



## 丹参SmVS基因的克隆和表达分析

吴丽萍, 苏兴隆, 曹梦阳, 王兆健, 邢世海

### 引用本文:

吴丽萍, 苏兴隆, 曹梦阳, 王兆健, 邢世海. 丹参SmVS基因的克隆和表达分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(3): 321–328.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4464>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 三角梅cDOPA 5GT基因的克隆和光照对其表达的影响

Cloning of Cyclo-DOPA-5-glucosyltransferase Gene from *Bougainvillea glabra* and Effect of Illumination on Its Expression  
热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 75–81 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4233>

### 铁皮石斛DoSMT2基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*  
热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591–598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

### 青花菜BoSCL3基因的克隆和渍水胁迫下的表达特征分析

Cloning *BoSCL3* Gene from *Brassica oleracea* var. *italica* and Expression Analysis under Waterlogging Stress  
热带亚热带植物学报. 2021, 29(2): 195–200 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4263>

### 马尾松PmPGK1和PmGPIC基因的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis on *PmPGK1* and *PmGPIC* Genes in *Pinus massoniana*  
热带亚热带植物学报. 2021, 29(4): 339–348 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4315>

### 铁皮石斛WOX转录因子的鉴定和分析

Identification and Analysis of WOX Transcription Factor in *Dendrobium officinale*  
热带亚热带植物学报. 2021, 29(3): 301–310 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4294>

向下翻页, 浏览PDF全文

# 丹参 *SmVS* 基因的克隆和表达分析

吴丽萍<sup>1</sup>, 苏兴隆<sup>1</sup>, 曹梦阳<sup>1</sup>, 王兆健<sup>1</sup>, 邢世海<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院中药资源保护与开发研究所, 合肥 230012)

**摘要:** 为了解丹参(*Salvia miltiorrhiza*)的 Vinorine 合成酶基因(*VS*)的功能, 从丹参中克隆了 *SmVS* 基因, 并通过 Ex PASy 等在线分析软件对其进行生物信息学分析, 同时利用 RT-qPCR 技术分析其表达模式。结果表明, *SmVS* 基因全长 726 bp, 编码 241 个氨基酸, 编码蛋白分子量为 26 861.72, 等电点 PI 为 5.66, 为膜外蛋白, 推测定位于线粒体。系统进化分析表明, 丹参 *SmVS* 与野生油橄榄(*Olea europaea* var. *sylvestris*)的 *VS* 亲缘关系较近。*SmVS* 基因在丹参根中的表达比叶的高, 叶中的转录水平在 21:00 最高。因此, 推测 *SmVS* 基因与光应答有关。

**关键词:** 丹参; Vinorine 合成酶; RT-qPCR; 基因表达; 克隆

doi: 10.11926/jtsb.4464

## Cloning and Expression Analysis of *SmVS* Gene from *Salvia miltiorrhiza*

WU Liping<sup>1</sup>, SU Xinglong<sup>1</sup>, CAO Mengyang<sup>1</sup>, WANG Zhaojian<sup>1</sup>, XING Shihai<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**Abstract:** In order to understand the function of vinorine synthase gene (*VS*) in *Salvia miltiorrhiza*, the *SmVS* gene were cloned from *S. miltiorrhiza*, and the bioinformation of *SmVS* was predicted by Ex PASy and other online analysis software, the expression pattern of *SmVS* was analyzed by RT-qPCR. The results showed that the full-length of *SmVS* was 726 bp, encoding 241 amino acids. The molecular weight of *SmVS* was 26 861.72 with isoelectric point of 5.66. It was an extramembrane protein, presumably located in mitochondria. Phylogenetic tree showed that *SmVS* had close relationship with *VS* in *Olea europaea* var. *sylvestris*. The expression of *SmVS* in roots was higher than that in leaves, and the transcription level of *SmVS* reached the highest at 21:00 pm in leaves. Therefore, it was suggested that *SmVS* could be involve in responding to light.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza*; Vinorine synthase; RT-qPCR; Gene expression; Clone

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)为唇形科(Labiatae)鼠尾草属多年生直立草本植物, 药用部分为干燥根和根茎, 为我国常用的传统中药材<sup>[1]</sup>。丹参主产于安徽、四川、山西、江苏、河北等地, 其性微寒、味苦、归心、肝经, 是治疗心脑血管疾病的传统中药材<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明, 丹参具有保护心血管系

统<sup>[3]</sup>、防止动脉粥样硬化<sup>[4]</sup>、保护神经系统<sup>[5]</sup>、改善微循环<sup>[6]</sup>和抗炎抗菌<sup>[7]</sup>等多种药理作用, 临床常用于心脑血管疾病、癌症、糖尿病和肝病等的治疗<sup>[8-10]</sup>。现代化学分析表明丹参的化学成分以脂溶性二萜丹参酮类和水溶性丹酚酸类为主, 还有多糖类、黄酮类、甾体类等成分<sup>[11-12]</sup>; 近年来还报道丹

收稿日期: 2021-06-11 接受日期: 2021-09-06

基金项目: 安徽省留学人员创新项目择优计划(DT1810003); 安徽省教育厅高等学校自然科学研究项目(KJ2019A0453); 安徽省自然科学基金面上项目(1908085MH268)资助

This work was supported by the Preferential Project for Innovation of Overseas Students in Anhui (Grant No. DT1810003); the Project for Natural Science Research of Colleges and Universities in Department of Education of Anhui (Grant No. KJ2019A0453); and the Project for Natural Science in Anhui (Grant No. 1908085MH268).

作者简介: 吴丽萍(1996~), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生药。E-mail: 942760843@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: xshshihai@163.com

参中含有生物碱成分<sup>[13]</sup>。目前对丹参的研究大多集中在丹参酮和丹酚酸上,其生物合成途径大部分已被解析<sup>[14-15]</sup>;而关于丹参生物碱的研究甚少,尚无其合成途径的报道。在生物碱中,萜类吲哚生物碱是一类非常重要的具有萜环和吲哚骨架的生物碱化合物,具有显著的药理学活性,临床主要用于抗癌、抗心律失常和抗疟疾等<sup>[16]</sup>。

单萜吲哚类生物碱阿吗灵,其合成路径已比较透彻<sup>[17]</sup>,其中 Vinorine 合成酶(vinorine synthase, VS)是阿吗灵合成途径中的 1 个关键酶,催化蛇根精型生物碱 16-epi-vellosimine 可逆性地合成阿吗灵型生物碱 Vinorine, Vinorine 合成酶连接 2 种不同类型的生物碱,即蛇根精型(Sarpagan)和阿吗灵型生物碱(Ajmalan)<sup>[17]</sup>。Vinorine 合成酶是第一个三维结构被解析的酰基辅酶 A 依赖型酰基转移酶(BAHD)家族成员,BAHD 得名于从植物中分离出的前 4 种家族酶,该家族成员在多种次生代谢产物的生物合成中起着重要作用<sup>[18-19]</sup>,但目前丹参中尚未见报道。本研究从丹参中克隆 *SmVS* 基因,对其编码蛋白进行生物信息学分析,利用实时荧光定量 PCR 技术(RT-qPCR)检测 *SmVS* 基因的表达模式,为进一步研

究其功能提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

材料采自安徽中医药大学药园,生长光/暗周期为 16 h/8 h,经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为唇形科丹参(*Salvia miltiorrhiza*)。采集丹参后用自来水清洗表面杂质,置于冰盒中转移至实验室,用蒸馏水冲洗 3 次,吸干水分立即用液氮冷冻提取总 RNA。

### 1.2 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

采用改良的 TRIzol 法<sup>[20]</sup>提取丹参根和叶的总 RNA,使用 FastQuant RT Kit (Tiangen Biotech, 北京)试剂盒合成 cDNA。

### 1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据丹参转录组数据库<sup>[21]</sup>,查找与 *SmVS* 同源的 cDNA 序列用 Primer 5.0 软件设计引物(表 1)进行特异 PCR 扩增。引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
SmVS-F	ATGGGCCGCTTCATCCCGCG	SmVS-RT-R	CGTTATCGCAGCCCTCAACTCC
SmVS-R	TCAACCATCATCCTCCACAAC	GAPDH-F	ACCCTCACGGGAAGACCATC
SmVS-RT-F	GAGCCCTCCGTTCCACAACAC	GAPDH-R	ACCACGGAGACGGAGGACAAG

### 1.4 生物信息学分析

根据 PCR 扩增得到的基因全长序列,利用 ORF Finder 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)寻找开放阅读框(ORF),并翻译出氨基酸序列;在线进行序列同源性比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>),并进行蛋白质理化性质分析(<http://web.expasy.org/protparam/>);用 TMHMM 在线程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析蛋白质的可能跨膜区;利用 PSORT 软件(<https://www.genscript.com/psort.html>)预测蛋白的亚细胞定位;利用 GOR4 软件([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl))预测蛋白的二维结构;用 SWISS-MODEL 软件(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行编码蛋白的三维结构预测;并利用 MEGA X 软件(Neighbor-joining, 邻位相连法)

构建系统进化树。

### 1.5 *SmVS* 基因表达的 RT-qPCR 分析

采用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂(TaKaRa)和 Roche Z480 实时荧光定量 PCR 仪,以 *GAPDH* 作为内参基因,设计定量引物 SmVS-RT(表 1),参照韩荣春等<sup>[22]</sup>的方法进行 RT-qPCR 反应,比较 *SmVS* 基因在叶和根中的表达差异,并分析其在叶中表达的日变化规律( $n=3$ )。

## 2 结果和分析

### 2.1 *SmVS* 基因的克隆

采用特异性引物进行 PCR 扩增,取 5  $\mu$ L 产物

进行凝胶电泳检测, 结果表明克隆得到的条带与转录组预期基因片段大小一致(图 1)。将其核苷酸序列(图 2)与其他植物 *VS* 基因进行比对, 表明该基因与

其他植物的同源基因具有很高相似性, 因此命名为 *SmVS*。基因全长为 726 bp, 编码 241 个氨基酸(图 2)。该基因在 GenBank 的登录号为 MW802630。

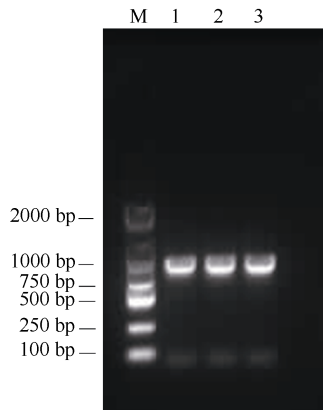


图 1 *SmVS* 基因 PCR 扩增产物电泳图。M: DL2000; 1~3: *SmVS* 基因。

Fig. 1 Electrophoretic diagram of PCR amplification products of *SmVS*. M: DL2000 marker; 1-3: *SmVS*.

```

1  ATG GGC CGC TTC ATC CCG CGG CGA ACC TCA AAA TTT CCG CCC TCA TTC GAT TTC GCT TCT GTT TTC CCA CCT AGA GAC CTC TCG GGG TTG
1  M G R F I P R R T S K F P P S F D F A S V F P P R D L S G L

91  GAT TTC ACC CAG AGA ATC GGC ATG ACA GAG GAG AGA ATC GCG ACG AAG AGA TTG GTT TTC GAC AAG GAA GAG CTG GCG AAG CTC AGG AAT
31  D F T Q R I G M T E E R I A T K R L V F D K E E L A K L R N

181 GGT GAA TCA TCG CAG GTG AAG AAT CCC ACT AGA GTC GAA GCC GTC TCT TCC TAC ATC TGG CGG CGC TTC ATG GAC GCG GCG AAA GAC AGA
61  G E S S Q V K N P T R V E A V S S Y I W R R F M D A A K D R

271 GGC TGC GGC TCC GAG ACG GCG ACG ATT GCT GCT GTA CAT GCA TTG AAT CCG AGG CCG AGG AAC AGC CCC CCG CTT CCC CCA CCC ATG TTC
91  G C G S E T A T I A A V H A L N P R P R N S P P L P P P M F

361 GGA AAC TGC TGG ATA CCT GCG GTG GCA GTT ATG TCC GGA GCG GAG GGG GGG GAT GAG GTC GAG CTG GTG GGG AAG TTG AGG GCT GCG ATA
121 G N C W I P A V A V M S G A E G G D E V E L V G K L R A A I

451 ACG AGG ATC GAC GGC GAT TTT ATC AGG CAG GAG GAG AAT GGA GAG TAT CTG AAT GTT TTG AGT AGA TCG GTG GAT CTG TTC ATG AAG GGT
151 T R I D G D F I R Q E E N G E Y L N V L S R S V D L F M K G

541 GGG GTG GAG TTT TGC AAC TTC AGC AGC TGG TGT AGG TTT CCG GTG TAC GAG GTG GAT TTC GGG TGG GGG AAG CCG GCT TGG GTT TGC ACG
181 G V E F C N F S S W C R F P V Y E V D F G W G K P A W V C T

631 ACG GCG CTG CCG TTC AAG AAT CTA GTG ATT TTG ATG AGC ACA CCA TGT GGG GAA GCA ATT GAA GCA TGG GTT AAC GTT GTG GAG GAT GAT
211 T A L P F K N L V I L M S T P C G E A I E A W V N V V E D D

721 GGT TGA
241 G *

```

图 2 *SmVS* 基因的核苷酸序列和编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *SmVS* and encoded amino acid sequence

蛋白质二级结构域预测表明(图 3: A), 约有 35.27%的氨基酸(85 个)以  $\alpha$  螺旋形式存在, 17.01%的氨基酸(41 个)为延伸主链, 4.98%的氨基酸(12 个)为  $\beta$  转角, 42.74%的氨基酸(103 个)为无规则卷曲, 表明该蛋白二级结构以  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲为主。用 SWISS-MODEL 对 *SmVS* 蛋白的氨基酸序列进行三维结构预测(图 3: B), 该蛋白的主要结构元件还是螺旋、折叠和卷曲, 与二级结构的预测结果相符。

## 2.2 生物信息分析

利用 ProtParam 软件对 *SmVS* 编码的蛋白进行理化性质分析, 结果表明, *SmVS* 蛋白分子式为  $C_{1200}H_{1857}N_{329}O_{347}S_{13}$ , 由 20 种共 241 个氨基酸组成, 相对分子量为 26 861.72, 原子总数为 3 746, 等电点(pI)为 5.66, 不稳定系数为 43.95, 预估在哺乳动物体外的网织红细胞的半衰期是 30 h、酵母体内大于 20 h、大肠杆菌体内大于 10 h, 脂肪族指数 74.02, 总平均亲水性为 -0.208。跨膜区分析表明 *SmVS* 未形成跨膜区结构域, 属于非跨膜蛋白。预测 *SmVS* 蛋白的亚细胞定位于线粒体, 可能性为 73.9%; 定位于细胞质的可能性为 17.4%; 定位于细胞质膜和细胞核的可能性较低, 均为 4.3%。

## 2.3 *SmVS* 蛋白的系统进化分析

选取 6 种植物的 *VS* 氨基酸序列, 利用 DNA MAN 软件进行序列多重比对分析(图 4: A), 结果表明, 这些 *VS* 蛋白间具有较高的相似性。同时, *SmVS* 蛋白功能域的氨基酸组成与其他植物几乎一致, 具有相同的保守域(Motif 1)(图 4: B), 其中 DFGWG 结构域是几乎所有 BAHD 家族成员都有的, 然而该结构域在不同酶中会有些许差异, 如 DFGWG 结

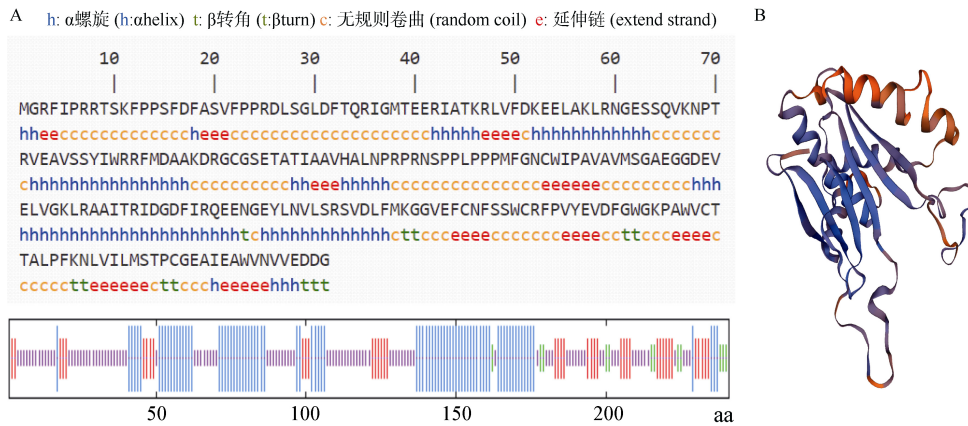


图 3 SmVS 蛋白二级结构(A)和三维结构(B)预测

Fig. 3 Prediction of secondary (A) and three dimensional (B) structures for SmVS

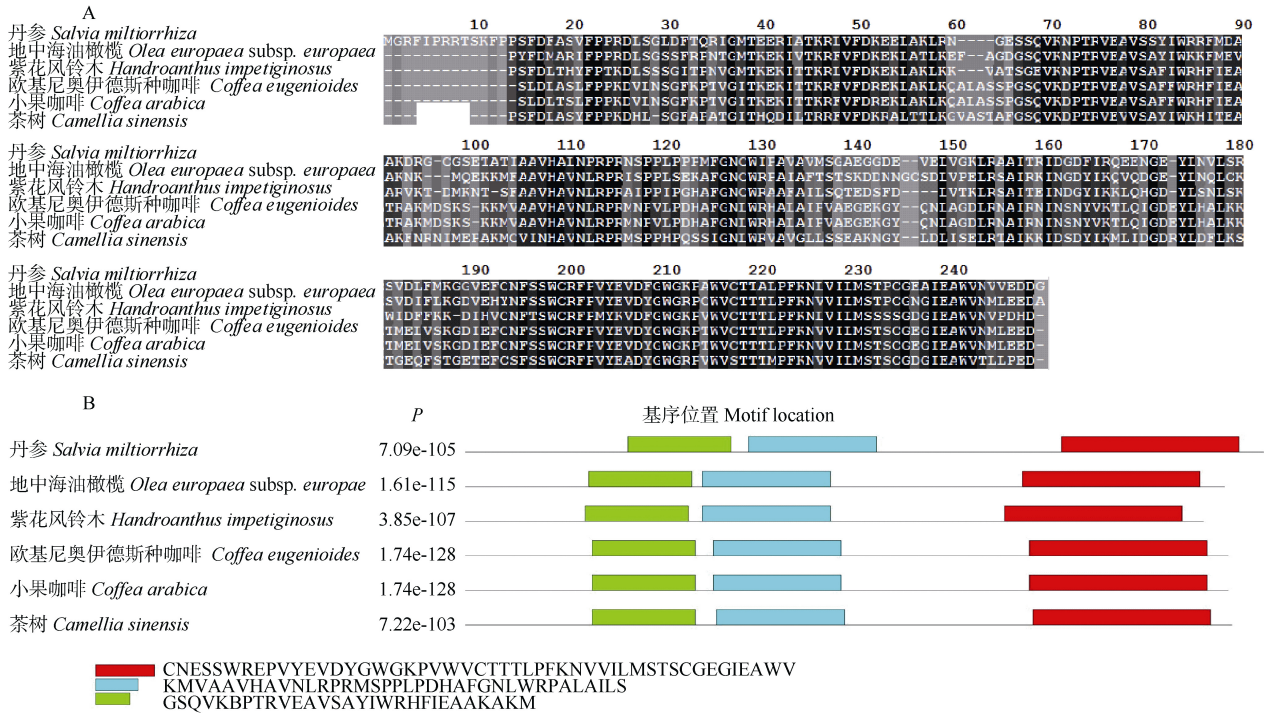


图 4 VS 的氨基酸序列比对(A)和保守域(B)分析

Fig. 4 Alignment of amino acid sequence and conserved domain of VS

构域在杨树(*Populus* sp.)的 BAHD 家族基因中成为 DYGWG、DFGFG、DFGWA、NFGWG、DFGWK、DLGFG 和 NLGWG<sup>[18]</sup>。

根据 NCBI Blast 对比结果, SmVS 蛋白的氨基酸序列与其他植物的同源性较高, 与野生油橄榄(*Olea europaea* var. *sylvestris*)的 VS 氨基酸序列相似度为 64%。在 MEGA X 软件平台上采用 NJ 法(bootstrap 设置为 1 000)对 11 种植物的 VS 氨基酸序列进行系统进化分析(图 5), 包括丹参(MW802630)、野生油橄榄(LOC111382475)、欧基尼奥伊德斯种咖啡(*Coffea euge-*

*noides*, LOC113763265)、烟草(*Nicotiana tabacum*, LOC 107765976)、茶树(*Camellia sinensis*, LOC114266018)、牵牛(*Ipomoea nil*, LOC109155698)、芝麻(*Sesamum indicum*, LOC105168028)、苦瓜(*Momordica charantia*, LOC111007275)、南瓜(*Cucurbita moschata*, LOC11 1439839)、哥伦比亚锦葵(*Herrania umbratical*, LOC11 0418295)和胡桃(*Juglans regia*, LOC108985508)。结果表明, SmVS 与野生油橄榄的 VS 聚为一支, 亲缘关系最近, 其次是欧基尼奥伊德斯种咖啡。系统进化和序列比对结果一致, 相似性越高亲缘关系越近, 可见

Vinorine 合成酶在进化过程中是相对保守的。

## 2.4 实时荧光定量表达分析

为了解 *SmVS* 基因在丹参中的表达模式, 以

*GAPDH* 为内参基因, 采用 RT-qPCR 技术检测 *SmVS* 基因的相对表达量。可见, *SmVS* 基因在根和叶中均有表达, 根中的表达是叶中的近 2 倍(图 6: A), 且叶中 *SmVS* 基因在 21:00 达最大值(图 6: B)。

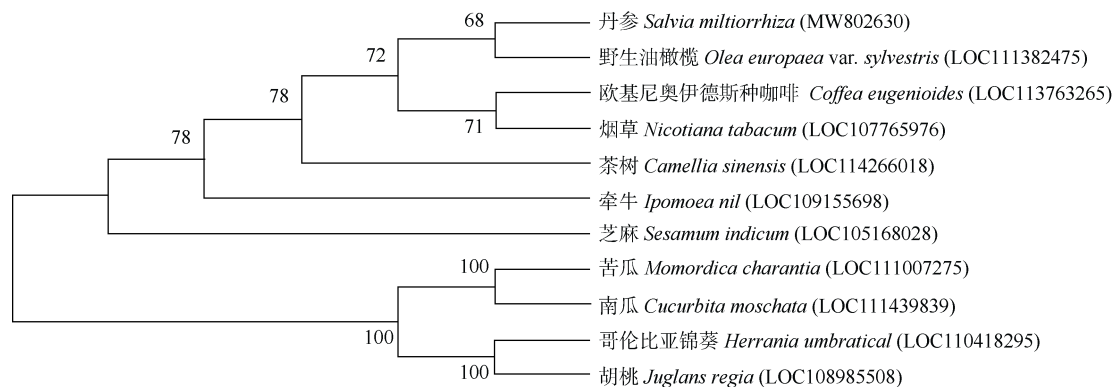


图 5 基于氨基酸序列的 VS 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of VS based on amino acid sequences

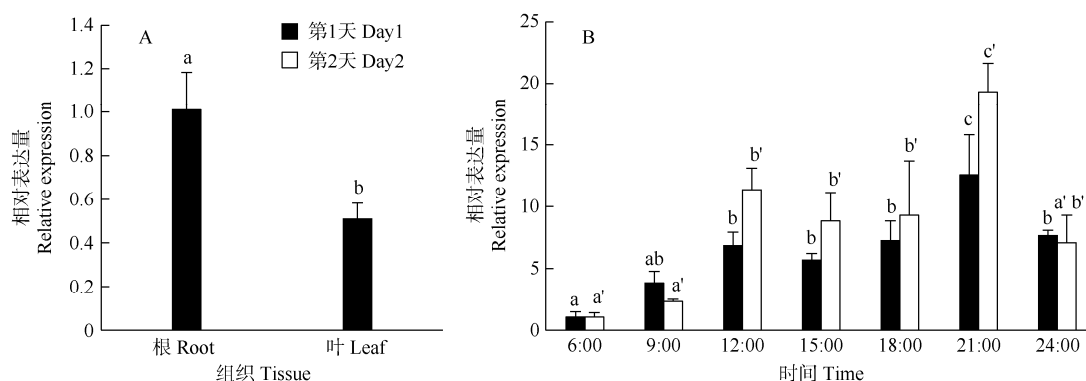


图 6 *SmVS* 基因的表达模式。柱上不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 6 Expression pattern of *SmVS*. Different letters upon column indicate significant differences at 0.05 level.

## 3 结论和讨论

本文从丹参中克隆得到了 *SmVS* 基因, 全长为 726 bp。生物信息学分析表明, *SmVS* 基因编码 241 个氨基酸, *SmVS* 蛋白的分子量为 26 861.72, 等电点 PI 为 5.66, 为非跨膜蛋白, 推测其定位于线粒体。氨基酸同源性分析表明, *SmVS* 蛋白功能域的氨基酸组成与其他植物的 VS 有较高的一致性, 具有相同的保守域(Motif 1), *SmVS* 蛋白具有 BAHD 家族的保守结构域 DFGWG, 因此, 推测 *SmVS* 基因可能属于 BAHD 家族成员。系统进化树分析表明丹参的 *SmVS* 蛋白与野生油橄榄亲缘关系较近。RT-qPCR 结果表明, *SmVS* 基因在丹参根中的表达量比叶中高, 说明其在丹参中具有组织特异性; 叶中 *SmVS*

在 21:00 时表达最高。这些为丹参生物碱的代谢调控研究提供了基础数据。

单萜类吡啶生物碱阿吗灵, 1931 年首次从蛇根木(*Rauvolfia serpentina*)树皮中分离得到<sup>[23]</sup>, 1959 年上市, 属于 Ia 类抗心律失常药物, 临床上主要用于治疗预激综合征伴发的心律失常<sup>[24]</sup>。乙酰辅酶 A 依赖酶的 Vinorine 合成酶是从蛇根木(*Rauvolfia serpentina*)和直瑞兹亚(*Rhazya stricta*)的杂交细胞悬浮培养物中分离出来的<sup>[25]</sup>。乙酰辅酶 A 依赖的酰基转移酶在植物细胞的次生代谢中起重要作用<sup>[26]</sup>。用于癌症治疗的二聚生物碱长春碱和长春新碱的生物合成前体单萜吡啶生物碱长春碱在长春花(*Catharanthus roseus*)的生物合成过程中, 发生了乙酰转移<sup>[27-28]</sup>; 二萜生物碱紫杉醇在东北红豆杉

(*Taxus cuspidata*)中的生物合成中,涉及到几种酰基转移酶,其中有 2 种乙酰辅酶 A 依赖性酶<sup>[29]</sup>。在阿吗灵生物合成途径中,乙酰辅酶 A 依赖型 Vinorine 合成酶通过连接 2 种不同类型的生物碱,即蛇根精和阿吗灵生物碱,在合成代谢途径中起重要作用。

*SmVS* 编码的氨基酸序列和其他 6 种植物具有相同的保守域,即 SmVS 蛋白具有 BAHD 家族成员的保守结构域 DFGWG,因此,推测 SmVS 属于 BAHD 家族的一员。最近几年报道的 BAHD 家族成员数目不断增长,目前在水稻(*Oryza sativa*)、杨树、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分别有 119、94 和 64 个相关基因<sup>[30-31]</sup>,而丹参中还未见报道。BAHD 家族中大多数功能已知的成员参与很多次生代谢过程,如花香、花青素的生物合成,尤其是许多具有临床治疗价值的生物碱的合成,如吗啡、紫杉醇、长春花碱和阿吗灵等<sup>[30]</sup>。该家族成员有很多保守区域,第 1 个是位于酶中心 HXXXD 结构域,对于乙酰基转移酶的反应非常重要,第 2 个是位于碳端的 DFGWG 结构域,是所有 BAHD 成员都拥有的结构域<sup>[17]</sup>。

表达分析表明,*SmVS* 基因的转录水平受不同组织和时间的影响,在根中表达量比叶中高,说明丹参生物碱多在根中合成。在基因工程中利用发根农杆菌诱导丹参发根,比利用根癌农杆菌诱导能产生更多的阿吗灵型生物碱 vinorine; 叶片中 *SmVS* 基因在白天的转录水平极低,夜间逐渐升高,21:00 达到最大值,可见该生物碱主要在夜间合成。植物的生长发育受外界很多因素影响,如光照、低温、干旱等,其中光照是一种重要的环境因子,植物体内存在很多光响应的转录因子,能够感受光的刺激而诱导下游基因的表达,最终影响植物的生长发育和代谢等<sup>[32-33]</sup>。Liu 等<sup>[34]</sup>报道长春花叶中生物碱 vindoline 的合成受光调控,其光应答转录因子 CrGATA1 可以调控 vindoline 生物合成,CrGATA1 的瞬时过表达导致长春花文多灵途径基因的上调,最终增加了 vindoline 的积累。因此,我们推测 *SmVS* 基因也是一个光应答基因,其转录水平受光的调控。

## 参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.  
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 第 2 部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] WANG X H, WANG Y L, ZHOU C Z, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2020, 51(3): 788–798. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.032.  
万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 788–798. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.032.
- [3] WANG C L, CHEN A D, QIN Y, et al. Research progress on anti-atherosclerosis effect and action mechanism of *Salvia miltiorrhiza* extracts [J]. Pract J Cardiac Cereb Pneum Vasc Dis, 2019, 27(6): 8–10. doi: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.06.003.  
王春玲, 陈阿娣, 秦阳, 等. 丹参提取物抗动脉粥样硬化作用及机制的研究进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(6): 8–10. doi: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.06.003.
- [4] ZHANG Y X, GU Y Y, CHEN Y H, et al. Dingxin Recipe IV attenuates atherosclerosis by regulating lipid metabolism through LXR- $\alpha$ /SREBP1 pathway and modulating the gut microbiota in ApoE<sup>-/-</sup> mice fed with HFD [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 266: 113436. doi: 10.1016/j.jep.2020.113436.
- [5] CHEN G B, CHEN H P, WU T, et al. Effect of danshensu on the iNOS, NOS and NO level in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury [J]. Chin Hosp Pharm J, 2008, 28(16): 1329–1332. doi: 10.3321/j.issn:1001-5213.2008.16.002.  
陈广斌, 陈华萍, 吴铁, 等. 丹参素对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤组织 iNOS、NOS、NO 的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(16): 1329–1332. doi: 10.3321/j.issn:1001-5213.2008.16.002.
- [6] SUN N Y, ZHU X L, CHEN J. Research progress of anti-fibrosis pharmacological effect and mechanisms of chemical components in *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 2020, 26(22): 201–208. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201870.  
孙宁远, 朱雪林, 陈君. 丹参化学成分抗纤维化药理作用及机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 201–208. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201870.
- [7] QIN Y, ZHENG B, YANG G S, et al. *Salvia miltiorrhiza*-derived salmiR-58 induces autophagy and attenuates inflammation in vascular smooth muscle cells [J]. Mol Ther Nucl Acids, 2020, 21: 492–511. doi: 10.1016/j.omtn.2020.06.015.
- [8] LI Z M, XU S W, LIU P Q. *Salvia miltiorrhiza* Burge (Danshen): A golden herbal medicine in cardiovascular therapeutics [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(5): 802–824. doi: 10.1038/aps.2017.193.
- [9] ORGAH J O, HE S, WANG Y L, et al. Pharmacological potential of the combination of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) and *Carthamus*

- tinctorius* (Honghua) for diabetes mellitus and its cardiovascular complications [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104654. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104654.
- [10] ZHANG X W, ZHANG P, AN L, et al. Miltirone induces cell death in hepatocellular carcinoma cell through GSDME-dependent pyroptosis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(8): 1397–1413. doi: 10.1016/j.apsb.2020.06.015.
- [11] HAO X L, PU Z Q, CAO G, et al. Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by SmMYB98 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *J Adv Res*, 2020, 23: 1–12. doi: 10.1016/j.jare.2020.01.012.
- [12] ZHAO K, LI B, HE D M, et al. Chemical characteristic and bioactivity of hemicellulose-based polysaccharides isolated from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165: 2475–2483. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.113.
- [13] XUE Z P. Study on water solubility phenolic acid and antioxidant activity from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. leaves [D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2011.  
薛治浦. 丹参叶抗氧化活性及相关酚酸类成分的研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2011.
- [14] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(29): 12108–12113. doi: 10.1073/pnas.1218061110.
- [15] MA X H, MA Y, TANG J F, et al. The biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 16235–16254. doi: 10.3390/molecules200916235.
- [16] MILLER J C, HOLLATZ A J, SCHULER M A. P450 variations bifurcate the early terpene indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus* and *Camptotheca acuminata* [J]. *Phytochemistry*, 2021, 183: 112626. doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112626.
- [17] BAYER A, MA X Y, STÖCKIGT J. Acetyltransfer in natural product biosynthesis: Functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(10): 2787–2795. doi: 10.1016/j.bmc.2004.02.029.
- [18] YU X H, GOU J Y, LIU C J. BAHF superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: Bioinformatics and gene expression [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 70(4): 421–442. doi: 10.1007/s11103-009-9482-1.
- [19] WANG Z J, JIANG W M, LIU Y Y, et al. Putative genes in alkaloid biosynthesis identified in *Dendrobium officinale* by correlating the contents of major bioactive metabolites with genes expression between protocorm-like bodies and leaves [J]. *BMC Genom*, 2021, 22(1): 579. doi: 10.1186/s12864-021-07887-6.
- [20] MA Y M, YUAN L C. Extraction of RNA from root of *Salvia miltiorrhiza* and preparation of full-length homogenized cDNA [J]. *Chin Med Mat*, 2014, 37(5): 770–773. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2014.05.045.  
马艺沔, 袁丽钗. 丹参根部 RNA 的提取与全长均一化 cDNA 的制备 [J]. *中药材*, 2014, 37(5): 770–773. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2014.05.045.
- [21] HUA W P, ZHANG Y, SONG J, et al. *De novo* transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients [J]. *Genomics*, 2011, 98(4): 272–279. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.03.012.
- [22] HAN R C, LIU L L, LIU J L, et al. Cloning and quantitative expression analysis of *GMPP* gene from *Dendrobium huoshanense* [J]. *China J Chin Mat Med*, 2019, 44(8): 1552–1557. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190129.013.  
韩荣春, 刘路路, 刘峻麟, 等. 霍山石斛 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因克隆及表达分析 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(8): 1552–1557. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190129.013.
- [23] RUPPERT M, WOLL J, GIRITCH A, et al. Functional expression of an ajmaline pathway-specific esterase from *Rauvolfia* in a novel plant-virus expression system [J]. *Planta*, 2005, 222(5): 888–898. doi: 10.1007/s00425-005-0031-0.
- [24] YANG L Q. Expression, purification, crystallization, 3-D structure and mechanism study of three important enzymes during ajmaline biosynthesis pathway in *Rauvolfia serpentina* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.  
杨柳青. 蛇根木阿吗灵生物合成途径中三个重要酶的表达, 纯化, 结晶, 三维结构表征及催化机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [25] GERASIMENKO I, MA X Y, SHELDUKO Y, et al. Purification and partial amino acid sequences of the enzyme vinorine synthase involved in a crucial step of ajmaline biosynthesis [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(10): 2781–2786. doi: 10.1016/j.bmc.2004.02.028.
- [26] CHEN Q W, YAN J P, MENG X X, et al. Molecular cloning, characterization, and functional analysis of acetyl-CoA C-acetyl-transferase and mevalonate kinase genes involved in terpene trilactone biosynthesis from *Ginkgo biloba* [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 74. doi: 10.3390/molecules22010074.
- [27] FAHN W, GUNDLACH H, DEUS-NEUMANN B, et al. Late enzymes of vindoline biosynthesis. Acetyl-CoA: 17-*O*-deacetylvindoline 17-*O*-acetyl-transferase [J]. *Plant Cell Rep*, 1985, 4(6): 333–336. doi: 10.1007/BF00269892.
- [28] ST-PIERRE B, LAFLAMME P, ALARCO A M, et al. The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new



- class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer [J]. *Plant J*, 1998, 14(6): 703–713. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00174.x.
- [29] WALKER K, SCHOENDORF A, CROTEAU R. Molecular cloning of a taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol-*O*-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374(2): 371–380. doi: 10.1006/abbi.1999.1609.
- [30] MA X Y, KOEPKE J, BAYER A, et al. Vinorine synthase from *Rauvolfia*: The first example of crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an enzyme of the BAHD superfamily [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1701(1/2): 129–132. doi: 10.1016/j.bba.pap.2004.06.011.
- [31] D'AURIA J C, REICHELT M, LUCK K, et al. Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl CoA: Anthocyanidin 5-*O*-glucoside-6"-*O*-malonyltransferase (At5MAT) in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(5): 872–878. doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.060.
- [32] ZHANG X Y, HUAI J L, SHANG F F, et al. A PIF1/PIF3-HY5-BBX23 transcription factor cascade affects photomorphogenesis [J]. *Plant Physiol*, 2017, 174(4): 2487–2500. doi: 10.1104/pp.17.00418.
- [33] CHANG C H, LIU Z W, WANG Y Y, et al. A bZIP transcription factor, CaLMF, mediated light-regulated camptothecin biosynthesis in *Camptotheca acuminata* [J]. *Tree Physiol*, 2019, 39(3): 372–380. doi: 10.1093/treephys/tpy106.
- [34] LIU Y L, PATRA B, PATTANAIK S, et al. GATA and phytochrome interacting factor transcription factors regulate light-induced vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 2019, 180(3): 1336–1350. doi: 10.1104/pp.19.00489.