

· 综述 ·

## 三七皂苷合成及调控机制的研究进展

李泽东<sup>1</sup>, 赵荣华<sup>1</sup>, 张兆传<sup>2</sup>, 俞捷<sup>1</sup>, 顾雯<sup>1</sup>, 贺森<sup>1,3\*</sup>, 曹冠华<sup>1\*</sup>

(1. 云南中医学院 中药学院, 昆明 650500;

2. 嘉祥县第二人民医院, 山东 济宁 272404; 3. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

**[摘要]** 三七是我国传统的名贵药材,在活血祛瘀、通脉活络、改善心肌缺血等方面具有重要的临床效果。三七主要活性成分为三七皂苷,包括人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub>, 均属于达玛烷型四环三萜化合物。本文对三七皂苷的生物合成途径及分子调控机制的最新研究进行了分析、整理和归纳,基于其他植物的研究结果,认为达玛烷型四环三萜皂苷主要通过乙酸/甲羟戊酸途径合成,包括异戊烯基焦磷酸、二甲基烯丙基焦磷酸的合成,2,3-氧化鲨烯的合成及环化、羟基化、糖基修饰等过程,涉及鲨烯合成酶、法呢基焦磷酸合成酶、鲨烯环氧酶、达玛烯二醇合成酶、糖基转移酶等关键合成酶,分析了关键合成酶的作用、表达特性、不同物种来源关键酶氨基酸序列的同源性及其对皂苷积累的影响;同时分析了三七皂苷对重金属、植物激素、内生真菌、温度、营养因子等环境因素刺激的响应方面,二者之间关系复杂,但皂苷类成分含量与各因子在一定范围或特定因子刺激下呈正相关。目前,相关研究主要集中在各个独立的关键酶基因的表达特性和对外界因子的响应,对于具体的催化过程、结构修饰和转录水平的调控仍处于初级阶段,缺乏系统性和完整性的认知。

**[关键词]** 三七; 三七皂苷; 生物合成; 调控机制; 外界因子

**[中图分类号]** R22;G353.11;R282;R284;Q946 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0207-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181413

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180425.1859.022.html>

**[网络出版时间]** 2018-04-27 15:00

## Advances in Biosynthesis and Regulation Mechanism of Notoginseng Saponins

LI Ze-dong<sup>1</sup>, ZHAO Rong-hua<sup>1</sup>, ZHANG Zhao-chuan<sup>2</sup>, YU Jie<sup>1</sup>,

GU Wen<sup>1</sup>, HE Sen<sup>1,3\*</sup>, CAO Guan-hua<sup>1\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China;

2. Jiexiang County Second People's Hospital, Jining 272404, China;

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

**[Abstract]** Notoginseng Radix et Rhizoma is a valuable medicine, which plays an important role in clinical treatment, including blood-activating, stasis-removing and improvement of myocardial ischemia, etc. Notoginseng saponins, one kind of dammarane-type tetracyclic triterpenoid saponins, are the main active ingredients in Notoginseng Radix et Rhizoma, such as ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>1</sub> and R<sub>1</sub>. In this paper, the latest researches on biosynthesis and molecular regulation mechanism of notoginseng saponins were analyzed and summarized. Based on the research results of other plants, dammarane-type tetracyclic triterpenoid saponins are

**[收稿日期]** 20180110(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81560612);云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项[2017FF116(-019),2017FF117(-014)]

**[第一作者]** 李泽东,在读硕士,从事中药资源与开发研究,E-mail:896506441@qq.com

**[通信作者]** \*贺森,博士,副教授,硕士生导师,从事中药资源与开发研究,E-mail:sunbelt123@163.com;

\*曹冠华,博士,实验师,从事菌根微生物研究,E-mail:egh20031695@163.com

synthesized by the acetic acid/mevalonic acid pathway, including synthesis of isopentenyl pyrophosphate and dimethylallyl pyrophosphate, synthesis, hydroxylation and other processes of 2, 3-oxidosqualene. The key synthetases, squalene synthase, farnesyl pyrophosphate synthase, squalene epoxidase and others are involved; the roles, expression characteristics, homology of amino acid sequence from organisms and the effect on accumulation of saponins of key synthetases were analyzed. Besides, the response of notoginseng saponins to environmental factors were also generalized; the results showed that the relationship of them was complex, but content of notoginseng saponins was positively correlated with each factor under certain range or specific factor stimulation. At present, relevant researches mainly focus on expression characteristics of independent key enzyme genes and their response to external factors, the regulation of specific catalytic processes, structural modifications and transcription levels is still in the primary stage, which lacks systematic and complete cognition.

[Key words] Notoginseng Radix et Rhizoma; notoginseng saponin; biosynthesis; regulation mechanism; external factors

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* 的干燥根及根茎,主产于云南、广西等地,是我国传统名贵药材之一,也是云南的道地药材之一,享有“参中之王”、“南国神草”等美誉,是云南白药的主要成分之一<sup>[1]</sup>,又名金不换、滇三七等。三七中含有皂苷类、糖类、氨基酸、黄酮类、油脂类、微量元素等活性成分<sup>[2]</sup>,具有散瘀止血、消肿定痛的功效<sup>[3]</sup>,其中,达玛烷型的四环三萜类皂苷为三七的主要活性成分,具有增加冠脉血流量、扩张血管、降低心肌耗氧量、抗衰老、抗肿瘤、抗炎等作用<sup>[4-5]</sup>。三七及其衍生品作为一种临床效果显著、作用明显的药材(物),药用价值和市场价值巨大,对其研究亦愈发深入,尤其在皂苷生物合成及调控机制等方面的研究。

### 1 三七皂苷生物合成途径中的关键酶及其作用

三七皂苷的主要成分为达玛烷型四环三萜类化合物。目前,研究认为植物达玛烷型四环三萜皂苷

主要通过乙酸/甲羟戊酸途径合成<sup>[6-7]</sup>,一般可划分为 3 个阶段,①合成异戊烯基焦磷酸(IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP);②由异戊烯基转移酶和萜类环化酶催化 IPP 和 DMAPP 形成 2,3-氧化鲨烯;③2,3-氧化鲨烯依次经过环化、羟基化、糖基化修饰后最终形成三萜类皂苷(三七皂苷)<sup>[8]</sup>。研究发现 2,3-氧化鲨烯是三七皂苷合成的最初前体物质,经一系列的酶促反应和修饰后生成达玛烷型四环三萜类化合物,其中涉及主要关键酶有鲨烯合酶(squalene synthase, SS),法呢基焦磷酸合成酶(farnesyl pyrophosphate synthase, FPS),鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE),达玛烯二醇-II 合成酶(dammareniol-II synthase, DS),细胞色素 P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases, CYP450),糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)和环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS),具体信息见表 1。

表 1 三七皂苷生物合成途径中的主要关键酶及其作用

Table 1 Primary key enzymes affecting biosynthesis of notoginseng saponins and their roles

关键酶	酶类型	主要功能及作用
FPS	异戊烯基转移酶	催化 IPP 和 DMAPP 发生缩合反应,形成法呢基焦磷酸(FPP) <sup>[8]</sup>
SS	内质网上的膜结合酶	催化两分子 FPP 结合形成鲨烯,并继续反应生成三萜化合物 <sup>[9]</sup>
SE	单加氧酶	催化鲨烯合成 2,3-氧化鲨烯 <sup>[10]</sup>
DS	氧化鲨烯环化酶中的一种	催化 2,3-氧化鲨烯环化为达玛烯二醇 <sup>[11]</sup>
CAS	氧化鲨烯环化酶中的一种	催化 2,3-氧化鲨烯环化生成环阿屯醇,并最终形成甾醇类物质,与 DS 竞争三萜化合物的前体物质 <sup>[12]</sup>
CYP450	超基因家族编码的含有血红素的氧化酶	主要催化三萜骨架惰性甲基和亚甲基的氧化 <sup>[13]</sup>
GT	葡萄糖基转移酶	催化皂苷元,将糖基转移到皂苷元上,最终形成皂苷 <sup>[14]</sup>

1.1 FPS 在三七皂苷合成途径中的表达调控 FPS 可催化五碳原子的 IPP 和 DMPP 以 1,4 头尾连续缩

合反应,形成萜类前体物质 FPP,典型的 FPS 有 2 个富含天冬氨酸的模序,每个亚基均含有底物烯丙基

焦磷酸 (allyl pyrophosphate, APP) 及 IPP 的结合位点<sup>[15]</sup>。目前已获得了玉米、三七、人参、西洋参、大戟等植物中的 FPS 氨基酸序列,发现其较为保守,其长度为 342 aa 或 357 aa<sup>[16-17]</sup>。吴耀生<sup>[18]</sup>证实三七 FPS 碱基序列与人参、积雪草的序列一致性分别可达 99% 和 95%。周秘等<sup>[19]</sup>利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 技术,对刺五加 FPS 基因在不同产地、不同器官、不同发育时期及茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理后的表达情况进行了分析。结果表明 FPS 基因在不同产地、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。Kim 等<sup>[20]</sup>通过毛根农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导的转化发现,超表达 FPS 基因可以显著增加人参皂苷水平,与野生型相比,最高可达 2.4 倍,证实 FPS 在人参的三萜生物合成中起着重要作用。

### 1.2 SS 与 DS 在三七皂苷合成途径中的表达调控

SS 是一种内质网膜结合酶,可催化两分子 FPP 结合形成鲨烯,并继续生成三萜化合物或植物甾醇,是三萜类化合物和植物甾醇合成的关键酶之一。DS 是一种氧化鲨烯环化酶,可催化 2,3-氧化鲨烯环化为达玛烯二醇即达玛烷型皂苷的前体物质,故 DS 同样在三萜皂苷合成中起着重要的调节作用。有文献<sup>[21-24]</sup>报道了三七、甜椒、人参、黄芪的氨基酸序列,其长度处于 409 ~ 415 aa,相对较为保守。而对 DS 表达调控的研究相对较少,只在西洋参、人参发现了其开放阅读框 (open reading frame, ORF),均为 769 aa<sup>[25]</sup>。石磊<sup>[26]</sup>从三七叶中克隆得到 SS、DS 基因全长 cDNA 序列,氨基酸序列同源比对发现,三七 SS 与西洋参、人参、积雪草和青蒿的相似性分别为 99%, 98%, 90% 和 81%; 三七 DS 与人参相似性为 99%, 均具有较高的同源性,并且 SS 转录水平的提高在一定程度上有利于三七皂苷的积累。

邢朝斌等<sup>[27]</sup>利用 RT-PCR 技术,分析了刺五加不同发育时期、不同器官及 MeJA 处理下 SS1, SS2 基因表达对皂苷量的影响,结果表明 SS2 基因的表达量与皂苷含量呈显著的正相关性,相关系数为 0.832。龙月红等<sup>[28]</sup>以肌动蛋白 (actin) 为内参基因,利用 Real-time PCR 技术分析了三七 SS 基因表达与皂苷含量积累之间的关系,结果发现了刺五加 SS2 基因会上调表达,且相对表达量与皂苷积累之间存有极显著正相关性。杨延等<sup>[29]</sup>亦获得类似的结果,其通过构建农杆菌 LBA4404 介导的三七超

表达系统,在三七植株中超表达 SS 或 DS 基因,发现二者在皂苷生物合成途径中均起到了正调控作用,双基因共超表达能进一步提高皂苷含量,揭示途径中 2 个甚至更多基因间可能存在正协同调控效应。

**1.3 SE 在三七皂苷合成途径中的表达调控** SE 是一种单加氧酶,可催化鲨烯合成 2,3-氧化鲨烯,是三萜皂苷合成途径中的关键酶之一。目前已获得了诸多植物来源的 SE 基因序列,如三七、人参、黄芪、南非醉茄、蒺藜状苜蓿,含有 530 ~ 550 aa<sup>[30-31]</sup>。和凤美<sup>[32]</sup>对三七 SE cDNA 序列进行的生物信息学分析,结果表明三七 SE 是一个膜蛋白,可从胞质溶胶中分泌出来;而根据 Real-time PCR 结果显示,三七 SE 基因表达具有明显的组织差异性,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。在刺五加中,SE 基因表达水平同样存有组织差异性,且其相对表达量与刺五加皂苷的量成显著的正相关关系<sup>[25,33]</sup>。HAN 等<sup>[34]</sup>研究发现人参 SE 基因 *PgSE1* 和 *PgSE2* 表达量同样存在组织差异性,且对茉莉酸甲酯的响应程度也不同,沉默 *PgSE1*,则会导致人参皂苷含量减少,同时造成 *PgSE2* 和 *CAS* 显著上调表达,且甾醇大量积累。

**1.4 CAS 在三七皂苷合成途径中的表达调控** CAS 是植物甾醇合成途径中的关键酶,与 DS 竞争 2,3-氧化鲨烯这一共同前体物质流向甾醇合成途径,而非三萜支流,因此 CAS 会间接影响三萜皂苷的生物合成<sup>[35]</sup>。目前已从烟草、拟南芥、水稻、玉米、三七等植物中获得编码 CAS 的 cDNA,其长度从 650 ~ 800 aa 不等<sup>[36-37]</sup>。孙颖等<sup>[38]</sup>利用 RNAi 基因沉默技术对三七中 CAS 基因进行沉默,结果显示抑制 CAS 基因表达可阻断植物甾醇的合成,间接增加三七皂苷的含量。

**1.5 CYP450 和 GT 在三七皂苷合成途径中的表达调控** 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<sup>[39-40]</sup>,在三七皂苷合成中具有催化三萜骨架惰性甲基和亚甲基的氧化等作用。近年来,已有研究人员从五加科的三七、人参和西洋参中克隆得到了修饰三萜皂苷合成的候选 CYP450 全长基因序列。吴鹏等<sup>[41]</sup>利用 Real-time 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茉莉酸甲酯刺激下的表达规律,结果表明 CYP450 表达量相互间差异极显著,且基因

表达量与总皂苷含量之间同样差异极显著。高通量测序结果显示,西洋参、三七和人参含有大量的 *CYP450* 基因,且与 *DS* 基因的表达模式类似,结合功能注释,推测其参与了三萜皂苷类成分的生物合成,属于关键酶之一<sup>[17,21,25,31,39]</sup>。

*GT* 是一类将糖基转移至皂苷元上,最终形成皂苷的酶。目前已从三七、狸藻、拟南芥、玉米等植物中获得 *GT* 基因 cDNA 序列,长度 416 ~ 1 036 aa 不等<sup>[42-43]</sup>。向丽等<sup>[44]</sup>通过对三七转录组数据分析发现,3 个三七 *GT* 基因与菝葜苜蓿中的三萜糖基转移酶 *UGT73K1* 和 *UGT71G1* 的亲缘关系较近,并对其生物信息进行了预测和分析,推测其可能在三七皂苷最后一步合成中起催化作用。郭淑<sup>[45]</sup>通过异源表达获得了纯化蛋白,为其结构的研究奠定了基础。邢朝斌等<sup>[46]</sup>从刺五加克隆得到 *GT-B* 型基因,认为其参与了次生代谢,Real-time PCR 结果显示,*GT-B* 基因在各生长时期和器官中均有表达,但表达量具有显著差异,最大表达量出现在盛花期,为最低表达量(叶片衰老期)的 1.81 倍;各器官中,叶片的表达量最高,是最低量幼茎的 1.64 倍。

## 2 三七皂苷生物合成对外界因子刺激的反应

### 2.1 三七皂苷生物合成对重金属胁迫的反应

重金属对植物的生长会产生毒害作用,并可通过食物链的富集作用最终对人体造成损害。但有研究发现重金属与植物生长及刺激代谢产物的合成之间的关系存在“低促高抑”的现象<sup>[47]</sup>。梁尧等<sup>[48]</sup>研究证实,当 Pb 质量分数为  $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,三七总皂苷含量显著增加,并在 Pb 质量分数为  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  时达到最高;而以  $\text{Cd}^{2+}$  进行胁迫,当其在土壤中的质量分数  $< 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,与对照组相比,三七皂苷  $R_1$ ,  $R_{b1}$ ,  $R_{g1}$  及总皂苷含量均无显著变化,当土壤  $\text{Cd}^{2+}$  的质量分数  $\geq 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,各种皂苷含量明显降低。此外,低质量分数的  $\text{Cd}^{2+}$  ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 还可以促进 *DS* 基因的表达,高质量分数条件下则会抑制其表达;而随着质量分数的增加,对 *P450* 基因也会出现明显的抑制作用<sup>[49]</sup>。黄超<sup>[50]</sup>研究了钒酸盐对人参皂苷合成的影响,结果发现添加钒酸盐可显著诱导人参皂苷合成途径中的关键基因 *SS*, *SE* 和 *DS* 在转录水平上调表达,推测钒酸盐可以直接诱导人参皂苷的生物合成。

阙奇<sup>[51]</sup>考察了在 Cd 胁迫下添加外源钨酸盐和一氧化氮专一清除剂(cPTIO)对人参皂苷  $R_{b1}$ ,  $R_e$  和  $R_{g1}$  含量及相关基因表达水平的影响,结果表明硝酸还原酶(NR)依赖的内源 NO 可以促进人参皂

苷  $R_{b1}$  的积累而降低人参皂苷  $R_e$  和  $R_{g1}$  的积累,但是对总皂苷含量却并无显著的抑制作用。对三七皂苷关键酶基因表达水平的研究也发现内源 NO 可以促进基因  $\beta\text{-AS}$ , *CAS* 和 *SE* 的表达,抑制基因 *DS* 的表达,进而影响了 2,3-氧化鲨烯向达玛烷型三萜皂苷的信息流。

### 2.2 三七总皂苷生物合成对植物激素刺激的反应

研究认为,植物激素与次级代谢产物的合成有着密切的关系,其中 MeJA 被认为是三萜类皂苷生物合成最有效的诱导因子<sup>[52]</sup>。徐立新等<sup>[53]</sup>向人参毛状根培养基中添加植物激素类物质 2,4-二氯苯氧乙酸,萘乙酸,3-吲哚丁酸,MeJA 和水杨酸,结果显示后 3 种外源激素在适宜浓度下均可不同程度地促进总皂苷和人参皂苷  $R_{b1}$  的积累。此外,用  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA 诱导人参不定根 24 h 可以促进 *SE* 和 *DS* 基因上调表达,提高总皂苷含量。HU 等<sup>[54]</sup>进一步证实植物激素 2-羟乙基茉莉酮酸酯,MeJA 和内源性茉莉酸可以刺激 *SE* 基因的上调表达,抑制 *CAS* 基因的下调表达,从而增强三七细胞中皂苷的合成,基本可确认作为信号转导的茉莉酸和 MeJA 在三七皂苷生物合成中起着重要作用。

### 2.3 三七总皂苷生物合成对温度、日照、土壤营养等环境因素刺激的反应

温度、日照和土壤营养等生态环境因素是影响三七生长和皂苷类成分合成最主要的因子。张涛<sup>[55]</sup>以人参为研究对象,对 *CYP* 基因家族基因与生态环境、皂苷含量的相关性进行了分析,结果显示 *CYP716A52v2* 表达量与平均温度、土壤含水量和人参皂苷  $R_o$  单体呈显著正相关,与人参皂苷  $R_{g1}$ ,  $R_e$  及总皂苷含量呈显著的负相关;平均降雨量、相对湿度、日照时数与皂苷含量相关性不显著,且随着平均温度和土壤含水量的升高,*CYP716A52v2* 表达量随之升高,而人参皂苷  $R_{g1}$ ,  $R_e$  及总皂苷含量下调;*CYP716A53v2* 基因表达量与平均温度呈显著负相关,而与土壤含水量,人参皂苷  $R_{g1}$  及总皂苷含量成显著正相关。总体而言,土壤含水量和月平均温度对人参皂苷的生物合成影响较大,月平均降雨量、相对湿度、日照时数对人参皂苷的生物合成影响较小<sup>[51]</sup>。

金航等<sup>[56]</sup>认为,日照是保证文山三七品质最主要的因素之一,日照时数高的产区所产三七中皂苷类成分较高。吴庆生等<sup>[57]</sup>也赞同此观点,认为适当延长日照是提高西洋参皂苷含量的关键途径之一。但三七生长怕强光,光照强度过大会极大影响三七的生长,甚至造成其死亡<sup>[58]</sup>。此外,温度的变化对

皂苷的积累也影响深刻。刘佳等<sup>[59]</sup>认为 HMAGR, SS, SE 家族的 *PgHMGR1*, *PgHMGR2*, *PgSS1*, *PgSE1* 和 *PgSE2* 是人参愈伤组织响应低温胁迫时的关键家族基因,在提高低温胁迫抗性方面发挥着重要作用。而不同土壤类型或土壤微环境中生长的三七,其皂苷类成分含量有明显差异,注意 N, P, K 肥的合理施用是提高三七内在质量的有效措施<sup>[60]</sup>。郑建芬等<sup>[61]</sup>研究发现纯氮用量在 10 ~ 15 kg/亩(1 亩 ≈ 667 m<sup>2</sup>),纯 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 用量在 15 ~ 25 kg/亩时,三七种苗质量最好,尤其在块根生物量方面。

**2.4 三七皂苷生物合成对内生真菌刺激的响应**  
研究发现部分内生菌侵染宿主后,能产生与宿主相同或相似的次生代谢物质,或能刺激植物的生长发育或调节宿主植物的次生代谢<sup>[62-63]</sup>,在种植和生产中具有广阔的应用前景。邢朝斌等<sup>[64]</sup>研究证实,刺五加内生真菌 P116-1a, P116-1b, P109-4, P312-1 可显著刺激刺五加中皂苷合成关键酶基因 *SS*, *SE*,  $\beta$ -*AS* 的上调表达,进而增加刺五加中皂苷的含量。张薇<sup>[65]</sup>从人参及其根际土壤中分离得到莫勒接霉、灰绿犁头霉等 105 株真菌,并初步证明有 24 株真菌对人参皂苷具有转化作用。其中,5 株真菌能高效转化人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 为 Rd,4 株真菌能将人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 转化为 Rg<sub>3</sub>,5 株真菌能将人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 转化为 Rh<sub>2</sub>,4 株真菌能将人参皂苷 Rd 转化为 Rg<sub>3</sub> 和 Rh<sub>2</sub>。陈冷<sup>[66]</sup>将人参内生真菌 3R-2 菌丝通过打孔的方式加入到人参毛状根培养液中培养 14 ~ 21 d,结果显示 3R-2 菌丝对人参毛状根的生物量、人参皂苷 Rg<sub>2</sub> 和人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 的含量有显著的促进作用。但目前尚没有利用内生真菌提高三七皂苷含量或进行相关生物转化研究的报道。

### 3 结语和展望

目前,虽然在三七皂苷合成分子生物学领域取得了一定的进展,但比较孤立和片面,主要集中在各个独立的关键酶基因的克隆、表达特性的研究和对外界因子的响应,对于具体的催化过程、结构修饰和转录水平的调控仍处于推测阶段,缺乏系统性和完整性的认知。此外,蛋白功能的表达或代谢产物的合成是由众多基因共同作用的结果,涉及多个代谢途径。在将来的研究中,除对其单个三七皂苷合成关键酶及相关基因进一步深入研究外,还应从基因组学、蛋白组学和代谢组学等方面进行整体考量和研究,才能真正了解三七皂苷的生物合成机制。

另外,对外界因子刺激的响应也是三七皂苷生物合成研究领域不可或缺的重要部分。通过对此方

面的研究,一方面可以有效解决现在中药材重金属超标的严重问题;另一方面可以通过一定重金属的刺激影响三七总皂苷合成途径中的关键酶,从而能有效控制三七总皂苷的生物合成。此外,加强内生菌的筛选和应用,提高三七的抗逆性和生物量,也是提高三七产量和品质的有效、快捷途径之一。

#### [参考文献]

- [1] 贾卓雅,石凯行,范彦芳,等.丹皮酚联合三七总皂苷对大鼠糖尿病心肌纤维化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(6):133-138.
- [2] 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.
- [3] 张登青,袁琴,袁成福,等.三七总皂苷对衰老大鼠肝脏内质网应激介导炎症反应的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(19):140-144.
- [4] 王莹,褚扬,李伟,等.三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展[J].中草药,2015,46(9):1381-1392.
- [5] 钟晓凤.三七的药理作用及其临床应用研究[J].中医临床研究,2015,9(6):116-117.
- [6] Jung J D, Park H W, Hahn Y, et al. Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags[J]. Plant Cell Rep, 2003, 22(3):224-230.
- [7] Ghosh S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes[J]. Front Plant Sci, 2017, doi:10.3389/fpls.2017.01886.
- [8] Ghosh S. Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases[J]. Proc Indian Natl Sci Acad, 2016, 82(4):1189-1210.
- [9] 马艺沔,袁丽钊,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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] XU Z, Peters R J, Weirather J, et al. Full-length transcriptome sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone biosynthesis[J]. Plant J, 2015, 82(6):951-961.
- [13] 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.
- [14] 修乐山,李非非,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].基因组学与应用生物学,2014,33(1):128-132.
- [15] 李建华.乌拉尔甘草黄酮异戊烯基转移酶研究[D].北京:北京协和医学院,2014.
- [16] CAO X, YIN T, MIAO Q, et al. Molecular characterization and expression analysis of a gene encoding for farnesyl diphosphate synthase from *Euphorbia pekinensis* Rupr [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39 (2):1487-1492.
- [17] ZHAO H, TANG Q, MO C, et al. Cloning and characterization of squalene synthase and cycloartenol synthase from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(2):215-222.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] LIU M H, YANG B R, Cheung W F, et al. Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in ginsenoside and alkaloid biosynthesis [J]. *BMC Genomics*, 2015, doi:10.1186/s12864-015-1477-5.
- [22] Lee J H, Yoon Y H, Kim H Y, et al. Cloning and expression of squalene synthase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Mol Cells*, 2002, 13 (3): 436-443.
- [23] DING C, ZHAO C L, CHEN Z J, et al. Bioinformatics analysis of the squalene synthase gene and the amino acid sequence in ginseng species [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2012, 8(8):12818-12825.
- [24] 吴松权,祖元刚,管清杰,等.膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析[J].中草药,2010,41(3):456-460.
- [25] HU W, LIU N, TIAN Y H, et al. Molecular cloning, expression, purification, and functional characterization of dammarediol synthase from *Panax ginseng* [J]. *Biomed Res Int*, 2013, doi:10.1155/2013/285740.
- [26] 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.
- [27] 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及其与皂苷含量的关系[J].西南农业学报,2014,27(3):1252-1255.
- [28] 龙月红,尤鹏升,国红玉,等.刺五加 SS 和 SE 拷贝数与皂苷含量的相关性分析[J].分子植物育种,2017,15(2):725-729.
- [29] 杨延,刘迪秋,葛锋,等.三七细胞中 SS、DS 共超表达对皂苷合成的影响[J].现代食品科技,2015,31(2):7-13.
- [30] Bhat W W, Lattoo S K, Razdan S, et al. Molecular cloning, bacterial expression and promoter analysis of squalene synthase from *Withania somnifera* (L.) Dunal [J]. *Gene*, 2012, 499(1):25-36.
- [31] 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.
- [32] 和风美.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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 刘天巍.人参 SQS、CAS 基因干扰载体的构建及转化人参研究[D].长春:吉林农业大学,2012.
- [36] Gas-Pascual E, Berna A, Bach T J, et al. Plant oxidosqualene metabolism: cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e109156.
- [37] Mayer K, Schüller C, Wambutt R, et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 1999, 402(6763):769-777.
- [38] 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.
- [39] Nelson D R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1814 (1):14-18.
- [40] Schuler M A, Werck-Reichhart D. Functional genomics of P450s [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54 (54): 629-667.
- [41] 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.
- [42] LUO H, SUN C, SUN Y, et al. Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers [J]. BMC Genomics, 2011, doi: 10.1186/1471-2164-12-S5-S5.
- [43] Schnable P S, Ware D, Fulton R S, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics [J]. Science, 2009, 326(5956):1112-1115.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 王飞,胥焘,郭强,等.喜旱莲子草对 Pb、Cd 胁迫响应的研究[J].环境科学与技术,2013,36(5):8-16.
- [48] 梁尧,姜晓莉,杨粉团,等.重金属铅胁迫对人参光合特征与皂苷含量的影响[J].中国中药杂志,2014,39(16):3054-3059.
- [49] 朱美霖,曾宪彩,蒋艳雪,等.重金属 Cd 胁迫下三七主要药效成分与其合成关键酶 DS 和 P450 基因表达相关性研究[J].中草药,2016,47(24):4428-4432.
- [50] 黄超.小分子化合物的添加提高人参皂苷产量及其作用机制探索[D].上海:华东理工大学,2013.
- [51] 阚奇.NO 对三七根中镉富集和皂苷含量调控的机理研究[D].昆明:昆明理工大学,2016.
- [52] 王和勇,罗恒,孙敏.诱导子在药用植物细胞培养中的应用[J].中草药,2004,35(8):U003-U007.
- [53] 徐立新,赵寿经,梁彦龙,等.外源调节物质对人参毛状根生长及皂苷合成的影响[J].吉林大学学报:工学版,2010,40(6):1619-1623.
- [54] HU F X, ZHONG J J. Jasmonic acid mediates gene transcription of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax notoginseng* treated with chemically synthesized 2-hydroxyethyl jasmonate[J]. Process Biochem, 2008, 43(1):113-118.
- [55] 张涛.生态因子与人参 *CYP716A52v2* 和 *CYP716A53v2* 基因表达量和皂苷含量相关性研究[D].长春:吉林农业大学,2016.
- [56] 金航,崔秀明,朱艳,等.气象条件对三七药材道地性的影响[J].西南农业学报,2005,18(6):825-828.
- [57] 吴庆生,朱仁斌,宛志沪,等.西洋参有效成分与气候生态因子的关系[J].生态学报,2002,22(5):779-782.
- [58] 左端阳,匡双便,张广辉,等.三七 (*Panax notoginseng*) 对不同光照强度的生理生态适应性研究[J].云南农业大学学报,2014,29(4):521-527.
- [59] 刘佳,全雪丽,姜明亮,等.低温胁迫对人参皂苷生物合成途径基因家族表达特性的影响研究[J].中草药,2016,47(11):1956-1961.
- [60] 崔秀明,陈中坚,王朝梁,等.土壤环境条件对三七皂甙含量的影响[J].人参研究,2000,12(3):18-21.
- [61] 郑建芬,尹兆波,赵芝,等.氮、磷肥施用对三七种苗生长的影响[J].云南农业大学学报,2017,32(1):113-119.
- [62] 陈美兰,黄璐琦,欧阳少华,等.植物内生菌对道地药材形成的影响[J].中国中医药信息杂志,2006,13(9):40-42.
- [63] 王婷,马越兴,叶耀辉,等.桃儿七茎部产鬼臼毒素类成分的内生真菌筛选及鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(2):27-31.
- [64] 邢朝斌,龙月红,劳风云,等.内生真菌对刺五加皂苷合成关键酶基因表达及皂苷含量的影响[J].中国中药杂志,2012,37(14):204-2045.
- [65] 张薇.人参根际土壤真菌与内生真菌的多样性及人参皂苷生物催化活性菌株的筛选[D].大连:辽宁师范大学,2011.
- [66] 陈冷.人参内生真菌对人参毛状根生长及次生代谢的影响[D].上海:第二军医大学,2016.

[责任编辑 刘德文]