



自然科学基金项目进展专栏

评述

灵芝: 一种研究天然药物合成的模式真菌

孙超^①, 胡鸢雷^②, 徐江^①, 罗红梅^①, 李春芳^①, 宋经元^①, 郭红卫^{②*}, 陈士林^{①③*}^① 中国医学科学院, 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;^② 北京大学生命科学学院, 北京 100871;^③ 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

* 联系人, E-mail: hongweig@pku.edu.cn; slchen@implad.ac.cn

收稿日期: 2012-12-09; 接受日期: 2013-03-04

国家自然科学基金重点项目(批准号: 81130069)和教育部长江学者和创新团队发展计划(批准号: IRT1150)资助项目

doi: 10.1360/052012-425

摘要 模式生物在生命科学研究中发挥着核心作用, 缺乏成熟的药用模式生物研究体系已成为阻碍天然药物生物合成研究发展的重要瓶颈. 灵芝是目前研究最深入的药用生物之一, 具有模式生物的鲜明特征: 世代短、子代多、基因组小、培养条件简单、可进行遗传转化、对人体和环境无害等. 灵芝多元化的次生代谢途径使其成为研究天然药物生物合成及其调控的理想模式生物. 近期, 全基因组序列的测定完成为灵芝成为模式生物奠定了坚实的基础. 作为药用模式真菌, 灵芝将在次生代谢产物多样性研究、药用真菌发育生物学及天然药物合成生物学等领域发挥重要作用. 同时, 推广灵芝成为一种新的模式生物将有利于整合现代生命科学的前沿技术和研究策略, 进而深入阐明次生代谢研究领域中具有普遍性的机制和规律, 为建设高效可控的天然药物合成平台奠定基础.

关键词

灵芝

模式生物

天然药物

合成生物学

在生命科学中为了揭示生命现象的一般规律, 回答生命科学的基本问题而被广泛和深入研究的生物称为模式生物(model organisms)^[1,2]. 模式生物在当今生命科学和医学的发展中发挥着重要作用, 迄今为止大部分有关生命过程和机制的研究都是利用模式生物完成的^[3]. 药用生物是对可用于疾病治疗的所有生物的统称. 次生代谢产物是大多数药用生物的主要有效成分, 因此次生代谢产物的合成与调控机制的阐释是药用生物研究的核心问题^[4,5]. 但是由于缺乏成熟可靠的药用模式生物研究体系, 已严重阻碍了次生代谢相关研究的发展.

灵芝(*Ganoderma lucidum*)为担子菌门大型真菌, 是中国传统的名贵中药材, 也是目前研究最为深入的

药用生物之一^[6]. 灵芝拥有模式生物的鲜明特征, 例如, 世代周期短、子代多、基因组小、易于在实验室内培养和繁殖、能够进行遗传转化、对人体和环境无害等^[7]. 同时, 灵芝编码多种次生代谢产物合成途径, 并拥有复杂的次生代谢调控网络, 是研究次生代谢的理想模式生物. 灵芝基因组染色体水平精细图的绘制完成为充分发挥灵芝的模式作用奠定了坚实的基础^[8,9].

1 灵芝药用模式真菌形成的基础与优势

1.1 灵芝的一般生物学研究基础

(i) 灵芝的生长发育研究. 灵芝为大型担子菌,

引用格式: 孙超, 胡鸢雷, 徐江, 等. 灵芝: 一种研究天然药物合成的模式真菌. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 447-456

Sun C, Hu Y L, Xu J, et al. *Ganoderma lucidum*: an emerging medicinal model fungus for study of the biosynthesis of natural medicines. SCIENTIA SINICA Vitae, 2013, 43: 447-456, doi: 10.1360/052012-425

在其有性生殖世代中经历了显著的形态变化. 灵芝的生长发育主要包括 4 个阶段——担孢子、菌丝体、原基和子实体. 灵芝的生长发育周期从担孢子萌发开始, 首先形成单核的初级菌丝, 继而初级菌丝融合形成双核的次级菌丝, 融合的次级菌丝在基质表面扭结形成原基, 原基发育形成成熟的子实体, 子实体弹射新一代担孢子完成世代循环^[10,11](图 1). 灵芝生命周期短, 在人工栽培条件下 3 个月左右可以完成一个有性世代循环, 每个子实体可以产生干重 100 g 以上的担孢子, 子代多有利于发现产生遗传突变的个体.

灵芝的形态建成是一个综合的发育过程. 菌株受环境信号的诱导和自身发育的调节, 经过一系列细胞间或细胞内信号转导事件, 启动灵芝形态建成的决定基因. 灵芝是典型的四极异宗真菌, 灵芝初级菌丝的融合受 2 对交配型座位(A 和 B)的控制^[10]. 座位 A 由一对包含同源异型结构域的转录因子组成, 与线粒体介质蛋白(MIP)紧密连锁^[12,13]. 灵芝交配型

座位 B 包括 6 个费洛蒙编码基因和 7 个费洛蒙受体编码基因. 座位 A 控制锁状结合的形成, 座位 B 控制细胞核的迁移^[8,14]. 灵芝发育受光信号的调控, 不同光质和光强对灵芝的生长发育有显著影响. 例如, 灵芝菌丝在黑暗中生长速度最快, 绿色光质照射下生长速度最慢, 白光照射下灵芝菌丝生物量积累最高^[15]. 灵芝菌丝的分化必须经过 400~500 nm 的蓝光诱导. 在原基期, 当光照强度适度时, 灵芝才可以形成正常的菌盖^[10]. 对于子实体, 经绿色光质处理的灵芝菌盖最厚, 黄色光质处理的灵芝菌盖大但偏薄. 原基期和子实体期的灵芝生长都表现出趋光性^[16,17]. 从原基期开始灵芝菌丝发生显著分化, 根据形态和功能, 可以分为生殖菌丝、骨架菌丝和联络菌丝. 这一时期起, 灵芝可观察到角质化的皮壳层和木栓化的菌肉层. 皮壳层内有树脂质和色素积累, 使灵芝表面具有漆状光泽并呈现各异的颜色^[10]. 与酵母等低等真菌相比, 灵芝在发育过程中经历了显著的形态变化, 使其可以在真菌发育和次生代谢相关性研究中发挥更大的作用.

(ii) 灵芝的发酵与栽培研究. 灵芝易于在实验室内培养, 并能够在实验室条件下完成生命周期是作为模式生物的一个必要条件^[18]. 目前灵芝菌丝的发酵工艺已十分完善^[19]. 与灵芝栽培相比, 菌丝发酵具有培养时间短、条件可控、质量稳定等优点. 碳源^[19]、氮源^[20]、酸碱度^[21]、氧气^[22]、光照^[23]、机械应力^[24]、化学诱导剂^[25,26]等多种因素对灵芝菌丝发酵的影响已得到广泛研究. 目前, 应用二阶段培养法, 灵芝三萜酸总含量可占到灵芝菌丝干重的 4% 以上^[27], 单一化合物 7-乙氧基灵芝酸 O 的含量达到 1.5 g/100 g 菌丝. 7-乙氧基灵芝酸 O 能作为灵芝酸 T 等 II 型灵芝酸的合成前体, 有很高的应用价值^[28]. 通过在培养基中加入外源 Ca^{2+} 离子, 可显著提高发酵菌丝总灵芝酸含量, 进一步推测认为, 外源 Ca^{2+} 信号通过胞内钙调磷酸酶途径影响甲羟戊酸(MVA)途径中关键酶的表达, 从而影响灵芝酸的合成^[29]. 另外, 直接增加 MVA 途径中关键酶的表达量也可以提高发酵菌丝中灵芝酸的含量^[30].

由于灵芝有巨大的经济价值, 野生灵芝难以满足商业和科研的需求^[11], 灵芝的人工栽培技术得到了广泛研究. 在中国大部分地区都可以在温室或大棚内进行灵芝的人工栽培, 椴木栽培和袋料栽培是最主流的 2 种灵芝栽培技术, 包括超过 22 科 42 属

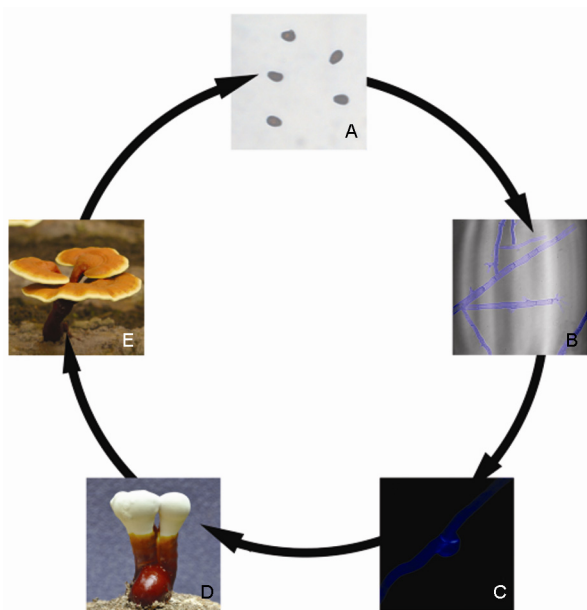


图 1 灵芝的生长发育周期

灵芝的有性世代经历了担孢子、单核菌丝、双核菌丝、原基和子实体等阶段. 灵芝担孢子 A 萌发形成单核菌丝 B, 不同配型的单核菌丝经过质配形成双核菌丝 C, C 中可见清晰的锁状结合, 是双核菌丝的典型特征. 双核菌丝可在培养基质表面积聚扭结形成原基 D, 原基继而发育成为伞状子实体 E. 子实体的子实层存在担孢子, 担孢子内发生核配和减数分裂, 形成新一代担孢子完成世代循环. A: 40×光学显微镜观察结果; B 和 C: calfour white 染色后, 激光共聚焦显微镜 100×油镜观察结果

70 余种木材都适合作为灵芝栽培的木料^[10]. 由于温度、湿度、光照、CO₂ 和氧气浓度都是灵芝子实体形成的重要条件, 因此, 在培养过程中需注意喷水、通气和照明的管理. Sanodiya 等人^[11]提出了灵芝生产的标准条件, 认为出芝前菌丝应在(30±2)℃黑暗中培养; 原基培养时应保持温度(28±2)℃, 湿度 95%, 光照 800 lux, CO₂ 浓度 0.15%; 子实体期根据灵芝发育情况降低温度、湿度和 CO₂ 浓度, 照明条件保持不变. 成熟的室内栽培技术对于构建突变体库和研究灵芝发育和形态建成的相关机制具有重要意义.

1.2 灵芝有效成分的生物合成研究基础

(i) 灵芝有效成分生物合成途径解析. 灵芝在中国被称为“仙草”, 已有两千多年的应用历史. 现代药理学研究表明, 灵芝具有提高免疫力^[31-36]、抗肿瘤^[37-43]、调节血糖血脂^[44-48]、延缓衰老^[49]等多种疗效. 灵芝含有丰富的生物活性成分, 目前已从灵芝中分离得到超过 400 种活性物质, 包括多糖、蛋白质、氨基酸、萜类、甾醇类、生物碱等^[7]. 通过对

灵芝基因组的分析进一步证实, 灵芝具有三萜、倍半萜、聚酮、非核糖体多肽等多条次生代谢合成途径. 灵芝三萜是灵芝的主要活性成分, 目前已从灵芝中分离得到了 150 多种^[50], 它们都是通过 MVA 途径合成的, 羊毛甾醇合酶(LSS)是合成灵芝酸环状骨架-羊毛甾醇的关键酶(图 2). 在 LSS 之前的合成途径中共有 11 种酶参与, 在灵芝中, 乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶(AACT)和法尼基二磷酸合成酶(FPS)含有 2 个拷贝, 其他酶都是由单基因编码的(表 1). 灵芝三萜是高度氧化的羊毛甾醇衍生物, 因此推测有多个细胞色素 P450 单加氧酶(CYP450)参与羊毛甾醇的修饰. 灵芝含有 22 个倍半萜合酶, 这些酶可以以 MVA 途径中的法尼基二磷酸(FPP)为底物, 催化形成环状的倍半萜产物. 多糖是灵芝中另一类主要的活性物质^[57], 主要由水溶性的 1,3-β 和 1,6-β 糖苷组成. 灵芝中含有 2 个 1,3-β 糖苷合酶和 7 个含有 SKN1 结构域的 β-糖苷生物合成相关蛋白, 后者被认为在 1,6-β 糖苷合成中具有重要作用^[58]. 此外, 灵芝基因组还编码 1 个非核糖体多肽合酶、5 个聚酮合酶和 2 个拷贝的真菌免疫球蛋白 LZ-8. LZ-8 已被发现具有抗肿瘤活性和

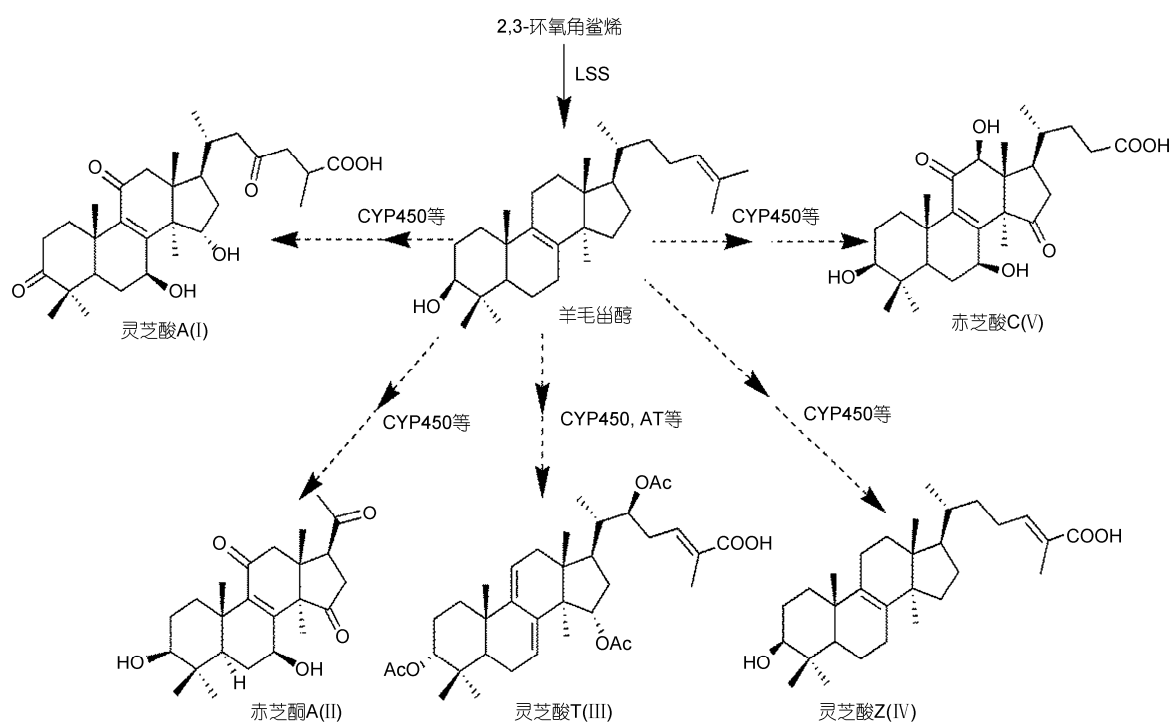


图 2 灵芝三萜的主要类型及其可能的生物合成途径

目前已发现的所有灵芝三萜都是由羊毛甾醇衍生而成的; 图中显示了 5 种灵芝三萜主要类型(I~V)的代表化合物及其可能的生物合成途径; AT: 乙酰基转移酶

表 1 灵芝三萜上游合成途径中的关键酶基因

基因名称	缩写	基因发现方法	文献
乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶基因	<i>AACT1</i>	基因组分析	[8]
	<i>AACT2</i>	基因组分析	[8]
3-羟基-3-甲基戊二酸合成酶基因	<i>HMGS</i>	基因组分析, 同源基因克隆	[8,51]
3-羟基-3-甲基戊二酸还原酶基因	<i>HMGR</i>	基因组分析, 同源基因克隆	[8,52]
甲羟戊酸激酶基因	<i>MK</i>	基因组分析	[8]
磷酸甲羟戊酸激酶基因	<i>PMK</i>	基因组分析	[8]
焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因	<i>MVD</i>	基因组分析, 同源基因克隆	[8,53]
异戊烯基二磷酸异构酶基因	<i>IDI</i>	基因组分析	[8]
法尼基二磷酸合成酶基因	<i>FPS1</i>	基因组分析, 同源基因克隆	[8,54]
	<i>FPS2</i>	基因组分析	[8]
鲨烯合酶基因	<i>SQS</i>	基因组分析, 同源基因克隆	[8,55]
鲨烯单加氧酶基因	<i>SE</i>	基因组分析	[8]
羊毛甾醇合酶基因	<i>LSS</i>	基因组分析	[8,56]

免疫调节活性^[31,59,60]。

在真菌中, 同一条代谢途径的相关基因往往以基因簇(gene cluster)的形式存在。利用 antiSMASH 软件对灵芝全基因组进行扫描, 共发现 17 个潜在的基因簇。在一些基因簇中, 除了代谢途径相关的骨架合成酶和修饰酶外, 有时还含有途径特异性的转录因子和参与次生代谢产物运输的转运子(transporter)。

(ii) 灵芝有效成分的生物合成调控研究。灵芝编码 600 多个转录调控蛋白, 其中包括途径特异性的调控蛋白, 如锌指蛋白家族、广域调控蛋白 Velvet 蛋白家族和 LaeA 蛋白及表观遗传修饰因子等, 表明灵芝具有复杂的多级次生代谢调控网络^[8]。在子囊菌中, Velvet 蛋白和 LaeA 蛋白在次生代谢和真菌发育中具有重要作用, LaeA 和 Velvet 蛋白家族中的 VeA, VelB 形成三聚复合体协同调控子囊菌的次生代谢和子实体发育^[61-63]。灵芝中存在相应的同源蛋白, 其表达与 LSS 正相关, 但功能还需要进一步研究。表观遗传修饰因子在次生代谢调控中也具有重要作用^[64]。在灵芝中发现了 33 个 GCN5 相关蛋白, 15 个 PHD 相关蛋白, 19 个 SET 相关蛋白和 8 个 HDAC 相关蛋白, 这些蛋白是否参与了灵芝次生代谢调控还需进一步研究。

1.3 灵芝基因组学研究基础

(i) 灵芝结构基因组学研究。在分子生物学时代, 基因组序列是模式生物更好地发挥其模式作用的前提和保障^[65]。目前几乎所有的模式生物都已经完成或者正在进行全基因组的测序工作。Chen 等人^[8]利用高通量测序技术对单倍体灵芝的基因组进行了

测序, 并利用光学图谱技术辅助基因组组装, 获得了染色体水平的灵芝基因组精细图, 基于基因组解析结果首次提出将灵芝作为药用模式真菌。测序的灵芝基因组由 13 条染色体组成, 全长 43.3 Mb, 重复序列约占灵芝基因组的 8.15%, 其中主要重复类型为长末端重复序列(LTR), 约占灵芝基因组的 5.42%。灵芝基因组编码 16113 个预测蛋白, 其中包括大量的与次生代谢产物合成及其调控相关的基因, 以及与木质素降解相关的基因。灵芝基因组精细图的完成, 为灵芝功能基因组研究和灵芝三萜等次生代谢产物的合成及调控研究奠定了基础^[8]。

简单重复序列(SSR)是遗传标记最丰富的来源之一, 已被广泛应用于种群遗传学、系统发育学及遗传图谱绘制等研究领域。在灵芝基因组中共发现 2674 个 SSR 位点, 相对丰度为 62 SSR/Mb, 单碱基重复是其最丰富的类型。SSR 分布于所有基因组区域, 非编码区比编码区更丰富。除 3 碱基和 6 碱基重复外, 超过 50%其余种类的 SSR 均分布于基因间区。SSR 相对丰度最高的是内含子区(108 SSR/Mb), 其次为基因间区(84 SSR/Mb)。684 个 SSR 分布于 588 个蛋白质编码基因中, 其中 81.4%为 3 碱基或 6 碱基重复。在这些含有 SSR 的基因中有 28 个基因与生物活性化合物的合成相关, 其中包括 1 个 *HMGR* 基因, 3 个多糖合成相关基因及 24 个 *CYP450* 基因^[9]。

(ii) 灵芝遗传转化体系研究。灵芝易于进行遗传转化。目前, 很多研究组已经展开灵芝遗传转化的研究。Sun 等人^[66]首次利用电击法, 以灵芝原生质体为受体, *bar* 基因为选择标记基因, 成功将香菇 GDP 启动子驱动下的报告基因 *GUS* 和 *GFP* 基因转入灵芝。

李刚等人^[67]利用 PEG 介导法, 以潮霉素抗性基因作为选择标记, 将报告基因 *GUS* 转到灵芝原生质体中, 转化频率为 5~6 个转化子/10⁷ 个原生质体. Shi 等人^[68]用农杆菌介导侵染灵芝的原生质体, 并用灵芝的内源 GDP 启动子驱动报告基因, 以潮霉素为抗性标记基因, 获得了转基因灵芝. 转化效率为 200 个转化子/10⁵ 个原生质体. Xu 等人^[30]利用突变的灵芝琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, *sdhB*)基因作为选择标记基因, 用除草剂萎锈灵(carboxin)作为筛选压力, 提高了转基因灵芝的安全性. 灵芝的遗传体系的初步建立, 为开展灵芝功能基因组学研究提供了有力的技术支撑.

(iii) 灵芝功能基因组学研究. 目前, 灵芝的功能基因组学研究主要集中在灵芝三萜合成途径相关酶的克隆和鉴定方面. 在灵芝全基因组测序完成之前, 灵芝三萜合成上游途径中编码 *HMGS*^[51], *HMGR*^[30,52], *MVD*^[53], *FPS*^[54], *SQS*^[55]和 *LSS*^[56]的基因已经通过同源基因扩增的方式进行了克隆和鉴定(表 1). 基因组测序完成也为从超基因家族中筛选参与灵芝三萜合成的修饰酶提供了条件. 例如, 灵芝中包含 219 个 *CYP450* 编码基因^[8], 分属于 42 个家族, 其中 22 个 *CYP* 编码基因是假基因, 除 *CYP51* 已被克隆和鉴定外^[69], 大部分灵芝 *CYP450* 功能未知. 根据与 *LSS* 的共表达分析, 及与其他参与甾醇类物质修饰的真菌 *CYP450* 的进化分析, 筛选出 16 个可能参与灵芝三萜合成的 *CYP450* 基因^[8], 这些 *CYP450* 的功能验证正在进行中. 此外, Joo 等人^[70]克隆了灵芝漆酶基因 *GLlac1*, 该酶参与了灵芝对木质素的降解过程. 随着灵芝基因组精细图的完成和灵芝转化体系的进一步完善, 使得通过基因缺失和 RNAi 等反向遗传学技术研究和鉴定灵芝功能基因变得更具可行性, 从而加速灵芝功能基因组学研究的进程.

2 药用模式真菌灵芝的应用前景

2.1 担子菌发育与次生代谢协同作用研究

灵芝是具有复杂形态建成和高度细胞分化的大型药用真菌, 其主要活性成分灵芝三萜的含量随着灵芝的发育过程而发生明显的改变, 在菌丝阶段的含量很低, 在原基期含量最高, 而到子实体期灵芝三

萜含量大约是原基期的一半. 此外, 灵芝三萜的种类在灵芝发育过程中也存在显著的变化, 例如, 菌丝阶段的灵芝三萜主要是 3 α 取代灵芝酸, 而在原基期和子实体期的灵芝三萜主要是 3 β 取代和 3 位羰基取代的灵芝酸^[19]. 令人感兴趣的是, 催化 2,3-环氧角鲨烯环化形成灵芝三萜骨架的 *LSS* 在灵芝发育过程中的表达变化与灵芝三萜含量的变化呈现高度的正相关性, 这种关联进一步证明灵芝三萜合成相关基因的表达与灵芝发育存在协同作用, 并受到严格调控^[8]. 因此, 灵芝是研究高等担子菌发育与次生代谢协同作用的理想模式系统.

由于缺乏有效的模式系统, 在担子菌中, 发育与次生代谢相关性研究进展缓慢. 目前关于真菌发育与次生代谢协同作用的信息主要来源于对子囊菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的研究. 在构巢曲霉中, *LaeA* 蛋白与 Velvet 蛋白家族的 2 个成员 *VelB* 和 *VeA* 形成三聚体, 在真菌的发育和次生代谢调控中发挥核心作用^[57]. 已发现的 Velvet 家族成员共有 4 个, 分别是 *VeA*, *VelB*, *VosA* 和 *VelC*. 在灵芝中已经发现了 Velvet 蛋白家族所有成员和 *LaeA* 蛋白的同源基因, 但是这些蛋白质在灵芝生长发育和次生代谢调控中的作用还有待于进一步的研究. 灵芝基因组精细图的完成和灵芝转化体系的建立, 有助于利用反向遗传学策略鉴定这些调控蛋白在灵芝体内的功能, 进而为揭示灵芝发育与次生代谢协同作用的分子机制奠定基础(图 3).

2.2 次生代谢产物多样性的形成和演化研究

次生代谢产物虽然种类繁多, 但是其合成途径具有一定的保守性, 都是通过有限的前体或模块合成的. 次生代谢产物多样性产生的主要来源包括: (i) 参与次生代谢的酶有多个拷贝, 不同的酶可以催化相同的底物产生不同的产物^[71,72]; (ii) 酶的产物专一性不强, 即同一个酶可以催化相同的底物合成多个不同的产物^[73]; (iii) 酶的底物专一性不强, 即同一个酶可以利用多种底物产生多个不同的产物^[74,75].

灵芝含有丰富的次生代谢产物, 为次生代谢产物多样性的形成和演化研究提供了有利条件. 例如, 目前已从灵芝基因组中发现了 20 余种倍半萜合酶基因, 推测骨架合成酶的多样性是灵芝倍半萜多样性产生的主要原因. 根据对来源于 *Coprinus cinereus*^[76,77]和 *Omphalotus olearius*^[78]的倍半萜合酶研究发现, 产

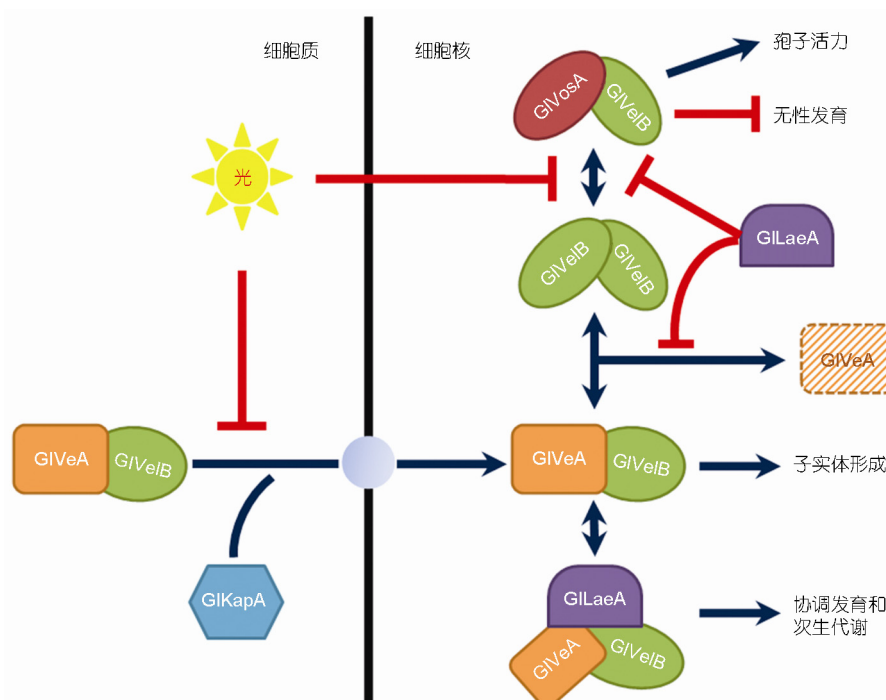


图3 Velvet 蛋白在灵芝发育和次生代谢中可能的作用机制

根据子囊菌中 Velvet 蛋白家族的研究结果^[63]和灵芝中发现的 Velvet 相关蛋白, 提出了 Velvet 蛋白在灵芝发育和次生代谢中可能的作用机制, 作为进一步研究的框架和蓝图. 在暗培养时, VeA/VelB 二聚体在 KapA 蛋白的辅助下进入细胞核, 光抑制这一进程. VeA/VelB 二聚体可以促进真菌的有性发育, 也可与 LaeA 形成三聚体协调真菌次生代谢与发育. 另一方面, VeA 降解后 VelB 可形成二聚体, VelB 进一步与 Velvet 蛋白家族另一成员 VosA 形成二聚体抑制真菌的无性生长. LaeA 可抑制 VeA 的降解及 VosA/VelB 二聚体的形成

物专一性差也是真菌倍半萜多样性产生的重要原因. 灵芝含有 150 多种灵芝三萜, 它们都是由共同的环状骨架羊毛甾醇修饰产生的, 因此灵芝三萜的多样性主要是由于 CYP450 等修饰酶的种类和功能的多样性造成的. 由于基因组重复、缺失和突变及基因水平转移等因素造成的次生代谢相关酶的种类和功能多样性是次生代谢产物多样性的遗传基础. 近来次生代谢多样性的起源和演化研究正逐步成为国内外研究的热点. 例如, Li 等人^[79]发现, 非种子植物 *Selaginella moellendorffii* 同时拥有种子植物和微生物类的萜类合酶, 揭示植物萜类合酶可能具有多个进化起源. Nelson 和 Werck-Reichhart^[80]更是提出了以 CYP450 为中心的植物代谢进化研究策略. 由于真菌基因组较小, 目前已测序的真菌基因组的数量远大于植物, 并且两者之间测序数量差距正在迅速扩大, 真菌已积累了丰富的次生代谢相关基因资源, 因此, 与植物相比, 真菌更适用于对次生代谢的起源和进化的系统研究.

2.3 合成生物学和创新性药物的生产平台

作为模式生物的灵芝将会受到更多研究者的关注, 从而推动对灵芝自身的生理、生化及功能基因组学研究, 为合成生物学研究提供丰富的调控元件和合成酶基因. 此外, 由于模式生物的遗传背景最为清晰, 目前所有的底盘细胞都来源于模式生物. 灵芝因含有丰富的药理活性成分而被誉为“治疗性真菌生物工厂”(therapeutic fungal biofactory)^[49], 有可能通过基因组改造和删除使其成为高效合成某些次生代谢产物的底盘系统.

目前次生代谢产物生物合成相关研究进展缓慢, 仅有紫杉醇、青蒿素等少数次生代谢途径得到了较为详尽的研究^[5,81,82]. 灵芝次生代谢途径及其调控元件的解析也将为其他药用生物中合成生物学相关元件的发掘提供借鉴, 丰富合成生物学的元件和模块库, 解决目前天然药物合成生物学研究中相关元件极端匮乏的困境, 为构建天然药物的生物合成技术平台奠定基

础. 利用该平台一方面可以大规模生物合成已有的天然药物, 另外也可以通过重构和改造天然药物的生物合成途径, 为创新性药物的研发提供新化合物.

3 灵芝模式真菌研究体系的完善与展望

灵芝固有的生物学特征和较好的研究基础使其已具备成为模式生物的基本条件, 但是要充分发挥灵芝的模式作用, 还有赖于对灵芝自身生物学的进一步研究. 灵芝基因组精细图的完成, 为开展灵芝功能基因组学研究奠定了良好的基础, 灵芝遗传转化体系的进一步完善也将为定点突变、基因删除和突变体库构建等主流生物学技术的引入创造条件. 此外, 现有灵芝属分类体系还存在着较多争议, 加之目前中国灵芝种质资源比较混乱, 这给灵芝研究带来了许多困扰. 因此, 建立灵芝模式生物的标准株并推广

应用, 是使灵芝药用模式真菌研究走向标准化和规范化的重要步骤.

模式生物研究策略将会改变目前天然药物合成研究中研究对象分散凌乱的局面, 整合领域的优势力量对模式生物进行重点研究, 一方面可以揭示有关次生代谢的普遍规律, 另一方面可以将先进的现代生命科学技术引入到天然药物合成研究中, 提升该领域的整体研究水平. 目前, 分离得到的大多数天然产物来源于植物, 因此, 作为药用真菌的灵芝, 其模式作用受到一定的限制. 此外, 次生代谢产物种类繁多, 针对不同类别的代谢途径可能需要不同的模式生物. 随着研究的逐步深入, 将会需要更多的药用模式生物. 模式生物研究策略已经在多个生物学领域获得了令人瞩目的成果, 成熟的药用模式生物研究体系的建立将为天然药物合成研究注入新的活力, 推动该领域进入一个高速发展的阶段.

参考文献

- Hunter P. The paradox of model organisms. *EMBO Rep*, 2008, 9: 717–720
- Davis R H. The age of model organisms. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 69–76
- 朱作言. 模式生物研究. *生命科学*, 2006, 18: 419
- 陈士林, 孙永珍, 徐江, 等. 本草基因组计划研究策略. *药学报*, 2010, 45: 807–812
- 陈士林, 朱孝轩, 李春芳, 等. 中药基因组学与合成生物学. *药学报*, 2012, 47: 1070–1078
- Boh B, Berovic M, Zhang J, et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev*, 2007, 13: 265–301
- Zhou X W, Su K Q, Zhang Y M. Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93: 941–963
- Chen S, Xu J, Liu C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat Commun*, 2012, 3: 913
- Qian J, Xu H, Song J, et al. Genome-wide analysis of simple sequence repeats in the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Gene*, 2013, 512: 331–336
- 林志彬. 灵芝的现代研究. 3 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2007. 25–198
- Sanodiya B S, Thakur G S, Baghel R K, et al. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10: 717–742
- Lee S C, Ni M, Li W, et al. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74: 298–340
- Ni M, Feretzaki M, Sun S, et al. Sex in fungi. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 405–430
- Raudaskoski M, Kothe E. Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. *Eukaryot Cell*, 2010, 9: 847–859
- 王立华, 陈向东, 王秋颖, 等. LED 光源的不同光质对灵芝菌丝体生长及抗氧化酶活性的影响. *中国中药杂志*, 2011, 18: 2471–2474
- 郝俊江, 陈向东, 兰进. 光质对灵芝生长与灵芝多糖含量的影响. *中国中药杂志*, 2010, 17: 2242–2245
- 郝俊江, 陈向东, 兰进. 光质对灵芝生长及抗氧化酶系统的影响. *中草药*, 2011, 12: 2529–2534
- Montagnes D, Roberts E, Lukes J, et al. The rise of model protozoa. *Trends Microbiol*, 2012, 20: 184–191
- Xu J W, Zhao W, Zhong J J. Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 457–466
- Fang Q H, Zhong J J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem Eng J*, 2002, 10: 61–65
- Fang Q H, Zhong J J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem*, 2002, 37: 769–774
- Tang Y J, Zhong J J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma*

- polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 32: 478–484
- 23 Zhang W, Tang Y J. A novel three-stage light irradiation strategy in the submerged fermentation of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* for the efficient production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. *Biotechnol Prog*, 2008, 24: 1249–1261
- 24 Gong H G, Zhong J J. Hydrodynamic shear stress affects cell growth and metabolite production by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Chin J Chem Eng*, 2005, 13: 426–428
- 25 Liang C X, Li Y B, Xu J W, et al. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86: 1367–1374
- 26 Zhu L W, Zhong J J, Tang Y J. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem*, 2008, 43: 1359–1370
- 27 Zhang W X, Tang Y J, Zhong J J. Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010, 33: 683–690
- 28 Wang J L, Gu T, Zhong J J. Enhanced recovery of antitumor ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia by novel chemical conversion strategy. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 754–762
- 29 Xu Y N, Zhong J J. Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Adv*, 2012, 30: 1301–1308
- 30 Xu J W, Xu Y N, Zhong J J. Enhancement of ganoderic acid accumulation by overexpression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase gene in the basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 7968–7976
- 31 Kino K, Mizumoto K, Sone T, et al. An immunomodulating protein, Ling Zhi-8 (LZ-8) prevents insulinitis in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*, 1990, 33: 713–718
- 32 Lin Z B. Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *J Pharmacol Sci*, 2005, 99: 144–153
- 33 Gao Y, Tang W, Dai X, et al. Effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. *J Med Food*, 2005, 8: 159–168
- 34 Chen X, Hu Z P, Yang X X, et al. Monitoring of immune responses to a herbal immuno-modulator in patients with advanced colorectal cancer. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6: 499–508
- 35 Ji Z, Tang Q, Zhang J, et al. Immunomodulation of bone marrow macrophages by GLIS, a proteoglycan fraction from Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. *Int J Med Mushrooms*, 2011, 13: 441–448
- 36 Tsai C C, Yang F L, Huang Z Y, et al. Oligosaccharide and peptidoglycan of *Ganoderma lucidum* activate the immune response in human mononuclear cells. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 2830–2837
- 37 Sliva D. *Ganoderma lucidum* in cancer research. *Leukemia Res*, 2006, 30: 767–768
- 38 Wang S Y, Hsu M L, Hsu H C, et al. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer*, 1997, 70: 699–705
- 39 Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Res*, 2002, 22: 3309–3318
- 40 Cao Q Z, Lin Z B. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 833–838
- 41 Li C H, Chen P Y, Chang U M, et al. Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sci*, 2005, 77: 252–265
- 42 Xu T, Beelman R B, Lambert J D. The cancer preventive effects of edible mushrooms. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12: 1255–1263
- 43 Wu Q P, Xie Y Z, Deng Z, et al. Ergosterol peroxide isolated from *Ganoderma lucidum* abolishes microRNA miR-378-mediated tumor cells on chemoresistance. *PLoS ONE*, 2012, 7: e44579
- 44 Liu J, Shiono J, Shimizu K, et al. Ganoderic acid DM: anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 2154–2157
- 45 Zheng J, Yang B, Yu Y, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides exert anti-hyperglycemic effect on streptozotocin-induced diabetic rats through affecting beta-cells. *Comb Chem High T Scr*, 2012, 15: 542–550
- 46 Lee S Y, Rhee H M. Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*: inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38: 1359–1364
- 47 Hajjaj H, Mace C, Roberts M, et al. Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 3653–3658
- 48 Kim S D. Isolation and structure determination of a cholesterol esterase inhibitor from *Ganoderma lucidum*. *J Microbiol Biotechnol*, 2010,

20: 1521–1523

- 49 Paterson R R M. *Ganoderma*—a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1985–2001
- 50 李晔, 朱忠敏, 姚渭溪, 等. 灵芝三萜类化合物的研究进展. *中国中药杂志*, 2012, 2: 165–171
- 51 Ren A, Ouyang X, Shi L, et al. Molecular characterization and expression analysis of G1HMGs, a gene encoding hydroxymethylglutaryl-CoA synthase from *Ganoderma lucidum* (Ling-zhi) in ganoderic acid biosynthesis pathway. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 29: 523
- 52 Shang C H, Zhu F, Li N, et al. Cloning and characterization of a gene encoding HMG-CoA reductase from *Ganoderma lucidum* and its functional identification in yeast. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72: 1333–1339
- 53 Shi L, Qin L, Xu Y, et al. Molecular cloning, characterization, and function analysis of a mevalonate pyrophosphate decarboxylase gene from *Ganoderma lucidum*. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 6149–6159
- 54 Ding Y X, Ou-Yang X, Shang C H, et al. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a farnesyl-diphosphate synthase gene from the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72: 1571–1579
- 55 Zhao M W, Liang W Q, Zhang D B, et al. Cloning and characterization of squalene synthase (SQS) gene from *Ganoderma lucidum*. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17: 1106–1112
- 56 Shang C H, Shi L, Ren A, et al. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a lanosterol synthase gene from *Ganoderma lucidum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74: 974–978
- 57 Diamantopoulou P, Papanikolaou S, Kapoti M, et al. Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: screening various mushroom species. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 167: 536–551
- 58 Kurita T, Noda Y, Yoda K. Action of multiple endoplasmic reticulum chaperon-like proteins is required for proper folding and polarized localization of Kre6 protein essential in yeast cell wall beta-1,6-glucan synthesis. *J Biol Chem*, 2012, 287: 17415–17424
- 59 Lin Y L, Liang Y C, Tseng Y S, et al. An immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- κ B and MAPK pathways. *J Leukocyte Biol*, 2009, 86: 877–889
- 60 Wu C T, Lin T Y, Hsu H Y, et al. Ling Zhi-8 mediates p53-dependent growth arrest of lung cancer cells proliferation via the ribosomal protein S7-MDM2-p53 pathway. *Carcinogenesis*, 2011, 32: 1890–1896
- 61 Bayram O, Krappmann S, Ni M, et al. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 2008, 320: 1504–1506
- 62 Bayram O S, Bayram O, Valerius O, et al. LaeA control of Velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1001226
- 63 Bayram O, Braus G H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the Velvet family of regulatory proteins. *Fems Microbiol Rev*, 2012, 36: 1–24
- 64 Williams R B, Henrikson J C, Hoover A R, et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem*, 2008, 6: 1895–1897
- 65 Shimamoto K, Kyojuka J. Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 399–419
- 66 Sun L, Cai H, Xu W, et al. Efficient transformation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Plant Mol Biol Rep*, 2001, 19: 383–384
- 67 李刚, 王强, 刘秋云, 等. 利用 PEG 法建立药用真菌灵芝的转化系统. *菌物学报*, 2004, 23: 255–261
- 68 Shi L, Fang X, Li M, et al. Development of a simple and efficient transformation system for the basidiomycetous medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28: 283–291
- 69 方星, 师亮, 徐颖洁, 等. 灵芝甾醇 14 甾醇脱甲基酶基因的克隆及超量表达对三萜合成的影响. *菌物学报*, 2011, 30: 242–248
- 70 Joo S S, Ryu I W, Park J K, et al. Molecular cloning and expression of a laccase from *Ganoderma lucidum*, and its antioxidative properties. *Mol Cells*, 2008, 25: 112–118
- 71 Ornston L N, Yeh W K. Origins of metabolic diversity: evolutionary divergence by sequence repetition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 3996–4000
- 72 Yeh W K, Ornston L N. Origins of metabolic diversity: substitution of homologous sequences into genes for enzymes with different catalytic activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 5365–5369
- 73 Wilfried S. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, 2003, 62: 837–849
- 74 Erich G. Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 57–62
- 75 Kittendorf J D, Sherman D H. The methymycin/pikromycin pathway: a model for metabolic diversity in natural product biosynthesis. *Bioorgan Med Chem*, 2009, 17: 2137–2146
- 76 Agger S, Lopez-Gallego F, Schmidt-Dannert C. Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol*

- Microbiol, 2009, 72: 1181–1195
- 77 Lopez-Gallego F, Agger S A, Abate-Pella D, et al. Sesquiterpene synthases Cop4 and Cop6 from *Coprinus cinereus*: catalytic promiscuity and cyclization of farnesyl pyrophosphate geometric isomers. *Chembiochem*, 2010, 11: 1093–1106
- 78 Wawrzyn G T, Quin M B, Choudhary S, et al. Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in Basidiomycota. *Chem Biol*, 2012, 19: 772–783
- 79 Li G, Köllner T G, Yin Y, et al. Nonseed plant *Selaginella moellendorffii* has both seed plant and microbial types of terpene synthases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 14711–14715
- 80 Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J*, 2011, 66: 194–211
- 81 Keasling J D. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metab Eng*, 2012, 14: 189–195
- 82 Chang M C, Eachus R A, Trieu W, et al. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 274–277

***Ganoderma lucidum*: an Emerging Medicinal Model Fungus for Study of the Biosynthesis of Natural Medicines**

SUN Chao¹, HU YuanLei², XU Jiang¹, LUO HongMei¹, LI ChunFang¹, SONG JingYuan¹,
GUO HongWei² & CHEN ShiLin^{1,3}

1 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2 School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

3 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Model organisms play critical roles in life science. At present, lack of mature model systems is one of the major bottlenecks that hinder the study of the biosynthesis of natural medicines. *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*) is one of the most widely studied medicinal organisms and has the general features of model organisms: short life cycle, ability to produce large number of progenies, small genome size, easy to culture and genetically transform, and no harm for human being and the environment. In addition, *G. lucidum* involves multiple biosynthetic pathways of secondary metabolites, making it an ideal model to study the biosynthesis of secondary metabolites and their regulations. Recently, the elucidation of the chromosome-level genome has laid the solid foundation for further application of *G. lucidum* as a medicinal model organism. *G. lucidum* is supposed to play important roles in the study on the diversity of secondary metabolites, development of medicinal fungi and synthetic biology of natural medicines. In addition, the proposal of *G. lucidum* as a medicinal model fungus will greatly contribute to introducing state-of-the-art technologies and strategies of modern life sciences into the study of medicinal organisms and uncovering the common mechanisms and principles in the biosynthesis of secondary metabolites, thus paving the way for the construction of effective and controllable biosynthetic platform of natural medicines.

***Ganoderma lucidum*, model organism, natural medicine, synthetic biology**

doi: 10.1360/052012-425