

引用:尹雨晴,敖志杰,周新茹,李旭东,罗斯成,梁海雪,刘湘丹.齐墩果烷型三萜皂苷生物合成及关键细胞色素P450基因研究进展[J].中医药导报,2025,31(2):112-119.

齐墩果烷型三萜皂苷生物合成及关键细胞色素P450基因研究进展*

尹雨晴¹,敖志杰¹,周新茹²,李旭东¹,罗斯成¹,梁海雪¹,刘湘丹^{1,3,4,5}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南 长沙 410208;

2.湖南九典制药股份有限公司,湖南 长沙 410000;

3.湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点研究室,湖南 长沙 410208;

4.湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室,湖南 长沙 410208;

5.湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心,湖南 长沙 410208)

[摘要] 齐墩果烷型三萜皂苷是多种药用植物的有效成分,药理作用丰富,市场需求量大。齐墩果烷型三萜皂苷生物合成量少,不足以满足市场需求,异源合成成为其提供了新思路。齐墩果烷型三萜皂苷生物合成途径分3个阶段,即积累前体、合成骨架、皂苷合成。其中细胞色素P450(CYP450)为皂苷合成过程中关键的下游修饰基因,可影响底物转化、中间代谢产物生成、合成速率及产量。综述近年来齐墩果烷型三萜皂苷异源合成及生物合成途径关键CYP450基因的最新研究进展,探讨其研究意义及存在的问题,发现其异源合成存在基因表达调控不明确、代谢途径多样、工业化生产难度大等挑战,未来可通过优化宿主细胞代谢途径,提高目标产物合成效率,以实现齐墩果烷型三萜皂苷的高效生产。

[关键词] 齐墩果烷型三萜皂苷;细胞色素P450;萜类合成关键基因;异源合成;综述

[中图分类号] R284.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)02-0112-08

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.02.021

Progress in the Biosynthesis of Oleanane-Type Triterpenoid Saponins and Key CYP450 Genes

YIN Yuqing¹, AO Zhijie¹, ZHOU Xinru², LI Xudong¹, LUO Sicheng¹, LIANG Haixue¹, LIU Xiangdan^{1,3,4,5}

(1.School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 2.Hunan Jiudian Pharmaceutical Co.,Ltd., Changsha Hunan 410000, China; 3.Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Hunan Large-Scale Genuine Medicinal Materials, Changsha Hunan 410208, China; 4.Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization Research in General Colleges and Universities of Hunan Province, Changsha Hunan 410208, China; 5.Hunan Traditional Chinese Medicine Piece Standardization and Function Technology Research Center, Changsha Hunan 410208, China)

[Abstract] Oleanolic alkane-type triterpenoid saponins are the active ingredients of a variety of medicinal plants with rich pharmacological effects and high market demand. However, the biosynthesis of oleanane-type triterpenoid saponins is insufficient to meet the market demand, and heterologous synthesis provides a new idea. It was found that the biosynthetic pathway of oleanolic alkane-type triterpenoid saponins is divided into three stages, the first and second stages of accumulation of precursors and synthesis of skeleton, and the third stage of saponin synthesis, in which cytochrome P450 (CYP450) is the key downstream modification gene in the process of saponin synthesis, which affects the conversion of the substrate, intermediate metabolite generation, synthesis rate and yield. This paper reviewed the latest research progress of the key CYP450 genes in the heterologous synthesis and biosynthesis pathway of oleanane triterpenoid saponins in recent years, and discusses its research significance and existing problems. It is found that the heterologous synthesis has the challenges

*基金项目:湖南省大学生创新创业训练计划一般项目(湘教通2022[174]号-S202210541054);湖南中医药大学本科生科研创新基金项目(2023BKS102);湖南省中药材产业技术体系项目(HARS-11);2020年湖南省一流本科专业建设点:中药资源与开发;湖南中医药大学重点学科中药学科(校行发规字[2023]2号)

通信作者:刘湘丹,女,教授,研究方向为中药资源与品质评价

of unclear gene expression regulation, diverse metabolic pathways and difficult industrial production. In the future, the efficient production of oleanane triterpenoid saponins can be achieved by optimizing the metabolic pathway of host cells and improving the synthesis efficiency of target products.

[Keywords] oleanolic triterpenoid saponins; cytochrome P450; key genes involved synthesis of saponins; heterologous synthesis; review

齐墩果烷型三萜皂苷类化合物是一种自然界中分布广泛的次生代谢产物,具有护肝、抗炎、抗恶性肿瘤、预防心血管疾病等多种药理活性^[1],是新药研发的重要原料。多种中药材的齐墩果烷型三萜皂苷为其标志性成分,如柴胡的柴胡皂苷a、柴胡皂苷d,桔梗的桔梗皂苷d,商陆的商陆皂苷a,远志的细叶远志皂苷,山银花的灰毡毛忍冬皂苷乙,以及川续断皂苷乙等^[2]。齐墩果烷型三萜皂苷结构复杂,人工合成困难,直接分离和提取不符合环境友好及可持续的解决方案,异源合成生产是解决其来源的重要途径^[3-4]。齐墩果烷型三萜皂苷合成过程分为3个阶段:上游前体物质C5(异戊二烯)的积累,中游6个异戊二烯环化生成C30骨架,下游以 β -香树脂醇为前体经羟基化、氧化、糖基化等过程生成齐墩果烷型三萜皂苷。(见图1)其中第一和第二阶段合成途径研究已比较成熟,很多关键基因已被分离和鉴定;第三阶段萜类合成阶段骨架修饰过程决定生成的萜类化合物类型,其过程复杂,机制至今尚未完全阐明。

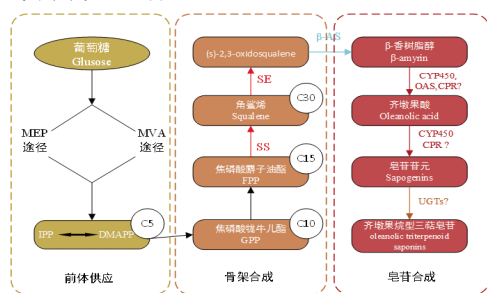


图1 齐墩果烷型三萜皂苷合成途径

从图1可知,细胞色素P450基因(cytochrome P450, CYP450)是齐墩果烷型三萜皂苷生物合成途径中催化 β -香树脂醇合成齐墩果酸及修饰齐墩果酸母核的关键基因,克隆CYP450并进行功能研究对解析齐墩果烷型三萜皂苷生源合成具有重要意义。本文对齐墩果烷型三萜皂苷异源合成及相关CYP450的相关研究进行综述,以期对齐墩果烷型三萜皂苷相关研究提供参考。

1 齐墩果烷型三萜皂苷异源合成进展

齐墩果烷型三萜皂苷多样的生物活性和药理特性使其展现出广阔药用前景,但天然植物中含量低,提取工艺复杂,使其大规模生产受限,异源合成成为解决之法。在异源合成过程中,改造工程菌株或细胞系、采用生物反应器进行大规模培养、利用微生物发酵体系等为提高其产量的有效方法。目前萜类、黄酮类、生物碱类成分异源合成途径研究比较深入,其中齐墩果烷型三萜皂苷异源合成相关研究综述如下。

1.1 齐墩果烷型三萜皂苷中间产物合成进展 王冬等^[5]通过优化前期的齐墩果酸工程酵母菌BY-OA,提高了工程菌BY-20A齐墩果酸产量,并发现一定的浓度范围内产量与初糖量成正比。马晓琳等^[6]在苹果(*Malus × domestica*)中筛选获

得基因催化齐墩果酸C-23位氧化的MdMAO2,以BY-OA工程菌为底盘细胞构建工程菌BY-OA-MdMAO2,通过控制培养液含氧量提高常春藤皂苷元产量。LI M等^[7]利用酿酒酵母表达源于光果甘草(*Glycyrrhiza glabra*)的 β -AS,并通过调节CYP93E3和CYP72A566的表达,利用发酵优化大豆甾醇B产量。KONG J等^[8]在解脂耶氏酵母中单独过表达或联合过表达甲羟戊酸途径中的主要基因(HMG1、ERG20、ERG9、ERG1)以引导流向香树脂醇生物合成,通过增强前体供应提高总香树脂醇产量,并通过优化发酵条件使 β -香树脂醇的浓度达到了至少20 mg/L。ZHU Y等^[9]利用酵母细胞表面的环糊精糖基转移酶(CGTase)从淀粉开始原位合成 β -环糊精(β -CD),增强 β -香树脂醇的生物合成及外排,还采用了诱导系统重塑、前体供应增强等多种方法,使 β -香树脂醇的产量比原菌株高了31倍。LI J L等^[10]在酿酒酵母中表征来自不同植物的8种角鲨烯环氧化酶,对水稻的角鲨烯环氧化酶(OsSQE52)进行蛋白质重构并得到突变体OsSQE52 L256R, β -香树脂醇浓度提高了2.43倍,并通过改善前体供应,将最终构建菌株 β -香树脂醇的产量提升为原始菌株的6.45倍。

LI W X等^[11]利用CYP716A262和CYP72A567转化底盘菌BY-bAS,在酵母中重构金铁锁皂苷元生物合成途径,获得的工程菌生产了丝石竹皂苷元和皂皮酸。CHEN K等^[12]从膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus*)中克隆了一种 β -AS-AmOSC2,通过在烟草和酵母中的异源表达,以及体内瞬时表达和病毒诱导的基因沉默发现,其与体内 β -香树脂醇和大豆皂苷的产生有关。ARNESEN J A等^[13]在已进行优化的解脂耶氏酵母菌株中以游离或融合形式表达植物酶,建立前体重组生产,产生熊果酸或齐墩果酸。HAN J Y等^[14]通过根瘤农杆菌介导将过表达蒲公英(*Taraxacum coreanum*)多功能氧化角鲨烯环化酶(TeOSC1)转入烟草,所有转基因烟草品系均产生新的三萜类化合物。ALAGNA F等^[15]在本氏烟草中重构了橄榄(*Olea europaea*)果实中齐墩果烷三萜类化合物合成的整个生物合成途径,并通过性状关联分析,找到了控制其中齐墩果酸和马斯林酸含量的主要候选基因,首次揭示了控制三萜类化合物含量的染色体区域。HAN J Y等^[16]在erg7突变酵母中对从日本栗(*Castanea crenata*)叶子转录组测序获得的5个假定的OSC单基因CcOSC1-5进行功能表征,发现CcOSC1-4产生 β -香树脂醇。SUN M C等^[17]优化CYP88D6氧化,在酵母中高效生产11-氧代- β -香树脂醇。LIU X C等^[18]在大肠杆菌中表达欧洲山芥中的糖基转移酶UGT73C11,并在体外对甘草次酸进行催化,使甘草次酸的C-3号位糖基化,增加甘草次酸衍生物的水溶性和抗炎效果。MAO Y P等^[19]在大肠杆菌和毕赤酵母中异源表达 β -AS基因BcBAS1并进行功能表征,发现其可催化柴胡皂苷(SSs)前体 β -香树脂醇的产生,且可能影响生物合成SSs。

1.2 齐墩果烷型三萜皂苷合成进展 YU H等^[20]提出从海洋放线菌Nonomuraea sp. MYH522中通过微生物转化实现由大豆皂苷Bb到5种齐墩果烷型三萜类化合物的生物转化。QIN L等^[21]发现较低的酵母发酵温度可以显著改善萜类化合物的合成和流出。LIU Y等^[22]采用模块化两步(M2S)技术和CRISPR-Cas9方法构建工程酵母,发现TwCYP712K1-K3能进一步氧化齐墩果烷型三萜类化合物的C-29羧化作用。YU H等^[23]从常春藤(*Hedera helix*)中筛选并鉴定了一种糖基转移酶HhUGT74AG11,并将候选UGT靶片段同源重组后导入大肠杆菌诱导重组蛋白表达,经体外酶促分析表明,HhUGT74AG11可催化齐墩果酸C-28位糖基化,并可催化多种三萜和黄酮类化合物。YU X C等^[24]在人参中鉴定了PgUGAT252645,并在大肠杆菌中进行表达和功能鉴定发现,其在人参不定根中的过表达显著增加了人参皂苷R0的含量。

2 参与齐墩果烷型三萜皂苷合成的CYP450

CYP450被认为是植物代谢过程重要的酶家族,在植物次生代谢产物合成的过程中发挥着重要作用,参与到萜类、苯丙烷类、生物碱、植物激素等代谢产物的合成过程中^[25],具有催化氧化、环氧化、羟化等功能,为三萜皂苷的生物合成提供了重要支撑,是三萜皂苷生物合成的关键基因。目前,植物中已发现127个CYP450家族,根据系统发育树上的不同分支被分为11个簇(clan),其中CYP51、CYP74、CYP97、CYP710、CYP711、CYP727、CYP746为单家族簇,CYP71、CYP72、CYP85、CYP86为多家族簇^[26]。特异性调控齐墩果烷型三萜类成分生物合成的CYP450基因主要归属于CYP51、CYP71、CYP72和CYP85簇^[27]。

2.1 CYP51簇 目前发现仅有1种CYP51簇基因参与齐墩果烷型三萜皂苷生物合成,属于CYP51H亚家族。GEISLER K等^[28]在燕麦(*Avena sativa*)中发现AsCYP51H10能催化 β -香树脂醇(β -amyrin)及 β -香树脂醇(β -Amyrin)形成12,13 β -环氧-16 β -羟基- β -香树脂醇,其具体反应机理见图2。

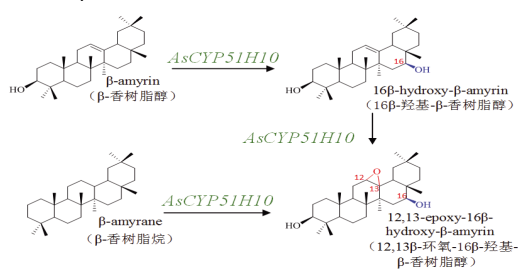


图 2 CYP51H10 参与齐墩果烷型三萜皂苷的生物合成

2.2 CYP71簇 CYP71簇的CYP93E亚家族参与豆科植物齐墩果烷型三萜皂苷生物合成中C-24位羟化。(见图3)

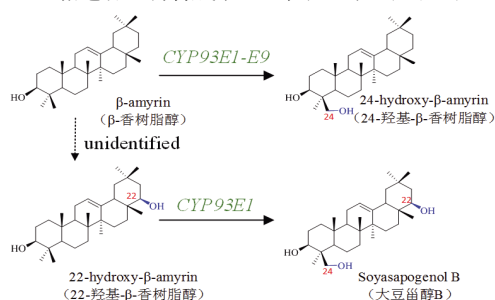


图 3 CYP71 簇参与齐墩果烷型三萜皂苷的生物合成

在大豆(*Glycine max*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)和甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)中分别发现的CYP93E1、CYP93E2和CYP93E3均能催化 β -香树脂醇的C-24位羟化。其他参与齐墩果烷型三萜皂苷生物合成的CYP71见表1。

表 1 其他参与齐墩果烷型三萜皂苷生物合成的 CYP71

基因	来源	功能底物	序列号	参考文献
CYP93E1	光叶百脉根(<i>Lotus japonicus</i>)	C-24位羟化(C24-hydroxylation)[β -香树脂醇(槐花二醇(β -amyrin)sophoradiol)]	LC414182	[29]
CYP93E4	落花生(<i>Arachis hypogaea</i>)	C-24位羟化(C24-hydroxylation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KF906535	[30]
CYP93E5	鹰嘴豆(<i>Cicer arietinum</i>)	C-24位羟化(C24-hydroxylation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KF906536	[30]
CYP93E6	光果甘草(<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	C-24位羟化(C24-hydroxylation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KF906537	[30]
CYP93E7	兵豆(<i>Lens culinaris</i>)	C-24位羟化(C24-hydroxylation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KF906538	[30]
CYP93E8	豌豆(<i>Pisum sativum</i>)	C-24位羟化(C24-hydroxylation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KF906539	[30]
CYP93E9	菜豆(<i>Phaseolus vulgaris</i>)	C-24位羟化(C24-hydroxylation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KF906540	[30]

注:sophoradiol(槐花二醇)。

2.3 CYP72簇 CYP72簇的CYP72A、CYP714E和CYP749A亚家族参与齐墩果烷型三萜皂苷合成,主要参与C-23、28、30位的氧化和C-2 β 、22、23位的羟化。(见图4)

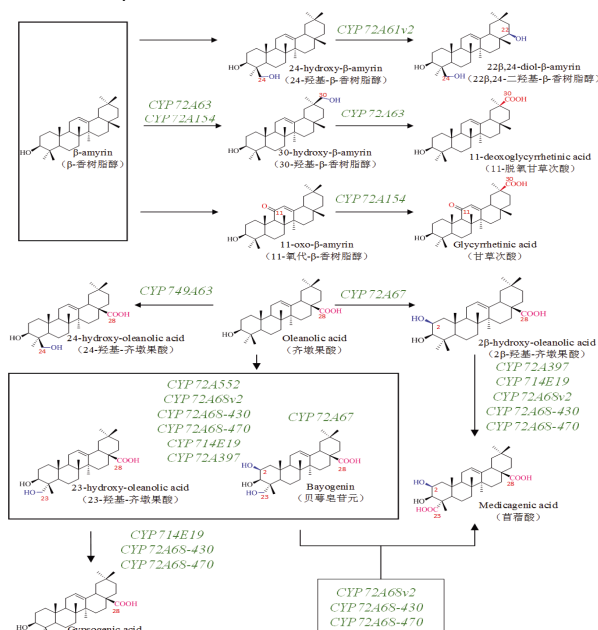


图 4 CYP72 簇参与齐墩果烷型三萜皂苷的生物合成

2.3.1 CYP72A亚家族 LIU Q等^[31]发现欧洲山芥(*Barbarea vulgaris*)中CYP72A522可催化齐墩果酸的C-23位发生羟化反应。王婷^[32]发现甘草CYP72A154是以11-氧代- β -香树脂醇为底物的C-30氧化酶。CYP72A154^[33]的底物也可为 β -香树脂醇。

2.3.2 CYP714E亚家族 KIM O T等^[34]在积雪草(*Centella asiatica*)中发现CYP714E19可催化齐墩果酸C-23位羟化及进一步氧化。其他参与齐墩果烷型三萜皂苷生物合成的CYP72见表2。

2.4 CYP85簇 CYP85簇的CYP87D、CYP88D、CYP716A、CYP716C、CYP716E、CYP716Y亚家族参与齐墩果烷型三萜皂苷合成,主要参与C-2 α 、11、16、28位的氧化及C-2 α 、16 α 、16 β 、28位的羟化。(见图5)

CYP85簇中的基因催化活性以C-28位氧化最为典型,而其大部分都包括3个连续的氧化反应,即C-28位的取代

基由羟基过渡到醛基,最后氧化成羧基,生成齐墩果酸,如 CYP716A179^[40]、CYP716A52v2^[41]、CYP716A140v2^[42]、CYP716A259^[43]等。除此之外,也有其他丰富的催化点位,如:MIETTINEN K等^[44]发现积雪草中CYP716C11可催化齐墩果

酸C-2 α 位羟基化,CYP16C53^[45]也具有相同作用。MOSES T等^[45]发现柴胡CYP716Y1可催化齐墩果烷型三萜C-16 α 位羟基化。其他参与齐墩果烷型三萜皂苷生物合成的CYP85见表3。

表2 其他参与齐墩果烷型三萜皂苷生物合成的 CYP72

基因	来源	功能[底物]	序列号	参考文献
CYP72A63	蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	C-30位氧化(C30-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	AB558146	[33]
CYP749A63	山楂(<i>Crataegus pinnatifida</i>)	C-24位羟基化(C24-hydroxylation)[齐墩果酸(oleanolic acid)]	MF596155	[35]
CYP72A397	刺楸(<i>Kalopanax septemlobus</i>)	C-23位羟基化(C23-hydroxylation)[齐墩果酸(oleanolic acid)]	KT150517	[36]
CYP72A68v2	蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	C-23位氧化(23-oxidation)[齐墩果酸/2 β -羟基-齐墩果酸/贝母皂苷元(oleanolic acid/2 β -hydroxy-oleanolic acid/bayogenin)]	AB558150	[33,37-38]
CYP72A68-430	蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	C-23位氧化(23-oxidation)[齐墩果酸/2 β -羟基-齐墩果酸/贝母皂苷元(oleanolic acid/2 β -hydroxy-oleanolic acid/bayogenin)]	Medtr2g055430	[28,38]
CYP72A68-470	蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	C-23位氧化(23-oxidation)[齐墩果酸/2 β -羟基-齐墩果酸/贝母皂苷元(oleanolic acid/2 β -hydroxy-oleanolic acid/bayogenin)]	Medtr2g055470	[37-38]
CYP72A61v2	蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	C-22位羟基化(C22-hydroxylation)[24-羟基- β -香树脂醇(24-hydroxy- β -amyrin)]	AB558145	[33,39]
CYP72A67	蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	C2 β -羟基化(C2 β -hydroxylation)[齐墩果酸/23-羟基-齐墩果酸(oleanolic acid/23-hydroxy-oleanolic acid)]	DQ335780	[37-38]

注: bayogenin(贝母皂苷元)。

表3 其他参与齐墩果烷型三萜皂苷生物合成的 CYP85

基因	来源	功能[底物]	序列号	参考文献
CYP716A110	变色锦斗菜(<i>Aquilegia coerulea</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KU878864	[44]
CYP716A12	蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	DQ335781	[46]
CYP716A140	桔梗(<i>Platycodon grandiflorus</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇/16 β -羟基- β -香树脂醇/12,13-环氧- β -香树脂醇(β -amyrin/16 β -hydroxy- β -amyrin/12,13-epoxy- β -amyrin)]	KU878853	[44]
CYP716A15	葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇/羽扇豆醇(α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)]	AB619802	[47]
CYP716A17	葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	AB619803	[47]
CYP716A244	刺五加(<i>Eleutherococcus senticosus</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KX354739	[48]
CYP716A249	远志(<i>Polygala tenuifolia</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KY385302.1	[49]
CYP716A254	鹅掌草(<i>Anemone flaccida</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	—	[50]
CYP716A265	大花紫薇(<i>Lagerstromia speciosa</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇/羽扇豆醇(α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)]	MG708187	[51]
CYP716A266	大花紫薇(<i>Lagerstromia speciosa</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇/羽扇豆醇(α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)]	MG808187	[51]
CYP716A46	光叶百脉根(<i>Solanum lycopersicum</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇/羽扇豆醇(α -amyrin/ β -amyrin/lupeol)]	XM_004243858	[52]
CYP716A51	番茄(<i>Lotus japonicus</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇(α -amyrin/ β -amyrin)]	AB706297	[32]
CYP716A52v2	人参(<i>Panax ginseng</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	JX036032	[53-54]
CYP716A83	积雪草(<i>Centella asiatica</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KU878849	[54]
CYP716A86	积雪草(<i>Centella asiatica</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KU878848	[54]
CYP716A78	藜麦(<i>Chenopodium quinoa</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KX343075	[55]
CYP716A79	藜麦(<i>Chenopodium quinoa</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KX343076	[55]
CYP716A94	刺楸(<i>Kalopanax septemlobus</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KT150521	[38]
CYP716A141	桔梗(<i>Platycodon grandiflorus</i>)	C-28位氧化/C16 β -羟基化(C28-oxidation/C16 β -hydroxylation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KU878854	[40]
CYP87D16	披针杜茎山(<i>Maesa lanceolata</i>)	C16 α -羟基化(C16 α -hydroxylation)[β -香树脂醇/齐墩果酸(β -amyrin/oleanolic acid)]	KF318735	[54]
CYP716A111	变色锦斗菜(<i>Aquilegia coerulea</i>)	C16 β -羟基化(C16 β -hydroxylation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	KU878865	[44]
CYP88D6	光果甘草(<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	C-11位氧化(C11-oxidation)[β -香树脂醇/30-羟基- β -香树脂醇(β -amyrin/30-hydroxy- β -amyrin)]	MG888351.1	[56]
CYP716E26	番茄(<i>Solanum lycopersicum</i>)	C6 β -羟基化(C6 β -hydroxylation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇(α -amyrin/ β -amyrin)]	XM_004241773	[44]
CYP716E41	积雪草(<i>Centella asiatica</i>)	C6 β -羟基化(C6 β -hydroxylation)[齐墩果酸/山楂酸(oleanolic acid/maslinic acid)]	KU878851	[44]
CYP716C55	大花紫薇(<i>Lagerstromia speciosa</i>)	C2 α -氧化(C2 α -oxidation)[齐墩果酸/熊果酸(oleanolic acid/ursolic acid)]	MG708191	[51]
CYP716A75	披针杜茎山(<i>Maesa lanceolata</i>)	C-28位氧化(C28-oxidation)[β -香树脂醇/16 α -羟基- β -香树脂醇(β -amyrin/16 α -hydroxy- β -amyrin)]	KF318733	[57]
CYP716A14v2	黄花蒿(<i>Artemisia annua</i>)	C-3位羟基化(C28-oxidation)[β -香树脂醇(β -amyrin)]	AK329870	[58]
CYP716A44	番茄(<i>Solanum lycopersicum</i>)	C-28位氧化(C3-hydroxylation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇(α -amyrin/ β -amyrin)]	KF309251	[58]
CYP716A83	积雪草(<i>Centella asiatica</i>)	C-28位氧化(C3-hydroxylation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇(α -amyrin/ β -amyrin)]	KU878849.1	[59]
CYP716C11	积雪草(<i>Centella asiatica</i>)	C2 α -羟基化(C2 α -hydroxylation)[α -香树脂醇/ β -香树脂醇(α -amyrin/ β -amyrin)]	KU878852.1	[59]

注: lupeol(羽扇豆醇)、maslinic acid(山楂酸)、ursolic acid(熊果酸)。

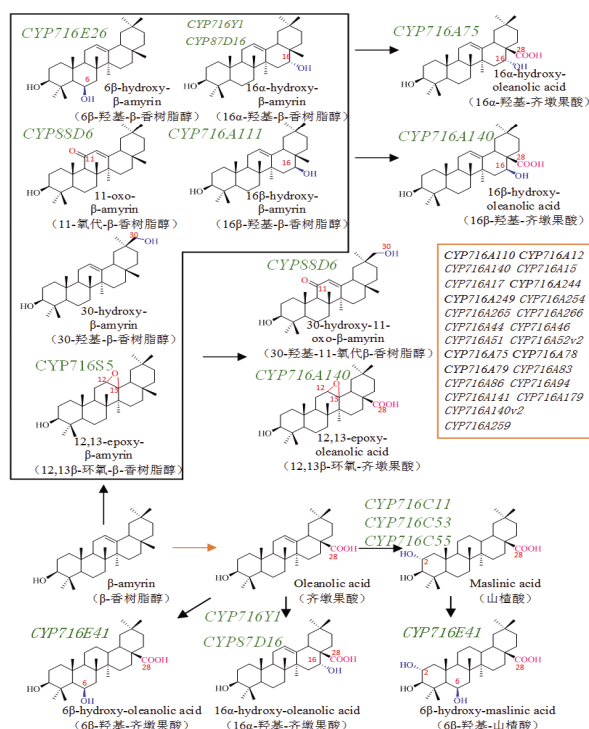


图5 CYP85簇参与齐墩果烷型三萜皂苷的生物合成

2.5 其他 YANG L Y等^[60]通过WGCNA和RT-qPCR分析,在油茶种子中鉴定出11个茶皂苷合成的候选基因CYP450。HUANG Y Y等^[61]在山芝麻中对筛选出的CYP450s进行功能验证,发现HaCYP3能催化生成齐墩果酸。REHMAN H M等^[62]通过对韩国野生大豆突变体CWS5095进行全基因组测序(WGS),发现位于CYP72A69第376位精氨酸突变成赖氨酸,这一突变使大豆甾醇B或其他中间体的C-21位置氧化产生大豆甾醇A。

3 总结与讨论

3.1 齐墩果烷型三萜皂苷的异源合成 齐墩果烷型三萜皂苷合成前体物质β-香树脂醇、齐墩果酸、常春藤皂苷元均可在工程菌株中得到。但部分异源合成体系产量远低于直接从植物中提取或者化学方法人工合成,经济效益不显著,因此其发展受限,难以实际生产。如菌株BY-20A,研究中发现初糖量会影响工程菌乙醇和齐墩果酸的合成,存在一定的竞争关系,后续建议研究人员可以针对酵母菌中合成乙醇的关键酶进行抑制或沉默。赵伟^[63]利用酿酒酵母验证远志CYP714E38可催化齐墩果酸产生常春藤皂苷元,但产物含量较低,故找到相关基因后还需优化基因在工程菌株中的表达,利用和开发更有效的分离和纯化技术,以提高常春藤皂苷元的产量。不同发酵条件对香树脂醇的浓度有不同影响,可通过调控温度、体积氧传质系数和碳源类型优化发酵条件实现其浓度的提高^[6];通过改善前体供应,优化目的基因的表达,CRISPR-Cas9技术调控关键酶,优化发酵条件,构建高效细胞工厂,可提高齐墩果烷型三萜皂苷的产量;将目的基因转化底盘菌,在酵母中重构皂苷合成途径或过表达目的基因,通过载体介导目的基因构建转基因烟草,均可用于阐明复杂代谢途径并作为天然产物替代来源。

3.2 参与齐墩果烷型三萜皂苷合成的主要CYP450基因与催化位点 目前研究较多的参与齐墩果烷型三萜皂苷的合成

相关的CYP450为CYP85簇和CYP72簇。相关CYP450主要参与齐墩果烷型三萜皂苷前体的C-2、6、12、13、16、23、24、28、30位的氧化和C-2、6、16、23、24、28、30位的羟基化。

3.3 参与齐墩果烷型三萜皂苷合成的CYP450基因间的联系及区别 大部分来源相似的基因有着同样的催化活性和相同的底物,如CYP716A83和CYP716A86均来自积雪草中,均有催化β-香树脂醇C-28位的氧化功能。但也有些来源相似的基因催化活性相同但底物种类不完全一致,如CYP716A15和CYP716A17,前者作用的底物包括α-香树脂醇、β-香树脂醇及羽扇豆醇,而后者仅能作用于β-香树脂醇。此外,有部分基因功能具有多样性,如CYP72A68^[35],除可催化齐墩果酸苷元C-23的氧化,产生醇(hederagenin)外,还可能催化进一步氧化为醛和羧酸。以上不同簇的基因并非独立割裂地行使着催化功能,一个三萜皂苷的合成往往需要多簇基因发挥协同作用或连锁反应,如:甘草次酸的合成,前期CYP88D6催化β-香树脂醇生成11-氧代-β-香树脂醇,再由CYP72A157催化C-30位氧化;大豆皂苷元B的合成,可以先由CYP91E1-9催化β-香树脂醇C-24位羟化,再由CYP72A61v2催化C-22位羟化。因此,化学成分的合成涉及多基因的协同作用。

异源合成包括系统设计与构建、优化与调控^[64],前期准备涉及基因筛选及功能鉴定、底盘细胞选择及合成途径挖掘。而系统的优化与调控主要是依靠四大光谱技术及色谱技术判断产物的产量、分子式及空间结构等特征以决定是否修改合成系统,如目的基因拷贝数量的修改、关键基因的替换及底盘细胞的替换等。基因功能鉴定常会用到基因过表达技术、CRISPR-SAM、RNAi干扰、CRISPR/CAS9基因敲除等方法。目前常用的底盘细胞有大肠杆菌、酿酒酵母菌、枯草芽孢杆菌等,非模式细菌及非传统酵母也有使用^[65],其中酿酒酵母广泛用于萜类成分的异源合成。但异源合成中,存在扩大生产后产量大大降低、合成机理不明、基因功能难以鉴定、成本较高及目的基因难以在底盘细胞中表达等问题。经研究发现,CYP450中主要为CYP85簇和CYP72簇参与齐墩果烷型三萜皂苷合成,酶的表达水平和活性调控机制尚未完全阐明。一般认为,酶特定的羟基化或氧化反应非常复杂,且齐墩果烷型皂苷生物合成途径复杂,涉及多个步骤和多个酶的参与,这都对皂苷合成造成一定影响。可通过深入研究CYP450的功能,利用生物合成对β-香树脂醇骨架及齐墩果酸骨架进行人工结构修饰和改造,而将异源合成与生物合成方法相结合不失为提高齐墩果烷型三萜皂苷产量和质量的有效方法。目前大部分植物次生代谢物的通用体内合成途径虽已基本阐明,但仍有许多影响化合物空间结构转化、取代基位置的机理不明,需进一步挖掘和验证。且齐墩果烷型三萜皂苷异源合成的报道相对较少,所得产物大多为基础的母体化合物,因此,可参考其他次生代谢产物异源合成经验合成齐墩果烷型三萜皂苷。可利用计算机技术和人工智能技术,高通量快速筛选合成齐墩果烷型三萜皂苷的相关基因,通过计算机和大数据模拟可能的作用底物、作用位点、产物结构等,阐明齐墩果烷型三萜皂苷的合成途径,进一步通过相关分子技术研究合成途径中限速酶的挖掘及功能鉴定、步骤的简化及产物取代基的修饰等,以此提升效率,获得多样的活性成分,并借助基因工程手段,设计和构建高质量齐墩果烷

型三萜皂苷生物合成系统,以期实现齐墩果烷型三萜皂苷经济高效、环境友好的高品质工业化生产。

参考文献

- [1] 栗真真,苏天琪,洪彪,等.齐墩果烷型三萜皂苷类化学成分的研究进展[J].中国现代中药,2020,22(7):1140-1150.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [3] 高惠芳,邵明龙,周武林,等.构建酿酒酵母细胞工厂高效合成摩尔酸[J].微生物学报,2021,61(11):3506-3519.
- [4] 马晓琳.创建酿酒酵母细胞工厂生产五环三萜酸及其衍生物[D].天津:天津科技大学,2018.
- [5] 王冬,王贝贝,刘怡,等.齐墩果酸酵母细胞工厂的合成途径与发酵工艺优化[J].中国中药杂志,2014,39(14):2640-2645.
- [6] 马晓琳,李畏娴,王冬,等.常春藤皂苷元生物合成解析及酵母细胞工厂的构建[J].中国中药杂志,2018,43(9):1844-1850.
- [7] LI M, ZHAO M Y, WEI P P, et al. Biosynthesis of soyasapogenol B by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2021, 193(10): 3202-3213.
- [8] KONG J, MIAO L, LU Z H, et al. Enhanced production of amyrin in *Yarrowia lipolytica* using a combinatorial protein and metabolic engineering approach[J]. Microb Cell Fact, 2022, 21(1): 186.
- [9] ZHU Y, ZHOU C, LIU X, et al. Aided-efflux and high production of β -amyrin realized by β -cyclodextrin in situ synthesized on surface of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnol Bioeng, 2023, 120(4): 1147-1158.
- [10] LI J L, WANG S, MIAO Y N, et al. Mining and modification of *Oryza sativa*-derived squalene epoxidase for improved β -amyrin production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biotechnol, 2023, 375: 1-11.
- [11] LI W X, MA X H, LI G D, et al. De Novo biosynthesis of the oleanane-type triterpenoids of tunicosaponins in Yeast[J]. ACS Synth Biol, 2021, 10(8): 1874-1881.
- [12] CHEN K, ZHANG M, XU L L, et al. Identification of oxidosqualene cyclases associated with saponin biosynthesis from *Astragalus membranaceus* reveals a conserved motif important for catalytic function[J]. J Adv Res, 2023, 43: 247-257.
- [13] ARNESEN J A, BELMONTE DEL AMA A, JAYACHANDRAN S, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for the production of plant triterpenoids: Asiatic, madecassic, and arjunolic acids[J]. Metab Eng Commun, 2022, 14: e00197.
- [14] HAN J Y, CHOI H S, JO H J, et al. Heterologous production of multiple triterpenes, including taraxasterol, in transgenic tobacco overexpressing *Taraxacum coreanum* oxidosqualene cyclase (TcOSC1)[J]. Plant Biotechnol Rep, 2022, 16(5): 529-537.
- [15] ALAGNA F, REED J, CALDERINI O, et al. OeBAS and CYP716C67 catalyze the biosynthesis of health-beneficial triterpenoids in olive (*Olea europaea*) fruits[J]. New Phytol, 2023, 238(5): 2047-2063.
- [16] HAN J Y, AHN C H, CHOI H S, et al. Characterization of oxidosqualene cyclases involved in pentacyclic triterpene biosynthesis in Korean chestnut (*Castanea crenata*)[J]. Plant Biotechnol Rep, 2023, 17(6): 853-864.
- [17] SUN M C, XIN Q, HOU K X, et al. Production of 11-oxo- β -amyrin in *Saccharomyces cerevisiae* at high efficiency by fine-tuning the expression ratio of CYP450:CPR[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(8): 3766-3776.
- [18] LIU X C, ZHANG L, FENG X D, et al. Biosynthesis of glycyrrhetic acid-3-O-monoglucose using glycosyltransferase UGT73C11 from *Barbarea vulgaris*[J]. Ind Eng Chem Res, 2017, 56(51): 14949-14958.
- [19] MAO Y P, CHEN H, ZHAO J, et al. Molecular cloning, functional characterization and expression of the β -amyrin synthase gene involved in saikosaponin biosynthesis in *Bupleurum chinense* DC [J]. J Plant Biochem Biotechnol, 2023, 32(2): 284-295.
- [20] YU H, CHEN Y H, CHENG Z, et al. Anti-inflammatory oleanane-type triterpenoids produced by *Nonomurea* sp. MYH522 through microbial transformation[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(8): 3777-3789.
- [21] QIN L, MA D S, LIN G Y, et al. Low temperature promotes the production and efflux of terpenoids in yeast[J]. Bioresour Technol, 2024, 395: 130376.
- [22] LIU Y, ZHOU J, LIU P, et al. Gene identification and semisynthesis of the anti-inflammatory oleanane-type triterpenoid wilforlide A[J]. New Phytol, 2024, 241(4): 1720-1731.
- [23] YU H, ZHOU J, ZHANG J, et al. Functional identification of HhUGT74AG11: A key glycosyltransferase involved in biosynthesis of oleanane-type saponins in *Hedera helix*[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(7): 4067.
- [24] YU X C, YU J H, LIU S Z, et al. Transcriptome-wide identification and integrated analysis of a UGT gene involved in ginsenoside ro biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. Plants, 2024, 13(5): 604.
- [25] MIZUTANI M. Impacts of diversification of cytochrome P450 on plant metabolism[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(6): 824-832.
- [26] NELSON D, WERCK-REICHHART D. A P450-centric view of plant evolution[J]. Plant J, 2011, 66(1): 194-211.
- [27] SEKI H, TAMURA K, MURANAKA T. P450s and UGTs: Key players in the structural diversity of triterpenoid saponins[J]. Plant Cell Physiol, 2015, 56(8): 1463-1471.
- [28] GEISLER K, HUGHES R K, SAINSBURY F, et al.

- Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of anti-microbial triterpenes in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013,110(35):E3360–E3367.
- [29] SUZUKI H, FUKUSHIMA E O, SHIMIZU Y, et al. Lotus japonicus triterpenoid profile and characterization of the CYP716A51 and LjCYP93E1 genes involved in their biosynthesis in planta[J]. *Plant Cell Physiol*, 2019, 60(11):2496–2509.
- [30] MOSES T, THEVELEIN J M, GOOSSENS A, et al. Comparative analysis of CYP93E proteins for improved microbial synthesis of plant triterpenoids[J]. *Phytochemistry*, 2014, 108:47–56.
- [31] LIU Q, KHAKIMOV B, CRDENAS P D, et al. The cytochrome P450 CYP72A552 is key to production of hederagenin-based saponins that mediate plant defense against herbivores[J]. *New Phytol*, 2019, 222(3):1599–1609.
- [32] 王婷.细胞色素P450 CYP72A154的半理性改造及在甘草次酸酵母合成中的应用研究[D].石河子:石河子大学, 2019.
- [33] SEKI H, SAWAI S, OHYAMA K, et al. Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(11):4112–4123.
- [34] KIM O T, UM Y, JIN M L, et al. A novel multi-functional C-23 oxidase, CYP714E19, is involved in asiaticoside biosynthesis[J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(6):1200–1213.
- [35] DAI Z B, LIU Y, SUN Z T, et al. Identification of a novel cytochrome P450 enzyme that catalyzes the C-2 α hydroxylation of pentacyclic triterpenoids and its application in yeast cell factories[J]. *Metab Eng*, 2019, 51:70–78.
- [36] HAN J Y, CHUN J H, OH S A, et al. Transcriptomic analysis of *Kalopanax septemlobus* and characterization of KsBAS, CYP716A94 and CYP72A397 genes involved in hederagenin saponin biosynthesis[J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(2):319–330.
- [37] TZIN V, SNYDER J H, YANG D S, et al. Integrated metabolomics identifies CYP72A67 and CYP72A68 oxidases in the biosynthesis of *Medicago truncatula* oleanate sapogenins[J]. *Metabolomics*, 2019, 15(6):85.
- [38] 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.
- [39] FUKUSHIMA E O, SEKI H, SAWAI S, et al. Combinatorial biosynthesis of legume natural and rare triterpenoids in engineered yeast[J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(5):740–749.
- [40] TAMURA K, SEKI H, SUZUKI H, et al. CYP716A179 functions as a triterpene C-28 oxidase in tissue-cultured stolons of *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(3):437–445.
- [41] SUZUKI H, FUKUSHIMA E O, UMEMOTO N, et al. Comparative analysis of CYP716A subfamily enzymes for the heterologous production of C-28 oxidized triterpenoids in transgenic yeast[J]. *Plant Biotechnol*, 2018, 35(2):131–139.
- [42] TAMURA K, TERANISHI Y, UEDA S, et al. Cytochrome P450 monooxygenase CYP716A141 is a unique β -amyrin C-16 β oxidase involved in triterpenoid saponin biosynthesis in *Platycodon grandiflorus*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(5):874–884.
- [43] NAKAMURA M, LINH T M, LIEN L Q, et al. Transcriptome sequencing and identification of cytochrome P450 monooxygenases involved in the biosynthesis of maslinic acid and corosolic acid in *Avicennia marina*[J]. *Plant Biotechnol*, 2018, 35(4):341–348.
- [44] MIETTINEN K, POLLIER J, BUYST D, et al. The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14153.
- [45] MOSES T, POLLIER J, ALMAGRO L, et al. Combinatorial biosynthesis of sapogenins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 α hydroxylase from *Bupleurum falcatum*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4):1634–1639.
- [46] CARELLI M, BIAZZI E, PANARA F, et al. *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(8):3070–3081.
- [47] FUKUSHIMA E O, SEKI H, OHYAMA K, et al. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis[J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12):2050–2061.
- [48] JO H J, HAN J Y, HWANG H S, et al. β -Amyrin synthase (EsBAS) and β -amyrin 28-oxidase (CYP716A244) in oleanane-type triterpene saponin biosynthesis in *Eleutherococcus senticosus*[J]. *Phytochemistry*, 2017, 135:53–63.
- [49] ZHANG F S, WANG Q Y, PU Y J, et al. PtOAS and its applications: CN, 109234291A[P]. 2019-01-18.
- [50] ZHAN C S, AHMED S, HU S, et al. Cytochrome P450 CYP716A254 catalyzes the formation of oleanolic acid from β -amyrin during oleanane-type triterpenoid saponins biosynthesis in *Anemone flaccida*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1):1271–1277.
- [51] SANDEEP, MISRA R C, CHANOTIYA C S, et al. Oxidosqualene cyclase and CYP716 enzymes contribute to triterpene structural diversity in the medicinal tree *Banaba*[J]. *New Phytol*, 2019, 222(1):408–424.
- [52] YASUMOTO S, SEKI H, SHIMIZU Y, et al. Functional characterization of CYP716 family P450 enzymes in

- triterpenoid biosynthesis in tomato[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8:21.
- [53] 陈勤,雷君,刘迪秋,等.人参属三萜皂苷骨架修饰的研究进展[J]. *中药材*, 2020, 43(11):2831-2837.
- [54] HAN J Y, KIM M J, BAN Y W, et al. The involvement of β -amyrin 28-oxidase (CYP716A52v2) in oleanane-type ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(12):2034-2046.
- [55] FIALLOS-JURADO J, POLLIER J, MOSES T, et al. Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in *Chenopodium quinoa* leaves[J]. *Plant Sci*, 2016, 250:188-197.
- [56] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37):14204-14209.
- [57] MOSES T, POLLIER J, FAIZAL A, et al. Unraveling the triterpenoid saponin biosynthesis of the African shrub *Maesa lanceolata*[J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1):122-135.
- [58] 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]. *Plant Cell*, 2015, 27(1):286-301.
- [59] WAN L, HUANG Q, LI C, et al. Integrated metabolome and transcriptome analysis identifies candidate genes involved in triterpenoid saponin biosynthesis in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urban[J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14:1295186.
- [60] YANG L Y, GU Y Y, ZHOU J Q, et al. Whole-genome identification and analysis of multiple gene families reveal candidate genes for theasaponin biosynthesis in *Camellia oleifera*[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12):6393.
- [61] HUANG Y Y, AN W L, YANG Z R, et al. Metabolic stimulation-elicited transcriptional responses and biosynthesis of acylated triterpenoids precursors in the medicinal plant *Helicteres angustifolia*[J]. *BMC Plant Biol*, 2022, 22(1):86.
- [62] REHMAN H M, NAWAZ M A, SHAH Z H, et al. Functional characterization of naturally occurring wild soybean mutant (sg-5) lacking astringent saponins using whole genome sequencing approach[J]. *Plant Sci*, 2018, 267:148-156.
- [63] 赵伟.远志CYP714E38(C-23)在酿酒酵母和CYP716A249(C-28)在拟南芥中的功能研究[D].太原:山西大学, 2023.
- [64] 李清清,刘志斋,张洁,等.中药药用活性成分的生物合成研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(11):3603-3608.
- [65] 李寅.合成生物制造2022[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(3):807-841.

(收稿日期:2024-07-31 编辑:罗英姣)

(上接第84页) 2018, 37(7):570-572.

- [7] 于天源.按摩推拿学[M].北京:中国中医药出版社, 2015: 77-79, 92-93.
- [8] 李拓,赵峻嘹,李晶磊,等.推拿擦法规范化文献研究:基于古籍、教材及现代临床文献对擦法的规范化研究[J]. *中医药导报*, 2022, 28(9):133-136.
- [9] 吕立江.推拿功法学[M].3版.北京:中国中医药出版社, 2021:109.
- [10] 徐国栋,袁琼嘉.运动解剖学[M].5版.北京:人民体育出版社, 2012.
- [11] 夏昀凡,范丽娟,奚若凡,等.推拿功法少林内功训练的能量代谢探讨[J]. *按摩与康复医学*, 2019, 10(11):62-64.
- [12] 周甜甜.不同稳定条件下俯卧撑上肢肌群激活程度比较[D].成都:四川师范大学, 2021.
- [13] 全国针灸标准化技术委员会.经穴名称与定位:GB/T 12346—2021[S].北京:中国标准出版社, 2021.
- [14] 姚斌彬,付春雨,王红卫,等.基于人工智能技术的推拿手法数字化教学价值探讨[J]. *中医教育*, 2023, 42(5):93-96.
- [15] 付春雨,叶佳锋,姚斌彬.手法节奏变化在推拿治疗腰肌劳损中的临床价值分析[J]. *北京中医药*, 2023, 42(12):1379-1381.
- [16] 周运峰.推拿手法学[M].5版.北京:中国中医药出版社, 2021:195.
- [17] 安光辉,姚斐,赵毅.浅谈推拿手法热效应研究的现代意义[J]. *中国民族民间医药*, 2011, 20(24):38.
- [18] 解观有,李冰心,张琳.擦法产热效应的客观化研究[J]. *按摩与康复医学*, 2017, 8(23):9-10.
- [19] 孙武权,严隽陶,陈志伟,等.严隽陶教授对推拿功法研究的贡献[J]. *按摩与导引*, 2005, 21(12):2-3, 23.
- [20] 严晓慧.推拿手法实训教学整体用力训练方法初探[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2023, 21(12):16-19.
- [21] 杨飞.习练少林内功对推拿揉法的力学参数影响的研究[D].石家庄:河北中医学院, 2020.
- [22] 李武,蒋全睿,危威,等.“按之则热气至”理论的临床应用探析[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(2):83-85.
- [23] 蒋全睿.不同参数和方式按压心俞穴对局部温度影响的实验研究[D].长沙:湖南中医药大学, 2018.
- [24] 姚斐,安光辉,田健材,等.推拿功法少林内功对大学生甲皱微循环影响的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(11):5443-5445.
- [25] 魏振朴,王志强,窦思东,等.基于红外热像技术探讨推拿功法“少林内功”对阳虚质的效应[J]. *福建中医药*, 2021, 52(1):50-51.
- [26] 罗志瑜,姚卫,袁宝国.手法热效应机理的实验研究[C]//中华中医药学会.第四届全国推拿学术交流论文汇编, 1995.

(收稿日期:2024-06-15 编辑:罗英姣)