药用植物萜类化合物的生物合成与代谢调控研究进展

时敏^{1,2}, 王瑶², 周伟², 花强^{1*}, 开国银^{2*}

1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;

2. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

* 联系人, E-mail: qhua@ecust.edu.cn; guoyinkai@yahoo.com

收稿日期: 2017-09-16; 接受日期: 2017-12-11; 网络版发表日期: 2018-03-27

国家自然科学基金(批准号: 81522049, 31270007, 31571735, 30900110)、上海市科委项目(批准号: 17JC1404300, 15430502700)和上海市曙光学者计划(批准号: 16SG38)资助

摘要 药用植物来源的萜类化合物是自然界中广泛存在的次级代谢产物, 其结构与功能多样, 具有抗癌、抗氧化、抗病毒等广泛的药理作用. 本文以青蒿素、丹参酮、人参皂苷为例, 总结了其代谢途径关键酶基因、转录调控、代谢工程、合成生物学、合成与转运等研究进展, 并对今后的发展方向进行展望.

关键词 药用植物, 萜类化合物, 次级代谢, 生物合成, 调控

作为世界上植物资源最为丰富的国家之一, 我国约有高等植物30000余种, 其中药用植物约有12000种^[1]. 自《神农本草经》开始, 历代本草中记载了众多的药用植物, 许多用途广且药用价值高的种类在我国都有分布, 如人参、三七、川贝母、沉香等. 在植物界中有200000种具有药用价值的化合物^[2], 称之为次级代谢产物或天然产物, 大多数不直接参与植物的生长发育, 具有广泛的药理活性, 如抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗菌及病毒等^[3~5]. 根据次级代谢产物生物合成的起始分子不同, 将其分为萜类、酚类、含氮化合物等^[1,6].

萜类是以异戊二烯为基本单元构成的一类烃类化合物, 其通式为(C₅H₈)_n; 根据异戊二烯的数目可将萜类化合物分为单萜、倍半萜、双萜、三萜、四萜和多

萜; 根据萜类分子结构中碳环数的不同, 可将其分为链萜、单环萜、双环萜、三环萜、四环萜等; 由于具有不同的含氧基团, 又可将其分为酸、酮、酯、苷等萜类化合物^[7,8]. 作为初生代谢物的萜类种类较少, 如甾醇、胡萝卜素、植物激素等, 主要在植物的生长、发育与生理调节等方面发挥作用^[7]. 作为次生代谢产物的萜类化合物种类丰富, 具多样结构与功能, 在植物的逆境胁迫、病虫害、信号传递等方面发挥着重要作用, 且具有重要的药用价值, 如爵床科植物穿心莲中的穿心莲内脂具解热、抗炎作用^[9]; 来源于菊科植物的倍半萜内酯衍生物青蒿素不仅能够抗癌、消炎, 更是一种非常强大的抗疟疾药物^[10]; 红豆杉科植物红豆杉中的紫杉醇对卵巢癌、乳腺癌有明显疗效^[11]. 此外, 多种萜类化合物被广泛应用于香料、农药、染料等领

引用格式: 时敏, 王瑶, 周伟, 等. 药用植物萜类化合物的生物合成与代谢调控研究进展. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 352–364

Shi M, Wang Y, Zhou W, et al. Research progress in terms of the biosynthesis and regulation of terpenoids from medicinal plants (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 352–364, doi: [10.1360/N052017-00194](https://doi.org/10.1360/N052017-00194)

表 1 药用植物中常见萜类化合物

类型	名称
单萜	香叶醇、柠檬烯、月桂烯、薄荷醇、薄荷酮、芍药苷、 α -蒎烯、橙花醇、 β -罗勒烯、马鞭烯酮、芳樟醇、丁香烯、松油烯
倍半萜	青蒿素、棉酚、 α -法尼烯、 β -石竹烯、姜黄酮
二萜	丹参酮、紫杉醇、穿心莲内脂、雷公藤内脂、银杏内脂、甜菊苷、乌头碱、桂二萜醇
三萜	人参皂苷、川楝素、苦楝子酮、地榆皂苷、委陵菜苷、甘草甜素、黄芪皂苷、苦参皂苷、羽扇豆醇、白桦脂醇、甾醇
四萜	胡萝卜素、叶黄素
多萜	杜仲胶

域^[12-14]. 药用植物中常见萜类化合物见表1.

近年来, 围绕萜类物质代谢调控的研究取得了很大进展, 如代谢途径的基因挖掘、转录调控、代谢工程、合成场所、转运机制、合成生物学等. 本文就青蒿素、丹参酮、人参皂苷等3种常见且应用广泛的萜类化合物生物合成与代谢调控领域的研究进展进行系统总结, 并对可能存在的问题及应用前景进行展望.

1 药用植物萜类化合物的生物合成途径

萜类化合物的生物合成途径主要由3个阶段组成(图1): (i) 生成异戊烯基二磷酸酯(isopentenyl diphosphate, IPP)及其双键异构体二甲基烯丙基二磷酸酯(dimethylallyl diphosphate, DMAPP) C5前体; (ii) 生成法尼基二磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)、牻牛儿基二磷酸(geranyl diphosphate, GPP)及牻牛儿基牻牛儿基二磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)等直接前体; (iii) 萜类物质的生成及修饰. 目前, 前两个阶段已经研究得比较清楚, 第三阶段具种属特异性, 包含了多种不同的萜类合酶和修饰酶, 决定了萜类化合物结构的多样性^[6].

1.1 C5结构单元(IPP和DMAPP)的形成

通用前体IPP和DMAPP的合成是通过两条不同的途径进行的, 分别是位于细胞质中以乙酰辅酶A为起始原料的甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径以及位于质体中以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸为原料的甲基赤藓醇-4-磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径^[15]. 在MVA途径中, 两分子的乙酰辅酶A在乙酰乙酰CoA硫解酶(acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT)的作用下缩合形成乙酰乙酰辅酶A, 随后在HMG-CoA合成酶

(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase, HMGS)的作用下, 乙酰乙酰辅酶A与乙酰辅酶A缩合形成3-羟基-3-甲基戊二酰CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A, HMG-CoA), HMG-CoA被3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA还原酶(3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR)还原生成甲羟戊酸, 再经过两步磷酸化作用及一步脱羧反应, 最终生成IPP. MEP途径的第一个关键酶1-脱氧-D-木酮糖合成酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatesynthase, DXS)催化丙酮酸与3-磷酸甘油醛生成1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(DOXP), 随后DOXP在第二个关键酶1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR)的作用下生成MEP, 再经过一系列的酶促反应生成IPP. 在异戊烯基焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI)的催化下, IPP与DMAPP可相互转化^[7,16].

1.2 GPP, FPP, GGPP等前体物质的生成

在不同异戊烯转移酶的催化下, 不同数量的IPP与一分子的DMAPP结合生成GPP, FPP, GGPP等前体^[6,17]. 其中, 一分子的IPP和一分子的DMAPP在牻牛儿基二磷酸合成酶(geranyl diphosphate synthase, GPS)催化下生成GPP, 作为单萜的前体; 法尼基二磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)催化两分子的IPP和1分子的DMAPP缩合生成FPP, 成为倍半萜和三萜前体; 3分子的IPP和1分子的DMAPP经过牻牛儿基牻牛儿基二磷酸合酶(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPS)催化反应生成GGPP, 作为二萜和四萜的前体^[6,18].

1.3 萜类化合物的生成及次级修饰

GPP, FPP, GGPP等直接前体在不同萜类合酶(ter-

图1 植物萜类化合物(青蒿素、丹参酮、人参皂苷)生物合成途径

penes synthases, TPS)的催化下可形成单萜、倍半萜、二萜。TPS位于类异戊二烯途径分支点上,是各类萜类物质合成的关键酶,且某些TPS结构上的改变可催化底物形成多种产物^[6,19-22],但在TPS作用下形成的直接产物多为挥发性物质,需经过修饰酶如甲基转移酶、脱氢酶、细胞色素P450单加氧酶、还原酶等进一步的修饰从而形成终产物。

(1) 青蒿素的生成。FPP形成后,经过紫穗槐二烯合成酶(amorpha-4,11-diene synthase, ADS)的环化生成紫穗槐-4,11-二烯^[23],在细胞色素P450单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenase, CYP71AV1)的作用下,紫穗槐-4,11-二烯分别形成青蒿醇(artemisinic aldehyde, AAOH)、青蒿醛(artemisinic aldehyde, AAA)和青蒿酸(artemisinic acid, AA)。青蒿醇可以被催化形成二氢青蒿醇,二氢青蒿醇在细胞色素P450单加氧酶(CYP71AV1)和醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)的催化下经二氢青蒿酸(dihydroartemisinic

acid, DHAA)形成青蒿素^[24-27]。青蒿素是一种含过氧桥基团结构的倍半萜内酯类化合物,是我国发现的第一个被国际公认的抗疟首选天然药物^[28]。

(2) 丹参酮的生成。GGPP前体在柯巴基焦磷酸合酶(copalyl-diphosphate synthase, CPS)的催化下形成柯巴基焦磷酸(copalyl diphosphate, CPP),CPP在类贝壳杉烯合酶(ent-kaurene synthase like, KSL)的作用下,经过三步环化及重新排列生成次丹参酮二烯(miltiradiene),随后在细胞色素P450单加氧酶(CYP76AH1)的催化下生成铁锈醇(ferruginol),再经过一系列反应进而生成终产物丹参酮^[29-31]。丹参酮是一类二萜醌类化合物,主要包括丹参酮I、丹参酮IIA、二氢丹参酮及隐丹参酮等,被广泛应用于治疗心脑血管疾病、月经不调及各种炎症等^[32]。

(3) 人参皂苷的生成。FPP形成后,角鲨烯合酶(squalene synthase, SS)催化两分子的FPP头-头还原偶联生成C30骨架的角鲨烯(squalene),随之被鲨烯环氧

酶(squalene epoxidase, SE)催化形成2,3-氧化鲨烯^[33]. 2,3-氧化鲨烯在 β -香树脂合成酶(β -amyrin synthase)的催化下生成齐墩果酸型皂苷(ginsenoside Ro)昔元- β -香树脂(β -amyrin), 并进一步在糖基转移酶的作用下生成人参皂苷Ro. 2,3-氧化鲨烯还可在达玛烷合酶(dammarenediol-II synthase, DS)的催化下生成达玛烯二醇(dammarenediol), 随后达玛烯二醇在细胞色素P450单加氧酶的催化下形成达玛烷型皂苷三萜昔元-原人参二醇(protopanaxadiol), 原人参二醇在P450的催化下转变为原人参三醇(protopanaxatriol)^[34-36]. 其中, 达玛烷型人参皂苷在含量与结构多样性上均高于齐墩果酸型^[37].

2 萜类化合物合成的生物反应器

萜类在植物中的含量通常很低, 如植源性抗癌药物紫杉醇在红豆杉中的含量仅为0.01%左右^[38], 且植物提取法还存在野生资源稀缺、分离效果不佳、产量极低等问题, 相对而言, 生物反应器的建立不受资源的制约且产率相对较高. 常见萜类化合物合成的生物反应器包括植物生物反应器与微生物反应器两种, 其中植物生物反应器是指利用天然的或经基因工程改良的植物细胞、组织、器官或整株植株, 大量生产具有重要功能的蛋白质, 如疫苗、抗体或次生代谢产物等^[39]. 微生物反应器是指在微生物体内直接生成或通过构建代谢途径、引入关键酶, 生产次级代谢产物的方法.

2.1 细胞培养

植物细胞培养是利用从植物体取下的细胞, 在一定的培养条件下, 达到大量繁殖、生产某些次级代谢产物的目的^[40]. 植物细胞的培养不受资源的限制, 易于工业化生产, 且便于分离纯化. 近年来, 进行植物细胞培养研究的萜类化合物越来越多, 包括紫杉醇、青蒿素、丹参酮、人参皂苷等^[41-44].

2.2 组织培养

利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或发根农杆菌(*A. rhizogenes*)感染植物外植体, 将质粒上的T-DNA插入植物细胞, 经过同源重组, 整合到植物基因组中, 在植物细胞中表达, 获得毛状根体系或转基因植株, 为提高有用次级代谢产物的含量及代谢调控的研

究奠定了基础^[45,46].

2.3 内生真菌

植物内生真菌是指在生活史中某一阶段存在于植物组织(种子、花、茎、叶片、根等)内部, 而不引起宿主明显病害症状的一类微生物^[47]. 由于内生真菌长期生活在植物体内, 可能产生与宿主相同或类似的具有生物活性的次级代谢产物^[48]. Kumaran和Hur^[49]从日本红豆杉的叶中分离到*Phomopsis* BKH27, 其紫杉醇产量达到418 $\mu\text{g/L}$, 经测试对人肿瘤细胞有很强的细胞毒作用. Ming等人^[50]从丹参根中分离出18种内生真菌, HPLC结果显示木霉菌D16的菌丝提取物中含有丹参酮 I 和丹参酮 II A.

3 萜类化合物的合成生物学研究

合成生物学是由分子生物学、基因组学、信息技术和工程学交叉融合而成的一门整合科学, 其本质是工程学, 按照人为需求, 采用“自下而上”的研究策略, 人工合成有生命功能的元件、模块或器件、系统、细胞等^[51]. 目前已有多个研究报道萜类化合物合成生物学的研究进展.

3.1 青蒿素的合成生物学研究

Tsuruta等人^[52]将青蒿中的紫穗槐-4,11-二烯合酶(amorpha-4,11.dienesynthase, ADS)在酵母中过表达, 实现了青蒿素合成前体紫穗槐-4,11-二烯的合成, 并通过元件改造、条件优化, 进一步提高了AD的产量. Paddon等人^[53]将 $MET3$ 启动子替换为铜调控的 $CTR3$ 启动子, 拟通过抑制 $ERG9$ 的表达减少鲨烯合成途径代谢流, 结果发现 P_{CTR3} - $ERG9$ 和 P_{MET3} - $ERG9$ 工程菌中紫穗槐二烯的产量相当; 在此基础上整合 $CYP71AV1$ 和 $CPR1$ 基因, 倍半萜含量明显降低且细胞生存能力降低, 推测是由细胞色素的氧化作用或青蒿酸的迅速积累引起的; 在降低 $CPR1$ 表达的菌株中整合细胞色素b5(cytochrome b5, $CYB5$), 青蒿酸及青蒿醛的含量明显升高; 融合青蒿醛脱氢酶基因($ALDH1$)及乙醇脱氢酶基因($ADH1$), 青蒿醇和青蒿醛含量大幅降低, 青蒿酸含量大幅度积累; 再通过添加十四烷酸异丙酯油(IPM), 最终使酵母中青蒿酸的含量达到25 g/L, 初步达到工业生产水平. 青蒿素是目前利用合成生物学技术实现

产业化最为成功的典范之一。

3.2 丹参酮的合成生物学研究

次丹参酮二烯是丹参酮类化合物合成的关键前体, Zhou等人^[54]通过模块途径工程策略在酿酒酵母基因组中将次丹参酮二烯合成途径的两个次丹参酮二烯合酶SmCPS, SmKSL以及催化FPP合成的ERG20, 将FPP转化成GGPP的BTS1进行融合, 使得次丹参酮二烯的合成更加高效, 最终获得次丹参酮二烯的含量高达365 mg/L。在细胞色素P450氧化酶的作用下, 丹参酮二烯可被转化成具有稳定生物学活性的铁锈醇, 以高产次丹参酮二烯的酵母为基础, 引入丹参酮细胞色素P450氧化酶基因及细胞色素CYP450还原酶基因SmCPR1/SmCPR2, 成功合成了丹参酮中间产物铁锈醇, 且铁锈醇的产量和次丹参酮二烯的积累呈负相关, 在摇瓶发酵条件下铁锈醇的最高产量达到10.5 mg/L^[31,55]。

3.3 人参皂苷的合成生物学研究

Dai等人^[56]在酿酒酵母中构建原人参二醇的生物合成途径, 通过密码子优化策略提高3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶、法尼烯焦磷酸合酶、鲨烯环氧酶和鲨烯合成酶的活性, 将原人参二醇的产量提高了262倍, 通过双相发酵工艺优化, 最终将原人参二醇的产量提高至8.40 mg/L DCM (1189 mg/L)。Wei等人^[57]首次鉴定了一个来源于人参的UDP-糖基转移酶(UDP-glycosyltransferase g1, UGTPg1), 在酵母中与CYP716A47及其辅酶ATR2-1共表达, 实现了人参二醇型皂苷CK的从头合成。

4 萜类化合物生物合成与调控的研究

现代分子生物学技术的发展为研究萜类化合物生物合成途径及调控机制提供了一定的技术支撑。目前在青蒿、丹参、人参中已经克隆得到众多萜类化合物生物合成途径的关键酶基因。通过过量表达或抑制表达关键酶基因, 可增加或抑制萜类的积累。随着高通量测序技术的发展, 调控生物合成途径关键酶基因表达的转录因子也逐渐被发现, 研究其作用机制及参与的信号通路, 为深入挖掘萜类化合物的合成与调控研究打下了基础。

4.1 青蒿素的生物合成与调控

(1) 青蒿素合成途径关键酶基因的研究。单基因过表达。青蒿3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A还原酶(*Artemisia annua* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase AaHMGR)是MVA途径中的关键酶, 过表达AaHMGR获得转基因青蒿植株, 发现其中的青蒿素含量与对照相比, 增加了22.5%^[58]。将青蒿素代谢途径上的关键酶基因FPS导入到青蒿中, 过量表达FPS的转基因青蒿植株与非转基因对照相比, 青蒿素含量提高了2.5倍^[59]。在青蒿中过表达AaHDDR1 (*A. annua* 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase 1)基因, 其中的青蒿素、青蒿素B及其他倍半萜的含量均有不同程度的增加^[60]。过表达AaDXR的转基因青蒿中青蒿素含量比野生型相比提高了近2倍^[61]。

多基因过表达。青蒿羟甲基丁烯基-磷酸还原酶(AaHDR)是MEP途径上最后一个关键酶, AaADS是催化青蒿素下游生物合成途径的第一个关键步骤。在青蒿中共表达HDR和ADS, 转基因株系AH70中青蒿素含量为对照的3.48倍, 表明HDR和ADS基因具有提高青蒿素含量的作用^[62]。在青蒿中过表达CrHMGR和AaADS, 同时调控MVA途径和青蒿素下游生物合成途径, 发现转基因株系中青蒿素含量比非转基因植株高7.65倍^[63]。共表达AaCYP71AV1和细胞色素P450还原酶(AaCPR)可使青蒿素含量比非转基因株系提高38%^[64]。Lu等人^[65]在青蒿中首次同时过表达ADS, CYP71AV1和CPR基因, HPLC分析表明ACR株系中的青蒿素含量比对照株系高出2.4倍, 达到15.1 mg/g DW。Shi等人^[66]通过在青蒿中同时过表达ADS, CYP71AV1, CPR, ALDH1等4个关键酶基因, 使青蒿素的含量达到27 mg/g, 是野生型的3.4倍。

基因抑制。Ma等人^[60]构建AaHDDR1基因的反义抑制载体, 遗传转化青蒿植株, Anti-sense-AaHDDR1植株的叶片中青蒿素含量下降了27%~33%, 青蒿素B的含量降低2倍, 多种其他萜类物质的含量也有不同程度地减少, 表明AaHDDR1不仅促进青蒿素的积累, 对其他萜类物质的合成也有重要作用。

(2) 调控青蒿素合成的转录因子的研究。AP2/ERF家族转录因子。Yu等人^[67]克隆的两个响应JA诱导并在花序中高表达的AP2转录因子AaERF1和AaERF2, 可通过与AaADS, AaCYP71AV1启动子中的CBF2

(CRTDREHVCBF2)和RAA (RAV1AAT)元件结合, 调控*AaADS*, *AaCYP71AV1*基因的表达, 促进青蒿素的积累. 与此同时, 在RNAi-*AaERF1*, RNAi-*AaERF2*转基因株系中, 青蒿素积累减少. 作为腺毛特异性表达的AP2/ERF家族转录因子, *AaORA*可正调控*AaADS*, *AaCYP71AV1*, *AaDBR2*和*AaERF1*等基因的表达来提高青蒿素的含量, 与对照相比, 过表达植株中青蒿素的含量提高了40%~53%; 在RNAi-*AaORA*株系中, 相关关键酶基因的表达明显降低, 同时*AaORA*可通过防御标志基因*PDF1.2* (plant defensin 1.2), *HEL* (heveinlike protein), *B-CHI* (basic chitinase)提高拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)对灰霉菌*B. cinerea*的抵抗能力^[68]. Tan等人^[69]研究发现, 青蒿*AaTAR1* (trichome and artemisinin regulator 1)可通过与*AaADS*和*AaCYP71AV1*启动子区域的CBF2和RAA结合, 调控腺毛发育与青蒿素的积累.

WRKY家族转录因子. WRKY转录因子是高等植物中最重要的转录因子基因家族之一, 其在植物形态建成、生长发育、应对生物或非生物胁迫过程中发挥重要作用. *AaWRKY1*是最早在青蒿中发现的转录因子, *AaWRKY1*可与*AaCYP71AV1*, *AaADS*基因启动子区域的W-box结合, 提高*AaCYP71AV1*与*AaADS*的表达, 从而促进青蒿素的积累^[70,71]. *AaGSW1*作为分泌型腺毛特异性的WRKY转录因子, 受到*AaMYC2*与*AaZIP1*的调控, 可与*AaCYP71AV1*, *AaORA*基因的W-box结构域结合, 正调控青蒿素的积累^[72].

NAC家族转录因子. Lv等人^[73]研究发现, 响应水杨酸、干旱及茉莉酸诱导的*AaNAC1*, 可正调控青蒿素合成途径中*ADS*, *DBR2*, *ALDH1*等基因的表达, 促进青蒿素的积累和转基因青蒿耐旱及抗灰霉菌的能力.

bHLH家族转录因子. Shen等人^[74]从青蒿中克隆得到受JA诱导的bHLH家族转录因子*AaMYC2*, 其可与*AaCYP71AV1*和*AaDBR2*启动子中的G-box like结构域结合, 正调控*AaCYP71AV1*和*AaDBR2*基因的转录, 从而影响青蒿素的合成. Ji等人^[75]分离得到一条*AaBHLH1*, 其可与*AaADS*, *AaCYP71AV1*启动子区域的E-box结合, 提高*AaADS*, *AaCYP71AV1*, *AaHMGR*等的表达水平, 促进青蒿素的积累.

MYB家族转录因子. MYB转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, 其N端都含有保守的MYB结构域. 根据MYB结构域R个数的不同, MYB可以分为四

类, 其中R2R3-MYB转录因子成员最多. 在青蒿中过表达*AaMYB1*, 其腺毛数量增加, 青蒿素合成途径中的关键酶基因的表达量增高, 青蒿素的含量增加. 同时在拟南芥中过表达*AaMYB1*, 发现其对拟南芥根的发育与气孔均有一定的影响^[76].

bZIP家族转录因子. 在ABA信号途径中, *AaZIP1*可与*AaADS*, *AaCYP71AV1*启动子区域的ABA反应元件(ABA response elements, ABRE)结合. 在*AaZIP1-OX*转基因株系中, *AaZIP1*通过上调*AaADS*, *AaCYP71AV1*, *AaDBR2*和*AaALDH1*基因的转录水平, 使青蒿素的含量增加了0.7~1.5倍^[77,78]. Yan等人^[79]克隆得到一条受JA调控的*AaHDI* (homeodomain protein 1), 其可与*AaJAZ8* (jasmonate ZIM-domain 8)结合, 通过调控腺毛的密度影响青蒿素的含量.

(3) 青蒿素的合成与转运. 分泌型腺毛是青蒿素生物合成的主要场所, 青蒿素生物合成途径中的相关基因或调控基因在腺毛中特异性表达, 可通过影响腺毛的密度或青蒿素生物合成途径中关键酶基因的表达来影响青蒿素的合成^[27]. 转运蛋白也可作为调控青蒿素生物合成的研究方向. Wang等人^[80]从青蒿中获得的在腺毛中特异表达的脂质转运蛋白3 (lipid transfer protein 3, *AaLTP3*)和多向耐药性转运蛋白(pleiotropic drug resistance 2, *AaPDR2*), 能够提高DH (AA)在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)叶子质外体中的积累, 阻止其从质外体流向细胞内. Fu等人^[81]克隆得到一个多向耐药性转运蛋白(*AaPDR3*), 其可通过将 β -caryophyllene募集在T型腺毛中以降低细胞损伤程度. 在*AaPDR3-RNAi*转基因青蒿中, β -caryophyllene的含量降低, 而青蒿素的含量增高, 推测*AaPDR3*可通过影响青蒿素生物合成的竞争途径, 让更多的前体流向青蒿素代谢途径.

4.2 丹参酮生物合成与调控的研究

(1) 关键酶基因的过表达与抑制. 单基因过表达. 丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.) *HMGR*基因编码565个氨基酸, 在丹参根、茎、叶中均有不同程度的表达^[82]. 在过表达*SmHMGR*丹参毛状根中, 丹参酮的含量比对照组高出2.2倍, 表明*SmHMGR*可有效促进丹参中丹参酮的积累^[83]. 开国银研究组^[83]从丹参中克隆出两个丹参*DXS*成员, 分别命名为*SmDXS1*和*SmDXS2*, 其中*DXS1*为组成型表达基因, *DXS2*为非组成型表达基因. 在丹

参毛状根中过表达*SmDXS2*, 丹参酮含量明显增加. 通过遗传工程策略, 在丹参毛状根中过表达*SmGGPPS*, 可将丹参酮含量提高至4.95 mg/g DW^[84].

多基因过表达. 在丹参毛状根中共表达*SmHMGR*和*SmGGPPS*, 可产生协同促进作用, 在HG9株系中, 丹参酮含量为2.727 mg/g DW, 是对照组的5.74倍^[83]. Shi等人^[85]在丹参毛状根中共表达*SmHMGR*和*SmDXR*, 将丹参酮含量提高到3.25 mg/g DW, 并通过YE, Ag⁺的诱导进一步提高毛状根中丹参酮的含量. 将*SmGGPPS*和*SmDXS2*共同导入丹参, 可促进丹参酮的积累, 其中GDH10株系中丹参酮含量提高至12.93 mg/g DW; 同时遗传转化拟南芥, 胡萝卜素等萜类物质的含量也明显提高^[84].

基因抑制. 黄璐琦研究组^[86]通过cDNA微阵列芯片, 筛选并克隆得到丹参异戊烯基焦磷酸异构酶(*SmIPI*)基因, 通过构建RNA干扰载体遗传转化获得毛状根体系, 发现RNAi株系的毛状根畸形老化比较严重, 且几乎检测不到丹参酮, 在大肠杆菌中异源过表达*SmIPI*可促进代谢流产生胡萝卜素, 表明*SmIPI*在MEP途径中发挥的作用更大. *SmCPS*是在GGPP形成后第一个发挥作用的关键酶, 在丹参毛状根中干扰*SmCPS*的表达, 二氢丹参酮和隐丹参酮的含量与对照相比分别下降53%和38%, 且检测不到丹参酮IIA^[87]. 在酵母表达系统及以次丹参酮二烯作为底物进行的体外酶促反应对丹参*CYP76AH1*基因的功能进行了初步研究, 为确定其在丹参酮生物合成途径中的作用, 通过遗传转化获得RNAi-*CYP76AH1*毛状根系统, 结果发现其有效抑制了转化过程, 铁锈醇的含量明显降低, 削弱了丹参酮IIA、隐丹参酮、丹参酮I等终产物的积累^[88]. Xu等人^[89]从丹参中克隆到2OGD (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase)基因, RNAi-2OGD第5号株系中的丹参新酮、隐丹参酮、丹参酮IIA含量均降低, 表明其能促进丹参酮类物质的合成.

(2) 调控丹参酮合成的转录因子的研究. bHLH家族转录因子. Zhou等人^[90]从丹参中克隆得到*SmMYC2a*和*SmMYC2b*转录因子, 此两条基因受JA诱导; 在*SmMYC2a/b*-RNAi毛状根株系中, *SmCPS*, *SmKSL*, *SmDXR*等基因的表达明显受到抑制, 降低了丹参酮的含量, 表明*SmMYC2a*, *SmMYC2b*是丹参酮合成途径中的正调控因子.

MYB家族转录因子. *SmMYB9b*是响应ABA的S20

R2R3-MYB家族转录因子的一个成员, 其主要在花中表达. 研究表明, *SmMYB9b*可通过促进*SmDXS2*, *SmDXR*, *SmGGPPS*, *SmKSL1*的表达提高丹参酮含量, 同时抑制毛状根的生长^[91].

JAZ转录抑制因子. JAZ (jasmonate ZIM-domain) 蛋白是茉莉酸信号途径中的转录抑制因子, 当受到环境胁迫时, 植物体内合成足够的JA, 在JAR1的作用下可形成JA-Ile. JA-Ile促进了SCF^{COI1}与JAZ的结合, 导致了26S蛋白水解酶对JAZ的降解, 使得有活性的MYC2被释放出来, 从而启动了茉莉酸响应基因的转录, 调控次级代谢物的合成或植物发育等. Shi等人^[92]从丹参中克隆得到两个JAZ基因, 分别命名为*SmJAZ3*, *SmJAZ9*, 在丹参毛状根中过表达*SmJAZ3*, *SmJAZ9*, 丹参酮的合成受到明显抑制. Zhou等人^[93]从丹参中获得两个JAZ基因(*SmJAZ1*, *SmJAZ2*), 其与*SmMYC2a/b*存在相互作用, 推测*SmJAZ1*, *SmJAZ2*通过抑制*SmMYC2*的活性, 抑制丹参酮合成途径关键酶基因的表达, 从而导致丹参酮含量的降低.

(3) 丹参酮的主要合成部位. 丹参根的周皮组织是丹参酮合成与积累的主要部位. 根周皮中丹参酮IIA的含量分别是木质部和韧皮部的185与17倍. 丹参酮合成途径中的3个关键基因*CPS1*, *KSL1*, *CYP74AH1*与几个关键的上游基因主要在周皮中表达^[94].

4.3 人参皂苷生物合成与调控的研究

(1) 人参皂苷生物合成关键酶基因的研究. 单基因过表达. 人参SS催化两分子的FPP生成鲨烯, 响应MeJA诱导的*PgSSI*在转基因人参不定根中可激活人参皂苷下游合成途径中*SE*, *bAS*, *CAS*的表达, 促进植物甾醇含量的合成及人参皂苷Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf和Rg₁的积累^[33]. 在积雪草(*Centella asiatica* (L.) Urban)毛状根中过表达*PgFPS*基因, 可促进*CaDDS*基因的转录, 从而引起植物甾醇与三萜化合物的积累^[95]. *PgLOX6*是人参中的一种13-脂氧合酶基因, 在人参毛状根中过表达*PgLOX6*基因, 可上调*PgSSI*, *PgSE1*, *PgDDS*等基因的表达, 使人参皂苷含量增加1.4倍^[96]. 在人参中过表达*CYP716A53v2*基因, 原人参三醇(Rg₁, Re, Rf)的含量增加, 原人参二醇(Rb₁, Rc, Rb₂, Rd)的含量降低^[97].

基因抑制. 鲨烯经SE的作用生成2,3-氧化鲨烯, Han等人^[98]研究发现, 两个受不同方式调控的鲨烯环

氧酶基因*PgSQE1*和*PgSQE2*, 两者具有83%的同源性, 在转基因人参中干扰*PgSQE1*的表达, 人参皂苷的含量降低, 但*PgSQE2*基因的表达上调, 促进甾醇的积累. 达玛烷合酶(dammarenediol synthase, DS)可催化2,3-氧化鲨烯生成达玛烯二醇, 被认为是人参皂苷生物合成中最重要的关键酶, Han等人^[36]通过RNAi技术使DS基因沉默, 导致人参根中皂苷含量降低至对照组的84.5%.

(2) 调控人参皂苷合成的转录因子的研究. WRKY家族转录因子. 茉莉酸甲酯作为一种信号分子, 可以通过激活细胞中的某些途径来调控次级代谢产物的合成. 研究表明, 在适当的浓度下, MeJA可促进人参毛状根中人参皂苷的积累. 利用MeJA诱导人参不定根, 通过转录组分析, 获得定位于细胞核的*PgWRKY1*, 可响应SA, ABA和NaCl的正向调控, 表明其可能参与人参的多个信号途径^[99].

MYB家族转录因子. Afrin等人^[100]从人参中克隆得到的*PgMYB1*属于R2R3型MYB转录因子; 其定位于细胞核, 并在根、叶中高通量表达; 受ABA, SA, NaCl及冷处理后表达上升, MeJA处理后表达量下调, 表明*PgMYB1*可能参与到不同的压力及信号通路中.

5 讨论

植物次生代谢产物是自然界中最丰富的天然产

物, 在植物与外界环境相互作用中具有重要作用, 且与人类的生存和发展息息相关. 作为植物次生代谢产物中最大的一类成员, 萜类具有重要功能及众多应用价值. 随着现代生物技术手段的发展, 近年来在萜类化合物生物合成途径相关功能基因研究、代谢调控、代谢工程、合成生物学等方面取得了很大进展. 药用植物代谢调控的研究与模式植物相比起步较晚, 对萜类物质的研究接下来将集中在以下4个方面(图2):

(1) 萜类生物合成途径功能基因的挖掘. 解析萜类化合物生物合成途径对于研究药用植物的生长、发育等规律具有重要意义, 也为异源合成次级代谢产物提供一定的基础. 目前仅有少数药用植物中萜类物质生物合成途径研究得较为清楚, 如青蒿素及紫杉醇等. 对于其他萜类化合物包括丹参酮、人参皂苷等代谢途径的研究还需分离各种萜类合酶及修饰酶, 通过体外原核或真核表达并结合酶促反应对其催化功能及产物进行鉴定; 在体内过表达或进行RNA干扰验证基因在植物体内的功能, 以进一步解析其合成途径.

(2) 萜类生物合成网络调控机制的研究. 转录因子是一类能特异结合基因启动子的蛋白质, 通过与基因启动子上相应的顺式作用元件相结合, 从而调控一条或多个合成酶基因的表达. 随着基因组学、转录组

图2 萜类化合物的生物合成与调控

①②③: 举例说明获得萜类物质的途径; ④⑤⑥: 举例说明萜类化合物生物合成途径及代谢调控的研究方法

学、蛋白质组学、代谢组学的发展, 需要将不同组学技术进行组合, 构建从基因到代谢的网络, 进一步确定萜类物质生物合成、转运、调控等相关基因及其调控机制, 并揭示不同代谢途径间的交叉作用机制及抗病、抗逆等机制。

(3) 萜类的合成生物学研究. 合成生物学的发展为解决某些药源紧张问题提供了一条新的思路. 为提高萜类化合物的产量, 需要考虑以下3个因素: (i) 产物合成能力的改进提高: 可通过提高生物合成途径中限速步骤的酶基因的效率或增加合成所需代谢前体物的供给来实现; (ii) 抑制竞争代谢途径或旁支途径以减少代谢流流入竞争代谢途径中, 促使其流入目标产物的生物合成途径; (iii) 培养工程或条件的控制与优

化: 选择具备生长快速、遗传操作简单、易于大规模培养等特征的更具优势的底盘细胞, 构建高产工程菌株, 并对发酵条件进行优化, 调控细胞生长与目的产物之间的平衡, 以高效生产目标产物。

(4) 萜类合成部位、转运机制. 由于关键酶基因的特异性表达, 使得次级代谢物质的积累具有空间特异性. 通过研究次级代谢物的特异性合成部位, 对于其代谢调控具有重要作用. 可通过构建特异性表达的启动子, 使其只在合成部位表达, 从而实现下游基因的特异性表达; 调控其合成部位相关的转录因子, 促进关键基因的表达, 实现萜类的定向合成. 通过研究相关转运蛋白及其转运机制对于萜类物质生物合成与积累、表皮形成、抗病虫等方面具有重要的意义。

参考文献

- 1 Yang L, Yang C, Li C, et al. Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants. *Sci Bull*, 2016, 61: 3–17
- 2 Harvey A L, Edrada-Ebel R A, Quinn R J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 111–129
- 3 Qiu J. A culture in the balance. *Nature*, 2007, 448: 126–128
- 4 Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, et al. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of cucurbitane glycosides from the roots of *Bryonia dioica*. *J Nat Prod*, 2002, 65: 179–183
- 5 Singh B, Sharma R A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *Biotech*, 2015, 5: 129–151
- 6 王凌健, 方欣, 杨长青, 等. 植物萜类次生代谢及其调控. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43: 1030–1046
- 7 梁宗锁, 方誉民, 杨东风. 植物萜类化合物生物合成与调控及其代谢工程研究进展. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2017, 37: 255–264
- 8 辛凤姣, 王凤忠, 李淑英, 等. 萜类化合物的合成生物学研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33: 64–75
- 9 付佳, 王洋, 阎秀峰. 萜类化合物的生理生态功能及经济价值. *东北林业大学学报*, 2003, 31: 59–62
- 10 Wright C W. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100: 67–71
- 11 Jennewein S, Croteau R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotech*, 2001, 57: 13–19
- 12 Martin V J J, Pitera D J, Withers S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotech*, 2003, 21: 796–802
- 13 Pichersky E, Gershenzon J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 237–243
- 14 Aharoni A, Jongsma M A, Bouwmeester H J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 594–602
- 15 Lange B M, Rujan T, Martin W, et al. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13172–13177
- 16 Nagegowda D A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett*, 2010, 584: 2965–2973
- 17 Liang P H, Ko T P, Wang A H J. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3339–3354
- 18 McGarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 1995, 7: 1015–1026
- 19 Köllner T G, Schnee C, Gershenzon J, et al. The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell*, 2004, 16: 1115–1131

- 20 Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1621–1637
- 21 Keeling C I, Weisshaar S, Lin R P C, et al. Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 1085–1090
- 22 Zerbe P, Bohlmann J. Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. *Trends Biotech*, 2015, 33: 419–428
- 23 Nguyen K T, Arsenault P R, Weathers P J. Trichomes+roots+ROS=artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2011, 47: 329–338
- 24 Wang H, Han J, Kanagarajan S, et al. Trichome-specific expression of the amorpho-4,11-diene 12-hydroxylase (*cyp71av1*) gene, encoding a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, as reported by a promoter-GUS fusion. *Plant Mol Biol*, 2013, 81: 119–138
- 25 Wang Y Y, Yang K, Jing F Y, et al. Cloning and characterization of trichome specific promoter of *cpr71av1* gene involved in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.. *Mol Biol*, 2011, 45: 817–824
- 26 Teoh K H, Polichuk D R, Reed D W, et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Lett*, 2006, 580: 1411–1416
- 27 肖玲, 吕宗友, 谭何新, 等. 青蒿素代谢调控研究进展. *中草药*, 2017, 48: 1005–1014
- 28 Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 1985, 228: 1049–1055
- 29 Gao W, Hillwig M L, Huang L, et al. A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights. *Org Lett*, 2009, 11: 5170–5173
- 30 Ma Y, Yuan L, Wu B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *J Exp Bot*, 2012, 63: 2809–2823
- 31 Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12108–12113
- 32 Hui X, Lin Z, Congcong Z, et al. Metabolic regulation and genetic engineering of pharmaceutical component tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *J Med Plants Res*, 2010, 4: 2591–2597
- 33 Lee M H, Jeong J H, Seo J W, et al. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 976–984
- 34 Tansakul P, Shibuya M, Kushiro T, et al. Dammarenydiol-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis, in *Panax ginseng*. *FEBS Lett*, 2006, 580: 5143–5149
- 35 Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. beta-Amyrin synthase-cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur J Biochem*, 1998, 256: 238–244
- 36 Han J Y, Kwon Y S, Yang D C, et al. Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarenydiol synthase gene in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 1653–1662
- 37 吴琼, 周应群, 孙超, 等. 人参皂苷生物合成和次生代谢工程. *中国生物工程杂志*, 2009, 29: 102–108
- 38 邱德有, 张彬, 杨艳芳, 等. 紫杉醇生物合成研究历史、现状及展望. *生物技术通报*, 2015, 31: 56–64
- 39 凌华, 黄惠琴, 鲍时翔. 植物生物反应器研究进展. *中国生物工程杂志*, 2002, 22: 21–26
- 40 Zhong J J. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2001, 72: 1–26
- 41 Sabater-Jara A B, Onrubia M, Moyano E, et al. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 1075–1084
- 42 Ali M, Abbasi B H, Ahmad N, et al. Strategies to enhance biologically active-secondary metabolites in cell cultures of *Artemisia*—current trends. *Crit Rev Biotech*, 2017, 37: 833–851
- 43 Zhao J L, Zhou L G, Wu J Y. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 137–144
- 44 Hu W W, Yao H, Zhong J J. Improvement of *Panax notoginseng* cell culture for production of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation in pneumatically agitated bioreactors. *Biotechnol Prog*, 2001, 17: 838–846
- 45 宋经元, 张荫麟, 任春玲. 农杆菌介导的药用植物的转化. *中国中药杂志*, 2000, 25: 73–76

- 46 孔静, 金鑫, 李晓波. 毛状根培养生产天然活性物质. 中国医学生物应用杂志, 2003, 3: 21–27
- 47 李秀清, 舒志恒, 明乾良, 等. 丹参中麦角甾醇高产内生真菌的鉴定及分析. 药学服务与研究, 2016, 16: 448–451
- 48 陈刚, 周谦, 王旻, 等. 产紫杉醇植物内生真菌的研究进展. 中国野生植物资源, 2015, 34: 24–29
- 49 Kumaran R S, Hur B K. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 54: 21–30
- 50 Ming Q, Han T, Li W, et al. Tanshinone IIA and tanshinone I production by *Trichoderma atroviride* D16, an endophytic fungus in *Salvia miltiorrhiza*. *Phytomedicine*, 2012, 19: 330–333
- 51 何询, 陈怡露. 合成生物学促进中药活性成分的生物合成. 生物产业技术, 2012, 4: 13–19
- 52 Tsuruta H, Paddon C J, Eng D, et al. High-level production of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2009, 4: e4489
- 53 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528–532
- 54 Zhou Y J, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 3234–3241
- 55 高伟, 胡添源, 郭娟, 等. 丹参酮合成生物学研究进展. 中国中药杂志, 2015, 40: 2486–2491
- 56 Dai Z, Liu Y, Zhang X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metab Eng*, 2013, 20: 146–156
- 57 Wei W, Wang P, Wei Y, et al. Characterization of *Panax ginseng* UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F1 and Rh1 in metabolically engineered yeasts. *Mol Plant*, 2015, 8: 1412–1424
- 58 Aquil S, Husaini A M, Abdin M Z, et al. Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. *Planta Med*, 2009, 75: 1453–1458
- 59 Chen D H, Ye H C, Li G F. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci*, 2000, 155: 179–185
- 60 Ma D, Li G, Zhu Y, et al. Overexpression and suppression of *Artemisia annua* 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase 1 gene (*AaHDR1*) differentially regulate artemisinin and terpenoid biosynthesis. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 77
- 61 陈韵斐, 张芳源, 唐克轩. 过量表达*DXR*基因提高青蒿中青蒿素的含量. 上海交通大学学报(农业科学版), 2012, 30: 19–23
- 62 王亚雄, 龙世平, 曾利霞, 等. 过表达*HDR*和*ADS*基因对青蒿素生物合成的影响. 药学报, 2014, 49: 1346–1352
- 63 Alam P, Abdin M Z. Over-expression of HMG-CoA reductase and amorpha-4,11-diene synthase genes in *Artemisia annua* L. and its influence on artemisinin content. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 1919–1928
- 64 Shen Q, Chen Y F, Wang T, et al. Overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase (*CYP71AV1*) and cytochrome P450 reductase (*CPR*) genes increased artemisinin content in *Artemisia annua* (Asteraceae). *Genet Mol Res*, 2012, 11: 3298–3309
- 65 Lu X, Shen Q, Zhang L, et al. Promotion of artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* by overexpressing *ADS*, *CYP71AV1* and *CPR* genes. *Indust Crops Products*, 2013, 49: 380–385
- 66 Shi P, Fu X, Liu M, et al. Promotion of artemisinin content in *Artemisia annua* by overexpression of multiple artemisinin biosynthetic pathway genes. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2017, 129: 251–259
- 67 Yu Z X, Li J X, Yang C Q, et al. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.. *Mol Plant*, 2012, 5: 353–365
- 68 Lu X, Zhang L, Zhang F, et al. *AaORA*, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea*. *New Phytol*, 2013, 198: 1191–1202
- 69 Tan H, Xiao L, Gao S, et al. TRICHOME AND ARTEMISININ REGULATOR 1 is required for trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Mol Plant*, 2015, 8: 1396–1411
- 70 Han J, Wang H, Lundgren A, et al. Effects of overexpression of *AaWRKY1* on artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. *Phytochemistry*, 2014, 102: 89–96
- 71 Ma D, Pu G, Lei C, et al. Isolation and characterization of *AaWRKY1*, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 2146–2161
- 72 Chen M, Yan T, Shen Q, et al. GLANDULAR TRICHOME-SPECIFIC WRKY 1 promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *New*

- Phytol*, 2017, 214: 304–316
- 73 Lv Z, Wang S, Zhang F, et al. Overexpression of a novel NAC domain-containing transcription factor gene (*AaNAC1*) enhances the content of artemisinin and increases tolerance to drought and *Botrytis cinerea* in *Artemisia annua*. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57: 1961–1971
  - 74 Shen Q, Lu X, Yan T, et al. The jasmonate-responsive *AaMYC2* transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytol*, 2016, 210: 1269–1281
  - 75 Ji Y, Xiao J, Shen Y, et al. Cloning and characterization of *AabHLH1*, a bHLH transcription factor that positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 1592–1604
  - 76 Matías-Hernández L, Jiang W M, Yang K, et al. *AaMYB1* and its orthologue *AtMYB61* affect terpene metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2017, 90: 520–534
  - 77 Shen Q, Cui J, Fu X Q, et al. Cloning and characterization of *DELLA* genes in *Artemisia annua*. *Genet Mol Res*, 2015, 14: 10037–10049
  - 78 Zhang F, Fu X, Lv Z, et al. A basic leucine zipper transcription factor, *AabZIP1*, connects abscisic acid signaling with artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Mol Plant*, 2015, 8: 163–175
  - 79 Yan T, Chen M, Shen Q, et al. HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua*. *New Phytol*, 2017, 213: 1145–1155
  - 80 Wang B, Kashkooli A B, Sallets A, et al. Transient production of artemisinin in *Nicotiana benthamiana* is boosted by a specific lipid transfer protein from *A. annua*. *Metab Eng*, 2016, 38: 159–169
  - 81 Fu X, Shi P, He Q, et al. *AaPDR3*, a PDR transporter 3, is involved in sesquiterpene β -caryophyllene transport in *Artemisia annua*. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 723
  - 82 Liao P, Zhou W, Zhang L, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a new gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31: 565–572
  - 83 Kai G, Xu H, Zhou C, et al. Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Metab Eng*, 2011, 13: 319–327
  - 84 Shi M, Luo X, Ju G, et al. Enhanced diterpene tanshinone accumulation and bioactivity of transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by pathway engineering. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 2523–2530
  - 85 Shi M, Luo X, Ju G, et al. Increased accumulation of the cardio-cerebrovascular disease treatment drug tanshinone in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by the enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Funct Integr Genomics*, 2014, 14: 603–615
  - 86 Zhang X, Guan H, Dai Z, et al. Functional analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase of *Salvia miltiorrhiza* via color complementation and RNA interference. *Molecules*, 2015, 20: 20206–20218
  - 87 Cheng Q, Su P, Hu Y, et al. RNA interference-mediated repression of *SmCPS* (copalylidiphosphate synthase) expression in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* causes a decrease of tanshinones and sheds light on the functional role of *SmCPS*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 363–369
  - 88 Ma Y, Ma X H, Meng F Y, et al. RNA interference targeting *CYP76AH1* in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* reveals its key role in the biosynthetic pathway of tanshinones. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477: 155–160
  - 89 Xu Z, Song J. The 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily participates in tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza*. *J Exp Bot*, 2017, 68: 2299–2308
  - 90 Zhou Y, Sun W, Chen J, et al. *SmMYC2a* and *SmMYC2b* played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Sci Rep*, 2016, 6: 22852
  - 91 Zhang J, Zhou L, Zheng X, et al. Overexpression of *SmMYB9b* enhances tanshinone concentration in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell Rep*, 2017, 36: 1297–1309
  - 92 Shi M, Zhou W, Zhang J, et al. Methyl jasmonate induction of tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots is mediated by JASMONATE ZIM-DOMAIN repressor proteins. *Sci Rep*, 2016, 6: 20919
  - 93 Zhou Y, Zhou X, Li Q, et al. Molecular cloning, bioinformatics analysis, and transcriptional profiling of *JAZ1* and *JAZ2* from *Salvia miltiorrhiza*. *Biotech Appl Biochem*, 2017, 64: 27–34
  - 94 Xu Z, 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. *Plant J*, 2015, 82: 951–961
  - 95 Kim O T, Kim S H, Ohya K, et al. Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed

- ginseng farnesyl diphosphate synthase. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 403–411
- 96 Rahimi S, Kim Y J, Sukweenadhi J, et al. *PgLOX6* encoding a lipoxygenase contributes to jasmonic acid biosynthesis and ginsenoside production in *Panax ginseng*. *J Exp Bot*, 2016, 67: 6007–6019
- 97 Park S B, Chun J H, Ban Y W, et al. Alteration of *Panax ginseng* saponin composition by overexpression and RNA interference of the protopanaxadiol 6-hydroxylase gene (*CYP716A53v2*). *J Ginseng Res*, 2016, 40: 47–54
- 98 Han J Y, In J G, Kwon Y S, et al. Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*. *Phytochemistry*, 2010, 71: 36–46
- 99 Nuruzzaman M, Cao H, Xiu H, et al. Transcriptomics-based identification of *WRKY* genes and characterization of a salt and hormone-responsive *PgWRKY1* gene in *Panax ginseng*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2016, 48: 117–131
- 100 Afrin S, Zhu J, Cao H, et al. Molecular cloning and expression profile of an abiotic stress and hormone responsive MYB transcription factor gene from *Panax ginseng*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47: 267–277

Research progress in terms of the biosynthesis and regulation of terpenoids from medicinal plants

SHI Min^{1,2}, WANG Yao², ZHOU Wei², HUA Qiang¹ & KAI GuoYin²

¹ State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

² College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Terpenoids from medicinal plants are widespread secondary metabolites in nature and exist as multiple types with different structures that are crucial in plant growth and development. Moreover, terpenoids exert a broad range of biological activities, including antitumor, antioxidation, anti-viral, and so on. In this study, artemisinin, tanshinone, and ginsenoside were selected as three representative examples, and progress in terms of research on biosynthetic genes, transcriptional regulation, metabolic engineering, synthetic biology, biosynthesis and transport was summarized. Future prospects including functional genes excavation and regulation mechanism network of terpenoids were also discussed.

medicinal plants, terpenoids, secondary metabolism, biosynthesis, regulation

doi: [10.1360/N052017-00194](https://doi.org/10.1360/N052017-00194)