三萜皂苷生物合成途径及关键酶的研究进展*

许晓双[1,2]，张福生[1**]，秦雪梅[1]

（1. 山西大学中医药现代研究中心　太原　030006；2. 山西大学化学化工学院　太原　030006）

摘　要：三萜皂苷是植物界中具有多种生物活性的一类重要的植物次生代谢产物，是许多药用植物或中药材的重要活性成分之一，阐明三萜皂苷的生物合成途径具有重要的理论意义与广阔的应用前景。近年来，三萜皂苷整个生物合成途径的阐明，尤其是三萜碳环骨架合成及环上复杂官能化等相关酶基因的确定与克隆，仍是众多学者关注与研究的热点。本文对三萜皂苷的生物合成途经和有关“鲨烯及三萜碳环骨架合成和碳环上的复杂官能化”的关键酶进行了综述，为深入阐明三萜皂苷生物合成途径及人工生物合成提供理论基础。

关键词：三萜皂苷　关键酶　细胞色素 P450 单加氧酶　糖基转移酶

doi: 10.11842/wst.2014.11.028　　中图分类号：R284.3　　文献标识码：A

三萜皂苷（Trierpenoid Saponins）作为一类重要的植物次生代谢产物，可增强植物抗病、抗虫害的能力，其体外药理作用主要有抗炎、抗凝血、抗病毒、降低胆固醇、保肝以及作为免疫佐剂等[1-3]。三萜皂苷是经糖苷键把三萜皂苷元和糖连接起来的配糖体，主要分为四环三萜（达玛烷型为主）和五环三萜（齐墩果烷型为主）两大类。目前大部分三萜皂苷存在于双子叶植物中，且广泛分布在五加科、伞形科、豆科、葫芦科、商陆科、木犀科、山茶科、桔梗科、远志科等植物中，许多常用中药如人参、黄芪、柴胡、三七、麦冬、知母、甘草、白头翁、夏枯草等都含有三萜皂苷类成分[4]。

由于三萜皂苷结构的复杂性，从植物中直接提取或通过化学合成间接获得变得较为困难。为了使三萜皂苷能得到更广泛应用，近年来对其研究的重心转移到生物合成途径。目前，提高药用植物中的三萜皂苷含量的方法有组织细胞培养条件的优化、应用诱导子及发根培养体系等，但效果均不明显；而开展中药材中三萜皂苷生物合成基因调控的研究已成为当今研究领域的前沿[5,6]。因此，本文就三萜皂苷的生物合成途径及其有关“鲨烯及三萜碳环骨架的合成和碳环上的复杂官能化”的关键酶研究进展作一综述。

1　三萜皂苷的生物合成途径

目前对三萜皂苷生物合成途径的研究可分为 3 个阶段，包括上游前体物质——3-异戊烯焦磷酸酯（Isopentenyl Diphos-phate，IPP）和 γ，γ-二甲基烯丙焦磷酸酯（Dimethylallyl Diphosphate，DMAPP）的合成，中游碳环骨架的合成和下游通过各种复杂官能化反应形成不同类型的三萜皂苷。

1.1　三萜皂苷前体物质的合成

1.1.1　MVA、MEP 合成途径

甲羟戊酸途径（Mevalonic Acid Pathway，MVA）是萜类化合物生物合成途径发现最早且较传统的途径。此外，在植物细胞中也发现了在内质网（胞

收稿日期：2014-01-22

修回日期：2014-07-04

*　国家自然科学基金委青年科学基金项目（31100244）：基于代谢组学及高通量测序技术筛选远志差异活性成分与皂苷合成关键酶基因，负责人：张福生；山西省科技厅科学技术发展计划（20140313010-1）：山西大宗道地药材优良种质筛选关键技术研究示范，负责人：张福生；科学技术部国家科技支撑计划（2011BAI07B05）：华北区沙棘、远志、葛根、板蓝根、栝楼、北柴胡等规划范化种植基地及其 SOP 优化升级研究，负责人：谢晓亮。

**　通讯作者：张福生，博士，副教授，主要研究方向：中草药资源评价及次生代谢产物研究。

液)、线粒体(或高尔基体)及质体中由 IPP 合成类异戊二烯的 MEP 途径 (2-methyl-D-erythritol-4-phosphate,MEP)。在生物体内被称为“活性异戊二烯”的物质 IPP 和 DMAPP,是萜类化合物和植物甾醇在生物体内合成的共同前体[7,8]。图 1 简要概括了三萜皂苷的生物合成途径及途径中的关键酶。

1.1.2 MVA、MEP 途径合成部位的区别与联系

现有研究表明,古细菌、真菌以及动物体内的 IPP 主要通过 MVA 途径合成,在胞质和内质网中参与倍半萜、三萜和甾体等次生代谢产物的生物合成。而大部分细菌、藻类和植物体则是通过 MEP 途径合成,在线粒体/高尔基体以及质体中参与单萜、二萜、类胡萝卜素和异戊二烯等次生代谢物的生物合成。此外,一些高等植物通过两条生物合成途径(以 MEP 途径为主)可以同时合成生命活动所必需的萜类化合物[9]。MVA 途径和 MEP 途径虽然分别存在于植物细胞内的不同部位,但两者并不是独立的,除了拥有共同合成前体物质 IPP 和 DMAPP 外,还可通过质体膜交换一些常见的中间代谢产物[10]。如 Bick J A 等[11]通过对无方向性的质子转运体系研究,直接证明了上述这种现象;而 Laule O 等[12]发现一些质膜转运蛋白可能参与了质体和胞质中萜类代谢中间产物间交换的调控。这些研究初步证实了 MVA 与 MEP 两条途径在代谢过程中存在着交换现象,因此推测部分单萜、二萜的合成可能来自胞质中的 MVA 途径,而部分甾体分子的形成则可能来自质体中的 MEP 途径。

1.2 三萜皂苷碳环骨架的合成

活性 DMAPP 在烯丙基转移酶和萜类环化酶的催化下,合成了三萜皂苷的碳环骨架。根据烯丙基底物长度的不同,烯丙基转移酶可分为:香叶基二磷酸合成酶(Geranyl Diphosphate Synthase,GPS)、法呢基二磷酸合成酶 (Farnesyl Diphosphate Synthase,FPPS) 和香叶基香叶基焦磷酸 (Geranylgeranyl Pyrophosphate,GGPP)合成酶。在高等植物体内,C_{10} 骨架的香叶基二磷酸(Geranyl Diphosphate,GPP)是由 GPS 催化 1 分子 IPP 以及 1 分子 DMAPP,经头尾缩合而形成的;然后另 1 分子的 IPP 和 GPP 在 FPPS 催化下,形成具 C_{15} 骨架的法呢基二磷酸(Farnesyl-diphosphate,FPP),最后 FPP 再与 1 分子 IPP 缩合成 GGPP。接着角鲨烯合酶(Squalene Synthase,SS)在环丙甲醇二磷酸参与下,催化 2 分子 FPP 以头—头还原偶联的形式,发生内环化反应,生成得到 1 分子的鲨烯(Squalene,SQ)。SQ 形成后,在鲨烯环氧酶(Squalene Epoxidase,SE)的催化下,在 C=C 之间插入一个氧原子,形成 2,3-环氧角鲨烯(2,3-epoxy-squalene),见图 2。因为在三萜皂苷的中游碳环骨架的生物合成途径中起到了关键作用,所以 SS 与 SE 被认为是此阶段的关键酶。

1.3 不同类型三萜皂苷的生物合成

由环氧角鲨烯环化酶(Epoxy Squalene Cyclase,OSCs)催化 2,3-氧化鲨烯的环化反应,是三萜皂苷与甾醇生物合成的关键步骤[13,14]。不同三萜化合物具有不同立体构型的选择,OSCs 是多基因家族,由环氧角鲨烯环化,可产生 100 多种不同骨架的三萜化合物,然后通过细胞色素 P450 单加氧酶(Cytochrome P450 Monooxygenase,CYP450)、糖基转移酶(UDP-glycosyltransferase,UGT)和糖苷酶,相继对三萜类骨架进行氧化置换及糖基化等化学修饰,最终获得不同类型的三萜皂苷产物(图 3)。在三萜皂苷的中、下游生物合成途径中参与的 OSCs、CYP450、UGT 等均属于多基因家族(后文会有详细介绍)。图 3 以典型的人参皂苷为例,阐明了三萜皂苷的下游合成途径,2,3-氧化鲨烯分别经过不同的 OSCs 催化,得到羽扇豆醇 (Lupeol)、达玛烯二醇(Dammaranediol)、环阿齐醇(Cycloartanol)、α-香树酯 (α-amyrin) 以及 β-香树酯 (β-amyrin),并经 CYP450 和 UGT 修饰,而得到羽扇豆烷型皂苷(Lupinealkyl-type Saponins)、人参皂苷 Rb_1 和 Rg_1(Panaxadiol-type Ginsengoside-Rb_1,-Rg_1)、植物甾醇(Phytosterols)、乌苏烷型皂苷 (Usualkl-type Saponins) 以及齐墩果烷型人参皂苷 R_0 (Oleanane-type Ginsenoside R_0)。

2 三萜皂苷生物合成途径中的关键酶

参与三萜皂苷生物合成途径的酶,大致可以分为 3 类:①上游的关键酶:催化 IPP 和 DMAPP 生成,如 MVA 途径中的 HMGR,MEP 途径中的 DXPS、DXR;②中游的关键酶:催化 IPP、DMAPP 形成形式和分子量各异的萜类碳环骨架化合物以及中间体,如 SS、SE、OSCs 等;③下游的关键酶:中间体和萜类化合物通过异构化、甲基化、羟基化、脱甲基化以及还原和加成等反应的复杂结构修饰得到种类众多的三萜皂苷[15],如 CYP450、UGT。由于三萜皂苷上游

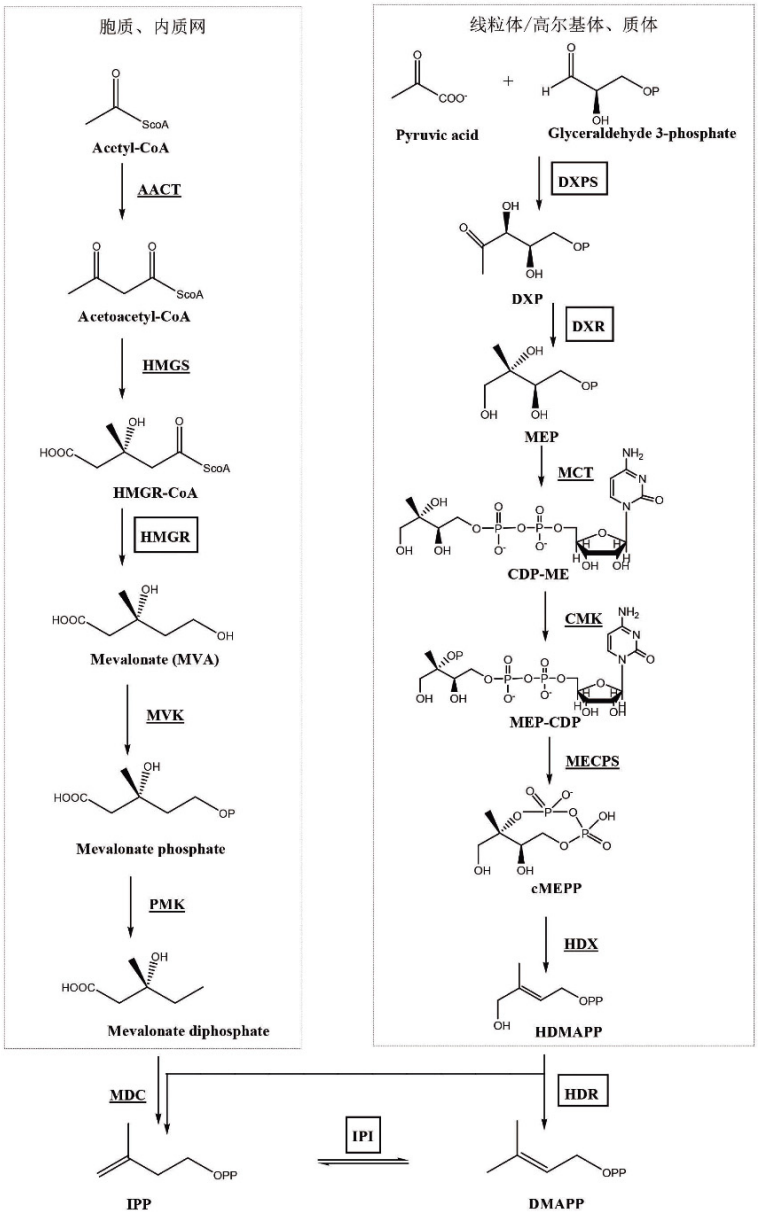

图1　MVA、MEP 途径中 IPP 与 DMAPP 的生物合成

注：实框为关键酶，虚框表示合成部位。Acetyl-CoA：乙酰辅酶 A；Mevalonate diphosphat：甲羟戊酸二磷酸；Pyruvic acid：丙酮酸；Glyceraldehyde-3-phosphate：甘油醛-3-磷酸；CDP-ME：4-二磷酸胞苷-2-甲基-D-赤藓糖醇；CDP-MEP：4-二磷酸胞苷-2-甲基-D-赤藓糖醇-2-磷酸；cMEPP：2-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环二磷酸；HDMAPP：1-羟基-2-甲基-3-(E)-丁烯基-4-焦磷酸；AACT：acetyl-CoA acetyhransferase 乙酰辅酶 A 乙酰转移酶；HMGS：3-hydroxy-3-methylglutatryl-CoA synthase 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶；HMG-CoA：3-hydroxy-3-methylglutatryl-CoA 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A；HMGR：3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶；MVK：Mevalonate kinase 甲羟戊酸激酶；PMK：Phosphomevalonate kinase 磷酸甲羟戊酸激酶；MDC：Mevalonate pyrophosphate decarboxylase 甲经戊酸焦磷酸脱羧酶；IPI：IPP isomerase IPP 异构酶；DXPS：1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶；DXP：1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸；DXR：1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reduetoisomerase 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶；MCT：4-diphosphoeytidyl-2-methyl-D-erytbritol synthetase 4-二磷酸胞苷-2-甲基-D-赤藓糖醇合成酶；CMK：4-diphosphoeytidyl-2-methyl-D-erythritol kinase 4-二磷酸胞苷-2-甲基-D-赤藓糖醇激酶；MECPS：2-甲基-D-赤藓糖-2,4-环二磷酸合酶 2-methyl-D-erythritol-2,4-eyelodiphosphate synthase；HDX：l-hydroxy-2-methyl-butenyl-4-diphosphate synthase 1-羟基-2-甲基-3-(E)-丁烯基-4-焦磷酸合酶；HDR：IPP/DMAPP synthase IPP/DMAPP 合酶。

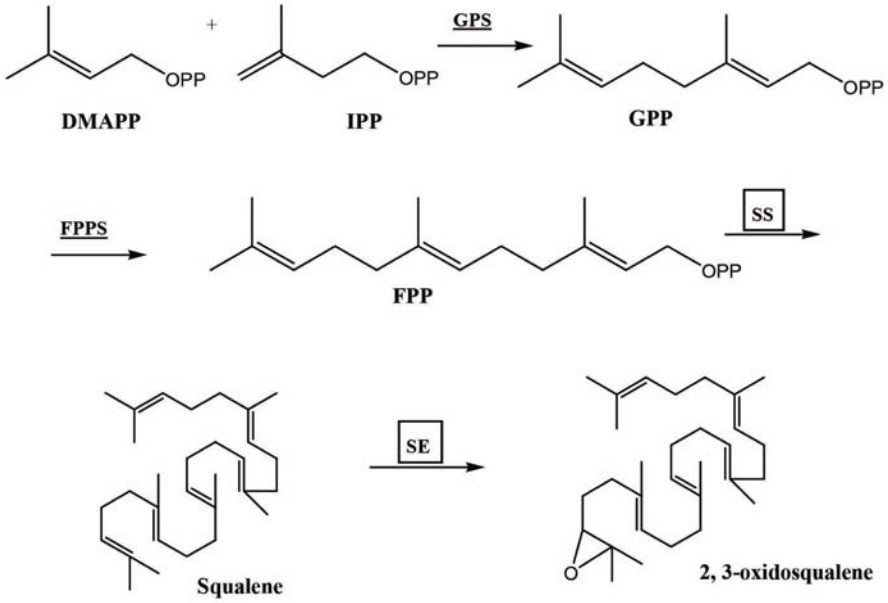

图 2 从 IPP 到 2,3-氧化鲨烯的生物合成途径

注:实框为关键酶。

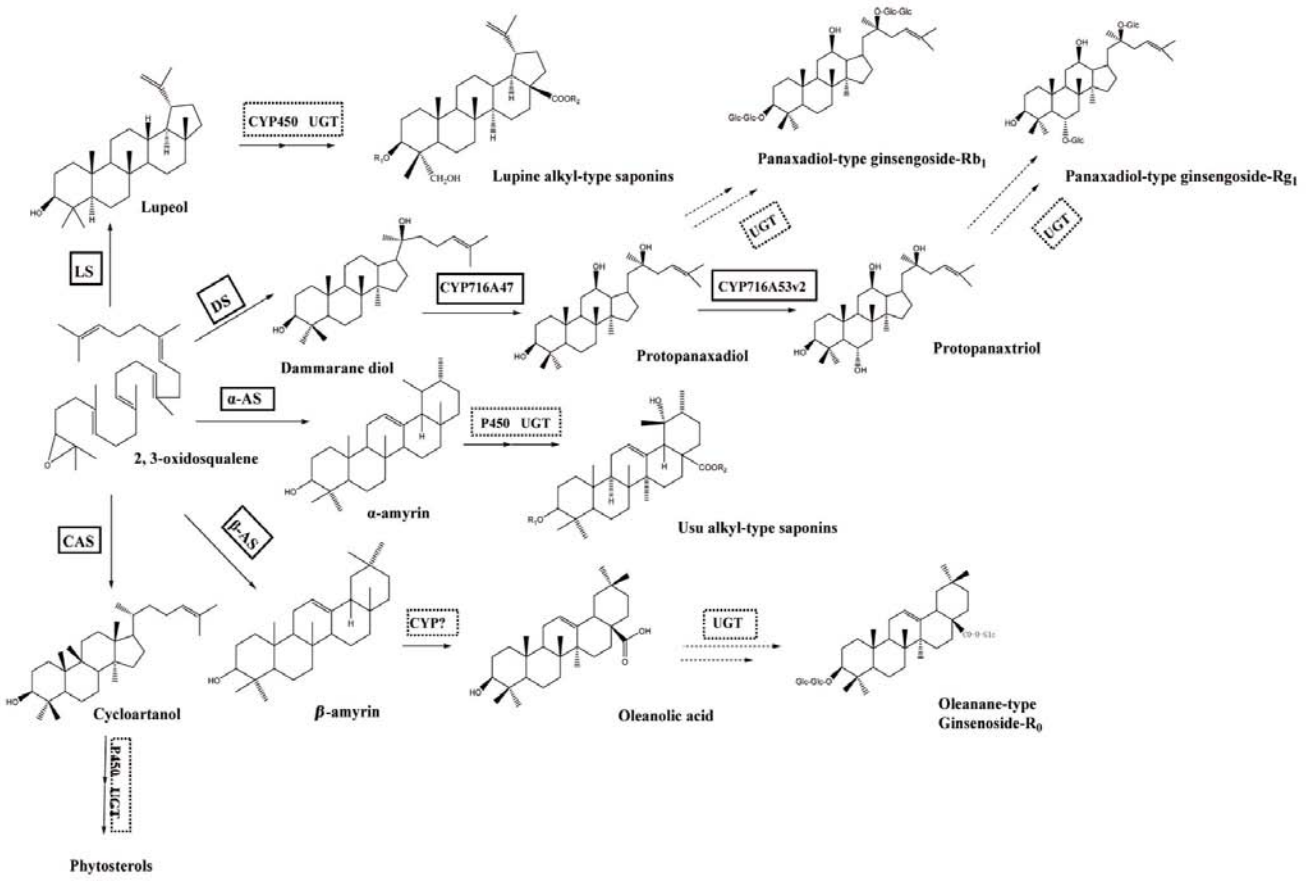

图 3 不同类型三萜皂苷的生物合成途径

注:实框为已阐明的酶,虚框为暂未阐明的酶。

途径中的关键酶的已有研究较多且较清楚，本文就不再赘述，现主要对中游、下游的关键酶作重点介绍。

2.1 鲨烯合成酶(SS)

SS 催化 FPP 合成 SQ，也是三萜皂苷生物合成的关键步骤，而 FPP 则通过多种酶合成数目众多的异戊二烯化合物，如三萜、倍半萜、二萜、甾醇等；且 SS 在三萜皂苷和植物甾醇的生物合成中有很强的调控功能，目前，在植物体各种组织中均发现了其转录物且在枝叶顶部和根部中含量最高。此外，诱导 SS 基因的表达，可进而影响到 SE、β-香树脂合成酶(Beta-amyrin synthase，β-AS)和环阿齐醇合成酶(Cycloarteno Synthase，CAS)基因的表达水平。Lee M H 等[16]用茉莉酮酸甲酯(Methyl Jasmonate，MeJA)处理人参不定根诱导 SS 上调，可以显著上调 SE、β-AS 水平；虽然 CAS 的基因表达水平没有改变，但在转基因的人参不定根中，诱导 SS 上调可使 SE、β-AS、CAS 水平显著提高，说明 SS 是三萜皂苷合成中起关键作用的调控酶，因其活性的升高可使三萜皂苷及植物甾醇的含量升高。目前，利用功能互补、荧光定量 PCR 技术(RT-PCR)与 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)结合以及 RT-PCR 与筛库结合的方法，克隆并鉴定了人参、甘草、葡萄、三七、拟南芥等多种植物中的 SS 酶基因[17]。

2.2 鲨烯环氧酶(SE)

SE 作为三萜皂苷中游碳环骨架生物合成途径中的关键酶之一，其亚细胞定位在质体。SE 是在 C=C 之间插入 1 个氧原子，催化 SQ 形成 2,3-氧化鲨烯的细胞膜结合酶。有关人参皂苷生物合成研究结果已证明了人参基因组中的 SE 形成了一个小的多基因家族。在研究三七总皂苷的生物合成研究中也发现三七鲨烯环氧酶与人参鲨烯环氧酶同源性达到 98%，而与其他 SE 酶家族成员的同源性差异则较大，且由于三七鲨烯环氧酶基因在根中高表达，表明了其表达具有组织特异性[18,19]。在苜蓿的研究中也发现的 SE 酶基因(SE1 和 SE2)与人参中公认的 SE 酶分别有 77.1%和 74.4%的同源性，而用 MeJA 处理苜蓿后，SE1 转录物没有被诱导而 SE2 转录物却有很高的诱导率，说明在三萜皂苷或植物甾醇的生物合成途径中，它们发挥了重要作用[20]。

2.3 氧化鲨烯环化酶(OSCs)

2,3-氧化鲨烯在各种 OSCs 的催化下，经过质子化、环化、重排和去质子化反应，得到三萜皂苷和植物甾醇的前体，这是产生种类各异的三萜皂苷的基础及关键反应。OSCs 属于超家族酶，主要催化包括甾醇类和三萜皂苷骨架的各种环化酶。植物中的各种 OSCs 的氨基酸序列呈高度的同源性，分为两个部分：一是 CAS 在系统进化树上的，目的是表明该酶基因存在于在植物分化为不同的物种前；二是除 CAS 以外的，由其他三萜合成酶家族各成员相互间表现出高度同源性而形成的。目前，从不同植物中已经分离出 4 个编码 OSCs 酶的基因，即达玛烯二醇合成酶(Dammarenediol Synthase，DS)、β-AS、羽扇醇合成酶(Lupeol Synthase，LS)和 CAS[21,22]。图 3 中详细描述了由以上这些 OSCs 酶，包括以上 4 个以及 α-香树酯合成酶(α-amyrin Synthase，α-AS)在内的催化合成具体的三萜类皂苷及甾醇类的过程。大部分的四环和五环三萜皂苷都是由达玛烯(Dammarane)和齐墩果烷(Oleanane)衍化得到的，所以 β-AS 和 DS 对各种三萜皂苷的合成均起到了关键性的作用。

2.4 细胞色素(P450/CYP450)

植物 CYP450 是植物中较大的酶蛋白家族，主要参与萜类、生物碱类、苯丙烷类、生菁糖苷类、植物激素等物质的生物合成，是一类具有广泛催化活性的，以铁卟啉为辅基的膜结合蛋白。植物 CYP450 催化的共同特征是在作用物分子中加入一个氧原子，在下游途径中催化三萜骨架上惰性甲基和亚甲基的氧化[23,24]。目前发现的典型的 CYP450 主要有 A(主要连接底物与氧分子)、B、C、D (通过共价键连接铁血红素)4 个特征性的结构域。

基于植物 CYP450 催化反应的复杂性，目前有关其催化机制的研究相对较少，而三萜皂苷结构复杂多样性主要取决于其复杂的后修饰过程，因此对 CYP450 的研究还在日益增加。目前的技术方法主要是依靠高通量测序等，如从西洋参根中得到 150 个 CYP450[25]，从三七根中得到 174 个 CYP450s[26]。现在已命名了 5 100 个植物的 CYP450 酶基因*。陆生植物的 CYP450 可分为 11 个簇(Clans)，包括单家族 簇 (CYP51、CYP74、CYP97、CYP710、CYP711、

* http://drnelson.uthsc.edu/GytochromeP450.html.

CYP727、CYP746）和多家族簇（CYP71、CYP72、CYP85、CYP86）[27]。表 1 列举的是目前已证明参与三萜皂苷生物合成的 CYP450。其中，CYP93E1、CYP93E2、CYP93E3 来源于 CYP71 簇，CYP716A12、CYP88D6 归属于 CYP85 簇，CYP51H10 为 CYP51 簇，CYP72A154、CYP716A53v2 为 CYP72 簇[28,29]。这些 CYP450 除了来自于一个特定的进化起源，也可以源自远距离的其它家族和簇系统[30]。

现在从已知的 CYP450 来推测新的基因以及确定其功能有一定的难度，因为依据现有的研究序列比对结果，除了 CYP93E1、CYP93E2 和 CYP93E3 在氨基酸水平上的序列一致性相关性较好外，其它已证明参与三萜皂苷合成的 CYP450 的相关性均较低。迄今为止，对 CYP450 的晶体结构和相应的蛋白结合位点均没有很清楚的解释，从而阻碍了有关三萜皂苷生物合成下游途径的后修饰机制的阐明。

2.5 糖基转移酶（UGT）

三萜皂苷生物合成的下游途径还涉及到 UGT 催化三萜皂苷骨架糖基化的反应。UGT 在生物体内催化已活化的糖连接到不同的受体分子上，通过对一系列化合物的激活、抑制或者调节溶解度，从而参与植物体多种调控和代谢途径。目前已发现的催化植物中天然产物糖基化的酶均属于糖基转移酶家族 1，其作用是将活性糖基从核苷糖（尿嘧啶核苷二磷酸糖）转移到包括次生代谢物在内的多种植物小分子化合物受体上，因此常缩写成 UGT[39]。

UGT 基因是生物体内一个种类众多、具有高度专一性的超基因家族，目前基于 EST 筛选（诱导表达调节及与 β-AS 共表达情况分析）、简并 PCR 和 RACE-PCR 相结合、SSR 标记的图位克隆、筛选酵母表达文库等方法，已证实参与皂苷生物合成的 UGT 包括 8 个参与三萜皂苷生物合成以及 2 个参

表 1 参与三萜皂苷生物合成的 CYP450

CYP450	植物	功能	参考文献
CYP93E1	大豆 *Glycine max*	β-香树脂醇-24-羟化酶和槐花二醇-24-羟化酶	[31]
CYP51H10	燕麦 *Avena sativa*	尚未明确	[32]
CYP88D6	甘草 *Glycyrrhizae uralensis*	β-香树脂醇-11-氧化酶	[33]
CYP93E3	甘草 *G. uralensis*	β-香树脂醇-24-羟化酶	[33]
CYP72A154	甘草 *G. uralensis*	11-羰基-β-香树脂醇-30-氧化	[34]
CYP93E2	蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula*	β-香树脂醇-24-羟化酶	[35]
CYP716A12	蒺藜苜蓿 *M. truncatula*	β-香树脂醇-28-氧化酶	[36]
CYP716A47	人参 *Panax ginseng*	催化 12-达玛烯醇醇转化为原人参二醇	[37]
CYP716A53v2	人参 *P. ginseng*	催化 6-原人参二醇转化为原人参三醇	[38]

表 2 参与三萜皂苷生物合成的 UGT

UGT	植物种类	功能	参考文献
UGT71G1	蒺藜苜蓿 *M. truncatula*	苜蓿酸和常春藤皂苷元的糖基化	[40]
UGT73K1	蒺藜苜蓿 *M. truncatula*	常春藤皂苷元和大豆皂醇 B、E 的糖基化	[40]
UGT73F3	蒺藜苜蓿 *M. truncatula*	常春藤皂苷元和其它齐墩果烷型皂苷元 C-28 位羧基的葡糖基化	[35]
UGT74M	王不留行 *Saponaria vaccaria*	齐墩果烷型皂苷元的 C-28 位糖基化	[44]
UGT73P2	大豆 *Glycine max*	催化半乳糖基连接到葡糖醛酸化的大豆皂醇 B	[45]
UGT91H4	大豆 *G. max*	催化鼠李糖基连接到二糖基化的大豆皂苷 III 的半乳糖基上	[45]
UGT73F4	大豆 *G. max*	催化木糖基连接到大豆 A 组皂苷 C-22 位的阿拉伯糖残基上	[46]
UGT73F2	大豆 *G. max*	催化葡糖基连接到大豆 A 组皂苷 C-22 位的阿拉伯糖残基上	[46]
SaGT4A	刺茄 *Solanum aculeatissimum*	催化多种甾体皂苷元如薯蓣皂苷元纽阿替皂苷元剑麻皂苷元等的 3-*O*-葡糖基化，也催化一些甾体生物碱的糖基化	[47]
StSGT	马铃薯 *Solanum tuberosum*	催化多种甾体皂苷元如薯蓣皂苷元纽阿替皂苷元剑麻皂苷元等的 3-*O*-葡糖基化，也催化一些甾体生物碱的糖基化	[48,49]

与甾体皂苷生物合成(见表2)。其他植物如蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中有164个UGT序列,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现了包括8个假基因在内的120个UGT基因序列[40]。由于植物体内众多UGT基因阻碍了通过同源性鉴定单一基因可能参与的特定代谢途径的研究;而决定催化反应底物的关键是UGT的蛋白立体结构,如松叶菊中的两个UGT基因编码的氨基酸序列只有19%的一致性[41],但催化相同的底物。因此目前仍不能仅仅通过序列分析确定基因编码酶的确切生物功能。但随着测序技术的深入发展研究,仍然有许多药用植物的UGT基因序列正在不断的被发现[42,43]。现有研究结果表明,UGT的催化活性大多来自基因、大肠杆菌或酵母菌株异源表达产物的体外催化,显示出了其催化底物的多样性与复杂性,但人们对UGT体内活性特征和基因表达所受调控状况的了解则较少。因此,明确UGT基因编码酶所催化的底物以及验证其确切的生物功能具有广阔的研究前景。

3 总结

三萜皂苷作为许多药用植物或中药材的重要有效成分之一,深入研究及阐明其生物合成途径及关键酶基因克隆的机理, 尤其是多基因家族的酶,不论对其的基础研究还是提高中药材中有效成分的含量,都有十分重要的理论及现实意义。虽然目前对三萜皂苷生物合成途径已有了大量的研究,但由于其中、下游合成途中的多基因家族酶的结构及类型的复杂性,使得其合成具体步骤还未能得到清晰的阐明。因此如果想要利用生物代谢工程的方法合成三萜皂苷,还需要对其碳环骨架建立后复杂的官能团反应进行深入研究。随着三萜皂苷类生物合成关键酶基因调控研究的深入,阐明三萜类皂苷生物合成途径中的关键酶基因及其协同性,人工方法调控改造关键酶基因水平达到其高表达目的,最终通过细胞培养、生物转化、发根培养等工业化生产,将会是实现大规模生产三萜皂苷类活性成分的有效方法。

参考文献

1 Henry M, Rahier A, Taton M. Effect of gypsogenin 3-*O*-glucuronide pretreatment of *Gypsophila paniculata* and *Saponaria officinalis* cell suspension cultures on the activities of microsomal 2,3-oxidosqualene cycloartenol and amyrin cyclases. *Phytochemistry*, 1992, 31:3855-3859.

2 程晓华,熊玉卿.五环萜皂苷的药理作用研究进展.中草药,2007,38(5):792-795.

3 莫微,林志宏.中药远志改善记忆障碍研究进展.世界科学技术-中医药现代化,2012,14(4):1913-1916.

4 陈颖,孙海燕,曹银萍.三萜皂苷生物合成途径研究进展.中国野生植物资源,2012,83(6):15-17.

5 罗志勇,陆秋恒,刘水平,等.人参植物皂苷生物合成相关新基因的筛选与鉴定.生物化学与生物物理学报,2003,35(6):554-560.

6 马百平,冯冰,黄鸿志,等.中药及其成分的生物转化.世界科学技术-中医药现代化,2010,12(2):150-154.

7 Newman J D, Chappll J. Isoprenoid biosynthesis in plant: carbon partitioning within the cytopl-asmic pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34(2):95-106.

8 Choi D, Ward L, Bostock R M. Differential in duction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reduetase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elieitor arechidonic acid. *Plant Cell*, 1992, 4(10):1333-1344.

9 Piel J, Donath J, Bandemer K, *et al*. Mevalonate-independent biosynthesis of terpenoid volatiles in plants: induced and constitutive emission of volatiles. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37(18):2478-2481.

10 Botella-Pavfia P, Besumbes O, Phillips M A, *et al*. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethyl hutenyl diphosphalereduetase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J*, 2004, 40(2):188-199.

11 Biek J A, Lange B M. Metabolic crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isopreneoid biosynthesis: unidircetional transports of intermediates across the ehloroplast envelope membrane. *Areh Biochem Biophys*, 2003, 415(2):146-154.

12 Laule O, Furholz A, Chang H S, *et al*. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proe Nat Aead Sci*, 2003, 100(11):6866-6871.

13 Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75:31-49.

14 Tansakul P, Shibuya M, Kushiro T, *et al*. Dammarenedio-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *FEBS Letters*, 2006, 580(22):5143-5149.

15 马靓,丁鹏,杨广笑,等.植物类萜生物合成途径及关键酶的研究进展.生物技术通报,2006(增刊):22-30.

16 Lee M H, Jeong J H, Seo J W, *et al*. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* over expressing squalene synthase gene. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8):976-984.

17 张风侠,梁新华,王俊.植物三萜皂苷生物合成及关键酶鲨烯合酶的研究进展.农业科学研究,2009,30(3):64-66.

18 He F, Zhu Y, He M, *et al*. Molecular cloning and characterization of the gene encoding squalene epoxidase in *Panax notogiseng*. *DNA Seq*, 2008, 9(3):270-273.

19 陈建,赵德刚.植物萜类生物合成相关酶类及其编码基因的研究

进展.分子生物育种,2004,2(6):757-764.

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

21 Choi D W, Jung J, Ha Y I, *et al*. Analysis of transcripts in methyl jasmanate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenoides and other secondary metabolites. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8):557-566.

22 Hayashi H, Huang P, Inoue K. Up-regulation of soya saponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(4):404-411.

23 Nelson D R, Ming R, Alam M, *et al*. Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes. *Trop Plant Biol*, 2008, 1(3-4): 216-235.

24 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.世界科学技术-中医药现代化,2012,14(1): 1177-1181.

25 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. *BMC Genomics*, 2010, 11:262.

26 Han J Y, Kim H J, Kwon Y S, *et al*. The cytochrome P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12):2062-2073.

27 Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J*, 2011, 66(1):194-211.

28 Mizutani M, Ohta D. Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Plant Biol*, 2010, 61:291-315.

29 Sui C, Zhang J, Wei J H, *et al*. Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saiko saponins. *BMC Genomics*, 2011, 12(1):539.

30 Augustin J M, Kuzina V, Andersen S B, *et al*. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 2011, 72(6):435-457.

31 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. *FEBS J*, 2006, 273 (5): 948-959.

32 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. *PNAS*, 2006, 103(49):18848-18853.

33 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. *PNAS*, 2008, 105(37):14204-14209.

34 Seki H, Sawai S, Ohyama K, *et al*. Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *Plant Cell*, 2011, 23(11):4112-4123.

35 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*. *Plant Cell*, 2010, 22 (3):850-866.

36 Carell M, Biazzi E, Panara F, *et al*. *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins. *Plant Cell*, 2011, 23(8):3070-3081.

37 Han J Y, Kim H J, Kwon Y S, *et al*. The CytP450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiology*, 2011, 52(12):2062-2073.

38 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*. *Plant Cell Physiology*, 2012, 53(9):1535-1545.

39 Paquette S, Moller B L, Bak S. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry*, 2003, 62(3):399-413.

40 Achnine L, Huhman D V, Farag M A, *et al*. Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, 2005, 41 (6):875-887.

41 Vogt T. Substrate specificity and sequence analysis define apolyphyletic origin of betanidin 5- and 6-*O*-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. *Planta*, 2002, 214(3):492-495.

42 Sui C, Zhang J, Wei J H, *et al*. Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saiko saponins. *BMC Genomics*, 2011, 12:539.

43 吴琼,孙超,陈士林,等.转录组学在药用植物研究中的应用.世界科学技术-中医药现代化,2010,12(3):457-462.

44 Meesapyodsuk D, Balsevich J, Reed D W, *et al*. Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria* cDNA sencoding β-amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. *Plant Physiol*, 2007, 143(2):959-969.

45 Shibuya M, Nishimura K, Yasuyama N, *et al*. Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycinemax*. *FEBS Lett*, 2010, 584(11):2258-2264.

46 Sayama T, Ono E, Takagi K, *et al*. The Sg-1 glycosyltransferase locus regulates structural diversity of triterpenoid saponins of soybean. *Plant Cell*, 2012, 24(5):2123-2138.

47 Kohara A, Nakajima C, Hashimoto K, *et al*. Anovel glucosyltransferase involved in steroid saponin biosynthesis in *Solanu maculeatissimum*. *Plant Mol Biol*, 2005, 57(2):225-239.

48 Kohara A, Nakajima C, Yoshida S, *et al*. Characterization and engineering of glycosyltransferases responsible for steroid saponin biosynthesis in *Solanaceous* plants. *Phytochemistry*, 2007, 68(4):478-486.

49 Moehs C P, Allen P V, Belknap W R. Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J*, 1997, 11(2):227-236.

Research Advances on Triterpenoid Saponins Biosynthesis and Its Key Enzymes

Xu Xiaoshuang[1,2], *Zhang Fusheng*[1], *Qin Xuemei*[1]

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China;
2. College of Chemistry and Chemical Engineering of Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: As an important kind of plant secondary metabolites and widely distributed in the plant kingdom, triterpenoid saponins have a variety of biological activities. The constitution and content of triterpenoid saponin are determined by some key enzymes and their expressing level in triterpenoid saponins biosynthesis pathway. So, it is very important to illuminate the molecular mechanism of triterpenoid saponins biosynthetic pathway. In recent years, illumination of the entire biosynthetic pathway especially the confirmation and cloning of the key enzymes, such as squalene synthase, squalene epoxidase, cytochrome P450 monooxygenase and UDP-glycosyltransferase, had become one of the hot spots by many scholars. In this paper, the entire biosynthetic pathway and some kinds of key enzymes involved in the synthesis of carbon skeleton, and its oxidation, and glycation were reviewed for further demonstrating the biosynthetic pathway of triterpenoid saponins and providing a theoretical basis for artificial biosynthesis.

Keywords: Triterpenoid saponins, key enzymes, cytochrome P450 monooxygenase, UDP-glycosyltransferase

（责任编辑:李沙沙　张志华,责任译审:王　晶）