

· 专题论坛 ·

淫羊藿类黄酮生物合成相关基因研究进展

范雪兰^{1, 2†}, 落艳娇^{1, 3†}, 徐超群^{1*}, 郭宝林^{1*}

¹中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

²江西中医药大学, 南昌 330000; ³中国中医科学院中医药健康产业研究所, 南昌 330000

摘要 淫羊藿(*Herba Epimedii*)是一种历史悠久的中草药(TCM), 药用价值高, 国内淫羊藿相关研究备受关注。黄酮醇苷类(PFGs)成分是淫羊藿的主要活性物质, 其含量决定了药用品质。了解淫羊藿类黄酮生物合成途径, 挖掘与淫羊藿黄酮醇苷类含量相关的基因, 阐明其生物合成途径的调控机制对于提高淫羊藿品质至关重要。该文系统综述了淫羊藿类黄酮生物合成相关结构基因和转录因子基因研究进展, 为揭示黄酮含量的分子调控机制, 进而为淫羊藿分子育种和黄酮醇苷的合成生物学研究奠定理论基础。

关键词 淫羊藿, 黄酮醇苷, 生物合成, 结构基因, 调控基因

范雪兰, 落艳娇, 徐超群, 郭宝林 (2024). 淫羊藿类黄酮生物合成相关基因研究进展. 植物学报 59, 834–846.

淫羊藿(*Herba Epimedii*)是应用历史悠久的传统中药, 具有补肾阳、强筋骨和祛风湿等功效, 现代药理研究表明其在抗骨质疏松、抗病毒、抗肿瘤、降血糖和降血脂等方面具有显著功效(Jiang et al., 2015)。其活性成分主要是一类在C-8位连有异戊烯基的黄酮醇苷化合物, 包括淫羊藿苷(Icariin)、朝藿定A(Epimedin A)、朝藿定B(Epimedin B)、朝藿定C(Epimedin C)、宝藿苷I(Baohuoside I)、鼠李糖基淫羊藿次苷II(2"-O-rhamnosyl icarisiside II)及上述化合物的去糖水解产物淫羊藿素(Icaritin)等(Kim et al., 2017)。

淫羊藿隶属小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属(*Epimedium*)。《中国药典》(2020版)规定淫羊藿(*E. brevicornu*)、箭叶淫羊藿(*E. sagittatum*)、柔毛淫羊藿(*E. pubescens*)和朝鲜淫羊藿(*E. koreanum*)的干燥叶片被用作中药材淫羊藿。近几十年来, 其新功效不断被发现和确认, 以淫羊藿为主要成分的中成药“仙灵骨葆胶囊”为治疗骨质疏松的基本用药; 此外, 研发的新药也不断上市, 国家一类抗晚期肝癌新药阿可拉定于2022年上市(Zhu et al., 2011; Zhao et al.,

2015)。通过野生变家种和人工规模化栽培可实现淫羊藿资源的可持续利用, 但不同淫羊藿物种、生长环境或栽培条件, 其药效成分含量差异较大。类黄酮物质的合成和积累受多种因素影响, 开展相关研究非常必要。

本文在介绍淫羊藿类黄酮生物合成途径的基础上, 系统总结了参与淫羊藿苷类黄酮生物合成的结构基因、淫羊藿花青素支路基因及相关转录因子基因研究进展, 旨在推进对其药效成分的生物合成及调控机制的系统认识, 指导分子育种及合成生物学研究与应用, 进而实现淫羊藿资源的可持续利用。

1 淫羊藿类黄酮的种类

目前, 在淫羊藿属植物中已鉴定出141种类黄酮化合物(Ma et al., 2011), 包括黄酮醇、黄酮及花青素等。其中, C-8位具有异戊烯基取代的黄酮醇(淫羊藿黄酮醇苷类)种类最多, 有74种(Ma et al., 2011), 是淫羊藿小分子化合物中含量最高的成分, 也是主要活性成分(Zhang et al., 2008)。

淫羊藿黄酮醇苷类的主要结构特征是以黄酮醇为母核, C-8位连有异戊烯基, C-3位和/或C-7位连有1

收稿日期: 2023-09-22; 接受日期: 2024-03-18

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(No.2021-I2M-1-031)

† 共同第一作者

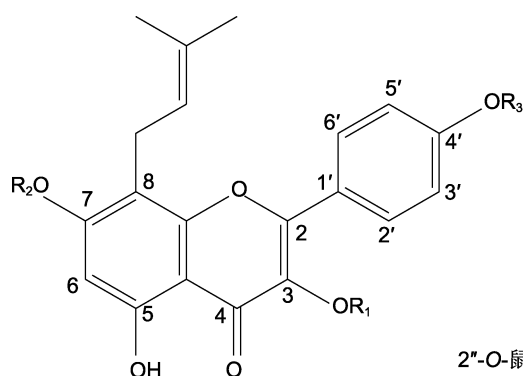
* 通讯作者。E-mail: cqunxu@implad.ac.cn; blguo@implad.ac.cn

或2个糖基, 糖基种类一般是葡萄糖(glucose, Glu)、鼠李糖(rhamnose, Rha)或木糖(xylose, Xyl) (Zhao et al., 2008) (图1)。

在早春萌发时, 大多数淫羊藿属植物的幼芽和嫩叶通常呈红色或具红色斑块; 在秋冬季节, 部分种类叶片呈紫红色(任璘等, 2008)。约一半种类的花为紫红色, 这些颜色的呈色物质均为花青素。花和叶中的主要花青素苷元为飞燕草素(delphinidin)和矢车菊素(cyanidin) (Mi et al., 2023)。叶的花青素成分主要是飞燕草素-3-对羟基桂皮酰槐糖苷-5-葡萄糖苷(乌蕊毒素, cayratinin)和矢车菊素-3-对羟基桂皮酰槐糖苷(cyanidin-3-*p*-coumaroylsophoroside) (Yoshitama, 1984; Qin et al., 2022; Zhang et al., 2022)。

2 淫羊藿类黄酮的生物合成途径

从苯丙氨酸到柚皮素(二氢黄酮)是所有已知类黄酮化合物生物合成的共同上游途径(林春草等, 2022; Shen et al., 2022b), 包括结构基因: 编码苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)基因、编码肉桂酸-4-羟化酶(cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H)基因、编码4-香豆酸辅酶A连接酶(4-coumarate: CoA ligase, 4CL)基因、编码查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)基因和编码查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)基因。其中, PAL是苯丙烷类成分合成的限速酶, CHS是类黄酮合成的限速酶(Schijlen et al., 2007; Liu et al., 2021a)。柚皮素在类黄酮-3-羟化酶(flavanone-3-hydroxylase, F3H)催化下形成二氢山奈酚(二氢黄酮醇)。二氢山奈酚是淫羊藿黄酮醇苷类和花青素合成支路的起始化合物。



淫羊藿黄酮醇苷合成支路: 二氢山奈酚在黄酮醇合酶(flavonol synthase, FLS)催化下转化为山奈酚, 这是黄酮醇类化合物合成的共有途径。淫羊藿黄酮醇苷类的下游合成途径为: 异戊烯基转移酶(prenyltransferase, PT)在C-8位上连接异戊烯基(Wang et al., 2021; Shen et al., 2022a; 周景文等, 2023a), 氧甲基转移酶(O-methyltransferase, OMT)将C-4'位OH甲基化(周景文等, 2023b), 糖基转移酶(glycosyltransferase)在C-3位OH连接鼠李糖(Feng et al., 2018; Lyu et al., 2020; Yao et al., 2022a), C-7位OH连接葡萄糖(Feng et al., 2019; Yang et al., 2020), 最后在C-3-O-鼠李糖上连接第2个糖(虞沂等, 2022; Yao et al., 2022b) (图2)。

淫羊藿花青素合成支路属于植物花青素合成的共有通路。二氢山奈素的C3'位和C3'、C5'位可分别被类黄酮-3'-羟化酶(flavanone-3'-hydroxylase, F3'H)和类黄酮-3',5'-羟化酶(flavanone-3',5'-hydroxylase, F3'5'H)羟基化, 产生二氢槲皮素和二氢杨梅素。3种二氢黄酮醇继续在二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol-4-reductase, DFR)催化下形成无色花青素, 再被花青素合酶(anthocyanidin synthase, ANS)进一步转化为相应有色的花青素苷元矢车菊素和飞燕草素(图2), 苷元再经糖基化和酰基化形成最终的花青素。

3 淫羊藿类黄酮合成结构基因

3.1 淫羊藿类黄酮合成途径的上游基因

目前, 在箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、巫山淫羊藿(*E. wushanense*)和拟巫山淫羊藿(*E. pseudowushanense*)

朝藿定A	$R_1=Rha(2-1)Glu, R_2=Glu, R_3=CH_3$
朝藿定B	$R_1=Rha(2-1)Xyl, R_2=Glu, R_3=CH_3$
朝藿定C	$R_1=Rha(2-1)Rha, R_2=Glu, R_3=CH_3$
淫羊藿苷	$R_1=Rha, R_2=Glu, R_3=CH_3$
宝藿苷I	$R_1=Rha, R_2=H, R_3=CH_3$
2"-O-鼠李糖基淫羊藿次苷II	$R_1=Rha(2-1)Rha, R_2=H, R_3=CH_3$

图1 淫羊藿黄酮醇苷的基本结构及主要活性成分

Figure 1 The basic structure and main active components of flavonol glycosides in *Herba Epimedium*

图2 淫羊藿属植物中类黄酮生物合成途径

4CL: 4-香豆酸辅酶A连接酶; C4H: 肉桂酸-4-羟化酶; PAL: 苯丙氨酸解氨酶; CHS: 查尔酮合酶; CHI: 查尔酮异构酶; DFR: 二氢黄酮醇-4-还原酶; ANS: 花青素合酶; F3H: 类黄酮-3-羟化酶; F3'H: 类黄酮-3'-羟化酶; F3'5'H: 类黄酮-3',5'-羟化酶; FLS: 黄酮醇合酶; PT: 异戊烯基转移酶; 3GT: 3-O-糖基转移酶; GGT: 2"-O-糖基转移酶; 7GT: 7-O-糖基转移酶; OMT: 氧甲基转移酶

Figure 2 Flavonoid biosynthesis pathway in *Epimedium* plants

4CL: 4-coumarate:CoA ligase; C4H: Cinnamic acid 4-hydroxylase; PAL: Phenylalanine ammonia lyase; CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; DFR: Dihydro flavonol-4-reductase; ANS: Anthocyanidin synthase; F3H: Flavanone-3-hydroxylase; F3'H: Flavanone-3'-hydroxylase; F3'5'H: Flavanone-3',5'-hydroxylase; FLS: Flavonol synthase; PT: Prenyltransferase; 3GT: 3-O-glycosyltransferase; GGT: 2"-O-glycosyltransferase; 7GT: 7-O-glycosyltransferase; OMT: O-methyltransferase

表1 淫羊藿属植物中类黄酮代谢途径的上游基因

Table 1 Upstream genes of flavonoid metabolic pathway in *Epimedium* plants

基因名	物种	功能	验证方法	参考文献
<i>EsPAL1</i>	箭叶淫羊藿	随着叶片的成熟, 表达量增高, 推测其可能参与木质素生物合成	a	Zeng et al., 2013b
<i>EsPAL2</i>	箭叶淫羊藿	在各发育阶段及组织中均表达, 推测其可能参与木质素、类黄酮和花青素的生物合成	a	Zeng et al., 2013b
<i>EsPAL3</i>	箭叶淫羊藿	主要在叶、花和蒴果中表达, 推测其主要参与花青素和4种主要活性成分的生物合成	a	Zeng et al., 2013b
<i>EwPAL</i>	巫山淫羊藿	体外功能验证: 催化L-苯丙氨酸和L-酪氨酸分别转化为肉桂酸和4-香豆酸	b	Liu et al., 2021b
<i>EpPAL2</i> 、 <i>EpC4H</i> 、 <i>Ep4CL3</i> 、 <i>Ep4CL2</i> 、 <i>EpCHS2</i> 、 <i>EpCHI1</i> 、 <i>EpCHI2</i> 、 <i>EpCHIL</i> 和 <i>EpF3H</i>	柔毛淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式呈正相关	a	Zeng et al., 2013a; Huang et al., 2015; Xu et al., 2023
<i>EsC4H</i> 和 <i>EsCHS1</i>	箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式无显著相关性	a	Zeng et al., 2013a; Huang et al., 2015
<i>Es4CL1</i> 、 <i>Es4CL2</i> 、 <i>EsCHS3</i> 和 <i>EsCHI2</i>	箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式呈负相关	a	Zeng et al., 2013a; Huang et al., 2015
<i>Ew4CL1</i>	巫山淫羊藿	体外功能验证: 催化4-香豆酸和肉桂酰乙酰化, 分别转化为4-香豆素基-CoA和肉桂酰基-CoA	b	Liu et al., 2021b
<i>Ew4CL2</i>	巫山淫羊藿	与其它物种参与木质素生物合成的4CL基因聚成一簇, 推测其参与木质素的生物合成	c	Liu et al., 2021b
<i>EwCHS1</i>	巫山淫羊藿	体外功能验证: 催化4-香豆素酰-CoA转化为柚皮素查尔酮和对香豆酰三乙酸内酯; 催化肉桂酰-CoA转化为松属素查尔酮和肉桂酰基三乙酸内酯	b	Liu et al., 2021b
<i>eppsCHS1</i>	拟巫山淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式相关	a	Pan et al., 2017
<i>EwCHI1</i>	巫山淫羊藿	体外功能验证: 催化柚皮素查尔酮和松属素查尔酮环化形成(2S)-柚皮素和(2S)-松属素	b	Liu et al., 2021b
<i>EwCHIL3</i>	巫山淫羊藿	与 <i>EwCHS1</i> 相互作用, 抑制对香豆酰三乙酸内酯和肉桂酰基三乙酸内酯产物的生成, 增加柚皮素和松属素的产生	b	Liu et al., 2021b

a: 实时荧光定量PCR和含量关联分析; b: 异源表达和酶活性分析; c: 序列比对或系统发育分析。4种主要活性成分为淫羊藿苷、朝藿定A、朝藿定B和朝藿定C
a: Quantitative real-time polymerase chain reaction and content correlation analysis; b: Heterologous expression and enzyme activity assay; c: Sequence alignment or phylogenetic analysis. Four main active ingredients are Icaritin, Epimedin A, Epimedin B, and Epimedin C

中发现了5个PAL、2个C4H、6个4CL、6个CHS、6个CHI和2个F3H编码基因(Zeng et al., 2013a, 2013b; Huang et al., 2015; Pan et al., 2017; Liu et al., 2021b; Xu et al., 2023)(表1)。其中, 仅巫山淫羊藿的*EwPAL*、*Ew4CL1*、*EwCHS1*、*EwCHI1*和*EwCHIL3*进行了体外功能验证, 明确了催化底物和

产物。个PT、1个OMT和12个UGT基因(表2)。

3.2 淫羊藿黄酮醇苷类支路基因

淫羊藿黄酮醇苷类支路基因包括FLS、PT、OMT和UGT。目前,在箭叶淫羊藿、朝鲜淫羊藿、柔毛淫羊藿、巫山淫羊藿和拟巫山淫羊藿中已发现3个FLS、3

3.2.1 黄酮醇合成酶

黄酮醇合成酶(FLS)与F3H同属α-酮戊二酸-Fe²⁺-双加氧酶(2-oxoglutarate-Fe (II)-dependent dioxygenases, 2-ODDs)超家族中的DOXC亚家族,部分FLS

表2 淫羊藿属植物黄酮醇苷生物合成途径基因
Table 2 Genes in the flavonol glycosides biosynthesis pathways in *Epimedium* plants

基因名	物种	功能	验证方法	参考文献
<i>EsFLS</i>	箭叶淫羊藿	在烟草中过表达导致花中黄酮醇含量增加,花青素含量降低	a	Zeng et al., 2013a; Huang et al., 2015
<i>eppsFLS1</i>	拟巫山淫羊藿	体外功能验证:分别催化二氢山奈酚和二氢槲皮素生成山奈酚和槲皮素	b	Pan et al., 2017
<i>EpFLS3</i> 和 <i>EsUF3GT</i>	柔毛淫羊藿 箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式呈正相关	a	Huang et al., 2015; Xu et al., 2023
<i>EsPT2</i>	箭叶淫羊藿	体外功能验证:分别催化山奈酚、山奈素和柚皮素生成8-异戊烯基山奈酚、淫羊藿素(8-异戊烯基山奈素)和8-异戊烯基柚皮素	b	Wang et al., 2021
<i>EpPT8</i>	柔毛淫羊藿	体外功能验证:分别催化山奈酚、槲皮素和芹菜素生成8-异戊烯基山奈酚、8-异戊烯基槲皮素和8-异戊烯基芹菜素	b	Shen et al., 2022a
<i>EKF8DT3</i>	朝鲜淫羊藿	体外功能验证:催化山奈酚生成8-异戊烯基山奈酚	b	周景文等, 2023a
<i>EKF4'OMT1</i>	朝鲜淫羊藿	体外功能验证:催化8-异戊烯基山奈酚C4'-OH甲基化,生成淫羊藿素	b	周景文等, 2023b
<i>EsUF7GT</i>	箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式呈负相关	a	Huang et al., 2015
<i>EKF3UGal</i>	朝鲜淫羊藿	体外功能验证:分别催化淫羊藿素和多种不带异戊烯基类黄酮的C3-OH半乳糖基化,生成8-异戊烯基山奈素-3-O-半乳糖和类黄酮-3-O-半乳糖苷	b	Lyu et al., 2020
<i>EKF3UGluT</i>	朝鲜淫羊藿	体外功能验证:分别催化淫羊藿素和多种不带异戊烯基类黄酮的C3-OH葡萄糖基化,生成8-异戊烯基山奈素-3-O-葡萄糖和类黄酮-3-O-葡萄糖苷	b	Lyu et al., 2020
<i>EKF3URhaT</i>	朝鲜淫羊藿	体外功能验证:分别催化淫羊藿素和多种不带异戊烯基黄酮醇的C3-OH鼠李糖基化,生成宝藿苷I和不含异戊烯基的黄酮醇-3-O-鼠李糖苷	b	Lyu et al., 2020
<i>EpGT60</i>	柔毛淫羊藿	体外功能验证:分别催化8-异戊烯基山奈酚和淫羊藿素的C3-OH鼠李糖基化,生成宝藿苷II和宝藿苷I	b	Yao et al., 2022a
<i>EpPF3RT</i>	拟巫山淫羊藿	体外功能验证:分别催化淫羊藿素、8-异戊烯基山奈酚、山奈酚和山奈素的C3-OH鼠李糖基化,生成宝藿苷I、宝藿苷II、山奈酚-3-O-鼠李糖苷和山奈素-3-O-鼠李糖苷	b	Feng et al., 2018
<i>Ep7GT (EpGT8)</i>	拟巫山淫羊藿	体外功能验证:分别催化宝藿苷I、宝藿苷II和山奈酚的C7-OH葡萄糖基化,生成淫羊藿苷、朝藿定A和山奈酚-7-O-葡萄糖苷	b	Feng et al., 2019
<i>EsGT1</i>	箭叶淫羊藿	体外功能验证:分别催化宝藿苷I和山奈酚的C7-OH葡萄糖基化,生成淫羊藿苷和山奈酚-7-O-葡萄糖苷	b	Yang et al., 2020
<i>EwGGTa</i>	巫山淫羊藿	体外功能验证:催化鼠李糖2"-OH位加1分子葡萄糖,使淫羊藿苷生成朝藿定A	b	虞沂等, 2022
<i>EwGGTb</i>	巫山淫羊藿	体外功能验证:催化鼠李糖2"-OH位加1分子木糖,使淫羊藿苷生成朝藿定B	b	虞沂等, 2022
<i>EpF3R2"XylT</i>	柔毛淫羊藿	体外功能验证:催化鼠李糖2"-OH位加1分子木糖,分别使淫羊藿苷、宝藿苷I、宝藿苷II和朝藿定A生成朝藿定B、箭藿苷B、大花淫羊藿苷F和淫羊藿苷E	b	Yao et al., 2022b

a、b以及4种主要活性成分同表1。
a, b, and four main active ingredients are the same as shown in Table 1.

同时具有FLS和F3H活性。FLS是黄酮醇合成的关键酶, 与二氢黄酮醇还原酶(DFR) (下游产物为花青素和原花青素)共同竞争底物二氢黄酮醇。

在淫羊藿中鉴定到3个FLS基因。箭叶淫羊藿*EsFLS* (Zeng et al., 2013a; Huang et al., 2015)和拟巫山淫羊藿*eppsFLS1* (Pan et al., 2017)通过克隆得到, *EpFLS3* (Xu et al., 2023)通过同源比对获得。3个基因都与黄酮含量相关。对*eppsFLS1*进行体外功能验证(潘俊倩, 2017), 发现其分别催化二氢山奈酚和二氢槲皮素生成山奈酚和槲皮素。

3.2.2 异戊烯基转移酶

植物中UbiA超家族的芳香族异戊烯基转移酶可将异戊烯基转移到酚类母核上, 该酶是定位于叶绿体的一种膜蛋白(Wang et al., 2015)。根据底物的不同, 植物芳香族异戊烯基转移酶分为初生代谢相关的异戊烯基转移酶(primary metabolite-related prenyltransferases, PMPTs)和次生代谢相关的异戊烯基转移酶(polyphenolic prenyltransferases, PHPTs)两大类。已发现的植物中合成异戊烯基取代酚类次生代谢产物的PT来自PHPTs (de Bruijn et al., 2020)。

在淫羊藿中已发现3个PT基因, 即箭叶淫羊藿*EsPT2* (Wang et al., 2021)、柔毛淫羊藿*EpPT8* (Shen et al., 2022a)以及朝鲜淫羊藿*EkF8DT3* (周景文等, 2023a), 均能催化山奈酚合成8-异戊烯基山奈酚。此外, 还发现*EsPT2*和*EpPT8*仅有9个氨基酸残基的差异, 且2个基因都以山奈酚为最适底物。而*EsPT2*还催化山奈素(kaempferide)和柚皮素(naringenin), *EpPT8*对槲皮素(quercetin)、异鼠李素(isorhamnetin)、高良姜素(galangin)等黄酮醇及漆黄素(fisetin)和芹菜素(apigenin)等黄酮有微弱的催化功能。

3.2.3 氧甲基转移酶

氧甲基转移酶能够把S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)供体上的甲基转移到受体化合物羟基的氧原子上。植物中的OMT分为两大类: CCoA-OMT (Caffeoyl-CoA OMT)和COMT (Caffeic acid OMT) (Lu et al., 2022)。参与植物类黄酮甲基化修饰的主要为COMT, 也有部分CCoAOMT。

目前, 仅从朝鲜淫羊藿中鉴定了*EkF4'OMT1*, 其对8-异戊烯基山奈酚的C4'-OH进行甲基化修饰, 生成

淫羊藿素(8-异戊烯基山奈素) (周景文等, 2023b)。

3.2.4 尿苷二磷酸糖基转移酶

尿苷二磷酸糖基转移酶(UDP-glycosyltransferase, UGT)是以尿苷二磷酸(Uridine diphosphate, UDP)活化的糖分子为糖基供体的糖基转移酶, 是植物中最大的糖基转移酶超家族(Vogt and Jones, 2000)。UGT分为17个组(A-Q), 其中与黄酮类成分糖基修饰相关的UGT基因位于A、B、C、D和F组。植物中糖基化黄酮醇及花青素3-OH的UGT通常在F组, 而糖基化黄酮醇7-OH和4'-OH的UGT通常来自B、C或D组, 糖基化黄酮醇糖苷及花青素糖苷的UGT通常在A组(Wilson and Tian, 2019; Yao et al., 2022a)。

目前已从拟巫山淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、朝鲜淫羊藿和巫山淫羊藿中发现12个糖基转移酶基因(Huang et al., 2015; Feng et al., 2018, 2019; Lyu et al., 2020; Yang et al., 2020; 虞沂等, 2022; Yao et al., 2022a, 2022b), 其中仅2个糖基转移酶(Huang et al., 2015)基因*EsUF3GT*和*EsUF7GT*未进行功能验证。已进行功能验证的基因中, 包含5个类黄酮3-O-糖基转移酶基因(1个半乳糖基转移酶基因(*EkF3UGalT*)、1个葡萄糖基转移酶基因(*EkF3UGluT*)和3个鼠李糖基转移酶基因(*EkF3URhaT*、*EpGT60*和*EpPF3RT*)、2个类黄酮7-O-葡萄糖基转移酶基因(*Ep7GT*和*EsGT1*)和3个3-O-鼠李糖苷: 2"-O-糖基转移酶基因(1个2"-O-葡萄糖基转移酶基因(*EwGGTa*)和2个2"-O-木糖基转移酶基因(*EwGGTb*和*EpF3R2"XylT*))。其中, *EpPF3RT*、*EpGT60*、*EpF3R2"XylT*、*EkF3URhaT*、*EwGGTa*以及*EwGGTb*属于A组UGT79家族, *EsGT1*属于A组UGT94家族, *Ep7GT*属于D组UGT73家族, *EkF3UGluT*和*EkF3UGalT*属于F组UGT78家族。A组UGT79家族不仅包含所有的GGT, 也包含部分3GT和7GT基因, 它们具有不同的修饰位点, 这些基因可能来自在专门识别8-异戊烯基取代的类黄酮底物时发生的扩张。

已鉴定的基因可用于利用8-异戊烯基山奈酚(8-prenylkaempferol)和8-异戊烯基山奈素(8-prenylkaempferide)合成淫羊藿中宝藿苷II、宝藿苷I、淫羊藿苷、淫羊藿苷A (Epimemoside A)、朝藿定A及朝藿定B。但是主要活性成分朝藿定C合成途径的关键UGT基因尚未被鉴定。

通过对糖基转移酶的归纳总结,发现不同的淫羊藿物种具有功能相似的糖基转移酶,但其特异性底物可能存在差异。3个异戊烯基黄酮醇3-O-鼠李糖基转移酶(EkF3URhaT、EpGT60和EpPF3RT)中,EpGT60不能催化山奈酚的糖基修饰,仅能识别C-8位上具有异戊烯基修饰的黄酮醇,如8-异戊烯基山奈酚和淫羊藿素;而EpPF3RT和EkF3URhaT既可识别以淫羊藿素为代表的8-异戊烯基黄酮醇,也可糖基化不含异戊烯基的山奈酚。因此,不同淫羊藿物种中,EpGT60与其直系同源基因的糖基化可能存在功能分化。2个异戊烯基黄酮醇7-O-葡萄糖基转移酶(Ep7GT和EsGT1),EsGT1属于A组,能够将葡萄糖转移到宝藿苷I和山奈酚的7-OH位;而具有类似功能的Ep7GT属于D组,可在体外特异性转移葡萄糖基到宝藿苷I、宝藿苷II及山奈酚,显示出罕见的广泛供体底物选择性。2个3-O-鼠李糖苷:2"-O-木糖基转移酶(EwGGTb和EpF3R2"XylIT)均可催化淫羊藿苷生成朝藿定A,但EpF3R2"XylIT对宝藿苷I、宝藿苷II和朝藿定A均具有催化活性,并且发现EpF3R2"XylIT对于底物是否有C-8异戊烯基修饰以及是否具有3-O-鼠李糖基化有严格的选择性,无异戊烯基修饰的黄酮醇糖苷(如山奈酚-3-O-鼠李糖苷)和无3-O-鼠李糖基化的异戊烯基黄酮醇(如淫羊藿次苷)均不能被催化。

3.3 淫羊藿花青素支路基因

目前,从箭叶淫羊藿、拟巫山淫羊藿和柔毛淫羊藿中克隆到1个F3'H、1个F3'5'H、2个DFR、1个ANS

(Huang et al., 2012, 2015; Zeng et al., 2013a)和1个UGT编码基因(姚宇, 2023)(表3)。除UGT基因外,均未进行功能验证。

3.3.1 类黄酮-3'-羟化酶和类黄酮-3',5'-羟化酶

类黄酮-3'-羟化酶(F3'H)以及类黄酮-3',5'-羟化酶(F3'5'H)分别属于细胞色素P450 (cytochrome P450, CYP450)超家族CYP75家族下CYP75B和CYP75A亚家族成员。

Huang等(2012)克隆到EsF3'H和EsF3'5'H,这2个基因均与箭叶淫羊藿叶片的花青素积累模式呈正相关。它们在绿色和红色的老叶、红色嫩叶、叶柄、花蕾、花和根组织中均被检测到,且在红色嫩叶和紫红色花蕾中表达量较其它组织高。

3.3.2 二氢黄酮醇-4-还原酶和花青素合酶

二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)是SDR超家族SDR108E家族成员(Moummou et al., 2012),是花青素代谢途径的第1个酶。不同的DFR底物选择决定了植物中花青素的种类和含量,从而使植物最终呈不同的颜色。

花青素合酶(ANS)与F3H及FLS都属于2-ODDs超家族中的DOXC亚家族成员(Kawai et al., 2014)。部分物种的ANS被认为还具有FLS或F3H的功能(Turnbull et al., 2000; Zhang et al., 2016)。

Huang等(2015)发现EsANS在箭叶淫羊藿红色嫩叶中的表达水平高于绿色老叶,而EsDFR1和EsDFR2在绿色老叶中的表达水平高于红色嫩叶。

表3 淫羊藿属植物中花青素合成途径基因

Table 3 Genes in the anthocyanin pathways in *Epimedium* plants

基因名	物种	功能	验证方法	参考文献
EsF3'H、EsF3'5'H和EsANS	箭叶淫羊藿	表达模式与叶片花青素的积累模式呈正相关	a	Huang et al., 2012, 2015; Zeng et al., 2013a
EsDFR1	箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式无显著相关性	a	Zeng et al., 2013a; Huang et al., 2015
EsDFR2	箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式呈负相关	a	Huang et al., 2012, 2015; Zeng et al., 2013a
EpGT43	柔毛淫羊藿	体外功能验证:以UDP-葡萄糖为供体,催化矢车菊素3-O-鼠李糖苷。推测其酶活产物可能为矢车菊素3-O-(2-O-(葡萄糖基))-鼠李糖苷	b, c	姚宇, 2023

b: 酶活性分析。a、c和4种主要活性成分同表1。
b: Enzyme activity assay. a, c, and four main active ingredients are the same as shown in Table 1.

3.3.3 尿苷二磷酸糖基转移酶

姚宇(2023)从柔毛淫羊藿A组UGT79家族中鉴定到1个葡萄糖基转移酶基因*EpGT43*,可修饰花青素3-O-鼠李糖糖苷,推测其修饰位点为鼠李糖上2"-OH位。通过进化树和序列比对分析表明,*EpGT43*属于GGT分支,并与圆叶牵牛(*Ipomoea purpurea*)的*UGT79G16*相似度最高。*UGT79G16*能够在花青素3-O-葡萄糖苷的2"-OH添加葡萄糖,推断*EpGT43*催化矢车菊素3-O-鼠李糖的酶活产物可能为矢车菊素3-O-(2-O-(葡萄糖基))-鼠李糖苷。具体结构有待进一步研究。

4 淫羊藿类黄酮的合成调控

类黄酮在植物不同组织和器官中的种类及含量差异较大。参与其生物合成调控的因子包括转录因子、长链非编码RNA (long non-coding RNA, LncRNA)、非编码单链小RNA (microRNA, miRNA)、DNA甲基化和蛋白质泛素化等(Hu et al., 2016; Liu et al., 2020;

Chen et al., 2023)。其中,对转录因子调控的研究最多,主要包括MYB、bHLH和WD40这3类转录因子(Liu et al., 2015; Xu et al., 2015)。转录因子通过与结构基因启动子对应的顺式作用元件结合来调节类黄酮生物合成结构基因的表达。其它转录因子(如bZIP、WRKY、HD-ZIP和HY5)也参与类黄酮生物合成的调控(Stracke et al., 2010; Jiang et al., 2017; Li et al., 2020)。

迄今为止,已在箭叶淫羊藿中获得16个R2R3-MYB转录因子(*EsMYB1–EsMYB13*、*EsMYBA1*、*EsMYBF1*和*EsAN2*)、2个bHLH转录因子(*EsGL3*和*EsTT8*)和1个WD40基因(*EsTTG1*) (Zeng et al., 2013a)。其中*EsMYB9*、*EsMYBA1*、*EsMYBF1*以及*EsAN2*已成功功能验证(Huang et al., 2013a, 2013b, 2015, 2016a, 2016b, 2017; Zeng et al., 2013a)。在柔毛淫羊藿中,通过同源比对获得6个MYB、1个bZIP和1个WRKY转录因子(表4)。对淫羊藿类黄酮的调控研究还比较匮乏。

表4 淫羊藿属植物中转录因子基因

Table 4 Transcription factor genes in *Epimedium* plants

基因名	物种	功能	验证方法	参考文献
<i>EsMYB1</i>	箭叶淫羊藿	与拟南芥中负调控肉桂酸-4-羟化酶的 <i>AtMYB4</i> 基因高度同源,推测其为类黄酮生物合成转录抑制因子	b	Huang et al., 2013b
<i>EsMYB5</i> 和 <i>EsMYB11</i>	箭叶淫羊藿	与葡萄中调控原花青素生物合成的 <i>VvMYB-PA2</i> 具有约50%的相似性,推测其参与原花青素积累	b	Huang et al., 2013b
<i>EsMYB7</i> 和 <i>EsMYB10</i>	箭叶淫羊藿	与拟南芥中调控原花青素生物合成的 <i>AtTT2 (AtMYB123)</i> 高度同源,推测其参与调节种皮中原花青素的积累	b	Huang et al., 2013b
<i>EsMYB9</i>	箭叶淫羊藿	单独作用时轻微激活 <i>EsCHS</i> 的启动子或与bHLH (<i>EsTT8</i>)相互作用强烈激活 <i>EsCHS</i> 、 <i>EsF3H</i> 、 <i>EsDFR1</i> 、 <i>EsDFR2</i> 和 <i>EsANS</i> 的启动子,正调控花青素和黄酮醇的生物合成	a, c	Huang et al., 2013b, 2017
<i>EsMYB12</i>	箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式呈负相关	a, b	Huang et al., 2013b, 2015
<i>EsMYBA1</i>	箭叶淫羊藿	单独作用或者与bHLH (<i>EsTT8</i>)相互作用激活 <i>EsDFR</i> 和 <i>EsANS</i> 的启动子,正调控花青素的生物合成	a, c	Huang et al., 2013a, 2015
<i>EsMYBF1</i>	箭叶淫羊藿	强烈激活 <i>EsF3H</i> 和 <i>EsFLS</i> 的启动子,正调控叶片4种主要活性成分的生物合成	a, c	Huang et al., 2015, 2016a
<i>EsAN2</i> (MYB)	箭叶淫羊藿	单独作用或与bHLH (<i>EsTT8</i>)相互作用激活早期和晚期花青素途径基因,正调控花青素的生物合成	a, c	Huang et al., 2016b

表4 (续)

Table 4 (continued)

基因名	物种	功能	验证方法	参考文献
<i>Ebr05G057070</i> 、 <i>Ebr05G003750</i> 、 <i>Ebr05G010200</i> 、 <i>Ebr05G056880</i> 、 <i>Ebr01G039680</i> 、 <i>Ebr01G039880</i> (MYB)、 <i>EsGL3</i> (bHLH)、 <i>EsTTG1</i> (WD40)、 <i>Ebr05G038380</i> (bZIP) 和 <i>Ebr03G071730</i> (WRKY)	柔毛淫羊藿和箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式呈正相关	a	Huang et al., 2015; Xu et al., 2023
<i>EsTT8</i> (bHLH)	箭叶淫羊藿	表达模式与4种主要活性成分的积累模式呈负相关	a	Huang et al., 2013a, 2015, 2016b, 2017

b: 序列比对或系统发育分析; c: 异源表达和酵母双杂交检测。a及4种主要活性成分同表1。
b: Sequence alignment or phylogenetic analysis; c: Heterologous expression and yeast two hybrid detection. a, and four main active ingredients are the same as shown in Table 1.

5 研究展望

淫羊藿的药用品质取决于其黄酮醇苷类成分含量。因此, 推进淫羊藿类黄酮生物合成和调控研究, 对于提高淫羊藿药材品质及其合成生物学和分子育种研究具有指导意义。

目前, 已在多个淫羊藿物种中鉴定并功能验证了除*C4H* (该基因在柔毛淫羊藿基因组中为单拷贝)和合成朝藿定C的糖基转移酶基因外的所有合成通路基因, 但对调控基因的研究仍显薄弱, 仅4个基因完成了克隆和功能验证。挖掘并解析调控基因对于揭示淫羊藿不同物种、不同组织器官以及响应不同环境因子的成分含量意义重大。Xu等(2023)结合叶片发育时间序列转录组揭示了3条药用黄酮醇调控路径与转录因子之间、转录因子与合成通路基因间的复杂调控关系, 上述转录因子对淫羊藿黄酮醇苷自然变异的调控机制仍有待进一步研究。

近年来, 合成生物学通过构建微生物细胞代谢途径, 已实现多个参与类黄酮生物合成的基因在微生物体内表达以及异戊烯基类黄酮的合成(Dong et al., 2007; Kawamura et al., 2012)。已实现淫羊藿素酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的生物合成(Wang et al., 2021), 但多数方法步骤复杂且费用较高(Gani et al., 2023)。异戊烯化类黄酮的合成生物学研究仍需完善反应方案及开发廉价高效的工序, 以实现高效高质高产。对于淫羊藿类黄酮的生物合成, 有必要进一步开展合成通路基因的完整解析, 包括朝藿定C合成途径的关键*UGT*基因, 并探索高效基因; 利用多组学技术挖掘关键调

控基因; 优化现有的异戊烯化类黄酮合成生物学体系, 实现高效高质合成。

作者贡献声明

范雪兰: 撰写论文; 落艳娇, 徐超群: 撰写论文及指导论文写作; 郭宝林: 构思并设计文章结构框架。

参考文献

Chen S, Wang XJ, Cheng Y, Gao HS, Chen XH (2023). A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. *Molecules* **28**, 4982.

de Bruijn WJC, Levisson M, Beekwilder J, van Berkel WJH, Vincken JP (2020). Plant aromatic prenyltransferases: tools for microbial cell factories. *Trends Biotechnol* **38**, 917–934.

Dong XW, Fan YJ, Yu LJ, Hu YZ (2007). Synthesis of four natural prenylflavonoids and their estrogen-like activities. *Arch Pharm* **340**, 372–376.

Feng KP, Chen RD, Xie KB, Chen DW, Guo BL, Liu X, Liu JM, Zhang M, Dai JG (2018). A regiospecific rhamnosyltransferase from *Epimedium pseudowushanense* catalyzes the 3-O-rhamnosylation of prenylflavonols. *Org Biomol Chem* **16**, 452–458.

Feng KP, Chen RD, Xie KB, Chen DW, Liu JM, Du WY, Yang L, Dai JG (2019). *Ep7GT*, a glycosyltransferase with sugar donor flexibility from *Epimedium pseudowushanense*, catalyzes the 7-O-glycosylation of baohuoside. *Org Biomol Chem* **17**, 8106–8114.

Gani I, Jameel S, Bhat SA, Amin H, Bhat KA (2023). Prenylated flavonoids of genus *Epimedium*: phytochemistry, estimation and synthesis. *Chemistry Select* **8**, e20-

- 2204263.
- Hu DG, Sun CH, Zhang QY, An JP, You CX, Hao YJ** (2016). Glucose sensor MdHXK1 phosphorylates and stabilizes MdbHLH3 to promote anthocyanin biosynthesis in apple. *PLoS Genet* **12**, e1006273.
- Huang WJ, Khaldun ABM, Chen JJ, Zhang CJ, Lv HY, Yuan L, Wang Y** (2016a). A R2R3-MYB transcription factor regulates the flavonol biosynthetic pathway in a traditional Chinese medicinal plant, *Epimedium sagittatum*. *Front Plant Sci* **7**, 1089.
- Huang WJ, Khaldun ABM, Lv HY, Du LW, Zhang CJ, Wang Y** (2016b). Isolation and functional characterization of a R2R3-MYB regulator of the anthocyanin biosynthetic pathway from *Epimedium sagittatum*. *Plant Cell Rep* **35**, 883–894.
- Huang WJ, Lv HY, Wang Y** (2017). Functional characterization of a novel R2R3-MYB transcription factor modulating the flavonoid biosynthetic pathway from *Epimedium sagittatum*. *Front Plant Sci* **8**, 1274.
- Huang WJ, Sun W, Lv HY, Luo M, Zeng SH, Pattanaik S, Yuan L, Wang Y** (2013a). A R2R3-MYB transcription factor from *Epimedium sagittatum* regulates the flavonoid biosynthetic pathway. *PLoS One* **8**, e70778.
- Huang WJ, Sun W, Lv HY, Xiao G, Zeng SH, Wang Y** (2013b). Isolation and molecular characterization of thirteen R2R3-MYB transcription factors from *Epimedium sagittatum*. *Int J Mol Sci* **14**, 594–610.
- Huang WJ, Sun W, Wang Y** (2012). Isolation and molecular characterisation of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes from a traditional Chinese medicinal plant, *Epimedium sagittatum*. *Gene* **497**, 125–130.
- Huang WJ, Zeng SH, Xiao G, Wei GY, Liao SH, Chen JJ, Sun W, Lv HY, Wang Y** (2015). Elucidating the biosynthetic and regulatory mechanisms of flavonoid-derived bioactive components in *Epimedium sagittatum*. *Front Plant Sci* **6**, 689.
- Jiang J, Song J, Jia XB** (2015). Phytochemistry and ethnopharmacology of *Epimedium* L. species. *Chin Herb Med* **7**, 204–222.
- Jiang YH, Liu CH, Yan D, Wen XH, Liu YL, Wang HJ, Dai JY, Zhang YJ, Liu YF, Zhou B, Ren XL** (2017). MdHB1 down-regulation activates anthocyanin biosynthesis in the white-fleshed apple cultivar 'Granny Smith'. *J Exp Bot* **68**, 1055–1069.
- Kawai Y, Ono E, Mizutani M** (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant J* **78**, 328–343.
- Kawamura T, Hayashi M, Mukai R, Terao J, Nemoto H** (2012). An efficient method for C8-prenylation of flavonols and flavanones. *Synthesis* **44**, 1308–1314.
- Kim DH, Jung HA, Sohn HS, Kim JW, Choi JS** (2017). Potential of icariin metabolites from *Epimedium koreanum* Nakai as antidiabetic therapeutic agents. *Molecules* **22**, 986.
- Li C, Wu J, Hu KD, Wei SW, Sun HY, Hu LY, Han Z, Yao GF, Zhang H** (2020). PyWRKY26 and PybHLH3 cotargeted the PyMYB114 promoter to regulate anthocyanin biosynthesis and transport in red-skinned pears. *Hortic Res* **7**, 37.
- Lin CC, Chen DW, Dai JG** (2022). Advances of synthetic biology of flavonoids. *Acta Pharm Sin* **57**, 1322–1335. (in Chinese)
- 林春草, 陈大伟, 戴均贵** (2022). 黄酮类化合物合成生物学研究进展. *药学报* **57**, 1322–1335.
- Liu JY, Osbourn A, Ma PD** (2015). MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. *Mol Plant* **8**, 689–708.
- Liu SA, Wang L, Cao M, Pang SY, Li WX, Kato-Noguchi H, Jin B, Wang L** (2020). Identification and characterization of long non-coding RNAs regulating flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* leaves. *Ind Crops Prod* **158**, 112980.
- Liu WX, Feng Y, Yu SH, Fan ZQ, Li XL, Li JY, Yin HF** (2021a). The flavonoid biosynthesis network in plants. *Int J Mol Sci* **22**, 12824.
- Liu YT, Wu LR, Deng ZX, Yu Y** (2021b). Two putative parallel pathways for naringenin biosynthesis in *Epimedium wushanense*. *RSC Adv* **11**, 13919–13927.
- Lu SW, Zhuge YX, Hao TY, Liu ZJ, Zhang MW, Fang JG** (2022). Systematic analysis reveals O-methyltransferase gene family members involved in flavonoid biosynthesis in grape. *Plant Physiol Biochem* **173**, 33–45.
- Lyu YB, Liu SK, Gao S, Zhou JW** (2020). Identification and characterization of three flavonoid 3-O-glycosyltransferases from *Epimedium koreanum* Nakai. *Biochem Eng J* **163**, 107759.
- Ma HP, He XR, Yang Y, Li MX, Hao DJ, Jia ZP** (2011). The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol* **134**, 519–541.
- Mi YL, He RK, Wan HH, Meng XX, Liu D, Huang WJ, Zhang YJ, Yousaf Z, Huang HW, Chen SL, Wang Y, Sun W** (2023). Genetic and molecular analysis of the anthocyanin pigmentation pathway in *Epimedium*. *Front Plant Sci* **14**, 1133616.

- Moummou H, Kallberg Y, Tonfack LB, Persson B, van der Rest B (2012). The plant short-chain dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns. *BMC Plant Biol* **12**, 219.
- Pan JQ (2017). The Effects and Molecular Mechanism of Light on the Physiological Characteristics and Flavonoid Synthesis in *Epimedium pseudowushanense* B.L.Guo. PhD dissertation. Beijing: Peking Union Medical College. pp. 1–164. (in Chinese)
- 潘俊倩 (2017). 光影响拟巫山淫羊藿生理特性以及黄酮类化合物合成的分子机制初步研究. 博士论文. 北京: 北京协和医学院. pp. 1–164.
- Pan JQ, Chen HM, Guo BL, Liu C (2017). Understanding the molecular mechanisms underlying the effects of light intensity on flavonoid production by RNA-seq analysis in *Epimedium pseudowushanense* B.L.Guo. *PLoS One* **12**, e0182348.
- Qin WH, Yang Y, Wang YH, Zhang XM, Liu X (2022). Transcriptomic and metabolomic analysis reveals the difference between large and small flower taxa of *Herba Epimedii* during flavonoid accumulation. *Sci Rep* **12**, 2762.
- Ren L, Dai SL, Wang Y (2008). The germplasm resources of *Epimedium* in China and its application in landscape architecture. *J Wuhan Bot Res* **26**, 644–649. (in Chinese)
- 任琳, 戴思兰, 王瑛 (2008). 淫羊藿属植物种质资源及其园林应用. *武汉植物学研究* **26**, 644–649.
- Schijlen EGWM, de Vos CHR, Martens S, Jonker HH, Rosin FM, Molthoff JW, Tikunov YM, Angenent GC, van Tunen AJ, Bovy AG (2007). RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiol* **144**, 1520–1530.
- Shen GA, Luo YJ, Yao Y, Meng GQ, Zhang YX, Wang YY, Xu CQ, Liu X, Zhang C, Ding G, Pang YZ, Zhang H, Guo BL (2022a). The discovery of a key prenyltransferase gene assisted by a chromosome-level *Epimedium pubescens* genome. *Front Plant Sci* **13**, 1034943.
- Shen N, Wang TF, Gan Q, Liu SA, Wang L, Jin B (2022b). Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem* **383**, 132531.
- Stracke R, Favory JJ, Gruber H, Bartelniewoehner L, Bartels S, Binkert M, Funk M, Weisshaar B, Ulm R (2010). The *Arabidopsis* bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the *PFG1/MYB12* gene in response to light and ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Environ* **33**, 88–103.
- Turnbull JJ, Sobey WJ, Aplin RT, Hassan A, Firmin JL, Schofield CJ, Prescott AG (2000). Are anthocyanidins the immediate products of anthocyanidin synthase? *Chem Commun* (24), 2473–2474.
- Vogt T, Jones P (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* **5**, 380–386.
- Wang J, Chu SS, Zhu Y, Cheng H, Yu DY (2015). Positive selection drives neofunctionalization of the UbiA prenyltransferase gene family. *Plant Mol Biol* **87**, 383–394.
- Wang PP, Li CJ, Li XD, Huang WJ, Wang Y, Wang JL, Zhang YJ, Yang XM, Yan X, Wang Y, Zhou ZH (2021). Complete biosynthesis of the potential medicine icaritin by engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Sci Bull* **66**, 1906–1916.
- Wilson AE, Tian L (2019). Phylogenomic analysis of UDP-dependent glycosyltransferases provides insights into the evolutionary landscape of glycosylation in plant metabolism. *Plant J* **100**, 1273–1288.
- Xu CQ, Liu X, Shen GA, Fan XL, Zhang Y, Sun C, Suo FM, Guo BL (2023). Time-series transcriptome provides insights into the gene regulation network involved in the icaritin-flavonoid metabolism during the leaf development of *Epimedium pubescens*. *Front Plant Sci* **14**, 1183481.
- Xu WJ, Dubos C, Lepiniec L (2015). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends Plant Sci* **20**, 176–185.
- Yang XM, Chen JJ, Huang WJ, Zhang YJ, Yan X, Zhou ZH, Wang Y (2020). Synthesis of icaritin in tobacco leaf by overexpression of a glucosyltransferase gene from *Epimedium sagittatum*. *Ind Crops Prod* **156**, 112841.
- Yao Y (2023). Cloning and Characterization of UDP-glycosyltransferases UGT79 Family of *Epimedium pubescens*. PhD dissertation. Beijing: Peking Union Medical College. pp. 1–126. (in Chinese)
- 姚宇 (2023). 柔毛淫羊藿糖基转移酶UGT79家族基因的克隆及功能研究. 博士论文. 北京: 北京协和医学院. pp. 1–126.
- Yao Y, Gu JJ, Luo YJ, Wang YY, Pang YZ, Shen GA, Guo BL (2022a). Genome-wide analysis of UGT gene family identified key gene for the biosynthesis of bioactive flavonol glycosides in *Epimedium pubescens* Maxim. *Synth Syst Biotechnol* **7**, 1095–1107.
- Yao Y, Gu JJ, Luo YJ, Zhang YX, Wang YY, Pang YZ, Jia SG, Xu CQ, Li DD, Suo FM, Shen GA, Guo BL (2022b). A novel 3-O-rhamnoside: 2"-O-xylosyltransferase responsible for terminal modification of prenylflavonol glycosides in *Epimedium pubescens* Maxim. *Int J Mol Sci* **23**, 16050.

- Yoshitama K** (1984). Anthocyanins and their distribution in the genus *Epimedium*. *Bot Mag Tokyo* **97**, 429–435.
- Yu Y, Cao YL, Liu YT** (2022). Glycosyltransferase and its coding gene for the synthesis of Epimedin and its applications. Chinese patent, ZL202111673688.6. 2021-12-31. (in Chinese)
- 虞沂, 曹应龙, 刘亚婷 (2022). 朝藿定合成用糖苷糖基转移酶及其编码基因和应用. 中国专利, ZL202111673688.6. 2021-12-31.
- Zeng SH, Liu YL, Hu WM, Liu YL, Shen XF, Wang Y** (2013a). Integrated transcriptional and phytochemical analyses of the flavonoid biosynthesis pathway in *Epimedium*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **115**, 355–365.
- Zeng SH, Liu YL, Zou CY, Huang WJ, Wang Y** (2013b). Cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase in medicinal *Epimedium* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **113**, 257–267.
- Zhang DW, Cheng Y, Wang NL, Zhang JC, Yang MS, Yao XS** (2008). Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Phytomedicine* **15**, 55–61.
- Zhang HR, Du C, Wang Y, Wang J, Zheng LL, Wang YC** (2016). The *Reaumuria trigyna* leucoanthocyanidin dioxygenase (*RtLDOX*) gene complements anthocyanidin synthesis and increases the salt tolerance potential of a transgenic *Arabidopsis LDOX* mutant. *Plant Physiol Biochem* **106**, 278–287.
- Zhang YX, Zhang C, Li ZH, Zeng C, Xue Z, Li EW, Li G, Li J, Shen GA, Xu CQ, Wang YY, Ma BP, Zhang H, Guo BL** (2022). New 8-prenylated quercetin glycosides from the flowers of *Epimedium acuminatum* and their testosterone production-promoting activities. *Front Chem* **10**, 1014110.
- Zhao H, Guo YM, Li S, Han RQ, Ying JM, Zhu H, Wang YY, Yin L, Han YQ, Sun LZ, Wang ZY, Lin QC, Bi XY, Jiao YC, Jia HY, Zhao JJ, Huang Z, Li ZY, Zhou JG, Song W, Meng K, Cai JQ** (2015). A novel anti-cancer agent Icaritin suppresses hepatocellular carcinoma initiation and malignant growth through the IL-6/Jak2/Stat3 pathway. *Oncotarget* **6**, 31927–31943.
- Zhao JY, Ohba S, Shinkai M, Chung UI, Nagamune T** (2008). Icaritin induces osteogenic differentiation *in vitro* in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 444–448.
- Zhou JW, Gao S, Chen J, Zeng WZ, Yu SQ** (2023a). A flavonoid 4'-O-methyltransferase derived from *Epimedium koreanum* and its application. Chinese patent, CN2021-11098372.9. 2021-09-18. (in Chinese)
- 周景文, 高松, 陈坚, 曾伟主, 余世琴 (2023a). 一种来源于朝鲜淫羊藿的黄酮4'-O-甲基转移酶及其应用. 中国专利, CN202111098372.9. 2021-09-18.
- Zhou JW, Yu SQ, Chen J, Zeng WZ, Gao S** (2023b). A flavonoid 8-isoprenyl transferase derived from *Epimedium koreanum* Nakai and its application. Chinese patent, CN2021-11098375.2. 2021-09-18. (in Chinese)
- 周景文, 余世琴, 陈坚, 曾伟主, 高松 (2023b). 一种朝鲜淫羊藿来源的黄酮8-异戊烯基转移酶及其应用. 中国专利, CN202111098375.2. 2021-09-18.
- Zhu JF, Li ZJ, Zhang GS, Meng K, Kuang WY, Li J, Zhou XF, Li RJ, Peng HL, Dai CW, Shen JK, Gong FJ, Xu YX, Liu SF** (2011). Icaritin shows potent anti-leukemia activity on chronic myeloid leukemia *in vitro* and *in vivo* by regulating MAPK/ERK/JNK and JAK2/STAT3/AKT signalings. *PLoS One* **6**, e23720.

Research Progress on Genes Related to Flavonoids Biosynthesis in *Herba Epimedii*

Xuelan Fan^{1, 2†}, Yanjiao Luo^{1, 3†}, Chaoqun Xu^{1*}, Baolin Guo^{1*}

¹Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicines, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; ²Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000, China; ³Institute of Traditional Chinese Medicine Health Industry, China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanchang 330000, China

Abstract *Herba Epimedii* is a traditional Chinese herb medicine (TCM) with a long history. Research on *Herba Epimedii* has attracted much attention in China due to its high medicinal value. C8-prenylated flavonol glycosides (PFGs) have been demonstrated to be the main bioactive components in *Epimedium brevicornu*, and their content determines the medicinal quality. Understanding the biosynthesis pathway of PFGs, exploring genes related to PFGs content, and elucidating the regulatory mechanisms of PFGs biosynthesis pathway is fundamental and essential for improving the quality of *E. brevicornu*. Here, we provide a comprehensive review of the research on structural and transcriptional factor genes related to the biosynthesis of PFGs, which not only contributes to unravel the regulatory mechanisms related to PFGs content, but also lay a foundation for research on molecular breeding and the synthetic biology in *Epimedium* plants.

Key words *Herba Epimedii*, flavonol glycosides, biosynthesis, structural genes, regulatory genes

Fan XL, Luo YJ, Xu CQ, Guo BL (2024). Research progress on genes related to flavonoids biosynthesis in *Herba Epimedii*. *Chin Bull Bot* **59**, 834–846.

† These authors contributed equally to this paper

* Authors for correspondence. E-mail: cqunxu@implad.ac.cn; blguo@implad.ac.cn

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者简介

徐超群, 中国医学科学院药用植物研究所助理研究员。主要研究方向为淫羊藿苷类成分的合成调控和高含量品种定向培育。参与国家自然科学基金等多个项目。主持重庆中药研究院开放课题及企业合作横向课题3项, 参与中国医学科学院创新工程以及四川省区域创新合作等项目。以第一作者在 *Frontiers in Plant Science* 和 *Giga Science* 等杂志发表论文10篇。

郭宝林, 研究员, 博士生导师, 中国医学科学院药用植物研究所药用植物鉴定中心副主任; 国家新药评审中心中药资源咨询专家, 中国植物学会药用植物和植物药专业委员会委员。承担国内外科研项目30余项; 发表论文290余篇, 主持编撰《中华医学百科全书·药用植物学》等著作11部; 培育药用植物新品种5个。目前其研究团队结合生产需求, 在药用植物分类鉴定、生理生态、遗传育种等基础上, 进行资源评估、新品种培育、大田栽培等技术研发、服务、评估和咨询; 并基于前沿多组学技术解析植物次生代谢途径, 揭示植物次生代谢的空间分布规律, 发掘和优化次生代谢相关元件, 通过代谢工程或合成生物学技术实现天然药物的绿色高效合成。