



中药活性成分生物合成研究及应用

马莹, 赵瑜君, 马晓晶, 郭娟*, 黄璐琦*

中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室, 北京 100700

* 联系人, E-mail: guojuanzy@163.com; huangluqi01@126.com

收稿日期: 2021-11-03; 接受日期: 2022-02-11; 网络版发表日期: 2022-05-23

国家自然科学基金(批准号: 81822046, 82003904)、国家重点研发计划(批准号: 2020YFA0908000)、中央本级重大增减支项目(批准号: 2060302)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(批准号: ZZ13-YQ-083-A1)资助

摘要 中药活性成分是中药发挥药效的物质基础, 也是创新药物的来源, 主要提取自药用植物。但植物中药用活性成分含量低、结构类似物多、分离纯化困难等因素限制了中药活性成分的深入研究及开发应用。挖掘中药活性成分生物合成过程中的关键催化元件, 解析其生物合成途径, 不仅对探讨中药成药性机制、道地性形成具有重要指导意义, 也为通过现代生物技术方法, 进一步可持续开发和利用中药活性成分奠定基础。本文将重点阐述中药活性成分生物合成途径的研究思路及重点研究方向, 并从其合成生物学与代谢工程两个方向的应用进行探讨, 为中药活性成分的开发利用提供新的思路, 推动中医药现代化研究。

关键词 中药活性成分, 生物合成元件, 生物合成途径, 中药活性成分细胞工厂, 合成生物学, 药用植物代谢工程

中药资源是中药产业和中医药传承发展的基础, 是国家的战略性资源。中药活性成分是中药发挥药效的物质基础, 也是创新药物的来源, 如抗疟药物青蒿素等。第四次全国中药资源普查表明, 85%以上的中药来源于药用植物, 其中大部分中药活性成分是栽培或野生药用植物的次生代谢产物, 在植物的特定组织部位以及特定的生长阶段积累。受气候环境的影响, 中药活性成分含量不稳定, 且植物中结构类似物多、分离纯化困难等问题, 严重制约了中药活性成分的进一步开发利用, 因此迫切需要利用现代科技手段寻求新的解决方式。

随着新药开发及中药产业发展对单体活性成分的需求增大, 中药资源正面临大宗常用资源短缺、珍稀

濒危资源被破坏等诸多问题。国家“十四五”发展规划对社会、经济、环境发展提出了新目标, 对中药资源开发利用也提出了新要求, 指出绿色可持续发展将是中药资源发展的方向。同时, 随着人类基因组测序的完成, 生命科学进入了后基因组时代, 随之产生的新技术、新方法, 如合成生物学、基因编辑、空间组学技术、单细胞测序等推动了中医药现代化和国际化的进程。

中药活性成分主要来源于萜类、生物碱、苯丙素类等植物次生代谢产物, 其积累具有较强的时空特异性, 比如丹参酮作为丹参的主要活性成分之一, 主要在丹参的根中积累。同时这也与中药特定的药用部位以及中药道地性息息相关。因此, 研究中药活性成分

引用格式: 马莹, 赵瑜君, 马晓晶, 等. 中药活性成分生物合成研究及应用. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 894–907

Ma Y, Zhao Y J, Ma X J, et al. Biosynthetic pathway of active components in traditional Chinese medicine and its application (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 894–907, doi: [10.1360/SSV-2021-0401](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0401)

在药用植物中的合成及调控对探讨中药成药性机制、道地性成因具有重要意义. 通过中药活性成分形成机制研究, 一方面为利用代谢通路元件在微生物中重构代谢途径, 实现高效可控异源生产提供前提, 另一方面为药用植物代谢工程改良、药用植物栽培驯化奠定基础. 基础研究与开发应用相结合, 将成为实现中药资源可持续开发利用的重要途径之一(图1).

1 中药活性成分生物合成途径解析及路径设计

具有明确药理药效作用的中药活性成分主要包括萜类、苯丙素类、生物碱等, 比如丹参酮类化合物是二萜、人参皂苷是三萜、黄芩素是苯丙素类、延胡索乙素和汉防己甲素等是苜基异喹啉类生物碱. 这些化合物是植物体内主要的次生代谢产物类型, 也称为天然产物. 据统计, 美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)批准上市的药物超过49.2%与天然产物的结构或信息相关^[1]. 植物次生代谢产物是不同植物在长期进化过程中为应对不同的环境变化而产生的, 与植物的环境适应性密切相关^[2]. 其中, 萜类化合物和苯丙素类广泛存在于不同的科、属、种, 生物碱的积累范围相对较窄, 比如异喹啉类生物碱仅存在于毛茛目^[3].

植物次生代谢产物的生物合成大体分为上游共同前体形成、下游结构形成及结构修饰三个过程, 在植物中以初生代谢产物为前体, 通过不同的代谢途径生成, 其类型众多、结构复杂. 但是这些看似复杂的化学结构间却存在着一定的关联, 大多经过一个简短的上游共同前体形成途径生成一些重要的中间体, 再在

包括细胞色素P450(cytochrome P450, P450)、糖基转移酶(UDP-glycosyltransferase, UGT)等后修饰酶的催化下生成结构多样的产物. 萜类化合物以3-磷酸甘油醛、乙酰辅酶A、丙酮酸为前体, 通过甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA pathway)和位于质体中的甲基赤藓醇-4-磷酸途径(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, MEP pathway)产生萜类的共同前体IPP, DMAPP, GPP, FPP, GGPP等^[4,5]. 不同结构的萜类化合物在植物体内通过萜类合酶(terpene synthase, TPS)、P450、酰基转移酶(acyltransferase, AT)、UGT等的催化作用生成结构多样的萜类活性成分^[4-6]. 苯丙素类化合物主要以L-苯丙氨酸和L-酪氨酸为前体, 经过短暂的共同途径生成不同类型苯丙素类的中间体, 包括4-香豆酰辅酶A、查尔酮、黄烷酮、二氢黄酮醇等, 其中聚酮合酶(polyketide synthase, PS)、P450、酮戊二酸氧化酶(Fe^{2+} /2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, 2ODD)、UGT、甲基转移酶(methyltransferase, MT)等在产生苯丙素类化合物结构多样性过程中发挥了重要作用^[7]. 与萜类化合物以及苯丙素类化合物生物合成不同的是, 生物碱以不同的氨基酸为前体, 比如单萜吲哚生物碱以L-色氨酸和GPP为前体, 异喹啉类生物碱以L-酪氨酸为前体, 烟碱和莨菪碱等以鸟氨酸为前体, 在生物碱的生物合成过程中, P450、MT、还原酶(reductase)、脱羧酶(decarboxylase)等参与其结构形成和结构修饰过程^[8](图2).

上游前体形成过程在不同的植物中相对保守, 随着基因组测序、转录组测序等技术的提升和成本的下降, 上游途径在不同的药用植物中已经研究得很透彻. 药用活性成分是一些前体化合物在不同的药用植物中经过不同的结构修饰所产生的活性各异的化合物, 这

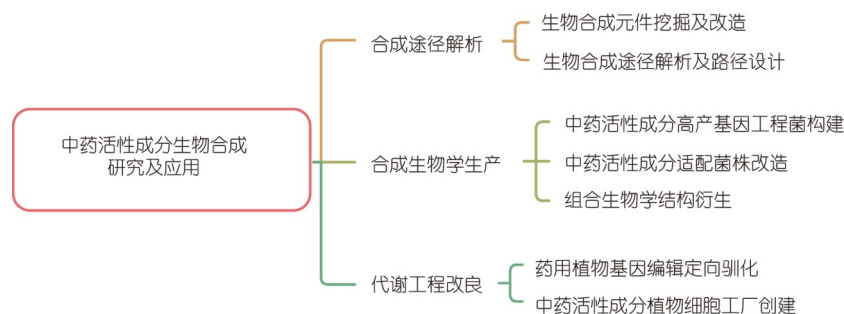


图1 中药活性成分生物合成研究及应用方向(网络版彩图)

Figure 1 Research and its application of biosynthetic pathway of active components in traditional Chinese medicine (color online)

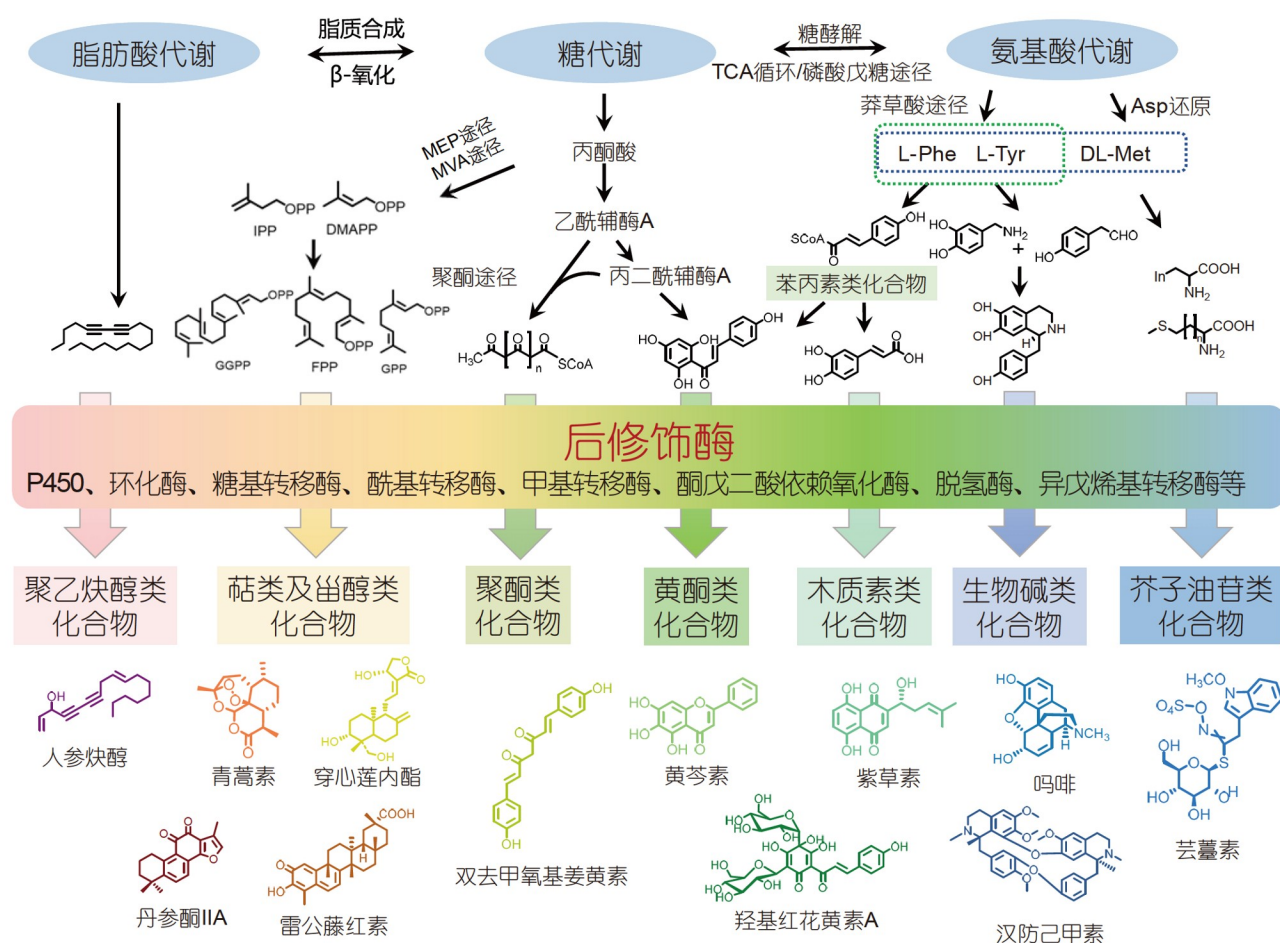


图2 中药活性成分生物合成途径

Figure 2 Biosynthetic pathway of active components of traditional Chinese medicine

些不同类型的结构修饰是药用植物药效差异的关键。解析其后修饰过程是研究药效物质形成的基础,为合成生物学及代谢工程改良生产药用植物活性成分提供元件和途径。

1.1 基于组学数据的酶挖掘和功能研究

中药活性成分生物合成途径十分复杂,往往涉及到几个甚至几十个酶的参与。不同于微生物生物合成途径的酶大多在基因组上成簇存在,植物次生代谢途径的基因经过植物基因组的复制和“新功能化”,大多分散在植物基因组中,即使在基因组中成簇,也是在较大的范围内成簇,因此针对植物次生代谢途径生物元件的挖掘具有一定的难度。由于植物次生代谢途径基因大多以基因家族存在,比如在植物次生代谢途径

中参与度非常高的细胞色素P450酶,在丹参基因组中有340个^[9],而参与到丹参酮生物合成途径中的可能不超过10%,因此对于未有研究过的途径进行分析很大程度上依赖于精确的候选基因筛选。

基因测序技术的加速、检测灵敏度的提升、组学分析技术的发展,为药用植物中活性成分生物合成途径解析提供了更高效的分析筛选手段。大多数情况下,药用活性成分的积累与基因表达成正相关,通过比较组学分析,能有效缩小候选基因范围,获得有效候选基因。以丹参酮为例,丹参酮的积累在丹参毛状根中受生物和非生物因子诱导表达上调,通过对不同诱导时间段的代谢组以及转录组进行比较分析,发现参与丹参酮生物合成的萜类合酶基因表达上调,基于此筛选到40个诱导表达上调的P450基因,进一步结合时空

表达分析, 筛选得到可能与丹参酮生物合成相关的多个基因^[10], 利用体外酶促结合体内RNA干扰研究发现, 其中CYP76AH1^[11,12], CYP76AH3和CYP76AK1能够催化丹参酮碳骨架结构生成C环酮基化的中间代谢产物^[13], CYP71D373和CYP71D375能够催化丹参酮特征五元呋喃环的形成^[9]. 这种基于比较时空组学分析的基因筛选策略在药用活性成分生物合成研究中应用非常广泛^[14,15]. 植物RNA干扰或者基于CRISPR的基因敲除为候选基因的筛选提供了另一种有效途径, 通过对同源性较高的CYP71D家族基因型进行RNA干扰实验, 结果表明, 在RNA干扰株系中, 目标亚基因家族的4个基因表达量都有不同程度的下降, 代谢物检测发现其中含有呋喃环的丹参酮类化合物积累下调, 而不含呋喃环的代谢物显著积累, 通过这一方法成功获得丹参酮生物合成途径呋喃环形成的关键催化酶, 并且基因组共线性分析也表明, 这些基因是丹参属中特有, 赋予丹参特有的药效活性^[9].

1.2 酶改造和定向进化提升酶催化效率

近年来, 中药活性成分尤其是一些具有明确药理活性天然产物的生物合成途径解析广受关注, 生物合成途径中有越来越多的生物元件被挖掘, 其功能得以解析, 为药用植物次生代谢研究提供了思路和方法参考. 随着数据的不断增多, 越来越多的研究表明, 次生代谢途径生物元件具有广泛的催化混杂性, 包括底物杂泛性或者催化位点杂泛性, 导致植物中次生代谢网络的形成^[13]. 如穿心莲中的一个糖基转移酶具有非常宽泛的杂泛性, 能催化26种不同类型的底物(二萜及其衍生物、黄酮类化合物, 以及一些简单的芳香族化合物)形成*O*-, *S*-, *N*-等糖苷^[16]. 这种催化杂泛性, 一方面产生了复杂的药用植物代谢网络, 生成结构多样的小分子化合物, 但是另一方面, 酶的专一性较差影响了目标代谢物的生成和积累, 因此基于结构生物学的酶理性结构改造成为近几年的研究热点. 通过对丹参酮生物合成途径两个同源性70%左右的P450进行序列比对分析、分子对接以及点突变改造, 成功将两个基因的功能整合至一个P450中, 显著提升了催化效率^[17]. 另一方面, 酶的改造很大程度上依赖于对酶蛋白结构及其催化机制的了解, 通过解析蛋白结构, 对关键氨基酸残基进行改造, 从而改造酶的催化特性, 拓宽其开发应用价值^[18]. 但是蛋白质组的全面结构解析是后

基因组时代的一个重要挑战, 截至目前, 仅有35%的人类蛋白质结构被登记到蛋白质数据库(PDB数据库), 不同蛋白的表达、纯化、数据收集处理还需要克服诸多障碍. 所幸的是, 2021年8月DeepMind公司在其前期工作的基础上公布了AlphaFold2人工智能系统及其源代码^[19], 其蛋白三级结构预测的准确性和精度进一步提升, 在一定程度上解决了一些难以获得晶体的蛋白的建模难题, 推动基于结构-功能相关性的结构改造和提升.

自然界中生命无时无刻不在进化发展, 但是一个新性状的稳定遗传需要相当长的时间. 随着基因工程技术的不断发展, 科学家可以通过实验室模拟和加速自然进化, 并设计高通量筛选方法来获得目标性状. 2018年, 弗朗西斯·阿诺德因酶的定向进化获得诺贝尔化学奖, 阿诺德的实验室通过酶的进化演化, 产生能够催化自然界不存在的化学反应, 利用进化的力量解决化学问题^[20]. 植物次生代谢的酶在微生物中的表达和功能往往受限, 而随着结构生物学和计算生物学的发展, 越来越多的酶结构被解析、海量数据集出现、量子化学理论及方法的不断完善、机器学习等人工智能的应用等, 人们对酶蛋白序列及其结构与功能关系有了更深入的认识, 辅助于计算机的模拟计算可以对酶进行重新设计, 并预测突变蛋白的表达、稳定性、活性等特性, 通过这样理性的设计计算以及有针对性的建库和筛选, 实现了酶的半理性设计^[21,22]. 研究者通过利用定向进化技术与晶体结构解析以及理论计算设计的组合, 解析了柠檬烯环氧化物水解酶的催化特异性与立体选择性的催化机制^[23]; 改造了糖基转移酶的区域选择性, 将杂泛性糖基转移酶定向改造为具有催化位点特异性的酶^[21]. 计算生物学和计算化学的发展和应用将为酶的定向进化提速, 从而获得目标更明确的酶, 以应用到植物天然产物的生成和结构改造中.

1.3 合成途径解析及途径设计

药用活性成分在植物中的合成经过一系列酶的催化产生目标产物, 除了人参皂苷、 β -榄香烯等部分小分子化合物的完整合成途径已经被解析^[24,25], 大多数药用活性化合物的完整合成途径仍然不明确. 青蒿素前体物质青蒿酸虽然已经实现了合成生物学方式的工业化生产, 但从青蒿酸到青蒿素的合成过程是否有酶的参与, 是哪类酶发挥作用仍然不明确^[26]. 紫杉醇生

物合成的19步途径中仍然有多步未被解析, 导致合成生物学生产的工作始终无法开展, 其生物合成途径的解析备受全球关注^[27]. 因此在未来一段时间之内, 生物合成途径的解析仍然会是中药活性成分生物合成研究应用的瓶颈. 转录组和基因组数据提供了丰富的基因元件, 全自动克隆挑选系统的应用为高通量筛选提供了平台, 但是针对大多数代谢产物的高通量检测技术还非常有限, 限制了高通量筛选平台的应用, 这是需要重点攻克的难题. 随着科技投入的增加, 越来越多的课题投入到相关的研究中, 这将加快推动该项技术的进步, 促进生物合成途径解析速度的提升.

不断产生的组学数据和被验证了功能的基因同时也为计算生物学方法设计生物合成路径提供了数据和基础. 2015年, *Science*发表了有关阿片类化合物的生物合成途径全解析的文章, 涉及20多个步骤, 研究人员从数据库中挖掘了跨越植物、微生物、动物不同物种的生物元件, 完成蒂巴因(thebaine)的21步催化过程和氢可酮(hydrocodone)的23步催化过程^[28], 并在酵母中实现了途径重构, 该研究被评为当年十大科学进展, 这种复杂代谢途径的解析以及重构被认为是合成生物学的里程碑事件. 2021年, 该团队利用计算生物学的方法, 基于文献检索、专利检索、计算预测来挖掘活性结构化合物, 并预测筛选合成活性结构化合物的高效催化酶, 成功完成了四氢巴马汀((S)-tetrahydropalmatine)的合成及结构衍生^[29]. 不断验证的功能基因为计算生物学提供基础数据库, 而基于大数据、计算生物学、人工智能的相结合的元件筛选、途径解析将在中药活性成分形成机制研究中发挥越来越重要的作用.

由于次生代谢途径中酶的催化混杂性, 产生一系列结构类似的化合物, 增加了目标化合物分离提取的难度以及生产成本, 因此有必要明确植物体内的合成及调控机制. 虽然用计算生物学方法在一定程度上能帮助解析药用活性成分的生物合成途径, 但是在植物体内, 途径解析和代谢网络搭建对了解合成过程以及更好地在植物中调控目标化合物的生成具有重要意义. 在异源重构的过程中, 正确的路径对于合成生物学途径创建具有重要的参考价值, 因此通过元件挖掘, 结合植物体内RNA干扰、过表达、基因编辑等方法, 利用高灵敏检测技术对植物体内代谢物的系统全面分析, 解析生物合成途径, 能帮助人们更好地了解代谢物的合成及调控, 为代谢工程改良以及合成生物学生产

提供基础和指导.

2 中药活性成分合成生物学生产

中药活性成分在药用植物中大多以次生代谢产物的形式积累, 含量相对较低, 如人参皂苷作为传统名贵中药人参的主要次生代谢产物, 近年来陆续有研究表明, 不同结构修饰的人参皂苷类化合物具有多种药理活性, 但不同人参皂苷在人参中含量各异. 含量低、结构类似物多等问题导致中药活性成分分离纯化困难、获取成本高, 在一定程度限制了中药活性成分的深入开发利用. 因此, 来源稳定、质量均一的获取方式是中药活性成分深入开发的一个重要前提. 近20年迅速发展起来的合成生物学为中药活性成分提供了新的、可持续获取的有效策略. 通过生物合成途径解析, 在微生物中重构中药活性成分的生物合成途径, 调控代谢流, 优化发酵条件能实现中药活性成分的高效绿色生产. 结合合成生物学以及化学转化, 研究者们已经实现了青蒿素的细胞工厂生产^[30], 酵母中阿片类化合物的生成^[31]等里程碑式成果; 构建了鼠尾草酸^[32]、人参皂苷^[24,33]、大麻素类化合物^[34]等一系列工程菌株, 通过在微生物中高效生产中药活性成分或其前体化合物, 将有效缓解中医临床用药的压力.

2.1 中药活性成分高产基因工程菌的构建

中药活性成分合成生物学菌株的构建主要是在成分代谢途径清晰的基础上, 根据底盘细胞自身的代谢和蛋白修饰特点, 在底盘菌内实现已有代谢途径的修饰并引入外源基因进行途径重构. 外源基因的引入和底盘细胞的改造修饰使工程菌的生物合成形成相互交错的动态代谢网络, 需从整体上对其代谢网络进行引流和调控优化, 从而实现目标中药活性成分的高效生物合成.

目前用于中药活性成分合成生物学菌株构建比较常用的底盘细胞有酿酒酵母和大肠杆菌, 这两种底盘细胞遗传背景清晰、遗传转化体系成熟、可用操作工具多、生长迅速. 但是通常情况下, 这些底盘细胞中积累次生代谢产物前体的功能较弱, 因此提升前体供给是中药活性成分高产基因工程菌构建的基础. 通过筛选多种植物及微生物来源的基因元件, 进行高拷贝强启动表达, 是中药活性成分工程菌构建的基本策略.

另外, 过表达反应所需辅酶合成途径, 增加其转运效率, 补全底盘菌缺陷型, 抑制竞争途径等是提高前体积累的常用策略^[35]. 在松香烷型二萜的前体物质次丹参酮二烯工程菌的构建中, Zhou等人^[36]通过过表达萜类上游途径关键酶基因和构建融合蛋白, 将丹参酮以及雷公藤内酯的碳骨架结构——次丹参酮二烯的产量提高到365 mg/L. Hu等人^[37]进一步利用CRISPR/Cas9技术修饰萜类上游合成途径, 敲除竞争支路基因, 并筛选多物种来源的松香烷型二萜合酶, 将次丹参酮二烯产量提高到3.5 g/L.

由于一些次生代谢中间产物具有细胞毒性或者存在反馈调节, 影响菌体增长和产物积累, 通过构建融合蛋白^[36]或者蛋白支架^[38], 能一定程度上调节代谢流, 进而提高产量. 左旋龙脑是具有抗炎和镇痛作用的单萜类中药活性成分, 冰片基焦磷酸合酶(CbTPS1)是其生物合成途径中的关键合成酶, Ma等人^[39]从梅片树中鉴定了高度特异性的CbTPS1, 并经过设计截短和添加Kozak序列对CbTPS1进行改造, 同时与ERG20WW融合以增强通往CbTPS1的代谢流, 使左旋龙脑在酵母中的产量提高了96.33倍. 此外, 针对途径中蛋白的动态调控也能防止有毒代谢物的积累^[40], 引入可以检测和响应代谢物的传感器, 可以有效实现这一动态调控. 然而, 针对不同代谢物的传感器在很大程度上是未知的. Dahl等人^[40]应用全基因组转录阵列来识别响应有毒中间体积累的启动子, 利用这些启动子控制中间体的积累, 并提高目标产物的最终产量, 消除了对昂贵诱导剂的需求, 改善了菌体生长情况.

目前, 通过微生物生产高价值化合物大多在细胞质中完成, 但合成过程多存在竞争途径阻碍目标化合物在细胞质中的有效合成, 并且有相当多的中药活性成分具有抗菌活性, 导致微生物基因工程菌构建过程中化合物产量提升困难. 真核细胞通过利用细胞器隔离生化途径以控制其代谢的复杂性, 受此启发, 研究者们采用叶绿体、过氧化物酶体、脂滴等亚细胞器作为外源基因表达和蛋白催化的场所. 在酵母过氧化物酶体中构建香叶基二磷酸衍生化合物的微工厂, 能够使产量较胞质中增加125倍, 成功将乙酰辅酶A转化为具有高商业价值的单萜、单萜吡啶生物碱和大麻素类化合物, 使过氧化物酶体工程成为生产类异戊二烯类化合物的有效策略^[41]. 中国科学院天津工业生物技术研究所与中国中医科学院中药资源中心合作开展人参

皂苷酵母工程菌的构建过程中, 通过利用脂滴膜蛋白将关键酶靶向至脂滴, 在细胞内建立生物反应区室, 显著提高了人参皂苷前体PPD的生产效率, 以三七中人参皂苷CK生成模块为例进行转化, 获得CK产量高达5 g/L的工程菌, 为稀有人参皂苷的获取提供了高效策略^[24]. 代谢途径的亚细胞器定位不仅可以避免细胞溶质因子的串扰, 还可以将细胞毒性产物隔离, 使代谢物底物和产物实现跨过氧化物酶体膜的自由流动, 在(S)-牛心果碱和下游途径苜蓿基异喹啉生物碱产量提升中取得显著效果^[42], 呈现出具有代谢工程所需特征的工程细胞器的潜力.

2.2 适合中药活性成分积累的底盘菌构建

结构后修饰酶通过对天然产物进行修饰, 使中药天然成分的结构更加多样, 从而提高了成功筛选获得中药活性成分的概率. 结构后修饰酶发挥催化功能过程中, 需要大量基因供体、辅助因子或在细胞中的特定部位表达等, 因此, 结构后修饰酶在底盘细胞的高效表达是中药活性成分生物合成研究的重点和难点. 在针对中药活性成分底盘菌的构建中, 研究者们通过代谢工程提高前体供给, 扩展后修饰酶底物谱, 增强后修饰酶的立体选择性, 提高辅因子产量等方法改良后修饰酶在底盘细胞的表达情况, 加速了中药活性成分合成生物学的研究进程.

中药活性成分生物合成后修饰中常见多个P450的连续催化反应^[43], 据统计93%的萜类化合物需要经过P450酶的修饰^[44]. 在中药活性成分底盘菌构建中, 常遇到P450酶表达稳定性差、辅因子消耗快等问题, 是合成生物学研究中尚未有效解决的关键问题. 除了针对P450蛋白本身进行定向进化改造, 缩短催化路径、提高反应效率外^[17], 关于辅助因子的研究也为改善其催化效率提供了思路. Liu等人^[45]对P450蛋白结合的铁血红素的生物合成途径进行工程改造, 显著提高了酵母细胞中的铁血红素水平, 这是辅助酵母细胞质P450蛋白形成催化性结构和发挥功能的潜在策略. NADPH是大多P450s发挥功能的辅助因子, 在催化过程中的消耗量极高, 其在细胞中的快速再生可以通过P450s和醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)的级联反应实现, 这种联合表达策略在天然萜类樟脑的氧化中取得了有效成果, 使樟脑的转化率增加了5倍^[46].

2.3 组合生物学产生结构衍生化合物

中药天然产物是药物研发的物质基础,但大多数天然产物还需经过提高药效、降低毒性等成药性改造。例如,木脂素五味子丙素具有保肝和降低转氨酶的作用,其结构衍生物联苯双酯的活性强于五味子丙素,因此被开发成新药;进一步将其中一个羧酸酯还原成羟甲基以提高其溶解性,从而被开发成用于降低转氨酶的药物双环醇。基于现代生物催化技术改造中药天然产物,结合合成生物学的绿色低碳生产方式,能有效提升植物天然产物的成药性,推动植物天然产物生物合成和合成生物学生产的转化应用,为中药活性成分的成药性改造提供新的策略^[47]。

糖基化通常用于改善苷元的特性,例如溶解度、稳定性和药理活性。丹参酮IIA是一种具有显著抗动脉粥样硬化活性的中药活性化合物,增加其水溶性和生物利用度有助于对其进行成药性开发。通过微生物转化对丹参酮IIA进行糖基化修饰,能够使其在甲醇-水溶液中的溶解度较改造前升高50倍,并显著改善其在小鼠体内的口服吸收率^[48]。甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)是一种具有多种药理作用和生物活性的五环三萜疏水苷元,利用大肠杆菌表达系统纯化出GA糖基化的生物催化剂蛋白,将GA转化为相应的GA-3-O-单葡萄糖,能使其溶解度和抗菌生物活性显著提高。这表明重组糖基转移酶等蛋白有可能被用作工业和药物用途中糖基化的生物催化剂,用于组合生物学生产活性更优、利用度更佳的结构衍生化合物^[49]。甲基化则通常可以改善化合物的脂溶性,从而改善其活性。Cui等人^[50]利用组合生物学方法和合成生物学相结合,筛选到两个能催化黄芩素甲氧基化的酶,活性研究表明,黄芩素甲氧基化后显著提升其抑制癌细胞生长的活性,且对正常细胞没有毒性,为中药活性成分生物合成研究的应用提供了新思路。

生物合成途径中酶催化的杂泛性导致植物中结构类似产物产生,但结构上的微小差异往往导致化合物活性的消失甚至毒性的产生,并且目标活性化合物与副产物结构和理化性质极为相似,对目标活性产物的提取分离造成了极大的困难,严重阻碍了其原材料的获取和成药开发。合成生物学研究可以在微生物中组装构建目标产物单一合成路径,从而减少副产物的生成。同时,与关键蛋白的定向改造技术相结合,能减轻

或去除蛋白催化的杂泛性,在细胞工厂内生产结构单一、提取分离简便的目标活性产物。研究者们利用合成生物学技术成功衍生了结构多样、性质改良的生物活性分子和潜在新药。随着药学、酶学和生物信息学等研究的快速发展,合成生物学技术在新型天然产物的发现、活性天然分子的成药性改良和绿色生产等方面将发挥不可替代的作用。

3 代谢工程改良

微生物细胞工厂已实现了诸多中药活性成分的高效合成,但仍然存在高耗能、高耗氧、P450酶表达性差、对次生代谢产物耐受性差等问题。相比之下,植物底盘细胞有其优越性,仅以二氧化碳和水为原料,经光合作用就可合成各种复杂的次生代谢产物,同时,植物底盘细胞本身复杂分区化、不同器官分工协作也为实现复杂人工设计提供了可能。因此药用植物代谢工程成为了获得高价值中药活性分子的另一种选择。

代谢工程技术是通过基因工程技术改变代谢流,或扩展、重构代谢途径以获得高产量、高纯度的药用活性成分的方法。有些次生代谢产物药理活性强但毒副作用较大,通过代谢工程技术改善其生物活性,有望制造出具有新的或改进的生物学特性的全新分子。与此同时,考虑到植物体内各种影响目标产物合成与分解的遗传因素、环境因子都可能会影响代谢流中化合物的积累,所以通过基因工程技术对代谢途径进行改造成为代谢工程最有效的手段,目前常用的策略包括增强关键酶的表达或活性,调节调控因子的表达,促进代谢产物的跨膜转运,抑制代谢竞争路径或削弱代谢产物的反馈抑制。

针对酶基因常用的基因工程手段有基因过表达、基因共表达、RNAi、VIGS等。2012年CRISPR/Cas9基因编辑技术的出现,对近10年的生命科学研究及应用产生了深远影响,并获得了2020年的诺贝尔化学奖。2016年,中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞研究团队在小麦中建立了基于CRISPR/Cas9瞬时表达基因组编辑系统^[51],之后考虑到生物安全问题,又通过体外组装核糖核蛋白复合体RNP建立了全程无外源DNA的基因组编辑系统^[52]。2019年报道了一种新型的Cas蛋白(Cas12a/Cpf1)扩展了基因编辑所依赖的Cas蛋白的种类^[53]。最近,中国科学家利用基因编辑实现了

四倍体野生水稻的快速驯化^[54]。基因编辑技术的应用缩短了作物的驯化周期, 推动了创新作物的诞生, 为生长周期长的药用植物提供了技术平台。

3.1 基因编辑定向驯化

基因编辑技术是一种可以精准实现定向遗传改良的现代生物技术, 在三大类型(I型、II型和III型)中, II型系统CRISPR/Cas9设计简单, 并且迅速推广到各种植物的研究中^[55], 包括拟南芥^[56]、烟草^[57]、水稻、小麦、玉米等^[58]。一方面用于目标基因的功能研究, 另一方面用于优良性状的快速建立。另外, CRISPR/Cas9也可以实现对多个靶位点或多个基因的同时定点修饰^[59-62]。不断更新的基因编辑技术, 为遗传操作尚不成熟的药用植物改良提供了诸多的工具和选择。

在次生代谢产物研究方面, CRISPR/Cas9技术主要用于研究植物体外系统的生物合成潜力, 通过关闭竞争途径, 最终将代谢通量转向目标化合物的生产。通过敲除丹参毛状根*RAS*基因获得的纯合突变体中, 迷迭香酸和丹酚酸B含量显著降低, 而杂合突变体中含量降低不明显^[63]。通过敲除丹参*SmCPSI*基因阻断了GGPP的代谢通量, 从而阻断丹参酮的生物合成, 由于丹参酮和紫杉醇具有相同的前体(GGPP), 研究者们认为GGPP在理论上可以作为其他有价值的二萜生物合成的来源, 如紫杉醇^[64]。研究者通过敲除罂粟的4'*OMT2*基因使吗啡和蒂巴因含量显著降低, 并产生了一种新的苜基异喹啉类生物碱^[65]。在定向育种方面, 育种家利用连续回交结合分子标记辅助选择策略培育了各种抗性水稻品种, 但该策略培育周期长、背景选择随世代提高, 进而会因为连锁累赘等导致出现不利表型。近些年, 基因编辑技术逐渐被应用于作物的生产实践, 该技术可以快速改良作物的农艺性状。2013年, 研究者们利用CRISPR技术对水稻香味基因*Os-BADH2*进行定点敲除, 获得了香稻*osbadh2*突变体^[66], 对水稻直链淀粉含量相关基因*OsWaxy*进行定点敲除, 创建了糯性水稻资源^[67]。基因组编辑CRISPR/Cas9辅助的性状改良与自然驯化相比, 具有快速、精准、经济等优点, 但需要建立可行的基因组编辑技术体系, 获取完整的基因组序列信息以及确定重要农艺性状形成的关键基因及其调控机理。2021年3月, 李家洋院士团队联合国内外多家单位研究人员通过组装异源四倍体高秆野生稻基因组, 优化遗传转化体系, 结合多维基

因组学和多靶点精准基因组编辑技术, 获得高度显著降低、籽粒长度显著增加的突变体, 绘制了异源四倍体野生稻从头驯化的“蓝图”, 使作物驯化时间呈现“跳跃式”前进^[54]。药用植物栽培种植大多是野生抚育, 没有驯化的过程, 因此难以形成稳定的品种, 基于基因编辑的驯化研究能为药用植物品种构建提供支撑。

3.2 植物细胞工厂构建

生物反应器除了上文提到的大肠杆菌和酵母外, 昆虫哺乳动物细胞或植物细胞也常作为生物工厂, 用于大规模生产人类使用的疫苗和药用蛋白^[68]。从对外源蛋白的加工修饰来说, 哺乳动物细胞是较为理想的表达系统, 已被应用于数百种药用蛋白的生产^[69], 但哺乳动物细胞培养的条件不易掌握, 容易污染, 所以对资金和技术都有一定的要求。而随着植物基因工程的发展和转基因技术的不断进步, 人们已成功实现了植物疫苗和植物源性抗体的表达, 植物作为生物反应器已经受到了越来越多的科研机构 and 商业公司的青睐^[70]。

植物生物反应器利用植物细胞、组织、器官或整株植株, 大量生产具有重要功能的蛋白质, 如疫苗、抗体或次生代谢产物等^[71]。相比于以上单细胞培养系统, 植物通过光合作用产生能量, 代表了未来代谢工程可持续发展的方向。植物反应器最大的优势是经济成本低, 仅为微生物发酵培养的2%~10%, 动物细胞培养生产成本的0.1%~1%^[72]。植物的可食性让其表达的医疗或者药用蛋白可以被直接口服, 且植物不会携带人类或动物的病原微生物, 种植简单, 更易大规模生产, 但是现阶段很难回答哪种植物作为底盘细胞是最好的。模式植物拟南芥研究基础好且资源极其丰富, 是基因组学和基因工程中植物模型的首选^[73], 在受控条件下最容易转化和生长, 优势十分显著, 但它缺乏充足的生物量。因此多数重组蛋白生产的表达系统往往选择生物量相对较大、容易转化且易于操作的模式植物烟草。大量其他植物种类(如水稻、玉米、小麦、大豆、马铃薯、番茄、莴苣和生菜等)也逐渐被用来生产重组蛋白。

目前我国植物生物反应器的研究和利用还主要集中在利用模式植物表达或生产药用蛋白的研究和应用方面, 而由于药用植物遗传转化体系不成熟, 利用代谢调控及代谢工程等技术对植物进行遗传改造, 进而大

量生产有用的植物次生代谢产物的研究还相对薄弱。已有的报道仅限于在药用植物组织培养体系中进行代谢调控,或利用烟草等遗传转化成熟的植物作为生物反应器来合成中药活性成分。常用的代谢工程改良策略包括:增强关键酶的表达或活性,调节调控因子的表达,促进代谢产物的跨膜转运,抑制代谢竞争路径或削弱代谢产物的反馈抑制,以及次生代谢物区室化。理论上,单独或者联合使用这些策略,都可以促进药用植物中目标产物的生物合成,提高其产量,但在实际应用中,关键酶基因的过量表达应用较多。例如,2004年,在药用植物天仙子发状根中同时过表达两个关键酶基因*PMT*和*H6H*,将其中东莨菪碱含量提升到野生对照组的9倍,达到了411 mg/L^[74]。将青蒿素代谢途径关键酶基因*FPS*导入青蒿中,青蒿素含量提高了40%^[75]。在丹参毛状根中过表达萜类生物合成限速酶*HMGR*基因,其丹参酮含量是对照组的4.2倍^[76]。抑制代谢竞争路径也能显著提升目标化合物积累,通过下调影响青蒿素生物合成的竞争支路上的关键基因 β -石竹烯合成酶(*CPS*)、 β -法呢基焦磷酸合成酶(*BFS*)和角鲨烯合成酶(*SQS*),使青蒿素含量提升达70%^[77]。另一方面,利用烟草等遗传转化体系成熟的植物作为异源合成载体生产中药活性成分也有报道,2016年,Fuentes等人^[78]将青蒿素生物合成的核心途径整合到烟草叶绿体基因组中,同时将辅助基因整合到核基因组,最终获得120 mg/kg青蒿酸。2019年,Schultz等人^[79]将编码针叶树醇和依托泊苷元途径的16个基因在烟草叶片中瞬时表达,其去氧鬼臼毒素积累达4.3 mg/g干重。虽然目前利用植物生物反应器生产次生代谢产物的例子屈指可数,但随着对重要生物活性代谢物的生物合成所涉及的复杂植物代谢网络的进一步了解,以及对支配次生代谢的调控系统的更深入的了解,植物生物反应器的研究和应用前景将越来越广阔。

4 总结与展望

中药活性成分主要是植物次生代谢产物,种类繁多,广泛参与植物的生长、发育和防御等生理过程,对植物自身在复杂环境中的生存和发展起到了重要作用。同时,次生代谢产物向人类提供了大量有用的天然有机化合物,占有治疗药的1/3以上。然而,中药活性成分在原植物中含量较低,加之药用植物大多生长缓

慢或在实验室条件下无法培养,影响了中药活性成分的开发和利用。随着测序技术、高分辨检测技术、合成生物学技术的发展,通过解析中药活性成分生物合成途径,利用合成生物学方法构建微生物细胞工厂,或者通过代谢工程手段进行遗传改良,为药用活性成分的获取提供了新方式。同时,中药活性成分作为中药发挥药效的物质基础,对其合成及代谢网络的了解,有助于人们更清晰地了解药效形成及道地性形成的机制,推动中医药现代化研究。

从2006年报道利用酵母基因工程菌生产青蒿素至今,中药活性成分生物合成及相关研究取得了突破进展,丹参酮(图3)^[9,11,13]、人参皂苷^[80]、雷公藤甲素^[81]、乌头碱^[82]等中药活性成分生物合成逐渐得以解析。同时,基因组测序手段的提升以及成本的下降,释放了大量用于基因筛选的遗传资源,也为合成生物学相关研究提供了丰富的元件库。然而,现阶段虽然已有大量的研究报道,但是显著性成果屈指可数,具有特殊催化功能的酶的发现及其催化机制的研究依然具有一定的难度,生物合成途径被完全解析的仍然不多。大量数据的积累一方面为酶的筛选以及利用组合生物学生成结构修饰新产物提供了丰富的元件,但也加大了筛选的难度。因此高通量筛选手段、全自动克隆系统、高通量检测技术等研发非常有必要。另外,通过多组学多维度的比较分析,或者依托人工智能等进行计算设计能有效助推催化酶的筛选和改造。总之,新方法新技术的发展将更快推动中药活性成分生物合成途径的解析。

基于合成生物学技术的微生物基因工程菌的构建已经初显成效,青蒿素、人参皂苷酵母的细胞工厂生产成本已经能与植物提取相抗衡,但对于具有细胞毒性的化合物比如冰片、合成途径冗长的化合物比如吗啡、紫杉醇等,实现微生物生产还有一定的距离。亚细胞器工程、蛋白质工程等对产量的提升有一定成效,另外不断开发应用的新底盘细胞,比如解脂耶氏酵母、甲醇酵母、绿藻等的使用^[83,84],为中药活性成分细胞工厂构建提供了新的选择。相关底盘基因编辑工具的开发将为在新型底盘细胞中构建中药活性成分合成途径奠定坚实的基础。

药用植物的代谢工程改良是中药活性成分生物合成途径研究的另一个应用方向,但也正是由于植物细胞代谢的特殊性、植物次生代谢途径的复杂性,以及

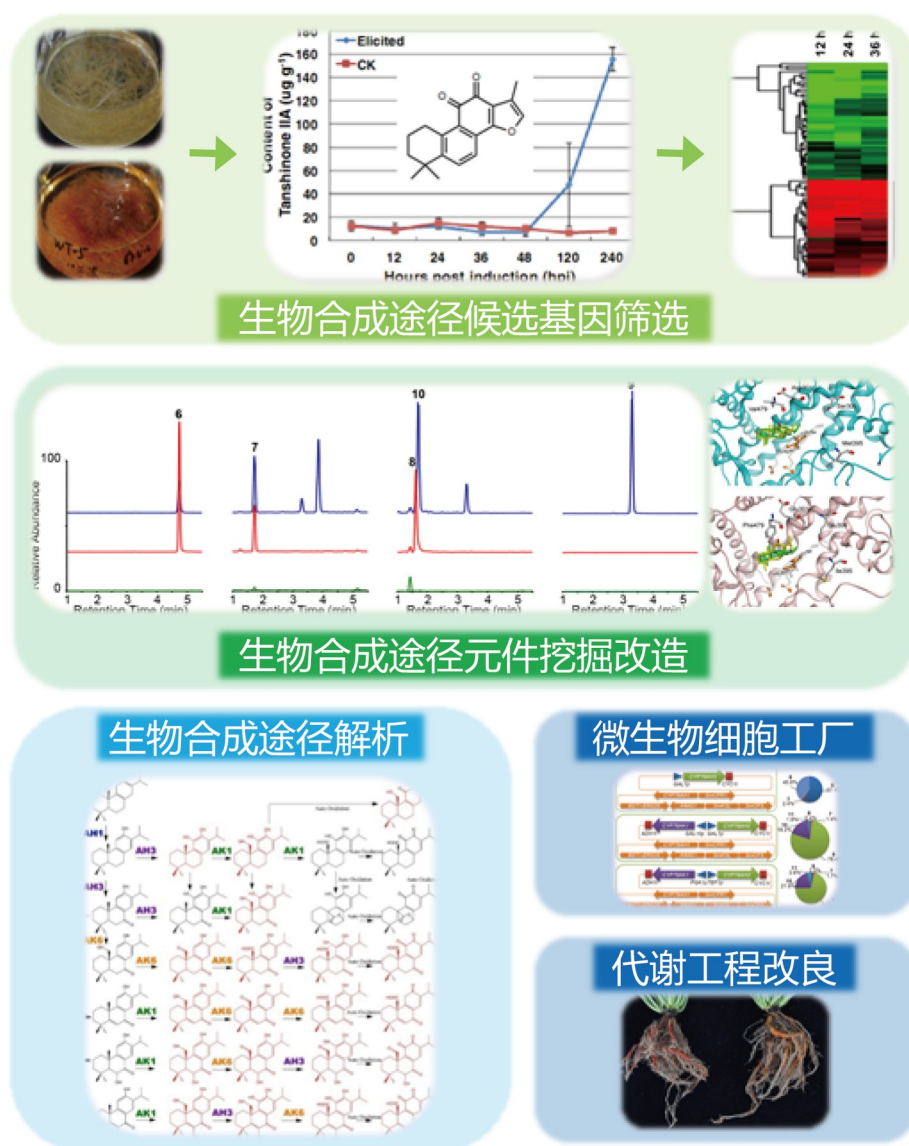


图 3 丹参酮生物合成研究及其合成生物学与代谢工程应用

Figure 3 Biosynthetic pathway analysis of tanshinones and its application in synthetic biology and metabolic engineering

植物生物反应器(植物细胞、组织、器官或植株)的选择问题, 建立大规模、可持续的次生代谢产物生产过程, 仍有许多瓶颈问题。例如, 大多数次生代谢产物的生物合成途径尚未完全解析, 已被解析的次生代谢产物的生物合成调控机制尚不十分清楚, 合成途径中间体不易获取导致关键基因鉴定受阻等, 这些问题都影响着代谢工程研究的进程。药用植物代谢工程改良还面临的另一个挑战是遗传转化和基因编辑难度大, 大多数药用植物遗传转化尚未实现, 未来基因编辑是植

物改良的重要方向, 但是建立在遗传转化的基础上, 因此加大投入提前技术储备非常必要。更高效基因编辑工具的开发, 将为植物底盘的构建以及药用植物代谢工程改造提供技术支出和平台。

中医药是我国古代文明的瑰宝, 在新冠疫情防控中发挥重要作用。随着国家对科技投入以及对中医药的重视, 越来越多的交叉学科开始关注中医药领域。习近平主席在中国中医科学院成立60周年贺信中强调, 中医药振兴发展迎来了天时、地利、人和的大好

时机. 中医药科研工作者唯有抓住机遇、迎接挑战, 通过生物技术、生命科学和计算科学等的交叉融合与团队协作, 共同促进中医药传承创新发展, 共同推动中医药的现代化和国际化.

参考文献

- 1 Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*, 2020, 83: 770–803
- 2 Chen X Y. Plant secondary metabolism (in Chinese). *World Sci Tech R & D*, 2006, 28: 1–4 [陈晓亚. 植物次生代谢研究. 世界科技研究与发展, 2006, 28: 1–4]
- 3 Yang L, Yang C, Li C, et al. Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants. *Sci Bull*, 2016, 61: 3–17
- 4 Hu Z, Liu X, Tian M, et al. Recent progress and new perspectives for diterpenoid biosynthesis in medicinal plants. *Med Res Rev*, 2021, 41: 2971–2997
- 5 Laule O, F rholz A, Chang H S, et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6866–6871
- 6 Li J L, Luo X D, Zhao P J, et al. Post-modification enzymes involved in the biosynthesis of plant terpenoids (in Chinese). *Acta Bot Yunnan*, 2009, 31: 461–468 [李军玲, 罗晓东, 赵沛基, 等. 植物萜类生物合成中的后修饰酶. 云南植物研究, 2009, 31: 461–468]
- 7 Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, et al. The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48: 123–152
- 8 Ziegler J, Facchini P J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 735–769
- 9 Ma Y, Cui G, Chen T, et al. Expansion within the CYP71D subfamily drives the heterocyclization of tanshinones synthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Nat Commun*, 2021, 12: 685
- 10 Gao W, Sun H X, Xiao H, et al. Combining metabolomics and transcriptomics to characterize tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *BMC Genomics*, 2014, 15: 73
- 11 Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12108–12113
- 12 Ma Y, Ma X H, Meng F Y, et al. RNA interference targeting CYP76AH1 in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* reveals its key role in the biosynthetic pathway of tanshinones. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477: 155–160
- 13 Guo J, Ma X, Cai Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones. *New Phytol*, 2016, 210: 525–534
- 14 Nett R S, Lau W, Sattely E S. Discovery and engineering of colchicine alkaloid biosynthesis. *Nature*, 2020, 584: 148–153
- 15 Sun J, Cui G, Ma X, et al. An integrated strategy to identify genes responsible for sesquiterpene biosynthesis in turmeric. *Plant Mol Biol*, 2019, 101: 221–234
- 16 Li Y, Lin H X, Wang J, et al. Glucosyltransferase capable of catalyzing the last step in neoandrographolide biosynthesis. *Org Lett*, 2018, 20: 5999–6002
- 17 Mao Y, Ma Y, Chen T, et al. Functional integration of two CYP450 genes involved in biosynthesis of tanshinones for improved diterpenoid production by synthetic biology. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 1763–1770
- 18 He J B, Zhao P, Hu Z M, et al. Molecular and structural characterization of a promiscuous C-glycosyltransferase from *Trollius chinensis*. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 11513–11520
- 19 Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, 596: 583–589
- 20 Arnold F H. Directed evolution: bringing new chemistry to life. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 4143–4148
- 21 Li J, Qu G, Shang N, et al. Near-perfect control of the regioselective glucosylation enabled by rational design of glycosyltransferases. *Green Synth Catal*, 2021, 2: 45–53
- 22 Reetz M T. A breakthrough in protein engineering of a glycosyltransferase. *Green Synth Catal*, 2021, 2: 4–5
- 23 Sun Z, Wu L, Bocola M, et al. Structural and computational insight into the catalytic mechanism of limonene epoxide hydrolase mutants in

- stereoselective transformations. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 310–318
- 24 Shi Y, Wang D, Li R, et al. Engineering yeast subcellular compartments for increased production of the lipophilic natural products ginsenosides. *Metab Eng*, 2021, 67: 104–111
 - 25 Hu Y, Zhou Y J, Bao J, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of germacrene A, a precursor of beta-elemene. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44: 1065–1072
 - 26 Paddon C J, Keasling J D. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 355–367
 - 27 Croteau R, Ketchum R E B, Long R M, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 75–97
 - 28 Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 2015, 349: 1095–1100
 - 29 Hafner J, Payne J, MohammadiPeyhani H, et al. A computational workflow for the expansion of heterologous biosynthetic pathways to natural product derivatives. *Nat Commun*, 2021, 12: 1760
 - 30 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528–532
 - 31 Winzer T, Kern M, King A J, et al. Morphinan biosynthesis in opium poppy requires a P450-oxidoreductase fusion protein. *Science*, 2015, 349: 309–312
 - 32 Scheler U, Brandt W, Porzel A, et al. Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast. *Nat Commun*, 2016, 7: 12942
 - 33 Yan X, Fan Y, Wei W, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast. *Cell Res*, 2014, 24: 770–773
 - 34 Luo X, Reiter M A, d’Espaux L, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature*, 2019, 567: 123–126
 - 35 Wei W, Zhang P, Shang Y, et al. Metabolically engineering of *Yarrowia lipolytica* for the biosynthesis of naringenin from a mixture of glucose and xylose. *Bioresour Tech*, 2020, 314: 123726
 - 36 Zhou Y J, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 3234–3241
 - 37 Hu T, Zhou J, Tong Y, et al. Engineering chimeric diterpene synthases and isoprenoid biosynthetic pathways enables high-level production of miltiradiene in yeast. *Metab Eng*, 2020, 60: 87–96
 - 38 Ji D, Li J, Xu F, et al. Improve the biosynthesis of baicalein and scutellarein via manufacturing self-assembly enzyme reactor *in vivo*. *ACS Synth Biol*, 2021, 10: 1087–1094
 - 39 Ma R, Su P, Guo J, et al. Bornyl diphosphate synthase from *Cinnamomum burmanni* and its application for (+)-Borneol biosynthesis in yeast. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 89
 - 40 Dahl R H, Zhang F, Alonso-Gutierrez J, et al. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 1039–1046
 - 41 Dusséaux S, Wajn W T, Liu Y, et al. Transforming yeast peroxisomes into microfactories for the efficient production of high-value isoprenoids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 31789–31799
 - 42 Grewal P S, Samson J A, Baker J J, et al. Peroxisome compartmentalization of a toxic enzyme improves alkaloid production. *Nat Chem Biol*, 2021, 17: 96–103
 - 43 Ma Y, Cai Y, Ma X J, et al. Research progress of P450 in the biosynthesis of bioactive compound of medicinal plants (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2020, 55: 1573–1589 [马莹, 蔡媛, 马晓晶, 等. 药用植物活性成分生物合成中P450的研究进展. *药学报*, 2020, 55: 1573–1589]
 - 44 Hamberger B, Bak S. Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Phil Trans R Soc B*, 2013, 368: 20120426
 - 45 Liu L, Martínez J L, Liu Z, et al. Balanced globin protein expression and heme biosynthesis improve production of human hemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2014, 21: 9–16
 - 46 Michizoe J, Ichinose H, Kamiya N, et al. Functionalization of the cytochrome P450cam monooxygenase system in the cell-like aqueous compartments of water-in-oil emulsions. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99: 12–17
 - 47 Wang Q, Chen Y J. Synthetic biology approaches to improve druggability of natural products (in Chinese). *Synth Biol J*, 2020, 1: 583–592 [王清, 陈依军. 天然产物成药性的合成生物学改良. *合成生物学*, 2020, 1: 583–592]
 - 48 Liang W, Li Z, Ji S, et al. Microbial glycosylation of tanshinone IIA by *Cunninghamella elegans* AS 3.2028. *RSC Adv*, 2015, 5: 63753–63756
 - 49 Liu X, Zhang L, Feng X, et al. Biosynthesis of glycyrrhetic acid-3-O-monoglucose using glycosyltransferase UGT73C11 from *Barbarea*

- vulgaris*. *Ind Eng Chem Res*, 2017, 56: 14949–14958
- 50 Cui M Y, Lu A R, Li J X, et al. Two types of *O*-methyltransferase are involved in biosynthesis of anticancer methoxylated 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 129–142
- 51 Zhang Y, Liang Z, Zong Y, et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun*, 2016, 7: 12617
- 52 Liang Z, Chen K, Li T, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 2017, 8: 14261
- 53 Li B, Rui H, Li Y, et al. Robust CRISPR/Cpf1 (Cas12a)-mediated genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 1862–1864
- 54 Yu H, Lin T, Meng X, et al. A route to de novo domestication of wild allotetraploid rice. *Cell*, 2021, 184: 1156–1170.e14
- 55 Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, et al. CRISPR/Cas system: recent advances and future prospects for genome editing. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 1102–1125
- 56 Feng Z, Mao Y, Xu N, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 4632–4637
- 57 Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 691–693
- 58 Chen K, Wang Y, Zhang R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 667–697
- 59 Li J F, Norville J E, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 688–691
- 60 Li J F, Zhang D, Sheen J. Targeted plant genome editing via the CRISPR/Cas9 technology. In: Alonso J, Stepanova A, eds. *Plant Functional Genomics. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2015. 239–255
- 61 Xie K, Minkenberg B, Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3570–3575
- 62 Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8: 1274–1284
- 63 Zhou Z, Tan H, Li Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis of RAS in *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 2018, 148: 63–70
- 64 Jin B, Cui G, Guo J, et al. Functional diversification of kaurene synthase-like genes in *Isodon rubescens*. *Plant Physiol*, 2017, 174: 943–955
- 65 Alagoz Y, Gurkok T, Zhang B, et al. Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. *Sci Rep*, 2016, 6: 30910
- 66 Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686–688
- 67 Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1229–1232
- 68 Chen J M. Biosynthesis of pharmaceutical artificial-microRNA using Plant (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Nanjing: Nanjing University, 2014 [陈金梅. 利用植物表达药用干扰小RNA的研究. 硕士学位论文. 南京: 南京大学, 2014]
- 69 Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*, 2012, 30: 1158–1170
- 70 Wilken L R, Nikolov Z L. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnol Adv*, 2012, 30: 419–433
- 71 Tang K X, Shen Q, Fu X Q, et al. Research Progress on plant secondary metabolite bioreactor (in Chinese). *J Agric Sci Technol*, 2014, 16: 7–15 [唐克轩, 沈乾, 付雪晴, 等. 植物次生代谢产物生物反应器研究进展. 中国农业科技导报, 2014, 16: 7–15]
- 72 Chen M, Liu X, Wang Z, et al. Modification of plant *N*-glycans processing: the future of producing therapeutic protein by transgenic plants. *Med Res Rev*, 2005, 25: 343–360
- 73 Holland C K, Jez J M. *Arabidopsis*: the original plant chassis organism. *Plant Cell Rep*, 2018, 37: 1359–1366
- 74 Zhang L, Ding R, Chai Y, et al. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 6786–6791
- 75 Chen D H, Ye H C, Li G F. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci*, 2000, 155: 179–185

- 76 Kai G, Xu H, Zhou C, et al. Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Metab Eng*, 2011, 13: 319–327
- 77 Lv Z, Zhang F, Pan Q, et al. Branch pathway blocking in *Artemisia annua* is a useful method for obtaining high yield artemisinin. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57: 588–602
- 78 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
- 79 Schultz B J, Kim S Y, Lau W, et al. Total biosynthesis for milligram-scale production of etoposide intermediates in a plant chassis. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 19231–19235
- 80 Wei W, Wang P, Wei Y, et al. Characterization of *Panax ginseng* UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F1 and Rh1 in metabolically engineered yeasts. *Mol Plant*, 2015, 8: 1412–1424
- 81 Tu L, Su P, Zhang Z, et al. Genome of *Tripterygium wilfordii* and identification of cytochrome P450 involved in triptolide biosynthesis. *Nat Commun*, 2020, 11: 971
- 82 Mao L, Jin B, Chen L, et al. Functional identification of the terpene synthase family involved in diterpenoid alkaloids biosynthesis in *Aconitum camichaelii*. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 3310–3321
- 83 Poliner E, Farré E M, Benning C. Advanced genetic tools enable synthetic biology in the oleaginous microalgae *Nannochloropsis* sp. *Plant Cell Rep*, 2018, 37: 1383–1399
- 84 Dai Z B, Wang Y, Zhou Z H, et al. Synthetic biology for production of plant-derived natural products (in Chinese). *Bull Chin Acad Sci*, 2018, 33: 1228–1238 [戴住波, 王勇, 周志华, 等. 植物天然产物合成生物学研究. 中国科学院院刊, 2018, 33: 1228–1238]

Biosynthetic pathway of active components in traditional Chinese medicine and its application

MA Ying, ZHAO YuJun, MA XiaoJing, GUO Juan & HUANG LuQi

State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

The active components are not only the material basis for traditional Chinese medicine, but also the source of new drug development. They are mainly extracted from medicinal plants. However, the low content of active components, accumulation of structural analogues, and difficulty in separation and purification limit the in-depth research, development and application of active components of traditional Chinese medicine. Biosynthetic pathway analysis of active components of traditional Chinese medicine not only has important guiding significance for exploring the formation of traditional Chinese medicine, but also lays a foundation for further sustainable development and utilization of active components of traditional Chinese medicine through modern biotechnology methods. Here, we review the biosynthetic pathway analysis of active components of traditional Chinese medicine, as well as its application in synthetic biology and metabolic engineering. It will provide a new perspective for the development and utilization of active components of traditional Chinese medicine, and promote the modernization of traditional Chinese medicine.

active components of traditional Chinese medicine, biosynthetic element, biosynthetic pathway, cell factory of active components of traditional Chinese medicine, synthetic biology, metabolic engineering of medicinal plants

doi: 10.1360/SSV-2021-0401