

丹参酮生物合成分子调控机制的研究进展

李 珅¹, 林爱真², 杨 媛¹, 沈亚芳¹, 饶 盈³, 羊 健⁴, 刘云辉¹, 王 洋¹, 周 伟¹

(1. 浙江农林大学 农业与食品科学学院 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江省泰顺县西阳镇农业公共服务中心, 浙江 泰顺 325509; 3. 临安天目山林场, 浙江 杭州 311311; 4. 浙江省农业科学院 农业部/浙江省植保生物技术重点实验室, 浙江 杭州 310021)

摘要: 丹参 *Salvia miltiorrhiza* 是中国的一种传统中草药, 对心脑血管疾病的预防和治疗效果显著。由于丹参药用原材料需求量大, 其品质越来越受到重视。丹参酮为丹参主要药效成分之一, 如何利用最新研究成果进行创新以提高丹参药材的品质是当下研究的热点。论文围绕丹参酮生物合成相关基因和转录调控因子的克隆与功能研究、诱导子促进丹参酮代谢合成的分子机制等方面最新研究展开综述; 同时总结了以往研究中存在的问题, 并结合自身研究对研究前景进行分析后指出: 为了从分子水平上全面阐明丹参酮生物合成的分子调控机制, 后续研究应首先围绕丹参酮代谢合成关键调控因子可变剪接的挖掘与分子机制解析; 其次是非编码核糖核酸(RNA)在丹参酮代谢合成过程中的调控作用研究; 最后是丹参酮合成生物学的探索性研究。图 1 表 2 参 41

关键词: 植物学; 丹参; 丹参酮; 合成途径; 分子机制; 综述

中图分类号: S718.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2018)02-0367-09

Research progress on molecular regulation mechanism involved in the biosynthetic pathway of tanshinone in *Salvia miltiorrhiza*

LI Shen¹, LIN Aizhen², YANG Yuan¹, SHEN Yafang¹, RAO Ying³, YANG Jian⁴, LIU Yunhui¹,
WANG Yang¹, ZHOU Wei¹

(1. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. The Agricultural Public Service Center in Xiyang Town, Taishun 325509, Zhejiang, China; 3. Forest Farm of Tianmu Mount, Hangzhou 311311, Zhejiang, China; 4. Key Laboratory of Biotechnology in Plant Protection of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China and Zhejiang Province, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China)

Abstract: *Salvia miltiorrhiza*, a traditional Chinese herbal medicine, is widely used in preventing and treating cardiovascular diseases. Due to the increasing demand of raw materials of *S. miltiorrhiza*, its quality has attracted more and more attentions. Tanshinone is one of the main pharmacodynamical components. How to make innovations to improve the content of effective pharmacodynamical component and improve the quality of *S. miltiorrhiza* based on the existing research is an important work for the researchers. In this study, the latest research progresses on the cloning and identification of genes and transcription factors involved in the biosynthesis pathway of tanshinones, the molecular mechanism of how the elicitors to improve the biosynthesis of tanshinones were reviewed. And then the problems of existing research and the future research direction involved in

收稿日期: 2017-06-02; 修回日期: 2017-08-08

基金项目: 农业部/浙江省植保生物技术重点实验室开放基金资助项目; 国家自然科学基金青年基金资助项目(31501394); 浙江农林大学大学生科研训练项目(113-2013200006)

作者简介: 李珅, 从事植物种质资源创新研究。E-mail: 469356875@qq.com。通信作者: 周伟, 副教授, 博士, 从事植物分子遗传与种质资源创新研究。E-mail: zhouwei19810501@163.com。饶盈, 园艺师, 从事林木种质资源收集与保护。E-mail: 88562701@qq.com

our recent research were also sorted out and discussed. In order to get a comprehensive knowledge about the molecular mechanism on the production of tanshinones, researchers should pay more attention to three key items. Firstly, alternative splicing of key regulatory factors underlying the biosynthesis of tanshinones should be discovered and identified. Secondly, regulation of the biosynthesis of tanshinones mediated by non-coding RNA should be paid more attention. Finally, we should pay more efforts to realize the fact of production of tanshinones using the strategies of synthetic biology. [Ch, 1 fig. 2 tab. 41 ref.]

Key words: botany; *Salvia miltiorrhiza*; tanshinones; biosynthetic pathway; molecular mechanism; review

丹参 *Salvia miltiorrhiza* 是传统的中药材, 其主要药用成分包括脂溶性的丹参酮类化合物和水溶性的酚酸类化合物。其中丹参酮是一类松香烷二萜化合物。20 世纪 30 年代末, 有学者首次发现丹参酮 II A 和丹参酮 II B 是天然的抗氧化剂。随后几十年, 又连续发现了丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I、异丹参酮、去甲基丹参酮等脂溶性有效成分。其药理作用主要表现在抗菌消炎、抗氧化、抗肿瘤、抗心肌缺氧、激素样活性等方面, 并能够改善学习记忆能力, 在临床上主要用于心脑血管疾病的治疗^[1-2]。丹参有效成分产量较低, 可利用资源有限, 使其应用推广受到很大的限制。因此, 筛选获得高丹参酮产量的优良品种或是通过其他方法解决药源问题是很有必要的。笔者从丹参酮生物合成途径及其分子调控机制等方面展开综述, 同时总结了以往研究中存在的问题, 并结合自身对研究前景进行了分析, 为后续深入研究提供参考。

1 丹参酮的生物合成途径

丹参酮是一类二萜类化合物, 其代谢合成方式有 2 条途径(图 1), 分别为位于细胞质中的甲羟戊酸途径 (mevalonate, MVA)^[3]和位于质体中的非甲羟戊酸途径 (2-C-methyl-d-erythritol-4-phosphate, MEP)^[4]。MVA 合成途径的上游基因包括 *AACT*, *HMGS*, *HMGR*, *MK*, *PMK* 和 *MDC*; MEP 合成途径上游基因包括 *DXS*, *DXR*, *CMS*, *CMK*, *MCS*, *HDS* 和 *IDS*; 中游合成酶基因包括 *IPPI*, *GPPS*, *FPPS* 和 *GGPPS*; 下游合成酶基因包括 *CPS*, *KSL*, *CYP76AH1*, *CYP76AH3*, *CYP76AK1* 以及未知的 P450s 基因; 在下游合成途径中柯巴基焦磷酸(copalyl diphosphate, CPP)经类贝壳杉烯合酶(*KSL*)催化形成丹参酮二烯(miltiradiene), 丹参酮二烯经细胞色素 P450 家族蛋白 *CYP76AH1* 催化合成铁锈醇(ferruginol), 铁锈醇经过 *CYP76AH3* 和 *CYP76AK1* 的多步催化生成 11,20-二羟基铁杉醇和 11,20-二羟基铁杉酚, 最后在其他 CYP

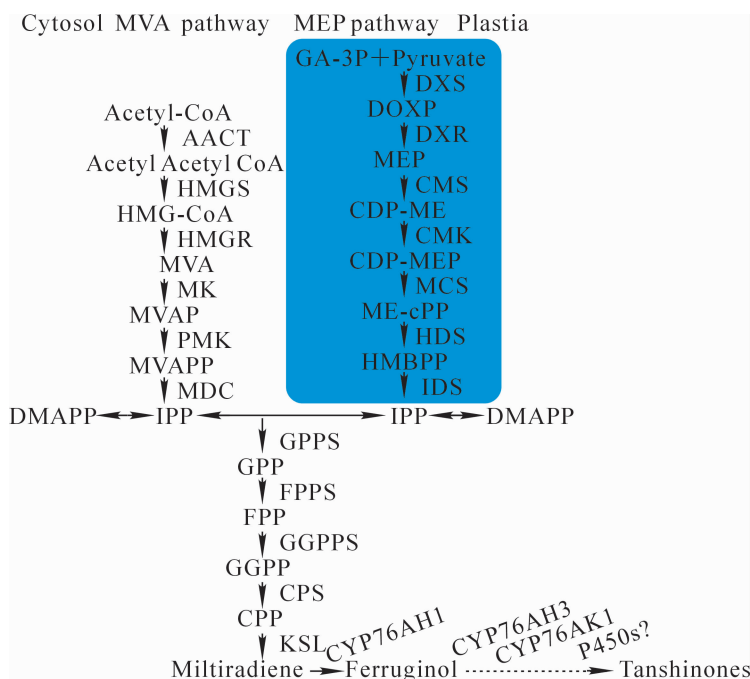


图 1 丹参酮代谢合成路径

Figure 1 Biosynthetic pathway involved in the biosynthesis of tanshinone in *Salvia miltiorrhiza*

家族或其他酶作用下产生次丹参酮(miltirone), 进而合成丹参酮类成分^[5]。目前, 从铁杉醇合成丹参酮之间的多步催化反应步骤仍不清楚, 需要进一步的研究。

2 诱导子对丹参酮生物合成的调控作用

诱导子能诱发植物次生代谢过程中酶的活性, 从而增加次生代谢物的产量, 有时可以诱导出新的代谢化合物。依据来源可划分为生物诱导子和非生物诱导子两大类。生物诱导子是指植物体在防御过程中为对抗微生物入侵而产生的防御性物质, 如分生孢子、分解细胞壁的酶、细胞壁的碎片。非生物诱导子是指所有非植物细胞的固有成分, 但能触发植物细胞形成抗毒素信号的物质^[6]。

2.1 生物诱导子对丹参酮合成的影响

研究人员围绕生物诱导子对丹参酮合成的影响做了许多研究。晏琼等^[6-7]利用酵母提取物(YE)、寡聚半乳糖醛酸和真菌诱导子等 3 种生物诱导子分别处理丹参毛状根, 发现都能显著提高丹参酮的产量。施加 100 g·L⁻¹ 的真菌诱导子, 总丹参酮的产量提升 4.70 倍; 施加 100 g·L⁻¹ 的 YE, 总丹参酮的产量提升 3.20 倍; 施加 100 g·L⁻¹ 的寡半乳糖醛酸, 总丹参酮的产量提升 4.20 倍。GE 等^[8]考察了不同浓度的 β -氨基丁酸(BABA)和 YE 单独或是协同对丹参酮代谢合成的影响, 与对照相比最多可提高 4.50 倍。BABA+YE 协同作用, 在 BABA 处理 3 d 后再加入 YE, 对丹参酮的积累更加有效。YAN 等^[9]发现密螺旋菌 *Streptomyces pactum* 处理丹参毛状根后, *GGPPS*, *HMGR*, *DXS*, *DXR* 等 4 个关键酶基因的表达量显著提升, 总丹参酮产量提高 12.61 倍^[9]。研究发现, 丹参毛状根中丹参酮 II A 和隐丹参酮的积累和产量受 YE 诱导。丹参酮的产量经诱导处理 6 d 后测得的最大值为 0.64 mg·g⁻¹, 其中 *HMGS*, *DXR*, *DXS2*, *CMK*, *IPPI*, *CPS* 等 6 个关键酶基因的表达量显著上调。YE 和银离子(Ag⁺)共同诱导处理表明, 丹参酮 II A 和隐丹参酮的产量显著增加。丹参酮诱导处理 9 d 后测得的丹参酮的最大值为 2.08 mg·g⁻¹, 其中 *AAC*, *HMGS*, *DXR*, *IPPI*, *CMK*, *FPPS*, *GGPPS*, *CPS* 等 8 个关键酶基因表达显著上调^[10]。上述研究表明, 生物诱导子对于丹参酮的合成具有促进作用。因此, 新型高效生物诱导子的挖掘和开发利用将是后续重要研究方向之一。

2.2 非生物诱导子对丹参酮合成的影响

非生物诱导子能引起或者促进植物细胞与防御机制有关的次生代谢产物的生物合成。目前, 已证实的非生物诱导子约有 100 多种, 主要包括茉莉酸甲酯(methyljasmonate, MeJA), 茉莉酸(jasmonate, JA), 水杨酸(alicyclic acid, SA), 重金属盐类和稀土元素。郭肖红等^[11]研究发现, 低浓度的铜离子(Cu²⁺), 镁离子(Mg²⁺), 锌离子(Zn²⁺), 亚铁离子(Fe²⁺), 锰离子(Mn²⁺)以及稀土元素均能促进丹参酮 II A 的合成。KAI 等^[10]研究了 0.10 mmol·L⁻¹ MeJA 诱导处理丹参毛状根后丹参酮 II A 和隐丹参酮的积累变化。处理 9 d 后, *HMGR*, *DXR*, *DXS2*, *GGPPS*, *CPS* 和 *KSL* 等基因的表达显著上调, 丹参酮的产量达到最大值 0.93 mg·g⁻¹ 干质量(DW), 相比于对照组 0.16 mg·g⁻¹ (DW)增加了约 5.78 倍。HAO 等^[12]发现 SA 处理丹参毛状根 36 h 后, 丹参酮产量上升 1.63 倍。银离子处理毛状根后, *HMGR*, *DXS2*, *IPPI*, *GGPPS* 等基因的表达显著上调; 丹参酮 II A 和隐丹参酮的积累逐渐增加, 处理 9 d 后测得的丹参酮的最大产量为 0.35 mg·g⁻¹, 相比于对照组的 0.16 mg·g⁻¹ (DW)增加约 2.20 倍。晏琼等^[6-7]利用银离子(Ag⁺), 钴离子(Co²⁺)和 α -氨基异丁酸(AIB)等 3 种非生物诱导子分别处理丹参毛状根, 通过检测丹参酮的产量发现, 此 3 种非生物诱导子都能提高丹参酮的积累, 但诱导能力比生物诱导子弱; 其中 50.00 mmol·L⁻¹ 钴离子获得了最高的丹参酮产量(1.75 mg·g⁻¹), 是对照组产量的 4.10 倍; 30.00 mmol·L⁻¹ 银离子处理后总丹参酮的产量提高了 2.10 倍; 50.00 mmol·L⁻¹ AIB 处理后总丹参酮产量提高了 2.30 倍。ZHOU 等^[13]利用金属元素 0.01 mmol·L⁻¹ 镧(La)对丹参毛状根进行诱导处理, 结果表明丹参酮代谢途径上关键酶基因包括 *HMGR*, *HMGS*, *KSL*, *DXR*, *CMK* 的表达量均上调, 丹参酮 I, 丹参酮 II 和隐丹参酮的产量均升高。由此可推测镧可能通过促进丹参酮代谢途径上游关键酶基因的表达而增加丹参酮的积累。房翠萍^[14]研究了外源激素对丹参毛状根生长和丹参酮 II A 生物合成的影响, 结果显示在 1/2MS 培养基中单独施加 2.00 mg·L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)能使丹参酮 II A 产量增加 3.01 倍; 同时添加 3.00 mg·L⁻¹ 6-BA 与 0.20 mg·L⁻¹ NAA 能使丹参酮 II A 产量增加 0.93 倍; 同时添加 1.00 mg·L⁻¹ 6-BA 与 2 mg·L⁻¹ 赤霉素(GA)能使丹参酮 II A 浓度增加 1.69 倍; 同时添加 1.00 mg·L⁻¹ 激动素(KT)与 1.00 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸(IBA)能使丹参酮 II A

产量增加 0.21 倍;此外还研究了 pH 值对丹参毛状根生长和丹参酮ⅡA 生物合成的影响,结果发现培养基 pH 值为 pH 9 时,丹参酮产量最高。YANG 等^[15]利用聚乙二醇(PEG)和脱落酸(ABA)对丹参毛状根进行诱导处理,发现 PEG 和 ABA 通过增加毛状根中活性氧含量促进丹参酮的代谢合成,推测 PEG 和 ABA 可能通过 ABA 途径诱导丹参毛状根中内源茉莉酸(JA)的活性,从而刺激丹参酮的代谢积累^[15-16](表1)。

表 1 诱导子对丹参酮代谢合成的影响

Table 1 Effect on the biosynthesis of tanshinone induced by elicitors in *Salvia miltiorrhiza*

诱导子类型	诱导子名称	浓度或质量 浓度	处理 材料	受诱导的基因	丹参酮的变化	参考 文献
非生物诱导子	Ag ⁺	30.00 mmol·L ⁻¹	毛状根		总丹参酮增加 2.10 倍	[7]
	Co ²⁺	50.00 mmol·L ⁻¹	毛状根		总丹参酮增加 4.10 倍	[7]
	YE	100.00 mg·L ⁻¹	毛状根	HMGR, DXR, DXS2, CMK, CPS, IPPI	6 d 时达到最大值 0.64 mg·g ⁻¹	[10]
	YE+Ag ⁺	100.00 mg·L ⁻¹ +0.03 mmol·L ⁻¹	毛状根	AACT, HMGS, DXR, CMK, FPPS, CPS, GGPPS, IPPI	9 d 时达到最大值 2.08 mg·g ⁻¹	[10]
	Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺	原 MS 培养基的 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 倍	丹参不 定根		低产量的 Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ 以 及较高产量 Fe ²⁺ , Mn ²⁺ 促进丹 参酮ⅡA 的合成	[11]
	MeJA	0.10 mmol·L ⁻¹	毛状根	HMGR, DXR, DXS2, GGPPS, CPS, KSL	总丹参酮增加 5.78 倍	[10]
	SA	10.00 mg·L ⁻¹	毛状根	GGPPS	总丹参酮增加 1.60 倍	[12]
	La	0.01 mmol·L ⁻¹	毛状根	HMGR, HMGS, DXR, CMK, KSL	总丹参酮增加 1.50 倍	[13]
	6-BA	2.00 mg·L ⁻¹	毛状根		丹参酮ⅡA 增加 3.01 倍	[14]
	6-BA+NAA	3.00 mg·L ⁻¹ +0.20 mg·L ⁻¹	毛状根		丹参酮ⅡA 增加 0.93 倍	[14]
	6-BA+GA	1.00 mg·L ⁻¹ +2.00 mg·L ⁻¹	毛状根		丹参酮ⅡA 增加 1.69 倍	[14]
	KT+IBA	1.00 mg·L ⁻¹ +1.00 mg·L ⁻¹	毛状根		丹参酮ⅡA 增加 0.21 倍	[14]
	PEG+ABA	20.00 g·L ⁻¹ +0.20 mmol·L ⁻¹	毛状根	HMGR, DXS		[15-16]
生物诱导子	真菌诱导子	100.00 g·L ⁻¹	毛状根		总丹参酮增加 4.70 倍	[7]
	内生真菌	100.00 g·L ⁻¹	毛状根		总丹参酮增加 3.20 倍	[7]
	寡聚半乳糖 醛酸	100.00 g·L ⁻¹	毛状根		总丹参酮增加 4.20 倍	[7]
	YE	2.00 mmol·L ⁻¹ 1.00 mmol·L ⁻¹	毛状根		总丹参酮增加 4.50 倍	[8]
	BABA+YE	1.00 mmol·L ⁻¹ +200 mg·L ⁻¹	毛状根		总丹参酮增加 9.40 倍	[8]
	密旋链霉菌	40.00 g·L ⁻¹	毛状根	HMGR, DXR, DXS, GGPPS	总丹参酮增加 12.60 倍	[9]

3 转录因子对丹参酮代谢合成的调控作用

转录因子又称为反式作用元件,是能够特异结合真核基因启动子区域顺式作用元件的脱氧核糖核酸(DNA)结合蛋白,通过蛋白与基因之间、蛋白与蛋白之间的相互作用激活或抑制转录^[17]。近年来,随着对植物转录因子研究和认识的不断深入,转录调控被认为是一种能有效调控植物次生代谢途径的新手

段。超表达转录因子能够有效地克服多基因共转化存在的弊端，全面调节相关基因的表达，对整个代谢途径的调控效果要优于单纯提高单个或多个结构基因的表达。目前，研究人员对转录因子在丹参次生代谢调控方面进行了深入研究，研究较多的转录因子有基本螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)、植物中髓细胞组织增生蛋白(myelocytomatosis, MYCs), WRKY 和 JAZ 等几个类型(表 2)。

3.1 bHLH 类转录因子

植物 bHLH 转录因子家族因其成员含有高度保守的 bHLH 区域而被命名为 bHLH 转录因子。bHLH 结构域由 50~60 个左右氨基酸组成，包含 10~15 个氨基酸组成的碱性氨基酸区和 40 个左右氨基酸构成的 HLH 区^[18]。50%以上的植物碱性氨基酸区含有高度保守的 His5-Glu9-Arg13 序列，这使得碱性氨基酸区能够识别 DNA 上 E-box(5'-CANNTG-3')和 G-box(5'-CACGTG-3')位点，并与之结合^[19-20]。由于 HLH 结构域中疏水氨基酸之间常常互作从而促进蛋白二聚体的形成，因此 bHLH 蛋白常以二聚体的形式发挥作用^[21]。目前已报道的植物 bHLH 家族转录因子已有很多，其中拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中报道的 bHLH 家族成员有 164 个，水稻 *Oryza sativa* 中 bHLH 家族成员有 180 个^[22]，而烟草 *Nicotiana tabacum* 和葡萄 *Vitis vinifera* 中 bHLH 转录因子分别有 190 个和 191 个以上^[23-24]。通过转录组测序，127 个丹参 bHLH 类转录因子已被分离，其中 7 个成员被发现能响应甲基茉莉酸 (MeJA) 信号诱导。SmbHLH37, SmbHLH74 和 SmbHLH92 被证实与丹参萜类物质的代谢合成密切相关^[25]。由此推测，bHLH 类转录调控因子在 JA 信号途径中调控丹参酮和丹酚酸的生物合成具有重要的作用。此外，丹参转录因子 SmbHLH1 和 SmbHLH93 的全长基因被相继克隆，分析表明此 2 个基因的表达与丹参酮的代谢合成密切相关^[26-27]，这些研究为从分子水平全面解析 bHLH 类转录因子调控丹参酮的代谢合成机制奠定了扎实的工作基础。

3.2 MYC 类转录因子

MYC 类转录因子是植物茉莉酸类激素响应途径中的核心转录因子。MYC 具有多种调节功能，广泛存在于动植物中。MYC 类转录因子中 MYC2 研究最为深入。MYC2 转录因子含有 bHLH 保守结构域，属于 bHLH 类转录因子家族成员。MYC2 在 N 端含有 1 个 JID 结构域，与 JAZ 结合相关^[28]。ZHOU 等^[29]研究发现，丹参 SmMYC2a 能和丹酚酸代谢途径的结构基因 *SmHCT6*, *SmCYP98A14* 的 E-BOX 互作；而 SmMYC2b 能和 *SmCYP98A14* 的 E-BOX 互作，直接调控丹酚酸而间接调控丹参酮的代谢合成。王晓荣^[30]研究发现，SmMYC2-like 能和 SmJAZ3 互作，在丹参毛状根中过表达 *AtMYC2* 后，丹参酮代谢合成关键酶基因 *SmGGPPS* 的表达上调，总丹参酮产量达 16.00 mg·g⁻¹(DW)，高出对照 5.40 倍。而过表达 SmMYC2-like 后，总丹参酮产量增加 3.50 倍。

3.3 WRKY 类转录因子

WRKY 转录因子家族是高等植物十大转录因子家族成员之一。WRKY 转录因子的保守结构域约由 60 个氨基酸残基组成，其中靠近氨基酸 N 端的 7 个保守氨基酸残基 WRKYGQK 为 WRKY 结构域的核心序列，它们的变异会导致 DNA 结合活性减弱或者丧失；羧基 C 末端的锌指类似结构在植物的进化中可能起到重要的作用^[31-32]。

在植物进化过程中，WRKY 转录因子家族成员不断扩大。LI 等^[33]克隆了 61 个 *WRKYs* 基因，发现其中 42 个 *WRKYs* 成员能够响应 MeJA 和银离子(Ag⁺)胁迫，与丹参酮的代谢合成密切相关。郝小龙^[34]研究发现，在丹参毛状根中过表达 *SmWRKY3* 后，丹参酮合成关键酶基因 *SmCPS* 表达上调，总丹参酮产量达 3.98 mg·g⁻¹(DW)，相比于对照提高了 1.83 倍；而抑制表达 *SmWRKY3* 后，*SmCPS* 的表达下调，总丹参酮产量仅为 1.98 mg·g⁻¹(DW)。因此，WRKY 转录因子能够促进丹参酮的合成，是丹参酮合成的正向调控因子。

3.4 JAZ 类转录因子

含有 ZIM 结构域的基因称为 JASMONATE ZIM-DOMAIN(JAZ)基因。ZIM 结构域一般位于 JAZ 蛋白的中间，主要由 28 个氨基酸组成；在 N 端含有(TIF[F/Y]XG)结构域，在 C 末端有 2 个不变的丙氨酸。Jas 结构域(SLX2FX2KRX2RX5PY)位于 JAZ 蛋白的 C 端，在 JAZ 蛋白中极其保守。研究发现，拟南芥的 SCFCOI1 复合体依赖 JA-Ile，并通过 Jas 结构域与 JAZ1, JAZ3, JAZ9, JAZ10 蛋白结合；Jas 结构域是 JAZ 蛋白核定位信号的关键结构。JAZ 参与 JA 信号介导的次生代谢物的合成在拟南芥中研究得比较

透彻。JAZ 在拟南芥中有 12 个成员, 其中至少 8 个 JAZ 蛋白成员都与 MYC2 相互作用。拟南芥 MYC2 的同源基因 MYC2-LIKE 成员 JAM1, JAM2 和 JAM3 也参与 JA 信号途径的次生代谢合成(表 2); 其中 JAM1 和 JAM2 分别与 6 个不同的 JAZ 成员相互作用, 而 JAM3 却不能与任何 JAZ 蛋白成员互作。近期丹参 JAZ 蛋白参与 JA 信号介导的次生代谢物的合成机制研究也取得一些进展。在丹参中超表达 *JA Z3* 和 *JA Z9* 基因能使毛状根中丹参酮的产量急剧降低; 酵母双杂试验证实 SmJAZ9 蛋白能与 bHLH 类转录因子拟南芥的 AtMYC2 互作, 而 SmJAZ3 不能与 AtMYC2 互作, 推测 SmJAZ9 通过与 bHLH 类转录因子互作, SmJAZ3 通过与其他 bHLH 类转录因子互作而调控丹参酮的生物合成^[5]。研究证实将 *SmJA Z8* 遗传转化丹参, 超表达 *SmJA Z8* 的转基因毛状根系表现出对 JA 信号不敏感的表型; *SmJA Z8* 的超表达导致 *SmJA Z1*, *SmJA Z2* 和 *SmJA Z3* 的表达量急剧下调, 从而提高丹参酮和花青素的代谢合成; 究其原因发现, SmJAZ8 蛋白跟拟南芥的 AtJAZ8 类似, 缺少 LPIARR 的结构域, 而此结构域是 JA 信号诱导 JAZ 蛋白降解释放正向调节因子的关键区域。可见拟南芥 JAZ 蛋白在 JA 信号介导的次生代谢合成作用机制的解析为在丹参中研究 JAZ 调控丹参酮和丹酚酸的合成提供了很好的参考。丹参 JAZ 家族其他成员的功能有待于进一步地解析。

表 2 转录因子对丹参酮代谢合成的影响

Table 2 Effect on the biosynthesis of tanshinone regulated by transcription factors in *Salvia miltiorrhiza*

转录调节类型	转录因子名称	超表达载体类型	转基因材料	丹参酮产量的变化	参考文献
正向调节	AtMYC2-like	pCAMBIA2300+	毛状根	提高 5.40 倍	[30]
	SmMYC2-like	pCAMBIA2300+	毛状根	提高 3.50 倍	[30]
	SmWRKY3	pCAMBIA2300+	毛状根	提高 1.83 倍	[34]
	SmWRKY70	pCAMBIA2300+	毛状根	提高 6.31 倍	[34]
	SmWRKY54	pCAMBIA2300+	毛状根	提高 2.23 倍	[35]
反向调节	SmJAZ3	pCAMBIA2300+	毛状根	下调 94.0%	[5]
	SmJAZ9	pCAMBIA2300+	毛状根	下调 80.6%	[5]

4 可变剪接的分子调控作用

真核生物基因转录产生的 mRNA 前体大多数只按一种方式进行剪接, 产生一种成熟的 mRNA 分子, 只翻译成一种蛋白质。但有的基因 mRNA 前体通过不同的剪接方式(按不同的剪接位点)产生不同的 mRNA 剪接异构体, 此过程称为可变剪接。RNA 可变剪接不涉及遗传信息的永久性改变, 是真核基因表达调控的重要手段, 是调节基因表达和产生蛋白质多样性的重要机制, 是导致人类基因和蛋白质数量变异的重要原因。

现如今可变剪接作为代谢和发育另一个重要的调节机制已在许多植物中被鉴定, 如拟南芥^[36-37], 大豆 *Glycine max*^[38], 蔓越橘 *Brachypodium distachyon*^[39] 和水稻^[40]。而在丹参中, 利用短读高通量测序技术(NGS)和单分子实时(SMRT)长读测序技术, 结合对根部各组织进行测序发现, *KSL1*, *HDR*, *HMGR*, *AACT3*, *MK* 和 *PMK* 基因存在着选择性剪接调控的现象^[41]。由此可见, 丹参酮代谢合成途径中关键合成酶基因的可变剪接对丹参酮的代谢合成起到了重要的调节作用。某些转录调控因子是否也存在可变剪接的调控方式有待进一步研究。

5 总结与展望

丹参这种传统的中草药具有重要的药用价值。近年来野生丹参品质严重退化, 濒临灭绝, 导致丹参原药的供应极不稳定, 解决药源问题已成为研究的热点。目前, 对丹参酮次生代谢合成的研究重点主要包括以下几个方面: ①丹参酮代谢合成途径的解析。分离丹参酮代谢合成酶或是修饰酶, 通过底物与产物的鉴定, 解析丹参酮次生代谢化合物的合成途径。②转录因子及其调控机制和调控网络的解析。转录因子可同时调控代谢途径上的 1 个或是多个基因的表达, 在丹参酮次生代谢合成中起重要的调控作用。为阐明丹参酮代谢合成的调控机制, 利用诱导子处理丹参, 结合转录组学、蛋白质组学和代谢组学揭示候选转录因子的表达与产物代谢流的分配规律, 以揭示转录因子间的表达与互作机制对丹参酮合成代谢

的调控规律。③丹参酮基因工程的研究。在代谢途径和调控网络充分解析的基础上, 实现代谢调控的可预测性。如采用时空特异性表达的启动子、多基因共转化技术, 实现丹参有效成分在特异部位或是全株系大量积累和特定性状改良的目标。

随着研究的深入, 进一步从转录调控水平全面解析丹参酮的代谢分子调控机制对于利用现代基因工程手段培育高品质丹参新品种/系具有重要的指导意义, 也具有广阔的应用前景。因此, 应从以下几个方面开展研究工作: ①丹参酮代谢合成关键调控因子可变剪接的挖掘与分子机制解析。②非编码 RNA 在丹参酮代谢合成过程中的调控作用。③丹参酮合成生物学的研究。通过工程酵母生产丹参酮前体物, 并利用有机半合成技术体外合成丹参酮, 这将改变丹参药源生产方式, 为丹参系列药物走向国际市场奠定工作基础, 无疑将具有重要的应用前景。

6 参考文献

- [1] CHEN Xiuping, GUO Jiajie, BAO Jiaolin, *et al.* The anticancer properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen): a systematic review [J]. *Med Res Rev*, 2014, **34**(4): 768 – 794. doi: 10.1002/med.21304.
- [2] WANG Xin, LEE W, ZHOU Xuelin, *et al.* A pharmacodynamic-pharmacokinetic (PD-PK) study on the effects of danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on midazolam, a model CYP3A probe substrate, in the rat [J]. *Phytomedicine*, 2010, **17**(11): 876 – 883. doi: 10.1016/j.phymed.2010.05.007.
- [3] LANGE B, RUJAN T, MARTIN W, *et al.* Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(24): 13172 – 13177. doi: 10.1073/pnas.240454797.
- [4] ROHMER M, KNANI M, SIMONIN P, *et al.* Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. *Biochem J*, 1993, **295**(2): 517 – 524. doi: 10.1042/bj2950517.
- [5] SHI Min, ZHOU Wei, ZHANG Jianlin, *et al.* Methyl jasmonate induction of tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots is mediated by JASMONATE ZIM-DOMAIN repressor proteins [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**(1): 20919. doi: 10.1038/srep20919.
- [6] 晏琼, 胡宗定, 吴建勇. 生物与非生物诱导子协同作用对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, **31**(3): 188 – 191.
YAN Qiong, HU Zongding, WU Jianyong. Synergistic effects of biotic and abiotic elicitors on the production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture [J]. *China J Chin Mater Med*, 2006, **31**(3): 188 – 191.
- [7] 晏琼, 胡宗定, 吴建勇. 生物和非生物诱导子对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J]. 中草药, 2006, **37**(2): 262 – 265.
YAN Qiong, HU Zongding, WU Jianyong. Influence of biotic and abiotic elicitors on production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture [J]. *China Tradit Herb Drug*, 2006, **37**(2): 262 – 265.
- [8] GE Xiuchun, WU Jianyong. Induction and potentiation of diterpenoid tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by β -aminobutyric acid [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2005, **68**(2): 183 – 188. doi: 10.1007/s00253-004-1873-2.
- [9] YAN Yan, ZHANG Shuncang, YANG Dongfeng, *et al.* Effects of *Streptomyces pactum* Act12 on *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone synthesis and its mechanisms [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, **173**(4): 883 – 893. doi: 10.1007/s12010-014-0876-4.
- [10] KAI Guoyin, LIAO Pan, XU Hui, *et al.* Molecular mechanism of elicitor-induced tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Acta Physiol Plant*, 2012, **34**(4): 1421 – 1433. doi: 10.1007/s11738-012-0940-z.
- [11] 郭肖红, 高文远, 陈海霞, 等. 金属离子对丹参酮 II A 和原儿茶醛生物合成的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, **30**(12): 885 – 888.
GUO Xiaohong, GAO Wenyuan, CHEN Haixia, *et al.* Effects of mineral cations on the accumulation of tanshinone II A and protocatechuic aldehyde in the adventitious root culture of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2005, **30**(12): 885 – 888.
- [12] HAO Xiaolong, SHI Min, CUI Lijie, *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, **62**(1): 24 – 31. doi: 10.1002/bab.1236.

- [13] ZHOU Jie, FANG Lei, WANG Xiao, *et al.* La dramatically enhances the accumulation of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Earth Sci Res*, 2012, **2**(1): 187 – 192. doi: <http://dx.doi.org/10.5539/esr.v2n1p187>.
- [14] 房翠萍. 丹参多倍体诱导、毛状根培养及其丹参酮产量提高的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
FANG Cuiping. *Polyploidy Induction, Hairy Root Culture and Improve the Yield of Tanshinone in Salvia miltiorrhiza* [D]. Hefei: Anhui Agriculture University, 2011.
- [15] YANG Dongfeng, SHENG Dongfeng, DUAN Qimei, *et al.* PEG and ABA trigger the burst of reactive oxygen species to increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *J Plant Growth Regul*, 2012, **31**(4): 579 – 587. doi:10.1007/s00344-012-9268-6.
- [16] YANG Dongfeng, MA Pengda, LIANG Xiao, *et al.* PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Physiol Plantarum*, 2012, **146**(2): 173 – 183. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01603.x.
- [17] 李洁. 植物转录因子与基因调控[J]. 生物学通报, 2004, **39**(3): 9 – 11.
LI Jie. Plant transcription factors and gene regulation [J]. *Bull Biol*, 2004, **39**(3): 9 – 11.
- [18] 张鑫, 宋经元, 胡鸢雷, 等. bHLH 转录因子调控植物活性成分生物合成的研究进展[J]. 药学学报, 2014, **49**(4): 435 – 442.
ZHANG Xin, SONG Jingyuan, HU Yuanlei, *et al.* Research progress of the regulation on active compound biosynthesis by the bHLH transcription factors in plants [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, **49**(4): 435 – 442.
- [19] WANG Jinyan, HU Zhongze, ZHAO Tongmin, *et al.* Genome-wide analysis of bHLH transcription factor and involvement in the infection by yellow leaf curl virus in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *BMC Genom*, 2015, **16**(1): 1 – 14. doi: 10.1186/s12864-015-1249-2.
- [20] PIRES N, DOLAN L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants [J]. *Mol Biol Evol*, 2010, **27**(4): 862 – 874. doi:10.1093/molbev/msp288.
- [21] FERRÉ-D'AMARÉ A R, PRENDERGAST G C, ZIFF E B, *et al.* Recognition by max of its cognate DNA through a dimeric bHLH/Z domain [J]. *Nature*, 1993, **363**(6424): 38 – 45. doi: 10.1038/363038a0.
- [22] XIONG Yuqing, LIU Tiejian, TIAN Chaoguang, *et al.* Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, **59**(1): 191 – 203. doi: 10.1007/s11103-005-6503-6.
- [23] RUSHTON P J, BOKOWIEC M T, HAN Shengcheng, *et al.* Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae [J]. *Plant Physiol*, 2008, **147**(1): 280 – 295. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.107.114041>.
- [24] JAILLON O, AURY J M, NOEL B, *et al.* The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla [J]. *Nature*, 2007, **449**(7161): 463 – 467. doi: 10.1038/nature06148.
- [25] ZHANG Xin, LUO Hongmei, XU Zhichao, *et al.* Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 11244. doi: 10.1038/srep11244.
- [26] 汪琬宜, 蒋喜红, 张利华, 等. 丹参转录因子 SmbHLH1 基因的克隆和表达分析[J]. 中国中药杂志, 2011, **36**(24): 3416 – 3420.
WANG Wanyi, JIANG Xihong, ZHANG Lihua, *et al.* Isolation and characteristics of SmbHLH1 gene in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, **36**(24): 3416 – 3420.
- [27] 周宏骏, 武玉翠, 晋鑫鑫, 等. 丹参转录因子 SmbHLH93 的克隆及表达模式分析[J]. 中草药, 2014, **45**(23): 3449 – 3455.
ZHOU Hongjun, WU Yucui, JIN Xinxin, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of transcription factor SmbHLH93 from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2014, **45**(23): 3449 – 3455.
- [28] HONG Gaojie, XUE Xueyi, MAO Yingbo, *et al.* Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression [J]. *Plant Cell*, 2012, **24**(6): 2635 – 2648. doi: 10.1105/tpc.112.098749.
- [29] ZHOU Yangyun, SUN Wei, CHEN Junfeng, *et al.* SmMYC2a and SmMYC2b played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 22852. doi: 10.1038/srep22852.
- [30] 王晓荣. 丹参 bHLH 类转录因子 MYCs 的基因克隆及功能初步研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2015.
WANG Xiaorong. *Isolation and Function Analysis of bHLH Transcription Factor in Salvia miltiorrhiza* [D]. Shanghai:

- Shanghai Normal University, 2015.
- [31] RUSHTON P J, TORRES J T, PARNISKE M, *et al.* Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes [J]. *Embo J*, 1996, **15**(20): 5690 – 5700.
- [32] XIE Zhen, ZHANG Zhonglin, ZOU Xiaolu, *et al.* Annotations and functional analyses of the rice *WRKY* gene super-family reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells [J]. *Plant Physiol*, 2005, **137**(1): 176. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.104.054312>.
- [33] LI Caili, LI Dongqiao, SHAO Fenjuan, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *WRKY* transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genom*, 2015, **16**(1): 200. doi: 10.1186/s12864-015-1411-x.
- [34] 郝小龙. 丹参 *SmWRKY3* 和 *SmWRKY70* 转录因子的功能研究[D]. 上海：上海师范大学，2014.
HAO Xiaolong. *The Functional Study of SmWRKY3 and SmWRKY70 Transcription Factor in Salvia miltiorrhiza* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2014.
- [35] 李磊磊. 丹参 *WRKY* 转录因子 *SmWRKY54* 的功能初步研究[D]. 上海：上海师范大学，2016.
LI Leilei. *The Functional Study of SmWRKY54 Transcription Factor in Salvia miltiorrhiza* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016.
- [36] FILICHKIN S A, PRIEST H D, GIVAN S A, *et al.* Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genome Res*, 2010, **20**(1): 45 – 58. doi: 10.1101/gr.093302.109.
- [37] MARQUEZ Y, BROWN J W, SIMPSON C, *et al.* Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis* [J]. *Genome Res*, 2012, **22**(6): 1184 – 1195. doi: 10.1101/gr.134106.111.
- [38] SHEN Yangting, ZHOU Zhengkui, WANG Zheng, *et al.* Global dissection of alternative splicing in paleopolyploid soybean [J]. *Plant Cell*, 2014, **26**(3): 996 – 1008. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.122739>.
- [39] BRADEN W, GENGKON L, GAURAV S, *et al.* Genome-wide landscape of alternative splicing events in brachypodium distachyon [J]. *DNA Res*, 2013, **20**(2): 163 – 171. doi: 10.1093/dnares/dss041.
- [40] ZHANG Guojie, GUO Guangwu, HU Xueda, *et al.* Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome [J]. *Genome Res*, 2010, **20**(5): 646 – 654. doi: 10.1101/gr.100677.109.
- [41] XU Zhicao, PETERS R J, WEIRATHER J, *et al.* Full-length transcriptome sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone biosynthesis [J]. *Plant J*, 2015, **82**(6): 951 – 961. doi: 10.1111/tpj.12865.