丹参酮生物合成的关键酶研究进展

刘莉嘉[1]，杨 鑫[1]，彭玉帅[1]，赵 灿[1]，刘 辰[1]，余世琪[1]，胡秀华[2*]，王如峰[1*]

1. 北京中医药大学中药学院，北京 100102
2. 北京中医药大学基础医学院，北京 100191

摘 要：丹参酮是丹参中具有较强生物活性和广泛药理作用的一类脂溶性二萜醌类化合物，是目前国际上广泛认可的有效治疗心脑血管疾病的天然药物之一。天然的丹参酮通过复杂的生物合成途径生成，唇形科植物丹参是其主要来源，然而由于丹参资源有限、丹参酮量低等原因，使丹参酮的产量无法满足市场需求。对丹参酮生物合成过程中的关键酶进行调控可提高其量。对丹参酮的生物合成途径及其关键酶的研究进展进行综述。

关键词：丹参酮；生物合成；关键酶；甲羟戊酸途径；丙酮酸/磷酸甘油醛途径

中图分类号：R282.12 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2015)01 - 0140 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.026

Research progress on key enzymes involved in biosynthesis of tanshinone

LIU Li-jia[1], YANG Xin[1], PENG Yu-shuai[1], ZHAO Can[1], LIU Chen[1], YU Shi-qi[1], HU Xiu-hua[2], WANG Ru-feng[1]

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
2. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100191, China

Abstract: Tanshinone, a group of diterpene quinones from *Salviae Miltiorrhizae Radix* with strong physiological activities and broad pharmacological effects, is well known as an effective compound to cure cardiovascular and cerebrovascular diseases. Natural tanshinone is generated by complex biosynthetic pathway and *Salvia miltiorrhiza* is its main source. The increasing medical demand for tanshinone, however, can not be satisfied. The limited resource of *S. miltiorrhiza* and the low content of tanshinone may cause the poor yield of these compounds. This problem may be solved by regulating the key enzymes involved in the biosynthesis of tanshinone so as to elevate its content. This review summarized the research progress in the biosynthetic pathway of tanshinone and the key enzymes related to this process.

Key words: tanshinone; biosynthesis; key enzymes; mevalonate pathway; pyruvate/glyceralde-hydes-3-phosphate pathway

丹参酮（tanshinone）又称总丹参酮，是丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 中的脂溶性二萜醌类化学成分，包括丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 II_B、隐丹参酮、异隐丹参酮等 10 余种化合物。这些化合物在改善冠状动脉供血、抑制血小板聚集、消炎、抑菌及抗肿瘤等方面疗效显著，同时具有抗氧化和提高耐缺氧能力等药理作用[1-3]。丹参酮的独特功效使其成为国际上广泛认可的有效治疗心脑血管疾病的天然药物之一。随着人类生活水平的不断提高和饮食结构的逐渐变化，心脑血管疾病已位居威胁人类健康的重大疾病之首，由此导致对丹参酮的需求量剧增。天然存在的丹参酮主要分布于丹参属植物中，丹参是其主要来源。然而，丹参的资源有限，并且其中丹参酮的量低，造成丹参酮的产量不能满足日益增长的临床需要。研究人员试图通过干预丹参酮生物合成过程达到提高丹参中丹参酮量的目的，因此，对丹参酮的生物合成途径及其关键酶进行了大量的研究。本文对这方面的研究进展进行了总结与展望。

1 生物合成途径

丹参酮属于二萜醌类化合物，而所有的天然萜类化合物都来自 2 个基本的五碳通用前体，即异戊烯基焦磷酸（IPP）和二甲烯丙基焦磷酸（DMAPP）[4]。

收稿日期：2014-05-17

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81274044）

作者简介：刘莉嘉（1990—），女，在读硕士研究生，研究方向为药物代谢。E-mail: lily199109231@163.com

*通信作者 王如峰 Tel: (010)84738646 E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

胡秀华 Tel: (010)64286960 E-mail: xiuhuahu@126.com

然而，生物合成却有 2 条截然不同的途径（图 1），一条是经典的甲羟戊酸（MVA）途径[5]，另一条为丙酮酸/磷酸甘油醛（DXP）途径[6]。这 2 条途径分别在不同的亚细胞区域内进行，MVA 途径位于细胞质中，DXP 途径位于质体中，并且这 2 条途径中所涉及的酶和基因也完全不同。但是，这 2 条途径却通过 IPP 和 DMAPP 联系在一起[7]。表 1 中列出了目前发现的这 2 条途径中关键酶基因的基本信息。

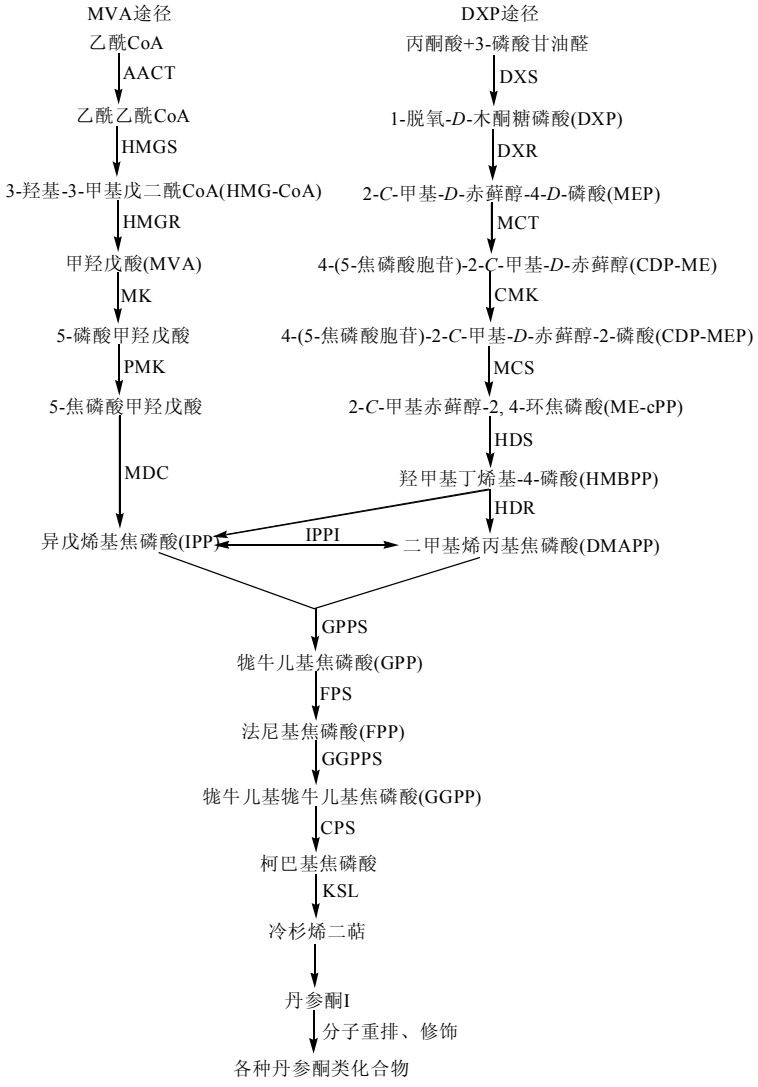


图 1 丹参酮的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of tanshinone

这 2 条途径中关键酶基因的研究结果表明，丹参酮类化合物的生物合成途径主要是 DXP 代谢途径，同时也受 MVA 途径的影响。

2 MVA 途径及其关键酶

2.1 乙酰 CoA 酰基转移酶（AACT）

AACT 是生物合成萜类化合物 MVA 途径的起始酶，其作用是将 2 分子的乙酰 CoA 缩合生成乙酰乙酰 CoA[32]。崔光红等[8]利用 cDNA 微阵列和 RACE 策略克隆得到了 SmAACT 基因，其 cDNA 全长 1 623 bp，含有 1 200 bp 开放阅读框，编码 399 个氨基酸。通过对其序列进行同源性和系统发育分析，结果表明该基因具有乙酰 CoA 酰基转移酶的重要结构域。同时，利用实时荧光定量 PCR 技术对 SmAACT 基因在丹参植株不同器官内的表达以及在毛状根中的诱导表达进行了分析。结果表明，其在丹参根、茎、叶中均有表达，在根中的表达量最高，并且其表达量受生物和非生物诱导子 Ag^+和酵母菌的诱导，并伴随丹参酮的积累。SmAACT 基因单核苷酸多态性分析表明，其在不同的个体中存在着大量的单核苷酸变异位点，且部分位点表现出产地特异性。

表 1 MVA 和 DXP 途径中关键酶基因的基本信息

Table 1 Basic information of key enzyme genes in MVA and DXP pathways

基因名称	催化步骤	物种来源	简写	Genbank 登录号	表达特征/序列分析
AACT	两分子乙酰 CoA→乙酰乙酰 CoA	丹参	SmAACT	EF635969	在根、茎、叶中均有表达，以根中的表达量最高，且受生物和非生物诱导子的调控；其 cDNA 全长 1 623 bp，含有 1 200 bp 开放阅读框，编码 399 个氨基酸[8]
		油茶 *Camellia oleifera*	CoAACT	GU594059	其 cDNA 长 1 495 bp，包括 65 bp 的 5’非编码区和 203 bp 的 3’非编码区，以及 1 227 bp 的编码区，编码 408 个氨基酸残基[9]
		罗汉果 *Siraitia grosvenorii*	SgAACT	HQ128554	其 cDNA 全长 1 580 bp，开放阅读框为 1 224 bp[10]
HMGS	乙酰乙酰 CoA+乙酰 CoA→3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA	丹参	SmHMGS	DQ243700	在根、茎、叶中均有表达，以叶中表达最高，根中最低[11]
		茶树 *Camellia sinensis*	CsHMGS	JQ390224	在成熟叶片中表达量高于幼嫩叶片中；全长 1 829 bp，开放阅读框 1 401 bp，编码 467 个氨基酸残基[12]
		喜树 *Camptotheca acuminata*	CaHMGS	ACD87446	在子叶和胚轴中的表达量很高，根中几乎不表达，且其表达受水杨酸和茉莉酸甲酯的诱导调控[13]
		罗汉果	SgHMGS	HQ128555	其 cDNA 全长 1 889 bp，开放阅读框为 1 389 bp[10]
HMGR	3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA→甲羟戊酸	丹参	smHMGR	EU680958	组成型表达基因，根中表达最强，茎中次之，叶中最弱，水杨酸和茉莉酸甲酯能够上调其表达；其 cDNA 全长为 2 115 bp，包含 1 695 bp 的开放阅读框，编码 565 个氨基酸残基[14]
		杜仲 *Eucommia ulmoides*	EuHMGR	AY796343	在叶子和幼果中均有表达，但其调控机制极其复杂[15]
		乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis*	GuHMGR	GQ845405	其 cDNA 全长 1 849 bp，含有 1 722 bp 开放阅读框，编码含 573 个氨基酸残基的蛋白质[16]
		秦艽 *Gentiana macrophylla*	GmHMGR1、GmHMGR2	JQ995754、JQ995755	主要在根和花中表达；包含完整的开放阅读框，编码蛋白含有 HMGR 蛋白特有的 4 个保守活性位点[17]
		马铃薯 *Solanum tuberosum*	HMGR-c2	AF096838	在根、茎、叶等组织中均有表达，且在叶中的表达量约为根、茎中的 2 倍[18]
		罗汉果	SgHMGR	HQ128556	其 cDNA 全长 1 926 bp，开放阅读框为 1 749 bp[10]
DXS	3-磷酸甘油醛+丙酮酸→1-脱氧-*D*-木酮糖磷酸	丹参	SmDXS1	EU670744	组成型表达基因，在叶中表达最强，茎中稍弱，根中最弱[11]
		丹参	SmDXS2	FJ643618	非组成型基因，只在根部表达，在茎和叶中检测不到其表达[11]
		高良姜 *Alpinia officinarum*	AoDXS1	HQ874656	开放阅读框为 2 148 bp，编码的蛋白含有 715 个氨基酸残基[19]
		高良姜	AoDXS2	HQ874657	开放阅读框为 2 136 bp，编码的蛋白含有 711 个氨基酸残基[19]

续表 1

基因名称	催化步骤	物种来源	简写	Genbank 登录号	表达特征/序列分析
CMK	4-(5-焦磷酸胞苷)-2-*C*-甲基-*D*-赤藓醇→4-(5-焦磷酸胞苷)-2-*C*-甲基-*D*-赤藓醇-2-磷酸	丹参	SmCMK	EF534309	其表达受茉莉酸甲酯的调控[20]
		巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis*	HbCMK	FJ217703	全长为 1 415 bp，编码 388 个氨基酸残基；其表达具有组织差异性，在愈伤组织中大量表达，在叶片和胶乳中微量表达，乙烯诱导胶乳 HbCMK 的表达，对 HbCMK 的表达几乎没有影响[21]
MCS	4-(5-焦磷酸胞苷)-2-*C*-甲基-*D*-赤藓醇-2-磷酸→2-*C*-甲基赤藓醇-2, 4-环焦磷酸	丹参	SmMCS	JX233816	其 cDNA 全长 988 bp，编码 234 个氨基酸残基；表达受 Ag^+的诱导[22]
		巴西橡胶树	HbMCS1	FJ196164	全长 965 bp，编码 241 个氨基酸残基；其表达具有组织差异性，在愈伤组织中大量表达，在叶片和胶乳中微量表达，割胶诱导胶乳 HbMCS1 的表达，乙烯对 HbMCS1 的表达几乎没有影响[23]
		黄花蒿 *Artemisia annua*	AaMCS	KC142157	其 cDNA 全长 994 bp，包含 681 bp 的开放阅读框，编码 226 个氨基酸残基，基因全长为 2 540 bp，包含 3 个外显子和 2 个内含子；在根、茎、叶、花中均有表达，花中表达量较高，根和茎中表达量低[24]
HDR	甲基丁烯基-4-磷酸→异戊烯基焦磷酸/二甲烯丙基焦磷酸	丹参	SmHDR	JX233817	由 1 647 个核苷酸组成，编码 463 个氨基酸残基；受 Ag^+诱导后其表达水平升高，同时伴随着丹参酮类成分量的增加[25]
		银杏 *Ginkgo biloba*	GbHDR	DQ364231	该基因 cDNA 全长为 1 827 bp，包含 1 425 bp 的开放阅读框，编码含 474 个氨基酸残基的蛋白质[26]
		巴西橡胶	HbHDR	EU881977	全长 1 627 bp，编码 462 个氨基酸；乙烯诱导胶乳 HbHDR 的表达[27]
GGPPS	法尼基焦磷酸→牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸	丹参	SmGGPPS	FJ643617	其 cDNA 全长 1 234 bp，编码 364 个氨基酸残基；属于组成型表达基因，在叶片和根中表达较强，在茎中表达较弱；SmGGPPS 在丹参叶片中受到水杨酸的诱导，但在丹参根、茎、叶中均不受茉莉酸甲酯的诱导[14]
		海南粗榧 *Cephalotaxus mannii*	CmGGPPS	JX971119	其 cDNA 全长 1 694 bp，包含一个 1 182 bp 的开放阅读框，编码 393 个氨基酸残基；用 Harpin 和茉莉酸甲酯等不同类型的激发子处理发现，GGPPS 在诱导后表达量均上升，但不同激发子诱导的基因表达强度和速率存在明显差异[28]
		甘薯 *Ipomoea batatas*	IbGGPPS	EU570195	其 cDNA 全长 1 368 bp，包含一段长度为 1 089 bp 的开放性阅读框及一段长度为 85 bP 的 5’非翻译区和 194 bp 的 3’非翻译区；在薯块和嫩叶中表达量最高，在成熟叶片和根中表达量次之，在茎中则检测不到其表达[29]
CPS	牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸→柯巴基焦磷酸	丹参	SmCPS	EU003997	cDNA 全长为 2 688 bp，包含了一个 2 382 bp 的开放阅读框，编码 793 个氨基酸残基[30]
		穿心莲 *Andrographis paniculata*	ApCPS	AJ973129	其 cDNA 全长 2 801 bp，包含 2 499 bp 的开放阅读框，编码 833 个氨基酸残基[31]

2.2 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶（HMGS）

HMGS 将乙酰乙酰 CoA 与乙酰 CoA 缩合生成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA（HMG-CoA）[33]。王敬[11]成功地从丹参中克隆出编码该蛋白的基因，命名为 SmHMGS，并进行了生物信息学和组织特征表达分析。氨基酸多重序列比对分析显示 HMGS 在不同物种中表现出高度的保守性，说明其在进化过程中是相对稳定的。组织特征表达分析结果表明 SmHMGS 为组成型表达基因，在叶中表达最高，茎中稍低，根中最弱。随后还考察了不同诱导子对 SmHMGS 基因表达的影响，结果表明茉莉酸甲酯（MJ）和酵母提取物（YE）能够较好地诱导 SmHMGS 基因的表达，并伴随着丹参酮的积累。

2.3 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶（HMGR）

在 HMGR 的催化下，HMG-CoA 生成 MVA。该反应是 MVA 途径中的限速反应[34]。廖攀等[14]在 2009 年第 1 次成功地从丹参中克隆出编码该蛋白的基因，命名为 SmHMGR。其 cDNA 全长为 2 115 bp，包含 1 695 bp 的开放阅读框，编码 565 个氨基酸。氨基酸多重序列比对显示 SmHMGR 与其他植物的 HMGR 有较高的同源性，和其他植物的 HMGRs 一样，包含 2 个跨膜结构域和催化结构域。进化树分析表明，其与胡黄连 HMGR 的亲缘关系最近。组织表达谱分析表明，SmHMGR 是一个组成型表达的基因，在丹参根中表达最强，在茎中次之，在叶中最弱，水杨酸（SA）和 MJ 能够上调其表达。同样 Dai 等[35]利用 RACE 技术从丹参中克隆得到了 HMGR 基因，将其命名为 SmHMGR2，其 cDNA 全长为 1 959 bp，开放阅读框长度为 1 653 bp，编码 550 个氨基酸。序列比对分析和进化树分析表明，SmHMGR2 与苍术的 HMGR 同源性最高，组织特征表达分析表明其在叶、茎、根中的表达较强。同时，实验结果表明上调 SmHMGR2 的表达伴随着丹参酮量的增加。

在甲羟戊酸激酶（MK）及磷酸甲羟戊酸激酶（PMK）催化的连续 2 步磷酸化步骤中，MVA 生成 5-焦磷酸甲羟戊酸（MD），随后，MD 在 5-焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶（MDD）催化作用下脱羧生成 IPP[36-37]。

3 DXP 途径及其关键酶

3.1 脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸合成酶（DXS）

该途径最初的前体物质是 3-磷酸甘油醛（G3P）和丙酮酸（PA），二者在 DXS 催化作用下生成 1-脱氧-*D*-木酮糖磷酸（DOXP），DXS 所催化的反应是该途径中的第 1 步限速反应[38-39]。王敬[11]成功地克隆出了丹参的 2 个 DXS 成员，分别命名为 SmDXS1 和 SmDXS2，并且表明 SmDXS1 是组成型表达的基因，在叶中表达最强，茎中稍弱，根中最弱。SmDXS2 基因不是组成型基因，只在根部表达，在茎和叶中检测不到其表达。

3.2 DXP 还原异构酶（DXR）

在 DXR 作用下，DXP 经原子重排和还原生成 2-*C*-甲基-*D*-赤藓醇-4-*D*-磷酸（MEP），DXR 是 DXP 途径中的第 2 步催化酶，也是 DXP 途径重要的限速酶[40]。Yan 等[41]从丹参中克隆得到了 SmDXR 基因，通过生物信息学分析证明其与其他植物具有很高的同源性，进化树分析表明其和番茄的亲缘关系较近，在根、茎、叶中均有表达，属于组成型基因。通过诱导子分析表明，其在叶片中能够被 SA 所诱导，而在根、茎、叶中则被 MJ 所阻遏。Wu 等[42]利用 DXR 功能缺陷的大肠杆菌菌株互补实验鉴定了 SmDXR 蛋白的酶活性，并首次报道在渗透压和 YE 处理后，SmDXR 转录水平表达量提高的同时，丹参酮量也提高，暗示 SmDXR 可能参与控制代谢流流动，并且可能是丹参酮生物合成代谢调控的靶点。

3.3 CMK、MCS、HDR

在 2-甲基-*D*-赤藓醇-4-磷酸胱氨酰转移酶（MCT）作用下，MEP 和 5-焦磷酸胞苷（CDP）缩合生成 4-(5-焦磷酸胞苷)-2-*C*-甲基-*D*-赤藓醇（CDP-ME）[43]，然后，CDP-ME 在 4-(5-焦磷酸胞苷)-2-*C*-甲基-*D*-赤藓醇激酶（CMK）催化作用下磷酸化生成 4-(5-焦磷酸胞苷)-2-*C*-甲基-*D*-赤藓醇-2-磷酸（CDP-MEP）[44]。接下来，在 2-*C*-甲基赤藓醇-2, 4-环焦磷酸合成酶（MCS）作用下，CDP-MEP 转化为 2-*C*-甲基赤藓醇-2, 4-环焦磷酸（ME-cPP）[45]。在上述 3 步酶促反应中，王学勇等[20]从丹参毛状根中克隆得到了中间一步反应的 CMK 酶基因（命名为 SmCMK），并且初步证明了 SmCMK 基因表达量与丹参酮类成分积累之间的关系。高伟等[22]采用 RACE 法克隆得到了 SmMCS 基因，其 cDNA 全长 988 bp，编码 234 个氨基酸，并且，其表达受 Ag^+ 的诱导。之后，ME-cPP 在羟甲基丁烯基-4-磷酸合成酶（HDS）催化作用下生成羟甲基丁烯基-4-磷酸（HMBPP）[46]，最后 HMBPP 在 1-羟基-2-甲基-2-(*E*)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶（HDR）催化下转化为 IPP 和 DMAPP[47]。程琪庆等[25]成功地从丹参中克隆得

到了 SmHDR 基因，其由 1 647 个核苷酸组成，编码 463 个氨基酸，序列比对和系统进化分析表明 SmHDR 与其他植物的 HDR 家族具有较高的同源性，和库洛胡黄连 HDR 的亲缘关系较近。并且，受 Ag^+诱导后其表达水平升高，同时伴随着丹参酮类成分量的增加，说明其可能参与丹参酮的生物合成。而后，IPP 和 DMAPP 在 IPP 异构酶（IPPI）的作用下相互转化，实现了 MVA 途径和 DXP 途径之间的交流。

4 下游途径及关键酶

4.1 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸环化酶（GGPPS）

GGPPS 催化法尼基焦磷酸（FPP）生成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸（GGPP），而 GGPP 是多种初级和次级代谢产物的共同前体，因此 GGPPS 成为丹参酮代谢途径中的关键酶。廖攀[14]成功地克隆出 SmGGPPS 基因，其 cDNA 全长 1 234 bp，编码 364 个氨基酸。氨基酸多重序列比对显示 SmGGPPS 与其他植物的 GGPPS 有较高的同源性。进化树分析表明其与其他 GGPPS 蛋白都来自同一祖先，组织特异性分析表明 SmGGPPS 是一个组成型表达的基因，在叶片和根中表达较强，在茎中表达较弱。SmGGPPS 在丹参叶片中受到 SA 的诱导，但在丹参根、茎、叶中均不受 MJ 的诱导。张蕾等[48]对二萜类物质代谢途径中的共同前体合酶 GGPPS 进行了研究，克隆得到一条 cDNA 序列，其全长 1 298 bp，开放阅读框为 1 095 bp，编码 364 个氨基酸，包含一段由 52 个氨基酸组成的质体定位信号肽。同时对其组织表达特异性进行了分析，结果表明该基因为组成型表达的基因，在根、茎、叶等多个组织的多个时期中均有表达，尤以花期叶片的表达最强。

4.2 柯巴基焦磷酸合酶（CPS）和类贝壳杉烯合酶（KSL）

CPS、KSL 是丹参酮 GGPP 下游生物合成途径的 2 个关键酶基因。高伟等[30]从丹参中克隆得到了 SmCPS 和 SmKSL。SmCPS 的 cDNA 全长为 2 688 bp，包含了一个 2 382 bp 的开放阅读框，编码 793 个氨基酸，氨基酸序列 N 端含有“DXDD”基序的结构功能域，推测其具有起始环化 GGPP 的功能。通过对 SmCPS 的 mRNA 表达进行分析，证明了该基因参与了丹参酮类成分的生物合成。通过对 SmCPS 基因的表达条件进行优化，制备了 SmCPS 的多克隆抗体[30]。SmKSL 的 cDNA 全长共 2 110 bp，包含了一个 1 788 bp 的开放阅读框，编码 595 个氨基酸，其氨基酸序列 C 端含有“DDXXD”基序的结构域，推测其具有磷酸离子化底物的功能，其 mRNA 表达分析结果说明该基因参与丹参酮类成分的生物合成。Cheng 等[49]利用实时荧光定量 PCR 技术考察了诱导子对 SmCPS 基因表达的影响，实验结果表明，诱导子能够显著提高 SmCPS 的表达。该作者同时还考察了诱导子对丹参酮量的影响，发现 YE＋Ag^+，Ag^+＋MJ 和 YE＋Ag^+＋MJ 诱导子的组合能够提高毛状根中隐丹参酮和二氢丹参酮的量。

5 展望

丹参酮是目前国际上广泛认可的治疗心脑血管疾病的有效天然药物之一，而心脑血管疾病是人类健康的“头号杀手”，因此，丹参酮的市场需求量很大。由于丹参酮药源匮乏问题使其临床应用受限。丹参毛状根的培养被认为是获得丹参有效成分的重要途径，且这方面的研究也较成熟[50]。然而丹参毛状根中有用的次生代谢产物量较低等原因阻碍了利用丹参毛状根培养生产丹参酮等有用次生代谢产物的工业化。通过基因工程技术，改造并克隆丹参酮生物合成途径中的关键酶基因并将其导入丹参植株内，获得高产丹参酮的丹参毛状根或再生植株，并对其进行大规模培养是进一步提高丹参酮产量的前提和基础。目前的研究局限在基于同源性的丹参酮生物合成途径中关键酶基因的克隆、生物学信息和表达特征分析等方面。这些只能从序列上表明其与已知的其他物种的具催化功能的基因同源，并推测其活性，但若要确定其功能，需要进行蛋白表达纯化后的酶活研究。因此，对改造后的基因进行表达谱分析和酶活分析，寻找适合的载体以获得高产、稳定的再生丹参植株是今后研究者需要克服的难题和努力的方向。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 王 昕. 丹参酮药理研究及临床应用进展 [J]. 光明中医, 2011, 26(7): 1514-1517.

[3] 葛宇清, 杨 波, 程汝滨, 等. 隐丹参酮对 K562 细胞凋亡的影响及其机制 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3188-3194.

[4] Capell T, Christou P. Progress in plant metabolic engineering [J]. *Curr Opinion Biotechnol*, 2004, 15: 148-154.

[5] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34(2):

95-106.

[6] Rohmer M, Knani M H, Simonin P, *et al*. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. *Biochem J*, 1993, 295: 517-524.

[7] Laule O, Fürholz A, Chang H S, *et al*. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6866-6871.

[8] 崔光红, 王学勇, 冯 华, 等. 丹参乙酰 CoA 酰基转移酶基因全长克隆和 SNP 分析 [J]. 药学学报, 2010, 45(6): 785-790.

[9] 张 琳, 谭晓风, 胡 姣, 等. 油茶乙酰 CoA 酰基转移酶基因 cDNA 克隆及序列特征分析 [J]. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 2011, 31(8): 108-112.

[10] 唐 其. 罗汉果转录组、表达谱的高通量测序及甜苷 V 生物合成关键酶的克隆 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2010.

[11] 王 敬. 丹参酮生物合成途径相关酶基因的克隆和特征分析 [D]. 上海: 上海师范大学, 2009.

[12] 陈林波, 刘本英, 汪云刚, 等. 茶树 HMGS 基因的克隆与序列分析 [J]. 西北农业学报, 2013, 22(5): 72-76.

[13] 王 伟. 喜树毛状根培养体系的建立及喜树 hmgs 基因的克隆分析 [D]. 上海: 上海师范大学, 2009.

[14] 廖 攀. 丹参酮生物合成相关基因的克隆及其代谢调控 [D]. 上海: 上海师范大学, 2010.

[15] 叶生晶. 杜仲 MVA 途径相关基因表达差异及全长 cDNA 序列特征 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2013.

[16] Liu Y, Xu Q X, Xi P Y, *et al*. Cloning and characterization of a cDNA coding 3-hydroxy-3-methylglutary CoA reductase involved in glycyrrhizic acid biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. 药学学报, 2013, 48(5): 773-779.

[17] 郑 鹏, 化文平, 王喆之. 秦艽 HMGR 基因家族的克隆及序列分析 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2012, 44(6): 67-72.

[18] 陈大华, 叶和春. 马铃薯 HMGR 基因的克隆, 序列分析及其表达特征 [J]. 植物学报, 2000, 42(7): 724-727.

[19] 张春荣, 杨 全, 陈虎彪, 等. 高良姜 1-脱氧-*D*-木酮糖-磷酸还原异构酶 cDNA 克隆与表达调控 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3208-3214.

[20] 王学勇, 崔光红, 黄璐琦, 等. 丹参 4-(5′-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-*D*-赤藓醇激酶的 cDNA 全长克隆及其诱导表达分析 [J]. 药学学报, 2008, 43(12): 1251-1257.

[21] 陈 洁, 雷美玉, 李辉亮, 等. 巴西橡胶树 HbCMK 基因的克隆及表达 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(2): 215-220.

[22] 高 伟, 程琪庆, 马晓惠, 等. 丹参 2-*C*-甲基-*D*-赤藓糖醇 2, 4-环焦磷酸合成酶 (SmMCS) 基因全长克隆及其生物信息学分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3365-3370.

[23] 雷美玉, 李辉亮, 彭世清. 巴西橡胶树 HbMCS1 基因的克隆及表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(3): 482-487.

[24] 王 英, 贾伟章, 谭明俊, 等. 黄花蒿 MCS 基因的克隆及其序列分析与原核表达 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2288-2293.

[25] 程琪庆, 何云飞, 李 耿, 等. 丹参 4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶基因的全长克隆与诱导表达分析 [J]. 药学学报, 2013, 48(2): 236-242.

[26] 杨颖舫, 杨春贤, 冯国庆, 等. 银杏 HDR 基因的克隆与功能分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(13): 6663-6665.

[27] 李辉亮, 雷美玉, 彭世清. 巴西橡胶树 4-羟基-3-甲基-2-(*E*)-丁烯基-4-磷酸还原酶基因 (Hb-HDR) 的克隆及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 15-21.

[28] 钱 丹, 江雪飞, 乔 飞. 海南粗榧 GGPPs 基因克隆与诱导表达分析 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(2): 204-210.

[29] 唐 俊. 甘薯 GGPPS 基因的克隆分析及抗草甘膦半夏的获得 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.

[30] 高 伟, 崔光红, 孔建强, 等. 丹参柯巴基焦磷酸合酶基因的优化表达、纯化及抗体制备 [J]. 药学学报, 2008, 43(7): 766-772.

[31] 姚 攀. 穿心莲二萜环合酶基因的克隆与原核表达 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.

[32] Lgual J C, Gonzalez-Bosch C, Dopazo J, *et al*. Phylogenetic analysis of the thiolase family implications for the evolutionary origin of peroxisomes [J]. *J Mol Evol*, 1992, 35(2): 147-155.

[33] Luskey K L, Stevens B. Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(18): 10271-10277.

[34] Basson M E, Thorsness M, Finer-Moore J, *et al*. Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methyIglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis [J]. *J Mol Cell Biol*, 1988, 8: 3797-3808.

[35] Dai Z, Cui G, Zhou S F, *et al*. Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 68(2): 148-157.

[36] Dhe-Paganon S, Magrath J, Abeles R H. Mechanism of

mevalonate pyrophosphate decarboxylase: evidence for carbocationic transition state [J]. *Biochemistry*, 1994, 33(45): 13355-13362.

[37] McGarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1015-1026.

[38] Sprenger G A, Sehrken U, Wiegert T, *et al*. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and Pyridoxo [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 1997, 94(24): 12857-12862.

[39] Esteévez J M, Cantero A, Reindl A, *et al*. l-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(25): 22901-22909.

[40] Lange B M, Croteau R. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint [J]. *Archiv Biochem Biophys*, 1999, 365(l): 170-174.

[41] Yan X M, Zhang L, Wang J. Molecular characterization and expression of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31: 1015-1022.

[42] Wu J Y, Shi M. Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(3): 441-448.

[43] Rohdieh F, Wungsintaweekul J, Luttgen H, *et al*. Biosynthesis of isoprenoids: 4-diphosphocytidyl-2-*C*-methyl-*D*-erythritolkinase from tomato [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2000, 97: 8251-8256.

[44] Steinbacher S, Kaiser J, Eisenreich W, *et al*. Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-*C*-methyl-erythritol-4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 18401-18407.

[45] Herz S, Wungsintaweekul J, Schuhr C A, *et al*. Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2*C*-methyl-*D*-eyrthritol 2-phosphate to 2*C*-methyl-*D*-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2000, 97(6): 2486-2490.

[46] Baker J, Franklin D B, parker J. Sequence and characterization of the gcpE gene of *Escherichia coli* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 94(1/2): 175-180.

[47] Cunningham F X, Lafond T P, Gantt E. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(20): 5841-5848.

[48] 张 蕾, 戴住波, 崔光红, 等. 丹参牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶基因的克隆和分析 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2704-2708.

[49] Cheng Q, He Y, Li G, *et al*. Effects of combined elicitors on tanshinone metabolic profiling and SmCPS expression in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Molecules*, 2013, 18(7): 7473-7485.

[50] 盛东峰, 陈 龙. 聚乙二醇-6000 胁迫对丹参毛状根中丹参酮积累的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1181-1185.