

刘天怡,金朝霞. MicroRNA 在植物药用天然活性物质代谢途径中的调控作用[J]. 江苏农业科学,2019,47(16):34-38.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.16.008

MicroRNA 在植物药用天然活性物质 代谢途径中的调控作用

刘天怡,金朝霞

(大连工业大学生物工程学院,辽宁大连 116034)

摘要:植物体中含有丰富的具有生理活性的化合物,其代谢过程错综复杂且受多元调控。MicroRNA(miRNA)是约 23 nt 大小的非编码 RNA 分子,属于参与基因调控的反式作用因子。在植物中,miRNA 主要通过靶基因的特异性结合来对其进行转录后水平的调控。近年来,关于植物 miRNA 的研究发展得非常迅速。越来越多的研究表明,miRNA 几乎参与调控了植物各个生长阶段的生理过程。药用天然活性物质主要来源于相关植物的次生代谢。miRNA 主要通过靶向作用植物细胞次生代谢途径上的酶及转录因子,或者通过影响植物激素的信号转导来调控次生代谢产物化学成分的合成。本文介绍了 miRNA 的生物合成、作用机制和生理功能,以及与植物化学相关的次生代谢的常见途径,主要综述了近年来国内外对 miRNA 在一些具有药用活性的植物天然化学产物合成过程中的调控作用的研究进展,并且展望了未来对药用植物中 miRNA 的研究方向。

关键词:miRNA;药用植物;次生代谢;植物化学;活性物质

中图分类号:Q946.8;Q943.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)16-0034-05

1 概述

1.1 MicroRNA 简介

MicroRNA(miRNA)是一类由 21~24 个核苷酸所组成的单链非编码 RNA 分子,由真核生物内源产生,通过 RNA 聚合酶 II 转录之后演变为对应的茎环结构,随后进行相应的剪切加工处理,进而获得成熟状态的 miRNA。其主要功能是在转录后水平通过翻译抑制、靶标 mRNA 切割和表观遗传学修饰等方式下调基因表达^[1-2]。1993 年, Lee 等在秀丽新杆小线虫(*Caenorhabditis elegans*)中鉴定出第 1 条 miRNA 分子 lin-4^[3];2000 年,Reinhart 等在线虫中鉴定出第 2 条 miRNA 分子 let-7^[4]。2002 年,Reinhart 实验室在拟南芥中鉴定出 16 条 miRNA 分子^[5],从此,科学家们开始了关于植物中的 miRNA 的研究。迄今为止,越来越多的研究表明,miRNA 是很多植物中最重要的基因表达调控元件之一,参与调控几乎所有的植物生理代谢过程,例如干细胞的维持和分化、器官发育、信号转导、调控次生代谢,并参与响应非生物胁迫及再生的过程^[6]。

1.2 miRNA 的作用机制

1.2.1 植物 miRNA 合成 植物 miRNA 的合成实际上是 MIRNA 基因表达的过程,关系到转录、转录后剪切加工以及与 AGO 蛋白结合生成 RISC 复合体等步骤。

植物的初级 miRNA(pri-miRNA)主要由 MIRNA 基因通过 RNA 聚合酶 II 转录而来。大多数保守的 MIRNA 基因的启动子结构与编码蛋白质的基因启动子很相似,具备 TATA 框及转录因子结合位点,所以 miRNA 的生物合成与蛋白质的翻译也会受到相关转录因子的影响^[7]。

转录因子是真核生物中可以和一些特定基因的启动子区域的顺式元件产生特异性相互作用的 DNA 结合蛋白,这些蛋白依靠特异性相互作用而激活或是抑制相关基因的转录,进一步调控下游基因的表达。例如拟南芥转录因子 TCP (TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF)家族。最早的研究发现与 cycloidea(CYC)和 teosinte branched 1(TB1)蛋白基因编码相似的蛋白,都可以演变为非典型的螺旋-环-螺旋[non-canonical basic-Helix-Loop-Helix(bHLH)]^[8],在水稻 PCF DNA 结合蛋白中也发现这种 bHLH 结构的存在^[9]。将含有这种保守结构域的转录因子定义为 TCP 转录因子家族。拟南芥基因组编码了 24 个 TCP 转录因子。其中 TCP3 能直接结合到 miR164a 的启动子,激活其表达^[10]。

随后,在 Dicer 酶 DCL1 配合 SE 蛋白和 HYL1 蛋白的共同作用下,剪切植物的初级 RNA 演变为 miRNA 的前体物质 pre-miRNA^[1,11]。

Dicer 酶是一种特殊的双链 RNA 专一性内切酶,针对特定的双链或茎环结构进行切割处理,进而获得长度为 21 nt 或 22 nt 的双链切割产物^[12]。自 N 末端开始,Dicer 酶依次由 RNA 解旋酶结构、PAZ 结构域、2 个 RNA 降解催化区等多个结构构成^[13]。拟南芥中,已被发现的 Dicer 酶有 4 种,分别是 DCL1、DCL2、DCL3、DCL4,用来加工花器官及叶片中的 miRNA^[14]。

随后在 pre-miRNA 上进行第 2 次剪切操作,从而获得对应的双链 miRNA-miRNA*^[15];这一双链在 HEN1(miRNA

收稿日期:2019-06-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31670604、31570303);辽宁省自然科学基金(编号 2015020659)。

作者简介:刘天怡(1993—),女,辽宁鞍山人,硕士研究生,研究方向为代谢调控与合成生物学。E-mail:liu_tianyee@sina.com。

通信作者:金朝霞,副教授,主要从事天然活性物质与次生代谢调控研究。E-mail:jinzx2018@163.com。

甲基转移酶)的作用下,3'端末尾的核苷酸发生甲基化^[16];甲基化之后,在 HASTY 蛋白的作用之下,将其自细胞核转运至细胞质^[17];最后,双链裂解演变为 2 个单链,已经接近成熟的 miRNA 和靶基因之间进行整合,在 AGO (Argonaute) 蛋白的作用下,加入到 RNA 沉默复合体(RISC)的组装环节中,另外一个互补链(miRNA*)则大部分被降解,其中仅有较少的具备相关功能的部分被保存下来^[18]。

AGO 蛋白是一类庞大的蛋白质家族,是 RISCs 复合物的主要成员,其序列高度保守,是转录因子 EIF2C 的同源物^[19]。AGO 蛋白主要包含 2 个结构域:PAZ 结构域和 PIWI 结构域。研究表明,PAZ 结构域结合到 siRNA 的 3' 的二核苷酸突出端;一些 AGO 蛋白的 PIWI 结构域赋予 slicer 以内切酶的活性。这 2 个结构域对于 siRNA 和目标 mRNA 相互作用,从而导致目标 mRNA 的切割或翻译抑制过程是必不可少的。

miRNA 和转录因子一样,都属于参与基因表达调控的反式作用因子,通过与 DNA 结合来调节真核基因的转录。miRNA 与转录因子一样,具有基因表达调控的时空特异性,通过激活和阻遏特定基因的表达来决定细胞分化的方向。miRNA 的靶基因大多是转录因子基因,主要调控转录因子的表达,并且受转录因子的负调控,同时 1 个 miRNA 可多个靶基因,例如拟南芥 miR156 及其靶基因 SPL 家族。

1.2.2 植物 miRNA 的作用机制 在植物中,miRNA - RISC 对靶基因 mRNA 的作用主要通过与靶基因完全互补结合,切断靶基因的 mRNA 分子,作用的方式和功能与 siRNA (small interfering RNA) 十分相似。在 miRNA 的切割环节内,5'端的 2~8 位残基作为和靶 mRNA 存在互补效应的特殊元件,切割位点是 miRNA 第 10~第 11 位所对应的靶 mRNA 的 ORF 区^[20-21]。miRNA 的另一种作用方式为抑制靶基因的翻译。发生这种作用时,miRNA 与靶基因不完全结合,依靠调整靶 mRNA 中核糖体的数量或特异性地降解多肽进一步约束 mRNA 的翻译^[22]。这种作用方式在植物中较为少见。但是互补程度与作用机制的关系并不绝对。例如拟南芥 miR172 与转录因子 APETALA2 的 ORF 序列完全互补,但却是通过翻译抑制来调节其表达的^[23],甚至切割和抑制 2 种模式大多是彼此协同而进行调控的^[24]。此外,miRNA 也可通过其他的模式来调控,例如通过与其他 RNA 竞争结合蛋白来实现靶基因的表达沉默^[25]。

1.3 植物次生代谢与植物天然活性物质的简介

植物次生代谢是相对于植物的初生代谢而言的,即植物利用初生代谢产物,在一系列酶的催化作用下,通过进一步合成或分解代谢,产生诸如生物碱、黄酮类、挥发油等物质。此类代谢的基础定义最初源自于 Kossel 在 1891 年的分析,随着研究的不断深入,人们发现,此类产物尽管并非细胞活动的必备物质,但其在植物与生态环境的关系中充当了重要的角色,赋予植物环境适应性和防御等能力^[26]。同时,次生代谢产物具有较大的应用性,很多传统中草药的有效成分主要是植物的次生代谢产物。例如生物碱有着抗菌、消炎以及抗癌等多方面的功能^[27];黄酮类在抗菌、消炎以及抗艾滋病等方面有着显著的效果^[28];植物酚酸类在清除氧自由基等方面有着良好的表现,进而可以优化循环和恢复控制损伤以及硬化等问题^[29]。此类药用植物的天然次级代谢活性物质对人类医学

的发展有着重要的意义。

植物体内天然活性物质的次生代谢合成途径核心为:依靠甲羟基戊酸等方式来获得所需求的萜类物质;依靠醋酸-丙二酸等方式来获得脂肪酸类以及酚类等相关的物质;依靠氨基酸等方式来获得生物碱类;依靠桂皮酸等方式来获得苯丙素类及黄酮类化合物等等^[30]。这些代谢途径因为次生代谢产物具有多样性,其合成途径也极为复杂并且易受外界影响,所以次生代谢的过程具有复杂的调节机制,研究人员可依靠针对次生代谢合成的有效控制,从而调整此类代谢物的实际产出规模。

大量研究表明,植物 miRNA 的调控功能涉及到植物几乎所有的代谢过程,例如参与植物的生长阶段转变、器官形态的建成、对环境胁迫的应答和相关的次生代谢效应。次生代谢使植物在长时间的进化过程中,对于生态环境产生适应性效果,在植物与生态环境之间的关系中发挥了显著的影响作用。很多植物在面临病原以及恶劣的环境威胁的情况下,会生成并且同时积累大量的次生代谢产物,以此来获得更具有适应性的免疫力以及抵抗力。而且相关的代谢途径涉及到许多转录因子、植物激素以及酶的调控。近些年关于该领域的众多试验结果表明,miRNA 可通过靶向作用植物次生代谢途径中的转录因子或关键酶的基因来调控植物次生代谢产物的合成过程。本文将结合 miRNA 的合成调控及其生物学功能,主要介绍目前已报道的部分植物 miRNA 在植物次生代谢合成调控过程中的作用。

2 植物 miRNA 参与调控植物次生代谢产物的生物合成

2.1 miRNA 对拟南芥次生代谢途径的调控作用

研究表明,模式植物拟南芥中主要存在着以下几类 miRNA 所介导的天然活性化合物的代谢合成调控现象,它们有些直接作用于靶向合成酶基因及转录因子,有些则通过间接调控植物激素合成及其信号传导来介导次生代谢的途径。

花青素 (anthocyanidins) 是自然界中一类广泛存在于植物体内的水溶性天然色素,具有向顶性,通常在植物的叶子和茎中积累,能够反映光照量及营养水平。花青素和黄酮醇都是酚类化合物,由苯丙氨酸通过苯丙烷素类合成途径合成而来。二氢黄酮醇是两者的共同中间前体物质。二氢黄酮醇由黄酮醇合成酶催化生成黄酮醇;由二羟黄酮醇 4 - 还原酶催化则生成花青素。拟南芥中,花青素的积累受 miR156 及其靶基因 *SPL9* 的负调控。在 miR156 活性高的情况下,花器官以及茎的连接位置存在较多的花青素;miR156 活性低的情况下,其中的花青素会急剧减少,黄酮醇则高水平积累。试验证实,转录因子 *SPL9* 依靠和 TT8 (Transparent Testa 8) 竞争结合 PAPI (production of anthocyanin pigment 1) 从而限制 MYB - BHLH - WD40 转录复合体的演变,进一步控制花青素合成基因 *DRF* (dihydroflavonol reductase) 的表达,负调控花青素的合成^[31]。拟南芥中另一保守的 miRNA - miR828 靶向作用 *TAS4* (transacting siRNA gene4) 和 *MYB113*。源自 *TAS4* 的 ta - siRNA 的靶向 PAPI、PAP2、MYB113 蛋白均属于 MYB 转录的基础构成之一,加入到控制黄酮类等产物的合成过程中^[32]。miRNA 通过直接作用于靶向合成酶基因及转录因子来调控拟南芥中花青素以及黄酮醇的积累。

拟南芥 miR163 是新近进化的 miRNA,在拟南芥中表达量很高。miR163 靶向参与次生代谢途径的甲基转移酶 SABATH 家族蛋白基因的表达调控,包括水杨酸羧基甲基转移酶(salicylic acid carboxyl methyltransferases, SAMT)、苯甲酸羧基甲基转移酶(benzoic acid carboxyl methyltransferases, BMT)和可可碱合酶(theobromine synthase)、麝油酸甲基转移酶(farnesoic acid O-methyltransferase, FAM)^[20,33]。麝油酸甲基转移酶也是 miR163 的靶标,它能把麝油酸(FA)转化为甲基麝油酸(MeFA)。植物中的甲基麝油酸能干扰昆虫的生长发育,是重要的次生代谢产物之一^[34]。

茉莉酸类物质(jasmonates, JAs)是茉莉酸(jasmonic acid, JA)、挥发性衍生物的茉莉酸甲酯(methyl-jasmonate, MeJA)以及氨基酸衍生物的总称,是高等植物中较为常见的植物激素之一。拟南芥 miR319 靶向作用转录因子 TCP 的 mRNA, TCP 依靠控制 JA 合成环节中的重要酶基因 LOX2 从而限制 JA 的合成。植物中 miR319 的表达水平越高,转录因子 TCP 的数量也相对较小,从而限制相关茉莉酸的具体合成量,减缓植物存在的衰老问题^[35]。茉莉酸通过激活或抑制相应转录因子的活性进而调控与植物次生代谢相关的关键酶基因的表达或者活性,从而对次级代谢进行调控。脱落酸(abscisic acid, ABA)也属于较为关键的植物激素,重点控制种子的萌发、生长,叶片气孔活动和植物的适应性问题。用 ABA 处理拟南芥后,拟南芥 miR167 表达量明显下调。miR167 的靶基因已被证实是生长素应答因子 ARF6 和 ARF8,它们在雌蕊群和雄蕊群的发育以及成熟度的调控中起到重要作用,它们的过量表达可导致植物早熟^[36]。

2.2 植物 miRNA 参与部分具有药用活性的次生代谢产物合成

2.2.1 miRNA 对红豆杉中紫杉醇次生代谢的调控作用

紫杉醇(paclitaxel, PTX)别名红豆杉醇,是二萜类生物碱化合物,是目前已发现的最优秀的天然抗癌药物,也是红豆杉最主要的次生代谢产物。通过降解组测序技术对红豆杉 miRNA 进行靶点预测的结果显示,红豆杉 miR164 及 miR171 以此控制合成环节的 13 α -羟基化酶(taxane 13 α -hydroxylase)和紫杉二烯 2 α -O-苯甲酰转移酶(taxane 2 α -benzoyl transferases)基因,表明此类 miRNA 或许参与了紫杉醇的合成调控^[37]。

2.2.2 miRNA 对白木香中沉香次生代谢的调控作用

沉香(Agarwood)具有相对较高的医药价值,是药用植物白木香最为关键的代谢物,可制香、入药,但均是在白木香受到外伤或病虫害侵害时才产生。Gao 等利用 miRNA 高通量测序技术并围绕 454 个转录组进行针对性的探讨,从而在其中发现了 27 条新的 miRNA 以及 25 个家族的 74 条保守 miRNA。采用实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR)技术来研究 10 条保守 miRNA 在木茎各个时期的表达状态,最终得出 miR160 和 miR398 或许和其中存在的沉香成分存在一定的联系。除此之外,研究 asi-miR408 和 asi-miR408* (asi-novel-miR2)在白木香植物的根、茎以及愈伤组织中的表达状态,发现植物组织中的 asi-miR408* 相对于 asi-408 有着更多的积累,表明有些 miRNA 发挥了特殊的影响^[38]。

2.2.3 miRNA 对丹参中丹酚酸次生代谢的调控作用

丹酚

酸(phenolic acid)是著名中草药丹参的次级代谢产物,从丹参的根、茎中提取获得。丹酚酸具有很强的抗氧化作用,能消除氧自由基、抑制脂质过氧化反应,是目前已知的抗氧化作用最强的天然产物之一,可以抑制血栓的形成,对心脑血管疾病有着重要的医疗效果。对丹酚酸的代谢途径以及调控机制的研究是尤为重要的。研究表明,丹酚酸的代谢与丹参多酚氧化酶家族(Salvia miltiorrhiza polyphenol oxidases, SmPPOs)有密切的关系。对 miRNA 进行高通量测序及降解组测序的试验结果显示,miR1444 介导了 PPOs 的调控。与此相反,SmPPOs 被一种新发现的 miRNA-Smi-miR12112 在转录后水平调节。这个发现为揭示与 PPOs 相关的丹酚酸的生物合成及次生代谢提供了重要线索^[39]。

2.2.4 miRNA 在其他药用植物次生代谢途径中的调控作用

油菜(*Brassica napus* L.)是一种常见的油料作物,具有非常丰富的营养价值及药用价值。油菜中含量最高的营养成分即为萜类化合物类胡萝卜素(carotenoids),是一种较为关键的代谢物。类胡萝卜素作为在自然环境中较为多见的基础色素之一,属于含有较多共轭双键的特殊的萜烯基团类物质,在抗氧化以及抗衰老等方面有着一定的效果,和身体的健康存在着紧密的联系。所以高类胡萝卜素油菜的培育是后续的重点研究趋势之一。在油菜株系的相关种子内过表达拟南芥 miR156,可使类胡萝卜素含量提高。试验证实,SPL15 能选择性地结合类胡萝卜素裂解双加氧酶(carotenoid cleavage dioxygenase, CCD)或 9-顺-环氧类(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)家族的配套启动子来调控类胡萝卜素的积累^[40]。

熟地黄(*Rehmannia glutinosa* L.)是一种常见的传统中药,主治由肝肾阴虚引起的各种病症,其中的主要药用成分为环烯醚萜类物质。环烯醚萜类化合物是广泛存在于双子叶植物中的一类化合物,具有广泛的生物学活性,是次生代谢途径中重要的化合物之一。熟地黄 rgl-miR164 靶向作用细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)蛋白家族,该细胞色素参与了一些植物萜类代谢途径中的重要化学反应^[41]。

多年生草本植物广藿香(*Pogostemon cablin*)是一种常见的中药,用于治疗湿浊中阻、脘痞呕吐、暑湿表证、湿温初起、发热倦怠、胸闷不舒、寒湿闭暑、腹痛吐泻、鼻渊头痛等症。Yu 等发现广藿香中的 miR156 靶向的转录因子 SPL9 能够结合相关的倍半萜合成酶 TPS21 基因来有效地启动对应的启动子区,以此来激活其中的基础表达,参与了次生代谢产物广藿香油主要成分倍半萜的合成过程^[42](表 1)。

3 结语

药用植物在中国传统医药学中扮演着重要的角色。中国有着数量较多的药用资源,而植物在中药材中的占比约为 87%。后续在药用植物中提取所需的化学成分来研制新药,对人类的医学发展具有重要的意义,因此对药用植物次生代谢途径的研究也将变得愈发重要。植物 miRNA 在维持植物营养、发育、应对环境以及胁迫等领域起到了显著的影响,参与了绝大多数植物细胞代谢的过程,包括植物生长周期的阶段性转变、植物器官形态的形成发育、在植物受到外界胁迫时的信号传导及激素应答等等,作为最为关键的调控因子。所

表 1 部分与植物次生代谢有关的 miRNA

物种名称	miRNA	靶向的调控因子	功能	参考文献
拟南芥	miR156	转录因子 SPL9	调控花青素和黄酮醇的积累	[31]
	miR828	TAS4 和 MYB113 蛋白		[32]
	miR163	甲基转移酶家族 SABATH	调控多个次生代谢物合成	[34]
	miR319	转录因子 TCP	通过调控茉莉酸的合成来调控次生代谢	[35]
	miR167	生长素应答因子 ARF6 和 ARF8	通过调控脱落酸的合成来调控次生代谢	[36]
红豆杉	miR164	13 α -羟基化酶	参与紫杉醇的合成	[37]
	miR171	紫杉二烯 2 α -O-苯甲酰转移酶	参与紫杉醇的合成	[37]
白木香	miR160、miR398	待研究	与沉香的代谢有一定联系	[38]
丹参	Smi-miR12112	多酚氧化酶家族 PPO	参与了丹酚酸的合成	[39]
菠菜	miR156	转录因子 SPL15	调控类胡萝卜素的积累	[40]
熟地黄	miR164	细胞色素 P450	参与蒽类代谢产物的合成	[41]
广藿香	miR156	转录因子 SPL9	参与倍半萜烯化学成分的合成过程	[42]

以,系统地探讨植物的 miRNA 对于发展新时代的高产以及优质的中药材而言存在较为关键的价值。

由于科学家们对 miRNA 的研究多数集中在动物细胞或肿瘤细胞上,对植物的 miRNA 研究相对较少,并且更多地集中在调控植物生长方面,对 miRNA 在次生代谢中的调控还不是很多。但近几年来,很多相关的研究者已发现了很多的植物 miRNA,并进而研究了它们在次生代谢环节所产生的调控效应,取得了较为理想的研究结果。笔者认为在后续的分析环节中,关于 miRNA 的深入研究会基于下述几个角度来推进:(1)运用相关技术,鉴定各个类别的药用植物的 miRNA;(2)探讨相同类别的植物内,各个器官以及不同生长阶段的 miRNA 的表达情况;(3)探讨 miRNA 在各种生物以及环境影响效应下存在的应答变化;(4)预测 miRNA 对应的靶基因信息;(5)利用基因工程的手段,研究其在各个生长环节中所发挥的功能以及配套的调控网络;(6)着重探讨 miRNA 在植物中对于药用活性物质合成途径中的特殊调控作用。伴随对 miRNA 研究的持续深化,后续期望通过调节 miRNA 的技术来优化相关植物的遗传效果,来解决更加关键的问题——野生药用植物的有效成分相对较少,而进行化学合成不仅需要耗费更高的成本,同时也需要复杂的化工程序,带来显著的污染问题,而系统地探究相关植物中 miRNA 在次生代谢产物合成环节产生的影响,能够更好地利用生物技术来提升特殊产物的合成量进行有效的铺垫。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281–297.
- [2] Ambros V, Bartel B, Bartel D P, et al. A uniform system for microRNA annotation[J]. RNA, 2003, 9(3): 277–279.
- [3] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843–854.
- [4] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901–906.
- [5] Lai X, Bazin J, Webb S, et al. CircRNAs in plants[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2002, 1087(13): 329–343.

- [6] Jung J H, Seo P J, Park C M. MicroRNA biogenesis and function in higher plants[J]. Plant Biotechnology Reports, 2009, 3(2): 111–126.
- [7] Xie Z X, Allen E, Fahlgren N, et al. Expression of arabidopsis MIRNA genes[J]. Plant Physiology, 2005, 138(4): 2145–2154.
- [8] Lu J, Sloan S R. The basic helix-loop-helix domain of the E47 transcription factor requires other protein regions for full DNA binding activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 290(5): 1521–1528.
- [9] Liu L, White M J, Macrae T H. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 262(2): 247–257.
- [10] Laufs P, Peaucelle A, Morin H, et al. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems[J]. Development (Cambridge, England), 2004, 131(17): 4311–4322.
- [11] Kurihara Y, Watanabe Y. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(34): 12753–12758.
- [12] Bass B L. Double-stranded RNA as a template for gene silencing[J]. Cell, 2000, 101(3): 235–238.
- [13] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001, 409(6818): 363–366.
- [14] Chapman E J, Carrington J C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways[J]. Nature Reviews Genetics, 2007, 8(11): 884–896.
- [15] Hofmann N R. MicroRNA evolution in the genus *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2010, 22(4): 994.
- [16] Hammond S M, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. Nature, 2000, 404(6775): 293–296.
- [17] Park M Y, Wu G, Gonzalez-Sulser A, et al. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(10): 3691–3696.
- [18] Hutvagner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex[J]. Science, 2002, 297(5589): 2056–

- 2060.
- [19] Fagard M, Boutet S, Morel J B, et al. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(21): 11650-11654.
- [20] Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, et al. Prediction of plant microRNA targets[J]. Cell, 2002, 110(4): 513-520.
- [21] Llave C, Xie Z, Kasschau K D, et al. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. Science, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- [22] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2004, 16(8): 2001-2019.
- [23] Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development[J]. Science, 2004, 303(5666): 2022-2025.
- [24] Millar A A, Waterhouse P M. Plant and animal microRNAs: similarities and differences[J]. Functional & Integrative Genomics, 2005, 5(3): 129-135.
- [25] Ambros V. MicroRNAs: tiny regulators with great potential[J]. Cell, 2001, 107(7): 823-826.
- [26] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA[J]. Cell Research, 2012, 22(1): 107-126.
- [27] 张鹏, 黄启来, 华子春. 茛菪酰胺的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(1): 201-204.
- [28] 高颖, 房德敏. 骨碎补黄酮类化合物的研究进展与开发前景[J]. 中草药, 2009, 40(2): 323-326.
- [29] 刘芬. 转录因子 PAP2 对丹参酚酸类产物合成的影响[D]. 西安: 陕西师范大学, 2011: 5-6.
- [30] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [31] Gou J Y, Felippes F F, Liu C J, et al. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor[J]. The Plant Cell, 2011, 23(4): 1512-1522.
- [32] Luo Q J, Mittal A, Jia F, et al. An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 2012, 80(1): 117-129.
- [33] Allen E, Xie Z, Gustafson A M, et al. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature Genetics, 2004, 36(12): 1282-1290.
- [34] Ng D W, Zhang C Q, Miller M, et al. cis- and trans-Regulation of miR163 and target genes confers natural variation of secondary metabolites in two *Arabidopsis* species and their allopolyploids[J]. Plant Cell, 2011, 23(5): 1729-1740.
- [35] Schommer C, Palatnik J F, Aggarwal P, et al. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets[J]. PLoS Biology, 2008, 6(9): e230.
- [36] Su Y H, Liu Y B, Zhou C, et al. The microRNA167 controls somatic embryogenesis in *Arabidopsis* through regulating its target genes *ARF6* and *ARF8*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2016, 124(2): 405-417.
- [37] Hao D C, Yang L, Xiao P G, et al. Identification of taxus microRNAs and their targets with high-throughput sequencing and degradome analysis[J]. Physiologia Plantarum, 2012, 146(4): 388-403.
- [38] Gao Z H, Wei J H, Yang Y, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in *Aquilaria sinensis* based on small RNA sequencing and transcriptome sequence data[J]. Gene, 2012, 505(1): 167-175.
- [39] Li C, Li D, Li J, et al. Characterization of the polyphenol oxidase gene family reveals a novel microRNA involved in post transcriptional regulation of PPOs in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44622.
- [40] Emami M D. Uncovering the molecular Link between miR156. SPL15 and carotenoid accumulation in *Arabidopsis* [D]. Western Ontario: The University of Western Ontario, 2014: 41-50.
- [41] Legrand S, Valot N, Nicolé F, et al. One-step identification of conserved miRNAs, their targets, potential transcription factors and effector genes of complete secondary metabolism pathways after 454 pyrosequencing of calyx cDNAs from the Labiate *Salvia sclarea* L. [J]. Gene, 2010, 450(1/2): 55-62.
- [42] Yu Z X, Wang L J, Zhao B, et al. Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-Targeted SPL transcription factors[J]. Molecular plant, 2014, 8(1): 98-110.