滨,等. 黄芩不同生长发育期有效成分的变化规律[J]. 中草药,2008(4):604.
[9] 帅凌飞,袁媛,陈平等. 黄芩体内 H₂O₂ 清除系统和黄酮类活性成分积累的相关性研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(13):1707.
[10] 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.
[11] Yuan Y, Liu Y J, Luo Y J, et al. High temperature affects flavonones accumulation and antioxidant system in *Scutellaria baicalensis* Georgi cells [J]. Afr J Biotechnol, 2011, 10(26):5182.
[12] 李莉,赵越,马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: *PAL, C4H, 4CL* 研究新进展[J]. 生物信息学,2007(4):187.
[13] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, et al. Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes regulates flower pigmentation in gentian plants[J]. Plant Sci,2005,168:1309.
[14] Wanner L A, Li G, Ware D, et al. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 1995,27(2):327.
[15] Leyva A, Jarillo J A, Salinas J. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner [J]. Plant Physiol, 1995,108(1):39.
[16] Lindermayr C, Mollers B, Fliegmann J, et al. Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate: coenzyme A ligase gene family-primary structures, catalytic properties, and differential expression [J]. Eur J Biochem, 2002,269:1304.
[17] Peter J Christie, Mark R Alfenito, Virginia Walbot. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings [J]. Planta, 1994,194(4):541.

Effect of different developmental stage on plant growth and active compounds in *Scutellaria baicalensis*

HU Guo-qiang^{1,2}, YUAN Yuan^{1*}, WU Chong¹, JIANG Chao¹, WANG Zhou-yong¹, LIN Shu-fang¹, WU Zhi-gang¹
(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the developmental phase on the growth and active compounds in *Scutellaria baicalensis*. **Method:** Seeds of wild plants were collected from Laiwu and sowed in Fangshan (Beijing) and Laiwu (Shandong). Samples of aerial and underground parts were collected in five growth periods of sprouts, seedlings, flowering, seed drop and withered periods respectively. The length of taproot, fresh weight of root, diameter of taproot and the length of stem were determined. The content of active compounds and total flavonoids were determined by HPLC and ultraviolet spectrophotometry respectively. The transcribed level of PAL1, PAL2, PAL3, C4H, 4CL, CHS, GUS and UBGAT were analyzed with RT-PCR. **Result:** The results showed that the aerial part of *S. baicalensis* grew quickly before flowering stage, and the underground part grew mostly between the periods of flowering and withered. In the whole growing developmental periods, the content of total flavonoids was not changed significantly, the content of baicalin was increased gradually and the content of baicalein was decreased gradually. Expression level of PAL and 4CL was the highest in withered period, CHS was increased between flowering and seed drop and decreased in withered period. **Conclusion:** Seedlings and withered periods may be the key phase affecting the growth and active compounds in *S. baicalensis*.

[**Key words**] phenological phase; active compounds; growing development

doi:10.4268/cjmm20122423

[责任编辑 吕冬梅]