

甾体皂苷生物合成相关酶及基因研究进展

尹艳¹, 关红雨², 张夏楠^{2*}¹ 贵州大学药学院, 贵阳 550025; ² 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

摘要: 甾体皂苷是植物中广泛存在的一种次生代谢产物, 其种类繁多且大多数有很强的生理活性, 具有很大的药用研究价值和广泛应用前景。甾体皂苷生物合成途径复杂, 受到多种酶的调控。本文综述了植物甾体皂苷的生物合成途径及途径中关键酶及基因的研究进展, 并对其研究前景做简要展望。

关键词: 甾体皂苷; 生物合成; 环阿屯醇; 糖基转移酶; 糖苷酶

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.8.029

Review on Enzymes and Genes Related to the Biosynthesis of Steroidal Saponins

YIN Yan¹, GUAN Hong-yu², ZHANG Xia-nan^{2*}¹ School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;² School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Steroidal saponins are a class of secondary metabolites widely existed in plants with strong physiological activity. The biosynthetic pathway of steroidal saponins is complex and regulated by many kinds of enzymes. This paper reviewed the research progress on the biosynthetic pathway of plant steroidal saponins and its key enzymes and genes, and give a brief outlook about the research prospects.

Key words: steroidal saponins; biosynthesis; cycloartenol; glycosyltransferase; glucosidase

甾体皂苷 (Steroidal saponins) 是一类具有螺甾烷结构母核的糖基皂苷, 因其水溶液经振摇后多能产生大量持久性肥皂水样泡沫而得名。甾体皂苷广泛存在于植物中, 尤其以薯蓣科、百合科、玄参科、蓼科、龙舌兰科等单子叶植物中多见, 作为双子叶植物, 蒺藜、葫芦巴, 以及所有茄科植物中也发现了甾体皂苷^[1]。20世纪60年代, 甾体皂苷元作为合成甾体避孕药和激素类药物的原料, 开始受到国内外学者的广泛关注与研究, 甾体皂苷或皂苷元越来越广泛的生理活性被发现, 如抗肿瘤、抗炎、抗真菌、抗病毒、解痉、扩张血管、治疗痴呆、降低血糖血脂等活性, 还对血液系统具有溶血、清除自由基、抗缺氧缺血、体外血小板活性等药理作用^[2]。目前市场上的地奥心血康胶囊、心脑舒通、盾叶冠心宁等都是甾体皂苷为有效成分的中药制剂, 在治疗心血管疾病方面临床效果显著^[3]。从百合科植物虎眼万年青中分离得到的甾体皂苷 OSW-1, 对人的正常细胞几乎没有毒性, 而抗癌活性比现在临床使用的紫杉

醇、阿霉素、喜树碱等抗癌药物强 10~100 倍, 成为目前世界上发现的最强抗癌活性物质^[4,5]。

甾体皂苷由甾体皂苷元和糖缩合而成, 以环戊烷多氢菲为母核的甾体皂苷元骨架包含 27 个碳原子, 分子中有含有多个羟基, 大多在 C-3 位有羟基取代。按 F 环的闭合状态甾体皂苷主要可分为三种类型: 螺甾烷型 [如, 知母皂苷 A III (图 1a)、重楼皂苷 I (图 1b)]、呋甾烷型 [如, 原菝葜皂苷 (图 1c)] 和变形螺甾烷型 [如, 颠茄皂苷 A (图 1d)]。其中, 螺甾烷型皂苷最为常见, 而呋甾烷型皂苷的 C-26 位糖苷键易被酶解, F 环随之环合成为相应的螺甾烷型皂苷。随着对甾体皂苷类化合物了解的日益深入, 以及近年来生物化学、植物化学、分子生物学的发展, 使人们逐步加深了对甾体皂苷合成途径的了解, 并试图通过基因工程等途径获取大量活性甾体皂苷类化合物服务于人类。本文就国内外研究者对甾体皂苷生物合成途径及催化主要中间产物合成酶类研究进行了概述。

1 甾体皂苷生物合成途径

甾体皂苷生物合成途径共有两条 (图 2): 细胞质甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和质体 2-C-甲

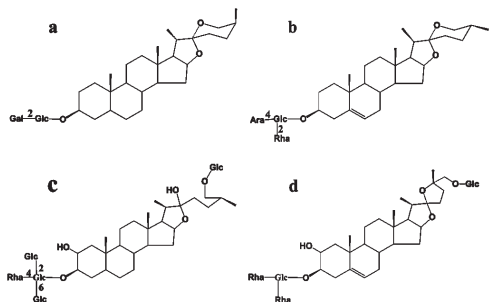


图 1 知母皂苷 A III (a)、重楼皂苷 I (b)、原菝葜皂苷 (c) 及颠茄皂苷 A (d) 化合物结构

Fig. 1 Chemical structure of timosaponin A III (a), polyphyllin I (b), prosarsasaponin (c) and belladonna saponin A (d)

基-D-赤藓醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径。其中, MVA 途径起主导作用^[6]。

甾体皂苷骨架的生物合成从乙酰辅酶 A (acetyl-Co A, C2) 通过 MVA 途径 (或丙酮酸通过 MEP 途径) 生成法尼基焦磷酸 (FPP, C17)。这个过程与萜类、类胡萝卜素的生物合成相同。此后法尼基焦磷酸先后通过鲨烯合酶 (squalene synthase, SQS)、角鲨烯环氧化酶 (squalene monooxygenase, SQE) 的催化形成 2, 3-氧化角鲨烯 (2,3-oxidosqualene, C30), 该中间体可启动角鲨烯发生环化反应。区别于萜类皂苷生物合成过程中 2,3-氧化角鲨烯的椅式-椅式-椅式-船式构型, 在甾体合成途径, 2,3-氧化角鲨烯在环阿屯醇合酶 (cycloartenol synthase, CAS) 的催化下以椅式-船式-椅式-船式构型环化形成环阿屯醇 (cycloartenol, C30), 以此作为甾体类化合物的先导前体^[6], 这个步骤在高等植物中也是甾体代谢与萜类代谢途径的一个重要分支点^[7]。

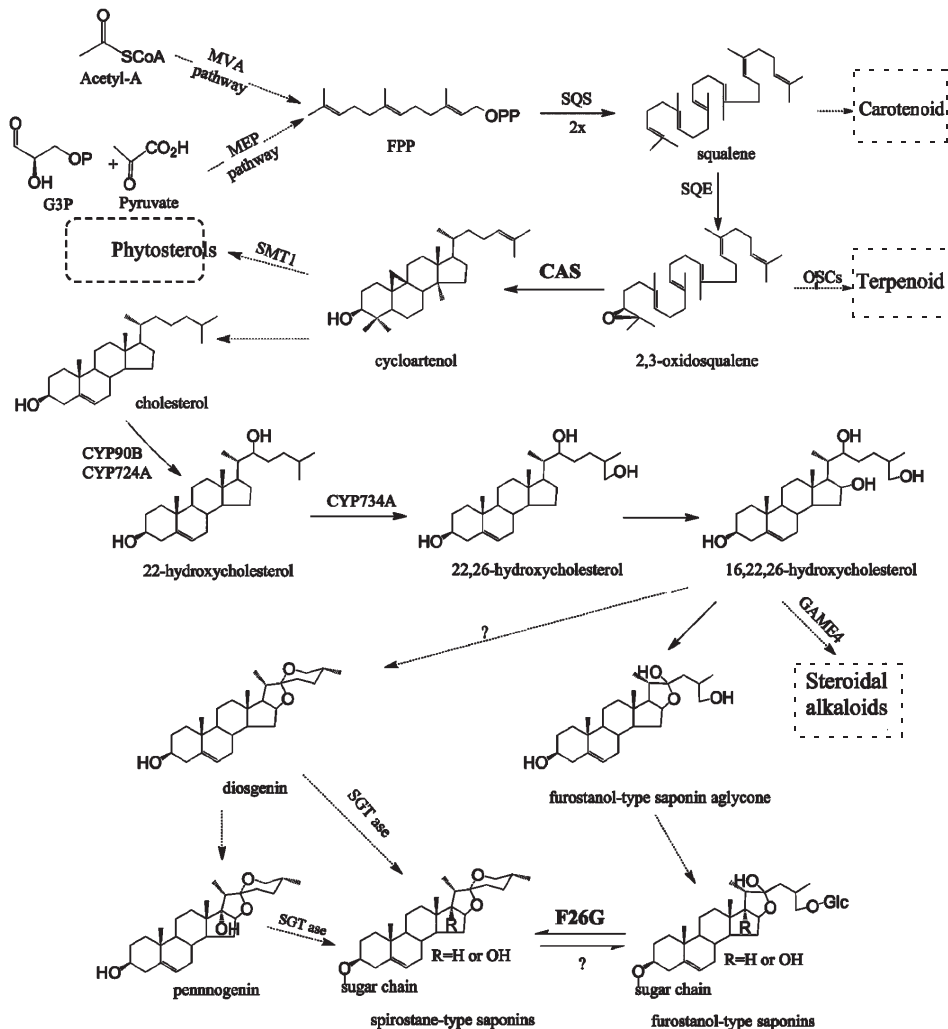


图 2 植物甾体皂苷生物合成途径

Fig. 2 Biosynthetic pathway of steroidal saponins in plant

国内外对甾体皂苷生物合成途径的早期研究工作主要集中在薯蓣科,并在 1965 年证明胆甾醇(cholesterol)是薯蓣皂苷元(diosgenin)的前体^[8]。在高等植物和藻类中,环阿屯醇作为烷基化底物,经过氧化、还原等一系列修饰,形成胆甾醇^[9-11]。胆甾醇侧链经过包括 C-22、C-26(27)、C-16 的羟基化、C-22 氧化成羰基等一系列反应后,生成的中间体环化为半缩酮,继而生成甾体皂苷元的螺缩酮结构,如薯蓣皂苷元^[12]。在此过程中,半缩酮在葡萄糖糖基转移酶作用下,C-26 位羟基可能形成糖苷键,生成呋甾烷型甾体皂苷,但该 C-26 位糖苷键易水解,水解后侧链自动环合生成螺缩酮,也因此呋甾烷型皂苷又被称为原型皂苷^[10,11]。值得注意的是,呋甾烷型甾体皂苷与螺甾烷型甾体皂苷之间的生物关系仍然存在争议。其中被普遍接受的观点为,甾体皂苷在植物细胞中主要以呋甾烷型的双链糖苷(bidesmosidic glycosides)形式储存和积累,只有在植物组织破坏后转化成相应的螺甾烷型产物^[13]。薯蓣皂苷元还可以经过修饰,如在 C-17、C-23、C-24、C-27 位引入羟基,形成偏诺皂苷元(pennogenin)或羟基偏诺皂苷元(hydroxyl-pennogenin)^[10]。

2 甾体皂苷生物合成途径中的关键酶及基因

2015 年 Wang X 等通过对墨西哥薯蓣(*Dioscorea composita*)进行 Illumina 深度 RNA 测序和转录组生物信息学分析,得到 79 条与甾体皂苷生物合成相关的功能基因,这些基因共编码 35 个酶,几乎覆盖整个甾体类化合物生物合成途径中的所有节点^[6]。甾体皂苷的合成酶根据其在途径中的位置可以分成四个部分:生成 IPP 和 DMAPP 之前与萜类合成共同途径的酶为一部分,在 MVA 途径中,3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGR)为限速酶;而 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR)则是 MEP 途径的关键酶^[14]。第二部分酶则是生成甾体环戊烷多氢菲母核的各种环化酶,它们负责催化直链 FPP 形成甾体的环状骨架,其中环阿屯醇合酶是甾体与萜类化合物合成途径分支的关键^[6]。第三部分酶负责催化甾体皂苷先导化合物生成甾体皂苷元过程中的结构修饰,包

括催化胆固醇生成的各种氧化酶、甲基转移酶等,以及以细胞色素 P450 酶为主的 C-26(27)、C-16、C-22 羟化酶。最后,由甾体皂苷糖基转移酶(steroidal glycosyltransferase, SGTase)催化甾体皂苷糖苷键的形成。由于第一部分酶为甾体皂苷与萜类生物合成共同的途径酶,在萜类的生物合成关键酶及基因研究中已有大量详细综述,本文中不再赘述。本文将重点介绍甾体皂苷生物合成的中下游途径关键酶。

2.1 环阿屯醇合酶

环阿屯醇合酶(CAS)催化 2,3-氧化角鲨烯向甾体合成先导化合物环阿屯醇转化,是甾体类化合物下游代谢的总开关。由于 CAS 在植物次生代谢途径中重要地位,CAS 基因的克隆研究受到了重视。迄今为止,登录 GenBank 的植物 CAS 基因序列超过 200 条,涉及诸如拟南芥、滇重楼、三七、刺五加等 50 多个物种,并有多物种的 CAS 基因被成功克隆并进行了功能验证。如 Chen D 等克隆了盾叶薯蓣一段全长 2280bp,编码 759 个氨基酸的 cDNA 序列,酵母表达证明该序列编码 CAS,且实时定量 PCR 分析表明该基因在盾叶薯蓣不同部位的表达量为幼叶 > 地下幼嫩块茎 > 地上幼茎^[15]。序列比对分析表明,不同植物 CAS 基因序列具有较高的保守性^[16]。Babiychuk E 所在研究团队对拟南芥 CAS1 基因进行等位突变,获得了 CAS1 缺陷型突变体,并发现 CAS1 缺陷将导致拟南芥白化甚至死亡^[17,18],该发现为 CAS 在其他物种中的研究提供了思路。

2.2 细胞色素 P450 酶

细胞色素 P450 酶在植物次生代谢中发挥了非常重要的作用。RNA 测序及转录组生物信息学分析表明,甾体类化合物生物合成途径有多个 P450 酶参与^[19],但实际针对甾体皂苷合成途径的 P450 酶的研究还很少。有研究者发现,菜油甾醇合成途径中编码 C-22-羟化酶的 CYP90 家族基因(CYP90B1, CYP90B2)、CYP724 家族基因(CYP724A1, CYP724B1)和编码 C-26-羟化酶的 CYP734A 家族基因同样也出现在其他植物甾醇的合成途径中,这可能意味着这几个家族的基因还参与甾体皂苷的生物合成^[12]。Choe S 等利用基因突变技术获得拟南芥 *dwf4* 突变体,即一个 CYP90B 基因的等位突变,该突变体证明了 DWF4 基因编码的 P450 酶催化菜油甾醇合成途径中的 C-22-羟化,且该突变体的矮化表型只能由 C-22-羟化的甾体底物拯救^[20]。该突变体的获得,为甾体类化合物合成途径中 C-22-羟化酶基因

研究的提供了一个有力研究材料。

2.3 甾体皂苷糖基转移酶和糖苷酶

甾体皂苷中,最常见的糖苷键是 3-*O*-糖苷键和 26-*O*-糖苷键,但目前对负责甾体皂苷元糖基化的糖基转移酶 SGTase 的研究成果鲜少报道。2005 年, Kohara A 等从刺茄 (*Solanum aculeatissimum*) 中克隆出了第一个参与甾体皂苷生物合成的糖基转移酶基因 *SaGT4A*, 并发现该酶能催化诸如薯蓣皂苷元、纽替皂苷元 (nuatigenin) 和剑麻皂苷元 (tigogenin) 等甾体皂苷元的 3-*O*-葡萄糖基化,同时还显示了对甾体生物碱,如茄碱、澳洲茄胺和番茄碱糖基化的作用^[21]。该研究团队随后的研究还发现,马铃薯中的糖基转移酶 StSGT 也能催化甾体皂苷糖基化,并且与 *SaGT4A* 相比,StSGT 对底物的特异性要求较低,且能利用半乳糖作为底物进行糖苷化^[22]。

值得注意的是,由于呋甾烷型皂苷与螺甾烷型皂苷之间的特殊生物转化关系,26- β -糖苷酶 (furostanol glycoside 26-*O*- β -glucosidase, F26G) 也是多种甾体皂苷合成代谢中一个非常关键的酶。从燕麦 (*Avena sativa*) 中分离的 Avenacosidase 就是一个 F26G 酶,能催化呋甾烷型皂苷 Avenacosides A 和 B 的 C-26 糖苷键水解, Sabine GM 等对编码该酶的 cDNA 及蛋白序列作了分析,发现其属于 BGA 家族 β -糖苷酶,包含一个 As-P60 亚单位^[23]。1996 年 Kentaro I 等根据从闭鞘姜 (*Costus speciosus*) 中纯化的 26- β -糖苷酶蛋白序列设计引物成功克隆得到一段编码 562 个氨基酸的 26- β -糖苷酶 cDNA 序列,命名为 *CSF26G*,大肠杆菌表达无细胞匀浆对呋甾烷型甾体皂苷 26- β -糖苷键的裂解具有特异性^[24]。随后,*CSF26G* 基因被成功转入烟草植株,证明了其能在异源植物中表达并发挥作用^[25]。Wang L 等将利用质粒 pET-22b 将 *CSF26G* 转入大肠杆菌并成功表达,实现了呋甾烷型甾体皂苷到螺甾烷型甾体皂苷的体外生物转化^[26]。2006 年,Arthan D 等从双子叶植物水茄 (*Solanum torvum*) 的叶子中提取纯化出一个 F26G 酶,这是植物源 GH3 家族 β -糖苷酶特异性水解呋甾烷型皂苷的首次报道^[27]。水茄甲醇提取物的薄层色谱分析表明,该 F26G 酶似乎只存在于叶子和叶柄中,而在果实中没有^[27]。高加索薯蓣 (*Dioscorea caucasica* Lipsky) 叶中 F26G 酶的组织定位研究表明该酶主要存在于叶肉细胞中,而呋甾烷型皂苷却在叶表皮中积累^[28]。这样的底物和酶的组织定位差异可能是作为一种防御机制防

止呋甾烷型皂苷在运输中被降解。

2.4 其他关键酶

由于研究者对甾体类化合物生物合成途径的研究主要集中在甾醇类和甾体生物碱类,甾体皂苷生物合成途径基因研究较少。但甾醇、甾体生物碱和甾体皂苷的生物合成具有共同的前体环阿屯醇,而从化学结构来推测,这几种化合物的合成途径存在一定的交集。2000 年,Diener AC 等研究发现,拟南芥甾醇合成途径中 C-24-甲基转移酶失活的 *SMT1* 突变体中胆甾醇大量积累,而 24-甲基甾醇含量降低^[29]。2013 年,Itkin M 等在甾体生物碱生物合成途径研究中发现,在番茄和土豆中, VIGS 诱导 *GAME11* 基因沉默导致胆甾烷醇型甾体皂苷的积累,而 RNAi 导致的 *GAME4* 基因沉默则会导致甾体皂苷的积累以及甾体生物碱含量的减少^[30]。由此可以推测,*SMT1*、*GAME11*、*GAME4* 等处于这几类甾体类化合物生物合成途径分支点,并起到调控甾体类化合物代谢流向的关键作用。25-AZA (25-azalanosterol) 是一个 SMT 特异性抑制剂,外源添加能有效抑制 SMT 酶的活性^[9],该抑制剂的应用将为研究 SMT 在甾体皂苷生物合成途径中的作用提供方便。

3 前景展望

甾体皂苷是植物中广泛存在的一类重要次生代谢产物,尤其在诸如重楼、薤白、知母、菝葜等中药材中含量丰富,具有极大的药用开发潜力和广阔的应用前景。目前,利用基因工程、发酵工程等生物技术手段,从分子水平对次生代谢产物生物合成途径中关键基因进行调控,促进其表达,从而实现药用植物有效成分的大量生产已经成为中药现代化的一大趋势,是解决药用植物资源日益匮乏的重要途径^[31]。但就甾体皂苷而言,其生物合成途径尚存在争议,前体环阿屯醇合成之后的具体途径及涉及到的酶克隆和基因功能鉴定的研究甚少。因此,有必要进一步深入研究甾体皂苷的生物合成途径,掌握调控甾体皂苷生物合成的关键酶及基因,从而实现利用基因工程、发酵工程等手段大量获得活性甾体皂苷服务于人类社会。

参考文献

- 1 Sparg SG, et al. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol*, 2004, 94: 219-243.
- 2 Liu X (刘星), et al. Research progress of bioactivity of ster-

- oidal saponins in recent ten years. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40:2518-2523.
- 3 Zhang CL (张存莉), *et al.* The development of the studies on the natural steroidal saponins' biological activities. *J Northwest Forest Univ* (西北林学院学报), 2004, 18:95-100.
 - 4 Yan Z, *et al.* OSW-1: a natural compound with potent anti-cancer activity and a novel mechanism of action. *J Nat Cancer Instit*, 2005, 97:1781-1785.
 - 5 Zhang Y (张瑜), *et al.* 虎眼万年青研究进展. *Central South Pharm* (中南药学), 2010:293-295.
 - 6 Wang X, *et al.* De novo transcriptome assembly and the putative biosynthetic pathway of steroidal saponins of *Dioscorea composita*. *Plos One*, 2015, 10:1-18.
 - 7 Moses T, *et al.* Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit Rev Biochem Molecul Biol*, 2014, 49:1-24.
 - 8 Eich E. Solanaceae and convolvulaceae: Secondary metabolites. *Springer Berlin Heidelberg*, 2008:393-395.
 - 9 Lu Y, *et al.* Regulation of the cholesterol biosynthetic pathway and its integration with fatty acid biosynthesis in the oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7:81-87.
 - 10 Wang Y, *et al.* Chemotaxonomic study of the genus *Paris* based on steroidal saponins. *Biochem Systemat Ecol*, 2013, 48:163-173.
 - 11 Cárdenas PD, *et al.* The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in Solanaceae steroidal alkaloid metabolism. *Phytochemistry*, 2015, 113:24-32.
 - 12 Ohnishi T, *et al.* Insights into the function and evolution of P450s in plant steroid metabolism. *Phytochemistry*, 2009, 70:1918-1929.
 - 13 Kalinowska M, *et al.* The formation of sugar chains in triterpenoid saponins and glycoalkaloids. *Phytochem Rev*, 2005, 4:237-257.
 - 14 Chen J (陈建), *et al.* Research advances on the enzymes and their coding gene involved in plant terpene biosynthesis. *Molecu Plant Breed* (分子植物育种), 2004, 2:757-764.
 - 15 Chen D, *et al.* Molecular cloning and expression of cycloartenol synthase gene from *Dioscorea zingiberensis*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2009, 29:221-228.
 - 16 Wang JB (王进波). Cloning and sequencing of squalene synthase gene and cycloartenol synthase gene from *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*. Yaan: Sichuan Agricultural University (四川农业大学), MSc. 2012.
 - 17 Bahiychuk E, *et al.* Albinism and cell viability in cycloartenol synthase deficient Arabidopsis. *Plant Signal Behavior*, 2008, 3:978-980.
 - 18 Bahiychuk E, *et al.* Allelic mutant series reveal distinct functions for Arabidopsis cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:3163-3168.
 - 19 Kumar S, *et al.* RNA-Seq mediated root transcriptome analysis of *Chlorophytum borivilianum* for identification of genes involved in saponin biosynthesis. *Funct Integr Genom*, 2015, 15:1-19.
 - 20 Choe S, *et al.* The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 1998, 10:231-243.
 - 21 Kohara A, *et al.* A novel glucosyltransferase involved in steroid saponin biosynthesis in *Solanum aculeatissimum*. *Plant Mole Biol*, 2005, 57:225-239.
 - 22 Kohara A, *et al.* Characterization and engineering of glucosyltransferases responsible for steroid saponin biosynthesis in Solanaceous plants. *Phytochemistry*, 2007, 68:478-486.
 - 23 Sabine GM, *et al.* Avenacosidase from oat: purification, sequence analysis and biochemical characterization of a new member of the BGA family of β -glucosidases. *Plant Mole Biol*, 1994, 26:909-921.
 - 24 Kentaro I, *et al.* Molecular cloning and bacterial expression of a cDNA encoding furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase of *Costus speciosus*. *FEBS Lett*, 1996, 389:273-277.
 - 25 Ichinose K, *et al.* Heterologous expression of furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase of *Costus speciosus* in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 1999, 51:599-603.
 - 26 Wang L (王亮), *et al.* Bioconversion *in vitro* from furostanol glycoside to spirostanol glycoside catalyzed by recombinated F26G. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2001, 11:326-328.
 - 27 Arthan D, *et al.* Furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase from the leaves of *Solanum torvum*. *Phytochemistry*, 2006, 67:27-33.
 - 28 Koba G, *et al.* Tissue and subcellular localization of oligofurostanosides and their specific degrading β -glucosidase in *Dioscorea caucasica* Lipsky. *Phytochemistry*, 2004, 65:555-559.
 - 29 Diener AC, *et al.* Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell*, 2000, 12:853-870.
 - 30 Itkin M, *et al.* Biosynthesis of antinutritional alkaloids in *Solanaceous Crops* is mediated by clustered genes. *Science*, 2013, 341:175-179.
 - 31 Gao WY (高文远). Traditional Chinese Medicine Biological Engineering (中药生物工程). Beijing: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2014. 1-7.