

• 综述 •

青蒿素生物合成与基因工程研究进展

刘万宏^{1,3}, 黄玺², 张巧卓³

1. 重庆科技学院化学化工学院, 重庆 401331

2. 西南药业股份有限公司, 重庆 400038

3. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715

摘要: 青蒿素因其在植物中的量很低并不能满足患者需求, 提高青蒿中青蒿素的量是植物次生代谢研究领域的热点之一。综述了青蒿素生物合成途径的相关酶与基因, 青蒿素生物合成的部位及特异性基因表达研究, 植物激素和诱导子对青蒿素生物合成的影响, 以及利用基因工程对青蒿进行遗传改良; 提出了基因工程技术是提高青蒿素的理想途径之一。

关键词: 青蒿; 青蒿素; 生物合成; 基因工程; 诱导子

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)01-0101-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.019

Advances in studies on biosynthesis and genetic engineering of artemisinin

LIU Wan-hong^{1,3}, HUANG Xi², ZHANG Qiao-zhuo³

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China

2. Southwest Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 400038, China

3. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinin; biosynthesis; genetic engineering; elicitor

疟疾是一种严重的流行性疾病, 世界卫生组织估计每年至少有 380 万人感染疟疾, 尤其在发展中国家, 每年超过 100 万人因患疟疾而死亡^[1]。青蒿素 (artemisinin) 由于其独特的过氧桥结构, 对抗氯喹疟疾和脑型疟疾疗效显著且具有速效和低毒的特点^[2]。世界卫生组织推荐青蒿素联合疗法 (artemisinin combination therapy, ACT) 作为治疗疟疾的首选方法。此外, 现代药理学研究发现青蒿素及其衍生物在杀灭寄生虫^[3]、抗肿瘤^[4-5]及抵御艾滋病毒^[6]等方面具有很好的效果, 这使得国际上对青蒿素的需求非常巨大。然而, 青蒿素目前仅在青蒿 (黄花蒿) *Artemisia annua* L. 中发现, 植物体内青蒿素的量很低 (质量分数为 0.01%~1%), 并不能满足患者治疗的需求^[7]。

近年来, 在诸如微生物改造发酵生产青蒿素前

体、揭示青蒿素生物合成分子机制^[8]、青蒿转基因、细胞培养合成青蒿素、探索青蒿素与外界环境关系^[9]、高产青蒿育种等方面取得大量科研成果。本文从目前了解的青蒿素生物合成途径出发, 综述了青蒿素生物合成途径、合成部位、外源激素及诱导子对青蒿素生物合成的影响, 以及在青蒿基因工程领域近期研究成果。

1 青蒿素生物合成途径

青蒿素为 C₁₅ 骨架的倍半萜类化合物, 其生物合成途径可分为 3 个阶段 (图 1): 1) 萜类化合物 C₅ 活性单位异戊烯焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 与其异构体二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 经过酶促反应合成紫穗槐二烯 (amorpho-4, 11-diene, AD); 2) AD 到二氢青蒿酸 (或青蒿酸); 3) 二氢青蒿酸 (或青蒿酸) 经过

收稿日期: 2012-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: DBR2 基因超表达与胞内 ROS 协同作用对青蒿素生物合成的影响 (31200223)

作者简介: 刘万宏 (1979—), 男, 讲师, 主要研究方向为药用植物次生代谢工程。Tel: (023)65022211 E-mail: liuwanh@163.com

网络出版时间: 2012-12-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121219.1641.003.html>

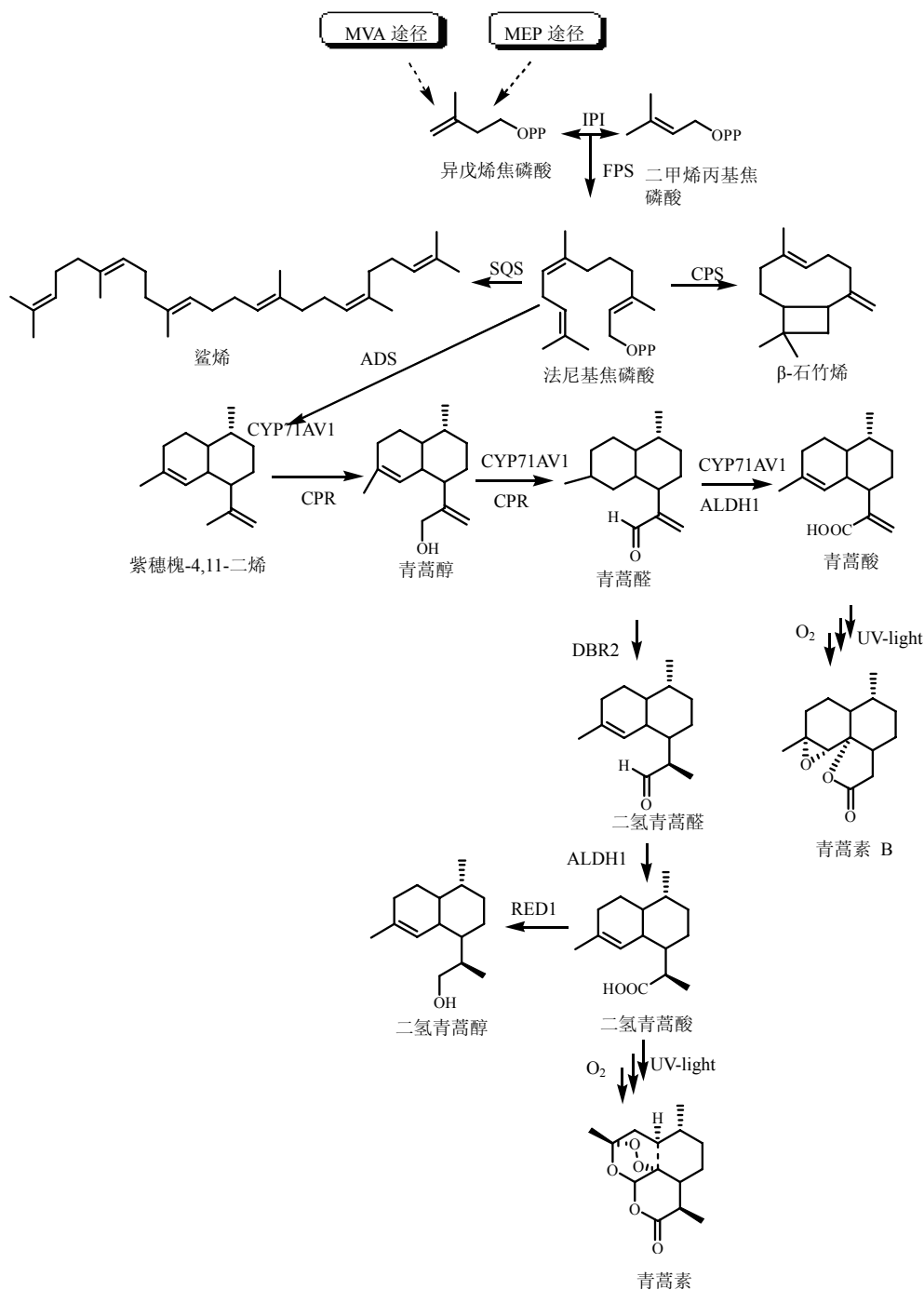


图1 青蒿素生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of artemisinin

不同的氧化反应合成青蒿素^[10]。在整个青蒿素生物合成途径研究中,有3个值得探讨的问题:1)青蒿素 C₁₅ 骨架来源于植物经典的甲羟戊酸途径 (mevanolate pathway, MVA) 或是新近发现的 MEP 途径 (methylerythritol phosphate pathway), 抑或两者均有贡献; 2) 青蒿素的直接前体是青蒿酸还是二

氢青蒿酸; 3) 二氢青蒿酸 (青蒿酸) 通过酶促反应或自动转化为青蒿素。

1.1 青蒿素 C₁₅ 单元合成主要来源途径

青蒿素属于倍半萜类化合物, 其碳骨架来源于共用前体法尼基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP), 后者是在 FPPS 的作用下将 IPP 和 DMAPP 以 2 : 1

的比例合成获得^[11]。然而在高等植物中,合成 C₁₅ 活性单位的途径有来源于定位于胞质的 MVA 途径和定位于质体的 MEP 途径。虽然在萜类化合物的合成过程中,上述两条途径存在“Closs-Talk”^[12],然而目前证实某些化合物合成过程中,这两条途径对活性单位的贡献有主次之分,如萝芙木中萜类吲哚生物碱异戊二烯基团主要来源于 MEP 途径^[13]。

近年来对于青蒿素前体来源途径的研究主要集中在: Weathers 小组^[14]通过 MVA 途径特异性阻断剂洛伐他汀(Mevinolin)和 MEP 途径阻断剂磷酸霉素(Fosmidomycin)分别处理青蒿幼苗,均发现青蒿素的量较对照显著降低,说明两条途径对青蒿素的合成均有重要影响;波兰科学院 Abdin 小组^[15]实验发现 MVA 途径的关键酶 HMGR 活性与青蒿素的量密切相关,阻断 MEP 途径青蒿素量仅降低 14.2%,而阻断 MVA 途径,较对照青蒿素量降低了 80.4%,提示 MVA 途径是青蒿素生物合成中碳骨架的主要贡献者;Schramek 等^[15]用 ¹³C₂O₂ 作为碳源饲喂青蒿植株,对青蒿素及其碳骨架前体进行了深入研究,发现青蒿素骨架的主要前体为 (E, E)-FPP,且 MEP 途径提供 1 分子的 IPP 构成 FPP 的核心骨架, MVA 途径提供另外的 1 分子 IPP 和 1 分子 DMAPP,研究结果同时解释了青蒿素合成场所腺毛体中不同细胞的具体功能。由此可见, MVA 途径和 MEP 途径对青蒿素碳骨架的合成均提供了 C₁₅ 基本单元。

1.2 二氢青蒿酸是青蒿素直接前体

在早期的研究中,青蒿酸(artemisinic acid)一度被认为是青蒿素生物合成的直接前体。Sangwan 等^[17]通过体内实验与无细胞系统实验发现,用 ¹⁴C 标记的青蒿酸能够转化生成青蒿素 B 及青蒿素,提出青蒿酸可能是青蒿素生物合成的直接前体。然而,如今更多的实验证据显示二氢青蒿素是青蒿素生物合成的直接前体,青蒿酸也被部分学者认为是青蒿素生物途径中的“Dead End”代谢物^[10]。Kim 等^[18]最早在青蒿瘤状物中发现青蒿酸,但其不能转化为二氢青蒿酸,且青蒿酸并不能生成青蒿素,推测青蒿素来源于二氢青蒿酸。Wallaart 等^[19]发现青蒿素的量较高的植株中二氢青蒿酸量亦较高,而青蒿酸的量相对较低;经过夜间霜冻胁迫,青蒿中的二氢青蒿素的量降低而青蒿素的量增高,推测植株通过二氢青蒿酸能够与细胞中活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS)反应抵御胁迫,并生成青蒿素。分别用 [15-¹³C₂H₃]- 和 [15-C₂H₃]- 标记的 2

种二氢青蒿酸饲喂青蒿根部,分析叶片代谢产物发现二氢青蒿酸是 11, 13-二氢-紫穗槐烷类(如青蒿素)和杜松烷类倍半萜的直接前体,而且其可以通过自发的化学反应快速生成代谢产物^[20]。Bertea 等^[21]通过分析青蒿叶片与腺毛体中一系列有关青蒿素合成的氧化还原酶,绘制出青蒿素合成途径的第 2 阶段,即紫穗槐二烯到二氢青蒿酸;利用同位素标记的青蒿酸饲喂青蒿,发现青蒿素 B 是青蒿酸的主要代谢产物,而且青蒿酸不能转化为二氢青蒿酸和青蒿素^[22]。因此,二氢青蒿素作为青蒿素生物合成直接前体的观点已经被广为接受。由此可见,青蒿植株中二氢青蒿酸的合成是实现青蒿素积累的重要前提。

1.3 单线氧激发青蒿素前体自发氧化生成青蒿素

青蒿素合成的最后一个阶段即青蒿素直接前体是否通过酶促反应生产青蒿素的研究具有重要的科学意义与实用价值。由于青蒿素生物合成的最后一步即二氢青蒿酸合成青蒿素的反应机制并不清晰,所以利用微生物工程仅能发酵生产青蒿素的前体二氢青蒿酸及青蒿酸^[23]。印度 Narasu 小组^[24]在以青蒿叶片为材料制备无细胞提取液,发现该提取液能够将青蒿素 B 催化合成青蒿素,提示可能存在催化合成青蒿素的酶;随后该小组在次年报道已纯化并鉴定了上述蛋白质,该酶是由 2 个相对分子质量分别为 2.1×10^4 和 1.1×10^4 的亚基组成的二聚体,全酶总相对分子质量为 6.6×10^4 ,以青蒿素 B 为底物的 K_m 值为 0.5 mmol/L^[25]。这一结果首次为青蒿素最后一步是酶促反应的推测提供了证据,并为利用微生物工程生产青蒿素提供了依据。然而很遗憾的是直到现在依然未见该蛋白序列或对应核苷酸序列的报道。

目前更多的实验证据推测二氢青蒿酸转化为青蒿素可能为非酶促反应。Towler 等^[26]发现二甲基亚砜(DMSO)能够有效刺激青蒿植株中青蒿素的积累,但没有对其机制进行阐述。进一步的研究发现, DMSO 提高青蒿素积累的机制并不是提高了关键基因(如 ADS、CYP71AV1)的表达,而 DMSO 诱导 ROS 的生成可能是提高青蒿素量的关键因素^[27]。此外,利用外源水杨酸(SA)喷洒青蒿叶片发现青蒿素量提高,其中原因之一为 SA 刺激植物体细胞产生 ROS,后者促进了二氢青蒿酸转化为青蒿素^[28]。在早期的实验中, Wallaart 等^[29]通过体外感光实验,推测二氢青蒿酸可能起到清除 ROS 的作用,从而生成青蒿素。二氢青蒿酸自发氧化生成青蒿素的步骤

已通过体外实验得到合理解释^[30]。通过以上研究,二氢青蒿酸可能通过自发氧化的形式而非酶促反应生成青蒿素的机制可以获得前期实验结果的支持,而且二氢青蒿酸转化为青蒿素的步骤可能依赖细胞内 ROS 的爆发。

2 青蒿中青蒿素生物合成场所与特异表达基因

腺状分泌毛状体(glandular secretory trichomes, GSTs)由植物表皮细胞发育形成,具有腺体状的单(多)细胞结构,通常分布在植物的叶片、茎和花等器官,是许多次生代谢产物合成的场所^[31]。目前发现与青蒿素合成紧密相关的GSTs由10个细胞组成,包括2个基细胞、2个颈细胞、4个近顶细胞和2个顶细胞,青蒿素合成反应发生在顶细胞中^[32]。然而在腺毛体细胞中,仅近顶细胞具有叶绿体;Schramek等^[15]推测这与青蒿素碳骨架合成相关,即需要由定位于叶绿体的MEP途径提供1分子的IPP为核心形成GPP,后者转运至顶细胞与胞质中MVA途径提供的IPP形成倍半萜的通用前体FPP。事实上,目前发现一大类与青蒿素骨架结构相近的艾莫烷型(amorphane type)化合物在GSTs中合成与储存^[33]。

早期的研究已经发现青蒿素在植物体内的积累具有组织特异性,在开花期的花序和叶中青蒿素的量最高^[34]。此外,研究结果也证实青蒿叶片和花序中GSTs的密度与青蒿素的积累具有密切关系^[35]。然而由于未能分离出GSTs,很难进行GSTs特异表达的基因研究。目前可以通过激光显微切割及压力弹射技术(laser microdissection & pressure catapulting, LMPC)从青蒿不同组织中分离获得GSTs细胞用以基因特异性表达研究^[36]。Olsson等^[32]利用qPCR分析了青蒿素生物合成下游途径关键酶基因紫穗槐二烯羟化酶(amorpha-4, 11-diene synthase, ADS)、细胞色素P450氧化酶(cytochrome P450 monooxygenase, CYP71AV1)以及青蒿醛 Δ 11(13)还原酶(artemisinic aldehyde Δ 11(13) reductase, DBR2)仅在腺毛体顶端细胞表达,而MEP途径关键酶基因5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)仅在近顶细胞中表达。将以上基因作为重要的靶点基因,通过基因工程改良青蒿,培育高产青蒿素转基因新品种是目前的研究热点之一,并且取得了良好的效果。

3 植物激素和诱导子对青蒿素合成的影响

3.1 外源激素对青蒿素合成的影响

利用外源赤霉素(GA3)处理青蒿发现可显著

增加青蒿素的量以及叶片生物量,在野生型及FPS超表达植株中,GA3均能上调青蒿素合成关键基因FPS、ADS及CYP71AV1的表达^[37];脱落酸(ABA, 10 μ mol/L)处理青蒿后青蒿素平均量达到干质量的1.84%,较对照提高了65%;基因表达分析显示ABA诱导CYP71AV1等青蒿素合成相关基因表达,而ADS表达未见显著增加,推测ABA的生物合成途径与青蒿素合成途径存在“对话”^[38];通过分析青蒿经茉莉酸甲酯(MeJA)处理后的次生代谢产物发现,青蒿素、青蒿酸及二氢青蒿酸分别提高了49%、80%、28%;除此之外,甲基青蒿酸和鲨烯分别提高了50%和67%^[39];青蒿悬浮细胞能在30 min内对外源MeJA产生响应,CYP71AV1基因表达上调且青蒿素量增加3倍^[40];不同化学型的青蒿植株对MeJA的诱导存在不同的响应方式,I型青蒿在MeJA的刺激下能够促进二氢青蒿酸和青蒿素的积累,而II型青蒿却表现出青蒿酸和青蒿素量的降低^[41];SA促进青蒿素积累主要表现在2个方面:一是导致胞内ROS产生,催化二氢青蒿酸转化为青蒿素;二是上调青蒿素合成途径关键酶基因ADS的表达^[28]。

3.2 外源诱导子对青蒿素合成的影响

利用100 mg/L壳聚糖处理青蒿叶片,能够诱导ADS基因和DBR2基因表达,并且发现活性氧物质H₂O₂及O₂⁻有明显增加,青蒿素及其前体二氢青蒿酸量较对照分别提高了53%和72%^[42];将脑苷脂加入青蒿毛状根培养体系中,青蒿素量达22.4 mg/L,较对照提高了2.3倍^[43];紫外线不仅能够改变青蒿生长、生物量、色素量及胞内氧化酶活性,而且能够提高青蒿素和类黄酮的量。在青蒿花期采用UV-B和UV-C辐射处理后,青蒿素的量分别提高了10.5%和15.7%,且青蒿素合成相关基因HMGR、CPR及ADS表达量上调^[44]。虽然咪康唑能够促进青蒿悬浮细胞中CPR与DBR2基因表达,而且使青蒿素的量较对照增加2.5倍,但是其对细胞的生长存在毒副作用^[40];糖类物质作为信号分子影响植物乙醛酸途径和花青素合成途径次生代谢产物的积累已有报道,葡萄糖与果糖的添加比例对青蒿素的合成起到重要作用,葡萄糖有利于青蒿素合成,而果糖具有抑制合成作用^[45]。Weather小组^[46]进一步研究发现,在葡萄糖刺激下,6个涉及青蒿素合成的关键酶基因如HMGR、DXS、DXR、FPS、ADS和CYP71AV1转录水平显示不同程度上调,该研究从分子水平揭示了葡萄糖对青蒿素积累的重要影响。

4 青蒿基因工程研究

4.1 超表达青蒿素合成途径基因对青蒿素合成影响

青蒿素代谢工程是植物基因工程研究领域热点之一,利用转基因技术超表达青蒿素生物合成途径关键酶基因或抑制支路重要基因表达已有诸多报道。在青蒿中超表达 IPI 基因发现细胞分裂素、叶绿素及青蒿素的量有不同程度的提高,其中青蒿素的量较对照提高 30%~70%^[47]。将青蒿 FPS 基因超表达后,转基因植株中青蒿素量最高可达 0.9%,较对照提高了 34.4%^[48]。构建来源于长春花的 HMGR 基因及青蒿的 ADS 基因植物高效表达载体,获得的双基因转基因株系中青蒿素的量最高达 1.73 mg/g,较对照有大幅度提高^[49]。景福远等^[50]超表达腺毛体特异表达的细胞色素 P450 蛋白 CYP71AV1 及其伴侣蛋白 CPR 基因,转基因青蒿中青蒿素的量约为对照组 2.4 倍。

4.2 抑制旁路基因促进代谢流朝靶标产物积累

在青蒿转基因研究中,已有利用代谢工程中的通过反义 RNA 技术或 RNAi 技术,降低特定代谢途径上重要基因的表达,减少非目的产物的生成,从而促进代谢流朝向目标产物积累。FPP 是植物体内合成倍半萜及三萜的前体,在不同的倍半萜合酶的作用下可以形成不同类型的萜类化合物。在青蒿中利用反义技术下调鲨烯合酶基因 SQS 表达,qPCR 考察发现转基因青蒿中 SQS 表达量显著下降,青蒿素生物合成途径的 ADS、CYP71AV1 及 CPR 基因表达得到大幅度提高^[51]。Zhang 等^[52]利用 RNAi 技术抑制 SQS 基因表达,GC-MS 分析固醇在转基因青蒿中量大幅降低,而青蒿素最高量可达 31.4 mg/g。

由此可见,利用转基因技术提高青蒿中青蒿素的量是行之有效的策略。上述研究中均对青蒿素生物合成途径中的不同基因进行了遗传操作,由于遗传改造选择了不同的靶点基因,转基因株系中青蒿素提高效果存在很大的区别。因此,靶点基因的选择在青蒿代谢工程研究中起到了至关重要的作用。

5 展望

随着青蒿素生物合成途径基因的不断克隆与鉴定,很大程度地提升了人们对青蒿素生物合成过程的认识。然而要实现青蒿素低成本生产还具有一定的距离,尽管利用微生物发酵的方式可以获得青蒿素前体,后者可以通过化学修饰半合成青蒿素。由于青蒿素的合成场所目前已经明确,深入了解青蒿

GSTs 的发育及特异表达基因将对青蒿素的合成产生重要的影响。外界环境对青蒿素的积累具有重要影响,揭示不同诱导子对青蒿素合成的时空影响,对利用植株获得高产量青蒿素具有重要的指导意义。利用成熟的转基因技术,超表达合适的靶基因对野生青蒿加以改良,获得高产青蒿素植株是目前可行的策略,为将来实现培育优质高产的青蒿新品系奠定基础。

参考文献

- [1] Weathers P J, Arsenault P R, Covello P S, *et al.* Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10(2): 173-183.
- [2] Liu C X, Xiao P G, Peng Y, *et al.* Challenges in research and development of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 1-28.
- [3] Utzinger J, Xiao S, Keiser J, *et al.* Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites [J]. *Curr Med Chem*, 2001, 8(15): 1841-1860.
- [4] Crespo-Ortiz M P, Wei M Q. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011/2012: 1-18.
- [5] 陈立军, 靳秋月, 于利人, 等. 青蒿素及其衍生物抗肿瘤研究进展 [J]. *中草药*, 2005, 36(11): 1754-1755.
- [6] Lubbe A, Seibert I, Klimkait T, *et al.* Ethnopharmacology in overdrive: the remarkable anti-HIV activity of *Artemisia annua* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(3): 854-859.
- [7] Delabays N, Simonnet X, Gaudin M. The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars [J]. *Curr Med Chem*, 2001, 8(15): 1795-1801.
- [8] 杨瑞仪, 卢元媛, 杨雪芹, 等. 低温诱导黄花蒿中青蒿素的生物合成及其机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(2): 350-354.
- [9] 漆小雪, 韦霄, 陈宗游, 等. 黄花蒿干物质的积累及青蒿素与 N、P、K 量的动态变化研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2541-2544.
- [10] Brown G D. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao) [J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 7603-7698.
- [11] Ku B, Jeong J C, Mijts B N, *et al.* Preparation, characterization, and optimization of an *in vitro* C30

- carotenoid pathway [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 6578-6583.
- [12] Hemmerlin A, Hoefler J F, Meyer O, *et al.* Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 26666-26676.
- [13] Liu W, Chen R, Chen M, *et al.* Tryptophan decarboxylase plays an important role in ajmalicine biosynthesis in *Rauvolfia verticillata* [J]. *Planta*, 2012, 236(1): 239-250.
- [14] Towler M J, Weathers P J. Evidence of artemisinin production from IPP stemming from both the mevalonate and the nonmevalonate pathways [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(12): 2129-2136.
- [15] Ram M, Khan M A, Jha P, *et al.* HMG-CoA reductase limits artemisinin biosynthesis and accumulation in *Artemisia annua* L. plants [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(5): 859-866.
- [16] Schramek N, Wang H, Romisch-Margl W, *et al.* Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua* A ¹³CO₂ study [J]. *Phytochemistry*, 2009, 71(2/3): 179-187.
- [17] Sangwan R S, Agarwal K, Luthra R, *et al.* Biotransformation of arteannuic acid into arteannuin-B and artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(5): 1301-1302.
- [18] Kim N, Kim S. Biosynthesis of artemisinin from 11, 12-dihydroarteannuic acid [J]. *J Kor Agric Chem Soc*, 1992, 35: 106-109.
- [19] Wallaart T E, Pras N, Beekman A C, *et al.* Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes [J]. *Planta Med*, 2000, 66(1): 57-62.
- [20] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60: 1139-1159.
- [21] Berteau C M, Freije J R, van der Woude H, *et al.* Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Planta Med*, 2005, 71(1): 40-47.
- [22] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of artemisinic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63: 9548-9566.
- [23] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [24] Dhingra V, Rajoli C, Narasu M L. Partial purification of proteins involved in the bioconversion of arteannuin B to artemisinin [J]. *Biores Technol*, 2000, 73: 279-282.
- [25] Dhingra V, Narasu M L. Purification and characterization of an enzyme involved in biochemical transformation of arteannuin B to artemisinin from *Artemisia annua* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281(2): 558-561.
- [26] Towler M, Weathers P. Evidence of artemisinin production from IPP stemming from both the mevalonate and the nonmevalonate pathways [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 2129-2136.
- [27] Mannan A, Liu C, Arsenault P R, *et al.* DMSO triggers the generation of ROS leading to an increase in artemisinin and dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* shoot cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(2): 143-152.
- [28] Pu G B, Ma D M, Chen J L, *et al.* Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(7): 1127-1135.
- [29] Wallaart T E, van Uden W, Lubberink H G, *et al.* Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its possible role in the biosynthesis of artemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(3): 430-433.
- [30] Brown G D, Sy L K. The mechanism of the spontaneous autoxidation of dihydroartemisinic acid [J]. *Tetrahedron*, 2002, 58: 897-908.
- [31] Nguyen K T, Arsenault P R, Weathers P J. Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2011, 47(3): 329-338.
- [32] Olsson M E, Olofsson L M, Lindahl A L, *et al.* Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(9): 1123-1128.
- [33] Covello P S, Teoh K H, Polichuk D R, *et al.* Functional genomics and the biosynthesis of artemisinin [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(14): 1864-1871.
- [34] Ferreira J F, Simon J E, Janick J. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions [J]. *Planta Med*, 1995, 61(2): 167-170.
- [35] Lommen W J, Schenk E, Bouwmeester H J, *et al.* Trichome dynamics and artemisinin accumulation during development and senescence of *Artemisia annua* leaves [J]. *Planta Med*, 2006, 72(4): 336-345.
- [36] Olofsson L, Lundgren A, Brodelius P E. Trichome isolation with and without fixation using laser microdissection and pressure catapulting followed by

- RNA amplification: expression of genes of terpene metabolism in apical and sub-apical trichome cells of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Sci*, 2011, 183: 9-13.
- [37] Banyai W, Mii M, Supaibulwatana K. Enhancement of artemisinin content and biomass in *Artemisia annua* by exogenous GA3 treatment [J]. *Plant Growth Regul*, 2011, 63: 45-54.
- [38] Jing F, Zhang L, Li M, *et al.* Abscisic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in *Artemisia annua* by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway [J]. *Biologia*, 2009, 64(2): 319-323.
- [39] Wang H, Ma C, Li Z, *et al.* Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. [J]. *Ind Crops Prod*, 2010, 31(2): 214-218.
- [40] Caretto S, Quarta A, Durante M, *et al.* Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures [J]. *Plant Biol*, 2010, 13(1): 51-58.
- [41] Wu W, Yuan M, Zhang Q, *et al.* Chemotype-dependent metabolic response to methyl jasmonate elicitation in *Artemisia annua* [J]. *Planta Med*, 2011, 77(10): 1048-1053.
- [42] Lei C Y, Ma D M, Pu G B, *et al.* Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Ind Crops Prod*, 2011, 33(1): 176-182.
- [43] Wang J W, Zheng L P, Zhang B, *et al.* Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in *Artemisia annua* hairy roots [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 85(2): 285-292.
- [44] Rai R, Meena R P, Smita S S, *et al.* UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. — an antimalarial plant [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2011, 105(3): 216-225.
- [45] Wang Y, Weathers P J. Sugars proportionately affect artemisinin production [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(7): 1073-1081.
- [46] Arsenault P R, Vail D R, Wobbe K K, *et al.* Effect of sugars on artemisinin production in *Artemisia annua* L.: transcription and metabolite measurements [J]. *Molecules*, 2010, 15(4): 2302-2318.
- [47] Sa G, Mi M, He-chun Y, *et al.* Effects of ipt gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Sci*, 2001, 160(4): 691-698.
- [48] Han J L, Liu B Y, Ye H C, *et al.* Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48(4): 482-487.
- [49] Alam P, Abdin M Z. Over-expression of HMG-CoA reductase and amorpha-4, 11-diene synthase genes in *Artemisia annua* L. and its influence on artemisinin content [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(10): 1919-1928.
- [50] 景福远, 张凌, 李美芽, 等. 过量表达 *cyp71av1* 和 *cpr* 基因提高青蒿中青蒿素的含量 [J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(3): 64-70.
- [51] Yang R Y, Feng L L, Yang X Q, *et al.* Quantitative transcript profiling reveals down-regulation of A sterol pathway relevant gene and overexpression of artemisinin biogenetic genes in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. *Planta Med*, 2008, 74(12): 1510-1516.
- [52] Zhang L, Jing F, Li F, *et al.* Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52(3): 199-207.