

从而达到减毒目的^[1];以甘草附子配伍中相应葡萄糖醛酸的比例,用醋酸葡醛内酯片进行研究,发现加入醋酸葡醛内酯片的附子煎液与单纯附子煎液相比,毒性的确有所下降,但该作用不明显^[26];再结合等分子数的甘草酸和甘草次酸与同剂量附子共煎后,甘草次酸的解毒作用比甘草酸要强,推断甘草酸口服后对附子有毒生物碱毒性的拮抗是由其水解产物来实现的。

刘岩等^[27]报道,甘草苷对乌头碱导致的心肌细胞离子通道 mRNA 异常表达有改善作用,这可能是甘草苷对乌头碱有减毒增效作用的机制之一。

2 附子配伍甘草的增效机制

目前的研究多认为甘草对附子的增效作用主要表现在两者各成分之间的协同作用。对四逆汤的拆方研究表明,附子与甘草合用的强心升压作用及其维持时间均优于单用附子或甘草,推测是由于甘草酸具有类肾上腺皮质激素样作用,能增强心肌细胞对附子的敏感性,起到强心升压作用^[28]。

杨明等^[1]结合我国学者在 20 世纪 80 年代发现附子水溶部分 ig 或 iv 均能对抗乌头碱所致的大鼠心律失常,因此认为附子自身也含有对抗乌头碱心脏毒性的成分,该成分或与甘草中的某些成分协同作用,共同达到减毒作用,从另一个角度实现了对双酯型生物碱的增效作用。

3 结语

临床应用表现出的优点以及优化改进的需要,使得人们不断从各个角度对附子甘草配伍进行研究,且已经取得了一定的认识,但其具体的物质基础和机制仍不完全清楚,甚至有相左的研究结果出现,因此还需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 杨明,刘小彬,黄庆德. 附子甘草配伍减毒增效机理探析[J]. 时珍国医国药, 2003, 4(4): 192-198.
- [2] 续海训,徐康雅. 参附注射液附子成分分析[J]. 中医杂志, 2003, 44: 91.
- [3] 陈建萍,谭炳炎,吴伟康,等. 四逆汤中附子甘草配伍规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3): 162-171.
- [4] 张梅,苏筱琳,雨田,等. 五种中药与附子配伍前后有效成分含量的变化[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2006, 8(3): 22-29.

- [5] 雷波,杜鹏,陈勇. 附子药对配伍规律的初步研究[J]. 湖北大学学报, 2007, 29(3): 280-282.
- [6] 许庆轩,刘志强,王勇,等. 八味地黄方与人参汤共煎液中毒性物质的电喷雾质谱研究[J]. 中草药, 2005, 36(1): 362-391.
- [7] 徐珊珊,陈长勋,高建平. 甘草与附子配伍减毒的有效成分及作用环节研究[J]. 中成药, 2006, 28(4): 526-530.
- [8] 苏孝礼,刘成基,胡衍军. 乌头碱和甘草酸相互作用的研究[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(12): 726-728.
- [9] 越皓,皮子凤,宋凤瑞,等. 附子不同配伍中生物碱成分的电喷雾质谱分析[J]. 药学报, 2007, 42(2): 202-205.
- [10] 丘小惠,何洁. 煎煮时间及甘草配伍剂量对附子中酯型生物碱含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3015-3017.
- [11] 马鸿雁,李楠,杨明. 乌头碱水解实验和热力学研究[J]. 成都中医药大学学报, 2005, 28(3): 572-591.
- [12] 王勇,刘志强,宋凤瑞,等. 附子配伍原则的电喷雾质谱研究[J]. 药学报, 2003, 38(6): 452-454.
- [13] 徐东铭,刘淑莹,孙晓波,等. 人参四逆汤药效物质及其作用机制和软电离质谱对复方物质基础研究[J]. 医学研究通讯, 2003, 32(12): 222-231.
- [14] 马鸿雁,刘小彬,李楠,等. 乌头碱和甘草酸作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 208-209.
- [15] 越皓,皮子凤,赵宇峰,等. 电喷雾串联质谱分析炮制附子中的化学成分变化[J]. 分析化学, 2007, 35(7): 952-963.
- [16] 王勇,石磊,宋凤瑞,等. 附子煎煮过程中酯型二萜类生物碱的酯交换反应的电喷雾串联质谱研究[J]. 质谱学快报, 2003, 17(4): 272-284.
- [17] 徐雅娟,宋凤瑞,赵洪峰,等. 人参四逆汤抗休克作用的有效组分成分分析[J]. 中草药, 2002, 33(5): 392-394.
- [18] 王勇,石磊,金东明,等. 四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的溶出和水解平衡[J]. 中草药, 2003, 34(4): 311-314.
- [19] 陈建萍,吴伟康,张敏生,等. 中药复方配伍规律研究的思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(1): 2-4.
- [20] 唐立中. 附子甘草配伍的药代动力学实验观察[J]. 山东医药, 2006, 46(10): 64.
- [21] 胡小鹰,彭国平. 甘草总黄酮抗心律失常研究[J]. 中草药, 1996, 27(12): 732-735.
- [22] 胡小鹰,彭国平,陈汝炎. 甘草拮抗附子心律失常毒性的机理研究[J]. 南京中医药大学学报, 1996, 12(5): 232-251.
- [23] 谢世荣,黄彩云,杨静娴. 甘草黄酮抗实验性心律失常的作用[J]. 基础医学与临床, 1998, 18(2): 72-74.
- [24] 张爱华,彭国平,文红梅,等. 甘草与附子配伍煎液的甘草黄酮含量测定[J]. 中成药, 1999, 21(4): 196-198.
- [25] 谢世荣,黄彩云,黄胜英. 甘草次酸抗心律失常作用的实验研究[J]. 医学导报, 2004, 23(3): 140-142.
- [26] 陈长勋,徐珊珊. 甘草、干姜与附子配伍减毒的物质基础与作用环节研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(6): 472-476.
- [27] 刘岩,赵世萍,董晔,等. 甘草苷及人参皂苷对乌头碱导致心肌细胞离子通道 mRNA 表达变化的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(5): 352-361.
- [28] 韩新民,陈玉生,丁建弥,等. 四逆汤对麻醉家兔低血压状态升压效应的初步拆方研究[J]. 中成药研究, 1983(2): 26.

药用丹参的基因工程改良研究现状与展望

田鹏,李刚强,王楠,刘德虎*

(中国农业科学院生物技术研究所,北京 100081)

摘要:系统介绍了国内外有关药用植物丹参的次生代谢产物基因工程、抗病基因工程、抗逆基因工程及植物生物反应器等方面的研究进展与现状,阐述了利用基因工程技术对丹参品质进行遗传改良的意义和应用前景,为今后丹参品质的基因工程改良研究工作提供借鉴。

关键词:丹参;基因工程;品质改良

中图分类号: R282.12

文献标识码: A

文章编号: 0253-2267(2009)08-1334-05

* 收稿日期: 2009-02-25

基金项目: 中国农业科学院生物技术研究所中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金

* 通讯作者: 刘德虎 Tel: (010)82109865/82106107 E-mail: liudehu@public3.bta.net.cn; liudehu2006@126.com

Current status and prospect on genetic engineering improvement of *Salvia miltiorrhizae*

TIAN Peng, LI Gangqiang, WANG Nan, LIU DeZhu

(Institute of Biotechnology, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Key words: *Salvia miltiorrhizae* Bunge; genetic engineering; improvement of quality

丹参 *Salvia miltiorrhizae* Bunge 系唇形科鼠尾草属植物, 始载于《神农本草经》, 被列为上品。其干燥根及茎入药, 具有扩张冠状动脉、增加冠状动脉血流量、防止心肌缺血和心肌梗死、降低胆固醇和血脂水平、抑制凝血、激活纤溶、保护肝损伤细胞以及消炎抗菌等多种功效^[1]。因此, 不同丹参制剂如丹参片、丹参滴丸在临床治疗心脑血管类疾病以及某些癌症方面, 已得到广泛应用且效果显著。丹参的活性成分目前主要被分为两大类: 一类为脂溶性的二萜醌类化合物, 其中包括丹参酮 A、丹参酮 B 和隐丹参酮等; 另一类主要为水溶性的酚酸类, 包括迷迭香酸、丹酚酸、紫草酸、原儿茶醛和丹参素等^[2]。随着丹参药理作用的发现, 市场需求量逐渐增加, 提高丹参药材有效成分的量的研究愈来愈受到人们的重视。许多基于毛状根培养、愈伤组织培养及细胞培养等生物工程的方法被先后应用于提高丹参活性成分量的研究^[3,4]。近些年, 随着植物基因工程技术的发展, 丹参次生代谢产物基因工程、抗病和抗逆基因工程以及丹参植物生物反应器的研究也都陆续开展起来, 为规模化生产丹参药用活性物质及培育高产优质抗逆的丹参新型品系奠定了基础。本文就国内外有关丹参基因工程方面的研究进展进行综述, 为今后丹参品质的基因工程改良研究工作提供借鉴。

1 丹参次生代谢产物基因工程

植物次生代谢产物基因工程是指利用基因工程技术对植物次生代谢途径的遗传特性进行修饰或改造, 进而改变目标次生代谢物质的量。目前, 该类研究主要包括代谢关键酶基因工程及其转录因子或调节基因的基因工程两个方面。通过基因工程途径, 提高控制某一特定次生代谢物合成的限速酶活性或在植物中引入新的次生代谢物合成途径, 可提高转基因植物目标次生代谢物的量和合成全新的外源次生代谢产物^[5]。如由于查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 是黄酮类代谢途径的早期酶, 也是增加黄酮醇产物的关键酶, Verhoeyen 等^[6]将矮牵牛 CHI 在番茄中超表达, 导致转基因番茄果皮中黄酮类的量增加 78 倍、果肉中黄酮醇增加 21 倍。然而, 作为重要中药材之一的丹参, 在该方面的研究尚属空白。为了能将植物次生代谢产物基因工程技术也应用于丹参, 以便其药用活性成分能更进一步积累, 了解丹参药用活性物质的代谢合成途径的分子机制及其调控模式, 从分子水平上阐述丹参药用活性物质的代谢途径和积累规律成为目前研究的重点。

1.1 丹参二萜醌类化合物的生物合成: 丹参二萜醌类化合物是丹参中一类非常重要的活性成分, 具有抑制血小板聚集、提高耐缺氧能力和改善冠状动脉供血等药理作用, 药用价值非常高。近年来, 随着植物萜类化合物生物合成途径的分子机制研究的飞速发展, 丹参二萜醌类化合物如丹参酮类

化合物的生物合成途径的研究也取得了一定的进展, 这对于今后通过基因工程途径调控生物合成代谢途径, 从而提高目标代谢产物的量具有非常重要的意义。

丹参酮类化合物由类异戊二烯代谢途径产生, 其前体物质是 Δ^2 -异戊烯焦磷酸 (IPP)。近年来, 人们发现植物细胞内的 IPP 形成途径有两种, 分别是在质体中存在的丙酮酸/磷酸甘油醛代谢途径 (DXP) 和在线粒体、细胞质和内质网存在的甲羟戊酸代谢途径 (MVA)。这两条途径由于分布在植物细胞中的不同区域, 看似完全隔离, 但是在一定程度上 IPP 可能会在细胞质和质体之间进行穿梭。关于 MVA 途径与 DXP 途径之间的相互影响, Ge 等^[7]以丹参发状根为研究对象, 用酵母诱导子和银离子来诱导产生丹参酮, 从而研究丹参酮类化合物生物合成途径。实验结果表明, 丹参酮类化合物的生物合成途径主要是 DXP 途径, 同时也受到 MVA 途径的影响, 这一发现对进一步利用基因工程技术调控丹参酮类化合物的生物合成提供了重要的理论依据。

随着丹参酮类化合物生物合成代谢途径逐渐被认识, 对于生物合成途径中参与合成参酮类化合物的关键酶的研究也取得了显著的进展。目前, 国内外所报道的在二萜生物合成中的关键酶类有 Δ^2 -磷酸脱氧木酮糖合成酶 (DXS)、 Δ^2 -磷酸脱氧木酮糖还原原构酶 (DXR)、2,2-甲基赤藓糖醇-2,4-二磷酸合成酶 (Yg1P)、2,2-甲基赤藓糖醇-2,4-胞苷二磷酸激酶 (YchB)、2,2-甲基赤藓糖醇-2,4-环焦磷酸合成酶 (Yg1B) 以及异戊烯焦磷酸合成酶 (IPPS)^[8]。与此同时, Δ^2 -羟基-2,2-甲基戊二酰辅酶 A (HMGCoA) 作为 MVA 途径的第一个关键酶, 其诱导活性与丹参酮类物质的合成呈正相关^[9]。在丹参酮类成分生物合成途径关键酶的基因克隆方面, 最近, 王学勇以丹参毛状根培养体系为研究对象, 加入外源性生物和非生物诱导子以促进此代谢产物的积累, 并通过与对照组比较, 研究此代谢产物积累的变化和差异情况。利用差异表达基因分析技术, 研究了丹参酮类成分的生物合成相关基因, 结果获得了丹参在诱导子作用下的基因表达谱, 克隆了 6 个脂溶性丹参酮类成分代谢相关酶和 1 个水溶性成份丹酚酸类代谢途径中的关键酶基因^[10]。中国中医科学院中药研究所也克隆获得了丹参酮类物质合成中的关键酶基因之一柯巴基焦磷酸合酶 (copalyl diphosphate synthase, CPS)^[11]。

1.2 丹参水溶性酚酸类化合物的生物合成: 由于丹参素、丹酚酸 B 和迷迭香酸等水溶性化合物具有重要的抗炎、抗菌和抗氧化等生理活性, 加上传统中药都是以水煎服的用药方法, 丹参水溶性酚酸类化合物目前逐渐成为研究热点。

目前, 尽管丹酚酸和紫草酸的合成机制尚不明确, 但是关于迷迭香酸的生物合成过程已经比较清楚。对丹参同科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt 的研究发现, 迷迭

香酸是由酪氨酸代谢途径中间产物丹参素和苯丙烷类代谢途径中间产物咖啡酸缩合形成的一种酯类。此过程分为两步:一方面,苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL:E.C. 4.3.1.5)作用下生成肉桂酸,生成的肉桂酸在细胞色素 P450 单加氧酶家族成员肉桂酸 ω 羟化酶(C4H:1.14.13.11)和 ω 香豆素辅酶 A 连接酶(4CL:E.C.6.2.1.12)的催化下生成 ω 香豆酰辅酶;另一方面,酪氨酸经酪氨酸氨基转移酶(TAT:E.C.2.6.1.5)和羟苯基丙酮酸还原酶(HPPR:E.C.1.1.1.237)作用生成丹参素,然后与苯丙烷类代谢途径的中间产物 ω 香豆酰辅酶 A 在迷迭香酸合成酶(RAS)以及细胞色素 P450 单加氧酶的另一家族成员的作用下生成迷迭香酸^[12]。紫苏中迷迭香酸合成途径的虽然在丹参中还没有得到证实,但是必然对丹参水溶性酚酸类物质代谢途径的分析研究提供借鉴。

到目前为止,大部分植物苯丙烷类代谢途径及酪氨酸代谢途径的关键酶基因、调节基因及转录因子都已被克隆,如苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸 ω 羟化酶基因(C4H)、酪氨酸氨基转移酶(TAT)、 ω 香豆酸 ω CoA 连接酶基因(4CL)、羟苯基丙酮酸还原酶基因(HPPR)、迷迭香酸合成酶基因(RAS)和 MYB 转录因子基因等。在有关该代谢途径关键酶基因的克隆研究方面,赵淑娟等^[13]从丹参中分离克隆到 4CL 基因家族的两个成员 Sm4CL1 (gb|AY237163)和 Sm4CL2 (gb|AY237164);段艳冰^[14]从丹参中获得了 1 条 HPPR 基因(DQ099741),同时从 cDNA 水平克隆获得了丹参的 C4H 基因,并对其在不同胁迫条件下的表达进行了分析。易博等^[15]也从丹参中分离克隆得到与迷迭香酸次生代谢途径相关的 3 个酶基因:酪氨酸氨基转移酶基因(tyrosine aminotransferase gene, SmTAT)、对羟基苯丙酮酸还原酶基因(ω hydroxyphenylpyruvate gene, SmHPPR)和对羟基苯丙酮酸双氧化酶基因(ω hydroxyphenylpyruvate reductase gene, SmHPPD)的全长 cDNA 序列和基因组 DNA 序列,并分别对各基因推测蛋白进行了生物信息学可信性分析,实现了基因水平对迷迭香酸生物合成酪氨酸支路相关酶基因的沟通。鉴于丹参苯丙氨酸解氨酶在苯丙烷类代谢途径中是关键酶,并且也是多数次生代谢物质合成途径的起始位点酶,宋婕等^[16]克隆获得了这种酶基因家族成员之一 SmPAL1 基因的全长机器 ω 侧翼序列,并对其在不同器官、不同胁迫条件下的表达情况进行分析,也初步探讨了该基因与丹参生长发育及此生代谢物合成之间的关系。

1.3 新的次生代谢产物的生物合成:随着植物次生代谢产物陆续被研究和开发及植物次生代谢基因工程的进一步发展,利用基因工程手段将外源基因导入到植物中进行表达,从而使植物自身合成全新的外源次生代谢产物逐渐成为可能。

在对丹参的转基因研究中,陈海敏等^[17]将来自葡萄的白藜芦醇(resveratrol, Res)合酶基因(RS)导入到丹参中,经 PCR 和 PCR-Southern 杂交检测,确定 RS 基因已整合到部分转基因丹参基因组中,与此同时,HPLC 方法检测证实白藜芦醇不仅存在于丹参叶片中,而且在丹参直根中也有所发

现。尽管其表达量目前可能仍比较低,但可通过更换其他类型的强启动子、增加外源基因的拷贝数及改变外源基因表达方式,有可能进一步提高白藜芦醇在丹参直根中的表达水平。白藜芦醇是一些植物在恶劣环境条件下或遭遇到病原体侵时所产生的天然二苯乙烯类多酚物质,具有抵御多种病原真菌侵染的能力。近年来的研究发现,白藜芦醇对人体具有多种有益功效,如防治心血管疾病、抗肿瘤、抗病毒及免疫调节功能等。含有白藜芦醇的转基因丹参能否加强丹参制剂在心血管等方面的治疗作用以及能否增强丹参自身的抗病性都有待于该研究的后续工作。

1.4 丹参次生代谢基因工程的发展方向:由此可见,丹参活性成分的次生代谢是由多种关键酶参与,多支路的和复杂的代谢途径。因此,只有涉及这些代谢途径的酶被更多的克隆和鉴定出来,才能更加清楚地阐明有关丹参活性成分完整的生化合成途径及途径中可能存在的中间体。也只有了解相关关键酶的前提下,才有可能尝试用这些酶的基因分别转化丹参,使丹参中水溶性或脂溶性药用活性化合物生物合成相关酶的基因过量表达,抑制合成竞争底物的酶的基因表达,从而有目的地调控药用活性化合物的生物合成,达到在转基因丹参中有选择性地过量表达主要药用成分的目的。最近,通过农杆菌介导的方法,王倩^[9]将来源于构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 的 ω 羟基 ω 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因(ω hydroxy ω methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGR)基因导入并整合到丹参基因组中,但是没有进行利用 HMGR 基因的过量表达对丹参酮等萜类化合物的合成与积累的影响的相关研究。除了有选择性地过量表达关键酶基因,由于丹参的次生代谢涉及多个基因的表达,同时增强多个基因的协同表达也可能是提高丹参目标次生代谢物产量所必需的。而多个酶基因的协同表达,与这些基因调控序列中相同或相似的顺式作用元件受到相同的转录因子或调节基因的作用相关^[18]。增强这些重要基因的转录因子或调节基因的表达,是实现增强多个基因协同表达的可行途径。因此,克隆分离与丹参次生代谢基因表达的调节基因和转录因子多种基因,将会成为今后丹参次生代谢基因工程研究的新的方向。

2 丹参抗病基因工程

植物抗病基因工程是指通过基因工程的手段,将外源或内源的抗病基因导入植物体内表达以提高转基因后代的抗病能力。根据抗病对象不同,可以分为抗病毒、抗细菌和抗真菌基因工程。目前国内外已经商品化生产的抗病转基因植物尚不多见,其中包括抗木瓜环斑病毒的番木瓜、抗烟草花叶病毒的烟草以及甜椒,它们均是在导入了病毒的外壳蛋白基因后而获得的。已进入田间进行安全性评价的抗病转基因作物实际上仍有很多,如抗细菌性白叶枯病的转基因水稻、抗马铃薯 Y 病毒的转基因马铃薯以及抗稻瘟病的转基因水稻等,但基于安全和政策方面的原因,迄今为止仍未获得商品化生产证书。

丹参的生长、药材的品质及产量均受病虫害影响较大,

目前,国内外有关丹参病害的报道比较少,主要有丹参紫纹羽病^[19]、丹参叶斑病^[20]和丹参花叶病等^[21]。河北农林科学院利用生物学、电镜观察、血清学和基因序列测定等方法对丹参花叶病的病原进行了初步研究,结果发现黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)与该病害密切相关,同时也对 CMV 丹参分离物进行了其 CP 基因序列分析,并与 CMV 其他株系的 CP 基因进行了比较。随后的研究也曾提出将该 CP 基因的密码子变成植物不常用的稀有密码子后,导入植物后可能达到高抗甚至免疫的效果,该研究为下一步进行丹参的抗病毒基因工程育种奠定了良好的基础^[21]。但到目前为止,关于国内外利用基因工程手段培育抗病虫新型转基因植物的报道,在丹参方面尚属空白,这说明丹参抗病基因工程目前仍然处于起步阶段,还需要相关研究工作者的进一步努力。

3 丹参抗逆基因工程

在丹参的生长发育过程中,干旱、盐碱、高温和低温等逆境条件都会在很大程度上影响其正常的生理状态,严重时会导致丹参药材的产量和品质大幅下降。目前,在植物抗逆基因工程研究方面,人们利用现代分子生物学手段,已经能够在基因组成、表达调控及信号转导等分子水平上认识和探索植物的抗逆机制,并且也克隆出一些抗逆相关基因,如渗透调节物质生物合成关键酶脯氨酸合成酶基因、LEA 蛋白基因、水通道蛋白(AQP)基因和抗冻蛋白(APF)基因等。但是,目前植物抗逆基因工程在丹参方面的研究仍然处于起步阶段,最近,韩立敏等^[2]成功克隆了丹参的抗坏血酸过氧化物酶基因(SmAPX)和丹参谷胱甘肽过氧化物酶基因(SmGPX),并详细分析了这两种基因在丹参各部位的表达情况及表达量与不同盐胁迫时间和浓度之间的关系,从而开展了丹参体内抗氧化保护酶基因的研究,为研究植物在逆境下的生长发育的分子机制提供了理论基础。王丽娟等^[23]将源自小麦的抗逆基因TaLea3整合到丹参基因组中,并对转基因丹参进行耐逆性实验分析,结果表明,转基因丹参植株提高了耐盐和耐干旱的能力。由此可见,利用现代转基因技术将抗逆基因转入到丹参中,从而获得新型、抗逆和高品质转基因丹参,对丹参品质改良和进一步提高药用成分的产量具有重要意义和广阔的应用前景。

4 其他功能基因的研究

近几年来,除了关于丹参药用活性物质生物合成途径中的关键酶基因的各项研究正在不断展开外,丹参其他特殊功能基因的研究也逐渐引起了国内很多学者的重视。如脱水素基因DHN2^[24]、丹参钙调蛋白基因^[25]乙烯应答结合蛋白基因^[26]等,其中中国中医科学院和佳木斯大学对丹参金属硫蛋白基因进行了较为详细的研究,成功克隆了丹参金属硫蛋白MT22基因,并且研究了铜离子和锌离子诱导丹参毛状根中MT基因表达的情况,证实了MT基因在丹参对铜、锌元素的吸收富集方面发挥着重要的作用^[27,28]。丹参各种功能蛋白基因的研究,为进一步研究丹参各种生理生化途径、抗病及抗逆分子机制奠定了物质基础。但值得一提的是,上

述实验研究大部分仍停留在生物信息学分析和基因克隆及表达分析阶段,对于后续的基因功能的研究仍然还很薄弱,丹参的基因工程研究进展仍然比较迟缓,这也说明国内科技部门及科技人员对丹参分子生物学研究的重视程度仍亟待加强。

5 丹参作为植物反应器的研究

植物生物反应器是近 20 年才逐渐发展起来的一种应用性很强的研究领域,作为未来的一种低投入和高产出的生物产业,现在正处于快速的发展阶段。目前,已有多种植物用来进行外源蛋白基因表达的研究,常用的植物有拟南芥、烟草、油菜、马铃薯和蕃茄等,而且已经有多数外源蛋白基因在这些植物中得到了高效表达。利用植物生物反应器表达的疫苗有乙型肝炎疫苗、狂犬病疫苗、口蹄疫病毒疫苗等。利用植物表达的其他药用蛋白和活性肽还有胰岛素和脑啡肽等。丹参本身作为一种重要的中草药,含有多种抗血栓药用成分,同时因为其易于遗传转化,便于存储,既可以营养繁殖也可以通过种子繁殖,也是一种很好的受体植物。因此,可以利用基因工程技术,将有关纤溶的酶基因转入到丹参植物中,以期获得丹参和纤溶酶的抗心血管疾病协同作用。本课题组目前在成功建立丹参的遗传转化系统的基础上,已成功将具有强纤溶活性的蛋白酶基因和降血脂蛋白基因转入到丹参中,该研究为进一步提高丹参的药用品质、扩大其应用范围以及利用转基因丹参研发新型药物等提供了强有力的支持,相关研究成果已申报了国家发明专利。

6 存在的问题与展望

目前,尽管国内外在丹参的基因工程研究方面已开展了大量的工作,同时也取得了令人鼓舞的成果,如丹参抗病毒基因工程和抗逆基因工程也已经逐渐开展、丹参次生代谢途径获得进一步的明确以及利用生物信息学方法分离克隆丹参功能基因也步入成熟阶段。但是,在丹参基因过程改良研究方面仍然存在着以下几方面问题:(1)丹参水溶性及脂溶性药用活性成分生物合成途径详细过程亟待进一步明确和阐明。目前,各功能基因在生化合成途径中的功能虽部分得到证实,但整体而言仍缺乏系统的研究,而合成代谢途径中其他一些关键酶基因也有待开发和研究。与此同时,在利用基因工程技术对植物次生代谢途径的遗传特性进行改造,进而改变次生代谢物质在植物体中的产量方面,对丹参的研究尚属空白。(2)利用分子生物学和生物信息学方法分析丹参品质相关基因的研究工作,不管从覆盖面和基因数目方面都十分有限,基因的克隆与分析及其后续的功能鉴定都有待进一步深化,因此,更多的相关基因需要被分离和克隆。(3)对于丹参土传病害的防治仍然停留在化学农药水平,这不仅危害环境,而且会大幅度降低药材的产量和品质。植物抗病基因工程作为一种新型、清洁的技术,正在越来越受到重视,然而目前丹参抗病基因工程研究仍然进展缓慢,利用基因工程技术培育抗病虫害的优良丹参品种具有极大的开发潜力。(4)植物表达外源蛋白一直都存在表达量低、表达稳定性差及基因沉默的问题,丹参也不例外。随着分子生物学技术的

不断进步,提高外源基因表达量还是有可行的方法,如对目的基因进行修饰和改造、对表达载体进行改造以及目的基因与分子伴侣协同表达等。这些都是今后努力的方向,它们将为丹参成为新一代的宿主植物奠定物质基础。

虽然丹参的基因工程改良研究进程相对缓慢,以及丹参的基因工程研究技术还存在很多问题,但是随着丹参药用价值进一步被社会重视、丹参生物工程技术的继续深化和丹参生物反应器技术走向成熟,大规模、低成本、高效率生产丹参药用活性物质及培育高产优质抗逆的丹参新型品系将成为可能。

参考文献:

- [1] 李家实. 中药鉴定学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996
- [2] 余世春, 琚小龙, 段广勋. 1 丹参的化学成分和药理活性研究概况 [J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2002, 1(2): 43247
- [3] 郭肖红, 高文远, 李克峰, 等. 1 丹参不定根组织培养的研究 (0) 碳源、氮源和磷源对丹参不定根培养的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 9072911
- [4] 晏琼, 胡宗定, 吴健勇. 1 生物和非生物诱导子对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 262265
- [5] 何水林, 郑金贵, 王晓峰, 等. 1 植物次生代谢: 功能、调控及其基因工程 [J]. 应用于环境生物学报, 2002, 8(5): 558563
- [6] Verhoeven M E, Bovy A, Collins G, et al. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. J Exp Bot, 2002, 53: 20922106
- [7] Ge X C, Wu J Y. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor [J]. Plant Sci, 2005, 168(2): 487491
- [8] Lichtenthaler H K. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants [J]. Physiol Plant, 1997, 101: 643652
- [9] 王倩. HMGR 基因表达载体构建及其对丹参遗传转化的研究 [D]. 陕西师范大学硕士学位论文, 2005
- [10] 王学勇. 1 丹参毛状根基因诱导表达分析及其有效成分生物合成基因的克隆研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2007
- [11] 崔光红. 1 丹参道地药材 cDNA 芯片构建及毛状根基因表达谱研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2006
- [12] Petersen M, Hausler E, Karwatzki B, et al. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth [J]. Planta, 1993, 189: 10214
- [13] 赵淑娟. 1 丹参 2 香豆酸: 辅酶 A 连接酶家族基因克隆及功能分析 [D]. 上海: 第二军医大学, 2003
- [14] 段艳冰. 1 丹参中迷迭香酸生物合成途径的苯丙氨酸支路基因的克隆及研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2006
- [15] 易博. 1 丹参迷迭香酸代谢酪氨酸支路重要基因克隆及调控分析 [D]. 上海: 第二军医大学, 2007
- [16] 宋婕. 1 丹参苯丙氨酸解氨酶基因 (SmPAL1) 的克隆及其功能初探 [D]. 陕西师范大学硕士学位论文, 2007
- [17] 陈海敏, 李刚强, 刘德虎, 等. 1 白藜芦醇合酶基因的克隆及丹参的转化 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 12321238
- [18] 何水林. 1 植保素代谢与植物防御反应 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2002
- [19] 匡红柳. 1 我省钟祥市首次发现检疫对象))) 丹参紫纹羽病 [J]. 湖北植保, 2001, 1(1): 26
- [20] 肖卫平, 王睿, 夏忠敏, 等. 1 丹参叶斑病的发生规律及防治措施研究 [J]. 耕作与栽培, 2004, 2: 4242
- [21] 吴志明, 温春秀, 彭卫欣, 等. 1 黄瓜花叶病毒丹参株系外壳蛋白基因的克隆和序列分析 [J]. 河北农业科学, 2004, 8(2): 22271
- [22] 韩立敏. 1 丹参 APX 和 GPX 基因克隆及表达分析 [D]. 陕西师范大学硕士论文, 2007
- [23] 王丽娜. 1 Talea 3 基因植物表达载体构建及其对丹参遗传转化的研究 [D]. 陕西师范大学硕士学位论文, 2005
- [24] 刘世海, 闫亚平, 王喆. 1 丹参 DHN2 基因的克隆与序列分析 [J]. 分子育种, 2005, 3(1): 66270
- [25] Zhang C, Wang Z Z. Isolation of a calmodulin cDNA from *Salvia miltiorrhiza* Bunge and construction of its antisense expression vector [J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(3): 332344
- [26] 崔光红, 袁媛, 黄璐琦, 等. 1 丹参乙烯应答因子结合蛋白基因的克隆分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(1): 2972299
- [27] 毛莹, 崔光红, 黄璐琦, 等. 1 铜、锌离子影响丹参金属硫蛋白 MT2 基因表达 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(3): 3892392
- [28] 崔光红, 毛莹, 黄璐琦, 等. 1 丹参功能基因组学研究 (0))) 丹参金属硫蛋白 MT2 基因的分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 13921395

四叶参化学成分和药理作用研究进展

谷红霞, 周茂金*, 苏美英*

(泰安市中心医院, 山东 泰安 271000)

摘要: 随着对四叶参的深入研究, 其化学成分和药理作用已逐渐被发现。四叶参主要成分为生物碱、甾萜类、黄酮类、挥发油、多种氨基酸等, 药理作用包括抗氧化、抗癌、改善免疫功能、保肝、镇咳、抗疲劳和对神经系统的影响等。现就四叶参的化学成分和药理作用研究进展进行简要概述, 为其研究与开发提供有价值的参考。

关键词: 四叶参; 免疫功能; 抗炎

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1338-03

四叶参 *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. 是桔梗科党参属多年生缠绕性草本植物, 又名羊乳、轮叶党参、山海螺。其根既可食用, 又是常用的民间草药, 是一种药食兼用植物。传统医学认为其根入药有补气养阴、润肺生津、消肿

排脓及解毒疗疮等功效^[1]。四叶参为多年生缠绕草本, 长达 2 m 以上, 全株有白色乳汁, 根似胡萝卜, 有多数短分枝。短枝上的叶 4 片簇生, 椭圆形或菱状卵形, 花萼先端 5 裂, 花冠钟状 5 裂, 内有紫色斑点^[1]。四叶参主要分布于我国东北、

* 收稿日期: 200810212

基金项目: 泰安市科技局资助项目

作者简介: 谷红霞 (1963), 女, 山东济南, 副主任药师, 研究方向为中药制剂与开发。 Tel: 13583865052 E-mail: yuhongxiata@163.com

* 通讯作者: 周茂金 Tel: (0538)2138623 E-mail: mjzhoutj@sina.com