

# 农杆菌转化体系在药用微藻中的研究进展

王柳英<sup>1,2</sup>, 林祥志<sup>1</sup>, 娄素琳<sup>1</sup>, 王昭凯<sup>1\*</sup> (1. 国家海洋局第三海洋研究所, 国家海洋局生物资源综合利用工程技术研究中心, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 农杆菌介导的遗传转化具有操作简便, 转化率高, 可低拷贝和大片段整合外源基因在宿主染色体上等优点, 已经在植物中广泛应用。微藻作为一种重要的种质资源, 是多种功能活性产物的初级生产者, 在药物开发方面极具发展潜能。农杆菌介导的转化体系在部分微藻中获得成功, 有效提高了药用活性产品的生产效率, 改良了微藻的生理性能, 为微藻药用资源的大规模工业化生产奠定了基础。本文综述了微藻来源的药用功能产物及农杆菌转化体系在微藻中的研究现状和影响转化效率的因素, 并展望了该技术在药用微藻中的应用前景, 为药用微藻资源的基因工程改造提供一定的参考和借鉴意义。

**关键词:** 微藻; 药用产物; 农杆菌介导; 遗传转化; 转化效率

中图分类号: S567.239 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2016)10-1084-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2016.10.014

## Research progress on the *Agrobacterium*-mediated medicinal microalgae genetic transformation system

WANG Liu-ying<sup>1,2</sup>, LIN Xiang-zhi<sup>1</sup>, LOU Su-lin<sup>1</sup>, WANG Zhao-kai<sup>1\*</sup> (1. *Engineering Research Center for Comprehensive Utilization of Marine Biological Resource, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen Fujian 361005*; 2. *School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen Fujian 361005*)

**Abstract:** *Agrobacterium*-mediated genetic transformation has been widely used for plants, owing to its merits such as operation simplicity, high efficiency of transformation, and transferring a large segment of foreign DNA with low copy of the transgene (s) into host chromosomes. Microalgae are known as germplasm resources and primary producers of a variety of functionally activated products. It also possesses great potential in the development of pharmaceutical exploitation. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system has been established successfully in some microalgae. This technology has efficiently increased the productivity of medicinal activated products and improved the physiological performance in microalgae, thus laying foundation for the mass production of medicinally valuable microalgae at large-scale. This paper summarizes the medicinally activated products from microalgae, the research progress on the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in microalgae as well as the factors affecting transformation efficiency, the application prospect of this technique in medicinal microalgae, and ultimately providing certain reference to the genetic engineering of medicinal microalgae.

**Key words:** microalgae; medicinal product; *Agrobacterium*-mediated; genetic transformation; transformation efficiency

微藻能够产生多种具有药用价值的生理活性物质。通过基因工程技术提高微藻的药用活性产物含量, 可以丰富药物资源的来源。本文概述了微藻的主要药用活性产物, 农杆菌介导微藻遗传转化的研究现状和影响转化效率的因素, 并展望这项技术在药物资源微藻工业化的应用前景。

### 1 药用微藻资源

微藻本身具有蛋白质、氨基酸、胞外多糖、多不饱和脂肪酸 (PUFA) 等各种营养物质, 还可以

通过代谢产生各类具有高附加值的产品, 特别是在医药领域具有重要生理功能, 可作为药物资源的活性产物, 如高产二十二碳六烯酸 (DHA) 的裂壶藻 (*Schizochytrium. sp*)、能工业化生产  $\beta$ -胡萝卜素的盐藻 (*Dunaliella Salina*)、色素成分中叶黄素含量最高的小球藻 (*Chlorella vulgaris*)、胁迫条件下能虾青素的雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 和小球藻 (*Chlorella zofingiensis*), 在生理代谢过程中释放胞外多糖和合成药用氨基酸的各种微藻等。

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费项目 (No. 201505032); 厦门南方海洋研究中心项目 (No.14GZP021NF21)。

作者简介: 王柳英, 女, 硕士, 主要从事基因工程方面的研究, E-mail: 451253697@qq.com \* 通讯作者: 王昭凯, 男, 博士, 主要从事基因工程方面的研究, E-mail: wang@tio.org.cn

### 1.1 二十二碳六烯酸 (DHA)

DHA 是  $\omega$ -3 PUFA, 是哺乳动物的必需脂肪酸, 具有促进大脑发育、改善大脑功能、提高记忆力, 防治心脏疾病、动脉硬化、癌症、风湿关节炎、哮喘和糖尿病等功能<sup>[1-2]</sup>。从深海鱼油中提取的 DHA 质量受环境、季节条件的影响较大, 副产品高, 后续处理繁琐, 成本高, 提取产物伴有腥臭味, 且可能含有重金属等污染物<sup>[3]</sup>。而微藻作为海洋生态系统的生产者, 是合成 PUFAs 特别是  $\omega$ -3 PUFAs 的最初来源。从微藻中提取 PUFAs 较从鱼油中提取具有更多优势, 如提取工艺简单, 产品无腥味, 组分简单, 某些微藻产 PUFAs 的含量高达细胞干重 5% ~ 6%, 远高于鱼体内的含量<sup>[4]</sup>, 部分微藻本身营养丰富无害, 无需提纯可以直接食用<sup>[5]</sup>。硅藻类、金藻类、绿藻类、甲藻类、红藻类等海洋微藻均具有含量不等的 DHA。其中异鞭藻类的裂壶藻 (*Schizochytrium limacinum*) 生长快, 可异养发酵是微藻中 DHA 的重要来源。

### 1.2 虾青素

虾青素是一种红色酮式类胡萝卜素, 虾青素的酮基和羟基赋予其清除自由基、防止油脂氧化、淬灭单线态氧、增强机体免疫系统、保护视网膜、保护皮肤免受紫外线损伤、预防心血管疾病和预防癌症等活性功能, 是迄今为止发现的最强的抗氧化活性物质, 其抗氧化活性是维生素 E 的几百倍<sup>[6]</sup>。但研究发现, 只有左旋虾青素具备强的生理活性, 右旋结构的虾青素生物活性较低, 内消旋虾青素几乎没有生物活性<sup>[7]</sup>。只有藻源的虾青素主要以左旋结构为主, 具有极强生物学活性<sup>[8]</sup>, 具备药用价值。目前, 藻源虾青素主要来源于雨生红球藻和小球藻, 关于这 2 种微藻在胁迫条件下积累虾青素的报道一直是研究的热点<sup>[9-10]</sup>。

### 1.3 $\beta$ -胡萝卜素

$\beta$ -胡萝卜素是一种橙黄色的四萜类化合物, 是维生素 A 的重要来源<sup>[11]</sup>, 具有抗氧化、延缓衰老、提高免疫力、降低肿瘤和心血管疾病等功效<sup>[12]</sup>。来源于胡萝卜的  $\beta$ -胡萝卜素含量低, 提取过程复杂, 着色力差, 经济效益低。而化学合成工艺复杂, 带有副产品, 也不能满足日益增长的对天然  $\beta$ -胡萝卜素产品的需求。杜氏藻适合大规模培养, 其  $\beta$ -胡萝卜素含量最高可达干重的 10% 以上<sup>[8]</sup>, 是工业上规模化生产  $\beta$ -胡萝卜素的首选藻种。

### 1.4 叶黄素

叶黄素是一种类胡萝卜素类的四萜类化合物, 具有延缓和预防因衰老引起的一系列症状, 如视力下降、动脉硬化、冠心病和肿瘤等疾病, 还能够减轻紫外线对皮肤造成的伤害<sup>[13]</sup>。小球藻色素成分中的叶黄素含量可达 0.267% ~ 0.31%<sup>[14]</sup>, 是叶黄素的一种来源方式。

### 1.5 微藻多糖

多糖类化合物具有极大的潜在药理学活性, 特别是硫酸化糖缀合物具有显著的免疫调节活性, 对肿瘤

的发生、发展和病毒感染有显著的抑制作用<sup>[15]</sup>。多糖是生命有机体的重要组分, 在控制细胞分裂和分化、调节细胞生长、衰老、维持生命有机体的正常代谢等方面有重要作用<sup>[16]</sup>。在极端环境下微藻分泌的胞外多糖也常有特殊的功能。藻类多糖化合物已经作为一种免疫调节剂应用于癌症的免疫治疗。

真核微藻的蕴藏量大, 应用前景广阔, 但是野生型藻株很少能达到工业化生产的标准, 通过基因工程改良微藻的生理性状获得具有工业潜能的藻株是一个重要的途径<sup>[17]</sup>, 如雨生红球藻作为虾青素的主要微藻来源, 规模化培养需要克服生长周期长, 不能异养发酵, 易被污染, 需高光照条件胁迫等局限性<sup>[18]</sup>。通过基因工程技术改良生物性状、克服局限性, 达到规模化生产的需求为未来通过生物合成方式生产具有药用价值的活性产物奠定基础。

## 2 农杆菌介导微藻遗传转化的研究概况

莱茵衣藻是研究真核微藻的模式生物<sup>[19]</sup>。在过去的几十年里, 采用粒子轰击、玻璃珠转化、碳化硅晶须转化、电击转化、农杆菌介导的转化等转基因技术在莱茵衣藻中均有成功的研究报道<sup>[20-24]</sup>, 证明了转基因技术在微藻中的可行性。遗传工程开始并将逐渐在具有工业前景、经济效益的其他微藻中普及<sup>[25]</sup>。

农杆菌介导的外源基因转化方法因其具有操作简单、经济、宿主范围广、可插入大片段 DNA (可达 15 kbp), 可单拷贝或低拷贝整合在宿主染色体上等优势<sup>[26-27]</sup>, 已经应用于多种经济作物的遗传改造。目前, 这种跨界基因转移技术已经在一些真菌<sup>[28-29]</sup>和人的哺乳动物细胞<sup>[30]</sup>中实现。近年来, 农杆菌介导的遗传转化体系在一些微藻中逐渐建立起来。但当前的转化体系还存在重现性和转化效率不高, 对转化机制的了解还不透彻等问题。

农杆菌介导植物的遗传转化过程主要包括以下几个步骤: 识别: 农杆菌和宿主细胞的接触是转化的前提条件<sup>[31]</sup>; 激活: 酚类化合物诱导农杆菌 VIR 区基因表达和相关转运蛋白表达, 效应蛋白与新合成的 T-DNA 链形成不成熟的 T-复合体; 转运: 不成熟的 T-复合体进入宿主细胞, 与宿主细胞内相关蛋白组合形成成熟的 T-复合体, 进入核孔; 整合: 在细胞核内, T-复合体解聚成 T-DNA 链, 重组到染色体上。在复合体进入宿主细胞后, 宿主细胞相关蛋白的协同作用对 T-DNA 的转运和整合起着至关重要的作用<sup>[32-33]</sup>。

与植物相比, 真核微藻作为农杆菌遗传转化的宿主具有以下特点: 微藻是单细胞生物, 每个细胞遗传信息的转录、表达几乎一致; 微藻没有组织、器官上的分化和差异性表达, 不需要考虑不同部位的愈伤组织对转化效率的影响, 简化了操作流程; 微藻和农杆菌都是微生物, 两者的接触更加全面, 预示藻与菌的比例对转化效率有重要影响; 微藻种类繁多,

种属特异性强,对农杆菌的亲性和不一;藻细胞如何协助进入细胞核内的 T-DNA 整合到染色体上,其对转化成功的贡献率有多大是亟待深入探索的课题。

### 3 农杆菌介导微藻遗传转化效率的影响因素

影响农杆菌介导植物遗传转化效率的因素有:宿主的基因型、农杆菌菌株、载体、*vir* 基因的诱导情况、共培养条件等<sup>[34-35]</sup>。根据近年来由农杆菌介导的以真核微藻为宿主的遗传转化研究情况,我们将影响农杆菌介导真核微藻遗传转化效率的因素分为以下几点进行分析。

#### 3.1 农杆菌菌株基因型与侵染浓度对转化效率的影响

农杆菌菌株的基因型对转化效率的影响需要综合考虑与藻株基因型的亲和性。本实验室研究发现 EHA105 较 LBA4404 介导的小球藻遗传转化效率更高<sup>[36]</sup>。但国际上已报道的以 LBA4404 菌株介导的微藻遗传转化为主,这可能是由于本实验室的转化方法与文献报道的方法不太一样有关,农杆菌菌株对不同转化方法可能具有偏好性。处于对数生长期的农杆菌菌株 ( $OD_{600} = 0.5 \sim 1.0$ ) 转化率较高。转化过程,农杆菌侵染浓度过高,农杆菌在共培养培养基上过度繁殖,不利于藻细胞的生理活性;但浓度太低,农杆菌与藻细胞的有效接触面积降低,也不能得到较高的转化率。

#### 3.2 共培养条件对转化效率的影响

共培养条件包括共培养时间、温度和光照。

共培养时间太长, T-DNA 整合转化过程虽已完成,但生长速度较快的农杆菌与藻细胞竞争营养物质,抑制转化藻细胞的生长;共培养时间太短,农杆菌与藻细胞的吸附、T-复合体形成和转移、T-DNA 整合到染色体的过程中断,也会降低转化效率。一般最佳共培养时间是 2 ~ 3 d。低于农杆菌最适生长温度 (28 ℃) 时有利于提高转化效率, 32 ℃ 以上的共培养温度,会抑制农杆菌 *vir* 基因的活性<sup>[37]</sup>。大多数微藻与农杆菌的共培养温度都低于 25 ℃。农杆菌介导等边金藻的共培养温度为 25 ℃<sup>[38]</sup>,略高于小球藻的 24 ℃<sup>[37]</sup>、莱茵衣藻的 23 ℃<sup>[24]</sup>、雨生红球藻和杜氏藻的 22 ℃<sup>[39-40]</sup>。但是,农杆菌与扁藻的最适共培养温度达到 27 ℃<sup>[41]</sup>。光照是影响农杆菌介导雨生红球藻遗传转化成败的重要因素<sup>[39]</sup>,但是在其他微藻中光照的影响可以忽略不计。

#### 3.3 培养基参数对转化效率的影响

共培养培养基是农杆菌 T-DNA 转移到微藻基因组的介质,即为转化过程的顺利进行的提供了基质。影响转化效率的共培养培养基参数主要有盐离子浓度、培养基 pH、乙酰丁香酮 (AS) 浓度等。

培养基中高盐离子浓度会抑制农杆菌的生长活性,阻碍转化过程。当宿主为海水藻时,需要考虑共培养培养基中盐离子浓度对农杆菌的毒性<sup>[40]</sup>。Tris-Acetate-Phosphate (TAP) 是一种淡水培养基,但能够支持农杆菌和海水藻的生长<sup>[40, 42]</sup>。海水藻需要考虑培养基的

盐离子浓度,但是淡水藻可以直接用常规的生长培养基如 FCM<sup>[37]</sup>、BBM<sup>[39]</sup> 和 BG-11<sup>[43]</sup> 等作为转化实验的共培养培养基。尚无相关实验比较不同培养基对转化效率的影响。本实验室在转化过程中,采用液体共培养培养基<sup>[35, 44]</sup>,但国际上报道的研究中均使用固体培养基,具体哪一种物理状态的培养基更有利于转化效率还需进一步研究。

理论上,培养基的 pH 会影响农杆菌 VirA 蛋白的表达,从而影响 T-DNA 转移<sup>[45]</sup>,已知 VirA 蛋白表达的最适 pH 在 5.3 ~ 5.8<sup>[46]</sup>。研究表明, pH 是影响农杆菌介导扁藻转化效率的关键因素,在 pH = 5.0 时转化效率最高<sup>[41]</sup>。但是在其他微藻的转化体系中, pH 并不是影响转化成败的关键因素。如雨生红球藻和杜氏藻的转化 pH 为 6.0<sup>[39-40]</sup>, 珊列藻和小球藻的转化 pH 为 5.5<sup>[17, 37]</sup>,而莱茵衣藻、等边金藻和海水小球藻的转化体系中未提及 pH 这一参数<sup>[24, 38, 42]</sup>。

AS 可以诱导农杆菌 *vir* 基因的活化<sup>[47]</sup>。有研究发现酚类化合物都能提高农杆菌介导的小球藻遗传转化效率,但 AS 成本经济成为常用的诱导剂<sup>[48]</sup>。在农杆菌介导的小球藻遗传转化研究中,发现通过添加 AS 提高转化率有最适浓度,当 AS 浓度高达 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时转化率又降低<sup>[37]</sup>。在其他转化体系中, AS 对转化效率没有显著影响,推测这些藻为农杆菌的天然宿主<sup>[39-42]</sup>。

#### 3.4 筛选标签对转化效率的影响

潮霉素是农杆菌介导微藻遗传转化中最常用的选择性标记基因,其编码的潮霉素磷酸转移酶,能够竞争叶绿体和线粒体中的核糖体与延长因子 EF-2 的结合位点,使核糖体无法行使正常功能,抑制蛋白合成<sup>[49]</sup>,从而抑制野生型微藻细胞的生长繁殖。随着筛选培养基抗生素浓度的提高,获得的阳性转化子越少,一些弱表达的转化子在筛选培养基上被淘汰。抗生素浓度太低,假阳性高,不利于后续的筛选。因此,筛选培养基中抗生素的使用浓度会影响转化藻株的获得率。

筛选培养基上头孢噻肟和羧苄青霉素属于  $\beta$ -内酰胺类抗生素,可选择性的抑制细菌细胞壁的合成,使残留的农杆菌无法繁殖,减少筛选板上形成假阳性单藻落。头孢噻肟是转化过程中常用的抑制农杆菌的抗生素。

同时,筛选培养基中抗生素的有效性会受到培养基盐离子浓度的影响。高盐浓度培养基导致高浓度抗生素的抑制效应与  $\text{H}^+$ -ATPase 有关<sup>[50]</sup>。一般潮霉素的使用浓度不超过 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而海水培养基或者添加了盐离子 (NaCl、KCl) 的培养基,会降低潮霉素的抑制效应。在本实验室的转化方法中,添加了 KCl 的筛选培养基,其抗生素使用浓度分别达到潮霉素 300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和卡那霉素 450  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[36, 44]</sup>。潮霉素易受培养基中盐离子浓度的影响,而博来霉素和腐草霉素受到的影响较小<sup>[41]</sup>。说明不是所有抗生素的有效性

都会受盐离子浓度的影响。

### 3.5 前处理对转化效率的影响

在藻细胞分裂旺盛时期,细胞被外源基因转化的可能性最高<sup>[51]</sup>。研究表明,藻细胞在固体培养基上预培养是转化之前的重要步骤。

杜氏盐藻没有细胞壁,但大多数微藻细胞膜外还有一层细胞壁。本实验室通过酶解微藻的细胞壁可以实现农杆菌介导小球藻和裂壶藻的遗传转化<sup>[36, 44, 52]</sup>。但是细胞壁的重新合成是一个较长的过程,在后续筛选培养基上需要添加 KCl 保持原生质体渗透压,使培养基的盐离子浓度升高,抗生素的有效致死浓度升高。在电镜下观察发现,众多的农杆菌吸附在未酶解细胞壁的雨生红球藻表面,藻细胞表面出现瞬时、可自我修复的微孔<sup>[39]</sup>。说明微藻细胞壁可能不是影响转化效率的原因,本实验室也开始尝试用不酶解微藻细胞壁的方法进行转化。

除此之外,藻株的基因型、表达载体的选择或改造等都有可能影响转化效率的因素。通过了解影响农杆菌转化效率的因素,为了解在转化过程中真核藻细胞的参与机制提供参考。

### 4 农杆菌介导微藻遗传转化提高药用产物含量的前景

将外源基因导入真核藻细胞的方法有基因枪法、电击转化法、碳硅钪丝穿刺法、玻璃珠法和近几年建立的农杆菌介导法。其中转入真核微藻的外源基因大部分是一些选择性标记基因(通常为抗生素抗性基因)和报告基因(如绿色荧光蛋白基因、 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因等),旨在验证转化体系的成功建立与表达,而转入功能基因或藻细胞代谢基因的研究较少。

通过基因工程提高真核微藻中药用产物含量的研究仍处于探索时期。通过基因枪和电击转化方法将八氢番茄红素脱氢酶(PDS)基因转入 *Chlorella zofingiensis* 中,提高了虾青素产量<sup>[53]</sup>。通过电击转化法将大肠埃希菌的乙酰辅酶 A 合成酶基因(ACS)转入海洋裂壶藻中,有效提高了脂肪酸和 DHA 的含量<sup>[54]</sup>。

农杆菌介导真核微藻遗传转化将外源功能基因转入微藻获得目标产物的研究也相对有限。将编码免疫 T 细胞抗原的 *esxH* 基因整合到莱茵衣藻染色体上,藻细胞能成功表达相应的蛋白<sup>[55]</sup>。本实验室分别成功地分别将异戊烯基焦磷酸异构酶基因(*idi*)、透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)和葡萄糖转运酶基因(*Glut1*)通过农杆菌介导的方法整合到普通小球藻的染色体中,提高了小球藻的叶黄素产量<sup>[56]</sup>。本实验室将来源于雨生红球藻的 $\beta$ -胡萝卜素羟化酶基因(*crtRB*)和来源于藏红花花柱的玉米黄素剪切双加氧酶基因(*ZCD1*)用农杆菌介导的方法转化到普通小球藻中,得到能够产藏红酸的小球藻<sup>[36]</sup>。这些研究结果均表明,应用农杆菌介导的遗传转化技术可以利用真核微藻生产人们所需的药用蛋白。但是,这一技术的重现性和遗传稳定性还

有待提高。

随着农杆菌介导的真核微藻遗传转化技术的成熟应用,这一技术将大大加快非模式藻的遗传和代谢工程进展,为定向积累人类所需的药物资源活性产物提供技术支撑,为微藻的规模化培养和工业化应用奠定基础。

### 参考文献

- [1] Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases [J]. J Am Coll Nutr, 2002, 21 (6): 495-505.
- [2] Shahidi F, Miraliakbari H. Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: part 1-cardiovascular disease and cancer [J]. Med Food, 2004, 7 (4): 387-401.
- [3] Zhou R, Wang F, Chang M, et al. Extraction and purification of EPA and DHA from *Eukaryotic* microalgae [J]. Anhui Agri Sci, 2012, 40 (14): 8014-8017.
- [4] 李荷芳, 樊云真, 刘发义. 海洋微藻高度不饱和脂肪酸研究. 几种常用海洋微藻的脂类和脂肪酸组成 [J]. 海洋科学集刊, 1998, 40: 149-153.
- [5] 秦昌蓉. 富油微藻中油脂的提取及 DHA 富集纯化的研究 [D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [6] Hagen C, Braune W, Birkner E, et al. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafiniski (Volvocales) [J]. New Phytol, 1993, 125 (3): 625-633.
- [7] 蔡小连, 杨安平, 马志浩, 等. 从雨生红球藻中提取纯化天然左旋虾青素的研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8 (2): 189-191.
- [8] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 55-59.
- [9] Cheng J, Li K, Yang ZB, et al. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress [J]. Bioresour Technol, 2016, 204: 49-54.
- [10] Mulders KJM, Weesepeel Y, Bodenes P. Nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* produces astaxanthin, ketolutein and their fatty acid esters: a carotenoid metabolism study [J]. Appl Phycol, 2015, 27 (1): 125-140.
- [11] Teenbock. White corn vs yellow corn and a probable relation between the fat-soluble vitamin and yellow plant pigments [J]. Science, 1919, 50 (1293): 352-353.
- [12] Basu M, Banerjee A, Bhattacharya UK, et al. Beta-carotene prolongs survival, decreases lipid peroxidation and enhances glutathione status in transplantable murine lymphoma [J]. Phytomedicine, 2000, 7 (2): 151-159.
- [13] 郑裕国, 王远山, 薛亚平, 等. 抗氧化剂的生产及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 59-74.
- [14] Haski HH. A spectrophotometric method for analysis of chloroplast pigments [J]. Biol Chem, 1942, 114: 149-160.
- [15] 黄益丽, 郑天凌. 海洋生物活性多糖的研究现状与展望 [J]. 海洋科学, 2004, 28 (4): 58-61.

- [16] 程启平. 盐生隐杆藻胞外多糖的药理学研究 [D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2005.
- [17] Dautor Y, úbeda-Mínguez P, Chileh T, et al. Development of genetic transformation methodologies for an industrially-promising microalga: *Scenedesmus almeriensis* [J]. *Biotech Lett*, 2014, 36 (12): 2551-2558.
- [18] Burick P. Production of astaxanthin from *Haematococcus* [J]. *Bioresour Technol*, 1991, 38 (2-3): 237-239.
- [19] Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2001, 52: 363-406.
- [20] Day A, Debuchy R, Dillewijn J, et al. Studies on maintenance and expression of cloned DNA fragments in the nuclear genome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Physiol Plant*, 1990, 78 (2): 254-260.
- [21] Kindle KL. High frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 (3): 1228-1232.
- [22] Dunahay TG. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers [J]. *Biotech*, 1993, 15 (3): 452-460.
- [23] Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, et al. High efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation [J]. *Genetics*, 1998, 148 (4): 1821-1828.
- [24] Kumar SV, Misquitta RW, Reddy VS, et al. Genetic transformation of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Sci*, 2004, 166 (3): 731-738.
- [25] Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production [J]. *Eukaryot Cell*, 2010, 9 (4): 486-501.
- [26] Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology [J]. *Curr Opin Biotech*, 2006, 17 (2): 147-154.
- [27] Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67 (1): 16-37.
- [28] Bundock P, Dulk-Ras Den A, Beijersbergen A, et al. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *EMBO*, 1995, 14 (13): 3206-3214.
- [29] Grootde MJA, Bundock P, Hooykas PJJ, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16 (9): 839-842.
- [30] Kunik T, Tzfira T, Kapulnic Y, et al. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium* [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (4): 1871-1876.
- [31] Matthyse AG. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Bacteriol*, 1987, 169 (1): 313-323.
- [32] Lacroix B, Loyter A, Citovsky V. Association of the *Agrobacterium* T-DNA-protein complex with plant nucleosomes [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (40): 15429-15434.
- [33] Gelvin SB. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48 (1): 45-68.
- [34] Opabode JT. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency [J]. *Biotech Mol Biol Rev*, 2006, (1): 12-34.
- [35] Alimohammadi M, Bagheriehnaajjar MB. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors [J]. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8 (8): 5142-5148.
- [36] Lou SL, Wang LY, He LJ, et al. Production of crocetin in transgenic *Chlorella vulgaris* expressing genes *crtRB* and *ZCD1* [J]. *J Appl Phycol*, 2015, 28 (3): 1-9.
- [37] Thye SC, Willy Y, Ahmad A. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris* [J]. *World J Microb Biot*, 2012, 28 (4): 1771-1779.
- [38] Prasad B, Vadakedath N, Jeong HJ, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of haptophytes (*Isochrysis* species) [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2014, 98 (20): 8629-8639.
- [39] Kathiresan S, Chandrashekar A, Ravishankar GA, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) [J]. *Phycol*, 2009, 45 (3): 642-649.
- [40] Anila N, Chandrashekar A, Ravishankar GA, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil* [J]. *Eur J Phycol*, 2011, 46 (1): 36-44.
- [41] úbeda-Mínguez P, Chileh T, Dautor Y, et al. Tools for microalgal biotechnology: development of an optimized transformation method for an industrially promising microalga—*Tetraselmis chuii* [J]. *J Appl Phycol*, 2015, 27 (1): 223-232.
- [42] Rathod JP, Prakash G, Pandit R, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of promising oil-bearing marine algae *Parachlorella kessleri* [J]. *Photosynth Res*, 2013, 118 (1-2): 141-146.
- [43] Sanitha M, Radha S, Fatima AA, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of three freshwater microalgal strains [J]. *Pol J Microbiol*, 2014, 63 (4): 387-392.
- [44] Ma RJ, Lin XZ. *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) improves lutein production in *Chlorella vulgaris* [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2014, 32 (2): 390-396.
- [45] Turk SCJ, Melchers LS, Dulk-Ras den H, et al. Environmental conditions differentially affect *vir* gene induction in different *Agrobacterium* strains: role of the VirA sensor protein [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16 (6): 1051-1059.
- [46] Rogowsky PM, Close TJ, Chirnera JA, et al. Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTi C58 [J]. *Bacteriol*, 1987, 169: 5101-5112.
- [47] Sheikholeslam SN, Weeks DP. Acetosyringone promotes high efficiency of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agro-*

*bacterium tumefaciens* [J]. Plant Mol Biol, 1987, 8 (4): 291-298.

[48] Cha TS, Chen CF, Yee W, et al. Cinnamic acid, coumarin and vanillin: Alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis* sp [J]. Microbiol Meth, 2011, 84 (3): 430-434.

[49] Gritz L, Daviea J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance, the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Gene, 1983, 25 (2-3): 179-188.

[50] Anila N, Simon DP, Chandrashekar A, et al. Glucose-induced activation of H<sup>+</sup>-ATPase in *Dunaliella salina* and its role in hygromycin resistance [J]. Appl Phycol, 2013, 25 (1): 121-128.

[51] Allnut FCT, Kyle DJ, Grossman AR, et al. Methods and tools for transformation of eukaryotic algae [P]. USA, 2000, 6027900.

[52] Cheng RB, Ma RJ, Li K, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium* [J]. Microbiol Res, 2012, 167 (3): 179-186.

[53] Liu J, Sun Z, Gerken H, et al. Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*. a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker [J]. Appl Microbiol Biot, 2014, 98 (11): 5069-5079.

[54] 闫晋飞. 利用基因工程手段提高两种微藻生物量与特定代谢产物产量 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2013.

[55] Pratheesh PT, Kurup GM. Molecular cloning and expression of TB antigen protein in microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Indian J Biotechnol, 2013, 12 (3): 350-355.

[56] 马瑞娟. 根癌农杆菌介导产叶黄素小球藻遗传转化的研究 [D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2013.

(收稿日期: 2016-02-17; 修回日期: 2016-03-29)

## 血管紧张素 受体拮抗剂降尿酸作用研究进展概述

刘杨从<sup>1</sup>, 李妍<sup>2</sup>, 张耕<sup>1\*</sup> (1. 武汉市第一医院药学部, 武汉 430022; 2. 山东省千佛山医院药剂科, 济南 250014)

**摘要:** 本文旨在通过查阅 CNKI、万方、Pubmed 数据库文献, 概述血管紧张素 受体拮抗剂 (ARB) 降尿酸作用研究进展。结果显示, 氯沙坦及其与小剂量氢氯噻嗪联用均具有确切的降血尿酸作用, 氯沙坦降低血尿酸作用具有结构特异性, 主要通过抑制肾小管上的尿酸转运蛋白 1 对尿酸的重吸收而发挥降尿酸作用, 其降低尿酸作用强弱可能跟剂量及尿酸转运蛋白 1 的基因多态性相关。厄贝沙坦结构与氯沙坦高度相似可能具有降尿酸作用, 但还需要进一步更高质量的 RCT 研究证实。其余 ARB 降血尿酸作用存在争议, 其降尿酸的可能机制为增加胰岛素的敏感性, 减少血尿酸的生成。

**关键词:** 血管紧张素 受体拮抗剂; 高尿酸血症; 高血压病; 尿酸转运蛋白 1

中图分类号: R544.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2016)10-1089-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2016.10.015

## Recent advance in angiotensin receptor antagonist lowering serum uric acid

LIU Yang-cong<sup>1</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, ZHANG Geng<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, the First Hospital of Wuhan, Wuhan 430022; 2. Department of Pharmacy, Qianfoshan Hospital of Shandong, Ji'nan 250014)

**Abstract:** To summarize recent advance in angiotensin receptor antagonist lowering serum uric acid by review the literatures from CNKI, Wanfang and PubMed database. We found that losartan and its low dose hydrochlorothiazide compound preparation definitely reduced the uric acid mainly via its special chemical structure and inhibiting urateanion transporter 1 on the renal tubular and reducing the reuptake of uric acid. Its uric acid reduction may be associated with dosages and genetic polymorphisms of urateanion transporter 1 coding genes. Irbesartan may reduce the uric acid due to its highly similar structure to losartan, but this needs further RCT study to confirm. Other angiotensin receptor antagonist reduction of the uric acid is controversial, and its possible mechanism may be through increasing insulin sensitivity, and finally reducing blood uric acid.

**Key words:** angiotensin receptor antagonist; hyperuricemia; hypertension; urateanion transporter 1

作者简介: 刘杨从, 男, 药师, 主要从事内分泌用药方面的研究, Tel: 13886107484, E-mail: 672407981@qq.com \*通讯作者: 张耕, 男, 硕士研究生导师, 主任药师, 主要从事医院药事管理方面的研究, E-mail: zhanggen888@126.com