过表达丹参 *GGPPS* 研究丹参酮类的生物合成途径

杨悦^{1,3}, 杨长青², 王勇², 杨蕾^{1*}

1. 上海辰山植物园, 中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海市资源植物功能基因组学重点实验室, 上海 201602;

2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 中国科学院合成生物学重点实验室, 上海 200032;

3. 东北林业大学, 森林植物生态学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

* 联系人, E-mail: leiyang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2017-03-25; 接受日期: 2017-04-27; 网络版发表日期: 2017-05-17

上海市绿化和市容管理局科学技术项目(批准号: G162409)资助

摘要 丹参酮是药用植物丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中具有较强生物活性的脂溶性二萜醌类化合物, 是目前国际上广泛认可的有效治疗心脑血管疾病的天然药物之一. 本研究通过分析过表达萜类生物合成途径中的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶(*GGPPS*)的转基因丹参, 发现丹参酮类化合物与叶绿素具有共同的上游生物合成途径, 而下游途径因组织的特异化而不同, 从而生成不同的代谢产物. 通过对丹参毛状根外施两个萜类生物合成途径的抑制剂 Lovastatin 和 Fosmidomycin, 在处理 6 周丹参酮积累达到稳定时测定丹参酮的含量, 探明了丹参酮类的生物合成主要是通过质体中的 *MEP* 途径来完成, 而非胞质中的 *MVA* 途径. 本研究为丹参酮类的代谢生物学及合成生物学研究提供了证据和基础.

关键词 丹参酮, *MEP* 途径, *MVA* 途径, 抑制剂, 过表达

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)是唇形科(Lamiaceae)鼠尾草属的传统中药, 以根和根茎入药, 因其对心脑血管疾病的显著疗效而被广泛使用^[1]. 丹参中的药用成分主要包括两类: 一类是脂溶性的萜类化合物, 另一类是水溶性的多聚酚酸类化合物. 脂溶性二萜类化合物具有较强的生物活性, 在丹参中含量较高. 自 20 世纪 30 年代日本学者首次从丹参中分离得到了脂溶性的丹参酮类物质, 丹参酮的相关研究便从此得到了广泛的关注. 丹参酮具有抗菌、消炎、活血化瘀、

促进伤口愈合等多方面作用^[2-4]. 因此, 近年来对于丹参酮类的生物合成及其调控研究不断获得新的进展, 丹参酮类的开发利用更具有广阔的开发潜力.

丹参酮类化合物属于萜类大家族, 所有萜类化合物的生物合成途径都来自于一个共同的前体, 异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, *IPP*)及它的异构物二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, *DMAPP*)^[5]. 在植物里, 共有两条途径参与了 *IPP* 和 *DMAPP* 的形成: 一条是在 50 多年前就已经发现的经

引用格式: 杨悦, 杨长青, 王勇, 等. 过表达丹参 *GGPPS* 研究丹参酮类的生物合成途径. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 586–594

Yang Y, Yang C Y, Wang Y, et al. Investigation of the tanshinone biosynthesis pathway by overexpressing *GGPPS* in *Salvia miltiorrhiza*. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 586–594, doi: 10.1360/N052017-00067

典的甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径, 该途径在胞质中产生 IPP, 随后通过 IPP 异构酶实现到 DMAPP 的转化; 另一条途径是 90 年代中期发现的存在于质体中的 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP)途径, 该途径也存在于原生动物和很多致病细菌中. 传统理论认为, 二萜类的生物合成主要是通过质体中的 MEP 途径. 开国银等通过丹参毛状根体系过表达 MVA 和 MEP 途径中的关键酶, 发现两条途径均可影响丹参酮类的生物合成^[6], 同时过表达 MVA 途径的 HMGR(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)和下游途径的 GGPPS(geranylgeranyl diphosphate synthase)时丹参酮类的含量最高^[7]. 本研究通过转基因过表达 GGPPS, 证明了丹参酮类与叶绿素拥有共同的上游途径, 因不同组织的特化而具有不同的下游途径, 从而产生特异性的次生代谢产物. 又分别采用 MVA 和 MEP 途径的抑制剂 Lovastatin(洛伐他汀)和 Fosmidomycin(膦胺霉素)对丹参毛状根进行处理, 在处理 6 周丹参酮类积累达到稳定水平时, 通过丹参酮类含量的测定分析, 探明了丹参酮类的上游生物合成途径.

1 材料与方法

1.1 材料

丹参种子购于安徽省, 在上海辰山植物园苗圃种植养护, 取叶片作为外植体进行消毒并接种于含 2 mg/L 6-BA 的 1/2MS 培养基上诱导愈伤组织, 转接到 1/2MS 培养基上诱导实验所需要的无菌苗.

用于侵染外植体的农杆菌菌株(LBA4404)和发根农杆菌(C58C1)以及植物表达载体 *pCambia2301* 由本实验室保存.

丹参毛状根的培养参照文献方法^[7]. 具体为选取丹参无菌苗, 以叶片作为外植体, 剪成 0.5 cm² 在菌液中侵染后, 用无菌滤纸吸干菌液接种至 6-7V 固体培养基上共培养 2~3 天, 叶片用无菌水冲洗 5 遍, 无菌滤纸吸干后转接至 6-7V+羧苄霉素除菌培养基上暗培养, 每 10 天继代一次除去农杆菌. 在除菌培养基上培养 2 周后叶缘便分化出毛状根, 培养 1 个月后可将毛状根剪下, 接种到 6-7V 液体培养基中, 于避光摇床中培养便可分化出大量毛状根.

丹参植株的转化以叶片为外植体, 农杆菌

LBA4404 介导, 共培养 3 天, 含 400 mg/L 特美汀的除菌培养基, 以及含有 0.2 mg/L IBA 的 1/2 MS 培养基为发根基质.

1.2 方法

1.2.1 丹参 DNA 和 RNA 的提取

丹参 DNA 和 RNA 的提取均采用 CTAB 法. CTAB 提取液为: 2% CTAB, 2% PVP, 100 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA, 2 mol/L NaCl, 2% 的 β -巯基乙醇. 氯仿抽提 3 次, DNA 采用异丙醇沉降, RNA 则采用 LiCl 沉淀法. RNA 反转录使用 TOYOBO 反转录试剂盒.

1.2.2 实时荧光定量 PCR 分析

实时荧光定量 PCR 用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM. 试剂盒(TaKaRa, 大连), 在定量 PCR 扩增仪(Eppendorf, 德国)上进行. 选丹参 *ACTIN* 作为内参基因^[8], 引物序列见表 1, 相关的表达值用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 实验重复 3 次, 取各组数据的平均值和方差, 绘制图表.

1.2.3 转基因载体的构建

通过 PrimerSTAR 高保真聚合酶扩增 GGPPS(GenBank ID: FJ643617.1)目标基因, 扩增所用引物见表 1, 利用 *XbaI* 和 *SacI*(NEB)双酶切后与 *pCambia 2301* 载体连接、转化 DH5 α 大肠杆菌(TaKaRa), 挑取单克隆进行测序鉴定, 获得阳性质粒, 进行后续农杆菌转化.

1.2.4 外施抑制剂处理

实验采用两个途径的抑制剂: Lovastatin 为 MVA 途径中针对 HMGR 的抑制剂; Fosmidomycin 为 MEP 途径中针对 DXR 的抑制剂. 在毛状根生长稳定 1 周后, 分别对悬浮培养的丹参毛状根施加 2 种抑制剂, Lovastatin 加入培养基后终浓度为 10 μ mol/L(Tokyo Chemical Industry, TCI), Fosmidomycin 为 100 μ mol/L(Invitrogen, 美国), 实验设置对照 CK, 之后继续在摇床中避光培养.

1.2.5 HPLC 测定丹参酮的含量

用装有 SB-C18 反相色谱柱(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m, Agilent, 美国)的 1260-DAD 检测器(G4212B, Agilent,

表 1 PCR 扩增引物^{a)}

引物	引物序列 5'→3'	
	正向引物序列	反向引物序列
<i>gus</i>	CGTCCTGTAGAAACCCCAAC	CTGTCTGGCTTTTGGCTGTG
Actin	CTGACAGGATGAGCAAGGAG	GCGAACGAAGAGTTTGATTT
HMGR	CGTCTCCGCCGTCTACATC	TCCTTGCTGGCTCCCTTG
DXS	CCGCCTTAGCTGCGTTAT	AGTCCCTGCGATGTGCTT
DXR	CCCGACATGAGACTTCCTAT	GTCGCATGTCAGCTCCAC
<i>GGPPS</i>	GATGCTCTGTTGGCTTTCG	GGGATACGTGGTCTTGTCG
<i>GGPSox</i>	GCTCTAGAATGAGATCTATGAATCTGGTG	CGAGCTCTTAGTTCTGCCTATGTGCAAT

a) 引物 *GGPPox* 正、反向序列中划线分别表示 *XbaI* 和 *SacI* 识别序列。

美国)测定丹参酮的含量. 流动相为 0.1%甲酸甲醇溶液(A)和 0.1%甲酸水溶液(B)以 37%到 80%配比进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 270 nm, 柱温设置 30 °C. 丹参酮的含量通过二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 IIA 标准品(WuXi App. Tec., 中国)绘制的标准曲线进行定量.

1.2.6 GUS 染色及 PCR 阳性鉴定

农杆菌介导侵染的叶片在除菌培养基上培养 1 个月后, 收集愈伤组织进行 GUS 染色. 愈伤组织在含 X-Gluc 的 GUS 染液中过夜, 再依次用 75%和 100%的乙醇洗脱, 染色和脱色均在 37°C 下进行.

经 GUS 染色检测为阳性的丹参幼苗用 CTAB 法提取 DNA, 利用分光光度计(Thermo scientific, 美国)检测 DNA 的质量和浓度, 用于进行 PCR 检测. *gus* 基因扩增所用引物序列见表 1.

1.2.7 叶绿素含量的测定

用手持叶绿素测定仪(Chlorophyll meter SPAD-502 plus, 日本)检测转基因植株叶片和对照植株叶片的叶绿素含量, 每株任意测 3 个叶片, 每片叶测定 3 次.

2 结果

2.1 过表达 *GGPPS* 基因对丹参二萜类生物合成的影响

2.1.1 *GGPPS* 基因在丹参不同组织中的表达水平

GGPPS 在植物体内广泛存在, 催化生成 *GGPP*, 是植物体中二萜、类胡萝卜素类、叶绿素和赤霉素等多种代谢物的共同前体. 通过荧光实时定量 PCR 检

测技术测定 *GGPPS* 基因在丹参成年植株的根、茎、叶和花等不同组织中的表达水平. 结果显示, *GGPPS* 基因的表达水平在丹参植株中存在显著的组织表达特异性, 相对表达量从大到小依次是叶>根>茎>花(图 1).

2.1.2 过表达 *GGPPS* 基因的转基因丹参

鉴于许多研究采用 *pCAMBIA2301* 作为植物表达载体通过农杆菌介导优化并建立遗传转化体系, 且有研究证实叶片是丹参较理想的外植体, 因此本研究以无菌苗叶片为外植体, 以 *pCAMBIA2301-GGPPS* 为载体, 导入根癌农杆菌 LBA4404 中诱导愈伤组织, 催生不定芽和根, 进而生成丹参幼苗(图 2A). 通过 GUS 染色和 PCR 鉴定筛选出转基因阳性植株 *GGPPSox-L1*, *GGPPSox-L8* 和 *GGPPSox-L9*(图 2B).

2.1.3 过表达 *GGPPS* 转基因植株的测定分析

转基因植株与对照植株相比, 地上表型具有明显的差异(图 3A), 因此使用叶绿素仪分别测定对照

图 1 *GGPPS* 基因在丹参不同组织中的转录表达水平

图2 农杆菌介导的丹参转基因

A: I, 叶片外植体; II, 诱导愈伤; III, 芽的分化; IV, 不定芽; V, 生根; VI, 转基因丹参幼苗; B: 转基因丹参的PCR鉴定. M, Marker; 1, *pCAMBIA2301-gus* 质粒; 2, 野生型DNA; 3, 水作为模板; 4-6, 阳性植株DNA

植株和转基因丹参叶片的叶绿素含量. 结果显示, 过表达 *GGPPS* 的转基因株系中叶绿素的含量显著高于对照植株(图 3C). 同时测定过表达株系中 *GGPPS* 在根和叶中的相对表达水平, 结果表明过表达 *GGPPS* 的植株中无论地上或地下部, *GGPPS* 的转录表达水平都高于对照(图 3B).

转基因株系生长至一年以上, 经观察发现, 过表达 *GGPPS* 的丹参植株的根部与对照相比颜色显示更红(丹参酮类化合物为红色物质), 因此本研究选取了 *GGPPS*ox-L9 的部分根部材料测定了丹参酮的含量.

测定结果表明, 过表达植株 *GGPPS*ox-L9 的根中隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 IIA 和二氢丹参酮 I 等均显著高于对照植株(图 3D).

2.2 抑制剂处理对丹参酮类生物合成的影响

2.2.1 抑制剂处理对代谢途径中关键基因表达的影响

通过外施能够抑制 MVA 和 MEP 途径的抑制剂, 在丹参毛状根处理 2 周后, 使用实时荧光定量 PCR 法分别测定 *HMGR*(GenBank ID: DQ266514), *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS)*, GenBank ID: EU670744), *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase(DXR)*, GenBank ID: DQ991431)和 *GGPPS* 的转录表达水平(图 4B). *HMGR* 为 MVA 途径中的限速酶, 在施用其抑制剂 Lovastatin 后, *HMGR* 的表达明显低于对照, 而对 MEP 途径进行抑制阻断后 *HMGR* 的表达却高于对照水平. 对于 MEP 途径中的关键酶 *DXS*, 当 MVA 途径被抑制阻断后 *DXS* 的转录表达明显提高, 而对 *DXS* 下游的 *DXR* 进行阻断抑制后(施加 Fosmidomycin), *DXS* 作为抑制剂作用的上游基因其表达不受影响. *DXR* 的表达在施加 Fosmidomycin 后明显下调, 而阻断 MVA 途径时 *DXR* 却有所上调. *GGPPS* 位于 MVA 和 MEP 下游途径, 且参与二萜的生物合成, 当施加 Lovastatin 和 Fosmidomycin 后其转录表达水平均明显低于对照, 说明 MVA 和 MEP 两条途径可以互相影响, 其中一条被抑制阻断, 另一途径就会被上调; MVA 途径和 MEP 途径均不同程度地影响二萜共同前体 *GGPP* 的合成.

2.2.2 抑制剂处理对丹参酮含量的影响

在毛状根材料处理 6 周后, 测定各样品丹参酮的含量. 结果各丹参毛状根样品产生了明显的颜色差异(图 4A,C), 所以本研究对其丹参酮类进行了提取并测定其含量. 结果表明对 MVA 途径进行抑制后, 丹参酮 I 和丹参酮 IIA 的含量略有下降, 而二氢丹参酮 I 和隐丹参酮与对照没有明显差异; 而对 MEP 途径进行抑制后 4 种丹参酮含量都显著下降, 且二氢丹参酮 I 和隐丹参酮在 Fosmidomycin 处理的样品中均未能检测到(图 4D). 说明丹参酮主要是通过 MEP 质体途径合成.

图3 过表达 *GGPPS* 的转基因丹参

A: 野生型丹参与过表达 *GGPPS* 的植株 GGPPox-L9; B: GGPPox 植株中 *GGPPS* 基因在根和叶中的相对表达水平; C: 过表达 *GGPPS* 对叶中叶绿素含量的影响; D: 过表达 *GGPPS* 对根中丹参酮类含量的影响

图4 外施抑制剂对毛状根中丹参酮类生物合成的影响

A: 分别外施 Lovastatin 和 Fosmidomycin 处理 6 周后的丹参毛状根; B: 抑制剂处理 6 周后毛状根中 *DXS*、*DXR*、*HMGR* 和 *GGPPS* 的转录表达水平; C: 外施 Lovastatin 和 Fosmidomycin 处理 6 周后, 丹参毛状根中丹参酮类的提取液; D: 抑制剂处理对丹参毛状根中隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 IIA 和二氢丹参酮 I 含量的影响

3 讨论与结论

3.1 二萜生物合成途径中 *GGPPS* 的组织差异性

前期研究发现丹参酮类在根中特异性积累, 丹参酮生物合成途径相关的关键酶基因的转录水平也存在着显著的组织差异性^[9]. 本研究中, 通过荧光定量 PCR 检测 *GGPPS* 在丹参各组织中的转录表达水平, 结果表明 *GGPPS* 在各个组织中均有转录表达. 进一步, 将 *GGPPS* 过表达转化丹参, 对阳性转基因植株的地上及地下部均进行了观察和测定分析. 结果表明, *GGPPS* 的转录表达水平在地下部和地上部均显著上调, 说明丹参酮类与叶绿体中叶绿素具有共同的上游合成途径, 均主要通过定位在质体中的 MEP 途径而合成. 转基因植株中, 地上叶片中叶绿素的含量均高于对照植株, 过表达植株 *GGPPS*ox-L9 根中的丹参酮含量也明显高于野生型对照. 这些结果说明 *GGPPS* 在各个组织中均发挥了重要的生物学功能, 而在不同的特化的组织器官中其下游代谢途径产生了分支, 合成了结构各异的次生代谢产物, 从而行使不同的生物学功能(图 5).

3.2 丹参酮生物合成途径研究

近年来对于二萜丹参酮类生物合成途径的解析研究已经取得了很多进展. 对于上游途径的解析, *HMGR*^[10], *DXR*^[11]和 *GGPPS*^[12]等已经被克隆并鉴定了功能; 对于丹参酮生物合成下游途径的解析也获得了突破性的进展, 黄璐琦团队克隆了 *GGPPS* 下游的两个萜类合酶 *ent-copalyl diphosphate synthase* (*CPS*)和 *kaurene synthase-like*(*KSL*), 催化生成丹参酮基本碳骨架次丹参酮二烯(*miltiradiene*)^[13], 构建了高产次丹参酮二烯的酵母工程菌株^[14], 并在此基础上发现了催化次丹参酮二烯生成代谢中间产物的关键 P450 家族成员 *CYP76AH1*^[15,16], *CYP76AH3* 和 *CYP776AK1*^[17]. 然而丹参酮类生物合成的亚细胞定位研究尚未见报道. 在模式植物拟南芥中, 通过外施抑制剂 fosmidomycin 可抑制 MEP 途径从而显著抑制幼苗中叶绿素的合成, 并且这种抑制作用依赖于光信号^[18]. 采用抑制剂的方法研究丹参酮类的生物合成已经有研究报道, Yang 等通过 mevinolin(MEV), fosmidomycin(FOS)和 D, L-glyceraldehyde(DLG)等抑制剂研究了 6 天处理的丹参毛状根中丹参酮生物合成途径关键酶基因的表达特征并分析了丹参酮的含

图5 丹参中萜类的生物合成途径

Lovastatin 是胞质 MVA 途径中 HMGR 的酶抑制剂, Fosmidomycin 是质体 MEP 途径中 DXR 的酶抑制剂

量, 结果表明 MVA 途径与细胞的生长相关, MVA 和 MEP 都参与了丹参酮的生物合成, 而 MEP 可能是其主要途径^[19]. 张夏楠等应用 fosmidomycin 对毛状根处理的时间延长至 21 天, 在处理过程中丹参酮含量始终随时间延长而降低^[20]. 然而, 通过研究发根农杆菌介导的丹参毛状根的培养时间与生物量及丹参酮积累的关系, 发现毛状根在转入液体培养基悬浮培养至 20 天时, 生物量随时间延长而迅速积累, 而 20 天时丹参酮含量仍处于较低水平; 20 天至 50 天时, 毛状根生长缓慢, 而丹参酮获得明显积累, 50 天之后趋于稳定(数据未在本研究中列出). 所以本研究通过

对液体培养 10 天的丹参毛状根外施 MVA 途径和 MEP 途径中关键酶的抑制剂 Lovastatin 和 Fosmidomycin, 分别在处理后的 2 周和 6 周时检测转录表达水平和丹参酮的含量. 在处理 2 周后, 毛状根的生长趋于稳定, 而次生代谢产物开始积累, 当 MVA 途径受到抑制时, MEP 途径中 DXS 和 DXR 的转录表达水平有所上调; 同样地, 当 MEP 途径受到抑制时, MVA 途径上的 HMGR 的转录表达水平也高于对照水平, 说明当植物体 MVA 或 MEP 任何一个途径受到抑制时, 即需要通过另一条途径合成更多萜类生物合成所需的前体. 而位于下游的 GGPPS 的转录表达水平, 在施加两种抑制剂处理后均显著下调, 说明两途径之间存在着前人报道的“对话”机制^[5], 影响下游的生物合成. 在外施抑制剂 6 周后, 丹参酮的积累达到稳定水平时, 测定丹参毛状根中 4 种丹参酮类的含量, Fosmidomycin 抑制 MEP 途径的合成后, 与 MVA 途径相比丹参酮的合成显著受到抑制, 隐丹参酮和二氢丹参酮 I 均未能检测到, 说明丹参酮类通过质体中 MEP 途径而合成.

4 展望

丹参酮是目前国际上广泛认可的治疗心脑血管疾病的有效天然药物之一, 而心脑血管疾病是人类健康的“头号杀手”, 因此, 丹参酮的市场需求量很大^[21]. 对丹参酮类生物合成途径的解析及调控研究日渐深入, 很多研究致力于通过合成生物学的手段生产丹参酮类化合物^[22,23], 本研究内容为丹参酮类的代谢生物学及合成生物学提供了证据及研究基础.

参考文献

- 1 Zhou L, Zuo Z, Chow M S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45: 1345–1359
- 2 Wang X, Morris-Natschke S L, Lee K H. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Med Res Rev*, 2007, 27: 133–148
- 3 Dong Y, Morris-Natschke S L, Lee K H. Biosynthesis, total syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep*, 2011, 28: 529–542
- 4 Li Y I, Elmer G, Leboeuf R C. Tanshinone IIA reduces macrophage death induced by hydrogen peroxide by upregulating glutathione peroxidase. *Life Sci*, 2008, 83: 557–562
- 5 Laule O, Furholz A, Chang H S, et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis

- thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6866–6871
- 6 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 Genomic*, 2014, 14: 603–615
- 7 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
- 8 Yang Y, Hou S, Cui G, et al. Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 507–513
- 9 Yang L, Ding G, Lin H, et al. Transcriptome analysis of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* and identification of genes related to tanshinone biosynthesis. *PLoS One*, 2013, 8: e80464
- 10 Dai Z, Cui G, Zhou S F, et al. Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 148–157
- 11 Wu S J, Shi M, Wu J Y. Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoid tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots. *Biotechnol Appl Bioc*, 2009, 52: 89–95
- 12 张蕾, 戴住波, 崔光红, 等. 丹参牛牻儿基牻牛儿基焦磷酸合酶基因的克隆与分析. *中国中药杂志*, 2009, 34: 2704–2708
- 13 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
- 14 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
- 15 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
- 16 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 Bioph Res Co*, 2016, 477: 155–160
- 17 Guo J, Ma X, Cai Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones. *New Phytol*, 2016, 210: 525–534
- 18 Kim S, Schlicke H, Van Ree K, et al. *Arabidopsis* chlorophyll biosynthesis: an essential Balance between the methylerythritol phosphate and tetrapyrrole pathways. *Plant Cell*, 2013, 25: 4984–4993
- 19 Yang D, Du X, Liang X, et al. Different roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in cell growth and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *PLoS ONE*, 2012, 7: e46797
- 20 张夏楠, 王志霜, 高伟, 等. 磷酸霉素处理对丹参毛状根合成丹参酮类化合物的影响. *中国中药杂志*, 2013, 38: 4263–4266
- 21 Zhang Y, Jiang P, Ye M, et al. Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 13621–13666
- 22 蔡媛, 郭娟, 周雍进, 等. 转化次丹参酮二烯酿酒酵母全细胞催化体系的构建. *药学报*, 2013, 48: 1618–1623
- 23 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

Investigation of the tanshinone biosynthesis pathway by overexpressing *GGPPS* in *Salvia miltiorrhiza*

YANG Yue^{1,3}, YANG Chang-Qing², WANG Yong² & YANG Lei¹

¹Shanghai Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Resource, Plant Science Research Center, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602, China;

²Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology & Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;

³Key Laboratory of Plant Ecology, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Tanshinones, a family of lipid-soluble diterpenoids found in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*, are widely recognized for being highly effective in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases. In this study, analysis of transgenic *Salvia miltiorrhiza* plants overexpressing *GGPPS* of the terpenoid biosynthesis pathway revealed that tanshinones share a common upstream precursor biosynthesis pathway with chlorophyll but have different downstream pathways due to specialized organ distribution, leading to distinct metabolites. Moreover, by treating *Salvia miltiorrhiza* hairy roots with the terpenoid biosynthesis pathway inhibitors lovastatin and fosmidomycin, we show that tanshinones are mostly synthesized via the MEP pathway in plastids, rather than the cytosolic MVA pathway. This study provides evidence and clues to aid in understanding the metabolic biology and synthetic biology of tanshinones.

Tanshinones, MEP pathway, MVA pathway, inhibitor, overexpression

doi: 10.1360/N052017-00067