中草药表观基因组学研究现状与展望

刘琬菁, 张建红, 罗红梅*

中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药资源保护重点实验室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: hmluo@implad.ac.cn

收稿日期: 2017-09-21; 接受日期: 2017-11-09; 网络版发表日期: 2018-02-05

中国医学科学院医学与健康科技创新工程(批准号: 2016-I2M-3-016)和国家自然科学基金(批准号: 31570302)资助

摘要 表观遗传学的实质是非DNA突变引起可继承表型变化的遗传现象. 表观基因组学是在基因组水平研究表观遗传变异的科学. 中草药表观基因组学是以药用植物和药用真菌为研究对象, 利用分子生物学、生物信息学及“组学”相关技术, 在全基因组水平上, 对表观遗传修饰调控中草药次生代谢、生长发育、胁迫响应的分子机制以及中草药活性成分对生物体表观调控的药理机制进行研究的一门学科, 将为解析环境因子在中药材道地性品质形成中的作用机制及中药药理新机制提供理论基础. 比较表观遗传学是中草药表观基因组学研究的主要方法. 本文综述了中草药表观基因组学的研究现状, 探讨并展望了中草药表观基因组学研究相关成果在阐明中药材道地性的生物学实质以及中药药理新机制等方面的理论意义和应用前景.

关键词 中草药, 表观遗传学, 表观基因组学, 道地性, 活性成分, 表观调控

表观遗传学(epigenetics)是指在基因的DNA序列没有发生改变的情况下, 基因表达和基因功能发生了可遗传的变化, 并最终导致表型变化的遗传学^[1,2]. 表观遗传现象不符合孟德尔遗传规律. 在经典遗传学和分子生物学基础上进一步发展而形成的表观遗传学是经典遗传学的重要补充. 表观基因组学(epigenomics)是在基因组水平研究表观遗传变异的科学^[3]. 研究发现, 基因组含有两类遗传信息: DNA序列所包含的遗传信息和表观遗传信息; 后者为生物体提供了何时、何地、以何种方式去启动并应用遗传信息的正确指令. 植物表观遗传修饰主要包括DNA甲基化(DNA methylation)、非编码RNA (non-coding RNA)调控、组蛋白修饰(histone modification)和染色质重塑(chro-

matin remodeling)等, 它们在基因选择性转录和基因转录后调控等过程中发挥重要作用^[4].

中草药是我国医药学者在传统药物研究领域取得的重大成就, 也是目前新药研发的宝贵资源. 随着“组学”技术的快速发展, 中草药表观基因组学(herb epigenomics)在中草药基因组学研究的基础上也取得显著进展^[5]. 目前, 在药用植物和药用真菌中, 广泛开展了DNA甲基化和非编码RNA鉴定及其调控机制的研究, 进一步还对表观遗传修饰调控中草药次生代谢、生长发育、胁迫响应的分子机制展开研究. 由于表观遗传修饰可检测到生物体响应环境因子而形成的可观察的表型改变^[6], 不同产地环境因子对中草药的品质产生不同影响, 认为中药材道地性的形成与环境因子对其

引用格式: 刘琬菁, 张建红, 罗红梅. 中草药表观基因组学研究现状与展望. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 365–378

Liu W J, Zhang J H, Luo H M. Status and prospects of herbal epigenomics (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 365–378, doi: [10.1360/N052017-00191](https://doi.org/10.1360/N052017-00191)

表型的影响密切相关. 因此, 利用比较表观遗传学的研究方法探讨中草药表观遗传修饰在中药材道地性形成过程中的作用具有重要科学意义; 还有研究表明, 中草药的部分活性成分通过表观遗传修饰的方式发挥药理作用, 这也为深入揭示中草药药理学新机制提供崭新研究思路和研究方向, 具有极好的应用前景.

1 中草药表观基因组学研究范畴

植物表观遗传修饰主要涉及DNA甲基化、非编码RNA调控、组蛋白共价修饰、染色质重塑等^[4], 它们广泛参与调控植物多种生长发育过程, 而这些不同类型的表观遗传修饰之间也具有复杂的调控关系(图1)^[7]. 目前, 中草药表观基因组学研究主要集中在药用植物/真菌中全基因组水平的DNA甲基化、非编码RNA调控研究两方面; 同时, 中草药表观基因组学的研究内容也涵盖了以中草药作为药物, 其活性成分通过改变生物体内的表观遗传修饰发挥药理作用, 这也为解析中草药活性成分的新药理学机制提供基础数据.

1.1 DNA甲基化

DNA甲基化是表观遗传修饰的一种主要形式, 在动物、植物、微生物基因组中普遍存在. 甲基化的形成主要通过DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)或DNA甲基酶的作用, 将S-腺苷甲硫氨酸(sadomet, SAM)的甲基基团转移至胞嘧啶上^[8], 部分甲基基团也可转移至腺嘌呤或鸟嘌呤. 植物细胞中的DNA甲基化主要发生在CG, CHG, CHH (其中H是A, T或C)等基序中的胞嘧啶上, 这种胞嘧啶甲基化呈现非随机分布的特点, 主要发生在富含转座子的重组区域、着丝粒区等. 胞嘧啶甲基化也发生在一些基因启动子区和高表达基因的编码区等^[9]. 植物中DNMTs

主要包括MET甲基转移酶家族、结构域重排甲基转移酶(domains-rearranged methyltransferases, DRM)和选择性甲基化异染色质区域DNA的染色质甲基化酶(chromomethylase, CMT). 其中, MET是主要的甲基转移酶之一, 与哺乳动物中Dnmt1是同系物, MET是维持性甲基化酶, 也可行使重新甲基化的功能, 负责维持拷贝和重复的DNA甲基化, 并对植物胚胎发育、形态建成、花期调控、移栽变异等具有调控作用. DRM与哺乳动物中Dnmt3是同系物, 在甲基化CpNpG位点中显示出与CMT3的部分功能冗余^[10], 主要功能是从头甲基化; CMT是植物中特有的甲基化酶, 可以选择性甲基化异染色质区域DNA, 主要负责甲基化CpNpN和CpNpG (N非G)^[11]. 与哺乳动物细胞中Dnmt2同源的甲基转移酶在植物体内也存在, 并具有转运RNA (tRNA)甲基化酶活性, 但这类酶暂未鉴定到催化活性.

不同物种、同一物种不同器官或组织、不同发育时期其基因组甲基化水平不同. DNA甲基化是一种较为保守的表观遗传学调控机制, 主要负责调控植物的基因表达、细胞分化、代谢等生理生化过程^[12]. 基因或基因组甲基化程度的高低会对植物的生长发育产生影响^[13]. 目前在羊乳(*Codonopsis lanceolate* Benth. et Hook. F)^[14]、石斛(*Dendrobium nobile* Lindl)^[15]、菰蓝(*Isatis indigotica* Fortune)^[16]、柳穿鱼(*Linaria vulgaris* L.)^[17]、人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)^[18]、丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)^[19]等药用植物中开展了DNA甲基化研究(表1).

1.2 非编码RNA

基因组的转录产物(transcripts)除了编码蛋白质的信使RNA (messenger RNA, mRNA)外, 多为不编码蛋白质的非编码RNA (noncoding RNA, ncRNA). ncRNA不具备典型的起始密码子、可读框、终止密码子等特性. 根据表达形式和功能的不同, ncRNA分为看家非编码RNA (housekeeping ncRNA)和调节非编码RNA (regulatory ncRNA). 看家非编码RNA在生物体中组成型表达. 调节非编码RNA根据序列长度差异分为长链非编码RNA (long noncoding RNA, lncRNA)和小RNA (small RNA, sRNA); 前者的碱基组成从200到100000 bp不等^[20], 它们在生物体的组织/器官发育或细胞分化过程中特异性表达, 或对外界环境产生的应激反应中特异性表达. lncRNA主要参与调节基因表

图1 不同表观遗传修饰之间相互调控示意图

表 1 药用植物DNA甲基化研究

中文名称	拉丁文名	鉴定方法	功能预测	参考文献
羊乳	<i>C. lanceolate</i>	MSAP和凝胶印迹分析	甲基化差异引起再生体变化	[14]
石斛	<i>D. nobile</i>	5-氮杂胞苷去甲基化处理	去甲基化调节生物碱和多糖含量	[15]
菰蓝	<i>I. indigotica</i>	MSAP分析	甲基化缓解盐胁迫	[16]
柳穿鱼	<i>L. vulgaris</i>	印迹分析、原位杂交	甲基化导致不同花型	[17]
人参	<i>P. ginseng</i>	MSP, MISP数据比对	甲基化影响生长形态	[18]
丹参	<i>S. miltiorrhiza</i>	AFLP和MSAP分析	甲基化差异形成产地性差异	[19]

达, 参与调控植物开花、春化等多种生长发育过程^[21]. 还有一类特殊lncRNAs, 它们像mRNA可以剪接、加帽和多聚腺苷酸化, 称为mlncRNAs (mRNA-like npcRNAs)^[22].

小RNA曾被*Science*赞誉为2002年的突破性成果, 主要包括微小RNA (microRNA, miRNA)和小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)等. 其中, miRNA是一类长度为21~24 nt的内源性非编码小分子单链RNA, 它们在转录水平和转录后水平负调控基因表达, 广泛参与植物生长发育、胁迫响应和信号转导等调控过程^[23]. siRNA通常为21~25 nt的RNA片段, 主要参与真核生物体内的内源性或外源性RNA的降解^[24], 引发RNA沉默. RNA沉默是真核生物基因表达调控的一种进化上的保守机制, 包括基因转录沉默和转录后沉默. siRNA参与的RNA降解途径和机制已研究得较为深入^[25], 主要参与调控植物发育^[26]、胁迫响应^[27]、防御反应^[28]等. Shao和Lu^[29,30]分别在丹参基因组中鉴定了RNA诱导沉默复合物的核心组分AGO (Argonaute)和小RNA生物合成途径中的RDRs (RNA-dependent RNA polymerases)基因家族, 为后续研究丹参中的sRNA的合成途径和RNAi作用机制奠定基础. 目前, 已在毛地黄(*Digitalis purpurea*)、人参(*P. ginseng*)、丹参(*S. miltiorrhiza*)等近三十余种药用植物中对非编码RNA进行了鉴定和系统分析(表2)^[31~59], 为后续研究ncRNA在中草药中的生物学功能奠定基础.

1.3 组蛋白修饰和染色质重塑

真核生物细胞核内的染色质是一切遗传学过程的物质基础, 而核小体(nucleosome)作为染色质的基本结构单位, 主要由DNA和核心组蛋白组成^[60]. 这些组蛋白没有种属及组织特异性, 在进化上十分保守. 研究发现, 核小体核心组蛋白并非是静态结构, 其N端尾部

15~38个氨基酸常常会发生翻译后共价修饰(posttranslational modifications), 如乙酰化、甲基化、泛素化、磷酸化、SUMO化(small ubiquitin-mediated protein)和ADP-核糖基化(ADP-ribosylation)等^[61]. 组蛋白甲基化和组蛋白乙酰化是组蛋白修饰的最主要类型. 组蛋白赖氨酸甲基转移酶(histone lysine methyltransferases, HKMTs)和赖氨酸特异性组蛋白脱甲基酶(lysine-specific histone demethylase-LIKE, LDL)等参与可逆的组蛋白甲基化过程. HKMTs甲基化特定的组蛋白赖氨酸, 可以促进或抑制其转录, 在植物生长发育过程中维持特定基因的转录抑制或激活状态; 而对于组蛋白赖氨酸去甲基化, 一方面可以LDL的氧化作用进行, 也可以通过JmjC (JUMONJI-C-DOMAIN)羟基化作用完成, 这也是两类在不同位置使组蛋白去甲基化的酶. 组蛋白乙酰化与活性染色质和转录活性相关, 也具有可逆性, 无转录活性的序列通常缺乏组蛋白乙酰化. 组蛋白主要通过乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)进行乙酰化修饰, 植物中的HAT和HDAC均是多基因家族, 如HAT家族可根据结构和底物特异性分为5个亚家族, 而HDAC目前在植物中通过遗传筛选仅鉴定得到2种表观遗传调节因子: HDA1和HDA6. 除组蛋白甲基化和乙酰化外, 组蛋白磷酸化也是重要修饰之一, 涉及DNA修复、调节染色体分离和细胞分裂; 组蛋白H2A和H2B的泛素化在植物中也具有重要调节功能, 可以招募和排除其他修饰酶. 组蛋白修饰与基因沉默、细胞周期、细胞分化和增殖、种子萌发、器官发生和形态建成等密切相关^[61].

真核生物以核小体(nucleosome)为基本单位的染色质(chromatin)通常以激活或沉默为基本方式调控基因的表达. 染色质重塑指的是通过影响核小体结构来改变基因的复制和重组等过程, 并改变染色质的包装

表 2 药用植物miRNA研究进展

中文名称	拉丁文	主要活性成分	miRNAs数目	靶标预测	参考文献
白木香	<i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Gilg.	倍半萜烯、树脂	27个新的miRNAs, 74个可能的保守miRNAs	涉及应激反应和沉香形成	[31]
黄花蒿	<i>Artemisia annua</i> L.	青蒿素	6个可能的miRNAs	涉及青蒿素生物合成、信号转导和发育	[32]
红花	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	类黄酮、苯乙醇苷、香豆素、脂肪酸、类固醇和多糖	236个已知miRNAs	涉及植物生长、发育和胁迫反应	[33]
姜黄	<i>Curcuma longa</i> L.	姜黄素	12个可能miRNAs	参与信号转导和凋亡, 可能在预防2型糖尿病、心血管疾病、阿尔茨海默病、癌症等疾病中起重要作用	[34]
铁皮石斛	<i>Dendrobium officinale</i> Kimura et Migo	多糖、凝集素、生物碱和黄酮	1047个miRNAs候选基因	涉及激素信号传导、植物发育、激素信号转导、AGO1相关调节和二次代谢	[35]
毛地黄	<i>Digitalis purpurea</i> L.	强心苷	13个miRNAs	涉及代谢、RNA过程、转录调节、信号转导和未知功能	[36]
叶籽银杏	<i>Ginkgo biloba</i> var. <i>epiphylla</i> Mak	类黄酮、萜烯和三内酰胺	83个保守miRNAs, 53个假定新的miRNAs	涉及生殖过程、代谢过程和刺激反应	[37]
贯叶连翘	<i>Hypericum perforatum</i> L.	黄酮类化合物	7个pri-miRNAs	涉及代谢、应激反应、花发育和植物繁殖	[38]
忍冬	<i>Lonicera japonica</i> Thunb	精油、有机酸和黄酮	148个miRNAs, miR2911来自煎剂	miR2911针对流感病毒mRNA	[39]
枸杞	<i>Lycium chinense</i> Mill.	多糖、类胡萝卜素和类黄酮	60个保守miRNAs, 30个可能新的miRNAs	涉及代谢和调节途径, 包括果实成熟、番茄红素生物合成和信号通路	[40]
薄荷	<i>Mentha haplocalyx</i> Briq.	精油	12个miRNAs, 11个miRNAs家族	涉及精油生物合成、调节关键调控基因的表达、植物激素和毛发育	[41]
苦瓜	<i>Momordica charantia</i> L.	酚类化合物	27个成熟miRNAs	涉及植物生长发育	[42]
罗勒	<i>Ocimum basilicum</i> L.	萜类、生物碱和类黄酮	9个miRNAs候选基因	可能涉及应激反应和次生代谢调节	[43]
人参	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey	三萜皂苷、多糖、酚类和黄酮类	101个miRNAs, 42个家族	涉及植物发育和胁迫反应的转录因子和转录物	[44]
三七	<i>Panax notoginseng</i> (Burk.) F.H. Chen	三萜皂苷	316个保守miRNAs, 52个新的miRNA	涉及代谢途径、剪接体和次生代谢产物的生物合成	[45]
罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	苄基异喹啉生物碱	316个保守miRNAs, 11个新的miRNAs	涉及应激反应和次生代谢产物合成过程	[46]
胡黄连	<i>Picrorhiza kurroa</i> Royle ex Benth	环烯醚萜苷	18个保守miRNAs	涉及信号转导、核酸代谢、抗病、激素调节、发育过程和次级代谢	[47]
掌叶半夏	<i>Pinellia pedatisecta</i> Schott	生物碱和凝集素	101个miRNAs, 22个miRNAs家族	涉及生殖、转录因子活性和植物发育过程	[48]
半夏	<i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breit	生物碱和凝集素	54个miRNAs, 23个miRNAs家族	无	[49]
广藿香	<i>Pogostemon cablin</i> Benth	萜类化合物	miR156a	涉及萜类合成反应	[50]
印度罗芙木	<i>Rauvolfia serpentina</i> L.	生物碱和花青素	15个保守miRNAs, 13个miRNAs家族	涉及生长和发育过程相关的基因、初级和次级代谢、疾病抗性和应激反应, 包含转录因子	[51]

(续表2)

中文名称	拉丁文	主要活性成分	miRNAs数目	靶标预测	参考文献
生地黄	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch	环烯醚萜苷、糖苷、糖类和氨基酸	89个保守miRNAs, 6个新的miRNAs	涉及生物调节、对刺激的反应、发育和代谢过程	[52]
蓖麻	<i>Ricinus communis</i> L.	蓖麻油和蓖麻油酸	86个保守miRNAs	参与生长发育过程	[53]
丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	丹参酮和酚类	452个已知miRNAs, 40个新的miRNAs	涉及参与丹参酮生物合成的乙酰辅酶A, C-乙酰转移酶等	[54]
南欧丹参	<i>Salvia sclarea</i> L.	苯丙素和萜类化合物	18个保守miRNAs	涉及转录、代谢或非生物胁迫反应	[55]
欧洲千里光	<i>Senecio vulgaris</i> Linn.	生物碱	10个可能的miRNAs	无	[56]
红豆杉	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	紫杉醇	871个成熟miRNA, 869个miRNA前体	涉及紫杉属特异性生物过程	[57]
苍耳	<i>Xanthium strumarium</i> L.	萜类化合物	1185个保守miRNAs, 37个新的miRNAs	涉及信号转导、代谢、应激反应, 以及部分基因未知功能	[58]
姜	<i>Zingiber officinale</i> (L.) H. Karst	姜酮醇和精油	16个可能的miRNAs家族	涉及细胞信号传导、繁殖、代谢过程和应激反应	[59]

状态, 进而使核小体中的组蛋白以及对应的DNA分子发生改变, 引起DNA甲基化和染色质构象变化等, 从而调控基因表达。组蛋白N端尾部的共价修饰和染色质重塑密切相关, 尤其是组蛋白H3和H4的修饰直接影响核小体的结构^[62], 调控基因转录。

1.4 中草药活性成分对生物体的表观遗传修饰

近年来, 对中草药的研究已经深入发展到次生代谢提取物的潜在性质和用途, 以制备用于治疗癌症等疾病的有效药物。同时也有研究发现, 中草药代谢提取物可以通过调节生物体内表观遗传修饰从而达到治疗疾病的效果^[63]。

由植物中分离提取的天然药物具有易获取、易口服的特点, 与化学衍生药物相比, 对人类正常细胞具有高耐受性(tolerated)和无毒性(non-toxic)的特点。有研究显示, 一些从植物分离获得的天然药物对癌细胞具有特异性毒性, 可以进入临床试验用于进一步的治疗研究。目前对于中草药衍生的天然药物调控生物体表观遗传变异的药物可以分为四类: 甲基转移酶抑制剂、DNA损伤预防药物或抗氧化剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂和有丝分裂干扰物。已有研究显示, 萝卜硫素、异硫氰酸酯、异黄酮和磷霉素为HDAC抑制剂, 可以抑制致癌蛋白的活性; 在癌细胞中, HDAC抑制剂可重新激活因乙酰化修饰而导致沉默表达的基因, 致使癌细胞进入程序性凋亡。同时该类化合物还可

以增强人类癌症细胞的化疗敏感性。长春花生物碱(长春碱等)的衍生物、紫杉烷类(紫杉醇等)通过结合 β -微管蛋白抑制细胞周期, 引起细胞周期停滞和细胞凋亡^[63]。因此, 一些中草药中的活性天然产物可通过改变生物体的表观遗传修饰而发挥治疗疾病的作用。

2 中草药表观遗传调控的生理效应

研究表明, 表观遗传调控植物多种生长发育和形态建成过程, 并参与调控植物的抗病抗逆反应。除此以外, 中草药表观遗传调控还在药用植物和药用真菌的活性成分合成过程中发挥重要调控作用。表1和2总结了近年来中草药DNA甲基化和miRNA的表观遗传调控研究进展。

2.1 表观遗传调控药用植物次生代谢

有研究报道, 组蛋白甲基化、DNA甲基化、RNAi等在植物类胡萝卜素合成和降解过程中发挥作用^[64], 该研究也表明, 植物表观遗传调控次生代谢过程。次生代谢产物是中草药主要活性成分, 已有多种药用植物活性成分生物合成机制研究取得显著进展; 同时DNA甲基化和非编码RNA调控次生代谢研究也得到广泛关注。

倪竹君等人^[15]利用5-azaC处理石斛(*Dendrobium nobile* Lindl)组培苗, 进行去甲基化修饰, 分析石斛苗

生长变化与生物活性成分含量及其相关基因的表达变化,发现5-azaC处理导致石斛组培苗多糖含量和生物碱含量明显上升,编码石斛生物碱合成相关酶基因的相对表达量均显著上调,说明5-azaC对石斛组培苗的去甲基化修饰处理可能诱导了石斛生物碱和多糖合成相关基因的表达,证实了DNA去甲基化修饰对石斛次生代谢产物的生物合成具有重要调控作用。

越来越多的研究表明,miRNAs在调控多种药用植物次生代谢物的合成过程中发挥重要作用(表2)。Hao等人^[57]利用深度测序技术分析了红豆杉(*T. mairei*)叶片中miRNAs和降解序列标签,并通过实时逆转录聚合酶链反应和降解组测序技术鉴定了一段来自紫杉二烯合酶的内含子序列的miRNA和部分miRNAs的靶基因。发现编码紫杉烷13 α -羟化酶(taxane-13 α -hydroxylase)和紫杉烷2 α -O-苯甲酰基转移酶(taxane-2 α -O-benzoyltransferase)的基因分别是miR164和miR171的靶基因,表明这两个miRNAs可能调控紫杉醇的生物合成。Zhang等人^[65]认为,长期植物细胞培养会造成代谢产物的下降,因此通过对红豆杉(*T. chinensis*)两个传代年限不同的培养细胞系(NA和CA)进行高通量测序并比较分析,发现67.17%已知的和60.63%新挖掘的差异表达miRNAs在传代时间较长的NA株系中具有上调趋势,并通过对这些miRNAs的靶基因进行分析,确认这些靶基因涉及植物初生代谢、次生代谢和生物信号传导功能。值得一提的是,Zhang等人对CA株系中上调的miR8154和miR5298b检测它们是否影响次生代谢产物合成,发现在miR8154和miR5298b的过表达株系中,参与紫杉醇、苯丙烷和黄酮类化合物合成的关键酶基因均显著上调表达,促进CA株系中代谢网络的恢复,但这些酶基因并不是这两个miRNAs的靶基因。推测miR8154和miR5298b可能通过靶向调控次生代谢途径的转录因子而间接调控次生代谢物的生物合成过程。Li等人^[66]对人参(*P. ginseng*)转录组功能注释后发现人参中14个可能的miRNAs,并预测它们的靶基因可能是参与植物生长发育和防御相关的转录因子(AP2, MYB)、转运体等。Vashisht等人^[47]对胡黄连(*P. kurroa*)转录组进行分析,鉴定到18个miRNAs,并预测miR4995的靶基因为3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase,该酶通过参与苯丙素途径而参与肉桂酸的合成;而肉桂酸是胡黄连苦苷-I合成所必需的底物之一,推测miR4995可能参与胡黄连苦苷-I的生物合成。Wu

等人^[36]在毛地黄(*D. purpurea*)中鉴定到了2660个miRNAs,并预测了部分miRNAs的靶基因,这些靶基因可能参与次生代谢、冷害和脱水胁迫等逆境响应;还鉴定了13个miRNAs,其中部分miRNAs的预测靶基因为ARF, AP2 (APETALA2), GRF (growth-regulating factor)等转录调控基因,这些靶基因可能间接调控毛地黄次生代谢产物的生物合成。

Zhu等人^[67]通过对药用真菌——紫芝(*Ganoderma sinense*)进行全基因组测序,分析基因图谱发现紫芝基因组内至少存在29个转录因子位于次生代谢基因簇中,其中有7个转录因子基因在紫芝生长发育过程中发生甲基化修饰,并有5个转录因子基因发生基因沉默;另外,紫芝中存在大量转运蛋白定位于次生代谢途径中,已确认36个转运蛋白的编码基因由于甲基化修饰发生基因沉默。这些结果表明,DNA甲基化诱导基因转录后沉默可能调节紫芝次生代谢过程。

2.2 表观遗传调控药用植物生长发育

在植物中,表观遗传修饰参与调控多种植物形态建成和生长发育过程;或通过调控植物激素的合成代谢、转运和信号转导过程实现对植物生长发育的调节作用^[68]。已有研究表明,DNA甲基化、sRNA在果实发育与成熟^[69]、花发育^[70]、杂种优势(heterosis)^[71]等发育过程中起调控作用。

野生人参和栽培人参具有显著的形态差异和生理差异^[72],Li等人^[18]通过比较两者遗传信息发现,栽培人参具有更低比例的胞嘧啶甲基化模式,尤其是在CHG甲基化位点处。因此推测这些胞嘧啶甲基化模式的改变可能与栽培型人参形态变化具有关联性,但仍需进一步的实验验证。张逸等人^[19]在对不同地区丹参居群的遗传信息和表观遗传修饰研究中发现,不同地区丹参的DNA甲基化变异主要存在于居群内部,DNA甲基化变异在丹参不同居群中具有多发性;栽培丹参与野生丹参之间的DNA甲基化模式不完全一致,体现了丹参不同居群内DNA甲基化变异的多样性。Yang等人^[52]对不同培养年限的生地黄(*R. glutinosa*)进行测序,并通过差异性比较鉴定得到89个保守的miRNAs和6个新的miRNAs。通过与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中已鉴定的miRNAs和靶基因比较,预测miR156和miR157的靶基因为SPL转录因子,其他miRNA预测调节的靶基因为ICU2和生长素响应因子(auxin response

factor, *ARF*)基因等, 这些基因可能都与植物开花、不定根发育相关, 暗示这些miRNAs可能与地黄块根发育过程有关, 也可能为解决地黄连作障碍提供候选基因.

2.3 表观遗传调控药用植物逆境胁迫响应

环境可以对植物在不改变其遗传信息的情况下引发长期的表型效应. 外界环境条件, 如光、温度、湿度和生物/非生物胁迫等可能会诱发植物体内的表观遗传因子而使植物获得表观遗传修饰的表型, 而这些表观遗传因子反过来可能改变基因表达来调节植物发育, 以适应外界环境. 植物系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)是植物应对生物或非生物胁迫的一种生理反应机制; 植物后代当面临相同的胁迫条件时可产生“获得性记忆”, 这种“记忆”可被保留在染色质构象中, 以及配子体的细胞质和发育的胚中, 并使植物获得胁迫诱导的表观遗传修饰, 用以促使植物通过改变基因表达状态来适应环境^[73,74].

菰蓝(*I. indigotica*)是具有清热解毒、凉血消肿之功效的板蓝根的主要基源植物. 为了解菰蓝的最佳生长状态及应对各类胁迫时的应激反应机制, 杨飞等人^[16]利用甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术研究了盐胁迫下, 菰蓝基因组内CCGG位点的DNA甲基化变化情况. 检测发现, 通过盐胁迫处理, 菰蓝基因组中共44个CCGG位点发生甲基化状态改变, 并有31个位点发生超甲基化, 还有13个位点发生了去甲基化. 这些结果证明在盐胁迫下, 菰蓝基因组DNA甲基化模式发生改变. 研究得出在环境压力下, DNA甲基化模式的改变可以缓解外界环境对植物产生的压力, 并推测基因组超甲基化可能与植物适应非生物胁迫相关. Wu等人^[44]在人参(*P. ginseng*)中利用对体外培养的胚性愈伤组织进行脱水和热处理, 分析基因差异表达情况, 鉴定到5个脱水响应和10个热激响应的miRNAs, 并且这些miRNAs在应对非生物胁迫时显示出不同的表达图谱, 说明不同miRNAs在应激反应中的生物学功能可能不同. Galla等人^[38]在贯叶连翘(*H. perforatum*)中鉴定了7个pre-miRNAs, 它们的靶基因参与代谢、胁迫响应、花发育和植物繁殖过程. Zhu等人^[67]通过紫芝全基因组测序和全基因组水平的甲基化分析以及小RNA鉴定, 阐释紫芝多样化的防御机制; 并在紫芝基因组中鉴

定了63个可能的miRNAs, 预测这些miRNAs的靶基因多为MFS (major facilitator superfamily)类转运蛋白的编码基因, 它们可能参与紫芝细胞内的膜转运过程.

3 中草药活性成分的表观调控作用

越来越多的研究证据表明, 膳食化学预防剂(dietary chemopreventive agents)可以预防或逆转培养细胞或癌症动物模型中的表观遗传修饰, 由此, “营养表观遗传学”(nutri-epigenetics)以膳食因素(dietary agents)影响表观遗传学机制为核心内容的研究正成为一个新的表观遗传学研究领域^[75]. 一些食物和药用植物中的活性化合物通过靶向调节DNA甲基转移酶、组蛋白修饰酶和miRNA的表达或活性, 导致细胞癌变过程中的表观遗传改变, 因而这些活性化合物具有抗癌药物的潜在作用^[75]. 这些活性化合物通过表观遗传修饰发挥药理作用, 将解析中草药的药理学机制提供新的研究思路.

白藜芦醇(resveratrol)是一类天然多酚类化合物, 在小叶买麻藤(*Gnetum parvifolium* (Warb.) C. Y. Cheng ex Chun)、虎杖(*Reynoutria japonica* Houtt.)、桑椹(*Fructus Mori*)等药用植物中含量丰富. 白藜芦醇具有抗癌、抗炎和降血糖的潜力, 对细胞分裂、细胞凋亡、血管生成和肿瘤转移的信号通路有调控作用^[76]. 有研究表明, 在乳腺癌细胞中, 白藜芦醇显示出弱的DNMT抑制活性^[77]. 白藜芦醇可以通过改变组蛋白H3的乙酰化修饰, 阻止表观遗传修饰引起人*BRCA1*基因的表达沉默, 而促进*BRCA1*的表达, 这是*BRCA1*靶向治疗乳腺癌的重要策略^[78]. 在人类SW480结肠癌细胞中, 白藜芦醇可以调控miRNAs靶基因的表达水平, 这些靶基因编码TGF信号途径的肿瘤抑制子或调节子^[79].

姜黄素(curcumin)是酸性多酚类物质, 是在姜科药用植物郁金(*Curcuma aromatica* Salisb.)、姜黄(*C. longa*)、莪术(*C. zedoaria* (Berg.) Rosc.)的根茎以及天南星科药用植物菖蒲(*Acorus calamus* L.)的根茎中富含的黄色色素, 具有抗炎、抗氧化等药理作用, 并具有预防癌症的效果. 姜黄素通过结合到DNMT1的C1226氨基酸的巯基共价阻断其活性位点来抑制DNMT1的活性^[80]. 姜黄素的抗肿瘤活性与其具有调节癌细胞中miRNA表达的能力相关. 姜黄素可调控人类

胰腺癌BxPC-3细胞中29个miRNA的表达; 其中, 姜黄素可诱导上调miRNA-22的表达; 导致miRNA-22的靶基因*Sp1*和*ESR1*的表达受到抑制^[81]。

人参皂苷Rh2 (ginsenoside Rh2)是一种从人参中提取的具有生物活性的化学成分, 它是一种由三萜甾体核和糖基组成的皂甙。Wu等人^[82]利用miRNA芯片和实时定量PCR的方法, 在经Rh2处理的人脑胶质瘤细胞系U251中检测到452个miRNAs中, 14个上调表达, 12个下调表达。其中, 上调表达的miR-128进一步在U251, T98MG和A172细胞株系中进行基因表达定量分析, 在转染了miR-128抑制剂的细胞系中, 检测到miR-128抑制剂的处理阻碍了Rh2对miR-128诱导上调的表达效应, 完全阻断了Rh2诱导的细胞毒性、细胞凋亡、caspase 3的活化、*E2F3a*的转录激活等。因此, Rh2通过介导上调miR-128的表达实现对人脑胶质瘤细胞的抗增殖作用。

茶多酚(tea polyphenols)是茶叶中多酚类物质的总称, 主要为黄烷醇(儿茶素)类, 占60%~80%。没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是儿茶素类化合物中的一类主要成分, 也是茶叶中有保健功能的主要成分之一。研究表明, 茶多酚等活性物质具有解毒和抗辐射作用。茶多酚可抑制DNMT活性并重新激活甲基化沉默基因^[83]。茶多酚具有调节多种人类癌细胞中miRNAs表达的功能。EGCG可改变人类肝癌细胞HepG2细胞中miRNAs的表达, 与对照组相比, EGCG可诱导上调13个miRNAs的表达, 下调48个miRNAs的表达。EGCG还可下调Bcl-2蛋白的表达水平, 用anti-miR-16抑制剂转染可抑制miR-16的表达, 抵消了这些细胞中EGCG对Bcl-2的下调和诱导细胞凋亡的作用^[84]。

槲皮素(querletin)属黄酮类化合物, 多以甙的形式存在, 如芦丁(芸香甙)、槲皮甙、金丝桃甙等, 许多药用植物的花、叶、果实中含量较高, 如八角莲(*Dysosma veitchii* (Hemsl. et Wils.) Fu)、红旱莲(*Hypericum ascyron* L.)等。槲皮素已被证明能在酵母中激活NAD-依赖性组蛋白脱乙酰酶*SIRT1*的表达。槲皮素通过逆转*p16INK4a*基因的超甲基化来抑制结肠癌RKO细胞的生长^[85]。槲皮素通过活化c-jun/AP-1并促进组蛋白H3乙酰化水平, 可反式激活人白血病HL-60细胞中的FasL介导的细胞凋亡^[86]。

4 中草药表观基因组学研究方法

随着测序技术的飞速发展, 表观基因组学和表观遗传学的研究方法也取得了较大进展, 表观修饰检测的灵敏度和特异性得到显著提高, 并从定性检测向定量分析方向发展, 从个别位点检测向高通量的“组学”检测水平发展, 比较表观遗传学的研究方法在中草药表观基因组学研究中发挥重要作用。

近年来, DNA甲基化检测技术发展迅速^[87-89]。最初的检测方法是以限制性内切酶为基础的检测技术, 然后发展到利用甲基化敏感性限制酶(methylation-sensitive restriction enzymes, MREs)与测序技术相结合的MRE-seq技术, 可以预测全基因组DNA甲基化水平。还可以利用甲基化DNA免疫沉淀方法(methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP)检测基因组甲基化水平; 该方法通过利用抗甲基胞嘧啶的抗体免疫沉淀基因组中富集甲基化或未甲基化片段。目前通用的DNA甲基化检测方法是亚硫酸氢盐测序(bisulfite sequencing, BS-seq)技术, 该技术的原理是在亚硫酸氢盐处理的DNA经PCR扩增和测序之后, 甲基化胞嘧啶可以被鉴定为胞嘧啶, 而未甲基化的胞嘧啶显示为胸腺嘧啶。这是检测特定位点DNA甲基化的黄金标准方法。目前, 基于BS-seq技术开发了TAB-seq, oxBS-seq, redBS-seq, CAB-seq和MAB-seq等技术以及全基因组亚硫酸氢盐测序(whole-genome bisulfite sequencing, WGBS)技术^[90]。

ncRNA (主要是miRNA和lncRNA等)的鉴定可以通过构建ncRNA文库再利用高通量测序技术进行转录本测序, 利用UEA sRNA tool软件将rRNA, tRNA, snoRNA等过滤去除, 通过与miRBase等数据库中的序列进行比对可以对ncRNA进行分类; 再利用BLAST, psRNATarget^[91], NONCODE database^[92]等进行靶基因预测。为排除生物信息学预测靶基因的假阳性, 通常利用RLM-RACE (RNA ligase-mediated RACE)^[93]、降解组测序^[94]和qRT-PCR等方法对miRNA靶基因进行验证。

高通量测序技术也被称为下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS), 近年来广泛应用于基因组测序、转录组测序等研究领域。NGS测序技术可以实现单碱基分辨率下构建DNA甲基化的基因组图谱^[88]。用于全基因组水平的胞嘧啶修饰的高通量检测

方法成为表观遗传学研究的新范例, 例如, “相对甲基化的综合高通量阵列”(comprehensive high-throughput arrays for relative methylation, CHARM)技术^[95]. 单分子实时测序技术(single-molecule real-time, SMRT)是第三代高通量测序技术, 利用DNA聚合酶边合成边收集荧光信号的方法进行测序^[96]. 单分子纳米孔测序技术能直接分辨出未修饰的胞嘧啶和甲基化胞嘧啶, 可以精确检测DNA链上甲基化位点^[97]. 微阵列和测序技术的进步使得在单核苷酸甚至单细胞分辨率下可以进行全基因组的表观遗传学分析. 与微阵列方法相比, 高通量测序在更高的分辨率下提供更多的定量结果. 随着测序成本的持续下降以及数据分析工具的完善, 高通量测序技术在表观遗传学研究中的优势将更加凸显. 基于微阵列和高通量测序的比较表观遗传学的研究方法, 可以鉴定道地产区和非道地产区的中草药表观遗传信息的差异与变异情况, 解析道地产区的环境因子对药材品质形成的影响, 揭示表观遗传修饰在中药材道地性形成中的作用机制.

5 展望

“基因决定论”表明基因对生命的决定性作用, 但是越来越多的研究表明, 生命作为开放的复杂系统, 各种生命活动不是完全由基因决定的. 表观遗传学以一种全新的视野来理解生命遗传现象. 基因组中表观遗传修饰的精确性对于调控基因转录活性和染色体稳定性, 以及生物体的正常生命活动和生长发育是必要的; 同时, 多种环境因素可以通过基因的表观遗传修饰使生物体获得可遗传的表型改变. 中草药的表观遗传修饰与中草药药效品质形成具有一定相关性^[98,99]. 中草药表观基因组学在全基因组水平, 通过研究不同生长环境下(道地产区与非道地产区等)的中草药表观遗传信息变异, 探索环境与基因和基因组、环境与表型的相互作用机制, 解析环境因素引发的中草药表观遗传修饰, 为探索中药性味以及道地性药材品质形成的分子机制提供基础数据, 也将为阐释道地药材形成的生物学实质提供理论基础(图2). 中草药表观基因组学还可在基因组水平探讨外界因素对中草药表观遗传修饰产生的生理效应及其对基因表达调控的影响, 阐明外界环境信息与基因组相互作用机制^[98], 进一步揭示中药材道地性品质形成过程中的关键性作用因子.

环境因素还可以通过调控表观遗传修饰来改变基

图2 表观遗传修饰在药材道地性形成中的作用(示意图)(网络版彩图)

因的表达模式, 而错误的表观遗传程序的建立可导致多种病理现象的发生, 成为引发疾病的发病机制^[100]. 目前表观调节因子成为药物研发的新靶标^[101,102]. 中草药是中医预防治疗疾病所使用的独特药物, 重要的是, 一些中草药体内的活性化合物可以通过表观性的干预措施而逆转不利的基因表达模式和表型, 改变疾病的表观遗传特征, 从而达到治疗疾病的目的, 这为解析中草药的药理学新机制以及研发新的药物靶点提供了崭新的研究思路和宝贵的药物研发资源. 此外, 研究中草药表观遗传修饰在药用植物和药用真菌生长发育及逆境胁迫响应等过程中的调控作用, 探索外源/环境物质改变(化学/物理因素等)引起的中草药表观基因组图谱的变化, 开发与药材道地性相关的表观遗传标记(QTLsepi或SNPsepi)用于道地药材的检测分析和优良品种选育, 都将是中草药表观遗传学研究的新方向.

应用新一代测序技术, 可以鉴定中草药的全基因组甲基化图谱和ncRNA, 结合比较“组学”研究, 还可以研究不同发育阶段及不同环境条件下基因组中表观遗传信息的变化, 借助于全基因组差异表达分析, 辨别出起调控作用的表观修饰位点及其靶基因, 从基因组层面研究这些位点的遗传模式及对基因表达的影响^[89,103]. 鉴于CRISPR/Cas9系统可以方便快捷地利用引导RNA (gRNA)进行基因敲除, 而且由多个gRNAs

一起作用可以获得一组基因同时激活/失活。因此, 可以利用CRISPR/Cas9技术, 鉴定中草药中参与表观遗传修饰的基因或复合体组分的功能, 为开发表观遗传修饰标签用于品种选育提供研究基础^[6]; 还可以利用该技术实现定点/定向的表观遗传修饰, 或调控中草药

体内活性成分的生物合成^[104], 获得具有优良性状的新品种^[105]。不断更新的新一代测序技术为研究中草药表观基因组学的核心内容提供了良好的技术平台, 越来越多的中草药表观遗传信息将被揭示, 必将推动中药现代化研究进程。

参考文献

- Berger S L, Kouzarides T, Shiekhatter R, et al. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*, 2009, 23: 781–783
- Bender J. Plant epigenetics. *Curr Biol*, 2002, 12: R412–R414
- Suzuki M M, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 465–476
- Iwasaki M, Paszkowski J. Epigenetic memory in plants. *EMBO J*, 2014, 33: 1987–1998
- Chen S L, Song J Y, Sun C, et al. Herbal genomics: examining the biology of traditional medicines. *Science*, 2015, 347: S27–S29
- Quadrana L, Colot V. Plant transgenerational epigenetics. *Annu Rev Genet*, 2016, 50: 467–491
- Costa F F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*, 2008, 410: 9–17
- Bender J. DNA methylation and epigenetics. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 41–68
- Zilberman D, Gehring M, Tran R K, et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet*, 2007, 39: 61–69
- Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, et al. Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol*, 2003, 13: 2212–2217
- Genger R K, Kovac K A, Dennis E S, et al. Multiple DNA methyltransferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1999, 41: 269–278
- Xiao W, Custard K D, Brown R C, et al. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*, 2006, 18: 805–814
- Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 8449–8454
- Guo W L, Wu R, Zhang Y F, et al. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 1297–1307
- 倪竹君, 殷丽丽, 应奇才, 等. 5-氮杂胞苷对石斛生物活性成分的影响. *浙江农业科学*, 2014, 7: 1018–1020
- 杨飞, 聂浩, 徐延浩. 盐胁迫对菰蓝基因组DNA甲基化的影响. *中草药*, 2013, 36: 515–518
- Cubas P, Lauter N, Doebley J, et al. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J*, 1999, 18: 215–222
- Li M R, Shi F X, Zhou Y X, et al. Genetic and epigenetic diversities shed light on domestication of cultivated ginseng (*Panax ginseng*). *Mol Plant*, 2015, 8: 1612–1622
- 张逸, 褚会娟, 张今今. 秦巴山区丹参居群遗传与表观遗传多样性比较. *西北农业学报*, 2012, 21: 142–148
- Iyer M K, Niknafs Y S, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet*, 2015, 47: 199–208
- Shafiq S, Li J, Sun Q. Functions of plants long non-coding RNAs. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859: 155–162
- Griffiths-Jones S. Annotating noncoding RNA genes. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2007, 8: 279–298
- Kidner C A, Martienssen R A. The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 38–44
- Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431: 356–363
- Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409: 363–366
- Tang G, Reinhart B J, Bartel D P, et al. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*, 2003, 17: 49–63
- Borsani O, Zhu J, Verslues P E, et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 123: 1279–1291
- Aravin A A, Hannon G J, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*, 2007, 318:

761–764

- 29 Shao F, Lu S. Genome-wide identification, molecular cloning, expression profiling and posttranscriptional regulation analysis of the Argonaute gene family in *Salvia miltiorrhiza*, an emerging model medicinal plant. *BMC Genomics*, 2013, 14: 512
- 30 Shao F, Lu S. Identification, molecular cloning and expression analysis of five RNA-dependent RNA polymerase genes in *Salvia miltiorrhiza*. *PLoS ONE*, 2014, 9: e95117
- 31 Gao Z H, Wei J H, Yang Y, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in *Aquilaria sinensis* based on small RNA sequencing and transcriptome sequence data. *Gene*, 2012, 505: 167–175
- 32 Pani A, Mahapatra R K, Behera N, et al. Computational identification of sweet wormwood (*Artemisia annua*) microRNA and their mRNA targets. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2011, 9: 200–210
- 33 Li H, Dong Y, Sun Y, et al. Investigation of the microRNAs in safflower seed, leaf, and petal by high-throughput sequencing. *Planta*, 2011, 233: 611–619
- 34 Rameshwari R, Singhal D, Narang R, et al. *In silico* prediction of miRNA in *Curcuma longa* and their role in human metabolomics. *Int J Biotechnol Res*, 2013, 4: 253–259
- 35 Meng Y, Yu D, Xue J, et al. A transcriptome-wide, organ-specific regulatory map of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb. *Sci Rep*, 2016, 6: 18864
- 36 Wu B, Li Y, Yan H, et al. Comprehensive transcriptome analysis reveals novel genes involved in cardiac glycoside biosynthesis and mncRNAs associated with secondary metabolism and stress response in *Digitalis purpurea*. *BMC Genomics*, 2012, 13: 15
- 37 Zhang Q, Li J, Sang Y, et al. Identification and characterization of microRNAs in *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* Mak. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0127184
- 38 Galla G, Volpato M, Sharbel T F, et al. Computational identification of conserved microRNAs and their putative targets in the *Hypericum perforatum* L. flower transcriptome. *Plant Reprod*, 2013, 26: 209–229
- 39 Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res*, 2014, 25: 39–49
- 40 Khaldun A B M, Huang W, Liao S, et al. Identification of microRNAs and target genes in the fruit and shoot tip of *Lycium chinense*: a traditional Chinese medicinal plant. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0116334
- 41 Singh N, Srivastava S, Shasany A K, et al. Identification of miRNAs and their targets involved in the secondary metabolic pathways of *Mentha* spp.. *Comp Biol Chem*, 2016, 64: 154–162
- 42 Thirugnanasambantham K, Saravanan S, Karikalan K, et al. Identification of evolutionarily conserved *Momordica charantia* microRNAs using computational approach and its utility in phylogeny analysis. *Comp Biol Chem*, 2015, 58: 25–39
- 43 Singh N, Sharma A. In-silico identification of miRNAs and their regulating target functions in *Ocimum basilicum*. *Gene*, 2014, 552: 277–282
- 44 Wu B, Wang M, Ma Y, et al. High-throughput sequencing and characterization of the small RNA transcriptome reveal features of novel and conserved microRNAs in *Panax ginseng*. *PLoS ONE*, 2012, 7: e44385
- 45 Wei R, Qiu D, Wilson I W, et al. Identification of novel and conserved microRNAs in *Panax notoginseng* roots by high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 2015, 16: 835
- 46 Boke H, Ozhuner E, Turktas M, et al. Regulation of the alkaloid biosynthesis by miRNA in opium poppy. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 409–420
- 47 Vashisht I, Mishra P, Pal T, et al. Mining NGS transcriptomes for miRNAs and dissecting their role in regulating growth, development, and secondary metabolites production in different organs of a medicinal herb, *Picrorhiza kurroa*. *Planta*, 2015, 241: 1255–1268
- 48 Dong M, Yang D, Lang Q, et al. Microarray and degradome sequencing reveal microrna differential expression profiles and their targets in *Pinellia pedatisecta*. *PLoS ONE*, 2013, 8: e75978
- 49 Wang B, Dong M, Chen W, et al. Microarray identification of conserved microRNAs in *Pinellia pedatisecta*. *Gene*, 2012, 498: 36–40
- 50 Yu Z X, Wang L J, Zhao B, et al. Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and *Patchouli* (*Pogostemon cablin*) by the miR156-Targeted SPL transcription factors. *Mol Plant*, 2015, 8: 98–110
- 51 Prakash P, Rajakani R, Gupta V. Transcriptome-wide identification of *Rauvolfia serpentina* microRNAs and prediction of their potential targets. *Comp Biol Chem*, 2016, 61: 62–74
- 52 Yang Y, Chen X, Chen J, et al. Differential miRNA expression in *Rehmannia glutinosa* plants subjected to continuous cropping. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 53
- 53 Xu W, Cui Q, Li F, et al. Transcriptome-wide identification and characterization of micrnas from castor bean (*Ricinus communis* L.). *PLoS*

- ONE, 2013, 8: e69995
- 54 Xu X, Jiang Q, Ma X, et al. Deep sequencing identifies tissue-specific microRNAs and their target genes involving in the biosynthesis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza*. PLoS ONE, 2014, 9: e111679
- 55 Legrand S, Valot N, Nicolé F, et al. One-step identification of conserved miRNAs, their targets, potential transcription factors and effector genes of complete secondary metabolism pathways after 454 pyrosequencing of calyx cDNAs from the labiate *Salvia sclarea* L.. Gene, 2010, 450: 55–62
- 56 Sahu S, Khushwaha A, Dixit R. Computational identification of miRNAs in medicinal plant *Senecio vulgaris* (Groundsel). Bioinformation, 2010, 7: 375–378
- 57 Hao D C, Yang L, Xiao P G, et al. Identification of Taxus microRNAs and their targets with high-throughput sequencing and degradome analysis. Physiol Plant, 2012, 146: 388–403
- 58 Fan R, Li Y, Li C, et al. Differential microRNA analysis of glandular trichomes and young leaves in *Xanthium strumarium* L. reveals their putative roles in regulating terpenoid biosynthesis. PLoS ONE, 2015, 10: e0139002
- 59 Singh N, Srivastava S, Sharma A. Identification and analysis of miRNAs and their targets in ginger using bioinformatics approach. Gene, 2016, 575: 570–576
- 60 Kornberg R D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science, 1974, 184: 868–871
- 61 Liu Y, Min J. Structure and function of histone methylation-binding proteins in plants. Biochem, 2016, 473, 1663–1680
- 62 Hiroto T, Masaaki U. Epigenetic control of cell division and cell differentiation in the root apex. Front Plant Sci, 2015, 6: 1178
- 63 Greenwell M, Rahman P K. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. Int J Pharm Sci Res, 2015, 6: 4103–4112
- 64 Arango J, Beltrán J, Nuñez J, et al. Evidence of epigenetic mechanisms affecting carotenoids. Subcell Biochem, 2016, 79: 295–307
- 65 Zhang M, Dong Y, Nie L, et al. High throughput sequencing reveals miRNA effects on the primary and secondary production properties in long-term subcultured Taxus cells. Front Plant Sci, 2015, 6: 604
- 66 Li C, Zhu Y, Guo X, et al. Transcriptome analysis reveals ginsenosides biosynthetic genes, microRNAs and simple sequence repeats in *Panax ginseng* C. A. Meyer. BMC Genomics, 2013, 14: 245
- 67 Zhu Y, Xu J, Sun C, et al. Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense*. Sci Rep, 2015, 5: 11087
- 68 Yamamuro C, Zhu J K, Yang Z. Epigenetic modifications and plant hormone action. Mol Plant, 2016, 9: 57–70
- 69 Seymour G, Poole M, Manning K, et al. Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11: 58–63
- 70 He Y. Chromatin regulation of flowering. Trends Plant Sci, 2012, 17: 556–562
- 71 Dapp M, Reinders J, Bédée A, et al. Heterosis and inbreeding depression of epigenetic *Arabidopsis* hybrids. Nat Plants, 2015, 1: 15092
- 72 Li S, Li J, Yang X L, et al. Genetic diversity and differentiation of cultivated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) populations in North-east China revealed by inter-simple sequencerepeat (ISSR) markers. Genet Resour Crop Evol, 2011, 58: 815–824
- 73 Kachroo A, Robin G P. Systemic signaling during plant defense. Curr Opin Plant Biol, 2013, 16: 527–533
- 74 D'Urso A, Brickner J H. Epigenetic transcriptional memory. Curr Genet, 2017, 63: 435–439
- 75 Thakur V S, Deb G, Babcook M A, et al. Plant phytochemicals as epigenetic modulators: role in cancer chemoprevention. AAPS J, 2014, 16: 151–163
- 76 Srivastava R K, Unterman T G, Shankar S. FOXO transcription factors and VEGF neutralizing antibody enhance antiangiogenic effects of resveratrol. Mol Cell Biochem, 2010, 337: 201–212
- 77 Stefanska B, Rudnicka K, Bednarek A, et al. Hypomethylation and induction of retinoic acid receptor beta 2 by concurrent action of adenosine analogues and natural compounds in breast cancer cells. Eur J Pharmacol, 2010, 638: 47–53
- 78 Papoutsis A J, Lamore S D, Wondrak G T, et al. Resveratrol prevents epigenetic silencing of BRCA-1 by the aromatic hydrocarbon receptor in human breast cancer cells. J Nutr, 2010, 140: 1607–1614
- 79 Tili E, Michaille J J, Alder H, et al. Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGF signaling pathway in SW480 cells. Biochem Pharmacol, 2010, 80: 2057–2065
- 80 Medina-Franco J L, López-Vallejo F, Kuck D, et al. Natural products as DNA methyltransferase inhibitors: a computer-aided discovery approach. Mol Divers, 2011, 15: 293–304
- 81 Sun M, Estrov Z, Ji Y, et al. Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. Mol

- [Cancer Therapeut](#), 2008, 7: 464–473
- 82 Wu N, Wu G, Hu R, et al. Ginsenoside Rh2 inhibits glioma cell proliferation by targeting microRNA-128. [Acta Pharmacol Sin](#), 2011, 32: 345–353
- 83 Lee W J, Shim J Y, Zhu B T. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. [Mol Pharmacol](#), 2005, 68: 1018–1030
- 84 Tsang W P, Kwok T T. Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells. [J Nutr Biochem](#), 2010, 21: 140–146
- 85 Tan S, Wang C, Lu C, et al. Quercetin is able to demethylate the *p16INK4a* gene promoter. [Chemotherapy](#), 2008, 55: 6–10
- 86 Lee W J, Chen Y R, Tseng T H. Quercetin induces FasL-related apoptosis, in part, through promotion of histone H3 acetylation in human leukemia HL-60 cells. [Oncol Rep](#), 2011, 25: 583–591
- 87 Gu H, Smith Z D, Bock C, et al. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. [Nat Protoc](#), 2011, 6: 468–481
- 88 Schmitz R J, Zhang X. High-throughput approaches for plant epigenomic studies. [Curr Opin Plant Biol](#), 2011, 14: 130–136
- 89 Peng J, Xia B, Yi C. Single-base resolution analysis of DNA epigenome via high-throughput sequencing. [Sci China Life Sci](#), 2016, 59: 219–226
- 90 Yong W S, Hsu F M, Chen P Y. Profiling genome-wide DNA methylation. [Epigenets Chromatin](#), 2016, 9: 26
- 91 Dai X, Zhuang Z, Zhao P X. Computational analysis of miRNA targets in plants: current status and challenges. [Briefings Bioinform](#), 2011, 12: 115–121
- 92 He S, Liu C, Skogerbø G, et al. NONCODE v2.0: decoding the non-coding. [Nucleic Acids Res](#), 2008, 36: D170–D172
- 93 Gibb E A. Mapping free-standing homing endonuclease promoters using 5'RLM-RACE. [Methods Mol Biol](#), 2014, 1123: 69–76
- 94 Baksa I, Szittyá G. Identification of ARGONAUTE/Small RNA cleavage sites by degradome sequencing. [Methods Mol Biol](#), 2017, 1640: 113–128
- 95 Irizarry R A, Ladd-Acosta C, Carvalho B, et al. Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). [Genome Res](#), 2008, 18: 780–790
- 96 Flusberg B A, Webster D R, Lee J H, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. [Nat Meth](#), 2010, 7: 461–465
- 97 Clarke J, Wu H C, Jayasinghe L, et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. [Nat Nanotech](#), 2009, 4: 265–270
- 98 陈士林, 宋经元. 本草基因组学. [中国中药杂志](#), 2016, 41: 3381–3391
- 99 袁媛, 魏渊, 于军, 等. 表观遗传与药材道地性研究探讨. [中国中药杂志](#), 2015, 40: 2679–2683
- 100 Simó-Riudalbas L, Esteller M. Cancer genomics identifies disrupted epigenetic genes. [Hum Genet](#), 2014, 133: 713–725
- 101 Dawson M A, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. [Cell](#), 2012, 150: 12–27
- 102 Kwa F A A, Thrimawithana T R. Epigenetic modifications as potential therapeutic targets in age-related macular degeneration and diabetic retinopathy. [Drug Discov Today](#), 2014, 19: 1387–1393
- 103 王晓玥, 宋经元, 谢彩香, 等. RNA-seq与道地药材研究. [药学报](#), 2014, 49: 1650–1657
- 104 Alagoz Y, Gurkok T, Zhang B, et al. Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. [Sci Rep](#), 2016, 6: 30910
- 105 Bilichak A, Kovalchuk I. Transgenerational response to stress in plants and its application for breeding. [J Exp Bot](#), 2016, 67: 2081–2092

Status and prospects of herbal epigenomics

LIU WanJing, ZHANG JianHong & LUO HongMei

Key Lab of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

The essence of epigenetics is the study of heritable changes in gene expression and function that occur without a change in DNA sequence. Epigenomics is the study of epigenetic variation at the genomic level. Herb epigenomics focuses on molecular mechanisms underlying secondary metabolism, growth and development, and stress responses in medicinal plants and fungi on a genome-wide scale by employing molecular biology, bioinformatics, and “omics” technologies as well as pharmacological mechanisms underlying epigenetic modifications brought about by active ingredients of traditional Chinese medicine (TCM) (Dao-di). Herb epigenomics will provide a theoretical basis for analyzing environmental factors responsible for the genuineness of TCM and new pharmacological mechanisms underlying it. Comparative epigenetics is the key method used in herb epigenomics. This study summarizes the current status of research pertaining to herb epigenomics and discusses the prospect of herb epigenomics for clarifying biological and new pharmacological mechanisms underlying TCM.

traditional Chinese medicine, epigenetics, epigenomics, Dao-di, active ingredients, epigenetic regulation

doi: [10.1360/N052017-00191](https://doi.org/10.1360/N052017-00191)