



诱导子对丹参有效成分次生代谢的诱导与调控

李文渊¹, 高伟², 邵爱娟¹, 何云飞¹, 黄璐琦^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
2. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 诱导子被认为是提高药用植物次生代谢产物最有效的方法之一,为当前研究的热点。生物和非生物诱导子对丹参有效成分次生代谢具有诱导和调控作用。作者介绍了诱导子对丹参的诱导、调控机制等方面的研究进展。

[关键词] 诱导子;丹参;次生代谢;诱导;调控

中药有效成分,多来源于药用植物次生代谢过程中合成的天然产物。中药丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge. 的干燥根及根茎^[1],其有效成分包括水溶性和脂溶性两大类,脂溶性成分主要是二萜醌类化合物(包括丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮、二氢丹参酮等丹参酮类化合物),水溶性成分主要为酚酸类化合物(包括丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸A、B等)^[2],脂溶性成分具有抑制血小板聚集、提高耐缺氧能力、改善冠状动脉供血、抗肿瘤等作用^[3-5];而水溶性成分具有抗氧化损伤、抗肝纤维化、改善尿毒症、改善肾功能等作用^[6-7]。由于丹参有效成分在原植物中含量较低、生长周期长、加之近年来产地环境破坏和粗放型的种植模式,导致丹参品质和产量下降,严重影响了临床应用和制药工业的发展。因此,有必要应用现代生物技术和分子生物学手段来促进丹参产业的发展。研究表明,利用茉莉酸甲酯、酵母、银离子、铜离子等生物和非生物诱导子能够显著的促进丹参有效成分的积累,是一种提高丹参药用成分含量的有效方法。本文旨在对诱导子在丹参培养生产次生代谢物中的应用研究进展及其作用机制进行归纳总结。

1 诱导子

诱导子(elicitor),从植物病理学的角度来讲,是指在抗病生理过程中诱发植物产生植保素(phytoalexin)和引起植物过敏反应(hypersensitive reaction,HR)的因子。从细胞培养的角度来讲,是指能促进植物细胞产生目的产物的因子^[8]。诱导子根据来源可分为生物诱导子(biotic elicitor)和非生物诱导子(abiotic elicitor),生物诱导子主要包括病原菌(真菌、细菌、病毒与酵母)与植物细胞成分,其中主要是细胞壁水解产物,而非生物诱导子主要是起诱导作用的理化因子^[9],主要有水杨酸(salicylic acid,SA)、茉莉酸(jasmonate,JA)、茉莉酸

甲酯(methyl jasmonate,MJ)、稀土元素以及重金属盐类。

2 诱导子对丹参次生代谢物的诱导

2.1 生物诱导子对丹参次生代谢物的诱导

2.1.1 酵母提取物 在培养丹参细胞时,加入 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母提取物和 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蜜环菌发酵液,有非常明显促进丹参酮积累的效果,其含量可达到生药样品的3倍以上^[10]。酵母提取物、寡半乳糖醛酸、尖孢镰刀菌的细胞壁粗提物都可以提高丹参酮的产量,其中经过 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的酵母诱导后丹参中丹参酮产量是对照组产量的4.7倍^[11]。酵母提取液诱导丹参毛状根,可以显著提高迷迭香酸在丹参毛状根中的积累^[12]。丹参毛状根中丹参酮的积累可以被某些真菌发酵物诱导^[13],Shi M^[14]利用酵母提取物($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)与山梨糖醇($50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)共同诱导丹参毛状根,总丹参酮含量提高10倍,丹参酮含量提高9倍。两者共同作用能够显著提高丹参次生代谢产物的含量。

2.1.2 真菌诱导子 真菌诱导子是来源于真菌的一种确定的化学信号,在植物与真菌的相互作用中能快速、高度专一和选择性地诱导植物特定基因的表达,进而活化特定的次生代谢途径积累特定的目的次生产物^[15]。1968年,Cruickshank从丛梗孢菌菌丝体中分离到一种多肽链核盘素A(monilicolin A),将其加入菜豆细胞培养基后发现,它能够诱导菜豆内果皮的形成和异黄酮植保素——菜豆素(phaseollin)的积累^[16],这是关于真菌诱导子在植物细胞培养中应用的首次报道。通过真菌诱导子诱导后,皂苷合成途径中过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和多酚氧化酶(PPO)的活性增强,使丹参毛状根对诱导物产生更高的抗性,从而促进次生代谢产物的积累,提高了皂苷的含量^[17]。黄柏青等^[18]研究了大丽轮枝菌诱导子V44诱导丹参毛状根和丹参转化细胞后POD活力的变化。结果表明,经过诱导后POD活力显著提高,丹参毛状根酶活力变化大于丹参转化细胞,2种植物材料POD活力变化与诱导浓度和诱导时间有关。宋经元等^[19]利用计算机软件“均匀设计、回归分析及优化系统”,研究了蜜环菌诱导子对丹参冠瘿组织的影响。结果表明,在培

[稿件编号] 20101028013

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072990);北京市自然科学基金项目(5102009)

[通信作者] *黄璐琦, Tel: (010)64014411-2956, E-mail: huangluqi@263.net

培养基中加入蜜环菌诱导子(119 mL · L⁻¹),第29天收获培养物与培养液时可获得最高的丹参酮产量(147 mg · L⁻¹, P < 0.05)。Jiang L Z等^[20]用PGPR蜡样杆菌多糖提取物诱导丹参毛状根,丹参酮含量增加了7倍,而且能够显著的促进丹参毛状根的生长(生物量增加15%)。

2.2 非生物诱导子对丹参次生代谢物的诱导

2.2.1 茉莉酸甲酯 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ),是茉莉属素馨花中香精油的有气味化合物,也是茉莉中特殊香味的重要组成成分,在其他植物中亦有广泛分布。研究发现它在植物细胞的多种逆境反应中起信号介导的作用,引起细胞抗逆反应产物的表达^[21-22]。王学勇等^[23]用茉莉酸甲酯诱导丹参毛状根,采用高效液相色谱法检测处理2,6,9 d后,丹参毛状根中隐丹参酮、丹参酮 II_A的含量以及其在培养基中的含量,结果表明茉莉酸甲酯能显著提高丹参酮类成分在丹参毛状根中的积累并刺激其向培养基中释放。李明等^[24]对茉莉酸甲酯处理的丹参茎叶中丹酚酸和丹酚酸 B 含量进行检测,结果表明外施茉莉酸甲酯能促进丹参茎叶中丹酚酸和丹酚酸 B 含量的积累。

2.2.2 水杨酸 水杨酸(salicylic acid, SA)是存在于植物体内重要的酚类物质,与植物抗病性密切相关。20世纪90年代以来水杨酸作为一种植物对胁迫反应所必需的信号分子被人们研究,其中SA介导的信号传递途径与植物抗病性关系受到广泛关注。它作为一种重要的细胞信使与植物抗毒素,可以诱导呼吸方式从细胞色素呼吸途径到交替呼吸途径的转变,为植物病理反应提供物质、能量以及信号传导的基础^[25]。Dong J等^[26]用SA诱导丹参细胞培养物,对酶活力及酚酸类物质的含量进行检测。结果表明,用SA刺激丹参培养物8 h后,苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性受到激发,酚酸类物质积累增多。

2.2.3 重金属 重金属离子对细胞培养合成次生代谢产物的影响可能是由于引起或促进植物防御机制有关的特异的次生产物合成途径^[27]。Jiang L Z等^[28]在丹参细胞培养物中分别加入重金属 Ag⁺ 和 Gd²⁺,结果数据显示丹参细胞培养物中总丹参酮含量增加了10多倍。其中隐丹参酮含量增加最为显著(30倍),丹参酮 II_A的含量增加了5倍。

3 诱导子对丹参有效成分次生代谢的调控机制研究

近年来,国内外有大量的文献报道利用生物和非生物诱导子能够增加药用植物中次生代谢物的积累。但是对其机制研究大多都是推测,诱导子的筛选工作还停留在尝试阶段。关于诱导子的筛选,有诸多问题需要解决。通常认为,诱导子信号被传递到细胞内以后,是通过控制次生代谢途径中关键酶的合成来调节次生代谢物的合成。因此,要想有针对性的筛选诱导子,首先必须对药用植物次生代谢生物合成的途径研究透彻,并且对次生代谢途径中的关键酶的结构和特性有足够的认识,其次要了解诱导子与代谢产物之间是如何相互作用的。

3.1 对丹参酮类有效成分的调控机制

萜类化合物在植物体中的合成是通过2个途径进行的,即位于细胞质中的甲羟戊酸途径(MVA pathway)和位于质体中的磷酸甘油醛途径(DXP pathway)。MVA途径^[29]由Conrad Bloch和Feodor Lynen于1958年首先在动物和酵母中发现,主要存在于细胞质中,又可称为细胞质途径(cytosolic pathway)。植物通过该途径可以形成植物中的倍半萜、三萜和甾醇等。DXP途径存在于植物、大多数真核微生物和一些寄生虫,在质体中进行,又可称为质体途径(plastid pathway)^[30]。植物通过该途径可形成植物中的单萜、二萜和四萜(图1)。一般认为,丹参中二萜丹参酮类有效成分是DXP途径的产物,同时也受MVA途径的影响。到目前为止,丹参二萜丹参酮类有效成分生物合成途径上的大部分关键酶基因已经被成功克隆。其中王学勇^[31]成功克隆了乙酰乙酰CoA硫解酶(AACT)、4-二磷酸胞苷-2-C-甲基赤藓糖激酶(CMK)、异戊烯基焦磷酸异构酶(IPPI)、法呢基焦磷酸合酶(FPPS)关键基因,得到了全长cDNA序列。高伟^[32]成功克隆了柯巴基焦磷酸合酶(CPS)、类贝壳杉合成酶(KSL)基因,并对其进行原核表达、纯化和功能鉴定。王敬^[33]成功克隆了羟甲基戊二酰CoA合酶(HMGS)、脱氧木酮-5-磷酸合酶(DXS),戴住波^[34]成功克隆了丹参法呢基焦磷酸合酶(FPS)基因,并对其进行特征分析与功能验证。

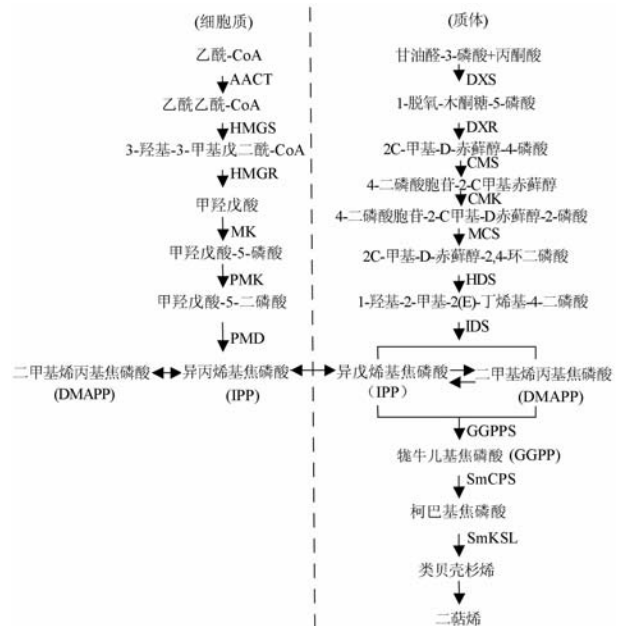


图1 丹参酮类二萜生物合成途径^[35-36]

与此同时,诱导子对丹参脂溶性有效成分生物合成途径的机制研究也有了初步的进展。用不同的诱导子诱导丹参后,其脂溶性有效成分生物合成途径上的关键酶基因的表达和有效成分的积累之间具有密切的关系。Ge X C等^[37]研究

表明 Ag^+ 能够诱导羟甲基戊二酰 CoA 还原酶 (HMGR) 的表达, Ag^+ 和酵母提取物 (YE) 均能刺激脱氧木酮糖-5-磷酸合酶 (DXS) 的表达, 但是 YE 的诱导作用更加明显。该研究结果显示, 非 MVA 途径阻断剂—腓胺霉素能有效抑制由 YE 和 Ag^+ 诱导的丹参酮类成分的积累, 而 MVA 途径阻断剂洛伐它丁只能阻断 Ag^+ 诱导的丹参酮的积累。提示丹参酮类成分的积累主要是通过非 MVA 途径, 但同时存在 MVA 与非 MVA 途径之间的交流。Wu S J 等^[51] 用 OS (渗透性应激) 和 YE (酵母提取物) 诱导丹参毛状根, 9 d 时具有明显的 RNA 杂交信号, 经过诱导后, 脱氧木酮糖磷盐还原异构酶 (DXR) 的转录水平也有显著的增加, 同时丹参毛状根中的丹参酮的含量也有相同的增加趋势, 结果表明 DXR 与丹参酮的积累有紧密的联系。Gao W 等^[35] 用 YE 和 Ag^+ 诱导丹参毛状根, SmCPS, SmKSL 的 mRNA 水平均有提高, 同时, 诱导子也刺激了丹参酮的积累, 这个研究表明 SmCPS, SmKSL 与丹参酮的次生代谢途径有关。

3.2 对酚酸类有效成分的调控机制

在丹参的有效成分中, 除了脂溶性的丹参酮类物质外, 水溶性的酚酸类成分因为其药用价值逐渐成为国内外的研究热点。在诸多的酚酸类成分中, 目前人们对迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA) 的生物合成途径研究最多也最清晰。RA 在酚酸类化合物中其结构具有典型意义, 被认为可能是其他酚酸类化合物的前体化合物^[50]。因此研究 RA 的生物合成机制对探索更加复杂的酚酸类化合物的合成机制具有重要的意义。1970 年, Elslis 等首次提出了迷迭香酸的生物合成途径, 他用放射性同位素喂饲薄荷和胡椒薄荷, 然后从幼芽中分离不同的化合物来推测迷迭香酸的生物合成途径, 认为苯丙氨酸和酪氨酸是迷迭香酸生物合成的前体^[38]。后来, 迷迭香酸生物合成途径在紫草和紫苏的悬浮培养细胞中得到了全面的阐述^[39-40]。迷迭香酸生物合成途径上的苯丙氨酸解氨酶 (PAL)^[41]、肉桂酸 4-羟化酶 (C4H)^[42]、羟基肉桂酸辅酶 A 连接酶 (4CL)、酪氨酸氨基转移酶 (TAT)^[43]、对羟基苯丙酮酸还原酶 (HPPR)^[43]、对羟基苯丙酮酸双氧化酶 (HPPD)^[43] 关键酶基因已经被成功克隆 (图 2)^[44]。

Huang B B 等^[45] 对丹参迷迭香酸代谢途径上酪氨酸分支上的第 1 个酶酪氨酸氨基转移酶 (TAT) 进行克隆和表达分析, TAT 在丹参茎中的表达量明显高于在根和叶子中。作者分别将脱落酸 (abscisic acid, ABA), 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJ), 水杨酸 (salicylic acid, SA) 喷洒在丹参叶片上, 结果表明, SA, MeJ, ABA 均能不同程度的诱导酪氨酸氨基转移酶 (TAT) 基因的表达, 提示 SA, MeJ, ABA 均与 TAT 介导的代谢途径相关联。此外, Qiong Y 等^[46] 就生物诱导子酵母提取物 (YE) 和非生物诱导子 Ag^+ 对丹参水溶性成分迷迭香酸 (RA) 的积累影响作了研究, 探讨了 2 种诱导子对 RA 次生代谢相关酶活性的影响。结果表明, 2 种诱导子均能提高丹参毛状根中总酚酸类成分的含量, 其中 YE 的作用更加明

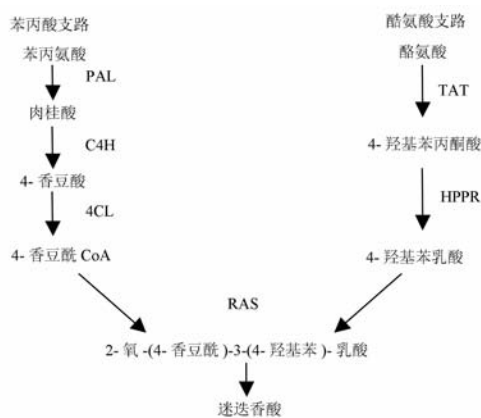


图 2 迷迭香酸生物合成途径

显。诱导子诱导 RA 积累之前, TAT 活性显著升高, 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性迅速降低。表明用 Ag^+ 和 YE 诱导丹参毛状根产生丹酚酸类成分与 TAT 的活性有关, 与 PAL 无关。Dong J 等^[26] 用水杨酸诱导丹参细胞培养物, 对酶活力及酚酸类物质的含量进行检测。结果表明, 在丹参细胞培养物酚酸类物质增加的同时, 苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、酪氨酸氨基转移酶 (TAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD) 的酶活性也相应增强。用 SA 刺激丹参培养物 8 h 后, PAL 酶活性受到激发, 酚酸类物质积累增多, 而 TAT 的活性在 48 h 后受到激发。结果表明, 酚酸类物质的积累与 PAL 的活性有关, 与 TAT 的关系甚微。同时, PAL 可能是丹酚酸 B 及咖啡酸生物合成路径上的关键酶。Xiao Y 等^[44] 克隆并且研究了与迷迭香酸合成有关的对羟基苯丙酮酸双氧化酶 (HPPD), 用茉莉酸甲酯、水杨酸、 Ag^+ 和酵母提取物诱导丹参毛状根, 结果表明, 用水杨酸和茉莉酸甲酯诱导丹参毛状根, HPPD 的表达量显著提高。用 Ag^+ 和酵母提取物诱导丹参毛状根, HPPD 的表达量降低, 结果提示酵母和银离子诱导迷迭香酸的积累与 HPPD 无关。

4 展望

显然, 通过添加各种诱导子以激活植物细胞防御响应已经成为提高植物培养体系次生代谢产物合成有效策略之一。已经有大量的实验证明添加各种诱导子能不同程度的增加各种植物次生代谢物的产量, 但是目前对于其机制研究还处于起步阶段。比如, 晏琼^[47] 等应用细胞信号转导理论对稀土元素铈离子 (Ce^{4+}) 诱导悬浮培养东北红豆杉细胞产生的生物学效应进行研究, 分析了 Ce^{4+} 对细胞氧迸发的诱导作用与机制, 并用特异性药理学抑制剂方法分析了与氧迸发产生相关的信号分子。从细胞信号转导角度对 Ce^{4+} 诱导紫杉醇合成和细胞凋亡的作用机制进行了研究, 发现 G 蛋白、 Ca^{2+} 通道、PLC 和 O_2^- 都参与了 Ce^{4+} 对这 2 种生物学效应的诱导调控。此外, 苗志奇^[48] 在简化的紫杉醇生物合成途径基础上, 提出了一种拟稳态转移模型。模型从诱导子作用下酶活



力改变的角度,成功的解释了诱导子作用下紫杉烷含量的变化,并给出了不同位点酶活力的提高与各代谢产物浓度转移模式间的关系,提供了一种从中间代谢产物拟稳态的转移模式确定诱导子的作用位点的方法。未作君^[49]用不同浓度的柠檬酸铵诱导红豆杉细胞,分析了诱导实验与对照实验中10-DAB,baccatin III的浓度变化趋势以及它们与紫杉醇产量间的相关性。通过拓扑简化将紫杉醇生物合成途径简化为一连串反应,从连串反应动力学的角度,分析了柠檬酸铵对各步反应速率的影响,从而获得柠檬酸铵作用位点的相关信息。

目前,紫杉醇等化合物生物合成途径比较清晰,所以,对于紫杉醇的诱导子诱导及机制研究,为丹参次生代谢物研究提供很好的参考。比如,在对机制的探求中,结合植物细胞信号转导途径、基因、酶活力等来研究植物细胞相关生理变化是一种相对有效的方法。但若要求系统阐释诱导子对药用植物次生代谢物的诱导及调控机制,分析诱导子在作用次生代谢物产生和积累的同时,探讨其产生过程中,细胞信号转导的变化,功能基因及调控因子的表达情况;建立诱导子-代谢物-基因(信号分子)等相关网络模型,将是非常可行和有价值的。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:70.
[2] Jing Y H, Jing Y F, Horie Y, et al. Ameliorating effects of compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion [J]. *Pharm Thera*, 2008, 117 (2) :280.
[3] 浦锡娟, 徐凯琳. 丹参的药理作用研究进展[J]. *临床医学工程*, 2009, 16 (8) :154.
[4] 袁淑兰, 王修杰, 魏于全. 丹参酮抗肿瘤作用及其机制的研究[J]. *癌症*, 2003, 22:1363.
[5] 张伟伟, 陆茵. 丹参抗肿瘤活性成分研究新进展[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35 (3) :389.
[6] 李克明, 付桂香. 丹参中丹酚酸B的药理研究进展[J]. *中日友好医院学报*, 2008, 22 (6) :366.
[7] 王虹, 王磊, 刘红梅, 等. 迷迭香提取物耐缺氧作用的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20 (5) :1089.
[8] 王和勇, 罗恒, 孙敏. 诱导子在药用植物细胞培养中的应用[J]. *中草药*, 2004, 35 (8).
[9] Ebel J. Phytoalexin synthesis; the biochemical analysis of the induction process[J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1986, 24:235.
[10] Song J Y, Zhang Y L, Qi J J, et al. Selection of a high tanshinone production crown gall strain and production of tanshinone in the strain [J]. *Chin J Biotechnol*, 1997, 13 (3) :317.
[11] 晏琼, 胡宗定, 吴建勇. 生物和非生物诱导子对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J]. *中草药*, 2006, 37 (2) :262.
[12] Yan Q, Shi M, Janet N, et al. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. *Plant Sci*, 2006, 170:853.
[13] Zhang Y L, Song J Y, Lu G L, et al. Establishment of *Salvia*

miltiorrhiza hairy root culture and tanshinone production[J]. *China J Chin Mater Med*, 1995, 20 (5) :269.
[14] Shi M, Kwok K W, Wu J Y. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor[J]. *Biotech Bio*, 2007, 46:191.
[15] 宁文, 曹日强. 真菌诱导物在植物次生代谢中的应用[J]. *植物生理学通讯*, 1993, 29 (5) :321.
[16] Cruickshank I A M, Perrin D R. The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollim-inducing activity from *Monilinia fructicola*[J]. *Life Sci*, 1968, 7:449.
[17] 张莲莲, 谈锋. 真菌诱导子在药用植物细胞培养中的作用机制和应用进展[J]. *中草药*, 2006, 37 (9) :1426.
[18] 黄柏青, 刘曼西. 真菌诱导物对丹参毛状根和转化细胞过氧化物酶活力的影响[J]. *湖北农学院学报*, 2001, 3:235.
[19] Song J Y, Qi J J, Lei H T, et al. Effects of *Armillaria mellea* elicitor on accumulation of transhinones in crown gall cultures of *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Acta Bot Sin*, 2000, 42 (3) :316.
[20] Jiang L Z, Li G Z, Jian Y W. Promotion of *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone production by polysaccharide-protein fractions of plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus*[J]. *Process Bio*, 2010, 45 (9) :1517.
[21] Parchmann S, Gundlach H, Mueller M J. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures[J]. *Plant Physl*, 1997, 115(3) :1057.
[22] Bohland C, Balkenhohl T, Loers G, et al, Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan and methyl jasmonate [J]. *Plant Physl*, 1997, 114(2) :679.
[23] 王学勇, 崔光红, 黄璐琦, 等. 茉莉酸甲酯对丹参毛状根中丹参酮类成分积累和释放的影响[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32 (4) :300.
[24] 李明, 冯世阳. 茉莉酸甲酯对丹参茎叶丹酚酸和丹酚酸 B 含量的影响[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20 (8) :1921.
[25] 仇燕, 贾宁, 王丽, 等. 诱导子在红豆杉细胞培养生产紫杉醇中的应用研究进展[J]. *植物学通报*, 2003, 20 (2) :184.
[26] Dong J, Wan G W, Liang Z S. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture [J]. *J Biotech*, 2010, 148:99.
[27] Popp M P, Lesney M S, Davis J M. Defense responses elicited in plant cell suspension culture[J]. *Pl Cell Tis*, 1997, 47:199.
[28] Jiang L Z, Li G Z, Jian Y W. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87:137.
[29] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plant: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34(2) :95.
[30] Eisenreich W, Bachera A, Arigonib D, et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway [J]. *Cell Mol Life*



- Sci, 2004, 61:1401.
- [31] 王学勇. 丹参毛状根基因诱导表达分析及其有效成分生物合成基因的克隆研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2007.
- [32] 高伟. 丹参酮类化合物生物合成相关酶基因克隆及功能研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2008.
- [33] 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.
- [34] 戴住波. 丹参酮类生物合成关键酶基因的克隆、鉴定及丹参毛状根基因修饰的研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2010.
- [35] Gao W, Hillwig M L, Huang L Q, et al. A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights[J]. *Org Lett*, 2009, 11:5170.
- [36] Iijima Y, Davidovich-Rikanati R, Fridman E, et al. The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of *Basil*[J]. *Plant Physl*, 2004, 136: 3724.
- [37] Ge X C, Wu J Y. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor[J]. *Plant Sci*, 2005, 168:487.
- [38] Ellis B E, Towers G H. The biosynthesis of rosmarinic acid[J]. *Biochem J*, 1970, 118:291.
- [39] Petersen M, Hausler E, Karwatzki B, et al. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth[J]. *Planta*, 1993, 189:10.
- [40] Petersen M, Hausler E, Meinhard J, et al. The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1994, 38:171.
- [41] Song J, Wang Z Z. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36:939.
- [42] Huang B, Duan Y, Yi B, et al. Characterization and expression profiling of cinnamate 4-hydroxylase gene from *Salvia miltiorrhiza* in rosmarinic acid biosynthesis pathway[J]. *Russ J*, 2008, 55(3):390.
- [43] 易博. 丹参迷迭香酸代谢酪氨酸支路重要基因克隆及调控分析[D]. 上海:第二军医大学, 2007.
- [44] Xiao Y, Di P, Chen J F, et al. Characterization and expression profiling of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene (Smhppd) from *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36:2019.
- [45] Huang B B, Yi B, Duan Y B, et al. Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2008, 35:601.
- [46] Qiong Y, Shi M, Janet N, et al. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. *Plant Sci*, 2006, 170: 853.
- [47] 晏琼. Ce⁴⁺ 诱导红豆杉细胞生物学效应及相关信号分子的研究[D]. 天津:天津大学, 2003.
- [48] 苗志奇, 未作君, 元英进. 紫杉醇合成中甲基茉莉酮酸作用位点与配伍特性研究[J]. *生物物理学报*, 2000, 16(2): 204.
- [49] 未作君, 苗志奇, 元英进. 柠檬酸铵对紫杉醇生物合成途径的诱导作用研究[J]. *中草药*, 2001, 32(3):213.
- [50] Tanaka T, Morimoto S, Nonaka G, et al. Magnesium and ammonium-potassium lithospermates B, the active principles having a uremiapreventive effect from *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37:340.
- [51] Wu S J, Shi M, Wu J Y. Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoid tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52:89.

Effect of elicitors on induction and manipulation of secondary metabolic effective ingredients in *Salvia miltiorrhiza*

LI Wenyuan¹, GAO Wei², SHAO Aijuan¹, HE Yunfei¹, HUANG Luqi^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] The application of elicitors, which is currently the focus of research, has been considered as one of the most effective methods to improve the synthesis of secondary metabolites in medicinal plants. Biotic and abiotic elicitors can regulate the secondary metabolic pathways of effective ingredients in *Salvia miltiorrhiza*. This paper has introduced the research progress about the induction and the regulation mechanism of *S. miltiorrhiza* by elicitors.

[Key words] elicitors; *Salvia miltiorrhiza*; secondary metabolic; induction; manipulation

doi:10.4268/cjcm20110306

[责任编辑 吕冬梅]