

植物细胞色素 P450 在三萜皂苷生物合成中的功能研究进展

徐洁森^{1,2}, 魏建和^{1,2}, 陶韵文^{1,3}, 孙晶^{1,4}, 隋春^{1,2*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

3. 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007

4. 东北林业大学生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 三萜皂苷是许多药用植物的药效成分, 其生物合成通常可分为前体形成、骨架构建以及后修饰 3 个部分。后修饰过程是植物调控形成众多种类单体皂苷的重要过程, 其机制至今尚未完全阐明。植物细胞色素 P450 是由少数几个超基因家族编码的, 参与多种生物过程, 包括三萜皂苷次生代谢的后修饰过程。目前, 已在少数植物中克隆到了催化个别单体皂苷生物合成的 P450 基因, 其功能研究取得了一定进展。将就其进行综述, 为进一步开展相关研究提供借鉴。

关键词: 三萜皂苷; 生物合成; 细胞色素 P450; 超基因家族; 基因克隆

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)08-1635-06

Advances in studies on functions of plant cytochrome P450 in triterpenoid saponin biosynthesis

XU Jie-sen^{1,2}, WEI Jian-he^{1,2}, TAO Yun-wen^{1,3}, SUN Jing^{1,4}, SUI Chun^{1,2}

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

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Beijing 100193, China

3. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

4. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Key words: triterpenoid saponin; biosynthesis; cytochrome P450; supergene family; gene cloning

三萜皂苷是一类重要的植物次生代谢产物, 是许多药用植物如甘草、人参、三七、柴胡等的活性成分^[1-3]。现代药理研究证明, 三萜皂苷具有抗癌、抗凝血、抗炎、抗病毒、调血脂、保肝、降血糖、免疫调节和神经保护等功能^[4-8]。三萜皂苷的量和组成随着植物的遗传背景、组织类型、生长年龄、生理状况以及环境因子的变化而发生显著变化^[9], 而其量和组成的变化又取决于三萜皂苷合成途径中的一些关键酶及其在细胞中的表达水平^[10]。本文着重对三萜皂苷生物合成途径中的后修饰酶细胞色素 P450 的功能研究进展进行综述。

1 三萜皂苷生物合成途径

在高等植物中, 三萜皂苷是通过类异戊二烯途径

合成的。其合成途径可大体分为 3 个阶段: 前体形成、骨架构建以及后修饰。活性 C-5 单位异戊烯基焦磷酸酯 (IPP) 作为前体物质, 是在细胞质和线粒体中通过甲羟戊酸途径 (MVAP) 合成的, 而在质体中则是由丙酮酸/磷酸甘油醛途径 (PGP) 生成^[10-14]。IPP 与其异构体二甲丙烯焦磷酸 (DMAPP) 缩合为牻牛儿基焦磷酸 (GPP), GPP 与 IPP 或 DMAPP 在法尼基焦磷酸合酶 (FPS) 作用下以头尾方式连接转化为法尼基焦磷酸 (FPP), 又在鲨烯合成酶 (SS) 的作用下合成鲨烯 (SQ), 然后经鲨烯环氧酶 (SE) 催化转变为 2,3-氧化鲨烯 (2,3-oxidosqualene), 2,3-氧化鲨烯在不同的 2,3-氧化鲨烯环化酶 (OSCs) 如羽扇豆醇合酶 (LS)、达玛烯二醇合酶 (DS)、 α -香树脂合酶

收稿日期: 2012-04-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81072994); 北京市自然科学基金面上项目 (5102033); 中医药行业科研专项 (201107011)

作者简介: 徐洁森, 硕士研究生。

*通讯作者 隋春 E-mail: csui@implad.ac.cn

(α -AS)、 β -香树脂合酶(β -AS)的环化作用下生成不同类型的三萜骨架;三萜骨架依赖细胞色素 P450 单加氧酶氧化、糖基转移酶的糖基化等后修饰过程,最终形成种类众多的单体皂苷^[3,10,14-22]。

2 参与三萜皂苷生物合成的 P450

植物细胞色素 P450 具有广泛的催化活性,参与苯丙烷类、萜类、生萜糖苷类、生物碱、植物激素等的生物合成^[23-26]。其催化作用的共同特点是在作用物分子中加入一个氧原子。其中在三萜皂苷的生物合成中,细胞色素 P450 主要催化三萜骨架惰性甲基和亚甲基的氧化^[27-28]。三萜皂苷广泛存在于自然界中,仅从柴胡属植物中分离皂苷类成分已达 120 多种,而后修饰过程是形成结构多样性的主要因素。鉴于植物细胞色素 P450 催化反应的复杂性,关于其催化机制的研究较少。目前已证明参与三萜

皂苷生物合成的细胞色素 P450 仅有:大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 中的 CYP93E1^[29],燕麦 *Avena strigosa* Schreb. 中的 CYP51H10^[30],甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 中的 CYP88D6、CYP93E3 和 CYP72A154^[31-32],蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* L. 中的 CYP716A12、CYP93E2^[33-34](表 1)。

2.1 大豆 CYP93E1

Shibuya 等^[29]在 2006 年从大豆中鉴定了第一个参与皂苷元修饰的细胞色素 P450 酶 CYP93E1。通过在酿酒酵母中的异源表达分析,CYP93E1 表现出 β -香树脂醇-24-羟化酶和槐花二醇-24-羟化酶的双重活性,催化产物分别为大豆皂醇 B 和齐墩果-12-烯-3 β ,24-二醇(图 1)。CYP93E1 对 C-24 位甲基的氧化具有区域专属性,不参与 C-22 位的羟基化,特异性地催化 3-羟基-12-齐墩果烯结构的氧化。

表 1 参与三萜皂苷生物合成的植物细胞色素 P450

Table 1 Cytochrome P450 involved in triterpenoid saponin biosynthesis

P450	植 物	功 能
CYP93E1	大豆	β -香树脂醇-24-羟化酶和槐花二醇-24-羟化酶
CYP51H10	燕麦	尚未明确
CYP88D6	甘草	β -香树脂醇-11-氧化酶
CYP93E3	甘草	β -香树脂醇-24-羟化酶
CYP93E2	蒺藜苜蓿	β -香树脂醇-24-羟化酶
CYP716A12	蒺藜苜蓿	β -香树脂醇-28-氧化酶
CYP72A154	甘草	11-羰基- β -香树脂醇-30-氧化酶

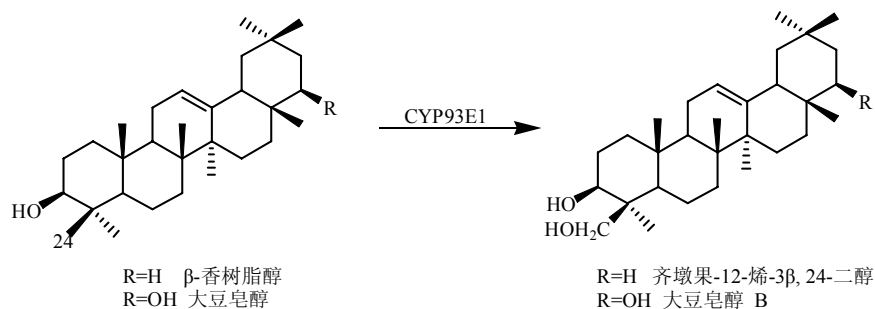


图 1 参与齐墩果烷型皂苷生物合成的 CYP93E1

Fig. 1 CYP93E1 involved in oleanane saponin biosynthesis

2.2 燕麦 CYP51H10

燕麦根皂苷是在燕麦根的表皮细胞中合成的^[35]。其主要皂苷成分燕麦根皂苷 A-1 在紫外灯下有很强的荧光性,并且可在细胞中直接观察到,这是其区别于其他三萜类成分的特性。通过燕麦根中荧光性的变化可有效地分离燕麦根皂苷缺陷突

变体^[30,35]。而皂苷缺陷突变体的获得将有利于皂苷合成相关基因的克隆及合成通路的阐明。在燕麦中,针对皂苷缺陷突变体的遗传分析显示,这些基因呈现出群聚性^[36]。由于这类基因簇涵盖了大部分与燕麦皂苷合成相关的基因^[37-38],故针对性地深入研究有望阐明燕麦皂苷的生物合成机制。Qi 等^[30]

组织表达特异性分析显示, CYP88D6 在根和匍匐枝中表达, 而在叶片和茎中检测不到^[31]; CYP72A154 除叶片外在根、茎和匍匐枝中均有表达^[32]。

2.4 蒺藜苜蓿 CYP716A12 和 CYP93E2

Carell 等^[33]用激活标签法和定向诱导基因组局部突变技术在蒺藜苜蓿中鉴定了参与溶血皂苷生物合成的 CYP716A12。CYP716A12 缺陷突变体不能产生溶血皂苷, 只生成大豆皂苷。与溶血性皂苷需 C-24 位羟基化所不同的是, 溶血皂苷的合成需在 C-23 位羟基化, 同时 C-28 位羧基化, 而 C-22 位不氧化^[40]。在酵母中异源表达实验证明, CYP716A12 催化 β -香树脂醇 C-28 位氧化生成齐墩果酸 (图 4)^[33]。

Carell 等^[33]采用实时荧光定量 PCR 分析了 CYP716A12 在蒺藜苜蓿不同组织 (叶、茎、根) 和不同生长阶段 (花前期、花期、果期) 的表达。结果显示, 基因在花中表达量最高, 在果实中最低; 不同生长期基因在根中的表达水平均较高, 且表达量相对稳定; 在叶片中, 基因表达量在生长期明显增加, 在花期达到最高值。

此外, Naoumkina 等^[41]通过对蒺藜苜蓿基因共表达聚类分析表明, CYP93E2 参与皂苷的生物合成。鉴于其与同为豆科植物中的 β -香树脂醇-24-羟化酶 CYP93E1 和 CYP93E3 的高度同源性, 认为 CYP93E2 也具有 β -香树脂醇-24-羟化酶活性, 但具体反应尚需实验验证。

2.5 其他

到目前为止, 在植物中除了上述已验证参与三萜皂苷生物合成的细胞色素 P450 酶以外, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 中 CYP705A5 和 CYP708A2 参与 2,3-环氧鲨烯的环化产物三萜烯醇的后修饰^[42], 然而, 文献中没有从三萜烯醇生成皂苷的描述, 也可能最终生成的是三萜环烯醚萜衍生物^[43]。

在人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 中, 推测人参皂苷是由细胞色素 P450 催化达玛烯二醇 II 羟基化生成的^[27]。人参细胞色素 P450 催化达玛烯二醇 C-12 羟基化生成原人参二醇, 催化原人参二醇 C-6 位羟基化生成原人参三醇^[44-45] (图 5)。但目前尚未有关于人参细胞色素 P450 酶基因克隆的报道。

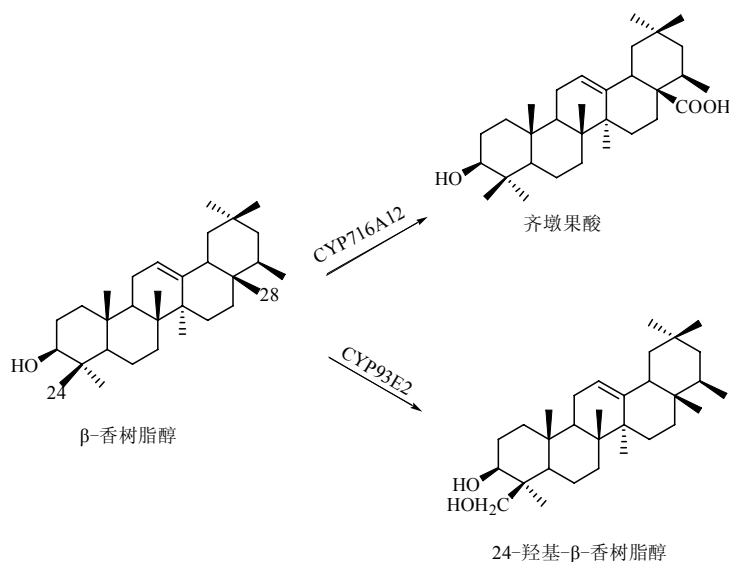


图 4 参与溶血皂苷生物合成的 CYP716A12 和 CYP93E2

Fig. 4 CYP716A12 and CYP93E2 involved in hemolytic saponin biosynthesis

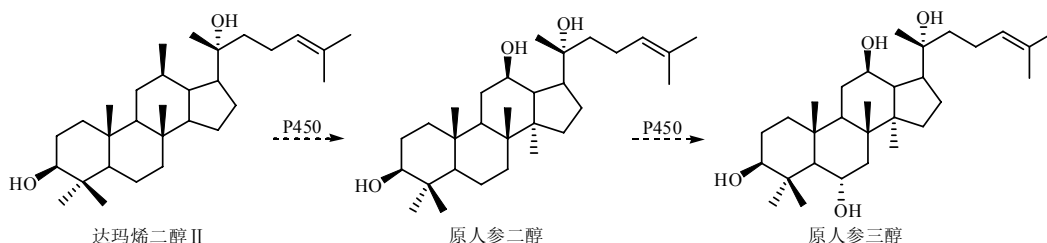


图 5 参与人参皂苷生物合成的 P450

Fig. 5 P450 involved in ginsenoside biosynthesis

3 结语

三萜皂苷广泛存在于自然界中,许多药用植物中含有众多种类的单体皂苷。如人参中已分离三萜皂苷单体60余种,三七中70多种,柴胡中将近120种^[46]。不同单体皂苷的生物活性差异较大,因而,研究多种单体皂苷的合成对调控药用成分生成具有重要意义。植物细胞色素P450是植物中较大的酶蛋白家族,参与植物体内多种物质如苯丙烷类、萜类、生萜糖苷类、生物碱、植物激素等的生物合成。到目前为止,已命名了5100个植物细胞色素P450酶基因(<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>)。陆生植物细胞色素P450可分为11个簇(clans),归为2类:单家族簇(CYP51、CYP74、CYP97、CYP710、CYP711、CYP727、CYP746)和多家族簇(CYP71、CYP72、CYP85、CYP86)^[47]。目前已验证参与三萜皂苷生物合成的细胞色素P450中,CYP93E1、CYP93E2和CYP93E3来源于CYP71簇,CYP716A12和CYP88D6归属于CYP85簇,CYP51H10为CYP51簇,CYP72A154为CYP72簇^[48-49]。这些细胞色素P450并不局限于一个特定的进化起源,而是源自距离较远的家族和簇系统^[50]。序列比对结果显示,除CYP93E1、CYP93E2和CYP93E3在氨基酸水平上的序列一致性较高外,已知的参与三萜皂苷合成的细胞色素P450酶的相关性较低。因而,从这些已知基因的特性来预测新基因的功能仍具一定难度。特别是目前尚未有关于这些酶晶体结构的描述,以及相应的蛋白结合位点的详细阐释。故仍需进一步开展更多的植物细胞色素P450基因克隆及其表达调控研究,为阐明其在三萜皂苷生物合成中的后修饰机制,并最终通过基因调控实现不同单体皂苷的人工可控生产奠定基础^[51]。

参考文献

- [1] Hostettmann K, Marston A. *Saponins* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [2] 匡海学. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [3] Vincken J P, Heng L, de Groot A, *et al.* Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 275-297.
- [4] Bader G. Pharmacology and biopharmaceutics of triterpenoid saponins [J]. *Pharmazie*, 1994, 49: 391-400.
- [5] Milgate J, Roberts D C K. The nutritional and biological significance of saponins [J]. *Nutrit Res*, 1995, 15: 1223-1249.
- [6] Rao A V, Gurfinkel D M. The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides [J]. *Drug Metab Drug Inter*, 2000, 17: 211-235.
- [7] 张云峰, 魏东, 邓雁如, 等. 三萜皂苷的生物活性研究新进展 [J]. *中成药*, 2006, 28(9): 1349-1353.
- [8] 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.
- [9] 焦晓林, 高微微. 环境因子对药用植物三萜皂苷合成影响的研究进展 [J]. *中草药*, 2011, 42(2): 398-402.
- [10] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Biochem Eng/Biotechnol*, 2002, 75: 31-49.
- [11] Lichtenthaler H K, Rohmer M, Schwender J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants [J]. *Physiol Plant*, 1997, 101: 643-652.
- [12] Liao Z H, Chen M, Gong Y F, *et al.* Isoprenoid biosynthesis in plants: pathways, genes, regulation and metabolic engineering [J]. *J Biol Sci*, 2006, 6: 209-219.
- [13] Laule O, Fürholz A, Chang H S, *et al.* Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PNAS*, 2003, 100: 6866-6871.
- [14] Ebizuka Y, Katsube Y, Tsutsumi T, *et al.* Functional genomics approach to the study of triterpene biosynthesis [J]. *Pure Appl Chem*, 2003, 75: 369-374.
- [15] Kim Y S, Han J Y, Lim S, *et al.* Ginseng metabolic engineering: Regulation of genes related to ginsenoside biosynthesis [J]. *J Med Plants Res*, 2009, 3: 1270-1276.
- [16] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. *Crit Rev Biochem Mole Biol*, 1999, 34: 95-106.
- [17] Suzuki H, Achnine L, Xu R, *et al.* A genomics approach to the early stages of triterpene saponin in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2002, 32: 1033-1048.
- [18] Sparg S G, Light M E, van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 94: 219-243.
- [19] Abe I, Rohmer M, Prestwich G D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes [J]. *Chem Rev*, 1993, 93: 2189-2206.
- [20] Cammareri M, Consiglio M F, Pecchia P, *et al.* Molecular characterization of β -amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis [J]. *Plant Sci*, 2008, 175: 255-261.
- [21] Yendo A C, de Costa F, Gosmann G, *et al.* Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields [J]. *Mol Biotechnol*, 2010, 46: 94-104.
- [22] Zhao C L, Cui X M, Chen Y P, *et al.* Key enzymes of triterpenoid saponin biosynthesis and the induction of their activities and gene expressions in plants [J]. *Nat*

- Prod Comm*, 2010, 5(7): 1147-1158.
- [23] Schuler M A, Werck-Reichhart D. Functional genomics of P450s [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 629-667.
- [24] 贺丽虹, 赵淑娟, 胡之璧. 植物细胞色素 P450 基因与功能研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2008, 15(2): 142-147.
- [25] Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 311-343.
- [26] Nelson D R, Ming R, Alam M, *et al*. Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes [J]. *Trop Plant Biol*, 2008, 1: 216-235.
- [27] Petersen M, Seitz H U. Cytochrome P450 dependent digitoxin 12 β -hydroxylase from cell cultures of *Digitalis lanata* [J]. *FEBS Lett*, 1985, 188: 11-14.
- [28] Hayashi H, Hanaoka S, Tanaka S, *et al*. Glycyrrhetic acid 24-hydroxylase activity in microsomes of cultured licorice cells [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34: 1303-1307.
- [29] Shibuya M, Hoshino M, Katsube Y, *et al*. Identification of β -amyrin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay [J]. *FEBS J*, 2006, 273: 948-959.
- [30] Qi X, Bakht S, Qin B, *et al*. A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: from essential sterols to plant defense [J]. *PNAS*, 2006, 103: 18848-18853.
- [31] Seki H, Ohyama K, Sawai S, *et al*. Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin [J]. *PNAS*, 2008, 105: 14204-14209.
- [32] Seki H, Sawai S, Ohyama K, *et al*. Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 4112-4123.
- [33] Carell M, Biazzi E, Panara F, *et al*. *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(8): 3070-3081.
- [34] Naoumkina M A, Modolo L V, Huhman D V, *et al*. Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 850-866.
- [35] Papadopoulou K, Melton R E, Leggett M, *et al*. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants [J]. *PNAS*, 1999, 96: 12923-12928.
- [36] Mylona P, Owatworakit A, Papadopoulou K, *et al*. Sad3 and sad4 are required for saponin biosynthesis and root development in oat [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 201-212.
- [37] Qi X, Bakht S, Leggett M, *et al*. A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants [J]. *PNAS*, 2004, 101: 8233-8238.
- [38] Osbourn A E, Field B. Operons [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 3755-3775.
- [39] Qin B, Eagles J, Mellon F A, *et al*. High throughput screening of mutants of oat that are defective in triterpene synthesis [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71: 1245-1252.
- [40] Tava A, Scotti C, Avato P. Biosynthesis of saponins in the genus *Medicago* [J]. *Phytochem Rev*, 2010, 10(4): 459-469.
- [41] Naoumkina M A, Modolo L V, Huhman D V, *et al*. Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 850-866.
- [42] Field B, Osbourn A E. Metabolic diversification independent assembly of operon-like gene clusters in different plants [J]. *Science*, 2008, 320: 543-547.
- [43] Ehlting J, Sauveplane V, Olry A, *et al*. An extensive (co-) expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 47-66.
- [44] 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: 933-940.
- [45] Kim O T, Bang K H, Kim Y C, *et al*. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2009, 98: 25-33.
- [46] Ashour M L, Wink M. Genus bupleurum: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63: 305-321.
- [47] Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution [J]. *Plant J*, 2011, 66: 194-211.
- [48] Sui C, Zhang J, Wei J H, *et al*. Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 539.
- [49] Mizutani M, Ohta D. Diversification of P450 genes during land plant evolution [J]. *Plant Biol*, 2010, 61: 291-315.
- [50] Augustin J M, Kuzina V, Andersen S B, *et al*. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72: 435-457.
- [51] Lambert E, Faizal A, Geelen D. Modulation of triterpene saponin production: *in vitro* cultures, elicitation, and metabolic engineering [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 164: 220-237.