

## 丹参细胞色素 P450 *SmCYP72A395* 基因克隆及功能研究

孙琳可<sup>1,2,3</sup>, 张建红<sup>4</sup>, 王喆<sup>5</sup>, 陈泓宇<sup>2</sup>, 张文颖<sup>2</sup>, 郑文芳<sup>2</sup>, 马艺沔<sup>2</sup>, 何柳<sup>2</sup>,  
孙稚颖<sup>1\*</sup>, 罗红梅<sup>2,3\*</sup>

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193; 3. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100193; 4. 河北省沧州市中心医院药学部, 河北 沧州 061001; 5. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 基于丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 基因组与转录组数据, 克隆获得在丹参根周皮中高丰度表达的细胞色素 P450 基因, 命名为 *SmCYP72A395*。采用多种在线分析工具对其编码蛋白质的理化性质、亚细胞定位、蛋白质二级结构及保守结构域进行预测分析, 发现 *SmCYP72A395* 基因编码区全长为 1 578 bp, 编码 525 个氨基酸残基, 蛋白质分子量为 59.9 kDa, 理论等电点为 8.68, 具有一个跨膜结构域。利用实时荧光定量 PCR 技术检测发现 *SmCYP72A395* 在丹参花、叶和根的周皮部位表达量较高。为进一步研究该基因的生物学功能, 分别构建了 *SmCYP72A395* 过表达 (*SmCYP72A395*-OE) 和 RNA 干扰 (*SmCYP72A395*-RNAi) 转基因毛状根材料, 并利用 UPLC 方法检测阳性株系中丹参酮类化合物的含量。与对照株系 (转化空载体的毛状根株系) 相比, 发现 *SmCYP72A395*-OE 株系中, 二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 及丹参酮 IIA 的含量均显著低于对照株系; 而在 *SmCYP72A395*-RNAi 株系中, 二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 的含量显著高于对照株系。以上结果表明 *SmCYP72A395* 在丹参酮类化合物的合成积累过程起负调控作用。本研究结果为进一步阐明丹参酮类化合物生物合成及调控途径奠定基础。

**关键词:** 丹参; 细胞色素 P450 酶; *SmCYP72A395*; 丹参酮类化合物; 生物合成调控

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)04-1166-09

## Isolation and functional analysis of *SmCYP72A395* in *Salvia miltiorrhiza*

SUN Lin-ke<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Jian-hong<sup>4</sup>, WANG Zhe<sup>5</sup>, CHEN Hong-yu<sup>2</sup>, ZHANG Wen-ying<sup>2</sup>,  
ZHENG Wen-fang<sup>2</sup>, MA Yi-mian<sup>2</sup>, HE Liu<sup>2</sup>, SUN Zhi-ying<sup>1\*</sup>, LUO Hong-mei<sup>2,3\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 3. State Key Laboratory for Quality Assurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 4. Department of Pharmacy, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, China; 5. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Based on the genome and transcriptome data of *Salvia miltiorrhiza*, a cytochrome P450 gene annotated as *SmCYP72A395*, which was highly expressed in the periderm of *S. miltiorrhiza* root was cloned. The total length of the cDNA sequence of *SmCYP72A395* was 1 578 base pairs, encoding 525 amino acids. The predicted

收稿日期: 2024-11-22; 修回日期: 2025-02-09.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-071); 国家自然科学基金 (31570302).

\*通讯作者 E-mail: hmluo@implad.ac.cn; szyww@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1160

molecular weight of the protein was 59.9 kDa. The physicochemical properties, subcellular localization, protein structure, and conserved domains were predicted by online bioinformatic tools. The theoretical isoelectric point of *SmCYP72A395* was 8.68, with a transmembrane domain in the protein. This gene was highly expressed in the flower, leaf, and root periderm tissues of *S. miltiorrhiza*. To further identify the biological function of *SmCYP72A395*, the transgenic hairy roots with *SmCYP72A395* overexpressed (*SmCYP72A395*-OE) and RNA interference (*SmCYP72A395*-RNAi) were constructed, and the content of tanshinone compounds was detected by UPLC between these transgenic lines and control line (harboring the vector plasmid in the transgenic line). Compared with the control line of transgenic hairy roots, the content of dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone IIA in the *SmCYP72A395*-OE lines was significantly less than those in the control line. On the contrary, the content of dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, and tanshinone I was higher in the *SmCYP72A395*-RNAi lines than those in the control line. These results demonstrated that *SmCYP72A395* played a negative role in the regulation of tanshinone accumulation in *S. miltiorrhiza*. This study lays the foundation for further elucidating the biosynthesis and regulatory pathways of tanshinone compounds in *S. miltiorrhiza*.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza*; cytochrome P450; *SmCYP72A395*; tanshinone; biosynthetic regulation

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 为多年生草本植物, 属唇形科鼠尾草属药用植物。以根及根茎入药, 中药名丹参, 又名“赤参”, 外表皮色越红, 其质越佳。该药入心经及肝经, 具有活血散瘀、调经止痛、清心除烦等功效, 常被用于治疗淤血阻滞之月经不调、心烦失眠等临床病症<sup>[1,2]</sup>。有研究发现, 丹参富含丹参酮类化合物等脂溶性活性成分<sup>[3]</sup>, 如二氢丹参酮 I (dihydrotanshinone I)、隐丹参酮 (cryptotanshinone)、丹参酮 I (tanshinone I) 及丹参酮 IIA (tanshinone IIA) 等, 且该类成分在丹参根及根茎组织中显著富集<sup>[4]</sup>。现代药理学研究表明, 丹参具有抗菌消炎<sup>[5,6]</sup>、抗肿瘤<sup>[7,8]</sup>、抗氧化<sup>[9]</sup>等药理活性。此外, 丹参在治疗心血管疾病方面也具有显著疗效<sup>[10,11]</sup>。

丹参酮类化合物的基本碳骨架化合物为次丹参酮二烯。次丹参酮二烯由前体物质牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphat, GGPP) 在柯巴基焦磷酸合酶 (copalyl diphosphate synthase, CPS) 和类贝壳杉烯合酶 (kaunene synthase, KSL) 的催化下合成。随后, 次丹参酮二烯在细胞色素 P450 单加氧酶 (CYP450) 等修饰酶的作用下, 进一步转化为多种类型的丹参酮类化合物<sup>[12-16]</sup>。

CYP450 是植物基因组中一类超基因家族<sup>[17]</sup>, 其独特的半胱氨酸-亚铁血红素结构赋予其多样性的催化功能<sup>[18]</sup>, 在萜类、脂类、黄酮类以及生物碱等多种化合物的生物合成途径中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。迄今为止, 已从丹参中鉴定出 116 条 CYP450 基因<sup>[20]</sup>, 其中 *SmCYP76AH1*、*SmCYP76AH3*、*SmCYP76AK1*、*SmCYP71D373* 及 *SmCYP71D375* 等基因被证实直接参与丹参酮类化合物的生物合成过程<sup>[20-23]</sup>。例如, *SmCYP76AH1* 与丹参酮生物合成关键酶基因 *SmCPS1*

和 *SmKSL1* 共表达, 且发现 *SmCYP76AH1* 催化次丹参酮二烯的 C-12 位羟基化, 生成铁锈醇; *SmCYP71D373* 和 *SmCYP71D375* 参与催化生成隐丹参酮和 15,16-二氢丹参酮 I<sup>[23]</sup>。

尽管 CYP450 在丹参酮生物合成途径中发挥重要作用, 但目前丹参酮生物合成途径中仍有多个可能由 CYP450 催化的步骤尚未解析。Xu 等<sup>[24]</sup>前期研究发现, *SmCYP72A395* 与已知参与丹参酮生物合成的 *SmCPS1* 等基因具有共表达趋势。依据已发表的丹参基因组和转录组数据<sup>[25,26]</sup>, 本研究克隆得到 *SmCYP72A395* 基因。为进一步探究 *SmCYP72A395* 的表达特性和生物学功能, 对其进行生物信息学分析、研究其在不同组织中的表达模式, 并构建表达载体转化丹参获得转基因毛状根阳性株系。通过检测 *SmCYP72A395*-OE 和 *SmCYP72A395*-RNAi 株系中的丹参酮类化合物含量差异, 明确其功能, 为研究 *SmCYP72A395* 在丹参酮合成调控中的作用提供科学依据。

## 材料与amp;方法

**植物材料** 丹参取自中国医学科学院药用植物研究所的试验田, 对丹参的根、茎、叶、花及根的周皮、韧皮部和木质部等组织分别取样。使用无菌水彻底清洗干净后用滤纸轻轻吸干样品表面水分, 立即置于液氮中速冻, 而后储存于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

**实验试剂** 实验过程中所用试剂见表 1。

**RNA 提取和 cDNA 合成** 总 RNA 的提取步骤主要参考 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 测定 RNA 浓度与完整性, 而后参考 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行反转录

**Table 1** Reagents used in this study

Reagent	Manufactory
RNAprep PurePlant Plus Kit (Polysaccharides\$Polyphenolics-rich) (DP441); TIANprep Mini Plasmid Kit (DP103); TIANgel Purification Kit (DP219)	Tiagen Biotech (Beijing) Co., Ltd.
PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (6210A); Pyrobest™ DNA Polymerase (R005A); T4 DNA Ligase (2011A)	Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.
pEASY-Blunt Zero Cloning Kit (CB501)	TransGen Biotech (Beijing) Co., Ltd.
Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (11789), Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (11791)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ Competent Cells (ZK206); carbenicillin (CC32111621); spectinomycin (CS322212120); rifampicin (SL342130200); kanamycin monosulfate (CK312234200)	Beijing Zoman Biotechnology Co., Ltd. Coolaber Science & Technology (Beijing)

合成 cDNA。

**SmCYP72A395 基因的筛选及克隆** 参考 Xu 等<sup>[24]</sup> 前期研究结果, 筛选出和参与丹参酮生物合成的 *SmCPSI* 等基因共表达的 *SmCYP72A395* 基因。依据丹参基因组中的 *SmCYP72A395* 基因全长序列设计特异引物 *SmCYP72A395-F/R* 以扩增获得基因编码区序列 (表 2), 扩增后产物经由琼脂糖凝胶电泳检测, 并利用 DNA 纯化试剂盒回收, 连接至 pEASY-Blunt Zero 载体, 并利用 Sanger 法测序。

**生物信息学分析** 利用 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 在线工具预测蛋白质保守结构域, 通过 ExPASy-protparam<sup>[27]</sup> (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具预测蛋白质的分子量、等电点等理化性质; 借助 ExPASy-protScale (<https://web.expasy.org/Scale/>) 分析蛋白质的亲疏水性; 使用 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 预测蛋白的磷酸化位点。通过 SignalP 5.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 预测信号肽, 跨膜结构域的预测则借助 TMHMM Server 2.0<sup>[28]</sup> (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 完成。亚细胞定位分析使用 Cell-PLoc<sup>[29]</sup> (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 在线平台预测; 此外, 通过 SOPMA<sup>[30]</sup> 在线工具分析蛋白质的脂肪系数及二级结构。利用 AlphaFold3<sup>[31]</sup> (<https://golgi.sandbox.google.com/about>) 预测蛋白三级结构, 并通过 Pymol 软件<sup>[32]</sup> 对蛋白结构进行可视化。

**SmCYP72A395 系统进化分析** 查阅 NCBI 数据库及拟南芥数据库, 并下载拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[33]</sup> 及其他物种中已鉴定的 CYP450 氨基酸序列, 包括人参 (*Panax ginseng*)<sup>[34]</sup>、薄荷 (*Mentha canadensis*)<sup>[35]</sup>、黄花蒿 (*Artemisia annua*)<sup>[20]</sup>、美国紫珠 (*Callicarpa americana*)<sup>[36]</sup>、水稻 (*Oryza sativa*)<sup>[37,38]</sup>、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)<sup>[39]</sup>、喜树 (*Camptotheca acuminata*)<sup>[40,41]</sup>、芝麻 (*Sesamum indicum*)<sup>[18]</sup>、大豆 (*Glycine max*)<sup>[18]</sup>、烟草 (*Nicotiana tabacum*)<sup>[18]</sup>、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)<sup>[42]</sup> 等 25 条序列, 利用 TB-tools 软件<sup>[43]</sup> 构建系统进化树, 并通过 iTOL (<https://itol.embl.de>) 在线网站对进化树进行美化。

**基因过表达和 RNAi 载体的构建** 根据 Gateway 克隆的工作原理, 基于 *SmCYP72A395* 基因序列中一段高度特异性的序列片段设计 RNAi 引物 (395i)。过表达引物 (395OE) 的设计是在基因全长扩增引物基础上, 于引物的 5' 端直接添加 *attB* 序列构成 (表 2)。以重组质粒 pEASY-*SmCYP72A395*-RNAi 或 pEASY-*SmCYP72A395*-OE 为模板, 利用上述 395i 或 395OE 引物进行 PCR 扩增, 将 PCR 回收产物与 pDONR221 入门载体进行 BP 反应, 产物转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 菌落 PCR 验证后将阳性克隆摇菌提取质粒并进行测序鉴定。pDONR221-*SmCYP72A395* 基因片段与 pK7GWIWG2D(II)/pK7WG2D 植物表达载体进行 LR 反应, 产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 菌落 PCR 验证后将阳性克隆摇菌提取质粒并进行测

**Table 2** The primers used in this study

Category	Primer name	Primer sequence (5'-3')
Gene cloning	<i>SmCYP72A395-F</i>	ATGGCGGTGGAATACCAAATT
	<i>SmCYP72A395-R</i>	CTAGAGCTTGTGCAAGGTAAGG
Overexpression	<i>SmCYP72A395-OE-F</i> (395OE-F)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCGGTGGAATACCAAATT
	<i>SmCYP72A395-OE-R</i> (395OE-R)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGAGCTTGTGCAAGGTAAGG
RNAi	<i>SmCYP72A395-RNAi-F</i> (395i-F)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCCATTAGTCTTGACGCTGAT
	<i>SmCYP72A395-RNAi-R</i> (395i-R)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACCTCCTTAAGTACTAGCTCAGG
qRT-PCR	<i>SmCYP72A395-qPCR-F</i>	CCCATTAGTCTTGACGCTGAT
	<i>SmCYP72A395-qPCR-R</i>	TCACCTCCTTAAGTACTAGCTCAGG
Housekeeping gene	<i>SmActin-F</i>	AGGAACCACCGATCCAGACA
	<i>SmActin-R</i>	GGTGCCCTGAGGTCCTGTT

序鉴定。对重组后的载体质粒进行提取, 分别将重组载体质粒和空载体质粒转入发根农杆菌 *ACCC10060* 中, 获得 RNAi 毛状根株系 (395i) 及对照株系 (PKi), 以及过表达毛状根株系 (395OE) 及对照株系 (PKOE)。

**叶盘法转化丹参** 选取生长状态良好的丹参组培苗叶片, 剪成  $1\text{ cm}^2$  叶盘后将其接种于 MS 固体培养基中,  $25\text{ }^\circ\text{C}$  预培养 2 天。将发根农杆菌 *ACCC10060* (含重组载体质粒或空载体质粒) 接种到含  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸壮观霉素 (spectinomycin, Spec) 和  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  利福平 (rifampicin, Rif) 的液体 LB 培养基,  $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养至  $\text{OD}_{600}$  达到  $0.4\sim 0.6$  集菌, 使用 MS 液体培养基重悬菌体, 侵染叶盘后将其置于 MS 固体培养基上,  $25\text{ }^\circ\text{C}$  黑暗条件下共培养 2 天。将共培养的叶盘分别用无菌水和  $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  羧苄青霉素 (carbenicillin, Car) 的无菌水洗净, 置于含  $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Car 和  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸卡那霉素 (kanamycin, Kana) 的 MS 固体培养基上,  $25\text{ }^\circ\text{C}$  黑暗条件下筛选培养<sup>[44]</sup>。筛选获得含荧光标记的阳性株系 395i-3、395i-4、395OE-1、395OE-2、395OE-5, 并将其转接至 6,7-V 液体培养基中继续培养。

***SmCYP72A395* 基因表达分析** 取丹参转基因株系和对照株系, 以及丹参不同组织部位, 提取总 RNA 后反转录为 cDNA。挑选 *SmCYP72A395* 基因特异性片段设计 qRT-PCR 引物, 以管家基因 *SmActin* (HM231319.1) 作为内参基因, 制备 qRT-PCR 系统 (每个反应 3 个生物学重复): TB Green<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup> II  $7.5\text{ }\mu\text{L}$ , cDNA 模板  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 正反引物各  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 适量 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 至总体积为  $15\text{ }\mu\text{L}$ 。qRT-PCR 程序为  $95\text{ }^\circ\text{C}$  变性 30 s;  $95\text{ }^\circ\text{C}$  退火 5 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$  延伸 34 s, 40 个循环。在  $65\sim 95\text{ }^\circ\text{C}$  内进行熔解曲线分析, 记录 Ct 值, 在不同实验组间以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法计算 *SmCYP72A395* 基因的相对表达量, 采用 *t* 检验对结果进行差异显著性分析。

**丹参酮类化合物含量检测** 观察并记录丹参毛状根形态颜色变化, 干燥后称重。取  $0.2\text{ g}$  毛状根粉末, 加入  $1\text{ mL}$  色谱级甲醇, 超声避光提取  $30\text{ min}$ ,  $8\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $10\text{ min}$ , 经  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  滤膜过滤上清液后注至进样瓶内, 采用 UPLC 检测其丹参酮类化合物含量。相关色谱条件如下: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 ( $100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$ ,  $1.7\text{ }\mu\text{m}$ ); 检测波长:  $255\text{ nm}$ ; 系统温度:  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ; 流速:  $0.25\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 进样量:  $5\text{ }\mu\text{L}$ ; 组成流动相的溶剂为甲醇 (A)-水 (B), 洗脱条件为:  $0\sim 5\text{ min}$ ,  $20\%\sim 60\%\text{ A}$ ;  $5\sim 20\text{ min}$ ,  $60\%\sim 70\%\text{ A}$ ;  $20\sim 25\text{ min}$ ,  $70\%\sim 80\%\text{ A}$ ;  $25\sim 26\text{ min}$ ,  $80\%\sim 100\%\text{ A}$ ;  $26\sim 30\text{ min}$ ,  $100\%\text{ A}$ 。记录出峰时间及峰面积, 每个样品设 3 个生物学重复, 采用外标一点法进行计算<sup>[44]</sup>, 采用 *t* 检验对结果进行差异显著性分析。

## 结果

### 1 *SmCYP72A395* 基因克隆

以丹参叶 cDNA 为模板, 经 RT-PCR 方法克隆获得基因全长  $1\text{ }578\text{ bp}$  的丹参基因 *SmCYP72A395*, 编码  $525$  个氨基酸, 确认其为包含 CYP450 保守结构域、血红素结合域 FXXGXRXCXG 基序和螺旋 K 区 EXXR 基序的 CYP450 超家族成员。

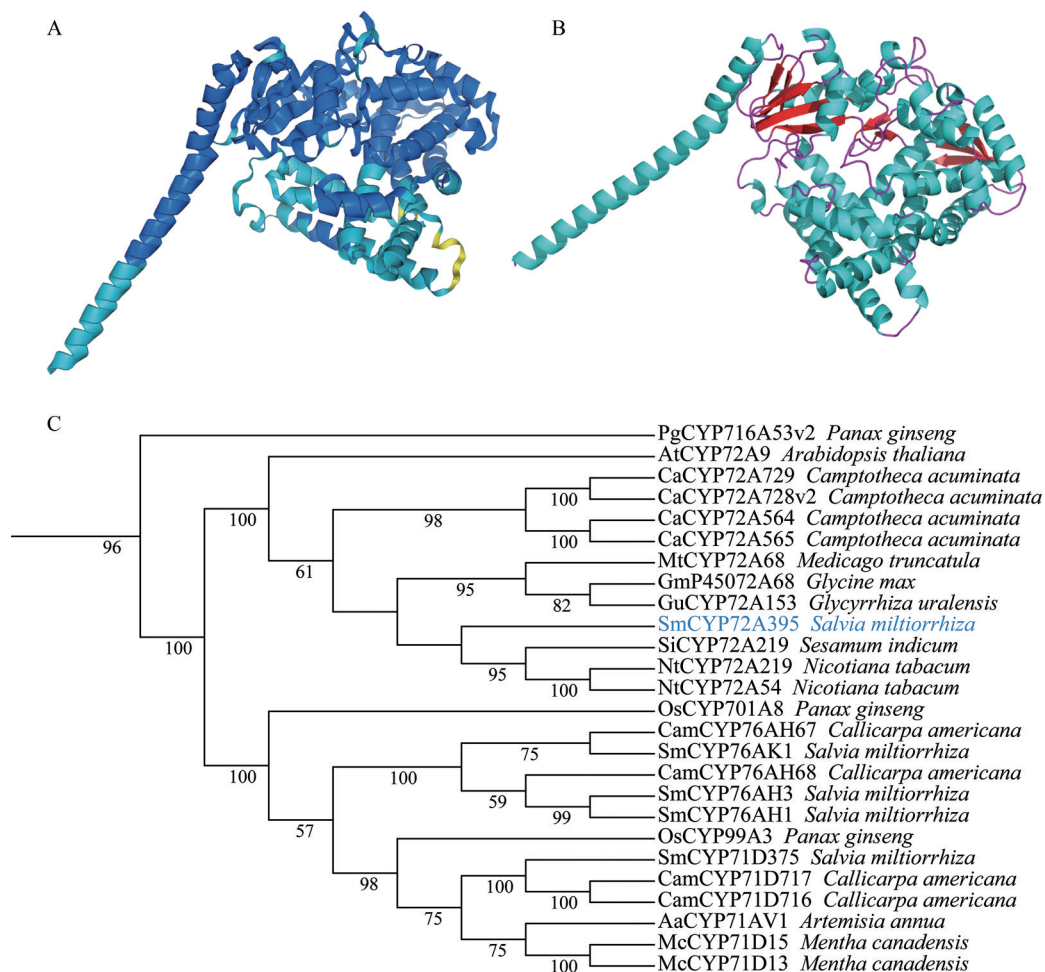
### 2 生物信息学分析及系统发育分析

**2.1 蛋白理化性质预测** 通过 ExPASy 预测 *SmCYP72A395* 蛋白的理化性质, 其相对分子质量为  $59.9\text{ kDa}$ , 分子式为  $\text{C}_{2728}\text{H}_{4284}\text{N}_{720}\text{O}_{756}\text{S}_{22}$ , 原子总数为  $8\text{ }510$ , 理论等电点为  $8.68$ 。氨基酸组成分析结果显示, 异亮氨酸 (Ile) 占比  $7.2\%$ 、丙氨酸 (Ala) 占比  $7.4\%$ 、亮氨酸 (Leu) 占比  $9.7\%$ , 说明 *SmCYP72A395* 蛋白主要由疏水性氨基酸组成。*SmCYP72A395* 蛋白不稳定系数为  $46.12$ , 为不稳定性蛋白; 水合作用总平均值为  $-0.138 < 0$ , 表明 *SmCYP72A395* 为疏水性蛋白。在 *SmCYP72A395* 蛋白中预测到  $48$  个潜在的蛋白磷酸化位点, 其中丝氨酸占比最大, 为  $60\%$ ; 苏氨酸次之, 为  $27\%$ ; 酪氨酸占比最少, 为  $13\%$ 。

**2.2 信号肽、跨膜区及蛋白质二级结构分析** 利用 SignalP-5.0 在线工具对 *SmCYP72A395* 蛋白质进行信号肽预测, 结果显示该蛋白质具有信号肽的可能性仅为  $0.1\%$ , 而不含信号肽的可能性高达  $99.9\%$ , 推断 *SmCYP72A395* 不含信号肽, 且不是分泌性蛋白。跨膜结构域预测结果表明 *SmCYP72A395* 在第  $17$  至  $39$  个氨基酸区间内形成了一个跨膜区域。亚细胞定位预测结果推测 *SmCYP72A395* 可能定位于内质网。蛋白质二级结构预测结果表明, *SmCYP72A395* 蛋白  $\alpha$ -螺旋结构包含了  $261$  个氨基酸, 占比最高, 为  $49.71\%$ ; 其次是无规则卷曲结构, 由  $210$  个氨基酸组成, 占比  $40.0\%$ ; 而延伸链则由  $54$  个氨基酸构成, 占比  $10.29\%$ 。

**2.3 蛋白质三级结构分析** 通过 Alphafold3 对蛋白质结构进行高精度预测, 图 1A 中蛋白质颜色越深, 数值越大, 表示置信度越高。结果显示  $\text{pLDD} > 90$ , 说明预测蛋白质结构可靠;  $\text{ipTM} = \text{pTM} = 0.92$ , 表明模型预测质量较高, 预测的蛋白质折叠质量较好, 与真实结构的相似性较高 (图 1A)。利用 Pymol 软件对预测后的蛋白质结构进行可视化, 蛋白质三级结构情况如图 1B 所示。

**2.4 系统进化树分析** 基于 NCBI 数据库下载得到的  $25$  条 CYP450 氨基酸序列, 利用 TB-Tools 软件构建系统进化树 (图 1C)。结果显示, 本研究中所有属于 CYP72A 亚家族的蛋白均聚类在同一分支上, 且丹参 *SmCYP72A395* 与芝麻 *SiCYP72A219*、烟草



**Figure 1** Protein tertiary structure and phylogenetic tree analysis of SmCYP72A395. A: Atomic confidence diagrams of SmCYP72A395; B: Tertiary structure prediction of SmCYP72A395; C: Phylogenetic tree analysis of SmCYP72A395 and other CYP450s

NtCYP72A219和NtCYP72A54聚为一分支,与蒺藜苜蓿MtCYP72A68、大豆GmCYP72A68及甘草GuCYP72A153聚在一个同源支。

### 3 SmCYP72A395表达模式分析

**3.1 表达谱分析** 分别以丹参根、茎、叶、花、周皮、韧皮部和木质部七个不同组织的cDNA为模板,对SmCYP72A395基因的表达水平进行检测(图2A)。分析发现,该基因在丹参花和叶中表达水平较高;在根中,发现其在周皮部的表达量显著高于韧皮部和木质部(图2B)。

**3.2 转基因毛状根获得** 分别构建SmCYP72A395-RNAi载体及SmCYP72A395-OE载体,利用农杆菌介导的转化方法,成功获得了丹参的转基因毛状根阳性株系。与对照株系相比,SmCYP72A395转基因毛状根的生长发育正常,无异常表型(图2C、D)。但与只转化空载体的对照株系(PKi)相比,在395i-4株系中,SmCYP72A395的表达量显著降低(图2E);而在过表达株系395OE-1、395OE-2和395OE-5中,SmCYP72A395

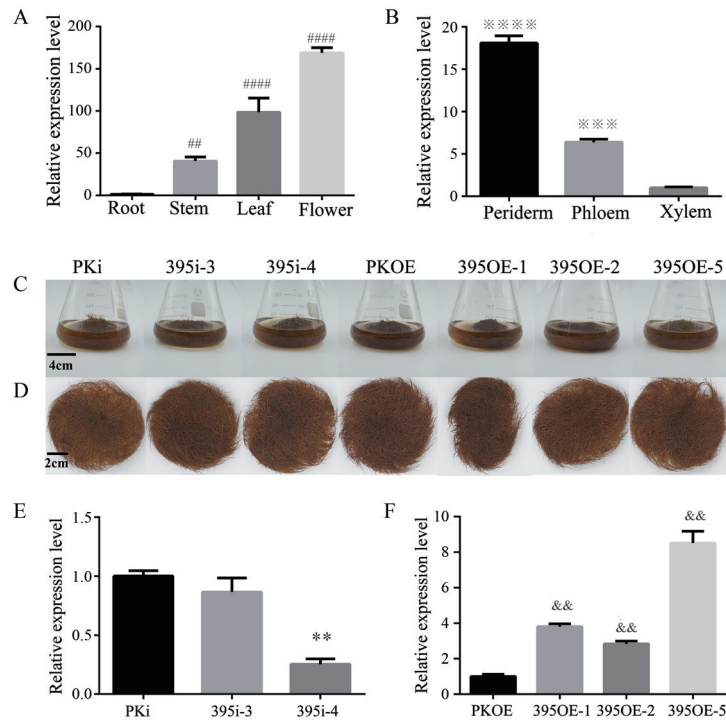
的表达水平均显著高于对照株系(图2F)。

## 4 UPLC含量检测

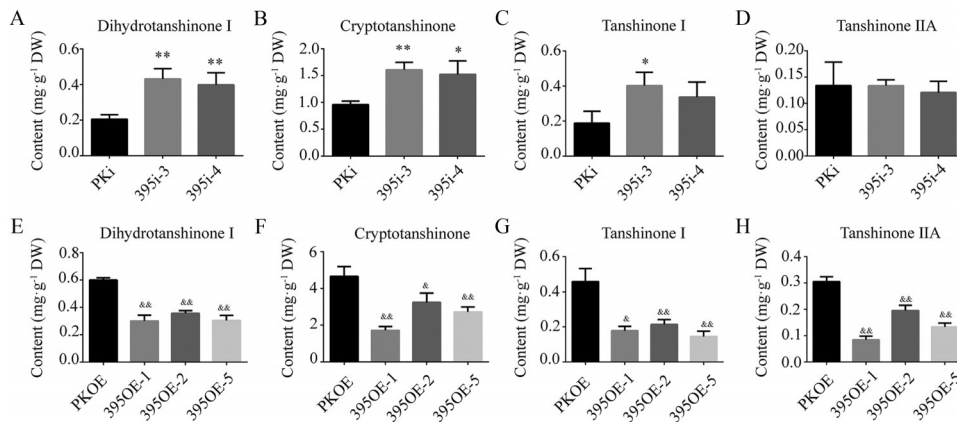
UPLC检测结果发现,在RNAi株系中,二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I的含量均显著高于对照株系(图3A~C)。其中二氢丹参酮I的含量差异最显著,其次是隐丹参酮和丹参酮I(图3A~C),而丹参酮IIA的含量与对照株系相比无显著差异(图3D);但在过表达株系中,这四种丹参酮的含量与对照株系相比均显著降低(图3E~H)。这一研究结果表明SmCYP72A395可能在丹参酮类化合物合成和积累过程中起负调控作用。

## 讨论

随着测序技术的不断升级和合成生物学的飞速发展,CYP450在植物生物合成途径中的功能正在被逐步验证。目前,通过基因组、转录组、RNA干扰、过表达、异源表达等技术体系,研究人员已在人参<sup>[45]</sup>、



**Figure 2** Expression patterns of *SmCYP72A395* in different tissues of *S. miltiorrhiza*. A: Relative expression level of *SmCYP72A395* in different positions; B: Relative expression level of *SmCYP72A395* in different tissues of the root; C, D: Phenotypic diagram of hairy roots of *S. miltiorrhiza*; E: Expression analysis of *SmCYP72A395* in *SmCYP72A395*-RNAi lines; F: Expression analysis of *SmCYP72A395* in *SmCYP72A395*-OE lines.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$ ,  $^{####}P < 0.0001$  vs Root;  $^{****}P < 0.0001$ ,  $^{***}P < 0.001$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs Xylem;  $^{*}P < 0.01$  vs PKi;  $^{&&}P < 0.01$  vs PKOE



**Figure 3** Content of tanshinones in transgenic hairy roots of *S. miltiorrhiza*. A: Detection of dihydrotanshinone I in *SmCYP72A395*-RNAi lines; B: Detection of cryptotanshinone in *SmCYP72A395*-RNAi lines; C: Detection of tanshinone I in *SmCYP72A395*-RNAi lines; D: Detection of tanshinone IIA in *SmCYP72A395*-RNAi lines; E: Detection of dihydrotanshinone I in *SmCYP72A395*-OE lines; F: Detection of cryptotanshinone in *SmCYP72A395*-OE lines; G: Detection of tanshinone I in *SmCYP72A395*-OE lines; H: Detection of tanshinone IIA in *SmCYP72A395*-OE lines. DW: Dry weight.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs PKi;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{&&}P < 0.01$  vs PKOE

拟南芥<sup>[46]</sup>、番茄<sup>[47]</sup>、绞股蓝<sup>[48]</sup>等植物中鉴定出CYP450的功能。而关于丹参CYP450基因的研究主要聚焦在CYP71D<sup>[23]</sup>、CYP76AH、CYP76AK<sup>[20-22]</sup>、CYP81C<sup>[44]</sup>、CYP98A<sup>[49]</sup>等亚家族成员,CYP72A亚家族的研究较少。

本研究利用RT-PCR克隆到丹参*SmCYP72A395*

基因的全长序列,并对其进行生物信息学分析。*SmCYP72A395*蛋白质具有CYP450家族的保守结构域、血红素结合域和螺旋K区保守基序<sup>[50]</sup>。亚细胞定位预测结果显示*SmCYP72A395*蛋白位于内质网中,与大多数CYP450的定位趋势一致,且与丹参

SmCYP76AH1 蛋白的亚细胞定位一致<sup>[51]</sup>。文献<sup>[20-23]</sup>报道, CYP71D、CYP76AH、CYP76AK 亚家族主要参与丹参酮类化合物的合成, 但本研究系统进化分析发现 CYP72A395 与 CYP72A 亚家族的蛋白在进化中具有较高的同源性, 而蒺藜苜蓿<sup>[39]</sup>、大豆<sup>[18]</sup>、甘草<sup>[42]</sup>等物种的一些 CYP72A 亚家族成员参与齐墩果烷三萜骨架的催化合成, 推测丹参 SmCYP72A395 可能参与丹参中三萜类化合物的生物合成途径, 从而间接影响丹参酮的生物合成。

丹参酮类化合物是分布于丹参根部的一类二萜类化合物。在前期研究中, Xu 等<sup>[24]</sup>发现一些参与丹参酮类化合物生物合成的 CYP450 基因主要在根和根周皮中高表达。而本研究发现 SmCYP72A395 虽然在丹参根周皮组织中的相对表达量高于韧皮部和木质部, 这与 CYP76AH1 等参与丹参酮生物合成的关键酶基因表达模式相似, 但其在叶和花中的表达量显著高于根 (图 2A、B), 这与参与丹参酮类化合物生物合成的关键 CYP450 基因表达部位明显不同, 暗示 SmCYP72A395 可能不直接参与丹参酮类化合物的生物合成。重要的是, 在 SmCYP72A395 转基因毛状根根系中, SmCYP72A395 基因的表达水平与丹参酮类化合物的含量呈负相关 (图 3)。Guo 等<sup>[51]</sup>研究发现, SmCPS1 和 SmCYP76AH1 双基因超表达的转基因丹参根中丹参酮 I、丹参酮 IIA 和隐丹参酮的含量都极显著升高。这与本研究发现的 SmCYP72A395-OE 转基因毛状根中丹参酮类化合物的含量变化结果相反。上述研究结果表明 SmCYP72A395 基因可能负调控丹参酮类化合物的生物合成。

高等植物 CYP72A 亚族成员在生理功能上具有一定的保守性<sup>[52]</sup>。有研究表明, CYP450 基因参与 GGPP 氧化为赤霉酸的反应过程, 且水稻 OsCYP72A20 可调节水稻穗发芽<sup>[53]</sup>。赤霉素为四环二萜类化合物, 与丹参酮类化合物共享底物 GGPP, 可能是丹参酮类化合物生物合成的竞争途径<sup>[54]</sup>。但 SmCYP72A395 具体催化底物及参与丹参中哪类次生代谢物的生物合成途径仍在进一步探索中, 将通过体外酶促反应、CRISPR-Cas9 等技术明确 SmCYP72A395 在调控丹参次生代谢物生物合成途径中的具体功能, 为解析丹参酮复杂生物合成途径的分子机制奠定基础。

**作者贡献:** 孙琳可负责部分实验、生物信息学分析、数据分析整理及文章撰写; 张建红、陈泓宇和王喆负责部分实验操作; 张文颖、郑文芳、马艺沔、何柳参与数据分析、图片绘制、文章修改等; 孙稚颖对本文实验思路及文章修改提供了宝贵意见; 罗红梅从实验设计、实验思路、方法建立及文章修改提供了专业指导。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 143.
- [2] Li SZ. Compendium of Materia Medica (本草纲目) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.
- [3] Wan XH, Wang YL, Zhou CZ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 788-798.
- [4] Tong Q, Zhang C, Tu Y, et al. Biosynthesis-based spatial metabolome of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by combining metabolomics approaches with mass spectrometry-imaging [J]. Talanta, 2022, 238: 123045.
- [5] Wang H, Wei S. Tanshinol relieves lipopolysaccharide-induced inflammatory injury of HaCaT cells via down-regulation of microRNA-122 [J]. Phytother Res, 2019, 33: 910-918.
- [6] Meng DQ, Li J, Li H, et al. Salvianolic acid B remits LPS-induced injury by up-regulating miR-142-3p in MH7A cells [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108876.
- [7] Dalil D, Iranzadeh S, Kohansal S. Anticancer potential of cryptotanshinone on breast cancer treatment: a narrative review [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 979634.
- [8] Wang M, Tang WH, Gong NJ, et al. Sodium Danshensu inhibits the progression of lung cancer by regulating PI3K/Akt signaling pathway [J]. Drug Dev Res, 2022, 83: 88-96.
- [9] Lin ZJ, Bao YY, Hong B, et al. Salvianolic acid B attenuated cisplatin-induced cardiac injury and oxidative stress via modulating Nrf2 signal pathway [J]. J Toxicol Sci, 2021, 46: 199-207.
- [10] Zeng X, Zheng YY, Liu YL, et al. Chemical composition, quality control, pharmacokinetics, pharmacological properties and clinical applications of Fufang Danshen Tablet: a systematic review [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278: 114310.
- [11] Zhang JY, Liang RX, Wang L, et al. Effects and mechanisms of Danshen-Shanzha herb-pair for atherosclerosis treatment using network pharmacology and experimental pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 229: 104-114.
- [12] Wang CL, Liwei M, Park JB, et al. Microbial platform for terpenoid production: *Escherichia coli* and yeast [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2460.
- [13] Paramasivan K, Mutturi S. Progress in terpene synthesis strategies through engineering of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Crit Rev Biotechnol, 2017, 37: 974-989.
- [14] Bian GK, Yuan YJ, Tao H, et al. Production of taxadiene by engineering of mevalonate pathway in *Escherichia coli* and endophytic fungus *Alternaria alternata* TPF6 [J]. Biotechnol J, 2017, 12: 1600697.
- [15] Kim J, Baidoo E, Amer B, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for isoprenol production [J]. Metab Eng, 2021, 64: 154-166.

- [16] Lu S. Biosynthesis and regulatory mechanisms of bioactive compounds in *Salvia miltiorrhiza*, a model system for medicinal plant biology [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2021, 40: 243-283.
- [17] Liu XJ, Gong Q, Zhao CN, et al. Genome-wide analysis of cytochrome P450 genes in *Citrus clementina* and characterization of a CYP gene encoding flavonoid 3'-hydroxylase [J]. *Hortic Res*, 2023, 10: uhac283.
- [18] Luo Y, Jing YY, Hu BX, et al. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *CYP72A546* gene of cytochrome P450 family in *Polygala tenuifolia* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2024, 55: 919-927.
- [19] Yu JY, Tehrim S, Wang LH, et al. Evolutionary history and functional divergence of the cytochrome P450 gene superfamily between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica* species uncover effects of whole genome and tandem duplications [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18: 733.
- [20] Chen HM, Wu B, Nelson D, et al. Computational identification and systematic classification of novel cytochrome P450 genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e115149.
- [21] Guo J, Zhou YJ, Hillwig M, 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.
- [22] Guo J, Ma XH, Cai Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones [J]. *New Phytol*, 2016, 210: 525-534.
- [23] Ma Y, Cui GH, Chen T, et al. Expansion within the CYP71D subfamily drives the heterocyclization of tanshinones synthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 685.
- [24] Xu ZC, Peters R, 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Qi SY, Wang LN, He BX, et al. Functional study of glycosyltransferase genes CtUGT25 in the flavone biosynthesis pathway of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 1854-1863.
- [28] Yu YX, Long LJ, Li CZ, et al. Cloning and interacted protein identification of AP1 homologous gene from *Lonicera macranthoides* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 2880-2888.
- [29] Chou KC, Shen HB. A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0 [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e9931.
- [30] Tian WS, Yan YR, Cui XX, et al. Gene cloning, functional identification, structural and expression analysis of sucrose synthase from *Cistanche tubulosa* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 3153-3163.
- [31] Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 [J]. *Nature*, 2024, 630: 493-500.
- [32] Zou H, Niu Z, Tang ZC, et al. The mechanism of action of the active ingredients of *Coptidis rhizoma* against porcine epidemic diarrhea was investigated using network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Viruses*, 2024, 16: 1229.
- [33] Salanoubat M, Lemcke K, Rieger M, et al. Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 2000, 408: 820-822.
- [34] Han JY, Hwang HS, Choi SW, et al. Cytochrome P450 *CYP716A53v2* catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 1535-1545.
- [35] Lupien S, Karp F, Wildung M, et al. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 368: 181-192.
- [36] Bryson A, Lanier E, Lau K, et al. Uncovering a miltiradiene biosynthetic gene cluster in the Lamiaceae reveals a dynamic evolutionary trajectory [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 343.
- [37] Zhu SF, Gao F, Cao XS, et al. The rice dwarf virus P2 protein interacts with *ent*-kaurene oxidases *in vivo*, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 1935-1945.
- [38] Wang Q, Hillwig M, Peters R. *CYP99A3*: functional identification of a diterpene oxidase from the momilactone biosynthetic gene cluster in rice [J]. *Plant J*, 2011, 65: 87-95.
- [39] Tzin V, Snyder JH, Yang DS, et al. Integrated metabolomics identifies CYP72A67 and CYP72A68 oxidases in the biosynthesis of *Medicago truncatula* oleanate saponinins [J]. *Metabolomics*, 2019, 15: 85.
- [40] Rao P, Yaroslavsky MA, Miller JC, et al. Catalytic site constraints in the P450s mediating loganic acid (7DLH) and secologanic acid synthesis (SLAS) in *Camptotheca* [J]. *Biochemistry*, 2023, 62: 2763-2774.
- [41] Yang Y, Li W, Pang J, et al. Bifunctional cytochrome p450 enzymes involved in camptothecin biosynthesis [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 4: 1091-1096.
- [42] Seki H, Sawai S, Ohyama K, et al. Triterpene functional genomics in licorice for identification of *CYP72A154* involved in the biosynthesis of glycyrrhizin [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 4112-4123.
- [43] Chen CJ, Wu Y, Li JW, et al. TBtools-II: a "one for all, all for

- one" bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Mol Plant*, 2023, 16: 1733-1742.
- [44] Zhang JH, Wang Z, Chen HY, et al. Cloning and functional research of *SmCYP81C16* related to tanshinone biosynthesis [J]. *World Chin Med (世界中医药)*, 2020, 15: 709-716.
- [45] Han JY, Kim HJ, Kwon YS, et al. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 2062-2073.
- [46] Tian X, Ruan JX, Huang JQ, et al. Characterization of gossypol biosynthetic pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 15: E5410-E5418.
- [47] Kwenda S, Birch P, Moleleki L. Genome-wide identification of potato long intergenic noncoding RNAs responsive to *Pectobacterium carotovorum* subspecies brasiliense infection [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 614.
- [48] Yun LL, Zhang CY, Liang TT, et al. Insights into dammarane-type triterpenoid saponin biosynthesis from the telomere-to-telomere genome of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Plant Commun*, 2024, 5: 100932.
- [49] Zhou Z. Elucidation and Functional Study of Key Enzymes in Salvianolic Acids Biosynthesis Pathway in *Salvia miltiorrhiza* (丹酚酸生物合成途径关键催化酶的解析及功能研究) [D]. Shanghai: Naval Medical University, 2021.
- [50] Gao SX, Rong M, Peng JX, et al. Research progress on the role of cytochrome P450 in plant sesquiterpene biosynthesis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 313-321.
- [51] Guo GY, Li YL, Xu HW, et al. Obtaining and photosynthetic characteristics analysis of *SmCPSI* and *SmCYP76AH1* double-gene overexpressed transgenic lines of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Agric Biotechnol (农业生物技术学报)*, 2024, 32: 2033-2048.
- [52] Li JT, Yang Y, Chai MM, et al. Gibberellins modulate local auxin biosynthesis and polar auxin transport by negatively affecting flavonoid biosynthesis in the root tips of rice [J]. *Plant Sci*, 2020, 298: 110545.
- [53] Zheng HT. Regulation of Pre-harvest Sprouting and Drought Response by OsCYP72A20 via Gibberellin in Rice (OsCYP72A20 通过赤霉素调节水稻穗发芽和干旱响应的研究) [D]. Changchun: Jilin University, 2024.
- [54] Du Q. Identification, Molecular Cloning and Expression Analysis of Gene Families Involved in Gibberellin Metabolism in *Salvia miltiorrhiza* (丹参赤霉素合成与代谢相关基因家族的鉴定、分子克隆及表达分析) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2015.