

doi:10.16055/j.issn.1672-058X.2022.0006.001

石斛碱生物合成途径及萜类化合物 CYP450 酶的研究进展

覃宏婷¹, 龚道勇^{1,2}, 李 标¹

(1. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193; 2. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400045)

摘 要: 为了对石斛碱生物合成途径进一步解析, 对石斛碱生物合成途径研究进展、5 种药用萜类生物合成的 CYP450 酶功能、CYP450 酶研究手段三个方面进行文献综述。通过综述石斛碱生物合成研究进展, 提出 CYP450 酶在石斛碱合成途径中羟基化中间体的作用; 总结对药用萜类青蒿酸、丹参酮、鼠尾草酸、人参皂苷、甘草甜素等合成途径中 CYP450 酶的功能研究与鉴定, 发现 CYP450 酶在萜类化合物中的主要功能为羟基化、酮基化等氧化功能; 总结 CYP450 酶的研究手段: 一方面基因的筛选可以通过数据库检索或植物组织、多因子诱导表达差异筛选, 另一方面基因的表达和功能鉴定通过基因工程的多种手段, 转入原核或真核宿主细胞中表达出酶蛋白, 然后加入底物鉴定其催化活性。最后, 展望下一步石斛碱生物合成 CYP450 酶的挖掘, 认为可以通过已有的转录组中筛选出差异 CYP450 酶基因并进行蛋白表达, 然后通过上游酶催化或从植物中分离纯化的方式获得底物, 从酶蛋白与底物的催化挖掘与石斛碱合成相关 CYP450 酶类。

关键词: 石斛碱; 生物合成; 萜类; CYP450

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1672-058X(2022)06-0001-13

0 引 言

石斛碱属于倍半萜类生物碱, 拥有 Picrotoxane 骨架并形成 N 环和内酯环, 具有独特的 4 环稠合结构^[1]。金钗石斛作为石斛药材的基源植物之一, 石斛碱被《中国药典》指定为其特征性成分^[2]。石斛是我国传统常用名贵中药, 首载于《神农本草经》, 益胃生津, 滋阴清热。《中国药典》中又称其干品为枫斗, 用于热病津伤, 口干烦渴, 胃阴不足。石斛在石斛夜光丸、石斛明目丸、石斛提取液、石斛卫青粉等中成药制剂中广泛使用^[3]。在现代药理研究中,

石斛碱表现改善肠胃功能^[4]、神经保护^[5]、心血管保护^[6]、抗炎^[7]、抗流感病毒^[8]等多种药理活性。石斛碱的合成通过植物中的萜类合成途径。其下游的生物合成途径包括骨架的形成及后修饰, 骨架的形成一般由萜类合酶催化产生环化和重排等, 后修饰一般由 CYP450 酶催化氧化反应产生各种官能团、脂环。

CYP450 酶是最大的蛋白质酶超家族, 长期以来因其作为多功能生物催化剂的广泛运用而备受关注^[9]。第一种被成功克隆的植物 CYP450 酶是 Bozak 等^[10]从牛油果植株中所得。此后发现 CYP450 酶广泛分布于高等植物中, 参与初级代谢

收稿日期: 2022-03-30; 修回日期: 2022-05-04.

基金项目: 中国医学科学院“医学与健康科技创新工程项目”(CIFMS 2021-I2M-1-032); 科技部“国家科技基础资源调查专项”(2018YF100702).

作者简介: 覃宏婷(1997—), 女, 广西玉林人, 硕士, 从事药学研究.

通讯作者: 李标(1970—), 男, 湖北黄梅人, 教授, 硕士生导师, 从事药用植物种质资源保护研究. Email: Libiao@126.com.

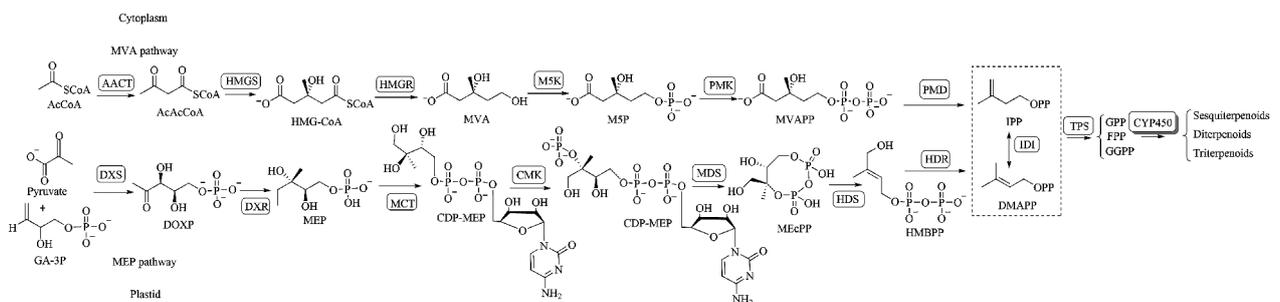
和各种次级代谢产物的生物合成。CYP450 酶催化的最常见的反应是氧化反应,特殊的还有扩环功能^[11]。由此可以看出,CYP450 酶的氧化参与后期结构修饰,从功能上鉴定参与石斛碱合成途径的 CYP450 酶就显得尤为重要。

本文综述了萜类化合物石斛碱生物合成的研究进展,发现石斛碱的合成研究节点为 CYP450 酶功能挖掘;同时总结了几种药用萜类青蒿酸、丹参酮、鼠尾草酸、人参皂苷、甘草甜素等合成途径中 CYP450 酶的鉴定和研究手段,发现 CYP450 酶在这几种萜类中的作用主要是氧化或者多步氧化,氧化的形式有羟基化、羰基化等。本文首次从 CYP450 酶的功能角度详细分析石斛碱的合成研究进展,以为石斛碱生物合成途径中的 CYP450 酶的挖掘和鉴定提供参考。

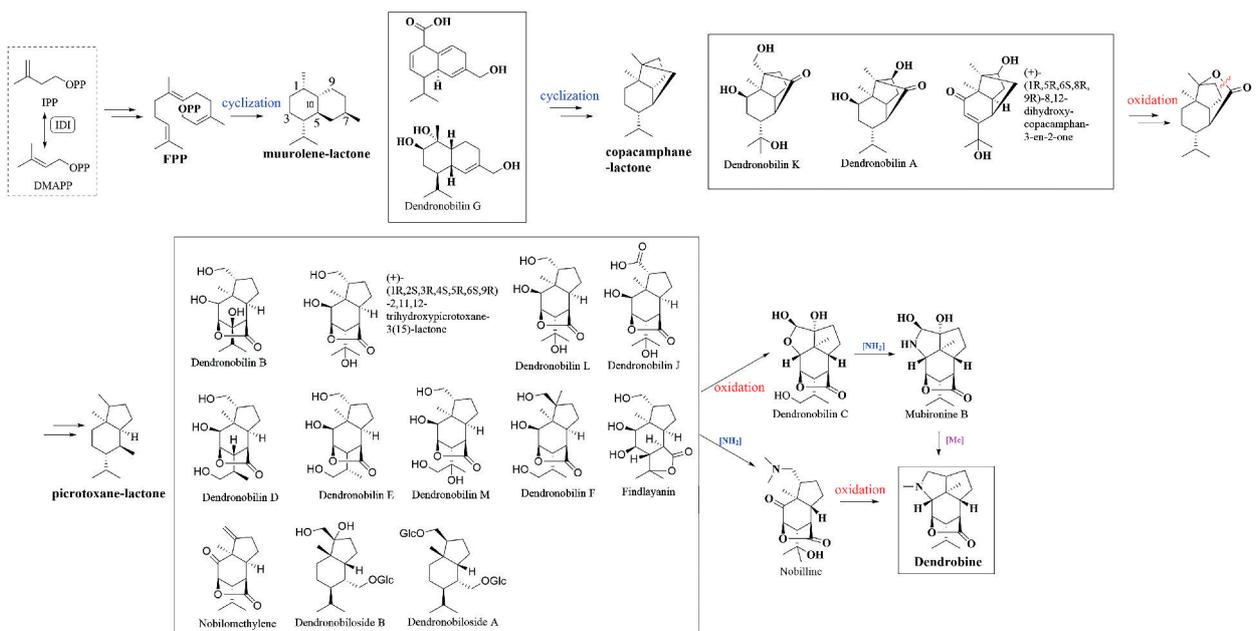
1 倍半萜类石斛碱生物合成研究进展

1.1 倍半萜生物合成途径

倍半萜类化合物是一大类植物天然产物,其基本骨架来源于异戊二烯五碳结构单元(IPP 和 DMAPP)的缩合。该生物合成被分为 2 个阶段,即上游共同前体产生的阶段以及下游的骨架形成和后修饰阶段,如图 1 所示。其共同前体 IPP 及其同分异构体 DMAPP 通过两种途径合成,即 MVA 与 MEP 途径;MEP 途径也称为非甲羟戊酸酯途径^[12]。MVA 途径位于细胞质或过氧化物酶体中,它起始于乙酰辅酶 A(acetyl-CoA),以通用异戊二烯前体 IPP 及其同分异构体 DMAPP 的产生而结束。植物中,所有 MEP 途径的酶都位于质体中;丹参酮和其他二萜主要通过 MEP 途径合成^[13]。



(a) MVA 和 MEP 途径



(b) 石斛碱合成推测途径

图 1 石斛碱合成途径推测

Fig. 1 Speculation on the pathway of dendrobine biosynthesis

前体 IPP 和 DMAPP 被用来构建萜类骨架,主要由萜类合酶催化。根据异戊二烯单元(C_5)的数量,萜类化合物可分为半萜类(C_5)、单萜类(C_{10})、倍半萜类(C_{15})、二萜类(C_{20})、三萜类(C_{30})、四萜类(C_{40})和多萜类。IPP 与 DMAPP 在异戊烯基二磷酸异构酶(Isopentenyl Diphosphate Isomerase, IDI)的催化可以互相转化。随后,IPP 和 DMAPP 在异戊二烯转移酶(Prenyltransferase)的催化下生成异戊二烯基二磷酸(Prenyl Diphosphate),异戊二烯转移酶也称为异戊二烯基二磷酸化酶(Isoprenyl Diphosphate Synthase),包括香叶基二磷酸合酶(Geranyl Diphosphate Synthase, GPPS)、法呢基二磷酸合酶(Farnesyl Diphosphate Synthase, FPPS)和香叶基香叶基二磷酸合酶(Geranylgeranyl Diphosphate Synthase, GGPPS)。GPPS 被认为参与质体中单萜和一些二萜如赤霉素的生物合成。FPPS 将两个分子的 IPP 与一个分子的 DMAPP 首尾依次缩合,在细胞质中产生倍半萜和三萜的前体(E, E)-法呢基焦磷酸((E, E)-Farnesyl Pyrophosphate, FPP),同位素示踪实验表明石斛碱在这一步的前体为 FPP。IPP 和 DMAPP 也以不同的方式缩合形成(E, E, E)-香叶基香叶基二磷酸酯((E, E, E)-Geranylgeranyl Diphosphate, GGPP),它是植物中二萜类化合物包括丹参酮、类胡萝卜素、赤霉素、生育酚和叶绿素等的前体^[14]。随后,后修饰酶进一步将环化骨架修饰成各种萜类化合物。萜类化合物后修饰酶的修饰主要包括骨架结构重排、羟基化、酰基化和糖基化等。

1.2 石斛碱的生物合成研究

石斛碱首次被发现是 1932 年,日本学者 Suzuki^[15]从金钗石斛中分离获取并测得其分子式及部分性质;在后续的研究中逐渐确定石斛碱的立体结构,并对其含量和药理作用进行了更广泛的研究。石斛碱生物合成的探索始于 1966 年, Yamazaki 等^[16]利用¹⁴C 同位素示踪技术发现大量甲羟戊酸(Mevalonate, MVA)参与了石斛碱的生物合成,并第一次提出萜类途径参与了石斛碱的生物合成。后续研究在这一基础上进行了改进,不仅标记了碳原子(¹⁴C),还标记了氘原子(³H),进一步证明法呢基焦磷酸(Farnesyl Pyrophosphate, FPP)是石斛碱生物合

成的关键中间体化合物;推测 FPP 的磷酸基团位置与异丙基上的 C 发生环化和去磷酸,随后通过进一步环化产生牻牛儿烷(Murolane)^[17]。基于此,石斛碱的生物合成途径被认为有 MVA 途径参与,并形成 FPP 的前体异戊烯基焦磷酸(Isopentenyl Diphosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(Dimethylallyl Diphosphate, DMAPP);又因为 IPP 与 DMAPP 的形成还可通过 2-C-甲基-D-赤藓糖醇 4-磷酸(2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate, MEP)途径,且没有实验证据证明石斛碱与 MEP 途径无关,所以推测中一般将形成 IPP 与 DMAPP 的两条途径 MVA 和 MEP 共同看作石斛碱生物合成的上游途径。在这之后,陆续有学者提出从 FPP 到石斛碱合成过程的结构变化途径假说^[18],这些假说途径均通过合成 Picrotoxane 骨架最后生成石斛碱。由于石斛碱具有 Picrotoxane 型倍半萜骨架,在萜类化合物中属于 Picrotoxane 型倍半萜,其合成途径与倍半萜相似。因此,倍半萜生物合成途径日益受到学者的重视。

基于倍半萜的生物合成途径和前人的实验结果,本课题组^[3,19]分析了金钗石斛中提取的 20 种单体化合物,推测了石斛碱的生物合成途径,如图 1 所示。IPP 和 DMAPP 通过 MVA 途径从 acetyl-CoA 起始,最终在 FPPS 酶的作用下产生 FPP。石斛碱的生物合成下游途径始于 FPPS 酶的催化作用;其次,在萜类合酶的催化下,FPP 发生分子内环化反应,形成 Muurolene-lactone(图 1b);该化合物再发生重排形成 Copacamphane-lactone;在 CYP450 酶的催化下,Copacamphane-lactone 生成石斛碱的基本骨架 Picrotoxane-lactone。形成基本骨架后,经过氧化、甲基化及胺化最终生成石斛碱。这三步可能通过不同的顺序进行反应生成石斛碱,一方面, Picrotoxane 型倍半萜可环化形成 Dendronobilin C,然后胺化形成 Mubironine B, Mubironine B 进一步甲基化形成石斛碱;另一方面,它们也可以直接胺化产生 Nobilline, Nobilline 环化和脱羧形成石斛碱。途径上的骨架化合物推测都来源于从石斛属植物中分离纯化得到的类似化合物(图 1 方框所示)。在这条推测路径上,TPS、CYP450、甲基转移酶和氨基转移酶都可能是参与石斛碱生物合成途径的关键酶,其中

CYP450 酶的氧化功能对石斛碱骨架的后修饰起到关键作用。

虽然推测了石斛碱可能的生物合成途径,但关于石斛碱合成中间体化合物和关键酶基因鲜有报道。在金钗石斛及石斛属植物化合物分离过程中发现大量具有 Picrotoxane 骨架的化合物,基于此,在分离得到的 Picrotoxane 型化合物作为底物的情况下使用 CYP450 酶研究该类化合物如何通过氧化、酯化等修饰作用最终得到石斛碱就显得尤为重要。在石斛碱合成中间体化合物的挖掘上,本课题组从金钗石斛干燥茎中分离得到两个 Picrotoxane 骨架化合物,其中一个为新结构化合物^[20],将为接下来基因功能的研究提供底物。另一方面,本课题组对石斛碱合成通路中合成酶的挖掘也取得一定进展。对于石斛碱合成的上游途径,到目前为止,本课题组已经克隆了 *HMGS*^[21]、*HMGR*^[22] 和 *MVD*^[23] 基因,这些基因与石斛碱生物合成上游途径相关。对于石斛碱的下游的未知部分,已经成功构建 FPPS 酶的体外表达与功能验证,建立起成熟的研究体系;本课题组^[24]还通过菌根真菌 MF23 的诱导,筛选出诱导后表达量显著上调的基因序列,得到了 4 个可能与石斛碱合成途径高度相关的 CYP450 酶基因 *CYP71D10*、*CYP71D55*、*CYP735A* 和 *CYP94C1*。*CYP71D10*、*CYP71D55*、*CYP735A* 属于 CYP71 多家族,*CYP94C1* 属于 CYP86 多家族。为了深入探究 CYP450 酶对石斛碱合成的作用,总结萜类的 CYP450 酶功能和研究手段十分必要。

2 植物萜类生物合成的 CYP450 酶

2.1 CYP450 基因家族分类

MVA 或 MEP 途径的萜类前体经萜类合酶形成基本骨架后,需要随后的修饰和重排过程来形成最终萜类化合物,这种后修饰作用主要是通过 CYP450 酶的催化。细胞色素 P450 酶广泛参与次生代谢产物的生物合成,是一个庞大的基因家族,具有多个分支,通常为催化氧化反应。

同一家族或亚家族中的 CYP450 酶可能催化同一途径中的连续步骤或不同底物上的类似反应。陆

生植物 CYP450 酶分为 CYP51、CYP74、CYP97、CYP710、CYP711、CYP727、CYP746 七个单家族以及 CYP71、CYP72、CYP85、CYP86 四个多家族^[25]。CYP71 多家族包含了植物次生代谢产物合成的多数 CYP450 酶^[26]。

单家族一般编码同一类重要的功能酶。CYP51 是最古老和保守的真核细胞 CYP450 酶之一,催化甾醇合成中的甾醇 14 α -sterol 的脱甲基反应^[27]。此外,CYP51H10 有助于通过 β -amyrin 的羟基化和环氧化进行 avenacin A-1 的生物合成^[28]。CYP710 可能从 CYP51 进化而来,CYP710 家族的 CYP710A 也参与甾醇的生物合成,表现出以 β -sitosterol 的 C-22 位去饱和作用^[29]。MAX1 属于 CYP711 家族,在类胡萝卜素 (Carotenoid) 衍生而来的芽体分枝抑制激素的合成中起作用^[30]。另一个家族 CYP74,通常催化脂肪酸的过氧化氢转化^[31]。CYP97 家族在类胡萝卜素的生物合成中起作用,具有催化 β -carotene 环上羟基化的活性^[32]。总之,CYP51 和 CYP710 家族都参与甾醇合成,而 CYP711 和 CYP97 家族在类胡萝卜素途径中发挥作用,CYP74 家族与多重不饱和脂肪酸的氧化代谢有关^[33]。在大家族中,CYP86 家族更保守,只有四个家族,它们与脂肪酸及其衍生物的代谢有关^[34]。CYP85 家族与萜类植物激素代谢有关^[35]。CYP720 是 CYP85 家族的成员,参与针叶树防御相关的萜类生物合成^[36]。CYP72 家族与脂肪酸、萜类、植物激素和细胞分裂素的代谢有关^[37]。CYP71 作为植物中最大的 CYP450 家族具有巨大的功能多样性,包括氨基酸衍生物、萜类化合物、生物碱、脂肪酸和激素前体的代谢^[38]。

参与药用植物萜类生物合成的 CYP450 主要分布在 CYP71、CYP85 和 CYP72 家族中。金钗石斛转录组中筛选的 CYP450 酶属于 CYP71、CYP73 和 CYP94 这三个多家族。修饰和催化形成青蒿素、丹参酮、鼠尾草酸、人参皂苷、甘草甜素的 CYP450 酶分别在 CYP71、CYP72、CYP85、CYP86 个多家族中都有出现,其功能都非常相似,都是催化底物发生一步氧化(羟基化)或者多步氧化(醛基化),如表 1。特殊的有丹参酮途径中的 CYP76AH1 能够催化丹参酮二烯的芳构化。

表1 植物药用萜类合成的 CYP450 基因家族分类

Table 1 Cytochrome P450 clans of pharmaceutical terpenoid biosynthesis in plants

多家族谱系	基因家族	名称	功能	来源	关联的合成途径	文献	
CYP71	CYP71	<i>CYP71A1V1</i>	紫穗槐二烯的多步氧化	黄花蒿 <i>A. annua</i>	青蒿素合成途径	[39]	
		<i>CYP71D10</i>		金钗石斛转录组	石斛碱的合成	[24]	
		<i>CYP71D55</i>		金钗石斛转录组	石斛碱的合成	[24]	
	CYP73	<i>CYP735A</i>		金钗石斛转录组	石斛碱的合成	[24]	
	CYP76	CYP76	<i>CYP76AH1</i>	丹参酮二烯芳构化、羟基化生成弥罗松酚	丹参 <i>S. multiorrhiza</i>	丹参酮的合成	[40]
			<i>CYP76AH3</i>	弥罗松酚芳环羟基化	丹参 <i>S. multiorrhiza</i>	丹参酮的合成	[41]
		<i>CYP76AH4</i>	丹参酮二烯芳环羟基化	丹参 <i>S. multiorrhiza</i>	丹参酮的合成	[42]	
		<i>CYP76AK1</i>	11-羟基弥罗松酚或 11-羟基柳杉酚 C-20 上的羟基化	丹参 <i>S. multiorrhiza</i>	丹参酮的合成	[41]	
		<i>CYP76AH24</i>	由丹参酮二烯自发氧化形成的松香三烯的芳环上连续羟基化丹参酮二烯 C-12 上的酮基化	鼠尾草 <i>S. pomifera</i>	鼠尾草酸的合成	[43]	
		<i>CYP76AK6</i>	弥罗松酚及类似物 C-20 上的连续氧化	鼠尾草 <i>S. pomifera</i>	鼠尾草酸的合成	[43]	
<i>CYP76AK8</i>		与 CYP76AK6 类似	鼠尾草 <i>S. pomifera</i>	鼠尾草酸的合成	[44]		
CYP85	CYP716	<i>CYP716A47</i>	达玛烯二醇 C-12 上的羟基化生成原人参二醇	人参 <i>P. ginseng</i>	人参皂苷的合成	[45]	
		<i>CYP716A53v2</i>	原人参二醇 C-6 上羟基化生成原人参三醇	人参 <i>P. ginseng</i>	人参皂苷的合成	[46]	
	CYP88	<i>CYP88D6</i>	β -香树脂醇 C-11 上酮基化	甘草 <i>Glycyrrhiza</i>	甘草甜素的合成	[47]	
CYP72	CYP72	<i>CYP72A154</i>	11-氧代- β -香树脂醇多步氧化形成羧基	蒺藜苜蓿 <i>M. truncatula</i>	甘草甜素的合成	[48]	
CYP86	CYP94	<i>CYP94C1</i>		金钗石斛转录组	石斛碱的合成	[24]	

2.2 萜类合成途径 CYP450 酶功能研究

萜类合成途径中 CYP450 酶的研究非常广泛,例如青蒿素、丹参酮、鼠尾草酸、人参皂苷以及甘草甜素的合成途径中 CYP450 酶解析比较透彻,为解析石斛碱生物合成途径提供了重要依据。

青蒿素是我国首次发现的有效抗疟药,与现有

抗疟药相比,作用更快,毒性更低。CYP71A1V1 作为一种多功能倍半萜类氧化酶,在青蒿素生物合成途径中起关键作用,参与中间体紫穗槐-4, 11-二烯 (Amorpha-4, 11-diene)、青蒿素醇 (Artemisinic alcohol) 和青蒿素醛 (Artemisinic aldehyde) 的异丙基上多步氧化形成青蒿素酸 (Artemisinic acid)^[39], 见图 2 (蓝色)。

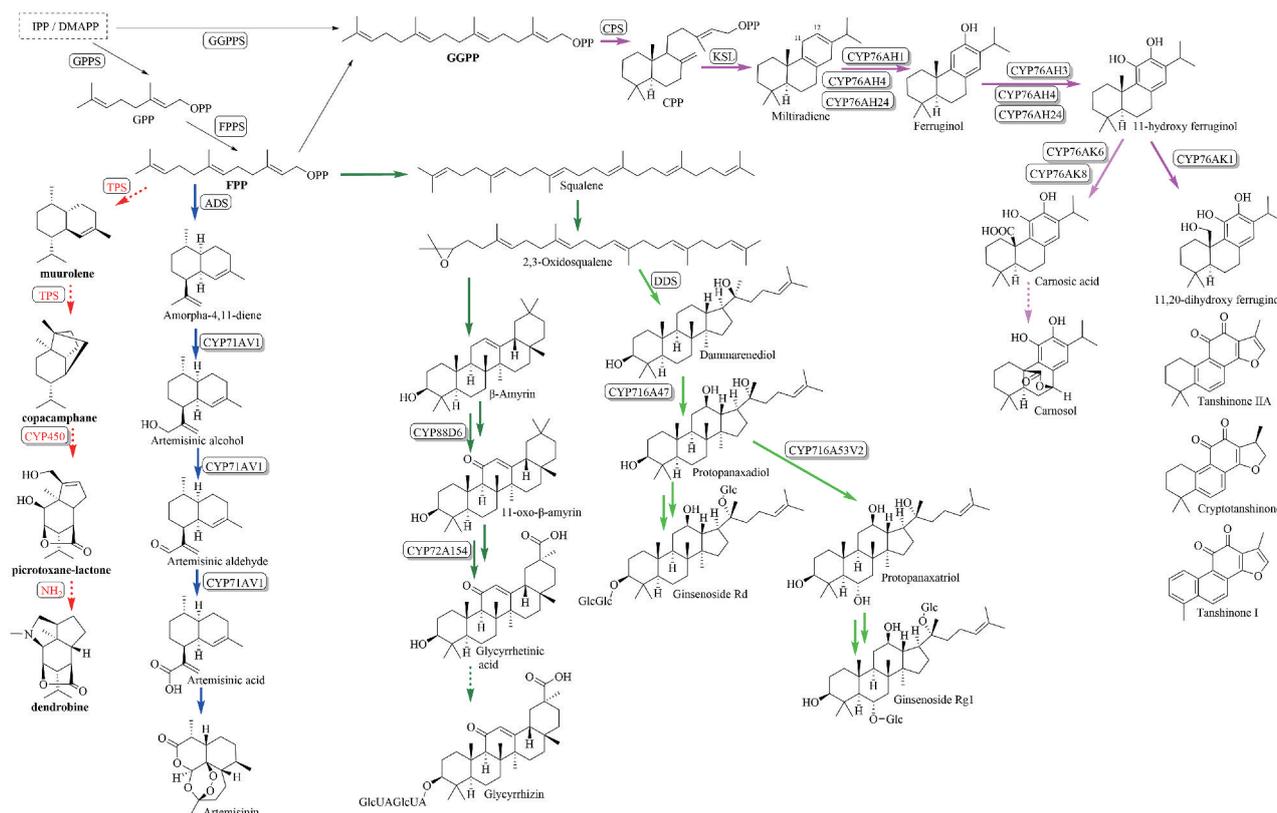


图 2 药用萜类化合物的生物合成途径及其与石斛碱的关系

Fig. 2 Biosynthetic pathway of pharmaceutical terpenoids and their relationship with dendrobine

二萜类丹参酮(Tanshinone)是中药丹参中主要的亲脂性生物活性成分,包括丹参酮 I、丹参酮 IIA、隐丹参酮和二氢丹参酮 I^[49]。其中,丹参酮 IIA 被认为是最重要的生物活性成分。近年来,丹参中丹参酮生物合成的基因组、转录组 CYP450 酶基因表达鉴定研究已有报道^[40,50-52]。两种重要的萜类环化酶,共烯丙基二磷酸合酶(Copalyl Diphosphate Synthase,CPS)和贝壳杉烯合酶(Kaurene Synthase-Like,KSL),参与半日花烷(Labdane)相关二萜的生物合成。SmCPS1 催化一般二萜前体 GGPP 环化为椰油酰二磷酸(Copalyl Diphosphate)^[53],再由 SmKSL1 进一步转化为丹参酮的前体丹参酮二烯(Miltiradiene)。CYP76AH1 催化了一个独特的四电子氧化级联反应,包括芳香化和在碳-12 位引入氧原子,在丹参酮生物合成的后期生成弥罗松酚(Ferruginol)^[40],见图 2(粉色)。Ma 等^[54]通过 RNAi 技术下调 CYP76AH1 基因,导致 Miltiradiene 积累显著增加,丹参酮含量降低,验证了其在丹参酮生物合成中的关键作用。此外,CYP76AH 亚家族的

一些其他成员也被证明在萜类生物合成中起类似的作用。CYP76AH4 是丹参 CYP76AH1 的迷迭香直系同源物,通过芳香中间体 Miltiradiene 的羟基化,在酚类二萜生物合成中产生 Ferruginol^[42]。随后的研究表明,CYP76AH3 和 CYP76AK1 这两个 CYP450 酶依次作用,形成丹参酮生物合成的分叉途径^[41]。RNAi 和生化研究表明,这两种 CYP450 酶都表现出多底物催化功能。CYP76AH3 在 C-11 位羟基化形成 11-羟基弥罗松酚(11-Hydroxy Ferruginol),或先在 C-7 酮基化再 C-11 羟基化形成 11-羟基柳杉酚(11-Hydroxy Sugiol)。CYP76AK1 分别催化 11-Hydroxy Ferruginol 和 11-Hydroxy Sugiol 产生 11,20-二羟基弥罗松酚(11,20-Dihydroxy Ferruginol)或 11,20-二羟基柳杉酚(11,20-Dihydroxy Sugiol)。CYP76AH3 在底物选择性和催化活性方面表现出多样性,而 CYP76AK1 表现出底物多样性,这表明丹参酮生物合成过程中存在分叉。除此之外,CYP76AH3 的敲除实验仅略微减少丹参酮的积累,这反映了 CYP76AH3 可能为非限速酶。

相比之下,CYP76AK1 的过表达增加了丹参酮产量,这表明它在丹参酮的生产中起着更加重要的作用。

Miltiradiene 和 Ferruginol 是松香烷型 (Abietane-type) 二萜,不仅作为丹参中丹参酮的前体,也是迷迭香中鼠尾草酸 (Carnosic acid) 的前体。Božić 等^[55]筛选来自鼠尾草的三个候选 CYP450 酶基因 *SfFS*、*RoFS1* 和 *RoFS2* (Ferruginol Synthases, FS),并鉴定了其参与鼠尾草酸生物合成途径。系统发育分析表明,这三个 CYP450 酶都属于大 CYP71 家族的 CYP76 亚组,与唇形科 CYP76AH1 和 CYP76AH4 密切相关。在其他研究中,CYP76AH24、CYP76AK6 和 CYP76AK8 催化了鼠尾草酸生物合成的大多数氧化反应^[43],见图 2(浅粉色)。作为一种双功能酶,CYP76AH24 催化松香三烯 (Abietatriene) 的 C-12 和 C-11 连续氧化生成 11-Hydroxy Ferruginol,与厚朴中的 CYP76AH4 具有相同的作用。由于连续氧化产生 11-Hydroxy Ferruginol, CYP76AH4、CYP76AH22、CYP76AH23 和 CYP76AH24,都被重新命名为 11-羟基弥罗松酚合酶 (11-Hydroxy Ferruginol Synthases)^[56]。迷迭香中的 CYP76AK8 是 CYP76AK6 的直系同源,这两个 CYP450 酶可以相继氧化 labdane 骨架上的 C-20^[44]。

人参皂苷 (Ginsenoside) 是一类四环三萜皂苷,主要分布在人参的根部。人参皂苷生物合成的第一步是 2,3-氧化喹烯 (2,3-Oxidosqualene) 的环化,形成达玛烯二醇 (Dammarenediol-II),由氧化喹烯环化酶组的达玛烯二醇合酶 (Dammarenediol Synthase, DDS) 催化^[57]。据报道,达玛烷型三萜 (Dammarane-type Triterpenoid) 是人参皂苷的主要成分,具有原人参二醇 (Protopanaxadiol) 和原人参三醇 (Protopanaxatriol) 两种不同的苷元结构。研究发现有两个 CYP450 酶基因参与人参中达玛烯型人参皂苷的生物合成,见图 2(浅绿色)。其中 CYP716A47 酶参与了 Dammarenediol-II 在 C-12 位的羟基化,生成 Protopanaxadiol^[45]。另一个酶 CYP716A53v2 参与 Protopanaxadiol 在 C-6 位的羟基化,产生 Protopanaxatriol^[58]。此外,三七中也发现了一个与 CYP716A53v2 同源序列,起到同样的催化作用^[46]。CYP716A47 和 CYP716A53v2 这两个 CYP450 酶分

别作为 Dammarenediol C-12 羟化酶和 Protopanaxadiol C-6 羟化酶参与了达玛烷型人参皂苷的合成。CYP716A53v2 的过表达和 RNAi 可以改变人参皂苷含量的积累^[59]。

甘草甜素 (Glycyrrhizin) 作为齐墩果烷型三萜 (Oleanane-type Triterpenoid) 的典型代表,在世界范围内被用作天然甜味剂和药用材料。在甘草甜素合成途径中,三萜类化合物的常见前体 2,3-oxidosqualene 最初环化为三萜骨架 β -香树脂醇 (β -amylin)。CYP88D6 基因编码 β -amyrin 氧化酶 (β -amyrin 11-oxidase),其在体外和体内被证明催化 β -amyrin 在 C-11 顺序两步氧化,产生 11-氧代- β -香树脂醇 (11-oxo- β -amyrin)^[47],见图 2(绿色)。此外,11-oxo- β -amylin 向甘草甜素的转化还需要在 C-30 位进一步氧化和 C-3 羟基的葡萄糖醛酸化。在甘草甜素等三萜皂苷生物合成的后期,三萜骨架的位点特异性氧化主要由 CYP450 酶催化。在鉴定了甘草甜素生物合成中最初的 CYP450 酶基因 CYP88D6 后^[60],CYP72A 亚家族也被认为参与了豆科植物中三萜皂苷的生物合成。CYP72A154 能够通过三个连续步骤氧化 11-oxo- β -amyrin 的 C-30,产生甘草次酸 (Glycyrrhetic acid),一种甘草甜素苷元^[48]。

综上,CYP450 酶家族广泛参与了萜类化合物的合成并在其中扮演着重要作用;随着技术手段的不断发展与研究的深入,将会有越来越多 CYP450 酶被发现。目前,对 CYP450 酶的研究主要是构建转录组文库,从文库中筛选出显著差异的 CYP450 酶基因进行组织特异性分析,随后对其进行功能分析。

3 CYP450 酶的研究手段

3.1 基因的筛选

Eljounaidi 等^[61]利用花楸 UniGene 数据库搜索关键词 Germacrene A 氧化酶和广木香内酯合成酶,随后通过同源检索得到匹配度最高的同源物种洋蓟中的 CYP450 基因 CYP71AV9 和 CYP71BL5。由于 CYP716 家族的特征是参与特定的三萜或皂苷元生物合成,因此来自蒺藜苜蓿的 CYP716A12 被用于在黄花蒿转录组数据集中筛选候选 CYP450 酶基因。结果,其中一个与

CYP716A12 相似度为 63% 的序列被注释为 CYP716A14v2,并最终被鉴定为功能性三萜氧化酶^[62]。

根据植物组织或多因子诱导表达差异筛选。植物黄花蒿的倍半萜类物质在其腺毛中分泌,因此 Teoh 等^[39]为了鉴定与青蒿素生物合成相关的基因,从黄花蒿中分离腺毛,用作 EST 检索的 mRNA 数据源,发现 12 个 CYP71D 亚家族基因。西洋参的重要成分人参皂苷主要在根部,根部组织特异性结合茉莉酸甲酯(MeJA)诱导表达模式分析更有助于鉴定参与人参皂苷生物合成的酶^[63]。西洋参根转录组 EST 测序和分析发现 150 个序列被注释为 CYP450 酶基因;结合 MeJA 诱导性上调进一步缩小范围,发现 MeJA 上调了 6 个 CYP450 酶基因,其中只有 *contig00248* 具有与 Dammareniol-II 合酶相似的组织特异性表达模式,发现 *contig00248* 是催化达玛烷或原人参二醇氧化的候选基因^[63]。

3.2 CYP450 酶基因表达与功能鉴定

基因表达和酶功能鉴定方式使用基因工程的多重手段。在筛选得到所需要的 CYP450 酶基因序列后,通过克隆或全合成手段得到 DNA 序列,与载体系统(病毒、细菌质粒或噬菌体)的 DNA 组合成一个重组质粒。这样形成的重组质粒可以先转化或转染至大肠杆菌中,克隆和筛选出成功转化的含重组质粒的菌体,再从中提出重组质粒导入适当的表达体系(大肠杆菌、酵母或植物),使重组基因在细胞内表达,优化表达条件,产生所需要的 CYP450 蛋白。原核(大肠杆菌)表达产生的蛋白可以纯化后在体外加入底物分子共催化然后检验是否有催化产物生成,或者不进行蛋白纯化,直接在真核系统(酵母或植物)中加入底物分子检验酶的催化功能。例如,参与三萜合成的三个 CYP716A 亚家族基因 CYP716A12、CYP716A15、CYP716A17 使用了酵母表达体系鉴定^[64]。CYP716A14v2 通过在酵母和本氏烟草中表达,表征了其催化五环三萜的氧化,产生在 C-3 位甲基化的三萜的催化功能^[62]。

3.3 异源合成与优化

CYP450 酶作用的发挥依靠宿主细胞中内源性合成途径、膜结合相关的内质网以及大量遗传工具如蛋白修饰酶、伴侣蛋白等。所以将原植物的 CYP450 转

入微生物系统中发挥作用存在许多挑战。为了在有效成分的异源合成中提升产量,蛋白质工程、氧化还原伴侣工程、底物工程及代谢工程等多种工程化改造手段相继被应用于 P450 酶的改造优化^[65]。Keasling 等^[66]设计了一条全新的青蒿酸合成途径,将来自植物黄花蒿以及单细胞系统大肠杆菌、酵母中的多种基因精确组装和调控,优化表达,削弱酵母中 FPP 的支路途径,表达来自黄花蒿的 CYP71A1,成功构建了青蒿酸高产量达工程菌株。

4 讨论与展望

多年来,合成生物学的发展促进了萜类代谢的研究,为生产高价值的萜类产品提供了工程平台。然而,由于代谢和调节网络的复杂多样性,植物萜类工程仍然面临巨大挑战。但是青蒿素等萜类化合物合成的成功解析为接下来多种萜类化合物的生物合成探索提供了重要参考。CYP450 酶在萜类生物合成中是复杂且至关重要的。克隆药物萜类生物合成的关键 CYP450 酶基因对于天然生产生物体和替代微生物的工程具有巨大的前景,以产生大量用于商业目的的目标分子。

天然产物一直是药物分子设计和开发过程中的重要灵感来源之一,源自天然产物的临床用药目前也占据着难以替代的地位。石斛碱及石斛碱类生物碱具有独特的化学结构,但是这类分子结构复杂、分离困难,利用传统的化学合成和天然产物化学方法难以满足日益增长的研究需求和市场需求。石斛碱类生物碱作为中药石斛特有的次生代谢产物和活性成分,具有广阔的应用前景。目前报道的此类化合物只有 31 种,而仅中国石斛属植物就有近 80 种。随着提取和分离技术的进步,可能会发现更多的化合物。目前对石斛碱类生物碱药理活性的研究主要集中在总生物碱和石斛碱两个方面。原因之一是通过传统提取和分离方法获得的其他生物碱的量非常少。如果石斛碱可以通过生物合成获得,那么其他具有 Picrotoxane 结构的石斛碱类生物碱可以通过后修饰获得。后修饰 CYP450 酶的催化反应对石斛碱类化合物最终结构的形成至关重要,其相关基因

的功能研究鉴定有待进一步探索。

作为酶底物的中间体的获取也是一项难点,可以参考两种解决办法。一种是在构建加入萜类前体 FPP 的 Picotoxane 合酶合成体系,生产中间体;另一种是通过天然药化手段从金钗石斛中提取得到 Picotoxane 骨架的中间体化合物。后者由于天然产物分离过程的不确定性,可以建立课题组的中间体化合物库,作为标准品建立化合物离子质谱信息库,建立组内的代谢组学平台用于检测金钗石斛不同分离流分中的 Picotoxane 类化合物含量,精准分离以提高得率。本课题组将继续探索石斛碱生物合成的构建,通过克隆萜类合成酶基因、构建酵母真核表达系统、加入分离的底物 Picotoxane 型化合物等手段来解析石斛碱生物合成。

目前,已经有石斛碱合成关联 CYP450 酶基因通过金钗石斛转录组挖掘出来,下一步的方向是对这些相关基因进行表达和功能验证。

参考文献 (References):

- [1] 肖检,彭羽,李卫东. 倍半萜生物碱 Dendrobine 的全合成研究进展[J]. 有机化学, 2021, 41(7): 2636—2649.
XIAO Jian, PENG Yu, LI Wei-dong. Advances on the total synthesis of sesquiterpenoid alkaloid dendrobine[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2021, 41(7): 2636—2649.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical and Technology Press, 2020.
- [3] 陈星月,龚道勇,郭顺星,等. 石斛碱型生物碱及石斛碱合成生物学研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2021, 38(3): 8—18.
CHEN Xing-yue, GONG Dao-yong, GUO Shun-xing, et al. Research progress of dendrobine-type alkaloids and synthetic biology of dendrobine[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2021, 38(3): 8—18.
- [4] 潘晓鸥,赵燕,赵远桥,等. 石斛碱对肝郁脾虚型肠易激综合征小鼠 GFAP、NGF、BDNF 表达及内脏敏感性影响[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1186—1190.
PAN Xiao-ou, ZHAO Yan, ZHAO Yuan-qiao, et al. Effects of dendrobine on visceral sensitivity associated GFAP, NGF, BDNF expressions in mice with irritable bowel syndrome of liver Qi-Stagnation&Spleen-Deficiency pattern[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(5): 1186—1190.
- [5] KUDO Y, TANAKA A, YAMADA K. Dendrobine, an antagonist of beta-alanine, taurine and of presynaptic inhibition in the frog spinal cord[J]. British Journal of Pharmacology, 1983, 78(4): 709—15.
- [6] 刘婵,刘娟,商黔惠. 石斛碱抑制高钠盐诱导的心脏成纤维细胞增殖[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 200(7): 649—654.
LIU Chan, LIU Juan, SHANG Qian-hui. The effect of dendrobine on the proliferation of cardiac fibroblasts induced by high sodium[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2017, 200(7): 649—654.
- [7] 张俊青. 金钗石斛有效成分对脂多糖激活星形胶质细胞产生炎症因子的影响[D]. 遵义医学院, 2010.
ZHANG Jun-qing. Effect of active components of dendrobium nobile on inflammatory factors induced by lipopolysaccharide-activated astrocytes[D]. Zunyi Medical University, 2010.
- [8] LI R, LIU T, LIU M, et al. Anti-influenza A virus activity of dendrobine and its mechanism of action[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(18): 3665—3674.
- [9] ZHENG X, LI P, LU X. Research advances in cytochrome P450-catalysed pharmaceutical terpenoid biosynthesis in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(18): 4619-4630.
- [10] BOZAK K R, YU H, SIREVÅG R, et al. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(10): 3904—3908.
- [11] 张丛,武临专,王丽非,等. 天然环庚三烯酚酮类化合物的生物合成及生物活性研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2021, 16(2): 139-144, 149.
ZHANG Cong, WU Lin-zhuan, WANG Li-fei, et al. Progress in biosynthesis and biological activities of natural

- tropolones[J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2021, 16(2): 139—149.
- [12] VRANOVA E, COMAN D, GRUISSEM W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 665—700.
- [13] ZHOU W, HUANG F, LI S, et al. Molecular cloning and characterization of two 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase genes involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Molecular Breeding*, 2016, 36(9): 124.
- [14] SHI M, LUO X, JU G, et al. Enhanced diterpene tanshinone accumulation and bioactivity of transgenic *salvia miltiorrhiza* hairy roots by pathway engineering[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(12): 2523—2530.
- [15] SUZUKI H, KEIMATSU I, ITO M. Über die Alkaloide der chinesischen Droge “Chin-Shih-Hu” I. Mitteil [J]. *YAKUGAKU ZASSHI*, 1932, 52(11): 996—1009.
- [16] YAMAZAKI M, MATSUO M, ARAI K. Biosynthesis of dendrobine[J]. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 1966, 14(9): 1058—1059.
- [17] CORBELLA A, GARIBOLDI P, JOMMI G, et al. Biosynthesis of the terpenoid dendrobine. Early stages of the pathway[J]. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1975, (8): 288—289.
- [18] EDWARDS O E, DOUGLAS J L, MOOTOO B. Biosynthesis of dendrobine [J]. *Canadian Journal of Chemistry*, 1970, 48(16): 2517—2524.
- [19] GONG D Y, CHEN X Y, GUO S X, et al. Recent advances and new insights in biosynthesis of dendrobine and sesquiterpenes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(18): 6597—6606.
- [20] 陈星月. 金钗石斛石斛碱的分离及其合成途径中 TPS 基因表达研究[D]. 北京协和医学院, 2021.
- CHEN Xing-yue. Isolation of dendrobine and study on TPS genes expression in its biosynthetic pathway from *dendrobium nobile* [D]. *Peking Union Medical College*, 2021.
- [21] 李清, 李标, 郭顺星. 金钗石斛中 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶基因的克隆及特征分析[J]. *中草药*, 2017, 48(12): 2502—2508.
- LI Qing, LI Biao, GUO Shun-xing. Molecular characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene from *dendrobium nobile* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48(12): 2502—2508.
- [22] 李清, 李标, 郭顺星. 金钗石斛 HMGR 基因克隆及菌根真菌诱导表达分析[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(22): 1976—1982.
- LI Qing, LI Biao, GUO Shun-xing. Cloning and expression analysis of HMGR gene in *dendrobium nobile* in response to mycorrhizal fungal inoculation[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2017, 52(22): 1976—1982.
- [23] 李清, 李标, 郭顺星. 金钗石斛焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因的克隆及表达分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(2): 850—858.
- LI Qing, LI Biao, GUO Shun-xing. Cloning and expression analysis of pyrophosphomevalonate decarboxylase gene in *dendrobium nobile*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(2): 850—858.
- [24] LI Q, DING G, LI B, et al. Transcriptome analysis of genes involved in dendrobine biosynthesis in *dendrobium nobile* lindl. infected with mycorrhizal fungus MF23 (*Mycena* sp.) [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 316.
- [25] NELSON D, WERCK-REICHHART D. A P450-centric view of plant evolution[J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 194—211. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 2011, 66(1): 194—211.
- [26] HAMBERGER B, BAK S. Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1612): 20120426.
- [27] LEPESHEVA G I, WATERMAN M R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1770(3): 467—477.
- [28] KUNII M, KITAHAMA Y, FUKUSHIMA E O, et al. β -Amyrin oxidation by oat CYP51H10 expressed heterologously in yeast cells: the first example of CYP51-dependent metabolism other than the 14-demethylation of sterol precursors[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(5): 801—804.
- [29] MORIKAWA T, SAGA H, HASHIZUME H, et al. CYP710A genes encoding sterol C22-desaturase in

- Physcomitrella patens as molecular evidence for the evolutionary conservation of a sterol biosynthetic pathway in plants[J]. *Planta*, 2009, 229(6): 1311—1322.
- [30] BOOKER J, SIEBERER T, WRIGHT W, et al. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone [J]. *Developmental Cell*, 2005, 8(3): 443—449.
- [31] TOPORKOVA Y Y, GORINA S S, BESSOLITSYNA E K, et al. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1863 (4): 32—39.
- [32] QUINLAN R F, JARADAT T T, WURTZEL E T. Escherichia coli as a platform for functional expression of plant P450 carotene hydroxylases [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 458(2): 146—57.
- [33] TOPORKOVA Y Y, SMIRNOVA E O, LANTSOVA N V, et al. Detection of the first epoxyalcohol synthase/allene oxide synthase (CYP74 Clan) in the lancelet (branchiostoma belcheri, chordata) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4737.
- [34] PINOT F, BEISSON F. Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(2): 195—205.
- [35] HAMBERGER B, BOHLMANN J. Cytochrome P450 mono-oxygenases in conifer genomes: discovery of members of the terpenoid oxygenase superfamily in spruce and pine[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2006, 34 (Pt 6): 1209—1214.
- [36] ZULAK K G, BOHLMANN J. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(1): 86—97.
- [37] NELSON D, WERCK-REICHHART D. A P450-centric view of plant evolution[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2011, 66(1): 194—211.
- [38] PITAKDANTHAM W, SUTABUTRA T, CHIEMSOMBAT P, et al. Isolation and characterization of chalcone synthase gene isolated from *Dendrobium Sonia Earsakul*[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 2010, 13(20): 1000—1005.
- [39] TEOH K H, POLICHUK D R, REED D W, et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(5): 1411—1416.
- [40] GUO J, ZHOU Y J, HILLWIG M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(29): 12108—12113.
- [41] GUO J, MA X, CAI Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones[J]. *The New Phytologist*, 2016, 210(2): 525—534.
- [42] ZI J, PETERS R J. Characterization of CYP76AH4 clarifies phenolic diterpenoid biosynthesis in the Lamiaceae[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013, 11(44): 7650—7652.
- [43] IGNEA C, ATHANASAKOGLU A, IOANNOU E, et al. Carnosic acid biosynthesis elucidated by a synthetic biology platform[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(13): 3681.
- [44] IGNEA C, ATHANASAKOGLU A, IOANNOU E, et al. Carnosic acid biosynthesis elucidated by a synthetic biology platform[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(13): 3681—3686.
- [45] HAN J Y, KIM H J, KWON Y S, et al. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2011, 52(12): 2062—2073.
- [46] 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, 16 (1): 265.
- [47] SEKI H, OHYAMA K, SAWAI S, et al. Licorice β -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, 2008, 105(37): 14204.
- [48] 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.
- [49] MA Y, YUAN L, WU B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(7): 2809—2823.
- [50] YANG L, DING G, LIN H, et al. Transcriptome analysis of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* and identification of genes related to tanshinone biosynthesis [J]. PloS One, 2013, 8(11): e80464.
- [51] GAO W, SUN H X, XIAO H, et al. Combining metabolomics and transcriptomics to characterize tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. BMC Genomics, 2014, 15(73).
- [52] ZHOU W, HUANG Q, WU X, et al. Comprehensive transcriptome profiling of *Salvia miltiorrhiza* for discovery of genes associated with the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10554.
- [53] CHENG Q, SU P, HU Y, et al. RNA interference-mediated repression of SmCPS (copalyldiphosphate synthase) expression in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* causes a decrease of tanshinones and sheds light on the functional role of SmCPS [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(2): 363—369.
- [54] MA Y, MA X H, MENG F Y, et al. RNA interference targeting CYP76AH1 in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* reveals its key role in the biosynthetic pathway of tanshinones [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 477(2): 155—160.
- [55] BOŽIĆ D, PAPAETHIMIOU D, BRÜCKNER K, et al. Towards elucidating carnosic acid biosynthesis in lamiaceae: functional characterization of the three first steps of the pathway in *salvia fruticosa* and *rosmarinus officinalis* [J]. PloS One, 2015, 10(5): e0124106.
- [56] SCHELER U, BRANDT W, PORZEL A, et al. Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast [J]. Nature Communications, 2016, 7(12942).
- [57] HAN J Y, KWON Y S, YANG D C, et al. Expression and RNA interference-induced silencing of the DAMM-arenediol synthase gene in *Panax ginseng* [J]. Plant & Cell Physiology, 2006, 47(12): 1653—1662.
- [58] HAN J Y, HWANG H S, CHOI S W, et al. Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopan-axatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. Plant & Cell Physiology, 2012, 53(9): 1535—1545.
- [59] PARK S B, CHUN J H, BAN Y W, et al. Alteration of *Panax ginseng* saponin composition by overexpression and RNA interference of the protopanaxadiol 6-hydroxylase gene (CYP716A53v2) [J]. Journal of Ginseng Research, 2016, 40(1): 47—54.
- [60] SEKI H, OHYAMA K, SAWAI S, et al. Licorice beta-amyrin 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.
- [61] ELJOUNAIDI K, CANKAR K, COMINO C, et al. Cytochrome P450s from *Cynara cardunculus* L. CYP71AV9 and CYP71BL5, catalyze distinct hydroxylations in the sesquiterpene lactone biosynthetic pathway [J]. Plant Science: an international journal of experimental plant biology, 2014, 223: 59—68.
- [62] MOSES T, POLLIER J, SHEN Q, et al. OSC2 and CYP716A14v2 catalyze the biosynthesis of triterpenoids for the cuticle of aerial organs of *Artemisia annua* [J]. The Plant Cell, 2015, 27(1): 286—301.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 蒋媛媛, 李盛英. 细胞色素 P450 酶在生物合成及有机合成中的催化功能及其应用 [J]. 有机化学, 2018, 38(9): 2307—2323.

JIANG Yuan-yuan, LI Sheng-ying. Catalytic function and application of cytochrome P450 enzyme in biosynthesis and organic synthesis [J]. *Organic Chemistry*, 2018, 38 (9): 2307—2323.

[66] RO D K, PARADISE E M, OUELLET M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinin acid in engineered yeast[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940—943.

Research Progress on Dendrobium Biosynthesis Pathway and Terpenoid CYP450 Enzymes

QIN Hong-ting¹, GONG Dao-yong^{1,2}, LI Biao¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China;

2. Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

Abstract: In order to further analyze the biosynthetic pathway of dendrobine, the literature review was conducted on the research progress of dendrobine biosynthesis pathway, the function of CYP450 enzymes in biosynthesis of five medicinal terpenoids, and the research methods of CYP450 enzymes. By summarizing the research progress of dendrobine biosynthesis, the role of CYP450 enzyme in the hydroxylation intermediate of dendrobine biosynthesis was put forward. This paper summarized the research and identification of CYP450 enzyme functions in the synthetic pathways of medicinal terpenoids artemisinin acid, tanshinone, carnosic acid, ginsenoside and glycyrrhizin, and found that the main functions of CYP450 enzyme in terpenoids were oxidation functions such as hydroxylation and ketonization. This paper summarizes the research methods of CYP450 enzyme: on one hand, the screening of genes can be performed by database search or differential screening of plant tissues and multi-factor induced expression; on the other hand, the expression and function identification of genes are transferred into prokaryotic or eukaryotic host cells to express the enzyme protein through various means of genetic engineering, and then the substrate is added to identify its catalytic activity. Finally, looking forward to the next step in the mining of dendrobine biosynthetic CYP450 enzymes, it is believed that the differential CYP450 enzyme genes can be screened from the existing transcriptome and protein expression, and then the substrate can be obtained by upstream enzyme catalysis or separation and purification from plants, and the CYP450 enzymes related to dendrobium alkaloids synthesis can be discovered by the catalysis of enzyme proteins and substrates.

Key words: dendrobine; biosynthesis; terpenoid; CYP450

责任编辑:陈 芳

引用本文/Cite this paper:

覃宏婷,龚道勇,李标. 石斛碱生物合成途径及萜类化合物 CYP450 酶的研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2022,39(6):1—13.

QIN Hong-ting, GONG Dao-yong, LI Biao. Research progress on dendrobium biosynthesis pathway and terpenoid CYP450 enzymes[J]. *Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition)*, 2022,39(6):1—13.