评述

基于多组学的黄芩活性成分生物合成及合成生物学研究进展

高冉冉¹, 徐志超^{1,2}, 浦香东¹, 宋经元^{1,2,3*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193;

2. 中药资源教育部工程研究中心, 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云南分所, 景洪 666100

* 联系人, E-mail: jysong@implad.ac.cn

收稿日期: 2020-06-11; 接受日期: 2020-07-31; 网络版发表日期: 2020-09-21

国家重点研发计划(批准号: 2019YFC1711100)和中国医学科学院本草基因组协同创新团队项目(批准号: 2016-I2M-3-016)资助

摘要 黄芩作为大宗常用中药, 具有清热燥湿、泻火解毒等功效, 在近期暴发的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)的治疗中作用显著. 黄芩主要活性成分为一类特殊的黄酮类化合物, 在黄芩属之外的物种中罕见, 其生物合成途径及体外合成生物学研究是国际关注热点. 中药黄芩基原植物存在野生资源短缺、人工栽培种质退化、质量不稳定等问题. 多组学技术的应用和发展, 可从分子层面揭示药用植物遗传信息及活性成分合成和调控机制, 推动中药科学研究和实践应用. 本文系统总结了黄芩基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等多组学的研究进展, 归纳了黄芩活性成分生物合成途径关键酶的鉴定、转录因子的调控研究及黄芩苷类化合物的微生物体外生产, 并提出未来亟待解决的科学问题, 如基因组辅助育种、黄芩生长发育及活性成分合成及调控机制、活性成分体外合成产率优化等, 为有效解决黄芩优良种质资源的培育及质量问题奠定了基础.

关键词 黄芩, 黄酮类化合物, 生物合成, 合成生物学

唇形科黄芩属植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi), 以根入药, 具有清热燥湿、泻火解毒、凉血止血、除热安胎的功效, 常用于治疗湿热痞满、泻痢、黄疸、肺热咳嗽、痈肿疮毒、胎动不安等病症^[1]. 新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)正肆虐全球, 中医药在新冠诊治方面发挥积极作用, 清热解毒药——黄芩受到关注. 国家中医药管理局发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》, 由黄芩等21味中药材组成的“清肺排毒汤”可用

于轻型、普通型及重型新冠肺炎患者的治疗. 基于《新冠诊疗方案(试行第七版)》《中医疫病方剂精选》推荐治疗新型冠状病毒肺炎恢复期的中医方剂, 通过分子对接VEGFR和FGFR靶点, 筛选出潜在抗肺纤维化活性成分命中率30%以上的中药, 其中以黄芩最多^[2]. 最新药理研究显示, 黄芩提取物具有有效的抗新冠病毒(syndrome coronavirus 2, SAR-CoV-2)活性, 黄芩素及其类似物可外源抑制SARS-CoV-2 3CL蛋白酶^[3]. 黄芩及其活性成分对SARS, H1N1等病毒均具有

引用格式: 高冉冉, 徐志超, 浦香东, 等. 基于多组学的黄芩活性成分生物合成及合成生物学研究进展. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 151–166
Gao R R, Xu Z C, Pu X D, et al. Research progress in biosynthesis and synthetic biology of active ingredients of *Scutellaria baicalensis* Georgi based on multi-omics approach (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 151–166, doi: 10.1360/SSV-2020-0185

较好活性^[4-7], 以黄芩为主要成分的“双黄连”“清开灵”“蓝芩口服液”等中成药临床常用于流感防治^[8]。除抗病毒活性外, 黄芩及其主要成分还具有多种生物活性, Chen等人^[9]在*Blood*杂志发文揭示汉黄芩苷可增强磷脂酰转氨酶1(phospholipid scramblase 1, PLSCR1)转录并促进其进入细胞核, 从而诱导细胞周期阻滞和促进细胞分化, 成为治疗急性髓系白血病的潜在药物; Tsou等人^[10]在*Journal of the American Chemical Society*发文证实了黄芩素的抗菌活性; Dai等人^[11]在*Proc Natl Acad Sci USA*发文表明黄芩苷可改善饮食引起的肥胖和肝脂肪变性; 此外, 近年来黄芩苷对乳腺癌^[12]、脑缺血再灌注损伤^[13]、溃疡性结肠炎^[14]、甲流致急性肺损伤^[6]的作用机制被逐步揭示。

黄芩主要活性成分为黄酮类化合物。研究发现, 在黄芩根中大量存在一类特殊的黄酮类化合物——4'-脱氧黄酮, 如黄芩素、汉黄芩素及其糖苷类化合物等, 该类化合物在黄芩属之外的物种罕见, *Science Advances*期刊报道了该类黄酮苷元的代谢途径及关键酶^[15]。随着多组学技术的发展, 药用植物基因组学、转录组学、蛋白质组学及代谢组学等多组学研究取得快速发展, 为阐明中药防病治病的分子机制提供了指导, 为解析药用植物生长发育机制及活性成分代谢途径奠定了基础。黄芩作为我国大宗常用中药材, 其基因组和转录组已被解析, 基于组学的活性成分代谢途径及合成生物学研究也取得突破性进展。近年来, 黄芩综述文章多关注于化学成分、药理毒理、临床应用

等方面^[16-18], 黄芩的组学研究呈现快速发展趋势, 对黄芩活性成分生物合成途径解析及合成生物学应用具有巨大推动作用。本文就黄芩基因组、转录组、蛋白质组及代谢组等组学研究, 活性成分的生物合成及合成生物学研究进展进行总结, 以期对黄芩科学研究和实践应用提供理论支撑。

1 黄芩主要活性成分及其分布特点

类黄酮类成分为黄芩的特征性成分, 研究表明在黄芩的地下和地上部位, 黄酮类成分的种类和含量存在明显差异, 其主要黄酮类成分的结构如图1所示^[19]。地下根为黄芩药用部位, 存在大量4'-脱氧黄酮化合物, 主要包括黄芩素、去甲汉黄芩素、汉黄芩素及其糖苷类化合物等, 该类化合物在黄芩属物种中特异存在, 黄芩属之外仅在紫葳科木蝴蝶(*Oroxylum indicum*)中有报道^[20]; 地上部分是民间常饮黄芩茶的来源之一^[21], 地上部分黄酮类化合物主要包括芹菜素、野黄芩素、红花素及其糖苷类化合物等。何春年等人^[22]对黄芩根、茎、叶三个部位的化学成分进行了系统比较, 发现三个部位均主含黄酮类成分, 但其主要成分显著不同: 聚类分析显示, 茎叶部位比根部更相近; 主成分分析显示, 茎叶与根部的区分主要为黄芩苷。申洁^[19]对黄芩不同部位15种主要黄酮类成分进行含量测定, 其中黄芩苷、汉黄芩苷、山姜素、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素A在根部含量明显高于地上部位; 异红花素-

图1 黄芩地上与地下部位主要黄酮类成分列举^[19](网络版彩图)

Figure 1 Main flavonoids identified in the root and aerial parts of *Scutellaria baicalensis*^[19] (color online)

7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、野黄芩苷、大波斯菊苷、异高山黄芩素-8-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、白杨素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、木犀草素、芹菜素在黄芩地上部位含量较高.

2 黄芩基因组与转录组研究进展

2.1 黄芩全基因组解析及进化分析

物种的全基因组序列包含物种起源、进化、生长发育及其活性成分合成代谢的遗传信息. 黄芩基因组已被解析, 主要数据统计见表1. 早在2008年, Cole等人^[23]使用流式细胞技术评估黄芩基因组大小约为377 Mb. 黄芩正常植株为二倍体, 2*n*=18. Zhao等人^[24]使用流式细胞仪及*k*-mer预测黄芩基因组大小分别为392 Mb和408.14 Mb; 结合二代和三代测序平台联合测序, 组装后黄芩基因组大小为386.6 Mb, scaffold N50为1.33 Mb; 基于Hi-C技术将98.04%的scaffolds挂载到9条染色体上, 基因注释得到28930个蛋白编码基因、1218个miRNA、517个tRNA、1846个rRNA和512个snRNA, GC含量为34.24%, 基因组包含55.15%的重复序列; 比较基因组揭示黄芩与鼠尾草属植物(*Salvia* spp.)分化时间为3270万年前; 基于基因组预测黄芩4'-脱氧黄酮化合物合成及进化相关的基因复制、片段复制及位点突变等, 进一步验证了黄芩根中特异黄酮化

合物的生物合成途径. Xu等人^[25]通过流式细胞技术及*k*-mer预测黄芩基因组大小分别为(440.2±10) Mb和441.9 Mb; 使用三代测序技术Oxford Nanopore technologies(ONT)和single molecule, real-time sequencing (SMRT)分别对黄芩及其近缘植物半枝莲(*Scutellaria barbata*)进行基因组测序, 组装后黄芩基因组大小为377.0 Mb, contig N50为2.1 Mb; 使用Hi-C技术将99.8%的contigs挂载到9条染色体上, 注释出33414个蛋白编码基因和2833个ncRNA, 55.2%的黄芩基因组序列被注释为重复序列; 基于直系同源的单拷贝基因序列, 推断黄芩与同属植物半枝莲的分化时间为1328万年前, 黄芩属物种与同科物种丹参(*Salvia miltiorrhiza*)的分化时间为4101万年前; 基于黄芩、半枝莲、丹参、芝麻(*Sesamum indicum*)和葡萄(*Vitis vinifera*)的全基因组共线性及蛋白编码基因同义替换速率(*K_s*)分析鉴定唇形科和胡麻科共享的全基因组复制事件(whole genome duplication, WGD), 该复制事件发生在4264万~6071万年前(图2). 此外, 该研究还将黄芩与半枝莲进行比较基因组分析, 揭示出黄芩中与黄酮类化合物合成相关的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)和查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)编码基因由于串联复制而扩张, 半枝莲中4-香豆酰辅酶A连接酶(4-coumarate CoA ligase, 4CL)编码基因由于串联复制而显著扩张, 两物种中编码黄酮羟化酶

表 1 黄芩全基因组信息统计

Table 1 Characteristics of *Scutellaria baicalensis* genome

	Zhao等人 ^[24]	Xu等人 ^[25]
预测基因组大小(流式细胞技术/ <i>k</i> -mer)	392 Mb/408.14 Mb	(440.2±10) Mb/441.9 Mb
染色体倍性	2 <i>n</i> =18	2 <i>n</i> =18
杂合度	0.31%	0.96%
组装方法	FALCON	CANU+SMARTdenovo
组装基因组大小	386.6 Mb	377.0 Mb
N50	scaffold N50: 1338244 bp	contig N50: 2102880 bp
挂载到染色体的比例	98.00%	99.80%
植物来源	上海辰山植物园	北京药用植物园
测序平台	Illumina+PacBio	ONT+Illumina
蛋白编码基因数量	28930	33414
基因重复序列	55.15%	55.17%
LTR比例	34.40%	31.79%
数据获取	NCBI: PRJNA484052	NGDC: CRA001730

图2 黄芩与半枝莲基因组染色体共线性及物种分化时间分析^[25]。A: 黄芩根及地上部分的形态; B: 黄芩和半枝莲基因组共线性分析; C: 基于黄芩等基因组的物种进化及全基因组复制事件(网络版彩图)

Figure 2 Analysis of the chromosome collinearity and estimated time of species differentiation of *Scutellaria baicalensis* and *S. barbata*^[25]. A: Morphology of the root and aerial part of *S. baicalensis*; B: collinearity detected between the genomes of *S. baicalensis* and *S. barbata*; C: phylogenetic tree featuring whole genome duplication (WGD) and whole genome triplication (WGT) events in the genomes of *S. baicalensis* and other angiosperm species (color online)

(flavone hydroxylase)的CYP82D基因均有串联复制。

通过比较黄芩的两个基因组测序数据(表1)发现, 两个基因组之间存在一定差异, 主要包括预测基因组大小差异(~400 Mb和~440 Mb)、样本杂合度差异(0.31%和0.96%)、组装基因组大小差异(386.6 Mb和377.0 Mb)、N50差异(scaffold N50 1.34 Mb和contig N50 2.10 Mb)和蛋白编码基因注释数量(28930和33414)差异。黄芩栽培驯化时间短, 遗传多样性丰富, 由于测序样本的差异、杂合度不同等原因导致已报道基因组预测或组装的基因组大小有所不同。此外, 测序平台、基因组组装策略、基因组注释方法等均不同, 导致基因组的组装及注释具有一定的差异。但基因组的组装及注释的完整性评估结果显示, 两个参考基因组的质量均较好, 足以满足目前基因挖掘、物种进化、基因组重测序等下游分析。目前, 测序平台、生物信息学技术等正处于飞速发展阶段, 如需要进一步提升基因组质量和注释完整性, 可通过遗传图谱和物理图

谱辅助黄芩基因组进行更精细的组装, 以及通过更多的转录组或基因表达标签数据辅助基因的注释。黄芩参考基因组的提升对该物种遗传资源的挖掘及利用具有重要意义。

2.2 黄芩叶绿体基因组研究

叶绿体基因组(chloroplast DNA, cpDNA)的遗传信息为母系遗传, 具有相对稳定的基因组结构和相对缓慢的变异速度^[26], 相比核基因组更易显示居群间的地理分化, 常用于系统发育研究和物种鉴定^[27]。与大多数植物一样, 黄芩叶绿体基因组也是由两个保守的反向重复(inverted repeat, IR)区域(IRA和IRB)分成的环状四分体结构。为了研究黄芩道地性物质基础, 阐释黄芩的分子谱系地理学, Jiang等人^[28]利用short-range PCR方法分别对来自黑龙江省和山西省的两个黄芩个体叶绿体基因组进行测序, 组装出叶绿体基因组大小分别为151817 bp和151824 bp, GC含量为

38.3%, 共注释出114个基因, 包括80个蛋白质编码基因、30个tRNA基因和4个rRNA基因. 通过与黄芩属 *Scutellaria insignis* 和 *Scutellaria lateriflora* 的叶绿体基因组比较分析, 发现6个可变区(*trnH-psbA*, *trnK-rps16*, *petN-psbM*, *trnT-trnL*, *petA-psbJ*, *ycf1*)可作为黄芩属物种DNA条形码鉴定序列, 该研究还从GenBank中获取唇形科34个完整的叶绿体基因组序列, 以84个串联编码基因为代表构建最大似然系统进化树, 从而判断黄芩在唇形科植物中的系统发育位置, 结果显示, 黄芩与 *S. insignis* 和 *S. lateriflora* 亲缘关系最近.

2.3 黄芩转录组研究

物种转录组数据可以反映个体在特定器官或组织的细胞内, 以及特定发育或生理阶段的完整基因表达, 可提供所有基因的表达特征并分析不同组织或生理条件下的基因表达差异, 发现与特定生理功能相关的基因, 并推测未知基因所编码蛋白质的功能. 随着测序技术的发展, 4个黄芩转录组研究相继被报道(测序信息见表2). Park等人^[29]以黄芩早期生长的幼苗为样本, 利用罗氏454和Illumina/Solexa HiSeq 2000高通量测序平台进行测序, 首次报道黄芩幼苗的转录组数据, 共组装出96663个转录本, 其中51188个长度大于500 bp, 31050个长度大于1000 bp; 基因注释表明, 至少20498个转录本在黄芩生长早期表达, 126个与植株生长发育和胁迫应答相关转录因子被挖掘; 基因表达分析发现, 718个高表达基因中有6个参与植株光合作用. Liu等人^[30]利用Solexa/Illumina Hiseq 2000对黄芩的根、茎、叶和花4个不同组织器官进行测序, 共组装出49507个去冗余后的转录本, 其中54个转录本编码黄

酮类成分合成途径中的12种关键酶, 如CHS、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)和黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS)等; 基因差异表达分析发现, 469个基因在根中显著上调, 推测与活性成分的合成有关. 王德富等人^[31]采用Illumina Hiseq 2500对两年生黄芩的根、茎、叶和花进行转录组测序和分析, 组装后获得107533个转录本和53353个去冗余后的转录本, N50分别为1257.69 bp和797.64 bp. 程林^[32]基于Illumina 4000测序平台对干旱胁迫下(对照、轻度、中度和重度)黄芩的根进行转录组测序, 研究干旱胁迫对黄芩的影响机制, 共拼接注释得到57307个去冗余的转录本, 发现转录因子MYB和WRKY可能对干旱胁迫下黄芩苷积累具有重要调控作用.

前期的黄芩转录组测序均采用二代测序技术, 由于测序读长短导致转录本组装碎片化、编码基因注释不完整等问题. 三代测序技术具有读长长的显著优势, 可覆盖整个转录本, 能够准确鉴定编码基因的全长转录本及可变剪接事件(alternative splicing, AS). 联合二代和三代全长转录组测序在植物界首次应用于唇形科物种丹参, 受到国际关注和认可^[34]. Gao等人^[32]基于杂和测序方式, 将三代PacBio测序平台长读长和二代Illumina测序平台准确度高的优势相结合, 获得了黄芩根、茎和叶3个组织器官的高质量全长转录组数据, 共获得338136条全长非嵌合(full-length nonchimeric, FLNC)读长和75785个非冗余的转录本, 97.27%的转录本长度大于1000 bp, 显示出全长转录组测序的优势, 基因注释获得11135个长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和64650个mRNA; 差异表达分析显示, 根和叶存在4932个差异表达基因, 根和茎存在

表 2 黄芩 *de novo* 转录组测序数据

Table 2 *De novo* sequencing of *Scutellaria baicalensis* transcriptome

发表年份	测序技术	植物来源	生长年限	测序部位	数据
2014 ^[29]	Roche/454 GS_FLX+和Illumina/Solexa HiSeq 2000	无菌苗	三个月	—	96663 contigs 20498 transcripts
2015 ^[30]	Illumina/Solexa HiSeq 2000	北京中医药大学自然植株	三年生	根、茎、叶、花	49507 unigenes
2016 ^[31]	Illumina HiSeq 2500	山西绛县黄芩种植基地	两年生	根、茎、叶、花	107533 transcripts 53353 unigenes
2019 ^[32]	PacBio和Illumina	山东青岛栽培品	三年生	根、茎、叶	75785 transcripts 11135 lncRNA 64650 mRNA 44071 AS events

3703个差异表达基因, 茎和叶存在2911个差异表达基因。黄酮类化合物合成相关基因在根中具有高表达, 与活性成分的积累规律一致。黄芩中存在44071个可变剪接事件, 三种主要可变剪接类型(内含子保留、3'端可变剪接、5'端可变剪接)占可变剪接事件的98.3%。筛选到黄酮类化合物合成及调控相关转录本188个, 其中PAL、4CL、黄烷酮-3-羟化酶(flavanone-3-hydroxylase, F3H)、黄烷酮-8-羟化酶(flavanone-8-hydroxylase, F8H)和R2R3-MYB编码基因存在可变剪接事件。

黄芩转录组*de novo*组装及注释、全长转录组研究、不同组织部位基因差异表达分析等为黄芩活性成分生物合成相关编码基因的筛选和鉴定以及其可变剪接事件等奠定了基础。此外, 转录组测序也用于辅助基因组注释等相关研究。相较于其他模式植物, 如药用模式植物丹参等, 目前的黄芩转录组只针对不同组织部位(根、茎、叶、花等)研究黄酮类成分合成的关键酶基因的差异表达及候选基因筛选。通过转录组揭示黄芩对于生物胁迫或非生物胁迫的应答及次生代谢产物合成响应机制的研究还未见报道, 因此更深入的黄芩转录组学研究有助于揭示黄芩生长发育、胁迫应答及活性成分合成的调控机制。

2.4 基于组学的分子标记开发

简单序列重复(simple sequence repeats, SSRs), 也称微卫星, 是1~6个核苷酸或2~8个核苷酸的短串联重复^[35,36], 存在于大多数真核生物基因组中, 近年来被广泛用作分子标记。Xu等人^[25]在黄芩基因组中筛选出142951条SSRs; 齐琳洁等人^[37]在黄芩基因组中进行搜索, 共得到12775条SSR序列, 最主要的重复基序类型为二核苷酸(68.32%), 筛选出9对SSR引物对10个不同产地的50个不同植株黄芩基因组DNA进行扩增, 结果表明黄芩具有较高的遗传多样性。Liu等人^[30]在黄芩转录组中筛选出6901条SSRs, 重复次数5~35次不等, 其中9次最频繁, SSR类型中二核苷酸占有SSRs的68.5%, 二聚体重复序列以GA、CT、AG和TC为主, 三聚体重复序列以TTC和TCT为主, 黄酮类化合物合成途径中有7个转录本具有候选SSRs。王德富等人^[31]基于黄芩转录组数据, 利用MISA软件获得了5658个SSR标记位点, 二核苷酸占51.75%。Yuan等人^[38]利用缺水和高温处理影响黄芩素合成, 构建了黄芩根和叶的全长cDNA文库, 获得了6491条表达序列标签(ex-

pressed sequence tags, ESTs), 平均读长为854 bp, 利用SSRIT工具在3569个转录本中检索得到78条EST-SSRs(可用于评价遗传多样性、物种进化和比较基因组学研究), 其中六核苷酸重复是主要的基序类型(占47.44%), 20条SSRs可能与黄芩中黄酮类活性成分的积累有关。Jiang等人^[28]在黄芩叶绿体基因组中发现39条SSRs, 其中均聚物25个、二聚物4个、三聚物3个、四聚物6个、六聚物1个。

得益于测序技术的快速发展, 黄芩全基因组及转录组研究已相对成熟, 高质量的基因组和转录组数据将全面推进黄芩的科学研究与应用, 为黄芩生长发育相关功能基因挖掘、活性成分代谢途径解析、合成生物学及分子辅助育种研究等奠定了基础。SSR分子标记的开发有助于黄芩不同种质遗传多样性研究, 从而推进黄芩种质资源评价、保存和新品种选育, 解决其野生资源短缺、人工种植种质退化等问题。叶绿体及线粒体基因组测序有助于黄芩的物种鉴定及系统发育研究, 目前黄芩线粒体基因组仍未被报道, 线粒体基因组具有丰富的长度多态性以及自身的优势, 在中药分子鉴定研究上具有一定价值, 值得进行进一步研究, 弥补该方面的空白。

3 黄芩蛋白质组学与代谢组学

中药蛋白质组学研究包含两方面目标: 一方面是寻找中药作用于机体时作用靶点的相关蛋白质, 从而阐明其作用机制, 为中药临床应用提供科学依据^[39]。研究人员受黄芩苷具有显著的抗脂肪变性活性启发, 利用定量的化学蛋白质组学研究策略发现, 黄芩苷是肉毒碱棕榈酰转移酶1(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1)的天然变构激活物, 可以直接与CPT1结合并激活其活性以加速脂肪酸降解, 从而显著改善肝脂肪变性相关症状^[11]。另一方面, 通过比较中药不同植株或同一植株不同组织器官中蛋白质组的差异, 用以评价中草药活性成分与蛋白组变化的相关性, 进而揭示中草药活性成分形成的分子机制, 目前基于蛋白质组学探讨黄芩植物活性成分形成机制的研究甚少, 仅Yuan等人^[40]基于蛋白质组学研究了缺水胁迫对黄芩中黄酮类成分含量及组成变化的内在影响机制, 他们在植株缺水条件下检测到15个上调蛋白、3个下调蛋白, 通过分析得出缺水胁迫导致的黄酮类成分变化是激素

调节的结果. 与基因表达相比, 蛋白质表达谱可更准确地反映参与活性成分生物合成关键酶的表达水平, 有助于揭示在逆境胁迫下药用植物体内次生代谢产物发生变化的分子机制.

中药代谢组学旨在采用各种分析化学手段, 全局性定性或定量分析中药小分子代谢产物, 从而研究基因或环境对植物代谢物的影响或揭示药物在机体内作用的代谢机制^[39]. 目前, 代谢组学技术多用于研究黄芩及其活性成分作用于机体后的代谢变化, 药用植物自身代谢组学报道较少, 主要涉及物种鉴别及质量评价方面. 庞溢媛等人^[41]通过UHPLC-MS/MS(ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry)对不同采收时期的黄芩进行化学成分种类和含量的动态变化检测, 筛选差异代谢物并分析其含量变化, 为探索黄芩最佳采收期提供了理论支持. Kang等人^[42]利用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)结合隐变量正交投影(orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis, OPLS-DA)的方法测定黄芩中的小分子代谢物, 以鉴别中国黄芩与韩国黄芩. Qiao等人^[43]利用高效液相色谱-混合四极轨道质谱联用技术, 联合创新性的关键离子过滤技术, 识别黄芩甲醇提取物中黄酮类、黄烷酮类、黄酮O-/C-苷类、苯乙醇苷类成分, 共检测到132种成分, 其中59个为首次报道.

中药代谢组学通常结合各种组学技术解析物种活性成分的生物合成途径、代谢网络及调控机制等. 代谢组学联合蛋白质组学在中草药中的应用并不罕见, Wang等人^[44]利用蛋白质组学与代谢组学相结合的方法研究盐胁迫影响甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)活性成分积累的作用机制发现, 盐胁迫下甘草中黄酮类化合物合成关键酶(PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI和FLS)及甘草酸合成关键酶(bAS, CYP88D6和CYP72A154)会显著上调, 且甘草酸等三萜皂苷类成分及多种黄酮类活性成分的含量在盐胁迫下也会增加, 该研究为揭示甘草中黄酮类和甘草酸代谢的分子机制提供了有价值的蛋白质组学信息. 类似研究策略还用于揭示大豆(*Glycine max*)耐盐机制^[45]、紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)中紫草素的合成途径^[46]、MeJA诱导苦蕒(*Physalis angulata*)毛状根中生物活性物质积累的调控机制^[47]等. 因此, 蛋白质组学与代谢组学联合用于阐明黄芩体内活性成分的合成途径及机制, 仍需引起国内外学者的关注.

4 黄芩活性成分生物合成及调控研究

4.1 黄芩活性成分生物合成途径解析

不同骨架的黄酮类化合物在植物中有共同的上游合成途径^[48]: 植物光合作用积累的碳水化合物首先经EMP途径(Embden-Meyerhof-Parnas pathway)和PPP途径(pentose phosphate pathway)形成莽草酸; 莽草酸转化为苯丙氨酸; 苯丙氨酸经由苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate-4-hydroxylase, C4H)和4-香豆酰辅酶A连接酶的依次催化生成对香豆酰辅酶A; 三分子来源于三羧酸循环的丙二酰辅酶A^[49]和一分子对香豆酰辅酶A在查尔酮合酶的催化下聚合成柚皮素查尔酮; 或者苯丙氨酸不经过C4H的催化步骤, 生成4'-脱氧的松属素查尔酮. 查尔酮类化合物进一步由查尔酮异构酶催化发生立体定向环化反应生成黄烷酮类骨架——松属素和柚皮素, 黄烷酮类可在黄酮合酶(flavone synthase, FNS)的催化下生成黄酮类, 在二氢黄酮还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)和花青素还原酶(anthocyanidin reductase, ANS)的催化下生成花青素类.

针对黄芩地上与地下部位主要黄酮种类的差异, 黄芩素、汉黄芩素、野黄芩素及其苷类的代谢途径已被解析(图3). Zhao等人^[15]基于转录组测序、基因表达、进化树等数据分析, 结合毛状根RNA干扰(RNA interference, RNAi)、酵母验证、转基因拟南芥、转化烟草叶片等功能验证体系, 挖掘并鉴定出参与黄芩根部4'-脱氧黄酮类化合物代谢途径的基因依次为: *SbCCL-7*, *SbCHS-2*, *SbCHI*和*SbFNSII-2*, 最终催化根中白杨素的合成; 而参与地上部分芹菜素的合成关键酶基因为: *SbCCL-1*, *SbCCL-5*, *SbC4H*, *SbCHS-1*, *SbCHI*和*SbFNSII-1*. 黄芩中编码黄酮-6-羟化酶和黄酮-8-羟化酶(F6H和F8H)的基因分别被鉴定为*SbCYP82D1.1*和*SbCYP82D2*; 其中, *SbCYP82D1.1*催化根中白杨素和地上部位芹菜素分别生成黄芩素和野黄芩素, *SbCYP82D2*催化根中白杨素生成去甲汉黄芩素和微量的黄芩素^[50]. Zhao等人^[24]筛选并克隆5个甲基转移酶基因(*PFOMT1*~5), 通过功能验证发现5个基因均具有催化去甲汉黄芩素生成汉黄芩素的活性, 其中*PFOMT5*的活性最强, *PFOMT1*和*PFOMT2*活性次之, *PFOMT3*和*PFOMT4*活性极弱. Nagashima等人^[51]在黄芩细胞中分离纯化出7-O-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-

图3 已解析的黄芩活性成分生物合成途径^[15,24,50-52](网络版彩图)

Figure 3 Biosynthetic pathways used to generate active flavonoids in *Scutellaria baicalensis*^[15,24,50-52] (color online)

glucuronate: baicalein 7-*O*-glucuronosyltransferase, UBGAT), 该酶可催化黄芩素、汉黄芩素和野黄芩素生成对应的糖苷类化合物. Hirotani等人^[52]在黄芩毛状根中分离出UBGT基因, UBGAT可以催化黄芩素、芹菜素、野黄芩素、汉黄芩素、山奈酚生成对应的7-*O*-葡萄糖苷类化合物. 2020年, 最新研究^[53]提出了一种基于空间分辨的质谱成像技术, 实现了黄芩中黄酮类化合物的定位及其生物合成的可视化, 有助于了解其空间合成代谢网络, 该研究通过优化MALDI矩阵, 首次绘制了黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷在黄芩根部的合成途径图谱, 发现这些黄酮类化合物及其生物合

成途径相关代谢物在韧皮部的含量显著高于其他部位, 并且发现4种关键酶(PAL, C4H, 4CL和FNS)在韧皮部表现出较高活性.

除上述完整合成途径外, Wang等人^[54]在黄芩中发现了一种区域特异性糖基转移酶Sb3GT1(UGT78B4), 该酶能在17种黄酮醇化合物的3-OH上引入葡萄糖、半乳糖、*N*-乙酰葡萄糖胺、木糖和阿拉伯糖, 转化率高达98%, 他们基于分子对接和突变实验预测了导致糖供体广泛性的关键残基. 另有多篇报道对上游基因进行了克隆、生物信息分析及功能验证, Zhou等人^[55]克隆得到SbCHS基因, 发现黄芩毛状根在受紫外照

射、创伤及酵母诱导时,该基因表达降低,以松属素和柚皮素为底物,在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达该蛋白,可显示其显著的查尔酮合成酶活性. Xu等人^[56]克隆出3个*SbPAL*和1个*SbC4H*基因,使用不同浓度茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJa)处理悬浮细胞和诱导悬浮细胞损伤, *SbPAL*, *SbC4H*, *Sb4CL*和*SbCHS*基因的表达水平均上调,利用HPLC检测发现黄酮类化合物的含量也升高,表明基因与黄芩中黄酮类化合物合成具有相关性. Park等人^[57]克隆*SbCHI*基因全长序列,利用毛状根体系进行基因过表达和沉默研究,与对照组相比, *SbCHI*过表达的毛状根中积累更多的黄酮类化合物,而*SbCHI*基因沉默使黄酮含量减少. Kim等人^[58]对黄芩中的*SbFLS*进行克隆和差异表达分析发现, *SbFLS*在根和花中表达量较高,其在各组织部位的表达模式和山奈酚含量分布相似,推测其与山奈酚的生物合成相关. 迷迭香酸在黄芩花中含量较高,酪氨酸氨基转移酶(tyrosine aminotransferase, TAT)和羟基苯基丙酮酸还原酶(hydroxyphenylpyruvate reductase, HPPR)是其上游合成途径的关键酶,研究人员克隆和分析了*SbTAT1*, *SbTAT2*和*SbHPPR*基因,发现它们的表达与迷迭香酸的积累一致^[59].

综上所述,黄芩根部主要活性成分的合成途径已经清晰,地上部位除野黄芩苷外,仍有红花苷、异红花苷等二氢黄酮类化合物的代谢途径未解析,推测由柚皮素的羟基化产物为中间体,进一步加糖催化生成. 此外,与其他苷类化合物不同,黄芩中黄酮苷类活性成分中的糖基多为葡萄糖醛酸,葡萄糖醛酸转移酶的糖基特异性分子机制也被揭示. Noguchi等人^[60]基于对黄酮7-葡萄糖苷转移酶(flavonoid 7-O-glucuronosyltransferases, F7GAT)的生化、同源建模和系统发育特征的研究发现,唇形科F7GATs均为UGT88家族成员,将精氨酸(Arg)替换为色氨酸(Trp)时,糖供体特异性将从UDP-葡萄糖醛酸转换为UDP-葡萄糖. 然而合成途径中其他关键基因的分子机制尚未报道,需进一步研究.

4.2 黄芩活性成分生物合成调控研究

通过转录水平调控发育相关基因及活性成分合成途径酶基因表达是实现定向、高效调节药用植物生长及活性成分合成的有效手段之一^[61]. Yuan等人^[62]对黄芩中的R2R3-MYB蛋白进行研究,从cDNA文库

中共筛选出19个MYB转录因子,发现*SbMYB2*和*SbMYB7*与*SbPAL*具有相近的表达谱,利用转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)植株对其进行过表达研究,证实*SbMYB2*或*SbMYB7*调控黄芩中黄酮类生物合成相关基因的表达,可上调黄酮类化合物合成的第一步,下调黄酮类化合物合成的最后一步,且过表达植株中的二咖啡酰亚精胺(dicaffeoylspermidine)和槲皮素-3,7-O-二糖苷(queretin-3,7-O-diglucoside)的含量明显降低. 烟草植株中过表达*SbMYB7*基因可使*NtUGT*转录水平升高,过表达*SbMYB2*基因可使*NtHCT*的转录水平升高,但赤霉素可以抑制*SbMYB7*和*SbMYB2*的转录水平,说明*SbMYB2*和*SbMYB7*可能通过赤霉素代谢调节黄酮类化合物的合成, *SbMYB8*蛋白可与*SbCHS*启动子区GmMYB92 BS3序列结合,调控*SbCHS*的表达,从而调控类黄酮生物合成,且过表达*SbMYB8*可提高转基因烟草的抗逆性,并可改变某些抗氧化酶的活性和基因表达水平,结果表明*SbMYB8*在植物类黄酮的合成和抗逆性方面起着重要的作用^[63]. 陈妮颖等人^[64,65]在黄芩转录组和cDNA文库中分别筛选出9个*ARF*基因和6个*bHLH*基因,并对其进行了生物信息学研究,和赤霉素刺激下的差异表达分析:其中*ARF*基因在黄芩的花中表达较高, *bHLH*基因在黄芩的根和花中表达较高,二者均与黄芩中黄酮类化合物的合成及调控基因的表达具有一定的相关性.

转录因子在植物次生代谢、生长发育及胁迫响应中有着至关重要的作用. 丹参中SmERF128能正向调控丹参酮合成关键酶基因的表达,在*SmERF128*过表达的毛状根中丹参酮含量显著增加,在*SmERF128* RNAi毛状根中丹参酮含量降低^[66]. 扁桃(*Prunus dulcis*)中*bHLH2*调控苦杏仁苷生物合成途径中*PdCYP79D16*和*PdCYP71AN24*的转录,对其进行非同义点突变(亮氨酸突变为苯丙氨酸)可阻止两个基因的转录,从而导致甜杏仁性状^[67]. 转录因子家族主要包括bZIP, MYB, WRKY, AP2/ERF和NAC等,基于全基因组的药用模式物种丹参AP2/ERF^[68], bZIP^[69]和*bHLH*^[70]转录因子家族已被报道,系统进化、保守基序、结合位点及可变剪接事件也被揭示. 目前,有关黄芩中转录因子调控的研究不够全面与深入,黄芩基因组已解析,基于基因组筛选与生长发育、胁迫响应及活性成分生物合成相关的转录因子并进行功能机制研究是今后研究方向之一.

5 黄芩活性成分合成生物学研究

随着组学技术和基因工程的快速发展, 合成生物学进入快速发展阶段, 利用合成生物学合成药物活性成分, 是解决中药资源短缺以及化学合成环境污染的有效途径, 合成生物学的优势已在青蒿酸(青蒿素前体)^[71,72]、紫杉醇^[73]、丹参酮^[74]等多种化合物中得到了有效验证. 类黄酮类化合物作为一大类植物次生代谢产物, 同样受到研究人员的关注.

松属素、柚皮素及芹菜素为黄芩苷及野黄芩苷合成的中间产物, 且是多种黄酮类化合物的重要前体物质, 研究较充分. Lee等人^[75]利用大肠杆菌为底盘细胞合成芹菜素和茺花素, 培养30 h后, 在不转化为茺花素的情况下, 芹菜素产量可积累到100 mg/L, Thuan等人^[76]以大肠杆菌为底盘细胞构建共培养系统: 香豆酸生产芹菜素系统和芹菜素生产芹黄素葡萄糖苷(apigenin)系统, 得到芹菜素和芹黄素葡萄糖苷产量分别为31.8 μ mol/L和38.5 μ mol/L. Wu等人^[77]利用大肠杆菌为底盘细胞, 在3 L发酵罐中生产2S-松属素, 其产量达到432.4 mg/L. 目前以葡萄糖为原料合成柚皮素的产量可达144.1 mg/L^[78], 以酪氨酸为原料, 柚皮素产量可达252.4 mg/L^[79], 以香豆酸(*p*-coumaric acid)为原料, 柚皮素的产量可达到648.63 mg/L^[80]. Palmer等人^[81]利用产油酵母*Yarrowia lipolytica*为底盘细胞, 从头合成柚皮素的产量可达898 mg/L. 此外, 体外无细胞合成系统也开始应用在柚皮素的生产中, 以香豆酸为底物培养3 h后, 柚皮素产量为11.22 mg/L^[82].

黄芩素和野黄芩素的合成生物学研究已取得初步进展. Li等人^[83]以大肠杆菌为底盘细胞, 利用来自于7个不同物种的黄酮生物合成途径基因构建工程菌, 分别以苯丙氨酸和酪氨酸为底物生产黄芩素和野黄芩素. 首先利用圆红冬孢酵母(*Rhodotorula toruloides*)的苯丙氨酸解氨酶、欧芹(*Petroselinum crispum*)中的4-香豆酰辅酶A连接酶、碧冬茄(*Petunia hybrida*)中的查尔酮合酶、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)中的查尔酮异构酶、欧芹的黄酮合成酶(FNSI), 当饲喂0.5 g/L的L-苯丙氨酸和酪氨酸时, 白杨素和芹菜素的产量可达到28.8 mg/L和109.7 mg/L. 随后, 为了改善P450在大肠杆菌中的表达和溶解, 将亲水性的2B1与N-端截短22个氨基酸的SbF6H结合, 使用拟南芥的全长CPR(*Arabidopsis cytochrome P450 reductase*, AtCPR), 并通过

优化大肠杆菌中的丙二酰辅酶A, 最终以苯丙氨酸为底物饲喂培养48 h后黄芩素产量为23.6 mg/L, 以酪氨酸为底物饲喂得到野黄芩素产量为106.5 mg/L. 黄芩地上部分主要活性成分——野黄芩苷, 也是药用植物短葶飞蓬(*Erigeron breviscapus*)中的主要活性成分, 研究人员验证了短葶飞蓬野黄芩苷合成途径中的F6H和UGT的基因功能, 利用*EbF6H*和*Eb7GAT*在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* W303-1B)底盘中构建灯盏花素合成的细胞工厂, 通过代谢工程改造与发酵工艺优化, 以芹菜素为底物培养7天, 最终野黄芩苷(灯盏花素的主要成分)产量为108 mg/L^[84].

目前, 黄芩主要活性成分的合成生物学研究较少且产量较低, 提高合成生物学产量的方法有: (i) 改变底盘细胞种类. 已有黄芩活性成分的合成生物学研究以酿酒酵母或大肠杆菌为底盘细胞, 可尝试具有丰富膜结构和亚细胞间隔的产油酵母, 它们能为类黄酮的区域选择性和立体选择性提供理想的疏水环境. (ii) 挖掘筛选高效基因. 糖基转移酶和甲基转移酶的挖掘与鉴定, 为汉黄芩素和黄酮苷物质的合成提供了有效的基因元件. Mark等人^[85]从基因筛选的角度, 比较不同物种中的4CL和CHS基因转入酿酒酵母中合成柚皮素的产率发现, 蒺藜苜蓿的4CL和葡萄的CHS组合可使柚皮素的产量最高; 基因突变也可改变基因的转化效率, 研究人员通过对CHS进行突变, 增大了生成肉桂酸的转变率. (iii) 优化合成途径和合成工艺. Lyu等人^[86]通过加入吐温-80改善溶解性等方式, 提高产物上清中的产量; Wu等人^[87]以柚皮素的生产为模型, 利用CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)系统来提高其产量.

6 总结与展望

黄芩作为我国传统中药材已有数千年的药用历史, 是中成药及复方的重要组成, 目前研究认为黄芩的主要活性成分为类黄酮类化合物, 主要包括黄芩素、野黄芩素、汉黄芩素以及它们的糖苷类化合物等, 其中野黄芩苷(又名灯盏乙素)在临床上用于心脑血管疾病的治疗, 临床使用的灯盏乙素制品来自于菊科植物短葶飞蓬, 黄芩植物的地上部分野黄芩苷含量也较高, 且黄芩植株较大, 资源相对较丰富, 有望成为野黄芩苷的重要植物来源.

2019年,《中共中央 国务院关于促进中医药传承创新发展的意见》中提出,中药材质量良莠不齐,要大力推动中药质量提升和产业高质量发展. 测序技术和生物技术的快速发展在中医药学与现代生命科学之间架起一座桥梁,越来越多的药用植物生物学本质被揭示. 黄芩是一种大宗常用药材,面临野生资源骤减、人工栽培种源混乱、种质退化、市售药材质量不一等问题,组学的快速发展为提升黄芩药材质量提供了重要支撑,也为黄芩药物开发指明方向. 为推动黄芩可持续发展和科学应用,我们认为今后研究人员可从以下6个方面开展工作: (i) 活性成分生物合成及生长发育调控机制研究,前文总结黄芩中主要活性成分代谢途径和关键基因功能验证已取得突破性进展,但仍有活性成分生物合成的功能基因未被鉴定,且黄芩活性成分合成与生长发育调控及抗逆性相关研究较为薄弱. (ii) 提高黄芩活性成分合成生物学产量,与化学提取和化学合成相比,合成生物学具有环境友好等优势,黄芩活性成分合成生物学研究已取得初步成效,但工程菌合成的效率及产量较低,合成生物学元件及发酵体系等

需要进一步优化,提升合成生物学产量,进而实现产业化生产,实现黄芩可持续发展. (iii) 道地药材形成机制研究,从分子水平揭示道地产区黄芩的物种遗传变异和基因型,明确环境因素对道地药材基因表达的影响,从而科学保护黄芩道地产区环境,或者模拟道地产区环境,进行黄芩规范化种植. (iv) 优良新品种选育,基于黄芩全基因组及分子标记技术,通过对不同种质资源进行重测序,筛选优良性状相关基因,开发优良新品种并进行种质保存与推广. (v) 黄芩市场流通质量监管,王彦峰等人^[88]对全球1980~2018年间有关黄芩的专利进行数据分析发现,其研发正处于快速发展阶段,黄芩中药材、中成药、保健功能的食品和茶饮是当前研究热点,市场流通监管成为极大挑战,研究人员提出可将中药材DNA条形码转换为二维码应用于市场流通监管体系^[89],该数字化手段将推动建立中药材质量追溯体系及市场规范化. (vi) 运用多组学方法揭示黄芩活性成分功能机制,黄芩及其活性成分具有良好的临床应用前景,通过多组学的联合应用,挖掘黄芩活性成分的新机制与新靶点,助力新药研发.

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol I (in Chinese). Beijing: China Medical Science Press, 2015. 301–302 [国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015. 301–302]
- 2 Bian Y Q, Ma J, Ren Y, et al. Discovery of intervention effect of Chinese herbal formulas on COVID-19 pulmonary fibrosis treated by VEGFR and FGFR inhibitors (in Chinese). *China J Chin Mater Med*, 2020, 45: 1481–1487 [边亚倩, 马婧, 任越, 等. 基于VEGFR, FGFR探讨中药方剂对COVID-19后遗症肺纤维化的干预作用. *中国中药杂志*, 2020, 45: 1481–1487]
- 3 Liu H B, Ye F, Sun Q, et al. *Scutellaria baicalensis* extract and baicalin inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease *in vitro*. *bioRxiv*, 2020
- 4 Li J H, Ling F F, Du J Y, et al. Antiviral effects of baicalin combined with peramivir against pandemic 2009 H1N1 virus *in vitro* and *in vivo* (in Chinese). *Chin Pharmacol Bull*, 2013, 29: 617–621 [李健猴, 凌芳芳, 杜金燕, 等. 黄芩苷联合帕拉米韦体内外抗甲型H1N1流感病毒作用. *中国药理学通报*, 2013, 29: 617–621]
- 5 Chen F, Chan K H, Jiang Y, et al. *In vitro* susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds. *J Clin Virol*, 2004, 31: 69–75
- 6 Zhi H J, Zhu H Y, Zhang Y Y, et al. *In vivo* effect of quantified flavonoids-enriched extract of *Scutellaria baicalensis* root on acute lung injury induced by influenza A virus. *Phytomedicine*, 2019, 57: 105–116
- 7 Ji S, Li R, Wang Q, et al. Anti-H1N1 virus, cytotoxic and Nrf2 activation activities of chemical constituents from *Scutellaria baicalensis*. *J Ethnopharmacol*, 2015, 176: 475–484
- 8 Zu M, Zhou D, Gao L, et al. Evaluation of Chinese traditional patent medicines against influenza virus *in vitro* (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2010, 45: 408–412 [祖勉, 周丹, 高丽, 等. 临床常用中成药的体外抗流感病毒活性评价. *药学报*, 2010, 45: 408–412]
- 9 Chen Y, Hui H, Yang H, et al. Wogonoside induces cell cycle arrest and differentiation by affecting expression and subcellular localization of PLSCR1 in AML cells. *Blood*, 2013, 121: 3682–3691
- 10 Tsou L K, Lara-Tejero M, RoseFigura J, et al. Antibacterial flavonoids from medicinal plants covalently inactivate type III protein secretion

- substrates. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 2209–2218
- 11 Dai J, Liang K, Zhao S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E5896–E5905
- 12 Zeng A, Liang X, Zhu S, et al. Baicalin, a potent inhibitor of NF- κ B signaling pathway, enhances chemosensitivity of breast cancer cells to docetaxel and inhibits tumor growth and metastasis both *in vitro* and *in vivo*. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 879
- 13 Liu J, Zhang T, Wang Y, et al. Baicalin ameliorates neuropathology in repeated cerebral ischemia-reperfusion injury model mice by remodeling the gut microbiota. *Aging*, 2020, 12: 3791–3806
- 14 Zhu L, Xu L Z, Zhao S, et al. Protective effect of baicalin on the regulation of Treg/Th17 balance, gut microbiota and short-chain fatty acids in rats with ulcerative colitis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 5449–5460
- 15 Zhao Q, Zhang Y, Wang G, et al. A specialized flavone biosynthetic pathway has evolved in the medicinal plant, *Scutellaria baicalensis*. *Sci Adv*, 2016, 2: e1501780
- 16 Wang Z L, Wang S, Kuang Y, et al. A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*. *Pharm Biol*, 2018, 56: 465–484
- 17 Zhao T, Tang H, Xie L, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71: 1353–1369
- 18 Zhao Q, Chen X Y, Martin C. *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *Sci Bull*, 2016, 61: 1391–1398
- 19 Shen J. Study on quality assessment of the aerial parts of *Scutellaria baicalensis* Georgi and a primary pharmacophylogenetic investigation in the genus *Scutellaria* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Beijing: Peking Union Medical College, 2018 [申洁. 黄芩地上部位质量评价研究及黄芩属药用亲缘学初探. 硕士学位论文. 北京: 北京协和医学院, 2018]
- 20 Deshmukh A B, Datir S S, Bhonde Y, et al. *De novo* root transcriptome of a medicinally important rare tree *Oroxylum indicum* for characterization of the flavonoid biosynthesis pathway. *Phytochemistry*, 2018, 156: 201–213
- 21 He C N, Peng Y, Xiao W, et al. Application history and research status quo of Huang-qin tea (in Chinese). *Mod Chin Med*, 2011, 13: 3–7+19 [何春年, 彭勇, 肖伟, 等. 黄芩茶的应用历史与研究现状. 中国现代中药, 2011, 13: 3–7+19]
- 22 He C N, Peng Y, Xiao W, et al. Comparative study chemical composition in aerial parts and roots of *Scutellaria baicalensis* (in Chinese). *Mod Chin Med*, 2011, 13: 32–35 [何春年, 彭勇, 肖伟, 等. 黄芩地上部分与根部的化学成分比较研究. 中国现代中药, 2011, 13: 32–35]
- 23 Cole I B, Cao J, Alan A R, et al. Comparisons of *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora* and *Scutellaria racemosa*: genome size, antioxidant potential and phytochemistry. *Planta Med*, 2008, 74: 474–481
- 24 Zhao Q, Yang J, Cui M Y, et al. The reference genome sequence of *Scutellaria baicalensis* provides insights into the evolution of wogonin biosynthesis. *Mol Plant*, 2019, 12: 935–950
- 25 Xu Z C, Gao R R, Pu X D, et al. Comparative genome analysis of *Scutellaria baicalensis* and *Scutellaria barbata* reveals the evolution of active flavonoid biosynthesis. *bioRxiv*, 2020
- 26 Wicke S, Schneeweiss G M, dePamphilis C W, et al. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Mol Biol*, 2011, 76: 273–297
- 27 Xu Z, Xin T, Bartels D, et al. Genome analysis of the ancient tracheophyte *Selaginella tamariscina* reveals evolutionary features relevant to the acquisition of desiccation tolerance. *Mol Plant*, 2018, 11: 983–994
- 28 Jiang D, Zhao Z, Zhang T, et al. The chloroplast genome sequence of *Scutellaria baicalensis* provides insight into intraspecific and interspecific chloroplast genome diversity in *Scutellaria*. *Genes*, 2017, 8: 227
- 29 Park N I, Choi I Y, Choi B S, et al. EST sequencing and gene expression profiling in *Scutellaria baicalensis*. *EXCLI J*, 2014, 13: 392–400
- 30 Liu J, Hou J, Jiang C, et al. Deep sequencing of the *Scutellaria baicalensis* Georgi transcriptome reveals flavonoid biosynthetic profiling and organ-specific gene expression. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0136397
- 31 Wang D F, Cheng Y Y, Yang F, et al. Transcriptome data assembly and analysis of *Scutellaria baicalensis* through high-throughput sequencing (in Chinese). *J Shanxi Agric Sci*, 2016, 44: 1065–1072 [王德富, 成媛媛, 杨锋, 等. 黄芩高通量转录组测序数据组装和分析. 山西农业科学, 44: 1065–1072]
- 32 Gao T, Xu Z, Song X, et al. Hybrid sequencing of full-length cDNA transcripts of the medicinal plant *Scutellaria baicalensis*. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 4426

- 33 Cheng L. Physiological and ecological changes of *Scutellaria baicalensis* Georgi under drought stress and molecular ecological mechanism of baicalin biosynthesis (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018 [程林. 干旱胁迫黄芩生理生态变化及其黄芩苷生物合成的分子生态机制. 博士学位论文. 长春: 吉林农业大学, 2018]
- 34 Xu Z, Peters R J, 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. *Plant J*, 2015, 82: 951–961
- 35 van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, et al. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 275–293
- 36 Gur-Arie R, Cohen C J, Eitan Y, et al. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Res*, 2000, 10: 62–71
- 37 Qi L J, Long P, Jiang C, et al. Development of microsatellites and genetic diversity analysis of *Scutellaria baicalensis* Georgi using genomic-SSR markers (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2015, 50: 500–505 [齐琳洁, 龙平, 蒋超, 等. 黄芩基因组SSR分子标记的开发及遗传多样性分析. 药学报, 2015, 50: 500–505]
- 38 Yuan Y, Long P, Jiang C, et al. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers based on a full-length cDNA library of *Scutellaria baicalensis*. *Genomics*, 2015, 105: 61–67
- 39 Xin T, Zhang Y, Pu X, et al. Trends in herbgenomics. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 288–308
- 40 Yuan Y, Liu Y, Wu C, et al. Water deficit affected flavonoid accumulation by regulating hormone metabolism in *Scutellaria baicalensis* Georgi roots. *PLoS ONE*, 2012, 7: e42946
- 41 Pang Y Y, Xue L Y, Zheng Y H, et al. Comparative study on quality of *Scutellaria baicalensis* Georgi in different harvest periods using UHPLC-MS/MS metabolomics technology (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2017, 52: 1903–1909 [庞溢媛, 薛立英, 郑艳红, 等. 基于UHPLC-MS/MS代谢组学技术的不同采收期黄芩质量比较研究. 药学报, 2017, 52: 1903–1909]
- 42 Kang J, Choi M Y, Kang S, et al. Application of a ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics approach combined with orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis as an efficient tool for discriminating between Korean and Chinese herbal medicines. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 11589–11595
- 43 Qiao X, Li R, Song W, et al. A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: Rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering. *J Chromatogr A*, 2016, 1441: 83–95
- 44 Wang C, Chen L, Cai Z C, et al. Comparative proteomic analysis reveals the molecular mechanisms underlying the accumulation difference of bioactive constituents in *Glycyrrhiza uralensis* fisch under salt stress. *J Agric Food Chem*, 2020, 68: 1480–1493
- 45 Pi E, Zhu C, Fan W, et al. Quantitative phosphoproteomic and metabolomic analyses reveal GmMYB173 optimizes flavonoid metabolism in soybean under salt stress. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17: 1209–1224
- 46 Takanashi K, Nakagawa Y, Aburaya S, et al. Comparative proteomic analysis of *Lithospermum erythrorhizon* reveals regulation of a variety of metabolic enzymes leading to comprehensive understanding of the shikonin biosynthetic pathway. *Plant Cell Physiol*, 2019, 60: 19–28
- 47 Zhan X, Liao X, Luo X, et al. Comparative metabolomic and proteomic analyses reveal the regulation mechanism underlying MeJA-induced bioactive compound accumulation in cutleaf groundcherry (*Physalis angulata* L.) hairy roots. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 6336–6347
- 48 Yonekura-Sakakibara K, Higashi Y, Nakabayashi R. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 943
- 49 Koes R E, Quattrocchio F, Mol J N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *Bioessays*, 1994, 16: 123–132
- 50 Zhao Q, Cui M Y, Levsh O, et al. Two CYP82D enzymes function as flavone hydroxylases in the biosynthesis of root-specific 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis*. *Mol Plant*, 2018, 11: 135–148
- 51 Nagashima S, Hirotani M, Yoshikawa T. Purification and characterization of UDP-glucuronate: baicalein 7-O-glucuronosyltransferase from *Scutellaria baicalensis* Georgi. cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 2000, 53: 533–538
- 52 Hirotani M, Kuroda R, Suzuki H, et al. Cloning and expression of UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Planta*, 2000, 210: 1006–1013
- 53 Sun C, Zhang M, Dong H, et al. A spatially-resolved approach to visualize the distribution and biosynthesis of flavones in *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 179: 113014
- 54 Wang Z, Wang S, Xu Z, et al. Highly promiscuous flavonoid 3-O-glycosyltransferase from *Scutellaria baicalensis*. *Org Lett*, 2019, 21: 2241–2245
- 55 Zhou Y, Nagashima S, Hirotani M, et al. Expression of the chalcone synthase gene in *Scutellaria baicalensis* hairy root cultures was unusually

- reduced by environmental stresses. *Plant Biotech*, 2003, 20: 207–214
- 56 Xu H, Park N I, Li X, et al. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis*. *Bioresour Tech*, 2010, 101: 9715–9722
- 57 Park N I, Xu H, Li X, et al. Enhancement of flavone levels through overexpression of chalcone isomerase in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Funct Integr Genomics*, 2011, 11: 491–496
- 58 Kim Y B, Kim K S, Kim Y J, et al. Cloning and characterization of a flavonol synthase gene from *Scutellaria baicalensis*. *Sci World J*, 2014, 2014: 1–7
- 59 Kim Y B, Uddin M R, Kim Y J, et al. Molecular cloning and characterization of tyrosine aminotransferase and hydroxyphenylpyruvate reductase, and rosmarinic acid accumulation in *Scutellaria baicalensis*. *Nat Product Commun*, 2014, 9: 1934578X1400900
- 60 Noguchi A, Horikawa M, Fukui Y, et al. Local differentiation of sugar donor specificity of flavonoid glycosyltransferase in Lamiales. *Plant Cell*, 2009, 21: 1556–1572
- 61 Ji A J, Luo H M, Xu Z C, et al. Research and perspectives on AP2/ERF transcription factors in medicinal plants (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2015, 60: 1272–1284 [季爱加, 罗红梅, 徐志超, 等. 药用植物转录因子AP2/ERF研究与展望. 科学通报, 2015, 60: 1272–1284]
- 62 Yuan Y, Wu C, Liu Y, et al. The *Scutellaria baicalensis* R2R3-MYB transcription factors modulates flavonoid biosynthesis by regulating GA metabolism in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE*, 2013, 8: e77275
- 63 Yuan Y, Qi L, Yang J, et al. A *Scutellaria baicalensis* R2R3-MYB gene, *SbMYB8*, regulates flavonoid biosynthesis and improves drought stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2014, 120: 961–972
- 64 Chen T Y, Liu J, Yuan Y, et al. Bioinformatics analysis and expressed level of auxin response factor genes in *Scutellaria baicalensis* (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2017, 52: 1770–1776 [陈媿颖, 刘娟, 袁媛, 等. 黄芩ARF基因家族生物信息学及表达分析. 药学报, 2017, 52: 1770–1776]
- 65 Chen T Y, Liu J, Yuan Y, et al. Analysis of bioinformatics and expression level of bHLH transcription factors in *Scutellaria baicalensis* (in Chinese). *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49: 671–677 [陈媿颖, 刘娟, 袁媛, 等. 黄芩bHLH转录因子基因家族生物信息学及表达分析. 中草药, 2018, 49: 671–677]
- 66 Zhang Y, Ji A, Xu Z, et al. The AP2/ERF transcription factor SmERF128 positively regulates diterpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Mol Biol*, 2019, 100: 83–93
- 67 Sánchez-Pérez R, Pavan S, Mazzeo R, et al. Mutation of a bHLH transcription factor allowed almond domestication. *Science*, 2019, 364: 1095–1098
- 68 Ji A J, Luo H M, Xu Z C, et al. Genome-wide identification of the AP2/ERF gene family involved in active constituent biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Genome*, 2016, 9: plantgenome2015.08.0077
- 69 Zhang Y, Xu Z, Ji A, et al. Genomic survey of bZIP transcription factor genes related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 295–305
- 70 Zhang X, Luo H, Xu Z, et al. Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Sci Rep*, 2015, 5: 11244
- 71 Westfall P J, Pitera D J, Lenihan J R, et al. Production of amorphaadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinin acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E111–E118
- 72 Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440: 940–943
- 73 Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330: 70–74
- 74 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
- 75 Lee H, Kim B G, Kim M, et al. Biosynthesis of two flavones, apigenin and genkwanin, in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotech*, 2015, 25: 1442–1448
- 76 Thuan N H, Chaudhary A K, Van Cuong D, et al. Engineering co-culture system for production of apigenin in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45: 175–185
- 77 Wu J, Zhang X, Dong M, et al. Stepwise modular pathway engineering of *Escherichia coli* for efficient one-step production of (2S)-pinocembrin. *J Biotech*, 2016, 231: 183–192

- 78 Du Y, Yang B, Yi Z, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* coculture platform for the production of flavonoids. *J Agric Food Chem*, 2020, 68: 2146–2154
- 79 Lv Y, Marsafari M, Koffas M, et al. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 2514–2523
- 80 Gao S, Lyu Y, Zeng W, et al. Efficient biosynthesis of (2S)-naringenin from *p*-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68: 1015–1021
- 81 Palmer C M, Miller K K, Nguyen A, et al. Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy. *Metab Eng*, 2020, 57: 174–181
- 82 Zang Y, Zha J, Wu X, et al. *In vitro* naringenin biosynthesis from *p*-coumaric acid using recombinant enzymes. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 13430–13436
- 83 Li J, Tian C, Xia Y, et al. Production of plant-specific flavones baicalein and scutellarein in an engineered *E. coli* from available phenylalanine and tyrosine. *Metab Eng*, 2019, 52: 124–133
- 84 Liu X, Cheng J, Zhang G, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nat Commun*, 2018, 9: 448
- 85 Mark R, Lyu X, Ng K R, et al. Gene source screening as a tool for naringenin production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Omega*, 2019, 4: 12872–12879
- 86 Lyu X, Zhao G, Ng K R, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *de novo* production of kaempferol. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 5596–5606
- 87 Wu J, Du G, Chen J, et al. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 13477
- 88 Wang Y F, Yi T M, Liu H B. Patent pattern analysis of *Scutellariae radix* (in Chinese). *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50: 5117–5124 [王彦峰, 扈铁梅, 刘海波. 黄芩专利格局分析. *中草药*, 2019, 50: 5117–5124]
- 89 Xin T Y, Li X W, Yao H, et al. A two-dimensional DNA barcode system for circulation regulation of traditional Chinese medicine (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2015, 45: 695–702 [辛天怡, 李西文, 姚辉, 等. 中药材二维DNA条形码流通监管体系研究. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45: 695–702]

Research progress in biosynthesis and synthetic biology of active ingredients of *Scutellaria baicalensis* Georgi based on multi-omics approach

GAO RanRan¹, XU ZhiChao^{1,2}, PU XiangDong¹ & SONG JingYuan^{1,2,3}

¹ Key Lab of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

² Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Beijing 100193, China;

³ Yunnan Branch, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China

Scutellaria baicalensis Georgi is a common kind of traditional Chinese medicine; it promotes heat-clearing and detoxification and has been used to treat coronavirus disease 2019. *Scutellaria baicalensis* contains a unique group of flavonoids that are largely distributed within the *Scutellaria* species. As such, there is significant interest in research focused on the metabolic pathways that promote endogenous flavonoid production and methods that might be used for their *in vitro* biosynthesis. However, as is the case with various Chinese medicinal herbs, there are still many challenges to overcome including shortage of wild resources, degradation associated with the cultivated germplasm, and instability leading to uneven product quality. The use of a multiomics approach will provide genetic information as well as insights into the endogenous mechanisms of flavonoid biosynthesis and their regulation, thus promoting frontier research and practical application of traditional Chinese medicine. In this study, we presented a systematic review of genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics associated with *S. baicalensis*; our current understanding of the functional genes that promote biosynthesis *in vivo* as well as the methods that facilitate the *in vitro* biosynthesis of active compounds are summarized. We also discussed the critical factors associated with further development of *S. baicalensis* including the cultivation of enriched varieties through genome-assisted breeding, regulatory mechanisms associated with plant growth and development, and optimization of conditions that promote biosynthesis of active compounds both *in vivo* and *in vitro*. This review provides a foundation for determining effective solutions for issues associated with the cultivation of *S. baicalensis* and for the production of high quality products.

***Scutellaria baicalensis*, flavonoids, biosynthesis, synthetic biology**

doi: [10.1360/SSV-2020-0185](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0185)