

丹参生物工程的研究与开发

周伟,沈亚芳,陈军峰,戴黎鸣,开国银,周根余

(上海师范大学生命与环境科学学院 植物生物工程实验室,上海 200234)

摘要:中药材的品质改良是中药现代化进程中的一个重要问题,现代生物工程技术是进行中药材品质改良的可行途径之一。对丹参的组织培养、毛状根诱导培养及基因工程等方面的最新进展作一综述,以期利用生物工程技术遗传改良丹参品质提供一些参考。

关键词:丹参;生物工程;组织培养;毛状根

中图分类号:Q78

文献标识码:B

文章编号:1008-9632(2007)03-0048-04

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)为唇形科多年生草本植物,丹参作为传统中药在中国沿用已久,始载于《神农本草经》,被列为上品。其活性成分主要分为两大类:即脂溶性二萜类化合物(丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA、隐丹参酮等)和水溶性酚酸类化合物(丹酚酸A、丹酚酸B、紫草酸、迷迭香酸、原儿茶醛、丹参素等)^[1]。现代药理研究发现丹参具有抗动脉粥样硬化,防治脑血栓^[2]、抗肿瘤^[3]、保护肝脏和肾脏免受损伤^[4,5]、抗过敏^[6]等作用,临床用途十分广泛。但是,由于丹参有效活性成分在原植物中含量低且生长周期长,在传统的栽培模式下又面临着品质严重退化等问题,因此,如何使得丹参这一原料药材的供应在数量和质量上能更好地满足临床应用的需求成了一个研究热点。现代生物

技术的飞速发展,为利用生物工程技术手段进行丹参品质的遗传改良提供了新的途径。近年来,国内外在丹参生物工程的研究方面开展了大量的工作并取得了许多新成果。

1 丹参的离体培养

1.1 丹参的植株再生 利用组织培养的技术,以丹参的离体组织为外植体,通过激素调控的方法再生完整植株,对优良品种的保存具有重要意义,也是利用基因工程手段进行丹参遗传改良的基础。目前,已有以丹参叶片、茎尖、根段、茎段和花药为外植体的组培再生植株的报道(表1)。我们实验室也在丹参的组培和基因工程方面做了一些研究工作(相关论文待发表)。

表1 丹参的组织培养文章概述表 (单位:mg/L)

Table 1 List of reported tissue culture of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (unit:mg/L)

外植体	愈伤诱导	愈伤增殖	丛生芽诱导	丛生芽增殖	幼苗生根	文献参考
叶片	MS+BA1.0+2,4-D0.5	MS+BA1.5+2,4-D0.5	MS+BA1.0+NAA0.05	MS+BA1	1/2MS+IBA1.1	冯玲玲 ^[8]
茎尖			MS+BA2+NAA1		MS+IAA0.2+NAA0.2	张跃非等 ^[9]
根段			1/3MS+BA1+IBA0.02	MS+BA1.5+IBA0.2	1/2MS+IBA0.2	温春秀等 ^[10]
茎段	MS+-BA1+2,4-D(0.5-2.0)			MS+BA1-2+NAA0.5		田宇红等 ^[11]
花药	MS+BA1+NAA0.1					田宇红等 ^[11]

目前,丹参愈伤的诱导一般采用MS+BA(1~1.5)mg/L+2,4-D(0.5~2)mg/L的组合,能使外植体100%的愈伤化;花药在MS+BA 1mg/L+NAA0.1mg/L的培养基上,一周能形成少量的愈伤,20d愈伤化的部位能产生不定芽;丹参芽的诱导和增殖大多采用MS+BA+NAA的组合;芽的生根较容易,在基本培养基MS

或1/2MS上就能生根,添加低浓度的激素IBA或NAA能促进丹参芽生根。刘学安^[7]试验发现,健壮的芽更容易生根,在2/3MS+NAA0.2mg/L+IBA0.2mg/L的培养基上生根率最高。

1.2 人工诱导多倍体 多倍体植株由于染色体的加倍,细胞和器官表现出“巨型性”的特征,因此对外界

收稿日期:2006-11-24

作者简介:周伟(1981-),男,在读研究生,主要从事药用植物的组织培养和基因工程的研究,E-mail:zhouwei19810501@163.com;

通讯作者:开国银,E-mail:gykai@shnu.edu.cn;周根余,E-mail:zhougenyu@sina.com。

基金项目:上海市高等学校科学技术发展基金项目(03DZ02);上海师范大学博士科研启动基金项目(PL520);上海市自然科学基金项目(05ZR14093)

环境具有较强的生态适应性和抗逆性。药用植物大多以根、茎和叶等器官为收获对象,其染色体加倍后,根、茎、叶巨型化;另一方面,药用植物的倍性变化往往能导致次生代谢产物含量的变化,这就有可能获得优质的药用植物新品种^[12]。高山林^[13]等用10~50ppm的秋水仙碱已成功诱导出丹参的四倍体株系。测定结果表明:在供试的10个多倍体株系中,3种丹参酮总含量是对照的211.1%。因此,进一步探索采用多倍体技术培育出高产的丹参多倍体新品种具有重要的意义。

1.3 丹参细胞培养 长期以来,有用次生代谢物的获得方法主要是从植株中提取,但是,这种方法必然会导致野生资源逐渐匮乏和灭绝。尽管目前已经有一些重要的药用物质可以采取化学合成的方法获得,但往往存在工艺流程复杂、成本高及易污染环境等缺点,且还有不少结构复杂的物质(如人参皂苷)尚难以合成。而植物细胞培养技术,则为人类获取植物特有的次级代谢物提供了一种新的方法。培养成分(如激素和营养物质等)和培养策略的改变(如诱导培养及分段培养等)对多样性代谢产物的含量分布有明显的影响^[14]。

陶璐璐^[15]等用海藻胶包埋丹参愈伤组织细胞,证实了细胞经固定处理后,在培养基中收获代谢产物是可行性的。固定化技术能够克服培养过程中的许多缺点诸如细胞过于分散,不易更换新鲜营养液、不易挑选优质细胞系及代谢产物与分散的细胞不易分离等,因而在生产中被广泛应用。摸清丹参细胞系在不同生长时期的营养供给条件和相应的激素调节是实现用细胞培养的方法生产次生代谢产物的基础。研究表明,MS培养基中蔗糖、氮源和硫胺素(VB1)是生产隐丹参酮和铁锈醇所必需的,硫酸盐、 $MnSO_4$ 和激动素表现出一些有益的影响,而MS培养基所有其他成分被认为不必需,甚至有抑制作用。B5培养基最适合愈伤的生长,其次是6,7-V培养基;MS培养基介于两者之间。对愈伤悬浮细胞生长的最适蔗糖浓度为3%,对迷迭香酸的形成的最适浓度为5%^[16]。植物生长激素2,4-D抑制水溶性总酚的形成,高浓度的KT能显著提高总丹参酮的含量。MS + KT1.0mg/L + NAA0.1mg/L对水溶性总酚和丹参酮的形成促进作用最大^[17]。WU^[18]等试验发现,以MS为基本培养基时附加0.2mg/L BA,60d后最有利于隐丹参酮的积累,达到 4.59 ± 0.09 mg/g干重。鉴于采取细胞培养在生产次生代谢产物方面的优点,因此,有必要进一步探索丹参细胞悬浮培养的营养供给条件,如培养基中有利的营养成分的最佳配比、添加量以及添加的最佳时期与

代谢产物的积累规律之间的关系等。

2 丹参毛状根的离体培养

毛状根培养是20世纪80年代发展起来的一项植物基因工程和细胞工程相结合的新技术。毛状根具有生长速度快,遗传性稳定等优点,因此成为颇具应用潜力的培养系统之一。据不完全统计,已有31科100余种植物建立了毛状根培养系统,其中不少是药用植物,其中人参皂甙、紫草素等已通过毛状根培养系统得以工业化生产^[19]。黄炼栋^[20]等利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)诱导出丹参毛状根,并可在无外源激素条件下自发形成再生植株,且生命力旺盛,根系发达,分枝多。将丹参毛状根在MS + NAA 0.1mg/L处理4d后再在6,7V培养基上悬浮培养44d,发现其增殖倍数可达370.5倍,表明合适的培养基成分有助于促进毛状根的大量增殖。试验发现一些诱导激发子如太丽轮枝菌V44菌株、酵母提取物及真菌诱导子等可以有效刺激丹参毛状根的生长及次生代谢产物的积累^[21~23]。Qiong Yant^[24]等在丹参毛状根的离体培养过程中,将添加酵母提取物(YE)、吸收树脂(X-5)和半连续培养模式等多种手段进行联合运用,结果发现毛状根产量可以增加3倍以上,而丹参酮的产量则达到87.5mg/L培养液,比常规培养增加了近15倍。Xiuchun Ge^[25]等发现非蛋白质氨基酸 β -氨基丁酸(BABA)比常用诱导子茉莉酮酸酯更加有效地诱导丹参毛状根中丹参酮类物质的增加,若将BABA和酵母提取物(YE)配合使用则效果更好。上述研究表明培养条件和调控因子对丹参毛状根的生长及其活性成分的积累具有极大的影响,所取得的成果为今后利用丹参毛状根培养系统大规模生产药用活性成分奠定了基础,并为其其他名贵药材资源的可持续开发与利用以及绿色原料药的生产开辟了一条新途径。

3 丹参的基因工程

3.1 丹参二萜成分的生物合成 二萜类化合物在鼠尾草属植物中分布较广,在丹参中尤为丰富,目前已经分离到至少30多个丹参二萜类新化合物,是丹参中一类非常重要的活性成分。近年来,植物萜类化合物的生源途径的分子研究取得了突破性的进展,如非甲羟戊酸途径的发现以及许多代谢关键酶的基因先后被分离克隆等。这些新进展为研究丹参二萜成分如丹参酮等的生物合成途径提供了重要的参考依据。有助于进一步了解丹参酮生物合成的中间产物、关键酶,前体分布、合成部位、运输机理等基础问题,对于今后调控生物合成途径从而提高目标代谢物的含量具有非常重要的意义。

丹参酮等萜类化合物是通过植物类异戊二烯代谢途径产生的,其中间前体是3-异戊烯焦磷酸(IPP)。近年来发现植物细胞内的IPP形成途径有两条:位于细胞质中的甲羟戊酸代谢途径(MVA途径)和位于质体中的丙酮酸/磷酸甘油醛(DXP途径)代谢途径。不管是MVA途径,还是DXP途径,3-异戊烯焦磷酸(IPP)和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)都是所有萜类物质生物合成的中心前体。虽然MVA和DXP途径在植物细胞中不同区域中存在,但这两条途径并不是完全隔离的,在一定程度上可能存在IPP在细胞质和质体之间的穿梭,只是主次及贡献大小的问题。最近,Ge^[26]等研究发现,丹参酮类化合物的生物合成主要是通过丙酮酸/磷酸甘油醛代谢途径,但同时也受到甲羟戊酸途径的影响,这为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。

随着萜类化合物的生物合成途径的逐渐清楚,生物合成相关催化酶的研究成为热点。在MVA途径中,3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, HMGR)是主要的关键酶;在DXP途径中,主要的关键酶有:1-去氧木糖-5-磷酸合成酶(DXPS)和1-去氧木糖-5-磷酸还原酶(DXR)。IPP形成后,萜类生物合成的关键酶有烯丙基转移酶(prenyl transferase)和萜类合成酶(terpenoid synthase, TPS)。但是有关丹参萜类代谢途径中关键酶基因克隆的工作进展比较缓慢,迄今为止国内外尚未见到相关基因分离克隆研究的公开报道,反映了对丹参分子生物学研究的重视程度还不够,起步相对迟缓。可喜的是,最近国内有一些单位开始启动这方面的工作。我们实验室在建立了丹参离体再生系统的基础上,开展了相关基因克隆的工作,并已经获得数条基因的核心片断,全长基因的克隆正在进行当中,从而为进一步利用基因工程技术遗传改良丹参的品质奠定了基础。

3.2 农杆菌介导丹参的遗传转化 近年来,随着基因工程技术的日臻成熟,药用植物生物工程的研究已进入了一个全新的时代。利用转基因技术培育优质抗逆的转基因丹参植株或发根等,在生产上具有重要的应用价值。最近王倩^[2]用根癌农杆菌介导法将来源于构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的HMGR基因导入到丹参中,经过抗性筛选获得一批丹参的再生植株。通过PCR和Southern blotting检测,证实了HMGR基因已整合到丹参的基因组,并用PT-PCR证实了HMGR在mRNA水平上的转录,但遗憾的是作者并没有进一步

分析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。王丽娟^[28]将采自小麦的抗逆基因Talea3整合到丹参基因组中。对转基因丹参进行耐逆性实验分析,结果表明转Talea3基因的丹参植株提高了耐盐和耐干旱的能力。上述实验证实了对丹参进行有目的的遗传转化是完全可行的。遗传转化对丹参的原有特性如株高、产量、生长势等是否会造成影响,尚无相关报道。越来越多的报道表明,一些植物通过导入外源基因后使其表型发生变化后,新获得的遗传特性并不都会稳定遗传,会发生转基因失活或转基因沉默的现象,在丹参的遗传转化中是否会发生这种情况值得关注。

4 展望

迄今为止,在丹参生物工程研究方面开展了大量的工作,丹参离体条件下的再生系统已经比较成熟、丹参细胞培养过程中的代谢产物积累规律和调控措施有了初步了解、农杆菌介导的遗传转化已有了一定基础以及对丹参萜类物质生物合成的重要前体物质和相关催化酶基因也有了新的认识,这些新的成果无疑为利用现代生物工程技术来提升丹参的科技含量,最终更好地为人类服务奠定了基础。但是要想真正利用生物技术手段来规模化生产丹参酮类药用活性物质及培育高产优质抗逆的丹参新型品系,还有不少研究工作需要开展,具体如下:(1)进一步了解丹参萜类物质生物合成的详细过程,阐明其生物合成的代谢规律和分子机理;(2)借鉴模式植物如拟南芥及水稻等基因组研究的最新成果,将分子生物学和生物信息学相结合,加快丹参品质相关基因的分离克隆与功能鉴定;(3)充分利用成熟的转基因技术,大规模开展丹参的遗传转化工作,进行有针对性的遗传改良。

随着丹参生物工程研究的不断深入,相信在不远的将来,利用现代生物工程技术大规模、高效率、低成本地生产丹参活性成分的目标一定能够实现。

参考文献:

- [1] 余世春, 琚小龙, 段广勤. 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): 43~47.
- [2] 董继革, 徐纳李. 乙酰丹酚酸A对大鼠大脑中动脉栓所致局部缺血性损伤的保护[J]. 药理学报, 1996, 31(1): 6~9.
- [3] Chang Jang - Yang, Chang Chi - Yen, Kuo Ching - Chuan, et al. Salvinal, a novel microtubule inhibitor isolated from *Salvia miltiorrhizae* Bunge (Danshen), with antimitotic activity in multidrug - sensitive and - resistant human tumor cells[J]. Mol Pharmacol 2004, 65: 77~84.

- [4] 胡义杨, 刘平, 刘成, 等. 丹酚酸 A 抗四氯化碳中毒致大鼠肝损伤和肝纤维化作用[J]. 中国药理学报, 1997, 18(5): 478~480.
- [5] 金和筠, 王爱民, 王玉坤. 丹参对实验性肾衰竭的防治作用[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 236~238.
- [6] 王芋, 曹德君. 丹参对培养人瘢痕成纤维细胞生长和胶原形成的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 11(1): 46~48.
- [7] 刘学安. 丹参组织培养技术研究及组培苗生产试验[D]. 四川农业大学硕士学位论文, 四川农业大学图书馆, 2004.
- [8] 冯玲玲. 丹参组织培养的初步研究[D]. 华中师范大学硕士学位论文, 华中师范大学图书馆, 2004.
- [9] 张跃非, 雷家容, 代其林. 丹参的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(2).
- [10] 温春秀, 谢晓亮, 吴志明, 等. 丹参脱病毒及组培快繁技术研究[J]. 中草药, 2004, 35(9).
- [11] 田宇红, 王喆之. 丹参组织培养及植株再生研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2003, 31(1).
- [12] 张爱民, 常莉, 薛建平. 药用植物多倍体诱导研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 645~649.
- [13] 高山林, 朱丹妮, 蔡朝晖, 等. 丹参多倍体形状和药材质量的关系[J]. 植物资源与环境, 1996, 5(2): 1.
- [14] 钟建江, 王威, 岳才军. 植物次级代谢物的多样性及其在细胞培养中的调控研究进展[J]. 化学世界, 2005(8): 498~503.
- [15] 陶璐璐, 袁静明. 丹参愈伤组织细胞固定化及其转化产物的特征[J]. 生物工程学报, 1990, 6(3): 218~223.
- [16] 黄炼栋, 周吉燕. 丹参组织培养研究及萜水溶性有效成分——迷迭香酸的含量测定[J]. 上海中医药大学学报, 1999, 13(4).
- [17] 王康才, 罗庆云, 陈红霞. 丹参愈伤组织中次生代谢产物形成的研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(10).
- [18] Chin - Tung W U, Vanisree MULABAGAL, Satish Manohar NALAWADE, et al. Isolation and quantitative analysis of cryptotanshinone, an active quinoid diterpene formed in callus of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Biol. Pharm. Bull, 2003, 26(6): 845~848.
- [19] 邱德有, 宋经文, 马小军. 丹参毛状根生物反应器大规模培养的研究[J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 699~703.
- [20] 黄炼栋, 胡之璧, 刘涤. 丹参发状根再生植株的研究[J]. 上海中医药杂志, 1995, (10): 40.
- [21] 黄柏青, 刘曼西. 真菌诱导物对丹参毛状根氧化酶活性的影响[J]. 华中科技大学学报, 2001, 29(8): 111~113.
- [22] 李国婧, 王树才, 夏凯. 酵母激酶与水杨酸对 Ti 转化的丹参组培物内源激素含量的影响[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(1): 13~16.
- [23] 程小萍, 刘曼西, 张一竹, 等. 酵母葡聚糖对丹参毛状根过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶的影响[J]. 生物技术, 2003, 13(6): 26~28.
- [24] Yan Qiong, Hua Zongding, Tan Ren Xiang, et al. Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi - continuous operation [J]. Journal of Biotechnology, 2005, 119: 416~424.
- [25] Ge Xiuchun, Wu Jianyong. Induction and potentiation of diterpenoid tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by β - aminobutyric acid [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68: 183~188.
- [26] Ge Xiuchun, Wu Jianyong. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag^+ and yeast elicitor [J]. Plant Science, 2005, 168: 487~491.
- [27] 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, 陕西师范大学图书馆, 2005.
- [28] 王丽娟. 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, 陕西师范大学图书馆, 2005.

Research and development of biotechnology of *Salvia miltiorrhiza* Bunge

ZHOU Wei, SHEN Ya - fang, CHEN Jun - feng, DAI Li - ming,
KAI Guo - yin, ZHOU Gen - yu

(Laboratory of Plant Biotechnology, College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University,
Shanghai 200234, China)

Abstract: *Salvia miltiorrhiza* Bunge is a famous traditional Chinese medicine. bioengineering is a feasible method to genetically improve its quality. New advances on tissue culture, hairy roots culture and genetic engineering of *S. miltiorrhiza* were reviewed.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; bioengineering techniques; tissue culture; hairy roots