

· 专 论 ·

生物技术在药用植物研究与开发中的应用和前景

黄鑫¹, 陈万生², 张汉明¹, 张磊^{1*}

1. 第二军医大学药学院, 上海 200433

2. 长征医院 药材科, 上海 200003

摘要: 药用植物研究与开发面临资源枯竭、药效物质不明确及质量难以控制等难题。生物技术是一门通过生物科学技术来增加生物制品产量和提高生物制品质量, 从而满足人类日益增长的需求的技术。作为一种综合了生命科学与诸多现代科学理论与研究手段的高新技术, 生物技术在药用植物资源研究与开发方面具有广阔的应用前景。综述了近年来生物技术在药用植物资源开发与保护、药用植物品种改良与提升及天然药效物质的工业化生产等方面的应用进展, 以期对药用植物的深入开发和可持续利用提供参考。

关键词: 药用植物; 生物技术; 分类鉴定; 次生代谢工程; 合成生物学

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)16-2343-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.001

Application and prospect of biotechnology in research and development for medicinal plant

HUANG Xin¹, CHEN Wan-sheng², ZHANG Han-ming¹, ZHANG Lei¹

1. College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Chinese Medicinal Materials, Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China

Abstract: Problems, being faced in medicinal plant research and development, are unclear drug substance, uncontrollable quality, exhausted resources, and so on. Biotechnology is a technology that increases the output and improves the quality of biological products through biological science and engineering technology, so as to meet the human's growing demand. Biotechnology as an integration of life sciences, modern scientific theories, and research methods of high and new technology, has broad application prospects in the field of medicinal plant resources. This paper reviewed the biotechnology applications about development and protection of the medicinal plant resources, the improvement and promotion of medicinal plant varieties, and the industrialization production of the natural medicinal materials, for the purpose that it can provide some references for the further research and development of medicinal plants.

Key words: medicinal plants; biotechnology; classification and determination; secondary metabolic engineering; synthetic biology

药用植物以其独特的疗效、较小的毒副作用等特点, 引起世界各国的普遍关注, 其需求量日渐增多。中药有效成分是其具有确切临床疗效的物质基础。药效物质的有无(真伪)、多寡(优劣)是其品质的核心部分。但是由于植物药成分复杂、药效物质不明确、来源不一, 且不同制剂工艺各异, 造成质量难以控制, 加之植物药材的造假问题也很突出, 这些都阻碍了药用植物产业的发展。同时由于

自然环境的破坏以及人们长期的过度采挖和滥用, 使很多的原料性药用植物资源已面临枯竭的威胁, 野生资源远远不能满足人们的需要。

因此, 应对保障与提升重要药用植物品质的国家需求, 以及中药野生资源短缺、品质严重退化的严峻形势, 就需要更好地开发利用药用植物资源, 改良和提升其品质, 加大工业化生产力度, 提高药效物质产量以满足市场需求, 同时加大对野生资源

收稿日期: 2015-06-11

作者简介: 黄鑫(1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物生物工程。Tel: 15021123436 E-mail: 415400804@qq.com

*通信作者 张磊(1977—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及品质评价研究。

Tel: 13681957251 E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

的保护力度,使其更好地、可持续地为人类所用。

1 药用植物资源开发与保护

药用植物开发利用过程中存在种类和数量不清、种质资源保存困难、野生资源遭受严重破坏、人工栽培品种品质退化等诸多问题,严重制约了产业发展。如何有效对药用植物资源进行分类鉴定,保护濒危和紧缺资源修复和再生,防止退化和灭绝,以实现保障药材可持续供应,提升药材质量,是现代药用植物开发领域最亟需解决的课题,也是中医药产业实现现代化、国际化的关键措施。

1.1 药用植物种质资源的分类与鉴定

药用植物传统分类和鉴别方法主要依据药材颜色、形状、气味、味道和质地等感观特征,其不足之处在于对这些特征的把握因人而异,具有很强的主观性,且强调经验积累,准确性不强,得不到国际同行的广泛认可。因此如何从分子水平揭示种质间差异成为研究者十分关心的问题。现代生物技术为药用植物种质鉴定开辟了一条新道路。

1.1.1 DNA 分子标记鉴定药用植物 DNA 分子标记(DNA molecular markers)是以脱氧核糖核酸分子差异为基础的一种标记,一般具有快速、微量、特异性强、稳定性好、结果直观可靠且不受生育阶段、供试部位、环境条件、贮藏等因素的影响等诸多优点^[1]。

DNA 分子标记在药用植物研究中的应用最先开始于日本。应用最早且最多的是药材的真伪鉴定及品种分类。较早的 DNA 分子标记技术有限制性内切酶片段长度多态性标记(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)。随着生物技术的发展,更加高效、快捷的 DNA 分子标记如扩增片段长度多态性标记(amplified restriction fragment polymorphism, AFLP)、简单序列重复标记(simple sequence repeat, SSR)、序列特征化扩增区域(sequence characterized amplified region, SCAR)、简单重复序列间长度多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)、单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)等相继出现,并且被应用于药用植物种质资源研究中的各个方面。

台湾中兴大学应用 RFLP 技术精确鉴定出了苦参与其伪品^[2],纪宝玉等^[3]对野葛的研究表明, RAPD 可作为种质资源筛选鉴定的关键技术;郝岗

平等^[4]将 AFLP 技术成功应用于丹参的道地性鉴别;潘清平等^[5]采用 ISSR 技术为玉竹商品药材的鉴定提供了分子依据等。由此可见, DNA 分子标记技术是一种有效鉴定药用植物的方法。

表 1 对几种常用 DNA 分子标记技术进行了比较,每种方法各有优点及局限性,实际应用过程中可根据实验目的、材料和实验条件综合考虑进行选择。

表 1 几种常见 DNA 分子标记技术特点比较

Table 1 Comparison on several common DNA molecular marker techniques

DNA 标记技术	适用范围	稳定性	重复性	灵敏性	技术要求	费用
RFLP	非干燥材料	高	好	低	繁杂	高
RAPD	广泛	低	差	高	简便	低
AFLP	广泛	高	好	高	简便	低
SSR	广泛	高	好	高	困难	高
SCAR	广泛	高	好	高	简便	低
ISSR	广泛	高	好	高	简便	低
SRAP	广泛	高	好	高	简便	低
SSCP	广泛	低	较差	高	简便	低

1.1.2 DNA 条形码序列鉴定药用植物 DNA 条形码(DNA barcoding)是以一段或几段标准 DNA 序列作为标记来实现物种鉴定,类似于超市利用条形码扫描区分不同的商品,具有快速简便、准确可靠和自动化等优点。

Chen 等^[6]对药用植物及近缘种的 4 800 个物种 6 600 个样本进行研究,证明 ITS2 在药用植物鉴定中能发挥关键作用;刘美子等^[7]发现 ITS2 序列对 9 种采自不同地域的常见蒿属物种水平鉴定成功率最高,可以作为鉴定蒿属植物的潜在条形码;崔志伟等^[8]利用 ITS2 和 psbA-tmH 有效区分不同品种金银花,说明 ITS2 和 psbA-tmH 可以作为鉴定金银花不同品种的优势条形码组合;李栎等^[9]对茜草科黎药植物的鉴定研究表明,ITS2 序列可以对海南茜草科黎药植物进行快速鉴定。

近些年来,新发展起来的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)标记技术可对不同等位基因之间仅有的个别碱基差异或只有小的插入、缺失等核苷酸差异进行检测,用以区分 2 个个体遗传物质的差异^[10]。Chen 等^[11]采用 SNP 标记技术结合 ITS2、matK 和 psbA-trnH 标准条形码序列,成功鉴定出了高丽参和西洋参。证明基于 DNA

条形码的 SNP 标记技术可以作为识别人参属的有效手段。SNP 可直接以序列变异作为标记,其检测分析方法用高精尖的 DNA 芯片技术代替了传统的凝胶电泳,被认为是应用前景最好的遗传标记。

DNA 条形码技术可以实现物种的快速有效鉴定,已成为现今药用植物种质资源分类与鉴定的主流方法。

1.2 种质资源保存

传统药用植物种质资源保存一般采用种子库的方法,存在占用空间大、保存物种数量有限、管理麻烦、容易染菌发霉及保存时间短等不足。利用生物技术方法进行离体保存,可以很好解决上述问题。保存材料经复苏后,可短时间快速繁殖大量种苗,不受自然环境影响,省时省力,同时降低劣变发生频率,达到随时使用和长期保存优质种质资源的目的^[12]。

1.2.1 组织培养保存法 依靠植物细胞全能性,将外植体接种在 MS 半固体培养基上或液体培养基的滤纸上,然后放在常温或低温条件下进行培养,并适时进行继代培养^[13],组织培养保存法分常温继代保存法和缓慢生长保存法。组织培养保存法能有效扩大繁殖药用植物,缓解野生资源不能满足市场需求的境况,同时也是保护濒危珍稀药用植物的有效手段。

(1) 常温继代保存法:在常温条件下,每隔一段时间,将外植体进行新一轮的继代培养,以达到保存种质的目的,需要时还可以随时进行扩繁^[14]。对铁皮石斛种质资源采用该方法保存取得了一定效果,并成功建立铁皮石斛快速繁殖体系^[13]。该方法间隔时间短,需要不断继代培养。

(2) 缓慢生长保存法:通过调节培养条件,在保证不使外植体死亡的情况下抑制其生长,尽量减少营养物的消耗,从而尽可能延长继代培养时间。主要措施有降低温度、调整渗透压、控制养分水平、使用生长抑制剂或延缓剂、控制培养基营养物质配比以及调节光照等^[13]。对山银花进行离体培养研究,探索出了最适于山银花种质离体保存的条件^[15]。

1.2.2 超低温保存法 该法不需要继代即可长期保存植物种质,因此引起遗传变异相对小。目前最成熟的超低温保存法是玻璃化法。利用高浓度复合保护剂处理植物培养物一定时间后用液氮速冻,使植物细胞内外溶液固化成无定形的玻璃化状态,避免了冰晶在形成和融化过程中对细胞产生的机械破坏作用。此状态下植物细胞内新陈代谢、生长活动几乎完全停止,同时又保持了生物材料的形态发生潜

能^[16],是一种保存种质的有效方法。

对西洋参悬浮细胞的超低温保存的探索性研究证明了该方法的可行性^[17];包埋玻璃化法超低温保存技术可以实现山药种质离体保存^[18];采用玻璃化法保存濒危植物矢车菊,成功实现了其茎尖的冻存程序^[19]。

在滴冻法和玻璃化法基础上发展起来的小滴玻璃化法具有高存活率、高再生率、广适性、处理量大、操作简易等优点^[20]。小滴玻璃化法在药用植物种质保存应用方面的报道还较少,但在其他植物上的应用可以作为借鉴。

1.2.3 人工种子 人工种子是用能提供养分的胶囊包裹组织培养产生的胚状体,再在胶囊外包上一层保护膜,形成一种类似于天然种子的结构。人工种子有不受季节限制、更好的营养供应和抗病能力、能保持优良品种的遗传特性、方便贮藏运输等优点。在濒危药用植物种质资源保存上大有用武之地。

长期以来,许多名贵珍稀的药用植物由于其独特的治病、保健、美容功效而供不应求,原药材价格持续走高,极大刺激了人们对野生珍稀药用植物资源的掠夺性采挖和收购,造成资源的毁灭性破坏。另外,全球气候变暖等自然环境的变化也使得很多地区不再适合原有药用植物的生长。多方面原因综合导致多种珍稀药用植物资源濒临灭绝。

传统对濒危珍稀药用植物采取的保护措施主要是就地保护和人工栽培,此方法也取得了比较可观的成果。但受人力、物力、气候条件及土地资源等条件限制,无法对一些珍稀濒危药用植物进行有针对性的保护。同时,濒危物种种群和个体数量已很少,仅依靠自我更新对其进行保护,恢复速率太慢。人工种子的方法则为濒危药用植物种质资源保存提供了新的出路。以杜鹃兰为材料,建立原球茎悬浮系,并以原球茎为繁殖体,包裹上人工胚乳和种皮,制成人工种子,确立了杜鹃兰人工种子制作基本技术^[21];以白术无菌体系为材料的实验结果表明,以组织培养为基础的白术人工种子快速繁殖技术具有一定优越性^[22];以铁皮石斛未萌发和萌发原球茎为繁殖体的研究表明,萌发原球茎为繁殖体的人工种子萌发率和成活率较高^[23]。近年来,有不少课题组用幼嫩头状花序、幼苗子叶、根、茎、真叶等成功诱导产生愈伤组织,进而产生不定芽或胚状体,实现了雪莲种质的快速繁殖^[24-29]。

人工种子技术对于濒危植物种质资源保存具有重大意义。但该技术依赖于植物组织培养,对于难

以进行组培的植物则不适用。

1.2.4 其他方法 运用器官培养、植物干细胞培养等^[30]生物技术方法也能很好地实现药用植物资源的可持续利用。此外，DNA 分子标记技术在种质资源的鉴定、保护对象和原地保护单元的确定、迁地保护的取样策略和效果评价、濒危原因的科学阐明等方面的应用，也可以为珍稀濒危药用植物资源保护策略制定及措施实施提供参考。

生物技术的运用既能使药用植物资源得到更好地开发利用，又可以最大限度地保护它们。生物技术将为中药这一中华文化瑰宝走向世界起到巨大的推动作用。

2 药用植物品质改良与提升

药用植物种植培养过程中存在病毒感染导致品质退化和质量评价体系缺乏科学性等问题。因此，培育脱毒的高品质药用植物植株，建立科学的质量评价体系，创制品质优于自然品种的药用植物新品

种等，是目前药用植物研究开发领域的热门方向。

2.1 脱毒

植物病毒因其干扰宿主体内新陈代谢，降低产量和品质，甚至导致死亡而有“植物癌症”之称。特别是无性繁殖作物，连年种植易积累多种病毒，从而造成品质退化^[31]。植物病毒已成为降低农作物产量和质量的主要因素之一。

目前，人类发现的植物病毒已多达近千种。药用植物感染的病毒种类主要有黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*)、芋花叶病毒 (*Dasheen mosaic virus*)、大豆花叶病毒 (*Soybean mosaic virus*) 和烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*) 等^[32]。全球每年因植物病毒造成的经济损失约 600 亿美元。因此，加大对药用植物脱病毒技术的研究力度，采取科学有效的防治措施，是当前及今后提升和改良药用植物品质的重点和难点^[33]。表 2 总结了近年来几种脱毒技术的应用进展。

表 2 脱毒技术原理及应用

Table 2 Principle and application of detoxification technology

方法	原理	应用	备注
热处理与茎尖培养结合	高温抑制 ^[34]	获得脱除潜隐病毒的百合植株 ^[35] ；较高的生姜脱毒率 ^[36] ；逐渐增加温度的方法，使脱毒更易成功 ^[37]	茎尖大小要适宜 ^[38] ；并非都对热处理敏感 ^[35] ，且与植物本身固有的生理生化反应也有直接的关系； <i>Nature</i> 曾探讨过高温脱除马铃薯病毒 ^[39] ，有待进一步研究优化
超低温疗法	冰晶杀伤 ^[40]	同时脱除马铃薯 Y 病毒 (PVY) 和马铃薯卷叶病毒 (PLRV) ^[41] ；结合热处理脱除木莓从矮病毒 (RBDV) ^[42] ；脱除马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 和马铃薯 X 病毒 (PVX) ^[43]	脱毒率不受茎尖大小限制、操作简便易推广、实验周期短、成本低及脱毒率高，很可能代替传统热处理法，成为新一代植物脱毒技术
转基因脱毒	干扰复制 ^[33]	将 R_{x1} 基因转化到本氏烟草和普通烟草中，使其对 PVX 产生抗性 ^[44]	

除表 2 中所列的常见脱毒法外，还有花药或花粉培养、珠心胚培养技术等，也可一定程度上起到脱病毒效果。

2.2 新品种的创制

植物新品种指经过人工培育的、对发现的野生植物加以引种驯化开发的或者通过生物技术改造的植物品种，具有新颖性、特异性、一致性和稳定性以及名称确定性的植物品种^[45]。

传统药用植物新品种创制一般采用杂交育种等方法，如桔梗^[46]、丹参^[47]等药材已开展杂交育种或杂种优势利用研究，并创制了新品种。但该方法存在不能产生新基因，且杂交后代会出现性状分离，

育种过程缓慢，过程复杂等不足。现代生物技术方法则开辟了新品种创制的新途径。

2.2.1 诱变育种 诱变育种指利用各种物理、化学及生物等因素诱导植物发生基因突变，促进基因重组，扩大遗传变异，然后根据育种目标选择新品种的育种技术^[48]。

离子束注入诱变技术是利用注入射程具有可控性、集束性和方向性的荷能离子束，在较轻程度损伤细胞的情况下，获得比较高的突变率和比较宽的突变谱，从而选育出新品种的技术。用不同剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束均匀辐照紫苏种子后，产生了一些染色体畸变，为筛选优良变异品种提供了更多可能^[49]。

说明低剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子束在辐照诱变新的突变类型、培育新的优良品种方面具有较大潜力。

太空育种是利用太空特殊环境使生物基因产生变异,选育新品种、新材料的育种新技术。其最大优势在于有可能在较短时间内获得常规育种和常规诱变育种方法难以获得的罕见基因资源,使植物获得新基因、新类型、新性状^[50]。据报道,“天丹一号”太空丹参由天士力集团培育成功。2008年,该集团将丹参种子搭载“神七”进入太空,返地后经株系培养繁育,选育出了“天丹一号”太空丹参,其有效成分量显著高于对照。

诱变育种虽能够提高突变率,短时间内获得更多变异类型,但诱发突变的方向难以控制,突变多为有害突变,要获得更多优良性状,就必须增大突变量。因此,筛选的工作量是相当大的。

2.2.2 倍性育种 倍性育种包括单倍体育种和多倍体育种。单倍体育种是单倍体培养技术与育种实践相结合形成的一种新的育种方法,具有克服远缘杂种不育、提高育种效率及选择效率、迅速获得纯系等优点^[48]。以发育时期的菘蓝花药为外植体,进行培养及单倍体诱导,获得了单倍体小绿苗。经染色体加倍后,一个世代即可出现纯合二倍体,其性状不分离,表型整齐一致,可显著缩短育种年限^[51]。

多倍体是指染色体数目在 $3n$ 或 $3n$ 以上的个体、居群和种。多倍体植物有更强的适应性和可塑性。药用植物多倍体具有强抗逆性、高生物产量、低可孕性以及增加某些药用成分量等特点。最常用的多倍体诱导剂是秋水仙素。秋水仙素诱导法分活体和离体处理加倍法2种^[52]。活体加倍法包括滴液法、浸泡法、琼脂法、喷雾法、注射法等。离体加倍法即组织培养诱变法,是用秋水仙素对植株某一离体部分进行处理,再进行组培,或在组培过程中进行染色体加倍处理的方法。将秋水仙素和琼脂混合,制成半固体,然后将其涂抹在植物顶芽或腋芽上诱导多倍体,该方法已在桔梗^[53]、金银花^[54]等药用植物上获得成功。用适当浓度的秋水仙素溶液浸泡地黄带芽茎段,也诱导出了四倍体植株,但是诱导率不高^[55]。将石斛的类原球茎接种在0.075%秋水仙素的培养基上,获得了较高的诱导率^[56]。通过离体培养的方法,在诱导紫锥菊染色体加倍上也取得了成功^[57]。此外,也可用温度骤变、机械创伤、电离射线、非电离射线、离心力等物理因素和有性杂交培育、胚乳培养法、体细胞杂交法、体细胞无性系

变异等生物学方法诱导染色体加倍。

虽然人工诱导多倍体的频率高、见效快、方法较简单,在生产和育种实践中可产生巨大经济效益。但同时也存在毒害、嵌合体现象比较严重、孕性降低、稳定耗时较长、育种成本高等问题^[58]。因此,还需在药用植物多倍体育种上开展更多、更广泛的研究。

2.2.3 转基因育种 转基因育种也称为基因工程育种,可按照人们的意愿将外源基因重组到受体细胞基因组中使之特异性表达,经筛选获得稳定表达的遗传工程新品种。其主要优势是能克服植物远缘杂交不亲和障碍,扩大物种杂交范围,并加快变异速度等,提供了定向创造生物的可能性^[59]。在创制新品种,开发优质、高产、高效兼各种抗性作物上可大显身手。目前,植物转基因主要方法有农杆菌介导法、聚乙二醇介导法、基因枪法、花粉管通道法、电激穿孔法、显微注射法及超声波导入法等。

农杆菌介导法是应用最多,技术较为成熟且结果比较理想的基因转化方法。先往根癌农杆菌中转入连接有目的基因的植物表达载体,然后用该农杆菌侵染植物,将载体上的目的基因导入并整合到植物基因组中,从而完成目的基因的转化,获得转基因植株。可用于转化较大的DNA片段,能稳定遗传,重复性好,且不易产生基因沉默,但存在只对双子叶植物敏感的缺陷。该方法已成功在丹参^[60]、诸葛菜和菘蓝^[61]、黄芪^[62]、蒿属植物^[63]等材料上取得成功。

基因枪法是继农杆菌介导转化法之后又一个广泛应用的遗传转化技术。利用火药爆炸或其他驱动力,将载有外源DNA的金属颗粒射入真空室中的靶细胞或组织中,从而导入外源基因。该法无宿主限制、操作简单、转化时间短,但转化率相对较低,外源DNA整合机制不清楚。近年在大蒜^[64]、白三叶^[65]等药用植物上取得了新的成果。

花粉管通道法是在植物授粉后,利用植物开花过程中萌发的花粉管通道,将外源DNA导入受精卵,进而使目的基因整合到受体植物基因组中,使其自然发育成种子并形成转基因植株,该方法简便、育种时间短。铁皮石斛^[66]、蓖麻^[67]等用该法转化获得了转基因新品种。表3对几种主要的植物基因转化法特点进行了比较。

转基因在药用植物上的应用虽然已取得相当不错的成果,但其安全问题一直是争论的热点。因此,对转基因药用植物还是应持有谨慎的态度,必须进行更加系统深入的研究。

表 3 主要植物基因转化法特点比较

Table 3 Comparison on major transgenic methods for plant gene

转化方法	受体	宿主限制	组培条件	嵌合体	操作性	设备要求	效率
农杆菌介导法	完整细胞	双子叶植物	简单	有	简单	便宜	高
PEG 法	原生质体	无	复杂	无	简单	便宜	低
基因枪法	完整细胞	无	简单	多	复杂	昂贵	高
花粉管通道法	卵细胞	有性繁殖植物	无	无	简单	便宜	低
电激法	原生质体	无	复杂	无	复杂	昂贵	低
显微注射法	原生质体	无	复杂	无	复杂	昂贵	低
超声波导入法	植物组织	无	简单	无	简单	便宜	高

2.3 次生代谢工程

次生代谢工程就是用 DNA 重组技术修饰生成次生代谢物的生化反应途径或引进新的生化反应,从而直接提高或抑制某个或某些特定次生代谢物的合成,改善细胞性能。随着药用植物次生代谢物生物合成途径的日渐探明,应用代谢工程技术对植物次生代谢途径进行遗传改良,以大幅度提高目标产物的量已成为研究的热点。

自 1991 年美国学者 Bailey 提出次生代谢工程概念以来,次生代谢工程技术的应用已有大量报道。早期最为经典的研究要属用该技术实现了水稻胚乳中维生素 A 原(β -胡萝卜素)的从无到有^[68]。近年来,该技术在药用植物上应用的报道更是层出不穷。药用植物中各类药效物质的量往往很低,无法满足人们的需求。通过次生代谢工程的手段可稳定地提高它们在植物体内的量。本文简要介绍药用植物中几类重要药效物质通过次生代谢工程方法提高量的应用进展。

2.3.1 苯丙素类化合物 苯丙素类化合物是植物在长期自然选择过程中产生的一类重要的天然有机化合物,一般具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗自由基、抗炎镇痛、保肝、保护心血管系统等多种生物活性,因此是非常重要的一类天然药效物质。

在药食两用的甘蓝菜中过表达拟南芥 MYB12 转录因子,大大提高了转基因甘蓝菜叶中黄酮醇的量^[69];用发根农杆菌介导法成功提升了天竺葵中香豆素、黄酮类和酚酸类化合物的量^[70];在苜蓿转录组测序^[71]和基因功能研究的基础上^[72],过量表达关键酶 PLR 成功提高了苜蓿毛状根中落叶松脂素的量^[73];过量表达丹参 JAs 合成途径中的关键酶基因 *AOC*、*AOS* 和 *JMT*,显著提高了丹参酚酸类成分的量^[74]。

2.3.2 萜类化合物 萜类化合物为异戊二烯单位的倍数的烃类及其含氧衍生物,是某些植物的精油、

树脂、色素等的主要成分,具有祛痰、止咳、祛风、发汗、镇痛等多种药理活性。因此是医药、食品、化妆品工业的重要原料。

过表达丹参 JAs 合成途径中的关键酶基因 *AOC*、*AOS* 和 *JMT*,显著提高了丹参中丹参酮 II_A 的量^[74];采用激活限速步骤的策略,显著提高了丹参毛状根中丹参酮的量^[75];过表达调节腺毛生长发育和青蒿素合成的关键基因 *TARI*,极大地提高了黄花蒿中抗疟药青蒿素的量^[76];用茉莉酸甲酯诱导基因过表达,从而提升灵芝中灵芝酸^[77]和紫花罗勒中五环三萜烯^[78]的合成量。

2.3.3 生物碱类化合物 生物碱类化合物是一类含氮且大多数呈碱性的有机化合物,具有镇痛、止喘、抗癌、抗菌消炎、抗中毒性休克等药理活性,是很重要的一类天然药物。

同时过量表达莨菪类生物碱合成的 2 个关键酶基因 *PMT* 和 *H6H*,成功提高了莨菪转基因发根中东莨菪碱的含量^[79];通过过表达芳香族氨基酸转氨酶 *ArAT4*,提高了颠茄中莨菪碱和东莨菪碱的量^[80];将可调控真核生物基因表达的非编码的 miRNA 克隆到罂粟中,提升了罂粟苯基异喹啉生物碱的量^[81]。

次生代谢工程的方法可以促进药用植物中目标产物的生物合成、降低竞争途径的代谢流或降低目标化合物的分解代谢等,使药用植物可积累更多目标药效活性化合物,从而达到定向且稳定改良药用植物品质的目的,以满足人类对天然药源日益增长的需求。从严格意义上讲,次生代谢工程属于利用生物技术改造植物,产生高产品种的范畴,因此也属于创制新品种的一种技术方法。

中药有效成分生源途径的成功解析,为开展代谢调控打下了坚实的基础。针对目前中药普遍存在的有效成分量低和含量不稳定 2 个影响中药品质的

关键问题，次生代谢工程策略可有效促进目标产物的高效合成和稳定积累，成功提高中药有效成分的含量和稳定性，保障并提升中药品质，丰富中药品质调控的技术手段和研究内涵。

利用生物技术方法对药用植物进行品质改良与提升，大大提高了药材品质，并丰富了药用植物种质资源的多样性。

3 天然药用活性成分的工业化生产

随着对药用植物需求量的剧增，野生的甚至包括人工栽培的药用植物的量已开始无法完全满足市场需求。而化学合成法又存在工艺流程复杂、成本高、合成过程中会形成同分异构体以及易造成环境污染等问题。因此，对药用植物中药效物质的生物合成途径进行研究，明确其生物合成途径及调控机

制，进而实现药效物质的大规模工业化生产以满足市场需求就显得尤为重要。

3.1 药效物质生物合成途径研究

要实现药效物质大规模工业化生产，就需要在体外构建生物合成体系，因此必须先弄清楚各药效物质在植物体内的生物合成途径。药效物质生物合成途径的研究一般采用同位素示踪和转录组分析的方法，以弄清其代谢流及各步骤关键酶和相应基因。目前已有许多重要药效物质的生物合成途径研究得比较明确，如丹参酮^[82]、花青素^[83]、龙胆苦苷^[84]、人参皂苷^[85]、青蒿素^[86]及广泛存在于药用植物中的黄酮类化合物^[87]等。药用植物几类重要次生代谢产物的主要生源合成途径见图1。药效物质生物合成途径的研究为药效物质工业化生产提供了理论背景和技术支持。

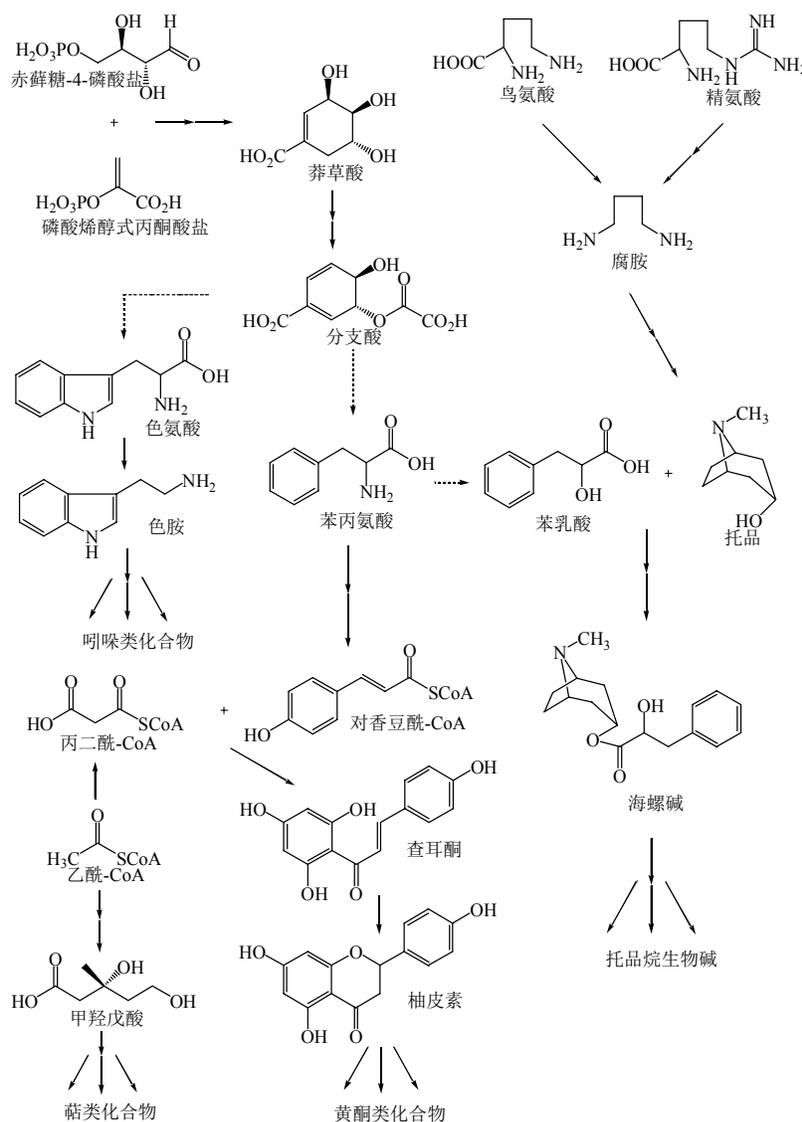


图1 植物主要次生代谢产物的生物合成途径简图

Fig. 1 Biosynthesis pathway of principal secondary metabolic products for plants

3.2 合成生物学

自通过化学合成法成功合成了人类历史上首个完整的细菌染色体 *mycoplasmamycoides*, 并成功转移到去除原基因组的山羊支原体细胞内以来^[88], 合成生物学受到了前所未有的关注。2010 年, *Nature* 和 *Cell* 同时为合成生物学创建 10 周年发表了专题社论^[89-90]。

天然药物合成生物学是在以基因组解析技术和化学合成技术为核心的现代生物技术基础上, 结合工程学和系统生物学, 并综合分子生物学、生物信息学、药物化学、药物合成、药物分析、药理学等多种学科, 建立起来的以规模化 and 程序化制备天然药物为目的的集成学科^[91]。其最终目标是简化复杂的自然生物系统, 完成自我繁殖, 并稳定表现特定功能的人工生命体。

天然药物合成生物学包括两大部分: 一是通过基因工程, 将天然药物生物合成相关途径酶基因导

入大肠杆菌、酵母以及模式植物等底盘细胞中, 重构 1 条天然药物的生物合成途径, 建成能制备天然药物的“细胞工厂”, 这是最成熟, 应用得最多的方法。二是模仿天然药物的生物合成途径, 按人们的意愿设计 1 条全新的多基因控制的药物合成途径, 然后利用这条代谢途径制备出结构优化、产量丰富的天然药物。这种方法是一种新兴的生物技术, 一般是用去除了自身基因组的不完整的细胞作为容器, 添加人为设计的代谢途径来合成目标产物, 因此也称之为“无细胞合成生物学”。相对普通合成生物学, 无细胞合成生物学在底物添加、产物移除、取样和检测、代谢调控等方面具有优势。且因没有细胞自身基因组, 所以不会出现不需要的代谢调控, 原料利用率更高, 产物更容易纯化^[92], 因此无细胞合成生物学很可能成为今后合成生物学发展的主流方向。近几年来天然药物合成生物学研究取得的部分成果见表 4。

表 4 天然药物合成生物学部分研究成果

Table 4 Publications of synthetic biology in natural medicine

产物	底盘细胞	原料	最高产量/(mg·L ⁻¹)	文献
白藜芦醇	酵母菌	香豆酸	391	93
	酵母菌	苯丙氨酸	0.31	94
	大肠杆菌	酪氨酸/香豆酸	25.8	95
次丹参酮二烯	酵母菌	法尼基焦磷酸	488	96
丹参酮二烯	酵母菌	葡萄糖	365	97
丹参素	大肠杆菌	葡萄糖	7 100	98
槲皮黄酮	酵母菌	苯丙氨酸	0.38	94
咖啡酸	大肠杆菌	葡萄糖/木糖	106	99
弥罗松酚	酵母菌	法尼基焦磷酸	10.5	100
青蒿酸	酵母菌	葡萄糖/乙醇	25 000	101
齐墩果酸	酵母菌	葡萄糖	165.7	102
染料木黄酮	酵母菌	苯丙氨酸	7.7	94
山柰酚	酵母菌	苯丙氨酸	4.6	94
圣草酚	大肠杆菌	酪氨酸	107	103
柚皮素	酵母菌	苯丙氨酸	15.6	94
	酵母菌	苯丙氨酸	8.9	104
	酵母菌	葡萄糖	108.9	105
原人参二醇	大肠杆菌	葡萄糖	84	106
	酵母菌	角鲨烯/氧角鲨烯	1 189	107
紫衫二烯	大肠杆菌	异戊烯焦磷酸	1 020	108
左旋多巴	弗氏柠檬酸杆菌和草生欧文菌	酪氨酸	112	109
	大肠杆菌	葡萄糖	1 510	110
左旋海松二烯	大肠杆菌	葡萄糖/甘油	700	111

虽然在全世界范围内合成生物学研究已取得较大进展,且应用前景可观。但与国外相比,我国在合成生物学方面的研究还基本处于起步阶段。因此需要国家加大投入,建立国家级合成生物研究中心,大力加强合成生物学基础研究,自主创新,跟上国际科研新潮流的步伐。

3.3 植物生物反应器

生物反应器是利用酶或生物体所具有的生物功能,在体外进行生化反应的装置系统,它是一种生物功能模拟机。植物生物反应器指通过基因工程途径,以常见的植物植株或植物细胞作为“工厂”,通过大规模种植或培养,生产医用蛋白、疫苗、特殊化合物材料及其他有各种效用的次生代谢物等具有高经济附加值的生物制剂的系统。

在中国红豆杉细胞中过表达 *TcWRKY1* 转录因子,并用微量酒精诱导后,转基因细胞系内紫杉醇的量提高了约 2.7 倍^[112]。对长春花由毛状根诱导同时超表达 *ORCA3* 和 *GIOH* 基因的再生植株,结果与对照相比,萜类吲哚生物碱的量明显增加^[113]。这也属于次生代谢工程的范畴。

对于植物细胞培养发酵而言,由于植物细胞培养过程中生长缓慢,因此有效成分的量较低。且植物细胞对机械剪切力较为敏感,生长条件、控制因素较为复杂,对生物反应器装置要求较高,成本较大,因此束缚了大规模的商业化发展。

药效物质工业化生产技术的应用可极大提高药效物质生产效率,有效缓解各种药效物质市场供应的压力。

4 前景与展望

以现代生命科学为基础发展起来的生物技术在药用植物研究与开发中的应用,丰富了其在传统学科研究中的内容,同时也赋予了研究新的内容,推动了基础性研究的发展,为其研究和发 展提供了机遇和手段,对实现资源保护和可持续利用以及品质改良与提升等具有重要意义。同时也展现了药用植物的巨大经济潜力和发展前景。

生物技术的发展必将为药用植物的研究应用到巨大的推动作用,并最终实现中药现代化,也将为推动这一中华文化瑰宝走向世界作出不可磨灭的贡献。相信不久的将来,中药会被全世界所认同和接受。

参考文献

[1] 徐荣,陈君. DNA 分子标记在药用植物种质资源研究中的应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化,

2006, 8(5): 58-62.

- [2] Lin T C, Yeh M S, Cheng Y M, et al. Using ITS2 PCR-RFLP to generate molecular markers for authentication of *Sophora flavescens* Ait. [J]. *J Sci Food Agric*, 2012, 92(4): 892-898.
- [3] 纪宝玉,裴莉昕,陈随清,等. 野葛种质资源的随机扩增多态性 DNA 技术分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 56-59.
- [4] 郝岗平,孙立彦,史仁玖,等. 山东产丹参遗传多样性的扩增片段长度多态性指纹分析 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 51-53.
- [5] 潘清平,周日宝,陈玉秀,等. 玉竹不同品种的 ISSR 分子鉴定 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(10): 28-30.
- [6] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e8613.
- [7] 刘美子,宋经元,罗 锬,等. DNA 条形码序列对 9 种蒿属药用植物的鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1393-1397.
- [8] 崔志伟,王康才,郑 晖,等. DNA 条形码序列对不同品种金银花的鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 43-45.
- [9] 李 楝,肖 憬,苏振宇,等. ITS2 条形码序列对茜草科藜药植物的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 43(13): 1814-1818.
- [10] 白 玉. DNA 分子标记技术及其应用 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(24): 7422-7424.
- [11] Chen X C, Liao B S, Song J Y, et al. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding [J]. *Gene*, 2013, 530(1): 39-43.
- [12] 刘月梅,白小安. 生物技术在药用植物育种和种质资源保存中的应用 [J]. 宁夏农林科技, 2008(1): 58-59.
- [13] 郑志仁,朱建华,李新国,等. 铁皮石斛的离体培养和快速繁殖 [J]. 上海农业学报, 2008, 24(1): 19-23.
- [14] 张 俊,蒋桂华,敬小莉,等. 我国药用植物种质资源离体保存研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(3): 556-560.
- [15] 付传明,黄宁珍,唐凤鸾,等. 山银花的组培快繁和种质离体保存研究 [J]. 广西科学, 2008, 15(3): 304-308.
- [16] 王跃华,林抗雪,刘益丽,等. 药用植物种质资源超低温保存研究 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2010, 29(4): 281-284.
- [17] 李亚璞,张小兵,闫静辉. 西洋参悬浮细胞的超低温保存研究 [J]. 河北省科学院学报, 2011, 28(4): 32-35.
- [18] 赵喜亭,王 苗,邵换娟,等. 山药种质包埋玻璃化超低温保存再生植株的稳定性分析 [J]. 华北农学报, 2012, 27(1): 234-238.
- [19] Mallon R, Bunn E, Turner S R, et al. Cryopreservation of *Centaurea ultriae* (Compositae) a critically endangered species from Galicia (Spain) [J]. *Cryo Lett*, 2008, 29(5): 363-370.

- [20] 吴 昉, 张 琳, 林 田, 等. 超低温保存植物种质资源的新途径——小滴玻璃化法 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(5): 511-517.
- [21] 张明生, 彭斯文, 杨小蕊, 等. 杜鹃兰人工种子技术研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1894-1897.
- [22] 汪福源, 唐 宁, 贾爱玲. 白术人工种子制作技术研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2): 731-732.
- [23] 曾颖苹, 朱乾坤, 王万军. 铁皮石斛人工种子包衣技术研究 [J]. 北方园艺, 2012(17): 155-158.
- [24] 庞红霞, 祝长青, 覃建兵. 新疆雪莲植株再生体系研究初探 [J]. 生物技术通报, 2009, S1(增刊): 215-218.
- [25] 覃建兵, 庞红霞, 祝长青. 植物激素对新疆雪莲愈伤组织诱导和分化的影响 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2009, 43(4): 633-637.
- [26] 袁永娟, 王晓军, 郝秀英, 等. 新疆雪莲胚性愈伤组织的诱导及原生质体分离 [J]. 北方园艺, 2010(8): 125-128.
- [27] Li M R, Li H Q, Hu X Y, *et al.* Genetic transformation and overexpression of a rice *Hd3* a induces early flowering in *Saussurea involucreata* Kar. et Kir. ex Maxim. [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2011, 106(3): 363-371.
- [28] 赵红艳, 江丽丽, 马 淼. 濒危药用植物天山雪莲高效植株再生体系的建立 [J]. 种子, 2012, 31(4): 1-3.
- [29] 韦善君, 武运芳, 杨 林, 等. 新疆雪莲叶片高效再生植株体系的建立 [J]. 北方园艺, 2014(5): 98-103.
- [30] 徐春明, 王英英, 庞高阳, 等. 药用植物干细胞培养技术及其应用 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2940-2945.
- [31] 杨 智, 陈春伶, 徐美隆. 超低温处理植物脱毒研究进展 [J]. 北方园艺, 2013(12): 184-187.
- [32] Wei T, Zhang C, Hong J, *et al.* Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO [EB/OL]. doi: 10.1371/journal.ppat.1000962, 2010.
- [33] 李 恒, 黎尼平, 缪兆瑞, 等. 常见药用植物脱病毒技术的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(12): 3530-3532, 3572.
- [34] 罗福利. 植物脱病毒技术 [J]. 农技服务, 2012, 29(4): 427-428.
- [35] 高慧卿, 樊兰瑛, 王秀红, 等. 茎尖培养及热处理技术在百合脱毒中的应用研究 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2010, 30(6): 529-532.
- [36] 韦坤华, 李林轩, 繆剑华, 等. 姜的脱毒方法比较与繁殖生根同步化培养技术研究 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(18): 4522-4525.
- [37] Maliogka V I, Skiada F G, Eleftheriou E P, *et al.* Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining *in vitro* thermotherapy with shoot tip culture [J]. *Sci Hortic*, 2009, 123(2): 280-282.
- [38] Ramgareeb S, Snyman S J, van Antwerpen T, *et al.* Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. euhivar NCo376) using apical meristem culture [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2010, 100: 175-181.
- [39] Thomson A D. Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from virus Y [J]. *Nature*, 1956, 177(4511): 709.
- [40] 许传俊, 黄珺梅, 曾碧玉, 等. 植物组织培养脱毒技术研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(3): 1318-1320.
- [41] Wang Q C, Liu Y, Xie Y H, *et al.* Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PUV) and potato virus Y (PVY) [J]. *Potato Res*, 2006, 49: 119-129.
- [42] Wang Q C, Wilmer J C, Minna-Liisa R, *et al.* Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips [J]. *Mole Plant Pathol*, 2008, 9(2): 237-250.
- [43] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 超低温保存法去除马铃薯 x 病毒和马铃薯纺锤块茎类病毒 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 605-611.
- [44] Hull R. *Matthews' Plant Virology* [M]. Fourth Edition. San Dicgo: Academic Press, 2004.
- [45] 李晓秋, 宋宗宇. 基于植物新品种保护视角的药用野生植物资源的永续利用 [J]. 社会科学家, 2006(6): 111-114.
- [46] Shi F H, Sui C, Yang C M, *et al.* Development of a stable male-sterile line and its utilization in high yield hybrid of *Platycodon grandiflora* [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(15): 3488-3499.
- [47] 王 晨, 李 佳, 张永清. 丹参种质资源与优良品种选育研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(4): 37-42.
- [48] 华国栋, 郭兰萍, 黄璐琦, 等. 药用植物品种选育的特殊性及其对策措施 [J]. 资源科学, 2008, 30(5): 754-758.
- [49] 武振华, 张 红, 王新宇, 等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照紫苏干种子当代效应 [J]. 原子核物理评论, 2010, 27(3): 336-339.
- [50] 孔四新, 崔旭盛, 李海奎. 药用植物太空育种研究进展 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(6): 273-278.
- [51] 李 焘, 林文媛, 王喆之. 菘蓝花药培养及单倍体的诱导 [J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(2): 225-228.
- [52] 刘露颖, 赵喜亭, 李明军. 秋水仙碱诱导药用植物多倍体的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 178-181.
- [53] Wu Y X, Yang F H, Zhao X M, *et al.* Identification of tetraploid mutants of *Platycodon randiflo* by colchicine induction [J]. *Caryologia*, 2011, 64(3): 343-349.
- [54] 王惠利, 赵晓明. 金银花多倍体诱变及早期形态鉴定 [J]. 山西农业科学, 2012, 40(12): 1240-1242.
- [55] 王建军. 怀地黄四倍体诱导及生物学特性研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2012.

- [56] Sarathum S, Hegele M, Tantivivat S, *et al.* Effect of concentration and duration of colchicine treatment oil polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. [J]. *Eur J Hort Sci*, 2010, 75(3): 123-127.
- [57] Nilanthi D, Chen X L, Zhao F C, *et al.* Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L. [J/OL]. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 2009: 343485.
- [58] 杜艳伟, 阎晓光, 赵晋锋. 药用植物多倍体育种的研究进展 [J]. *生物技术进展*, 2011, 1(4): 249-253.
- [59] 薛菲, 孙春玉, 蒋世翠, 等. 植物转基因技术及其应用 [Z]. *专家论坛*, 2013: 39-41.
- [60] Xiao Y, Zhang L, Gao S H, *et al.* The *c4h*, *tat*, *hpr* and *hpd* genes prompted engineering of rosmarinic acid biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29713.
- [61] 关慧. 根瘤农杆菌介导 NPR1 基因对诸葛菜和菘蓝的遗传转化 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [62] 帅凌飞. 黄芩体内 H₂O₂ 清除系统和黄酮类活性成分积累的相关性及农杆菌介导 DHAR 基因转化黄芩愈伤组织的研究 [D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
- [63] Sharafi A, Sohi H H, Mirzaee H, *et al.* *In vitro* regeneration and *Agrobacterium* mediated genetic transformation of *Artemisia aucheri* Boiss [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2014, 20(4): 487-494.
- [64] 唐巧玲, 王旭静, 王志兴. 基因枪介导的大蒜遗传转化体系的建立 [J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(3): 576-581.
- [65] 李志亮, 杨清, 叶嘉, 等. 利用 P5CS 基因转化白三叶的研究 [J]. *生物技术通报*, 2012(5): 61-65.
- [66] 洗康华. 铁皮石斛生殖特性及花粉管介导的转基因研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2014.
- [67] 陈宇杰, 黄凤兰, 狄建军, 等. 花粉管通道法转化蓖麻的研究 [J]. *华北农学报*, 2013, 28(5): 124-127.
- [68] Ye X, Al-Babili S, Klöti A, *et al.* Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm [J]. *Science*, 2000, 287(5451): 303-305.
- [69] Länneppää M. Heterologous expression of *AtMYB12* in *kale* (*Brassica oleracea* var. *acephala*) leads to high flavonol accumulation [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(8): 1377-1388.
- [70] Colling J, Groenewald J H, Makunga N P. Genetic alterations for increased coumarin production lead to metabolic changes in the medicinally important *Pelargonium sidoides* DC (Geraniaceae) [J]. *Metab Eng*, 2010, 12(6): 561-572.
- [71] Chen J, Dong X, Zhang L, *et al.* Biosynthesis of the active compounds of *Isatis indigotica* based on transcriptome sequencing and metabolites profiling [J]. *BMC Genomics*, 2013, doi: 10.1186/1471-2164-14-857.
- [72] Li Q, Chen J, Zhang L, *et al.* The dirigent multigene family in *Isatis indigotica*: gene discovery and differential transcript abundance [J]. *BMC Genomics*, 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-388.
- [73] Xiao Y, Ji Q, Zhang L, *et al.* Combined transcriptome and metabolite profiling reveals that *liPLR1* plays an important role in lariciresinol accumulation in *Isatis indigotica* [J]. *J Exp Bot*, 2015, doi: 10.1093/jxb/erv333.
- [74] Gu X C, Chen J F, Chen W S, *et al.* Overexpression of allene oxide cyclase promoted tanshinone/phenolic acids production in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(12): 2247-2259.
- [75] Kai G Y, Xu H, Zhou C C, *et al.* Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Metab Eng*, 2011, 13(3): 319-327.
- [76] Tan H, Xiao L, Zhang L, *et al.* Trichome and artemisinin regulator 1 is required for trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Mol Plant*, 2015, doi: 10.1016/j.molp.2015.04.002.
- [77] Ren A, Li M J, Shi L, *et al.* Profiling and quantifying differential gene transcription provide insights into ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum* in response to methyl jasmonate [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65027.
- [78] Misra R C, Maiti P, Chanotiya C S, *et al.* Methyl jasmonate-elicited transcriptional responses and pentacyclic triterpene biosynthesis in sweet basil [J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(2): 1028-1044.
- [79] Zhang L, Ding R, Chai Y, *et al.* Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 6786-6791.
- [80] Bedewitz M A, Góngora-Castillo E, Uebler J B, *et al.* A root-expressed *L*-phenylalanine: 4-hydroxyphenylpyruvate aminotransferase is required for tropane alkaloid biosynthesis in *Atropa belladonna* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(9): 3745-3762.
- [81] Boke H, Ozhuner E, Turktas M, *et al.* Regulation of the alkaloid biosynthesis by miRNA in *Opium poppy* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(3): 409-420.
- [82] Di P, Zhang L, Chen J, *et al.* ¹³C tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(7): 1537-1548.
- [83] 彭玉帅, 王如峰, 张陆军. 花青素生物合成的关键酶及其调控因子 [J]. *中草药*, 2014, 45(1): 131-136.
- [84] 王彩云, 张晓东, 沈涛, 等. 龙胆苦苷生物合成途径研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(3): 4-9.
- [85] 于丽莉, 张关萍, 王康宇, 等. 人参皂苷生物合成调控的研究进展 [J]. *吉林农业*, 2014(3): 25-27.
- [86] Brown G D. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao) [J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 7603-7698.
- [87] Schijlen E G, Ric de Vos C H, van Tunen A J, *et al.* Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants [J].

- Phytochemistry*, 2004, 65(19): 2631-2648.
- [88] Gibson D G, Glass J I, Lartigue C, *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome [J]. *Science*, 2010, 329(5987): 52-56.
- [89] Ten years of synergy [J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 269-270.
- [90] Kruger R P. Synthetic biology select [J]. *Cell*, 2010, 140(1): 5-7.
- [91] 孔建强, 王伟, 程克棣, 等. 青蒿素的合成生物学研究进展 [J]. *药学报*, 2013, 48(2): 193-205.
- [92] Harris D C, Jewett M C. Cell-free biology: exploiting the interface between synthetic biology and synthetic chemistry [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(5): 672-678.
- [93] Sydor T, Schaffer S, Boles E. Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(10): 3361-3363.
- [94] Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metab Eng*, 2009, 11(6): 355-366.
- [95] 汪建峰, 张嗣良, 王勇. 大肠杆菌中从头合成白藜芦醇途径的设计及优化 [J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(2): 71-77.
- [96] Dai Z B, Liu Y, Huang L Q, *et al.* Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(11): 2845-2853.
- [97] Zhou Y J, Gao W, Rong Q, *et al.* Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(6): 3234-3241.
- [98] Yao Y F, Wang C S, Qiao J, *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway [J]. *Metab Eng*, 2013, 19: 79-87.
- [99] Zhang H, Stephanopoulos G. Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(8): 3333-3341.
- [100] 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 [J]. *PNAS*, 2013, 110(29): 12108-12113.
- [101] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, *et al.* High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [102] 王冬, 王贝贝, 刘怡, 等. 齐墩果酸酵母细胞工厂的合成途径与发酵工艺优化 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(14): 2640-2645.
- [103] Zhu S, Wu J, Du G, *et al.* Efficient synthesis of eriodictyol from L-tyrosine in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(10): 3072-3080.
- [104] Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metab Eng*, 2009, 11(6): 355-366.
- [105] Koopman F, Beekwilder J, Crimi B, *et al.* De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microb Cell Fact*, 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-155.
- [106] Santos C N, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose [J]. *Metab Eng*, 2011, 13(4): 392-400.
- [107] Dai Z B, Liu Y, Huang L Q, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides [J]. *Metab Eng*, 2013, 20: 146-156.
- [108] Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E, *et al.* Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70-74.
- [109] Kurt A G, Aytan E, Ozer U, *et al.* Production of L-DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the *Vitreoscilla* hemoglobin gene [J]. *Biotechnol J*, 2009, 4(7): 1077-1088.
- [110] Muñoz A J, Hernández-Chávez G, de Anda R, *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) synthesis from glucose [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38(11): 1845-1852.
- [111] Leonard E, Ajikumar P K, Thayer K, *et al.* Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control [J]. *PNAS*, 2010, 107(31): 13654-13659.
- [112] Li S T, Zhang P, Zhang M, *et al.* Functional analysis of a WRKY transcription factor involved in transcriptional activation of DBAT gene in *Taxus chinensis* [J]. *Plant Biol*, 2013, 15(1): 19-26.
- [113] 龚一富, 王何瑜, 卢鹏, 等. 长春花毛状根再生植株的获得及抗癌生物碱的产生 [J]. *中草药*, 2012, 43(4): 788-794.