

• 综述 •

青蒿素生物合成分子机制及调控研究进展

谭何新¹, 肖玲¹, 周正¹, 张磊^{1*}, 陈万生^{2*}

(1. 第二军医大学 药学院 药用植物学教研室, 上海 200433;

2. 第二军医大学 附属长征医院 药学部, 上海 200003)

[摘要] 以青蒿素为基础的联合用药是疟疾特别是恶性疟现有的首选、最佳疗法, 青蒿素类药物需求巨大。青蒿素原料药依旧主要依赖于从药用植物黄花蒿(中药青蒿)提取、分离、纯化, 但其在黄花蒿中的含量较低, 且含量变异大。黄花蒿分泌腺毛是合成、分泌、积累及储存青蒿素的场所, 腺毛的正常发育直接关系到青蒿素的产量。提高青蒿素产量、降低生产成本有重大意义, 也是当前国际研究热点。该文介绍了青蒿素体内生物合成的分子机制和代谢调控, 以及青蒿素合成器腺毛的研究进展, 这些将为开拓新的方法来提高植物来源青蒿素的产量提供帮助。

[关键词] 青蒿素; 黄花蒿; 腺毛; 分子机制; 遗传调控

DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20161222.019

Molecular mechanism of artemisinin biosynthesis and regulation in *Artemisia annua*

TAN He-xin¹, XIAO Ling¹, ZHOU Zheng¹, ZHANG Lei^{1*}, CHEN Wan-sheng^{2*}

(1. Department of Pharmaceutical Botany, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] Artemisinin-based combination therapy (ACT) is the best available treatment, particularly for *Plasmodium falciparum* malaria. Artemisinin, whose main source is *Artemisia annua*, has large demand and short supply every year. Artemisinin is synthesized, stored, and secreted by the glandular secretory trichomes of *A. annua* (AaGSTs). In general, the population and morphology of AaGSTs are often positively correlated with artemisinin content. This review article introduces the molecular mechanism of biosynthesis and regulation of artemisinin in *A. annua*. Furthermore, this article will refresh the classification of trichomes in *A. annua* and provide an overview of the recent achievements regarding AaGSTs and artemisinin. These will shed light on exploring the method for increasing plant-derived artemisinin.

[Key words] artemisinin; *Artemisia annua*; trichomes; molecular mechanism; genetic manipulation

疟疾流行于 97 个国家和地区, 威胁着 32 亿人口的健康。据世界卫生组织最新统计, 2015 年约有 2.14 亿人感染疟疾, 并有约 43.8 万人死于疟疾^[1]。以青蒿素为基础的联合用药(artemisinin-based combination therapies, ACTs)是治疗疟疾特别是恶性疟现有的首选、最佳方法^[1-2]。屠呦呦先生

也因其在青蒿素的发现及青蒿素在疟疾治疗方面的巨大贡献获得了 2015 年的诺贝尔生理学或医学奖。青蒿素是一种含过氧桥基团结构的倍半萜内酯类化合物, 其每年需求量巨大, 但是供应量却相对紧缺^[3], 这直接导致了 ACTs 制剂成本的增加。此外, 青蒿素及其衍生物的药理作用还表现在抗肿

[收稿日期] 2016-10-27

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(31300159); 国家自然科学基金面上项目(81673529, 31670292); 国家自然科学基金杰出青年科学基金项目(81325024)

[通信作者] * 陈万生, 教授, Tel: (021) 81871361, E-mail: chenws126@126.com; * 张磊, 副教授, Tel: (021) 81871307, E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

[作者简介] 谭何新, 博士, 副教授, Tel: (021) 81871361, E-mail: hexintan@163.com

瘤、抗寄生虫、抗纤维化、抗心律失常、免疫等多方面^[4-5], 随着青蒿素及其衍生物应用的开发, 其需求将进一步增大。

青蒿素来源于菊科蒿属药用植物黄花蒿 *Artemisia annua* L., 其干燥地上部分被称为中药青蒿^[6-7]。黄花蒿是青蒿素的唯一天然来源, 但是其含量却相对较低, 只占干重的 0.1%~0.8%^[8-9]。如何提高青蒿素产量, 降低生产成本, 是当前国内外黄花蒿育种研究的热点。已有许多科学家正在尝试用不同的方法来增加青蒿素的产量, 合成生物学及化学合成在青蒿素生物半合成上取得了较大进展^[10]。由于酵母无法像黄花蒿腺毛一样提供青蒿素合成所需的特殊油性氧化环境, 所以目前还无法实现青蒿素的体外生物全合成, 因此目前青蒿素的市场供应仍然依赖于植物提取^[10]。未来青蒿素的市场可能是植物来源和生物半合成的协调平衡^[11]。

为了提高青蒿素产量, 在青蒿素生物合成途径代谢酶的调控方面已有较多研究。在黄花蒿中过表达青蒿素生物合成的关键酶基因或抑制与青蒿素生物合成竞争相同底物的酶基因的表达, 通过转录因子或植物激素来直接或间接地提高青蒿素的含量^[12-13]。这些方法都在一定程度上提高了黄花蒿中青蒿素的含量^[12]。如果要进一步提高青蒿素的产量, 还需开发新的方法。前期研究表明, 青蒿素在黄花蒿地上部分表面的一种突起结构——腺毛中合成、积累和分泌^[14-15]。作为青蒿素生物合成的“化学工厂”, 调控腺毛发育有可能实现青蒿素含量大幅提高。

1 青蒿素合成于黄花蒿腺毛

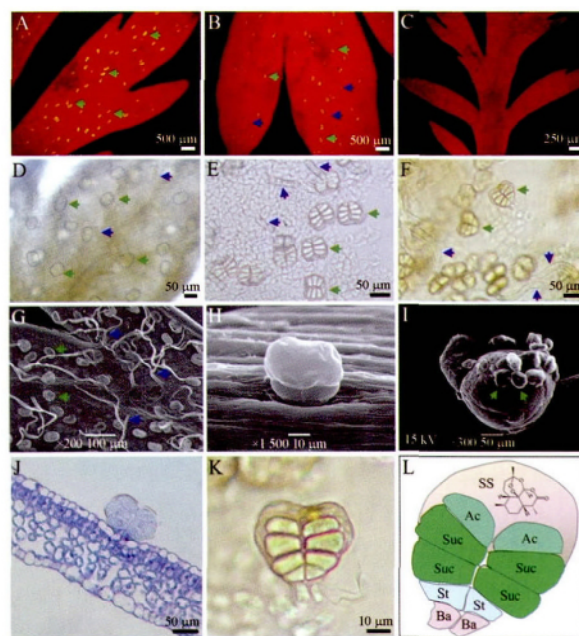
腺毛是毛状体 (trichome) 的一种, 毛状体是许多植物叶片和其他器官表面的小突起结构, 它们的最大特征就是能够合成、储存, 有时候还能分泌大量特定的代谢产物^[16], 包含多种类型的萜烯、苯丙烷衍生物、酰基糖、甲基酮和类黄酮。许多毛状体产生的化合物具有重要的医药、香料、食品添加剂、天然杀虫剂等商业价值。近年来将腺毛开发成“化学工厂”来生产高价值的植物产物引起了植物生物技术专家的关注^[17]。

腺毛通过表皮细胞分化而形成, 以各种各样的形态结构存在于不同植物表面^[18]。腺毛形态的多样性不仅因物种不同而异, 同一物种、同一株植物中腺毛的形态也会表现出多样性。通常来说, 腺毛可以根据形态和功能被分为分泌型腺毛和非分泌型腺毛两大类。分泌型腺毛具有多个细胞, 能合成、分泌和贮存多种植物次生代谢产物, 并广泛分布在唇形科植物如薄荷^[19]、茄科植物如番茄^[20]、菊科植物如黄花蒿^[18]和大麻科植物如大麻^[21]中。非分泌型腺毛基本为单细胞, 主要作为物理防御器官。有些也能合成次生代谢产物, 如三萜类物质^[22]。非分泌型腺毛广泛分布在锦葵科植物如棉花^[23]和十字花科植物如拟南芥^[24]中。

腺毛是植物对抗外界胁迫的第一道屏障, 可以保护植物本身免受外界昆虫、细菌、紫外辐射以及干旱等的影响^[25]。特别是分泌型腺毛, 可以通过释放一些对昆虫和动物有害的

化学物质 (通常为一些次生代谢产物), 从而阻挡它们对植物体的进一步侵害。此外, 青蒿素和一些其他生物活性物质对植物本身有很高的毒性^[26], 所以将其扣留在或者分泌出合成部位就显得非常重要。腺毛的表皮下空间很可能就是黄花蒿扣留青蒿素和其他植物毒性物质的场所^[14]。

与自然界中腺毛的分类相同, 黄花蒿中腺毛也可以分为 2 类, 即分泌型腺毛 (AaGSTs) (图 1 绿色箭头) 和非分泌型腺毛 (又称 T 型腺毛, AaTNGs) (图 1 蓝色箭头)。它们都起源于表皮细胞^[14, 27]。其中 AaGSTs 由 2 列 5 对、10 个细胞组成, 包含 2 个基细胞 (basal cells, Ba)、2 个柄细胞 (stalk cells, St)、4 个下顶细胞 (subapical cells, Suc) 和 2 个顶细胞 (apical cells, Ac), 以及 1 个皮下腔空间 (subcuticular space, SS) (图 1)。2 个顶细胞和 4 个下顶细胞又称为分泌细胞^[14]。AaTNGs 由 5 个纤维状细胞组成, 头部还有 1 个特别细长的细胞, 最终形成一个类似于英文字母大写“T”的结构^[28] (图 1G)。



绿色箭头所示为分泌型腺毛, 蓝色箭头所示为非分泌型腺毛; A~C. 荧光显微镜下的同一片黄花蒿叶片的远轴面 (叶腹面, A, C), 近轴面 (叶背面, B); D~F, J, K. 显微镜下经过不同处理的黄花蒿叶片; J. 叶片的树脂切片示腺毛内部结构; L. 分泌型腺毛示意图; SS. 皮下腔空间; Ac. 顶细胞; Suc. 下顶细胞; St. 柄细胞; Ba. 基细胞。

图 1 黄花蒿中的腺毛形态结构

Fig. 1 The morphological structure of trichomes in *Artemisia annua*

叶细胞分化成腺毛细胞起始于最早的叶原基时期, 当 10 个细胞形成后, 6 个分泌细胞的角质层从细胞壁分离形成 1 个 2 列的囊腔, 并最终裂开释放内含物^[14]。在整个发育时

期,腺毛细胞都含有很少的液泡,分泌细胞含有较多的内质网,每一对细胞的质体都是不一样的^[14]。在成熟期,顶细胞含有前质体和白色体,只有少量的类囊体。而下顶细胞含有大量的叶绿体,不具有淀粉粒。基细胞有前质体或者白色体,柄细胞有叶绿体^[14]。

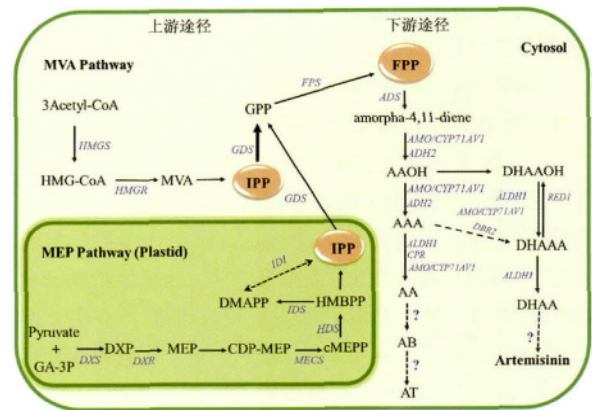
Duke 等通过 5 s 的氯仿浸泡,可以提取黄花蒿叶片中 97% 的青蒿素和全部的青蒿烯,同时发现除了分泌型腺毛的皮下腔空间(SS)塌陷了,叶片表面并没有其他破坏,因此认为青蒿素和青蒿烯全部储存在分泌型腺毛的皮下腔空间^[15]。而且青蒿素只存在于含有腺毛的种中^[15],因此腺毛也被认为是青蒿素体内合成、分泌、积累及储存的场所,但是青蒿素如何在腺毛内合成不清楚。由于下顶细胞与顶细胞的结构及内含物不同,关于青蒿素是只在顶细胞中合成,还是在 6 个分泌细胞中都合成一直存在较大争议。Olsson 等^[17]因在 4 个下顶细胞中没有检测到青蒿素生物合成关键基因 *ADS*、*CYP71AV1* 和 *DBR2* 的表达,认为下顶细胞不能合成青蒿素,可能具有与顶细胞不同的功能,比如合成单萜类化合物。2012 年 Olofsson 等^[29]通过激光显微切割和 qRT-PCR 提出顶细胞和下顶细胞都能合成青蒿素。腺毛转录组数据分析显示下顶细胞中存在所有青蒿素生物合成途径基因的表达^[22]。因此,青蒿素是否由分泌型腺毛的下顶细胞和顶细胞共同产生,还需要细胞化学的研究证据来进一步确认。此外,黄花蒿腺毛转录组数据分析还发现非分泌型腺毛中也存在倍半萜和三萜类生物合成特异性基因的表达,这暗示非分泌型腺毛——T 型腺毛,也可能具有与分泌型腺毛相似的功能。

2 青蒿素生物合成途径

青蒿素的生物合成途径属于类异戊二烯代谢合成途径,起源于异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。

高等植物中,这种 5C 骨架的化合物有 2 条独立的生物合成途径,分别为位于胞质的甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径和位于质体的甲基赤藓醇-4-磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径(图 2)。文献报道已经确定 MVA 途径和 MEP 途径对最后生成青蒿素的贡献度是不同的^[30]。法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)的形成是青蒿素生物合成的第一个特异性步骤。2010 年 Schramek 等^[30]通过¹³C₂同位素标记证明, FPP 由 2 份来源于 MVA 途径的异戊二烯和 1 份来源于 MEP 途径的异戊二烯形成(图 2 不同粗细的线条示不同贡献)因此 MVA 途径在青蒿素生物合成中起主要作用。

以 FPP 为分界线, FPP 之前的步骤被认为是青蒿素生物合成的上游步骤, FPP 之后的步骤被认为是青蒿素生物合成的下游步骤。青蒿素上游合成途径已经比较清楚,且有公认的酶及催化步骤^[31-32],但下游步骤仍存有争议。青蒿素生物合成的上游及下游路径由图 2 所示,黑色字体为青蒿素合成代谢路径中的化合物,蓝色字体所示为参与这一过程的



黑色字体所示为化合物,蓝色字体所示为参与这个过程的基因; ADS. 紫穗槐-4,11-二烯合成酶; ADH1. 乙醇脱氢酶; ALDH1. 醛脱氢酶 1; AMO. 紫穗槐-4,11-二烯氧化酶; AAOH. 青蒿醇; AAA. 青蒿醛; AA. 青蒿酸; AB. 青蒿素 B; AT. 青蒿烯; CYP71AV1. 细胞色素 P₄₅₀ 单加氧酶; DBR2. 青蒿醛 Δ -11(13) 还原酶; DHAAOH. 二氢青蒿醇; DHAAA. 二氢青蒿醛; DHAA. 二氢青蒿酸; DMAPP. 二甲基丙烯基焦磷酸; FPS. 法呢基焦磷酸合成酶; FPP. 法呢基焦磷酸; GPP. 牻牛儿基二磷酸; HMGR. 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶; HMGs. 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶; IPP. 异戊烯基焦磷酸; IDS. 异戊烯基焦磷酸合成酶; MEP. 二甲基丙烯基焦磷酸; MVA. 甲羟戊酸; DXP. 5-磷酸脱氧木酮糖; DXR. 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶; DXS. 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶; GPP. 牻牛儿基二磷酸; GDS. 牻牛儿基二磷酸合成酶; HDS. 羟甲基丁烯基-4-磷酸合成酶。

图 2 青蒿素生物合成途径

Fig. 2 General scheme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*

基因。青蒿素由 MVA 途径和 MEP 途径提供 IPP,经催化后形成 FPP。FPP 经紫穗槐二烯合成酶(amorpha-4,11-diene synthase, ADS)催化生成紫穗槐二烯^[33]。紫穗槐二烯经过三步由细胞色素 P₄₅₀ 单加氧酶(cytochrome P₄₅₀ monooxygenase, CYP71AV1)催化的反应,分别形成青蒿醇、青蒿醛和青蒿酸^[34-36]。其中青蒿醇可以被催化形成二氢青蒿醇^[37]。青蒿醛可以被青蒿醛双键还原酶[artemisinic aldehyde Δ -11(13) reductase, DBR2]催化形成二氢青蒿醛^[37]。二氢青蒿醛可以被醛脱氢酶 1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)^[38]催化形成青蒿酸的直接前体二氢青蒿酸,也可以被二氢青蒿醛还原酶(dihydroartemisinic aldehyde reductase, RED1)催化形成上一步的产物二氢青蒿醇^[39]。二氢青蒿醇可以被 CYP71AV1 和 ALDH1 催化形成二氢青蒿醛,最后经二氢青蒿酸形成青蒿素。

青蒿素合成下游途径还存在一些争议, Alejos-Gonzalez 等^[40]2011 年提出青蒿酸可转化为青蒿素 B 和青蒿烯,进而形成青蒿素。但是通过青蒿酸和二氢青蒿酸前体饲喂实验证明二氢青蒿酸才是青蒿素的直接前体^[37],青蒿素 B 和青蒿素可能是青蒿素生物合成途径上的 2 个不同分支的终产

物^[34]。在释喂实验中没有提及青蒿烯,可能由于青蒿素 B 和青蒿烯不稳定,不易检测到。因此青蒿酸是否能通过青蒿烯进而转化成青蒿素还未知。此外,二氢青蒿酸与青蒿素之间是否真的仅需要腺毛提供的特殊油性环境加上光照条件就能顺利转化,是否存在未知的氧化步骤和酶也是未知的。青蒿素下游合成途径在青蒿素生物合成中具有十分重要的作用,正确解析青蒿素生物合成下游途径对于有效开展代谢工程,进而提高青蒿素含量意义重大。腺毛包含了青蒿素生物合成所需要的全部因素,对腺毛进行调控可以避免青蒿素生物合成途径上存在的暗箱,从宏观上调控青蒿素的生物合成。

3 青蒿素含量的代谢调控

目前针对青蒿素的代谢调控研究策略主要分为 3 大类。一是过表达青蒿素合成路径中的关键酶基因或阻断青蒿素合成竞争性支路上的关键酶基因;二是通过转录因子调控青蒿素生物合成途径;三是通过植物激素等间接调控青蒿素的合成。

3.1 生物合成途径关键酶基因调控

3.1.1 通过单基因的过表达 已经进行单基因过表达的青蒿素生物合成途径基因有 *HMGR*, *FPS*, *DXR*, *DBR2*, *ALDH1*, *ADS* 这些基因在青蒿素的生物合成途径上的位置显示(图 2)。*HMGR* 是 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶,能够将 HMG-CoA 分流到 IPP 途径来,从而促进青蒿素的合成。Aqui 等^[41-42]在 2009 年将长春花中的 *HMGR* 基因过表达在青蒿中后,能将青蒿素的产量提高 22.5% ~ 38.9%。此外,*HMGR* 也能促进青蒿酸的合成。酵母表达体系中,3 个拷贝的 *HMGR* 基因比单拷贝的更能提高青蒿酸的产量^[10, 43]。*FPS* 是法尼基焦磷酸合成酶,能够将牻牛儿基二磷酸(GPP)转化成法尼基焦磷酸(FPP)。FPP 是一个重要的分支点,也被认为是青蒿素合成下游途径的起点。过表达木本棉 *FPS* 基因可以提高青蒿素产量到 2 ~ 3 倍^[44]。过表达黄花蒿内源 *FPS* 基因也能将青蒿素含量提高到 2 ~ 2.5 倍。但是转入 2 个拷贝的 *FPS* 基因反而会降低转基因材料中青蒿素的产量^[45-46]。*DXR* 基因是 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶^[47],是质体中合成 IPP 的 MEP 途径第二步(图 2),*DXR* 基因过表达能将青蒿素的产量提高到 1.21 ~ 2.35 倍^[48]。此外,膦胺霉素能够阻断 DXR 催化的这一步反应,即阻断 DXP 转化成 MEP^[49],100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的膦胺霉素处理 14 d,能将青蒿素的产量降低 25%^[50]。*ADS* 是紫穗槐-4,11-二烯合成酶,能够催化青蒿素合成下游途径的起始步骤(图 2)将 FPP 转化成紫穗槐-4,11-二烯^[51-52]。而且通过对启动子的研究发现 *ADS* 基因特异地表达在腺毛中^[53-54],而腺毛是青蒿素产生和储存的地方,因此 *ADS* 基因是调控青蒿素合成的重要靶标。将青蒿酸喷涂到黄花蒿上可使 *ADS* 基因的表达降低 10 倍,说明在青蒿素的合成、积累中存在负反馈抑制^[55]。*ADS* 基因的过表达,可将青蒿素、青蒿酸、二氢青蒿酸的含量分别提高 82%、65% 和 59%^[56],但是 *ADS* 的直接产物紫穗槐-4,

11-二烯并没有明显增多,应该是快速被下游反应消耗了^[51]。*DBR2* 是青蒿醛 $\Delta^{11(13)}$ 还原酶,能够将青蒿醛还原成二氢青蒿醛,在 *DBR2* 过表达的转基因植株中,青蒿素的含量显著提高,最高达到非转化对照植株的 2.83 倍^[57]。*ALDH1* 是乙醛脱氢酶,能够催化青蒿醛转化成青蒿酸。黄花蒿内源的 *ALDH1* 基因过表达可将青蒿素含量最高提高到干重的 25.6 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,是非转化对照(8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重)的 3.2 倍^[58]。

3.1.2 通过多基因的过表达 将代谢途径中多基因过表达可以同时打破多个瓶颈步骤,往往比单个基因的过表达更能提高青蒿素含量。已经进行组合的青蒿素生物合成途径基因为 *CYP71AV1/CPR*, *HMGR/ADS*, *HMGR/FPS*, *ADS/CYP71AV1/CPR* 和 *FPS/CYP71AV1/CPR*。*CYP71AV1* 是细胞色素 P450 单加氧酶,是一种多功能的倍半萜氧化酶在青蒿素的合成中起关键作用,它通过 3 步将紫穗槐-4,11-二烯转化成青蒿醇、青蒿醛并最终生成青蒿酸^[36]。*CPR* 是细胞色素 P450 氧化还原酶,它可以和 *CYP71AV1* 一起作用,帮助 *CYP71AV1* 将紫穗槐-4,11-二烯转化成更氧化的产物^[43]。*CYP71AV1* 也特异地表达在分泌型腺毛中^[35],并且涂抹青蒿素或青蒿酸时会大大降低 *CYP71AV1* 的表达^[55]。内源 *CYP71AV1* 和 *CPR* 基因在黄花蒿中共同过表达时可以提高青蒿素产量 38%^[48, 59]。*FPS*, *CYP71AV1* 和 *CPR* 3 个基因分别通过 CaMV35 启动子驱动,同时过表达能将青蒿素的产量提高到 3.6 倍^[60]。*ADS*, *CYP71AV1* 和 *CPR* 3 个基因同时过表达可提高青蒿素量到 15.1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重,是对照的 2.4 倍^[61]。将长春花来源的 *HMGR* 基因和黄花蒿来源 *ADS* 同时过表达可大大提高青蒿素的产量,最高的转基因植株可达到 1.73 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重,比对照提高 7.65 倍^[62]。将 *HMGR* 基因和 *FPS* 基因同时过表达后,同样可以将青蒿素的量提高到 9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重,是对照的 1.8 倍^[63],但是 *HMGR* 和 *FPS* 同时过表达并没有比 *HMGR* 或 *FPS* 单基因过表达更明显地提高青蒿素含量^[63]。

3.1.3 通过阻断青蒿素合成竞争性支路上的关键酶基因来提高青蒿素的含量 法尼基焦磷酸(FPP)是青蒿素合成下游路径的起始步骤,同时 FPP 也能被其它倍半萜合成酶催化生成不同的倍半萜,从而和青蒿素合成途径竞争 FPP 底物。甾醇合酶 *SQS* 催化甾醇生物合成途径的第一步,是青蒿素合成的竞争性支路^[64]。当 *SQS* 基因的表达通过 RNAi 抑制时,青蒿素的量可大大提高到 31.4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重,是非转基因植株的 3.14 倍^[65],但是 4 种主要甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、谷甾醇和麦角甾醇的含量都降低了,虽然甾醇的降低并没有明显影响青蒿的生长及植株的总生物量^[65]。 β -石竹烯合成酶(*CPS*)能够将 FPP 转化成 β -石竹烯,也是青蒿素合成的竞争性支路^[66]。*CPS* 基因的表达被抑制后 β -石竹烯的含量降低了 40% ~ 60%,而青蒿素的含量提高了 54.9%^[67]。因此抑制竞争性支路来提高青蒿素含量也是一种可行的提高青蒿素含量的办法。

3.2 转录因子调控

转录因子是通过转录水平或转录后水平上调调控目的基因的表达来调控植物生长发育及生理代谢的。转录因子通过与被调控基因启动子上顺式作用元件结合,激活一个级联或整个网络的基因,这种特征使其成为代谢工程的强大工具,对药用植物的育种改良有重要价值。利用不同家族的转录因子,可以实现对多个化合物合成途径的调控,这在植物和动物的研究中已经得到了充分的证实。目前已经报道的能调控青蒿素合成的转录因子主要集中在 WRKY, AP2/ERF, bZIP, bHLH 4 大家族。*AaWRKY1* 特异地表达在腺毛中,并能被茉莉酸甲酯诱导,是第一个报道的能调控青蒿素合成的转录因子。*AaWRKY1* 通过结合青蒿素合成途径上 *ADS* 和 *CYP71AV1* 基因启动子上的 W-box 来激活 *ADS* 和 *CYP71AV1* 基因的表达。*AaWRKY1* 的过表达可将青蒿素的量提高到 $19 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重,是对照的 1.9 倍^[68-69]。

AP2/ERF 是一类在初生、次生代谢植物的生长发育,应对环境刺激方面都有重要作用的家族^[71]。目前已经报道的能调控青蒿素合成的该家族成员有 *AaORA*^[72-73], *AaERF1*, *AaERF2*^[74] 和 *AaTAR1*^[75] 4 个。*AaORA* 是青蒿素合成的正向调控子,GUS 染色证实 *AaORA* 特异地表达在分泌型和非分泌型腺毛中,*AaORA* 的过表达可将青蒿素和二氢青蒿酸的含量分别提高 40% ~ 53% 和 22% ~ 35%^[72-73]。*AaERF1*, *AaERF2* 来源于分泌型腺毛的 cDNA 文库,属于 ERF 亚家族成员的 B3 组(能响应茉莉酸和植物保护的正向调控因子)^[70, 74]。通过酵母单杂和 EMSA 实验证实 *AaERF1*, *AaERF2* 可以和青蒿素合成路径上的关键酶基因 *ADS*, *CYP71AV1* 启动子上的 CBF2, RAA 结构域结合,从而来调控青蒿素的合成。*AaERF1* 或者 *AaERF2* 的过表达都可显著提高青蒿素和青蒿酸的含量^[70, 74]。*AaTAR1* 是另外一个非常重要的调控青蒿素合成的 AP2/ERF 类转录因子^[75]。*TAR1* 在幼嫩叶片分生组织、幼嫩花苞及分泌型和非分泌型腺毛中表达,在 *TAR1*-GFP 的转基因黄花蒿植株中,*TAR1* 蛋白特异地定位在幼嫩叶片的细胞核。当 *TAR1* 基因通过 RNAi 抑制后,青蒿素、青蒿酸、二氢青蒿酸的含量大大降低,同时分泌型及非分泌型腺毛的形态出现异常,叶片表面角质和蜡质成分也发生改变,导致叶片的渗透性增强。当 *TAR1* 过表达时青蒿素、青蒿酸、二氢青蒿酸的含量升高,并且 *ADS*, *CYP71AV1* 基因的表达上调上千倍。并进一步通过 EMSA、酵母单杂和体内转基因实验证实 *TAR1* 也能够与 *ADS*, *CYP71AV1* 基因启动子上的 CBF2, RAA 结构域结合,从而激活这 2 个基因的表达,来促进青蒿素的合成^[75]。此外 *AaTAR1* 除了可以直接调控青蒿素合成路径基因 *ADS* 和 *CYP71AV1* 外,还可以控制蜡质合成从而影响黄花蒿腺毛的发育^[75]。

bZIP 家族也是一类非常大且功能多样的转录因子家族,但是其调控植物次生代谢的报道却很少。*AabZIP1* 是从 100 多个黄花蒿 bZIP 家族成员中通过基因表达、系统进化分析

和双荧光素酶实验筛选出的与 *ADS* 和 *CYP71AV1* 有相似表达特征的 bZIP 家族基因,并进一步证明 *AabZIP1* 通过结合 *ADS* 和 *CYP71AV1* 基因启动子上的 ABRE 结构域来激活基因的表达,促进青蒿素的合成。*AabZIP1* 基因过表达的植株对脱落酸(ABA)敏感,外源施加 ABA 能进一步促进青蒿素的积累^[76]。

bHLH 是最大的转录因子家族之一,参与许多重要的发育和生理过程。近年来越来越多 bHLH 转录因子成员被报道能参与植物次生代谢的调控,例如拟南芥中花青素^[71]和倍半萜^[77]的合成,长春花中生物碱的合成^[78-79]。*AabHLH1* 是从黄花蒿分泌型腺毛 cDNA 文库中获得的 1 个 bHLH 家族转录因子,*AabHLH1* 能够和 *ADS*, *CYP71AV1* 启动子上的 E-box 顺式作用元件相结合,激活基因的表达,从而正向调控青蒿素的合成^[80]。*AaMYC2* 是黄花蒿中能够响应茉莉酸诱导的 bHLH 转录因子,它可以结合到 *CYP71AV1*, *DBR2* 启动子上的 G-box 顺式作用元件,从而激活这 2 个基因的表达。在 *AaMYC2* 过表达的转基因植株中,不仅青蒿素的含量增加了,黄花蒿对灰霉菌的抗性也有显著的增强^[81]。

3.3 植物激素调控

植物激素茉莉酸及其衍生物是一类重要的信号分子,调控植物的次生代谢来增强植物对抗生物及非生物胁迫^[82-83]。外源施加茉莉酸甲酯不仅可以提高黄花蒿的次生代谢,提高青蒿素的产量 49%^[84],而且可以增加分泌型腺毛的密度^[85-86]。茉莉酸产生于脂氧化物合成途径上的一个特异分枝,其中丙二烯氧化物环化酶(AOC)催化其中的一个重要步骤^[84]。*AaAOC* 基因是从黄花蒿中克隆到的丙二烯氧化物环化酶基因,在 *AaAOC* 基因过表达的植株中,茉莉酸的含量可以达到对照的 2 ~ 4.7 倍,青蒿素合成代谢途径中多个基因的表达上调,同时分泌型腺毛的密度也增加了,在一些转基因植株中青蒿素的含量也提高了 87.9%^[12, 87]。植物激素 ABA 在植物的生长及对抗环境胁迫,包括干旱、盐、冷及渗透性等逆境中起到重要的作用^[88]。外源 ABA 喷洒开花前的黄花蒿叶子可提高青蒿素含量^[89]。*AaPYL9* 是黄花蒿中的 ABA 受体,*AaPYL9* 过表达的转基因植株相对于野生植株对 ABA 的敏感性显著增加。在没有 ABA 诱导时,其青蒿素含量和对照没有差异,但是 ABA 的诱导可使其青蒿素含量增加 74% ~ 95%,明显高于野生型的 33%,并且蒸腾作用降低,对干旱的耐受性增强^[90]。*CRY1* 是拟南芥光信号通路中的重要受体,其过表达能促进许多物种中次生代谢物的积累^[91]。在黄花蒿中过表达拟南芥 *CRY1* 基因不仅能提高青蒿素的含量 30% ~ 40%,同时也能提高花青素的积累^[92]。

目前所做的青蒿素合成调控多是针对青蒿素合成代谢路径的,而已经报道的青蒿素合成相关的基因都在腺毛中高表达或特异性表达。分泌型腺毛是青蒿素的“生物合成器”。因此通过调控腺毛来提高青蒿素的含量有可能也是一种比较有前景的代谢工程手段。

4 腺毛的生长发育及调控研究

腺毛的生理和代谢产物的特殊性以及相关生物合成酶基因在其中的高表达使其成为天然产物生物合成基因组研究的重要对象。例如由腺毛特异表达基因 cDNA 组成的 EST 数据库已被用来确定薄荷 *Mentha piperita* 中负责萜类化合物的合成酶^[19]; 九层塔 *Ocimum basilicum* 中苯丙烯类的合成酶^[94]; 番茄 *Solanum lycopersicum* 中甲基酮的合成酶^[95]; 黄花蒿中倍半萜类的合成酶^[96-98]; 啤酒花 *Humulus lupulus* 中烯类^[99]和萜类的合成酶^[100]。

作为青蒿素合成、分泌和贮存的器官,黄花蒿分泌型腺毛的研究还非常少,而非分泌型腺毛研究更少。尽管在模式植物拟南芥中报道了相对较多关于腺毛形态、密度和发育的信息,但是在拟南芥中只存在非分泌型腺毛。黄花蒿中存在非分泌型和分泌型腺毛,两者的形态和功能完全不同,影响二者的因素也不完全相同,有研究指出二者由不同网络调控^[16]。因此,拟南芥腺毛的研究成果只有部分的借鉴意义,黄花蒿腺毛的研究还需进一步深入地展开。通过总结腺毛研究较多的拟南芥、番茄、烟草、棉花等物种,可发现影响腺毛的因素归结为 3 类,即基因、microRNA 和植物激素。其中基因起主导作用, microRNA 和植物激素都是通过调控腺毛有关基因来影响腺毛的形成和发育。

4.1 基因对腺毛的影响

目前关于黄花蒿腺毛的研究还非常少,已经报道的与黄花蒿腺毛相关的基因只有 *TAR1* (trichome and artemisinin regulator 1)^[75], *TTG1* (transparent testa Glabra 1)^[101], *GL3* (enhancer of Glabra3)^[101] 和 *TFAR1* (trichome-specific fatty acyl-CoA reductase 1)^[86]。其中 *TTG1*, *GL3* 只报道能参与黄花蒿腺毛产生^[101], *TFAR1* 的研究相对完整,但主要是蜡质方面,被证明与腺毛发育及倍半萜的生物合成相关^[86]。*TAR1* 是目前研究最为详细的黄花蒿腺毛发育相关基因^[75]。*TAR1* 为 AP2/ERF 类的转录因子,表达在幼嫩的叶片、花以及腺毛中,并专一地定位于细胞核。当 *TAR1* 被敲除时,分泌型及非分泌型腺毛的形态都发生改变,青蒿素的含量大大降低,而过表达 *TAR1* 则会增加青蒿素的产量^[75]。并进一步通过凝胶阻滞、酵母单杂交、瞬时转化 GUS 等实验证实 *TAR1* 可以直接调控青蒿素合成路径上的关键酶基因 *ADS* 和 *CYP71AV1* 来控制青蒿素的合成。因此 *TAR1* 是腺毛发育和青蒿素合成分子调控网络中的重要调控者^[75]。

Graham 等^[102]在 2010 年对黄花蒿进行了深度转录组测序,试图寻找和青蒿素产量相关的基因和分子标记。希望通过分子生物学手段对黄花蒿进行改良,以期提高青蒿素产量,降低生产成本。并希望可以将这种在中国已经栽种了 1 000 多年的药用植物改良成为一种种植范围更广的“全球性植物”。同时 Graham 也预测了 7 个可能与腺毛发育相关的基因^[102]。此外,黄花蒿的全基因组测序将为分子水平的研究提供帮助和便利,也预示着黄花蒿功能基因组研究时代的来临。目前,拟南芥、番茄和烟草中腺毛相关基因的研究

比较详细且完整,可作为研究黄花蒿腺毛的参考,特别是番茄和烟草中分泌型腺毛的研究。网站 <http://www.plant-trichome.org/> 包含了所有腺毛的 ESTs (expressed sequence tags),也可以作为研究黄花蒿腺毛的参考工具^[103]。

4.2 microRNAs 对腺毛的影响

microRNAs 是一种存在于动、植物和病毒中的只有 22 个碱基的小 RNA,可以在转录和转录后水平调节基因的表达。植物 miRNAs 通常能与它们所对应的信使 RNA 完全匹配或几近完全匹配,最终导致基因抑制^[104]。

目前在黄花蒿中通过计算机预测了几个 miRNA 和它们的靶标,但没有任何实验证明。共预测了 6 个 miRNA,属于 miR414 和 miR1310 家族,共有 8 个靶标基因,包括 *HMGR*, *ADS*, *FPS* 和细胞色素 P450^[105]。在拟南芥中报道的 miRNA156 可以靶向调控 *SPL* (squamosa promoter binding protein like) 基因的表达,而 *SPL* 基因可以调控腺毛发育的负调控因子 *TCL1* (trichomeless 1) 和 *TRY* (tryptichon)^[106]。miRNA390 则被报道可以直接靶向调控腺毛的发育^[107]。另外有报道称卷心菜的 miRNA172 可以调控 AP2 家族的基因^[108]。这些研究说明植物体内存在能够调控腺毛发育的 miRNA,这种调控尚需更多深入的研究。

4.3 植物激素对腺毛的影响

植物激素作为一种信号分子,可以调节特定的细胞进程,对于植物生长发育和适应环境十分重要。通常来说植物激素可以分为 5 大类,包括脱落酸、植物生长素 (auxin)、细胞分裂素 (CTK)、乙烯 (ETH) 和赤霉素 (GA)。除此之外,还有 2 类比较重要的激素,水杨酸 (SA) 和茉莉酸 (JA)。

研究表明,细胞分裂素和赤霉素可以影响黄花蒿腺毛发育,但不能促进青蒿素的生物合成。茉莉酸既能促进分泌型腺毛的发育又能提高青蒿素生物合成相关基因的表达,最终导致青蒿素含量增加^[86]。而其他植物激素影响黄花蒿腺毛发育的研究较少。与黄花蒿中激素作用相似,茉莉酸、细胞分裂素和赤霉素也能促进拟南芥中腺毛的形成^[109]。水杨酸能负调控拟南芥腺毛发育,且减弱茉莉酸的作用^[110]。

在黄花蒿中植物激素可以通过转录调控 WD40-bHLH-MYB 复合物,调控腺毛形成^[86]。WD40-bHLH-MYB 复合物是由 R2R3-type MYB 蛋白与 bHLH 蛋白相互结合,再与 *TTG1* 编码的 WD40 蛋白结合,最终促进表皮细胞分化成腺毛。在拟南芥中细胞分裂素和赤霉素通过调控能促进 *GL1* 基因表达的 C2H2 转录因子,如 *GIS*, *GIS2* 和 *ZFP8*,来调控茎和花序上腺毛发育^[106]。

5 结语

青蒿素的生物合成途径属于类异戊二烯代谢合成途径,其上游途径已较清楚,有公认的酶及催化步骤,但是从 FPP 开始的下游合成途径仍存在争议。主要是关于青蒿酸能否转化成青蒿烯并进一步转化成青蒿素,以及二氢青蒿酸如何转化成青蒿素等,这些还有赖于青蒿素生物合成代谢途径的

进一步解析。

在青蒿素生物合成途径代谢酶的调控方面已有较多研究,已经进行的有将代谢路径 *HMGR*, *FPS*, *DXR*, *DBR2*, *ALDH1*, *ADS* 等单基因过表达,或 *CYP71AV1/CPR*, *HMGR/ADS*, *HMGR/FPS*, *ADS/CYP71AV1/CPR*, *FPS/CYP71AV1/CPR* 等 2 个或 3 个基因的共同表达,或者阻断竞争性支路上的 *SQS*, *CPS* 等基因都可不同程度地提高青蒿素含量,最高可提高到 $31.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)。已经证实的能参与青蒿素代谢调控的转录因子有 *AaWRKY1*, *AaORA*, *AaERF1*, *AaERF2*, *AaTAR1*, *AabZIP1*, *AabHLH1*, *AaMYC2*, 它们大多通过调控青蒿素合成途径上的关键酶基因来调控青蒿素的合成。此外,植物激素茉莉酸及其衍生物、脱落酸、光信号通路,以及参与到这些路径中的基因 *AaAOC*, *AaPYL9*, *AaPP2C1*, *AtCRY1* 等都能影响青蒿素的合成。随着黄花蒿功能基因组学研究的开展,将有更多的重要靶标基因被揭示出来,将对青蒿素的生物合成及调控有更深层次的理解。掌握这些基因资源,不仅有益于提高青蒿素含量,还能保护我国黄花蒿基因资源,拥有我国自主的基因知识产权。

化合物分析及重要基因的表达分析证明腺毛是青蒿素体内合成、分泌、积累及储存的场所,青蒿素由腺毛的分泌细胞合成并被存储在皮下腔空间。但是腺毛如何合成青蒿素还不是非常清楚,2 个顶细胞与 4 个下顶细胞是非常不同的,青蒿素是由 2 个顶细胞合成,还是在 6 个分泌细胞中都合成一直存在较大争议。这些还有赖于细胞化学的研究证据来进一步确证。此外,非分泌型腺毛中也存在倍半萜和三萜类生物合成特异性基因的表达,因此非分泌型腺毛中是否也存在青蒿素合成,以及如何合成还需进一步研究。

对腺毛的研究或许能够为青蒿素的体外生物合成提供环境条件,并有益于开发青蒿素的合成工厂。此外,黄花蒿腺毛是一种典型的分泌型腺毛,分泌型腺毛是许多重要次生代谢产物的合成场所,而模式植物拟南芥、水稻中并不具有这种特殊器官,因此黄花蒿腺毛可以作为分泌型腺毛的模式器官进行研究,并被其他物种借鉴。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. World malaria report 2015 [EB/OL]. (2015-04) [2016-10-27]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
- [2] Dondorp A M, Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria[J]. N Engl J Med, 2009, 361: 1807.
- [3] Peplow M. Malaria drug made in yeast causes market ferment [J]. Nature, 2013, 494: 160.
- [4] 李斌,周红. 青蒿素及其衍生物药理作用研究有关进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 572.
- [5] 杨丹,都艳玲,赵楠,等. 青蒿素及其衍生物的药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2014, 35(2): 132.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2015: 198.
- [7] 张小波,赵宇平,黄晓巍,等. 青蒿素道地药材研究综述[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 2015.
- [8] Abidin M Z, Israr M, Rehman R U, et al. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production[J]. Planta Med, 2003, 69: 289.
- [9] Zhang X B, Guo L P, Huang L Q. Climate suitable rank distribution of artemisinin content of *Artemisia annua* in China[J]. Acta Pharm Sin, 2011, 46(4): 472.
- [10] 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: 528.
- [11] A2S2. Artemisinin imports into India [EB/OL]. (2016-06) [2016-10-27]. <http://www.a2s2.org/market-data/artemisinin-imports-into-india.html>.
- [12] Tang K, Shen Q, Yan T, et al. Transgenic approach to increase artemisinin content in *Artemisia annua* L [J]. Plant Cell Rep, 2014, 33: 605.
- [13] 孙洪波,刘越,冯金朝. 生物技术在中药青蒿中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1388.
- [14] Duke S O, Paul R N. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L [J]. Int J Plant Sci, 1993, 154: 107.
- [15] Duke M V, Paul R N, Elsohly H N, et al. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L [J]. Int J Plant Sci, 1994, 155(3): 365.
- [16] Schillmiller A L, Last R L, Pichersky E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds[J]. Plant J, 2008, 54: 702.
- [17] 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: 1123.
- [18] Tissier A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? [J]. Plant J, 2012, 70(1): 51.
- [19] Lange B M, Wildung M R, Stauber E J, et al. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 2934.
- [20] Kang J H, Shi F, Jones A D, et al. Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry[J]. J Exp Bot, 2010, 61: 1053.
- [21] Happyana N, Agnolet S, Muntendam R, et al. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LC-MS and cryogenic NMR [J]. Phytochemistry, 2013, 87: 51.
- [22] Soetaert S, Neste C, Vandewoestyne M, et al. Differential transcriptome analysis of glandular and filamentous trichomes in *Artemisia annua* [J]. BMC Plant Biol, 2013, 13: 220.
- [23] Walford S A, Wu Y, Llewellyn D J, et al. Epidermal cell differ-

- entiation in cotton mediated by the homeodomainleucine zipper gene , GhHD-4 [J]. Plant J , 2012 , 71: 464.
- [24] Perazza D , Herzog M , Hülkamp M , et al. Trichome cell growth in *Arabidopsis thaliana* can be derepressed by mutations in at least five genes [J]. Genetics , 1999 , 152(1) : 461.
- [25] Glas J , Schimmel B , Alba J , et al. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores [J]. Int J Mol Sci , 2012 , 13: 17077.
- [26] Duke S O , Vaughn K C , Croom E M , et al. Artemisinin , a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*) , is a selective phytotoxin [J]. Weed Sci , 1987 , 35: 499.
- [27] Kliebenstein D J. Making new molecules—evolution of structures for novel metabolites in plants [J]. Curr Opin Plant Biol , 2013 , 16: 112.
- [28] Ferreira J F S , Floral Janick J. Morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes [J]. Int J Plant Sci , 1995 , 156(6) : 807.
- [29] 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 , 2012 , 183: 9.
- [30] Schramek N , Wang H , Römisch-Margl W , et al. Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua*. A $^{13}\text{CO}_2$ study [J]. Phytochemistry 2010 , 71: 179.
- [31] 彭梅芳. 青蒿素代谢途径中两个关键酶基因的克隆及黄花蒿遗传转化研究 [D]. 重庆: 西南大学 , 2009.
- [32] 景福远. 利用基因工程技术提高青蒿中青蒿素含量的研究 [D]. 上海: 上海交通大学 , 2008.
- [33] 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.
- [34] Wang H , Han J , Kanagarajan S , et al. Trichome-specific expression of the amorpho-4 , 11-diene 12-hydroxylase (cyp71av1) gene , encoding a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* , as reported by a promoter-GUS fusion [J]. Plant Mol Biol , 2013 , 81(1/2) : 119.
- [35] Wang Y , Yang K , Jing F , et al. Cloning and characterization of trichome specific promoter of cpr71av1 gene involved in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L [J]. Mol Biol (Mosk) , 2011 , 45(5) : 751.
- [36] Teoh K H , Polichuk D R , Reed D W , et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1 , a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin [J]. FEBS Lett , 2006 , 580: 1411.
- [37] Wu T , Wang Y , Guo D. Investigation of glandular trichome proteins in *Artemisia annua* L. using comparative proteomics [J]. PLoS ONE 2012 , 7(8) : e41822.
- [38] Teoh K H , Polichuk D R , Reed D W , et al. Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. Botany , 2009 , 87(6) : 635.
- [39] Ryden A M , Carolien R S , Quax W , et al. The molecular cloning of dihydroartemisinic aldehyde reductase and its implication in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. Planta Med , 2010 , 76(15) : 1778.
- [40] Alejos-Gonzalez F , Qu G , Zhou L L , et al. Characterization of development and artemisinin biosynthesis in self-pollinated *Artemisia annua* plants [J]. Planta , 2011 , 234(4) : 685.
- [41] Aquil S , Husaini A M , Abdin M Z , et al. Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. Planta Med , 2009 , 75: 1453.
- [42] Nafis T , Akmal M , Ram M , et al. Enhancement of artemisinin content by constitutive expression of the HMG-CoA reductase gene in high-yielding strain of *Artemisia annua* L [J]. Plant Biotechnol Rep 2011 , 5: 53.
- [43] 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: 940.
- [44] Chen D H , Ye H C , Li G F. Expression of a chimeric farnesyl-diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. Plant Sci , 2000 , 155: 179.
- [45] Banyai W , Kirdmanee C , Mii M , et al. Overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult , 2010 , 103: 255.
- [46] 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: 482.
- [47] Carretero-Paulet L , Ahumada I , Cunillera N , et al. Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase , the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. Plant Physiol , 2002 , 129: 1581.
- [48] Xiang L E , Zeng L X , Yuan Y , et al. Enhancement of artemisinin biosynthesis by overexpressing dxr , cyp71av1 and cpr in the plants of *Artemisia annua* L [J]. Plant Omics J , 2012 , 5: 503.
- [49] Rodríguez-Concepción M , Forés O , Martínez-García J F , et al. Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development [J]. Plant Cell , 2004 , 16: 144.
- [50] 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: 2129.
- [51] Bouwmeester H J , Wallaart T E , Janssen M H , et al. Amorpho-4 , 11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis [J]. Phytochemistry , 1999 , 52: 843.

- [52] Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester H J, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of amorpha-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L[J]. Arch Biochem Biophys 2000 381: 173.
- [53] Kim S H, Chang Y J, Kim S U. Tissue specificity and developmental pattern of amorpha-4,11-diene synthase (ADS) proved by ADS promoter-driven GUS expression in the heterologous plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta Med, 2008, 74: 188.
- [54] Wang H Z, Olofsson L, Lundgren A, et al. Trichomespecific expression of amorpha-4,11-diene synthase, a keyenzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L, asreported by a promoter-GUS fusion[J]. Am J Plant Sci 2011, 2: 619.
- [55] Arsenault P R, Vail D R, Wobbe K K, et al. Reproductive development modulates gene expression and metabolite levels with possible feedback inhibition of artemisininin *Artemisia annua* L[J]. Plant Physiol, 2010 154: 958.
- [56] Ma C, Wang H, Lu X, et al. Terpenoidmetabolic profiling analysis of transgenic *Artemisia annua* L. by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-offlight mass spectrometry [J]. Metabolomics, 2009, 5: 497.
- [57] 唐克轩, 沈乾, 陈韵斐, 等. 转 DBR2 基因提高青蒿中青蒿素含量的方法: 中国, CN201210014227. 2 [P]. 2012-09-49.
- [58] 唐克轩, 陈韵斐, 沈乾, 等. 转 ALDH1 基因提高青蒿中青蒿素含量的方法: 中国, CN201210014242. 7 [P]. 2012-08-22.
- [59] Shen Q, Chen Y F, Wang T, et al. Overexpression of thecytochrome P450 monooxygenase (cyp71av1) and cytochrome P450 reductase (cpr) genes increased artemisinin content in *Artemisia annua*(Asteraceae) [J]. Genet Mol Res, 2012, 11: 3298.
- [60] Chen Y, Shen Q, Wang Y, et al. The stacked over expression of *FPS*, *CYP71AV1* and *CPR* genes leads to the increase of artemisinin level in *Artemisia annua* L[J]. Plant Biotechnol Rep, 2012, 7: 287.
- [61] Lu X, Shen Q, Zhang L, et al. Promotion of artemisinin biosynthesis intransgenic *Artemisia annua* by overexpressing *ADS*, *CYP71AV1* and *CPR* genes[J]. Ind Crop Prod, 2013, 49: 380.
- [62] 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: 1919.
- [63] Wang Y Y, Jing F Y, Yu S Y, et al. Co-overexpression of the *HMG*R and *FPS* genes enhances artemisinin content in *Artemisia annua* L[J]. J Med Plants Res 2011 5: 3396.
- [64] Liu Y, Ye H C, Wang H, et al. Molecular cloning, *Escherichia-coli* expression and genomic organization of squalene synthasegene from *Artemisia annua* [J]. Acta Bot Sin 2003 45: 608.
- [65] Zhang L, Jing F Y, Li F P, 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 genesilencing [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2009 52: 199.
- [66] Cai Y, Jia J W, Crock J, et al. AcDNA clone for β -caryophyllene synthase from *Artemisia annua* [J]. Phytochemistry, 2002 61: 523.
- [67] Chen J L, Fang H M, Ji Y P, et al. Artemisinin biosynthesisenhancement in transgenic *Artemisia annua* plants by downregulation of the beta-caryophyllene synthase gene [J]. Planta Med, 2011, 77: 1759.
- [68] Han J, Wang H, Lundgren A, et al. Effects of overexpression of AaWRKY1 on artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. Phytochemistry, 2014, 102: 89.
- [69] 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: 2146.
- [70] Lu X, Jiang W, Zhang L, et al. AaERF1 positively regulates the resistance to *Botrytis cinerea* in *Artemisia annua* [J]. PLoS ONE, 2013, 8: e57657.
- [71] Lorenzo O, Chico J M, Sanchez-Serrano J J, et al. Jasmonateinsensitive1 encodes a MYC transcription factor essentialto discriminate between different jasmonate-regulated defenseresponses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16: 1938.
- [72] 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.
- [73] Shen Q, Yan T, Fu X, et al. Transcriptional regulation of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L[J]. Sci Bull 2016, 61(1): 18.
- [74] 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: 353.
- [75] Tan H, Xiao L, Gao S, et al. Trichome and Artemisinin Regulator 1 is required for trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. Mol Plant 2015, 8: 1396.
- [76] Zhang F, Fu X, Lv Z, et al. A basic leucine zipper transcription factor, AabZIP1, connects abscisic acid signaling with artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L[J]. Mol Plant, 2015, 8: 163.
- [77] Hong G J, Xue X Y, Mao Y B, et al. *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthasegene expression [J]. Plant Cell, 2012, 24: 2635.
- [78] Van Moerkercke A, Steensma P, Schweizer F, et al. ThebHLH transcription factor BIS1 controls the iridoid branch of themonoterpoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 8130.
- [79] Zhang H, Hedhili S, Montiel G, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive-expression of the ORCA genes that regulate alkaloidbiosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. Plant J, 2011, 67: 61.
- [80] Ji Y, Xiao J, Shen Y, et al. Cloning and characterization of AabHLH1, a bHLH transcription factor that positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. Plant Cell Physiol

- ol, 2014, 55(9): 1592.
- [81] 唐克轩, 沈乾, 陆续, 等. 一种青蒿 MYC2 转录因子蛋白编码序列及其应用: 中国, 201310413155.3 [P]. 2013-09-11.
- [82] Galis I, Gaquerel E, Pandey S P, et al. Molecular mechanisms underlying plant memory in JA-mediated defence responses [J]. Plant Cell Environ, 2009, 32: 617.
- [83] Wasternack C, Kombrink E. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development [J]. ACS Chem Biol, 2010, 5: 63.
- [84] Wang H H, Ma C F, Li Z Q, et al. Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L [J]. Ind Crop Prod, 2010, 31(2): 214.
- [85] Maes L, Goossens A. Hormone-mediated promotion of trichome initiation in plants is conserved but utilizes species- and trichome-specific regulatory mechanisms [J]. Plant Signal Behav, 2010, 5: 205.
- [86] Maes L, Van Nieuwerburgh F C, Zhang Y, et al. Dissection of the phytohormonal regulation of trichome formation and biosynthesis of the antimalarial compound artemisinin in *Artemisia annua* plants [J]. New Phytol, 2010, 189(1): 176.
- [87] Lu X, Zhang F, Shen Q, et al. Overexpression of allene oxide cyclase improves the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L [J]. PLoS ONE, 2014, 9(3): e91741.
- [88] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53: 247.
- [89] Jing F, Zhang L, Li M, et al. Absciscic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in *Artemisia annua* by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway [J]. Biologia, 2009, 64: 319.
- [90] Zhang F, Lu X, Lv Z, et al. Overexpression of the artemisia orthologue of ABA receptor, AaPYL9, enhances ABA sensitivity and improves artemisinin content in *Artemisia annua* L [J]. PLoS ONE, 2012, 8(2): e56697.
- [91] Chatterjee M, Sharma P, Khurana J P. Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotyl/stem growth and anthocyanin accumulation [J]. Plant Physiol, 2006, 141: 61.
- [92] Hong G J, Hu W L, Li J X, et al. Increased accumulation of artemisinin and anthocyanins in *Artemisia annua* expressing the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1 [J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27: 334.
- [93] Zhang F, Fu X, Lv Z, et al. Type 2C Phosphatase 1 of *Artemisia annua* L. is a negative regulator of ABA signaling [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 1.
- [94] Gang D R, Wang J, Dudareva N, et al. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropanes in sweet basil [J]. Plant Physiol, 2001, 125: 539.
- [95] Fridman E, Wang J, Iijima Y, et al. Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones [J]. Plant Cell, 2005, 17: 1252.
- [96] Berteau C M, Voster A, Verstappen F W A, et al. Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from glandular trichome cDNA library [J]. Arch Biochem Biophys, 2006, 448: 3.
- [97] Berteau C M, Freije J R, 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: 40.
- [98] Zhang Y, Teoh K H, Reed D W, et al. The molecular cloning of artemisinic aldehyde $\Delta^{11(13)}$ reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 21501.
- [99] Wang G, Tian L, Aziz N, et al. Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop [J]. Plant Physiol, 2008, 148: 1254.
- [100] Nagel J, Culley L K, Lu Y, et al. EST analysis of hop glandular trichomes identifies an *O*-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol [J]. Plant Cell, 2008, 20: 186.
- [101] Liu S, Tian N, Li J, et al. Isolation and identification of novel genes involved in artemisinin production from flowers of *Artemisia annua* using suppression subtractive hybridization and metabolite analysis [J]. Planta Med, 2009, 75: 1542.
- [102] Graham I A, Besser K, Blumer S, et al. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin [J]. Science, 2010, 327: 328.
- [103] Dai X, Wang G, Yang D S, et al. TrichOME: a comparative omics database for plant trichomes [J]. Plant Physiol, 2010, 152: 44.
- [104] Wikipedia. MicroRNA [EB/OL]. [2016-10-27]. <http://en.wikipedia.org/wiki/MicroRNA>.
- [105] Pani A, Mahapatra R K, Behera N, et al. Computational identification of sweet wormwood (*Artemisia annua*) microRNA and their mRNA targets [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2011, 9(6): 200.
- [106] Yu N, Cai W J, Wang S, et al. Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2010, 22: 2322.
- [107] Pe'rez-Quintero A L, Sablok G, Tatiana V T, et al. Mining of miRNAs and potential targets from gene oriented clusters of transcripts sequences of the anti-malarial plant, *Artemisia annua* [J]. Biotechnol Lett, 2012, 34: 737.
- [108] Song X, Li Y, Hou X. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factor superfamily in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 573.
- [109] Maes L, Goossens A. Hormone-mediated promotion of trichome initiation in plants is conserved but utilizes species- and trichome-specific regulatory mechanisms [J]. Plant Physiol, 2008, 148: 1453.
- [110] Traw M B, Bergelson J. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2003, 133: 1367.

[责任编辑 丁广治]