

人参糖基转移酶 PgUGT74AE2 催化生成新型人参三醇皂苷研究

张婷婷, 梁会超, 巩 婷, 胡宗风, 顾安颀, 杨金玲*, 朱 平*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室 & 国家卫生健康委员会天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050)

摘要: 人参 (*Panax ginseng*) 来源的糖基转移酶 PgUGT74AE2 能够催化原人参二醇 (protopanaxadiol, PPD) 的 C-3 位羟基发生糖基化反应, 生成人参皂苷 Rh2, 但其催化原人参三醇 (protopanaxatriol, PPT) 的 C-3 位羟基发生糖基化反应的研究至今未见报道。本研究构建重组表达质粒 pET-32a-PgUGT74AE2, 转化大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 感受态细胞, 获得重组菌株 *Transetta*-PgUGT74AE2。通过异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 诱导表达, 获得重组 PgUGT74AE2。建立重组 PgUGT74AE2 催化 PPT 的酶促反应体系, 结果表明, PgUGT74AE2 能够催化 PPT 的 C-3 位羟基发生糖基化反应, 生成产物 3-O- β -D-glucopyranosyl-dammar-24-ene-3 β ,6 α ,12 β ,20S-tetraol。本研究通过酶促反应获得 C-3 位糖基化的新型人参三醇皂苷, 可为创新药物研究提供原料。

关键词: 人参; 糖基转移酶; 糖基化; 原人参三醇; 人参三醇皂苷

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1565-06

Studies on the enzymatic synthesis of a new PPT-type ginsenoside via UDP-glycosyltransferase PgUGT74AE2 from *Panax ginseng*

ZHANG Ting-ting, LIANG Hui-chao, GONG Ting, HU Zong-feng, GU An-di,
YANG Jin-ling*, ZHU Ping*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines and Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products of National Health Commission of PRC, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: UDP-glycosyltransferase PgUGT74AE2 from *Panax ginseng* can transfer a glucose moiety to the free C-3 hydroxyl of protopanaxadiol (PPD) to produce ginsenoside Rh2. However, no report demonstrates that PgUGT74AE2 can transfer a glucose moiety to the free C-3 hydroxyl of protopanaxatriol (PPT) to produce a PPT-type ginsenoside. In this study, the expression plasmid pET-32a-PgUGT74AE2 was constructed for expression of the recombinant protein and transferred into *Escherichia coli* *Transetta* (DE3) to generate the recombinant strain *Transetta*-PgUGT74AE2. The recombinant enzyme PgUGT74AE2 was expressed by induction of isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). An *in vitro* enzymatic reaction system was established with the recombinant enzyme PgUGT74AE2 and the substrate PPT. PgUGT74AE2 catalyzed the glycosylation of the free C-3 hydroxyl of PPT to produce 3-O- β -D-glucopyranosyl-dammar-24-ene-3 β ,6 α ,12 β ,20S-tetraol, a new PPT-type ginsenoside. This study provides an efficient approach for the biosynthesis of a new PPT-type ginsenoside through *in vitro* enzymatic reaction, which may pave a way to produce promising lead in drug discovery.

收稿日期: 2018-04-04; 修回日期: 2018-04-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673341); 北京市自然科学基金资助项目 (7122115); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费 (2016-I2M-3-012).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165199, Fax: 86-10-63165197, E-mail: yangjl@imm.ac.cn; zhuping@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0300

Key words: *Panax ginseng*; glycosyltransferase; glycosylation; protopanaxatriol; protopanaxatriol-type ginsenoside

人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 是一种传统的名贵中药材, 其主要活性成分是人参皂苷^[1]。药理学研究表明, 人参皂苷具有广泛的药理活性, 如抗肿瘤、抗炎、降低血糖、抗氧化及延缓衰老等^[2–6]。人参皂苷可分为两种类型: 一类是达玛烷型四环三萜类皂苷; 一类是齐墩果烷型五环三萜类皂苷。达玛烷型皂苷在人参皂苷中占大多数, 是其中的主要活性成分。达玛烷型皂苷又包括二醇皂苷和三醇皂苷。大多数人参皂苷是在糖基转移酶的作用下, 由四环三萜类皂苷元原人参二醇 (protopanaxadiol, PPD) 和原人参三醇 (protopanaxatriol, PPT) (图 1) 糖基化而生成的。在糖基转移酶的作用下, PPD 的 C-3 和/或 C-20 位羟基引入一个或几个糖基生成人参二醇皂苷; PPT 的 C-6 和/或 C-20 位羟基引入一个或几个糖基生成人参三醇皂苷。糖基化修饰是人参皂苷生物合成的最后一步, 在人参皂苷的生物合成过程中起着至关重要的作用。糖基的数目、位置以及供体种类的不同造成了人参皂苷结构的多样性, 从而使人参皂苷具有多种生物活性^[7–9]。

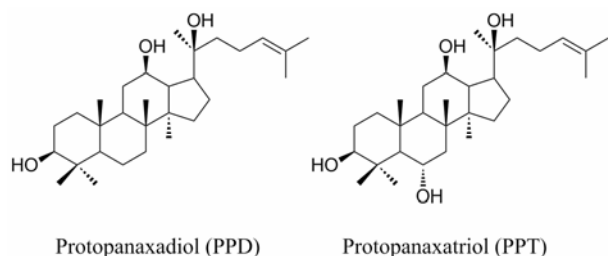


Figure 1 The chemical structures of ginsenoside aglycones

近年来, 人参皂苷生物合成相关糖基转移酶的研究取得了较大进展。人参糖基转移酶 UGTPg1 能够催化 PPD 和 PPT 的 C-20 位羟基糖基化, 分别生成人参皂苷 Compound K 和 F1^[10, 11]。糖基转移酶 UGTPg45 能够催化 PPD 的 C-3 位羟基发生糖基化, 生成人参皂苷 Rh2; 而在 UGTPg29 的催化作用下, Rh2 的 C-3 位糖基的 2' 位羟基发生糖基化, 从而生成人参皂苷 Rg3^[12]。UGTPg100 能够催化 PPT 和人参皂苷 F1 的 C-6 位羟基发生糖基化, 分别生成人参皂苷 Rh1 和 Rg1; UGTPg101 能够催化 PPT 的 C-20 位羟基发生糖基化, 生成人参皂苷 F1, 在此基础上, 能够继续催化人参皂苷 F1 的 C-6 位羟基发生糖基化, 生成人参皂苷 Rg1^[11]。Jung 等^[13]对糖基转移酶

PgUGT74AE2 进行了研究, 发现 PgUGT74AE2 可以催化 PPD 和 Compound K 的 C-3 位羟基发生糖基化, 分别生成人参皂苷 Rh2 和 F2, 但不能催化 PPT 的 C-3 位羟基发生糖基化。

本研究构建 PgUGT74AE2 重组表达质粒, 将其转入大肠杆菌获得重组菌株, 经过诱导表达, 获得重组 PgUGT74AE2; 以 PPT 为底物, 建立体外酶促反应体系, 确证了重组 PgUGT74AE2 能够催化 PPT 的 C-3 位羟基发生糖基化, 生成一种新型三醇皂苷。

材料与方法

菌株与质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans1-T1 和 Transetta (DE3) 感受态细胞购自 Transgene 公司; 质粒 pET-32a 购自 Novagen 公司; 质粒 pUC57-PgUGT74AE2 由本实验室保存, 其中 PgUGT74AE2 基因序列与文献^[13]一致。

试剂与仪器 T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司; DNA Marker 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Transgene 公司; 质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 和氨苄青霉素购自 INALCO 公司; PPT 购自南京春秋生物工程有限公司; UDP-glucose (UDPG) 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

3K18 型低温高速离心机 (Sigma 公司); HZQ-Q 型振荡器 (哈尔滨东联电子技术开发有限公司); PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); 高效液相色谱仪 (Agilent 1200, 安捷伦公司); DNA 电泳仪 (Bio-Rad 公司); 凝胶成像仪 (UVP 公司); 恒温培养箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司); 旋转蒸发器 (Re-2000, 上海亚荣生化仪器厂); 超声破碎仪 (Sonic VCX130, 美国 Sonics 公司); 高压细胞破碎仪 (APV-2000 型, 德国 SPX 公司); HPLC-LTQ/FTICRMS (Thermo 公司); INOVA-500 核磁共振波谱仪 (Varian 公司)。

PgUGT74AE2 原核表达载体的构建及异源表达 质粒 pUC57-PgUGT74AE2 含有目的基因 PgUGT74AE2, 且两端分别含有 BamH I 和 Sal I 酶切位点, 利用 BamH I 和 Sal I 对质粒 pUC57-PgUGT74AE2 和载体 pET-32a 进行双酶切, 电泳检测, 并用凝胶回收试剂盒对目的基因 PgUGT74AE2 和载体 pET-32a 进行回

收。利用 T4 DNA 连接酶将 *PgUGT74AE2* 连接到质粒 pET-32a 上, 转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞。随机挑取转化子, 以引物 T7-F 和 T7-R 进行菌落 PCR 筛选, 测序确证, 将重组质粒命名为 pET-32a-PgUGT74AE2。将 pET-32a-PgUGT74AE2 和 pET-32a 分别转化大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 感受态细胞, 获得重组菌株 *Transetta*-PgUGT74AE2 和对照菌株 *Transetta*-32a。菌株在含 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上进行培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。从抗性平板上挑取单菌落, 接种于 10 mL LB 培养基 (含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中培养过夜, 然后按照 1% 接种量转接于 150 mL LB 培养基 (含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 培养, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养至 OD_{600} 为 0.6~1.0, 加入 IPTG 至终浓度为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下, 诱导表达 18 h。菌液以 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 收集菌体。用适量缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0) 将菌体重悬浮, 利用超声破碎仪 (超声 5 s, 间隔 5 s, 共 40 min) 将菌体进行破碎。超声后的菌液在 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 40 min, 收集上清液, 取 20 μL 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

重组 PgUGT74AE2 的纯化 利用 Ni-NTA 亲和色谱对重组 PgUGT74AE2 进行纯化。先用 10 倍体积分含 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0) 对镍柱进行平衡。将含重组蛋白的上清液用 0.22 μm 的滤膜过滤, 缓慢加入到镍柱中, 流速控制在 0.5~1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。依次用含 20、30、40、50 及 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0) 进行洗脱, 并对不同浓度咪唑洗脱下来的样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。将重组蛋白用 30 kDa 超滤管进行浓缩。采用 Bradford 法 (美国 Bio-Rad 公司) 测定蛋白浓度。

重组 PgUGT74AE2 的活性检测 以 UDPG 为糖基供体, PPT 作为糖基受体, 加入纯化的重组 PgUGT74AE2, 建立酶促反应体系。100 μL 反应体系如下: 0.05 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ PgUGT74AE2, 10 μL ; 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物 PPT, 2 μL ; 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ UDPG, 10 μL ; 缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0), 补加至体系为 100 μL 。将反应体系混匀, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 静置反应 12 h, 加入 200 μL 甲醇终止反应。12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤。利用 C_{18} 反相柱 (4.6 $\text{mm}\times 150\text{ mm}$, 5 μm , 日本 CAPCELL PAK 公司) 检测反应产物。紫外检测波长为 203 nm, 以水 (A) 和乙腈 (B) 为流动相。HPLC 检测条件如

下: 0 min, 10% B; 20 min, 55% B; 30 min, 70% B; 31 min, 100% B; 40 min, 100% B; 41 min, 10% B; 50 min, 10% B。

PgUGT74AE2 催化产物的制备及结构鉴定 将通过发酵培养收集的 *Transetta*-PgUGT74AE2 菌体用适量缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0) 重悬浮, 利用高压破碎仪将菌体进行破碎。破碎后的菌液在 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 40 min, 收集上清液作为 PgUGT74AE2 粗酶液。酶促反应体系如下: PgUGT74AE2 粗酶液, 22 mL; 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物 PPT, 0.5 mL; 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ UDPG, 2.5 mL; 缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0), 25 mL。将催化体系混匀后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下, 震荡反应 24 h, 加入 100 mL 甲醇终止反应。10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取出上清液, 将离心沉淀用适量甲醇洗涤 3 次, 然后将上清液与甲醇洗涤液合并, 利用旋转蒸发仪蒸干, 用适量甲醇将化合物溶解后, 经 0.22 μm 滤膜过滤。利用 C_{18} 反相柱 (10 $\text{mm}\times 250\text{ mm}$, 5 μm , 日本 CAPCELL PAK 公司) 对产物进行制备。紫外检测波长为 203 nm, 流动相为 42% 乙腈。将制备的产物进行 ESI-MS、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HMBC 测定, 确定其结构。

结果与分析

1 重组表达质粒的构建及重组蛋白的表达与纯化

将质粒 pUC57-PgUGT74AE2 利用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切, 并用凝胶回收试剂盒回收长度为 1 356 bp 的 *PgUGT74AE2* 基因片段。利用 T4 DNA 连接酶将 *PgUGT74AE2* 基因连接到用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切过的载体 pET-32a 上, 转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞。通过菌落 PCR 筛选阳性转化子并测序, 确证 *PgUGT74AE2* 基因正确插入。重组质粒命名为 pET-32a-PgUGT74AE2。

将重组表达质粒 pET-32a-PgUGT74AE2 转入大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 获得重组菌株 *Transetta*-PgUGT74AE2。通过 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 诱导重组蛋白表达。SDS-PAGE 电泳检测, 发现重组菌超声破碎后的上清液在 55~70 kDa 之间出现一条预期大小的蛋白条带, 而转入空载体 pET-32a 的对照菌株 *Transetta*-32a 在相应位置没有出现蛋白条带, 表明经 IPTG 诱导后 PgUGT74AE2 获得了可溶性表达 (图 2A)。

通过 Ni-NTA 亲和色谱对重组蛋白进行纯化时, 依次用含 20、30、40、50 及 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的缓冲液 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0) 洗脱, 结果显示, 大部分 PgUGT74AE2 被 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱下

来。因此，最终采用 20 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱除去杂蛋白、40 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱目的蛋白的方法对重组 PgUGT74AE2 进行纯化 (图 2B)。

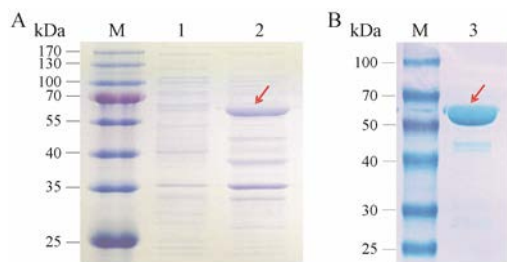


Figure 2 SDS-PAGE analysis of the expression (A) and purification (B) of the recombinant PgUGT74AE2. M: Marker; 1: Soluble protein fraction of Transetta-32a; 2: Soluble protein fraction of Transetta-PgUGT74AE2; 3: The recombinant PgUGT74AE2 purified by Ni-NTA affinity chromatography

2 重组 PgUGT74AE2 催化活性的检测

以 PPT 为底物, UDPG 为糖基供体, 利用重组 PgUGT74AE2 进行催化反应, HPLC 检测反应产物。在不含重组 PgUGT74AE2 的对照反应体系中, 仅检测到保留时间为 23.72 min 的 PPT 底物峰, 而在含重组 PgUGT74AE2 的反应体系中, 在 19.48 min 有明显的产物峰出现, 即化合物 **1**, 其紫外吸收与底物 PPT 一致 (图 3)。PPT 转化率约为 28%。

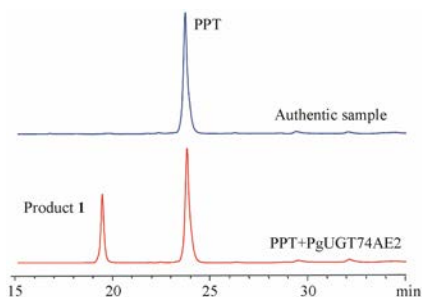


Figure 3 HPLC analysis of the glycosylated product of PPT catalyzed by PgUGT74AE2

3 PgUGT74AE2 催化产物的制备及结构鉴定

通过 HPLC 对 PgUGT74AE2 催化 PPT 得到的化合物 **1** 进行制备, 并利用 ESI-MS、¹H NMR、¹³C NMR

和 HMBC 进行检测。

ESI-MS 检测结果显示, 化合物 **1** 的分子离子峰为 661 [M+Na]⁺, 可以确定化合物 **1** 的相对分子质量为 638, 比底物 PPT 的分子量 476 增加了 162, 推测化合物 **1** 是在重组 PgUGT74AE2 催化作用下, 由 PPT 与一分子葡萄糖发生糖基化反应生成的产物 (图 4)。

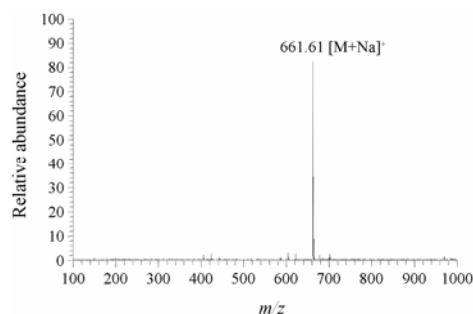


Figure 4 ESI-MS analysis of the glycosylated product of PPT catalyzed by the recombinant PgUGT74AE2

化合物 **1** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与底物 PPT 非常相似, 差异在于多出一组葡萄糖基信号。¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) δ: 4.28 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 3.30 (1H, m, H-2'), 3.35 (1H, m, H-3'), 3.24 (1H, m, H-4'), 3.17 (1H, m, H-5'), 4.00 (1H, td, *J* = 10.5, 3.5 Hz, H-6'), 3.52 (1H, m, H-6'); ¹³C NMR (100 MHz, methanol-*d*₄) δ: 107.0 (C-1'), 75.7 (C-2'), 78.3 (C-3'), 72.0 (C-4'), 77.7 (C-5'), 62.8 (C-6')。同时, 在 ¹³C NMR (100 MHz, methanol-*d*₄) 谱中, C-3 的化学位移向低场位移 12.3 ppm, 说明化合物 **1** 的 C-3 位羟基发生了糖基化。通过对 HMBC 谱的分析: δ_H 3.10 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.5 Hz, H-3) 与 δ_C 107.0 (C-1') 相关, δ_H 4.28 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1') 与 δ_C 90.7 (C-3) 相关, 进一步证明了推测的正确性。葡萄糖基的端基质子具有较大的偶合常数 *J* = 8.0 Hz, 说明该分子葡萄糖基的构型为 β 型。通过以上综合分析并与文献报道数据比对^[14], 确定化合物 **1** 的结构为 3-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-dammar-24-ene-3β,6α,12β,20*S*-tetraol (图 5)。¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄) 和 ¹³C NMR (100 MHz, methanol-*d*₄) 具体数据见表 1。

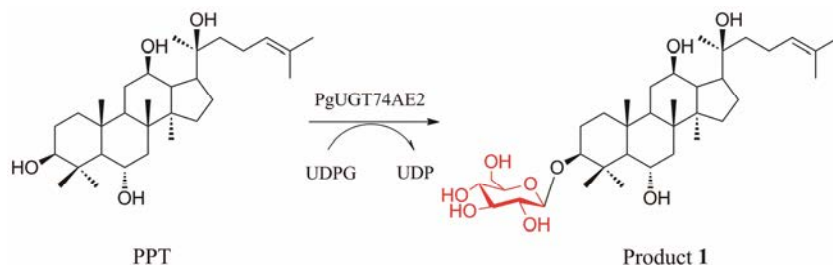


Figure 5 Glycosylation pattern of PgUGT74AE2 towards PPT

Table 1 ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) spectral data for product **1** in methanol- d_4

C	δ_{C}	δ_{H} (mult, J in Hz)
1	39.8	0.90 (1H, s); 1.43 (1H, m)
2	27.3	1.50 (1H, m); 1.56 (1H, m)
3	90.7	3.10 (1H, dd, $J = 12.0, 4.5$ Hz)
4	40.9	
5	62.4	1.06 (1H, m)
6	68.8	3.62 (1H, dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz)
7	47.3	1.67 (1H, m); 1.85 (1H, m)
8	41.9	
9	52.4	1.38 (1H, m)
10	40.0	
11	32.0	1.83 (1H, s); 1.97 (1H, m)
12	71.7	3.81 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz)
13	50.7	1.72 (1H, m)
14	55.1	
15	31.2	1.02 (1H, m); 1.29 (1H, s)
16	26.5	1.20 (1H, m); 1.52 (1H, m)
17	58.8	2.00 (1H, m)
18	17.7	0.94 (3H, s)
19	17.6	1.01 (3H, s)
20	74.4	
21	26.9	1.04 (3H, s)
22	36.2	1.46 (1H, m); 1.69 (1H, s)
23	23.3	1.99 (1H, m); 2.12 (1H, m)
24	126.2	5.11 (1H, t, $J = 7.0$ Hz)
25	132.0	
26	25.9	1.59 (3H, s)
27	17.8	1.34 (3H, s)
28	31.9	1.65 (3H, s)
29	16.8	1.12 (3H, s)
30	17.1	0.92 (3H, s)
3- <i>O</i> -Glc-1'	107.0	4.28 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)
2'	75.7	3.30 (1H, m)
3'	78.3	3.35 (1H, m)
4'	72.0	3.24 (1H, m)
5'	77.7	3.17 (1H, m)
6'	62.8	4.00 (1H, td, $J = 10.5, 3.5$ Hz); 3.52 (1H, m)

讨论

糖基化是一种在植物中广泛存在的由糖基转移酶催化的修饰反应, 通常是天然产物合成的最后一步^[15]。人参中存在多种糖基转移酶, 人参皂苷昔元的糖基化作为人参皂苷合成的最后一步, 就是由这些糖基转移酶催化完成。糖基化修饰不仅使人参皂苷的种类更加丰富, 而且糖基的种类、数目以及连接的位置等都会对人参皂苷的生物活性产生影响。例如, 在结构方面, 人参皂苷 Rh2 在 C-3 位羟基上连有一个葡萄糖基, Rb1 在 C-3 和 C-20 位羟基上均连有由两个葡萄糖基组成的二糖链; 在药理活性方面, Rh2 主要

表现为抗肿瘤活性, 而 Rb1 主要对神经细胞的生长起到促进作用^[16]。Rb1 和 Rg1 都能作用于中枢神经系统, 但是由于糖基化修饰的不同, 两者在药理活性以及作用机制上也略有不同。Rb1 通过激活 cAMP 依赖的蛋白激酶通路刺激神经递质释放^[17], Rg1 则通过蛋白激酶-II 依赖的信号通路来刺激神经递质释放^[18], 而且 Rb1 的作用比 Rg1 弱, 甚至在一些情况下会对中枢神经系统起到抑制作用^[19]。因此, 许多人参皂苷仅仅是糖基化修饰的微小差异, 就产生了不同的药理作用。

在达玛烷型皂苷中, 二醇皂苷主要在 C-3 和/或 C-20 位羟基发生糖基化, 而三醇皂苷主要在 C-6 和/或 C-20 位羟基发生糖基化。通过大肠杆菌表达的重组 PgUGT74AE2 能够催化 PPT 的 C-3 位羟基发生糖基化反应, 获得一种新型三醇皂苷 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-dammar-24-ene-3 β ,6 α ,12 β ,20*S*-tetraol。Jung 等^[13]研究发现 PgUGT74AE2 可以催化 PPD 和 Compound K 的 C-3 位羟基发生糖基化, 但不能催化 PPT 的 C-3 位羟基发生糖基化。上述研究结果不一致可能是反应体系的不同造成的。本研究通过重组 PgUGT74AE2 催化的酶促反应获得新型人参三醇皂苷, 下一步将对该皂苷进行药理活性研究, 为新药研究奠定基础。

References

- [1] Choi J, Kim TH, Choi TY, et al. Ginseng for health care: a systematic review of randomized controlled trials in Korean literature [J]. PLoS One, 2013, 8: e59978.
- [2] Shibata S. Chemistry and tumor preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds [J]. J Korean Med Sci, 2001, 16: S28-S37.
- [3] Yun TK. *Panax ginseng*—a non-organ-specific cancer preventive? [J]. Lancet Oncol, 2001, 2: 49-55.
- [4] Ahn S, Siddiqi MH, Noh HY, et al. Anti-inflammatory activity of ginsenosides in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. Sci Bull, 2015, 60: 773-784.
- [5] Mathiyalagan R, Subramaniam S, Kim YJ, et al. Ginsenoside compound K-bearing glycol chitosan conjugates: synthesis, physicochemical characterization, and *in vitro* biological studies [J]. Carbohydr Polym, 2014, 112: 359-366.
- [6] Ni HX, Yu NJ, Yang XH. The study of ginsenoside on PPAR-gamma expression of mononuclear macrophage in type 2 diabetes [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37: 2975-2979.
- [7] Park MT, Cha HJ, Jeong JW, et al. Anti-invasive activity of ginsenoside Rh1 and Rh2 in the HT1080 cells [J]. J Ginseng

- Res, 1998, 22: 216–221.
- [8] Lee Y, Jin Y, Lim W, et al. A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 84: 463–468.
- [9] Jung JS, Shin JA, Park EM, et al. Anti-inflammatory mechanism of ginsenoside Rh1 in lipopolysaccharide-stimulated microglia: critical role of the protein kinase A pathway and hemoxygenase-1 expression [J]. *J Neurochem*, 2010, 115: 1668–1680.
- [10] Yan X, Fan Y, Wei W, et al. Production of bioactive ginsenoside Compound K in metabolically engineered yeast [J]. *Cell Res*, 2014, 24: 770–773.
- [11] Wei W, Wang P, Wei Y, et al. Characterizations of *Panax ginseng* UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F1 and Rh1 in metabolically engineered yeasts [J]. *Mol Plant*, 2015, 8: 1412–1424.
- [12] Wang P, Wei Y, Fan Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts [J]. *Metab Eng*, 2015, 29: 97–105.
- [13] Jung SC, Kim W, Park SC, et al. Two ginseng UDP-glycosyltransferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 2177–2188.
- [14] Li KK, Yang XB, Yang XW, et al. New triterpenoids from the stems and leaves of *Panax ginseng* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 1030–1035.
- [15] Harborne JB. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986* (Harborne, J. B.) [M]. Boca Raton: CRC Press, 1988, 72: A73.
- [16] Song XZ, Gao WB, Zheng YN, et al. New advances in the study of biotransformation of ginsenosides [J]. *Ginseng Res (人参研究)*, 2012, 24: 34–39.
- [17] Xue JF, Liu ZJ, Hu JF, et al. Ginsenoside Rb1 promotes neurotransmitter release by modulating phosphorylation of synapsins through a cAMP-dependent protein kinase pathway [J]. *Brain Res*, 2006, 1106: 91–98.
- [18] Liu ZJ, Ming Z, Yun Z, et al. Ginsenoside Rg1 promotes glutamate release via a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent signaling pathway [J]. *Brain Res*, 2010, 1333: 1–8.
- [19] Chen C, Chiou W, Zhang J. Comparison of the pharmacological effects of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29: 1103–1108.