

西红花中类胡萝卜素生物合成途径研究进展

陈祥慧, 谭何新, 张磊*

第二军医大学药学院 药用植物学教研室, 上海 200433

摘要:以西红花苷为代表的脱辅基类胡萝卜素类化合物是传统中药西红花 *Crocus sativus* 的主要药效成分, 具有广泛的抗氧化、抗炎、抗粥样动脉硬化、抗癌、抗抑郁等药理活性。西红花中类胡萝卜素的生物合成途径包括以甲羟戊酸起始合成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸至玉米黄质的传统上游路径, 以及裂解玉米黄质特异性合成西红花酸及西红花苷的下游途径。对近年来西红花中类胡萝卜素代谢途径相关关键酶基因的研究现状进行综述, 为进一步解析合成西红花苷等类胡萝卜素衍生物的下游途径指明方向, 更为后续采用代谢工程的手段提高西红花苷等药效物质产量提供理论依据。

关键词: 西红花; 类胡萝卜素; 生物合成; 酶; 西红花酸; 西红花苷

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)19-4702-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.034

Research progress on biosynthetic pathway of apo-carotenoids in *Crocus sativus*

CHEN Xiang-hui, TAN He-xin, ZHANG Lei

Department of Pharmaceutical Botany, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: The apo-carotenoid compounds represented by crocins are the main medicinal components of *Crocus sativus*, which have extensive anti-oxidation, anti-inflammatory, anti-atherosclerosis, anticancer, antidepressant, and other pharmacological activities. Biosynthetic pathways of apo-carotenoids in *C. sativus* include the traditional upstream route of the synthesis of geranylgeranyl pyrophosphate to zeaxanthin starting from mevalonate, and downstream pathway for the specific synthesis of crocetin and crocin by cleavage of zeaxanthin. This article reviews the recent research of key enzymes involved in the metabolism of apo-carotenoids in *C. sativus*, which facilitates further analysis of downstream pathways for the synthesis of apo-carotenoid derivatives such as crocin, and further provides a theoretical basis for the use of metabolic engineering methods to increase the production of crocins and other pharmacodynamic substances.

Key words: *Crocus sativus* L.; apo-carotenoids; biosynthetic pathway; enzyme; crocetin; crocin

西红花 *Crocus sativus* L. 是鸢尾科番红花属球茎类草本植物, 原产自南欧各国及伊朗等地, 后从印度经我国西藏传入内地, 成功引种栽培, 故又名番红花或藏红花^[1]。西红花的入药部位是干燥的三分叉柱头, 其具有良好的活血化瘀、解郁安神、凉血解毒等功效, 作为名贵的妇科良药, 用于产后瘀阻、经闭癥瘕、忧郁痞闷、惊悸发狂^[2]; 同时因其亮丽的颜色而普遍应用于食品染色和化妆品行业, 也可作为丝绸和羊毛的高级染料^[3]。其水溶液具有浓郁的香味, 是一种极其昂贵的香料^[4-5]。现代药理学研究发现, 西红花具有广泛的治疗心血管疾病及预防动脉粥样硬化^[6]、治疗慢性病毒性肝炎及

肝硬化^[7-8]、抗癌^[9-12]、抗抑郁和焦虑、抗氧化^[13]等诸多疗效。其主要发挥药效的物质基础是类胡萝卜素及其糖苷类衍生物, 包括藏红花苦素(picrocrocin, 1)、藏花醛(safranal, 2)、西红花酸(crocetin, 3)和西红花苷1~5(crocin 1~5, 4~8), 结构见图1。特别是藏花醛和西红花糖苷对癌细胞生长具有较强的细胞毒活性, 可作为癌症治疗潜在的靶标分子^[3,14-16]。可见类胡萝卜素类化合物含量高低成为影响西红花饮片品质的重要因素。

目前, 对西红花中类胡萝卜素代谢途径的研究已取得一定的进展, 一些相关酶基因已被克隆并进行了功能研究。随着对类胡萝卜素代谢途径以及调

收稿日期: 2018-06-05

基金项目: 上海市科学技术委员会基金(15391900500, 14QB1402700); 中国人民解放军第二军医大学2017年优秀硕士研究生苗子培育基金

作者简介: 陈祥慧, 硕士研究生, 研究方向为中药西红花品质调控。E-mail: 15821608915@163.com

*通信作者 张磊, 博士, 教授, 研究方向为基于药效物质的中药品质调控。E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

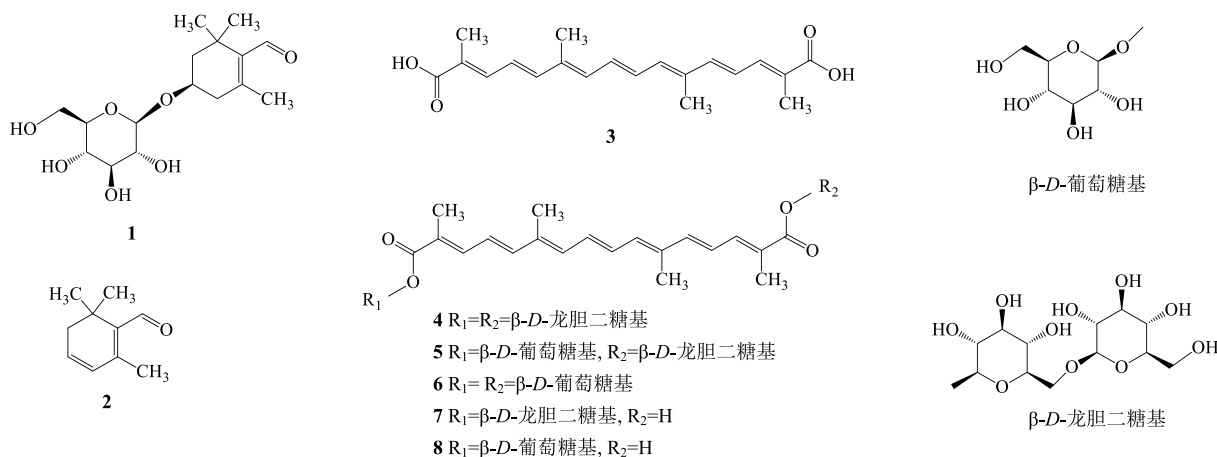


图 1 西红花中药效活性物质基础

Fig. 1 Active substance basis in *C. sativus*

控机制的深入研究,以基因工程技术为基础的代谢工程将成为提高目标化合物含量的有效手段之一。因此,本文对近年来在西红花中类胡萝卜素类化合物生物合成代谢通路的研究进展进行综述,为利用西红花胡萝卜素类化合物生物合成途径相关酶进行代谢工程研究奠定基础。

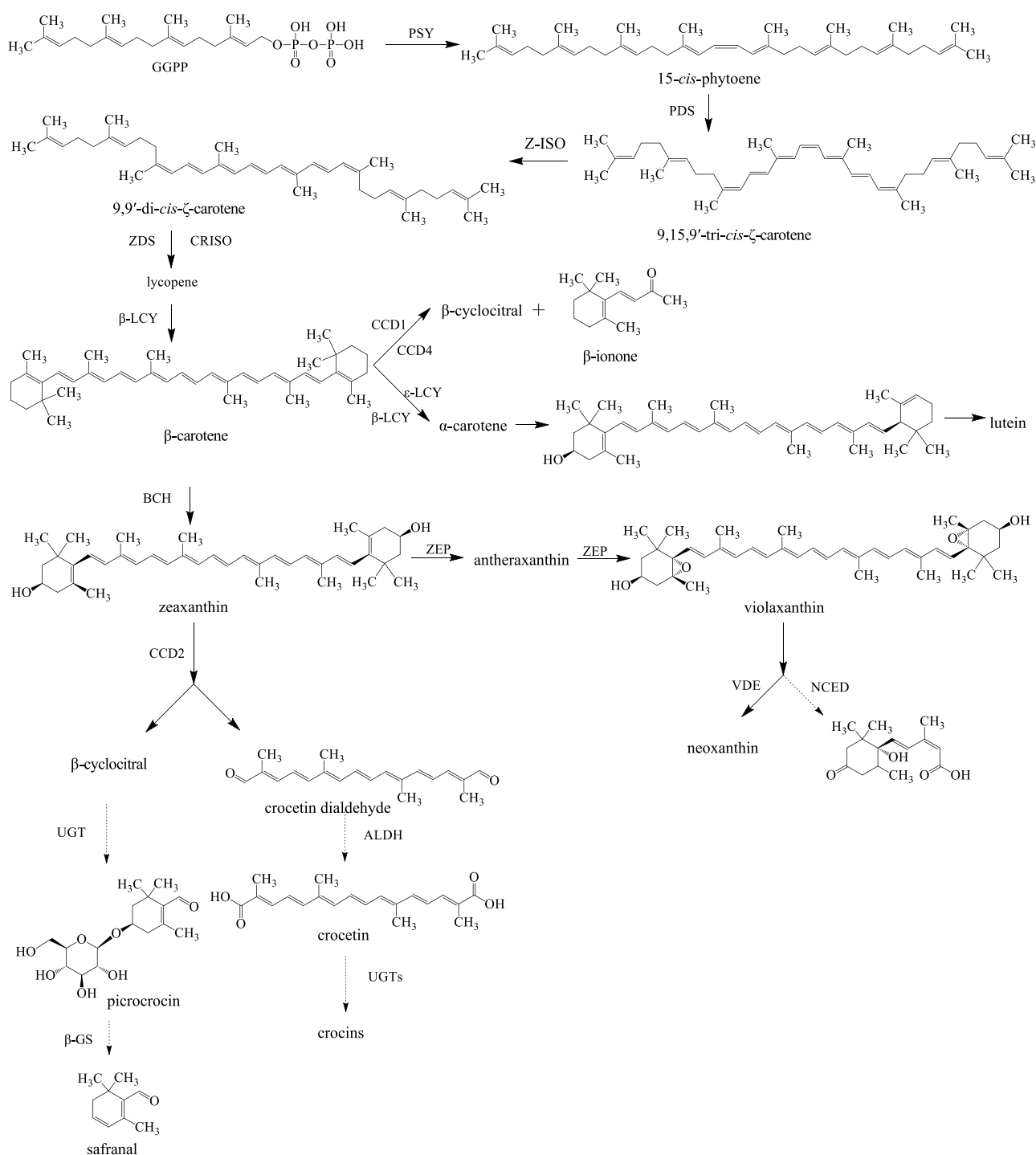
1 西红花中类胡萝卜素的生物合成

西红花中的类胡萝卜素属于萜类化合物,通过类异戊二烯化合物合成途径合成。综合前人研究,推测西红花中的类胡萝卜素完整的合成途径见图2。类胡萝卜素合成起始于由3个乙酰辅酶A分子缩合成的3-甲基-3,5-二甲基戊酸(mevalonate, MVA),经一系列酶的作用生成异戊二烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)^[17]。质体中,IPP在异戊二烯焦磷酸异构酶(IPP isomerase, IPPI)的催化下异构化成甲叉双丙烯焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP),后经牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)作用,依次与3个IPP分子缩合生成牻牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)、法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)和含20个碳原子的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)。生成的GGPP是西红花苷等二萜类(C₂₀)及番茄红素等四萜类(C₄₀)化合物合成的直接前体^[18]。

核心类胡萝卜素生物合成途径由2分子GGPP经过八氢番茄红素合酶(phytoene synthase, PSY)催化缩合形成由40个碳原子组成的线性15-顺式-八氢番茄红素(15-*cis*-phytoene)^[19]。然后经过植

物中的八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)和 ζ -胡萝卜素脱氢酶(ζ -carotene desaturase, ZDS)氧化形成番茄红素(lycopene)^[20]。而番茄红素在15-顺式- ζ -胡萝卜素异构酶(15-*cis*- ζ -carotene isomerase, Z-ISO)^[21]和类胡萝卜素异构酶(carotenoid isomerase, CRISO)^[22]2个顺反异构酶的作用下,由多顺式构型的八氢番茄红素转化为全反式番茄红素。番茄红素是该途径的一个分支点,经过酶作用转化成不同种类的 β -型或 ϵ -型胡萝卜素化合物骨架,如经过番茄红素 ϵ -环化酶(lycopene ϵ -cyclase, ϵ -LCY)和番茄红素 β -环化酶(lycopene β -cyclase, β -LCY)的共同作用形成 α -胡萝卜素(α -carotene),进一步被修饰酶 β -胡萝卜素羟化酶(β -carotene hydroxylase, BCH)/ ϵ -羟化酶(ϵ -hydroxylase)修饰分别生成玉米黄质(zeaxanthin)和叶黄素(lutein);或在 β -LCY单独作用下转化为 β -胡萝卜素(β -carotene)^[23],后经BCH作用下羟基化最终生成玉米黄质。

而玉米黄质作为西红花苷生物合成的重要前体物质,引领西红花酸及糖苷衍生物进一步的生物合成。主路中玉米黄质通过类胡萝卜素裂解双加氧酶(carotenoid cleavage dioxygenase, CCD)氧化裂解成 β -环柠檬醛(β -cyclocitral)和西红花二醛(crocetin dialdehyde),经过醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)和UDP-葡萄糖基转移酶(UDP-glucosyltransferases, UGT)催化的数步反应,可得到西红花中的药效物质脱辅基类胡萝卜素化合物(藏红花苦素、西红花酸和西红花苷)^[18]。最后,藏红花苦素经过温度和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase,



GGPP-牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸 PSY-八氢番茄红素合酶 PDS-八氢番茄红素脱氢酶 Z-ISO-15-顺式- ζ -胡萝卜素异构酶 ZDS- ζ -胡萝卜素脱氢酶 CRISO-类胡萝卜素异构酶 β -LCY-番茄红素 β -环化酶 CCD-类胡萝卜素裂解双加氧酶 ϵ -LCY-番茄红素 ϵ -环化酶 BCH- β -胡萝卜素羟化酶 ZEP-玉米黄素环氧化酶 UGT-UDP-葡萄糖基转移酶 ALDH-醛脱氢酶 β -GS- β -葡萄糖苷酶 VDE-紫黄质脱环氧化酶 NECD-9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶; 虚线表示推测的路径, 实线表示已确定的路径

GGPP-geranylgeranyl diphosphate synthase PSY-phytoene synthase PDS-phytoene desaturase Z-ISO-15-*cis*- ζ -carotene isomerase ZDS- ζ -carotene desaturase CRISO-carotenoid isomerase β -LCY-lycopene β -cyclase CCD-carotenoid cleavage dioxygenase ϵ -LCY-lycopene ϵ -cyclase BCH- β -carotene hydroxylase ZEP-zeaxanthin epoxidase UGT-UDP-glucosyltransferases ALDH-aldehyde dehydrogenase β -GS- β -glucosidase VDE-violaxanthin de-epoxidase NECD-9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase; The dotted line indicates the putative pathway, the solid line means the pathway that has been confirmed

图2 西红花中类胡萝卜素生物合成途径

Fig. 2 Apo-carotenoids biosynthetic pathway in *C. sativus*

β -GS) 的联合作用转化成藏花醛。而支路中玉米黄质经玉米黄质环氧化酶 (zeaxanthin epoxidase, ZEP) 和紫黄质脱环氧化酶 (violaxanthin de-epoxidase, VDE) 作用, 转化为紫黄质 (violaxanthin) 和环氧玉米黄质 (epoxy-zeaxanthin), 紫黄质由新黄质合成酶 (neoxanthin synthase, NSY) 催化转化成 9-顺式-新黄质 (9-*cis*-neoxanthin) [17]。而 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 (9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED) 裂解新黄质和紫黄质以形成脱落酸 (abscisic acid, ABA) [18]。

2 西红柿类胡萝卜素合成途径关键酶

随着越来越多的西红柿组学数据的报道[17-18,24], 西红柿中类胡萝卜素生物合成途径中关键酶基因的解析、克隆和调控逐渐成为研究热点, 西红柿中已克隆的与类胡萝卜素生物合成相关酶基因见表 1。调控这些基因的表达能直接影响西红柿中类胡萝卜素的代谢水平, 进而影响西红柿饮片的内在品质。

表 1 西红柿中已克隆的与类胡萝卜素生物合成相关酶基因
Table 1 Enzymic genes related to apo-carotenoids biosynthesis in *C. sativus*

酶基因类型	名称	基因登录号	长度/bp
β -LCY ^[25]	LcyB1	GQ202143	1 491
	LcyB2	GQ202141	1 538
BCH ^[26]	BCH1	CAC95130	1 461
	BCH2	AAT84408	891
CCD ^[27-28]	CCD2	KJ541749	1 689
	CCD1a	AJ416712	657
	CCD1b	AJ416713	557
	CCD4	AJ416714	630
NCEDs ^[29]	NCED	ACD44928	1 833
UGTase ^[30]	UGTCs2	AY262037	1 383
	UGTCs3	AY290820	1 425

2.1 β -LCY 和 ϵ -LCY

类胡萝卜素生物合成的重要分支点发生在番茄红素的环化。化学结构为线性的番茄红素两端经 β -LCY 的作用, 形成具有 2 个 β 环的维生素 A 的前体 β -胡萝卜素分子[31-33]。另外, 在 β -LCY 和 ϵ -LCY 共同作用下, 催化生成具有 1 个 β 环和 1 个 ϵ 环的 α -胡萝卜素。 β -LCY 和 ϵ -LCY 是相似度极高的基因编码产物, 但 ϵ -LCY 仅在番茄红素上添加 1 个 ϵ 环, 而 β -LCY 可添加 2 个 β 环。具有 2 个 ϵ 环的类胡萝卜素在植物中并不常见, 唯一例外是生菜 *Lactuca*

sativa L. var. *ramosa* Hort., 其 ϵ -环化酶催化生成双环的 ϵ -胡萝卜素[23]。生菜的 ϵ - 和 β -环化酶在序列上与蓝藻 *Cyanobacteria* β -环化酶类似, 并且这些环化酶与另一类类胡萝卜素环化酶相关, 包括质体定位的番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill.[34]和柑橘属 *Citrus* L. 植物[35]中的 β -环化酶, 来自辣椒 *Capsicum annuum* L. 的辣椒红素-辣椒素合酶 (CCS) [36]及来自马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 的新黄质合成酶 (NSY) [37]。

目前在西红柿中鉴定到 2 种形式的 β -LCY 基因, 即 LcyB1 和 LcyB2[38]。其氨基酸序列具有高度相似性, 同源性可达 47%, 与来自葡萄 *Vitis vinifera* L.、柑橘和番茄中的 β -环化酶基因有超过 70% 的相似度。含 LcyB2 基因的质粒转入产番茄红素的大肠杆菌中证实有 β -胡萝卜素的合成, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 中过表达 LcyB2 基因能导致其 β -胡萝卜素含量增加, 同时引起叶黄素含量的增加, 说明西红柿 LcyB2 酶在番茄红素环化反应过程中发挥关键作用。西红柿 LcyB2 基因在花柱中特异性表达, 同时 LcyB2 基因表达量的上调与西红柿柱头中 β -胡萝卜素含量积累保持一致[39-40]。

近年来, 关于 LcyB 基因的报道主要集中在富含胡萝卜素的果实中, 其在质体中特异性表达, 如来自番茄的 LcyB 基因在果实和花瓣中瞬时表达, 而根、茎和叶中无法检测到[32]。橘子中的 LcyB 基因将胡萝卜素代谢流引至 β -分支, 导致柑橘果实成熟过程中叶黄素的积累, 从而发挥其在柑橘类果实的胡萝卜素形成中的关键作用[33]。在辣椒中使 LcyB 基因沉默时, 辣椒红素含量明显下降[41]。因此, 染色体特异的 LcyB 基因参与调控类胡萝卜素组成是富含类胡萝卜素植物组织中的常见调控机制。

2.2 BCH

BCH 可催化 β -胡萝卜素 2 个 β 环羟基化, 产生西红柿苷合成途径最为重要的前体物质玉米黄质。BCH 基因家族是一个小基因家族 (通常只有 2 个或 3 个基因座), 其所有成员有至少 4 个保守的内含子, 这些内含子通常侧接保守的外显子, 这为开发直接测序的通用引物提供极大的便利。西红柿中鉴定到 2 条具有全长的编码 BCH 的基因, 其中 BCH1 基因 cDNA 全长 1 461 bp, 编码 291 个氨基酸, 在完全成熟时期西红柿花柱中 BCH1 基因比 BCH2 基因有更高的表达[39]。在拟南芥[42]、番茄[43]、辣椒[44]、柑橘[45]等植物中也曾报道鉴定出 2 条同源性较高的

BCH 基因, 有趣的是番茄中的 2 条 BCH 基因都是组织特异表达的, 1 条高表达在绿色组织中, 另 1 条在花中高表达^[43]。而在西红花中, 柱头的发育伴随着淀粉质体到色素体的转变, 但柱头在此过程中从未变绿, 只发生了黄色到猩红色的转变^[46]。

有研究同步检测西红花黄色时期、橘色时期和完全成熟时期花柱中 BCH1 基因的表达, 以及玉米黄质衍生物西红花苷、西红花酸和藏红花苦素含量, 发现基因表达和化合物积累模式高度一致, 均在花柱成熟前达到最高水平^[39]。特别是与 BCH 酶相关的底物 β -胡萝卜素和产物玉米黄质, 是柱头提取物中存在的主要类胡萝卜素。结果表明西红花 BCH1 酶催化的反应是在柱头组织中形成西红花脱辅基类胡萝卜素类化合物的限制性步骤。此外, 对不同种类西红花柱头中类胡萝卜素进行定性和定量分析表明, 类胡萝卜素的含量变化与 BCH1 基因的表达水平相关, 从而支持影响类胡萝卜素积累的主要机制是转录调控类胡萝卜素合成途径基因的假说^[47]。

2.3 CCD

CCD 是参与裂解类胡萝卜素过程的重要酶。根据 CCD 的裂解位置及对底物的偏好, 植物中的 CCD 可分为 5 个亚家族, 即 CCD1、CCD4、CCD7、CCD8 及 NCEDs^[48-50]。NCEDs 仅裂解 9-顺式-环氧类胡萝卜素的 11,12 位双键, 从而产生 ABA 前体黄氧素。CCD7 和 CCD8 在独脚金内酯合成途径中发挥作用, CCD7 催化 9-顺式- β -胡萝卜素的 9,10 位双键裂解, 产生 10'-脱辅基- β -胡萝卜素和 β -紫罗兰酮; CCD8 裂解 10'-脱辅基- β -胡萝卜素以产生 C_{18} -酮- β -脱辅基-13-胡萝卜素, 再通过一系列不同的反应, 该化合物转化成独脚金内酯前体己内酯^[51]。CCD1 酶家族对各种类胡萝卜素不同位置的双键具有广泛裂解作用, 包括 C-9,10 位、C-9,10,9',10'位、C-5,6,5',6'位及 C-7,8,7',8'位^[52-53]。CCD4 酶以裂解类胡萝卜素 C-9',10'位或 C-7',8'位双键而影响植物组织中色素沉着的水平, 已被报道的组织包括菊花 *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel. 花瓣^[54]、桃 *Amygdalus persica* L. 果肉^[55]、马铃薯块茎^[56]、柑桔皮^[57]和拟南芥种子^[58]。

从结构上看, 所有 CCD 都是由固定的 7 个 β -螺旋结构及其轴线上的 1 个 Fe^{2+} 原子组成, 螺旋结构上方覆盖由一系列环形形成的不保守圆顶。研究发现, CCD2 基因在西红花柱头发育的橙色阶段高度表达, 同期西红花酸含量积累达到最大值。将

CCD2 基因引入 3 种分别积累番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄质 (3,3'-二羟基- β -胡萝卜素) 的基因工程大肠杆菌菌株中表达时, 发现在积累番茄红素或 β -胡萝卜素的大肠杆菌菌株中未观察到脱色, 且未能检测到裂解产物; 相反, 在积累玉米黄质的大肠杆菌中因 CCD2 基因表达导致出现明显的脱色现象, 并且使用 HPLC 检测到裂解产物西红花二醛, 证明 CCD2 可裂解玉米黄质的 7,8/7',8'位碳碳双键, 从而产生 3-羟基- β -环柠檬醛和西红花二醛。CCD2 基因在玉米粒的体内表达和体外酶活性测定证实了其催化玉米黄质裂解的活性^[59]。

玉米黄质作为西红花苷合成途径的重要前体物质, 结构上是高度对称的多烯分子, 含有 9 个交替的碳共轭双键和单键, 碳骨架的两端各连接 1 个带羟基的紫罗酮环。CCD2 是负责裂解玉米黄质的限速酶, 而其催化反应由 Fe^{2+} 原子通过引入氧气分子而引发, 裂解产物经过脱氢及糖基化生成西红花饮片中的药效物质西红花苷及藏红花苦素。

2.4 GTase

GTase 是催化葡萄糖分子以糖苷键连接到特定受体上的酶。在高等植物中, 许多次生代谢产物包括芳香化合物都存在糖基化的现象^[60]。类胡萝卜素类化合物作为植物组织中重要的次生代谢产物常以糖苷形式在果实等组织中存在。西红花中类胡萝卜素生物合成的最后一步是通过葡萄糖基化将脂溶性类胡萝卜素转化成可溶且稳定的西红花苷及藏红花苦素。

Dufresne 等^[61]推测存在 2 个具有催化西红花酸糖基化活性的酶, 分别是西红花酸 8,8'-O-葡萄糖基转移酶和西红花酸葡萄糖酯 6"-O-葡萄糖基转移酶。Moraga 等^[62]从西红花花柱中克隆并表达出 2 条含 PSPG (plant secondary product glycosyltransferase) 结构域的重组蛋白 UGTCs2 和 UGTCs3, 分别由 460 和 475 个氨基酸组成。表达模式分析发现, UGTCs2 在西红花花柱中高表达, 但在未合成西红花苷的西红花亚种中无表达; UGTCs3 在西红花雄蕊中高表达, 且在所有实验用的西红花亚种中均有表达。大肠杆菌异源表达 UGTCs2 重组蛋白并进行体外酶活实验发现, UGTCs2 对西红花酸、西红花酸 β -D-葡萄糖酯和西红花酸 β -D-龙胆二糖酯表现出强大的糖基化活性, 进而认定 UGTCs2 是西红花中催化西红花酸糖基化的关键酶。

梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 是另外一种高度富集西红花苷的植物, 食品及纺织品行业中使用

的类胡萝卜素糖苷衍生物大部分来自于栀子果实。Nagatoshi 等^[63]首次鉴定并表征栀子中 2 种葡萄糖基转移酶 UGT75L6 和 UGT94E5 的功能,发现它们依次介导栀子中西红花苷生物合成途径的最终糖基化步骤。体外酶活性实验发现 UGT75L6 优先将西红花酸的羧基糖基化生成西红花酸葡萄糖基酯,而 UGT94E5 继续糖基化西红花酸葡萄糖基酯的 6'位羟基。同时 UGT75L6 和 UGT94E5 基因的表达模式与栀子中西红花苷积累的模式相关,进一步佐证了这 2 个酶可能参与西红花苷的合成。

3 结语与展望

西红花是我国传统的名贵中药材,因其良好的活血化瘀和解郁安神的功效而享誉中国。西红花柱头中丰富的类胡萝卜素糖苷衍生物赋予了其强大的医疗保健功能,具有广泛的抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、抗癌、抗抑郁等作用。目前对于西红花类胡萝卜素代谢途径上游部分研究较为清楚,以玉米黄质为界限,下游西红花特异的西红花苷合成途径中的关键酶仍需进一步解析和表征,特别是从 3-羟基- β -环柠檬醛进一步形成藏红花苦素,以及催化西红花二醛生成西红花酸甚至西红花苷过程中的关键酶尚未明确。

在组学大数据时代来临的大背景下,整合分析基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等各种组学数据,利用分子生物学手段解析次生代谢产物生源合成途径,辅助现代生物工程技术提高植物药有效成分含量,促进中药材资源可持续利用已经成为不可逆转的趋势。Xiao 等^[64]整合分析组学数据,准确解析了能被 Ag^+ 高效激活的从迷迭香酸到丹参酚酸 B 的特异性生物合成步骤,并对筛选出的关键酶基因进行植物遗传转化,成功提高丹参酚酸类成分的含量^[65]。D'Agostino 等^[24]首次报道了西红花柱头中的 EST 序列,近年来不同课题组连续报道了西红花全花和西红花全株的二代转录组测序数据^[17-18],这为深入开展西红花功能基因研究提供了有利的基础。未来可针对西红花类胡萝卜素合成下游途径关键酶的解析开展进一步的工作,揭示西红花苷等有效成分在西红花体内代谢具体的化学轮廓,为后续采用代谢工程的手段规模化生产西红花苷,切实提高西红花苷产量提供理论依据。

参考文献

[1] 白洁. 番红花 (*Crocus sativus*) 八氢番茄红素脱氢酶 CsPDS 基因的克隆、表达及含西红花资源植物的研

究 [D]. 成都: 四川大学, 2003.

[2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[3] Winterhalter P, Straubinger M. Saffron-renewed interest in an ancient spice [J]. *Food Rev Int*, 2000, doi: 10.1081/FRI-100100281

[4] Sampathu S, Shivashankar S, Lewis Y. Saffron (*Crocus sativus* L.) cultivation, processing, chemistry and standardization [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1984, 20(2): 123-157.

[5] Liakopoulou-Kyriakides M, Tsatsaroni E, Laderos P, et al. Dyeing of cotton and woolfibres with pigments from *Crocus sativus*-effect of enzymatic treatment [J]. *Dye Pigment*, 1998, 36(3): 215-221.

[6] Liakopoulou-Kyriakides M, Skubas A I. Characterization of the platelet aggregation inducer and inhibitor isolated from *Crocus sativus* [J]. *Biochem Int*, 1990, 22(1): 103-110.

[7] Tsatsaroni E, Liakopoulou-Kyriakides M. Effect of enzymatic treatment on the dyeing of cotton and wool fibers with natural dyes [J]. *Dyes Pigments*, 1995, 29(3): 203-209.

[8] 陈静, 王灵台. 西红花治疗慢性病毒性肝炎和肝炎后肝硬化的疗效观察 [J]. *中成药*, 1998, 20(11): 21-22.

[9] Nair S C, Pannikar B, Panikkar K R. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*) [J]. *Cancer Lett*, 1991, 57(2): 109-114.

[10] Ochiai T, Soeda S, Ohno S, et al. Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingomyelinase-ceramide signaling by increasing glutathione synthesis [J]. *Neurochem Int*, 2004, 44(5): 321-330.

[11] Abdullaev F. *Crocus sativus* against cancer [J]. *Arch Med Res*, 2003, doi: 10.1016/S0188-4409(03)00048-1.

[12] Das I, Chakrabarty R N, Das S. Saffron can prevent chemically induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2004, 5(1): 70-76.

[13] Danila D M, Marco G, Maurizio L G. Flavanones in citrus fruit, structure-antioxidant activity relationship [J]. 2005, 38(10): 1161-1166.

[14] Rezaee R, Hosseinzadeh H. Safranal: From an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2013, 16(1): 12-26.

[15] Srivastava R, Ahmed H, Dixit R K, et al. *Crocus sativus* L.: A comprehensive review [J]. *Pharmacogn Rev*, 2010, 4(8): 200-208.

[16] Abdullaev F I, Espinosa-Aguirre J J. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials [J]. *Cancer Detect Prev*, 2004, 28(6): 426-432.

- [17] Baba S A, Mohiuddin T, Basu S, *et al.* Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis [J]. *BMC Genomics*, 2015, doi: 10.1186/s12864-015-1894-5.
- [18] Jain M, Srivastava P L, Verma M, *et al.* De novo transcriptome assembly and comprehensive expression profiling in *Crocus sativus* to gain insights into apocarotenoid biosynthesis [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep22456.
- [19] Cazzonelli C I, Pogson B J. Source to sink: Regulation of carotenoid biosynthesis in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(5): 266-274.
- [20] Matthews P D, Luo R, Wurtzel E T. Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: Implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(391): 2215-2230.
- [21] Li F, Murillo C, Wurtzel E T. Maize Y9 encodes a product essential for 15-*cis*-zeta-carotene isomerization [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(2): 1181-1189.
- [22] Park H, Kreunen S S, Cuttriss A J, *et al.* Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 321-332.
- [23] Cunningham F J, Pogson B, Sun Z, *et al.* Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(9): 1613-1626.
- [24] D'Agostino N, Pizzichini D, Chiusano M L, *et al.* An EST database from saffron stigmas [J]. *BMC Plant Biol*, 2007, 53(7): 1-8.
- [25] Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Lopez R C, *et al.* The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(1):105-119.
- [26] Castillo R, Fernandez J A, Gomez-Gomez L. Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(2): 674-689.
- [27] Frusciante S, Diretto G, Bruno M, *et al.* Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2014, 111(33): 12246-12251.
- [28] Rubio A, Rambla J L, Santaella M, *et al.* Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in β -ionone release [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(36): 24816-24825.
- [29] Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Trapero A, *et al.* Developmental and stress regulation of gene expression for a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, CstNCED, isolated from *Crocus sativus* stigmas [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(2): 681-694.
- [30] Moraga A R, Nohales P F, Pérez J A F, *et al.* Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas [J]. *Planta*, 2004, 219(6): 955-966.
- [31] Pecker I, Gabbay R, Cunningham F J, *et al.* Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30(4): 807-819.
- [32] Hugueney P, Badillo A, Chen H C, *et al.* Metabolism of cyclic carotenoids: A model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts [J]. *Plant J*, 1995, 8(3): 417-424.
- [33] Cunningham F J, Sun Z, Chamovitz D, *et al.* Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(8): 1107-1121.
- [34] Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, *et al.* An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(20): 11102-11107.
- [35] Alquezar B, Zacarias L, Rodrigo M J. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene beta-cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(6): 1783-1797.
- [36] Bouvier F, D'Harlingue A, Backhaus R A, *et al.* Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(21): 6346-6352.
- [37] Al-Babili S, Hugueney P, Schledz M, *et al.* Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum* [J]. *FEBS Lett*, 2000, 485(2/3): 168-172.
- [38] Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Lopez R C, *et al.* The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(1): 105-119.
- [39] Castillo R, Fernandez J A, Gomez-Gomez L. Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives [J]. *Plant Physiol*, 2005,

- 139(2): 674-689.
- [40] Moraga A R, Rambla J L, Ahrazem O, *et al.* Metabolite and target transcript analyses during *Crocus sativus* stigma development [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(8): 1009-1016.
- [41] Tian S L, Li L, Chai W G, *et al.* Effects of silencing key genes in the capsanthin biosynthetic pathway on fruit color of detached pepper fruits [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, doi: 10.1186/s12870-014-0314-3.
- [42] Tian L, Dellapenna D. Characterization of a second carotenoid beta-hydroxylase gene from Arabidopsis and its relationship to the LUT1 locus [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 47(3): 379-388.
- [43] Hirschberg J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(3): 210-218.
- [44] Bouvier F, Keller Y, D'Harlingue A, *et al.* Xanthophyll biosynthesis: Molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1391(3): 320-328.
- [45] Kim I, Ko K, Kim C, *et al.* Isolation and characterization of cDNAs encoding β -carotene hydroxylase in *Citrus* [J]. *Plant Sci*, 2001, 161(5): 1005-1010.
- [46] Grilli-Caiola M, Canini A. Ultrastructure of chromoplasts and other plastids in *Crocus sativus* L. (Iridiaceae) [J]. 2004, 138(1): 43-52.
- [47] Wurtzel E. *Secondary Metabolism in Models Systems* [M]. Oxford: Elsevier Science, 2004.
- [48] Walter M H, Strack D. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(4): 663-692.
- [49] Auldrige M E, Mccarty D R, Klee H J. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(3): 315-321.
- [50] Giuliano G, Al-Babili S, von Lintig J. Carotenoid oxygenases: Cleave it or leave it [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(4): 145-149.
- [51] Alder A, Jamil M, Marzorati M, *et al.* The path from beta-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone [J]. *Science*, 2012, 335(6074): 1348-1351.
- [52] Vogel J T, Tan B C, Mccarty D R, *et al.* The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(17): 11364-11373.
- [53] Ilg A, Beyer P, Al-Babili S. Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranial biosynthesis [J]. *FEBS J*, 2009, 276(3): 736-747.
- [54] Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, *et al.* Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(3): 1193-1201.
- [55] Brandi F, Bar E, Mourgues F, *et al.* Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, doi: 10.1186/1471-2229-11-24.
- [56] Campbell R, Ducreux L J, Morris W L, *et al.* The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase 4 from potato [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(2): 656-664.
- [57] Rodrigo M J, Alquezar B, Alos E, *et al.* A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis of *Citrus* fruit-specific apocarotenoid pigments [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(14): 4461-4478.
- [58] Gonzalez-Jorge S, Ha S H, Magallanes-Lundback M, *et al.* Carotenoid cleavage dioxygenase 4 is a negative regulator of beta-carotene content in Arabidopsis seeds [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(12): 4812-4826.
- [59] Frusciante S, Diretto G, Bruno M, *et al.* Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2014, 111(33): 12246-12251.
- [60] Winterhalter P, Skouroumounis G K. Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1997, 55: 73-105.
- [61] Dufresne C, Cormier F, Dorion S. *In vitro* formation of crocetin glucosyl esters by *Crocus sativus* callus extract [J]. *Planta Med*, 1997, 63(2): 150-153.
- [62] Moraga A, Nohales P, Perez J, *et al.* Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas [J]. *Planta*, 2004, 219(6): 955-966.
- [63] Nagatoshi M, Terasaka K, Owaki M, *et al.* UGT75L6 and UGT94E5 mediate sequential glucosylation of crocetin to crocin in *Gardenia jasminoides* [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(7): 1055-1061.
- [64] Xiao Y, Gao S, Di P, *et al.* Lithospermic acid B is more responsive to silver ions (Ag^+) than rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Biosci Rep*, 2009, 30(1): 33-40.
- [65] Xiao Y, Zhang L, Gao S, *et al.* The c4h, tat, hppr and hppd genes prompted engineering of rosmarinic acid biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29713.