

# ERK1/2 信号通路介导 PGI<sub>2</sub> 对 γ-分泌酶亚基 APH-1 的调控作用

张海波<sup>1\*</sup>, 孙 阳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>沈阳医学院附属中心医院神经外二科, 沈阳 110024; <sup>2</sup>沈阳急救中心, 沈阳 110000

**摘要:** 本文主要探讨环氧合酶-2 的下游代谢产物 PGI<sub>2</sub> 通过 ERK1/2 信号通路调控 γ-分泌酶亚基 APH-1 蛋白表达的影响。应用免疫荧光技术检测 PGI<sub>2</sub> 对人源和鼠源的神经母细胞瘤 SH-SY5Y 和鼠源神经母细胞瘤 n2a 细胞 APH-1 蛋白表达情况的调控作用, 同时应用 Western blot 和 Real-Time PCR 的方法进一步检测 PGI<sub>2</sub> 调控 APH-1 表达的具体机制, 最后利用 ELISA 实验检测 PGI<sub>2</sub> 对细胞内 Aβ 表达的调控作用。结果发现 PGI<sub>2</sub> 处理 SH-SY5Y 和 n2a 细胞 24 h 后可通过 ERK1/2 信号通路增加 APH-1 蛋白表达, 进而明显增加 Aβ 表达。以上结果说明 COX-2 代谢产物 PGI<sub>2</sub> 可通过促进 APH-1 的表达, 进一步增加 γ-分泌酶的剪切活性, 从而使 Aβ 产生增加, 最终加速阿尔茨海默病的发病进程。

**关键词:** 前列腺素; γ-分泌酶 APH-1; ERK1/2 信号通路; β-淀粉样蛋白; 环氧合酶-2

中图分类号: R741.02

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.016

## Effect of PGI<sub>2</sub> on γ-Secretase Subunit APH-1 via ERK1/2 Signaling Pathway

ZHANG Hai-bo<sup>1\*</sup>, SUN Yang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Second Department of Neurosurgery, the Affiliated Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China; <sup>2</sup>Shenyang First Aid Center, Shenyang 110000, China

**Abstract:** In this study, the effect of COX-2 metabolic product, prostaglandin (PG) I<sub>2</sub> on the expression of γ-secretase subunit APH-1 was investigated via ERK1/2 signaling pathway. APH-1 expression in human neuroblastoma SH-SY5Y and mouse neuroblastoma n2a was tested by immunofluorescence. Western blot and Real-Time PCR assay demonstrated APH-1 was essential for γ-secretase activity. ELISA results showed the effect of PGI<sub>2</sub> on Aβ. It was found that PGI<sub>2</sub> treatments accelerated the mRNA and protein expressions of APH-1 in SH-SY5Y and n2a cells, and increased the production of Aβ. These findings provided novel insights into the mechanism of PGI<sub>2</sub>-induced AD progression.

**Key words:** prostaglandin I<sub>2</sub>; γ-secretase APH-1; ERK1/2 Signaling pathway; Aβ; COX-2

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 又名老年痴呆病, 是一种最常见的与年龄呈正相关的神经退行性疾病, 65 岁以上是 AD 的高发人群。AD 患者的主要临床表现为以缓慢出现并逐渐加重的记忆障碍、认知障碍、精神症状及日常生活能力下降为特征, 病程长且进展缓慢, 到了晚期, 患者同常生活不能自理, 给患者的家庭均带来沉重的负担。因此, 深入研究 AD 发病机制具有重要的理论价值和实际意义。

AD 的主要病理特征是胞外 β-淀粉样蛋白 (β-amyloid protein, Aβ) 沉积和胞内神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)<sup>[1]</sup>。APP 的水解过程

主要受到三种酶的调控, 即 α (ADAM10)、β (BACE1) 和 γ (PS1/2、NCT、PEN2、APH-1)-分泌酶, 而 Aβ 主要是由 β 和 γ 分泌酶先后剪切而成的。Aβ 的大量产生将逐渐聚集形成寡聚体和纤维体, 最终形成老年斑 (β-amyloid plaques, APs)<sup>[2]</sup>。除此之外, tau 蛋白异常过度磷酸化, 将导致其与微管蛋白的结合力降低, 失去了促进微管形成和维持微管稳定的作用, 导致了 NFT 的形成。APs 和 NFTs 的形成将逐渐导致 AD 的恶化<sup>[3]</sup>。

近年来有研究表明 AD 患者脑内环氧合酶 (cyclooxygenase-2, COX-2) 代谢紊乱与其特征性病理改变密切相关, COX-2 的代谢产物——前列腺素 (prostaglandins, PGs, 包括: PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、15d-PGJ<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> 和 TXA<sub>2</sub>) 与 AD 的关系逐渐受到了人

们的重视,已有研究提示 PGE<sub>2</sub> 在早期 AD 患者脑脊液(Cerebrospinal fluid, CSF)中的水平远远高于正常人的水平<sup>[4]</sup>,此外,作为 COX-2 的另外一种代谢产物的 15d-PGJ<sub>2</sub> 也参与调控 AD 的炎症反应<sup>[5]</sup>。那么,PGI<sub>2</sub> 与阿尔茨海默病主要病理特征  $A\beta$  产生是否存在联系尚不清楚,本研究利用 COX-2 下游代谢产物 PGI<sub>2</sub> 处理 SH-SY5Y 和 n2a 细胞,分析 PGI<sub>2</sub> 对  $\gamma$ -分泌酶亚基 APH-1 表达的具体调控机制,以及探讨 PGI<sub>2</sub> 对  $A\beta$  产生的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品

PGI<sub>2</sub> 和 U0126(ERK1/2 特异性抑制剂)均购于 Sigma,  $\beta$ -actin, APH-1 Antibody, Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit IgG, HRP-labeled goat anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology), Inc. (Danvers, MA, USA); RNA total kit I, Reverse Transcription system, GoTaqqPCR Master mix (Promega), 酶联免疫试剂盒 (Raybiotech), Inc.

#### 1.1.2 实验仪器

低温离心机 (Allegra X-30R, Beckman, 美国), 酶标仪 (iMark, Bio-Rad, 美国), BIO-RAD 凝胶图像分析系统 (Gel Doc 2000, BIO-RAD, 美国), 电泳仪 (Mini-Protein II, BIO-RAD, 美国), 荧光共聚焦显微镜 (TCS-SP8, Leica, 德国), 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad CFX Connect)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

SH-SY5Y 和 n2a 细胞用含 10% FBS、1% 青/链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM/高糖培养液,于 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。隔天换液 1 次,3~4 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验,且细胞存活百分率在 95% 以上。

#### 1.2.2 实验分组及处理

根据 MTT 实验检测 PGI<sub>2</sub> 的最适浓度为 10  $\mu$ M, ERK1/2 信号通路的特异性抑制剂为 U0126, U0126 的而最适浓度为 10  $\mu$ M (结果未给出)。SH-SY5Y 和 n2a 细胞根据要求分为以下几组 (细胞加药前进行无血清培养基饥饿处理 12 h): (1) 正常对照组:吸出无血清培养基后,加入无抗生素的无血清培养基,加入 DMSO 2  $\mu$ L; (2) 加药组 a:吸出无血清培养基后,加入无抗生素的无血清培养基,PGI<sub>2</sub> 终

浓度为 10  $\mu$ M; (3) 加药组 b:吸出无血清培养基后,加入无抗生素的无血清培养基,PGI<sub>2</sub> 终浓度为 10  $\mu$ M, U0126 最适浓度为 10  $\mu$ M。

#### 1.2.3 免疫荧光染色和共聚焦激光扫描显微术

细胞爬片并药物处理 24 h 后, PBS 冲洗 3 次, 4% 甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 3 次, 0.3% Triton-100 通透 30 min, 羊血清室温预孵育 30 min, APH-1 抗体 4 °C 过夜孵育。PBS 冲洗 3 次后,用羊抗兔 IgG (1:200) 室温孵育 1 h, PBS 漂洗后, DAPI 原液染核 5 min, PBS 漂洗后, 甘油封片剂封片。共聚焦激光扫描显微镜下观察实验结果并拍照, 图片经 Photoshop 8.0 软件处理并打印。

#### 1.2.4 Western blot 检测

用含 1% PMSF 的蛋白裂解液提取细胞蛋白, 并按 BCA 蛋白测定说明书对每组蛋白含量进行测定, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 4 °C 转膜过夜, 5% 脱脂奶粉封闭, APH-1、ERK1/2、p-ERK1/2 (1:3300 稀释) 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, ECL 发光 (ECL 试剂盒, Pierce, CA), Kodak-XAR 胶片曝光、显影。洗膜重新封闭后,  $\beta$ -actin 抗体 (1:10000) 孵育, 二抗孵育, 发光, 胶片曝光显影。以  $\beta$ -actin 作为上样量参照标准。胶片扫描后, 用 Image-pro Plus 6.0 软件包分析。

#### 1.2.5 Real-Time PCR 检测

用 Promega 试剂盒提取小鼠脑组织总 RNA 并反转录获得 cDNA, 按照试剂盒说明将 cDNA 扩增, 所用的引物序列为: human-APH-1 $\alpha$  F-TTTTGGCT-GATGCACTTGGG, R-TTCAGGAATGTCAGTCCCGATG; APH-1 $\beta$  F-TGTTTCTGGCTTGGGCTTTG, R-TGCT-GACGCCAGGTTTATTTC; mouse-APH-1 $\alpha$  F-AGTGCCC TGAAGGAGTCAGA, R-CCCCTCTTAAAGCCAAGTC C; mouse-APH-1 $\beta$  F-CAATGGGGAGTTCGAGAAAA, R-GCTGGTGAAGGCTAGCAAAC, human-GAPDH F-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA, R-TCTAGACG-GCAGGTCAGGTCCACC, mouse-GAPDH F-AACTTT-GGCATTGTGGAAGG, R-ACACATTGGGGGTAGGAA-CA.

#### 1.2.6 酶联免疫 (ELISA)

检测细胞内  $A\beta$  时, 用 PBS 稀释细胞悬液, 细胞浓度达到 1000000/mL 左右。通过反复冻融, 以使细胞破坏并且释放出细胞内的成分。2000~3000 rpm, 离心 20 min。小心收集上清。保存过程中如有沉淀形成, 需再次离心。

### 1.2.7 统计分析

本实验所有数据均采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析处理,对数据进行 One-way ANOVA 分析,结果以均值  $\pm$  标准差表示 ( $X \pm SD$ ),  $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 2 实验结果

### 2.1 Western blot 和 Real-Time PCR 结果

为检测 APH-1 的表达情况,用 PGI<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) 和

U0126 (10  $\mu$ M) 处理 SH-SY5Y 和 n2a 细胞 24 h 后, Western blot 检测结果表明,内参  $\beta$ -actin 的表达水平没有受到 PGI<sub>2</sub> 和 U0126 影响,而 PGI<sub>2</sub> 单独处理后,APH-1 的 mRNA 和蛋白水平明显升高,当同时利用 PGI<sub>2</sub> 和 ERK1/2 特异性抑制剂 U0126 处理后,APH-1 的 mRNA 和蛋白水平降低,说明 PGI<sub>2</sub> 可通过 ERK1/2 信号通路促进 APH-1 表达,且结果具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 1A ~ D。

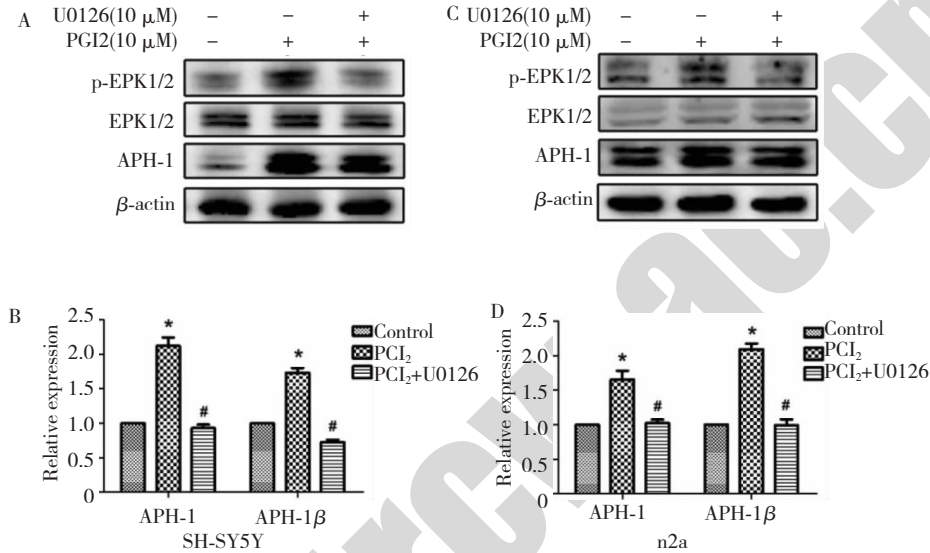


图 1 PGI<sub>2</sub> 对 SH-SY5Y 和 n2a 细胞内 APH-1 mRNA 和蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of PGI<sub>2</sub> on the mRNA and protein expression levels of APH-1 in SH-SY5Y and n2a cells

注:A:Western blot 检测每组处理条件下 SH-SY5Y 细胞内 APH-1 蛋白表达变化;B:Real-Time PCR 检测每组处理条件下 SH-SY5Y 细胞内 APH-1 $\alpha$  和 APH-1 $\beta$  mRNA 变化水平;C:Western blot 检测检测每组处理条件下 n2a 细胞内 APH-1 蛋白表达变化;D:Real-Time PCR 检测每组处理条件下 n2a 细胞内 APH-1 $\alpha$  和 APH-1 $\beta$  mRNA 变化水平。与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与 PGI<sub>2</sub> 单独处理组相比, #  $P < 0.05$ 。

Note:A:The protein expression levels of APH-1 was detected in SH-SY5Y cells by western blot;B:The mRNA expression levels of APH-1 $\alpha$ /APH-1 $\beta$  were detected in SH-SY5Y cells by Real-Time PCR;C:The protein expression levels of APH-1 were detected in n2a cells by western blot;D:The mRNA expression levels of APH-1 $\alpha$ /APH-1 $\beta$  were detected in n2a cells by Real-Time PCR;Compare with control, \*  $P < 0.05$ ;compare with PGI<sub>2</sub> treatment, #  $P < 0.05$ .

### 2.2 免疫荧光染色结果

为了进一步证实 PGI<sub>2</sub> 可通过 ERK1/2 信号通路促进细胞内 APH-1 表达,我们将进一步采用免疫荧光染色细胞爬片的方法检测细胞给药处理后,细胞内 APH-1 的表达情况,结果显示,PGI<sub>2</sub> 可通过 ERK1/2 信号通路促进 SH-SY5Y 和 n2a 细胞内 APH-1 的表达,见图 2 和图 3。

### 2.3 酶联免疫(ELISA)结果

采用 ELISA 方法分别定量检测了对照组、PGI<sub>2</sub> 处理组细胞中 A $\beta$ 1-42 的含量变化。ELISA 结果显示,PGI<sub>2</sub> 处理后 SH-SY5Y 和 n2a 细胞内 A $\beta$ 1-42 的

含量明显增高,见图 4。

## 3 讨论与结论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见于老年人以进行性痴呆为临床特征的神经退行性疾病,以散发性居多<sup>[6,7]</sup>。其主要的病理特征包括胞外的 A $\beta$  的沉积形成老年斑、胞内形成神经原纤维缠结以及突触和特定脑区选择性胆碱能神经元丢失。A $\beta$  是由  $\beta$  淀粉样前体蛋白(amyloid- $\beta$  precursor protein, APP)经  $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶先后剪切形成的<sup>[8]</sup>。脑内 APP 代谢主要有两种途径:一条途径是

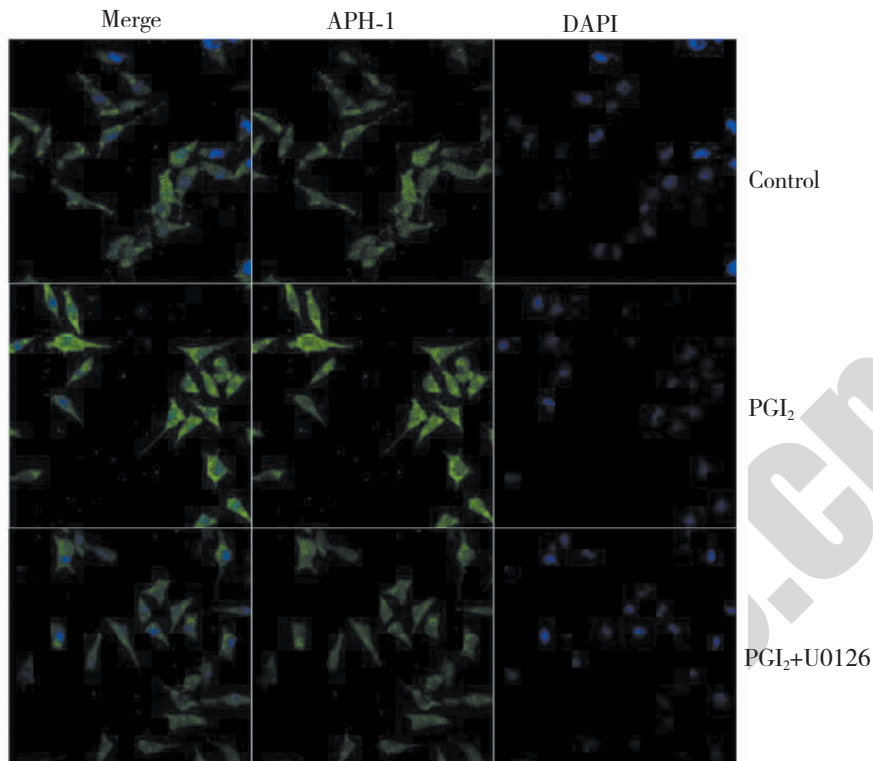


图 2 SH-SY5Y 细胞内 APH-1 的表达

Fig. 2 The expression of APH-1 in SH-SY5Y cells

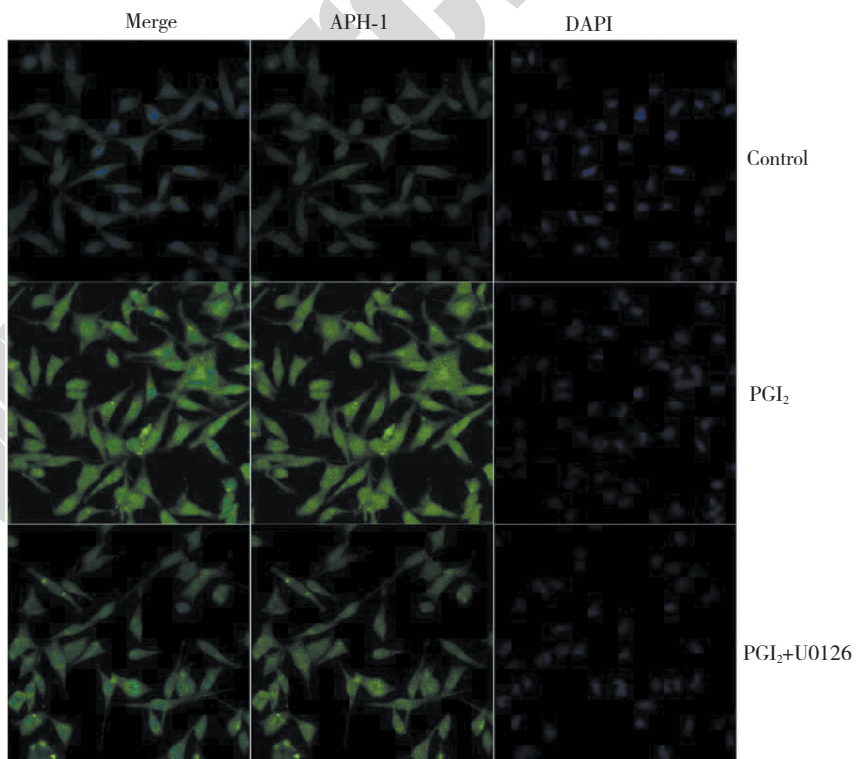


图 3 n2a 细胞内 APH-1 的表达

Fig. 3 The expression of APH-1 in n2a cells

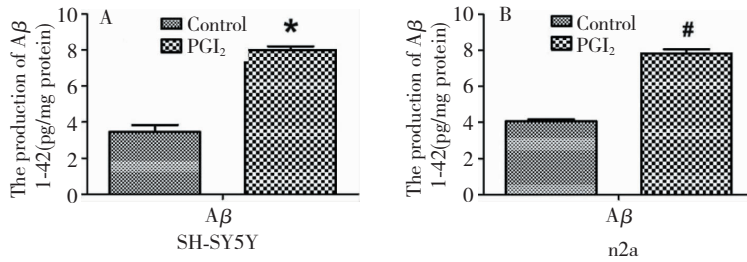


图4 SH-SY5Y 和 n2a 细胞内 Aβ 的表达

Fig. 4 The expression of Aβ in SH-SY5Y and n2a cells

由 α-分泌酶在 α 位点把 APP 水解为 sAPPα 和 C83 两个片段, γ-分泌酶再把 C83 分解成 P3 和 APP 胞内段 (APP intracellular domain, AICD), 其中 α-分泌酶活性受 NAD<sup>+</sup> 所依赖的 Sirtin-1 活性的调控, 不形成 Aβ, 称为非 Aβ 生成途径; 另一途径是 Aβ 生成途径, 经 β-和 γ-分泌酶连续裂解 APP 形成 sAPPβ 和 Aβ 产物。然而, 目前对于 AD 的上述病理学改变的原因及发病机制尚未完全阐明。因此, 深入探讨 AD 的发病机理以及探寻新的有效治疗 AD 策略是亟待解决的科学问题。

前列腺素 (PG) 是多不饱和脂肪酸—花生四烯酸 (aa) 的衍生物, 当细胞膜受到刺激时, 体内大多数细胞都会产生并释放 PG<sup>[9]</sup>。而前列腺素是由 COX-2 催化花生四烯酸 (aa) 产生的<sup>[10]</sup>。环氧合酶可以将花生四烯酸催化形成 5 中不同的亚型: PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 和 TAX<sub>2</sub> 这 5 个亚型在体内分别发挥不同的作用<sup>[11-15]</sup>。文献报道, 在 AD 的发病初期, COX-2 就已经被高度激活<sup>[16,17]</sup>, 在大脑皮层的锥体细胞和海马都发现了 COX-2 免疫活性增加, 提示 COX-2 可能参与阿尔茨海默病发病, 并现已作为 AD 诊断、预防的生物标志物并预示着 AD 的发生<sup>[18]</sup>。研究表明, APP/PS1 转基因小鼠中敲除 PGE<sub>2</sub> 下游受体 EP<sub>2</sub> 基因可以降低脂氧化, 还可以通过减少 BACE-1 来降低 Aβ 沉积<sup>[19]</sup>, 更有趣的是, PGI<sub>2</sub> 可促进 APP/PS1 小鼠脑内皮层和海马中 APH-1 的表达<sup>[20]</sup>。近年来有文献报道, 在 AD 患者脑内 COX-2 被激活的同时, PGI<sub>2</sub> 合成酶表达增加, 最终导致在 AD 发展过程中脑内 PGI<sub>2</sub> 表达增加<sup>[21,22]</sup>。那么, PGI<sub>2</sub> 参与阿尔茨海默病发病的具体机制尚不清楚。因此, 本课题选取人源和鼠源神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞和 n2a 细胞作为细胞模型, PGI<sub>2</sub> 处理后, APH-1 的 mRNA 和蛋白水平明显升高, 更重要的是, Aβ 分泌增多, 而同时利用 PGI<sub>2</sub> 和 U0126 共同处理细胞后, APH-1 表达降低, 免疫荧光结果也

显示 PGI<sub>2</sub> 可通过 ERK1/2 信号通路促进 APH-1 表达, 最终使 Aβ 分泌增多。由此, 以上结果提示 PGI<sub>2</sub> 在调控 APH-1 产生方面发挥重要作用, 此结果为进一步探讨 COX-2 参与 AD 的发病机制提供了可靠的研究依据。

#### 参考文献

- Shoghi-Jadid K, Small GW, Agdeppa ED, et al. Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2002, 10: 24-35.
- Lammich S, Kojro E, Postina R. Constitutive and regulated a-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3922-3927.
- Baksalerska-Pazera M, Niewiadomska G. Structure and role of the tau protein. *Postepy Biochem*, 2002, 48: 289-295.
- Montine TJ, Sidell KR, Crews BC, et al. Elevated CSF prostaglandin E<sub>2</sub> levels in patients with probable AD. *Neurology*, 1999, 53: 1495-1498.
- Gilroy DW, Colville Nash PR, Willis D, et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*, 1999, 5: 698-701.
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Brit Med*, 2001, 322: 1447-1451.
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late life Alzheimer disease. *Ann Intern Med*, 2002, 137: 149-155.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease; the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992, 256(5054): 184-185.
- Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci*, 1974, 71: 3400-3404.



- 10 Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and-2. *J Biol Chem*, 1996, 271:33157-33160.
- 11 Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest*, 1996, 97:2672-2679.
- 12 Greenhough A, Smartt HJM, Amy E, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 2009, 30:377-386.
- 13 Buckman SY, Gresham A, Hale P, et al. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*, 1998, 19:723-729.
- 14 Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91:2046-2050.
- 15 Silver RM, Edwin SS, Trautman MS, et al. Bacterial lipopolysaccharide-mediated fetal death. Production of a newly recognized form of inducible cyclooxygenase (COX-2) in murine decidua in response to lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 1995, 95:725-731.
- 16 Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, et al. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res*, 1999, 830:226-236.
- 17 Yermakova AV, O'Banion MK. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2001, 22:823-836.
- 18 Ho L, Purohit D, Haroutunian V, et al. Neuronal cyclooxygenase 2 expression in the hippocampal formation as a function of the clinical progression of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 2001, 58:487-492.
- 19 Montine TJ, Sidell KR, Crews BC, et al. Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. *Neurology*, 1999, 53:1495-1498.
- 20 Wang P, Guan PP, Guo JW, et al. Prostaglandin I<sub>2</sub> upregulates the expression of anterior pharynx-defective-1 $\alpha$  and anterior pharynx-defective-1 $\beta$  in amyloid precursor protein/presenilin 1 transgenic mice. *Aging Cell*, 2016, 15:861-871.
- 21 Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, et al. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res*, 1999, 830:226-236.
- 22 McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2; the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96:272-277.

(上接第 1083 页)

- 70 Zhou QQ, et al. Differential expression of genes in purple-shoot tea tender leaves and mature leaves during leaf growth. *J Sci Food Agric*, 2016, 96:1982-1989.
- 71 Jin QF (金琦芳), et al. Cloning and bioinformatical analysis of anthocyanin synthase gene and its promoter in *Camellia sinensis*. *J Tea Sci (茶叶科学)*, 2016, 36:219-228.
- 72 Cui Q (崔祺), et al. Transformation of *Lilium* 'Sorbonne' (oriental hybrids) with anthocyanin regulatory gene B1/C1. *J Beijing Fore Univ (北京林业大学学报)*, 2015, 37(11):100-108.
- 73 Brugliera F, et al. Violet/blue chrysanthemums-metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54:1696-1710.
- 74 Li Z (李智). Effect of the main environmental factors on anthocyanin content and related genes expression of purple tea shoots. Shandong: Shandong Agricultural University (山东农业大学), PhD. 2014.
- 75 Zhou QQ (周琼琼), et al. Review on the application of metabonomic approach in tea science. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2015, 27:1821-1826.
- 76 Zhao JT (赵杰堂). Research progresses on molecular mechanism of hormone regulation of plant anthocyanin biosynthesis. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2016, 14:1884-1891.
- 77 Xie XB, et al. The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples. *Plant Cell Env*, 2012, 35:1884-1897.
- 78 Sun BM, et al. Purple foliage coloration in tea (*Camellia sinensis* L.) arises from activation of the R2R3-MYB transcription factor CsAN1. *Sci Rep*, 2016, 6:32534.
- 79 Chen XL (陈晓丽), et al. Overexpression of IbMYB1 gene enhanced tolerance to soil drought stress in sweet potato. *J Plant Physiol (植物生理学报)*, 2015, 51:1440-1446.
- 80 Xiang Y (项阳), et al. Improve drought tolerance via accumulating anthocyanidin under drought stress in TPS1 transgenic maize. *J Plant Physiol (植物生理学报)*, 2015, 51:2054-2062.
- 81 Li LL (李琳玲), et al. Molecular cloning, characterization and expression of flavonoid 3' hydroxylase-like protein gene from *Ginkgo biloba*. *Acta Horti Sin (园艺学报)*, 2015, 42:643-654.
- 82 Han YT (韩永涛), et al. Cloning and expression analysis of CsbHLH2 in tea plant (*Camellia sinensis*). *J Tea Sci (茶叶科学)*, 2015, 35:481-490.