

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

丹參中迷迭香酸的基因選殖與基因轉殖

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 97-2313-B-039-002-MY3
執行期間：2008年08月01日至2011年07月31日

計畫主持人：林麗娟助理教授
共同主持人：曾志正教授
計畫參與人員：郭名恩、周誼、翁廷禹

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
 涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學 中醫系

中 華 民 國 99 年 05 月 30 日

中、英文摘要及關鍵詞

關鍵字: 丹參、迷迭香酸、迷迭香酸合成酶、基因轉殖

Salvia miltiorrhiza、rosmarinic acid、rosmarinic acid synthase

生技藥物研發是今日世界的潮流，亦是我國的重點政策。丹參(*Salvia miltiorrhiza*)為中國傳統醫學上著名的活血化瘀藥物，被廣泛地用於治療冠狀動脈心臟疾病。丹參中含有許多藥理活性成分，包括水溶性的丹參酚酸 B (salvianolic acid B)、迷迭香酸 (rosmarinic acid)、咖啡酸 (caffeic acid) 以及脂溶性的丹參酮 IIA (tanshinone IIA) 等，其效果廣受世人的肯定。迷迭香酸具有許多的生物活性，包含清除自由基、抗氧化、抗菌、抗病毒、降低發炎反應，減少過敏發生和保護肝臟、心肌細胞和腎臟的效果。雖然早已推測彩葉草中的迷迭香酸生合成路徑，但直到 2006 年才將所有參與生合成路徑的酵素相對基因選殖出來。

結合傳統藥物的研究與運用基因轉殖作物作為生物反應器，來生產具有保健或醫療價值代謝物，其可直接作為食物來源或經純化提煉為針劑、口服使用，將是未來藥物研發之新重點。因此為了提高丹參中迷迭香酸的含量，以期迷迭香酸合成路徑相關的基因轉殖入丹參植物中，以獲得具有高產值的轉植株。

The research and development of biopharmaceuticals have become a current trend and a major policy in Taiwan. The dry root of *Salvia miltiorrhiza* is a very important traditional Chinese herbal medicine, and has been used extensively for the treatment of cardiovascular diseases. Pharmacological studies showed that Salvianolic acid B、rosmarinic acid、caffeic acid and tanshinone IIA are active components with a variety of biological activities. Rosmarinic acid has been shown to exhibit a variety of pharmacological activities, *e.g.*, antioxidant, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and anti-allergic activities and protective effects in liver, myocardium and kidney. The biosynthesis of rosmarinic acid has been fully elucidated in *Coleus blumei*. Until 2006, the corresponding genes had been reported.

Combination of traditional medicine and transgenic plant as bioreactor for producing the constitutional and medical value metabolites is the development key point in the future. Thus, the transgenic plants can eat directly or prepare the drug for injection and oral medicine. In order to improve the content of rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza*, we will transfer the corresponding genes to generate the high rosmarinic acid production transgenic plants.

報告內容

生技藥物研發是今日世界的潮流，亦是我國的重點政策。世界各國從很早開始就有使用藥用植物的記載，如已有百年使用歷史的阿斯匹靈(aspirin)，主要的原料即是萃取自柳樹(*Salix alba*)樹皮的水楊酸，又如癌症的臨床用藥，紫杉醇、喜樹鹼等，亦是來自於植物。近幾年來，多種植物的萃取物，如紫錐菊(*Echinacea spp.*)、銀杏葉(*Ginkgo biloba*)、金絲桃草(*St. John's wort*, *Hypericum perforatum*)等，在歐洲數國已是法律許可之藥物，而美國則是以功能性健康食品的形式在市場販賣，同時亦允許以規格化生產的植物粗萃取物進行臨床實驗，以發展植物藥(botanical drugs)。

丹參(*Salvia miltiorrhiza*)為中國傳統醫學上著名的活血化癥藥物，具有抗凝血、抗發炎、抗菌、鎮靜和肝保護作用，並被廣泛地用於治療冠狀動脈心臟疾病和肝疾病。透過臨床的中、長期觀察和研究，許多的專家和醫生發現丹參對於心絞痛、心肌梗塞等疾病具有良好的效果。以丹參為主所做成的冠心二號，更是被大陸收錄在中國藥典內，而且也是日本唯一合格認證作為治療心絞痛的漢方藥。丹參中含有許多藥理活性成分，包括水溶性的丹參酚酸 B (salvianolic acid B)、迷迭香酸 (rosmarinic acid)、咖啡酸 (caffeic acid) 以及脂溶性的丹參酮 IIA (tanshinone IIA) 等，其效果廣受世人的肯定。

同時研究也證實迷迭香酸具有許多的生物活性，主要的活性包含止血(Parnham and Kesselring. 1985)、抗氧化(Gao et al. 2005)、抗菌、抗病毒、降低發炎反應，減少過敏發生的機會(Sanbongi et al. 2004; Osakabe et al. 2004; Takano et al. 2004; Banno et al. 2004; Makino et al. 2003; Makino et al. 2003; Shin et al. 2000; Makino et al. 1999; Swarupn et al. 2007)和抗血栓、抗血小板聚集的作用。

因此，迷迭香酸在製藥、食品和化妝品等領域中已出現其重要的應用價值。在此後基因體時代中，結合傳統藥物的研究與利用現代化的生物技術，並且透過調控植物體內的生化和生理系統，達到改良或製造出具醫療價值的化合物，將是未來藥物研發之新重點。

研究方法

一、大量表達迷迭香酸合成酶以及4CL 的蛋白

分別挑選含迷迭香酸合成酶以及含4CL 的單一菌落，分別培養於5 ml LB 培養液中(內含LBamp100)，置於37°C振盪培養隔夜。分別取已隔夜培養的菌液2 ml 加入新鮮的50 ml LB 培養液中(內含LBamp100)，置於37°C振盪培養至OD600=1.4 時，加入IPTG 至濃度為1 mM，再繼續37°C振盪培養5-6 小時。利用離心收集細胞，並置於-80°C保存，以待測酵素活性使用。

二、純化迷迭香酸合成酶以及4CL 的蛋白

每離心收集50ml 的細胞，加入12.5 ml 的20 mM Tris/HCl pH 8.0 溶液清洗。離心後再加入3 ml 50 mM sodium phosphate pH 7.5 溶液，置於細胞均質機將細胞打破。再以4°C，10000 xg 20 分鐘，取上清液進一步進行Ni-NTA His-Bind Superflow Resin (Novagen)的純化，純化方法則是參考操作手冊進行。此純化的蛋白將進行酵素的活性分析。

三、測試迷迭香酸合成酶的酵素活性

迷迭香酸合成酶的活性測試是依照Petersen 等人(2006)所提的方法。反應液總體基為250 µl包含純化的迷迭香酸合成酶、0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.0，1 mM DTT，0.5 mM ascorbic acid，0.2 mM 4-coumaroyl-或caffeoyl-CoA 和0.4 mM acceptor (已先溶在20 %酒精中的 4-Hydroxyphenyllactate、3,4-Dihydroxyphenyllactate、shikimic 或quinic acid)。混和均勻後，於30°C水浴中，反應30 分鐘，隨後加入20 µl 6N HCl終止反應。再加入0.5 ml ethyl acetate 於反應液中，震盪後以12000 xg 離心5 分鐘，小心吸取上清液至新的微量離心管。將上清液置於抽風櫃中風乾後，加入100 µl 50 % 甲醇/0.01% H₃PO₄ 回溶。此回溶的溶液將進行HPLC 的分析。

四、測試4CL 的酵素活性

反應液總體基為250 µl 包含100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 , 0.5 mM (hydroxy)benzoic acid 或(hydroxy)cinnmic acid , 2.5 mM ATP , 0.2 mM CoA , 2.5 mM MgCl₂ , 1 mM DTT 以及200 µ g protein(Wagner Barillas and Ludger Beerhues ,1997) 。混和均勻後，於30°C 水浴中，反應2 小時，隨後加入10 µl 3mM trichloroacetic acid 終止反應。震盪後以13000xg 離心10 分鐘，小心吸取上清液至新的微量離心管，以進行下一步HPLC 的分析。

Reference:

Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, Ukiya M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J, and Nishino H. (2004) Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 85-90.

Gao L.P, Wei H.L, Zhao H.S, Xiao S.Y. and Zheng R.L. (2005) Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie*, 60: 62-65.

Lin Li-Jen, Tai S.S.K, Peng C.C, and Tzen J.T.C. (2002) Steroleosin, a Sterol-Binding Dehydrogenase in Seed Oil Bodies. *Plant Physiology*, 128: 1-12.

Makino T, Ono T, Muso E, Honda G, and Sasayama S. (1999) Suppressive effects of *Perilla frutescens* on spontaneous IgA nephropathy in ddY mice. *Nephron*,. 83: 40-46.

Makino T, Ono T, Matsuyama K, Nogaki F, Miyawaki S, Honda G, and Muso E. (2003) Suppressive effects of *Perilla frutescens* on IgA nephropathy in HIGA mice. *Nephrol Dial Transplant*, 18: 484-490.

Makino T, Furuta Y, Wakushima H, Fujii H, Saito K, and Kano Y. (2003) Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytother Res*, 17: 240-243.

Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, and Yoshikawa T. (2004) Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 25: 549-557.

Parnham M.J, and Kesselring K. (1985) Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*,10: 756-757.

Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, Sasa N, Natsume M, Yanagisawa R, Inoue K.I, Sadakane K, Ichinose T, and Yoshikawa, T. (2004) Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clin Exp Allergy*, 34: 971-977.

Shin T.Y, Kim S.H, Kim S.H, Kim Y.K, Park H.J, Chae B.S, Jung H.J, and Kim H.M. (2000) Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Perilla frutescens*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 22: 489-500.

Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, and Basu A. (2007) Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemothe.*, 51: 3367-3370.

Takano H, Osakabe N, Sanbongi C, Yanagisawa R, Inoue K, Yasuda A, Natsume M, Baba S, Ichiishi E, and Yoshikawa T. (2004) Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229: 247-254.

王亞男、黃鵬林、王淑美、鄭石通、常玉強、王淑珍和鄭誠漢。2003. 植物組織培養與基因轉殖。國立台灣大學生物技術研究中心。

李冠群、江志明、余淑美和蕭介夫。2003. 植物基因轉殖在工業上之應用。植物基因轉殖之原理與應用。植物生物技術教學資源中心。231-242.

王昇陽、徐麗芬和楊寧蓀。2003. 植物基因轉殖在醫藥上之應用。植物生物技術教學資源中心。219-229

結果與討論

本計劃將從丹參中選殖出迷迭香酸合成酶以及其上游基因(4CL),並建立兩者酵素的活性測試平台,最終將高效能的迷迭香酸合成酶轉殖入丹參植物中,以獲得具有高產值的轉植株。本研究的具體成果為完成迷迭香酸合成酶以及其上游基因(4CL)的基因選殖,我們也將迷迭香酸合成酶的基因至NCBI 基因庫中註冊(ACCESSION: EU358958),同時利用大腸桿菌系統大量表現這兩者酵素,雖然表達的蛋白為不可溶,但經過denature and refolding 過程,我們已經可以成功利用His-taq column 純化為可溶的蛋白。目前建立4CL 的活性平台,並利用MALDI TOF MS 來鑑定4CL 的反應產物。同時,我們也研究RAS 和 4CL 在丹參全株中的基因表現情況,以及迷迭香酸在丹參全株中的含量分布。

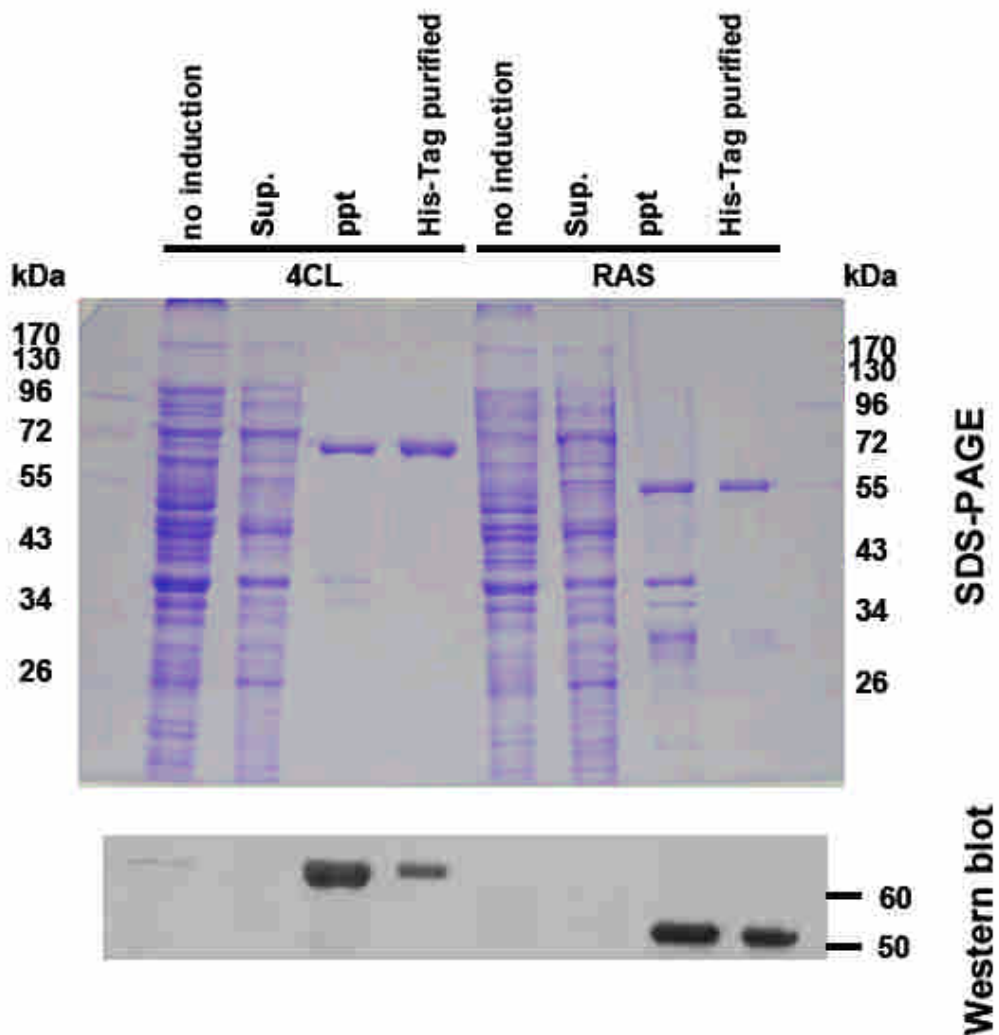


Fig 1 (A.) SDS-PAGE and western blotting of overexpressed *Salvia miltiorrhiza* 4CL and RAS in E.Coli, respectively. (B.) A duplicate gel was transferred onto PVDF membrane and

was then subjected to immunodetection using His-tag antibodies (1: 3000 dilution). These cDNA sequences encoding the RAS and 4CL, respectively, were constructed in a His-tag fusion vector and were then expressed in *E.coli*. These overexpressed polypeptides were predominantly present in the insoluble pellet of *E.coli* lysate. The insoluble pellets containing the overexpressed polypeptides were solubilized by guanidinium and then purified by ProBond™ purification System (Invitrogen).

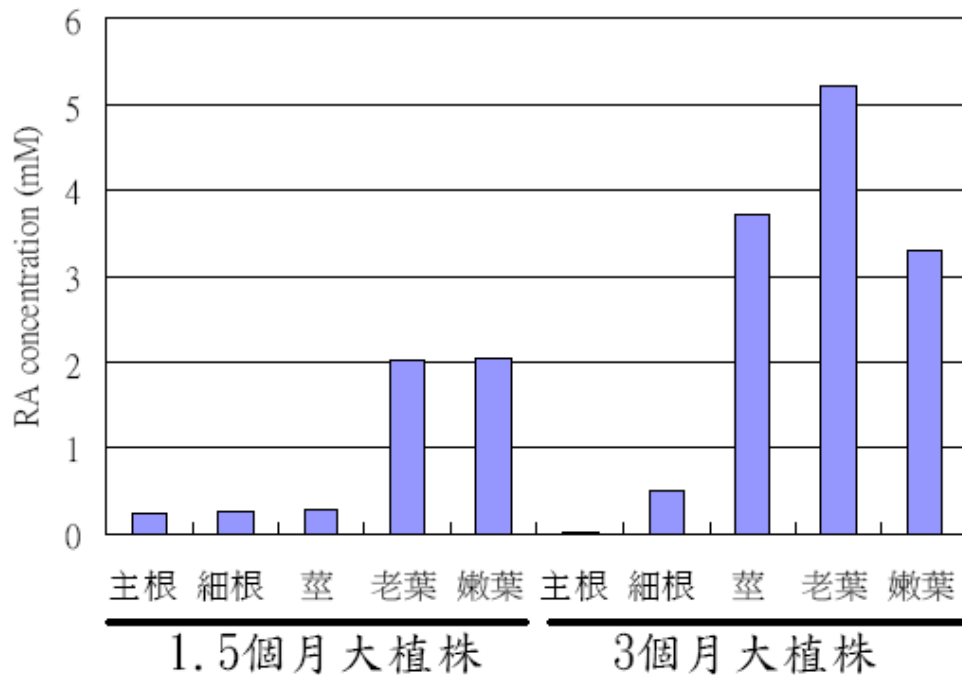


Fig 2. Investigation of contribution of rosmarinic acid in *salvia miltiorrhiza* was used by HPLC method. Rosmarinic acid was isolated from methanol extract of *salvia miltiorrhiza* tissues. We found the old leaf of three month *salvia miltiorrhiza* had a great quantity rosmarinic acid.

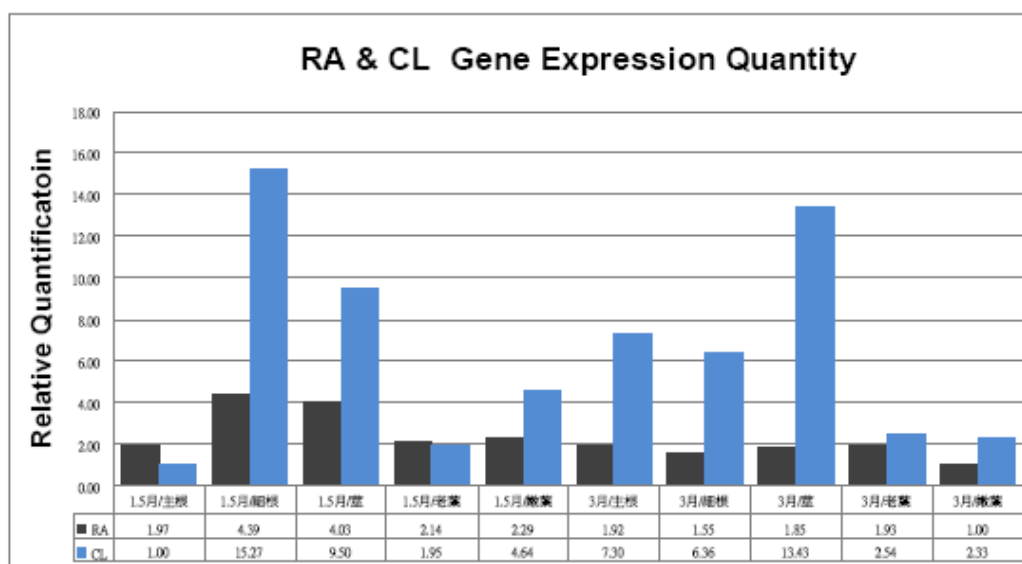


Fig 3 : The genes expression of RAS and 4CL in *salvia miltiorrhiza*, respectively, were analysis by Real-Time PCR. The quantitative study revealed a variety of gene expression level of RAS and 4CL. The patterns of two genes expression appeared differently. However, the maximal level of RAS and 4CL genes expression were in same tissue, small root of 1.5 month *salvia miltiorrhiza*.

