

环境因子对药用植物三萜皂苷合成影响的研究进展

焦晓林, 高微微*

中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 三萜皂苷类化合物是一类具有多种生物及药理活性的植物次生代谢产物, 除去遗传因素外, 环境对植物体内三萜皂苷的生物合成产生较大的影响。总结三萜皂苷类化合物的生物合成途径及其关键酶, 并综述了环境中光照、温度、水分、盐、土壤状况等因子对药用植物三萜皂苷合成的影响和可能的作用机制, 以期优化药用植物的栽培环境和提高药材质量提供参考。

关键词: 药用植物; 三萜皂苷; 生物合成; 环境因子; 酶

中图分类号: R282.21; R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)02-0398-05

Advances in studies on influence of environmental factors on triterpenoid saponin synthesis in medicinal plants

JIAO Xiao-lin, GAO Wei-wei

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Key words: medicinal plant; triterpenoid saponin; biosynthesis; environmental factor; enzyme

三萜皂苷类化合物是植物体内一类重要的次生代谢产物, 由具有 30 个碳原子的三萜类苷元和糖组成, 在蕨类、单子叶、双子叶植物中分布广泛。三萜皂苷因具有抗炎^[1]、抗肿瘤^[2]、抗菌^[3]、抗病毒^[4]、杀寄生虫^[5]、增强抗氧化酶活性^[6]及缓解风湿性关节炎^[7]、提高免疫力^[8]等广泛的药理和生物活性, 成为植物和医药领域研究的热点。三萜类皂苷主要有四环三萜和五环三萜, 四环三萜类包括人参、西洋参、三七中的人参皂苷, 黄芪中的黄芪苷, 绞股蓝中的绞股蓝苷等; 五环三萜类包括甘草中的甘草酸、柴胡中的柴胡皂苷、紫花苜蓿中的苜蓿皂苷等。由于具有明确的活性, 三萜皂苷通常是评价中药材质量和制订药品质量标准的主要指标。提高药材中这类成分的量及确保其在药材中的稳定性, 对于保证药材质量有着至关重要的意义。植物次生代谢产物往往受生长环境的调控, 由于含有三萜皂苷的药用植物特性各异且生长环境不同, 导致三萜皂苷的生物合成对环境因子的响应呈现出多样性。因此,

研究不同环境因子对三萜皂苷的影响, 探索此类成分在药用植物体内的变化规律及机制, 对指导药用植物栽培环境的选择和栽培技术的确定具有重要的意义, 也可以为中药材质量控制提供理论依据。

植物生存环境中的生态因子可分为生物因子和非生物因子。生物因子主要包括植物因子(植物之间共生、寄生、附生关系)和动物因子(摄食、传粉、践踏等); 非生物因子主要指气候因子(温度、光照、降水)、土壤因子(土壤的理化性质)和地形因子(海拔高度、坡度、坡向)等。另外, 栽培作物还受灌水、施肥和种植方式等人为因子的影响。本文综述近 10 年来有关非生物因子即通常意义的环境因子影响药用植物体内三萜皂苷类化合物生物合成的研究进展, 针对存在的不足、对今后应加强的研究方向提出建议。

1 三萜皂苷生物合成途径及相关酶

Ruzicka 于 1938 年提出了“生源异戊二烯法则”,

收稿日期: 2010-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873380)

作者简介: 焦晓林(1985—), 女, 河北省石家庄市人, 博士, 主要研究环境因子对药用植物次生代谢产物的调控。

Tel: (010)62899737 E-mail: jiao_1110@yahoo.com.cn

*通讯作者 高微微 Tel: (010)62899737 Fax: (010)62896313 E-mail: wwgao411@sina.com

认为萜类化合物是由甲羟戊酸 (MVA) 途径衍生而来。目前认为三萜皂苷类化合物的生物合成以初生代谢产物乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 为起始物质, 经过一系列的酶促反应实现复杂的结构转化, 得到各种三萜皂苷。随着分子生物学技术的发展, 一系列相关酶基因相继被克隆, 为合成途径的判断提供了更加确定的证据。

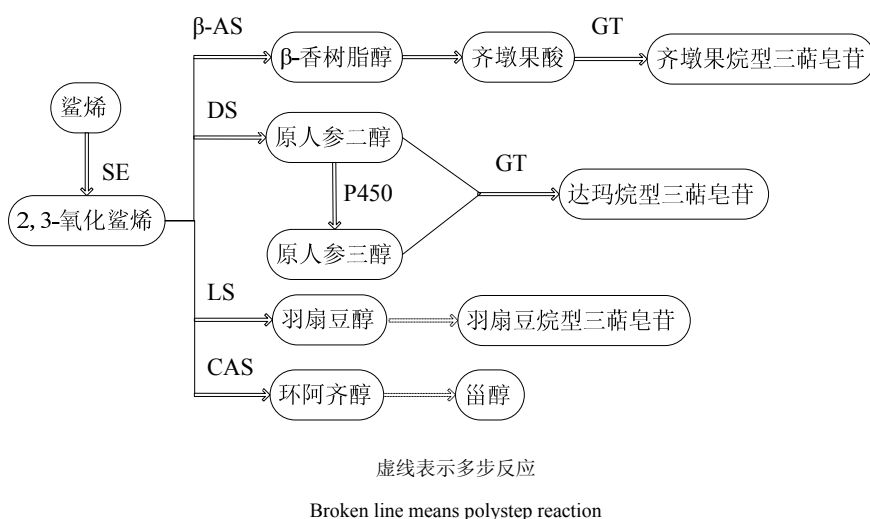
1.1 前体物质鲨烯的合成

鲨烯 (squalene) 是三萜皂苷、甾醇、胆固醇等萜烯类重要物质的共同前体。鲨烯的生物合成以初生代谢产物乙酰辅酶 A 为起始物质, 在多种酶的催化作用下经由一系列氧化还原反应, 生成 Δ^3 -异戊

烯焦磷酸酯 (IPP) 和 γ, γ -二甲基烯丙焦磷酸酯 (DMAPP), 最终合成鲨烯。

1.2 三萜皂苷的合成

鲨烯在鲨烯环氧酶 (SE) 的作用下转变为 2, 3-氧化鲨烯 (2, 3-oxidosqualene)。在不同的氧化鲨烯环化酶 (OSCs) 作用下, 2, 3-氧化鲨烯环化形成三萜的前体物质, 环化的多样性是形成各种三萜骨架的根源^[9]。目前从不同植物中克隆的 OSCs 酶包括 β -香树脂醇合成酶 (β -AS)、达玛烯二醇合成酶 (DS)、羽扇醇合成酶 (LS) 和环阿齐醇合成酶 (CAS)^[10], 其中前 3 个酶负责合成各类三萜类产物前体, 第 4 个酶负责合成植物甾醇类物质前体 (图 1)。



虚线表示多步反应

Broken line means polystep reaction

图 1 三萜皂苷生物合成途径
Fig. 1 Biosynthetic pathway of triterpenoid saponin

目前在药用植物中发现的三萜皂苷多数由齐墩果烷和达玛烷衍化而来。在齐墩果烷型三萜皂苷 (oleanane type triterpenoid saponin) 合成过程中, β -香树脂醇 (β -amyrin) 是此类化合物的骨架化合物及最直接的前体物质, 已经证明是甘草酸生物合成途径中的重要中间产物, 因此在研究环境对三萜皂苷的生物合成影响作用时, β -AS 酶成为人们关注的主要对象^[11]。达玛烷型三萜皂苷 (dammarane type triterpenoid saponins) 先由达玛烯二醇合成酶 (DS) 环化 2, 3-氧化鲨烯, 再经由细胞色素 P450 和糖基转移酶 (GT) 的共同作用形成各式各样的达玛烷型三萜皂苷。P450 和 GT 酶位于该合成途径的最下游, 主要参与相同结构类型三萜皂苷的衍生化反应, 它们的活性强度直接决定了植物中某个特定皂苷的量, 因此 P450 和 GT 酶也成为环境对此类三萜皂苷

影响研究中的一个关注点^[12]。

2 环境因子对药用植物中三萜皂苷合成的影响

植物的次生代谢是植物在进化过程中对复杂的外界环境变异适应和选择的结果。与初生代谢产物相比, 次生代谢产物的产生和变化与环境有着更强的相关性和对应性。次生代谢产物的产生和分布表现出明显的地域特异性, 其在药用植物体内的合成和积累与药材产地环境具有紧密的联系, 是“道地”药材形成的重要原因之一^[13]。本文对近年来报道较多的光照、温度、水分、盐、土壤状况等因子对三萜皂苷类次生代谢物的影响和可能的作用机制进行综述。

2.1 光照

光照在植物生长发育及初生代谢中起重要作用, 同时, 光照强度、时间和光质也影响植物体内次生代谢产物的合成与积累。阴生和阳生植物受光

照强度影响与本身特性有关,对光强的需求有极大差异。人参在人工栽培时需遮荫,在 20%透光棚下根中人参皂苷的量最高^[14],叶片中皂苷的量以在 15%透光棚下最高^[15];光强过大时人参皂苷的量反而下降,可能与光强过大造成叶片损伤有关。相对于阴生植物,阳生植物对光照的需求较高,光强较大时三萜皂苷的合成较为旺盛,如绞股蓝在相对照度为 70%左右时绞股蓝总皂苷量最高^[16]。从影响机制来说,植物体内光反应与电子传递需要光能激发产生,光反应产物是参与初生代谢和次生代谢的必需物质,如在鲨烯生物合成途径中,MVA 的形成、MVA 磷酸化生成 MVAP、SS 酶催化 FPP 缩合生成鲨烯等多个步骤均需要 ATP 与 NADP(H)的参与^[17],因此光照强度影响植物体三萜皂苷生物合成的机制可能与光反应产物有一定关系。

在适宜的光照强度下,延长光照时间有利于提高三萜皂苷的生物合成。吴庆生等^[18]以西洋参总皂苷量对产地主要气候因子作回归分析,发现日照时数是影响我国西洋参总皂苷生物合成的主要气候因子,日照时数延长有利于西洋参皂苷的积累。朱仁斌等^[19]将皖西山区不同海拔高度所产西洋参根中总皂苷的量与相应的年日照时数作相关分析后发现,日照时数的差异是影响西洋参总皂苷量的主要因子,各种单体皂苷的合成随日照时数增加而增加,总皂苷的量随年日照时数增加呈线性增加趋势。对不同产地三七的研究中也得出相似的结果,日照时数高的产区所产三七中皂苷成分较高^[20]。关于光照时间对三萜皂苷的影响机制尚未见报道。

目前有关光质对药用植物中三萜皂苷影响的研究,多来自发状根、愈伤组织或悬浮细胞等离体技术,对植株的影响报道较少。Kee 等^[21]在荧光、金属卤化物灯光、红光、蓝光以及红光+蓝光照射下培养人参发状根,发现荧光照射发状根中人参皂苷积累程度最高。Broecklin 等^[22]用紫外线处理蒺藜苜蓿细胞悬浮培养物,结果表明紫外线基本不影响三萜皂苷前体物 β -香树脂醇的量。从光质对三萜皂苷关键酶的影响研究中发现,蓝光处于 450 nm 波段,照射后可能与细胞色素 P450 酶的激活有一定内在关系,如在原人参二醇 (protopanaxadiol) 转化为原人参三醇 (protopanaxatriol) 的生物过程中就需要细胞色素 P450 的参与(图 1)。Yue 等^[23]在三七细胞悬浮培养物中发现一种转化酶 P6H,具有将原人参二醇转化为原人参三醇的作用,这种酶对细胞色

素 P450 抑制剂敏感,在环境中存在 CO 时其活性被抑制,而蓝光照射可缓解 CO 的抑制作用,由此推论此酶依赖于细胞色素 P450,蓝光照射有利于其催化三萜皂苷类化合物的转化。除蓝光以外,其他光质对三萜皂苷合成的调控机制未见相关报道。何水林等^[24]使用离体辣椒叶片,用紫外线处理后发现辣椒叶片 SS 酶活性在一定程度上受到抑制。完整植株对不同光质的响应是否与离体细胞或组织培养物一致尚有待进一步考察。

2.2 温度

适度的高温有利于植物中三萜皂苷的生物合成。Pecetti 等^[25]对紫花苜蓿的研究表明,在生长期日间温度较高时,紫花苜蓿中总皂苷量也较高。在植物次生代谢物质生物合成途径中,GT 酶通常位于三萜皂苷生成的最下游,其主要功能为调控结构类型相似的三萜皂苷之间的转化。适度高温处理可提高甾醇 GT 酶活力,而三萜皂苷合成中涉及的 GT 酶对高温胁迫是否会作出与甾醇 GT 酶相似的反应有待进一步研究论证。

2.3 水分

通常情况下适度干旱胁迫能够刺激植物中次生代谢产物的合成和积累^[26-27]。这个规律同样适用于三萜皂苷类物质,药用植物在受到干旱胁迫时组织中三萜皂苷的量通常会上升。在研究不同生长环境条件下气候对三七的影响时发现,降水量与三七内三萜皂苷的量呈负相关,降雨量过大不利于皂苷的积累^[20]。刘长利等^[28]对盆栽甘草移栽苗进行不同程度的干旱胁迫,发现在不同的干旱胁迫条件下甘草酸的积累量显著不同,多重比较分析结果发现中度干旱胁迫(土壤相对含水量 45%~50%)条件下甘草酸的积累量显著高于对照组(土壤相对含水量 60%~70%),推论适当的干旱胁迫有利于甘草酸的积累,这与廖建雄等^[29]采用 PEG6000 模拟干旱处理砂培甘草的试验结果相同。唐晓敏^[30]测定了甘草酸合成过程中关键酶表达量,发现适当的干旱胁迫可提高 β -AS 酶和 SE 酶的表达量,从而提高甘草酸的相对量,最终提高甘草药材的质量。

2.4 盐

适度的盐胁迫可以提高植物中次生代谢产物的量^[27],药用植物中三萜皂苷的积累也符合这一特点。Jeong 等^[31]在人参毛状根培养时加入少量盐,结果表明硒、NiSO₄ 和 NaCl 均会提高毛状根中人参皂苷的量。杨秀红^[32]和唐晓敏等^[33]分别对甘草幼苗

和一年生温室移栽苗施加 NaCl, 发现适度 NaCl 胁迫下生长的甘草根中甘草酸量较对照显著提高; 进一步测定盐胁迫下盆栽甘草一年生移栽苗根中 β -AS 酶和 SE 酶的表达量, 发现 0.3% NaCl 处理时这两种酶的表达量最高, 同时甘草酸合成前体物质 β -香树脂醇量降低, 推测适度的盐胁迫条件下甘草酸量的增加可能是由于盐胁迫刺激了两种酶的表达, 增加了前体物质的消耗, 从而促进甘草酸积累^[30]。

2.5 土壤状况

土壤土质、pH 值、肥力水平都会影响植物中三萜皂苷的合成。张继等^[34]比较了同一生长环境下沙质土和草甸土生长的甘草中甘草酸的量, 沙质土比草甸土有利于甘草酸积累。药用植物生长在特定 pH 值土壤时, 所含三萜皂苷可以得到较充分的合成, 张程诚^[35]测定了在不同 pH 值土壤生长的西洋参中主要人参皂苷的量, 发现土壤 pH 值 5.5 时总皂苷量最高, 明显优于其他酸度土壤所栽培的西洋参。改善土壤肥力能改变药用植物中三萜皂苷类物质的量, 任一猛等^[36]用发酵玉米秸秆粉、EM 菌、硅藻土 3 种物质对农田土壤进行改良后栽培人参, 使人参皂苷的量得到提高, 增施磷肥和钾肥有利于提高栽培人参中皂苷的量^[37]。目前土壤对三萜皂苷生物合成的影响机制未见报道。

3 结语

经过近半个多世纪的研究, 植物体中以初生代谢产物为起始物质合成鲨烯的途径已基本明确, 但涉及由 2, 3-氧化鲨烯合成各种三萜皂苷的下游分支途径, 除了对达玛烷和齐墩果烷两类较常见三萜皂苷的生物合成有一定研究外, 对其他类型皂苷研究并不充分。药用植物种类多, 所含的皂苷种类和结构多样, 在各个科属药用植物中由三萜骨架衍生到各种三萜皂苷的步骤报道很少, 苷元上连接糖链的位置、种类、数目如何受酶的调控尚待进一步明确。充分了解三萜皂苷的合成途径是实现对其调控的基础, 进一步明确三萜皂苷生物合成的下游途径, 将有助于对特定皂苷进行精细调控。在这方面, SSH 等分子生物学技术的发展为快速发现三萜皂苷相关合成基因提供了新的途径。

在生产实践中, 环境因素对三萜皂苷生物合成产生的影响往往是综合作用, 除主要环境因子外, 栽培方式、生长年限、采收加工等因素都会影响植物中三萜皂苷的量。在各种环境因素中, 对光照影响机制的研究相对较多, 温度、水分、盐胁迫及土

壤情况等方面的研究较少, 有关多种环境因素综合作用方面的研究涉及极少。采用多因子分析明确其中的主效因子及各因子之间的相互作用是今后需要加强的研究方向。在此基础上, 可以通过改变栽培技术以实现提高皂苷量的目的, 而对于难以改变的环境因子应对策略则是选择适宜生产区域。

另外, 在研究环境因子的影响作用时, 目前主要集中在人参、西洋参、三七、甘草等少数药材上, 对其他药用植物的报道很少。从三萜皂苷在植物体内的生物合成过程来看, 对环境因子影响机制集中在 β -AS 酶和 GT 酶上, 对生物合成途径中其他酶研究较少。由于植物中三萜皂苷的量由多个酶促反应共同作用决定, 其生物合成途径中一系列酶对环境因子的响应应受到关注。

随着对三萜皂苷类化合物参与免疫缺陷、癌症等重大疾病控制的研究的深入, 人类对三萜皂苷类化合物的需求逐渐增加, 应用人工栽培、植物细胞培养及组织培养提高植物中三萜皂苷类化合物的量, 已成为目前植物学及医药领域中的重点研究内容之一。探索和阐明植物中三萜皂苷的代谢过程及其与环境的关系, 不仅有助于揭示道地药材形成的机制, 也将为全面、深入认识植物与环境的相互关系提供新的途径, 从而最终达到人为调控环境因素以保证药材质量的预期目标。

参考文献

- [1] Gao H, Zhao F, Chen G D, *et al.* Bidesmoside triterpenoid glycosides from *Stauntonia chinensis* and relationship to anti-inflammation [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(6): 795-806.
- [2] Magid A A, Bobichon H, Borie N, *et al.* Cytotoxic triterpenoid saponins from the stem bark of *Antonia ovata* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(4): 429-434.
- [3] Yadava R N, Jharbade J. New antibacterial triterpenoid saponin from *Lactuca scariola* [J]. *Fitoterapia*, 2008, 79(4): 245-249.
- [4] Wang S, Li J, Huang H, *et al.* Anti-hepatitis B virus activities of astragaloside IV isolated from *Radix astragali* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(1): 132-135.
- [5] Maes L, Vanden Berghe D, Germonprez N, *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral leishmania species [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(1): 130-136.
- [6] 梁启明, 曲绍春, 于晓风, 等. 刺五加叶皂苷 B 对急性心肌梗死大鼠的保护作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(3):

- 444-447.
- [7] Nam J H, Jung H J, Choi J, *et al.* The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(5): 967-970.
- [8] 程 慧, 宋新波, 张丽娟. 人参皂苷 Rg₃ 与 Rh₂ 的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(4): 307-311.
- [9] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75: 31-49.
- [10] Hayashi H, 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.
- [11] 赵云生, 万德光, 陈 新, 等. 五环三萜皂苷生物合成与调控的研究进展 [J]. *中草药*, 2009, 40(2): 327-330.
- [12] Kalinowska M, Zimowski J, Pączkowski C, *et al.* The formation of sugar chains in triterpenoid saponins and glycoalkaloids [J]. *Phytochem Rev*, 2005, 4: 237-257.
- [13] 黄璐琦, 陈美兰, 肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(6): 494-496.
- [14] 张治安, 徐克章, 任跃英, 等. 光照条件对参株碳水化合物和人参皂甙含量的影响 [J]. *吉林农业大学学报*, 1994, 16(3): 15-17.
- [15] Park H. Physiological response of *Panax ginseng* to light [A]. *Proceeding of the 3rd International Ginseng Symposium* [C]. Seoul: Korean Ginseng Research Institute, 1980.
- [16] 邓 铭, 钟 山, 任 波, 等. 光照强度对绞股蓝总皂甙含量的效应研究 [J]. *湖北医科大学学报*, 2000, 21(2): 102-103.
- [17] 王镜岩, 朱胜庚, 徐长法. *生物化学 (下册)* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [18] 吴庆生, 朱仁斌, 宛志沪, 等. 西洋参有效成分与气候生态因子的关系 [J]. *生态学报*, 2002, 22(5): 779-782.
- [19] 朱仁斌, 吴庆生, 宛志沪, 等. 皖西山区海拔高度对西洋参有效成分的影响 [J]. *中国农业气象*, 2001, 22(1): 19-22.
- [20] 金 航, 崔秀明, 朱 艳, 等. 气象条件对三七药材道地性的影响 [J]. *西南农业学报*, 2005, 18(6): 825-828.
- [21] Kee W Y, Hosakatte N M, Eun J H, *et al.* Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality [J]. *Biochem Eng J*, 2005, 23(1): 53-56.
- [22] Broeckling C D, Huhman D V, Farag M A, *et al.* Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism [J]. *J Exp Bot*, 2004, 56(410): 323-336.
- [23] Yue C J, Zhou X, Zhong J J. Protopanaxadiol 6-hydroxylase and its role in regulating the ginsenoside heterogeneity in *Panax notoginseng* cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(5): 933-940.
- [24] 何水林, 林文雄, 陈如凯, 等. 辣椒倍半萜植保素代谢的分子生态学研究 I: 紫外线对辣椒叶片倍半萜环化酶及鲨烯合成酶的作用 [J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(4): 377-381.
- [25] Pecetti L, Tava A, Romani M, *et al.* Variety and environment effects on the dynamics of saponins in Lucerne (*Medicago sativa* L.) [J]. *Eur J Agron*, 2006, 25(3): 187-192.
- [26] 徐 鹏, 刘长利, 许利平, 等. 干旱胁迫下甘草酸合成与脱落酸的相关性初步研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(8): 1375-1377.
- [27] 王红星, 乔传英, 古红梅. 影响植物次生代谢产物形成的因素 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(35): 11376-11377.
- [28] 刘长利, 王文全. 干旱胁迫对甘草酸积累影响的物质组分分配研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(23): 2852-2853.
- [29] 廖建雄, 王根轩. 甘草酸在甘草适应荒漠生境中的可能作用 [J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(4): 367-370.
- [30] 唐晓敏. 水分和盐分处理对甘草药材质量的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
- [31] Jeong G T, Park D H. Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system: effect of abiotic elicitors [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, 129-132: 436-446.
- [32] 杨秀红, 李健民, 董学会, 等. 外源甘草酸对 NaCl 胁迫条件下甘草幼苗生长、根部甘草酸含量以及几种与盐胁迫相关生理指标的影响 [J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42 (3): 441-444.
- [33] 唐晓敏, 王文全, 杨 全, 等. NaCl 处理对甘草生长、生理指标及药效成分含量的影响 [J]. *吉林农业大学学报*, 2008, 30(2): 172-175.
- [34] 张 继, 杨永利. 相同条件下的 5 种甘草中甘草酸含量的比较研究 [J]. *西北植物学报*, 1997, 17(6): 111-114.
- [35] 张程诚. 调节土壤酸度对西洋参生境、品质及土壤微生物环境的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2008.
- [36] 任一猛, 王秀全, 赵 英, 等. 农田栽参土壤的改良与培肥研究 [J]. *吉林农业大学学报*, 2008, 30(2): 176-179.
- [37] 赵 英, 王秀全, 任跃英. 磷、钾肥与人参产量 [J]. *中药材*, 2002, 25(8): 543-544.