

紫草素及其衍生物合成相关基因及信号传导研究进展

王升¹, 李璇^{1,2}, 蒋超¹, 郭兰萍^{1*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031

摘要: 紫草素类化合物是紫草的有效成分, 也是重要的工业原料。紫草素及其衍生物为萘醌类化合物, 总结了紫草素类化合物生物合成途径中相关基因的研究进展, 并介绍了这些基因的功能及表达特性; 综述了紫草素类化合物合成调控过程的信号传导及相关基因的表达, 并对今后紫草素及其衍生物的生物合成研究的发展方向进行了展望。

关键词: 紫草素; 生物合成; 基因; 信号传导; 萘醌类

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)06-1219-07

Advances in studies on genes related to shikonin and its derivatives biosynthesis and signal transduction

WANG Sheng¹, LI Xuan^{1,2}, JIANG Chao¹, GUO Lan-ping¹

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. College of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Key words: shikonin; biosynthesis; gene; signal transduction; naphthoquinones

紫草素 (shikonin) 及其衍生物是紫草科 (Boraginaceae) 植物中普遍存在的一类萘醌类化合物, 作为我国传统中药紫草的有效成分, 紫草素类化合物具有抑制 DNA 拓扑异构酶、抗肿瘤、抗 HIV、抗血栓、抗生育、抗氧化、镇静、抗炎、促进伤口愈合等生物活性, 广泛应用于临床^[1-2]。紫草素类化合物主要从紫草科紫草属紫草 (又称硬紫草) *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.、滇紫草属滇紫草 *Onosma paniculatum* Bur. et Franch.、假紫草属新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst 和内蒙紫草 *A. gutlata* Bunge 中获得^[3]。紫草素类化合物除了具有非常重要的药用价值, 还是重要的天然化妆品原料以及食品、饮料的天然无毒添加剂和天然印染化工原料等, 被国际上称为天然红色素之王。

为了满足紫草素的市场需求, 细胞培养生产紫草素已经成为紫草素的重要来源。从 20 世纪 80 年代起日本就建立起了紫草的细胞培养体系, 随后我

国也建立了新疆紫草和滇紫草的细胞培养体系, 用于生产紫草色素, 并对紫草中紫草宁的生物合成相关代谢酶和基因及其调控展开全面的研究^[4-6]。几十年来, 国内外学者致力于提高细胞培养体系中紫草素类化合物的产量、降低生产成本, 对紫草素及其衍生物生物合成途径和调控进行了大量的研究。紫草素类生物合成的调控研究主要从筛选高产细胞系、优化培养基和改善培养方式、物理条件影响、调节物质的添加、基因工程调控、优化生物反应器培养工艺等方面展开^[7]。其中利用分子生物学的方法调控紫草素的合成是最高效、稳定的方法。本文综述了紫草素类化合物生物合成过程中的相关基因及这些基因的功能和表达特性, 并从信号传导与基因表达角度综述了紫草素类化合物代谢调控网络的研究进展, 对紫草素类化合物生物合成的代谢调控网络、酶学、基因等深入研究具有重要的意义。

1 紫草素及其衍生物生物合成相关基因

紫草素类化合物的母核是萘醌环上连接一分子

收稿日期: 2012-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81130070, 81072989); 国家中医药管理局行业科研专项 (201107009); 国家科技重大专项 (2009ZX09502-026, 2009ZX09301-005); 中国中医科学院课题 (ZZ20090302.发高办高技[2010]1196)

作者简介: 王升, 硕士。E-mail: mmcniu@163.com

*通讯作者 郭兰萍 Tel: (010)64011944 E-mail: glp01@126.com

的戊烯,紫草素类化合物的生物合成过程比较复杂,通常认为是通过苯丙素(phenylpropanoid, PP, 苯丙素途径亦称苯丙氨酸途径)-甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径/去氧木酮糖还原(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径的复合途径合成,由焦磷酸香叶酯(geranyl pyrophosphate, GPP)的一个香叶烯基转移到对-羟

基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoate acid, PHB)上,形成一分子香叶烯基-对羟基苯甲酸(*m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid, GHB),进一步羟化合成紫草素的前体苯二酚香叶醌(geranylhydrquinone, GHQ)^[8-10]。紫草素类化合物生物合成途径见图 1。这类次生代谢产物在内质网中形成,然后通过胞外分泌作用将紫草素微粒运输到细胞壁中积累^[11]。

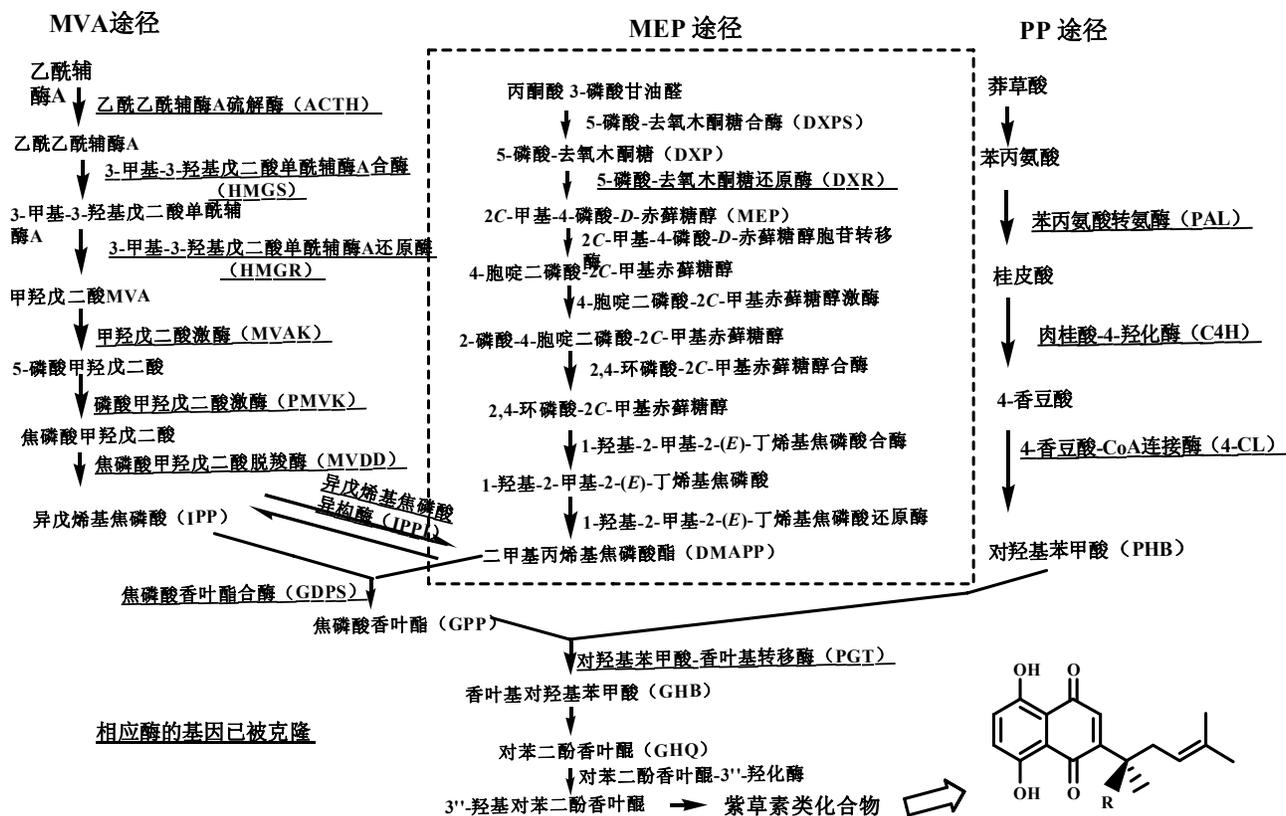


图 1 紫草素类化合物生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of shikonins

1.1 GPP 合成相关酶基因

自然界中 GPP 来源于 2 种生物途径: MVA 途径和 MEP 途径(图 1)。由于早年 Gaisser 等^[12]发现 mevinolin (MVA 途径中关键酶 HMGR 的抑制剂)能够抑制 98%的紫草素类化合物的合成,所以,普遍认为紫草素合成过程中合成 GHB 的 GPP 来源于 MVA 途径。但是目前尚没有研究表明此类化合物的合成与 MEP 途径无关,且 Singh 等^[13]在分别用 MVA 和 MEP 途径的抑制剂研究紫草素的合成过程中发现,MEP 途径的关键酶新疆紫草叶绿体中磷酸去氧木酮糖还原酶(DXR)的活性被抑制后,酸去氧木酮糖还原酶基因(*AeDXR*)表达下调,紫草素类化合物的合成同样受到抑制。紫草素类化合物的合成

过程中 MVA 和 MEP 这两个生物合成途径的关系还需要进一步的研究。

随着分子生物学研究发展迅速,已经有一系列 GPP 合成过程相关酶基因的 cDNA 被克隆,如新疆紫草乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶基因(*AeACTH*)、甲羟戊酸单酰辅酶 A 合成酶基因(*AeHMGS*)、甲羟戊酸单酰辅酶 A 还原酶基因(*AeHMGR*)、甲羟戊酸焦磷酸激酶基因(*AePMVK*)、甲羟戊酸二磷酸脱羧酶基因(*AeMVDD*)、异戊烯焦磷酸 IPP/DMAPP 异构酶基因(*AeIPPI*)以及香叶基二磷酸合酶基因(*AeGDPS*)都已经相继被克隆。硬紫草和滇紫草中的甲羟戊酸单酰辅酶 A 还原酶(*LeHMGR*)也已经被克隆。

Singh 等^[13]研究发现抑制 *AeHMGR* 的表达能同时抑制以上其他基因的表达, 但是这些基因的表达量与紫草素的积累量的相关性不明显, 表明这些基因与紫草素的合成相关但不是紫草素合成过程的限速酶基因。

甲戊二羟酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, HMGR) 是 MVA 代谢途径的关键酶, 它将甲戊二羟酸单酰辅酶 A 还原为甲戊二羟酸, 然后经过一系列反应生成紫草宁合成代谢中重要的中间产物 GPP。HMGR 与紫草宁的形成密切相关, Gaisser 和 Singh 的实验结果都表明 HMGR 的表达对紫草素类化合物的积累具有至关重要的作用, 抑制 HMGR 的表达能 90% 以上抑制紫草素的积累^[12-13]。植物中的 HMGR 基因属于小基因家族, 不同种属植物的 HMGR 之间具有较高的同源性。根据其他植物克隆的 HMGR 基因的保守序列设计兼并引物, Lange 等^[14]从来自 M9 培养基中的紫草培养细胞 cDNA 文库中获得了 1 个长 443 bp 的 PCR 克隆; Singh 等^[13]从新疆紫草中克隆了 700 bp 的 cDNA 序列, 分别命名为 *LeHMGR* 和 *AeHMGR*。在生长培养基上培养时, 紫草和新疆紫草细胞中 HMGR 基因的表达量都很低; 而当接种到生产培养基时其 mRNA 量快速增长^[15]。强烈光照可抑制紫草培养细胞中 HMGR 基因的表达^[12]。而强烈光照抑制紫草培养细胞中紫草宁的形成, 可见 HMGR 基因的表达调控对紫草宁的形成具有重要的调节作用。

1.2 PHB 合成相关酶基因

紫草素及其衍生物的另一重要前体 PHB 是由 PP 途径提供的, PP 途径主要的关键酶有苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 和 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4CL), PAL 是苯丙素类代谢途径中的起始代谢酶, 催化 L-苯丙氨酸 (L-phenylalanine) 生成反式肉桂酸 (*trans*-cinnamic acid), C4H 催化反式肉桂酸生成 4-香豆酸 (4-coumaric acid), 该产物由 4CL 催化生成 4-香豆酸辅酶 A。C4H 是苯丙氨酸途径的第 2 个关键酶, 属于细胞色素单加氧酶超家族中的 CYP73A 亚家族。4-香豆酸辅酶 A^[16] 是苯丙氨酸途径的代谢枢纽, 位于苯丙氨酸途径与木质素特异合成途径的转折点上, 经过不同的途径可分别合成苯丙素类、香豆素类、木质素类、黄酮类等化合物, 紫草素类化合物合成的重要前体之一 PHB 就是由 4-香豆酸辅酶 A 经过

几步转化生成。

Yazaki 等^[17]从硬紫草中克隆出了 2 个 PAL 的单拷贝基因 *LePAL-1* 和 *LePAL-2*, *LePAL-1* 的表达高于 *LePAL-2*, 此基因在硬紫草中仅在合成紫草素类化合物的根部表达。Yamamura 等^[18]从硬紫草中分离得到了 2 个 C4H 的全长 cDNA 克隆, *LeC4H-1* 和 *LeC4H-2* 在酵母中的异源表达产物都具有 C4H 功能; C4H 基因的表达在硬紫草中是组成性的, 不受光照、生长素、茉莉酸甲酯等环境因素影响。Yazaki 等^[19]用马铃薯的 4CL 基因作为异源探针, 从硬紫草细胞的 cDNA 文库中筛选出了 2 个 4CL 的 cDNA 克隆, *Le4CL-1* 和 *Le4CL-2*, *Le4CL-1* 为 3 拷贝基因, *Le4CL-2* 为单拷贝基因, 在培养基中 *Le4CL-1* 的表达量是 *Le4CL-2* 的 3 倍, 但是目前的研究尚不能证明 *Le4CL-1* 和 *Le4CL-2* 参与了紫草素类化合物合成中间产物 PBH 的形成。Singh 等^[13]在新疆紫草中也克隆了一系列此代谢途径的基因, 并分别命名为新疆紫草苯丙氨酸解氨酶基因 (*AePAL*)、新疆紫草 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (*Ae4-CL*) 和新疆紫草肉桂酸-4-羟化酶 (*AeC4H*), 而且研究发现这些基因在新疆紫草细胞从生长培养基转入到生产培养基中后第 3 天均出现表达上调。

1.3 对羟基苯甲酸香叶基转移酶 (PGT) 基因

PGT 是紫草细胞中生物合成紫草素类化合物的一个关键而重要的代谢酶, 它将 MVA 代谢途径形成 GPP 的香叶烯基转移到来自 PP 途径的代谢产物 PHB 上, 形成香叶基-对羟基苯甲酸 (GHB), 该化合物是生成紫草宁及其衍生物的前几步反应中的重要前体。Yazaki 等^[8]在硬紫草中分离到 2 个 PGT 的 DNA 克隆, *LePGT-1* 和 *LePGT-2*, 它们的异源表达均显示出了香叶基转移酶活性, 而且特异地以 GPP 为代谢底物, 充分证明了它们在紫草宁形成代谢中的作用。*LePGT-1* 和 *LePGT-2* 基因仅在硬紫草原植株根中表达。Singh 等^[13]克隆了新疆紫草中的 PGT 基因 (*AePGT*), 并且研究发现新疆紫草悬浮培养细胞从生长培养基转入到生产培养基时, *AePGT* 表达明显上调。暗培养、寡糖和茉莉酸甲酯能增加培养基中紫草细胞 *LePGT* 基因表达和 PGT 活性以及紫草素类化合物的形成; 而光照、铵离子和 2, 4-D 却起到相反的作用, 充分表明了 PGT 基因的表达与紫草素类化合物的合成直接相关。

对羟基葡萄糖基转移酶是与 PGT 存在底物竞争的酶, 适宜浓度的油菜素内酯、茉莉酸甲酯均能

在一定程度上上调滇紫草中 PGT 基因的表达,而同时下调对羟基葡萄糖基转移酶基因的表达,从而使更多的苯甲酸用于紫草素类化合物的合成,促进紫草素类化合物的积累^[20-21]。

1.4 其他相关基因

此前,还有多种与紫草素的合成相关的基因被发现并克隆,如黑暗诱导蛋白基因、乙烯受体基因等,但是尚不清楚这些基因在紫草素合成途径中的作用位置,只能证明这些基因与紫草素的生物合成相关。

1.4.1 黑暗诱导蛋白基因 紫草素类化合物的合成表现出强烈的光抑制,仅在黑暗条件下合成,截然不同于其他酚类物质的合成,这种强烈的光抑制在硬紫草、滇紫草、新疆紫草的细胞培养过程均存在,而这种抑制是可逆的过程,是紫草素类化合物生物合成的一个显著的特征。为了探索光照对紫草素合成影响的分子机制,Yazaki 等^[22]采用差减杂交基因克隆技术从硬紫草细胞中分离了在暗培养条件下优势表达的 5 个 cDNA 克隆,分别表示为 *LDI-1~5*,硬紫草细胞在 M9 培养基中的 *LDI-1* 保持较高的表达水平,而暗培养时的表达量约是光照时的 2 倍;*LDI-2* 在暗培养的紫草细胞中特异表达,仅在硬紫草植株生产色素的地下根中表达。从滇紫草中克隆了 *OpDI-1*、*OpDI-3*、*OpDI-5*,并研究了不同光波长条件下表达的差异,表明不同波长的光源通过不同的信号转导途径及表达调控机制调控着目的基因的表达。新疆紫草中亦克隆出了 2 个黑暗诱导蛋白的 cDNA 序列,但是这些蛋白的功能还没有得到相应的验证,不能确定与紫草素类化合物的合成是否直接相关^[23]。

1.4.2 细胞壁蛋白基因 Yamamura 等^[24]从紫草细胞中获得了 1 个长 843 bp 的 cDNA 克隆 *LEPS-2*,该基因编码一个细胞壁蛋白,*LEPS-2* 在生产紫草宁的紫草培养细胞系和紫草植株的地下根中表达,而在没有紫草宁色素合成的突变细胞系中不能表达,由此推断,此基因可能与紫草宁的形成和分泌有着密切的联系。

1.4.3 乙烯受体和相关蛋白 朱思梅等^[25]在硬紫草高产细胞系 Y8 中克隆出了乙烯信号转导途径的关键转录因子组分 ENI3 的全长 cDNA——*LeEIL-1*,定量 PCR 分析表明,该基因在紫草培养细胞从 B5 生长培养基转入 M9 生产培养基时,在 6 h 内表现出明显的应激反应,而且在 M9 中表现出一个较为

稳定的表达模式,且该基因在紫草幼苗的根系的表达量显著高于叶片和茎段。尹雅乐等^[26]在紫草中克隆了乙烯响应因子 ERF 基因的 cDNA,并发现在 8 d 的培养周期内,相对于白光培养,黑暗培养可显著上调 ERF 基因的表达;另外,紫草在白光预培养 2 或 5 d 后转入黑暗培养,ERF 基因的表达也显著上调。这些结果表明光信号参与调控紫草 ERF 基因的表达,乙烯信号传导可能与紫草素的积累相关。

2 紫草素及其衍生物生物合成的信号传导及相关基因表达

植物感受外界环境的刺激后,细胞通过刺激-感受-信号传导-分子调控-表达反应的过程,调控植物的生理、生长发育和形态建成,包括次生代谢产物的积累。信号传导系统是植物在进化过程中形成的分子水平调控的应答网络,使植物在野生环境下存活、发展、繁殖成为可能。外界环境通过信号传导的过程使植物产生一定的应答机制,这些应答通过调控一系列相关基因的表达来实现对外界环境的适应。植物在接受刺激后,胞内起信号传导作用的信使系统主要有以下几个:钙信使系统、肌醇磷脂信使系统、环核苷酸信使系统、 H_2O_2 信使系统、pH 系统等。信号传导研究是植物学家们研究、分析、了解植物感受环境并适应环境的重要途径^[27]。目前,国内外关于紫草素及其衍生物生物合成调控过程的信号传导研究比较零散,主要集中在乙烯、NO、ROS、胞内钙离子浓度等方面。

2.1 乙烯

乙烯作为一种重要的植物激素信号分子,对紫草宁的合成起着重要的调控作用。朱思梅等^[25]用紫草高产细胞系 Y8 为材料克隆出了乙烯信号转导途径的关键转录因子组分 ENI3 的全长 cDNA,并命名为 *LeEIL-1*,为揭示乙烯调控紫草宁合成的分子机制提供了前提条件。尹雅乐等^[26]在硬紫草中克隆了乙烯响应因子 ERF 基因的 cDNA,在研究乙烯调控紫草宁合成相关基因的克隆和表达时,发现在 8 d 的培养周期内,相对于白光培养,黑暗显著上调了 ERF 基因的表达。用半定量 RT-PCR 方法初步检测了乙烯合成前体 ACC 和 Ag^+ 处理对紫草宁合成相关基因 (*PAL*、*C4H*、*4CL*、*HMGR*、*PGT*、*CYP98A6*、*LeDI-2*) 的影响。结果表明, Ag^+ 略微上调 *PAL*、*4CL*、*CYP98A6* 的表达,强烈上调 *LeDI-2* 的表达,略微下调 *HMGR* 的表达;ACC 除明显下调 *LeDI-2* 基因的表达,对其他相关酶基因的表达无明显影响。这

些结果说明, 乙烯信号可能参与了通过影响紫草宁合成相关酶基因的表达来调控紫草宁的合成^[28]。

2.2 NO

NO 作为一个重要的第 2 信使调控诸如免疫神经系统和血管系统的生理过程。近年来也发现, 在植物与病原菌非亲和反应中除了活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 外也伴随着 NO 的合成。NO 和 ROS 是相互作用的, NO 也有自己作用的靶标, 也能诱导防御反应基因, 诱导具有防御作用的次生代谢过程。内源 NO 的产生与滇紫草中紫草素形成的调控相关, 滇紫草细胞转入生产培养基后 2 d, NO 的量达到最高水平, 是实验原始 NO 水平的 16 倍, 并且这种高 NO 水平在滇紫草细胞转入生产培养基后维持了 6 d。小麦纹枯病菌诱导子引起内源 NO 的上调, 而后提高了紫草素类化合物的量, 表明此调节依赖诱导子引起的 NO 的迸发。Wu 等^[29]在研究 NO 对滇紫草细胞悬浮培养紫草素合成的调控中发现, 抑制 NO 生物合成的抑制剂 L-NNA 和硝化还原酶抑制剂叠氮化钠都可以显著地抑制紫草素的合成, 而硝普钠提供的外加 NO 可以减轻或消除这种影响, 表明 NO 起到调节紫草素合成的作用。通过实时定量 PCR 分析, NO 可以显著地促进紫草素类化合物合成途径中起关键作用的苯丙氨酸脱氨酶、PGT 和羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶的基因的表达。

2.3 ROS

ROS 是植物应对刺激时原初的反应产物, 其积累对植物有伤害作用的同时也是重要的信号传导物质, ROS 的信号可以刺激植物启动系列的防御机制, 包括具有防御机制的次生代谢产物的积累。外源施加适宜浓度的 H_2O_2 可以显著促进硬紫草中紫草宁及其衍生物的合成, 并且明显增强紫草宁合成关键酶基因 *PAL*、*LePGT*、*HMGR* 的转录表达, 并且外源加入适量的胞内 ROS 产生酶抑制剂能显著抑制胞内 H_2O_2 水平和紫草宁及其衍生物的量, 表明硬紫草细胞中 H_2O_2 很可能作为信号分子诱导紫草宁的产生^[30]。不同光照条件下, ROS 信号可能参与了光信号对紫草宁生物合成的调控过程。在白光培养条件下, 紫草宁合成完全受到抑制, 紫草细胞内源 H_2O_2 和超氧阴离子量稳定在较低的水平上; 在黑暗培养条件下, 紫草宁开始合成并且不断积累, 24 h 紫草细胞内源 H_2O_2 和超氧阴离子量与白光处理无显著差异, 随着培养时间的延长, 内源 H_2O_2

量在 48 h 上升到一个较高的水平, 并在 72 h 时达到顶峰, 内源超氧阴离子量同样在 48 h 开始大幅上升, 并在 60 h 达到最高点, 与白光处理相比均具显著差异。POD 酶基因的转录表达的趋势和 H_2O_2 表现一致, 光信号对细胞内源 H_2O_2 和超氧阴离子积累的影响和对紫草宁合成的影响趋势一致。米曲霉诱导子处理能显著促进紫草素类化合物的合成, 诱导子处理后 ROS 的浓度增高, 10 min 内快速释放, 2 h 接近对照值, 抗氧化酶系统活性随之增高, 表明 ROS 可能也参与了诱导子诱导滇紫草次生代谢产物积累的调控过程^[31]。

2.4 胞内钙离子浓度

钙离子是细胞内信号传导的重要途径, 胞内钙离子浓度与肌醇磷酸系统、ROS 系统具有密切的联系, 其作为重要的胞内第 2 信使一直都是信号传导研究的重点。研究表明, 钙离子浓度与紫草细胞的生长及紫草素的生物合成相关, 在无钙培养基中新疆紫草细胞会褐化死亡, 低浓度下随着钙离子浓度的增加细胞的生长增加, 浓度过高则抑制细胞生长, 促进紫草素的生成^[31]。胞内钙离子浓度与紫草素的合成调控密切相关, 米曲霉激发子作用于滇紫草悬浮培养细胞 5 min 后, 胞内游离钙离子浓度相对下降; 利用钙通道阻滞剂和钙离子载体研究表明, 抑制胞内钙离子浓度的升高可以模拟诱导子的作用, 低浓度钙阻断剂和诱导子同时使用可以加强诱导子的效应; 钙离子载体可以抑制诱导子的作用和紫草素的合成^[32-33]。在研究暗培养条件下 Ca^{2+}/CaM (钙调蛋白) 对 M9 培养基中的滇紫草细胞紫草素形成及其相关基因的影响时发现, 紫草宁的产量随着钙离子螯合剂 EGTA 浓度的增加而明显降低, 最后乃至完全抑制, 钙离子通道阻滞剂能部分抑制紫草素的合成, 钙离子载体能一定程度上促进紫草素的合成。另外, 紫草素的量随 CaM 拮抗剂浓度的增加而明显减少, 最后至完全抑制。说明 Ca^{2+}/CaM 信号分子可能参与滇紫草培养细胞中紫草素的合成调控。但基因表达分析表明, 不同浓度的 EGTA 和 CaM 抑制剂处理后滇紫草中的 *PAL1*、*C4H2*、*LDI2*、*LePGT1*、*HMGR*、*CYP98A6* 基因的转录水平与对照无差异, Ca^{2+}/CaM 可能在转录后水平、代谢酶的结构或者其他未知的代谢酶基因的表达中对紫草素合成的调控起作用^[34-35]。

2.5 环核苷酸

紫草细胞有关环核苷酸的研究报道较少。环核

苷酸包括环腺苷酸 (cAMP) 和环鸟苷酸 (cGMP), 环核苷酸信使系统作为一个重要的胞内第 2 信使系统, 常与其他的信使系统如钙信使系统等相互作用。米曲霉诱导子处理滇紫草悬浮培养细胞 20 min 后 cAMP 的量急速增加, 60 min 达到最高水平后回复到对照水平^[32]。这与米曲霉诱导子处理后 ROS 的变化趋势一致, 可能之间存在着某种联系。

3 结语

紫草素在工业上的广泛应用给野生紫草、滇紫草、新疆紫草等药用植物资源带来了巨大的压力, 导致其资源严重匮乏。通过细胞培养生产紫草素是目前缓解野生资源压力的重要手段, 紫草细胞培养过程中应用基因工程等分子生物学的手段调控紫草素的产量既稳定又高效。目前, 紫草素及其衍生物合成的代谢途径已基本清楚, 生物合成过程中的许多关键酶和相应的关键基因也逐步被分离、鉴定, 紫草素前半部分合成过程已经研究得比较清晰, 但是从 GHB 到紫草素合成的了解几乎是一片空白, GHO 在细胞内经过一系列修饰方能形成紫草素及其衍生物。紫草素及其衍生物的生物全合成途径的探索道路仍然任重而道远。

紫草素的生物合成途径包括植物次生代谢过程 PP 和 MVA 两条重要的代谢途径, 这两条代谢途径在植物次生代谢过程中普遍存在, 与萜类、黄酮类、木质素类、香豆素类化合物的生物合成均密切相关。紫草素生物合成途径的研究不仅可以作为 2 种生物合成途径各自研究的参考, 同时还可以用于 2 种途径之间的相互作用以及两条代谢通路的代谢分流等问题的研究, 对于植物次生代谢的研究具有重要的意义。

另外, 代谢调控方面的研究尚未形成比较完整的理论体系, 信号传导机制的研究主要集中在单个信号通路的研究, 关于信号传导物质之间的相互作用、传导过程等研究还需要更加全面深入的探索。总之, 紫草素及其衍生物的生物合成调控需要紫草素合成的代谢调控网络、酶学、相关基因等方面更深入的研究。

参考文献

[1] 任贻军, 张宏琳. 新疆紫草的药理作用 [J]. 中国民族民间医药, 2009(1): 13-14.
 [2] 徐新刚, 王宝珍, 孙志蓉, 等. 新疆紫草的主要化学成分 [J]. 吉林大学学报: 理学版, 2010, 48(2): 319-322.
 [3] 葛 锋, 王晓东, 王玉春. 药用紫草的研究进展 [J].

中草药, 2003, 24(9): 附 6-附 10.

- [4] 周立刚, 郑光植, 王世林. 滇紫草愈伤组织培养与紫草素产生 [J]. 云南植物研究, 1991, 13(3): 315-320.
 [5] 李国凤, 伍正容, 叶和春, 等. 离体培养的新疆紫草萘醌色素的诱导形成 [J]. 植物学通报, 1988, 5(2): 84-86.
 [6] Tabata M, Mizukami H, Hiraoka N. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Phytochemistry*, 1974, 13: 927-932.
 [7] 黄文虎, 葛 锋, 刘迪秋, 等. 紫草素及其衍生物的调控策略 [J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(11): 100-105.
 [8] Yazaki K, Kunihisa M, Fujisaki T, et al. Geranyl diphosphate: 4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(8): 6240-6246.
 [9] Inouye H, Ueda S, Inoue K, et al. Biosynthesis of shikonin in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Phytochemistry*, 1979, 18(8): 1301-1308.
 [10] Yamamoto H, Inoue K, Li S, et al. Geranylhydroquinone 3"-hydroxylase, a cytochrome P-450 monooxygenase from *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures [J]. *Planta*, 2000, 210: 312-317.
 [11] 刘 骅, 徐敏源, 陈 彤, 等. 产色素与不产色素新疆紫草培养细胞超微结构的动态变化 [J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(S): 1-4.
 [12] Gaisser S, Heide L. Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(4): 1065-1072.
 [13] Singh R S, Gara R K, Bhardwaj P K, et al. Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, *p*-hydroxybenzoate-*m*-geranyltransferase and genes of phenylpropanoid pathway exhibits positive correlation with shikonin content in *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston [J]. *BMC Mol Biol*, 2010, 11: 88.
 [14] Lange B M, Severin K, Bechthold A, et al. Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase for shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures [J]. *Planta*, 1998, 204(2): 234-241.
 [15] Yamamoto H, Zhao B, Yazaki K, et al. Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(8): 1086-1090.
 [16] 冯春燕. 植物 4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶 (4CL) 研究进展 [J]. 现代农业科技, 2010(8): 39-40.
 [17] Yazaki K, Mieko K, Gisho H, et al. cDNA Cloning and gene expression of phenylalanine ammonia-lyase in

- Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(12): 1995-2003.
- [18] Yamamura Y, Ogihara Y, Mizukami H. Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon*: cDNA cloning and gene expression [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(7): 655-662.
- [19] Yazaki K, Ogawa A, Tabata M. Isolation and characterization of two cDNAs encoding 4-coumarate: CoA ligase in *Lithospermum* cell cultures [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36(7): 1319-1329.
- [20] Ding J, Shi S, Jiang B, *et al.* Effects of methyl jasmonate with indole-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells [J]. *In Vitro Cell*, 2004, 40: 581-585.
- [21] Yang Y H, Zhang H, Cao R Q. Effect of brassinolide on growth and shikonin formation in cultured *Onosma paniculatum* cells [J]. *Plant Growth Regul*, 1990, 18: 89-92.
- [22] Yazaki K, Matsuokam H, Ujihara T, *et al.* Shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*. Light-induced negative regulation of secondary metabolism [J]. *Plant Biotechnol*, 1999, 16(5): 335-342.
- [23] Liu Z, Qi J, Chen L, *et al.* Effect of light on gene expression and shikonin formation in cultured *Onosma paniculatum* cells [J]. *Plant Cell*, 2006, 84: 39-46.
- [24] Yamamura Y, Sahin F, Nagatsu A, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a novel apoplastic protein preferentially expressed in a shikonin-producing callus strain of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(4): 437-446.
- [25] 朱思梅, 邹爱兰, 殷晶晶, 等. 紫草细胞中乙烯信号转导途径组分LeEIL-1基因的克隆及表达分析 [A]. 江苏省遗传学会第八届会员代表大会暨学术研讨会论文集 [C]. 南京: 江苏省遗传学会, 2010.
- [26] 尹雅乐, 戚金亮, 庞延军, 等. 乙烯调控紫草宁合成相关基因的克隆和表达研究 [A]. 江苏省遗传学会第七届二次代表大会暨学术研讨会论文集摘要汇编 [C]. 盐城: 江苏省遗传学会, 2008.
- [27] Casal J J. *Plant Signal Transduction* [M]. New York: Humana Press, 2009.
- [28] 刘少华, 尹雅乐, 戚金亮, 等. 紫草 ERF 基因的克隆、表达及乙烯调控紫草宁合成的研究 [A]. 中国植物学会七十五周年年会论文集摘要汇编 [C]. 兰州: 中国植物学会, 2008.
- [29] Wu S J, Qi J L, Zhang W J, *et al.* Nitric oxide regulates shikonin formation in suspension-cultured *Onosma paniculatum* cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(1): 118-128.
- [30] 刘根林, 陈婷婷, 戚金亮, 等. 活性氧信号调控紫草宁合成及其相关基因表达的研究 [A]. 中国植物学会七十五周年年会论文集摘要汇编 [C]. 兰州: 中国植物学会, 2008.
- [31] 宁文, 徐红, 曹日强. 米曲霉激发子刺激滇紫草细胞活性氧的产生及与紫草色素形成的关系 [J]. 南京大学学报: 自然科学版, 1997, 33(2): 259-264.
- [32] 李国凤, 方德秋, 侯嵩生, 等. 不同营养因子对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物形成的影响 [J]. 武汉植物学研究, 1994, 12(4): 348-354.
- [33] 宁文, 曹日强, 王金晞, 等. 米曲霉激发子促进紫草色素合成中细胞内 Ca^{2+} 和 cAMP 的变化 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(3): 194-196.
- [34] 刘志, 戚金亮, 杨永华. Ca^{2+}/CaM 和不同波长的光对滇紫草培养细胞中紫草宁的形成及其相关代谢基因表达的影响 [A]. 中国植物生理学会第九次全国会议 [C]. 贵阳: 中国植物生理学会, 2004.
- [35] Ning W, Wang J, Liu Y, *et al.* The effects of Ca^{2+} during the elicitation of shikonin derivatives in *Onosma paniculatum* cells [J]. *In Vitro Cell*, 1998, 34: 261-265.