

五环三萜皂苷生物合成与调控的研究进展

赵云生^{1,2}, 万德光^{1*}, 陈新¹, 李占林², 田洪岭^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075; 2. 山西省农科院经济作物研究所, 山西 汾阳 032200)

摘要:五环三萜皂苷是一类重要的天然产物,具有多种生理活性,临床应用前景诱人,但自然界中,其产量较低。采用分子生物学与蛋白质组学相关知识,通过代谢工程或基因工程进行五环三萜皂苷生物合成的工厂化生产,具有广阔的市场前景。综述了五环三萜皂苷生物合成途径及其调控因子的研究进展,并简要探讨了五环三萜皂苷生物合成的研究方法。

关键词:五环三萜皂苷;生物合成;调控

中图分类号:R282.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)02-0327-04

Advances in studies on biosynthesis and regulation of pentacyclic triterpenoid saponin

ZHAO Yun-sheng^{1,2}, WAN De-guang¹, CHEN Xin¹, LI Zhan-lin², TIAN Hong-ling²

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Institute of Industrial Crop, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Fenyang 032200, China)

Key words: pentacyclic triterpenoid saponin; biosynthesis; regulation

五环三萜皂苷是一类重要的天然化合物,大多以游离或苷类的形式广泛存在于自然界。依据苷元的不同,五环三萜皂苷可分为齐墩果烷(oleanane)型、乌苏烷(ursane)型、羽扇豆烷(lupane)型和木栓烷(friedeane)型等多种不同类型的化合物。大量的研究表明,含五环三萜母核的皂苷化合物具有广泛的药理作用和重要的生物活性,尤其在抗炎、护肝、抗肿瘤、抗 HIV 以及机体免疫调节等方面已经显现出令人瞩目的活性,显示了五环三萜皂苷广泛的应用前景^[1]。

目前对五环三萜皂苷的生物合成途径已有一定的了解,其生物合成途径一般分为 4 个阶段:(1)活性异戊二烯单位³-异戊烯焦磷酸酯(IPP)和³,⁷-二甲基烯丙焦磷酸酯(DMAPP)的生物合成;(2)2,3-氧化鲨烯的生物合成;(3)五环三萜碳环系统的生物合成;(4)环上复杂的官能化反应过程,最终形成完整的五环三萜皂苷分子^[2]。

在自然界中,很多具有重要价值的五环三萜皂苷产量较低,利用栽培措施大幅度地提高产量难度很大,如果从分子水平上对其生物合成的关键基因进行调控,促进表达,不仅能够提高目标产物的量,而且还可改变药用植物各种成分之间的比例,减少甚至完全去除某些有毒成分,这是单靠栽培措施难以实现的。随着对五环三萜皂苷生物合成途径及相关酶研究的不断深化,通过代谢工程直接合成或利用基因工程实现五环三萜皂苷的工业化生产与田间种植,将大大弥补产量的不足,产生良好的社会及经济效益。

1 IPP 和 DMAPP 的生物合成与调控

IPP 和 DMAPP 是公认的萜类成分在生物体内合成的真正前体,是生物体内的“活性异戊二烯”物质。动物细胞中 IPP 的形成经由经典的甲羟戊酸(MVA)途径(图 1)。这一途径中不可逆的限速反应是 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)经 HMG-CoA 还原酶还原形成甲羟戊酸。在植物细胞中,IPP 合成类异戊二烯至少发生在 3 个不同部位:内质网(胞液)、线粒体(和/或高尔基体)及质体^[3,4]。现在发现的植物 HMG-CoA 还原酶只定位于内质网的胞液面。Lichtenthaler 等^[5]经过大量的实验认为:在大多数乃至全部的质体中,IPP 是以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸作为前体,先合成 2-甲基赤藓醇-4-磷酸(MEP),再经过磷酸化和环化等多个反应,最终生成 IPP,称之为 IPP 生物合成的 MEP 途径(图 1),并非以乙酰辅酶 A 为前体由甲羟戊酸途径合成。

DMAPP 是 IPP 的烯丙基异构体,由 IPP 异构酶(IPP)催化形成,和 IPP 一起构成类异戊二烯的活性单位。这是一步可逆反应。IPP 异构酶活性的调节可能参与调控类异戊二烯的生物合成。有学者发现在大肠杆菌中经过 MEP 途径可以直接产生 IPP 和 DMAPP,而不需要 IPP 异构酶^[6-8]。高等植物中类异戊二烯合成是否需要 IPP 异构酶,需要进一步深入研究。

植物中通常含有多个 HMG-CoA 还原酶基因,在真核生物细胞,特别是在植物细胞中 HMG-CoA 还原酶基因具

* 收稿日期:2008-06-19

基金项目:山西省自然科学基金项目:远志道地性基因与蛋白质组遗传多样性研究(2007011091);四川省教育厅科研基金项目:远志功能基因与蛋白质研究(07ZC014);成都中医药大学“优秀博士研究生科研创新基金”项目:远志鲨烯环氧酶 cDNA 基因的克隆与表达(070104)

作者简介:赵云生(1974—),男,山西闻喜人,博士,助理研究员,主要从事中药品种、质量和资源开发研究。

Tel.: (0358) 3321076 13408670774 E-mail: zwhjzs @126.com

*通讯作者 万德光 Tel: (028) 87779801

有高度的保守性,它们共同编码 HMG-CoA 还原酶的同工酶。甲羟戊酸是合成 IPP 的前体,HMG-CoA 还原酶是否通过调控甲羟戊酸的合成而成为整个类异戊二烯生物合成途径的关键酶,是利用基因工程生产有效成分最重要的问题。这方面虽然进行大量的研究,却得到了两种不同的结论,一是认为 HMG-CoA 还原酶既然作为萜类物质的合成前体,提高 HMG-CoA 还原酶的活性应该可以提高类异戊二烯的量;二是认为由于存在着无甲羟戊酸的 IPP 生物合成途径,或者由于萜类物质的生物合成步骤太复杂,较早期的代谢中间产物对终产物的影响较弱,该酶对萜类物质的合成速率不

起限制作用^[9~11]。在不同植物中,五环三萜皂苷合成是否需要以 HMG-CoA 还原酶作为关键酶调控代谢过程,还有待进一步研究。

2 2,3-氧化鲨烯的生物合成与调控

尽管存在着无甲羟戊酸的 IPP 生物合成途径,但许多具有重要生物活性的类异戊二烯物质的生物合成仍然依靠胞质的甲羟戊酸途径。依次在香叶二磷酸合成酶(GPS)、法呢二磷酸合成酶(FPS)、鲨烯合成酶(SS)和鲨烯环氧酶(SE)的催化下,最终合成 2,3-氧化鲨烯^[12](图 1)。此过程中 SS 和 SE 是最关键的两个酶。

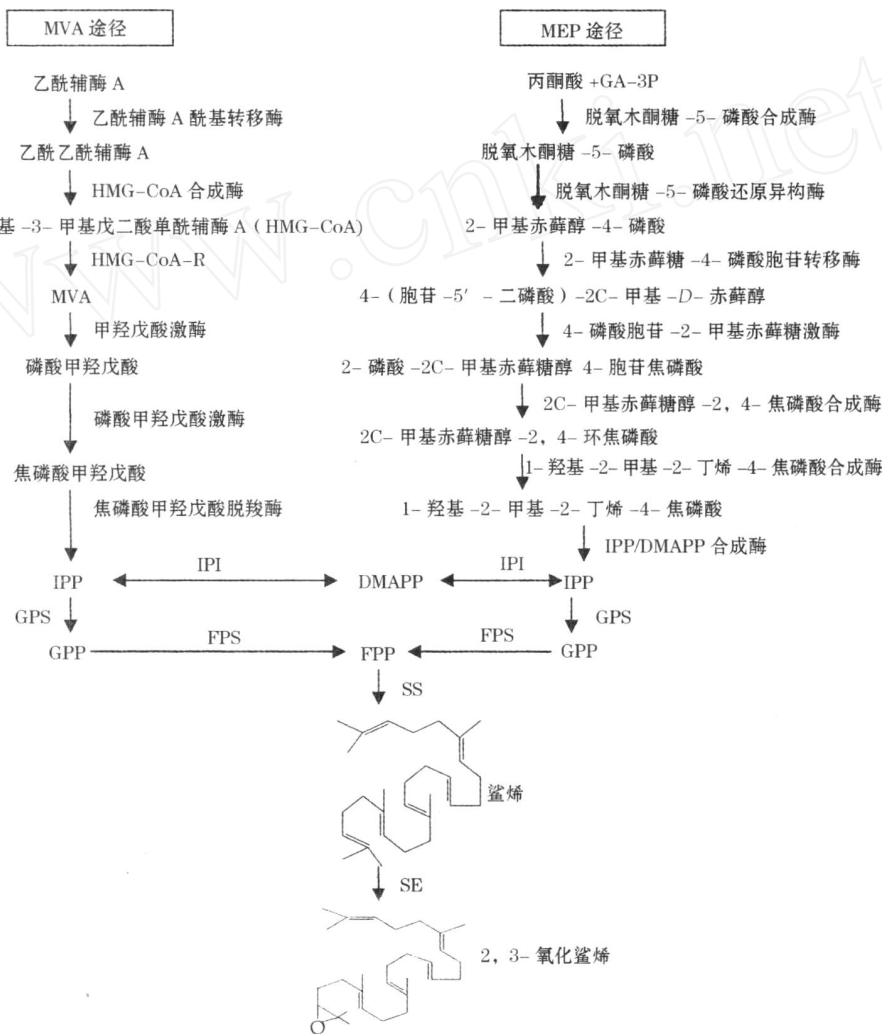


图 1 五环三萜皂苷生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of pentacyclic triterpenoid saponin

在环丙甲醇二磷酸中间体介导下,SS 催化 2 个法呢二磷酸(FPP)分子以头对头的形式形成还原性的二聚体^[13]。SS 催化两分子 FPP 形成一分子鲨烯(SQ)要经两步反应。第一步反应是两分子的 FPP 通过异戊烯基转移反应缩合成前鲨烯焦磷酸(PSQPP),并释放出一分子无机二磷酸。在这个过程中,其中一个 FPP 的 C1-C2 的双键作为另一个 FPP 的异戊烯基受体;第二步反应是 PSQPP 在 NADPH 作为氢供体的情况下,通过正碳离子重排转化为 SQ。在 PSQPP 转

化为 SQ 的过程中有一个正离子的环丙烷进行了重排。对于 PSQPP 合成早期的动力学,曾用乒乓反应机制(Ping-Pong mechanism)来解释,而对从 PSQPP 和 NADPH 合成为 SQ 用依次反应机制(Ordered mechanism)来解释。最近的研究支持在 PSQPP 形成过程中,FPP 是依次叠加到两个不等价的 FPP 结合位点上。Agnew 和 Poljak 发现 FPP 浓度在 100 μmol/L 以上时,FPP 会抑制 SQ 的合成,但并不抑制 PSQPP 的合成。Radisky 等^[14]也指出高浓度的 FPP 会抑制

SQ的合成,但不抑制PSQPP合成,并指出由于FPP与NADPH的竞争,而产生底物选择性抑制作用,当FPP浓度高时,第3个分子的FPP结合于E·FPP·FPP三元复合物上,因而阻碍了E·FPP·FPP·NADPH复合物的形成,但并没有干扰PSQPP形成反应,SS催化反应的限速步骤是在SQ和PSQPP形成之前。

SE是一种细胞膜结合酶,催化SQ在C=C之间插入一个氧原子形成2,3-环氧鲨烯,是五环皂苷生物合成路径中的限速酶之一。酶反应除需要分子氧外还需要FAD、NADPH(真菌SE需NADH)、上清液蛋白因子(SPF)等,其中SPF可以用TritonX-100代替^[15]。Choi等^[16]在研究人参皂苷合成时,已识别3个编码SE酶的转录物,这表明在人参基因组中SE酶形成了一个小的多基因家族。Suzuki等^[17]通过DNA琼脂印迹分析,在苜蓿基因组中发现了2个SE基因(SE1和SE2)。SE1和SE2编码的蛋白与人参中公认的SE编码蛋白高度相似,分别有77.1%和74.4%的序列完全相同。用茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理苜蓿后,SE1转录物并没有被诱导,相反,SE2转录物的诱导率却很高。这表明SE2并不是SE1,它们在植物甾醇和三萜类皂苷合成过程中都起到重要的作用。

3 五环三萜碳环系统的生物合成与调控

五环三萜碳环系统的生物合成主要通过氧化鲨烯环化酶(OSC)的环化作用生成,是由2,3-氧化鲨烯在OSC的催化下,经过一系列的质子化作用、环化、重排和去质子化作用形成的。这一反应是三萜皂苷生物合成途径的一个分支反应,因而OSC是整个三萜皂苷生物合成的关键酶。该酶属于一个超家族,大多编码OSC的基因是由5个蛇麻脂醇合成酶基因和7个公认的五环三萜合成酶基因组成的。OSC三萜合成酶家族各成员间表现高度的同源性,都含有一些高度保守的序列,一个是与底物结合有关的DDTAEA序列,另一个是QW特征序列^[2]。

目前已经从不同植物中分离得到了4个编码OSC酶的基因^[16~18],即羽扇醇合成酶(lupeol synthase, LS)、-香树脂合成酶(-amyrin synthase, -AS)、达玛烯二醇合成酶(dammarenediol synthase, DS)和环阿齐醇合成酶(cycloartenol synthase, CAS),其中前3个酶合成各类三萜类产物的前体,第4个酶是甾醇的前体。由于大多数三萜类皂苷是从齐墩果烷(oleanane)和达玛烷(dammarane)衍化而来的,因此-AS和DS对三萜皂苷的合成非常重要。

Haralampidis等^[13]在研究与产物专一性有关的酶的结构域时发现,-AS的Trp²⁵⁹通过齐墩果烷阳离子控制-香树脂的形成;高保守的Tyr²⁶¹附近的氨基酸残基易于产生突变,其突变导致五环三萜类转变为组氨酸,而产生四环碳骨架的相应残基的突变导致了达玛烷型三萜类的合成。

到目前为止,已经获得了几种多功能酶的克隆。如拟南芥ATLUP2和豌豆PSM,两者表达产物可以催化生成五环三萜类物质,前者产生羽扇豆醇、-香树脂素及-香树脂素,后者产生-香树脂素、-香树脂素及6种少量的三萜副产品^[2]。

4 五环三萜碳环的官能化反应与调控

五环三萜碳环系统合成后,碳环骨架还必须经过复杂的修饰作用,对这一过程的具体步骤还不十分清楚。大多数研究表明细胞色素P450依赖的单加氧酶和糖基转移酶参与了这一过程。细胞色素P450是一种以铁卟啉为辅基的b族细胞色素,大多数都催化羟化反应。典型的细胞色素P450包括A、B、C、D4个特征性结构域,其中两个已被认为具有特殊功能^[19]。Durst等^[20]将细胞色素P450分为两个不同的组,除了少数例外,A组的P450都具有均一的特征性序列,显示出参与催化植物特殊反应的特征,参与五环三萜皂苷生物合成的P450应属于这组。非A组的P450并非只局限在植物上发挥作用,而是参与了生物体生命活动所必须的物质合成。

催化五环三萜皂苷元与糖通过糖苷键相连的是糖基转移酶。它是具有众多成员的大家族,具有高度的专一性。转移不同的糖基或糖基的受体不同,所需的糖基转移酶也不同。已知序列的糖基转移酶没有明显的同源性,但有相似的结构域。到目前为止,仅有一种参与三萜皂苷生物合成的糖基转移酶被克隆出来^[21]。

5 结语

由于五环三萜皂苷结构复杂且类型众多,经过大量的研究,五环三萜皂苷生物合成代谢途径的研究取得了一定的进展,但由于五环三萜皂苷的代谢是一个受多因素调节、非常复杂的动态变化过程,距离完全破解该类物质的代谢途径尚有很多问题亟待解决,如工艺流程复杂、成本高、易产生同分异构体及受环境污染等问题,特别是五环三萜皂苷元碳环骨架建立后环上复杂的官能化反应过程尚不清楚,使得现今利用代谢工程直接合成五环三萜皂苷还存在一定困难。

随着五环三萜皂苷类生物合成关键酶基因调控研究的不断深入,阐明具有时空调控作用的各种顺式和反式作用因子,分离具有组织特异功能的启动子,实现五环三萜皂苷类相关代谢基因在特定组织或细胞中的定向表达,确定五环三萜类次生物质代谢的关键酶基因及其协同性,人工改造关键酶基因并使之高效表达,进行细胞培养、生物转化、发根培养等工业化生产,是实现大规模生产活性成分五环三萜皂苷类的可行方法。

参考文献:

- [1] 程晓华,熊玉卿.五环三萜皂苷的药理作用研究进展[J].中草药,2007,38(5):792-795.
- [2] 陈莉,吴耀生.三萜皂苷生物合成途径及相关酶[J].国外医药:植物药分册,2004,19(4):156-161.
- [3] Bach T J. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants: a review [J]. *Lipids*, 1995, 30: 191-202.
- [4] Mcgarvey D, Croreau R. Terpenoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1015-1026.
- [5] Lichtenthaler H K, Schwender J, Disch A, et al. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway [J]. *FEBS Lett*, 1997, 400(3): 271-274.
- [6] Kajiwara S, Fraser P D, Kondo K, et al. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. *Biochem J*, 1997, 324(2): 421-426.
- [7] Sun Z R, Cunningham F X, Gantt E. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced

carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, 95(19): 11482-11488.

[8] Concepcion R. Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett*, 2000, 473(3): 328-332.

[9] Choi D, Ward B L, Bostock R M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(10): 1333-1344.

[10] Wang G Y, Keasling J D. Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa* [J]. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 193-201.

[11] 孙彬贤, 翁颖琦, 刘 涂, 等. 代谢中间产物和诱导子对南方红豆杉培养细胞生长和紫杉醇含量的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2000, 14(3): 54-56.

[12] Jung J D, Park H W, Hahn Y, et al. Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(3): 224-230.

[13] 邢朝斌, 王一曼, 陈正恒, 等. 三萜皂苷的生物合成 [J]. *生命的化学*, 2005, 25(5): 420-422.

[14] 赵明文, 钟家禹, 王 南, 等. 鲨烯合酶的研究进展 [J]. *微生物学报*, 2003, 43(5): 670-676.

[15] 彭 剑, 龚炳永. 角鲨烯环氧化酶抑制剂的研究进展 [J]. *国外医药: 抗生素分册*, 1998, 19(3): 177-183.

[16] Choid W, Jung J, Ha Y I, et al. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 557-566.

[17] Suzuki H, Achnine L, Xu R, et al. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2002, 32(6): 1033-1048.

[18] Hayashin, Huang P, Inoue K. Up regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(4): 404-411.

[19] Kalb V F, Loper J C. Proteins from eight eukaryotic cytochrome P-450 families share a segmented region of sequence similarity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(19): 7221-7225.

[20] Durst F, Nelson D R. Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases [J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 1995; 12(3-4): 189-206.

[21] Kurosawa Y, Takahara H, Shiraiwa M. UDP-glucuronic acid: soyasapogenol glucuronosyltransferase involved in saponin biosynthesis in germinating soybean seeds [J]. *Planta*, 2002, 215: 620-629.

日本药品进口程序及相关要求

罗 辉¹, 于瑞钧², 宋立平³, 马 军⁴, 江永萍³, 东 红^{3*}

(1. 天津中新药业药品营销公司, 天津 300457; 2. 天津劳动和社会保障局, 天津 300040; 3. 天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂, 天津 300457; 4. 莱生(天津)天然保健品开发有限公司, 天津 301700)

摘 要:日本是我国中药出口的第一大市场,并且在将我国中医药推向国际市场方面,日本也是首要选择的市场。通过对日本药品进口程序、各种申请及要求提交的资料进行介绍,以期对我国药品出口日本有所裨益,使中药能被接受认可。

关键词:日本;药品;进口程序

中图分类号:R956 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)02-0330-04

日本是我国的近邻,历史上深受中国文化的影响,是中国中药出口的第一大市场,并且在将我国中医药推向国际市场方面,日本也是首要选择的市场。

中成药进入日本市场,如果在日本厚生省规定的药局方中的汉方药 210 种处方之内,则较易被批准,如属新增的品种还要进行药理及临床复核试验,审查期少则 10 个月,多则几年,费用上千万日元,一经获准,质量方面则要按申报标准严格把关执行。

曾对日本汉方药注册进行过简要介绍^[1],下面就日本药品进口程序及相关要求加以详细介绍,以便国内企业开拓日本市场及医药界人士加以了解、借鉴。

1 外国生产企业的各种申请

1.1 外国生产企业的认定申请:所谓外国生产企业即是指在国外想生产出口到日本的医药品的企业,和日本国内生产企业一样需要厚生劳动大臣的批准。认定申请前,外国生产

企业以及生产场所必须根据别纸样式 1 业者编码登记票进行登记。认定申请时,根据施行规则样式第十六(二)向机构提出认定调查申请书。注意必须在生产销售批准申请之前申请认定。申请手续、申请书的记载方法、提交资料见表 1。

1.2 外国生产企业认定区分变更/追加变更:认定区分追加申请是指外国生产企业取得认定后,重新追加其他认定区分的申请;认定区分变更申请是指废止已认定区分的同时,重新追加其他认定区分的申请。申请手续、申请书的记载方法、提交资料见表 1。

1.3 外国生产企业的认定更新申请:外国生产企业的认定有效期为 5 年,如果到期不更新则自动失效。申请手续、申请书的记载方法、提交资料见表 1。

1.4 外国生产企业的其他申请:关于外国生产企业认定的其他申请如变更申请、休止、废止、再开申请、许可证的再交付申请等按照日本国内生产企业的各申请的规定执行。

* 收稿日期:2008-05-12