

二氢槲皮素的研究进展

董潞娜, 曹浩, 张欣宇, 王海胜*

中国农业科学院研究生院, 北京 100081

摘要: 二氢槲皮素是自然界中一种重要的黄酮类化合物, 主要存在于高寒带落叶松的根部。由于其具有较好的抗氧化、抗肿瘤等生物学活性而被广泛应用于食品领域、工业领域和医药领域。然而, 目前二氢槲皮素的工业化生产仍然依赖于传统的植物提取, 原料稀缺、提取难度大、产率较低, 阻碍了其工业化应用的推进。基于此, 主要综述了二氢槲皮素的化学结构及性质、生物合成的分子机制、生物学活性以及生产工艺的研究进展, 并对未来二氢槲皮素的相关研究趋势进行了展望, 以期对日后二氢槲皮素的生物合成研究提供理论参考。

关键词: 二氢槲皮素; 生物学活性; 生产工艺

DOI:10.19586/j.2095-2341.2020.0008

Research Progress on Dihydroquercetin

DONG Luna, CAO Hao, ZHANG Xinyu, WANG Haisheng*

Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Dihydroquercetin is an important flavonoid compound in nature, which mainly exists in the root of *Larix gmelinii* in alpine zone. It has been widely used in food, industry and medicine fields due to its good biological activities such as anti-oxidation and anti-tumor. However, at present, the industrial production of dihydroquercetin still depends on traditional plant extraction, which is scarce in raw materials, difficult to extract and low in yield, thus hindering the advancement of its industrial application. Based on this, the research progress of chemical structure and properties, molecular mechanism of biosynthesis, biological activity and production technology of dihydroquercetin were mainly reviewed, and the related research trends in dihydroquercetin in the future were prospected, so as to provide theoretical references for the biosynthesis research on dihydroquercetin in the future.

Key words: dihydroquercetin; biological activity; production process

二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ), 别名花旗松素(taxifolin)。它存在于多种植物中, 在落叶松中含量较高, 特别是花旗松^[1]。二氢槲皮素最早由日本学者 Fukui 从针叶植物 *Chamaecyparis obtusa* 叶中提取分离, 近年来, 在很多水果中也发现了二氢槲皮素的存在, 如葡萄、橘子和西柚等^[2]。二氢槲皮素结构的特殊性, 决定了其具有较强的抗氧化特性^[3-6]、调节酶活等^[7-8]多种生物学活性。因此, 二氢槲皮素在食品、药品、化妆品等领域均有广泛的应用, 市场需求量巨大。但是, 目前二氢槲皮素的工业化生产仍然依赖于传统的植物提取, 原料稀缺、提取难度大、产率较低等缺点

阻碍了其工业化应用的推进。本文主要综述了二氢槲皮素的基本性质和生物合成途径、生物学活性和生产工艺, 并对二氢槲皮素以后的研究方向进行了展望, 以期对二氢槲皮素的生物合成研究提供理论参考。

1 二氢槲皮素的化学结构与性质

二氢槲皮素是自然界中存在的一种重要的二氢黄酮醇类化合物, 属于 P 族维生素^[9]。它在植物中以苷元或苷 2 种形式存在, 分子式为 $C_{15}H_{12}O_7$ (图 1), 相对分子质量为 304.25, 其分子

收稿日期:2020-01-15; 接受日期:2020-03-23

基金项目:中国农业科学院基本科研业务基金项目(1610042018005)。

联系方式:董潞娜 E-mail:1581986901@qq.com; * 通信作者 王海胜 E-mail:wanghaisheng@caas.net.cn

结构中有 2 个手性碳 (C_2^* 和 C_3^*)。DHQ 在理论上存在 4 个对映异构体,绝对构型和 CA 登记号分别为 I (C_2S, C_3S) [11003-33-9]、II (C_2S, C_3R) [153666-25-2]、III (C_2R, C_3S) [114761-89-6]、IV (C_2R, C_3R) [480-18-2]。DHQ 呈淡黄色或无色针状的结晶,没有任何气味,熔点为 240 °C,易溶于乙醇、乙酸、沸水等溶剂,稍溶于冷水,几乎不溶于苯。

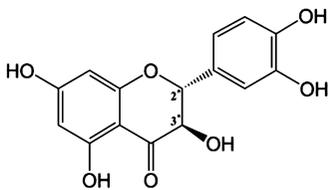


图 1 二氢槲皮素分子式
Fig.1 Molecular formula of dihydroquercetin

2 二氢槲皮素的生物合成途径及关键基因

2.1 二氢槲皮素的生物合成途径

目前,二氢槲皮素的生物合成过程已基本探

明,涉及到苯丙烷和类黄酮两个阶段(图 2)。在苯丙烷途径中,在苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)的催化下,来源于莽草酸途径的苯丙氨酸脱去 1 个氨基生成肉桂酸;接着肉桂酸经过肉桂酸羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)的催化作用获得 1 个羟基,生成对香豆酸;在 4-香豆酰辅酶 A 连接酶(coumaryl 4-ligase, 4CL)的催化下,对香豆酸发生硫酸酯化反应,生成对香豆酰辅酶 A。1 分子的对香豆酰辅酶 A 和 3 分子的丙二酰辅酶 A 在查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)的催化下进行缩合,生成柚皮素查尔酮,它是类黄酮物质合成的起点。然后柚皮素查尔酮在查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)的催化下生成柚皮素。类黄酮途径中,柚皮素在黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)的催化下生成二氢黄酮醇类物质。二氢槲皮素可由二氢黄酮醇经类黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3'-hydroxylase, F3'H)催化生成^[10-14]。同时,该过程也可先经 F3'H 催化,再经 F3H 催化。在类黄酮途径中涉及到 2 个基因 *F3H* 和 *F3'H*,它们是二氢槲皮素生物合成途径中的关键基因。

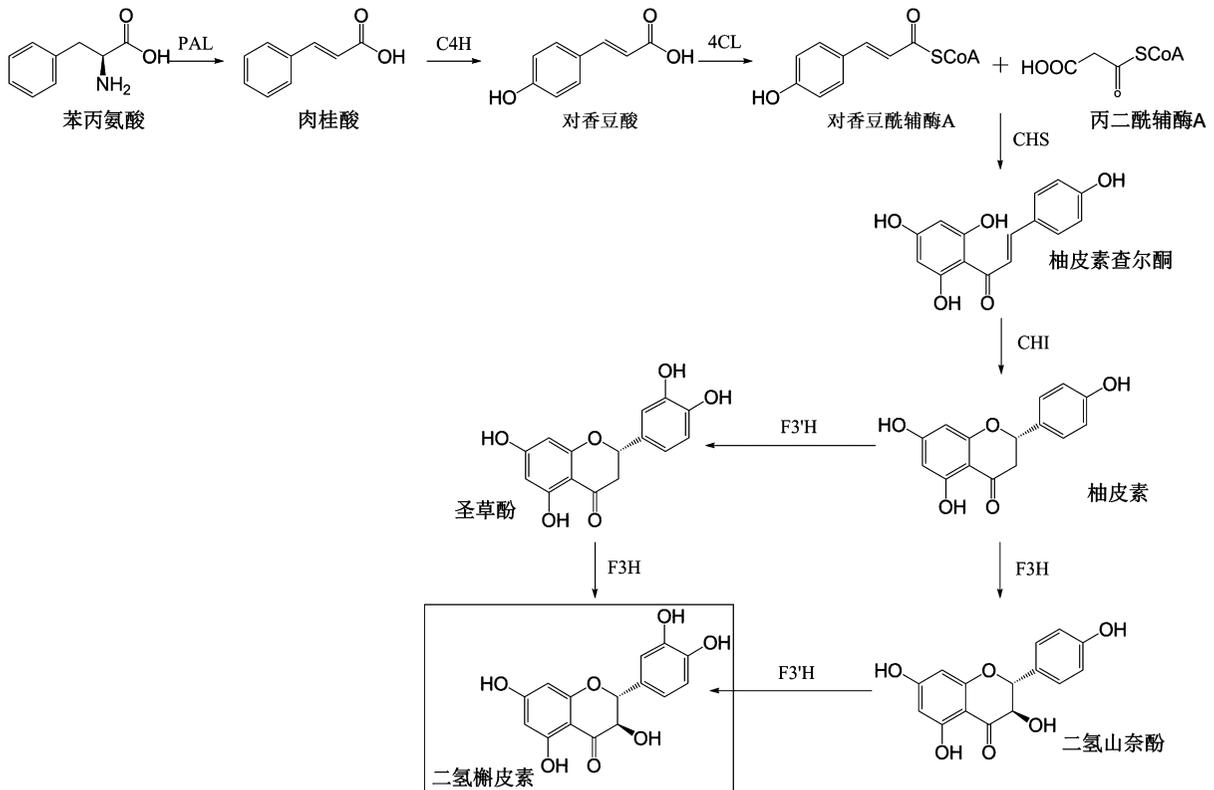


图 2 二氢槲皮素的生物合成途径

Fig.2 Biosynthesis of dihydroquercetin

2.2 F3H 基因

F3H 基因的 cDNA 最早于 1991 年从金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 中分离克隆得到^[15]。到目前为止,其已在多种植物中被克隆,如枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、茶树 (*Camellia sinensis*) 等^[16-19]。*F3H* 基因以单拷贝形式存在^[20],在进化上十分保守^[21-22]。*F3H* 的作用底物是柚皮素和圣草酚,它调控着黄酮类物质与花青素苷的合成,是黄酮类化合物代谢途径中的关键酶之一^[23]。经过对来自矮牵牛的 *F3H* 研究表明,*F3H* 是一种单体蛋白,分子量约为 42 kD,该蛋白中 Ser290、His220、Arg222 和 His278 等氨基酸残基能够较为明显地对酶活性产生影响^[24]。它主要催化柚皮素 C3 位的羟基化,生成二氢山奈酚 (dihydrokaempferol, DHK),催化过程需要 2-酮戊二酸、分子氧、铁和抗坏血酸的参与。此外,研究表明,在不同植物或组织中,*F3H* 具有底物特异性^[25]。

2.3 F3'H 基因

F3'H 基因最早由 Brugliera 等从矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中分离得到,经鉴定属于细胞色素 P450 亚家族^[26-27]。此后,相继在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、矢车菊 (*Centaurea cyanus*)、金鱼草 (*Antirrhinum majus*)、紫茎泽兰 (*Eupatorium adenophorum*)、大豆 (*Glycine max*)、玉米 (*Zea mays*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、苹果 (*Malus domestica*) 等多种植物中克隆得到了 *F3'H* 基因^[13,28-31]。不同植物 *F3'H* 基因的 cDNA 系列的相似性为 69.5%^[32]。*F3'H* 可以催化底物为柚皮素 (naringenin) 和 DHK 的 3' 位置发生羟基化反应,分别生成花青素和原花青素生物合成所需的重要中间产物圣草酚 (eriodictyol) 和 DHQ^[33]。而花青素和原花青素可以保护植物细胞免受紫外线照射造成的伤害^[34]。将多种植物 *F3'H* 蛋白的氨基酸序列比对之后发现,*F3'H* 存在于多种植物中高度保守的细胞色素 P450 结构域“LPPGP”,它可以使 *F3'H* 稳定锚定在微粒体膜上^[35]。

3 二氢槲皮素的生物学活性

3.1 二氢槲皮素对肝脏细胞的影响

肝脏是人体内的重要器官,它以代谢功能为主,并在身体内起着去氧化、储存肝糖原以及合成

分泌性蛋白质等作用。肝脏健康对于维持人体健康至关重要。国内外大量的研究表明,DHQ 对肝脏具有较好的保护作用,对肝脏疾病的治疗有着巨大的潜力^[36-40],其作用机制包括:①激活或抑制相关酶的活性;②调节相关转录因子的表达;③诱导细胞自噬等。

DHQ 可以通过调节酶活和减少活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的积累来改善机体氧化和血糖过高的现象。研究发现,DHQ 以剂量依赖型的方式抑制对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导肝细胞坏死,并抑制乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的释放,从而调节细胞外信号末端激酶 (extracellular signal-terminal kinase, ERK-JNK) 的应激反应。此外,DHQ 还能够减少 ROS 的积累、减轻线粒体的功能障碍等^[36]。Ding 等^[37]的研究表明在高脂饮食/链脲佐菌素诱导的糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 大鼠中,添加剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 DHQ 可以显著减弱尿微量白蛋白的排泄并稳定血糖水平和脂质代谢,减轻肾组织的病理学损伤;在体外研究中,DHQ 可以显著抑制细胞增殖和过量的 ROS 生成,并减少核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体的激活和肾脏中肾纤维化相关蛋白的表达。

同时,DHQ 对酒精性脂肪肝变性及其伴有的炎症也有一定的抑制作用^[38]。Zhang 等^[39]研究发现 DHQ 可以通过激活 *LKB1* 基因的表达增强腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 磷酸化来调节胆固醇调节元件结合蛋白 SREBP1 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 的表达;DHQ 还可以上调 *SIRT1* (负责去乙酰化) 的表达,下调 *P2X7R* (负责促炎因子的合成与释放) 和 *NLRP3* 等转录因子的表达。综上所述,DHQ 可以通过调节相关转录因子的表达从而起到抑制脂肪生成和保肝的功效,提示 DHQ 对酒精性肝脂肪变性具有一定的治疗潜力。

DHQ 还可以在调节酶活的同时,介导细胞自噬。Chen 等^[40]利用刀豆球蛋白 A (concanavalin A, Con A) 诱导小鼠免疫性肝损伤,发现 DHQ 给药显著降低了血清丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶水平,并提高了 Con A 处理小鼠的存活率,证明

了DHQ可起到保肝作用;同时,研究了DHQ对刀豆球蛋白Con A诱导的小鼠肝损伤的免疫调节作用,结果表明,DHQ可以通过抑制Caspase-3、Caspase-7和Caspase-8(Caspase家族是一类与细胞凋亡有关的蛋白)的活化来保护HepG2细胞免受TNF- α /ActD诱导的细胞凋亡。

3.2 二氢槲皮素对心肌细胞的影响

DHQ还具有降低血压、保护心肌缺血再灌注损伤和抑制心肌肥厚等作用。王秋红等^[41]研究发现DHQ能改善大鼠心电图J点的位移,显著降低心肌缺血大鼠血清中肌酸激酶(creatine kinase,CK)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme,CK-MB)、乳酸盐脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)的含量,提高心肌组织匀浆中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)的活力,降低心肌组织匀浆中脂质过氧化终产物丙二醛的含量,从而有效抑制异丙肾上腺素(isoprenaline,ISO)导致的心肌组织缺血,保护心肌细胞免受损伤,进而起到治疗冠心病的作用。

而大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的抗氧化实验结果表明,DHQ对离体大鼠缺血/再灌注损伤具有明显的保护作用,此保护作用可能与DHQ可以减少氧自由基产生、提高氧自由基清除、降低脂质过氧化损伤有关^[42]。王知斌等^[43]同样发现二氢槲皮素对H₂O₂诱导的H9c2心肌细胞的损伤具有保护作用。其作用机制可能与其能够提高细胞内抗氧化酶活性、增强细胞稳定性有关。

3.3 二氢槲皮素对淋巴细胞的影响

淋巴细胞在人机体免疫反应中具有关键作用,而DHQ可以特异地抑制白血淋巴瘤细胞的增殖,从而在一定程度上保护人的免疫系统。Devi和Das^[44]研究了多种天然植物中的黄酮类活性物质对人类普通淋巴白血淋巴瘤细胞系MoIt-4及其组织分化的成人淋巴细胞系IM-9的生长影响。其中,当DHQ的浓度为10~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,普通淋巴细胞中白介素-2(interleukin-2,IL-2)的分泌受到抑制,MoIt-4细胞中的IL-2水平升高,对IM-9细胞没有影响。而IL-2分泌水平与MoIt-4细胞的生长抑制率有直接关系,故这一研究可能成为日后将DHQ等多种天然黄酮类物质开发为治疗急性淋巴白血淋巴瘤药物的依据之一。

3.4 二氢槲皮素的抗炎抗氧化作用

由于DHQ结构的特殊性,其抗炎、抗过敏、止痒作用也得到了广泛研究^[45-46]。DHQ能显著对抗二甲苯所致的小鼠耳肿胀,缓解二硝基氯苯诱导的小鼠过敏反应,并且能明显减少4-氨基吡啶诱导的瘙痒反应的舔体次数^[40]。Borovskaya等^[46]研究了DHQ对大鼠前列腺慢性非细菌性炎症模型的作用。发现施用DHQ之后,大鼠前列腺中结缔组织的面积减少至初始水平,这证明了该氧化剂的抗纤维化性质。此外,DHQ还可以阻止腺泡上皮的萎缩,如研究发现DHQ的抗氧化能力对神经细胞有保护作用,可以有效防治阿尔兹海默氏症或帕金森氏病^[47];通过动物实验也证明了DHQ的抗氧化能力使其具有抗心肌坏死的能力^[48]。

3.5 二氢槲皮素的抗病毒作用

DHQ还被发现对病毒也有一定的抵抗性。DHQ对由柯萨奇病毒B4(Coxsackie virus B4,CVB4)引起的白色小鼠胰腺炎的影响实验表明,DHQ的使用会导致胰腺组织中病毒滴度的剂量依赖性降低^[49]。形态学上,与安慰剂治疗的小鼠相比,经过DHQ处理的小鼠的胰腺组织表现出较少的炎性细胞浸润并且没有组织破坏的迹象;经过利巴韦林和DHQ处理的小鼠产生较少的胰腺炎症病灶,并且这些病灶包含的浸润细胞少于安慰剂治疗的小鼠^[49]。此外,DHQ的使用还可导致胰腺炎过程中受损的胰腺组织的抗氧化活性的恢复^[49]。研究结果表明了DHQ的高抗病毒活性及其在治疗复杂病毒性胰腺炎中的潜力。

3.6 二氢槲皮素对多种细胞内酶的影响

DHQ能够激活或抑制多种酶的酶活,从而产生不同的生理学效应。研究发现,DHQ可以作为 α -淀粉酶的新型抑制剂^[7]。利用不同浓度的DHQ处理后,测定 α -淀粉酶的酶活,该化合物的半抑制浓度(inhibitory concentration,IC₅₀)接近9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,证明了它具有竞争性抑制的动力学机制;其抑制常数为(2.25 \pm 0.22) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,表明DHQ对酶的高亲和力^[7]。因此,DHQ对研究开发治疗糖尿病的新药具有重要意义。

此外,不同来源的DHQ对同一种酶的作用也会有所不同。付警辉等^[8]研究了长白落叶松DHQ对酪氨酸酶的抑制作用,并与兴安落叶松

DHQ 进行了对比。结果表明,质量浓度在 $0.001 \sim 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,长白落叶松 DHQ 对酪氨酸酶的抑制作用高于兴安落叶松 DHQ。长白落叶松 DHQ 低质量浓度时,纯度越高,对酪氨酸酶的抑制作用越强;高质量浓度时,纯度越高,抑制作用越弱。而且 DHQ 对酪氨酸酶表现为竞争性抑制,抑制常数 KI 为 0.017。

3.7 二氢槲皮素的其他活性

除了以上活性,DHQ 对脑部疾病也有一定的改善作用。Plotnikov 等^[50]研究发现 DHQ 可通过改善大鼠大脑皮层的微循环超微结构从而改善脑部微循环,经过 DHQ 处理的自发性高血压 (spontaneous hypertension, SHR) 大鼠视皮层局部的脑血流量显著高于未接受 DHQ 处理的大鼠,且接近京都种大鼠 (Wistar-Kyoto, 正常对照) 的值。其原因可能是 DHQ 在动脉高血压形成期间改善了 SHR 大鼠大脑皮层的微血管化。此外,DHQ 还具有肠道保护作用,还可以通过促进骨代谢相关蛋白的表达影响骨代谢等^[51]。

4 二氢槲皮素的生产工艺

虽然 DHQ 的生物学活性多样,应用广泛,但目前其产量仍较低,生产方式还主要依赖于植物提取,包括有机试剂萃取、乙醇回流、超声法、微波提取等方法,提取率较低且不环保。此外,还有采用化学试剂进行人工合成等,但此种方法合成的产物纯度较低且原料成本较高。随着国际、国内市场对于黄酮类物质需求量的快速增长,迫切地需要研发一种来源限制少、生产成本低、安全性高和污染排放低的方法进行生产,而微生物合成法或许可以成为解决该问题的关键方法。

4.1 植物提取法

由于 DHQ 主要以游离状态存在于落叶松中,且含量高达 7%,所以植物提取时主要选取落叶松为原料。在植物提取早期,主要采用溶剂提取法将 DHQ 从植物中提取出来。金建忠^[52]以落叶松为原料,用 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 的沸水进行提取,再进一步将提取液沉淀之后用有机溶剂进行萃取、重结晶,最终的提取率达到 0.29%。而刘妍和王遂^[53]分别用水、丙酮-水作为提取溶剂从落叶松中提取 DHQ,通过 $L_9(3^4)$ 正交实验优化了最佳提取条

件,结果显示以丙酮-水为提取剂的提取量高于以沸水作为提取剂的提取量。此外,吸附剂的加入也可提高提取率。如以落叶松木屑为原料,以 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 沸水为溶剂、聚酰胺为吸附剂提取 DHQ,在此条件下 DHQ 的提取率为 0.814%^[54]。

后期出现了回流提取法、超声-微波法和酶诱导法等多种提取方法。韩俊凤和贾林艳^[55]改进了传统水热提取法,采用微波辅助预处理来提取落叶松中的 DHQ,平均提取率为 0.981%。与传统的水热提取法比较,微波辅助提取效率提高了 22.17%。同时,也有诸多研究表明,采用超声辅助提取法可以不同程度地提高 DHQ 的提取率^[56-58]。苏丹等^[59]对热水回流提取法、乙醇回流提取法、微波提取法和乙醇超声辅助提取法进行了比较,热水回流提取和乙醇回流提取所用时间较长,120 min 其提取率分别为 0.17% 和 0.20%;微波和乙醇超声提取时间较短,30 min 时提取率分别为 0.21% 和 0.22%,其提取率较前 2 种方法稍有提高。此外,Wang 等^[60]采用酶诱导法,使用因子设计和中心复合设计方法对兴安落叶松木屑中 DHQ 的提取进行优化。最优条件为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纤维素酶和果胶酶 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,在优化条件下 DHQ 的得率分别增加到 $(1.06 \pm 0.08) \sim (1.35 \pm 0.04) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

可以看出,随着提取工艺的不断改进,不再单纯以沸水作为提取试剂,且提取量有所提高。植物落叶松的提取工艺的提取率一般在 1%~2%,纯度在 95% 以上,可操作性也相对较强,但是这种工艺对植物资源和各种试剂的浪费较多,且存在不环保的缺点。

4.2 化学合成法

为了降低对植物资源的依赖,拓展 DHQ 的来源,各种化学合成的方法也被开发出来^[61],但在其研发过程中也面临着诸多问题。孙淑香^[62]以甲基氯甲醚为原料采用 AFO (algar-flynn-olyamada) 反应法合成了 DHQ,其回收率约为 20%,但是甲基氯甲醚毒性较大,已有资料显示接触其蒸汽后罹患肺癌的概率很高,因此,有学者正在寻找其他酚羟基保护剂做替代品。也有研究人员采用各种化学试剂(如过钌酸四丙胺盐、ADMix- α 等)利用光延反应法合成 DHQ,回收率约为 30%^[63],但这些试剂在我国国内市场并不常见,若不解决这些试剂的获取途径,则该工艺不具备

在国内工业化的价值。胡昆等^[64]将2,4,6-三羟基苯乙酮与3,4-二羟基苯甲醛进行甲氧甲氧基保护羟基、羟醛缩合、环氧化及脱保护关环反应合成了DHQ,但此合成方法的纯度并不高。此外,也可将其他天然产物作为原料,如可以将儿茶素作为原料利用半合成法制备DHQ,摩尔回收率约为5%^[65],但需要注意的是,儿茶素的市场价格约为1 000元·kg⁻¹,可以计算得出,该工艺生产二氢槲皮素的成本在20 000元·kg⁻¹左右,远超过提取法的成本。

4.3 生物合成法

目前基于生物合成法的研究仍处于实验室阶段,尚未进行大规模生产。Leonard等^[66]对大肠杆菌进行代谢工程改造,在大肠杆菌内异源表达多种黄酮代谢相关的酶类,当使用黄烷酮为前体分子时,从工程菌株中生物合成了B环三羟基黄酮醇杨梅素,并少量检测到多种类黄酮物质的存在。也有研究表明,可将茶树类黄酮3'-羟基化酶(F3'H)基因应用于圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素的生物合成^[67-68]。

而本实验室基于二氢槲皮素的生物合成途径,主要对由柚皮素向二氢槲皮素合成的方向进行了研究,筛选了3种不同植物来源(大豆、茶树、银杏)的F3H基因,并将其在大肠杆菌和酿酒酵母中进行了异源表达,现已证实均有活性且表达量较高(未发表数据)。综上,相较于化学合成法来说,生物合成法更为环保,研究潜力较大。

5 展望

二氢槲皮素作为一种重要的黄酮类化合物,普遍存在于多种植物中,由于其在抗炎、抗病毒、抗氧化等方面的突出作用,其药理活性正被逐步探究并被广泛应用于保健品、药品、食品等领域。2018年3月21日,欧盟委员会发布了2017/461号法规,此项法规正式授权了二氢槲皮素提取物可以作为新的食品成分进入欧盟市场。此外,二氢槲皮素可用于治疗脑梗及其后遗症、脑血栓、心脏冠状动脉等疾病,应用于调节脂代谢、抗脂质过氧化、抗病毒、抗肿瘤等医学领域,均具有较大的开发潜力。

然而,二氢槲皮素在研究过程中仍存在以下问题。①对于二氢槲皮素应用过程中的毒副作用

研究甚少,该物质应用于临床治疗仍需要大量的研究来确保其安全性。②由于二氢槲皮素水溶性较差,传统的提取工艺复杂且效率低等一些生产工艺问题,尚未实现大规模自动化生产,这种情况使得目前二氢槲皮素单价较高,在各领域应用中的利用度很低。当下,代谢工程、合成生物学快速发展,而二氢槲皮素的基因工程菌株构建的研究报道鲜有报道,因此构建良好的基因工程菌将是解决其大规模应用的重要途径。

参 考 文 献

- [1] WANG Y, WANG W, LIAO J, *et al.*. Prevention of macrophage adhesion molecule-1 (Mac-1)-dependent neutrophil firm adhesion by taxifolin through impairment of protein kinase-dependent NADPH oxidase activation and antagonism of G protein-mediated calcium influx [J]. *Biochem. Pharmacol.*, 2004, 67(12):2251-2262.
- [2] WANG X, MENG M, GAO L, *et al.*. Permeation of astilbin and taxifolin in Caco-2 cell and their effects on the P-gp [J]. *Int. J. Pharm.*, 2009, 378(1-2):1-8.
- [3] MAROZIEN A, KLIUKIEN R, ŠARLAUSKAS J, *et al.*. Inhibition of phthalocyanine-sensitized photohemolysis of human erythrocytes by polyphenolic antioxidants: description of quantitative structure-activity relationships [J]. *Cancer Lett.*, 2000, 157(1):39-44.
- [4] YUN B S, LEE I K, KIM J P, *et al.*. Lipid peroxidation inhibitory activity of some constituents isolated from the stem bark of *Eucalyptus globulus* [J]. *Arch. Pharm. Res.*, 2000, 23(2):147-150.
- [5] HARAGUCHI H, MOCHIDA Y, SAKAI S, *et al.*. Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis* [J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2014, 60(6):945-948.
- [6] NAKAYAMA T, YAMADA M, OSAWA T, *et al.*. Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids [J]. *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 45(1):265-267.
- [7] ZAYNULLIN R A, KUNAKOVA R V, KHUSNUTDINOVA E K, *et al.*. Dihydroquercetin: known antioxidant—new inhibitor of alpha-amylase activity [J]. *Med. Chem. Res.*, 2018, 27(3):966-971.
- [8] 付警辉, 柴婧, 韩佳彤, 等. 落叶松中花旗松素对酪氨酸酶的抑制作用 [J]. *日用化学工业*, 2014, 44(4):218-221.
- [9] SHIKOV A N, POZHARITSKAYA O N, MIROSHNYK I, *et al.*. Nanodispersions of taxifolin: impact of solid-state properties on dissolution behavior [J]. *Int. J. Pharm.*, 2009, 377(1-2):148-152.
- [10] ASHIHARA H, DENG W, MULLEN W, *et al.*. Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(5):559-566.
- [11] LIU Y, GAO L, LIU L, *et al.*. Purification and characterization of a novel galloyltransferase involved in

- catechin galloylation in the tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *J. Biol. Chem.*, 2012,287(53):44406-44417.
- [12] PUNYASIRI P A N, ABEYSINGHE I S B, KUMAR V, *et al.*. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways[J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, 431(1): 22-30.
- [13] SEITZ C, EDER C, DEIML B, *et al.*. Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase in the *Asteraceae* family [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2006,61(3):365-381.
- [14] WINKEL-SHIRLEY B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. *Plant Physiol.*, 2001,126(2):485-493.
- [15] MARTIN C, PRESCOTT A, MACKAY S, *et al.*. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. *Plant J.*, 1991,1(1):37-49.
- [16] 师守国, 户婷婷. 枣果实黄酮-3-羟化酶基因(*F3H*)的克隆及生物信息学分析[J]. *北方园艺*, 2016(14):89-93.
- [17] CHARRIER B N D, CORONADO C, KONDOROSI A, *et al.*. Molecular characterization and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavanone-3-hydroxylase and dihydroflavonol-4-reductase encoding genes[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1995,29(4):773-786.
- [18] PELLETIER M K, SHIRLEY B W. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase[J]. *Plant Physiol.*, 1996,111(1):339-345.
- [19] SINGH K, RANI A, KUMAR S, *et al.*. An early gene of the flavonoid pathway, flavanone 3-hydroxylase, exhibits a positive relationship with the concentration of catechins in tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Tree Physiol.*, 2008, 28(9):1349-1356.
- [20] GONG Z, YAMAZAKI M, SUGIYAMA M, *et al.*. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in forma-specific manner in *Perilla frutescens*[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1997,35(6):915-927.
- [21] 张华玲, 黄元射, 杨春贤, 等. 苦苣黄烷酮 3-羟化酶基因 *F3H* 的克隆及序列分析[J]. *西北植物学报*, 2010,30(3):447-452.
- [22] MA G, GUO J P. *In silico* cloning and sequence analysis of *F3H* gene in *Phaseolus Coccineus*[J]. *Modern Food Sci. Technol.*, 2014,30(4):6-9.
- [23] 李萍, 王若曦, 王欢. 黄酮 3-羟化酶(*F3H*)的生物信息学分析[J]. *生物学杂志*, 2015,32(6):25-29.
- [24] LUKACIN R, BRITSCH L. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase. [J]. 1997, 249: 748-757.
- [25] OWENS D K, CROSBY K C, RUNAC J, *et al.*. Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3 β -hydroxylase[J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2008,46(10):833-843.
- [26] WERCK-REICHHART D, BAK S, PAQUETTE S. Cytochromes P450[J/OL]. *Arabidopsis Book*, 2002,1:e0028 [2020-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3243372/>. DOI:10.1199/tab.0028.
- [27] BRUGLIERA F, BARRI-REWELL G, HOLTON T A, *et al.*. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida* [J]. *Plant J.*, 1999,19(4):441-451.
- [28] SCHOENBOHM C, MARTENS S, EDER C, *et al.*. Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme [J]. *Biol. Chem.*, 2000,381(8):749-753.
- [29] KITADA C, GONG Z, TANAKA Y, *et al.*. Differential expression of two cytochrome P450s involved in the biosynthesis of flavones and anthocyanins in chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*[J]. *Plant Cell Physiol.*, 2001,42(12):1338-1344.
- [30] TODA K, YANG D, YAMANAKA N, *et al.*. A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2002, 50(2):187-196.
- [31] JEONG S T, GOTO-YAMAMOTO N, HASHIZUME K, *et al.*. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*) [J]. *Plant Sci.*, 2006,170(1):61-69.
- [32] 苏丽, 赵昶灵, 杨晓娜, 等. 高等植物 F3'H cDNA 及其氨基酸序列的生物信息学分析[J]. *云南农业大学学报(自然科学版)*, 2010,25(3):316-326.
- [33] 侯杰, 佟玲, 崔国新, 等. 植物类黄酮 3'-羟化酶(*F3'H*)基因的研究进展[J]. *植物生理学报*, 2011,47(7):641-647.
- [34] 许志茹, 崔国新, 李春雷, 等. 芜菁的类黄酮 3'-羟化酶基因克隆和 UV-A 诱导表达特性[J]. *植物生理学通讯*, 2008(5):931-935.
- [35] 刘海峰, 杨成君, 赵权, 等. 山葡萄中类黄酮 3'-羟化酶基因(*F3'H*) cDNA 的克隆和分析[J]. *植物生理学通讯*, 2009,45(12):1186-1190.
- [36] ZAI W, CHEN W, LUAN J, *et al.*. Dihydroquercetin ameliorated acetaminophen-induced hepatic cytotoxicity via activating JAK2/STAT3 pathway and autophagy[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2018,102(3):1443-1453.
- [37] DING T, WANG S, ZHANG X, *et al.*. Kidney protection effects of dihydroquercetin on diabetic nephropathy through suppressing ROS and NLRP3 inflammasome [J]. *Phytomedicine*, 2018,41:45-53.
- [38] 郑今花. 二氢槲皮素基于 NLRP3 炎症小体通路调控酒精性脂肪肝与炎症的机制研究[D]. 吉林延:延边大学, 硕士学位论文, 2017.
- [39] ZHANG Y, JIN Q, LI X, *et al.*. Modulation of AMPK-dependent lipogenesis mediated by P2x7R-NLRP3 inflammasome activation contributes to the amelioration of alcoholic liver steatosis by dihydroquercetin [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2018, 66(19):4862-4871.
- [40] CHEN J, SUN X, XIA T, *et al.*. Pretreatment with dihydroquercetin, a dietary flavonoid, protected against concanavalin A-induced immunological hepatic injury in mice and TNF- α /ActD-induced apoptosis in HepG2 cells [J]. *Food Funct.*, 2018,9(4):2341-2352.

- [41] 王秋红, 匡海学, 吴伦, 等. 二氢槲皮素对异丙肾上腺素致大鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 177-180.
- [42] 卢宁, 韩吉春, 任博雪, 等. 二氢槲皮素预处理对心肌缺血/再灌注损伤抗氧化作用的影响[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(4): 487-492.
- [43] 王知斌, 翟亚东, 苏晓琳, 等. 二氢槲皮素对 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 16-19.
- [44] DEVI M A, DAS N P. *In vitro* effects of natural plant polyphenols on the proliferation of normal and abnormal human lymphocytes and their secretions of interleukin-2[J]. Cancer Lett., 1993, 69(3): 191-196.
- [45] 蔡华君, 郑毅男, 刘文丛. 二氢槲皮素抗炎抗过敏止痒作用的活性研究[J]. 人参研究, 2015, 27(3): 32-35.
- [46] BOROVSKEYA T G, KAMALOVA S I, POLYEKTOVA M E, et al.. Experimental analysis of the efficacy of dihydroquercetin on the model of chronic nonbacterial inflammation of the prostatic gland[J]. B. Exp. Biol. Med., 2018, 164(5): 617-619.
- [47] Korea Institute of Science and Technology. Use of an *Opuntia ficus-indica* extract and compounds isolated therefrom for protecting nerve cells; US07563467B2[P]. 2009-07-21.
- [48] 师智勇, 孙宗全, 王国华. 花旗松素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 华中医学杂志, 2008(4): 287-289.
- [49] GALOCHKINA A V, ANIKIN V B, BABKIN V A, et al.. Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, a flavonoid from *Larix sibirica*, against coxsackievirus B4 in a model of viral pancreatitis[J]. Arch. Virol., 2016, 161(4): 929-938.
- [50] PLOTNIKOV M B, ALIEV O I, SIDEKHMEENOVA A V, et al.. Dihydroquercetin improves microvascularization and microcirculation in the brain cortex of SHR rats during the development of arterial hypertension[J]. B. Exp. Biol. Med., 2017, 163(1): 57-60.
- [51] 蔡聪. 花旗松素在体内和体外对破骨细胞生成和功能的影响及其机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 博士学位论文, 2019.
- [52] 金建忠. 落叶松中二氢槲皮素的提取工艺研究[J]. 林产化工通讯, 2005, 39(4): 12-15.
- [53] 刘妍, 王遂. 二氢槲皮素的提取及抗氧化性研究[J]. 化学研究与应用, 2011, 23(1): 107-111.
- [54] 席丹莹, 王正平, 宁正祥. 吸附法提取二氢槲皮素的研究[J]. 食品科技, 2007(12): 142-144.
- [55] 韩俊凤, 贾林艳. 落叶松中二氢槲皮素提取新工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(24): 11385-11387.
- [56] 马春慧, 李伟, 孙震, 等. 乙醇超声法提取二氢槲皮素工艺优化[J]. 中国造纸, 2010, 29(2): 78-80.
- [57] MA C, YANG L, LI W, et al.. Ultrasound-assisted extraction of arabinogalactan and dihydroquercetin simultaneously from *Larix gmelinii* as a pretreatment for pulping and papermaking[J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(12): e114105[2020-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4252091/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0114105.
- [58] LIU Z, GU H, YANG L. A novel approach for the simultaneous extraction of dihydroquercetin and arabinogalactan from *Larix gmelinii* by homogenate-ultrasound-synergistic technique using the ionic liquid[J]. J. Mol. Liq., 2018, 261: 41-49.
- [59] 苏丹. 二氢槲皮素的提取分离与结构修饰[D]. 黑龙江佳木斯: 佳木斯大学, 硕士学位论文, 2016.
- [60] WANG Y, ZU Y, LONG J, et al.. Enzymatic water extraction of taxifolin from wood sawdust of *Larix gmelini* (Rupr.) Rupr. and evaluation of its antioxidant activity[J]. Food Chem., 2011, 126(3): 1178-1185.
- [61] 林强. 二氢槲皮素的生产工艺改进[D]. 西安: 西北大学, 硕士学位论文, 2009.
- [62] 孙淑香. 二氢黄酮醇的合成[J]. 现代化工, 1998(12): 29-31.
- [63] JEW S S, KIM H A, BAE S Y, et al.. Enantioselective synthetic method for 3-hydroxyflavanones: an approach to (2R, 3R)-3',4'-O-dimethyltaxifolin[J]. Tetrahedron Lett., 2000, 41(41): 7925-7928.
- [64] 胡昆, 王振山, 刘显华, 等. 二氢槲皮素的全合成[J]. 化学试剂, 2011, 33(1): 85-87.
- [65] ES-SAFI N, GHIDOUCHE S, DUCROT P H. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity[J]. Molecules, 2007, 12(9): 2228-2258.
- [66] LEONARD E, YAN Y, KOFFAS M. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*[J]. Metab. Eng., 2006, 8(2): 172-181.
- [67] 周天山. 茶树类黄酮 3'-羟基化酶功能分析及其在代谢工程中的应用[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 博士学位论文, 2016.
- [68] 周天山, 余有本, 肖斌, 等. 操纵茶树类黄酮 3'-羟基化酶生物合成 B 环-3',4'-二羟基黄酮类化合物[J]. 微生物学报, 2017(3): 132-143.