

· 专题论坛 ·

异喹啉类生物碱生物合成、运输、储藏相关 细胞生物学研究进展

程巧^{1,2}, 曾建国^{1*}, 乐捷^{2*}

¹湖南农业大学国家中药材生产(湖南)技术中心, 长沙 410128; ²中国科学院植物研究所, 北京 100093

摘要 生物碱是存在于自然界中一类含氮的杂环小分子天然化合物, 约有1.2万多种。其代谢途径往往受到特异酶类的调控, 因此通过对某些特征性关键酶的定位可以确定生物碱的合成、转运和储藏相关的特定细胞或亚细胞结构。该文以异喹啉类生物碱血根碱为主, 对其生物合成、运输和储藏相关的细胞和亚细胞水平上的研究结果进行概述。异喹啉类生物碱生物合成主要发生在皮层、筛管、伴胞和乳汁管等组织细胞中, 囊泡、液泡、细胞质基质、微粒体、内质网和叶绿体类囊体等众多细胞器参与生物碱的运输和储存。同时对药用植物中常见的其它几类主要生物碱的相关研究结果进行了讨论。

关键词 生物碱, 合成, 转运, 储藏, 细胞生物学

程巧, 曾建国, 乐捷 (2014). 异喹啉类生物碱生物合成、运输、储藏相关细胞生物学研究进展. 植物学报 49, 720–728.

生物碱是含氮的杂环小分子天然化合物, 有特定的毒性和药理性, 大约20%的植物可以产生生物碱 (Yazaki, 2006; Facchini and De Luca, 2008)。生物碱一般在特殊的细胞中积累, 它们有特殊的细胞毒性, 具有防御作用 (Hartmann, 2004)。截至目前已发现大约有12 000种生物碱具有生物活性。由于生物碱结构和形式的多样性使得其生物合成途径也不相同 (Facchini and De Luca, 2008)。生物碱的生物合成和积累是在生物和非生物环境控制下完成的 (De Luca and St-Pierre, 2000)。

根据生物碱的基本结构类型可将其分为5类。第1类为异喹啉类生物碱。目前国内外研究表明, 罂粟科、毛茛科、小檗科和防己科等植物中发现的天然异喹啉生物碱大约有2 500种, 如有止痛麻醉效果的吗啡、咳嗽抑制剂、肌肉松弛剂罂粟碱、抗菌剂血根碱和黄连素等。研究人员从罂粟科植物博落回 (*Macleaya cordata*) 中分离得到的白屈菜红碱 (chelirubine)、血根碱 (sanguinarine)、别隐品碱 (allocryptopine) 和原阿片碱 (protopine) 均为异喹啉类生物碱 (罗忠勇等, 2010; 郭宇鸽等, 2011; 李文亮等, 2011)。研究表明, 上述生物碱具有抗肿瘤、抗炎和抗病毒等多种药理作用 (Newman et al., 1999; Blank et al., 2010; 程辟和曾

建国, 2012)。第2类为吡啶类生物碱, 其作为化学生态学中的一个复杂化合物, 同时也对植物有防护作用。对吡啶类生物碱的研究表明, 吡啶类生物碱不像异喹啉生物碱是单一来源的生物碱, 通过对关键酶的定位发现吡啶类生物碱具有多源性 (Hartmann, 2004)。第3类是莨菪烷类生物碱。莨菪生物碱是一类具有抗胆碱效果的化合物, 如莨菪碱和东莨菪碱, 一般出现在莨菪属、颠茄属和曼陀罗属等植物中。第4类为吲哚类生物碱。其有近3 000种结构, 主要出现在夹竹桃科、马钱科、茜草科等植物中。这类生物碱也有很强的生物活性, 如蛇根碱 (利血平) 可作用于神经障碍; 长春花碱和长春新碱可以作为抗肿瘤成分; 壮阳碱可作用于血管舒张等 (Facchini and De Luca, 2008)。第5类为有机胺类生物碱, 如麻黄碱、秋水仙碱和益母草碱等。

通过对生物代谢途径中的关键酶定位, 有助于弄清生物碱的合成、转运、储藏位置, 为人为调控生物碱的合成、运输和储藏多种综合手段提高生物碱产量提供理论依据。鉴于此, 本文将对异喹啉生物碱、吡啶生物碱、吲哚类生物碱和莨菪生物碱的代谢、合成、储藏等相关的细胞生物学研究进展进行综述。

收稿日期: 2013-10-18; 接受日期: 2014-02-25

基金项目: 国家自然科学基金 (No.31200615)、湖南省自然科学基金 (No.12JJ4027) 和国家重点实验室培育基地开放项目 (No.11KFXM04)

* 通讯作者。E-mail: ginkgo@world-way.net; lejje@ibcas.ac.cn

1 生物碱的生物合成途径

为了掌握生物碱的合成、运输和储藏部位,有必要先弄清生物碱生物合成的整个途径。现以异喹啉类生物碱中的血根碱为例进行说明。

异喹啉类生物碱的生物合成途径是从2种酪氨酸衍生物的缩合开始(Facchini and De Luca, 2008),紧接着是一系列的反应形成反式心果碱(De Luca and St-Pierre, 2000),其主要是由苯丙氨酸、色氨酸、赖氨酸和鸟氨酸衍生出来的(Wink, 1999),并产生多巴胺等。反式心果碱是大部分生物碱的中间及普遍的前体物质(De Luca and St-Pierre, 2000; Facchini and De Luca, 2008),在合成血根碱的通路中,小檗碱桥接酶(berberine bridge enzyme, BBE)将反式心果碱转化成金黄紫堇碱。碎叶碱合成酶(cheilanthifoline synthase, CFS)和人血草碱合成酶(stylophine synthase, STS)通常与P450酶系的酶起作用,催化其形成2个亚甲基的桥接并产生反式人血草碱(Liscombe and Facchini, 2007; Vrba et al., 2011)。随后,在四氢化小檗碱-顺式-氮-甲基转移酶(tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase, TNMT)的作用下将人血草碱转化成(S)-顺式-N-甲基人血草碱(Liscombe and Facchini et al., 2007)。另外2个P450酶: N-甲基人血草碱-14羟化酶(N-methylstylophine 14-hydroxylase, MSH)和原阿片碱-6-羟化酶(protopine 6-hydroxylase, P6H)都催化(S)-顺式氮甲基人血草碱转换成6-羟化原阿片碱,然后自发地重新排列形成二氢血根碱(Vrba et al., 2011)。最终,二氢血根碱被二氢苯并啡啉氧化酶(dihydrobenzophenanthridine oxidase, DBOX)氧化成血根碱(Arakawa et al., 1992; Ignatov et al., 1996)(图1)。别隐品碱和白屈菜红碱从金黄紫堇碱的另一个通路开始生物合成,该通路与原阿片碱和血根碱的生物合成相似(Park et al., 2002)。

2 细胞水平上的生物碱合成部位

2.1 异喹啉生物碱的合成部位

通过对罂粟(*Opium poppy*)的代谢研究发现,其生物碱可能是在筛管和伴胞中合成(Facchini and De Luca, 2008)。对代谢酶的研究发现,罂粟含有的络氨

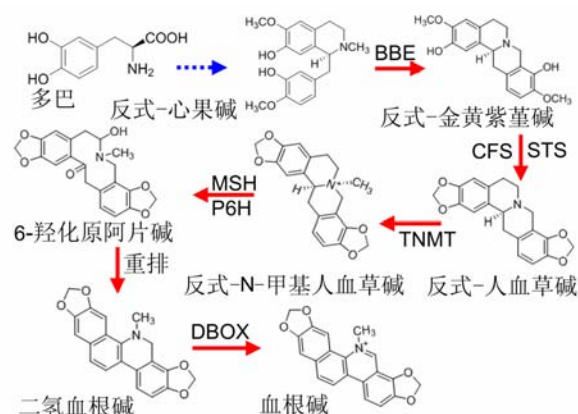


图1 血根碱的代谢途径(Bird et al., 2003; Ziegler and Facchini, 2008)

Figure 1 Sanguinarine metabolic pathways (Bird et al., 2003; Ziegler and Facchini, 2008)

酸多巴脱羧酶的基因表达仅限于茎和根维管组织中的次生韧皮部和初生木质部(De Luca and St-Pierre, 2000)。利用原位杂交技术对罂粟生物碱中的关键酶小檗碱桥接酶的表达进行定位,发现其在大多数器官韧皮部的筛管和伴胞中进行转录,且其它关键酶,如反式-氮-甲基乌药碱-3-羟化酶((S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase, CYP80B1)和可待因还原酶(codeinon reductase, COR)也在同一器官的同一位置表达。对乳汁管的观察发现其在植物的各个器官都有出现,且都出现在小檗碱桥接酶出现位置的周围,直径一般大于30 μm ;同时,对罂粟乳汁的主要成分乳胶蛋白(major latex protein, MLP)的定位发现其仅出现在乳汁管的细胞质处(Facchini and De Luca, 1995; Bird et al., 2003)。研究显示乳汁管与生物碱的储藏相关,而与其合成无关(Bird et al., 2003)。罂粟生物碱合成通路中的第1步起催化作用的酪氨酸脱羧酶的基因转录发生在韧皮部而不是乳汁管,其它的酶,如norcoclaurine 6-O-methyltransferase(6OMT)、CNMT(coclaurine N-methyltransferases)、乌药碱-氮-甲基转移酶、氮-甲基乌药碱3'-羟化酶、3'-羟基-氮-甲基乌药碱4'-甲氧基转移酶和salutaridinol 7-O-acetyltransferase (SalAT)的定位出现在筛管,但其基因转录发生在相关的伴胞中(Samanani et al., 2006)。利用原位杂交法对异喹啉生物碱代谢中间物的定位结果表明,筛管与乳汁管中

成分不同(筛胞中出现的是生物碱生物合成酶, 乳汁管中出现的是生物碱)可能是由于细胞间运输的是合成通路中的酶和产生的中间产物, 而非最终产物。这打破了传统的植物生物学中对筛管功能的定义。目前发现筛管具有运输大分子物质, 如RNA(Jorgensen et al., 1998)、抗坏血酸(Hancock et al., 2003)、茉莉酸(Hause et al., 2003)和有防御作用的化合物的潜能。

利用免疫荧光定位的方法对黄唐松草(*Thalictrum flavum*)中积累的异喹啉生物碱(如黄连素等)进行分析, 表明异喹啉生物合成基因在根和根状茎中表达(Samanani et al., 2005), 根中的9个酶被定位到中柱鞘和邻近的皮层细胞中(图2A中红色和紫色部位所示)(Ziegler and Facchini, 2008)。对小檗科植物的研究发现黄连素在培养细胞的胞内囊泡(intracellular vesicles)(也可能是内质网)中合成(Yazaki, 2006)。小檗碱合成酶基因的转录仅限于根中非成熟区的内皮层细胞和中柱鞘细胞, 还有一部分在叶原基的原表皮层中进行(Samanani et al., 2005)。此外, 对茄科植物的研究发现, 根中的中柱鞘是四氢异喹啉生物碱的制造中心, 中柱鞘最接近木质部, 可能木质部协助其运输生物碱到叶片并积累(De Luca and St-Pierre, 2000)。

2.2 吡啶类生物碱的合成部位

在大麻叶泽兰(*Eupatorium cannabinum*)中, 作为吡啶类生物碱生物合成的关键酶高精脒合酶(homo-spermidine synthase, HSS)出现在根的整体皮层细胞(不包括内皮层和外皮层)中(Anke et al., 2004)。在千里光属(*Senecio*)植物中, 作为吡啶类生物碱生物合成中的千里光碱N-氧化物产生于根, 然后通过韧皮部运输到植物的地上部分(Hartmann and Dierich, 1998), 随后通过脱氢作用、环氧化作用和羟基化等反应使其在不同的植物中生成不同的吡啶类生物碱(Ziegler and Facchini, 2008)。对千里光(*Senecio scandens*)植物的酶定位研究发现, 在吡啶类生物碱合成通路中的酶HSS出现在根的内皮层和韧皮部附近的皮层处(图2A中紫色细胞所示)。在泽兰属(*Eupatorium*)植物中发现高精脒合酶贯穿于根的皮层(图2A中蓝色细胞所示)(Anke et al., 2004)。在千里光中, 吡啶生物碱的合成发生在韧皮部附近的内皮层和

皮层细胞中(Moll et al., 2002)。

2.3 吲哚类生物碱的合成部位

吲哚类生物碱出现在长春花(*Catharanthus roseus*)的不同器官的不同细胞中, 其代谢通路中的色氨酸脱羧酶和胡豆合酶在根中大量分布(St-Pierre et al., 1999), 也有如水甘草碱-16-羟化酶(St-Pierre and De Luca, 1995), desacetoxyvindoline 4-hydroxylase (D4H)(St-Pierre et al., 1998)和deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase(DAT)(Flota et al., 1997)仅仅出现在起光合作用的幼嫩叶片和其它器官顶端, 此处多出现文多灵生物碱。利用原位杂交和免疫细胞化学法对色氨酸脱羧酶和胡豆合酶定位, 发现它们都出现在茎的表皮、叶、花蕾、根尖分生组织中(St-Pierre et al., 1999; Irmiler et al., 2000), 对于D4H及DAT出现在乳汁管和幼嫩部位的异型细胞中, 但是没有在根中出现, 乳汁管和异型细胞贯穿于叶片的叶肉组织中(Burlat et al., 2004; Oudin et al., 2007)(图2B)。吲哚类生物碱合成相关酶至少与3种不同类型的细胞相关, 长春花碱植物中香叶醇10-羟化酶存在于植物地上部分器官的韧皮部薄壁组织中(Burlat et al., 2004); 色氨酸脱羧酶、开联番木鳖苷和胡豆合酶定位在地上部分器官的表皮层和根的顶端分生组织中(St-Pierre et al., 1999; Irmiler et al., 2000); D4H、DAT仅出现在乳汁管、茎和叶的异型细胞中(St-Pierre et al., 1999)。因此, 文多灵通路上的中间产物在不同类型的细胞中进行转运(Ziegler and Facchini, 2008)。

2.4 莨菪烷类生物碱的合成部位

莨菪烷类生物碱合成过程中的腐胺-N-甲基转移酶(PMT)和莨菪碱-6 β -羟化酶出现在颠茄(*Atropa belladonna*)和天仙子(*Hyoscyamus niger*)植物根的中柱鞘中(Hashimoto et al., 1991; Suzuki et al., 1999a, 1999b)(图2A中红色细胞所示); 同时在生成莨菪碱代谢通路中的中间关键酶莨菪酮还原酶I(tropinone reductase I, TR-I)被定位在植物内皮层和邻近的皮层细胞中(Nakajima and Hashimoto, 1999)。莨菪酮还原酶II(tropinone reductase II, TR-II)被定位于马铃薯(*Solanum tuberosum*)韧皮部的筛管中(Kaiser et al., 2006)。在颠茄中, 莨菪烷类生物碱的合成酶被定位在中柱鞘细胞中(Hashimoto et al., 1991)。颠茄根的

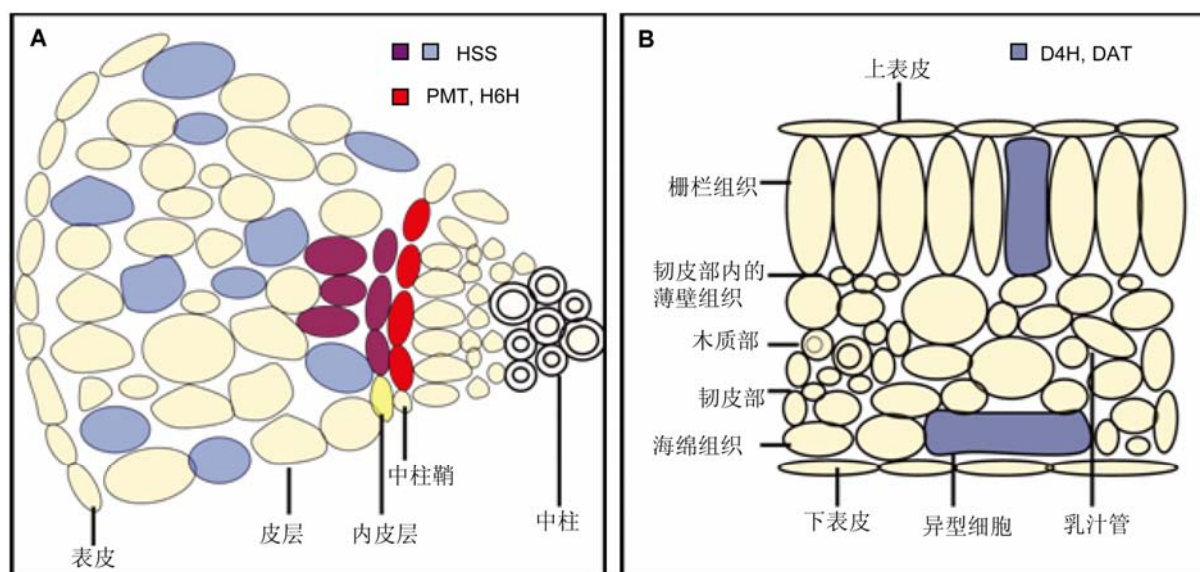


图2 几种生物碱生物合成酶的组织定位(Ziegler and Facchini, 2008)

(A) 蓝色代表大麻叶泽兰根中吡啶生物碱生物合成酶的位置; 紫色代表千里光根中吡啶生物合成酶的位置; 红色代表颠茄和天仙子根中莨菪生物碱生物合成酶的位置; (B) 红色和蓝色代表长春花叶中萜类吲哚生物合成酶的位置

Figure 2 The tissue-specific localization of biosynthetic enzymes of several alkaloids (Ziegler and Facchini, 2008)

(A) Blue indicates for the location of enzymes involved in pyrrolizidine alkaloids biosynthesis in the root of *Eupatorium cannabinum*; Purple, enzymes involved in pyrrolizidine alkaloids biosynthesis in the root of *Senecio scandens*; Red, enzymes involved in belladonna alkaloids biosynthesis in the roots of *Atropa belladonna* alkaloids and *semen Hyoscyamus niger*, (B) Red and blue indicates for the location of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in the leaf of *Catharanthus roseus*

中柱鞘是莨菪烷类生物碱的制造中心, 且其邻近的木质部可能将生物碱运输到叶片储藏(De Luca and St-Pierre, 2000)。

3 细胞水平上的生物碱运输与储藏部位

3.1 异喹啉生物碱的运输与储藏部位

对罂粟的代谢研究发现罂粟中的生物碱在维管束伴胞邻近的乳汁管中积累(Bird et al., 2003; Samanani et al., 2005)。对其生物碱合成途径中的关键酶进行定位, 发现合成通路中中间产物的转运发生在不同形式的细胞中(Ziegler and Facchini, 2008)。通过酶催化步骤发现罂粟生物碱在乳汁管中累积, 乳汁管在次生木质部(De Luca and St-Pierre, 2000)。烟草中产生的尼古丁被转移到地上部分积累, 在这个转移过程中生物碱进入木质部, 然后停留在叶肉细胞, 最终在液泡中积累(Yazaki, 2006)。黄连(*Coptis japonica*)细胞经培养后的荧光显微观察结果显示, 在培养基中加入

的黄连素通过ABC转运体(ATP-binding cassette transporter)运输进入细胞质基质, 然后聚集到液泡中(Yazaki, 2006)。在芸香(*Ruta graveolens*)中, 生物碱的积累与内皮层细胞有关(Samanani et al., 2005)。在罂粟中, 异喹啉生物碱的积累出现在有节乳汁管及邻近的韧皮部的筛管。唐松草植物积累生物碱, 如黄连素。利用鸢尾(*Iris tectorum*)RNA杂交发现异喹啉生物碱的合成基因在其植物的根和根状茎中。在根部, 9种酶的基因在中柱鞘和邻近的皮层细胞中转录; 而在根状茎中, 所有生物合成的酶基因的转录发生在叶原基的原表皮层中(Samanani et al., 2005)。

与一般的细胞相比, 乳汁管细胞壁厚, 在形态学观察上较容易观察到乳汁管。采用免疫荧光检测法对罂粟乳汁管进行定位, 发现在根部, 乳汁管贯穿于次生韧皮部, 散布在薄壁细胞中; 在茎部, 乳汁管要比根中的大且相对于筛管和伴胞离皮层近, 叶片中的乳汁管大多也是在韧皮部的远轴端(Bird et al., 2003)。

使用激光显微切割技术结合LC-Q/TOF-MS, 研究青风藤(*Sinomenii caulis*)中6种生物碱在其表皮、皮层、石细胞、中柱鞘、维管束和髓等组织中的代谢累积分布, 并同时实现了生物活性成分的组织定位和定量定性分析(Yi et al., 2012)。

综上所述, 异喹啉类生物碱的合成部位主要有皮层细胞(包括内皮层)、中柱鞘和木质部; 而生物碱的转运是发生在不同细胞之间的, 如韧皮部与乳汁管、伴胞与筛管之间; 生物碱的积累主要发生在内皮层和乳汁管中。乳汁管不仅能储存分泌物, 而且还具有运输作用。

3.2 莨菪和吲哚生物碱的运输和储藏部位

莨菪生物碱代谢过程中涉及的腐胺-N-甲基转移酶出现在根的中柱鞘, 而莨菪酮还原酶I只出现在内皮层和外皮层, H6H只在根中表达, 且鸟氨酸、腐胺前体和精氨酸通过导管运输到中柱鞘, 其它的中间产物和N-甲基腐胺被运输到内皮层, 为下一步转变成托品碱做准备(De Luca and St-Pierre, 2000)。

在长春花的叶中, 单萜类吲哚生物碱的代谢途径被认为是在韧皮部、表皮、乳汁管和异形细胞中进行(Burlat et al., 2004)。通过对长春花碱的研究, 发现文多灵生物碱生物合成的中间产物的转运是从韧皮部到表皮、表皮到乳汁管和异形细胞(图3中绿色细胞所示)(Ziegler and Facchini, 2008)。长春花属植物根能积累很多生物碱, 包括长春碱、水甘草碱及其衍生物。因此, 很有可能是由根产生的长春碱和水甘草碱前体物在木质部和与乳汁管相关联的管胞的运输下运输到乳汁管, 在乳汁管中水甘草碱转变成文多灵, 然后在非特异性的过氧化物酶的作用下长春碱变成长春花碱和长春新碱(De Luca and St-Pierre, 2000)。

4 亚细胞水平的生物碱合成、转运和储藏部位

目前, 对于生物碱生物合成、转运和存储在亚细胞水平的定位也有了进展。如在异喹啉生物碱研究中, 与之相关的生物合成酶定位在不同的亚细胞结构中; 在血根碱通路上, 小檗碱桥接酶和P450加氧酶被定位

到微粒体和内质网上(Tanahashi and Zenk, 1990; Bauer and Zenk, 1991)。也有报道称血根碱合成通路中涉及的N-甲基转移酶与叶绿体内囊体相关。催化小檗碱生物合成最后几步的小檗碱桥接酶和四氢小檗碱氧化酶与植物液泡和内质网相关(De Luca and St-Pierre, 2000)。罂粟中的异喹啉生物碱在细胞质或罂粟乳汁中积累, 吗啡和相关的次生代谢物都存储在罂粟的囊泡中, 以便于在乳汁管中合成(Bird et al., 2003)。对白羽扇豆(*Lupinus albus*)的研究表明, 尽管叶绿体可能是形成喹诺里西啶骨架的场所, 但是其进一步的结构修饰应是出现在细胞质基质和线粒体的胞内运输之后(De Luca and St-Pierre, 2000)。

吲哚生物碱生物合成中的水甘草碱通常与内质网的表面相关, 其中胡豆苷合酶被定位到液泡中, 其生物合成通路中所涉及的亚细胞结构包括内质网表面、液泡、叶绿体类囊体和细胞质隔室(cytoplasmic compartment) (De Luca and St-Pierre, 2000)。对长春花碱通路中酶定位表明其至少与5种亚细胞结构相关, 如色氨酸脱羧酶、D4H、DAT出现在细胞质(De Luca and Cutler, 1987); 胡豆合酶和过氧化物酶出现在液泡中(McKnight et al., 1990, 1991); 异胡豆苷- β -葡萄糖苷酶是可溶性酶, 可能与细胞中的内质网有关(Stevens et al., 1993); 氮-甲基转移酶被定位到类囊体膜上(Dethier and De Luca, 1993)。莨菪碱和尼古丁大部分产生于根, 但储藏在于叶和根的液泡中(De Luca and St-Pierre, 2000)。

生物碱和其它次生代谢物是通过ABC转运蛋白来转运和聚集的(Shitan and Yazaki, 2007)。对罂粟的研究表明, 通过包括ABC转运蛋白在内的多样化的细胞内部和细胞间的运输, 生物碱也许会被转运和分散到不同的器官中(Shitan and Yazaki, 2007)。在尼古丁的运输过程中ABC蛋白可能承担运输生物碱的作用(Yazaki, 2006)。以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的ABC转运蛋白作为对照, 确定了药用植物博落回和小果博落回(*Macleaya microcarpa*)序列中部分ABC转运蛋白功能基因(Verrier et al., 2008)。通过进一步研究发现ABC转运蛋白功能基因在博落回的果荚和小果博落回幼嫩叶片中有较高的表达量(Zeng et al., 2013)。由此推断ABC转运蛋白可能在博落回和小果博落回中体现了重要的运输功能, 但该功

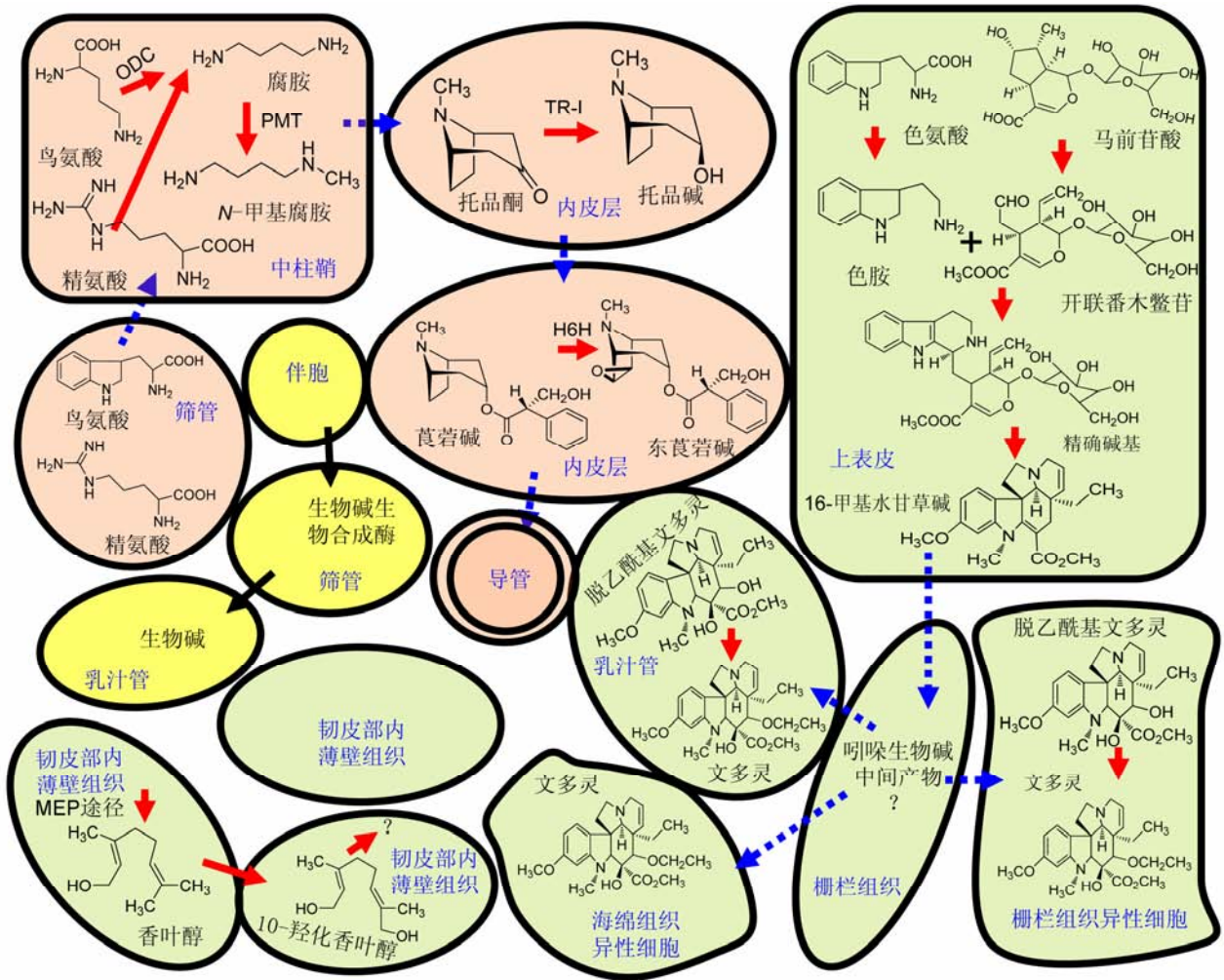


图3 几种生物碱生物合成通路中的酶及通路中的中间产物的运输模型

黄色细胞代表异喹啉生物碱运输模型; 红色细胞代表莨菪生物碱运输模型; 绿色细胞代表单萜类吲哚莨菪生物碱的运输模型; 红色箭头代表特定酶的催化反应; 蓝色箭头和黑色箭头表示细胞间未知化合物的转运。H6H: 莨菪碱-6 β -羟化酶; TR-I: 莨菪酮还原酶I; PMT: 腐胺-N-甲基转移酶; ODC: 鸟氨酸脱羧酶

Figure 3 The transport model of synthetase and intermediates in several alkaloid metabolic pathways

Yellow cells represent the transport model of isoquinoline alkaloid; Red cells represent the transport model of belladonna alkaloids; Green cells represent the transport model of indole alkaloids; Red arrows indicate the specific enzyme-catalyzed reactions; Blue and black arrows represent the intercellular transport of unknown compounds. H6H: Hyoscyamine 6 β -hydroxylase; TR-I: Tropinone reductase I; PMT: Putrescine N-methyltransferase; ODC: Ornithine decarboxylase

能还有待进一步验证。

5 研究展望

已有的研究表明, 生物碱的生物合成受高度有序的发育进程和环境因素等控制, 不同植物中生物碱代谢相关的组织或细胞差异很大。通过上述数据说明生

物碱不同通路中的关键酶在特定的细胞器中行使特定的功能。要想进一步弄清这些生物碱代谢通路的具体过程, 需要解析与其生物合成相关的更多有效关键基因。因此, 有必要对不同类型药用植物进行解剖学研究, 寻找与生物碱代谢途径及其合成转运相关的组织。今后我们将结合以上所述部位有针对性地对特定的药用植物进行相应的研究, 为发现与特定的药用植

物(如具有很高药用价值的博落回等)生物碱合成、运输与存储有关的关键结构提供理论依据,同时研究生物碱合成、运输与存储的相应机制,建立相应的药用模式植物,最终通过这些机理的了解,人为培育出某种特定高产生物碱的植株,以满足人们对生物碱的强大市场需求。

致谢 感谢湖南农业大学柳亦松博士和彭琼博士、中国科学院植物研究所杨克珍老师和邹俊杰老师在论文的写作中给予的帮助与支持。

参考文献

- 程辟, 曾建国 (2012). 苯并吡啶类生物碱及其衍生物合成研究进展. *有机化学* **32**, 1605–1619.
- 郭宇鸽, 曾建国, 谈满良, 黄金红, 刘秀斌 (2011). 博落回叶与小果博落回叶中4种生物碱的含量比较. *中南药学* **9**, 829–832.
- 李文亮, 曾建国, 刘发宝, 张雪 (2011). 一测多评法测定博落回果实中原阿片碱、别隐品碱、血根碱和白屈菜红碱的含量. *湖南中医药大学学报* **31**, 25–28.
- 罗忠勇, 曾建国, 黄敬, 谈满良 (2010). RP-HPLC法测定小果博落回中7种异喹啉类生物碱. *中草药* **40**, 1188–1190.
- Anke S, Niemüller D, Moll S, Hänsch R, Ober D (2004). Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae: evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiol* **136**, 4037–4047.
- Arakawa H, Clark WG, Psenak M, Coscia CJ (1992). Purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from elicited *Sanguinaria canadensis* cell cultures. *Arch Biochem Biophys* **299**, 1–7.
- Bauer W, Zenk MH (1991). Two methylenedioxy bridge forming cytochrome P-450 dependent enzymes are involved in (S)-stylopine biosynthesis. *Phytochemistry* **30**, 2953–2961.
- Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell* **15**, 2626–2635.
- Blank R, Müller-Sieghardt B, Wolfram S (2010). Sanguinarine does not influence availability or metabolism of tryptophan in pigs. *Livestock Sci* **134**, 24–26.
- Burlat V, Oudin A, Courtois M, Rideau M, St-Pierre B (2004). Co-expression of three MEP pathway genes and *geraniol 10-hydroxylase* in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant J* **38**, 131–141.
- De Luca V, Cutler AJ (1987). Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **85**, 1099–1102.
- De Luca V, St-Pierre B (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci* **5**, 168–173.
- Dethier M, De Luca V (1993). Partial purification of an N-methyltransferase involved in vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **32**, 673–678.
- Facchini PJ, De Luca V (1995). Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell* **7**, 1811–1821.
- Facchini PJ, De Luca V (2008). Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J* **54**, 763–784.
- Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R (2003). Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biol* **3**, 7.
- Hartmann T (2004). Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta* **219**, 1–4.
- Hartmann T, Dierich B (1998). Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta* **206**, 443–451.
- Hashimoto T, Hayashi A, Amano Y, Kohno J, Iwanari H, Usuda S, Yamada Y (1991). Hyoscyamine 6 β -hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *J Biol Chem* **266**, 4648–4653.
- Hause B, Hause G, Kutter C, Miersch O, Wasternack C (2003). Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant Cell Physiol* **44**, 643–648.
- Ignatov A, Clark WG, Cline SD, Psenak M, Krueger J, Coscia CJ (1996). Elicitation of dihydrobenzophenanthridine oxidase in *Sanguinaria canadensis* cell cultures. *Phytochemistry* **43**, 1141–1144.
- Irmiler S, Schröder G, St-Pierre B, Crouch NP, Hotze M, Schmidt J, Strack D, Matern U, Schröder J (2000). Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 Cyp72A1 as secologanin synthase. *Plant J* **24**, 797–804.
- Jorgensen RA, Atkinson RG, Forster RLS, Lucas WJ (1998). An RNA-based information superhighway in

- plants. *Science* **279**, 1486–1487.
- Kaiser H, Richter U, Keiner R, Brabant A, Hause B, Dräger B** (2006). Immunolocalisation of two tropinone reductases in potato (*Solanum tuberosum* L.) root, stolon, and tuber sprouts. *Planta* **225**, 127–137.
- Liscombe DK, Facchini PJ** (2007). Molecular cloning and characterization of tetrahydroprotoberberine *cis*-N-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *J Biol Chem* **282**, 14741–14751.
- McKnight TD, Bergey DR, Burnett RJ, Nessler CL** (1991). Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants. *Planta* **185**, 148–152.
- McKnight TD, Roessner CA, Devagupta R, Scott AI, Nessler CL** (1990). Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*. *Nucleic Acids Res* **18**, 4939.
- Moll S, Anke S, Kahmann U, Hänsch R, Hartmann T, Ober D** (2002). Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase. *Plant Physiol* **130**, 47–57.
- Nakajima K, Hashimoto T** (1999). Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant Cell Physiol* **40**, 1099–1107.
- Newman SE, Roll MJ, Harkrader RJ** (1999). A naturally occurring compound for controlling powdery mildew of greenhouse roses. *HortScience* **34**, 686–689.
- Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, Hervouet N, Zelwer C, Rodríguez-Concepción M, St-Pierre B, Burlat V** (2007). Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol* **65**, 13–30.
- Park SU, Yu M, Facchini PJ** (2002). Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy. *Plant Physiol* **128**, 696–706.
- Samanani N, Alcantara J, Bourgault R, Zulak KG, Facchini PJ** (2006). The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *Plant J* **47**, 547–563.
- Samanani N, Park SU, Facchini PJ** (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell* **17**, 915–926.
- Shitan N, Yazaki K** (2007). Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. *Curr Pharm Biotechnol* **8**, 244–252.
- Stevens LH, Blom TJM, Verpoorte R** (1993). Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and strictosidine glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*. *Plant Cell Rep* **12**, 573–576.
- St-Pierre B, De Luca V** (1995). A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **109**, 131–139.
- St-Pierre B, Laflamme P, Alarco AM, De Luca V** (1998). The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J* **14**, 703–713.
- St-Pierre B, Vazquez-Flota FA, De Luca V** (1999). Multi-cellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell* **11**, 887–900.
- Suzuki K, Yamada Y, Hashimoto T** (1999a). Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiol* **40**, 289–297.
- Suzuki K, Yun DJ, Chen XY, Yamada Y, Hashimoto T** (1999b). An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6 β -hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Mol Biol* **40**, 141–152.
- Tanahashi T, Zenk MH** (1990). Elicitor induction and characterization of microsomal protopine-6-hydroxylase, the central enzyme in benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **29**, 1113–1122.
- Vazquez-Flota F, De Carolis E, Alarco AM, De Luca V** (1997). Molecular cloning and characterization of desacetoxylvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Mol Biol* **34**, 935–948.
- Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu Ü, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EP, Yazaki K, Theodoulou FL** (2008). Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* **13**, 151–159.
- Vrba J, Vrublova E, Modriansky M, Ulrichova J** (2011).

Protopine and allocryptopine increase mRNA levels of cytochromes P450 1A in human hepatocytes and HepG2 cells independently of AhR. *Toxicol Lett* **203**, 135–141.

Wink M (1999). Plant secondary metabolites: biochemistry, function and biotechnology. In: *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Sheffield: Sheffield Academic Press.

Yazaki K (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett* **580**, 1183–1191.

Yi L, Liang TZ, Peng Y, Yao X, Chen BH, Zhao ZZ (2012). Tissue-specific metabolite profiling of alkaloids in *Si-*

nomenii caulis using laser microdissection and liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1248**, 93–103.

Zeng JG, Liu YS, Liu W, Liu XB, Liu FQ, Huang P, Zhu PC, Chen JJ, Shi MM, Guo F, Cheng P, Zeng J, Liao YF, Gong J, Zhang HM, Wang DP, Guo AY, Xiong XY (2013). Integration of transcriptome, proteome and metabolism data reveals the alkaloids biosynthesis in *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa*. *PLoS One* **8**, e53409.

Ziegler J, Facchini PJ (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 735–769.

Process of Cell Biology of Isoquinoline Alkaloid Biosynthesis, Transport and Storage

Qiao Cheng^{1,2}, Jianguo Zeng^{1*}, Jie Le^{2*}

¹National Chinese Medicinal Herbs (Hunan) Technology Center, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract Plants contain about 12 000 kinds of alkaloids. Alkaloids belong to small-molecule nitrogen heterocyclic compounds. The metabolic pathways of alkaloids are controlled by specific enzymes, and the locations of some key enzymes can determine the cellular and subcellular structure of specific cells where synthesis, transport and storage of alkaloid take place. Here we summarize findings for the isoquinoline alkaloid sanguinarine in biosynthesis, transport and storage functions at the cellular and subcellular levels. Biosynthesis of isoquinoline alkaloids mainly occurs in the cortex, sieve tubes, companion cells, and latex tubes. Vesicles, vacuoles, cytoplasmic matrix, microsomes, endoplasmic reticulum, and chloroplast thylakoid are involved in transport and storage. We discuss related results of several other types of alkaloids found in medicinal plants.

Key words alkaloids, synthesis, transport, storage, cell biology

Cheng Q, Zeng JG, Le J (2014). Process of cell biology of isoquinoline alkaloid biosynthesis, transport and storage. *Chin Bull Bot* **49**, 720–728.

* Authors for correspondence. E-mail: ginkgo@world-way.net; lejie@ibcas.ac.cn