

- 2 cells [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2005, 31(4): 397-404.
- [2] Gao J, Hugger E D, Beck-Westermeyer M S, *et al*. *Current Protocols in Pharmacology Estimation of Intestinal Mucosal Permeation of Compounds Using Caco-2 Cell Monolayers* [M]. New York: John Wiley Sons, Inc. 2000.
- [3] Walgren R A, Karnaky K J, Lindenmayer G E, *et al*. Efflux of dietary flavonoid quercetin 4-O- β -glucoside across human intestinal Caco-2 cells monolayers by apical multidrug resistance associated protein-2 [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2000, 37(5): 325.
- [4] Hu M, Chen J, Tran D. The Caco-2 cell monolayers as an intestinal metabolism model: metabolism of dipeptide Phe-Pro [J]. *J Drug Target*, 1994, 2(1): 79-89.
- [5] Hu M, Chen J, Lin H M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2003, 307(1): 314-321.
- [6] Chen J, Lin H M, Hu M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: Role of intestinal disposition [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2003, 304(3): 1228-1235.
- [7] Richard A W, Walle U K, Walle T. Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. *Biochem Pharm*, 1998, 55: 1721-1727.
- [8] Galijatovic A, Otake Y, Walle U K, *et al*. Induction of UDP-glucuronosyl transferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells-potential role in carcinogen bioinactivation [J]. *Pharm Res*, 2001, 18(3): 374-379.
- [9] Vaidyanathan J B, Walle T. Transport and metabolism of the tea flavonoid (-) epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2 [J]. *Pharm Res*, 2001, 18(10): 1420-1425.
- [10] Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides T C. The effects of plant flavonoids of mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer [J]. *Am Soc Pharm Expe Ther*, 2000, 52(4): 673-751.
- [11] Zhu M, Yao T W, Zeng S. Glucuronidation and *in vitro* interaction of Ginkgo flavonoids with other drugs [J]. *J Zhejiang Univ: Med Sci* (浙江大学学报: 医学版), 2004, 33(1): 15-20.
- [12] Liu Y, Hu M. Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model [J]. *Drug Metab Disp*, 2001, 30(4): 370.
- [13] Oitate M, Nakaki R, Koyabu N, *et al*. Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2) [J]. *Biopharm Drug Disp*, 2001, 22(1): 23-29.
- [14] Chen J, Lin H M, Hu M. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavonone analogs in the human intestinal Caco-2 model [J]. *Cancer Chem Pharm*, 2005, 55: 159-169.
- [15] Richard A W, Karl J R, George E L, *et al*. Efflux of dietary flavonoid quercetin 4-O- β -glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein2 [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2000, 294(3): 830-836.
- [16] Wells U K, French K L, Walgren R A, *et al*. Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal Caco-2 cells: potential role for MRP2 [J]. *Res Comm Mole Pathol Pharm*, 1999, 103(1): 45-56.
- [17] Jia X B, Chen J, Lin H M, *et al*. Disposition of flavonoids via enteric recycling: enzyme-transporter coupling affects metabolism of biochanin A and formononetin and excretion of their phase II conjugates [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2004, 310(3): 1103-1113.
- [18] Paivi T, Leena L, Anna G, *et al*. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 425(2): 193-199.
- [19] Chen J, Steven C H, Joshua F A, *et al*. Potential beneficial metabolic interactions between tamoxifen and isoflavones via cytochrome P450-mediated pathways in female rat liver microsomes [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(11): 2095-2104.
- [20] Jeong E J, Lin H M, Hu M. Disposition mechanisms of Raloxifene in the human intestinal Caco-2 model [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2004, 310(1): 376-385.
- [21] Wang R T, Zhou S Y, Mei Q B, *et al*. Enzyme kinetics of genistein metabolism in rat liver microsomes [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2005, 10(3): 294-297.

银杏内酯的生物合成途径及生物技术研究进展

刘万宏, 陈敏, 廖志华*, 龚一富*

(西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 银杏内酯因其特殊的血小板活化因子拮抗作用成为当今天然产物研究的热点。综述了银杏内酯的合成部位、生物合成途径及途径上已知的酶和基因; 利用银杏愈伤组织和细胞悬浮培养生产银杏内酯的方法; 前体饲喂提高银杏内酯产量和通过银杏遗传转化获取高产量银杏内酯的优质药源等相关研究。最后提出代谢工程策略是可能解决银杏内酯药源缺乏的理想途径。

关键词: 银杏内酯; 生物合成; 悬浮培养; 遗传转化; 前体饲喂

中图分类号: R 282.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2007)06-0941-05

Advances in studies on biosynthetic pathway and biotechnology of ginkgolides

LIU Wan-hong, CHEN Min, LIAO Zhi-hua, GONG Yi-fu

(Key Laboratory of Eco-environments, Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education,

School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Key words: ginkgolides; biosynthesis; suspension cultures; genetic transformation; precursor feeding

收稿日期: 2006-11-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: 银杏内酯前体生物合成途径中关键酶基因的克隆与功能分析 (30500303)

作者简介: 刘万宏 (1979-) 男, 江西峡江人, 研究方向为药用植物次生代谢工程。 E-mail: liuwanh@swu.edu.cn

* 通讯作者 廖志华 Tel: (023) 68367146 E-mail: zhiliao@swu.edu.cn

银杏是著名的子遗植物,出现在 2 亿年前,在冰川纪几近灭种。目前野生银杏仅在我国幸存,被称为“活化石”。银杏含有多种药用次生代谢产物,包括银杏内酯、白果内酯、黄酮和黄酮苷等。这些成分广泛用于治疗和预防心血管疾病^[1]。早期研究认为银杏叶中量较高的黄酮类物质是有效成分;随着研究的深入,越来越多的研究表明银杏中量很低的银杏内酯才是真正的心血管疾病拮抗活性成分^[2]。大量临床医学证据表明银杏内酯是目前最好的血小板活化因子受体(platelet-activating factor receptor)的天然专一拮抗剂(antagonist),也是治疗和预防心脑血管疾病的优良天然药物。由于银杏是国家保护植物,生长缓慢,资源非常有限,而银杏内酯量又非常低(我国出产的优质银杏干叶中仅为 0.06%)^[3],所以从天然银杏中提取银杏内酯远远不能满足需求,使其价格极为昂贵,高达 20 万美元/kg。近年来,开发银杏内酯优质药源成为十分活跃的研究领域。本文就银杏内酯合成部位、生物合成途径的分子生物学和生物化学,及生物技术在银杏内酯生产中的应用做一系统综述。

1 银杏内酯合成部位

Furukawa 等首先是从银杏叶中分离到的 4 种萜类化合物, 随后 Nakanishi 等^[4]和 Marayama 等^[5]确定其结构为银杏内酯 A (ginkgolide A, GA)、银杏内酯 B (ginkgolide B, GB)、银杏内酯 C (ginkgolide C, GC)、银杏内酯 M (ginkgolide M, GM)。银杏内酯是一类具有特殊 20 碳结构的二萜化合物, 仅在银杏中发现, 其合成具有高度的组织特异性。Cartayrade 等^[6]以银杏树苗为材料, 通过用¹⁴C 标记 CO₂ 示踪法发现带有标记的银杏内酯最先在根中检测到, 然后是茎和叶, 表明根是银杏内酯的合成部位, 随后转运到叶中储藏; 同时还揭示了 GA 是最先合成的内酯化合物, GA 通过羟基异构产生其他内酯化合物 GB、GC 和 GM。Neau 等^[7]发现左旋海松二烯 (levopimaradiene) 和冷杉二烯 (abietadiene) 等银杏内酯的前体物质仅能够在根中发现, 进一步证明银杏内酯的合成部位是根。银杏内酯在根中生物合成的高度组织特异性的确定为进一步开展银杏内酯生物合成的分子机制和相关生物技术研究奠定了重要的基础, 在克隆银杏内酯生物合成途径中的基因时, 就应该选择根作为材料; 在离体培养银杏细胞生产银杏内酯时, 也要优先考虑根作为起始材料或者以诱导的发根代替细胞作为生产银杏内酯的组织。

2 银杏内酯前体生物合成途径

所有天然萜类化合物(包括银杏内酯)都来自于两个基本的 5 碳通用前体;异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和其异构物二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。虽然植物萜类都来源于 IPP 和 DMAPP,但其生物合成却由两条截然不同的途径完成:一是经典的甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径;另一是新近发现的 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径。这两条途径分别在不同的亚细胞区域中进行: MVA 途径位于细胞质, MEP 途

径位于质体,而且这两条途径所涉及到的基因和酶也完全不同^[8]。

在过去的几十年中, MVA 途径曾被认为是萜类前体生物合成的唯一通用途径, 直到 20 世纪 90 年代, 另一条独立的萜类前体生物合成途径即 MEP 途径才首先在银杏中发现^[9], 该发现阐明了银杏内酯的化学起源, 即作为二萜类的银杏内酯是由位于质体的 MEP 途径提供 5 碳前体 IPP 和 DMAPP; 同时该研究为植物次生代谢研究开辟了一个崭新的领域, 成为萜类生物合成的里程碑。随后关于 MEP 途径的分子水平研究表明该途径定位于质体, 其最初的前体物质是丙酮酸 (pyruvate) 和 3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde 3-phosphate, G3P)。丙酮酸和 G3P 在经过依次由 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXPS)、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR)、2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸脱氢酶 (MEP cytidyltransferase, MCT)、4-(5-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶 [4-(cytidine 5-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase, CMK]、2-C-甲基赤藓醇-2, 4-环焦磷酸合成酶 (2-C-methylerythritol 2, 4-cyclodiphosphate synthase, MECPS)、羟甲基-丁烯基-4-磷酸合成酶 (hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase, HDS)、羟甲基丁烯基-4-磷酸还原酶 (hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate reductase, 又名异戊烯基焦磷酸/二甲基烯丙基焦磷酸合成酶, IPP/DMAPP synthase, IDS) 催化的 7 步酶促反应后生成 IPP 和 DMAPP^[10] (图 1), 为单萜、部分倍半萜和二萜生物合成提供基本前体^[11]。3 分子的 IPP 和 1 分子的 DMAPP 在香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS) 作用下缩合生成 20 碳的香叶基香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP), 作为银杏内酯生物合成的线性骨架^[12]; 随后 GGPP 在萜类环化酶——左旋海松二烯合成酶 (levopimaradiene synthase, LS) 作用下生成左旋海松二烯, 作为银杏内酯的环化骨架^[13]; 随后通过一系列的羟化和酰化等多步酶促反应生成银杏内酯。

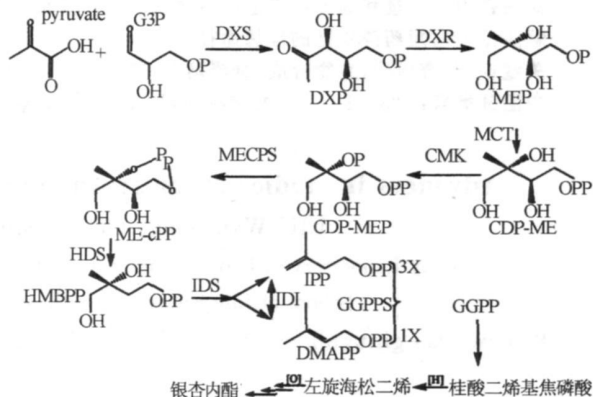


图 1 银杏内酯生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of ginkgolides

3 银杏内酯前体生物合成途径中已经克隆的关键酶基因

近年来兴起的第二代基因工程——代谢工程技术是改造代谢途径,调控靶标天然产物合成的重要方法。而实现代谢工程的前提是开展天然产物生物合成途径的研究,包括分离和鉴定代谢途径上功能基因,为代谢工程提供候选基因;明确途径中的限速步骤,提供代谢工程理想的作用靶点等。目前,已经克隆并鉴定了银杏内酯前体生物合成途径上的 6 个基因,即 *GbDXPS*、*GbDXR*、*GbMECT*、*GbMECPs*、*GbGGPPs* 和 *GbLS*。这些基因的克隆为采用代谢工程技术在分子水平改造银杏内酯合成途径,提高其合成能力提供了必需的功能基因和作用靶点。

3.1 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶基因(DXPS):是 MEP 途径上的第一个酶,也是第一个关键酶,其作用是催化丙酮酸和 G3P 生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸,该步骤是植物萜类合成第一步限速步骤。为研究 DXPS 在植物质体类异戊二烯化合物及其衍生物合成中的作用,利用转 *dxps* 基因提高或者降低拟南芥中 *dxps* 的表达水平,对一些转基因株系的分析表明,超量表达 *dxps* 的植株异戊二烯类化合物的水平得到了提高,包括叶绿素、维生素 E、类胡萝卜素、脱落酸和赤霉素等;而在 *dxps* 表达水平受到抑制的植株中,这些产物的量都降低了;*dxps* 表达水平的改变导致了不同类异戊二烯(萜类)终产物量的改变这一事实,证实了 DXPS 是质体 IPP 合成的一个关键酶^[4]。

Gong 等^[5]从银杏中克隆了 *dxps* (*GbDXPS*),该基因 cDNA 全长为 2 795 bp,编码区为 2 154 bp,编码长度为 717 氨基酸的 DXPS,进一步的分析表明银杏 DXPS 定位于质体,这与银杏内酯在质体中合成的事实相吻合;*GbDXPS* 的组织表达谱分析结果表明 *dxps* 在银杏根、茎、叶、种皮和种子都表达,但是表达量各不相同,根中的表达量高于叶中的表达量,这与银杏内酯在根中合成的事实吻合;用甲基茉莉酸、脱落酸、乙酰水杨酸和硫酸铈铵等 4 种诱导子处理银杏细胞后,都使得 *dxps* 的表达水平提高,同时伴随着 GB 量的提高。*dxps* 表达量和银杏内酯量的正相关性表明由 DXPS 催化的该步酶促反应是银杏内酯生物合成的重要调节步骤,*dxps* 是实现银杏内酯代谢工程的重要候选功能基因。

3.2 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR):在位于质体的 MEP 途径中,DXP 在 DXR 催化作用下经原子重排和还原生成 MEP^[16],该反应是 MEP 途径上最重要的限速反应,也是萜类物质代谢工程最重要的靶点。作为 MEP 途径最重要的限速酶,DXR 是 MEP 途径代谢工程最理想的靶点,美国科学院院士 Croteau 教授领导的实验室在实现薄荷精油的代谢工程时,以 DXR 的催化步骤作为靶点之一,在薄荷中过量表达来源于薄荷的 *dxr* 和 *menthofuran synthase* 两个基因,使得薄荷精油的量提高了 50%^[17],表明突破 MEP 途径中上游限速瓶颈,可以实现对目标产物的代谢工程生产。可以推断,要提高银杏中银杏内酯的量,DXR 是一个很有效的代谢工程靶点。Gong 等^[18]采用 RACE 方法克隆银杏 *dxr* 基因(*GbDXR*),该基因 cDNA 全长为 1 720 bp,编码区

长为 1 431 bp,编码定位于质体的长度为 477 个氨基酸的 DXR,组织表达谱分析表明 *dxr* 在银杏根、茎、叶、种皮和种子都表达,但是表达量各不相同,根中的表达量高于叶中的表达量,这同样与银杏内酯在根中合成的事实吻合。*GbDXR* 的克隆和分析有助于在分子水平阐明银杏内酯前体生物合成的一个限速反应,为银杏内酯的代谢工程提供一个理想的候选基因和作用靶点。

3.3 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸脱氨酰转移酶(MECT):MECT 在 MEP 途径的酶促反应依赖于胞苷三磷酸(CTP)。在植物中,编码 MECT 的基因和 MECT 酶已从拟南芥分离得到。拟南芥的 MECT 氨基酸序列 N 端包含一条质体转运肽序列,与 MEP 途径定位于质体的事实相吻合^[19]。Rohdich 等^[20]在大肠杆菌 *E. coli* 细胞提取物中分离到蛋白 ygbP (EcMECT)。为验证其功能,Rohdich 以¹⁴C 标记的 MEP 为底物在 ygbP 催化生成带有¹⁴C 的 CDP-ME,将带¹⁴C 标记的 CDP-ME 转入辣椒,结果在辣椒质体中检测到 CDP-ME 参与类胡萝卜素生物合成。

Kim 等^[21]用 RACE 方法在银杏中克隆到全长为 1 411 bp 的 *GbMECT*,编码长度为 327 个氨基酸残基的 MECT 蛋白;其 N 端 88 个氨基酸残基序列经绿色荧光蛋白标记实验证明为质体转运肽,其亚细胞结构定位于质体。利用 *mect* 缺失的 *E. coli* 菌株 NM W33 验证 *mect* 功能,发现转入外源 *mect* 基因的突变菌株在抗性 LB 平板上能复苏生长。

3.4 2-甲基赤藓糖-2,4-环二磷酸合成酶(MECPS):是 MEP 途径中的第 5 个酶,催化 CDP-MEP 转变为 2-甲基赤藓糖-2,4-环二磷酸(2-C-methylethritol 2,4-cyclo-diphosphate, ME-cPP)。在植物中,考察 MECPS 功能的报道仅见于长春花,该基因能刺激长春花吲哚类生物碱的积累^[22]。Gao 等人在银杏中克隆到 836 个碱基的 MECPS 的完整读码框(GeneBank Accession: AY971576),但遗憾的是没有相关文献报道。Kim 等在银杏中克隆到全长为 935 bp 的 *GbMECPS*,编码长为 238 个氨基酸残基的 MECPS。将 *GbMECPS-GFP* 融合基因转入拟南芥,电镜检测发现在质体中能检测到融合蛋白发出的绿色荧光,这与 MECPS 定位质体的事实相吻合。将 *GbMECPS* 转入 *ygbB* (*MECPS*) 缺失的 *E. coli* 菌株 NM W26,发现突变菌株恢复了生长能力,这证明 *GbMECPS* 具有替代 *ygbB* 基因功能,恢复大肠杆菌中 MEP 代谢途径的功能^[23]。

3.5 香叶基香叶基焦磷酸合成酶(GGPPs):包括银杏内酯在内的所有二萜类化合物的直接通用前体是具有 20 碳结构的 GGPP。由 GGPPs 催化的缩合反应是萜类基本前体合成二萜共同前体的分支点,也是二萜生物合成调控的重要靶点^[24]。Engprasert 等^[25]从紫苏中克隆并鉴定了 *ggpps* 基因,提出 GGPPs 是从紫苏根中提取的二萜类化合物 forskolin (用于治疗心脏病)生物合成途径上的关键酶。Croteau 等^[26]从加拿大红豆杉 cDNA 文库中克隆并功能鉴定了 *ggpps* 基因,Northern 杂交显示红豆杉的 *ggpps* 基因的表达受到化学信号诱导分子甲基茉莉酸(methyl jasmonate, MeJA)的

调节,经过诱导的红豆杉细胞中的 *gpps* 基因的表达量比非诱导的红豆杉细胞中的表达量高得多,同时紫杉醇的产量也大为增加。Liao 等^[27]从曼地亚红豆杉基因组中分离并鉴定了 *gpps* 基因,发现该基因没有内含子;同时在其编码区上游的调控区域内分离到了具有 G-box 的顺式作用元件,分析为甲基茉莉酸反应元件,在分子水平上初步阐明了该基因受 MeJA 刺激表达上调的机制,使得对于 GGPPS 催化的该步反应的分子机制又深入了一步。

Liao 等^[12]从银杏中克隆到银杏的 *gpps* 基因, cDNA 全长 1 657 bp, 编码 391 个氨基酸残基的 GGPPS, 其中 N 端具有由 79 个氨基酸残基组成的质体转运肽。生物信息学分析表明 *GbGGPPS* 基因同其他物种 GGPPS 基因一样具有两个高度保守的天冬氨酸富集区域, 属于多聚异戊二烯基转移酶基因家族。*GbGGPPS* 催化 5 碳单位的基本前体缩合成为 20 碳的 GGPP, 为银杏内酯生物合成提供 20 碳的骨架。由此可见, GGPPS 是二萜生物合成途径上重要的调节基因, 其催化的反应是二萜生物合成代谢调控的重要靶点。因而分离和鉴定银杏 *gpps* 基因有助于阐明银杏内酯前体生物合成关键步骤的分子机制和为银杏内酯的代谢工程提供重要的候选基因和作用靶点。

3.6 左旋海松二烯合成酶(LS): 类异戊二烯的环化是萜类生物合成中关键步骤, 在银杏内酯生物合成途径中 LS 起到最初的环化作用。GGPPS 在 LS 作用下环化, 经质子传递、氧化作用, 最终生成银杏内酯 A, 随后经过各种修饰形成银杏内酯家族其他化合物。Hala 等^[13]在银杏 cDNA 文库中克隆到 *GbLS* 基因, 长为 2 619 bp 的编码区, 编码含 873 个氨基酸残基的蛋白; LS 蛋白在 N 端也含有质体转运肽, 这给银杏内酯在质体中合成又提供了一个有力证据; 序列中具有 3 个天冬氨酸富集区域, 此结构推测与 LS 的环化功能相关; 将外源 LS 导入大肠杆菌, 结果生成了左旋海松二烯, 表明该基因具有将 GGPP 环化为左旋海松二烯的功能。

4 组织细胞培养合成银杏内酯的研究

4.1 培养基的选择及诱导子的添加: 细胞培养是大规模生产次生代谢产物的一个有效途径。自从 1991 年 Carrier^[28]在银杏愈伤组织悬浮培养检测到银杏内酯存在以来, 利用银杏细胞培养获得银杏内酯的研究成为热门方向。银杏外植体在添加适当植物激素的 MS 固体培养基上均能诱导出银杏愈伤组织, 其中子叶与幼叶诱导率较高。Park 等^[29]以银杏叶柄为外植体用 MS 加 5~40 $\mu\text{mol/L}$ 的 NAA 诱导愈伤, 将愈伤组织采用细胞沉降体积百分率为 30% 以及添加 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 NAA 的 MS 液体培养基进行悬浮培养, 取得了较好的效果。

为增加目的产物产量, 许多研究者致力在细胞培养过程中添加外界诱导子, 促进目的产物的积累。Kang 等^[30]在银杏悬浮细胞培养中添加甲基茉莉酸(MJ)和水杨酸(SA), 0.01 mmol/L MJ 分别使得 GA、GB 增加了 4.3 倍和 8.2 倍; 1.0 mmol/L SA 分别使得 GA 和 GB 增加了 3.1 倍和 6.1 倍。Gong 等^[16]采用 MJ、乙酰水杨酸(ASA)、花生四烯酸(AA)、硫酸铈胺(CAS)诱导子处理银杏细胞, 结合半定量

RT-PCR 技术在分子水平揭示以上 4 种诱导子能有效调控银杏内酯合成。

4.2 前体饲喂对银杏内酯产量的影响: 在对银杏内酯代谢途径认识清晰的基础上, 在细胞培养过程中进行前体饲喂也是提高目的产物的一个有效途径。Camper 等^[31]在培养基中加入银杏内酯的前体 GGPP, 取得良好的培养效果; Dai 等^[32]在银杏悬浮培养过程中添加异戊二烯(isoprene)和牻牛儿醇(geraniol), 银杏内酯量比对照组分别提高了 69% 和 13.8%; Kang 等^[33]研究悬浮培养的银杏细胞中银杏内酯的积累时发现, 添加 MVA 途径或 MEP 途径前体均能加快细胞生长, 添加 MVA 与 MEP 途径前体后, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)可提高 GA 量达 3.5 倍, 但对 GB 合成无影响, 焦磷酸香叶酯(GPP)提高 GB 量效果最高, 达 2.7 倍。该实验表明添加上游前体均可提高 GA 的积累, 而只有 IPP 以后的前体才能促进 GB 的合成。对前体饲喂的研究和对银杏内酯合成途径的深入认识, 对靶向调控基因促进银杏内酯的合成具有积极的意义。

4.3 银杏的遗传转化: 裸子植物转基因操作是农杆菌介导的遗传转化的一大难题, 银杏也不例外, 在遗传转化方面一直难以取得满意结果。Lauraín 等^[34]首次利用农杆菌型发根农杆菌菌株 GFBP2409 侵染银杏胚, 诱导发根获得成功。2003 年 Radia 等^[35]用野生型发根农杆菌 A4 菌株侵染银杏合子胚, 在 MS 培养基上产生愈伤组织小球, 将小球转移到 White 培养基发现有发根形成。分子检测表明 *rolA*, *rolB* 和 *rolC* 基因已经整合到了宿主细胞基因组中。通过遗传转化银杏细胞得到毛状根, 筛选银杏内酯高产单克隆株系, 是实现基因改良和工业化生物合成银杏内酯的有效途径, 也是近年来基因改良技术研究热点之一。

5 展望

心脑血管疾病是目前全球发病率最高的疾病之一, 是世界卫生组织公布的人类健康头号杀手。由于银杏内酯在治疗心脑血管疾病方面有良好疗效, 而且在增强记忆力、维持神经系统健康等诸多方面都表现出良好的效果, 因此银杏内酯的相关领域研究成为当今植物次生代谢研究的热点之一。在银杏内酯生物合成研究中, 多个相关的关键酶基因都已经被克隆, 这为采用代谢工程策略遗传改良银杏, 提高银杏内酯合成能力提供了必需的功能基因和作用靶点; 而银杏遗传转化的成功为这些基因的遗传转化提供了必要的技术支撑。这两方面的研究使得实现银杏内酯的代谢工程不再遥远。在开展代谢工程研究时, 面对众多的功能基因, 如何选择最有价值的关键酶基因就显得十分重要。由于前人研究证明 DXR 是 MEP 途径中最重要、最关键的关键酶基因, 其与下游关键酶基因的組合能够很好的提高目标产物量, 如在薄荷中提高薄荷醇量; 同时, 线型 GGPP 分子的特有环化反应被公认为是萜类合成中最关键的一步反应, 因而由 LS 催化的反应是银杏内酯代谢工程必需的一个功能基因。据此, 在开展银杏内酯代谢工程研究时, 在有多功能基因选择的情况下, 同时选择 DXR 和 LS 构建双基因表达载体, 遗传转化银杏可以

获得理想的结果。由于银杏内酯的下游合成途径中还有多步反应的基因没有分离,故银杏内酯合成的分子遗传学和生物化学研究还将在较长时期内深入开展并成为植物科学领域的一个前沿方向和热点领域。随着功能基因组学、代谢组学和生物信息学研究手段的不断丰富,阐明银杏内酯整个合成途径的分子机制已经为期不远。

References:

- [1] Jacobs B P, Browner W S. *Ginkgo biloba*: A living fossil [J]. *Am J Med*, 2000, 108: 341-342.
- [2] Bilia A R. *Ginkgo biloba* [J]. *Füoterapia*, 2002, 73(3): 276-279.
- [3] Van Beek T A, Scheeren H A, Rantio T, et al. Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromat*, 1991, 543: 375-387.
- [4] Nakanishi K. The ginkgolides [J]. *Pure Appl Chem*, 1967, 14(1): 89-113.
- [5] Maruyama M, Terahara A, Nakadaira Y, et al. The ginkgolides VI: Stereochemistry of the ginkgolides [J]. *Tetrahed Lett*, 1967(4): 315.
- [6] Cartayrade A, Neau E, Sohler C, et al. Sites of synthesis, translocation and accumulation of ginkgolides and bilobalide [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1997, 35(11): 859-868.
- [7] Neau E, Cartayrade A, Balz J P, et al. Identification of a possible intermediate compound by using inhibitors of cytochrome P-450-dependent oxygens [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1997, 35(11): 869-879.
- [8] Aule O, Furlholz A, Chang H S, et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings Nat Acad Sci United States America (PNAS)*, 2003, 100: 6866-6871.
- [9] Schwarz M K. Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: eine überraschende Geschichte [A]. *Dissertation of Doctor Degree of ETH Zurich* [D]. Switzerland: ETH Zurich, 1994.
- [10] Liao Z H, Chen M, Gong Y F, et al. Isoprenoid biosynthesis in plants: pathways, genes, regulation and metabolic engineering [J]. *J Biol Sci*, 2006, 6(1): 209-219.
- [11] Rodríguez-Consuepo M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: A metabolic milestone achieved through Genomics [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(3): 1079-1089.
- [12] Liao Z H, Chen M, Gong Y F, et al. A new geranylgeranyl diphosphate synthase gene from *Ginkgo biloba*, which intermediates the biosynthesis of the key precursor for ginkgolides [J]. *DNA Sequence*, 2004, 15(2): 153-158.
- [13] Hala G, Schepmann, Pang J H, et al. Cloning and Characterization of *Ginkgo biloba* levopimaradiene synthase, which catalyzes the first committed step in ginkgolides biosynthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 392(2): 263-269.
- [14] Est vez J M, Cantero A, Reindl A, et al. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(25): 22901-22909.
- [15] Gong Y F, Liao Z H, Guo B H, et al. Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *Planta Med*, 2006, 72: 329-335.
- [16] Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, et al. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis [J]. *Proceedings Nat Acad Sci United States America (PNAS)*, 1998, 95(17): 9879-9884.
- [17] Mahmoud S S, Croteau R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase [J]. *Proceedings Nat Acad Sci United States America (PNAS)*, 2001, 98(15): 8915-8920.
- [18] Liao Z H, Chen M, Gong Y F, et al. Molecular cloning and characterization of a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *DNA Sequence*, 2005, 16(2): 111-120.
- [19] Rohdich F, Wungsintaweekul J, Eisenreich W, et al. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings Nat Acad Sci United States America (PNAS)*, 2000, 97: 6451-6456.
- [20] Rohdich F, Wungsintaweekul J, Fellermeier M, et al. Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol [J]. *Proceedings Nat Acad Sci United States America (PNAS)*, 1999, 96: 11758-11763.
- [21] Kim S M, Kuzuyama T, Chang Y J, et al. Cloning and functional characterization of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (GbMECT) gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1435-1441.
- [22] Rohdich F, Wungsintaweekul J, Luttgen H, et al. Biosynthesis of isoprenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato [J]. *Proceedings Nat Acad Sci United States America (PNAS)*, 2000, 97: 8251-8256.
- [23] Kim S M, Kuzuyama T, Chang Y J, et al. Cloning and characterization of 2-C-methyl-D-erythritol 2, 4-cycoldiphosphate synthase (MECS) gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 829-835.
- [24] Walker K, Croteau R. Taxol biosynthetic genes [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58: 1-7.
- [25] Engpraser S, Taura F, Kawamukai M, et al. Molecular cloning and functional expression of geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Coleus forskohlii* Briq. [J]. *BMC Plant Biol*, 2004, 4(18): 1-8.
- [26] Hefner J, Ketchum R E B, Croteau R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 360: 62-74.
- [27] Liao Z H, Gong Y F, Kao G Y, et al. An intron-free methyl jasmonate inducible geranylgeranyl diphosphate synthase gene from *Taxus media* and its functional identification in yeast [J]. *Molec Biol*, 2005, 39(1): 14-20.
- [28] Carrier D J, Chauret N, Mancini M, et al. Detection of ginkgolides-A in *Ginkgo biloba* cell cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 10(5): 256-269.
- [29] Park Y G, Kim S J, Jung H Y, et al. Variation of ginkgolides and bilobalide contents in leaves and cell cultures of *Ginkgo biloba* [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2004, 9: 35-40.
- [30] Kang S M, Min J Y, Kim Y D, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba* [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2006, 42(1): 44-49.
- [31] Camper N D, Coker P S, Wedge D E, et al. *In vitro* culture of *Ginkgo* [J]. *In Vitro Plant*, 1997, 33(2): 125-127.
- [32] Dai J G, Zhu W H, Wu Y Q, et al. Effects of precursors and fungal elicitors on GKB production in suspension cultured cells of *Ginkgo biloba* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2000, 35(2): 151-155.
- [33] Kang S M, Min J Y, Kim Y D, et al. Effect of supplementing terpenoid biosynthetic precursors on the accumulation of bilobalide and ginkgolides in *Ginkgo biloba* cell cultures [J]. *J Biotechnol*, 2005, 123: 85-92.
- [34] Laurain D, Tremouillaux G J, Chemieux J C, et al. Production of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(1): 127-130.
- [35] Ayadi R, Tr mouillaux-Guiller J. Root formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba* [J]. *Tree Physiol*, 2003, 23: 713-718.