

- J Nephrol* (中华肾脏病杂志), 2001, 17(3): 185-187.
- [36] Wang J G, Wang X T, Lu X M, *et al.* Protective effect of paeonol on mice hepatic toxic injury induced by isoniazid and rifampicin [J]. *Chin Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 1999, 6(6): 26-27.
- [37] Qi J S, Li E, Wang F. Effect of paeonol on inhibition of peroxynitrite on osteoblast proliferation [J]. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2003, 23(2): 132-134.
- [38] Han B, Wang J, Zhu Q. The inhibitory effect of paeonol on proliferation of human umbilical vein endothelial cells induced by advanced glycation end products [J]. *Study J Tradit Chin Med* (中医药学刊), 2002, 20(5): 681-687.
- [39] Yang L Y, Cao Y, Wei Y J, *et al.* Inhibitory effect of extracted components from Chinese medicinal herbs on tyrosinase [J]. *Chin J Dermatol* (中华皮肤科杂志), 2003, 36(4): 207-209.

基因调控技术提高药用植物细胞有效成分产量的研究进展

江 湖¹, 苏 虎^{2*}

(1. 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047; 2. 江西科技师范学院生命科学学院, 江西 南昌 330013)

利用植物细胞培养技术生产具有重要经济价值的药用植物次生代谢产物为中药可持续发展提供了一条新的途径。然而, 药用植物细胞培养过程中目的次生代谢产物的低产问题一直困扰着该技术的发展与应用, 传统的克服这一问题的方法主要有优化培养条件、筛选高产细胞株等, 大量的研究表明, 通过上述途径无法从根本上解决植物细胞次生代谢产物的低产问题。

近年来, 随着基因工程等现代生物技术的发展, 人们尝试利用基因调控手段来调节植物细胞的次生代谢, 如采用关键酶基因调控技术、转录因子调控技术等从分子水平上解决药用植物细胞次生代谢产物的低产问题。本文就这方面的研究、发展现状进行综述。

1 关键酶基因调控技术

在药用植物次生代谢网络中, 一些关键酶基因表达水平对某些目的产物的生物合成水平有着重要的调节作用。将次生代谢途径中的关键酶基因克隆, 重组后导入到植物细胞中, 通过提高次生代谢途径中关键酶的活性和数量, 增加代谢强度, 提高目的次生代谢产物的产量。目前, 许多种属的关键酶基因, 如紫杉醇合成过程中的 2a-O-benzoyltransferase、taxa-4(5), 11(12)-diene synthase^[1,2], 黄连中黄连素合成过程中的 scoulerine-9-O-methyltransferase (SMT)^[3]等关键酶基因已经被克隆。Sato 等^[4]在农杆菌介导下将 SMT cDNA 导入黄连悬浮细胞中, 当 SMT 基因过量表达时该酶活力增加 20%, 黄连素在总生物碱中的量提高了 12%。Canel 等^[5]通过转基因技术使 strictosidine synthase (STR) 基因在长春花中过量表达, 结果该酶的活性比野生型细胞中酶活性提高了 10 倍, 生物碱合成水平也有很大提高。

利用关键酶基因调控技术可以实现对代谢途径中的某个限速步骤进行局部调控, 对提高药用植物细胞中次生代谢产物的量有一定效果, 但也存在不足之处。首先, 由于植物细胞次生代谢是一个复杂的网络, 代谢分支之间彼此交错, 代

谢过程中存在一系列反馈调节机制, 细胞内部会抵制某种次生代谢产物流量的变化, 因此仅仅依靠增加代谢途径中一两个关键酶基因的表达水平往往对产物的代谢流量增加作用效果有限^[6~8]。其次, 利用该技术对药用植物细胞中目的次生代谢产物的合成进行调控需要清楚掌握其代谢途径。然而目前对许多药用植物次生产物的代谢途径研究尚不深, 因而克隆这一类代谢途径中关键酶基因的难度较大, 制约了该技术在药用植物细胞培养过程中的应用。

2 转录因子基因调控技术

转录因子也称为反式作用因子, 是能够与真核基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用的 DNA 结合蛋白。根据转录因子 DNA 结合域的结构可以将其分为 bHLH(basic helix-loop-helix)、bZIP(basic leucine zipper)、zinc-finger、Myb 等几类^[9]。如从长春花中分离得到的 CrMYC1 转录因子就属于 bHLH 转录因子家族; 金鱼草、欧芹的 Myb 转录因子参与了苯丙氨酸代谢途径的调控^[10~12]。转录因子对植物次生代谢有着重要的调节作用, 它可以调节生物体内多个功能基因表达水平, 使用合适的转录因子能够提高整条代谢途径中一系列酶基因的表达水平, 因此被认为是一种新的提高次生代谢产物流量的分子调控策略^[13,14]。

转录因子调控是一种重要的植物次生代谢调控手段^[15], 然而以转录因子基因作为调控基因对植物细胞的次生代谢进行调控也存在着一些不足之处。如转录因子基因的作用比较单一, 不同植物次生代谢产物的合成往往需要不同的转录因子基因进行调控, 而且通常情况下需要两种或两种以上不同的转录因子基因共同作用才能有效提高代谢流量。

3 反义核酸与 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术

反义核酸是指能够与靶 DNA 或 RNA 片断互补、结合的一段 DNA 或 RNA 序列, 反义核酸技术即利用反义核酸关闭目标基因表达的技术。目前, 应用该技术对植物次生代谢调控常常与关键酶基因技术相结合。在药用植物次生代谢调控过

收稿日期: 2006-01-04

作者简介: 江湖(1980—), 女, 蒙古族, 河北承德人, 助教, 硕士研究生, 2005 年毕业于南昌大学中德联合研究院, 主要从事分子生物学研究。 E-mail: riverhu@163.com

* 通讯作者 苏 虎 Tel: (0791)3815794 E-mail: suhujiang@163.com

程中可以利用反义核酸技术关闭某个基因的表达或切断某个代谢分支,从而使合成代谢向预期目标转移。如利用罂粟 benzophenanthridine alkaloid 合成途径中的 BBE (berberine bridge enzyme) 酶、CYP80B1 (*N*-methylcoclaurine 3'-hydroxylase) 的反义 RNA 片断可以降低 benzophenanthridine alkaloid 的流量^[16];紫草中暗诱导基因 LeDI-2 是紫草宁合成过程中的关键编码基因,利用反义核酸技术将其表达抑制后会降低紫草宁的产量^[17]。尽管这实现的是对目的产物的负调节,但说明利用反义核酸技术对代谢途径进行调节是可行的。当然,由于植物细胞内反馈抑制等多种调节机制的存在,以及目前药用植物功能基因组和次生代谢途径研究还不够深入,给利用该技术提高细胞中的次生代谢产物量,尤其是对细胞具有一定毒性的防御性次生代谢产物的量带来了一定的难度。

RNAi 是指特定的双链 RNA 分子使基因在转录或翻译阶段沉默的现象,这就意味着利用 RNA 分子可以对基因表达进行调控^[18]。Allen 等利用该技术使罂粟中的可待因酮还原酶 (codeinone reductase, COR) 基因家族沉默,结果阻断了阿片类物质的合成,同时导致可待因前体物质网状番茄碱 [(S)-reticuline] 大量累积,而番茄碱是治疗疟疾的有效成分^[19]。利用 RNAi 技术对药用植物细胞次生代谢途径中的目的基因进行调控,不失为一种新的分子调控策略。但是 RNAi 载体构建及稳定转化体的获得需要消耗大量的时间和物力^[20],且需要对药用植物的次生代谢途径和功能基因组有较深入的了解。

4 结语

中药是我国的传统特色资源,其有效成分对药材的质量有着重要影响,再加之一些品种资源有限,因此利用分子生物学技术对中药次生代谢进行调控,以提高其有效成分量,对中药的可持续发展和中药现代化具有重要的现实意义。

References:

- [1] Walker K, Croteau R. Toxol biosynthesis: Molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *PNAS*, 2000, 97(25): 13591-13596.
- [2] Wildung M R, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis [J]. *Biol Chem*, 1996, 271: 9201-9204.
- [3] Takeshita N, Fujiwara H, Mimura H, et al. Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-L-methionine: scoulerine-9-O-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36(1): 29-36.
- [4] Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, et al. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis [J]. *PNAS*, 2001, 98: 367-372.
- [5] Canel C, Lopes-Cardoso M I, Whitmer S, et al. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Planta*, 1998, 205(3): 414-419.
- [6] Rontein D, Dieuaidé-Noubhani M, Erick J, et al. The Metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells [J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 43948-43960.
- [7] Rontein D, Basset G, Hanson A D. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants [J]. *Metab Eng*, 2002, 4(1): 49-56.
- [8] Lloyd J C, Zakhleniuk O V. Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant, *pho3*. [J]. *Exp Bot*, 2004, 55(400): 1221-1230.
- [9] Schwechheimer C, Zourelidou M, Bevan M W. Plant transcription factor studies [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 127-150.
- [10] Sablowski R W, Moyano E, Culianez-Macia F A, et al. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes [J]. *EMBO*, 1994, 13: 128-137.
- [11] Chen J, Wang Z Y. Progress in the study of plant MYB transcription factors [J]. *Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学报), 2002, 28(2): 81-88.
- [12] Guillaume C, Grégory M, Martial P, et al. *CrMYC1*, a *Catharanthus roseus* elicitor- and jasmonate-responsive bHLH transcription factor that binds the G-box element of the strictosidine synthase gene promoter [J]. *Exp Bot*, 2003, 54: 2587-2588.
- [13] Van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a Jasmonate-Responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism [J]. *Science*, 2000, 289: 295-297.
- [14] Ganter P, Memelink J. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 23(12): 563-569.
- [15] Memelink J, Kijne J W, van der Heijden R, et al. Genetic modification of plant secondary metabolite pathways using transcriptional regulators [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2001, 72: 103-125.
- [16] Park S U, Y M, Facchini P J. Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128: 696-706.
- [17] Yazaki K, Matsuoka H, Shimomura K, et al. A novel dark-Inducible protein, LeDI-2, and its involvement in root-specific secondary metabolism in *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1831-1841.
- [18] Novian C D, Sharp P A. The RNAi revolution [J]. *Nature*, 2004, 430: 161-164.
- [19] Allen R S, Millgate A G, Chitty J A, et al. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in *Opium poppy* [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12): 1559-1566.
- [20] Dubouzet J G, Morishige T, Fujii N, et al. Transient RNA silencing of scoulerine 9-O-methyltransferase expression by double stranded RNA in *Coptis japonica* protoplasts [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(1): 63-70.