

# 柴胡生物培养技术与柴胡皂苷合成生物学的研究进展

王晨<sup>1</sup>, 安立成<sup>1</sup>, 李剑超<sup>1</sup>, 戚文涛<sup>1</sup>, 刘长利<sup>1,2\*</sup>, 李莉<sup>3,4\*</sup>

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 中医络病研究北京重点实验室, 北京 100069;  
3. 北京市中药研究所, 北京 100035; 4. 首都医科大学 附属北京中医医院, 北京 100010)

**[摘要]** 合成生物学是解析中药活性成分生物合成途径、发掘参与生物合成功能基因的一门新兴学科。柴胡是我国常用大宗中药材,药用价值显著。柴胡皂苷是其指标性成分,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等显著活性。但目前野生柴胡资源遭到破坏,人工栽培过程中存在一定问题。生物培养技术及合成生物学的应用可扩大柴胡皂苷的来源,保护柴胡资源。不同植物的培养条件没有固定模式可遵循,不同药用活性成分的生物合成途径也是不一致的。目前,尚无柴胡组织培养技术及柴胡皂苷生物合成途径研究的综述报道。该文拟介绍合成生物学过程中用到的愈伤组织培养、不定根培养、毛状根培养与悬浮细胞培养等生物培养技术与柴胡皂苷生物合成途径及其关键酶功能基因的研究进展,建议通过借鉴其他传统根类药材的组织培养技术,对柴胡的生物培养技术进行优化,为深入研究柴胡皂苷的生物合成途径与代谢调控提供参考。

**[关键词]** 柴胡; 生物培养技术; 柴胡皂苷; 合成生物学; 不定根; 培养条件; 组学

**[中图分类号]** R22;R931;R28;Q52;Q813.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0228-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191048

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190124.0947.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-25 13:46

## Advances in Bioculture Technology of Bupleuri Radix and Biosynthesis Pathways of Saikosaponins

WANG Chen<sup>1</sup>, AN Li-cheng<sup>1</sup>, LI Jian-chao<sup>1</sup>, QI Wen-tao<sup>1</sup>, LIU Chang-li<sup>1,2\*</sup>, LI Li<sup>3,4\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Capital Medical University, Beijing 100069, China;  
2. Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China;  
3. Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing 100035, China;  
4. Beijing Hospital of TCM, Capital Medical University, Beijing 100010, China)

**[Abstract]** Synthetic biology is an emerging discipline that analyzes the biosynthesis pathways of active constituents in traditional Chinese medicine and explores genes involved in biosynthesis. Bupleuri Radix is one of the most commonly used Chinese medicinal materials with remarkable medicinal value, its index component is saikosaponins, which has significant anti-inflammatory, anti-viral and anti-tumor activities. However, the current wild resources of Bupleuri Radix have been destroyed, and there were some problems in the process of artificial cultivation. The application of biological culture technology and synthetic biology can expand the sources of saikosaponins and protect resources of Bupleuri Radix. The culture conditions of different plants can be followed without a fixed pattern, and the biosynthetic pathways of different medicinal active ingredients are also inconsistent. At present, there is no review report on the culture technology of Bupleuri Radix and the research on the biosynthesis pathway of saikosaponins. This paper introduces the research progress of biological culture techniques,

**[收稿日期]** 20181130(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81872947);首都中医药研究专项(17zy06)

**[第一作者]** 王晨,在读硕士,从事中药资源学研究,Tel:010-83950333,E-mail:wangchen90022@163.com

**[通信作者]** \*刘长利,副教授,从事药用植物次生代谢机制及其药材质量调控研究,Tel:010-83911632,E-mail:lcl74@126.com;

\*李莉,副研究员,从事中药材质量评价与中药资源开发研究,Tel:010-83229447,E-mail:lyx9981@163.com

such as callus culture, adventitious root culture, hairy root culture and suspension cell culture used in synthetic biology, and the biosynthesis pathway of saikosaponins and its key enzyme functional genes. It is suggested to optimize the biological culture technology of *Bupleuri Radix* by referring to the tissue culture technology of other traditional root medicinal materials, so as to provide a reference for the in-depth study on the biosynthesis pathway and metabolic regulation of saikosaponins.

[Key words] *Bupleuri Radix*; biological culture technique; saikosaponins; synthetic biology; adventitious roots; culture conditions; omics

合成生物学是利用基因组测序技术、计算机模拟技术、生物工程技术及化学合成技术等设计生物工厂进而产生高价值化合物的学科。许多药用植物生长受环境影响较大且生长周期长,药用活性成分在原植物中含量低<sup>[1]</sup>。将合成生物学灵活应用到现代中药中,用于研究中药药用活性成分,是获得部分中药有效成分的重要方法之一,从而使中药资源得到有效保护与可持续利用。现已有多种中药药用活性成分进行合成生物学研究,例如丹参酮<sup>[2]</sup>、青蒿素<sup>[3]</sup>、紫杉醇<sup>[4]</sup>、柴胡皂苷<sup>[5]</sup>等。

柴胡是我国常用大宗中药材,药用历史悠久,始载于《神农本草经》,列为上品,具有解热、抗炎、镇痛、免疫调节、保肝等功效,是传统中医治疗少阳证的首选药物。柴胡药用价值显著,是柴胡疏肝丸、小柴胡颗粒、逍遥丸、感冒清热颗粒等中成药的主要成分之一。其市场需求量逐步增大,野生柴胡资源遭到开采,蕴藏量逐渐下降。此外,野生柴胡资源存在来源地不明、种质混杂等弊端,药材均一性差、药材市场混乱导致药效不稳定。目前应用的柴胡多为人工栽培品,发芽率低、出苗不整齐、周期长、产量低;且在栽培中通常使用农药,易造成农药残留和重金属残留等问题。为了保护日渐枯竭的野生柴胡资源,保证药材质量和药效,应用现代生物技术,特别是组织培养技术,进行大规模工业化培养,对解决这些问题具有重要意义<sup>[6]</sup>。合成生物学的飞速发展,也可进一步扩大柴胡皂苷的来源,进而保护柴胡资源;其借助于人工设计或改造的微生物细胞工厂合成自然界中不易得到的天然产物,对于获取成本较高的中药活性成分的工业化生产具有重要意义。应用组织培养技术、生物合成技术皆可有效应对当今柴胡资源出现的问题。在不同植物中应用的生物培养技术是类似的,但不同植物的培养条件没有固定模式可遵循。不同药用植物中的药用活性成分不同,在不同植物体内的生物合成途径也是不一致的。目前,尚无柴胡组织培养技术及柴胡皂苷生物合成途径研究的综述报道,本文通过介绍合成生物学过

程中用到的愈伤组织培养、不定根培养、毛状根培养与悬浮细胞培养等生物培养技术,柴胡皂苷生物合成途径及其关键酶功能基因的研究进展,对柴胡的生物培养技术提出可能的优化方案,为深入研究柴胡皂苷的生物合成途径与代谢调控提供参考。

### 1 柴胡的生物培养技术研究进展

我国有柴胡属植物 36 种,柴胡药材来源广泛,各地使用品种不一。据调查,中国现在使用的柴胡主要有 25 种之多,广泛分布于除海南省以外的全国各省<sup>[7]</sup>。然而 2015 年版《中国药典》(一部)收录的柴胡来源仅为柴胡 *Bupleurum chinese* 或狭叶柴胡 *B. scorzoniferifolium*, 分别习称“北柴胡”和“南柴胡”。柴胡为传统的根类药材,可以采用不定根培养、毛状根培养、悬浮细胞培养等技术获取柴胡中柴胡皂苷等药用活性成分。在生物培养过程中,可通过调节培养基成分、添加适宜浓度的外源物质、激素等促进生长、提高产量及其药用活性成分的含量。

**1.1 愈伤组织培养技术** 植物愈伤组织是薄壁松散的细胞团。愈伤组织培养是植物组织培养中的基础技术,操作步骤相对简单,且有重要的应用价值。愈伤组织培养技术指在无菌条件下,将离体的植物器官、组织、细胞、胚胎、原生质体培养在人工配制的培养基中,给予适宜的培养条件,诱发产生愈伤组织<sup>[8]</sup>。研究发现愈伤组织在适宜的培养条件下,可产生比原外植体更多的次生代谢产物<sup>[9]</sup>。柴胡愈伤组织的常见培养方法是取柴胡无菌苗的不同部位,在添加了适宜浓度植物激素的培养基中进行诱导,即脱分化的过程。姚智等<sup>[10]</sup>研究发现在 MS 培养基中添加  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  萘乙酸(NAA)及  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  激动素(KT)是最适宜无菌苗诱导产生愈伤组织的条件。愈伤组织在培养过程中易出现褐化问题,研究表明采用 N6 培养基并在其中加入  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)及  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抗褐化剂聚乙烯吡咯烷酮(PVP)可减少培养过程中褐化问题,同时提高愈伤组织的诱导率<sup>[11]</sup>。

愈伤组织不仅可以进一步再分化,诱导产生不

定根、毛状根等,同时也是制备原生质体的理想材料。原生质体是去除坚韧细胞壁后裸露的植物细胞,在快速繁殖、远缘遗传重组、选育优良突变体方面有重要作用。应用柴胡的原生质体分别与胡萝卜<sup>[12]</sup>、葡萄、石防风及川西獐牙菜<sup>[13]</sup>等原生质体杂交已见报导。程玉鹏等<sup>[14]</sup>使用 2% 纤维素酶 + 1% 离析酶酶解细胞壁,采用  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  甘露醇为稳渗剂,27 °C 避光预裂解 2 h 后酶解 4 h 时可获得较多的狭叶柴胡原生质体,为进一步研究提供了材料。

**1.2 不定根培养技术** 不定根是指从植物的非根组织上形成的根,如从茎叶等位置上长出的根。不定根的发生方式分为 2 种,一种为直接生发,即从茎、叶、枝条上直接生长出不定根;另一种为间接生发,即先产生愈伤组织,再进行分生、分化,最后产生不定根原基。不定根培养的增殖速度快,获取量多<sup>[15]</sup>。杨东方等<sup>[16]</sup>通过直接生发实验,在 MS 或 1/2 MS 培养基中分别添加不同浓度的吲哚丁酸(IBA)进行北柴胡的带侧芽茎段不定根诱导,不定根诱导成功率在 80% 以上,效果显著。在间接生发实验中,培养基中通常可加入各种植物激素、前体物质、诱导子、抑制剂等诱导愈伤组织,可以提高柴胡不定根中有效成分含量<sup>[15]</sup>。实验发现 NAA 更适于诱导愈伤组织产生不定根,并且宜在黑暗条件下诱导产生愈伤组织和不定根<sup>[10]</sup>。若选择丛生芽诱导不定根的方法,余马等<sup>[17]</sup>选择北柴胡带叶嫩茎段为外植体,在基本培养基中加入  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 诱导产生的不定芽数量多、鲜重及干重高、叶绿素含量高。剥离丛生芽放入  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的基本培养基中,诱导产生的不定根个数多。

在 不定根诱导产生次生代谢物柴胡皂苷实验中,关倩<sup>[15]</sup>发现在基础培养基中添加不同浓度前体物质、诱导子均可不同程度的提高北柴胡中柴胡皂苷含量。采用分步控糖法,控制蔗糖质量分数为 5%,适宜北柴胡不定根生长和皂苷合成。通过补加培养基的方法也可延长不定根生长及柴胡皂苷合成的时间。王梅等<sup>[18]</sup>以 3 种产于山西万荣、左权、芮城的柴胡为原植物体,在基础培养基中添加乙酸钠、水杨酸(SA)和  $\text{Cu}^{2+}$ ,均有利于不定根合成柴胡皂苷。战晴晴等<sup>[19]</sup>利用茉莉酸甲酯处理北柴胡不定根,发现其对柴胡皂苷的积累有明显促进作用。Hilo 等<sup>[20]</sup>研究指出,铁元素及铵根离子( $\text{NH}_4^+$ )可以加速不定根的生成,进而提高次生代谢物的合成速率。目前,关于柴胡不定根培养技术的研究相对较多<sup>[10,15-20]</sup>,培养条件日益成熟。选择不同的生物

反应器、尝试添加不同的诱导子,不定根的生长速率及其柴胡皂苷的含量可能会进一步提高。

**1.3 毛状根培养技术** 毛状根培养于 1980 年代发展起来,是将基因工程与细胞工程相结合的一项生物技术,1977 年首次用发根农杆菌侵染高等植物获得毛状根,通过将发根农杆菌中 Ri 质粒的转移 DNA(T-DNA)整合到植物细胞的 DNA 上,诱导植物细胞产生毛状根。毛状根具有生长迅速、生长条件简单、次生代谢物合成产量高且稳定、不需外源激素、在无激素培养基上也能快速生长等优点。例如可培养罂粟毛状根来获得苜蓿基异喹啉类生物碱,以此减少罂粟的种植,且安全有效<sup>[21]</sup>。影响毛状根生长及有效成分积累的因素很多,如物理因素、化学因素、诱导子等<sup>[22]</sup>。物理因素常见的有光照、温度、水、溶氧情况和 pH 等,化学因素常见的有培养基类型、外源激素、前体物质<sup>[23]</sup>等,诱导子可分为生物诱导子(如细菌、真菌)和非生物诱导子[如茉莉酸甲酯(MeJA),SA 及重金属等]。孙晶等<sup>[24]</sup>研究指出在添加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 的 B5 培养基中,毛状根和柴胡皂苷产量最高,分别为 2.4 g 和 9.05 mg。YANG 等<sup>[25]</sup>研究显示,酵母抽提物(YE)和  $\text{Ag}^+$  可提高丹参毛状根中次生代谢物含量,因此可尝试在柴胡毛状根培养基中加入不同的诱导子来提高柴胡皂苷的含量。柴胡毛状根培养方面所做的研究较少,特别是南柴胡毛状根的培养,这可以作为下一步的重点研究方向。

**1.4 悬浮细胞培养技术** 植物悬浮细胞培养技术是将植物愈伤组织加入装有特定培养基的培养瓶中,并在摇床中振荡培养,来得到植物代谢产物。影响柴胡悬浮细胞生长速率的因素有愈伤组织接种量、培养基体积和外源物质种类及其浓度等。在悬浮细胞培养过程中,其生长分裂需具有一定的初始细胞密度,但细胞密度过高则细胞液泡膨胀,容易积累有害物质进而影响次生代谢物的合成。程玉鹏等<sup>[26]</sup>验证狭叶柴胡悬浮细胞的最佳生长条件是无菌条件下取狭叶柴胡愈伤组织 2.0 g,将其放入装有 MS 发酵液 100 mL 的 250 mL 锥形瓶中,细胞鲜重增加 2.342 g。周永强<sup>[27]</sup>分析狭叶柴胡悬浮细胞干重随时间变化的曲线,得知在第 15 天时,细胞干重最大,若在培养基内添加  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  水解酪蛋白可得细胞最佳收获量。另外,也可尝试添加不同的外源物质如  $\text{Mg}^{2+}$  等来提高细胞收获量。悬浮细胞培养技术步骤简单,但相关实验开展不多,可进一步优化其培养条件,得到稳定的培养体系。

## 2 柴胡皂苷合成生物学研究进展

合成生物学的研究包括解析化合物的生物合成途径,明确其中关键酶基因功能,进而构建人工系统,优化培养方案,实现大规模生产。目前柴胡皂苷详细的生物合成途径尚不完全明晰,但合成途径上游中间体及相关酶基因已经有所报道,下游细胞色

素 P450 酶基因与糖基转移酶(UGT)基因还未研究透彻。

**2.1 柴胡皂苷的生物合成途径** 根据现有研究推测柴胡皂苷合成主要包括 3 个阶段,分别为前体形成、三萜骨架的搭建、结构修饰。柴胡皂苷的生物合成途径见图 1。

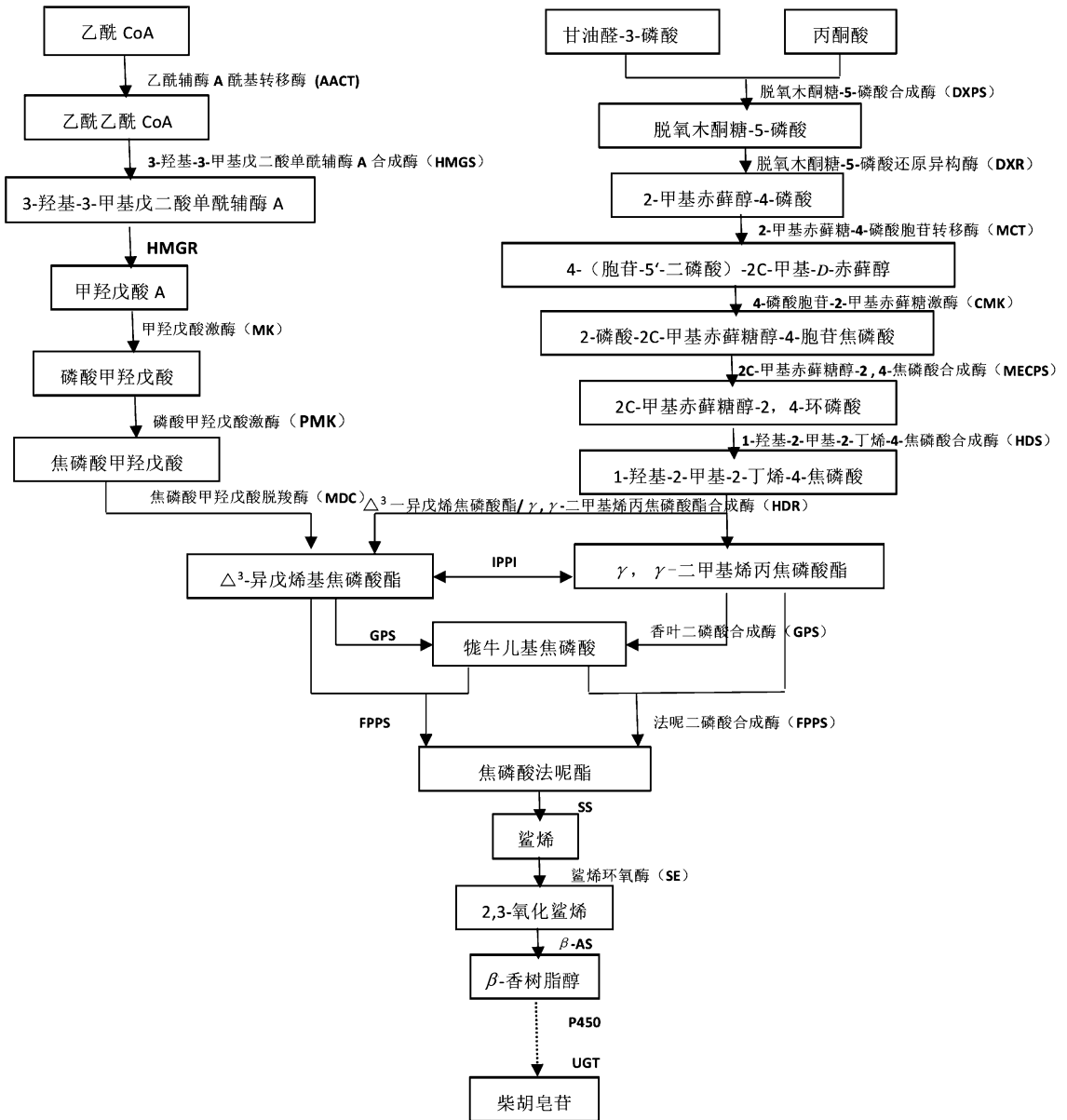


图 1 柴胡皂苷的生物合成途径

Fig.1 Biosynthetic pathways of saikosaponins

### 2.2 柴胡皂苷合成途径中关键酶功能基因研究

**2.2.1 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 基因** 由乙酰辅酶 A(乙酰 CoA)形成 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A (HMG-CoA), 然后在其还原酶 HMGR 的催化作用下生成甲羟戊酸 (MVA)。生成的 MVA 是类异戊二烯生物合成途径中的重要

前体, HMGR 基因是此途径中的第 1 个限速酶<sup>[28]</sup>, 此过程是不可逆反应。董乐萌等<sup>[5]</sup>采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 从北柴胡植株中克隆了 HMGR 基因互补脱氧核糖核酸 (cDNA) 片段, 并对获得的序列进行初步分析, 通过 DNAMAN 软件, 在 HMGR 氨基酸序列中发现了 2 个功能烟酰胺腺嘌呤

二核苷酸磷酸 (NADPH) 结合基序, 分别为 DAMGMNM 和 GTVGGGT。

**2.2.2 异戊烯基焦磷酸异构酶 (IPPI) 基因** 柴胡皂苷属于类异戊二烯化合物, 是由异戊烯基焦磷酸 (IPP) 与其烯丙基异构体二甲基丙烯基二磷酸 (DMAPP) 缩合后经一系列催化反应而形成<sup>[29]</sup>。其中 IPP 和 DMAPP 的相互转化由 IPPI 催化。IPPI 是类异戊二烯化合物生物合成过程中的关键酶<sup>[30]</sup>, 大多数植物体细胞内存在 2 种不同亚细胞定位的 IPPI<sup>[31-32]</sup>。董乐萌等<sup>[5]</sup>报道了北柴胡柴胡皂苷合成途径中关键酶基因 *IPPI* 的 cDNA 片段, 获得了新的基因片段序列, 并通过构建植物 *IPPI* 的分子进化树表明, 北柴胡 *IPPI* 基因与伞形科植物 (胡萝卜和三岛柴胡) 亲缘关系最近。隋春等<sup>[33]</sup>利用 PCR 矩阵法快速筛选出北柴胡全长 cDNA 文库, 并首次克隆出生物合成途径中关键酶之一的 *IPPI* 的全长 cDNA, 此基因核苷酸序列长 1 117 bp, 编码了 319 个氨基酸。

**2.2.3 鲨烯合酶基因** 鲨烯合酶 (SS 或 SQS) 是植物甾醇和三萜化合物生物合成的关键酶, 其定位于细胞内质网膜, 催化两分子的法呢酰基二磷酸 (FPP) 缩合生成植物甾醇和三萜类化合物形成的第一个前体——鲨烯。隋春等<sup>[34]</sup>根据氨基酸序列的同源性构建了 32 种植物中 43 条蛋白序列的系统发育树, 结果表明不同植物来源的氨基酸序列长度差别不大, 同一种植物的 2 条氨基酸序列差异也不大, 由此得出氨基酸在进化过程中相对保守。以北柴胡不定根为材料, 运用 trizol 法提取总 RNA, 从北柴胡中扩增出鲨烯合酶 cDNA 特异性片段, 并进行了克隆与测序。测序结果显示得到了 2 个序列不同的 cDNA (*BcSS1* 和 *BcSS2*), 序列长度分别为 1 245 bp 和 1 248 bp, 分别编码了 414, 415 个氨基酸。

**2.2.4  $\beta$ -香树脂醇合成酶 ( $\beta$ -AS) 基因**  $\beta$ -AS 是合成各类三萜类产物的前体, 由于大多数三萜类皂苷是由齐墩果烷和达玛烯衍化而来的, 因此  $\beta$ -AS 对三萜类皂苷的合成有举足轻重的作用。董乐萌<sup>[35]</sup>利用 RT-PCR 从北柴胡中扩增出了  $\beta$ -AS, 并发现  $\beta$ -AS 基因在根中的含量最高, 是叶子中含量的 11.5 倍。

**2.2.5 细胞色素 P450 酶基因** 植物细胞色素 P450 酶具有广泛的催化活性, 参与了苯丙烷类、植物激素、生氰糖苷类、萜类、生物碱等化合物的生物合成, 被称为“万能生物催化剂”。其催化作用的共同特点是在前体分子中加入 1 个氧原子。在三萜皂苷的生物合成中, 细胞色素 P450 酶主要催化三萜骨

架惰性甲基和亚甲基的氧化。但细胞色素 P450 酶催化反应很复杂, 对其的研究为数不多。徐洁森<sup>[36]</sup>在利用 454 高通量测序获得 5' 和 3' 端部分 cDNA 序列基础上, 利用长距离-PCR (LD-PCR) 获得全长 cDNA, 扩增到了北柴胡细胞色素 P450 酶基因 *BcCYP87E* 并构建了这一基因的过量表达载体, 但该基因功能尚未验证。

**2.2.6 UGT 基因** UGT 位于三萜皂苷生物合成途径下游, 其可催化三萜骨架糖基化。UGT 在生物体内将糖基催化活化并连接到不同的受体分子如蛋白、核酸、寡糖等。糖基化的产物具有很多生物学功能, 现普遍认为代谢物和外源物的糖基化可调整其稳定性、生物活性、溶解度以及信号存储或者内部运输、胞间运输等<sup>[37-38]</sup>。在植物体的调控和代谢途径中 UGT 通过对一系列化合物的激活、抑制或者是溶解度调节而发挥作用。三萜皂苷的苷元糖基化是决定三萜皂苷生物活性的重要一步。三萜皂苷的糖基通常是由寡聚糖链和 2~5 个单糖单元构成, 糖链和单糖较多连接在皂苷元的 C-3 或 C-28 位置。徐洁森<sup>[36]</sup>在 454 高通量测序已获得部分 cDNA 序列基础上, 通过 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE) 和 LD-PCR 扩增全长 cDNA 克隆。得到北柴胡其中 1 个 UGT 基因, 并命名为 *BcUGT10*。构建了这一基因的过表达和抑制表达转基因载体, 但北柴胡中还有部分 UGT 基因尚未发掘。

### 3 展望

生物培养技术与合成生物学的结合日益密切, 二者之间相辅相成。例如在研究基因功能的实验中所用的基因沉默、过表达技术<sup>[39]</sup>, 可用转入特定载体的发根农杆菌侵染外植体的方法获得毛状根来进行深入研究。此外也可在原生质体、毛状根中<sup>[40]</sup>转入外源如绿色荧光蛋白等蛋白质基因, 以进一步研究基因功能。今后, 生物培养技术势必将更广泛地运用于合成生物学中, 加速柴胡皂苷生物合成途径的解析过程。在生物培养技术应用过程中, 培养条件将逐渐被优化, 方法也会更加成熟。毛状根、悬浮细胞等可导入或沉默相关代谢途径中的基因, 以此来产生更多的次生代谢产物。二者的相辅相成可扩大柴胡皂苷的来源, 进而提高和保证药材质量, 这也是解决如今柴胡资源混乱、野生资源匮乏的重要途径。

柴胡应用广泛, 药效明显。因此其不定根培养、毛状根培养、悬浮细胞培养等技术的研究与应用具有广阔前景。但每种植物都有其特殊性, 每种植物的诱导模式没有固定模式可循, 且受多种因素影响,

因此,在柴胡生物培养技术领域还有很多方向值得研究。由于不定根的特殊形态,在传统容器内培养可能不利于其增长,生物反应器可为不定根提供良好的生长环境<sup>[41]</sup>。同为根类入药的人参,在不定根培养过程中应用生物反应器的方式已经成熟,且研究得知应用生物反应器可提高人参不定根中皂苷类成分的含量<sup>[42]</sup>。目前利用生物反应器培养柴胡不定根、愈伤组织、毛状根的研究尚未见报道,可尝试应用此方法来提高柴胡组织的培养效率。毛状根培养技术发展时间较短,但柴胡的毛状根培养体系还需优化。目前柴胡大多采用外植体接种法产生毛状根,但此方法要求在严格无菌环境下操作且耗时较长。提示柴胡的毛状根培养体系优化及考察还需深入研究。药用植物丹参近期已有原位土培侵染产生毛状根的报道,在植株生长的自然条件下即可侵染产生毛状根,这种方法省时、简单、便于操作<sup>[43]</sup>。说明开发柴胡新的毛状根诱导途径成为可能,但柴胡毛状根是否可以代替传统柴胡药材应用还需要考证。黄志成等<sup>[44]</sup>在丹参毛状根与丹参药材进行对比的实验中,发现,不添加诱导子或添加 Ag<sup>+</sup>,脱落酸(ABA)和 YE 等诱导子产生的毛状根与丹参药材的指纹图谱相似度并不高,甚至很低,且有效成分含量大幅低于药材。研究柴胡内生真菌或许可开发新种类的抗生素、扩大柴胡次生代谢物生产途径,具有广阔的推广前景。植物内生真菌是指其在生活中某一段时期生活在植物组织内,对健康植物组织不引起任何病害症状的所有真菌。和植物体存在一定的寄生关系,很多真菌带有植物体的酶系,不仅可以促进植株生长、赋予植株抗逆性,还可以产生和寄主植物相同的次生代谢产物。目前,已有初步分离野生柴胡<sup>[45]</sup>及狭叶柴胡<sup>[46]</sup>内生真菌的报道,并且初步验证其中一些菌类有抗菌活性,但还需更加深入的研究。研究柴胡内生真菌或许可开发新种类的抗生素、扩大柴胡次生代谢物生产途径,具有广阔的推广前景。

随着技术的发展及研究的深入,基因组学和转录组学、蛋白质组学、生物信息学等生物技术的不断发展和融合<sup>[47-48]</sup>,其将越来越广泛地应用于柴胡皂苷生物合成途径研究中,为柴胡次生代谢工程的研究注入新活力,同时,技术的快速发展为柴胡次生代谢物的大量合成提供了新思路和新工具。合成生物学最终的目的是要用于生产,在投入生产前还需进行一些必要研究,首先要找到完整的合成途径,其次可利用最新的 CRISPR/Cas 等技术对工程菌进行改造,通过对调控柴胡皂苷有影响的因素进行研究,找

到合适的高产载体作物,将合成工艺系统进行优化,最终实现生产。

[参考文献]

- [1] 黄璐琦,高伟,周雍进.合成生物学在中药资源可持续利用研究中的应用[J].药学学报,2014,49(1):37-43.
- [2] 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.
- [3] Ajikumar P K,XIAO W H,Tyo K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. Science, 2010, 330 ( 6000 ): 70-74.
- [4] ZHOU Y J,GAO W,RONG Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for mitratriene production[J]. J Am Chem Soc,2012,134(6):3234-3241.
- [5] 董乐萌,刘玉军,魏建和.柴胡皂苷合成途径中三个关键酶基因片段的克隆与序列分析[J].世界科学技术—中医药现代化,2008,10(5):56-60.
- [6] 李晓伟,王玉庆,杜国军,等.药用柴胡资源调查及市场现状分析[C]//中国自然资源学会.海峡两岸暨 CSNR 全国中药及天然药物资源学术研讨会论文集:2012 年卷.北京:中国自然资源学会,2012:159-165.
- [7] 孟杰,姚入宇,陈兴福,等.柴胡属植物分类研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(11):1523-1526.
- [8] 程玉鹏,李天聪,林进华,等.狭叶柴胡愈伤组织诱导的研究[J].中医药学报,2015,43(6):46-48.
- [9] Castro A H F,Braga K D Q,Sousa F M D, et al. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae) [J]. Rev Cienc Agron,2016,47(1):143-151.
- [10] 姚智,高文远,李克峰,等.柴胡愈伤组织生长和不定根诱导研究[J].中草药,2007,38(2):275-278.
- [11] 丛登立,鞠会艳,张婷婷.北柴胡高频愈伤诱导优化技术研究[J].人参研究,2018,30(2):14-17.
- [12] 黄贤荣,向凤宁,夏光敏,等.胡萝卜与柴胡的体细胞杂交及其愈伤组织的同工酶鉴别[J].中国中药杂志,2002,27(12):887-890.
- [13] 向凤宁,黄贤荣,王颖,等.柴胡与高寒藏药——川西獐芽菜科间体细胞杂交[J].山东大学学报:理学版,2003,38(2):93-96.
- [14] 程玉鹏,李天聪,林进华,等.狭叶柴胡愈伤组织原生质体的制备及纯化[J].山西农业大学学报:自然科学版,2017(4):254-257.
- [15] 关倩.北柴胡不定根培养中生物转化与皂苷合成研究[D].太原:山西大学,2011.
- [16] 杨东方,郝建平.北柴胡愈伤组织及不定根诱导研究[J].山西农业大学学报:自然科学版,2012,35(1):140-144.

- [17] 余马,左文松,刘茹,等.北柴胡新品种川北柴1号组织培养快繁初步研究[J].种子,2017,36(9):27-34.
- [18] 王梅,郝建平,赵暘,等.乙酸钠、水杨酸和 $\text{Cu}^{2+}$ 对北柴胡不定根培养合成皂苷的影响[J].天然产物研究与开发,2012,24(S1):87-91.
- [19] 战晴晴,金钺,魏建和,等.北柴胡不定根培养及茉莉酸甲酯处理对柴胡皂苷含量的影响[J].生物技术通讯,2011,22(1):57-60.
- [20] Hilo A, Shahinnia F, Druege U, et al. A specific role of iron in promoting meristematic cell division during adventitious root formation [J]. J Exp Bot, 2017, 68 (15):4233-4247.
- [21] Qavami N, Azizi M, Yazdian F, et al. Effective induction of hairy roots in persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.) using sonication method [J]. J Med Plants, 2018,17(65):73-82.
- [22] 孙晶,杨洪一,隋春.不同因子对药用植物毛状根产量和次生代谢产物积累影响的研究进展[J].中国现代中药,2014,16(11):945-952.
- [23] Renouard S, Corbin C, Drouet S, et al. Investigation of *Linum flavum* (L.) hairy root cultures for the production of anticancer aryltetralin lignans [J]. Int J Mol Sci, 2018,19(4):990-1008.
- [24] 孙晶,高珂,王玲,等.不同培养基、外源激素和真菌诱导子对北柴胡毛状根生长及柴胡皂苷含量的影响[J].生物技术通讯,2015,26(4):546-550.
- [25] YANG D F, FANG Y M, XIA P G, et al. Diverse responses of tanshinone biosynthesis to biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* [J]. Gene, 2018, 643:61-67.
- [26] 程玉鹏,林进华,高宁,等.不同因素对狭叶柴胡悬浮细胞生长的影响[J].山西农业大学学报:自然科学版,2016,36(5):305-309.
- [27] 周永强.狭叶柴胡悬浮细胞及内生真菌活性成分抗肿瘤研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2014.
- [28] Choi D, Ward B L, Bostock R M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid [J]. Plant Cell, 1992,4(10):1333-1344.
- [29] Ramos-Valdivia A C, van der Heijden R, Verpoorte R. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis: a review of its biochemistry and function [J]. Nat Prod Rep, 1997,14(6):591-603.
- [30] Ebizuka Y, Katsube Y, Tsutsumi T, et al. Functional genomics approach to the study of triterpene biosynthesis [J]. Pure Appl Chem, 2003,75(2):369-374.
- [31] Nakamura A, Shimada H, Masuda T, et al. Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco [J]. FEBS Lett, 2001,506(1):61-64.
- [32] Okada K, Kasahara H, Yamaguchi S, et al. Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2008,49(4):604-616.
- [33] 隋春,战晴晴,魏建和,等.北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA 克隆及其序列分析 [J]. 中草药, 2010,41(7):1178-1184.
- [34] 隋春,魏建和,战晴晴.北柴胡鲨烯合酶基因及其编码区 cDNA 克隆与序列分析 [J]. 园艺学报, 2010,37(2):283-290.
- [35] 董乐萌.北柴胡柴胡皂苷合成相关基因的分子克隆与组织表达分析[D].北京:北京林业大学,2008.
- [36] 徐洁森.北柴胡皂苷合成相关 P450、UGT 基因的筛选、克隆及遗传转化初步研究[D].北京:北京协和医学院,2013.
- [37] Bowles D, Isayenkova J, Lim E K, et al. Glycosyltransferases: managers of small molecules [J]. Curr Opin Plant Biol, 2005,8(3):254-263.
- [38] WANG X Q. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases [J]. FEBS Lett, 2009,583(20):3303-3309.
- [39] YANG N, ZHOU W P, SU J, et al. Overexpression of *SmMYC2* increases the production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Front Plant Sci, 2017, doi: 10.3389/fpls.2017.01804.
- [40] 于一凡,郭娟,苏平,等.灯盏细辛转基因毛状根体系建立[J].中国中药杂志,2018,43(10):2048-2052.
- [41] Murthy H N, Dandin V S, Paek K Y. Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures [J]. Phytochem Rev, 2016,15(1):129-145.
- [42] 左北梅,高文远,王娟,等.鼓泡式生物反应器培养人参不定根的研究[J].中国中药杂志,2012,37(24):3706-3711.
- [43] 毛亚平,马莹,卜俊玲,等.丹参植株原位侵染 RNAi 毛状根体系的建立及其干扰效果[J].世界中医药, 2018,13(2):256-258.
- [44] 黄志成,任加惠,沈丽红,等.丹参毛状根和丹参药材 HPLC 指纹图谱的比较研究[J].浙江理工大学学报:自然科学版,2016,35(3):444-449.
- [45] 李玲玲,罗合春,张先淑.柴胡内生真菌鉴定与抑菌活性筛选[J].生物技术通报,2015,31(10):165-170.
- [46] 高宁,王强,王振月,等.狭叶柴胡内生真菌分布特征的研究[J].中国林副特产,2012(1):10-11.
- [47] 尉广飞,董林林,陈士林,等.本草基因组学在中药材新品种选育中的应用[J].中国实验方剂学杂志, 2018,24(23):18-28.
- [48] 张大燕,文欢,王伟,等.乌头碱类生物合成代谢的转录组学分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(16):45-50.

[责任编辑 刘德文]