

## 三七总皂苷生物合成的关键酶及其调控研究进展

赵 灿, 郭丽娜, 彭玉帅, 刘 辰, 王如峰\*

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

**摘 要:** 三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)属于达玛烷型三萜皂苷, 是中国传统珍贵药材三七的主要活性成分。三七总皂苷对中枢神经系统、心脑血管系统和免疫系统具有较好的保护作用, 并被广泛地用于衰老、肿瘤等疾病的治疗。对三七总皂苷生物合成中的关键酶如法呢基焦磷酸合酶(FPS)、鲨烯合成酶(SS)、鲨烯氧化酶(SE)、达玛烯二醇合成酶(DS)、环阿屯醇合成酶(CAS)、P450单加氧酶(CYP450)和糖基转移酶(GT)等在催化机制、基因克隆、转录水平的表达调控及其表达模式和表达组织和器官的特异性方面的研究进展进行综述, 并首次总结了多态性和环境胁迫等在三七皂苷生物合成的基因表达调控中的作用, 为应用代谢工程人工合成PNS提供依据。

**关键词:** 三七总皂苷; 三萜皂苷; 生物合成; 关键酶; 表达调控

中图分类号: R282.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)19-2954-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.023

## Research progress in key enzymes involved in biosynthesis of *Panax notoginseng* saponins and their regulation

ZHAO Can, GUO Li-na, PENG Yu-shuai, LIU Chen, WANG Ru-feng

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

**Abstract:** *Panax notoginseng* saponins (PNS), which belong to dammarane-type triterpenoid saponins, are the main active components of a precious Chinese materia medica (CMM) named *Notoginseng Radix*. PNS have better protective effects on the central nervous system, cardiovascular system, and immune system, and have been widely used in the treatment of diseases including fibrosis, aging, and neoplasm. This review summarized the research progress in the key enzymes involved in the biosynthesis of PNS, such as farnesyl pyrophosphate synthase (FPS), squalene synthase (SS), squalene oxidase (SE), dammarenyldiol-II synthase (DS), cycloartenol synthase (CAS), cytochrome P450 monooxygenases (CYP450), and glycosyltransferase (GT) in terms of catalytic mechanism, gene cloning, and expression regulation on the transcriptional level, as well as the specificity in expression patterns and expression tissues and organs. Meanwhile, the effects of polymorphism and environmental stress on the regulation of gene expression have been first summarized. This review provides a basis for artificial synthesis of PNS using metabolic engineering.

**Key words:** *Panax notoginseng* saponins; triterpenoid saponins; biosynthesis; key enzymes; expression regulation

三七 *Notoginseng Radix* 为五加科 (Araliaceae) 人参属 *Panax* L. 植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根, 主产于我国云南、广西及四川等地<sup>[1-2]</sup>。三七中含有皂苷、糖类、氨基酸、黄酮、油脂、微量元素等活性成分, 具有散瘀止血、消肿止痛的功效<sup>[2]</sup>。其中, 三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)是三七的主要活性成分, 其量高达12%<sup>[3]</sup>。研究表明, PNS 和部分单体皂苷在心脑血管系统、神经系统、物质代谢以及抗炎、抗肿瘤等方

面均有较好的生理活性, 且对某些疾病的药用价值远高于人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.<sup>[2-5]</sup>。

随着 PNS 和部分单体皂苷生物活性研究的深入, 市场需求也越来越大。但是, 三七对生长环境要求苛刻, 适宜栽种地域狭小, 传统栽培方法的产量难以满足市场需求, 导致三七市场价格不断上升, 并出现假三七扰乱市场的问题, 不利于中药市场的繁荣。近年来, 药用植物次生代谢产物合成的基因调控已成为分子生物学十分活跃的前沿研究领域,

收稿日期: 2015-03-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274044)

作者简介: 赵 灿 (1992—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为药物代谢。E-mail: zhaocan330755698@qq.com

\*通信作者 王如峰 Tel: (010)84738646 E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

而皂苷类物质是植物次生代谢产物的重要组成部分,其量和组成主要取决于生物合成关键酶以及在细胞中的表达水平。随着三萜皂苷生物合成过程中相关酶系研究的不断深入,通过代谢工程手段调控三七皂苷的生物合成逐步成为可能<sup>[6]</sup>。

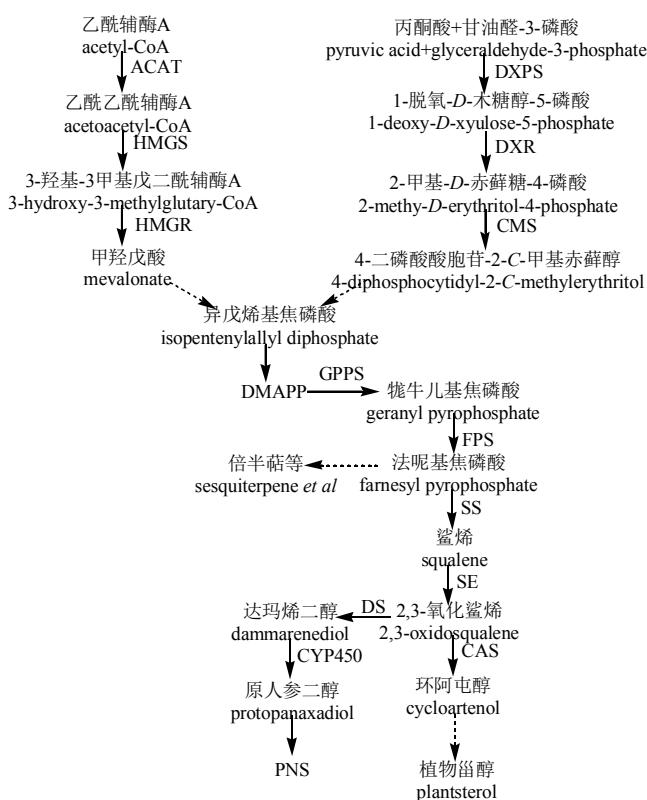
## 1 PNS 的生物合成

PNS 的主要成分为人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 等达玛烷型四环三萜皂苷。目前,对植物达玛烷型四环三萜皂苷的生物合成途径已有初步的认识,一般可划分为 3 个阶段:(1) 异戊烯基焦磷酸(isopentenylallyl diphosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMPP)的合成;(2) IPP 和 DMPP 被异戊烯基转移酶和萜类环化酶催化合成 2,3-氧化鲨烯(2,3-oxidosqualene);(3) 2,3-氧化鲨烯依次经过环化、羟基化、糖基化修饰,最终形成 PNS<sup>[6]</sup>。

## 2 PNS 生物合成的关键酶

PNS 生物合成途径包含了 209 步连续的酶促反

应,其可能的关键酶有 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGR)、法呢基焦磷酸合成酶(farnesyl pyrophosphate synthase, FPS)、鲨烯合成酶(squalene synthase, SS)、鲨烯氧化酶(squalene epoxidase, SE)、达玛烯二醇合成酶(dammarenediol synthase, DS)、P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases, CYP450)和糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)。另外,催化 2,3-氧化鲨烯转变为植物甾醇的关键酶——环阿屯醇合成酶(cycloartenol synthase, CAS)的活性也间接影响 PNS 的合成,因为植物甾醇与达玛烷型三萜皂苷共享前体物质 2,3-氧化鲨烯<sup>[7]</sup>。图 1 中所示的生物合成途径从鲨烯开始专属于 PNS 和植物甾醇的合成途径,开展鲨烯合酶及其后续代谢途径关键酶的基因克隆和调控研究,对 PNS 的合成及其相关基因功能的研究有直接而重要的意义<sup>[8]</sup>。因此,本文主要针对 FPS、SS、SE、DS、CAS 等与 PNS 碳骨架形成和修饰过程直接相关的酶进行介绍。



图中虚线表示多步酶促反应; ACAT-乙酰辅酶 A 酰基转移酶 DXPS-1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 HMGS-3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 DXR-1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 HMGR-HMG-CoA 还原酶 CMS-4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇合酶 GPPS-牻牛儿基焦磷酸合酶 CYP450-P450 单加氧酶

Dotted lines indicate several enzyme reactions; ACAT-acetyl-CoA acyltransferase DXPS-1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase HMGS-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase DXR-1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase HMGR-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase CMS-4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase GPPS-geranylpyrophosphate synthase CYP450-P450 monooxygenase

图 1 PNS 的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of PNS

## 2.1 FPS

FPS 是一种异戊烯基转移酶, 是类异戊二烯途径的 1 个关键酶。它催化 5 碳原子的 IPP 和 DMPP 以 1~4 头尾连续缩合反应, 形成 15 碳的法呢基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP)。FPP 是植物体内许多萜类物质合成的前体, 是 1 个同型亚基二聚体。典型的 FPS 有 2 个富含天冬氨酸的模式, 每个亚基均有底物丙烯基焦磷酸 (allyl pyrophosphate, APP) 及 IPP 结合位点。FPS 是基因家族编码的产物, 在植物中可提供对环境变化或抗食草动物、病原体袭击的差异调节。Lan 等<sup>[9]</sup>报道了姜花 1 个新的 FPS 全长 cDNA 序列 1 068 bp, 开放阅读框编码 356 个氨基酸, 相对分子质量为  $4.07 \times 10^4$  的蛋白质。对姜花 *Hedychium coronarium* Koen. 中 HcFPS mRNA 和相应的挥发性倍半萜量进行组织特异性和发育分析发现, HcFPS 可能调节花的挥发性倍半萜的合成。FPS 衍生的挥发性萜类的释放与植物叶的机械损伤和姜弄蝶损伤所诱导的 FPS 强表达有关, 这表明 HcFPS 在姜花营养器官中有重要的功能。

对 FPS 基因在植物中的表达模式的研究中发现, 该基因具有组织表达特异性, 而且也伴随着类异戊二烯衍生物量的增加。Cunjllera 等<sup>[10]</sup>克隆了拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. FPS cDNA, 分析表明拟南芥 FPS1 和 FPS2 基因在幼苗、根、茎、叶和花中都表达。其中, FPS1 mRNA 在根和花序中表达水平最高, 而 FPS2 mRNA 则以较低水平表达, 但优先在花序中累积。目前已从三七、罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang、积雪草 *Centella asiatica* (Linn.) Urban、青蒿 *Artemisia carvifolia* Buch. -Ham. ex Roxb. 等 40 多种植物中分离并克隆了 FPS 的 cDNA 序列。

周秘等<sup>[11]</sup>利用 RT-PCR 技术, 对刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms FPS 基因在不同产地、不同器官、不同发育时期及茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理后的表达情况进行了分析。结果表明, FPS 在不同产地、时期、器官及 MeJA 处理后的刺五加中均有表达, 但表达水平存在显著差异, 且 FPS 的相对表达量与刺五加叶器官的皂苷量存在显著的正相关关系。Guo 等<sup>[12]</sup>报道了 1 个潜在药用植物虎眼万年青 *Ornithogalum caudate* Jacq. 的 FPS 全长 cDNA 序列, 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中成功表达可溶性的 OsaFPS, 经 SDS-PAGE 得到

验证。近年来, 进行了大量的有关 FPS 基因过表达的研究。Kim 等<sup>[13]</sup>为了明确 FPS 在三萜皂苷生物合成中的功能, 构建了调节 FPS 表达的基因并转化入人参毛状根中。相对于野生对照株, 转基因株表现出更高的 PgFPS 表达水平, 转化株 F11 和 F20 的 PgFPS 转录水平比对照株高 11.1 倍。转化株 F17 人参总皂苷量最高 (36.42 mg/g), 比对照株高 2.4 倍。人参代谢工程已成功实现经毛根农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导的转化, 通过将 PgFPS 基因导入人参的毛状根中, 使植物甾醇和人参皂苷的积累量明显增加, 说明 PgFPS 在人参的三萜生物合成中起重要作用。

吴耀生<sup>[14]</sup>采用同源分析设计引物进行 RT-PCR 扩增, 得到三七 FPS 的 cDNA 全长为 1 409 bp, GenBank 登录号为 DQ059550。根据三七 FPS cDNA 推测的蛋白质读码框架为 130~1 161 bp, 编码 343 个氨基酸。比对分析及构建的系统进化树表明, 三七与人参、积雪草的 FPS 序列一致性分别为 99% 和 95%, 其三萜物质结构也相似。同时, 还构建了三七 FPS 的原核表达载体 pET32a (+)-FPS, 并成功转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。蛋白电泳分析表明, 转化的阳性菌能在适当的条件下表达重组蛋白。pET32a (+)-FPS 受到异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导时, 表达的重组蛋白随着 IPTG 浓度的增大而增加。其相对分子质量为  $4 \times 10^4$  左右, 与预期相符。陈莉等<sup>[15]</sup>用 RACE 技术从三七中克隆出 FPS 基因, 蒋东等<sup>[16]</sup>参照罗汉果 FPS 基因, 扩增了绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino FPS 基因的 3'RACE 引物, 并采用 3'RACE 和 5'RACE 法克隆了绞股蓝 FPS 基因全长 cDNA。

## 2.2 SS

SS 是一种结合在内质网上的膜结合酶, 它催化 2 分子 FPP 结合形成鲨烯, 由鲨烯继续生成三萜化合物和植物甾醇。SS 在催化 2 分子 FPP 形成鲨烯的过程中需要还原型辅酶 II (NADPH) 作为氢供体, 同时具有 2 价金属离子依赖性。Liu 等<sup>[17]</sup>研究显示, 人源 SS 及其突变体和几种底物类似物与  $Mg^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  的中间体结合形成复合物。在 SS 活性位点存在于还原型 NADPH 结合的关键性残基。基于突变数据和在 hSS-(F288L)-PSPP 复合物中观察到的局部封闭结构 (JK 环路), 提出了 SS 的 NADPH 结合模型, 确定了 4 个参与 1'-1' 类异戊二烯生物合成途

径有序连续机制的主要步骤:底物结合、缩合、中间形成和转运。Ye 等<sup>[18]</sup>得到盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright SS 基因全长 cDNA 序列,并成功将羧基端去除 24 个氨基酸的 DzSS 在大肠杆菌中表达,然后将细菌粗提物和 FPP 及 NADPH 共体系反应,用 GC-MS 在此体外反应混合物中检测到鲨烯。同时用 RT-PCR 分析表明,DzSS 在不同器官和不同时期的表达有显著性差异,这可能与 SS 的功能有关。

目前认为 SS 是三萜类化合物和植物甾醇生物合成的关键酶。编码 SS 的基因已从多种植物中克隆和鉴定,包括三七、人参、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu、绿玉树 *Euphorbia tirucalli* Linn. 等。随着近年来更多植物的 SS 基因被克隆,发现许多植物存在 SS 的多态性。马艺沔等<sup>[19]</sup>通过 RT-PCR 法得到 2 个丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge SS 基因,它们编码的多肽具有鲨烯合酶相关结构域和保守基序。这 2 个基因具有不同的外显子/内含子结构特征,以及不同的组织特异性表达模式和时间表达模式,可能在丹参甾体类和三萜类化合物生物合成中起不同作用。邢朝斌等<sup>[20]</sup>以 actin 为内参基因,利用 RT-PCR 技术,分析刺五加不同发育时期、不同器官及 NeJA 处理对 SS1、SS2 基因表达及皂苷量的影响,结果表明刺五加 SS 基因家族 SS1、SS2 在整个生长期和各器官中均有表达,且表达量差异显著 ( $P < 0.05$ )。刺五加 SS1 的表达量与皂苷量间的相关性小,SS2 的表达量与皂苷量呈显著的正相关关系 ( $P < 0.01$ )。SS2 是刺五加中三萜皂苷生物合成中的关键酶,其表达量的高低决定了皂苷量的高低。刘颖等<sup>[21-22]</sup>分析了 4 个存在明显差异的 SS 序列的单核苷酸多态性 (SNPs)、插入与缺失多态性 (InDel) 和选择性剪接多态性 (AS),并通过体外酶促反应研究其编码酶催化效率。同时根据甘草鲨烯合酶 1 基因多态性及其与  $\beta$ -香树脂醇合成酶共表达对  $\beta$ -香树脂醇积累的影响,提出甘草 SS 基因丰富的多态性,其编码酶催化效率差异显著,可能是优质甘草形成的分子基础。

吴耀生等<sup>[23]</sup>利用 RT-PCR 技术成功从三七中获得 SS cDNA,全长 1 270 bp,编码 415 个氨基酸。GenBank 登录号为 DQ18663。同源性分析发现,三七 SS 氨基酸序列与人参、青蒿、拟南芥和水稻 *Oryza sativa* Desv. 的 SS 氨基酸序列一致性分别为 98%、

81%、78%和 71%。

石磊<sup>[24]</sup>通过农杆菌介导法将构建好的 pCambia2300S-SS 植物表达载体转入三七子叶愈伤细胞,利用基因组 PCR 法初步检测含卡那霉素抗性转基因的三七细胞,然后通过荧光定量 PCR 对基因组 PCR 阳性细胞进行转录水平的表达分析,最后以阳性细胞为材料,检测 PNS 和单体皂苷的量。分析三七转基因细胞株中转录水平、单体皂苷和 PNS 量可知,转基因细胞株中 SS 转录水平均有所增加,单体皂苷、PNS 的量大部分有所提高,初步表明 SS 转录水平的提高有利于皂苷量的积累,说明 SS 在三七皂苷生物合成中起着重要的调控作用。SS 在三七中超表达能够明显提高三萜类物质的量。孙颖等<sup>[25]</sup>成功构建了 SS 植物超表达载体,利用农杆菌介导法将超表达载体转移并整合到三七愈伤组织中,实现 SS 基因的超表达,初步表明 SS 转录水平的提高有利于皂苷量的积累,明确了 SS 基因在三七皂苷生物合成途径中的调节功能。

SS 既是三萜和甾醇分支代谢流中的第 1 个酶,也是第 1 个关键酶,对植物甾醇和三萜生物合成均起着重要调控作用。

### 2.3 SE

SE 是一种单加氧酶,催化鲨烯合成 2,3-氧化鲨烯,是三萜皂苷和植物甾醇生物合成途径中的关键酶之一。鲨烯在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen 中作为第 1 前体专用于麦角甾醇 (provitamin) 的生物合成。Garaiová 等<sup>[26]</sup>报道,不管是用特比萘芬引起编码 SE 的 ERG1 基因的定点突变,使 SE 活性降低,还是使用 SE 抑制剂均会造成鲨烯的积累。但是前者不会影响酿酒酵母的生长,后者会造成明显的酿酒酵母生长缺陷,证明 SE 与鲨烯的转化有关。Han 等<sup>[27]</sup>通过对人参三萜皂苷和甾醇生物合成中的 2 个 SE 基因 (PgSE1 和 PgSE2) 进行研究,发现二者在不同部位的表达以及受到 MeJA 诱导下的表达均不相同。PgSE1 RNA 干扰 (RNAi) 完全抑制 PgSE1 的转录,伴随着人参皂苷的量减少;用 RNAi 沉默 PgSE1 可使人参根中 PgSE2 和 CAS 明显上调,导致甾醇大量积累。李宝财等<sup>[28]</sup>用 RT-PCR 技术对刺五加 SE 基因的表达进行了分析,探讨了其与刺五加皂苷量的关系。结果显示不同产地、器官及发育时期的刺五加 SE 表达量差异显著,且 SE 的表达与刺五加皂苷的量存在显著的正相关关系 ( $P < 0.05$ )。

牛云云等<sup>[29]</sup>从三七中获得2种类型的SE编码基因PnSE1、PnSE2, PnSE1与PnSE2基因预测编码蛋白分别包含537和545个氨基酸, 序列相似性为79%, 但N端(前70个氨基酸)序列不保守。对PnSE1、PnSE2进行生物信息学分析, 并通过RT-PCR方法检测其在4年生三七不同组织部位的表达模式, 以及受MeJA诱导处理后基因的表达量变化, PnSE1基因在根、茎、叶、花中均有表达, 以花中表达丰度最高; PnSE2基因只在花中表达量显著, 其余组织较弱。MeJA诱导24 h后PnSE1基因在叶中的表达量最大; 相同诱导条件下, PnSE2基因未响应诱导, 表达水平无显著变化。结果表明, PnSE1和PnSE2基因具有不同的表达模式, 在三七次生代谢产物合成中起不同的催化作用, 推测PnSE1基因参与三萜皂苷生物合成, PnSE2基因则在甾醇合成途径中起催化作用。该推测与蒺藜苜蓿*Medicago truncatula* Gaertn.、人参中2种SE同源基因表达模式相似。

已经在多个物种中对SE进行了克隆与鉴定。李坤<sup>[30]</sup>采用改进的异硫氰酸胍一步法提取三七根总RNA, 通过RT-PCR法从三七根组织总RNA中扩增出SE基因的cDNA序列, cDNA序列长1 648 bp, 开放阅读框共编码537个氨基酸残基。序列分析表明: 三七SE氨基酸序列与人参、毛曼陀罗*Datura innoxia* Miller、亚洲栽培稻、刺番茄*Solanum lycopersicum* Swartz、拟南芥和甘蓝型油菜*Brassica napus* Linn. 的同源性分别为97%、76%、73%、71%、70%和45%; 核酸序列的同源性分别为97%、63%、62%、62%、60%和48%; GenBank序列号为DQ457054。并成功构建表达载体pET30a(+)-SE, 测序结果显示其读码框架正确。该重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)plys感受态细胞并经IPTG诱导首次表达出SE的融合蛋白质——His6-SE(N端带6个His的SE)。SDS-PAGE结果显示, 诱导的工程菌能明显表达出相对分子质量约为 $6.4 \times 10^4$ (包括质粒本身表达的约 $5.0 \times 10^3$ 的氨基酸)的蛋白质, 与His6-SE的理论相对分子质量基本相符, 说明成功地扩增了三七SE基因, 表达出三七SE融合蛋白质。和凤美<sup>[31]</sup>对三七SE cDNA序列进行的生物信息学分析表明, 三七SE是一个膜蛋白, 可从胞质溶胶中分泌出来。RT-PCR实验结果证明, 三七SE在三七不同组织中存在差异表达, 在根中的表达水平高于茎和叶, 而茎中又高于叶, 3年生根

中的表达又高于1年生根中的表达。这些结果说明, 三七SE基因的表达可能是组织特异性的。以上研究结果可为阐明三七皂苷生物合成途径和其药理学活性奠定基础。

## 2.4 DS

DS是氧化鲨烯环化酶(squalene-2,3-oxidecycloartenolcyclase, OSCs)中的一种, 催化2,3-氧化鲨烯环化为达玛烯二醇。PNS属于达玛烷型四环三萜皂苷, 而达玛烯二醇是达玛烷型皂苷的前体, 所以DS在三萜皂苷合成中起着重要的调节作用。近年来开发了很多DS体外表达生产达玛烯二醇的模型, 并且逐渐从原核细胞表达体系发展到真核植物细胞表达体系。

Liang等<sup>[32]</sup>成功实现了DS基因在工程酿酒酵母菌中的异源表达, 并用硅胶色谱法和HPLC在发酵液中检测到达玛烯二醇。同时还探索了重组酿酒酵母工程菌在不同培养条件(有氧和厌氧)下达玛烯二醇的积累水平。Hu等<sup>[33]</sup>通过特异性引物从5年生人参根cDNA噬菌体文库中筛选出DS基因, 构建了重组表达载体——重组质粒PET-30A-DS, 表达于罗塞塔大肠埃希氏菌。重组的DS蛋白经亲和色谱纯化并通过SDS-PAGE被检测到, 而产物中的达玛烯二醇也通过LC-MS被检测到。研究显示, 重组的DS蛋白可以提高达玛烯二醇的产量, 同时也说明DS的表达在人参皂苷的生物合成中发挥了重要作用。Wang等<sup>[34]</sup>克隆了西洋参*Panax quinquefolius* Linn.的DS基因PqDS, 并实现了在酵母菌中的异源表达, 用液相色谱-大气压化学电离质谱(LC/APCI-MS)在菌液中检测到达玛烯二醇。此外, 在PqDS过表达的转基因毛状根中, PqDS转录增加的同时也伴随着另一P450基因PqD12H(编码西洋参原人参二醇合酶)的增加。用LC/APCI-MS在PqDS和PqD12H基因共表达的重组酵母培养混合物中检测到原人参二醇(protopanaxadiol), 揭示了三萜皂苷生物合成途径中各酶间的相关性, 同时也预示着三萜皂苷体外合成的可行性。Han等<sup>[35]</sup>建立了通过转基因烟草悬浮细胞培养来生产达玛烯二醇的方法, 转基因的PgDS来自于人参并置于农杆菌介导转化的35S启动子控制下。转基因烟草植株中达玛烯二醇的积累存在器官特异性, 并导致植物甾醇量的降低。此外, 达玛烯二醇可能在植物中充当防御物质, 特别是防御烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV),

这可能与 DS 与葡萄糖醛酸糖苷酶 (glucuronidase, GUS) 的共表达有关<sup>[36]</sup>。

目前已从三七、人参、积雪草、粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Naka 等植物中克隆得到编码 DS 的基因。Luo 等<sup>[37]</sup>以 454GS FLX Titanium 高通量测序技术 (454 GS FLX Titanium system) 对 4 年生三七根的 cDNA 文库进行了 1/4 个 run 的测序, 产生了平均长度为 410 bp 的 188 185 个序列。这些序列用 454 GS De Novo 汇编软件初步分析和收集, 产生了 30 852 个独立基因 (unique sequences)。用基本局部对比搜索工具 (BLAST) 对独特序列与公共序列数据库进行了相似性搜索, 总数的 70.2% 得到注释。京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 任务显示, 41 个独特序列代表在 454-EST 数据库中的 11 个三萜皂苷碳骨架生物合成基因。其中 DS 基因包含 1 018 个序列, GenBank 登录号为 GU997680。对其进行的同源性分析表明, 人参、西洋参和三七均编码 769 个氨基酸并具有高度相似性。在 DS 蛋白质水平上, 三七与人参和西洋参分别表现出 98.7% 和 99% 的同源性。石磊<sup>[24]</sup>对三七 DS 进行了序列分析, DS 全长 cDNA 序列长度为 2 500 bp, 包含一个 2 310 bp 的开放阅读框; 对 DS 进行的结构域功能分析显示, DS 蛋白序列的结构域与氧化鲨烯环化酶的结构域相似, 已知的氧化鲨烯环化酶催化 2,3-氧化鲨烯环化生成甾醇和三萜类的前体物质, 如人参中的角鲨烯经  $\beta$ -香树脂醇合成酶 ( $\beta$ -AS)、DS, 这与三七中的 DS 功能相符。

Han 等<sup>[38]</sup>利用 RNAi 技术使人参中的 DS 沉默, 导致人参皂苷的量减少了 84.5%。最近有研究报道, MeJA 可以上调植物中 DS 的表达, 从而提高细胞中三萜皂苷的量<sup>[39]</sup>。如用 MeJA 处理人参毛状根 7 d 后, 毛状根中原人参二醇和原人参三醇 (protopanaxatriol) 的量分别增加了 5.5~9.7 和 1.85~3.82 倍, 同时, 基因水平检测表明, 毛状根中的 SS、SE、DS 转录水平均显著提高。说明 DS 在三萜皂苷生物合成途径中扮演重要的角色, 是三萜皂苷生物合成的关键调控点。

## 2.5 CAS

CAS 属于 OSCs 的一种, 催化 2,3-氧化鲨烯环化生成环阿屯醇。Basyuni 等<sup>[40]</sup>将从红海欖 *Rhizophora stylosa* Griff. 和秋茄 *Kandelia candel* (Linn.) Druce 中克隆得到的 CAS 基因转入羊毛甾醇合成酶基因缺陷型酿酒酵母突变菌株 GIL77 中, 突

变酿酒酵母细胞中有环阿屯醇积累, 说明 CAS 能催化 2,3-氧化鲨烯环化生成环阿屯醇。

CAS 蛋白处于皂苷合成的分支处, 不同的 OSCs 蛋白参与不同种类的皂苷合成。若其中一种分支酶出现缺陷, 则可能导致 2,3-氧化鲨烯的积累及各下游产物比例发生变化<sup>[41]</sup>。Dhar 等<sup>[42]</sup>克隆得到了催眠睡茄 *Withania somnifera* Linn. 3 个全长 OSCs 的 cDNA 序列, 包括  $\beta$ -香树脂素合成酶 (WsOSC/BS)、羽扇豆醇合酶 (WsOSC/LS) 和 CAS (WsOSC/CS), 并通过 LC-MS 和动力学研究证实了各自在粟酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyce spombe* 中异源表达的功能; 并通过观察 3 种 OSCs 在不同诱导下的 mRNA 和蛋白水平, 证明在 1 条支流的 OSC 的转录水平发生变化会引起其他支流的相应变化。另外, OSCs 参与合成的各类皂苷是生物膜的重要组成部分, 且可能承担了重要的生物学功能。有研究表明, 植物 CAS 与植物中叶绿体类囊体膜形成及内质网膜各组分平衡有关, 而如果植物中基因发生变异, 导致 CAS 缺陷, 则可能使植物出现白化等现象, 在缺陷较为严重时可能会致死<sup>[43]</sup>。

CAS 与 DS 享有共同前体 2,3-氧化鲨烯, 从 2,3-氧化鲨烯开始, 出现了三萜类化合物代谢支流和植物甾醇支流。三萜类化合物代谢支流由 DS 催化 2,3-氧化鲨烯合成达玛烯二醇, 成为该支流的第一步反应; 植物甾醇支流由 CAS 催化 2,3-氧化鲨烯环化生成环阿屯醇, 目前认为 CAS 是该支流的第一关键酶<sup>[44]</sup>。吴耀生<sup>[14]</sup>对三七根 CAS 基因 cDNA 进行了克隆测序, 获得三七 CAS 基因, 全长 2 293 bp。翻译的起始密码位于第 9 碱基处, 终止密码位于第 2 285 碱基处, 开放阅读框架共编码 758 个氨基酸。三七 GenBank 登录号为 EU342419。比对分析表明, 三七根 CAS 与人参 CAS 氨基酸序列一致性为 90.1%。近年来, 有研究认为抑制植物中 CAS 表达能够提高三萜的积累量。孙颖等<sup>[45]</sup>利用 Gateway 技术建立了 CAS 基因的 RNAi 表达载体, 并利用农杆菌介导法转移并整合到三七基因组中, 由此方法抑制 CAS 基因的表达, 阻断植物甾醇的合成, 间接增加三七皂苷的量。何沐阳<sup>[46]</sup>利用 RNAi 技术, 通过 RT-PCR 扩增人参 CAS 基因的核心保守序列, 然后利用重组 PCR 方法构建含有发夹结构的 RNAi 植物表达载体。再利用发根农杆菌 A4 介导, 将含 CAS 核心保守序列的 RNAi 植物表达载体转入到人参细胞内, 最终得到 CAS 基因表达受到干扰的人参发根

系;并对 RNAi CAS 基因的表达效果以及 CAS 被干扰后人参发根内三萜物质量的变化进行了研究。结果显示,CAS 基因 RNAi 发根系的环阿屯醇量比对照组降低了 80.64%,而达玛烯二醇量有所增加;采用紫外分光光度法分析人参总皂苷的量和总植物甾醇的量,结果显示 CAS 基因 RNAi 发根系的植物甾醇量比对照平均降低 53.61%,而人参皂苷量有所增加;用高效液相色谱法分析检测人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> 的量,结果显示, CAS 基因 RNAi 发根系的人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> 量相对于对照组均有不同程度的升高。在拟南芥中通过对 CAS 等位基因突变体的特性研究发现, CAS 等位基因突变使得 CAS 表达量下降,并引起上游 HMRG 基因表达升高,从而促使三萜皂苷增加。表明 CAS 是植物甾醇合成的关键酶,也是调控三萜皂苷合成的重要调控点<sup>[47]</sup>。

## 2.6 细胞色素氧化酶

CYP450 是一类超基因家族编码的含有血红素的氧化酶类,分布于各种需氧生物体内,如植物、动物、真菌以及细菌等。在植物体内催化多种初生和次生代谢反应,参与萜类、生物碱类、脂肪酸、甾醇类、植物激素、信号分子、色素及植物抗毒素防御等合成与代谢反应<sup>[48-49]</sup>。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,CYP450 主要催化三萜骨架惰性甲基和亚甲基的氧化。鉴于植物 CYP450 催化反应的复杂性,关于其催化机制的研究较少。在植物体内,CYP450 在不同组织中的表达具有特异性,如在皂苷合成较多的根和花中的表达量明显高于其他组织。在三萜皂苷合成代谢途径中,SS、FPS 和 DS 等基因会响应 MeJA 诱导表达量上调,从而使下游 CYP450 的表达量也随之增加<sup>[50]</sup>。结合上述 2 种 CYP450 的表达特性不难看出,将植物特定组织进行 MeJA 诱导,筛选与上游基因 SS 及 DS 相似表达模式的 CYP450,是从 CYP450s 家族中筛选参与人参皂苷生物合成的 CYP450 的重要手段<sup>[51]</sup>。吴鹏等<sup>[52]</sup>利用 RT-PCR 分析了刺五加 CYP450 基因在不同产地、不同器官、不同发育时期及受到 MeLA 刺激下的表达规律,结果表明 CYP450 表达量差异极显著( $P<0.01$ ),且 CYP450 基因表达量与总皂苷量间存在极显著的正相关关系( $P<0.01$ )。近年来,五加科的三七、人参和西洋参都得到了参与三萜皂苷生物合成的候选 CYP450 全长基因序列。

Luo 等<sup>[37]</sup>对三七根进行了高通量测序,进而拼接、注释和扩增得到 15 个全长 CYP450。其中 Pn00158 转录本与西洋参候选 CYP450 contig00248 转录本具有极高的相似性,并且与已进行功能确证的人参 CYP716A47 的氨基酸序列同源性高达 97.95%;有 7 个 CYP450 属于 CYP71 家族,从系统进化关系角度分析 Pn02132 转录本与从大豆中鉴别的与皂苷元修饰有关的 CYP93E1 很近。由此推断 Pn00158 及 Pn02132 2 个转录本很可能是参与人参皂苷合成的候选 CYP450。这些 cDNA 序列的 GenBank 登录号为 GU997664~GU997678。

近年来利用新一代测序技术及生物信息学分析等方法,筛选出了参与人参皂苷生物合成的相关 CYP450,并对候选基因进行了生物功能验证,进一步阐明了人参皂苷生物合成途径<sup>[53]</sup>。Han 等<sup>[54]</sup>对 MeJA 诱导的人参不定根进行了转录组测序,通过拼接、注释及扩增得到 9 个候选 CYP450 全长基因。其中 CYP716A47 基因不仅可响应 MeJA 诱导的表达量上调,而且转入过量表达 SS 基因的转基因人参植株后能使人参根中皂苷的产量提高。将 CYP716A47 基因转入酿酒酵母后表达的重组蛋白能催化达玛烯二醇的 C-12 位羟基化使其转化为原人参二醇。将 DS 与 CYP716A47 同时转入酿酒酵母,重组菌株中检测到了原人参二醇的产生。该报道首次对参与人参皂苷合成的 CYP450 进行了功能确证。Chen 等<sup>[55]</sup>应用高通量 454GS FLX 测序技术进行了人参、西洋参和三七转录组研究,在大量的转录组数据中挖掘 CYP450,为进一步筛选参与人参皂苷合成的 CYP450 提供了重要依据。Sun 等<sup>[50]</sup>对西洋参根进行了高通量测序,通过拼接、注释得到 150 个 CYP450。选取其中转录水平最高的 27 个 CYP450 进行 MeJA 诱导实验,在根、茎、叶和花组织中仅 contig00248 转录本与 DS 表达模式一致。转录本 contig00248 在系统进化中与拟南芥 CYP88 家族较近。Han 等<sup>[56]</sup>从 MeJA 诱导的人参不定根 EST 文库中克隆到 CYP716A53v2,将其转入酿酒酵母后表达的重组蛋白能催化原人参二醇的 C-6 位羟基化,使其转化为原人参三醇。上述关于五加科三萜皂苷相关 CYP450 的研究进展,大大推进了三萜皂苷生物合成途径的研究,也为通过合成生物学技术生产三萜皂苷的探索提供了重要的元器件。

## 2.7 葡萄糖基转移酶(GT)

皂苷由皂苷元与糖构成,根据苷元不同,可以

分为甾体类皂苷和三萜类皂苷。PNS 主要为三萜类皂苷, 包括人皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Re 等 60 余种。皂苷在生物体内合成的最后一步反应中, 皂苷元被 GT 催化, 将糖基转移到皂苷元上, 最终形成皂苷, 因此 GT 是三七皂苷、人参皂苷等天然皂苷合成的关键酶<sup>[41,57-58]</sup>。另外, 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 通过与植物激素的相互作用参与植物应激反应。Tognetti 等<sup>[59]</sup>研究表明, 拟南芥中过氧化氢响应的 UGT74E2 通过影响植物激素吲哚丁酸 (IBA) 的活性参与植物结构和水胁迫应答的调控。Dong 等<sup>[60]</sup>最近的研究提出, 脱落酸 (ABA) 的 UGT71B6 及其 2 个同系物通过参与 ABA 的结合途径, 在 ABA 的稳态和应答各种非生物胁迫中起到至关重要的作用。此外, UGT 还参与多种植物的防御反应<sup>[61-62]</sup>。

目前, 植物中 GT 在三萜类皂苷合成过程中的作用得到了广泛研究, 多种植物如罗汉果<sup>[63]</sup>等克隆得了葡萄糖基转移酶基因的全长序列并实现了原核表达。向丽等<sup>[64]</sup>通过分析三七转录组数据, 发现 3 个 GT 转录本和与蒺藜苜蓿中的三萜糖基转移酶 UGT73K1 和 UGT71G1 的亲缘关系较近, 推测其可能在三七皂苷最后一步合成中起催化作用, 并对其 1 条转录本 (Pn02086) 进行了基因全长克隆, 得到 1 条开放阅读框为 1 488 bp 的 cDNA 序列, 命名为 PnUGT1。该基因编码 495 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为  $5.545 \times 10^4$ , 属于不稳定蛋白。该蛋白不具有信号肽和跨膜区, 最有可能定位在细胞质中。序列比对和进化关系分析表明, 该蛋白和蒺藜苜蓿三萜合成相关的 UGT AAW56092 的亲缘关系较近, PSPG 保守区域的相似性为 66%。该基因在三七叶中表达量较在花、茎和根中的表达量高, 推测 PnUGT1 基因可能属于三七 GT 家族。

Luo 等<sup>[37]</sup>对三七根进行了高通量测序, 进而拼接、注释和扩增得到 8 个 UGT 全长序列。GenBank 登录号为 GU997656-GU997663。3 种 UGT 包括 Pn00082、Pn02086 和 Pn13895 与蒺藜苜蓿 2 个三萜糖基转移酶 UGT73K1 和 UGT71G1 一致, 其中由于 Pn13895 与 UGT71G1 较近的亲缘关系被当作最有可能参与三萜皂苷生物合成过程的候选 UGT。郭淑<sup>[65]</sup>通过分析上述已获得的三七转录组数据, 利用 RT-PCR 方法克隆得到三七 PnUGT02086 和 PnUGT13895 基因的全长 cDNA 序列, 并对这些基

因所编码的蛋白进行了理化性质、蛋白二级结构及三维结构预测分析。Pn00082 未能成功克隆, 可能是假基因。将 PnUGT02086 和 PnUGT13895 基因通过酶切连接到 pET28a 载体并转化表达菌株 BL21, 成功表达并纯化到了 PnUGT02086 和 PnUGT13895 蛋白, 为进一步验证其功能奠定了基础。

邢朝斌等<sup>[66]</sup>利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 从刺五加中分离出全长为 1 959 bp 的 UGT 基因 cDNA 序列, 该基因开放阅读框为 1 827 bp, 编码 1 个含 608 个氨基酸的蛋白质。生物信息学分析结果显示, 该蛋白包含 UGT 家族的标志性序列, 不存在跨膜区域, 定位于细胞质中, 属于参与植物次生代谢的 UGT-B 型。修乐山等<sup>[67]</sup>以 GAPDH 基因为内参基因, 采用 RT-PCR 技术分析不同产地、器官、时期和 MeJA 对刺五加 UGT 基因表达的影响, MeJA 处理可显著提高 UGT 基因的表达量 ( $P < 0.05$ )。不同产地、器官和时期的刺五加的 UGT 基因表达量和总皂苷量差异显著, 但 UGT 基因的表达量与总皂苷量同升同降, 存在极显著的正相关关系 ( $P < 0.01$ )。初步判定, UGT 基因的表达量决定了刺五加中总皂苷的量, UGT 是决定刺五加中总皂苷量的关键酶。上述研究表明 UGT 是三萜皂苷碳骨架生物合成途径最后的关键酶。

## 2.8 PNS 生物合成的关键酶分析

随着对 PNS 生物合成相关关键酶的深入研究, SS、SE、CYP450 等酶在不同器官、不同时期和受到 MeJA 刺激下的表达量均存在明显差异, 这些酶的组织特异性可能是不同器官的总皂苷量不同的分子基础。另外 SS、SE、GT 等酶的基因多态性可能是优质三七形成的分子基础。Niu 等<sup>[68]</sup>克隆了参与三萜皂苷生物合成的 PnFPS、PnSS、PnSE1、PnSE2 和 PnDS, 并分析了相应蛋白的保守结构域和种系遗传学; 用 RT-PCR 检测 4 年生三七不同器官和受到 MeJA 刺激后各基因的表达量, 分析了其组织和器官特异性和表达模式; 对达玛烷型三七皂苷生物合成的表达模式进行了全面分析, 并为进一步阐明其分子机制和开发下游基因提供基础。

李珍等<sup>[69]</sup>研究发现丹参 CAS 基因 SmCAS 的表达受低温和干旱等环境因素显著影响。Nasrollahi 等<sup>[70]</sup>研究显示甘草 SS 和 bAS 不管是在幼苗期还是成年植株在干旱胁迫条件下基因表达水平均上调, 并表明在干旱胁迫条件下参与三萜皂苷生物合成的关键酶的表达上调, 并直接提高包括甘草酸在内的

次生代谢产物产量。上述研究表明,三萜皂苷生物合成的关键酶受到环境因素的调控。

### 3 PNS 生物合成过程关键酶的相关调控

目前,对 PNS 生物合成过程中关键酶的相关调控研究还不够充分,对三七和同源或异源植物三萜皂苷合成途径中存在的调控进行分析,可推测 PNS 生物合成的相关调控因子。目前研究最深入的是转录水平的调控,相关转录因子(transcription factor, TF)陆续被发现,而调控因子是指能够特异性地结合在基因序列上的蛋白质,在植物应对发育程序和环境改变时调控基因的表达中发挥重要作用。

有研究报道西洋参中的皂苷合成途径是受 MeJA 诱导的<sup>[71]</sup>。西洋参 PqWRKY1 基因在 MeJA 处理 3 h 后表达量升到最高,然后开始下降,这与参与皂苷合成的基因如达玛烷合成酶基因的诱导表达是一致的。PqWRKY1 基因定位于细胞核,具有转录激活活性,是具有生物学活性的转录因子基因。有研究表明通过异源转化的方式可以鉴定非模式植物中 WRKY 类转录因子基因的功能。孙永珍<sup>[72]</sup>研究表明,用 PqWRKY1 基因转化拟南芥,通过转化株系的基因表达、转化幼苗的抗逆性等来鉴定 PqWRKY1 基因在西洋参中的生物学功能。实验结果表明,转基因株系中三萜合成相关基因 HMGR、FPS2、SS1 和 SE2 的表达量均比对照转化株系的表达量高,这在其他 WRKY 转化研究中未见报道。对 AtHMGR、AtFPS2、AtSQS1 和 AtSQE2 的启动子区分析结果表明,这些基因的启动子区均存在可以和 WRKY 基因相结合的 W-box。推测 PqWRKY1 基因可能直接或间接地结合三萜皂苷合成基因的启动子区,进而调控三萜皂苷合成基因的表达,这是西洋参中克隆和鉴定的第 1 个可能参与三萜皂苷合成调节的转录因子基因。

李娜等<sup>[73]</sup>采用 SEFA-PCR 方法,以总 DNA 为模板,克隆了灵芝 SS 基因的启动子序列,长 1 042 bp。序列分析发现灵芝鲨烯合酶基因启动子中没有明显的 TATA 和 CAAT 框,但是含有 CCAA T-binding factor、GATA-1、GC-box、TFIID 等重要的转录因子的结合位点。

Razdan 等<sup>[74]</sup>克隆和鉴定了催眠睡茄中 1 个 SE 的全长 cDNA 序列,并成功将 WsSE 克隆到 pGEX4T-2 载体中,并在大肠杆菌中表达。利用基因组位移法分离得到 1 个 513 bp 的 WsSE 启动子序列,用 PLANT CARE 和 PLACE 站点分析工具从

WsSE 启动子中破译了几个与植物生物和非生物应激反应有关的关键顺式调控元件。与翻译起始精确度相关的 TATA-box 定位在 96 (-);与组织特异性启动子活性相关的 CAATBOX 定位于 226 (-)、299 (-)、497 (-)、144 (-)、511 (-)、149 (-);钙响应顺式元件 ABRERATCAL 定位于 240 (+);与基于 erd1 表达的黄化现象相关的 ACGTATERD 定位于 469 (+);保守序列 AMYBOX1 和转录因子 ARR1AT、ARR1、BIHD1OS 结合位点 OsBIHD1、CATA 等都得到鉴别;还在启动子区域找到了与重要植物激素诱导调控相关的 ABREOSRAB21 469 (+)、ARFAT 327 (+)、ASF1MOTIFCAMV 228 (+)、348 (-)、WRKY71OS 228 (+),表明转录活性区域与植物激素有关。Dhar 等<sup>[42]</sup>克隆得到了催眠睡茄的 3 个全长 OSC 的 cDNA 序列,其中包括 CAS 序列,并用基因组步移法分离得到 3 个 OSC 的启动子,其中 CAS 的启动子长 475 bp。通过用 In silico 工具分析启动子的 PLACE 和 PlantCare 数据库,从 WsOSCs 启动子中鉴别得到包括 TATA box 和一些参与基因调控的重要顺式作用元件,这些顺式作用元件与光响应、激素响应及多种应激反应有关。其中 bZIP、GARE 和 Box-W1 3 类调控元件被用来研究它们在诱导下对启动子诱导或抑制的调控。

Luo 等<sup>[37]</sup>以 Inter-Pro 自动预测的研究为基础,得到了代表分属于各个不同 TF 家族的公认同源序列的 906 个三七独特序列,包括 ARF、AUX/IAA、B3、MYB、碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)、bZIP、Homeobox、Homeodomain-like/related、Pathogenesis-related/ERF、WRKY 和锌指环家族蛋白。MYB、bZIP 和 WRKY 转录因子的许多成员蛋白与应激反应的调节有关。454-EST 数据库中三七最丰富的 TF 家族是以 DNA 结合域为特点的 MYB 家族蛋白,在拟南芥中,包含 163 个基因的 MYB 家族也是最大的 TF 家族<sup>[75]</sup>。同源异型框蛋白是三七中另一种高表达的 TF,同源框基因调节植物发育的多个方面,比如调控器官发生<sup>[76]</sup>。三七中高表达的 MYB 和同源异型框蛋白可能与响应特定的生境和/或发育调控有关。由于 TF 在植物中的功能多种多样,三七中可能参与环境应答和发育调控的 TF 的生物学功能会在未来的研究中得到鉴别。

### 4 结语和展望

虽然与 PNS 合成相关的酶基因的克隆已经取得了一些进展,但随着对更多酶和在分子水平上调控

的研究深入,认识到 PNS 生物合成调控,尤其是三萜皂苷碳骨架形成以后的后修饰过程的复杂性。最近的一些研究显示,从三七中得到了与人参  $\beta$ -AS 匹配的 2 个单序列,看似与以前报道的三七中不存在齐墩果烷型皂苷相抵触,这可能与齐墩果烷型皂苷在三七中的量太低不能够被检测到,或者由于不存在齐墩果烷型皂苷生物合成的  $\beta$ -AS 下游基因所致。

由于 PNS 种类较多且合成途径长而复杂,这使得控制 PNS 代谢流的遗传操作还存在一定困难。因此,未来的研究方向应该是进一步补充和完善 PNS 生物合成途径及其网络,开展更多关键酶及其基因的分离、克隆和表达特征的分析;明确相关酶基因表达的组织和发育的调控机制及对基因时空调控作用的各种顺式和反式作用因子,以实现代谢途径中调控因子的合理应用和基因的协同转化;分离具有时空特异性表达功能的启动子,实现目的成分在特定组织和细胞中的定向和高效表达;通过基因工程技术实现目的化合物的工业化高效生产,可以有效缓解目前以 PNS 为主要成分的药用植物资源不足的现状,也为今后实现大规模生产 PNS 奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 夏鹏国,张顺仓,梁宗锁,等.三七化学成分的研究历程和概况[J].中草药,2014,45(17):2564-2570.
- [2] 李冠烈.三七的现代研究与进展(二)[J].世界中西医结合杂志,2008,3(11):618-623.
- [3] 时圣明,袁永兵,陈常青,等.HPLC法在三七及其制剂现代药学研究中的应用[J].药物评价研究,2010,33(6):472-475.
- [4] NG T B. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*) [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(8): 1007-1019.
- [5] 冯陆冰,潘西芬,孙泽玲.三七的药理作用研究进展[J].中国药师,2008,11(10):1185-1187.
- [6] 王莉,史玲玲,张艳霞,等.植物次生代谢研究进展[J].武汉植物学研究,2007,25(5):500-508.
- [7] 吴琼,周应群,孙超,等.人参皂苷生物合成和次生代谢工程[J].中国生物工程杂志,2009,29(10):102-108.
- [8] 石磊,葛峰,刘迪秋,等.三七总皂苷生物合成与关键酶调控的研究进展[J].西北植物学报,2010,30(11):2358-2364.
- [9] Lan J B, Yu R C, Yu Y Y, *et al*. Molecular cloning and expression of *hedychium coronarium* farnesyl pyrophosphate synthase gene and its possible involvement in the biosynthesis of floral and wounding/herbivory induced leaf volatile sesquiterpenoids [J]. *Gene*, 2013, 518(2): 360-367.
- [10] Cunjillera N, Arr Ó M, Delourme D, *et al*. Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(13): 7774-7780.
- [11] 周秘,柴丽花,修乐山,等.刺五加法呢基焦磷酸合酶基因的表达式及其与皂苷含量的相关性分析[J].河南农业科学,2013,42(12):106-109.
- [12] Guo L, Kong J Q. CDNA cloning and expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase from *Ornithogalum saundersiae* [J]. *Z Naturforsch C*, 2014, 69(5/6): 259-270.
- [13] Kim Y K, Kim Y B, Uddin M R, *et al*. Enhanced triterpene accumulation in *Panax ginseng* hairy roots overexpressing mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase and farnesyl pyrophosphate synthase [J]. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(10): 773-779.
- [14] 吴耀生.药用植物三七三萜合成途径功能酶特征与植物三萜合成通路分子进化[D].南宁:广西医科大学,2008.
- [15] 陈莉,蓝秀万,李坤,等.三七法呢基焦磷酸合酶的基因克隆及序列分析[J].中草药,2006,37(7):1080-1083.
- [16] 蒋东,唐银琳,陶晨陈,等.绞股蓝法呢基焦磷酸合酶基因的克隆及其序列分析[J].生物技术通讯,2014,25(2):198-202.
- [17] Liu C I, Jeng W Y, Chang W J, *et al*. Structural insights into the catalytic mechanism of human squalene synthase [J]. *Acta Crystallogr D*, 2014, 70(2): 231-241.
- [18] Ye Y, Wang R, Jin L, *et al*. Molecular cloning and differential expression analysis of a squalene synthase gene from *Dioscorea zingiberensis*, an important pharmaceutical plant [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(9): 6097-6104.
- [19] 马艺沔,袁丽钗,张林魁,等.2个丹参鲨烯合酶基因的克隆和鉴定[J].中草药,2014,45(9):1307-1312.
- [20] 邢朝斌,龙月红,李非非,等.刺五加鲨烯合酶基因家族两成员的表达式及其与皂苷含量的关系[J].西南农业学报,2014,27(3):1252-1255.
- [21] 刘颖,张宁,王学勇,等.甘草鲨烯合酶基因多态性对其编码酶催化效率影响的研究[J].中国中药杂志,2012,37(24):3777-3783.
- [22] 刘颖,陈宏昊,文浩,等.甘草鲨烯合酶1基因多态性及其与 $\beta$ -香树脂醇合成酶共表达对 $\beta$ -香树脂醇积累的影响研究[J].药学学报,2014,49(5):734-741.
- [23] 吴耀生,朱华,李坤,等.三七鲨烯合酶基因三七根、茎、芦头中的转录表达和三萜皂苷合成[J].中国生物化学与分子生物学报,2007,23(12):1000-1005.
- [24] 石磊.三七皂苷生物合成途径 SS、DS 基因的克隆和调控研究[D].昆明:昆明理工大学,2012.
- [25] 孙颖,赵恒伟,葛峰,等.三七中 SS 基因超表达载体的构建及其遗传转化[J].药学学报,2013,48(1):138-143.
- [26] Garaiová M, Zambojová V, Simová Z, *et al*. Squalene

- epoxidase as a target for manipulation of squalene levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2014, 14(2): 310-323.
- [27] Han Y, In J G, Kwon Y S, *et al.* Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 36-46.
- [28] 李宝财, 修乐山, 周 秘, 等. 刺五加鲨烯环氧酶基因的表达及其与刺五加皂苷含量的相关性分析 [J]. *中药材*, 2013, 36(7): 1063-1066.
- [29] 牛云云, 朱孝轩, 罗红梅, 等. 三萜皂苷合成生物学元件的初步开发: 三七鲨烯环氧酶编码基因克隆及表达模式分析 [J]. *药学报*, 2013, 48(2): 211-218.
- [30] 李 坤. 三七三萜皂苷合成途径鲨烯环氧酶基因的克隆及初步表达 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2006.
- [31] 和凤美. 三七消减文库构建和皂苷合成关键酶基因克隆及表达 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [32] Liang Y L, Zhao S J, Xu L X, *et al.* Heterologous expression of dammarenediol synthase gene in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2012, 55(5): 323-329.
- [33] Hu W, Liu N, Tian Y, *et al.* Molecular cloning, expression, purification, and functional characterization of dammarenediol synthase from *Panax ginseng* [J]. *Biomed Res Int*, 2013, doi: 10.1155/2013/285740.
- [34] Wang L, Zhao S J, Cao H J, *et al.* The isolation and characterization of dammarenediol synthase gene from *Panax quinquefolius* and its heterologous co-expression with cytochrome P450 gene PqD12H in yeast [J]. *Funct Integr Genomics*, 2014, 14(3): 545-557.
- [35] Han J Y, Wang H Y, Choi Y E. Production of dammarenediol-II triterpene in a cell suspension culture of transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(2): 225-233.
- [36] Lee M H, Han J Y, Kin H J, *et al.* Dammarrenediol-II production confers TMV tolerance in transgenic tobacco expressing *Panax ginseng* dammarenediol-II synthase [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(1): 173-182.
- [37] Luo H M, Sun C, Sun Y Z, *et al.* Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(Suppl 5): S5.
- [38] Han J Y, Kwon Y S, Yang D C, *et al.* Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarenediol synthase gene in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(12): 1653-1662.
- [39] Kim O T, Bank 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 Tiss Organ Cult*, 2009, 98(1): 25-33.
- [40] Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, *et al.* Cloning and functional expression of cycloartenol synthases from mangrove species *Rhizophora stylosa* Griff. and *Kandelia candel* (L.) Druce [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(7): 1788-1792.
- [41] Kosmas H, Miranda T, Anne E O. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75: 31-49.
- [42] Dhar N, Rana S, Razdan S, *et al.* Cloning and functional characterization of three branch point oxidosqualene cyclases from *Withania somnifera* (L.) Dunal [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(24): 17249-17267.
- [43] Babiychuk E, Bouvier-Nave P, Compagnon V, *et al.* Albinism and cell viability in cycloartenol synthase deficient [J]. *Plant Signal Behav*, 2008, 3(11): 978-980.
- [44] Kim O T, Kim Y M, Hwang S J, *et al.* Cloning and molecular analysis of cDNA encoding cycloartenol synthase from *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2005, 10(1): 16-22.
- [45] 孙 颖, 葛 锋, 刘迪秋, 等. 三七中由 RNAi 介导的 CAS 基因沉默对三七皂苷含量的影响 [J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(3): 80-85.
- [46] 何沐阳. 干扰人参 CS 基因的表达对人参三萜成分含量的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [47] Babiychuk E, Bouvier N, Compagnon V, *et al.* Allelic mutant series reveal distinct functions for Arabidopsis cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 3163-3168.
- [48] Chapple C. Molecular genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 311-343.
- [49] Schuler M A, Werck-Reichhart D. Functional genomics of P450s [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54(1): 629-667.
- [50] Sun C, Li Y, Wu Q, *et al.* De novo sequencing and analysis of the American ginseng root transcriptome using a GS FLX Titanium platform to discover putative genes involved in ginsenoside biosynthesis [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 262.
- [51] 汪思远, 蒋世翠, 王康宇, 等. 植物细胞色素 P450 的研究进展 [J]. *吉林蔬菜*, 2014(4): 41-45.
- [52] 吴 鹏, 谷俊涛, 修乐山, 等. 刺五加 P450 基因时空表达差异及与皂苷含量的相关性分析 [J]. *河北农业大学学报*, 2014, 37(3): 29-33.
- [53] 牛云云, 罗红梅, 黄林芳, 等. 细胞色素 P450 在人参皂苷生物合成途径中的研究进展 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2012, 14(1): 1177-1183.
- [54] Han J Y, Kim H J, Kwon Y S, *et al.* The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12): 2062-2073.
- [55] Chen S L, Luo H M, Li Y, *et al.* 454 EST analysis detects genes putatively involved in ginsenoside biosynthesis in

- Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(9): 1593-1601.
- [56] Han J Y, Hwang H S, Choi S W, *et al.* Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(9): 1535-1545.
- [57] Jorgensen K, Rasmussen A V, Morant M, *et al.* Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(3): 280-291.
- [58] Hayashi H, Nishiyama Y, Tomizawa N, *et al.* UDP-glucuronic acid: triterpene glucuronosyltransferase activity in cultured licorice cells [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(3): 665-666.
- [59] Tognetti V B, Van Aken O, Morreel K, *et al.* Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(8): 2660-2679.
- [60] Dong T, Hwang I. Contribution of ABA UDP-glucosyltransferases in coordination of ABA biosynthesis and catabolism for ABA homeostasis [J]. *Plant Signal Behav*, 2014, doi: 10.4161/psb.28888.
- [61] Langenbach C, Campe R, Schaffrath U, *et al.* UDP-glucosyltransferase UGT84A2/BRT1 is required for Arabidopsis nonhost resistance to the Asian soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi* [J]. *New Phytol*, 2013, 198(2): 536-545.
- [62] 孟庆山, 尹恒, 胡建恩, 等. 植物糖基转移酶在植物抗病过程中的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(2): 290-293.
- [63] 邢爱佳. 罗汉果葡萄糖基转移酶基因的克隆及原核表达 [D]. 南宁: 广西大学, 2013.
- [64] 向丽, 郭淑, 牛云云, 等. 三七 PnUGT1 基因的全长 cDNA 克隆和生物信息学分析 [J]. *药学学报*, 2012, 47(8): 1085-1091.
- [65] 郭淑. 基于转录组测序的石斛生物碱和人参皂苷生物合成相关基因的发掘、克隆及鉴定 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [66] 邢朝斌, 修乐山, 吴鹏, 等. 刺五加葡萄糖基转移酶基因的克隆与表达分析 [J]. *西北农业学报*, 2014, 23(2): 126-130.
- [67] 修乐山, 李菲菲, 周秘, 等. 刺五加糖基转移酶基因的表达及其对皂苷含量的影响 [J]. *基因组学与应用*, 2014, 33(1): 128-132.
- [68] Niu Y, Luo H, Sun C, *et al.* Expression profiling of the triterpene saponin biosynthesis genes FPS, SS, SE, and DS in the medicinal plant *Panax notoginseng* [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 295-303.
- [69] 李珍, 王东浩, 姚伟, 等. 丹参环阿屯醇合酶基因克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2013, 33(7): 1285-1291.
- [70] Nasrollahi V, Mirzaie-asl A, Piri K, *et al.* The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) [J]. *Phytochemistry*, 2014, 103(7): 32-37.
- [71] 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(13): 1270-1276.
- [72] 孙永珍. 灵芝三萜酸、喜树碱、人参皂苷合成及调控基因的筛选、克隆和功能分析 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [73] 李娜, 王世明, 陈军, 等. SEFA-PCR 法克隆灵芝鲨烯合酶基因启动子及其序列分析 [J]. *菌物学报*, 2006, 25(4): 592-598.
- [74] Razdan S, Bhat W W, Rana S, *et al.* Molecular characterization and promoter analysis of squalene epoxidase gene from *Withania somnifera* (L.) Dunal [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(2): 905-916.
- [75] Chen Y H, Yang X Y, He K, *et al.* The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(1): 107-124.
- [76] Green K A, Prigge M J, Katzman R B, *et al.* CORONA, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in Arabidopsis, regulates stem cell specification and organogenesis [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 691-704.