

综述



于荣敏, 博士, 暨南大学二级教授, 博士生导师, 欧洲自然科学院院士。现任暨南大学中药生物技术研究所所长。先后兼任重大新药创制/国家科技重大专项评审专家、国家发展和改革委员会药品价格评审专家、中国药学会生化与生物技术药物专业委员会副主任委员、《中国生化药物杂志》副主编、*Pharmacogn Mag*、*Drug Discov Ther*、《中国中药杂志》《中草药》《中药材》《药物生物技术》《食品与药品》等杂志编委。主持重大新药创制国家科技重大专项、国家自然科学基金等省部级以上科研项目20余项; 出版专著21部; 发表论文300余篇, 包括SCI/EI收录论文130余篇。研究方向: (1) 中药及天然药物活性成分的生物合成和生物转化; (2) 多肽蛋白/多糖活性成分研究; (3) 创新药物的研究与开发。

青蒿素及其衍生物的生物合成

李江琦, 黄煜文, 朱建华, 于荣敏*

(暨南大学中药生物技术研究所, 广州 511400)

摘要: 青蒿素(artemisinin, ART)是一种含有独特过氧桥结构的倍半萜内酯类化合物, 是目前治疗恶性疟疾的首选药物。近年来研究发现, 青蒿素及其衍生物还具有其他多种药理作用。黄花蒿中青蒿素含量为0.01%~0.80%, 且传统提取工艺得率很低, 成本较高。随着合成生物学技术的不断发展, 越来越多的科研人员致力于青蒿素的生物合成途径的解析以及代谢工程的研究, 以提高青蒿素的产量。然而, 由于青蒿素终端生物合成途径尚未被解析, 目前青蒿素仍主要来源于植物提取, 与传统的生产方法相比, 以生物反应器大规模生产青蒿素被视为一个重要的替代方法。本文从青蒿素的生物合成途径、异源合成、转录因子及其代谢调控等多个方面进行综述, 旨在为绿色、高效生产青蒿素提供科学资料。

关键词: 青蒿素; 生物合成; 转录因子; 异源合成

The biosynthesis of artemisinin and its derivatives

LI Jiangqi, HUANG Yuwen, ZHU Jianhua, YU Rongmin*

(Biotechnological Institute of Chinese Materia Medica, Jinan University, Guangzhou 511400, China)

Abstract: Artemisinin, a sesquiterpene lactone with a special endoperoxide bond, is the first choice for treating falciparum malaria. It also has other significant pharmacologically effects. However, *Artemisia annua* has very low artemisinin content (0.01%~0.80%), and the products that are created using the old extraction method are expensive and have low content, making it difficult to meet market demand. A growing number of scientists have dedicated to study the biosynthesis pathway of artemisinin and metabolic

收稿日期: 2024-05-08

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2022SFGC0105); 广州市科技计划项目(202201010107, 2023A03J0613); 广东省自然科学基金项目(2024A1515010301)

第一作者: E-mail: 2332709284@qq.com

*通信作者: E-mail: tyrm@jnu.edu.cn

engineering to enhance artemisinin production in recent years, along with the ongoing advancement of synthetic biology. Since the artemisinin's terminal biosynthesis pathway has not yet been finished, clarified compound is still primarily isolated from plants. This paper reviews the biosynthetic pathways, heterologous synthesis, transcription factors, and metabolic regulation of artemisinin. It also offers a proposed scientific information for the efficient and environmentally friendly production of artemisinin, suggesting that large-scale bioreactor production of the drug could be a significant alternative to conventional methods.

Key Words: artemisinin; biosynthesis; transcription factor; heterologous synthesis

中药和天然药物中含有多种具有重要药理作用的生物活性物质, 其中很多已被用于临床治疗。青蒿素(artemisinin, ART)是一种重要的植物代谢产物, 在自然界中其主要来源于药用植物黄花蒿(*Artemisia annua* Linn)的地上部分。黄花蒿是菊科蒿属一年生草本植物, 作为一种经济作物, 遍及中国全境, 也广泛分布于欧亚温带、寒温带及亚热带地区。《中国植物志》记载, 黄花蒿又被称为“青蒿”, 含有多种化学成分, 除以青蒿素为代表的萜类物质外, 还含有挥发油、黄酮、生物碱等活性成分, 具有清热解暑、凉血利尿、抗疟等功效, 在古代多用于治疗发热^[1]。

青蒿素是一种倍半萜内酯类物质, 具有过氧桥结构, 主要存在于黄花蒿的腺体分泌毛状体(glandular secreting trichomes, GSTs)中, 在治疗恶性疟疾方面发挥极其重要的作用^[2,3]。疟疾是一种世界范围内极具传染性的恶性疾病, 临床表现大多为发热、出汗等症状, 严重者导致死亡。世界卫生组织表示, 2022年全球大约有2.49亿疟疾病例, 死亡人数高达60.8万。恶性疟原虫是疟疾感染的病原体, 它通过多个宿主完成生命周期, ART通过破坏疟原虫细胞内的膜结构, 使其膜丧失导致营养缺失而消亡; 同时通过阻滞疟原虫呼吸导致其形成自噬泡最终导致死亡。与其他抗疟药物如氯喹相比, ART具有低毒性、不良反应小等优点。但近年来在东南亚出现了耐青蒿素疟原虫菌株, 单独使用ART会产生抗药性, 因此以ART为基础的联合疗法(artemisinin-based combination therapies, ACTs)在治疗疟疾方面发挥了重要的作用。White等^[4]发现, 使用ACTs是降低疟疾发病率和死亡率的有效手段。自1972年中国科学家屠呦呦发现青蒿素以来, 对于青蒿素的研究已经受到越来越多

研究人员的关注。随着研究的深入, 人们发现青蒿素及其衍生物除了具有抗疟活性外, 还具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗病毒等药理作用^[5]。随着对青蒿素需求的不断增加, 如何高效合成青蒿素一直以来都是国际研究热点。早在1983年, Schmid等^[6]就通过(-)-异胡薄荷醇化学合成ART, 但其中涉及9个反应步骤, 过程繁琐、得产率低。传统的方法难以满足ART的生产需求, 且ART在植株中含量低, 在黄花蒿中干重仅占0.01~0.80%^[7]。因此, 利用现代生物技术方法如植物细胞、组织、器官培养、代谢工程等策略来生产ART已引起众多科学家的高度关注。2006年, Ro等^[8]在酿酒酵母中构建了产青蒿酸(artemisinic acid, AA)的酵母菌株, 产量达到100 mg/L, 开启了通过半合成法生产ART的新篇章。目前, 通过合成生物学的方法只能生物合成ART的直接前体青蒿酸, ART的终端生物合成途径仍未解析阐明, 故目前ART主要还是来源于黄花蒿植株直接提取。本文主要从ART的生物合成途径、异源合成、转录因子以及代谢调控等方面进行述评, 旨在为构建高产青蒿素底盘菌株和青蒿素的绿色、高效生产提供科学资料。

1 ART的生物合成途径

近年来, 青蒿素生物合成的研究已经成为科学家们关注的热点领域之一(图1)。研究表明, 青蒿素主要来源于黄花蒿叶表面地上部分突起结构毛状体腺毛的角质层下, 但近期研究发现ART也存在于非腺毛内^[9], ART的生物合成主要发生在叶片的GSTs中, 涉及合成、积累和分泌等过程^[10]。由于ART合成场所的特殊性, 前期研究人员通过增加GSTs在黄花蒿中的密度和大小来提高ART的含量。目前, 已经在黄花蒿中发现几种转录因子可

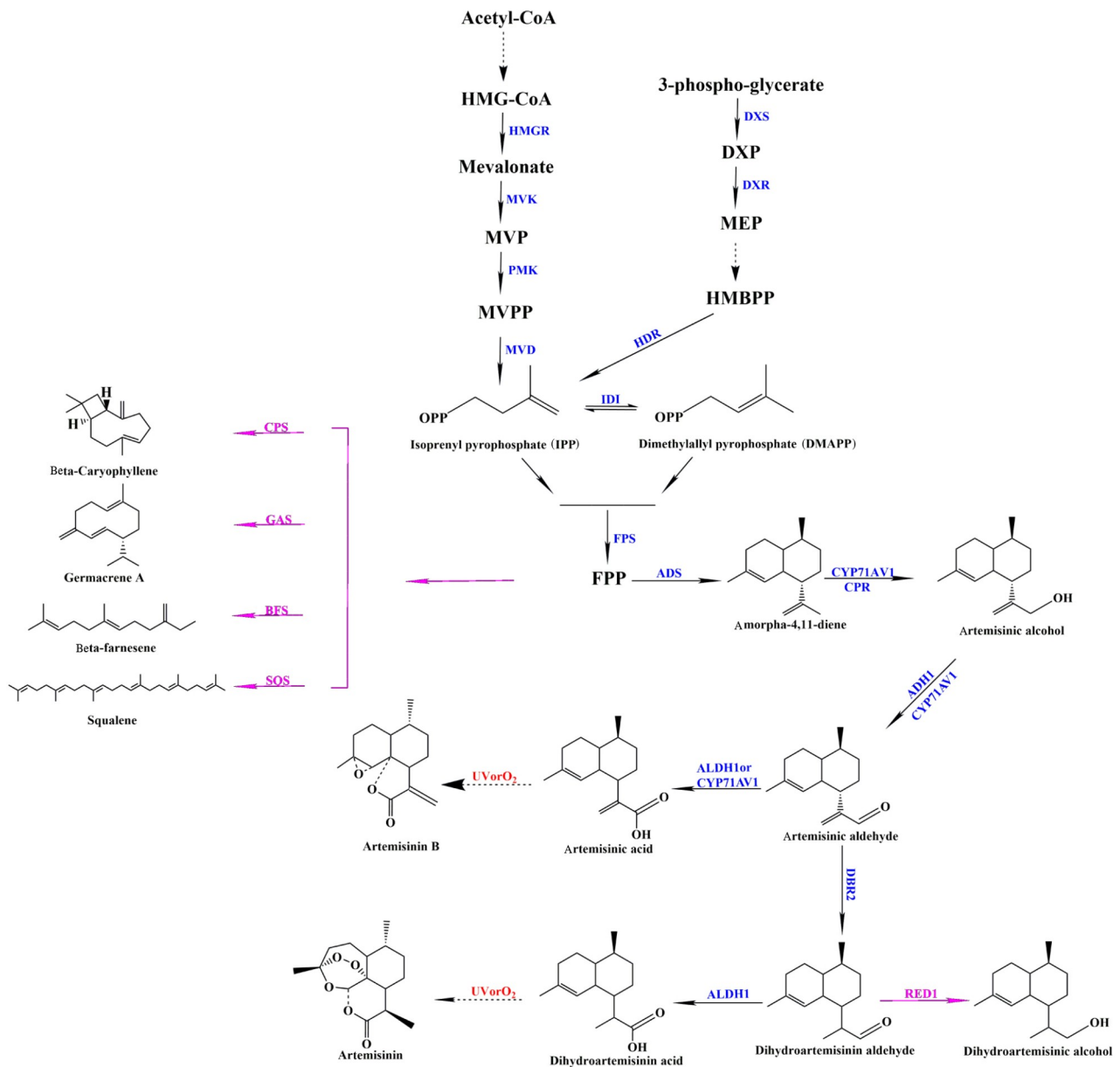


图1 青蒿素生物合成途径

以参与GSTs的调控, 增加GSTs的密度。如在黄花蒿植株中过表达转录因子*AaMYB1*可以显著增加GSTs的密度^[11]; *AaHD8*通过直接结合*AaMIXTA1*的启动子正调控GSTs的生成^[12,13]。

ART的上游合成途径中存在两条独立的分支合成异戊烯基焦磷酸酯(isopentenyl pyrophosphate, IPP)及其同分异构体二甲基丙烯基焦磷酸酯(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)。存在于细胞质中的甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径主要由羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methyl

glutaryl coenzyme A reductase, HMGR)调控^[14,15]。另一条存在于质体中的2-甲基赤藓醇磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径主要由1-脱氧木糖5-磷酸合酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)和1-脱氧木糖5-磷酸还原异构酶(deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR)调控^[15,16]。随后, IPP和DMAPP作为底物在法尼基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)作用下, 一分子DMAPP与两分子IPP结合生成一分子焦磷酸合金欢酯

(farnesyl diphosphate, FPP)。FPP在紫穗槐二烯合酶(amorphadiene synthase, ADS)的作用下生成紫穗槐-4,11-二烯,之后在细胞色素P450单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenase, CYP71AV1)及细胞色素P450氧化还原酶(cytochrome P450 reductase, CPR)催化作用下生成青蒿醇。青蒿醇再经CYP71AV1及醇脱氢酶1(alcohol dehydrogenase 1, ADH1)作用得到青蒿醛。生成的青蒿醛作为一个分支点:其中一条分支在青蒿醛 Δ 11(13)双键还原酶2(double bond reductase 2, DBR2)的作用下还原青蒿醛为二氢青蒿醛,之后在醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)催化下生成二氢青蒿酸,最终在各种非酶促反应如分子氧和光生成酮烯醇作用下生成产物ART; ALDH1在另一分支上也催化青蒿醛生成青蒿酸,同时也需要在CYP71AV1氧化下完成,最终青蒿酸在光/氧气的作用下生成青蒿素-B(artemisinin-B, ART-B)。

此外, Rudén等^[17]研究发现,在二氢青蒿醛还原酶1(dihydroartemisinic aldehyde reductase 1, RED1)的作用下,二氢青蒿醛可转化生成二氢青蒿醇,并且这是一种终产物,对于青蒿素的生成是一种竞争负面影响。除合成青蒿素这一途径外, Mercke等^[18]发现, FPP经雪松醇合酶(epi-cedrol synthase, ECS)催化可生成 β -雪松醇倍半萜; Cai等^[19]发现, β -石竹烯合酶(β -caryophyllene synthase, CPS)可将FPP转化为 β -石竹烯; Berteau等^[20]研究发现, FPP还可被大根香叶烯合酶(germacrene A synthase, GAS)催化生成大根香叶烯A; Picaud等^[21]发现, FPP经 β -法尼烯合酶[(E)- β -farnesene synthase, BFS]催化生成 β -法尼烯;此外, FPP还可被角鲨烯合酶(squalene synthase, SQS)催化合成角鲨烯^[22]。这些支路途径都会竞争影响ART的生成。因此,可以通过抑制这些途径中关键酶基因的表达,使整条通路流向合成ART的方向。

2 ART的异源合成

随着合成生物学技术的不断发展,人们开始把代谢工程、植物组织细胞培养和生物合成等多学科交叉结合,采用半合成的方法绿色、高效生产有药用价值的次级代谢产物。近年来,青蒿素的

异源合成受到越来越多研究人员的关注,科研人员以异源生物(主要包括微生物和植物)为反应器来高效生产ART。目前,人们普遍认为, AA和DHAA是ART生物合成途径中的前体化合物^[23,24]。AA和DHAA的生物合成途径已被解析阐明。因此,科研人员主要在异源宿主中构建产AA或DHAA的菌株,之后通过化学半合成的方法生成ART。

2.1 异源宿主微生物生产ART

利用微生物作为反应器来生产ART是可行的。因为以ART为代表的萜类化合物生物合成的许多步骤在高等植物与原核生物中是高度共享的,尤其是大肠杆菌以其生长繁殖速度快且遗传背景清楚等优点成为许多次生代谢产物常见的宿主。Chang等^[25]在大肠杆菌中表达CYP71AV1,体内外实验都难以检测到其活性,通过优化密码子等方法只能检测到微量青蒿醇;随后,科研人员将克隆得到的黄花蒿中的CPR基因导入大肠杆菌,与CYP71AV1结合后检测到青蒿醇的含量为之前的12倍。有研究通过大肠杆菌来合成ART,发现由于大肠杆菌中缺乏像真核细胞一样的内膜系统,不能进行翻译后的修饰,因此导致黄花蒿中关键酶基因的表达受限,同时在大肠杆菌中成功合成ART最关键的一步是表达有正常活性的细胞色素P450基因,该类酶基因属于膜结合酶,然而在大肠杆菌中缺乏必要的膜室,表达P450(如CYP71AV1)并不相宜^[8]。因此,如今多采用酿酒酵母作为反应器来生产ART。此外,酵母是第一个全基因组测序的真核生物,亲缘关系较大肠杆菌更接近于植物,并且发酵时间较短,所得产物合成量高,具有内膜系统,能够更好地表达蛋白质。因此,有研究在2006年将来源于黄花蒿克隆得到的ADS、CYP71AV1和CPR导入酿酒酵母中,得到高浓度的AA,质量浓度达100 mg/L^[8]。Westfall等^[26]在此基础上为降低成本,利用葡萄糖来替代半乳糖,进一步通过优化酵母发酵工艺使得紫穗槐二烯的含量达40 g/L。之后, Paddon等^[27]将CYP71AV1、ADH1、ALDH1、CPR1和CYB5五种酶基因整合至酵母菌株,并且通过硫酸铜抑制角鲨烯合成酶启动子基因活性,提高ART合成代谢流,得到AA的含量为25 g/L,并采用单重态氧的化学源将AA转

化为ART, 产率提高了40%~45%。通过过表达MVA途径的每个酶基因, 紫穗槐-4,11-二烯的产量达到41 g/L, 这也是目前所知的最高产量。目前大多数以微生物为反应器进行植物次生代谢物合成的研究主要集中于重要药用植物, 因此更加注重于经济成本。然而, 实际生产过程中还需要考虑微生物生存所需要的营养物质, 如碳源(葡萄糖、半乳糖等)、氮源以及所需要的无菌环境等。此外, 酿酒酵母虽然是一种很有益的工业微生物, 但是其代谢效率低, 存在较低的ATP和低氧率, 这些都成为微生物作为宿主进行生物合成的限制因素^[28]。

2.2 异源宿主植物生产ART

目前模式植物烟草和小立碗藓作为反应器已经成功合成ART, 烟草具有生长速度快、生物量大、遗传转化稳定等优点, 故适合作为ART及其前体物质生物合成的反应器。此外, 植物是合成生物学的一个独特而强大的物种基础, 因为它们只依赖大气中的碳(而不是像微生物的外界碳源)、水和光来高效生长, 同时植物本身还存在一些常见的辅酶因子, 为蛋白质的正确折叠表达提供了一个良好的环境, 这在微生物中是不存在的。因此, 植物是一个更可持续和绿色的合成生物学平台。Fuentes等^[29]将ART前体物质AA合成的完整途径整合到烟草叶绿体基因中, 经过一系列的转化产生120 mg/kg的AA。van Herpen等^[30]以烟草为反应器, 将*ADS*、*FPS*和*HMGR*基因经农杆菌转化法导入烟草, 结果表明, 在烟草中发现紫穗槐-4,11-二烯, 之后又将该载体与另一个含*CYP71AV1*基因的载体共转化烟草, 但无法检测到紫穗槐二烯等青蒿酸氧化产物, 经液-质检测发现, AA已被糖基化生成糖苷类化合物。烟草中ART的低积累或难以检测到ART类化合物的产生是由于烟草含有内源性糖基转移酶使得产物高水平的糖基化, 或是不利的胞质环境条件阻止了ART前体的生成^[31]。近年来, 研究人员发现, 烟草叶绿体是一个无糖基化的腔室, 通过将叶绿体特异性的启动子、终止子等和外源基因共同构建至同一表达载体, 通过基因枪法或PEG法转化至叶绿体中, 可避免糖基化产物的产生^[31]。Saxena等^[32]将ART中的12个关键酶基因导入烟草的叶绿体基因组中检测到AA的产生, 但庞

大的转基因体系影响了植株的生长, 因此, 通过三个细胞器(胞质、线粒体、叶绿体)来平衡叶绿体超负荷的缺陷, 成功获得能够产生约0.8 mg/g干重ART的转基因植株^[31]。尽管近些年来科研人员尝试将途径酶靶向不同隔区, 但这些过程涉及诸多生物工程操作, 成本较高, 产量提高程度有限。

近年来, 用小立碗藓等苔藓植物来合成青蒿素也得到科研人员的青睐。与烟草相比, 在小立碗藓中未检测到青蒿素生物合成中间体相关产物发生糖基化现象, 同时, 在2018年发布了小立碗藓染色体的水平的基因组数据^[33]。Ikram等^[34]将ART完整的生物合成过程整合到小立碗藓中, 在小立碗藓中异源表达5个ART生物合成关键酶基因的不同组合, 研究结果显示: 单独引入*ADS*基因时就可检测到ART-B的生成, 表明小立碗藓中存在内源性杂合酶活性(可能是细胞色素P450), 引入三个关键酶*ADS-CYP71AV1-ALDH1*或*ADS-DBR2-ALDH1*均有ART的产生, 表明在小立碗藓中可能存在一个或多个内源性基因, 其可以补充完整的合成途径。并且ART在*ADS-CYP71AV1-ALDH1*中的积累表明, 小立碗藓中含有与黄花蒿中*DBR2*和*ALDH1*活性相似的酶, 但产生的ART含量低, 说明相似酶活性不如*DBR2*和*ALDH1*高, 含有不同基因组合的转基因苔藓系产生不同数量的ART, 研究发现, *ALDH1*在所有转基因品系中均表现出低表达。此外, 在所有的转基因苔藓株系中, ART生物合成途径基因的表达导致脂肪体的形成, 表明这些基因可能具有隔离异源代谢物的功能。

通过将微生物和植物等作为反应器, 异源合成青蒿素及其前体化合物已逐渐被认为是一种可行的方法, 对于降低青蒿素合成成本及高效生产青蒿素的作用是显而易见的, 但该方法仍需不断的探索和优化。

3 转录因子(transcription factors, TFs)调控ART的生物合成

TFs是通过转录水平或转录后水平调控目的基因的表达, 识别靶基因启动子的顺式作用元件, 从而调控植物的次生代谢及生长发育等过程的蛋白质分子。在植物中, 次生代谢产物的合成和积累在空间和时间上受转录因子形成复杂的网络调

控^[35,36]。为了响应环境信号, TFs可以通过激活或抑制其靶基因表达, 从而控制次级代谢物的特异性积累。

ART作为黄花蒿植物主要的次生代谢产物, 在代谢物合成过程中, 一些关键的转录因子可以调控单个或多个基因的表达, 调节代谢流的方向与速度, 从而影响代谢物的含量。因此, 某些关键转录因子的表达对青蒿素的生物合成发挥着重要的作用。对转录因子的干预是一种提高ART产量的方法, 转录调控通常涉及来自相同或不同家族的多个转录因子的组合作用。目前在ART生物合成过程中发挥关键调控作用的有以下五个家族: WRKY、bZIP、AP2/ERF、bHLH和MYB转录因子家族。

3.1 WRKY家族

WRKY蛋白是植物代谢过程中具有重要作用的TFs家族之一, 其通过与启动子区域内的W-box特异性结合来调控基因的表达; 此外, 该蛋白质还调控多种植物过程, 如种子萌发、种子休眠、果子成熟等生理过程^[37]。WRKY转录因子属于锌指调控蛋白家族, N端含有氨基酸序列, C端含有锌指结构。*AaWRKY1*是第一个从黄花蒿中分离和表征的转录因子, 可调控ART的生物合成^[38]。同时*AaWRKY1*在GSTs中高度表达, 并被茉莉酸甲酯强烈诱导。Han等^[38]发现, *AaWRKY1*可以显著上调CY71AV1的表达, 从而促进ART的生成。体内外分析表明, *AaWRKY1*能够与ADS中的W-box顺式作用元件结合, 通过在烟草中瞬时表达生成ART。Fu等^[39]发现, *AaWRKY9*可与*AaDBR2*和*AaGSW1*基因的启动子结合, 上调相关生物合成基因的表达, 从而使得ART的产量增加1.6~2.2倍。以上结果表明, WRKY家族TFs在介导植物次生代谢产物的生物合成中发挥着重要作用。

3.2 bZIP家族

碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)转录因子是另一类种类丰富、规模数量庞大的家族, 普遍存在于动植物及微生物中, 具有与特定DNA序列结合的碱性结合域和用于DNA结合域的亮氨酸拉链区。bZIP转录因子主要识别含有ACGT的顺式作用元件, 如G-box(CACGTG)、C-box(GACGTC)以及A-box

(TACGTA)等。研究发现, 一些受脱落酸(abscisic acid, ABA)等诱导的基因启动子中含有上述作用元件, 最常见的是G-box, 多见于受ABA、光、茉莉酸、茉莉酸甲酯等诱导的基因启动子区域^[40]。此外, bZIP蛋白还参与植物生长发育、器官组织分化、病菌防御和能量代谢等多种生物学过程, 同时在信号转导及生物或非生物诱导胁迫方面也发挥着重要的作用^[41]。

Shu等^[42]发现, *AabZIP1*能促进多种ART生物合成酶基因的表达, 包括*DBR2*和*ALDH1*, 但*AabZIP1*不能直接激活这些基因, 只能通过结合*AaMYC2*的启动子并上调其表达, 进而*AaMYC2*结合*ALDH1*的启动子区域进行激活转录。在代谢工程育种中, *AabZIP1*基因是开发ART含量高、耐旱性好的黄花蒿的候选基因。此外, bZIP转录因子家族还可以与其他家族转录因子相互作用调控植物代谢。Hao等^[43]研究发现, bZIP转录因子家族中的*AaHY5*与WRKY家族中的*AaGSW1*相互作用, 调节光诱导ART的生物合成。

3.3 AP2/ERF家族

AP2/ERF(apetala2/ethylene-responsive factor)是在植物中广泛存在的另一类转录因子超家族。与其他家族不同的是, AP2/ERF蛋白中至少含有一个AP2/ERF结构域, 该结构域可以识别并结合DNA。根据AP2/ERF蛋白含有结构域的个数可将其分为五个独立的亚家族, 分别是AP2、ERF、DREB、RAV和Soloist家族。这些转录因子家族共同识别各种顺式作用元件, 如GCC-box、DRE/CRT、VWRE和CE1等, 参与调控植物初生和次生代谢、植物生长发育、对环境刺激的响应以及生物和非生物胁迫应答等^[44]。

Yu等^[45]在黄花蒿中发现两个受茉莉酸(jasmonic acid, JA)响应的*AaERF1*和*AaERF2*, 它们能够与ADS和CYP71AV1启动子中的CBF2和RAA序列结合, 过表达这两种TFs可以使ADS和CYP71AV1转录水平升高, 从而导致ART与AA含量的积累。Wang等^[46]从黄花蒿中分离鉴定出一个WIN/SHN蛋白, 将其命名为*AaWIN1*。WIN/SHN蛋白是AP2/ERF家族的一个分支, 可以调控植物腺毛的发育, 在黄花蒿中过表达*AaWIN1*基因可以显著提高GSTs密度, 从而增加ART的含量。

3.4 bHLH家族

碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)是动植物中最大的转录因子家族之一, 具有重要的生物学功能。bHLH蛋白家族的特征性表现为具有一个碱性区域和一个双 α -螺旋环, 碱性区域可与DNA结合, 双螺旋环能促进蛋白质形成同型或异型二聚体。因此, bHLH转录因子常以二聚体的形式发挥作用。研究表明, 大多数动植物bHLH蛋白可识别结合E-box(5'-CANNTG-3')区域, 同时bHLH被发现参与许多重要的生理过程, 如植物气孔发育、光信号转导、激素信号传导、各种生物或非生物诱导胁迫植物次生代谢反应等^[47-49]。

另有研究报道, 从黄花蒿GSTs的cDNA文库中克隆的*AabHLH1*可调节ART的生物合成^[50]。生化分析表明, *AabHLH1*蛋白能够与*ADS*和*CYP71AV1*中存在的E-box顺式元件结合, 并强烈激活*ADS*和*CYP71AV1*的表达, 这些结果表明*AabHLH1*可以正向调节ART的生物合成^[50]。而*AabHLH2*和*AabHLH3*参与ART的负反馈调节, 通过基因沉默技术抑制*AabHLH2*及*AabHLH3*的表达从而提高ART的产量^[51]。Shen等^[52]发现, *AaMYC2*可以结合*CYP71AV1*和*DBR2*启动子区域中的E-box顺式作用元件, 从而显著激活*CYP71AV1*和*DBR2*转录水平, 导致ART含量增加。Zhang等^[53]发现, *AaPIF3*能够显著增强*ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2*、*ALDH1*等ART生物合成关键酶基因启动子活性, 正向调控ART的生物合成, 含量分析发现, 过表达*AaPIF3*的植株比野生型产ART的含量提高了55.97~65.21%。

3.5 MYB家族

MYB转录因子家族是含有MYB结构域的一类转录因子, 具有高度保守性的52个氨基酸肽段和间隔序列。研究发现, MYB转录因子家族可能是最关键的调控因子, 具有最多的元件结合位点, 尤其是R2R3-MYB类转录因子, 主要参与植物的次生代谢产物的合成、植物组织器官的生长发育、组织应答等多种生理生化反应^[54]。MYB类转录因子的C端存在共识基序, 表明该家族在调节不同途径方面的特异性是通过与其他转录因子蛋白家族的相互作用而产生的。

Wu等^[55]发现, 黄花蒿中存在一个属于R2R3-

MYB类ART生物合成的负反馈调控因子, 将其命名为*AaMYB15*, 暗处理或JA处理均可以诱导*AaMYB15*的表达; 过表达*AaMYB15*导致*ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2*和*ALDH1*的表达量显著下降, ART含量显著降低。此外, 他们还发现, *AaMYB15*可与ART生物合成正调控因子*AaORA*中的启动子结合, 抑制其转录活性从而下调下游关键酶基因的表达水平, 负向调控ART的生物合成。Shi等^[12]从GSTs中筛选到一个MYB类TFs基因*AaMIXTA1*, 过表达*AaMIXTA1*基因导致GSTs和ART含量增加, 同时*AaMIXTA1*还可以调控角质层的生物合成。有研究发现了两种负调控GSTs的生成MYB类的TFs, *AaTLR1*和*AaTLR2*, 通过基因编辑手段降低*AaTLR1*和*AaTLR2*的表达, 可以促进GSTs的积累从而增加ART的含量^[56]。因此, MYB类TFs对于ART的生物合成既有促进作用也有抑制作用。

除了上述常见的五种转录因子家族之外, 还存在其他未归类的转录因子影响ART的生物合成。*AaZFP1*是一种C2H2型TFs, 可与*AaIPPI1*启动子结合正向调控该基因的表达, 从而促进ART的生成^[57]。在过表达*AaSPL9*的转基因植株中, GSTs的密度增加, 从而使得ART的产量增加33%~60%^[58]。*AaSEP4*属于MADS-box转录因子家族, *AaSEP4*主要在GST中表达, 过表达*AaSEP4*可促进ART生物合成相关酶基因的表达, 从而促进ART的生成^[59]。随着黄花蒿基因组和转录组被报道, 未来会有更多的转录因子家族被挖掘。

4 总结与展望

目前, 青蒿素仍然是治疗恶性疟疾的首选药, 同时还具有其他多种药理活性。关于ART的来源大致有以下几种途径: 从黄花蒿中直接提取、多步化学反应合成、植物组织培养和转基因代谢生物工程。但传统方法得到的ART成本高、产量低。因此, 为了获得低成本且产量大的ART, 近年来国内外的研究人员开始关注ART的生物合成及代谢工程的研究。目前关于ART的生物合成及代谢调控研究策略主要集中于几个方面: 首先, 尝试通过不同手段来增加GSTs的密度, 从而进一步提高ART的产量; 其次, 通过转录因子直接或间接调控ART的

生物合成, 通过过表达合成途径中单个或多个关键酶基因或阻断竞争性支路上关键酶基因的方式来促进ART的合成, 或通过生物或非生物诱导因子来直接或间接调控ART的生物合成; 此外, 利用异源微生物/植物细胞作为反应器能够稳定高效地生产青蒿素, 同时可以消除一些有毒的中间产物, 抑制青蒿素生物合成的旁路途径、成本低廉且环境友好。但异源宿主中重建青蒿素仍面临一些挑战, 如一些中间产物不明、其中存在的某些功能酶或基因不明、外源基因的正确表达的确定以及合适载体的挖掘等, 因此还需要不断地探索和优化, 去挖掘更多的异源反应器。同时, 青蒿素终端生物合成途径关键酶基因仍未找到, 目前还是通过半合成的方法得到ART。因此, 随着科学技术的不断进步、信息安全交流平台的不断更新, 运用成熟的合成生物学方法生产青蒿素具有光明的前景。

参考文献

- [1] 张小波, 赵宇平, 黄晓巍, 等. 青蒿道地药材研究综述. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 2015-2018
- [2] 方欣, 卢山, 于宗霞, 等. 青蒿素的生物合成研究. 科技导报, 2015, 33(20): 31-35
- [3] Weathers PJ, Arsenault PR, Covello PS, et al. Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. *Phytochem Rev*, 2010, 10(2): 173-183
- [4] White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, et al. Malaria. *Lancet*, 2014, 383(9918): 723-735
- [5] 蒋沅岐, 董玉洁, 周福军, 等. 青蒿素及其衍生物的研究进展. 中草药, 2022, 53(2): 599-608
- [6] Schmid G, Hofheinz W. Total synthesis of qinghaosu. *J Am Chem Soc*, 1983, 105(3): 624-625
- [7] Abdin MZ, Israr M, Rehman RU, et al. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Med*, 2003, 69(4): 289-299
- [8] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943
- [9] Judd R, Bagley MC, Li M, et al. Artemisinin Biosynthesis in non-glandular trichome cells of *Artemisia annua*. *Mol Plant*, 2019, 12(5): 704-714
- [10] Duke MV, Paul RN, Elsohly HN, et al. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. *Int J Plant Sci*, 1994, 155(3): 365-372
- [11] Luis MH, Weimin J, Ke Y, et al. AaMYB1 and its orthologue AtMYB61 affect terpene metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2017, 90(3): 520-534
- [12] Shi P, Fu X, Shen Q, et al. The roles of AaMIXTA1 in regulating the initiation of glandular trichomes and cuticle biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytol*, 2018, 217(1): 261-276
- [13] Yan T, Li L, Xie L, et al. A novel HD-ZIP IV/MIXTA complex promotes glandular trichome initiation and cuticle development in *Artemisia annua*. *New Phytol*, 2018, 218(2): 567-578
- [14] Shi P, Fu X, Liu M, et al. Promotion of artemisinin content in *Artemisia annua* by overexpression of multiple artemisinin biosynthetic pathway genes. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2017, 129(2): 251-259
- [15] Ma D, Li G, Alejos-Gonzalez F, et al. Overexpression of a type-I isopentenyl pyrophosphate isomerase of *Artemisia annua* in the cytosol leads to high arteannuin B production and artemisinin increase. *Plant J*, 2017, 91(3): 466-479
- [16] Han JL, Liu BY, Ye HC, et al. Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48(4): 482-487
- [17] Rydén AM, Ruyter-Spira C, Quax WJ, et al. The molecular cloning of dihydroartemisinic aldehyde reductase and its implication in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Planta Med*, 2010, 76(15): 1778-1783
- [18] Mercke P, Crock J, Croteau R, et al. Cloning, Expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 369(2): 213-222
- [19] Cai Y, Jia JW, Crock J, et al. A cDNA clone for β -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2002, 61(5): 523-529
- [20] Berteau CM, Voster A, Verstappen FWA, et al. Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 448(1-2): 3-12
- [21] Picaud S, Brodelius M, Brodelius PE. Expression, purification and characterization of recombinant (E)- β -farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2005, 66(9): 961-967
- [22] Hazra A, Dutta M, Dutta R, et al. Squalene synthase in plants—functional intricacy and evolutionary divergence while retaining a core catalytic structure. *Plant Gene*,

- 2023, 33
- [23] Lu X, Shen Q, Zhang L, et al. Promotion of artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* by over-expressing ADS, CYP71AV1 and CPR genes. *Industrial Crops Products*, 2013, 49: 380-385
- [24] Teoh KH, Polichuk DR, Reed DW, et al. Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Planta Med*, 2009, 87(6): 635-642
- [25] Chang MCY, Eachus RA, Trieu W, et al. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(5): 274-277
- [26] Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, et al. Production of amorpha-4,11-diene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(3): E111
- [27] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532
- [28] Huang JQ, Li DM, Tian X, et al. Side products of recombinant amorpha-4,11-diene synthase and their effect on microbial artemisinin production. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(7): 2168-2178
- [29] Fuentes P, Zhou F, Erban A, et al. A new synthetic biology approach allows transfer of an entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop. *Elife*, 2016, 5: e13664
- [30] van Herpen TWJM, Cankar K, Nogueira M, et al. *Nicotiana benthamiana* as a production platform for artemisinin precursors. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14222
- [31] Malhotra K, Subramanian M, Rawat K, et al. Compartmentalized metabolic engineering for artemisinin biosynthesis and effective malaria treatment by oral delivery of plant cells. *Mol Plant*, 2016, 9(11): 1464-1477
- [32] Saxena B, Subramanian M, Malhotra K, et al. Metabolic engineering of chloroplasts for artemisinic acid biosynthesis and impact on plant growth. *J Biosci*, 2014, 39(1): 33-41
- [33] Lang D, Ullrich KK, Murat F, et al. The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *Plant J*, 2018, 93(3): 515-533
- [34] Ikram NKK, Kashkooli AB, Peramuna A, et al. Insights into heterologous biosynthesis of artemisinin B and artemisinin in *Physcomitrella patens*. *Molecules*, 2019, 24(21): 3822-3835
- [35] De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci*, 2012, 17(6): 349-359
- [36] Shen Q, Yan T, Fu X, et al. Transcriptional regulation of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Sci Bull*, 2016, 61(1): 18-25
- [37] Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, et al. WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(5): 247-258
- [38] Han J, Wang H, Lundgren A, et al. Effects of over-expression of AaWRKY1 on artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. *Phytochemistry*, 2014, 102: 89-96
- [39] Fu X, Peng B, Hassani D, et al. AaWRKY9 contributes to light- and jasmonate-mediated to regulate the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *New Phytol*, 2021, 231(5): 1858-1874
- [40] Ali Z, Sarwat SS, Karim I, et al. Functions of plant's bzip transcription factors. *PAKJAS*, 2016, 53(2): 303-314
- [41] Silveira AB, Gauer L, Tomaz JP, et al. The *Arabidopsis* AtbZIP9 protein fused to the VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. *Plant Sci*, 2007, 172(6): 1148-1156
- [42] Shu G, Tang Y, Yuan M, et al. Molecular insights into AabZIP1-mediated regulation on artemisinin biosynthesis and drought tolerance in *Artemisia annua*. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(3): 1500-1513
- [43] Hao X, Zhong Y, Nutzmans HW, et al. Light-induced artemisinin biosynthesis is regulated by the bZIP transcription factor AaHY5 in *Artemisia annua*. *Plant Cell Physiol*, 2019, 60(8): 1747-1760
- [44] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(3): 998-1009
- [45] 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*. *New Phytol*, 2013, 198(4): 1191-1202
- [46] Wang C, Chen T, Li Y, et al. AaWIN1, an AP2/ERF protein, positively regulates glandular secretory trichome initiation in *Artemisia annua*. *Plant Sci*, 2023, 329: 111602
- [47] Pires N, Dolan L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Mol Biol Evol*, 2010, 27(4): 862-874
- [48] Castelain M, Le Hir R, Bellini C. The non-DNA-binding bHLH transcription factor PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7 is involved in the regulation of light signaling pathway in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 2012, 145(3): 450-460

- [49] Hassani D, Fu X, Shen Q, et al. Parallel transcriptional regulation of artemisinin and flavonoid biosynthesis. [Trends Plant Sci](#), 2020, 25(5): 466-476
- [50] 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*. [Plant Cell Physiol](#), 2014, 55(9): 1592-1604
- [51] Shen Q, Huang H, Xie L, et al. Basic helix-loop-helix transcription factors AabHLH2 and AabHLH3 function antagonistically with AaMYC2 and are negative regulators in artemisinin biosynthesis. [Front Plant Sci](#), 2022, 13: 885622
- [52] Shen Q, Lu X, Yan T, et al. The jasmonate-responsive Aa MYC2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. [New Phytol](#), 2016, 210 (4): 1269-1281
- [53] Zhang Q, Wu N, Jian D, et al. Overexpression of AaPIF3 promotes artemisinin production in *Artemisia annua*. [Industrial Crops Products](#), 2019, 138: 111476
- [54] 刘彻, 姚盼盼, 宋皓, 等. 烟草1R MYB转录因子亚家族鉴定与分析. [植物生理学报](#), 2022, 58(5): 904-918
- [55] Wu Z, Li L, Liu H, et al. AaMYB15, an R2R3-MYB TF in *Artemisia annua*, acts as a negative regulator of artemisinin biosynthesis. [Plant Sci](#), 2021, 308: 110920
- [56] Lv Z, Li JX, Qiu S, et al. The transcription factors TLR1 and TLR2 negatively regulate trichome density and artemisinin levels in *Artemisia annua*. [J Integr Plant Biol](#), 2022, 64(6): 1212-1228
- [57] Deng Y, Li L, Peng Q, et al. Isolation and characterization of AaZFP1, a C2H2 zinc finger protein that regulates the AaIPPI1 gene involved in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. [Planta](#), 2022, 255(6): 122
- [58] He Y, Fu X, Li L, et al. AaSPL9 affects glandular trichomes initiation by positively regulating expression of AaHD1 in *Artemisia annua* L. [Plant Sci](#), 2022, 317: 111172
- [59] Chen TT, Yao XH, Liu H, et al. MADS-box gene AaSEP4 promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. [Front Plant Sci](#), 2022, 13: 982317