

参与植物三萜生物合成的细胞色素 P450 酶研究进展

朱灵英¹, 郭娟², 张爱丽¹, 王宝婕¹, 曾礼芳¹, 徐福荣^{1*}, 马晓惠^{1*}

1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500

2. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700

摘要: 三萜是许多药用植物的活性成分, 目前已对其生物合成途径进行了大量研究并取得了重大进展。细胞色素 P450 (CYP450) 主要参与三萜的后修饰过程, 对三萜的多样性起着关键作用。目前, 已从多种植物中克隆得到与三萜生物合成相关的 CYP450 基因。对参与三萜生物合成的 CYP450 的功能研究进行综述, 为三萜生物合成途径的解析及 CYP450 的功能研究提供借鉴。

关键词: 细胞色素 P450; 三萜; 生物合成; 基因功能; 药用植物

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)22-5597-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.031

Research progress on CYP450 involved in medicinal plant triterpenoid biosynthesis

ZHU Ling-ying¹, GUO Juan², ZHANG Ai-li¹, WANG Bao-jie¹, ZENG Li-fang¹, XU Fu-rong¹, MA Xiao-hui¹

1. College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Triterpenoids are active constituents of many medicinal plants. The biosynthetic pathways of triterpenes have been fully studied and significant progress has been made. CYP450s are mainly involved in the post-modification process of triterpenoids biosynthesis, which plays a key role in the diversity of triterpenoids. Currently, a lot of CYP450s, which related to the biosynthesis of triterpenoids, have been cloned from many plants. In this paper, CYP450s involved in the biosynthesis of triterpenoids were reviewed, which provided a reference for the analysis of the biosynthetic pathway of triterpenoids and the functional study of CYP450s.

Key words: cytochrome P450; triterpenoids; biosynthesis; gene function; medicinal plant

三萜是一类基本母核由 30 个碳原子组成的化合物, 其广泛分布于自然界, 是植物重要的一类次生代谢产物。三萜具有多种生物活性, 其不仅可以在植物体中防御病虫害^[1], 而且具有降糖、抗炎、抗肿瘤、抗氧化、骨保护等作用^[2-11], 是许多药用植物的活性成分, 被广泛用于药物、化妆品、食品等行业^[12]。常见的三萜主要为四环三萜和五环三萜 2 类。四环三萜从结构上分为 6 类, 分别是葫芦烷型、达玛烷型、羊毛脂烷型、环阿屯烷型、甘遂烷型及楝烷型。五环三萜的类型较多, 主要的五环三萜为齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扇豆烷型和木栓烷

型 4 类^[13]。由于三萜的结构相对复杂, 在植物中含量较低且多种结构相似的化合物常混合存在, 通过植物提取分离或化学合成方法获得大量单体三萜化合物较难, 三萜的获取限制了其应用^[14]。合成生物学为获取大量高价值天然产物提供了新思路, 然而通过合成生物学方法得到三萜化合物首先需要解析其生物合成途径。

2,3-氧鲨烯是三萜生物合成的前体物质, 其在氧鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclases, OSCs) 的作用下形成不同类型的三萜碳骨架, 细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450 monooxygenases,

收稿日期: 2019-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81760690); 国家自然科学基金项目 (81960693); 云南省科技厅科技计划项目 (2018FB144); 云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项项目 [2019FF002(-059)]; 中央本级重大增减支项目: 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302)

作者简介: 朱灵英, 硕士研究生, 主要从事分子生药学研究。E-mail: Zhulingying2017@126.com

***通信作者** 徐福荣, 研究员, 主要从事中药资源质量与开发研究。E-mail: xfrong99@163.com

马晓惠, 讲师, 主要从事分子生药学研究。E-mail: maxiaohui1988@126.com

CYP450) 进一步对三萜骨架进行修饰产生结构多样的三萜, 部分三萜在糖基转移酶(UDP-glycosyltransferases, UGTs) 的作用下引入糖基生成复杂多样的三萜皂苷^[15]。CYP450 与三萜的多样性密切相关, 因此, CYP450 的克隆和功能研究对解析三萜生物合成途径有着重要作用。三萜是许多药用植物的活性成分, 其生物合成途径是近年研究的热点, 随着分子生物学及合成生物学的发展, 三萜的生物合成途径研究取得了新的进展, 大量新的参与植物三萜生物合成的 CYP450 被发现^[15-19]。本文以三萜为例, 重点对参与药用植物中三萜生物合成的 CYP450 功能研究进行综述, 以期对三萜生物合成途径的进一步解析及 CYP450 的功能研究提供参考。

1 CYP450 的分类

CYP450 是植物代谢中最大的酶家族, 约占植物基因组编码基因的 1%, 其具有广泛的催化活性, 参与苯丙烷类、生物碱、萜类、脂类、氰苷类、植物激素等植物初生和次生代谢产物的生物合成, 其主要参与氧化反应^[18-22]。CYP450 的分类主要依据其氨基酸同源性, 同源性大于 40% 为同一基因家族, 同源性大于 55% 则为同一亚家族^[22]。目前, 植物中已发现 127 个 CYP450 家族, 根据系统发育树上的不同分支, 127 个 CYP450 家族被分为 11 个簇(clan), 其中 CYP51、CYP74、CYP97、CYP710、CYP711、CYP727、CYP746 为单家族簇, CYP71、CYP72、CYP85、CYP86 为多家族簇^[22]。然而, CYP450 的分类仅仅只能代表系统进化关系, 与其功能无必然关系^[23]。

CYP450 参与植物三萜骨架修饰^[19], 目前, 发现与三萜结构修饰有关的 CYP450 主要分布于 CYP51 簇的 CYP51H 亚家族, CYP71 簇的 CYP71A、CYP71D、CYP81Q、CYP93E 和 CYP705A 亚家族, CYP72 簇的 CYP72A、CYP714E 和 CYP749A 亚家族, CYP85 簇的 CYP87D、CYP88D、CYP88L、CYP708A、CYP716A、CYP716C、CYP716E、CYP716S、CYP716U、CYP716Y、CYP90B 和 CYP90G 亚家族及 CYP86 簇的 CYP94N 亚家族。

2 参与三萜生物合成的 CYP450

2.1 甘草皂苷生物合成相关 CYP450

甘草皂苷为齐墩果烷型皂苷, 是甘草的活性成分, 同时也是甘草味甜的物质基础。甘草中已发现 10 多种甘草皂苷, 其中甘草甜素(glycyrrhizin)是

其主要成分^[24], 具有抗炎、抗菌、保肝等多重药理活性^[25-27]。由于甘草甜素的特殊甜味, 其还被广泛用作甜味剂和调味添加剂^[28]。科研人员对甘草皂苷的生物合成进行了大量研究^[28-32]。 β -香树脂醇(β -amyrin)是甘草皂苷生物合成的前体, 其 C-3、11、22、24、29 和 30 位在 CYP450 作用下氧化后与糖基缩合形成甘草皂苷^[24], 目前甘草中已报道 4 个参与甘草皂苷生物合成的 CYP450, 即 CYP88D6 (AB433179)^[28]、CYP72A154 (AB558153)^[31]、CYP93E3 (AB437320)^[28] 和 CYP716A179 (LC157867)^[32] (图 1)。

CYP88D6 具有 β -香树脂醇-11-氧化酶活性, 可氧化 β -香树脂醇和 30-羟基- β -香树脂醇(30-hydroxy β -amyrin) 的 C-11 位分别生成 11-羰基- β -香树脂醇(11-oxo- β -amyrin) 和 30-羟基-11-羰基- β -香树脂醇(30-hydroxy-11-oxo- β -amyrin)^[28]。CYP72A154 进一步对 11-羰基- β -香树脂醇的 C-30 位进行 3 步连续氧化生成甘草次酸(glycyrrhetic acid), 参与甘草甜素的合成^[31]。酵母体内实验结果表明, CYP72A154 还可氧化 β -香树脂醇的 C-30 位生成 30-羟基- β -香树脂醇, 此外, 体外酶促实验和酵母体内实验均表明 CYP72A154 为多功能酶, 能氧化 D 和 E 环上不同位置的碳原子, 与甘草皂苷的多样性密切相关^[31]。CYP93E3 则能氧化 β -香树脂醇的 C-24 位生成 24-羟基- β -香树脂醇(24-hydroxy- β -amyrin)^[28]。Tamura 等^[32]将 CYP716A179 在酵母工程菌中异源表达, 结果表明 CYP716A179 为 C-28 位氧化酶, 其能氧化 α -香树脂醇(α -amyrin)、 β -香树脂醇及羽扇豆醇(lupeol) 的 C-28 位分别生成乌苏酸(ursolic acid)、齐墩果酸(oleanolic acid) 和桦木酸(betulinic acid)。

2.2 人参皂苷生物合成相关 CYP450

人参皂苷是人参、西洋参、三七等人参属植物的重要活性成分, 具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗糖尿病和抗疲劳等多重活性^[33-34]。人参皂苷根据结构主要分为达玛烷型和齐墩果烷型 2 种类型^[35]。已报道 3 个参与人参皂苷生物合成的 CYP450: CYP716A47 (新命名为 CYP716U1, JN604536)^[36]、CYP716A53v2 (新命名为 CYP716S1, JX036031)^[37] 和 CYP716A52v2 (JX036032)^[38] (图 2)。

2.2.1 参与达玛烷型人参皂苷生物合成的 CYP450 达玛烯二醇(dammarenediol II)是达玛烷型四环三萜皂苷生物合成的基本前体, 其在 CYP450 和 UGTs 等的作用下形成达玛烷型人参皂苷。Han 等^[36-37]采

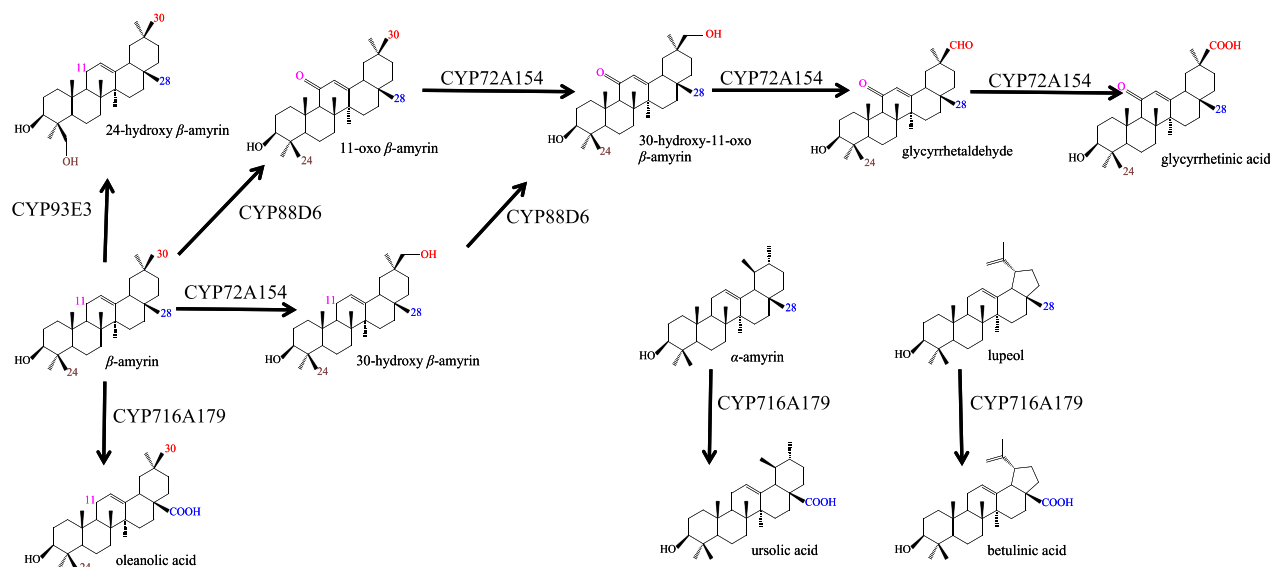


图 1 CYP450 参与甘草皂苷的生物合成

Fig. 1 CYP450 participated in glycyrrhizins biosynthesis

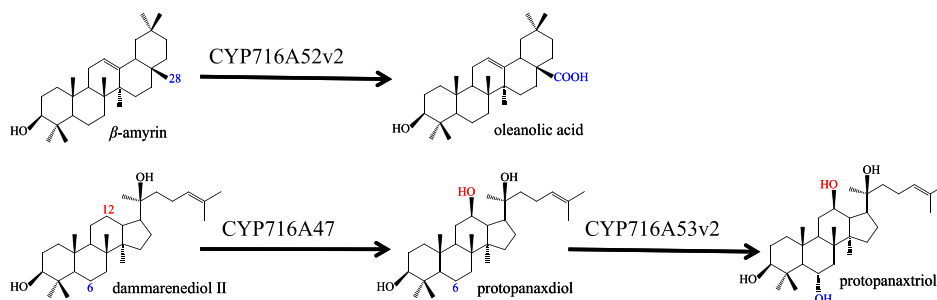


图 2 CYP450 参与人参皂苷的生物合成

Fig. 2 CYP450 participated in ginsenosides biosynthesis

用酵母表达系统对 CYP716A47 和 CYP716A53v2 进行功能研究, CYP716A47 为原人参二醇合酶, 氧化达玛烯二醇的 C-12 位生成原人参二醇 (protopanaxadiol), CYP716A53v2 则进一步氧化原人参二醇的 C-6 位生成原人参三醇 (protopanaxatriol), CYP716A47 和 CYP716A53v2 参与达玛烷型皂苷生物合成过程中 2 个连续的氧化反应, 研究人员还利用农杆菌介导转化的方法在烟草中共表达人参达玛烯二醇合酶 (PgDDS)、CYP716A47 和 CYP716A53v2, 在转基因烟草的叶片中检测到了达玛烯二醇、原人参二醇和原人参三醇, 在烟草体系中进一步验证了 PgDDS、CYP716A47 和 CYP716A53v2 的功能^[39]。

2.2.2 参与齐墩果烷型人参皂苷生物合成的 CYP450 β-香树脂醇是齐墩果烷型五环三萜皂苷的前体, 其在 CYP450 和 UGTs 等的作用下形成齐

墩果烷型人参皂苷。Han 等^[38]通过酵母表达系统对 CYP716A52v2 进行功能研究, CYP716A52v2 具有 β-香树脂醇-28-氧化酶活性, 氧化 β-香树脂醇的 C-28 位生成齐墩果酸, 在人参中过表达 CYP716A52v2 显著提高齐墩果烷型人参皂苷 (人参皂苷 Ro) 的含量, 说明 CYP716A52v2 是人参中齐墩果烷型三萜皂苷生物合成的关键酶。

2.2.3 人参皂苷生物合成相关 CYP450 在合成生物学中的应用 人参皂苷生物合成途径中 CYP450 的功能研究为“人参酵母”的获得提供了可能性。Dai 等^[40]将人参的 PgDDS、CYP716A47 和拟南芥的细胞色素 CYP450 还原酶基因 (AtCPR) 整合到酿酒酵母染色体中, 并通过密码子优化、过表达 tHMG1、ERG20 和 ERG9 增加角鲨烯和 2,3-氧化角鲨烯的供应, 最终获得了高产原人参二醇的酵母工程菌株 (原人参二醇的质量浓度为 1 189 mg/L)。在此基础上,

Dai 等^[41]将人参中的 β -香树脂醇合酶基因、CYP716A53v2、CYP716A52v2 与 PgDDS、CYP716A47 同时导入酵母中,获得了能同时产生原人参二醇、原人参三醇和齐墩果酸 3 种人参皂苷苷元的酵母工程菌,为利用合成生物学方法生产人参皂苷奠定了基础。

2.3 罗汉果苷和葫芦素生物合成相关 CYP450s

罗汉果苷和葫芦素为葫芦烷型四环三萜皂苷,主要存在于葫芦科植物中^[42],药理研究表明,二者均具有抗癌活性^[43-45]。罗汉果苷是罗汉果的主要活性成分,还具有降血糖、抗炎、抗氧化、抗疲劳等生物活性^[46-49],同时也是罗汉果味甜的物质基础,

具有甜度高、热量低的特点^[50],是糖尿病患者和肥胖者食品的良好添加剂^[51]。

葫芦二烯醇(cucurbitadienol)是葫芦烷型四环三萜皂苷生物合成的基本前体,其在环氧化酶(epoxide hydrolase)、CYP450、酰基转移酶(acetyltransferase)及 UGTs 等的作用下形成罗汉果苷和葫芦素等化合物^[52-53]。目前已报道 10 个与葫芦烷型皂苷生物合成相关的 CYP450: CYP88L4^[53]、CYP87D18^[53-54]、CYP87D20 (KM655862)^[42]、CYP81Q59^[42]、CYP88L2 (NM_001308937)^[55]、CYP81Q58 (KM655856)^[55]、CYP89A140^[55]、CYP87D19^[55]、CYP712D8^[55]和 CYP88L3^[55](图 3)。

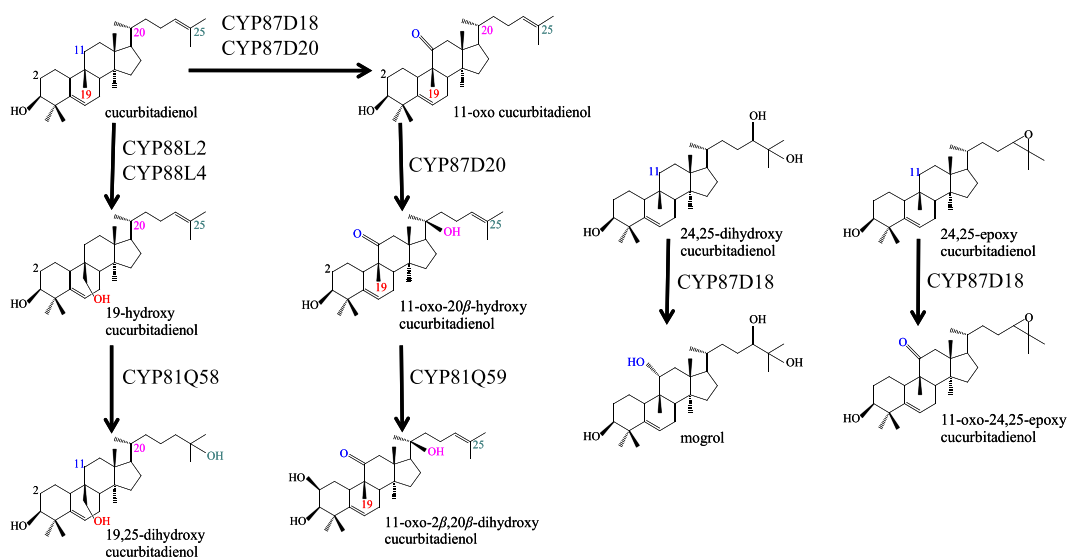


图 3 CYP450 参与葫芦烷型皂苷的生物合成

Fig. 3 CYP450 participated in cucurbitane saponins biosynthesis

2.3.1 参与罗汉果苷生物合成的 CYP450 罗汉果中已报道参与罗汉果苷生物合成的 CYP450 有 CYP87D18^[53-54]和 CYP88L4^[53]。Zhang 等^[54]将酵母中表达的 CYP87D18 与葫芦二烯醇进行反应,结果发现 CYP87D18 能连续氧化葫芦二烯醇的 C-11 位生成 11-羟基葫芦二烯醇(11-hydroxy cucurbitadienol)和 11-羰基葫芦二烯醇(11-oxo-cucurbitadienol)。为进一步验证 CYP87D18 的功能,将 CYP87D18 与葫芦二烯醇合成酶基因(SgCbQ)和细胞色素还原酶基因(CPR)在酿酒酵母中进行共表达,产物中除检测到了 11-羟基葫芦二烯醇和 11-羰基葫芦二烯醇之外,还检测到了 11-羰基-24,25-环氧葫芦二烯醇(11-oxo-24,25-epoxy cucurbitadienol)。Itkin 等^[53]研究发现,CYP87D18

能氧化 24,25-二羟基葫芦二烯醇(24,25-dihydroxy cucurbitadienol)的 C-11 位而生成 11,24,25-三羟基葫芦二烯醇(mogrol)。CYP87D18 为多功能酶,对葫芦二烯醇、24,25-环氧葫芦二烯醇(24,25-epoxy cucurbitadienol)和 24,25-二羟基葫芦二烯醇的 C-11 位均具有氧化活性^[53-54]。CYP88L4 为葫芦二烯醇-19-氧化酶,氧化葫芦二烯醇的 C-19 位生成 19-羟基葫芦二烯醇(19-hydroxy cucurbitadienol)^[54]。

2.3.2 参与葫芦素生物合成的 CYP450 黄三文课题组^[42,55]对黄瓜、甜瓜和西瓜中葫芦素类化合物的生物合成进行了深入研究,利用酵母单杂和 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)对黄瓜中 8 个候选 CYP450 进行研究,结果发现,其中 7 个 CYP450 (CYP81Q58、CYP89A140、CYP87D19、CYP712D8、

CYP88L2、CYP88L3 和 CYP87D20) 均参与葫芦素 C 的生物合成, 进一步利用合成生物学方法对 CYP450 的催化功能进行研究, CYP88L2 与罗汉果中的 CYP88L4 的功能一致, 均氧化葫芦二烯醇的 C-19 位生成 19-羟基葫芦二烯醇, CYP81Q58 则进一步氧化 19-羟基葫芦二烯醇的 C-25 位生成 19,25-二羟基葫芦二烯醇 (19,25-dihydroxy cucurbitadienol)^[55]。CYP87D20 是葫芦素生物合成中的多功能氧化酶, 同时存在黄瓜、甜瓜和西瓜中, 其序列同源性较高且催化功能一致, 能催化葫芦二烯醇的 C-11 位和 C-20 位, 生成 11-羰基葫芦二烯醇和 11-羰基-20 β -羟基-葫芦二烯醇 (11-oxo-20 β -hydroxy cucurbitadienol)^[42]。在西瓜和甜瓜中还发现了与葫芦素 B 和葫芦素 E 生物合成相关的 CYP81Q59, 将 CYP81Q59 转入产 11-羰基-20 β -羟基葫芦二烯醇的工程菌中验证其催化功能, CYP81Q59 能氧化 11-

羰基-20 β -羟基-葫芦二烯醇的 C-2 位生成 11-羰基-2 β ,20 β -二羟基-葫芦二烯醇 (11-oxo-2 β ,20 β -dihydroxy cucurbitadienol)^[42]。

2.4 桔梗皂苷生物合成相关 CYP450

桔梗皂苷为齐墩果烷型皂苷, 是桔梗的主要活性成分, 目前已从桔梗中分离得到 70 多种桔梗皂苷^[56]。现代药理研究表明, 桔梗皂苷具有抗肿瘤、抗炎、降糖、调血脂、保肝和调节免疫等多种药理活性^[56-60]。根据桔梗皂苷 D (platycodin D) 的结构推测, CYP450 在 β -香树脂醇的 C-28 位引入羰基并氧化 β -香树脂醇的 C-2 β 、16 α 、23、24 位生成桔梗皂苷元^[61]。目前桔梗中已报道 4 个参与桔梗皂苷生物合成的 CYP450: CYP716A140 (KU878853)^[12]、CYP716S5 (KU878856)^[12]、CYP716A140v2 (LC209199)^[61]、CYP716A141 (KU87885, LC209200)^[12,61] (图 4)。

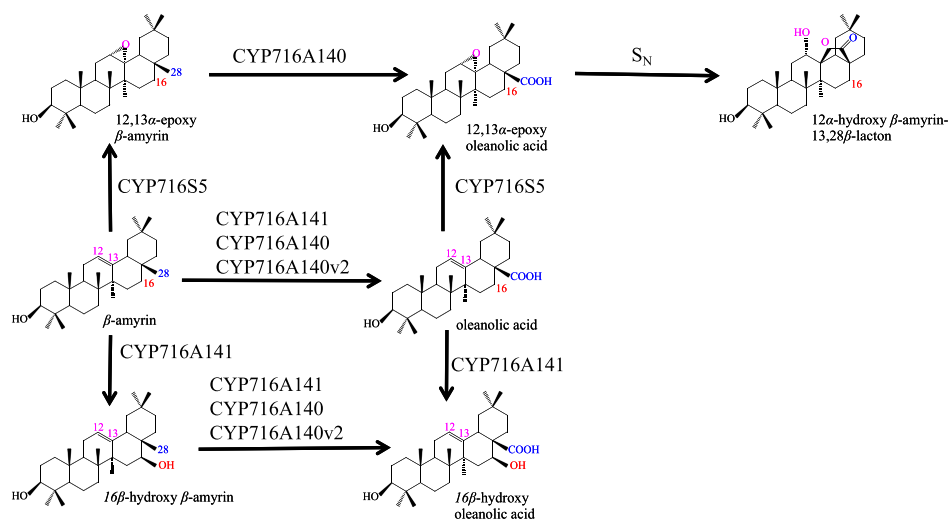


图 4 CYP450 参与桔梗皂苷的生物合成

Fig. 4 CYP450 participated in platycodins biosynthesis

Miettinen 等^[12]将光果甘草的 β -香树脂醇合酶 (GgGAS)、蒺藜苜蓿的 CYP450 还原酶 (MTR1) 及候选基因在产 2,3-氧鲨烯的酵母工程菌中共表达, 结果表明, CYP716A140 具有 β -香树脂醇-28-氧化酶活性, 可氧化 β -香树脂醇的 C-28 位生成齐墩果酸。CYP716S5 催化 β -香树脂醇生成 12,13 α -环氧- β -香树脂醇 (12,13 α -epoxy- β -amyrin) 及质荷比 (m/z) 为 586 的一个化合物, 在共表达 CYP716A140 和 CYP716S5 的体系中检测到 2 个相对分子质量为 473.362 2 的化合物, 分别为 12 α -羟基- β -香树脂醇-13,28 β -内酯 (12 α -hydroxy β -amyrin-13,28 β -lactone) 和 12,13 α -环

氧齐墩果酸 (12,13 α -epoxy oleanolic acid), 12,13 α -环氧齐墩果酸可自发形成 12 α -羟基- β -香树脂醇-13,28 β -内酯, 说明 CYP716S5 能催化 β -香树脂醇及齐墩果酸的 C-12,13 α 环氧化反应及某一位置的羟基化。Tamura^[61]发现 CYP716A141 为多功能酶, 不仅能催化 β -香树脂醇 C-16 β 生成 16 β -羟基- β -香树脂醇 (16 β -hydroxy β -amyrin), 还能催化 β -香树脂醇的 C-28 生成齐墩果酸, 并且在共表达 CYP716A141 和 CYP716A140 的体系中还检测到了 m/z 688 的化合物, 根据其相对分子质量推测其为 16 β -羟基齐墩果酸 (16 β -hydroxy oleanolic acid), 说明 CYP716A141 可能

还能催化齐墩果酸的 C-16 β 位。CYP716A140v2 的催化功能与 CYP716A140 的一致^[61]。

2.5 参与乌苏烷型皂苷生物合成的 CYP450

乌苏烷型三萜皂苷生物合成的基本前体为 α -香树酯醇，目前报道的 CYP450 主要参与乌苏烷型皂苷元 C-2 α 、3、6 β 、16 α 、22 α 、23 和 28 位的氧化

(表 1 和图 5)。

2.6 参与羽扇豆烷型皂苷生物合成的 CYP450

羽扇豆烷型三萜皂苷的基本前体为羽扇豆醇，CYP71D353(KF460438)主要参与羽扇豆烷型皂苷 C-20 和 28 位的氧化^[79]，其他已报道的 CYP450 主要参与羽扇豆烷型皂苷 C-2 α 和 28 位的氧化(表 1 和图 6)。

表 1 参与乌苏烷型和羽扇豆烷型皂苷生物合成的 CYP450

Table 1 CYP450 participated in ursane and lupane saponins biosynthesis

基因	序列号	来源	功能(底物)	参考文献
IpAO2	—	<i>Ilex pubescens</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin)	62-63
CYP716A12	FN995112、 FN995113	<i>Medicago truncatula</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	64-65
CYP716A15	AB619802	<i>Vitis vinifera</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	64
CYP716A265	MG708187	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	66
CYP716A266	MG708188	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	66
CYP716A80	KP795926	<i>Barbarea vulgaris</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	67
CYP716A81	KP795925	<i>Barbarea vulgaris</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	67
CYP716AL1	JN565975	<i>Catharanthus roseus</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	68
CYP716A51	AB706297	<i>Lotus japonicus</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	69
CYP716A175	EB148173	<i>Malus $\times$ domestica</i>	C-28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol/ germanicol)	70
CYP716A155	MK592859	<i>Rosmarinus officinalis</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)	71
CYP716A83	KU878849、 KT004519	<i>Centella asiatica</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/ ψ -taraxasterol)	12,72
CYP716A86	KU878848	<i>Centella asiatica</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin)	12
CYP716A44	AK329870	<i>Solanum lycopersicum</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin)	73
CYP716A46	XM_004243858	<i>Solanum lycopersicum</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin)	73
CYP716A252	JQ958967	<i>Ocimum basilicum</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin)	74
CYP716A253	JQ958968	<i>Ocimum basilicum</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin)	74
CYP716A1	NM_001344126	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C28-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin)、C28- hydroxylation (lupeol)	75
CYP716A2	LC106013	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C28-hydroxylation (α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)、 C22 α -hydroxylation (α -amyrin/ β -amyrin)、 C16-hydroxylation (β -amyrin)	75
CYP714E19	KT004520	<i>Centella asiatica</i>	C23-oxidation (ursolic acid/oleanolic acid/23- hydroxy ursolic acid/23-hydroxy oleanolic acid)	72
CYP716Y1	KC963423	<i>Bupleurum falcatum</i>	C16 α -hydroxylation (α -amyrin/ β -amyrin)	76
CYP716E26	XM_004241773	<i>Solanum lycopersicum</i>	C6 β -hydroxylation (α -amyrin/ β -amyrin)	73
CYP716E41	KU878851	<i>Centella asiatica</i>	C6 β -hydroxylation (ursolic acid/oleanolic acid/2 α - hydroxy oleanolic acid)	12
CYP716A14v2	KF309251	<i>Artemisia annua</i>	C3-oxidation (α -amyrin/ β -amyrin/ δ -amyrin)	77
CYP716C55	MG708191	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	C2 α -oxidation (ursolic acid/oleanolic acid)	66
CYP716C49	—	<i>Crataegus pinnatifida</i>	C2 α -hydroxylation (ursolic acid/oleanolic acid/ betulinic acid)	78
CYP716C11	KU878852	<i>Centella asiatica</i>	C2 α -hydroxylation (ursolic acid/23-hydroxy ursolic acid/oleanolic acid/6 β -hydroxy oleanolic acid/ 23-hydroxy oleanolic acid)	12,72

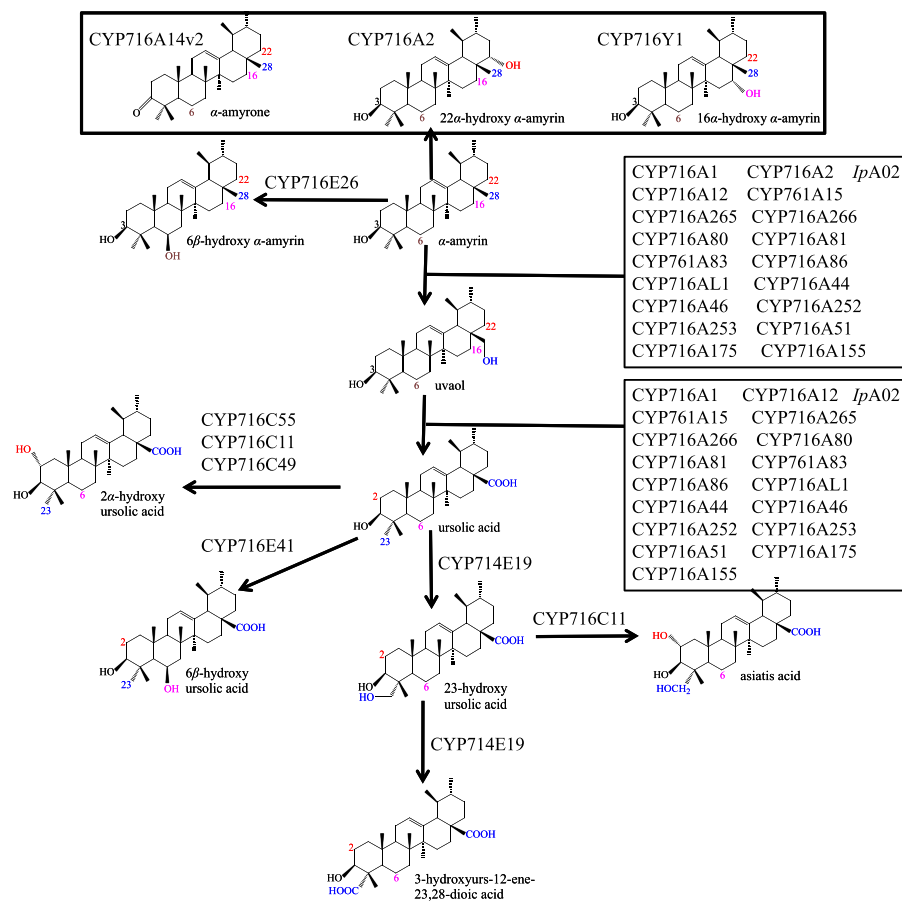


图 5 CYP450 参与乌苏烷型皂苷的生物合成

Fig. 5 CYP450 participated in ursane saponins biosynthesis

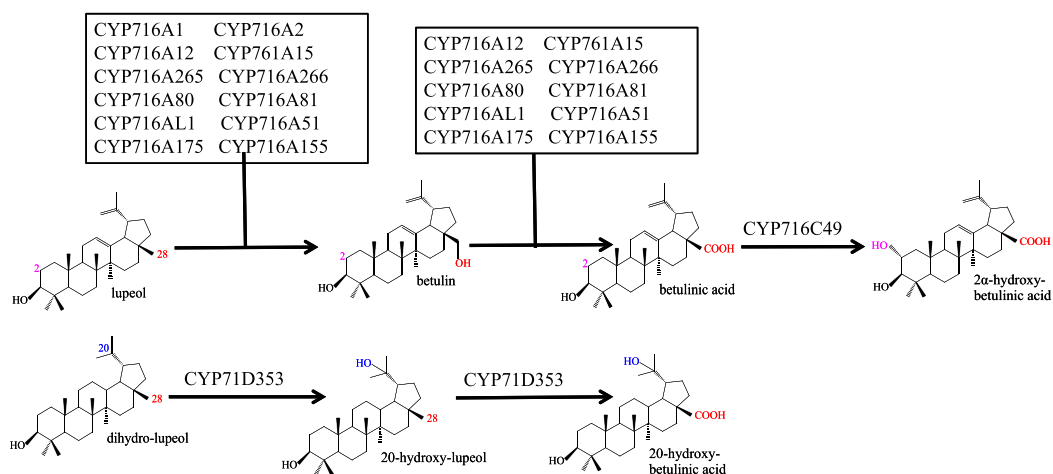


图 6 CYP450 参与羽扇豆烷型皂苷的生物合成

Fig. 6 CYP450 participated in lupane saponins biosynthesis

2.7 参与其他齐墩果烷型皂苷生物合成的 CYP450

齐墩果烷型皂苷合成的基本前体为 β -香树酯醇，其在 CYP450 等后修饰酶作用下生成齐墩果烷型三萜皂苷。目前，已报道大量与齐墩果烷型皂苷

生物合成的相关 CYP450，主要参与齐墩果烷型皂苷 C-2 α 、2 β 、3、6 β 、12、13 β 、16、22、23、24、28、30 位的氧化，参与其他齐墩果烷型皂苷生物合成的 CYP450 见表 2 和图 7。

表 2 参与其他齐墩果烷型皂苷生物合成的 CYP450

Table 2 CYP450 participated in oleanolic saponins biosynthesis

基因	序列号	来源	功能 (底物)	参考文献
CYP72A63	AB558146	<i>Medicago truncatula</i>	C30-oxidation (β -amyrin)	31
CYP716A110	KU878864	<i>Aquilegia coerulea</i>	C28-oxidation (β -amyrin)	12
CYP716A17	AB619803	<i>Vitis vinifera</i>	C28-oxidation (β -amyrin)	64
CYP716A244	KX354739	<i>Eleutherococcus senticosus</i>	C28-oxidation (β -amyrin)	80
CYP716A94	KT150521	<i>Kalopanax septemlobus</i>	C28-oxidation (β -amyrin)	81
CYP716A254	—	<i>Anemone flaccida</i>	C28-oxidation (β -amyrin)	82
CYP716A78	KX343075	<i>Chenopodium quinoa</i>	C28-oxidation (β -amyrin)	83
CYP716A79	KX343076	<i>Chenopodium quinoa</i>	C28-oxidation (β -amyrin)	83
CYP716A249	KY385302.1	<i>Polygala tenuifolia</i>	C28-oxidation (β -amyrin)	17,84
CYP716A75	KF318733	<i>Maesa lanceolata</i>	C28-oxidation (β -amyrin/16 α -hydroxy β -amyrin)	14
CYP93E1	AF135485	<i>Glycine max</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	85
LjCYP93E1	LC414182	<i>Lotus japonicus</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin/sophoradiol)	69
CYP93E2	DQ335790	<i>Medicago truncatula</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	64
CYP93E3	AB437320	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	28
CYP93E4	KF906535	<i>Arachis hypogaea</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	86
CYP93E5	KF906536	<i>Cicer arietinum</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	86
CYP93E6	KF906537	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	86
CYP93E7	KF906538	<i>Lens culinaris</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	86
CYP93E8	KF906539	<i>Pisum sativum</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	86
CYP93E9	KF906540	<i>Phaseolus vulgaris</i>	C24-hydroxylation (β -amyrin)	86
CYP749A63	MF596155	<i>Crataegus pinnatifida</i>	C24-oxidation (oleanolic acid)	78
CYP72A397	KT150517	<i>Kalopanax septemlobus</i>	C23-hydroxylation (oleanolic acid)	81
CYP72A68v2	AB558150	<i>Medicago truncatula</i>	C23-oxidation (oleanolic acid/2 β -hydroxy oleanolic acid/bayogenin)	31,87-88
CYP72A68-430	Medtr2g055430	<i>Medicago truncatula</i>	C23-oxidation (oleanolic acid/2 β -hydroxy oleanolic acid/bayogenin)	87-88
CYP72A68-470	Metr2g055470	<i>Medicago truncatula</i>	C23-oxidation (oleanolic acid/2 β -hydroxy oleanolic acid/bayogenin)	87-88
CYP72A552	MH252571	<i>Barbarea vulgaris</i>	C23-hydroxylation (oleanolic acid)	89
CYP72A61v2	AB558145	<i>Medicago truncatula</i>	C22-hydroxylation (24-hydroxy β -amyrin)	31,90
CYP87D16	KF318735	<i>Maesa lanceolata</i>	C16 α -hydroxylation (β -amyrin/olenolic acid)	14
CYP716A111	KU878865	<i>Aquilegia coerulea</i>	C16 β -hydroxylation (β -amyrin)	12
CYP51H10	DQ680852	<i>Avena strigosa</i>	C16 β -hydroxylation (β -amyrin); C12,13 β - epoxidation (β -amyrin)	91-92
CYP72A67	DQ335780	<i>Medicago truncatula</i>	C2 β -hydroxylation (oleanolic acid/23-hydroxy- oleanolic acid)	87-88

2.8 参与其他三萜生物合成的 CYP450

CYP450 除参与乌苏烷型、羽扇豆烷型、齐墩果烷型、达玛烷型和葫芦烷型三萜的生物合成外，

还参与其他三萜化合物的生物合成，在拟南芥^[75,93-95]、藜芦^[96-97]等植物中已报道多个参与其他三萜生物合成的 CYP450 (表 3 和图 8)。

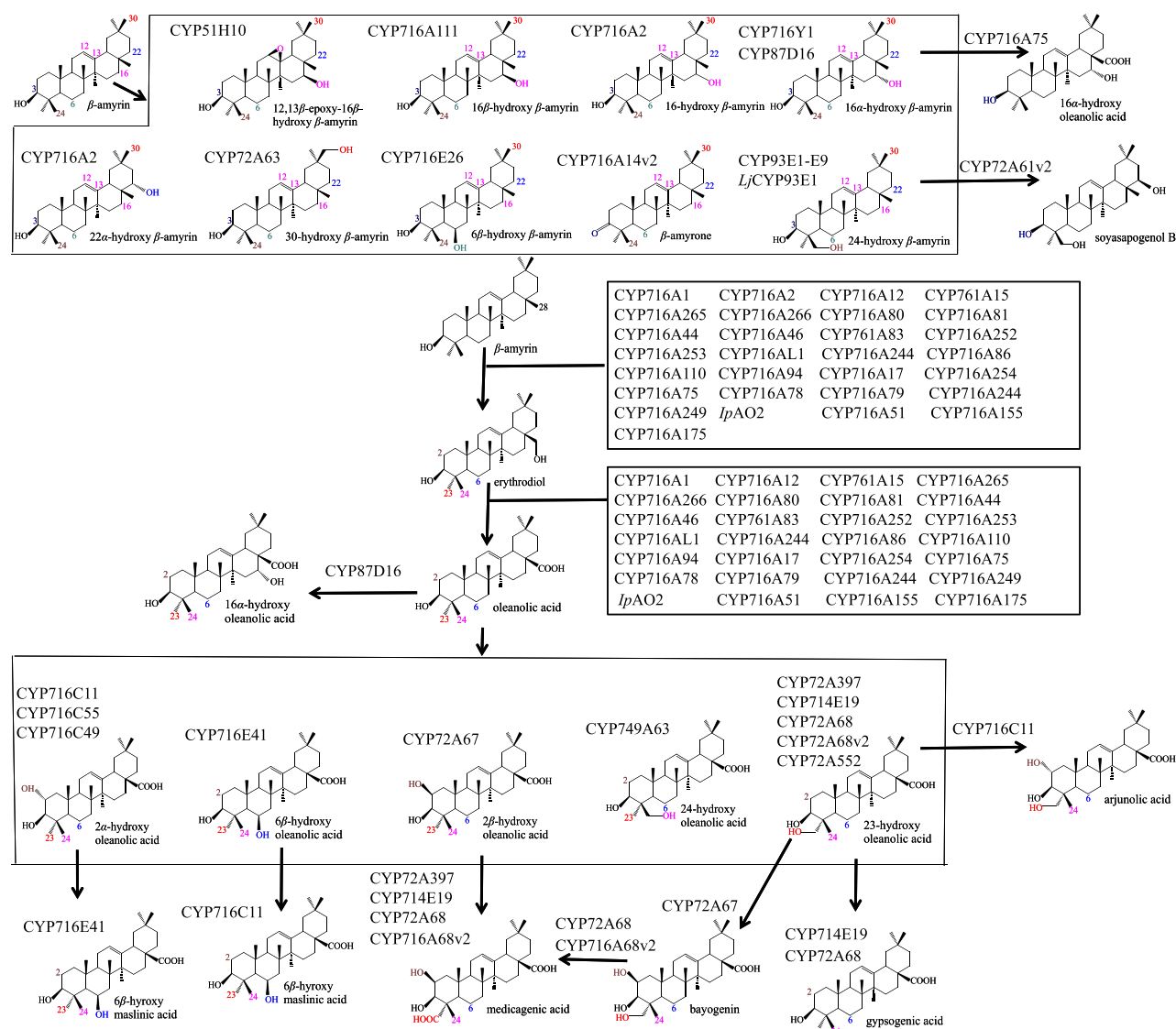


图 7 CYP450 参与其他齐墩果烷型皂苷的生物合成

Fig. 7 CYP450 participated in oleanane saponins biosynthesis

表 3 参与其他三萜生物合成的 CYP450

Table 3 CYP450s participated in biosynthesis of other triterpenoids

基因	序列号	来源	功能（底物）	参考文献
CYP705A1	NM_117621	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C15,C16-cleavage (arabidiol)	93
CYP705A5	NM_124173	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C15,C16-desaturation (7 β -hydroxythalianol)	94
CYP708A2	NM_180822	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C7 β -hydroxylation (thalianol)	93-94
CYP71A16	NM_123623	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C23-hydroxylation (marneral/marnerol)	93,96
CYP90B27	KJ869252	<i>Veratrum californicum</i>	C22-hydroxylation (cholesterol)	97
CYP90G1	KJ869260	<i>Veratrum californicum</i>	C22-oxidation (22-hydroxy-26-amincholesterol)	97
CYP94N1	KJ869255	<i>Veratrum californicum</i>	C26 hydroxylation (22-hydroxycholesterol)	97
CYP716A113v1	KU878867	<i>Aquilegia coerulea</i>	unknown hydroxylation (cycloartenol)	12
CYP716A1	NM_001344126	<i>Arabidopsis thaliana</i>	unknown hydroxylation (tirucalla-7,24-dien-3 β -ol)	75,96

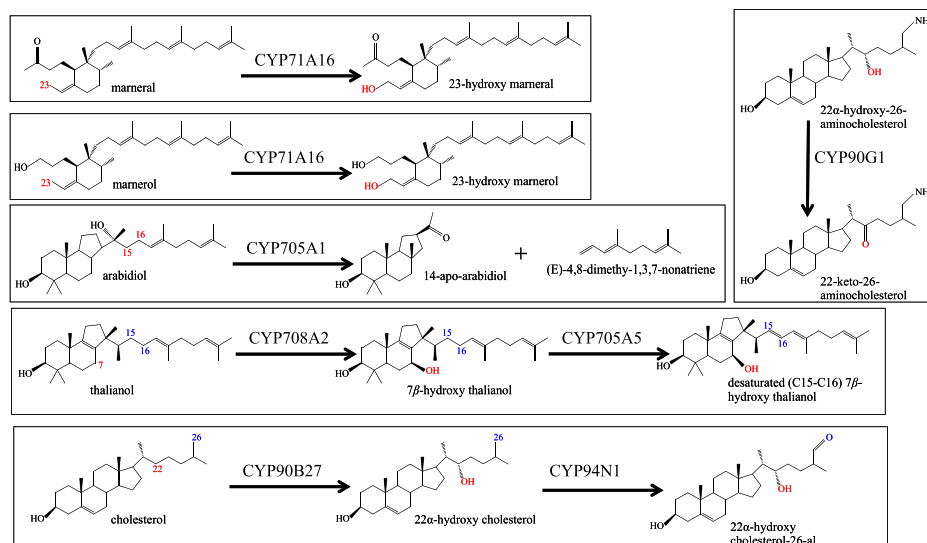


图 8 CYP450 参与其他三萜的生物合成

Fig. 8 CYP450 participated in biosynthesis of other triterpenes

3 结语及展望

CYP450 参与植物三萜骨架修饰, 对三萜的多样性起着关键作用。随着合成生物学的发展, 酵母基因工程菌已成为研究 CYP450 功能的重要工具, CYP450 在植物三萜代谢中的作用研究取得了重大进展。已报道的与三萜生物合成相关的 CYP450 属于 CYP51、CYP71、CYP72、CYP85 和 CYP86 簇。参与乌苏烷型皂苷生物合成的 CYP450 属于 CYP72 和 CYP85 簇, 除 CYP714E19 (CYP72 簇) 外, 其他均属于 CYP716 家族; 参与羽扇豆烷型皂苷生物合成的 CYP450 属于 CYP71 和 CYP85 簇, 其中仅 CYP71D353 为 CYP 71 簇, 其余均为 CYP716 家族基因 (除 CYP716C49 为桦木酸-2 α -羟化酶外, 其余均为羽扇豆醇-28-氧化酶)。已报道的参与葫芦烷型皂苷生物合成相关 CYP450 为 CYP712D、CYP89A、CYP81Q、CYP87D 和 CYP88L 亚家族基因, 属于 CYP71 和 CYP85 簇; 参与齐墩果烷型皂苷生物合成的 CYP450 属于 CYP51、CYP71、CYP72 和 CYP85 簇, 其中仅参与燕麦皂苷生物合成的 CYP51H10 属于 CYP51 簇, 在豆科植物中发现的参与齐墩果烷型皂苷生物合成的 CYP93E 及 CYP72A、CYP714E 和 CYP749A 亚家族基因分别属于 CYP71 和 CYP72 簇, 其余均属于 CYP85 簇 (除 CYP87D16 外, 均属于 CYP716 家族)。CYP716 家族基因广泛参与五环三萜的生物合成, 能氧化五环三萜 C-2、3、6、12、13、16、22、28 多个位点。

CYP450 是三萜生物合成的关键基因, 且是造成三萜苷元多样性的重要原因, CYP450 的克隆和

功能研究具有重要科学意义和应用价值, 对三萜的生物合成途径解析及合成生物学应用起着关键作用。目前预测 CYP450 的功能仍具有一定难度, 因此需要进一步开展 CYP450 的克隆及功能研究, 解析三萜生物合成途径, 为最终通过基因调控实现不同单体三萜的异源生产奠定基础。

参考文献

- [1] Osbourn A, Goss R J M, Field R A. The saponins-polar isoprenoids with important and diverse biological activities [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(7): 1261-1268.
- [2] Nazaruk J, Borzym-Kluczyk M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications [J]. *Phytochem Rev*, 2014, 14(4): 675-690.
- [3] Kasangana P B, Haddad P S, Eid H M, *et al*. Bioactive pentacyclic triterpenes from the root bark extract of *Myrianthus arboreus*, a species used traditionally to treat type-2 diabetes [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(10): 2169-2176.
- [4] Mihoub M, Pichette A, Sylla B, *et al*. Bidesmosidic betulin saponin bearing *L*-rhamnopyranoside moieties induces apoptosis and inhibition of lung cancer cells growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193386.
- [5] Zhang Y, Wang C, Zhang L. Cucurbitacin D impedes gastric cancer cell survival via activation of the iNOS/NO and inhibition of the Akt signalling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(6): 2595-2603.
- [6] Xiao S, Tian Z, Wang Y, *et al*. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives [J]. *Med Res Rev*, 2018, 38(3): 951-976.

- [7] Park J H, Kim J K. Pristimerin, a naturally occurring triterpenoid, attenuates tumorigenesis in experimental colitis-associated colon cancer [J]. *Phytomedicine*, 2018, doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.033.
- [8] Jin Z, Hao J, Yang X, *et al.* Higenamine enhances the antitumor effects of cucurbitacin B in breast cancer by inhibiting the interaction of AKT and CDK2 [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(4): 2127-2136.
- [9] Li K, Kang C, Yin X, *et al.* Ginsenoside Rh₂ inhibits human A172 glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest status via modulating Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 17(2): 3062-3068.
- [10] Arora R, Kumar R, Agarwal A, *et al.* Comparison of three different extracts of *Centella asiatica* for anti-amnesic, antioxidant and anticholinergic activities: *In vitro* and *in vivo* study [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.156.
- [11] Cao S, Dong X, Ho M X, *et al.* Oleanolic acid exerts osteoprotective effects and modulates vitamin D metabolism [J]. *Nutrients*, 2018, 10(2): E247.
- [12] Miettinen K, Pollier J, Buyst D, *et al.* The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis [J]. *Nat Commun*, 2017, doi: 10.1038/ncomms14153.
- [13] 吴立军. 天然药物化学 [M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [14] Moses T, Pollier J, Faizal A, *et al.* Unraveling the triterpenoid saponin biosynthesis of the African Shrub *Maesa lanceolata* [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 122-135.
- [15] Seki H, Tamura K, Muranaka T. P450s and UGTs: Key players in the structural diversity of triterpenoid saponins [J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56(8): 1463-1471.
- [16] Ghosh S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 9(8): 1886.
- [17] 张福生, 孔冉冉, 陈彤垚, 等. P450s 介导远志皂苷等齐墩果烷型植物三萜生物合成的研究进展 [J]. *药学学报*, 2019, 54(6): 1000-1009.
- [18] 徐洁森, 魏建和, 陶韵文, 等. 植物细胞色素 P450 在三萜皂苷生物合成中的功能研究进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(8): 1635-1640.
- [19] 杨杰, 詹亚光, 肖佳雷, 等. 细胞色素 P450 在植物三萜和甾醇骨架修饰中的功能研究进展 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2018, 48(10): 31-49.
- [20] Mizutani M. Impacts of diversification of cytochrome P450 on plant metabolism [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(6): 824-832.
- [21] Mizutani M, Ohta D. Diversification of P450 genes during land plant evolution [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61(1): 291-315.
- [22] Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 194-211.
- [23] Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases [J]. *Annual Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49(1): 311-343.
- [24] Kitagawa I. Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine [J]. *Pure Appl Chem*, 2002, 74(7): 1189-1198.
- [25] Wang X, Hao H, Chu L. Glycyrrhizin inhibits LPS-induced inflammatory mediator production in endometrial epithelial cells [J]. *Microb Pathog*, 2017, doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.032.
- [26] Yin X, Xia G, Zhang L, *et al.* Glycyrrhetic acid attenuates lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in *D*-galactosamine-sensitized mice by up-regulating expression of interleukin-1 receptor-associated kinase-M [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.taap.2017.02.011.
- [27] Chakotiya A S, Tanwar A, Narula A, *et al.* Alternative to antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of *Glycyrrhiza glabra* on membrane permeability and inhibition of efflux activity and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and its *in vitro* time-kill activity [J]. *Microb Pathog*, 2016, doi: 10.1016/j.micpath.2016.07.001.
- [28] Seki H, Ohya 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 14204-14209.
- [29] Hayashi H, Hirota A, Hiraoka N, *et al.* Molecular cloning and characterization of two cDNAs for *Glycyrrhiza glabra* squalene synthase [J]. *Biol Pharm Bull*, 1999, 22(9): 947-950.
- [30] Hayashi H, Huang P, Kirakosyan A, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA encoding β -amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(8): 912-916.
- [31] Seki H, Sawai S, Ohya K, *et al.* Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(11): 4112-4123.
- [32] Tamura K, Seki H, Suzuki H, *et al.* CYP716A179 functions as a triterpene C-28 oxidase in tissue-cultured stolons of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 36(3): 437-445.
- [33] Qiu R, Qian F, Wang X, *et al.* Targeted delivery of

- 20(S)-ginsenoside Rg₃-based polypeptide nanoparticles to treat colon cancer [J]. *Biomed Microdev*, 2019, doi: 10.1007/s10544-019-0374-0.
- [34] Gui Q, Xu Z, Xu K, *et al.* The efficacy of ginseng-related therapies in type 2 diabetes mellitus [J]. *Medicine*, 2016, 95(6): e2584.
- [35] Huq M A, Siraj F M, Kim Y J, *et al.* Enzymatic transformation of ginseng leaf saponin by recombinant β -glucosidase (bgp1) and its efficacy in an adipocyte cell line [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 63(4): 532-538.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] Han J Y, Kim M J, Ban Y W, *et al.* The Involvement of β -amyrin 28-oxidase (CYP716A52v2) in oleanane-type ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(12): 2034-2046.
- [39] Gwak Y S, Han J Y, Choi Y E. Production of ginsenoside aglycone (protopanaxatriol) and male sterility of transgenic tobacco co-overexpressing three *Panax ginseng* genes: *PgDDS*, *CYP716A47*, and *CYP716A53v2* [J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(2): 261-271.
- [40] Dai Z, Liu Y, Zhang X, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides [J]. *Metab Eng*, 2013, doi: 10.1016/j.ymben.2013.10.004.
- [41] Dai Z, Wang B, Liu Y, *et al.* Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast [J]. *Sci Rep*, 2014, doi: 10.1038/srep03698.
- [42] Zhou Y, Ma Y, Zeng J, *et al.* Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in Cucurbitaceae [J]. *Nat Plants*, 2016, doi: 10.1038/nplants.2016.183.
- [43] Ge W, Chen X, Han F, *et al.* Synthesis of cucurbitacin B derivatives as potential anti-hepatocellular carcinoma agents [J]. *Molecules*, 2018, doi: 10.3390/molecules23123345.
- [44] Chen X, Bao J, Guo J, *et al.* Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: A focus on cancer [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2012, 23(8): 777-787.
- [45] Wang L, Yang Z, Lu F, *et al.* Cucurbitane glycosides derived from mogroside IIE: Structure-taste relationships, antioxidant activity, and acute toxicity [J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12676-12689.
- [46] Liu H, Qi X, Yu K, *et al.* AMPK activation is involved in hypoglycemic and hypolipidemic activities of mogroside-rich extract from *Siraitia grosvenorii* (Swingle) fruits on high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Food Funct*, 2018, 10(1): 151-162.
- [47] Di R, Huang M, Ho C T. Anti-inflammatory activities of mogrosides from *Momordica grosvenorii* in murine macrophages and a murine ear edema model [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(13): 7474-7481.
- [48] Liu H, Wang C, Qi X, *et al.* Antiglycation and antioxidant activities of mogroside extract from *Siraitia grosvenorii* (Swingle) fruits [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55(5): 1880-1888.
- [49] Liu D, Ji X, Li R. Effects of *Siraitia grosvenorii* fruits extracts on physical fatigue in mice [J]. *Iran J Pharm Res*, 2013, 12(1): 115-121.
- [50] Jin J S, Lee J H. Phytochemical and pharmacological aspects of *Siraitia grosvenorii*, *luo han kuo* [J]. *Orient Pharm Exp Med*, 2012, 12(4): 233-239.
- [51] Sun B, Chen Y, Wang Y, *et al.* Anti-obesity effects of mogrosides extracted from the fruits of *Siraitia grosvenorii* (Cucurbitaceae) [J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2012, 6(20): 1492-1501.
- [52] Takase S, Saga Y, Kurihara N, *et al.* Control of the 1, 2-rearrangement process by oxidosqualene cyclases during triterpene biosynthesis [J]. *Org Biomol Chem*, 2015, 13(26): 7331-7336.
- [53] Itkin M, Davidovich-Rikanati R, Cohen S, *et al.* The biosynthetic pathway of the nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(47): E7619-E7628.
- [54] Zhang J, Dai L, Yang J, *et al.* Oxidation of Cucurbitadienol Catalyzed by CYP87D18 in the Biosynthesis of Mogrosides from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(5): 1000-1007.
- [55] Shang Y, Ma Y, Zhou Y, *et al.* Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1084-1088.
- [56] Zhang L, Wang Y, Yang D, *et al.* *Platycodon grandiflorus*-An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, doi: 10.1016/j.jep.2015.01.052.
- [57] Kang S H, Kim T H, Shin K C, *et al.* Biotransformation of food-derived saponins, platycosides, into deglycosylated saponins including deglycosylated platycodin D and their anti-inflammatory activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(5): 1470-1477.

- [58] Kim H L, Park J, Jung Y, *et al.* Platycodin D, a novel activator of AMP-activated protein kinase, attenuates obesity in db/db mice via regulation of adipogenesis and thermogenesis [J]. *Phytomedicine*, 2018, doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.227.
- [59] Kim Y J, Choi J Y, Ryu R, *et al.* *Platycodon grandiflorus* root extract attenuates body fat mass, hepatic steatosis and insulin resistance through the interplay between the liver and adipose tissue [J]. *Nutrients*, 2016, doi: 10.3390/nu8090532.
- [60] Li W, Tian Y H, Liu Y, *et al.* Platycodin D exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis [J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(3): 417-428.
- [61] Tamura K, Teranishi Y, Ueda S, *et al.* Cytochrome P450 monooxygenase CYP716A141 is a unique β -amyrin C-16 β oxidase involved in triterpenoid saponin biosynthesis in *Platycodon grandiflorus* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(5): 874-884.
- [62] 陈媛媛, 赖美红, 贡小芸, 等. 毛冬青三萜 C-28 位氧化修饰相关 CYP450 基因的发掘和功能鉴定 [J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(4): 459-467.
- [63] 温羚羚. 毛冬青中乌苏烷型三萜皂苷生物合成相关基因的发掘 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [64] Fukushima E O, Seki H, Ohyama K, *et al.* CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12): 2050-2061.
- [65] Carelli 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.
- [66] Sandeep, Misra R C, Chanotiya C S, *et al.* Oxidosqualene cyclase and CYP716 enzymes contribute to the triterpene structural diversity in the medicinal tree banaba [J]. *New Phytol*, 2018, 222(1): 408-424.
- [67] Khakimov B, Kuzina V, Erthmann P Ø, *et al.* Identification and genome organization of saponin pathway genes from a wild crucifer, and their use for transient production of saponins in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant J*, 2015, 84(3): 478-490.
- [68] Huang L, Li J, Ye H, *et al.* Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *Planta*, 2012, 236(5): 1571-1581.
- [69] Suzuki H, Fukushima E O, Shimizu Y, *et al.* *Lotus japonicus* triterpenoid profile and characterization of the CYP716A51 and LjCYP93E1 genes involved in their biosynthesis in planta [J]. *Plant Cell Physiol*, 2019, 60(11): 2496-2509.
- [70] Andre C M, Legay S, Deleruelle A, *et al.* Multifunctional oxidosqualene cyclases and cytochrome P450 involved in the biosynthesis of apple fruit triterpenic acids [J]. *New Phytol*, 2016, 211(4): 1279-1294.
- [71] Huang J, Zha W, An T, *et al.* Identification of RoCYP01 (CYP716A155) enables construction of engineered yeast for high-yield production of betulinic acid [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(17): 7029-7039.
- [72] Kim O T, Um Y, Jin M L, *et al.* A novel multifunctional C-23 oxidase, CYP714E19, is involved in asiaticoside biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(6): 1200-1213.
- [73] Yasumoto S, Seki H, Shimizu Y, *et al.* Functional characterization of CYP716 family P450 enzymes in triterpenoid biosynthesis in tomato [J]. *Front Plant Sci*, 2017, doi: 10.3389/fpls.2017.00021.
- [74] Misra R C, Sharma S, Sandeep, *et al.* Two CYP716A subfamily cytochrome P450 monooxygenases of sweet basil play similar but nonredundant roles in ursane-and oleanane-type pentacyclic triterpene biosynthesis [J]. *New Phytol*, 2017, 214(2): 706-720.
- [75] Yasumoto S, Fukushima E O, Seki H, *et al.* Novel triterpene oxidizing activity of *Arabidopsis thaliana* CYP716A subfamily enzymes [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(4): 533-540.
- [76] Moses T, Pollier J, Almagro L, *et al.* Combinatorial biosynthesis of sapogenins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 hydroxylase from *Bupleurum falcatum* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1634-1639.
- [77] Moses T, Pollier J, Shen Q, *et al.* OSC2 and CYP716A14v2 catalyze the biosynthesis of triterpenoids for the cuticle of aerial organs of *Artemisia annua* [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(1): 286-301.
- [78] Dai Z, Liu Y, Sun Z, *et al.* Identification of a novel cytochrome P450 enzyme that catalyzes the C-2 α hydroxylation of pentacyclic triterpenoids and its application in yeast cell factories [J]. *Metab Eng*, 2018, doi: 10.1016/j.ymben.2018.10.001.
- [79] Krokida A, Delis C, Geisler K, *et al.* A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis [J]. *New Phytol*, 2013, 200(3): 675-690.
- [80] Jo H J, Han J Y, Hwang H S, *et al.* β -Amyrin synthase (EsBAS) and β -amyrin 28-oxidase (CYP716A244) in oleanane-type triterpene saponin biosynthesis in

- Eleutherococcus senticosus* [J]. *Phytochemistry*, 2017, doi: 10.1016/j.phytochem.2016.12.011.
- [81] Han J Y, Chun J H, Oh S A, *et al.* Transcriptomic analysis of *Kalopanax septemlobus* and characterization of KsBAS, CYP716A94 and CYP72A397 genes involved in hederagenin saponin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 59(2): 319-330.
- [82] Zhan C, Ahmed S, Hu S, *et al.* Cytochrome P450 CYP716A254 catalyzes the formation of oleanolic acid from β -amyrin during oleanane-type triterpenoid saponins biosynthesis in *Anemone flaccida* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1271-1277.
- [83] Fiallos-Jurado J, Pollier J, Moses T, *et al.* Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in *Chenopodium quinoa* leaves [J]. *Plant Sci*, 2016, doi: 10.1016/j.plantsci.2016.05.015.
- [84] Zhang F S, Wang Q Y, Pu Y J, *et al.* *PtOAS* and its applications: CN, 109234291A [P]. 2019-01-18.
- [85] 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(5): 948-959.
- [86] Moses T, Thevelein J M, Goossens A, *et al.* Comparative analysis of CYP93E proteins for improved microbial synthesis of plant triterpenoids [J]. *Phytochemistry*, 2014, doi: 10.1016/j.phytochem.2014.10.002.
- [87] Biazzi E, Carelli M, Tava A, *et al.* CYP72A67 catalyzes a key oxidative step in *Medicago truncatula* hemolytic saponin biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(10): 1493-1506.
- [88] Tzin V, Snyder J H, Yang D S, *et al.* Integrated metabolomics identifies CYP72A67 and CYP72A68 oxidases in the biosynthesis of *Medicago truncatula* oleanate sapogenins [J]. *Metabolomics*, 2019, doi: 10.1007/s11306-019-1542-1.
- [89] Liu Q, Khakimov B, Cárdenas P D, *et al.* The cytochrome P450 CYP72A552 is key to production of hederagenin-based saponins that mediate plant defense against herbivores [J]. *New Phytologist*, 2019, 222(3): 1599-1609.
- [90] Fukushima E O, Seki H, Sawai S, *et al.* Combinatorial biosynthesis of legume natural and rare triterpenoids in engineered yeast [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(5): 740-749.
- [91] Geisler K, Hughes R K, Sainsbury F, *et al.* Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(35): E3360-E3367.
- [92] Qi X Q, 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(49): 18848-18853.
- [93] Castillo D A, Kolesnikova M D, Matsuda S P T. An effective strategy for exploring unknown metabolic pathways by genome mining [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(15): 5885-5894.
- [94] Field B, Osbourn A E. Metabolic Diversification-independent assembly of operon-like gene clusters in different plants [J]. *Science*, 2008, 320(5875): 543-547.
- [95] Boutanaev A M, Moses T, Zi J, *et al.* Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 112(1): E81-E88.
- [96] Field B, Fiston-Lavier A S, Kemen A, *et al.* Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(38): 16116-16121.
- [97] Augustin M M, Ruzicka D R, Shukla A K, *et al.* Elucidating steroid alkaloid biosynthesis in *Veratrum californicum*: Production of verazine in Sf9 cells [J]. *Plant J*, 2015, 82(6): 991-1003.