

## 基于多组学的丹参活性成分生物合成与调控研究进展

詹忠根\*

(浙江经贸职业技术学院生物制药教研室, 浙江 杭州 310018)

**摘要:** 中药丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 具有很高的药用价值, 对心血管疾病、肝硬化、慢性肾功能衰竭、阿尔茨海默病、心绞痛、心肌缺血、肝病、糖尿病、肾病具有治疗作用。近年来, 随着丹参基原植物野生资源的短缺和栽培种质质量不稳定等问题的突显, 其主要活性成分生物合成与调控机制研究成为国际关注的热点。而多组学技术在丹参研究中的应用和发展, 为分子层面揭示丹参遗传信息及活性成分合成与调控机制研究提供了可能。本文在系统总结丹参基因组、转录组、蛋白质组和代谢组研究进展的基础上, 归纳了丹参活性成分生物合成、调控及相关功能基因的研究概况, 并提出未来亟待深入研究的科学问题, 旨在为进一步发挥丹参在药用植物研究方面的模式作用提供参考。

**关键词:** 丹参; 活性成分; 生物合成与调控; 多组学技术

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)12-2892-12

## Advances in biosynthesis and regulation of the active ingredient of *Salvia miltiorrhiza* based on multi-omics approach

ZHAN Zhong-gen\*

(Biopharmaceutical Laboratory, Zhejiang Institute of Economics and Trade, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** *Salvia miltiorrhiza* Bge. is one of the most important traditional Chinese medicinal plants and is used for a variety of diseases and disorders, including cardiovascular diseases, hepatocirrhosis, chronic renal failure, Alzheimer's disease, angina pectoris, myocardial ischemia, liver diseases, and diabetic nephropathy. In recent years, with the shortage of uncultivated resources and uneven product quality of cultivated germplasm, the biosynthesis and regulation of its main active ingredient has become a topic of interest. The use of a multi-omics approach with *Salvia miltiorrhiza* may provide genetic information as well as insights into the synthesis and regulation of the active ingredient at the molecular level. The paper presented a systematic review of the genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics associated with *Salvia miltiorrhiza*, summarized the advances in biosynthesis, regulation and related functional genes, and also put forward some scientific problems of *Salvia miltiorrhiza* that need to be further studied in the future.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza*; active ingredient; biosynthesis and regulation; multi-omics approach

中药丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 具有活血化瘀、消肿止痛、养心安神等功效, 在心血管疾病、肝硬化、慢性肾功能衰竭、阿尔茨海默病、心绞痛、心肌缺血、肝病、糖尿病、肾病等治疗中作用显著<sup>[1]</sup>, 其基原植

物生态适应能力强、世代周期短、基因组小、染色体数目少、繁殖方式多样, 是理想的中药研究模式生物。近年来, 随着丹参基因组、转录组、蛋白质组学及代谢组学信息的逐步丰富以及毛状根可控研究模型的建立, 许多功能基因或基因家族得到详细研究, 主要活性成分生源途径被逐步解析, 对丹参的遗传转化体系构建、优良品种培育、活性成分调控机制研究和阐明中药道

收稿日期: 2020-08-07; 修回日期: 2020-10-09.

\*通讯作者 Tel: 86-571-86929836, E-mail: zhgz9321@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1300

地性实质等诸多方面的研究发挥了重要作用,其作为药用模式植物的条件更为成熟,提供其他中药材研究与开发的模式作用也更为明显,如利用基因工程方法增强丹参酮合成关键酶活性进行高产品种的培育方法,可为通过甲羟戊酸 (mevalonate pathway, MVA) 途径合成活性成分的药用植物提供借鉴<sup>[2]</sup>。为进一步发挥丹参在药用植物研究方面的模式作用,本文基于丹参多组学研究进展,对其活性成分的合成与调控机制作一梳理。

## 1 丹参主要活性成分及其分布

丹参中主要活性成分包括丹参酮I、丹参酮IIA、丹参酮IIB、二氢丹参酮I、隐丹参酮等脂溶性二萜醌类化合物和丹酚酸A、丹酚酸B、咖啡酸、丹参素、迷迭香酸等水溶性酚酸类成分。其中丹参酮类化合物为心脑血管疾病治疗的主要活性物质,主要分布于丹参根及根茎周皮木栓层,其次是韧皮部,且周皮木栓层细胞的颜色分布与其含量正相关,即木栓层细胞红色强度越强的部位,丹参酮类成分含量越高<sup>[3]</sup>。而木质部细胞的颜色与丹参酮类成分分布没有直接相关性,木质部是丹酚酸类化合物的主要分布场所,其次是韧皮部,木栓层中丹酚酸含量很低<sup>[4]</sup>。近年来的研究表明,丹参地上茎叶及花序也具有与根及根茎类似的药理作用,丹酚酸类化合物的含量在生长旺盛期明显高于地下根及根茎<sup>[5]</sup>。因此,对丹参茎叶的合理开发利用,可有效减少资源浪费、扩大药源。

## 2 丹参多组学研究

### 2.1 基因组研究

**2.1.1 核基因组** 2010年,一张覆盖92%的基因组序列和96%的基因编码区的基因组框架图(数据未发表)的完成开启了丹参全基因组测序的序幕,但丹参基因组杂合度和重复序列较高,组装难度大,随着长读长测序技术的应用才有效提高了其拼接效果。利用该技术 Zhang 等<sup>[6]</sup>测得丹参基因组全长641 Mb, Contig N50 = 82.8 kb, Scaffold N50 = 1.2 Mb, 重复序列占53.58%, 含有34 598个蛋白质编码基因和1 644个特异基因。Xu 等<sup>[7]</sup>测得基因组全长538 Mb, 重复序列占54.44%, 2.76个 SNP/1Kb, 蛋白质编码基因30 478个。两者测序结果虽然略有差异,但丹参基因组的成功测定为其次生代谢产物的合成与调控机制研究发挥了很大作用,如在基因组中注释了1 602个转录因子、82个萜类合酶和437个细胞色素P450 (cytochromes P450, CYPs) 蛋白编码基因,并鉴定了包括参与丹参酮合成相关酶基因 *SmCPS1*、*SmCPS2*、*CYP76AH1*、*CYP76AH3* 和 *CYP76AK1* 及参与赤霉素代谢必需因子 *SmCPS5* 在内的 *CPS1*、*CPS2*、*CPS5* 和 *CPS7* 等4对 *CPS/CYP* 相连

的基因簇,发现 *SmCPS1* 基因簇和 *SmCPS2* 基因簇可能来自同一个 *CPS/CYP76AH* 基因对的扩张,编码萜类、芪类、二苯基庚烷类和姜辣素类化合物的基因家族可能与丹参酮、丹酚酸类化合物的合成均存在一定的相关性等。当然,如需进一步提升基因组在丹参遗传资源的挖掘及利用中的作用,还要借助遗传图谱、物理图谱及其他组学数据提高基因组组装的精密度和基因的注释能力。

**2.1.2 叶绿体和线粒体基因组** 丹参叶绿体基因组 (chloroplast DNA, cpDNA) 的结构、基因顺序、GC含量和密码子使用与典型被子植物的 cpDNA 相似,全长151 328 bp,在大、小两个单拷贝区之间由一对反向重复序列隔开,呈典型的四段式结构。含有80个蛋白编码基因、30个 tRNA 基因和4个 rRNA 基因,并含有4对正向、3对反向的散在重复序列和7对串联重复序列<sup>[8]</sup>。单分子实时 (single molecule real time, SMRT) 测序技术结合链特异性 (strand-specific RNA-Seq, RNA-Seq) 技术分析表明,丹参 cpDNA 共有19个多顺反子,其中 pc1 为新发现的多顺反子, pc3 为连续多顺反子,除 pc17 上含有已用于载体构建的基因插入位点 *trnI-GAU/trnA-UGC* 外, pc8 上的 *psaA/psaB* 和 pc9 上的 *ndhK/ndhC* 也是潜在的外源基因插入位点。同时,丹参 cpDNA 的非编码序列中还含有大量的 ncRNAs (136个),其中反义 ncRNA 的数量及其位置将影响 cRNA 的表达丰度。此外, DNA 修饰 (检测到2 687个位点) 在丹参 cpDNA 中也普遍存在,尤其是 TATANNATNA 和 WNYANTGAW 基序的修饰现象更为明显,分别有36.1%和24.7%的位点被修饰,修饰后的 TATANNATNA 基序能显著提高其下游距离小于400 bp 的 ncRNA 基因表达丰度<sup>[9]</sup>。

丹参线粒体基因组全长499 236 bp,编码69个基因(蛋白编码基因44个、tRNA 基因22个、rRNA 基因3个),基因组中含有22个分布于11个蛋白编码基因的内含子(18个顺式、4个反式);在57对重复序列中检测到可能具有组织特异性的重组事件18对;检测到1 123个、12种类型的 RNA 编辑位点(575个位点位于正链、548个位点位于负链),其中“C到U”的编辑类型最多;在蛋白质编辑区的225个“C到U”编辑位点中,202个编辑位点会引起 mRNA 密码子的改变,另有115个位点存在 RNA 对称编辑的现象<sup>[10]</sup>。

可见,相较于叶绿体基因组,丹参线粒体基因组的基因数量较少、重组事件增多,所缺少的部分编码基因需要由叶绿体迁移而来方可进行蛋白合成(如编码 *Ala*、*Arg*、*Thr* 的 tRNA 基因),但与大多数迁移基因“到达即死 (dead on arrival)”不同的是,丹参叶绿体基因迁

移到线粒体后可与基因组进行整合并进行转录<sup>[11]</sup>。通过基因组测定,有利于利用叶绿体基因组相对稳定的基因组结构和相对缓慢的变异速度,为丹参系统发育研究提供更为可靠的方法选择,而线粒体基因组的高变异率,则为开发更为有效的丹参种质鉴定、物种划分相关的分子标记提供了可能。

## 2.2 转录组分析

近10年来,丹参活性物质相关的转录组研究取得长足进展,自崔光红等<sup>[12]</sup>利用cDNA芯片获得4354条ESTs和52个与毛状根发育相关的新基因以来,已从不同平台测定了20多个转录组序列,并构建了丹参转录资源数据库(DsTRD)<sup>[13]</sup>。具体来说,为阐明诱导子促进丹参酮和丹酚酸合成的分子机制,利用转录组数据,发现酵母提取物(yeast extract, YE)对丹参酮合成相关酶基因的激活作用较茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)更强,但与MeJA不同的是, YE对丹酚酸合成相关的酶基因无激活作用<sup>[14]</sup>。在水杨酸(salicylic acid, SA)诱导下,349个PPR(pentatricopeptide repeat)基因上调表达,其中23个与丹酚酸合成相关的酶基因共表达,而在YE和银离子(Ag<sup>+</sup>)组合诱导下,183个PPR基因表达上调,其中16个与丹参酮合成相关的酶基因共表达<sup>[15]</sup>。为发掘丹参活性成分合成的关键基因,利用DNA芯片克隆了5条丹参酮合成相关酶基因<sup>[16]</sup>;基于SmCPS1、SmKSL1和SmRAS等基因共表达从122个差异表达基因中筛选出3个参与萜类生物合成,4个参与酚酸类合成相关的CYP450候选基因<sup>[17]</sup>;基于EST鉴定了10个二萜类生物合成基因和26个酚酸生物合成基因<sup>[18]</sup>;随后又分别扩大到29条序列(编码11个关键酶)和27条序列(编码15个关键酶)<sup>[19]</sup>。此外,通过Illumina测序,挖掘了包括参与苯丙烷类和萜类化合物生物合成途径在内的5个主要次级代谢物途径的全部基因及686个转录因子<sup>[20]</sup>。为阐明丹参酮、丹酚酸积累的特异性空间分布机制,从基因表达谱中发现参与丹参酮合成的关键酶基因具有根优先表达模式<sup>[21]</sup>,如SmDXS2、SmDXR、SmHDS、SmHDR1、SmHDR3、SmIPI1、SmGGPPS1、SmCPS1、SmCPS5、SmKSL1、SmKSL7等与丹参酮合成相关的酶基因在周皮中高度表达<sup>[22]</sup>,而与迷迭香酸合成有关的SmPAL1、SmPAL3、sm4H1、Sm4CL3、Sm4CL-like 1、Sm4CL-like 4、SmTAT1、SmHPPR3、SmRAS和SmCYP98A78等基因在韧皮部和木质部中表达丰度更高<sup>[23]</sup>。

转录组的测定,为了解丹参特定发育或生理阶段下特定器官或组织细胞的基因差异表达、发现与特定生理功能相关的基因、推测未知基因编码蛋白的生理功能等奠定了基础。目前,丹参转录组相关研究,在方

向上,主要集中在阐明诱导效应、发掘活性成分生物合成关键酶基因、调控因子及其空间表达等方面,对胁迫应答、选择性剪接等还缺乏深入研究;在技术上,主要利用二代、三代或二代三代结合技术进行转录组测序,还未见单细胞转录组测序技术(scRNA-seq)的应用,而在单细胞水平上揭示丹参全基因组范围的基因表达对于研究细胞间的表达异质性非常有利。

## 2.3 蛋白质组研究

转录水平的基因表达变化并不总能精确地反映在蛋白质水平上,对诱导子效应的蛋白质组学研究有助于进一步了解植物抗逆和次生代谢产生的分子机制,优化药材品种,提高药材质量。Wang等<sup>[24]</sup>采用双向凝胶电泳和MALDI-TOF-MS对受YE、Ag<sup>+</sup>诱导的丹参毛状根蛋白质组进行分析,共鉴定出64种差异蛋白。结果表明:在YE、Ag<sup>+</sup>诱导下,将激活活性氧和Ca<sup>2+</sup>/钙调素信号通路,免疫抑制蛋白表达增加,表皮细胞经历程序性细胞死亡,能量代谢增强,碳代谢转向有利于木质素、丹参酮和丹酚酸等次生代谢产物的合成,同时丹参酮和丹酚酸沉积在塌陷的表皮细胞上形成物理化学屏障,与其他防御蛋白共同增强抗逆性。Contreras等<sup>[25]</sup>利用LC-MS/MS对不同诱导子组合诱导下的丹参毛状根差异蛋白变化情况作进一步研究,共鉴定出2650个差异蛋白,其中893个相对丰度与对照相比有显著变化( $P < 0.05$ )。在上调的蛋白中,主要功能类别为代谢(47%)、应激防御(18%)和氧化还原稳态(10%)。而Wang等<sup>[26]</sup>则利用同位素相对标记与绝对定量(isotope tagging for relative and absolute protein quantitation, iTRAQ)技术对雄性不育突变型(MT)和野生型(WT)进行蛋白质组学分析,共发现639个差异蛋白,其中与雄性不育相关的差异蛋白主要参与碳水化合物和能量代谢以及蛋白质的合成和降解。

中药材蛋白质组学研究的目标之一是通过比较不同植株或器官的蛋白差异,以评价活性成分与蛋白质组之间的相关性,从而揭示其生物合成的分子机制,是一种比基因表达谱更可靠、更准确反映活性成分生物合成关键酶表达水平的研究方法。目前,关于丹参蛋白质组的相关研究还处于起步阶段,值得更为深入的研究。

## 2.4 代谢组研究

生物信息从基因组到代谢组的传递实现了遗传物质和环境因素对个体生长、发育、衰老的调控。Jiang等<sup>[27]</sup>为筛选丹参地理标志物,从4个主要产区的丹参核磁共振指纹图谱中鉴定出26种代谢产物,结合稀疏偏最小二乘判别分析(sparse partial-least-squares discriminant analysis, sPLS-DA)及丙二酸和琥珀酸盐

对植物根呼吸速率的调节,认为这两种代谢物可作为区分丹参地理来源的关键标志物。Zhao等<sup>[28]</sup>采用LC/MS技术对生长在3个不同地点的同一基因型丹参及在同一地点生长的4种基因型丹参进行代谢组测定,经多元统计分析后发现其代谢组存在显著差异,并通过隐式结构的正交投影判别分析(orthogonal projection to latent structure with discriminant analysis, OPLS-DA)鉴定出16个次级代谢产物可作为丹参潜在的位置特异性标记,14个次级代谢产物可作为丹参潜在的基因型特异性标记。但生物发育过程复杂多变,基因调控网络复杂,将转录组测序获得的差异表达基因与代谢组测定得到的差异代谢物进行关联分析,从原因和结果两个层面分析丹参代谢产物的通路变化,构建核心调控网络成为研究重点。如,Gao等<sup>[29]</sup>对YE和Ag<sup>+</sup>组合诱导的丹参毛状根转录组和代谢组单独分析后进行联合讨论,发现2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, MEP)是异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)的主要来源,但在真菌诱导下,MVA途径成为IPP的主要合成途径<sup>[30]</sup>。从YE和Ag<sup>+</sup>诱导后*SmFPS*、*SmSQS*、*SmGGPS*、*SmKSL*表达上调,*SmGPS*的表达没有显著变化,单萜环化酶基因(*SmMS*)表达显著下调的现象表明,丹参萜类代谢对诱导反应是双向的,早期诱导倍半萜和三萜类的合成,后期诱导二萜类丹参酮的合成,且诱导效应更持久<sup>[29]</sup>。Zhan等<sup>[31]</sup>通过丹参正常品系和橙色根品系转录组和代谢组的相互验证,发现橙色根丹参品系的表型改变和质量下降并不是由于相关脱氢酶基因表达下降,而是由于催化C<sub>15</sub>-C<sub>16</sub>脱氢酶的错误折叠和内质网的降解致使隐丹参酮和二氢丹参酮I脱氢生成丹参酮IIa和丹参酮I型减少所致。Liu等<sup>[32]</sup>利用该策略揭示MeJA主要通过促进咖啡酸和4-羟基苯乳酸生成迷迭香酸(rosmarinic acid, RA)以实现丹酚酸累积的增加。而Ge等<sup>[33]</sup>则通过MeJA处理后丹参全株植物的代谢组与转录组分析,联合锁定茉莉酸信号通路中JAZs抑制因子进行新功能验证,揭示了JAZ基因在次生代谢物积累中的作用,并确认了SmJAZ8是丹参JA信号通路中的转录调节因子。可见,代谢组学对于研究基因或环境对植物代谢的影响或揭示活性成分的合成机制,有着不可或缺的优势,是丹参研究仍需关注的热点。

### 3 活性成分生物合成、调控及相关功能基因研究

#### 3.1 活性成分生物合成及相关功能基因

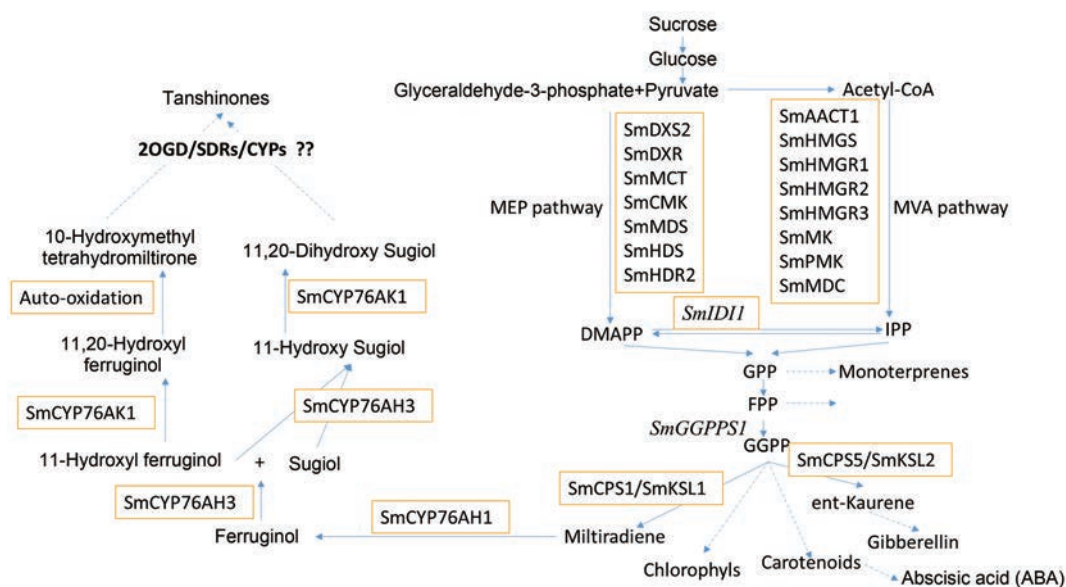
丹参主要活性物质的生物合成与调控机制的研究广受关注。尤其是高通量测序技术的快速发展及丹参全基因组和转录组的相继测定,为丹参活性成分的合成及调控机制研究开启了快速通道。

**3.1.1 丹参酮生物合成及相关功能基因** 丹参酮的生物合成大致分为3个阶段。第一阶段,以MEP途径为主,MVA途径为辅生成IPP;第二阶段,IPP依次转化为牻牛儿基二磷酸(geranyl diphosphate, GPP)、法尼基二磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP);第三阶段,GGPP通过逐步电离和环异构化反应生成二萜类化合物(图1)。

在前人通过分子克隆获得13个丹参酮合成相关基因的基础上<sup>[34-39]</sup>,基于丹参基因组框架图获得27个新基因,分属19个基因家族,编码所有参与IPP、DMAPP生成及两个参与二萜合成的酶基因<sup>[40]</sup>。基于丹参转录组又获得7个基因家族的23个新基因,并在根周皮中检测到11个与丹参酮合成相关的基因高度表达<sup>[22]</sup>。经组织特异性表达和对MeJA诱导的不同反应,推测第一阶段的MEP途径主要有*SmDXS2*、*SmDXR*、*SmMCT*、*SmCMK*、*SmMDS*、*SmHDS*和*SmHDR2*等基因参与,MVA途径主要有*SmAACT1*、*SmHMGS*、*SmHMGR1*、*SmHMGR2*、*SmHMGR3*、*SmMK*、*SmPMK*和*SmMDC*等基因参与;第二阶段的关键酶基因是*SmIDII*和*SmGGPPS1*,过表达*SmGGPPS*、*SmDXSII*的毛状根中丹参酮含量可达到12.93 mg·g<sup>-1</sup>(干重)<sup>[41]</sup>;而*SmKSL1*、*SmCPS1*、*SmCYP76AH1*、*SmCYP76AH3*、*SmCYP76AK1*等酶基因主要参与第三阶段的合成<sup>[40]</sup>。

自CPS和KSL被确认为是GGPP生成次丹参酮二烯(miltiradiene)的关键酶后,在丹参基因组中注释了12个*SmCPS*和9个*SmKSL*,其中*SmCPS1*和*SmKSL1*在周皮中表达程度最高,以此构建的酵母工程菌中次丹参酮二烯的产量达到了365 mg·L<sup>-1</sup>,优化改造后次丹参酮二烯的产量可提高到488 mg·L<sup>-1</sup><sup>[42]</sup>。在体外,将*SmCPS2*和*SmKSL1*组合,可催化生成次丹参酮二烯;将*SmCPS5*和*SmKSL2*组合,则产生赤霉素前体<sup>[43]</sup>。RNAi干扰*SmCPS1*,丹参酮IIA和丹参酮I显著下降;RNAi干扰*SmCPS5*,植株出现叶片短窄、花变小等性状<sup>[44]</sup>。通过检测7个丹参地方品种的*SmCPS1*和*SmKSL1*编码区域单核苷酸多态性(cSNPs),发现38个*SmCPS1*的cSNPs和42个*SmKSL1*的cSNP与丹参酮合成相关,品种间的丹参酮含量变化是由*SmCPS1*和*SmKSL1*编码区域的cSNP变异产生的<sup>[45]</sup>。由此可见,*SmKSL1*、*SmCPS1*在GGPP生成次丹参酮二烯过程起关键作用,*SmCPS5*、*SmKSL2*则参与赤霉素的合成。

至于次丹参酮二烯修饰生成各种丹参酮类化合物的分子机制,目前仍不十分清楚,仅明确*SmCYP76AH1*可催化次丹参酮二烯羟基化为铁锈醇(ferruginol),在工程菌中引入*CYP76AH1*基因后将铁锈醇的产量提高到



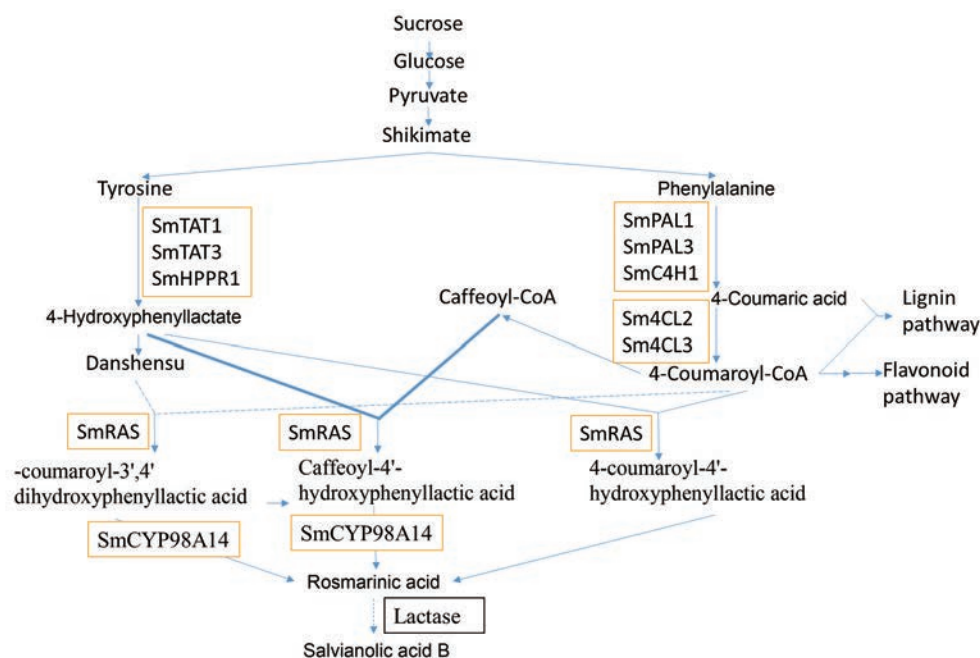
**Figure 1** Schematic tanshinone biosynthetic pathway and the major branch pathways in *Salvia miltiorrhiza*. MEP: 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate; MVA: Mevalonate; DXS: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; MCT: 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase; CMK: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase; MDS: 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; HDS: 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase; HDR: 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase; AACT: Acetyl-CoA acetyltransferase; HMGS: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; HMGR: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; MK: Mevalonate kinase; PMK: 5-Phosphomevalonate kinase; MDC: Mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase; GGPPS: Geranylgeranyl diphosphate synthase; CPS: Copalyl diphosphate synthase; KSL: Kaurene synthase-like cyclase

10.5 mg·L<sup>-1</sup>, 然后由 SmCYP76AH3 催化铁锈醇生成 11-羟基铁锈醇 (11-hydroxyl ferruginol)、柳杉酚 (sugiol) 和 11-羟基柳杉酚 (11-hydroxy sugiol), 再由 SmCYP76AK1 催化生成 11,20-二羟基铁锈醇 (11,20-dihydroxyl ferruginol) 和 11,20-二羟基柳杉酚 (11,20-dihydroxy sugiol)<sup>[46-48]</sup>。实际上, 次丹参酮二烯转化为丹参酮需要经过氧化、杂环化、芳构化和去甲基等多步反应, 除 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, 2OGD)、短链醇脱氢酶 (short-chain alcohol dehydrogenases, SDRs) 等参与外, 这些反应大多由 CYPs 介导<sup>[22,49,50]</sup>。目前已利用 454 GS FLX 技术从丹参根中的转录组数据中鉴定了 70 个可能编码 CYP450 的 unigene<sup>[19]</sup>, 利用 RNA-Seq 技术从毛状根中鉴定出约 300 个 CYP450 基因<sup>[46]</sup>。发现 85 个 CYP450 在 YE 和 Ag<sup>+</sup> 诱导的毛状根转录组中基因差异表达, 其中 CYP71 家族基因表达上调幅度最大, 在该家族中已鉴定出 8 个参与丹参酮合成的 CYP450 基因<sup>[29]</sup>。鉴定了 16 条 CYP450 基因在周皮中特异表达<sup>[22]</sup>, 分别有 119 个、13 个和 16 个 SmCYP450 基因与 SmKSL、SmCPS1、CYP76AH1 共表达<sup>[14]</sup>, SmCYP76AK2、SmCYP716D25 和 SmCYP728D17 可能参与萜类合成<sup>[48]</sup>, 并基于 MeJA 诱导表达, 又新鉴定出可能参与丹参酮合成的 CYP450 4 个<sup>[51]</sup>。

然而, 植物基因组中 CYPs 非常丰富, 编码庞大的 CYPs 酶超家族。CYPs 与 97% 以上的萜类生物合成相关, 除催化典型的区域性和立体特异性羟基化反应外, 还参与许多机制更为复杂的多底物酶催化反应<sup>[50,52]</sup>。CYPs 基因的丰富性和 CYPs 催化反应的复杂性在产生萜类物质结构多样性的同时, 也为鉴定特定天然产物生物合成相关的 CYPs 提出了巨大的挑战, 即便在模式植物拟南芥中, 仍有 70% 以上的 CYPs/CYPs 没有明确具体功能<sup>[53]</sup>。因此, 阐明丹参酮生物合成途径的关键在于相关 CYPs 的功能鉴定, 明晰 CYPs 的功能有利于为通过基因工程或合成生物学方法改善丹参酮获取途径扫清障碍。

**3.1.2 丹酚酸生物合成及相关功能基因** 目前认为, 起源于苯丙烷代谢途径两条平行支路的丹酚酸前体迷迭香酸 (RA) 有 3 种可能合成途径 (图 2), 即以 4-香豆酰 CoA 和 4-羟基苯乳酸为底物的传统途径, 以咖啡酰 CoA 和 4-羟基苯乳酸为底物的主要途径及以丹参素与 4-香豆酰 CoA 为底物的衍生途径<sup>[54-56]</sup>。

为阐明上述合成途径的分子机制, 在 SmRAS 和 SmCYP98A78 等 10 个基因的克隆鉴定基础上<sup>[56-63]</sup>, Wang 等<sup>[64]</sup>从全基因组中获得 19 个丹酚酸合成相关的新基因, 分属 9 个基因家族。在总共 29 个基因中, 编码苯丙烷途



**Figure 2** Schematic phenolic biosynthetic pathway and the major branch pathways in *Salvia miltiorrhiza*. TAT: Tyrosine aminotransferase; HPPR: Hydroxyphenylpyruvate reductase; PAL: Phenylalanine ammonia-lyase; C4H: Cinnamate-4-hydroxylase; 4CL: Hydroxycinnamate-CoA ligase; RAS: Rosmarinic acid synthase

径酶基因 15 个、酪氨酸途径酶基因 7 个、羟基肉桂酰转移酶基因 6 个以及 1 个 *CYP98A78* 基因 (*SmCYP98A78* 是 *SmCYP98A14* 的等位基因变体, 其编码蛋白可引入 3-羟基形成 RA<sup>[56]</sup>)。经组织特异性表达和 MeJA 诱导反应分析, 推断 *SmPAL1*、*SmPAL3*、*SmC4H1*、*Sm4CL2*、*Sm4CL3*、*SmTAT1*、*SmTAT3*、*SmHPPR1*、*SmRAS* 和 *SmCYP98A78* 基因可能参与迷迭香酸的生物合成。

在丹酚酸生物合成中, *CYPs* 也发挥着重要作用, 已发现与 *SmTAT1*、*SmHPPR1*、*SmRAS1* 共表达的 *SmCYP450* 基因分别达 15、9 和 7 个, 另有 4 个 *SmCYP450* 同时与 *SmHPPR1* 和 *SmRAS1* 共表达, *SmCYP98A78* 是 *SmCYP98A14* 的等位基因变体, 通过引入 3-羟基形成 RA<sup>[14,56]</sup>。鉴定了 *SmCYP73A120*、*SmCYP98A75*、*SmCYP98A76* 和 *SmCYP98A77* 分别编码肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamate-4-hydroxylase, C4H)、 $\beta$ -香豆酰辅酶 A 3'-羟化酶 ( $\beta$ -coumaroyl-CoA 3'-hydroxylase, CS3'H)、 $\beta$ -香豆酰基莽草酸酯 3'-羟化酶 ( $\beta$ -coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase, CS3'H) 和  $\beta$ -香豆酸酯 3-羟化酶 ( $\beta$ -coumarate 3-hydroxylase, C3H) 等与 RA、丹酚酸 B 累积直接相关的酶<sup>[65]</sup>。

相对于 RA 的合成, 丹酚酸下游生源途径还没有完全明确, 丹酚酸 B 可能在漆酶 (lactase, LAC) 等氧化酶催化下直接生成或经丹酚酸 E 转化而成, 也可能由咖啡酸与 RA 结合后生成紫草酸, 然后由紫草酸与丹参素自发酯化而成<sup>[66-70]</sup>。通过对丹参基因组数据中注

释的 80 个 *SmLACs* 综合分析及 29 个候选基因的功能鉴定, 发现 7 个 *SmLAC* 受 miR397 的负调控, *SmLAC7/8/20/27/28* 等 5 个基因参与丹酚酸的下游合成, 其中 *SmLAC7*、*SmLAC20* 作用最为重要, 当该基因被沉默时, 丹酚酸的含量分别下降 29.6% 和 87%, 而过表达时, 丹酚酸的含量则分别提高 5.61 和 5.45 倍<sup>[66]</sup>。丹酚酸是丹参活血化瘀功效的主要物质基础, 具有抗氧化、抗凝、抗血栓等多种药理活性, 部分组分已作为心脑血管保护剂候选药物进行开发<sup>[71]</sup>, 需求量很大, 但即便是含量最为丰富的丹酚酸 B 在丹参药材中也仅约 3%<sup>[72]</sup>。因此, 明晰丹酚酸下游生物合成途径, 对提升丹酚酸获取途径研究至关重要。

### 3.2 活性成分生物合成的调控机制及相关功能基因研究

#### 3.2.1 转录因子对活性成分合成的调控研究

生物及非生物诱导子对丹参酮、丹酚酸类化合物的诱导作用机制之一是通过转录因子调控关键酶基因实现的。研究表明, 丹参转录因子对丹参酮、丹酚酸类化合物的转录调控作用广泛而复杂, 如 YE 和/或 MeJA 介导的转录组中检测到 59 个 *WRKY*、28 个 *AP2-EREBP*、38 个 *MYB*、2 个 *GRAS* 和 51 个 *bHLH* 转录因子的基因表达上调, 其中 23 个 *WRKY*、6 个 *AP2-EREBP*、4 个 *MYB*、1 个 *GRAS* 和 7 个 *bHLH* 仅被 YE 诱导上调; 8 个 *WRKY*、13 个 *AP2-EREBP*、15 个 *MYB*、1 个 *GRAS* 和 41 个 *bHLH* 仅由 MeJA 诱导上调<sup>[14]</sup>。

具有来说(图3、4),丹参中9个 *SmJAZ* 基因的编码蛋白均负调控丹酚酸 B 合成,而对丹参酮合成而言, *SmJAZ3/4/8* 起负调控作用, *SmJAZ1/2/5/6/9* 起正调控作用<sup>[73]</sup>。在已注释的127条 *SmbHLH* 转录因子基因中<sup>[74]</sup>,其编码蛋白 *SmMYC2* 能激活 *SmTAT1*、*SmPAL1*、*SmC4H* 和 *SmCYP98A14* 等丹酚酸合成相关基因的转录<sup>[75]</sup>, *SmbHLH10* 能激活转录丹参酮合成关键酶 *SmDXS2*、*SmCPS1*、*SmCPS5* 基因<sup>[76]</sup>, *SmbHLH7* 则与 *JAZ3L* 结合,负调控丹酚酸而正调控丹参酮合成基因的转录<sup>[77]</sup>, *SmbHLH37* 能与 *SmJAZ3/8* 结合,负调控 *SmTAT1*、*SmPAL1* 基因<sup>[17]</sup>,而 *SmbHLH51* 和 *SmbHLH148* 丹酚酸类物质合成均有正向调节作用。111个丹参 *R2R3-MYB* 转录因子基因中, *S3*、*S4*、*S5*、*S6*、*S7*、*S13*、*S20*、*S21* 亚族的基因编码蛋白对丹参酮和丹酚酸类化合物的合成

具有调控作用,如 *SmMYB4* 通过抑制丹酚酸上游苯丙烷代谢途径的 *SmPAL1* 和 *SmC4H* 基因和丹参酮合成途径下游关键酶基因 *SmGGPPS3* 转录,起负调控作用<sup>[78]</sup>, *SmMYB98b*、*SmMYB9a* 和 *SmMYB9b* 能激活 MEP 途径中 *SmDXS2*、*SmDXR*、*SmGGPPS* 和 *SmKSL1* 转录,起正调控作用<sup>[79,80]</sup>,而 *SmMYB98* 则对 *SmGGPPS1*、*SmPAL1*、*SmRAS1* 等丹参酮和丹酚酸合成途径的酶基因均起激活作用<sup>[81]</sup>。69条 *SmWRKYs* 基因中,42条能响应 *MeJA* 和 *Ag<sup>+</sup>* 胁迫<sup>[82,83]</sup>,如 *SmWRKY1*<sup>[84]</sup>、*SmWRKY2*<sup>[85]</sup>、*SmWRKY54*<sup>[86]</sup>、*SmWRKY3* 和 *SmWRKY70*<sup>[87]</sup> 等能正调控丹参酮的合成,其中, *SmWRKY1* 能使丹参酮产量增加5倍, *SmWRKY9* 正调控 *SmRAS1* 和 *SmCYP98A14* 的转录,促进迷迭香酸的合成<sup>[84,88]</sup>。在34个 *SmGRAS* 转录因子基因中有4个属于 *SmDELLA* 亚家族,其编码蛋白

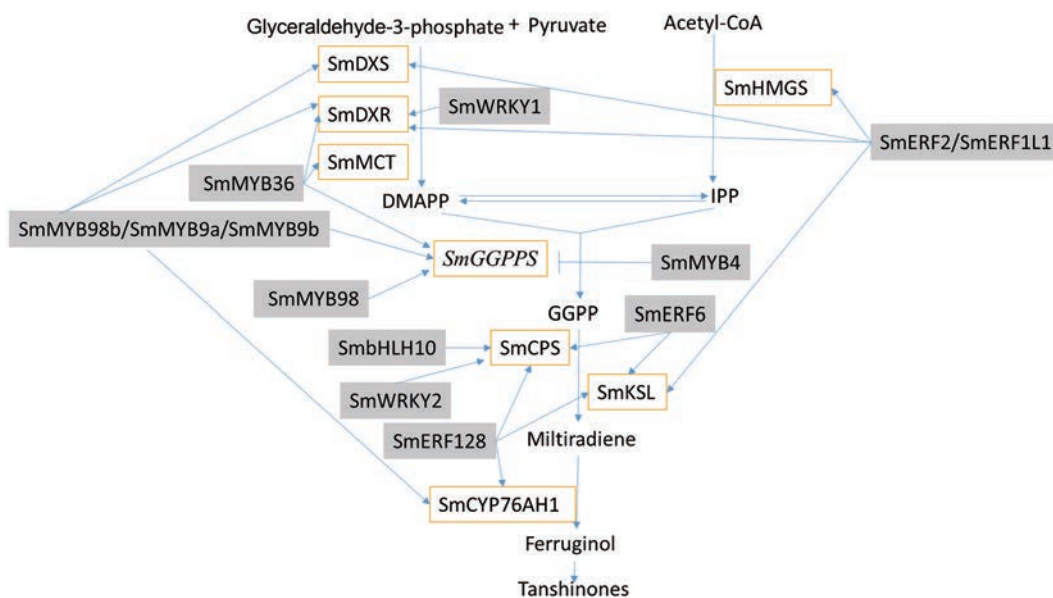


Figure 3 Major transcriptional regulation of tanshinone biosynthesis pathway in *Salvia miltiorrhiza*

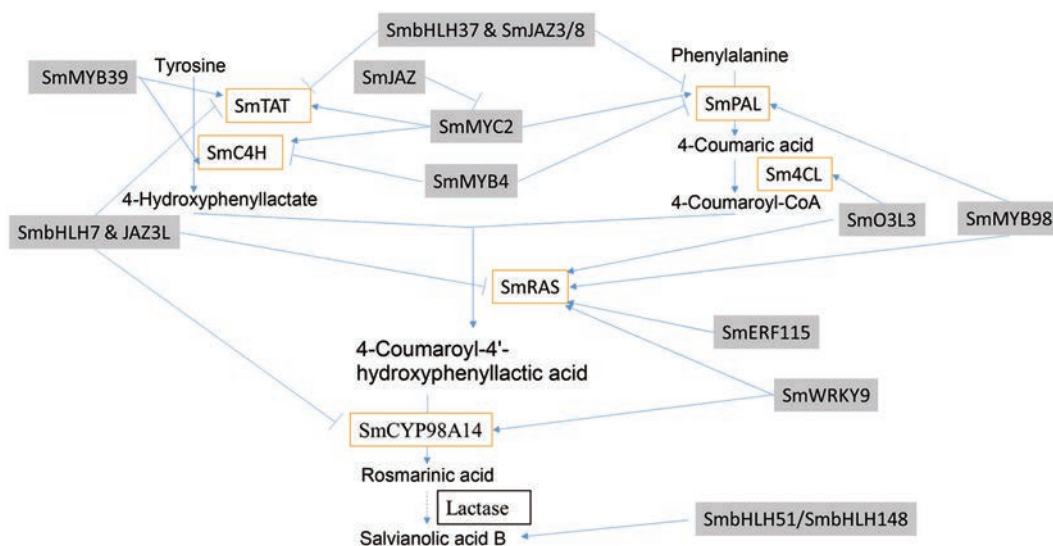


Figure 4 Major transcriptional regulation of phenolic acid biosynthesis pathway in *Salvia miltiorrhiza*

能与 SmJAZ1、SmJAZ3、SmMYB36、SmMYC2 等转录因子互作, 产生调控作用<sup>[89]</sup>。170 个 ERF 转录因子中, SmERF2 和 SmERF1L1 可激活 *SmDXR*、*SmDXS2*、*SmHMGS* 和 *SmKSL* 转录<sup>[90,91]</sup>, SmERF6 可识别 *SmCPS1* 和 *SmKSL1* 启动子区的乙烯反应元件 GCC-box<sup>[92]</sup>, SmERF128 可激活 *SmCPS1*、*SmKSL1* 和 *SmCYP76AH1* 等丹参酮类合成相关基因表达<sup>[93]</sup>。而 SmERF115 能直接结合 *SmRAS1* 启动子激活表达<sup>[94]</sup>, SmO3L3 可激活 *Sm4CL1*、*SmRAS* 等丹酚酸类合成相关基因的表达<sup>[90]</sup>。在 51 个丹参 *SmLBD* 中, *SmLBD9/13/21/50* 等基因的编码蛋白与丹酚酸化合物的合成关系密切, *SmLBD44* 的编码蛋白与丹参酮的合成调控相关<sup>[95]</sup>。

可见, 丹参中转录因子众多, 每类转录因子的家族成员数量庞大, 功能相似或相左, 以及家族成员之间、不同家族的转录因子之间往往相互作用 (如 SmTTG1-SmMYB111-SmbHLH51 转录复合体对丹酚酸的正向合成调控), 共同响应多种信号途径、调控多个合成途径, 厘清各转录因子的调控机制, 特别是筛选与丹参活性成分生物合成与积累相关的转录因子并进行功能机制研究应作为今后转录因子调控研究的重点。

**3.2.2 非编码 RNA 对活性成分合成的调控研究** 在丹参基因组中分离到 452 个 miRNAs, 其中仅在根、茎、叶、花中表达的 miRNAs 分别为 62、95、19、7 个, 尤其是 *miR156* 和 *miR167* 在花和叶中高度表达, *miR164* 和 *miR166* 在 4 种组织中表达丰度均很高, 且花中表达更为丰富。通过降解组分析鉴定了 25 个 miRNAs 的 69 个靶点, 其中 *miR5072* 通过酰基转移酶基因靶点调控丹参酮合成<sup>[96]</sup>。*miR156/157* 通过 *SmSPL* (SQUAMOSA promoter binding protein-like) 靶点正调控丹酚酸合成, *miR172* 则起负调控作用<sup>[97]</sup>。*miR160* 和 *miR167* 分别负调控生长素响应因子 *SmARF1/12/13/14/15/16* 和 *SmARF8/10/19/24/25*<sup>[98]</sup>。同时, 选择性剪接可能对丹参酮生物的合成调控更为广泛, 如 *SmKSL1*、MEP 途径的 *SmHDR3* 和 MVA 途径的 *SmAACT3*、*SmHMGR*、*SmMK* 和 *SmPMK* 都有选择性剪接现象, 特别是 *SmKSL1*、*SmHDR3* 和 *SmPMK* 有多个剪接异构体 (FPKM>10), 且只有其中一种可能编码催化活性酶<sup>[22]</sup>。*SmKFB* (Kelch repeat F-box) 1/2/5 可能参与丹酚酸合成酶的翻译后修饰<sup>[99]</sup>。有 1 904 个 lincRNAs (mRNA-like ncRNAs) 在酵母和 Ag<sup>+</sup> 处理后丹参转录组中差异表达, 参与胁迫反应和活性物质的调节<sup>[100]</sup>, 而这些小 RNA 的合成受相关 AGOs (Argonaute) 和 RDRs (RNA-dependent RNA polymerases) 等基因的调控<sup>[101,102]</sup>。

丹参活性成分生物合成过程中特异表达的 miRNAs、选择性剪接研究表明, 转录后调控对活性成分生物合

成影响较大, 继续深入开展 miRNAs 功能、选择性剪接机制研究以及利用 RNAi 干扰等技术全面揭示丹参活性成分合成的转录后调控机制, 有利于促进丹参活性成分的进一步积累, 而一些新型非编码 RNAs 的发现和功能解析, 将会丰富对丹参活性成分调控机制的认识。

### 3.3 活性成分合成的调控网络研究

丹参次生代谢除丹参酮、丹酚酸类化合物外, 还有木质素、赤霉素、黄酮类等多种化合物, 这些产物与丹参酮、丹酚酸化合物的合成共用部分途径 (图 2、3), 其基因表达情况也将影响丹参酮、丹酚酸化合物的合成。如上游苯丙烷途径的相关基因表达对下游次级代谢的合成起调控作用, 其表达下调将激发丹酚酸合成的竞争途径--木质素的合成加速<sup>[103]</sup>。在赤霉素代谢中, 其上游合成也通过 MVA 和 MEP 途径完成, 其下游途径的 *SmKOV1*、*SmGA2ox3v* 和 *SmGA2ox11v1* 和丹参酮合成相关基因 *SmCPS1* 和 *SmKSL1* 均受 GA3 的诱导表达<sup>[104]</sup>。过表达 *SmGASA4* (gibberellic acid-stimulated Arabidopsis), 能有效提高丹酚酸合成酶基因的上调表达, 但对丹参酮合成酶基因的表达则起抑制作用<sup>[105]</sup>。黄酮类化合物和酚酸类化合物共享苯丙烷代谢上游途径, 从丹参基因组中注释到的 26 个黄酮生物合成相关的酶基因中可能有 14 个有编码功能, 在 MeJA 诱导下, 不同的 *SmCHS*、*SmCHI*、*SmF3H*、*SmF30H* 和 *SmFLS* 成员时空表达有所差异<sup>[106]</sup>。过表达 *SmF3'H* 或沉默 *SmF3'H* 将降低或提高总酚酸的含量, 却能提高某些株系的 RA 和丹酚酸 B 含量, 表明对类黄酮下游合成基因对丹酚酸途径具有调控效应<sup>[107]</sup>。

丹参次生代谢是一个复杂的过程, 不同类型的次生代谢产物既有各自相对独立的合成与降解途径, 又存在相互交叉、互相影响, 是一个非常复杂的代谢和调控网络。丹参体内异戊二烯类化合物种类繁多, 在初生代谢和次生代谢中均有存在, 研究其合成、调控机制不仅有其自身的重要科研意义, 而且还有极大的应用价值, 一直是该领域植物学研究的热点。

## 4 总结与展望

丹参作为传统中药材已有相当长的历史, 其产品已远销日本、美国、欧洲等地作为临床使用, 但受限于其活性成分含量低、生长周期长等因素, 丹参产品已不能满足日益增长的市场需求。而丹参多组学研究的快速推进及萜类和酚酸生物合成基因、参与 RNA 沉默基因、转录因子基因及 microRNAs 和长非编码 RNAs 等研究, 为丹参活性成分的合成与调控机制研究和模式作用发挥奠定了坚实的基础。但是仍存在不足, 一是尽管丹参活性成分生物合成及调控机制研究取得了很大进展, 但仍有许多相关功能未得到鉴定, 调控机制未完

全解晰, 需要进一步深入研究。二是关于 microRNAs 和长非编码 RNAs 的研究还处于起步阶段, 研究结论还有待进一步验证。如叶绿体 asRNA 和 DNA 修饰对基因表达的调控相当复杂, 然而要验证由 SMRT、RNA-Seq 技术获得的检测结论仍存在技术上的困难, 主要是 asRNA 表达水平偏低, 很难用 northern 杂交、原位杂交等经典技术进行验证; 正义链和反义链之间关系复杂, 转录本的相互干扰, 将影响采用基因敲除/敲入等方法对其生物学功能的验证; 另外, 叶绿体作为细胞器有其特殊性, 且与核基因间存在互作关系, 也给叶绿体中 asRNA 和 DNA 修饰的功能验证带来困难。三是关于丹参活性成分功能基因网络的研究还有待进一步深化。目前仅对木质素、黄酮类和赤霉素途径进行了初步研究, 还比较粗浅, 而且其他初级代谢和次级代谢的研究也很少涉及。但植物的代谢是一个系统工程, 对其他代谢途径的研究及其与丹参活性成分合成之间的协同或互斥关系研究, 有利于加快全面揭示丹参活性成分合成与调控机制的步伐。

**作者贡献:** 詹忠根调研文献, 总结, 撰写文稿并校对。

**利益冲突:** 本文作者声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Wang QW, Dai XX, Xiang X, et al. Advances in the molecular mechanism of salvianolic acid and tanshinone for intervention of diabetic kidney disease [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1356-1363.
- [2] Song JY, Luo HM, Li CF, et al. *Salvia miltiorrhiza* as medicinal model plant [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 1099-1106.
- [3] Wang QR, Li XY, Sun Y, et al. Research on distribution of tanshinones in different parts of danshen's root by raman spectroscopy [J]. J Light Scattering (光散射学报), 2018, 30: 351-356.
- [4] Duan ZQ, Liu YY, Zheng XJ, et al. A study on distribution characteristics of tanshinone IIA and salvianolic acid B in root tissues of *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Henan Agric Univ (河南农业大学学报), 2007, 41: 178-182.
- [5] Sha XX, Su SL, Shen F, et al. Distribution of salvianolic acids in aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* during different growing periods and accumulation dynamic analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 3414-3419.
- [6] Zhang GH, Tian Y, Zhang J, et al. Hybrid *de novo* genome assembly of the Chinese herbal plant danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) [J]. Giga Sci, 2015, 4: 62-65.
- [7] Xu HB, Song JY, Luo HM, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. Mol Plant, 2016, 9: 949-952.
- [8] Qian J, Song JY, Gao HH, et al. The complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. PLoS One, 2013, 8: e57607.
- [9] Chen HM, Zhang JH, Yuan G, et al. Complex interplay among DNA modification, noncoding RNA expression and protein-coding RNA expression in *Salvia miltiorrhiza* chloroplast genome [J]. PLoS One, 2014, 9: e99314.
- [10] Wu B, Chen HM, Shao JJ, et al. Identification of symmetrical RNA editing events in the mitochondria of *Salvia miltiorrhiza* by strand-specific RNA sequencing [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42250-42260.
- [11] Qian J. Study on Chloroplast and Mitochondrial Genomes of *Salvia miltiorrhiza* (丹参的叶绿体和线粒体基因组研究) [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 2014.
- [12] Cui GH, Huang LQ, Tang XJ, et al. Functional genomics studies of *Salvia miltiorrhiza* I. establish cDNA microarray of *S. miltiorrhiza* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1137-1141.
- [13] Shao YX, Wei JB, Wu FL, et al. DsTRD: Danshen transcriptional resource database [J]. PLoS One, 2016, 11: e0149747.
- [14] Zhou W, Huang Q, Wu X, et al. Comprehensive transcriptome profiling of *Salvia miltiorrhiza* for discovery of genes associated with the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids [J]. Sci Rep, 2017, 7: 10554-10565.
- [15] Li HQ, Li CL, Deng YX, et al. The pentatricopeptide repeat gene family in *Salvia miltiorrhiza*: genome-wide characterization and expression analysis [J]. Molecules, 2018, 23: 1364-1375.
- [16] Wang XY. The Analysis of Expression and Biosynthesis Gene Cloning of Active Components from Hairy Root of *Salvia miltiorrhiza* (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]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2007.
- [17] Luo HM, Zhu YJ, Song JY, et al. Transcriptional data mining of *Salvia miltiorrhiza* in response to methyl jasmonate to examine the mechanism of bioactive compound biosynthesis and regulation [J]. Physiol Plant, 2014, 152: 241-255.
- [18] Yan Y, Wang Z, Tian W, et al. Generation and analysis of expressed sequence tags from the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. Sci China Life Sci, 2010, 53: 273-285.
- [19] Li Y, Sun C, Luo HM, et al. Transcriptome characterization for *Salvia miltiorrhiza* using 454 GSFLX [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 524-529.
- [20] Hua WP, Zhang Y, Song J, et al. *De novo* transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients [J]. Genomics, 2011, 98: 272-279.
- [21] Yang L, Ding GH, Lin HY, et al. Transcriptome analysis of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* and identification of genes related to tanshinone biosynthesis [J]. PLoS One, 2013, 8: e80464.
- [22] Xu ZC, Peters RJ, Weirather J, et al. Full-length transcriptome

- sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone biosynthesis [J]. *Plant J*, 2015, 82: 951-961.
- [23] Xu ZC, Luo HM, Ji AJ, et al. Global identification of the full-length transcripts and alternative splicing related to phenolic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 100-109.
- [24] Wang YJ, Shen Y, Shen Z, et al. Comparative proteomic analysis of the response to silver ions and yeast extract in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 107: 364-373.
- [25] Contreras A, Leroy B, Mariage PA, et al. Proteomic analysis reveals novel insights into tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 5768-5780.
- [26] Wang RH, Lu CY, Shu ZM, et al. iTRAQ-based proteomic analysis reveals several key metabolic pathways associated with male sterility in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *RSC Adv*, 2020, 10: 16959-16970.
- [27] Jiang MM, Wang CH, Zhang Y, et al. Sparse partial-least-squares discriminant analysis for different geographical origins of *Salvia miltiorrhiza* by <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics [J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25: 50-58.
- [28] Zhao Q, Song ZQ, Fang XS, et al. Effect of genotype and environment on *Salvia miltiorrhiza* roots using LC/MS-based metabolomics [J]. *Molecules*, 2016, 21: 414-430.
- [29] Gao W, Sun H X, Xiao H, et al. Combining metabolomics and transcriptomics to characterize tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 73-86.
- [30] Jiang Y, Wang L, Lu SR, et al. Transcriptome sequencing of *Salvia miltiorrhiza* after infection by its endophytic fungi and identification of genes related to tanshinone biosynthesis [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57: 1-11.
- [31] Zhan ZL, Fang WT, Ma XH, et al. Metabolome and transcriptome analyses reveal quality change in the orange-rooted *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) from cultivated field [J]. *Chin Med*, 2019, 14: 42-51.
- [32] Liu BX, Jin MX, Zhang M, et al. The application of combined <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics and transcriptomics techniques to explore phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 172: 126-138.
- [33] Ge Q, Zhang Y, Hua WP, et al. Combination of transcriptomic and metabolomic analyses reveals a JAZ repressor in the jasmonate signaling pathway of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14048-14061.
- [34] Wu SJ, Shi M, Wu JY. 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: 89-95.
- [35] Liao P, Zhou W, Zhang L, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a new gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31: 565-572.
- [36] Wang X, Cui G, Huang L, et al. A full length cDNA of 4-(cytidine 5'-2 diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase cloning and analysis of introduced gene expression in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 43, 1251-1257.
- [37] Kai GY, Liao P, Zhang T, et al. Characterization, expression profiling, and functional identification of a gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2010, 15: 236-245.
- [38] Cui G, Huang L, Tang X, et al. Candidate genes involved in tanshinone biosynthesis in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* revealed by cDNA microarray [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 2471-2478.
- [39] Dai ZB, Cui GH, Zhou SF, et al. Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 148-157.
- [40] Ma YM, Yuan LC, Wu B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 2809-2823.
- [41] Shi M, Luo XQ, Ju GH, et al. Enhanced diterpene tanshinone accumulation and bioactivity of transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by pathway engineering [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 2523-2530.
- [42] Gao W, Hillwig ML, Huang L, et al. A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights [J]. *Org Lett*, 2009, 11: 5170-5173.
- [43] Cui G, Duan L, Jin B, et al. Functional divergence of diterpene syntheses in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1607-1618.
- [44] Cheng Q, Su P, Hu Y, et al. RNA interference-mediated repression of SmCPS expression in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* causes a decrease of tanshinones and sheds light on the functional role of SmCPS [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 363-369.
- [45] Bai ZQ, Liu JL, Zhang CL, et al. Coding single nucleotide polymorphisms and SmCPS1 and SmKSL1 subcellular localization are associated with tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* Bunge roots [J]. *Acta Physiol Plant*, 2018, 40: 6-16.
- [46] Guo J, Zhou YJ, Hillwig L, et al. *CYP76AH1* catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 12108-12113.
- [47] Guo J, Ma XH, Cai Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones [J]. *New Phytologist*, 2016, 210: 525-534.
- [48] Chen H, Wu B, Nelson DR, et al. Computational identification and systematic classification of novel cytochrome 450 genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e115149.
- [49] Xu Z, Song J. The 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily participates in tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza*

- [J]. J Exp Bot, 2017, 68: 2299-2308.
- [50] Mizutani M, Sato F. Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism [J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 507: 194-203.
- [51] Chang YJ, Wang MZ, Li J, et al. Transcriptomic analysis reveals potential genes involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Sci Rep, 2019, 9: 14929.
- [52] Renault H, Bassard JE, Hamberger B, et al. Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges [J]. Curr Opin Plant Biol, 2014, 19: 27-34.
- [53] Bak S, Beisson F, Bishop G, et al. Cytochromes P450//in Arabidopsis Book [M]. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2011, 9: e0144.
- [54] Petersen M, Häusler E, Karwatzki B, et al. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth [J]. Planta, 1993, 189: 10-14.
- [55] Di P. Exploring the Biosynthetic Pathway of Phenolic Acids and Functional Study of the Involved Genes in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (丹参酚酸类成分生源途径的探索及相关基因的克隆与功能研究) [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2012.
- [56] Di P, Zhang L, Chen JF, et al. C<sup>13</sup> tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. ACS Chem Biol, 2013, 8: 1537-1548.
- [57] Song J, Wang Z. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza* [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36: 939-952.
- [58] Song J, Wang ZZ. RNAi-mediated suppression of the phenylalanine ammonia-lyase gene in *Salvia miltiorrhiza* causes abnormal phenotypes and a reduction in rosmarinic acid biosynthesis [J]. J Plant Res, 2011, 124: 183-192.
- [59] 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 Plant Physiol, 2008, 55: 390-399.
- [60] Zhao SJ, Hu ZB, Liu D, et al. Two divergent members of 4-coumarate: coenzyme A ligase from *Salvia miltiorrhiza* Bunge: cDNA cloning and functional study [J]. J Integr Plant Biol, 2006, 48: 1355-1364.
- [61] Huang BB, Yi B, Duan YB, 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: 601-612.
- [62] Xiao Y, Zhang L, Gao SH, et al. The *C4H*, *TAT*, *HPPR* and *HPPD* genes prompted engineering of rosmarinic acid biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. PLoS One, 2011, 6: e29713.
- [63] Xiao Y, Di P, Chen JF, et al. Characterization and expression profiling of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene (SmHPPD) from *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36: 2019-2029.
- [64] Wang B, Sun W, Li QS, et al. Genome-wide identification of phenolic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Planta, 2014, 241: 711-725.
- [65] Song J, Ji YY, Xu K, et al. An integrated analysis of the rosmarinic acid-biosynthetic genes to uncover the regulation of rosmarinic acid pathway in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Physiol Plant, 2012, 34: 1501-1511.
- [66] Li Q, Feng JX, Chen L, et al. Genome-wide identification and characterization of *Salvia miltiorrhiza* laccases reveal potential targets for salvianolic acid B biosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 435-449.
- [67] Xiao Y, Gao SH, Di P, et al. Lithospermic acid B is more responsive to silver ions (Ag<sup>+</sup>) than rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. Biosci Rep, 2010, 30: 33-40.
- [68] Xing BC, Yang DF, Guo WL, et al. Ag<sup>+</sup> as a more effective elicitor for production of tanshinones than phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Molecules, 2015, 20: 309-324.
- [69] Guo YX, Zhang DJ, Wang H, et al. Hydrolytic kinetics of lithospermic acid B extracted from roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43: 435-439.
- [70] Zhang SC, Yan Y, Wang BQ, et al. Selective responses of enzymes in the two parallel pathways of rosmarinic acid biosynthetic pathway to elicitors in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. J Biosci Bioeng, 2014, 117: 645-651.
- [71] Jiang BH, Li DF, Deng YP, et al. Salvianolic acid A, a novel matrix metalloproteinase-9 inhibitor, prevents cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. PLoS One, 2013, 8: e59621.
- [72] Cao J, Wei YJ, Qi LW, et al. Determination of fifteen bioactive components in Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22: 164-172.
- [73] Pei TL, Ma PD, Ding K, et al. *SmJAZ8* acts as a core repressor regulating JA-induced biosynthesis of salvianolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. J Exp Bot, 2018, 69: 1663-1678.
- [74] Zhang X, Luo HM, Xu ZC, et al. Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11244.
- [75] Yang N, Zhou WP, Su J, et al. Overexpression of *SmMYC2* increases the production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1804-1815.
- [76] Xing BC, Yang DF, Yu HZ, et al. Overexpression of *SmbHLH10* enhances tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Sci, 2018, 276: 229-238.
- [77] Cao WZ. The Functional Study of *SmbHLH 7* Transcription Factor in *Salvia miltiorrhiza* (丹参 *SmbHLH7* 转录因子的克隆与功能初探) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2018.
- [78] Zhu XY. Study on the Regulation of *SmMYB4* on the Synthesis of Secondary Metabolites in *Salvia miltiorrhiza* (*SmMYB4* 对丹参次生代谢产物合成的调节作用研究) [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2016.

- [79] Liu L, Yang DF, Xing BC, et al. SmMYB98b positive regulation to tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* Bunge hairy roots [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2020, 140: 459-467.
- [80] Zhang J, Zhou L, Zheng X, et al. Overexpression of SmMYB9b enhances tanshinone concentration in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Cell Rep, 2017, 36: 1297-1309.
- [81] Hao XL, Pu ZQ, Cao G, et al. Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by SmMYB98 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. J Adv Res, 2020, 23: 1-12.
- [82] Li CL, Li DQ, Shao FJ, et al. Molecular cloning and expression analysis of WRKY transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 200-220.
- [83] Yu HZ, Guo WL, Yang DF, et al. Transcriptional profiles of SmWRKY family genes and their putative roles in the biosynthesis of tanshinone and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 1593-1609.
- [84] Cao WZ, Wang Y, Shi M, et al. Transcription factor SmWRKY1 positively promote the biosynthesis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 554-563.
- [85] Deng CP, Hao XL, Shi M, et al. Tanshinone production could be increased by the expression of SmWRKY2 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Sci, 2019, 284: 1-8.
- [86] Li LL. Preliminary Study on the Function of SmWRKY54 Transcription Factor in *Salvia miltiorrhiza* (丹参 SmWRKY54 转录因子功能初步研究) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016.
- [87] Hao XR. The Function Study of SmWRKY3 and SmWRKY70 Transcription Factors in *Salvia miltiorrhiza* (丹参 SmWRKY3 和 SmWRKY70 转录因子功能研究) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2014.
- [88] Zhang XC. The Functional Study of SmWRKY9 Transcription Factor in *Salvia miltiorrhiza* (丹参 SmWRKY9 转录因子功能研究) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2019.
- [89] Wang LR. Identification of GRAS Transcription Factor Family and Study on the Function of DELLA Subfamily Gene in *Salvia miltiorrhiza* (丹参 GRAS 转录因子家族鉴定及 DELLA 亚家族基因功能研究) [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2018.
- [90] Huang Q. Isolation and Functional Analysis of Two ERF Transcription Factors in *Salvia miltiorrhiza* (丹参两个 ERF 类转录因子的克隆与功能分析) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2015.
- [91] Huang Q, Sun MH, Yuan TP, et al. The AP2/ERF transcription factor SmERF1L1 regulates the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Food Chem, 2019, 274: 368-375.
- [92] Bai ZQ, Li WR, Jia YY, et al. The ethylene response factor SmERF6 co-regulates the transcription of SmCPS1 and SmKSL1 and is involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Planta, 2018, 248: 243-255.
- [93] Zhang Y, Ji AJ, Xu ZC, et al. The AP2/ERF transcription factor SmERF128 positively regulates diterpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Plant Mol Biol, 2019, 100: 83-93.
- [94] Sun M, Shi M, Wang Y, et al. The biosynthesis of phenolic acids is positively regulated by the JA-responsive transcription factor ERF115 in *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Exp Bot, 2019, 70: 243-254.
- [95] Lu XY, Liang XY, Li X, et al. Genome-wide characterisation and expression profiling of the LBD family in *Salvia miltiorrhiza* reveals the function of LBD50 in jasmonate signaling and phenolic biosynthesis [J]. Ind Crops Prod, 2020, 144: 112006-112019.
- [96] Xu XB, Jiang QH, Ma XY, et al. Deep sequencing identifies tissue-specific microRNAs and their target genes involving in the biosynthesis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. PLoS One, 2014, 9: e111679.
- [97] Zhang LS, Wu B, Zhao DG, et al. Genome-wide analysis and molecular dissection of the SPL gene family in *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Integr Plant Biol, 2014, 56: 38-50.
- [98] Xu ZH, Ji AJ, Song JY, et al. Genome-wide analysis of auxin response factor gene family members in medicinal model plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. Biol Open, 2016, 5: 848-857.
- [99] Yu HZ, Jiang MD, Xing BC, et al. Systematic analysis of Kelch Repeat F-box (KFB) protein gene family and identification of phenolic acid regulation members in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Genes, 2020, 11: 557-572.
- [100] Li DQ, Shao FJ, Lu SF, et al. Identification and characterization of mRNA-like noncoding RNAs in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Planta, 2015, 241: 1131-1143.
- [101] Shao FJ, Lu SF. Genome-wide identification, molecular cloning, expression profiling and posttranscriptional regulation analysis of the Argonaute gene family in *Salvia miltiorrhiza*, an emerging model medicinal plant [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 512.
- [102] Shao FJ, Lu SF, Zhang BH. Identification, molecular cloning and expression analysis of five RNA-dependent RNA polymerase genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. PLoS One, 2014, 9: e95117.
- [103] Song ZQ, Guo LL, Liu T, et al. Comparative RNA-sequence transcriptome analysis of phenolic acid metabolism in *Salvia miltiorrhiza*, a traditional Chinese medicine model plant [J]. Int J Genomics, 2017, 2017: 9364594.
- [104] Du Q, Li CL, Li DQ, et al. Genome-wide analysis, molecular cloning and expression profiling reveal tissuespecifically expressed, feedback-regulated, stress-responsive and alternatively spliced novel genes involved in gibberellin metabolism in *Salvia miltiorrhiza* [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1087-1108.
- [105] Wang HB, Wei T, Wang X, et al. Transcriptome analyses from mutant *Salvia miltiorrhiza* reveals important roles for SmGASA4 during plant development [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 2088-2108.
- [106] Deng YX, Li CL, Li HQ, et al. Identification and characterization of flavonoid biosynthetic enzyme genes in *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae) [J]. Molecules, 2018, 23: 1467-1485.
- [107] Li YH. Cloning and Functional Analysis of the Key Enzyme Genes Involved in the Flavonoids Biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (丹参类黄酮合成途径关键酶基因的克隆与功能分析) [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019.