

调控药用植物药效成分合成的转录因子研究进展

高珂, 王玲, 吴素瑞, 隋春*

中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 大多药用植物的药效成分为植物本身的次生代谢产物, 包括生物碱、萜类、类黄酮、酚类、苷类等。植物体内及体外环境条件会影响这些次生代谢产物的合成, 导致其合成量的增加或减少, 或是影响同类代谢产物不同单体成分的合成与否及合成量。目前所知调控次生代谢产物合成的机制有转录调控、转录后调控等多种形式, 其中转录调控研究较多。综述了药用植物类黄酮、生物碱、萜类等活性成分生物合成相关的转录因子研究进展, 为利用转录调控控制和提高药用植物药效成分合成的研究与应用提供借鉴。

关键词: 转录因子; 药用植物; 活性成分; 次生代谢产物; 黄酮类; 生物碱; 萜类

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)20-3100-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.20.024

Advances in studies on transcriptional factor regulation of biosynthesis of active components in medicinal plants

GAO Ke, WANG Ling, WU Su-ru, SUI Chun

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Most of active ingredients from medicinal plants are secondary metabolites including alkaloids, terpenoids, flavonoids, phenols, glycosides, and so on. The biosynthesis of secondary metabolites is not only determined by the plant internal factors but also influenced by the environmental factors, leading to the variation of synthetic quantity and the metabolite monomer composition. At present, transcriptional and post-transcriptional regulations have been found in the biosynthesis of secondary metabolites. More advances were achieved in transcriptional regulation. The paper reviews the progress obtained in the researches on transcription factors regulation of the biosynthesis of flavonoids, alkaloids, terpenoids, and other active ingredients from medicinal plants, which will be useful for further studies on the biosynthetic regulation of the active ingredients in medicinal plants.

Key words: transcription factors; medicinal plants; actives ingredients; secondary metabolites; flavonoids; alkaloids; terpenoids

转录因子 (transcription factor, TF) 是一种具有特殊结构、能调控基因表达功能的蛋白质分子, 也称为反式作用因子。转录因子通过识别和结合基因启动子区的顺式作用元件, 启动和调控基因表达。植物中的转录因子分为 2 种, 一种是非特异性转录因子, 非选择性地调控基因的转录表达; 另一种是特异性转录因子, 能够选择性调控某种或某些基因的转录表达。后一种转录因子研究得较多。典型的转录因子含有 DNA 结合区、转录调控区、寡聚化

位点以及核定位信号等功能区域, 这些功能区域决定转录因子的功能和特性。转录因子对基因表达的调控有正调控和负调控之分, 如长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中转录因子 ORCA2 可直接结合 STR 启动子, 正向调控萜类吲哚生物碱 (TIAs) 生物合成途径中的关键酶基因表达^[1], 而转录因子 ZCTs 可抑制转录因子 ORCAs 表达^[2]。但转录因子对于代谢产物合成的正调控和负调控, 即促进和抑制代谢产物合成的转录因子对于基因表

收稿日期: 2015-05-08

基金项目: 四川省“十二五”农作物及畜禽育种攻关项目 (2011NZ0098-12-11); 药植所创新团队发展计划; 中医药行业科研专项 (201407005)

作者简介: 高珂 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物基因资源和次生代谢调控研究。E-mail: yzzkgk@163.com

*通信作者 隋春, 副研究员, 主要从事药用植物基因资源和次生代谢调控研究。Tel: (010) 57833363 E-mail: csui@implad.ac.cn

达的调控方式并不完全一致,有些转录因子对于抑制酶基因表达的调控因子进行负调控,则是对代谢产物合成的正调控。此外,转录因子既可以单独作用于靶基因启动子,也可以与其他蛋白形成复合体后与靶基因启动子结合,如拟南芥中的 TT2 (MYB) - TT8 (bHLH) - TTG1 (WD40) 作为复合体调控原花青素结构基因 (BAN) 表达^[3]; 还有一些转录因子作用于其他转录因子,通过改变其他转录因子的作用而起到调控作用,如长春花中的 CrMYC2 基因,通过与转录因子 ORCA3 结合,控制 ORCA3 基因的表达,从而调控长春花生物碱的合成^[4]。

药用植物药效成分的合成与调控研究已越来越备受关注。合成生物学的兴起,更掀起了药用植物代谢途径和调控研究的热潮。在代谢途径酶基因克隆和功能分析方面^[5-6]、利用酵母等宿主合成药用植物代谢产物方面^[7-10],已取得了显著进展。以往关于转录因子方面的综述,或集中在某一植物上,如长春花、红豆杉等;或集中于某一类转录因子上,如 WRKY 类转录因子、MYB 类转录因子、bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 类转录因子等。本文重点关注药用植物转录因子研究方面的最新成果,就药用植物药效成分合成的转录调控研究进展进行综述,为深入研究药用植物药效成分转录因子的调控机制,并将其应用于药效成分合成的生物工程中提供参考。

1 调控萜类代谢的转录因子

以萜类为主要药效成分的药用植物包括红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.、黄花蒿 *Artemisia annua* L.、人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.、柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 等。萜类成分包括单萜、二萜、倍半萜、三萜及其衍生物,如单萜柠檬烯、芳樟醇、芍药苷等;倍半萜青蒿素、顶羽菊素、雷公藤康碱等;双萜雷公藤甲素、紫杉醇、长春碱、银杏内酯等;三萜人参皂苷、柴胡皂苷、白桦酸等。绝大多数萜类化合物具有较高的药用价值,如抗肿瘤药物紫杉醇、抗疟疾特效药物青蒿素、抗炎药物雷公藤内酯、防癌化合物柠檬烯、血小板活化因子拮抗剂银杏内酯以及防治心脑血管疾病的首选药物三七总皂苷等^[11-12]。目前,萜类代谢途径已基本清晰。植物萜类的生物合成含有 2 条途径: 甲羟戊酸 (MVA) 途径和 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径,分为 3 个阶段: C₅ 前体 [焦磷酸异戊烯酯 (IPP)] 及其双键异构体 [焦磷酸二甲烯丙酯 (DMAPP)] 生成阶段; 直接前体 [法尼基二磷酸 (FPP)、牻牛儿基二磷酸 (GPP)、牻牛儿基牻牛

儿基二磷酸 (GGPP)] 生成阶段; 萜类生成及修饰阶段^[11-12]。现已发现的调控萜类合成的转录因子主要有 AP2 类、WRKY 类、锌指类、bZIP 类等。

1.1 AP2/ERF 类转录因子

AP2/ERF 是一个庞大的转录因子家族,也称 AP2/EREBP,含有由 60~70 个氨基酸组成的 AP2/ERF 结构域而得名,是植物特有的一类转录因子。这个家族中的成员参与多种生物学过程,包括植物生长发育、损伤、病菌防御、干旱等环境胁迫响应等。另外,AP2/ERF 类转录因子参与水杨酸 (SA)、茉莉酸 (JA)、乙烯、脱落酸 (ABA) 等多种信号转导途径^[13]。

利用酵母单杂技术从黄花蒿分离到 2 个 AP2 类转录因子 AaERF1 和 AaERF2,经凝胶迁移实验 (EMSA) 证实它们可分别与紫穗槐-4,11-二烯合酶 (ADS) 和下游 P450 单加氧酶 CYP71AV1 启动子区域中的 CBF2 和 RAA 元件结合。在烟草中瞬时表达 AaERF1 和 AaERF2,可提高 ADS 和 CYP71AV1 转录水平,增加青蒿素和青蒿素酸的量。相反, RNA 干扰 (RNAi) 技术抑制 AaERF1 和 AaERF2 表达能够使青蒿素和青蒿素酸的量下降。上述结果表明 AaERF1 和 AaERF2 可正向调控青蒿素的合成^[14]。此外,在青蒿中发现 1 个在表皮毛特异表达的 AP2 类转录因子 AaORA。qRT-PCR 证实 AaORA 的表达模式与 ADS、CYP71AV1 和双键还原酶 2 (DBR2) 相似。对 AaORA 基因过表达或抑制,可明显上调或下调青蒿中 ADS、CYP71AV1、DBR2 的表达水平,可见 AaORA 转录因子也能够正向调控青蒿素的合成^[15]。

从长春花中克隆到了控制 TIAs 合成相关基因表达的 AP2/ERF 类转录因子 ORCA1、ORCA2 和 ORCA3。ORCA2 可以和 TIAs 合成途径中关键酶异胡豆苷合成酶 (STR) 的启动子结合,特异性激活 STR 的表达,使长春碱的产量增加^[16]。ORCA3 的启动子区域中含有茉莉酸诱导响应元件 (JERE),在 JA 诱导下,能够增强参与 TIAs 合成的基因色氨酸脱羧酶 (TDC)、STR、异胡豆苷 D-糖苷酶 (SGD)、细胞色素 P450 还原酶 (CPR) 的表达^[13,17]以及色氨酸和色胺的合成,可见 ORCA3 能够诱导吲哚前体的代谢合成^[18],并且在 TIAs 合成途径中发挥重要作用,其过量表达可以增加 TIAs 的产量^[19]。

东北红豆杉 *Taxus cuspidate* S. et Z. 中发现的与 AP2 家族其他的转录因子具有很高同源性的 TcAP2,能够在茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导下表达,

而 MeJA 可以诱导并增强紫杉醇合成途径中关键酶基因的表达,进而增加东北红豆杉中活性成分的量^[20]。戴怡龄等^[21]发现了红豆杉中另 1 个 AP2 类转录因子 TcDREB,也具有典型的 AP2 结构域。TcDREB 能够与红豆杉异戊二烯代谢途径产物紫杉醇的合成途径中的 TS、10 β 、13 α 和 5 α 4 个关键酶的启动子及萜类合酶(TS)基因的启动子区中 MeJA 响应元件 GCC-Box 结合,可见 TcDREB 转录因子的调控作用可能与红豆杉异戊二烯代谢途径产物紫杉醇的合成相关,且受信号分子 MeJA 的影响。

1.2 WRKY 类转录因子

WRKY 类转录因子是植物所特有的,其 N 端至少包含 1 个高度保守的以“WRKYGQK”为特征的 WRKY 结构域。这一结构域能专一地与靶标基因启动子区中的 W 盒 [(T) (T) TGAC (C/T)] 序列结合,激活下游基因的表达,从而调控植物的各种生理活动。其 C 端是 1 个典型的锌指结构,即 C₂H₂ 或 C₂HC。根据其结构域的数目及锌指结构的类型可将 WRKY 转录因子分为 3 大类群:第 1 类含有 2 个 WRKY 结构域,锌指结构类型为 C₂H₂ 型;第 2 和第 3 大类群 WRKY 转录因子只含有 1 个 WRKY 结构域,锌指结构分别为 C₂H₂ 和 C₂HC 型。该转录因子广泛参与植物的抗病、抗旱等逆境的调控,在细胞代谢和防卫反应中具有重要的作用^[22]。

青蒿素合成过程中的关键酶倍半萜合酶 ADS 能够促进青蒿素的生物合成。青蒿中分离出的 AaWRKY1 能够与 ADS 启动子区域中的顺式作用元件 W-box 结合,从而激活其表达。同时,AaWRKY1 cDNA 在青蒿叶片中的瞬时表达可明显激活青蒿素合成途径中大多数基因的表达。由此证实 AaWRKY1 转录因子参与调控青蒿素合成,并且 ADS 是 AaWRKY1 的靶基因^[23]。杨致荣等^[24]发现长春花 TIAs 合成途径中的一些主要酶基因的启动子序列中均含有 W-box 顺式元件,推测到长春花中 WRKY 类的 CrWRKY 转录因子可能参与调控 TIAs 合成。发现的 47 个 CrWRKY 转录因子中,约 1/3 以上 CrWRKY 的表达受 MeJA 和真菌诱导子(YE)的调控,表明它们可能参与萜 TIAs 的合成和逆境胁迫反应,因为长春花 TIAs 的生物合成受 YE 和 MeJA 等植物激素诱导。同时,还比较分析了长春花野生型毛状根、TDCi 转基因毛状根和 RebH/F 转基因毛状根中 CrWRKY 基因表达谱,发现 CrWRKY 可能参与对毛状根中生物碱合成的前体物质变化的响应以及下游某些生物碱合成积累的调控。

1.3 bHLH 类转录因子

bHLH 类转录因子是植物中最大的转录因子家族之一,具有重要的生物学功能。bHLH 蛋白的 N 末端含有螺旋-环-螺旋结构域和 1 个碱性结构域,是 DNA 的识别和结合所必需的。同时,研究表明 bHLH 蛋白必须形成同源二聚体或异源二聚体后才能特异性地与 DNA 六聚体结合。bHLH 转录因子在植物的生长发育、抗逆性和信号转导等方面发挥着重要作用^[25]。

利用 STR 合成酶基因启动子中的 G-box,从长春花 cDNA 文库中分离出 1 个编码 bHLH 类转录因子的 CrMYC1 的 cDNA。在长春花悬浮细胞中,CrMYC1 mRNA 表达水平受真菌诱导子和 JA 的影响,推测 CrMYC1 可能参与上述信号应答相关的基因表达调控^[26]。在长春花中发现的另 1 个很重要的 bHLH 类转录因子 CrMYC2 是 MeJA 应答基因 ORCA3 表达的主要激活因子,CrMYC2 在体外可结合到 ORCA3 中 JER 的定性序列,并通过该序列激活报告基因的表达。当降低 CrMYC2 的表达水平时,ORCA3 和 ORCA2 的转录因子表达水平也明显下降。由此说明 CrMYC2 转录因子通过调节 ORCA 类基因表达进而调控长春花中响应 MeJA 的萜类生物碱的量^[4]。红豆杉中 bHLH 转录因子 TcJAMYC 可与紫杉醇通路相关基因启动子的 E-box 结合进而激活启动子。若将 TcJAMYC 基因与代谢工程相结合并应用于红豆杉悬浮细胞培养,将有利于提高紫杉醇的产量^[27]。

1.4 bZIP 类转录因子

具有 bZIP 结构域的碱性亮氨酸拉链转录因子是真核生物转录因子中最大且最保守的类型之一。bZIP 转录因子是通过其碱性亮氨酸拉链结构域命名的。bZIP 结构由 1 个接近亮氨酸拉链的富含碱性氨基酸的区域组成。亮氨酸拉链的特征是空间上每隔 7 个氨基酸残基出现 1 个亮氨酸残基,亮氨酸拉链形成 1 个两亲的螺旋结构,该结构参与 bZIP 蛋白与 DNA 结合之前的二聚体化。bZIP 转录因子与植物抵抗各种非生物胁迫以及植物发育与生理代谢过程密切相关^[28]。

以 STR 基因启动子中的 G-box 为诱饵,从长春花 cDNA 库中分离出编码 bZIP 类转录因子 CrGBF 的 cDNA: CrGBF1 和 CrGBF2。CrGBF1 与 STR 启动子中的 G-box 结合能力强于与 TDC 启动子中的 G-box 结合能力,TDC 基因编码 TIAs 合成途径中的另一个酶。实验表明 CrGBF1 和 CrGBF2 能够结

合于 STR 启动子中的 G-box, 负调控萜类生物碱合成基因 STR 的表达^[29]。

1.5 锌指类转录因子

锌指蛋白是一类广泛存在于真核生物体中的重要转录调控因子并且含有特殊的 DNA 结合序列, 锌指的重复个数一般与 DNA 结合能力有关。锌指类转录因子在植物的生长发育过程中起着重要作用。在研究调控长春花中 STR 和 TDC 基因表达的分子机制时, 发现了锌指蛋白家族 ZCT1、ZCT2、ZCT3。这些蛋白结合于 TDC 和 STR 启动子中的特定序列, 并抑制启动子的活性。此外, ZCT 蛋白可抑制 AP2/ERF 转录因子 ORCAs 的活性, 且酵母提取物和 MeJA 能够快速诱导 ZCT 基因表达。上述结果表明 ZCT 转录蛋白能够负调控长春花中受外界因素诱导的次级代谢^[30]。

2 调控黄酮类代谢的转录因子

黄酮类化合物是一类广泛存在于植物中的多酚类次级代谢产物。以黄酮类为主要药效成分的药用植物有黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi、三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen、银杏 *Ginkgo biloba* L.、淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn. 等。黄酮类药效成分包括大豆异黄酮、黄芩黄酮、槲皮素、淫羊藿苷、水飞蓟素等。同时, 黄酮类是植物的主要显色物质, 具有很强的生物活性, 是一种天然的抗氧化剂, 具有抗衰老、增强免疫力、抗癌防癌的作用^[31]。

黄酮类化合物合成代谢途径中的相关基因分为 2 类: 一类是编码酶的结构基因, 另一类是调控基因。黄酮类化合物是一类由苯丙素起始的植物次级代谢物, 其合成途径中关键酶依次主要有查耳酮合成酶 (CHS)、查耳酮异构酶 (CHI)、苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、黄酮醇合成酶 (FLS)、二氢黄酮醇还原酶 (DFR), 其中 DFR 是花青素合成途径中的关键酶^[32]。目前已分离、鉴定了多个调控黄酮类次级代谢的转录因子, 主要包括编码 MYB、MYC、bZIP、WD40 蛋白等基因家族, 其中对 MYB 转录因子研究较为深入^[33]。

2.1 MYB 转录因子

MYB 转录因子是指含有保守的 MYB 基序的一类转录因子, 每个 MYB 基序含有 51~52 个氨基酸残基, 3 个保守的色氨酸残基。每个 MYB 结构域会折叠成的疏水 HTH 形式与 DNA 大沟结合。MYB 蛋白根据其含有 MYB 结构域的数量, 可将其分为 R1 蛋白、R2R3 蛋白、R1R2R3 蛋白以及 4R 蛋白,

植物中绝大多数 MYB 蛋白是 R2R3 型。MYB 类转录因子在植物体内具有广泛的生物学功能, 如参与初生和次生代谢反应、细胞形态与模式建成、植物生长发育、对生物和非生物胁迫的应答等^[34]。

赵海霞等^[35]采用半定量 RT-PCR 分析了苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. 黄酮类合成途径中关键酶基因 (PAL、CHI、FLS) 和 MYB 转录因子基因 FtMyb1、FtMyb2、FtMyb3 的相对表达水平。结果表明, 苦荞种子萌发过程中, 子叶中黄酮的积累与 FtMyb3 的表达呈显著正相关, 与 FtMyb2 的表达呈显著负相关, 与 FtMyb1 的表达没有显著相关性。而且 CHI 可能是 FtMyb2 和 FtMyb3 的激活或抑制转录的效应基因。聚类分析发现, FtMyb1、FtMyb2 与已证实的与花青素调控相关的 MYB 转录因子聚为一类, FtMyb3 可以与已证实的与黄酮醇调控相关的 MYB 转录因子聚为一类。综上所述, 参与苦荞黄酮合成的关键酶基因和 MYB 转录因子之间存在显著的相关性关系, 但是苦荞芽期黄酮合成与 MYB 转录因子及关键酶关系复杂, 有待进一步研究。虎萌^[36]分析了来自苦荞的 FtMyb1 和 FtMyb2 转录因子对转基因烟草黄酮类化合物代谢途径关键酶基因表达的影响。运用紫外-可见分光光度法检测了转基因烟草叶片中总黄酮量的变化。分析表明, FtMyb1 和 FtMyb2 可显著增强 PAL、CHI 基因的表达, 完全抑制 FLS 基因的表达, 则 FtMyb1 和 FtMyb2 可能通过抑制黄酮醇支路, 增加花青苷支路流量, 而提高总黄酮积累。

伍翀^[37]以黄芩为研究对象, Blast 比对发现了 18 个可能的黄芩 MYB 转录因子。通过将黄芩 MYB 转录因子候选基因、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. MYB 转录因子以及其他植物功能已知的 MYB 转录因子的保守基因进行系统发育分析, 其中部分 SbMYB 可能与黄酮类化合物代谢相关。同时外源 ABA 处理可下调黄芩幼苗中黄酮类化合物的生物合成及激活过程, 而 SbMYB7/8 在 ABA 处理后表达量均发生变化, 说明它们可能受 ABA 调控。

2.2 bHLH 类转录因子

在植物中, bHLH 家族的转录因子既可单独结合 DNA, 又可与 MYB 转录因子相互作用来调节黄酮类的合成^[32]。如玉米 *Zea mays* L. 中的 ZmC1MYB 和 ZmB bHLHs^[38]、矮牵牛花 *Petunia hybrida* Vilm 中 NA2MYB 和 JAF13 bHLHs^[39], 均通过蛋白质之间的相互作用, 来调控花青素的合成。在金鱼草

Antirrhinum majus L. 中, 将分别编码 bHLH 和 MYB 转录因子家族的 DEL 和 Ros1 基因转入油菜中, 转基因株系中不仅花青素的量有所增加, 其抗氧化能力也大大增强^[40]。在杨梅 *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. 果实花青苷合成调控研究中, Liu 等^[41]发现 MrbHLH1 可与 MrMYB1 形成转录复合体, 通过选择性激活结构基因活性而促进花青苷的积累。

bHLH 类转录因子不仅能够调控 1 条或多条黄酮类化合物合成途径, 同时还具有调控表皮细胞建成的生理功能^[42]。如拟南芥中的 bHLH 类蛋白既调控黄酮类化合物合成途径中的关键酶基因, 又参与腺毛或根毛的形成和发育^[43]。在玉米中 ZmLc 仅调控花青素的合成, 但是将其在拟南芥中过表达会使腺毛的数量增加, 并伴有花青素的合成^[44]。

2.3 WD40 转录因子

WD40 蛋白是一种具有 β -螺旋结构的超家族, 通常含有 44~60 个氨基酸, 包含 1~10 个串联的 WD40 基序, 每个基序具有保守的 N 端 GH (Gly-His) 和 C 端 WD (Trp-Asp)。WD40 转录因子具有信号转导、转录调控、细胞运动及衰老调控的功能^[45]。参与黄酮类化合物合成调控的 WD40 相继在拟南芥 (TTG1)、紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. (PfPFW)、玉米 (ZmPAC1)、苜蓿 *Medicago sativa* Linn. (MtWD40-1)、苹果 *Malus pumila* Mill. (MdTTG1)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (WDR1 和 WDR2) 等中被分离。WD40 重复蛋白可以同时与其他几种转录蛋白相互作用, 甚至成为蛋白之间相互作用的关键位点, 所以会参与到不同的生物调控途径中。研究发现, 其主要的配体是 bHLH 和 MYB 转录因子。bHLH 转录因子和 MYB 转录因子通过蛋白与蛋白之间的相互作用进而诱导结合 DNA, WD40 转录因子调节促进蛋白间的相互作用, 使其产生更强的效应, 在植物体中常以三元复合体 MYB-bHLH-WD40 的形式存在^[38]。如拟南芥中至少存在 4 种 MYB-bHLH-WD40 (MBW) 复合体参与种皮中原花色苷 (PAs) 的积累, 分别是 TT2-TT8、GL3、EGL3-TTG1 和 MYB5-TT8-TTG1。复合体 TT2-TT8-TTG1 主要调控花青素下游合成途径的关键酶基因的表达, 而 TT2-EGL3、GL3-TTG1 复合体则激活花青素还原酶 (BAN) 基因的表达, TTG1 (WD40) 主要是调节三元复合体的相互作用来阻止其不易降解而调控 BAN 的表达, 进而调节花青素的合成^[46]。蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. 中

MtWD40-1 基因突变后, 植物酚类代谢过程受到抑制, 根部的异黄酮合成也减少, 可见 MtWD40-1 转录因子可能参与植物中酚类的代谢过程如原花色苷、表儿茶酸还有其他黄酮类的合成^[47]。

3 参与生物碱次生代谢合成的转录因子

以生物碱为主要药效成分的药用植物有雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.、长春花、苦参 *Sophora flavescens* Ait.、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 等。生物碱药效成分包括萜类生物碱雷公藤碱, 异喹啉类生物碱小檗碱、药根碱、黄连碱, 吲哚类生物碱喜树碱、长春碱, 喹诺里西啉类生物碱苦参碱等。大多数生物碱具有不同的、显著的生理活性, 如黄连 *Coptis japonica* Makino 中的小檗碱具有抗菌消炎作用; 萝芙木 *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baill. 中的利血平具有降压作用; 长春花中的长春新碱具有抗癌活性; 苦参中的苦参碱具有抗炎、抗过敏作用; 喜树中的喜树碱具有抗肿瘤作用。

长春花中相继鉴定了参与 TIAs 代谢途径调控的 CrORCAs、CrMYCs、CrZCTs 和 CrWRKYs 等转录因子, 这些转录因子可独自正、负调控 1 个或多个酶, 也能共表达调控多个酶促反应, JA 能够诱导由这些转录因子构成的 TIAs 代谢途径调控网络^[48]。

利用酵母单杂交技术从红豆杉中筛选到了 1 个可以和 ts 启动子 JA 响应区结合的 bHLH 家族类转录因子 TcMYC 蛋白和 1 个可与 dbat 启动子 SA 响应区结合的 WRKY 家族类转录因子 TcWRKY1。RNAi 技术和基因过表达分析发现 TcWRKY1 能激活 dbat 基因的表达, TcMYC 则可激活 ts 基因的表达, 进而调控紫杉醇的合成^[49]。

黄连中的 WRKY 类转录因子 CjWRKY1 能够调控异喹啉类生物碱 (IQAs) 合成基因的表达。利用 RNAi 技术减弱黄连细胞原生质体中 CjWRKY1 的表达水平, 发现大部分小檗碱生物合成基因的表达情况也相应地减弱, 过表达 CjWRKY1 使几乎所有参与小檗碱生物合成的基因表达水平上调, 由此可见 CjWRKY1 转录因子是 IQAs 生物合成的调节器^[50]。同样, 通过 RNAi 和过表达实验在黄连中发现了另一个调控 IQAs 合成的 bHLH 类转录因子 CjbHLH1。且染色质免疫沉淀实验表明 CjbHLH1 在胞内直接与 IQAs 生物合成基因启动子序列结合而发挥调控作用^[51]。

目前已鉴定的调控萜类、黄酮类、生物碱类药效成分合成的转录因子见表 1。

表 1 目前已鉴定的调控药效成分合成的转录因子

Table 1 Identified transcription factor genes involved in composition biosynthesis of medicinal plants

植物	类别	命名	参考文献
参与黄酮类合成调控的转录因子			
金鱼草	R2R3MYB	Rosea1、Rosea2、Venosa	52
	bHLH	Delila	53
龙胆 <i>Eustoma russellianum</i>	bHLH	GtbHLH1	54
三花龙胆 <i>Gentiana triflora</i>	R2R3MYB	GtMybP3、GtMybP4	55
苦荞	MYB	FtMyb1、FtMyb2、FtMyb3	56
黄芩	MYB	SbMYB	37
参与萜类合成调控的转录因子			
黄花蒿	WRKY	AaWRKY1	23
	AP2/ERF	AaERF1、AaERF2	14
		AaORA	15
红豆杉	WRKY	WRKY1	49
	AP2/ERF	TcAP2	20
		TcDREB	21
	bHLH	TcJAMYC	27
参与生物碱合成调控的转录因子			
长春花	bHLH	CrMYC1	26
		CrMYC2	4
	AP2/ERF	ORCA1、ORCA2	16
		ORCA3	19
	bZIP	CrGBF1、CrGBF2	29
	WRKY	CrWRKY1	57
	C2H2 Zinc-Finger	ZCT1、ZCT2、ZCT3	30
黄连	bHLH	CjbHLH1	51
	WRKY	CjWRKY1	50

4 调控其他代谢产物合成的转录因子

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的水溶性酚酸类化合物是其主要药用成分之一。王浩如等^[58]发现了 1 个 bHLH 类转录因子 SmMYC，利用农杆菌转化法将 SmMYC 特异性沉默的 amiRNA 植物表达载体导入丹参后发现，阳性株系中 SmMYC 的 mRNA 表达水平均呈现下降趋势，酚酸类代谢途径中相关酶基因的表达水平也表现出相应的下降趋势，因此，初步认为丹参中 SmMYC 可能作为 1 个重要的转录因子参与酚酸类活性物质的代谢调控。刘芬^[59]将拟南芥中的 PAP2 转录因子在丹参中异位表达，发现其可有效激活苯丙烷类代谢途径，调节该途径终产物丹酚酸 B 的合成和积累。

腺毛是多种药用植物药效成分合成的部位，因

此从转录因子角度进行代谢工程还有另外一种策略，即调节控制腺毛发育的转录因子。腺毛的发育受转录因子调控，在拟南芥中 WD40 重复蛋白 (TTG1)、R2R3-MYB 蛋白 (GL1) 和 bHLH 蛋白 (GL3 或 EGL3) 组成了 1 个有活性的 MYB-bHLH- WD40 复合体，该复合体能够诱导毛状体形成。过表达 GL1 导致腺毛数量减少，说明 GL1 在腺毛形成过程中起到负调控^[60]。GL2 和 GL3 在腺毛的形态建成方面起调控作用，且对 GL3 进行过量表达可使腺毛数目增加^[60-66]。Payne 等^[67]研究发现 AtMYC1 是调控腺毛和根毛形成的 1 个重要转录因子，且 AtMYC1 与 GL3/EGL3 存在部分同源序列，此同源序列对于 MYB 蛋白相互作用并发挥相应功能是必不可少的。因此，通过调节转录因子的活性来增加腺毛的密度，

进而增加腺毛中活性物质的产量,从而大幅度提高中药中有效成分的量是可行有效的。

5 结语

天然产物生物合成受植物体严格控制,包括转录调控、发育和时空调控及翻译后调控等。早在利用大规模测序挖掘酶基因和调控基因研究迅速发展起来之前,就有学者指出转录因子是通过生物工程生产源于植物代谢的药理活性成分的重要工具^[5,68]。利用转录因子调控代谢途径的优势在于有些转录因子不仅能调控途径中的单个酶基因,往往可以调控多个酶基因协同表达,可有效启动和关闭次生代谢合成途径,从而调节特定次生代谢物的合成。还可以改变代谢产物产生的植物组织器官,甚至在天然不产生某种代谢产物的植物中调控产生新的代谢产物。随着植物次生代谢调控机制的阐明,特别是随着调节特定次生代谢物合成的转录因子的分离和鉴定,转录因子基因工程将为人类开发利用植物次生代谢物这一巨大的宝库提供有效的手段。

目前,在天然活性成分生物合成途径和调控方面研究还很薄弱,鉴定出的调控代谢途径中的靶基因还较少,很多研究仅仅是发现了转录因子和成分合成相关,但具体调控的靶基因和作用机制还不清晰。另外,该领域的研究主要集中在长春花、青蒿、红豆杉等少数物种,与药用植物中药效成分合成相关的转录因子报道还不多,而且有关转录因子调控机制的研究还不透彻,大部分的转录因子还处于认识和探索阶段,离应用开发还有一定距离。同时,次生代谢物生物合成过程的调控比较复杂,其合成还与环境刺激因子如光、温度和营养供给有关;此外,也受内部因子的作用,如生长调节因子、代谢物以及组织特殊发育阶段的影响。不同的调控因子控制了生物合成途径的不同部分,不同的调控因子之间也存在着相互作用,而这些调控机制仍需要进一步研究。总之,研究药用植物药效成分的生物合成及其基因调控模式,将有利于更好地采用基因工程手段改良植物次生代谢途径。

参考文献

[1] Liu D H, Ren W W, Cui L J, *et al.* Enhanced accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots by overexpression of transcriptional factor ORCA2 [J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(17): 3260-3268.

[2] Pauw B, Hilliou F A, Martin V S, *et al.* Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid

biosynthesis genes in *Catharanthus roseus* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 79(51): 52940-52948.

[3] Baudry A, Heim M A, Dubreucq B, *et al.* TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2004, 39(3): 366-380.

[4] Zhang H, Hedhili S, Montiel G, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonateresponsive expression of the ORCA genes regulating alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant J*, 2011, 67(1): 61-71.

[5] Broun P. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(2): 202-209.

[6] Yang C Q, Fang X, Wu X M, *et al.* Transcriptional regulation of plant secondary metabolism [J]. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54(10): 703-712.

[7] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, *et al.* High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.

[8] Dai Z B, Wang B B, Liu Y, *et al.* Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 3698-3703.

[9] Engels B, Dahm P, Jennewein S. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards taxol (paclitaxel) production [J]. *Metab Eng*, 2008, 10(3/4): 201-206.

[10] Dai Z B, Liu Y, Guo J, *et al.* Yeast synthetic biology for high value metabolites [J]. *FEMS Yeast Res*, 2015, 15(1): 1-11.

[11] 王凌健, 方欣, 杨长青, 等. 植物萜类次生代谢及其调控 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(12): 1030-1046.

[12] 赵恒伟, 葛锋, 孙颖, 等. 植物萜类物质生物合成的相关转录因子及其应用前景 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2512-2519.

[13] 张计育, 王庆菊, 郭忠仁. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展 [J]. *遗传*, 2012, 34(7): 835-847.

[14] Yu Z X, Li J X, Yang C Q, *et al.* The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 353-365.

[15] Lu X, Zhang L, Zhang F, *et al.* AaORA, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea* [J]. *New Phytol*, 2013, 198(4): 1191-1202.

[16] Menke F L H, Champion A, Kijne J W, *et al.* A novel jasmonate-and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene strinteracts with a jasmonate and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2 [J]. *EMBO J*,

- 1999, 18(16): 4455-4463.
- [17] Boer K D, Tilleman S, Pauwels L, *et al.* APETALA2/ETHYLENE response factor and basic helix-loop-helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis [J]. *Plant J*, 2011, 66(6): 1053-1065.
- [18] Van der Fits L, Memelink J. The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element [J]. *Plant J*, 2001, 25(1): 43-53.
- [19] Memelink J, Gantet P. Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Phytochemistry*, 2007, 6(2/3): 353-362.
- [20] Dai Y L, Qin Q L, Dai D L, *et al.* Isolation and characterization of a novel cDNA encoding methyl jasmonate-responsive transcription factor TcAP2 from *Taxus cuspidate* [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(11): 1801-1809.
- [21] 戴怡龄. 红豆杉中与异戊二烯代谢途径相关的 AP2 类转录调控因子的克隆与功能研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [22] 田云, 卢向阳, 彭丽莎, 等. 植物 WRKY 转录因子结构特点及其生物学功能 [J]. *遗传*, 2006, 28(12): 1607-1612.
- [23] Ma D, Pu G, Lei C, *et al.* Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12): 2146-2161.
- [24] 杨致荣, 王兴春, 薛金爱, 等. 药用植物长春花 WRKY 转录因子的鉴定及表达谱分析 [J]. *生物工程学报*, 2013, 29(6): 785-802.
- [25] 张鑫, 宋经元, 胡鸢雷, 等. bHLH 转录因子调控植物活性成分生物合成的研究进展 [J]. *药学学报*, 2014, 49(4): 435-442.
- [26] Chatel G, Montiel G, Pré M, *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]. *J Exp Bot*, 2003, 54(392): 2587-2588.
- [27] Nims E, Vongpaseuth K, Roberts S C, *et al.* TcJAMYC: a bHLH transcription factor that activates paclitaxel biosynthetic pathway genes in yew [J]. *J Biol Chem*, 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.026195.
- [28] 张计育, 渠慎春, 郭忠仁, 等. 植物 bZIP 转录因子的生物学功能 [J]. *西北植物学报*, 2011, 31(5): 1066-1075.
- [29] Sibénil Y, Benhamron S, Memelink J, *et al.* *Catharanthus roseus* G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 45(4): 477-488.
- [30] Pauw B, Hilliou F A O, Martin V S, *et al.* Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 52940-52948.
- [31] 沈忠伟, 许昱, 夏彝, 等. 植物类黄酮次生代谢生物合成相关转录因子及其在基因工程中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6(3): 542-548.
- [32] 康亚兰, 裴瑾, 蔡文龙, 等. 药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因的研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(9): 1336-1341.
- [33] 乔小燕, 马春雷, 陈亮. 植物类黄酮生物合成途径及重要基因的调控 [J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(2): 354-360.
- [34] 刘淑君, 万红建, 叶青静, 等. 植物 MYB 转录因子的研究进展 [J]. *分子植物育种: 网络版*, 2011, 9(114): 1835-1842.
- [35] 赵海霞, 吴小峰, 吴琦, 等. 苦荞芽期黄酮合成关键酶和 MYB 转录因子基因的表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(2): 121-128.
- [36] 虎萌. 苦荞转录因子 FtMYB1 和 FtMYB2 对烟草黄酮合成关键酶基因表达和黄酮积累的影响 [D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
- [37] 伍翀. 黄芩 MYB 转录因子功能初步研究 [D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
- [38] Shou Q F, Wang Y L, Yang S, *et al.* Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a R2R3-MYB transcription factor PyMYB10 [J]. *Planta*, 2010, 232(1): 245-255.
- [39] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 485-493.
- [40] Espley R V, Brendolise C, Hellens R P, *et al.* Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 168-183.
- [41] Liu X F, Yin X R, Xu C J, *et al.* The Role of MrbHLH1 and MrMYB1 in regulating anthocyanin biosynthetic genes in tobacco and Chinese bayberry (*Myrica rubra*) during anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2013, 115(3): 286-298.
- [42] Hichri I, Barrieu F, Bogs J, *et al.* Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(8): 2465-2483.
- [43] Heim M A, Jakoby M, Werber M, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(5): 735-747.
- [44] Lloyd A M, Walbot V, Davis R W. Arabidopsis and nicotiana anthocyanin production activated by maize regulators R and C1 [J]. *Science*, 1992, 258(5089): 1773-1775.
- [45] 李宗艳, 李名扬. 调控植物类黄酮生物合成的转录因子研究进展 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2011, 35(5): 129-134.

- [46] Xu W J, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(3): 176-185.
- [47] Pang Y Z, Wenger J P, Saathoff K, *et al.* A WD40 repeat protein from *Medicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but not for trichome development [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(3): 1114-1129.
- [48] 杨致荣, 陈 钊, 李润植. 茉莉素介导的长春花生物碱次生代谢转录调控机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(6): 533-542.
- [49] 李书涛. 调控紫杉醇合成转录因子 TcMYC 和 TcWRKY1 的克隆及功能研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [50] Kato N, Dubouzet E, Taniguchi Y, *et al.* Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(1): 8-18.
- [51] Yamada Y, Kokabu Y, Chaki K, *et al.* Isoquinoline alkaloid biosynthesis is regulated by a unique bHLH-type transcription factor in *Coptis japonica* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(7): 1131-1141.
- [52] Schwinn K, Venail J, Shang Y, *et al.* A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in genus *Antirrhinum* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 831-851.
- [53] Goodrich J, Carpenter R, Coen E S. A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species [J]. *Cell*, 1992, 68(5): 955-964.
- [54] Nakatsuka T, Haruta K S, Pitaksutheepong C, *et al.* Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(12): 1818-1829.
- [55] Nakatsuka T, Saito M, Yamada E, *et al.* Isolation and characterization of GtMYBP3 and GtMYBP4, orthologues of R2R3-MYB transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in gentian flowers [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(18): 6505-6517.
- [56] 蒙 华. 苦荞 MYB 转录因子基因的克隆及转录激活功能鉴定 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [57] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, *et al.* The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(4): 2081-2093.
- [58] 王浩如, 王 健, 王仕英, 等. 丹参转录因子基因 SmMYC amiRNA 表达载体的构建及其对丹参的转化 [J]. *植物生理学报*, 2013, 49(12): 1339-1346.
- [59] 刘 芬. 转录因子 PAP2 对丹参酚酸类产物合成的影响 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.
- [60] Szymanski D B, Klis D A, Larkin J C, *et al.* Cot1: a regulator of *Arabidopsis* trichome initiation [J]. *Genetics*, 1998, 149(2): 565-577.
- [61] Balkunde R, Pesch M, Hülskamp M. Trichome patterning in *Arabidopsis thaliana* from genetic to molecular models [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 91: 299-321.
- [62] Tominaga-Wada R, Ishida T, Wada T. New insights into the mechanism of development of *Arabidopsis* root hairs and trichomes [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2011, 286: 67-106.
- [63] Pesch M, Hülskamp M. One, two, three ... models for trichome patterning in *Arabidopsis* [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12(5): 587-592.
- [64] Bernhardt C, Lee M M, Gonzalez A, *et al.* The bHLH genes GLABRA3 (GL3) and enhancer of GLABRA3 (EGL3) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root [J]. *Development*, 2003, 130(26): 6431-6439.
- [65] Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, *et al.* The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci [J]. *Development*, 2008, 135(11): 1991-1999.
- [66] Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, *et al.* A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2003, 130(20): 4859-4869.
- [67] Payne C T, Zhang F, Lloyd A M. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1 [J]. *Genetics*, 2000, 156(3): 1349-1362.
- [68] Gantet P, Memelink J. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(12): 563-569.