

三七总皂苷的生物合成研究进展

韩菁婕, 娄月芬



同济大学附属上海市第四人民医院药剂科 (上海 200434)

【摘要】三七总皂苷由于具有良好的抗凝、改善血流动力学等药理作用,被广泛用于临床心脑血管疾病的治疗。本文整理分析了三七总皂苷的生物合成途径,对其中的关键酶如法尼基二磷酸合成酶、鲨烯合成酶、鲨烯环氧酶、达玛烯二醇合成酶、氧化鲨烯环化酶、超基因家族氧化酶、葡萄糖苷转移酶在表达调控中的作用进行归纳总结,并综述了异源人工合成途径的构建及生物合成调控方面的研究进展,以期三七总皂苷的生物合成方法优化提供参考。

【关键词】三七总皂苷; 生物合成; 关键酶; 底盘细胞; 调控策略

【中图分类号】 R963

【文献标识码】 A

Research progress on biosynthesis of Panaxnotoginseng saponins

HAN Jingjie, LOU Yuefen

Department of Pharmacy, Shanghai Fourth People's Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200434, China

Corresponding author: LOU Yuefen, Email: louyuefen@sina.cn

【Abstract】 Panaxnotoginseng saponins is widely used in the treatment of clinical cardiac cerebrovascular disease due to its excellent anticoagulant and hemodynamics effects. This review sorted out and analyzed the biosynthetic pathway of Panaxnotoginseng saponins, summarized the role of key enzymes involved expression regulation such as farnesyl pyrophosphate synthase, squalene synthase, squalene epoxidase, dammarenyldiol-II synthase, oxidosqualene cyclase, cytochrome P450 monooxygenases, and glycosyltransferase. Meanwhile, the research progress in the construction of heterologous synthetic pathways and the regulation of biosynthesis were also generalized, to provide reference for the optimization of the biosynthetic method.

【Keywords】 Panaxnotoginseng saponins; Biosynthesis; Key enzymes; Chassis cell; Regulatory strategy

三七 (notoginseng radix) 为五加科人参属 *Panax* L. 植物三七 [*Panaxnotoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥根, 具有散瘀止血、消肿止痛的作用^[1]。三七总皂苷 (panaxnotoginseng saponins, PNS) 作为主要活性成分, 约占三七中成分含量的 12%, 药理学研究发现其在抗凝、抗炎、神经

元保护等方面有着良好药效^[2]。研究发现, PNS 可通过晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end product, AGE) - 受体 (advanced glycation end product receptor, RAGE)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) - 蛋白激酶 (Akt kinase, Akt) 信号通路发挥抗凝和抗板作

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202412024

基金项目: 上海市“科技创新行动计划”生物医药科研支撑专项 (23S21900900); 上海市第四人民医院学科助推计划项目 (SY-XKZT-2022-1015)

通信作者: 娄月芬, 主任药师, Email: louyuefen@sina.cn

用^[3-4], 显著降低血清炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 水平, 在心脑血管疾病患者中发挥抗炎作用^[5-7]。此外, PNS 可以透过血脑屏障, 调节帕金森患者体内氨基酸水平, 同时改善海马组织形态, 减少神经细胞凋亡, 促进神经元修复^[5-6]。动物和细胞研究也证实 PNS 在抗肿瘤、降脂、促进骨损伤修复等方面也显示出了良好的药理作用。

PNS 相关制剂已广泛用于临床心脑血管疾病的治疗, 但天然药物三七产量受自然气候、病虫害、生长年限等因素影响较大, 且 PNS 在天然药物中含量通常较低, 提取工序复杂繁琐, 需要较多的人力物力, 现有的传统栽培育种方式尚未能实现快速提高三七中皂苷的含量, 导致 PNS 产量和价格不稳定, 因此亟需开发人工合成途径以满足日益增加的临床使用需求。本文总结了近年来 PNS 的生物合成进展, 以期对相关中成药制剂的工艺优化提供参考。

1 PNS生物合成途径的关键酶

目前已从三七植物中陆续发现以三萜皂苷为主的皂苷类成分达 80 余种^[8-9], 三萜皂苷主要由原人参二醇 (protopanaxadiol, PPD) 型皂苷和人参三醇 (protopanaxatriol, PPT) 型皂苷^[10]组成。

三萜皂苷的生物合成途径如图 1 所示^[11-17], 限速酶有法尼基二磷酸合成酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPS)、鲨烯合成酶 (squalene synthase, SS)、鲨烯环氧化酶 (squalene epoxidase, SE)、达玛烯二醇合成酶 (dammarenediolsynthase, DS)、氧化鲨烯环化酶 (cycloartenol synthase, CAS)、超基因家族编码的含有血红素的氧化酶 CYP450 和糖苷转移酶 (glycosyl transferases, GT) 等。

1.1 法尼基二磷酸合成酶

FPS 含有底物烯丙基焦磷酸 (allyl pyrophosphate, APP) 及异戊烯焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 的结合位点^[18], 可催化 IPP 和二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 以 1,4 头尾连续缩合反应, 形成萜类前体物质法尼基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP)。已有研究表明, FPS 的氨基酸序列在三七、人参、西洋参、大戟等多种植物中比较保守, 长度在 342 个或 357 个 aa 左

右^[19-20]。吴耀生^[21]运用系统发育树的方法对三七种 FPS 与人参、积雪草进行多序列比较, 结果表明, 两者与三七种 FPS 之间碱基同源性分别为 99% 和 95%。周秘等^[22]通过对 FPS 相对表达量与刺五加叶中皂苷产率的相关性研究, 发现 FPS 相对表达量越高, 刺五加叶子中皂苷产率越高。Kim 等^[23]通过毛根农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的转化, 发现与野生型比较, FPS 基因的过表达可以使人参皂苷含量从 4.81% 增加到 11.5% 的水平, 这也说明 FPS 参与了三萜皂苷类物质的生物合成过程, 并起到重要作用。现有研究表明, 过表达 FPS 可显著提高人参、积雪草等植物中三萜皂苷的含量, 该策略是提高人参皂苷产量的一个重要因素^[24-25]。

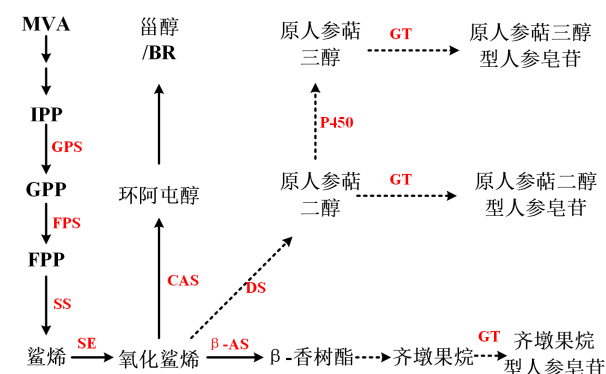


图1 植物三萜皂苷的生物合成途径
Figure 1. Biosynthetic pathway for triterpene saponins in plant

注: MVA: 甲羟戊酸; IPP: 异戊烯焦磷酸; GPP: 香叶二磷酸; FPP: 法尼二磷酸; GPPS: 香叶二磷酸合成酶; FPS: 法尼二磷酸合成酶; SS: 鲨烯合成酶; SE: 鲨烯环氧化酶; CAS: 氧化鲨烯环化酶; β -AS: β -香树脂合成酶; DS: 达玛烯二醇合成酶; GT: 糖苷转移酶。

1.2 鲨烯合成酶

SS 酶能够促进两分子 FPP 发生缩合反应生成鲨烯, 随后通过系列催化作用转化为三萜类物质或植物甾醇, 在植物次生代谢过程中扮演着不可或缺的角色。该酶作为三萜合成途径的核心催化剂, 对植物甾类物质的生物合成具有决定性影响。SS 在不同植物间表达具有多态性, 通过分析目前所具有的研究成果, 三七、甜椒、人参、青蒿以及黄芪的 ss 氨基酸序列相对固定并高度相同, 其长度处于 409~415 aa^[26-29]。大量文献研究显示, SS 的表达量与皂苷产量呈显著的正相关关系, 其表达水平决定了皂苷产量, 提高 SS 的转录水平有利于提高皂苷产量, 说明 SS 在三七皂苷生物合成中起重要作用^[30-32]。

1.3 鲨烯环氧酶

SE 是关键限速酶之一, 可将氧化鲨烯催化为 2,3-氧化鲨烯。Garaiová 等^[13]发现 SE 抑制剂会导致酿酒酵母生长缺陷, 导致鲨烯堆积, 证明 SE 与鲨烯的转化有关。李坤等^[33]从三七根中提取得到了编码长度为 1 648 bp、包含 537 个氨基酸残基的 SE 基因 cDNA 序列。通过对氨基酸序列和核苷酸序列对比, 可发现三七与人参中 SE 的同源性达到 97%。

Han 等^[34]研究发现了人参三萜皂苷和甾醇生物合成中的 *PgSE1* 基因对人参皂苷的合成起到正调节, 同时导致根中 *PgSE2* 基因和 CAS 显著上调, 使甾醇产量显著增加。牛云云等^[35]从三七中筛选得到 2 类不同类型的 SE 编码基因 *PnSE1* 和 *PnSE2*, 通过生物信息学研究推测, *PnSE1* 基因广泛存在于三七植物中, 催化三萜皂苷的生物合成; *PnSE2* 基因主要在花中表达, 参与甾醇合成。目前的研究认为, 三七、人参等植物中存在 2 种表达模式相似的 SE 同源基因, 分别调控三萜皂苷和甾醇的合成, 二者的表达水平是影响三萜皂苷产量的重要因素之一。

1.4 达玛烯二醇合成酶

DS 的主要作用是催化 2,3-氧化鲨烯环化为达玛烯二醇。在 DS 氨基酸水平上, 三七与人参和西洋参具有较高的同源性, 分别为 98.7% 和 99%。

Sun 等^[36]从人参根 cDNA 噬菌体文库中得到 DS 基因, 研究结果表明, 表达重组的 DS 蛋白可以提高达玛烯二醇的表达水平, 同时也表明 DS 在人参皂苷的生物合成中具有重要功能。Han 等^[37]利用 RNA 干扰技术沉默人参中的 DS 基因, 结果工程菌株的人参皂苷产量降低 84.5%。有文献利用茉莉酸甲酯刺激上调植物中 DS 的表达, 发现细胞中三萜皂苷的产量也随之升高^[38], 证实了 DS 在三萜皂苷生物合成途径中起到关键调控作用。

1.5 氧化鲨烯环化酶

CAS 与 DS 同样作用于 2,3-氧化鲨烯, 可催化其向甾醇的合成转化, 生成环阿屯醇, 从而间接影响三萜皂苷的生物合成^[39]。

孙颖^[40]利用 GatewayTM 技术, 构建 RNA 干扰沉默载体, 利用 T-DNA 介导法转化至三七基因组中, 抑制 CAS 基因的表达, 阻断或降低植物甾醇的合成, 进而提高三七皂苷的合成。何沐阳^[41]

利用 RNA 干扰技术沉默人参细胞中的 CAS 核心保守序列, 发现相较于对照组, 突变体发根系的环阿屯醇量降低了 80.64%, 而达玛烯二醇量得到提高; 植物甾醇量相较于对照平均降低 53.61%, 而人参皂苷产量有所增加; 用高效液相色谱法分析检测显示, CAS 基因抑制的突变体发根系中人参皂苷 Rg₁、Re 和 Rb₁ 量比对照组均有不同程度的升高。

1.6 超基因家族氧化酶

CYP450 是一类亚铁血红素-超基因家族氧化酶^[42], 位于三萜皂苷合成代谢途径的下游, 其表达量与三萜皂苷的合成量呈正相关^[43]。

Luo 等^[44]利用高通量测序技术, 获得了 15 个来自三七根的全长 CYP450。其中 Pn00158 及 Pn02132 转录本分别与人参 CYP716A47、大豆 CYP93E1 的氨基酸序列高度同源, 推断二者很可能是参与 PNS 合成的候选 CYP450。吴鹏等^[45]运用 RT-PCR 分析了刺五加中 *CYP450* 基因在不同产地、器官及不同发育期及 MA 刺激条件下的表达差异。结果表明, *CYP450* 基因的表达与总皂苷的含量呈极高度相关。Han 等^[46]首次验证了 CYP450 家族中 *CYP716A47* 基因可催化工程菌体内原人参二醇的生物合成。Chen 等^[47]应用高通量 454GS FLX 测序技术挖掘人参、西洋参和三七含有大量的 *CYP450* 基因, 猜测这可能是在生物合成三萜皂苷类成分过程中最重要的一种酶。

1.7 葡萄糖苷转移酶

GT 基因 cDNA 序列在三七、狸藻、拟南芥、玉米等植物中发现, 长度为 416~1 036 aa, 这是因为 gt 通过糖基转位于皂苷元合成的最后一步 (即体内合成) 催化皂苷元的生成^[48]。

向丽等^[49]通过分析各紫锥菊转录组结果得到, 有 3 个三七糖基转移酶基因与蒺藜苜蓿中三萜 GT 基因 *UGT73K1* 和 *UGT71G1* 非常接近, 认为其可能参与紫锥菊皂素的最终生成, 发挥催化作用。修乐山等^[17]发现茉莉酸甲酯处理可显著提高刺五加中 *UGT* 基因的表达量。不同产地、器官和时期刺五加 *UGT* 基因的表达量与总皂苷产量有较大的变化, 但 *UGT* 基因的表达量与总皂苷产量有很好的相关性, 即两者同时增加或减少。结果表明, *UGT* 作为刺五加合成总皂苷的关键酶, 其表达水平决定了刺五加中总皂苷的产量。

2 PNS人工细胞合成体系的构建

2.1 底盘细胞的选择和优化

研究人员在分析了三七皂苷的合成途径以及发掘三七中一些重要的合成酶基因的基础上,运用合成生物学手段证明了微生物细胞不能产生 PNS,构建获得了三七、人参等植物中三萜皂苷人工细胞合成体系^[50-51]。

目前,大肠埃希菌模式微生物底盘宿主仍是当前三萜皂苷及其前体物质的主要合成宿主,包括:原核细胞如大肠杆菌(*E.coli*)和枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*);真核细胞如酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、毕赤酵母(*P.pastoris*)、解脂耶氏酵母(*Y.lipolytica*)等。

2.1.1 原核细胞宿主

以生长速度快、遗传背景简单、使用方便为优势的大肠埃希菌成为目前合成天然产物的典型模式微生物。大肠杆菌中天然存在甲基赤藓糖醇磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径,由于其特点,研究人员可以通过这种底盘细胞生产合成三萜皂苷途径中的重要中间体——角鲨烯。张亦男等^[52]以 *E.coli* 作为宿主细胞对鲨烯合酶进行了异源表达,同时增加 MEP 途径相关合成酶和异构酶的表达,从而采用大肠杆菌作为底盘细胞生产角鲨烯,产率达到 73.88 mg/L,发酵条件最优化^[53]。然而大肠杆菌体内不具有 MVA 代谢通路,Zhu 等^[54]基于大肠杆菌底盘细胞 MVA 代谢途径,实现外源合成重要中间体衍生物法尼烯,并且引入了关键参茸皂苷合成通路中的 C 阶段成分。他们进一步优化不同组分酶反应次序来实现法尼烯的合成,获得 1.1 g/L 的较高收率。

天然的枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)具有无内毒素产生、低营养物质要求、高密度高效发酵、高外源蛋白质生产能力等优点,因而备受食品、药用产业的青睐并已应用于生产很多菌产制品,如枯草芽孢杆菌。Song 等^[55]利用不同来源筛选及分离了鲨烯合酶并将其引入枯草芽孢杆菌宿主细胞系统建立了新的角鲨烯生物合成途径,通过改善培养条件和代谢途径,他们将鲨烯的产量从枯草芽孢杆菌宿主细胞中增加至 7.5 mg/L。然而,该宿主细胞原核系并没有产生关键酶 CYP450,是制约其进一步合成三萜皂苷的重要因素。

2.1.2 真核细胞宿主

至今,酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母和解脂耶氏酵母是公认的 3 个最常用的三萜皂苷人工细胞合成系统的真核底盘细胞。真核底盘细胞在复杂天然产物三萜皂苷人工细胞合成系统上,相对于原核底盘细胞,具有不可替代的独特优势:其中携带有自身的 MVA 途径,可以有效地进行前体化合物的 IPP、DMAPP、角鲨烯等的合成;同时,得益于细胞内丰富的膜状体系及翻译后修饰,能够使得环化酶、细胞色素 P450 等氧化酶作用更加高效。

作为一种优质的底盘细胞,除具有普通酵母底盘细胞的功能之外,毕赤酵母还可以很容易地使异源基因整合在其染色体上,而且改造后的细菌具有高效遗传稳定性,所以是首选的底盘细胞之一。Zhao 等^[56]已经成功地建立了毕赤酵母体内生产人工皂苷 D(达玛烯二醇-II)的生物合成途径,这种生产途径使用的是两种关键酶,即达玛烯二醇-II 合酶和角鲨烯环氧酶的自我组合方法。当利用这种方法时,获得了最高的 0.10 mg/g 产品产量,该工程菌株能在 48 h 内获得这种产物。

解脂耶氏酵母具有无毒、可以在非极性环境中生长和具有高效生物产脂能力等特点,它现在已成为生产多种萜类、黄酮类、聚酮类等化合物的发酵工程微生物。Wu 等^[57]将原人参二醇合成代谢途径构建在解脂耶氏酵母外源体上,使原人参二醇达到 300.67 mg/L 的产率。Li 等^[58]用外源性 MVA 途径中的核心基因进行过表达,合成出了将细胞色素 p450 单加氧酶和辅酶还原酶等融合为蛋白质的一个基因,并且可以通过工程生物合成产生人参皂苷 Compound K。所得产品的浓度能够达到 161.8 mg/L。

酿酒酵母是一种具备相对简单基因改造操作、低生产成本的典型真核改造模型体系,在许多生物通路的应用非常广泛,特别是用于原生苷,如三萜皂苷类化合物的生产。酵母细胞平台所生产的三萜皂苷类物质主要包括达玛烯二醇、原人参二醇、原人参三醇、人参皂苷 Compound K、人参皂苷 Rh₂、人参皂苷 Rg₃、部分人参皂苷糖基化衍生物^[59-63]。

选育并改造底盘细胞是三萜皂苷及其他化合物异源生产的重中之重,底盘细胞的改造是建立三萜皂苷生物合成通路的关键环节。该技术主要

包括底盘细胞的基因组工程及染色体工程等,如基因工程删减基因片段和密码子压缩技术^[64-65]。其过程主要去除那些可有可无的基因,以增加自身代谢速率和能源利用效率,可大大提高底盘细胞生物合成途径的预测性和可控性,从而达到高效合成产物的目的。

2.2 三七皂苷生物合成途径的调控

2.2.1 提高三萜皂苷合成途径的代谢流

因为外源三萜皂苷的生物合成过程会与内源形成的三萜皂苷生物合成过程形成竞争,所以增加前体物质的浓度能够保证基础内源性代谢过程的稳定性,也能够提高其异源性三萜皂苷形成的能力,有利于增加所合成产品的产量。另外也可通过改变关键基因的启动子强弱或者改变其拷贝数等方式来优化其目标过程,利用新的基因挖掘技术、酶工程或蛋白质工程等技术来提高三萜皂苷产生过程所需酶的酶活性,进而提高目标产物的形成。以上常规的调控手段也可相互结合应用于提高目标产品的产量。

Wu 等^[57]通过基因修饰技术提高解脂耶氏酵母内转醛醇酶和转酮醇酶活性,扩大细胞质内的乙酰辅酶 A 需求,从而提高了原人参二醇产量达 88.73 mg/L。Wang 等^[63]采用类似的方法,在 UGTPg45 中添加多个 delta 位置点的复制以增大 UGTPg45 的表达量,从而把原有人参皂苷 Rh2 生产能力 35.7 mg/L 提高到 52.7 mg/L,并用一个非常强的启动器—UAS-TDH 进一步促进,最终成功获得了人参皂苷 Rh2 产量高达 74.7 mg/L 的表达。Song 等^[55]通过对 UGT51 进行半理性的设计,有效提高了 UGT51 的催化效率,将其应用于人工细胞合成人参皂苷 Rh2 过程中效果显著,最终可将 Rh2 产量翻番至 2.90 mg/L,是原始菌株的 900 多倍。Zhang 等^[66]通过在酿酒酵母体内过量表达关键酶基因保证前体供应,与从光果甘草新挖掘出的 β -香树脂醇合成酶进行过量表达,这样在酿酒酵母细胞内 β -香树脂醇作为人参皂苷 ro 前体物的产量提高 65 倍。

2.2.2 下调底盘细胞内源竞争途径

为了提高底盘细胞生产目标产物(三萜皂苷)的质量和产率,可以将一些不需要或不需要的内源性代谢路径限制、切断,从而增加它们形成三萜皂苷所需的重要代谢通路的输入资源和能量,从而促进目标产物的合成产能。其中 FPP

(前一步合成功能性目标产物三萜皂苷的前体物质)、角鲨烯、2,3-氧化角鲨烯等都是甾醇类物质合成的必经元素,参与调控甾醇类物质合成的核心酶基因,对于维持底盘细胞基本的生命活动影响比较大,不能完全灭绝该元素,所以不存在削减底盘细胞与目标产物竞争的影响。研究的手段主要为调控甾醇合成通路上的关键酶基因,减少该条竞争性链路对目标产物合成的阻碍,从而实现优化产物的目标。有研究构建了利用底盘细胞的羊毛甾醇合酶催化 2,3-氧化角鲨烯转化为麦角固醇从而在巴斯德毕赤酵母中合成达玛烯二醇-II 的合成途径^[56]。通过改变麦角固醇竞争通路启动子的起始启动子为硫酸素抑制型启动子,从而增加了达玛烯二醇-II 的产量 3.6 倍。而对于对基础细胞只进行轻微干扰或者不产生影响的竞争内部通路,可以直接剪切竞争通路以提高基础细胞中人参皂苷目标产物的产量。Kim 等^[67]通过构建酵母产酒过程中建立一个合成初始人参皂苷二醇的竞争路径,剪切了底部细胞中抑制 FPP 向法尼醇转换的 *LPPI* 和 *DPPI* 基因,因此减少了底物,也保证了中间材料 FPP 的足够供应,同时还删除了一些氧化还原酶基因使其更好地利用还原型辅酶 II,从而大大提高了 PPD 的产量超过了 11 倍。

3 结语

PNS 及其制剂因良好的药理活性,已被广泛用于临床心脑血管疾病的治疗。随着 PNS 的临床需求日益增大,生物合成 PNS 成为研究热点之一。微生物具有卓越的生物合成能力,可以产生广谱代谢物,已被广泛开发用于生产各种化学品、多聚物前体和药用活性分子的合成。

目前对 PNS 合成途径关键酶的调控机制尚未完全明确,仍需进一步对关键酶的作用方式和调控网络深入探索。尽管生物合成途径已经为高校生产 PNS 提供了新思路,但目前仍处于研究阶段,产生提升有限且未实现大规模生产。我们期望持续不断开发合成生物学工具和基因组编辑策略促进底盘菌株的构建,应用于合成生物学的研究,促进 PNS 的合成。针对甲羟戊酸途径强化的底盘菌株,构建分层动态调控系统,用于产物的合成、调控研究。一方面动态上调合成途径中的限速步骤,解除合成限速瓶颈,另一方面在发酵后期下调细胞生长,引导更多碳流量转向产物合成,同

时构建优势小基因组底盘菌株,自上而下删减染色体片段。构建优质微生物底盘菌株用于高附加值化合物的合成,具有广阔的前景。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典 2025 年版.一部[S]. 2025: 13.
- 2 赵灿,郭丽娜,彭玉帅,等.三七总皂苷生物合成的关键酶及其调控研究进展[J].中草药,2015,46(19):2954–2965.[Zhao C, Guo LN, Peng YS, et al. Research progress in key enzymes involved in biosynthesis of Panax notoginseng saponins and their regulation[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(19): 2954–2965.] DOI: 10.7501/j.issn.0253–2670.2015.19.023.
- 3 Yan B, Ning Y, Guo J, et al. Network pharmacology analysis and clinical verification of Panax notoginseng saponins in deep venous thrombosis prevention[J]. Biomed Rep, 2024, 22(1): 8. DOI: 10.3892/br.2024.1886.
- 4 陈玉珍.探讨三七总皂苷联合抗血小板药物在缺血性脑卒中二级预防中的临床应用价值[D].广西白色:右江民族医学院,2023. DOI: 10.27908/d.cnki.gymzy.2023.000024.
- 5 梁晓莲,刘纤纤,李文莉,等.三七总皂苷药理作用及临床应用研究进展[J].湖北农业科学,2021,60(6):15–19.[Liang XL, Liu XX, Li WL, et al. Research progress in pharmacological effects and clinical applications of Panax notoginseng saponins[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(6): 15–19.] DOI: 10.14088/j.cnki.issn0439–8114.2021.06.002.
- 6 高家乐.三七总皂苷对缺血性中风后急性期神经保护和恢复期修复的机制研究[D].北京:中国中医科学院,2024. DOI: 10.27658/d.cnki.gzzyy.2024.000053.
- 7 陈红丽.三七总皂苷心肌靶向脂质体的药动学、靶向性、心肌保护作用 and 安全性研究[D].南宁:广西医科大学,2022. DOI: 10.27038/d.cnki.ggxyu.2022.001096.
- 8 刘永利,雷蓉,王晓蕾,等.基于中药质量标志物的人参、西洋参、三七及相关中成药质量控制方法研究[J].中国药理学杂志,2019,54(17):1402–1410.[Liu YL, Lei R, Wang XL, et al. Research on quality control methods of Panax ginseng, Panax quinquefolius, Panax notoginseng and related proprietary chinese medicines based on Q–marker[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2019, 54(17): 1402–1410.] DOI: 10.11669/cpj.2019.17.007.
- 9 Li W, Shi H, Wu X. A narrative review of Panax notoginseng: Unique saponins and their pharmacological activities[J]. J Ginseng Res, 2025, 49(2): 118–133. DOI: 10.1016/j.jgr.2024.12.005.
- 10 王金鹤.三七皂苷生物合成途径解析与应用[D].天津:天津科技大学,2019. DOI: 10.27359/d.cnki.gtqgu.2019.000374.
- 11 Ghosh, S. Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases[J]. P Indian Natl Sci Ac, 2016, 82(4): 1189–1210. DOI: 10.16943/ptinsa/2016/48578.
- 12 马艺沔,袁丽钗,张林甦,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.[Ma YM, Yuan LC, Zhang LS, et al. Cloning and identification of two squalene synthase genes from Salvia miltiorrhiza[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(9): 1307–1312.] DOI: 10.7501/j.issn.0253–2670.2014.09.021.
- 13 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. DOI: 10.1111/1567–1364.12107.
- 14 Wang L, Zhao SJ, Cao HJ, 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. DOI: 10.1007/s10142–014–0384–1.
- 15 Xu Z, Peters RJ, 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. DOI: 10.1111/tpj.12865.
- 16 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. DOI: 10.1016/j.molp.2015.06.003.
- 17 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.[Xiu LS, Li FF, Zhou M, et al. Expression of glycosyltransferase gene in eleutherococcus senticosus and its influence on saponins content[J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(1): 128–132.] DOI: 10.13417/j.gab.033.000128.
- 18 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. <https://cdmd.cnki.com.cn/article/cdmd-10023-1014345693.htm>.
- 19 Cao X, Yin T, Qian M, 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. DOI: 10.1007/s11033–011–0886–z.
- 20 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. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.06.012.
- 21 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. <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10598-2008106702.htm>.
- 22 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.[Zhou M, Chai LH, Xiu LS, et al. Expression level of eleutherococcus senticosus farnesyl diphosphate synthase gene and its correlation with saponin content[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(12): 106–109.] DOI: 10.3969/j.issn.1004–3268.2013.12.025.
- 23 Kim YK, Kim YB, Uddin MR, 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. DOI: 10.1021/sb400194g.
- 24 杨林林,杨利民,马秀杰,等.人参法尼基焦磷酸合成酶基因

- 的表达及其与皂苷含量的关系[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(6): 695–702, 708. [Yang LL, Yang LM, Ma XJ, et al. Correlation between panax ginseng farnesyl diphosphate synthase gene expression and ginsenoside content[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2017, 39(6): 695–702, 708.] DOI: [10.13327/j.jjlau.2017.3585](https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2017.3585).
- 25 Hong WP, Kim OT, Dong YH, et al. Overexpression of farnesyl diphosphate synthase by introducing CaFPS gene in panax ginseng C.A.Mey[J]. Korean J Med Crop Sci, 2013, 21(1): 32–38. DOI: [10.7783/kjmcs.2013.21.1.32](https://doi.org/10.7783/kjmcs.2013.21.1.32).
 - 26 Liu MH, Yang BR, Cheung WF, et al. Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of Panax notoginseng identifies genes involved in ginsenoside and alkaloid biosynthesis[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 265. DOI: [10.1186/s12864-015-1477-5](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1477-5).
 - 27 Tae-Dong K, Jung-Yeon H, Hye GH, et al. Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in Panax ginseng[J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(1): 125–137. DOI: [10.1093/pcp/pcq179](https://doi.org/10.1093/pcp/pcq179).
 - 28 姚萱航, 刘翠晶, 常晶茹, 等. 2 种类型膜荚黄芪主要药效成分含量及关键酶基因表达量差异研究[J]. 中草药, 2021, 52(7): 2072–2081. [Yao XH, Liu CJ, Chang JR, et al. Study on content of main active components and expression of key enzyme genes in two types of Astragalus membranaceus[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(7): 2072–2081.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.024](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.024).
 - 29 吴耀生, 朱华, 李珅, 等. 三七鲨烯合酶基因在三七根、茎、芦头中的转录表达与三萜皂苷合成[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(12): 1000–1005. [Wu YS, Zhu H, Li K, et al. Transcription expression of squalene synthase gene in root, stem and rootstock of panax notoginseng and synthesis of triterpenoids[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 23(12): 1000–1005.] DOI: [10.3969/j.issn.1007-7626.2007.12.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-7626.2007.12.006).
 - 30 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达及其与皂苷含量的关系[J]. 西南农业学报, 2014, 27(3): 1252–1255. [Xing ZB, Long YH, Li FF, et al. Relationship between expression of two member of squalene synthase gene family from eleutherococcus senticosus and saponins content[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014, 27(3): 1252–1255.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-4829.2014.03.065](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-4829.2014.03.065).
 - 31 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. <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10674-1012430929.htm>.
 - 32 孙颖, 赵恒伟, 葛锋, 等. 三七中 SS 基因超表达载体的构建及其遗传转化[J]. 药学报, 2013, 48(1): 138–143. [Sun Y, Zhao HW, Ge F, et al. The construction of over-expression vector for Panax notoginseng SS gene and its transformation[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2013, 48(1): 138–143.] DOI: [10.16438/j.0513-4870.2013.01.008](https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2013.01.008).
 - 33 李珅. 三七三萜皂甙合成途径鲨烯环氧酶基因的克隆及初步表达[D]. 南宁: 广西医科大学, 2006. DOI: [10.7666/d.Y903463](https://doi.org/10.7666/d.Y903463).
 - 34 Han JY, In JG, Kwon YS, 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.] DOI: [10.1016/j.phytochem.2009.09.031](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.09.031).
 - 35 牛云云, 朱孝轩, 罗红梅, 等. 三萜皂苷合成生物学元件的初步开发: 三七鲨烯环氧酶编码基因克隆及表达模式分析[J]. 药学报, 2013, 48(2): 211–218. [Niu YY, Zhu XX, Luo HM, et al. Development of the devices for synthetic biology of triterpene saponins: cloning and expression profiling of squalene epoxide genes in panax notoginseng[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2013, 48(2): 211–218.] DOI: [10.16438/j.0513-4870.2013.02.014](https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2013.02.014).
 - 36 Sun Y, Li Q, Li Z, et al. Molecular cloning, expression, purification, and functional characterization of palustrin-2CE, an Antimicrobial Peptide of Rana chensinensis[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(1): 157–162. DOI: [10.1271/bbb.110672](https://doi.org/10.1271/bbb.110672).
 - 37 Han JY, Yong SK, Yang D, et al. Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarenediol synthase gene in Panax ginseng[J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47(12): 1653–1662. DOI: [10.1093/pcp/pcl032](https://doi.org/10.1093/pcp/pcl032).
 - 38 Kim OT, Bang KH, Kim YC, et al. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate[J]. PCTOC, 2009, 98(1): 25–33. DOI: [10.1007/s11240-009-9535-9](https://doi.org/10.1007/s11240-009-9535-9).
 - 39 Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, et al. Cloning and functional expression of cycloartenol synthases from mangrove species griff. and (L.) druce[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 71(7): 1788–1792. DOI: [10.1271/bbb.70113](https://doi.org/10.1271/bbb.70113).
 - 40 孙颖. 三七中由 RNAi 介导的 CAS 基因沉默对三七皂苷合成的影响[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013. <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotol-SWGJ201303015.htm>.
 - 41 何沐阳. 干扰人参 CS 基因的表达对人参三萜成分含量的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2013. <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10183-1013196094.htm>.
 - 42 Nelson DR. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1814(1): 14–18. DOI: [10.1016/j.bbapap.2010.08.008](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.08.008).
 - 43 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[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 262. DOI: [10.1186/1471-2164-11-262](https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-262).
 - 44 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, 12(5): S5. DOI: [10.1186/1471-2164-12-S5-S5](https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S5-S5).
 - 45 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. [Wu P, Gu JT, Xiu LS, et al. Differential expression of Eleutherococcus senticosus P450 gene in time and space and the correlation analysis between expression level of E.senticosus P450 gene and saponins content[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2014, 37(3): 29–33.] DOI: [10.13320/j.cnki.jauh.2014.0059](https://doi.org/10.13320/j.cnki.jauh.2014.0059).

- 46 Han JY, Kim HJ, Kwon YS, 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. DOI: 10.1093/pcp/pcr150.
- 47 Chen S, Luo H, Li Y, et al. 454 EST analysis detects genes putatively involved in ginsenoside biosynthesis in Panax ginseng[J]. Plant Cell Rep, 2011, 30(9): 1593–1601. DOI: 10.1007/s00299-011-1070-6.
- 48 Liu H, Wang Y, Wang T, et al. De novo assembly and annotation of the Zhe-Maidong [*Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker-Gawl] transcriptome in different growth stages[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3616. DOI: 10.1038/s41598-017-03937-w.
- 49 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]. 药学报, 2012, 47(8): 1085–1091. [Xiang L, Guo S, Niu YY, et al. Full-length cDNA cloning and bioinformatics analysis of PnUGT1 gene in Panax notoginseng[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47(8): 1085–1091.] DOI: 10.16438/j.0513-4870.2012.08.003.
- 50 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. <https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/CiBUaGVzaXNOZXdT MjAyNTA2MTMyMDI1MDYxMzE2MTkxNhIIWtIzNDA0ODYyYGRjMzRkeG02>.
- 51 刘啸尘, 范代娣, 杨帆, 等. 人参皂苷化合物生物合成进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(1): 80–93. [Liu XC, Fan DD, Yang F, et al. Advances in microbial production of ginsenoside and its derivatives[J]. China Biotechnology, 2021, 41(1): 80–93.] DOI: 10.13523/j.cb.2010014.
- 52 张亦男, 刘振, 毛相朝. 大肠杆菌角鲨烯合成途径的构建与调控[J]. 工业微生物, 2019, 49(3): 1–6. [Zhang YN, Liu Z, Mao XZ, et al. Construction and regulation of squalene synthesis pathway in Escherichia coli[J]. Industrial Microbiology, 2019, 49(3): 1–6.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-6678.2019.03.001.
- 53 Zhu J, Mao Y, Mo H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for squalene overproduction[J]. Synth Syst Biotechnol, 2025, 10(4): 1119–1126. DOI: 10.1016/j.synbio.2025.06.003.
- 54 Zhu FY, Zhong XF, Hu MZ, et al. *In vitro* reconstitution of mevalonate pathway and targeted engineering of farnesene overproduction in Escherichia coli[J]. Biotechnol Bioeng, 2014, 111(7): 1396–1405. DOI: 10.1002/bit.25198.
- 55 Song YF, Guan Z, Merkerk RV, et al. Production of squalene in Bacillus subtilis by squalene synthase screening and metabolic engineering[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(15): 4447–4455. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c00375.
- 56 Zhao CC, Gao X, Liu XB, et al. Enhancing biosynthesis of a ginsenoside precursor by self-assembly of two key enzymes in Pichia pastoris[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(17): 3380–3385. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00650.
- 57 Wu YF, Xu S, Gao X, et al. Enhanced protopanaxadiol production from xylose by engineered Yarrowia lipolytica[J]. Microb Cell Fact, 2019, 18(1): 83. DOI: 10.1186/s12934-019-1136-7.
- 58 Li DS, Wu YF, Zhang CB, et al. Production of triterpene ginsenoside compound K in the non-conventional Yeast Yarrowia lipolytica[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(9): 2581–2588. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00009.
- 59 Wei W, Wang PP, Wei Y J, et al. Characterization of panax ginseng UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F1 and Rh1 in metabolically engineered Yeasts[J]. Mol Plant, 2015, 8(9): 1412–1424. DOI: 10.1016/j.molp.2015.05.010.
- 60 Zhuang Y, Yang GY, Chen XH, et al. Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh2 in yeast via repurposing a key promiscuous microbial enzyme[J]. Metab Eng, 2017, 42: 25–32. DOI: 10.1016/j.jymben.2017.04.009.
- 61 Wang PP, Wei YJ, Fan Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts[J]. Metab Eng, 2015, 29: 97–105. DOI: 10.1016/j.jymben.2015.03.003.
- 62 Hu ZF, Gu AD, Liang L, et al. Construction and optimization of microbial cell factories for sustainable production of bioactive dammarenediol-II glucosides[J]. Green Chem, 2019, 21(12): 3286–3299. DOI: 10.1039/C8GC04066D.
- 63 Wang PP, Wei W, Ye W, et al. Synthesizing ginsenoside Rh₂ in saccharomyces cerevisiae cell factory at high-efficiency[J]. Cell Discov, 2019, 5: 5. DOI: 10.1038/s41421-018-0075-5.
- 64 谢泽雄, 陈祥荣, 肖文海, 等. 基因组再造与重排构建细胞工厂[J]. 化工学报, 2019, 70(10): 3712–3721. [Xie ZX, Chen XR, Xiao WH, et al. Cell factory construction accelerated by genome synthesis and rearrangement[J]. CIESC Journal, 2019, 70(10): 3712–3721.] DOI: 10.11949/0438-1157.20190702.
- 65 王文方, 钟建江. 合成生物学驱动的智能生物制造研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(4): 95–104. [Wang WF, Zhong JJ. Recent advances in smart biomanufacturing driven by synthetic biology[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2019, 31(4): 95–104.] DOI: 10.13376/j.cbbs/2019055.
- 66 Zhang GL, Cao Q, Liu JZ, et al. Refactoring β -amyrin synthesis in Saccharomyces cerevisiae[J]. Aiche J, 2015, 61(10): 3172–3179. DOI: 10.1002/aic.14950.
- 67 Kim JE, Jang IS, Sung BH, et al. Rerouting of NADPH synthetic pathways for increased protopanaxadiol production in Saccharomyces cerevisiae[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15820. DOI: 10.1038/s41598-018-34210-3.

收稿日期: 2024 年 12 月 05 日 修回日期: 2025 年 02 月 26 日
本文编辑: 李 阳 钟巧妮