

· 专论 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.21.003

金铁锁三萜皂苷合成生物学研究进展*

李畏嫻^{1,2}, 张爱丽², 钱子刚², 陈洁¹, 孙辉¹, 陈永刚¹, 刘幸^{1△}

(1. 云南省昆明市第三人民医院, 云南 昆明 650041; 2. 云南中医学院, 云南 昆明 650500)

摘要:金铁锁是国家二级保护珍稀濒危药用植物,三萜皂苷类化合物是其主要活性成分。目前,利用合成生物学构建酿酒酵母细胞工厂高效生产药用植物中有效化合物的研究已在逐步完善,为实现微生物发酵生产药用中药三萜类有效成分提供了基础。掌握金铁锁有效成分三萜皂苷的生物合成途径,是进行金铁锁定向育种和利用合成生物学进一步开发人工细胞工厂发酵生产金铁锁总皂苷等活性成分的基础。该文利用合成生物学的方法,在酿酒酵母细胞中进行金铁锁三萜皂苷的生物合成途径异源重建,以解析金铁锁有效成分生物合成的途径。

关键词:金铁锁;三萜皂苷;合成生物学;生物合成途径;酿酒酵母;进展

中图分类号:R932;R284

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)21-0009-04

Research Progress of the Synthetic Biology of Triterpenoid Saponins from *Psammosilene Tunicoides*

LI Weixian^{1,2}, ZHANG Aili², QIAN Zigang², CHEN Jie¹, SUN Hui¹, CHEN Yonggang¹, LIU Xing¹

(1. The Third People's Hospital of Kunming, Kunming, Yunnan, China 650041; 2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: *Psammosilene tunicoides* is a rare and endangered medicinal plant of the national second-class protection, and its main active ingredient is triterpenoid saponins. At present, the use of synthetic biology to construct *Saccharomyces cerevisiae* cell factories to efficiently produce effective compounds in medicinal plants has been gradually improved, which provides a basis for the realization of microbial fermentation to produce the active ingredient of the medicinal Chinese terpenoids. Mastering the biosynthetic pathway of triterpenoid saponins is the foundation for directive breeding of *Psammosilene tunicoides* and fermenting and producing the active ingredient of *Psammosilene tunicoides* by furthermore developing the artificial cell factories using synthetic cell biology. For realizing the biosynthetic pathway analysis of the active ingredient of *Psammosilene tunicoides*, this research uses the method of synthetic biology to make heterologous reconstruction of the biosynthetic pathway in triterpenoid saponins from *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: *Psammosilene tunicoides*; triterpenoid saponins; synthetic biology; biosynthetic pathway; *Saccharomyces cerevisiae*; progress

金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu 是石竹科单种属植物^[1],主要药理作用为镇痛、抗炎、抗风湿、免疫调节、抑菌、抗氧化等。目前对金铁锁的研究主要集中在根部,其主要化学成分是三萜皂苷和环肽类化合物^[2],皂苷的母核结构为齐墩果烷型。近年来,对金铁锁化学成分的研究主要为三萜皂苷,较为集中的是齐墩果烷型五环三萜皂苷化合物,目前皂苷类成分被认为是主要活性成分之一^[3]。金铁锁收录入《中国植物红皮书》中,属国家二级保护植物^[4]。目前,由于人工栽培技术还不完善,金铁锁药材主要通过野生采挖,对野生植物资源造成严重破坏,且由于其自然分布区域狭窄且生长环境极其恶劣,导致自然分布资源迅速减少。通过化学合成或半化学合成其有效成分在一定程度上能降低成本,提高合成效率,但毒性大,工艺流程复杂,环境污染严重。基于合成生物学方法在微生物体内重建金铁锁三萜皂苷的生成途径,实现金铁锁药用有效成分生物合成途径解析,并在此基础上通过研究生物合成途径和关键酶基因的挖掘鉴定与调控,通过金铁锁三萜皂苷人工细胞工厂

开发直接发酵法生产金铁锁药用有效成分。

1 有效成分

1.1 萜类化合物

萜类化合物又称类异戊二烯,广泛存在于植物界的一类天然烃类化合物,基本组成骨架为异戊二烯单元,分子式为 $(C_5H_8)_n$ 。根据所含异戊二烯数目分为单萜、倍半萜、双萜、三萜、四萜、多萜等。次生代谢萜类化合物通常用作食品添加剂、农药和药物等,具有重要的经济价值^[5]。由黄花蒿中提取到了青蒿素,是治疗疟疾的强有效药^[6]。在临床,中药中所含有的萜类化合物为重要有效成分。近年的研究表明,桦木酸及其衍生物具有较多生物活性,对多种肿瘤细胞有较强毒杀效应而对正常细胞无杀伤力^[7]。萜类生物合成途径是生物体内主要的代谢途径,随着萜类化合物的发现及其在生活、生产中的应用,其生物合成途径的研究也受到极大关注。

1.2 三萜类化合物

三萜类化合物是由6个异戊二烯结构单元联结而成,多数含30个C原子,大多数三萜皂苷元以五环三

*基金项目:云南省科技计划中医联合面上项目[2017FF117-030]。

第一作者:李畏嫻,硕士研究生,研究方向为分子生物学,(电子信箱)962402688@qq.com。

△通信作者:刘幸,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)254914514@qq.com。

萜形式存在。五环三萜皂苷元的碳架主要有齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扇豆烷型、木栓烷型^[8]等。三萜类化合物是中草药中的重要有效成分,其生物合成途径为甲羟戊酸途径(MVA)。目前,对五环三萜化合物的研究主要集中在齐墩果酸。

1.3 三萜皂苷的合成生物学

齐墩果烷广泛存在三萜植物中,主要以苷的形式存在,但亦有以游离状态形式存在。其中分布较广的皂苷元为齐墩果酸,存在于中药女贞子和青叶胆全草中,具有降转氨酶作用,是治疗肝炎的有效药物^[9]。大部分植物中都有五环三萜皂苷,在植物中最主要的功能是防御病原体和害虫;在人体中可增强药用植物有效成分的产生,提高药用价值。齐墩果烷类三萜化合物具有抗癌、抗病毒、抗氧化及保肝等作用,如齐墩果酸作为齐墩果烷型五环三萜的标志性化合物,具有抗炎^[10]、抗肿瘤^[11]、抗变态反应、促进肝细胞再生^[12]和促进肝糖原合成^[13]的重要生理活性,但自然界中每个植物所含齐墩果酸的含量均较低,目前的来源主要是通过从植物中提取和化学合成的方法来获得,非常不利于环境和资源的可持续发展,利用合成生物学的原理和方法,可实现药用资源的可持续利用。

2 生物合成途径

2.1 MVA 途径

三萜皂苷生物合成途径主要是分为前体形成、骨架构建、后期修饰三部分(见图1)。碳源经过 MVA 途径合成萜类基本前体,再由萜类合成酶催化合成三萜类骨架后,再由 CYP450 酶及 UGT 酶对骨架的结构进行修饰,最终获得相关的三萜类皂苷化合物。有学者将 2,3-环氧角鲨烯作为三萜皂苷生物合成途径上游和下游途径的分支点,三萜皂苷的后期修饰酶在其生物合成途径中作为关键酶基因,是产生萜类次生代谢最终产物的关键。

2.2 关键酶基因

前期研究中,已成功地在酿酒酵母中完成 MVA 途径的优化,在参与三萜皂苷生物合成下游途径的关键元

件中,参与植物体内多种生命活动获得参与三萜皂苷生物合成细胞色素 CYP450 单加氧酶为关键酶基因。植物细胞中,CYP450 为催化初级和次级代谢反应作用的催化剂,可参与各类化合物的合成与代谢反应^[14-15]。CYP450 是在环氧角鲨烯合成不同构型的母核后进行一系列的修饰,包括羟基化、醛基化、酮基化、羧基化和脱氧脱水等氧化反应^[16]。CYP450 参与催化合成多种具有药用价值的次生代谢产物,如皂苷^[17-18]、青蒿素^[19-20]、紫杉酚^[21]、黄酮类化合物^[22]、萜类碱^[23]等。

研究至今,大豆来源的 GmCYP93E1 基因是最早被证实具有催化合成三萜化合物的 CYP450,其催化合成齐墩果-12-烯-3,24-二醇^[17]。甘草中的 CYP88D6 和 CYP72A154 基因可催化甘草次酸的合成,并参与甘草酸苷的生物合成^[24-25]。葡萄来源的 VvCYP716A15 和 VvCYP716A17 在生物合成途径中,催化 β -香树脂生成齐墩果酸,又催化羽扇豆醇合成桦木酸^[26]。来源于蕨藜状苜蓿的基因 MtCYP716A12 在生物合成途径中的作用是催化齐墩果酸的合成^[18,26]。从人参中克隆到的基因 PgCYP716A4, PgCYP716A52v2, PgCYP716A53v2 参与人参皂苷合成途径^[27-29],在生物合成过程中,人参来源的 CYP450 基因依次发挥自己的催化作用, PgCYP716A47 可以催化达玛烯二醇合成原人参二醇, PgCYP716A53v2 催化原人参二醇合成原人参三醇, PgCYP716A52v2 催化合成齐墩果酸型皂苷(见图2)。

3 合成生物学

3.1 常用菌株

在合成生物学的运用过程中,有较多的微生物可作为度盘菌株的使用,如完成全基因测序的酿酒酵母,遗传背景清晰的大肠杆菌、链霉菌,能产阿维菌素的阿维链霉菌、天蓝链霉菌、恶臭假单胞菌等一系列的微生物。

3.2 底盘菌株选用-酿酒酵母

酿酒酵母具有遗传背景清楚,发酵密度大,生物安全性好,遗传改造和发酵方法成熟等优点,因此在工业

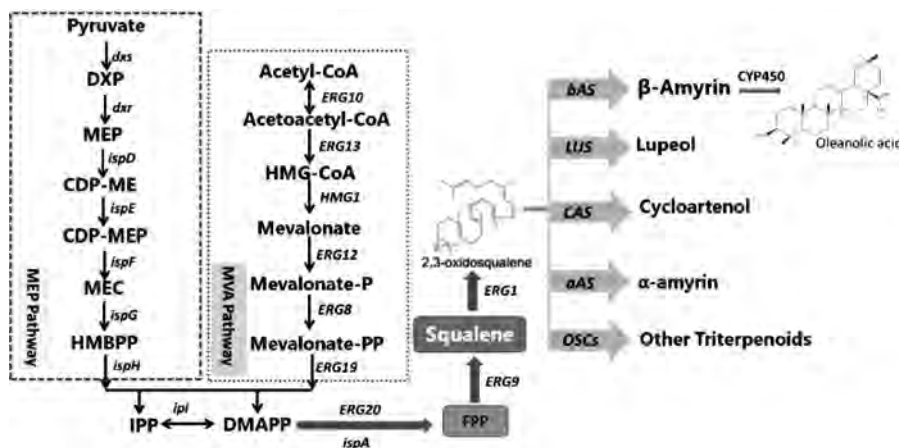


图1 三萜化合物生物合成途径

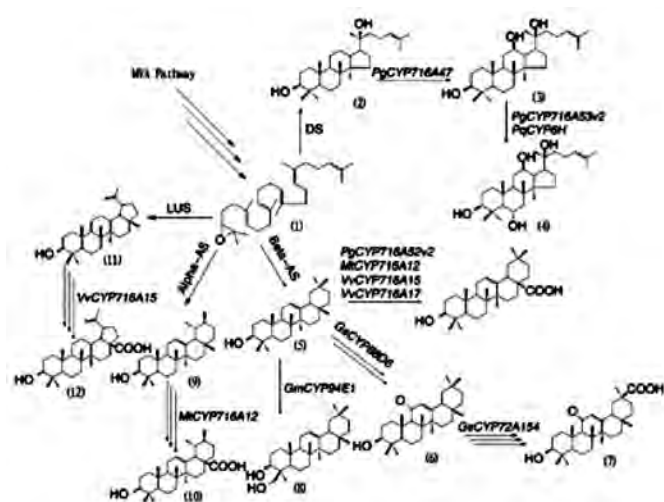


图2 参与三萜合成的 CYP450s

生产中常选择为底盘菌株的微生物,在基因工程、遗传学分析及蛋白表达研究领域被广泛应用^[30-31],因安全、无毒、不致病等优点被广泛应用于食品与医疗卫生领域。1996年已完成了对酿酒酵母的全基因组测序工作^[32]。在酿酒酵母中开展了酵母基因敲除技术、酵母基因定位技术、酵母功能基因芯片技术等^[33]。利用酿酒酵母可以很大程度地阐明高等真核生物基因表达调控的基本原理及基因编码产物结构与功能间的关系,从而起到表达鉴定或异源表达目的蛋白的作用^[34-35],建立了酵母表达系统。

酿酒酵母体内自身含有提供萜类化合物合成的 MVA 途径,能代谢合成以麦角甾醇为主要产物的固醇类物质^[36],能用来生产高修饰型外源天然产物如 β -香树脂^[37-38],因而广泛用于构建生产天然产物的底盘工程菌株^[39]。目前,构建酿酒酵母基因工程菌,建立细胞工厂高产所需有效成分已成为研究主流,而且已有很多成功构建天然产物细胞工厂的实例,如 Keasling 团队利用合成生物学的方法在酵母中合成青蒿素的前体物青蒿酸,产量可达 25 g/L^[20]。目前,酿酒酵母菌在青蒿酸生物合成路线比较清晰的基础上,采用一系列的基因调控方法,通过酵母代谢工程菌合成了青蒿酸,其产量超过 100 mg/L,实现了在酵母中大量合成抗疟药物青蒿素的前体物质^[20]。DAI 等^[40-41]已在酿酒酵母底盘细胞成功构建了原人参二醇的生物合成途径。构建酿酒酵母工程菌株,能快速高产药用有效成分或其中间体^[19],为濒危药材的保护和可持续利用提供应用基础。HAN 等^[28]利用酿酒酵母成功构建了人参中原人参二醇合成酶基因 CYP716A47 的异源表达鉴定菌株,完成了人参中的达玛烯二醇合成酶基因 PgDDS 与原人参二醇合成酶基因 CYP716A47 的异源共表达,实现了利用酿酒酵母培养体系自身所含底物产目标化合物。可见,酿酒酵母为三萜皂苷的异源代谢合成提供了表达系统,为实现代谢

工程中三萜皂苷异源工业化生产提供了研究思路。在本实验研究中重点研究金铁锁有效成分三萜皂苷合成的下游途径,故选择酿酒酵母作为底盘菌株。

4 小结

金铁锁的药理作用主要表现为镇痛、抗炎、抗类风湿、免疫调节、抑菌、抗氧化等。近年对金铁锁的研究所获皂苷类成分,目前被认为是主要的活性成分,较为集中的是齐墩果烷型五环三萜皂苷化合物^[3]。目前,利用合成生物学在酿酒酵母中构建细胞工厂高效生产药用植物有效成分已成为最环保、高产的手段。酿酒酵母体内自身含有提供萜类化合物合成的 MVA 途径,以其作为底盘菌株,在细胞色素 P₄₅₀ 单加氧酶对骨架进行结构修饰下,最终获得相关的三萜类皂苷化合物。

实验室前期已完成了金铁锁转录组测序及生物信息学分析工作,并完成了 MVA 途径的修饰与合成,在酶的催化下,构建出了高产金铁锁有效成分三萜皂苷的前体物质齐墩果酸的工程菌株,再在酿酒酵母中实现金铁锁三萜皂苷元生物合成途径异源重建,将金铁锁 P₄₅₀ 单加氧酶通过合成生物学方式将其在酿酒酵母中表达实现重建,构建出高产药用植物金铁锁有效成分的初级细胞工厂。

综上所述,基于合成生物学方法在微生物体内重建金铁锁三萜皂苷的生成途径,实现金铁锁药用有效成分生物合成途径解析,并在此基础上通过研究生物合成途径和关键酶基因的挖掘鉴定与调控,可增加药用植物有效成分的含量,提高中药材的品质,为中药的良种选育、规范化种植和质量控制提供技术支撑。同时,通过金铁锁三萜皂苷人工细胞工厂的开发直接发酵法生产有效成分,是获得新资源的又一重要补充。

参考文献:

- [1] 吴征镒. 云南植物志:第6卷[M]. 北京:科学出版社,1995:247-248.
- [2] 李媛. 金铁锁中三萜皂苷相关功能基因的鉴定分析与表达研究[D]. 昆明:云南中医学院,2017.
- [3] 赵保胜,桂海水,朱寅荻,等. 金铁锁化学成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):288-291.
- [4] 国家林业局,中华人民共和国农业部. 国家重点保护野生植物名录(第一批)[J]. 中华人民共和国国务院公报,2000(13):39-47.
- [5] ROBERTS SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture[J]. Nat Chem Biol,2007,3(7):387-395.
- [6] KLAYMAN DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China[J]. Science,1985,228(4703):1049-1055.
- [7] ZUCO V, SUPINO R, RIGHETTI SC, et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells[J]. Cancer Letters,2002,175(1):17-25.
- [8] 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.

- [9] 邱蓉丽,李 璘. 中药女贞子化学与药理研究进展[J]. 中药材,2007,30(7):891-894.
- [10] 吴 虹,魏 伟,吴成义. 木瓜化学成分及药理活性的研究[J]. 安徽中医学院学报,2004,23(2):62-64.
- [11] ZHANG P, LI H, CHEN D, et al. Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cells through caspase activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39(10):803-809.
- [12] 田丽婷,马 龙,堵年生. 齐墩果酸的药理作用研究概况[J]. 中国中药杂志,2002,27(12):9-11.
- [13] 唐春红,叶志义,项昭保,等. 木瓜营养保健作用研究动态[J]. 天然产物研究与开发,2000,12(4):97-100.
- [14] CHAPPLE C. Molecular-Genetic Analysis of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49:311-343.
- [15] SCHULER MA, WERCK-REICHHART D. Functional genomics of P450s[J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54:629-667.
- [16] 郑夏生. 岗梅转录组及三萜皂苷生物合成相关酶基因的挖掘[D]. 广州:广州中医药大学,2014.
- [17] SHIBUYA M, HOSHINO M, KATSUBE Y, et al. Identification of beta-amyirin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay[J]. The FEBS Journal, 2006, 273(5):948-959.
- [18] CARELLI M, BIAZZI E, PANARA F, et al. Medicago truncatula CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins[J]. The Plant Cell, 2011, 23(8):3070-3081.
- [19] PADDON CJ, WESTFALL PJ, PITERA DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. Nature, 2013, 496(7446):528-532.
- [20] RO DK, PARADISE EM, OUELLET M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. Nature, 2006, 440(7086):940-943.
- [21] KASPERA R, CROTEAU R. Cytochrome P450 oxygenases of Taxol biosynthesis[J]. Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 2006, 5(2-3):433-444.
- [22] YAN Y, KOHLI A, KOFFAS MA. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9):5610-5613.
- [23] LI R, REED DW, LIU E, et al. Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement[J]. Chemistry & Biology, 2006, 13(5):513-520.
- [24] SEKI H, OHYAMA K, SAWAI S, et al. Licorice beta-amyirin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(37):14204-14209.
- [25] SEKI H, SAWAI S, OHYAMA K, et al. Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin[J]. The Plant Cell, 2011, 23(11):4112-4123.
- [26] FUKUSHIMA E O, SEKI H, OHYAMA K, et al. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis[J]. Plant & cell physiology, 2011, 52(12):2050-2061.
- [27] HAN JY, KIM MJ, BAN YW, et al. The involvement of beta-amyirin 28-oxidase (CYP716A52v2) in oleanane-type ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. Plant & Cell Physiology, 2013, 54(12):2034-2046.
- [28] HAN JY, KIM HJ, KWON YS, et al. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammaradiol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. Plant & Cell Physiology, 2011, 52(12):2062-2073.
- [29] HAN JY, HWANG HS, CHOI SW, et al. Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. Plant & Cell Physiology, 2012, 53(9):1535-1545.
- [30] REID RJ, BENEDETTI P, BJORNSTI MA. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1400(1-3):289-300.
- [31] SYCHROVA H. Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations[J]. Physiological Research, 2004, 53(Suppl 1):S91-S98.
- [32] DUJON B. The yeast genome project: what did we learn? [J]. Trends in Genetics: TIG, 1996, 12(7):263-270.
- [33] 叶世超,薛 婷,何文锦,等. 酿酒酵母育种技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16):372-375.
- [34] OSTERGAARD S, OLSSON L, NIELSEN J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2000, 64(1):34-50.
- [35] 黄璐琦,高 伟,周雅进. 合成生物学在中药资源可持续利用研究中的应用[J]. 药学报, 2014, 49(1):37-43.
- [36] VEEN M, STAHL U, LANG C. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Res, 2003, 4(1):87-95.
- [37] KIRBY J, ROMANINI DW, PARADISE EM, et al. Engineering triterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*-beta-amyirin synthase from *Artemisia annua* [J]. The FEBS Journal, 2008, 275(8):1852-1859.
- [38] MADSEN KM, UDATHA GD, SEMBA S, et al. Linking genotype and phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals metabolic engineering targets and leads to triterpene hyper-producers[J]. PLoS One, 2011, 6(3):e14763.
- [39] 王 冬,王贝贝,刘 怡,等. 齐墩果酸酵母细胞工厂的合成途径与发酵工艺优化[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14):2640.
- [40] DAI Z, LIU Y, GUO J, et al. Yeast synthetic biology for high-value metabolites[J]. FEMS Yeast Res, 2015, 15(1):1-11.
- [41] DAI Z, WANG B, LIU Y, et al. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast[J]. Sci Rep, 2014, 4:3698.

(收稿日期:2019-04-09)