

蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物转化和生物合成研究进展

陈文杰^{1,2}, 胡耀廷^{1,2}, 王如锋^{1,2,3,4*}, 赵淑娟^{1,2,3,4*}, 王峥涛^{1,2,3,4}

1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203
2. 中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201203
3. 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203
4. 上海市中药复方重点实验室, 上海 201203

摘要: 蟾蜍二烯酸内酯类化合物是名贵中药蟾酥的主要活性成分, 具有显著的抗肿瘤、强心、镇痛和抗炎等药理活性。目前, 蟾蜍二烯酸内酯成分的主要来源方法是从蟾蜍类药材中直接提取, 但此方法成本高、收益低, 且药用资源十分短缺, 相关新药开发与应用研究严重受阻。近年来, 中药活性成分的生物合成在中药资源保护方面发挥起越来越重要的作用。基于合成生物学原理, 设计和改造微生物菌株发酵生产天然产物的方法已被广泛使用。该方法的应用需要建立在目标产物生物合成途径完全解析的基础之上。基于此, 总结近年来蟾蜍二烯酸内酯的生物转化以及生物合成途径解析方面的研究进展, 并进一步推测蟾蜍二烯酸内酯类的生物合成途径, 并进一步展望与其相关的生物合成发展方向。

关键词: 蟾酥; 蟾蜍二烯酸内酯类; 生物转化; 生物合成; 微生物转化

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)15-4741-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.033

Research progress on biotransformation and biosynthesis of bufadienolides

CHEN Wen-jie^{1,2}, HU Yao-ting^{1,2}, WANG Ru-feng^{1,2,3,4}, ZHAO Shu-juan^{1,2,3,4}, WANG Zheng-tao^{1,2,3,4}

1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
2. The SATCM Key Laboratory for New Resources & Quality Evaluation of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
3. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China
4. Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, Shanghai 201203, China

Abstract: Bufadienolides are the main active ingredients of traditional Chinese medicine (TCM) Chansu (*Bufonis Venenum*) that have significant pharmacological activities such as antitumor, cardiac, analgesic and anti-inflammatory. Until now, the acquisition of bufadienolides is still mainly extracted from toad medicinal materials. However, the cost of this method is high and the profit is quite low. Meanwhile, the medicinal resources of bufadienolides are deficient seriously. Hence, the associated drug development and usage was greatly limited. In recent years, researches on the synthetic biology of active ingredients of TCM have played an increasingly important role in protecting the resources of TCM. Based on the principles of synthetic biology, the method of designing and modifying microbial strains to produce natural products has been widely applied. Yet, the application of this method should be based on the elucidation of biosynthetic pathways of target compounds. This review summarized the recent research progresses on the biotransformation and biosynthesis of bufadienolides. Furthermore, the biosynthetic pathways of bufadienolides were speculated and related future directions for producing these compounds have been prospected as well.

Key words: *Bufonis Venenum*; bufadienolides; biotransformation; biosynthesis; microbial transformation

以蟾酥为代表的蟾蜍类药材是一类传统动物药^[1-5], 药用历史悠久, 市场需求量大。随着国内 外学者对蟾蜍类药材研究的深入, 发现其所含蟾蜍二烯酸内酯类成分在强心、抗肿瘤、镇痛、抗炎、

收稿日期: 2020-12-20

基金项目: 国家十三五“重大新药创制”科技专项(2017ZX09309006); 国家自然科学基金资助项目(81673540); 上海市自然科学基金资助项目(16ZR1434100)

作者简介: 陈文杰(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术。

*通信作者: 王如锋(1986—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为中药资源与品质评价。Tel: (021)51322495 E-mail: wrfrrw0801@163.com

赵淑娟(1971—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为天然产物合成生物学与代谢工程、药用植物次生代谢调控。

Tel: (021)51322576 E-mail: zhaoshujuan@126.com, zhaoshujuan@shutcm.edu.cn

抗病毒、抗辐射、镇咳、利尿、调节免疫等多方面具有显著的药理活性^[1,6-8], 临床上广泛应用于冠心病、心脏病等相关疾病的治疗^[1]。例如, 在麝香保心丸中, 臣药蟾酥在治疗心肌缺血引起的心绞痛、胸闷、心肌梗死以及冠心病中发挥了重要的作用^[9-12]。

目前, 蟾蜍二烯酸内酯类成分的获取主要从蟾酥等蟾蜍类药材中直接提取^[1,13], 该方法成本高、收益低。随着医药及研发需求的日益增长, 蟾蜍类药材的开发与应用, 需要充足的药用资源作为支撑, 仅仅依靠现有的天然蟾蜍资源, 必然会导致蟾蜍野生物种衰退甚至灭绝, 严重破坏生态环境平衡。通过人工规模化养殖蟾蜍, 不仅需要一定的生长周期, 而且还要面临产品纯化难、品种退化及重金属污染等诸多问题^[14-16]。一直以来, 国内外对蟾酥的研究主要集中在化学成分和药理作用^[1,17], 而解决其药用资源短缺难题的研究相对较少。近年来, 中药活性成分的生物合成在保护中药资源方面发挥起越来越重要的作用^[18]。基于合成生物学原理, 设计和改造微生物菌株生产天然产物的方法已被广泛认可, 该方法的应用需要建立在目标产物生物合成途径完全解析的基础之上^[19-22]。本文全面总结了蟾酥中主要蟾蜍二烯酸内酯类成分及其相互间的生物转化关系, 系统回顾了蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成途径解析进展及其生物转化应用, 并进

一步讨论了蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成的发展前景。

1 蟾蜍二烯酸内酯类成分结构分类

蟾蜍内酯类是珍稀中药蟾酥的主要活性成分, 为中华大蟾蜍 *Bufo gararizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的次生代谢产物。蟾蜍内酯类成分主要分为两类, 即蟾蜍二烯酸内酯类 (bufadienolides) 和 20,21-环氧蟾蜍内酯类^[1]。

在新鲜采集的蟾酥中, 蟾蜍二烯酸内酯类成分主要为蟾蜍毒素类化合物, 而蟾蜍毒素类化合物又分为蟾毒、蟾毒配基硫酸酯和蟾毒配基脂肪酸酯。而中药制剂和临床上使用的是加工炮制过后的蟾酥制品。鲜蟾酥经高温炮制后, 主要成分蟾蜍毒素类化合物会分解为蟾毒配基类化合物。蟾蜍二烯酸内酯类成分是一类甾体强心苷, 在 C-17 位与六元不饱和内酯环 (α -吡喃酮环) 相连。根据配体母核上的取代基的不同, 蟾蜍二烯酸内酯类成分按照其配基上母核取代基的不同分为 5 类, 分别为蟾毒灵类 (I)、脂蟾毒配基类 (II)、沙蟾毒精类 (III)、假蟾毒精类 (IV)、环氧酯蟾毒配基类 (V), 母核结构见图 1^[1,13,17]。蟾蜍二烯酸内酯类成分的结构特征是 A/B 环顺式结构、B/C 环反式结构和 C/D 环反式结构, 同时还具有诸如 3-OH、14 β -OH 或 14,15-环氧环的特征取代基团^[17]。

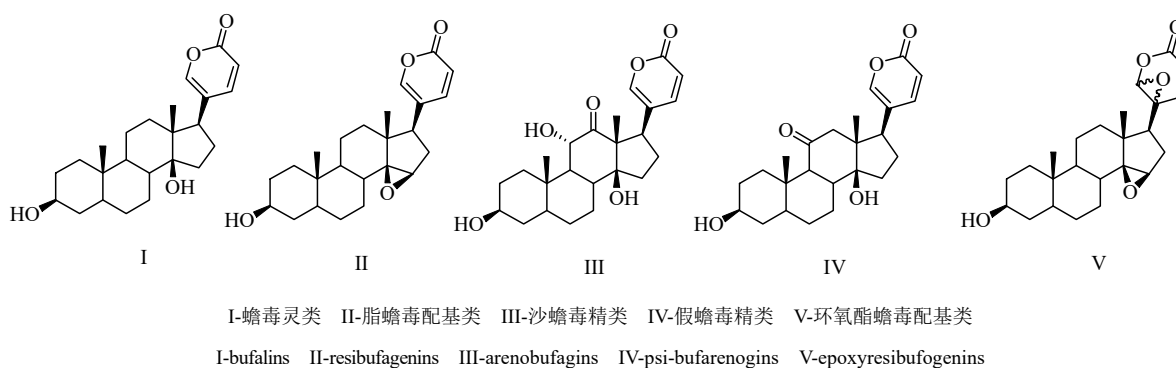


图 1 蟾蜍二烯酸内酯类成分的结构母核

Fig. 1 Skeletons of bufadienolides

目前, 已分离出 142 种蟾蜍内酯类化合物, 如蟾毒灵 (bufalin, 1)、酯蟾毒配基 (resibufagenin, 2)、华蟾毒精 (cinobufagin, 3)、华蟾毒它灵 (cinobufotalin, 4)、远华蟾毒精 (telocinobufagin, 5) 等。其中蟾毒灵、酯蟾毒配基和华蟾酥毒基作为蟾酥质量标准中含量测定的指标成分被收录于《中国药典》2020 年版。

2 蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物转化

蟾蜍二烯酸内酯类成分具有良好的强心、镇痛、抗肿瘤、消炎等药理活性^[23-24]。游离性蟾蜍二烯酸内酯类成分水溶性较差, 对人体具有一定毒性^[25]。因此, 许多研究者尝试通过生物转化改变蟾蜍二烯酸内酯类成分相关化学结构, 以寻找具有良好生理活性且毒性低的结构新颖的化合

物。生物转化 (biotransformation) 是利用生物体系 (细菌、真菌或植物组织等) 或酶为催化剂对外源性化合物进行结构修饰以实现化学转化的生物化学过程, 具有选择性强、反应条件温和、催化效率高、反应类型多、产物成分较为单一、易于分离纯化等优点, 往往可用于有机合成难以完成的化学反应, 易于得到结构新颖的化合物^[26]。本文总结了利用微生物及植物悬浮培养体系对蟾蜍二烯酸内酯类成分进行生物转化的研究进展, 生物转化产物见图 2。

于分离纯化等优点, 往往可用于有机合成难以完成的化学反应, 易于得到结构新颖的化合物^[26]。本文总结了利用微生物及植物悬浮培养体系对蟾蜍二烯酸内酯类成分进行生物转化的研究进展, 生物转化产物见图 2。

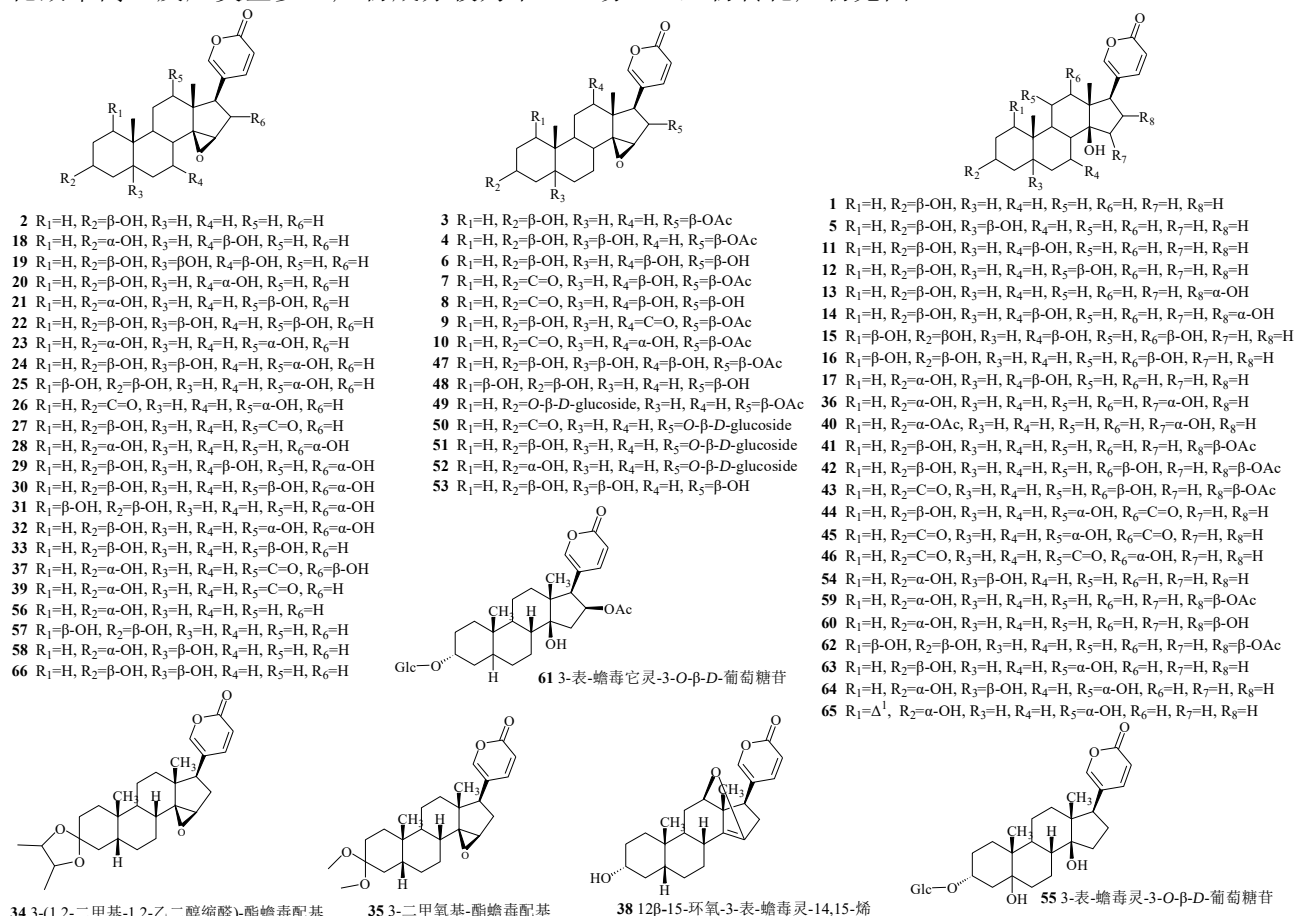


图 2 蟾蜍二烯酸内酯类成分生物转化反应的产物
Fig. 2 Biotransformation products of bufadienolides

2.1 微生物转化

叶敏等^[26-28]利用链格孢 *Alternaria alternata* AS 3.457 8 对华蟾毒精 (3) 进行生物转化实验, 分离并鉴定了 6 个转化产物, 其中 12β-羟基-去乙酰华蟾毒精 (12β-hydroxy-desacetylcinobufagin, 6)、3-氧代-12β-羟基-华蟾毒精 (3-oxo-12β-hydroxy-cinobufagin, 7)、3-氧代-12β-羟基-去乙酰华蟾毒精 (3-oxo-12β-hydroxy-desacetylcinobufagin, 8)、12-氧代-华蟾毒精 (12-oxo-cinobufagin, 9) 和 3-氧代-12α-羟基华蟾毒精 (3-oxo-12α-hydroxycinobufagin, 10) 为新化合物, 主要的生物转化反应为 12β-羟基化、3-OH 脱氢和 16-位脱乙酰基。该转化过程的动态考察结果显示, 华蟾毒精的转化顺序为华蟾毒精先全部转化为 12β-羟基-华蟾毒精, 然后发生了

3-OH 脱氢反应, 最后是 16-位脱乙酰基反应^[26]。铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* AS 1.860 对华蟾毒精 (3) 表现出特异性的 3-OH 脱氢作用^[26,29]。刺囊毛霉 *Mucor spinosus* AS 3.3450 对蟾毒灵 (1) 的生物转化反应, 分离并鉴定了 12 个产物, 其中 7β-羟基-蟾毒灵 (7β-hydroxy-bufalin, 11)、11β-羟基-蟾毒灵 (11β-hydroxybufalin, 12)、16α-羟基-蟾毒灵 (16α-hydroxy-bufalin, 13)、7β,16α-二羟基-蟾毒灵 (7β,16α-dihydroxy-bufalin, 14)、1β,7β-二羟基-蟾毒灵 (1β,7β-dihydroxy-bufalin, 15)、1β,12β-二羟基-蟾毒灵 (1β,12β-dihydroxy-bufalin, 16) 和 3-表-7β-羟基-蟾毒灵 (3-epi-7β-hydroxy-bufalin, 17) 为新化合物, 主要的生物转化反应为 7β-、12β- 和 16α-位羟基化^[26,30-31]。细胞毛霉 *Mucor subtilissimus* AS

3.2454 对酯蟾毒配基(2)的生物转化反应,分离并鉴定了 7 个转化产物,主要的转化反应是 1 β -、11 β -、12 β - 和 16 α -位羟基化,产物中包括了单羟基化、双羟基化和糖苷化化合物^[26]。丝状真菌 *Mucor polymorphosporus* 生物转化酯蟾毒配基(2)共获得 22 种产物,其中 3-表-7 β -羟基-酯蟾毒配基(3-*epi*-7 β -hydroxy-resibufogenin, 18)、5 β ,7 β -二羟基-酯蟾毒配基(5 β ,7 β -dihydroxy-resibufogenin, 19)、7 α -羟基-酯蟾毒配基(7 α -hydroxy-resibufogenin, 20)、3-表-12 β -羟基-酯蟾毒配基(3-*epi*-12 β -hydroxy-resibufogenin, 21)、5 β ,12 β -二羟基-酯蟾毒配基(5 β ,12 β -dihydroxy-resibufogenin, 22)、3-表-12 α -羟基-酯蟾毒配基(3-*epi*-12 α -hydroxy-resibufogenin, 23)、5 β ,12 α -二羟基-酯蟾毒配基(5 β ,12 α -dihydroxy-resibufogenin, 24)、1 β ,12 α -二羟基-酯蟾毒配基(1 β ,12 α -dihydroxy-resibufogenin, 25)、3-氧代-12 α -羟基-酯蟾毒配基(3-oxo-12 α -hydroxy-resibufogenin, 26)、12-氧代-酯蟾毒配基(12-oxo-resibufogenin, 27)、3-表-16 β -羟基-酯蟾毒配基(3-*epi*-16 β -hydroxy-resibufogenin, 28)、7 β ,16 α -二羟基-酯蟾毒配基(7 β ,16 α -dihydroxy-resibufogenin, 29)、12 β ,16 α -二羟基-酯蟾毒配基(12 β ,16 α -dihydroxy-resibufogenin, 30)、1 β ,16 α -二羟基-酯蟾毒配基(1 β ,16 α -dihydroxy-resibufogenin, 31)及 12 α ,16 α -二羟基-酯蟾毒配基(12 α ,16 α -dihydroxy-resibufogenin, 32)为新化合物^[32]。转化反应涉及 1 β -、C-5-、7 α -、7 β -、12 α -、12 β - 和 16 α -位的羟基化以及 3-OH 的差向异构化和脱氢化,其中 12 α -、12 β - 和 16 α -位的羟基化是主要生物转化反应^[32]。铜绿假单胞菌对酯蟾毒配基(2)和 12 β -羟基-酯蟾毒配基(12 β -hydroxy-resibufogenin, 33)表现出特异性的 3-OH 脱氢作用^[26,29]。*Fusarium solani* AS 3.1829 菌株对酯蟾毒配基(2)的生物转化反应,分离鉴定了 5 个转化产物,其中 3-(1,2-二甲氧基-1,2-乙二醇缩醛)-酯蟾毒配基[3-one-cyclic 3-(1,2-dimethyl-1,2-ethanediylacetal)-resibufogenin, 34]、3-二甲氧基-酯蟾毒配基(3-dimethoxyl-resibufogenin, 35)和 3-表-15 α -羟基-7 β H-蟾毒灵(3-*epi*-15 α -hydroxy-7 β H-bufalin, 36)为新化合物^[33]。*Curvularia lunata* AS 3.4381 对酯蟾毒配基(2)的生物转化反应,分离并鉴定了 4 个转化产物,其中 12-氧代-3-表-16 β -羟基-酯蟾毒配基(12-oxo-3-*epi*-16 β -hydroxy-resibufogenin, 37)和 12 β ,15-环氧-3-表-蟾毒灵-14,15-烯(12 β ,15-epoxy-3-*epi*-bufalin-14,15-

ene, 38)为新化合物,观察到在生物转化反应过程中存在异构化、羟基化和氧化反应^[34]。由 *Actinomucor elegans* AS 3.277 8 对酯蟾毒配基(2)进行生物转化反应,分离并鉴定了 5 种产物,反应中观察到了高度立体和区域特异性异构化、羟基化和酯化反应,产物中 3-表-12-氧代-羟基酯蟾毒配基(3-*epi*-12-oxo-hydroxy-resibufogenin, 39)和 3 α -乙酰氧基-15 α -羟基蟾毒灵(3 α -acetyloxy-15 α -hydroxy-bufalin, 40)未见报道^[35]。链格孢对蟾毒它灵(bufotalin, 41)的生物转化反应,分离并鉴定了 3 种转化产物,其中 12 β -羟基-蟾毒它灵(12 β -hydroxy-bufotalin, 42)和 3-氧代-12 β -羟基-蟾毒它灵(3-oxo-12 β -hydroxy-bufotalin, 43)为新化合物^[36]。链格孢对沙蟾毒精(arenobufagin, 44)转化得到 3 个转化产物,其中 3-氧代-沙蟾毒精(3-oxo-arenobufagin, 45)、3-氧代-异沙蟾毒精(3-oxo-bufarenagin, 46)为新化合物^[37]。链格孢对华蟾毒它灵(4)的生物转化反应得到了 4 个转化产物,其中 12 β -羟基-华蟾毒它灵(12 β -hydroxy-cinobufotalin, 47)新化合物^[37]。革兰阳性菌芽孢杆菌 *Bacillus* sp. CMB-TD29 能特异性羟基化南美蟾毒精(marinobufagenin, 66),生物转化反应产生了 11 α -、12 β -、17- α 3 种新的羟基化衍生物^[38]。

2.2 植物悬浮培养细胞生物转化

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. 细胞培养体系对华蟾毒精(3)的生物转化反应获得了 8 个转化产物,其中 5 个为新化合物,分别为 1 β -羟基-去乙酰华蟾毒精(1 β -hydroxy-desacetylcinobufagin, 48)、华蟾毒精 3-O- β -D-葡萄糖苷(cinobufagin-3-O- β -D-glucoside, 49)、3-氧代-去乙酰华蟾毒精-16-O- β -D-葡萄糖苷(3-oxo-desacetylcinobufagin-16-O- β -D-glucoside, 50)、去乙酰华蟾毒精-16-O- β -D-葡萄糖苷(desacetyl-cinobufagin-16-O- β -D-glucoside, 51)和 3-表-去乙酰华蟾毒精-16-O- β -D-葡萄糖苷(3-*epi*-hydroxy-desacetylcinobufagin-16-O- β -D-glucoside, 52)^[26,39-40]。长春花细胞培养体系能使华蟾毒精(3)的 3-OH 和 16-OH 发生糖基化反应,证明长春花细胞培养体系能特异性糖苷化华蟾毒精,其他转化反应还包括 C-5-、C-1 β 位羟基化,3-OH 脱氢反应及 C-16 位脱乙酰基反应等^[26,39-40]。桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 细胞悬浮培养体系对华蟾毒精(3)的生物转化反应得到了 3 个产物,其中去乙酰华蟾毒它灵

(desacetylcinobufotalin, **53**) 为主产物^[26,39]。长春花和桔梗体系对华蟾毒精(**3**)的生物转化具有一定的相似性,转化反应以 C-5 位羟基化和 C-16 位脱乙酰基为主^[26,39-40]。桔梗悬浮培养体系对蟾毒灵(**1**)的生物转化反应得到 2 个产物,分别为 3-表-远华蟾毒精(3-*epi*-telocinobufagin, **54**)和 3-表-蟾蜍灵-3-O- β -D-葡萄糖苷(3-*epi*-bufalin-3-O- β -D-glucoside, **55**)^[41]。银杏 *Ginkgo biloba* L. 叶细胞悬浮培养体系生物转化酯蟾毒配基(**2**),转化产物为 3-表-酯蟾毒配基(3-*epi*-resibufogenin, **56**)^[42]。李莉欣^[43]研究结果显示,桔梗悬浮培养体系对酯蟾毒配基(**2**)的生物转化反应得到了 4 个产物,其中 1 β -羟基-酯蟾毒配基(1 β -hydroxy-resibufogenin, **57**)和 3-表-南美蟾毒精(3-*epi*-marinobufagenin, **58**)为新化合物。雪莲 *Saussurea involucre* (Kar. et Kir.) Sch. -Bip. 悬浮细胞对蟾毒它灵(**41**)有较好的生物转化能力,从中分离并鉴定了 5 个转化产物,其中 3-表-蟾毒它灵(3-*epi*-bufotalin, **59**)、3-表-去乙酰蟾毒它灵(3-*epi*-desacetylbufotalin, **60**)、3-表-蟾毒它灵-3-O- β -D-葡萄糖苷(3-*epi*-bufotalin-3-O- β -D-glucoside, **61**)和 1 β -羟基蟾毒它灵(1 β -hydroxy-bufotalin, **62**)为新化合物^[37]。雪莲悬浮细胞体系对远华蟾毒精(**5**)的生物转化反应,分离并鉴定了 4 个转化产物,但是转化率较低,可能远华蟾毒精水溶性较差以致反应不完全^[37]。雪莲悬浮细胞对日蟾毒它灵(gamabufotalin, **63**)的生物转化反应,分离并鉴定了 4 个转化产物,其中 3-表-日蟾毒它灵(3-*epi*-gamabufotalin, **64**)和 3-氧代- Δ^1 -日蟾毒它灵(3-oxo- Δ^1 -gamabufotalin, **65**)为新化合物^[37]。

3 蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成

3.1 蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成途径解析进展

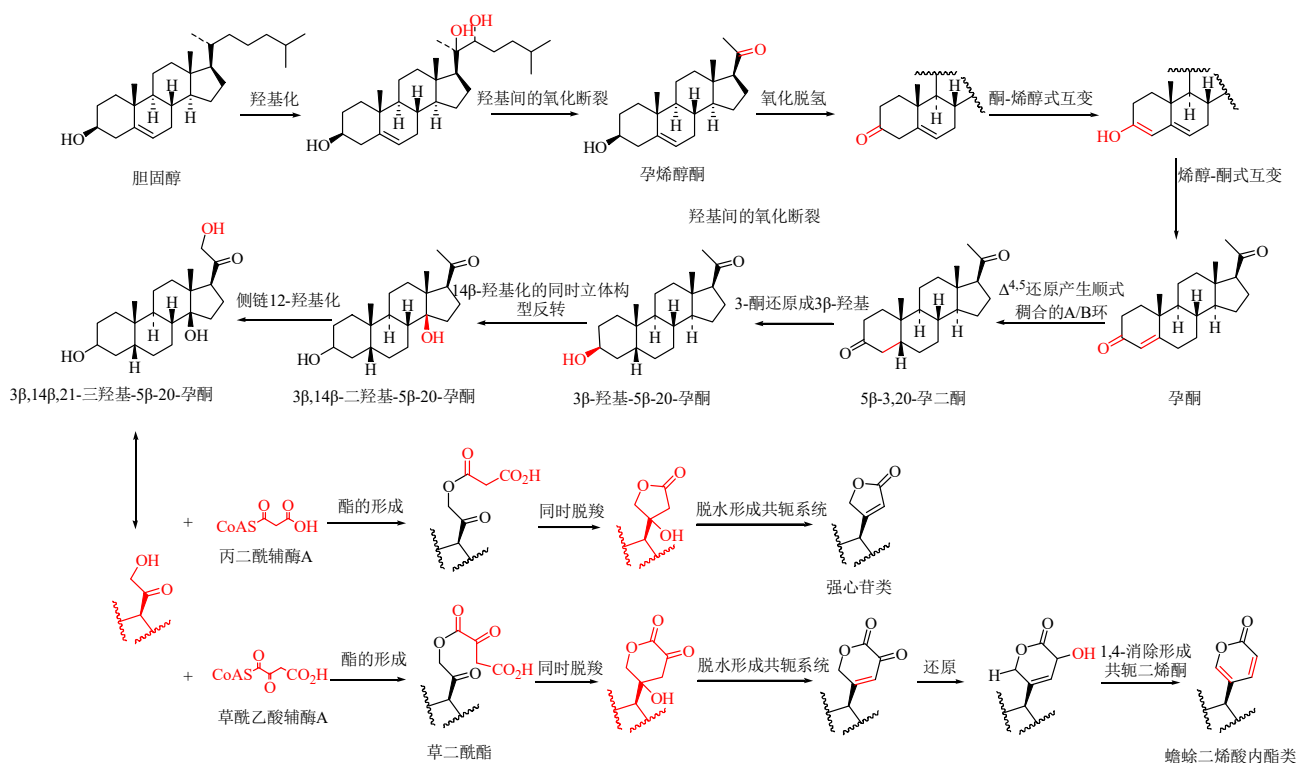
蟾蜍二烯酸内酯类成分为乙型强心苷,强心甙类成分为甲型强心苷,它们的区别为强心苷元 C-17 位上的不饱和内酯环。蟾蜍二烯酸内酯类成分为六元不饱和内酯环,强心甙类成分为五元不饱和内酯环。蟾蜍二烯酸内酯类化合物在植物和动物体内均有,动物中主要存在于蟾蜍毒腺内。植物体内的蟾蜍二烯酸内酯类化合物生物合成途径与蟾蜍体内的并不一致,前者更接近与强心甙的生物合成途径。与蟾蜍二烯酸内酯类不同,强心甙类成分大多存在于植物体内,如洋地黄类植物。

在洋地黄植物中,强心甙类成分的生物合成途

径: 甲羟戊酸 $\rightarrow$ 胆固醇 $\rightarrow$ 孕烯醇酮 $\rightarrow$ 孕酮 $\rightarrow$ 强心甙类^[44-48](图 3)。可以为动植物中蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成途径解析提供一些借鉴。类似的,胆固醇也是植物来源蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成前体^[49]。后续其反应过程大致如下:首先是胆固醇的侧链发生断裂,依次在 C-22 位和 C-20 位发生羟基化反应,随后 C-20/22 键断裂生成孕烯醇酮,孕烯醇酮氧化生成孕酮,孕酮还原得到 3 β -羟基-5 β -20-孕酮,最后发生 14 β -羟基化反应^[50-52]。对于六元不饱和内酯环的形成过程,首先侧链 C-21 位发生羟基化反应,形成草二酯中间体,通过如图 3 所示的羟醛加成过程和脱羧反应,生成含有六元不饱和内酯环的蟾蜍二烯酸内酯类成分^[50-52]。

在蟾蜍中, Siperstein 等^[53]利用同位素示踪法揭示 marinobufotxin 和南美蟾毒精的生物合成前体为胆固醇。胆固醇在动物中被代谢成孕烯醇酮和羟基胆汁酸盐,这可能是蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成的重要中间体。Chen 等^[54]通过给予蟾蜍 ^{14}C 或氘标记的类固醇,发现 5 α -和 3 β ,5 β -羟基胆酸衍生物是比胆固醇更有效的前体;但是给予标记的孕烯醇酮时不能检测到放射性。这与已报道的植物中强心甙类生物合成前体是孕烯醇酮的结果正好相反^[54]。

为了找到动植物来源蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成途径之间的相关性,Porto 等^[49]同时给蟾蜍和红海葱 *Scilla maritima* (L.) Stearn 接种孕烯醇酮-20- ^{14}C , 结果发现孕烯醇酮是 scilliroside 的良好前体,但是它没有被合成到南美蟾毒精。该实验表明 Chen 等^[54]实验结果可能是正确的,即在蟾蜍体内,胆固醇被代谢为孕烯醇酮的情况下,后者不能用来合成蟾蜍二烯酸内酯类成分。进一步,Porto 等^[55]和 Dmitrieva 等^[56]研究结果证实了蟾蜍二烯酸内酯类的生物合成不依赖于胆固醇侧链的切割。胆固醇可能先转化为胆汁酸盐中间体,后者可以通过其他步骤转化为蟾蜍二烯酸内酯类成分。从蟾蜍毒液中分离出来的 7 α -羟基胆固醇和 7 β -羟基胆固醇(胆汁酸生物合成中的关键中间体)将支持这一假设^[49]。另外, Fedorova 等^[57-58]发现哺乳动物的 marinobufagenin 是由胆固醇通过新型酸性胆汁酸途径合成的,而 marinobufagenin 与南美蟾毒精具有相似的化学结构。在新型酸性胆汁酸途径中,胆固醇侧链的切割由细胞色素 P450 (CYP) 27A1 酶启动,该酶在肝外组织中表达,包括肾上腺^[58-62]。因此,蟾蜍可能通过

图3 蟾蜍二烯酸内酯类成分的下游生物合成途径 (植物)^[50-52]Fig. 3 Downstream biosynthetic pathways of bufadienolides (plant)^[50-52]

一种类似于哺乳动物中 marinobufagenin 的肝外酸性胆汁酸途径合成蟾蜍二烯酸内酯类成分。

孕烯醇酮在强心甙类及其相关化合物的生物合成中起着非常重要的作用^[49]。Garraffo 等^[63]研究结果显示,具有完整的胆固醇型侧链的胆固醇及其类固醇能够穿透到蟾蜍二烯内酯类成分生物合成的位点并且通过未知机制转化为蟾蜍二烯酸内酯类成分。孕烯醇酮在蟾蜍中作为蟾蜍二烯内酯类成分前体的失败原因可能是由于其不能渗透到蟾蜍二烯内酯类成分的生物合成位点^[63]。Santa Coloma 等^[64]将乙酸钠-1-¹⁴C 和甲羟戊酸-5-³H 接种到蟾蜍的耳后腺和肝脏,发现肝脏产生的胆固醇中含有这样 2 种标记,而耳后腺产生的胆固醇不含任何标记。推测蟾蜍中用于合成的胆固醇前体主要在肝脏或肠道产生,并通过转运蛋白转移到皮肤腺和耳后腺从而发挥前体的作用。

3.2 蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成途径总结与推测

如图 4 所示,推测蟾蜍中蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成可能分为 3 个阶段。第 1 阶段是类异戊二烯前体和胆固醇中间体的形成。无论是在植物

中还是在蟾蜍中,蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成起点都是类异戊二烯前体^[56]。类异戊二烯前体经过甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP/DOXP) 途径生成异戊焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallylpyrophosphate, DMAPP)^[65]。IPP 和 DMAPP 经过一系列酶的作用下,生成香叶草基焦磷酸 (geranyl pyrophosphate, GPP) 和焦磷酸法尼酯 (farnesyl pyrophosphate, FPP)^[65]。两分子 FPP 在鲨烯合酶 (squalene synthase, SQS) 的作用下合成角鲨烯 (squalene)。角鲨烯为甾体化合物的前体。下一步,角鲨烯在鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SQE) 的作用下,生成中间体 2,3-氧化角鲨烯 (2,3-oxidosqualene)^[65]。该中间体可启动角鲨烯的环化反应,即在 2,3-氧化角鲨烯在羊毛甾醇合酶 (lanosterol synthase, LS) 的作用下环化成羊毛甾醇 (lanosterol),其主要作用是合成甾体骨架^[65-66]。最后,羊毛甾醇经过一系列酶的作用下合成酵母甾醇 (zymosterol) 和胆固醇^[65]。

蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成第 2 阶段涉

及胆固醇甾体母核 A/B 环的脱氢异构化、母核 14 β -OH 或 14,15-环氧化以及胆固醇侧链的修饰环合。对于这一阶段的反应机制、反应顺序以及相关酶基因的研究报道很少(图3)。第2阶段中,蟾蜍二烯酸内酯类成分的母核 A/B 环发生一系列氧化、脱氢、异构化和还原过程,并且 3-羟基-5-烯结构转化为 3-羟基-5- β H 结构形成顺式配置的 A/B 环^[67]。3 β -HSD 属于短链脱氢酶/还原酶超家族^[68]。其催化甾体的 Δ^5 -3-羟基构型氧化转化为 Δ^4 -3-羰基构型。该转化反应是在 2 个独立的顺序反应中进行的,在需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)的第 1 个反应中,该酶催化 3 β -羟基类固醇脱氢为 3-氧代类固醇中间体;在第 2 个反应中,还原的辅酶(仍保持附着在酶上)激活还原反应,使 Δ^5 构型异构化为 Δ^4 构型^[67-68]。这些结果表明 3 β -HSD 可能在蟾蜍二烯酸内酯类成分 A/B 环顺式构型的形成中发挥重要作用。相关研究表明^[69-70], 3 β -HSD 可以催化胆固醇转化为 4-cholesten-3-one,

后者可以先后 7 α -羟基化为 4-cholesten-7 α -ol-3-one, 这是重要的胆汁酸生物合成中间体。而胆汁酸可能是蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成的最重要的中间体之一^[56,71]。Xu 等^[67]从中华大蟾蜍中克隆了一个 Bbg-3 β HSD 脱氢酶,发现其能氧化孕烯醇酮和脱氢表雄酮,但却对胆固醇和谷固醇没有脱氢活性;原因可能是 Bbg-3 β HSD 脱氢酶的催化口袋无法容纳 C₂₇类固醇的长侧链。3 β -HSD7 脱氢酶对具有 Δ^5 -双键的 3 β ,7 β -二羟基-C₂₇-类固醇具有高度特异性^[72-73]。所以,胆固醇可能先经过 CYP27A1 启动的酸性胆汁酸途径形成 27-羟基胆固醇和 3 β -羟基-5-胆甾烯酸酯,然后胆汁酸盐被 3 β -HSD7 催化形成顺式配置的 A/B 环^[71]。

蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成的第 3 阶段是相关基因家族对母核上多种取代基的修饰(图4)。这也是蟾蜍二烯酸内酯类成分化学结构多样性的原因。由于绝大多数的蟾蜍二烯酸内酯类成分母核结构为蟾毒灵类(I)和酯蟾毒配基类(II)。所以本文

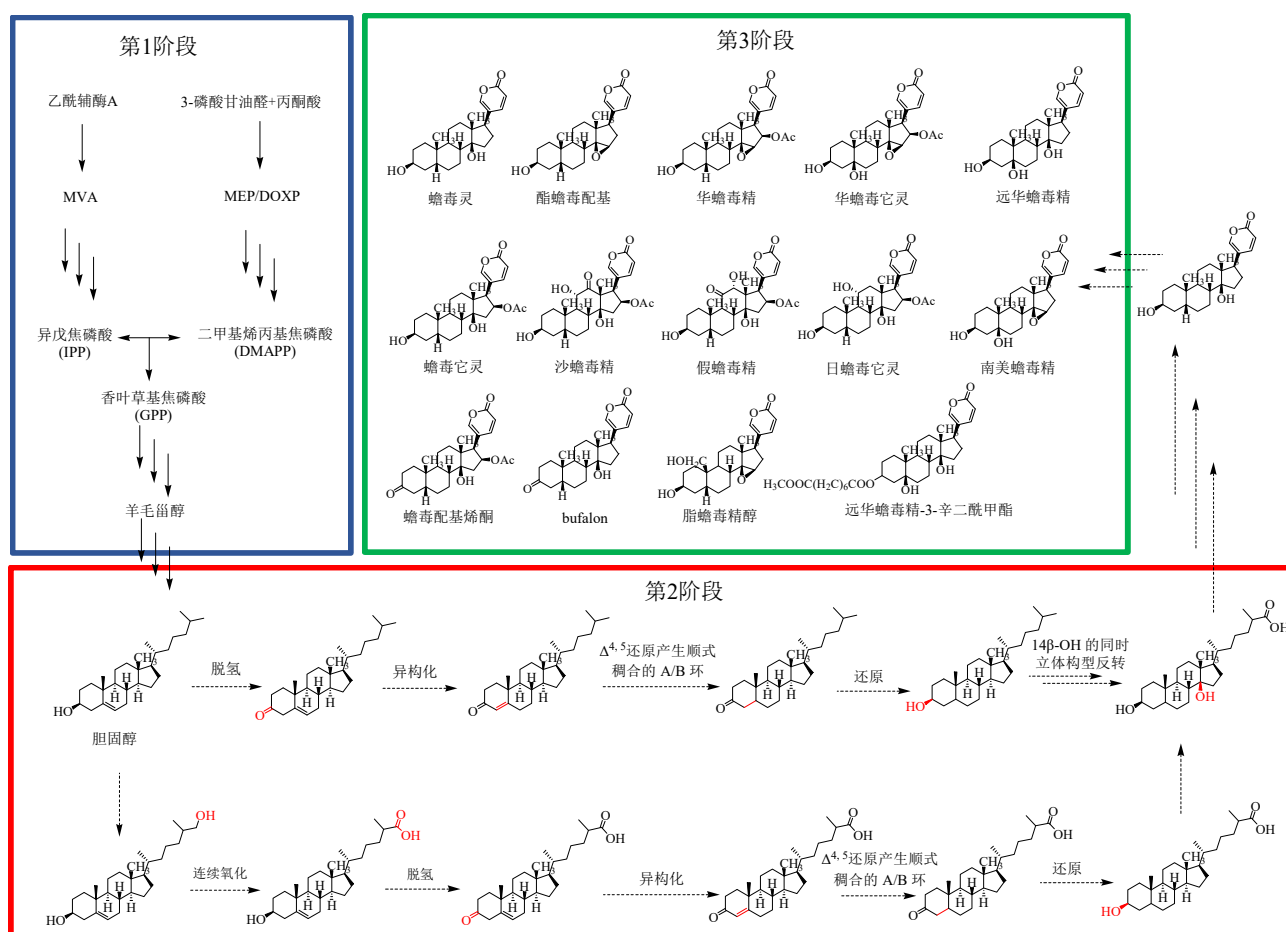


图4 蟾蜍二烯酸内酯类成分可能的生物合成途径(蟾蜍)

Fig. 4 Possible biosynthetic pathways of bufadienolides (*B. gararizans*)

总结了这2类母核结构的蟾蜍二烯酸内酯类成分,并根据母核上取代基的类型、数量和位置,推断它们相互间结构的生物转化关系和绘制了可能转化路线图(图5)。总结发现,蟾蜍二烯酸内酯类成分化学结构差异的原因主要是取代基的类型、数量、位置和立体异构。蟾蜍二烯酸内酯类成分的甾体母核上具有多种取代基,如羟基、环氧基、乙酰基、糖基、酮基等。因此,参与蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成有关的基因家族可能包括CYP450s、糖基转移酶^[74](glycosyltransferases, UGTs)、酰基转移酶(acyltransferases, ATs)和脱氢酶(dehydrogenases,

DHs)等。涉及的羟基化反应主要位于C-1 β 、3 β 、5 β 、11 α 、12 α / β 、14 β 、16 β 和19位;乙酰化和糖基化反应主要位于C-3 β 、16 β 位;氧化反应主要位于在C-3、11、12和19位。

5 β -OH、14 β -OH和14,15-环氧化的先后顺序:首先,14 β -OH和14,15-环氧化是蟾蜍二烯酸内酯类成分的特征基团,目前从自然界分离并鉴定的蟾蜍二烯酸内酯类成分都含有14 β -OH或者14,15-环氧化。其次,由于在C-5没有羟基的蟾蜍二烯酸内酯类已经存在,所以14 β -OH或14,15-环氧化应该在5 β -OH之前^[54]。而对于蟾蜍二烯内酯类成分中 α -

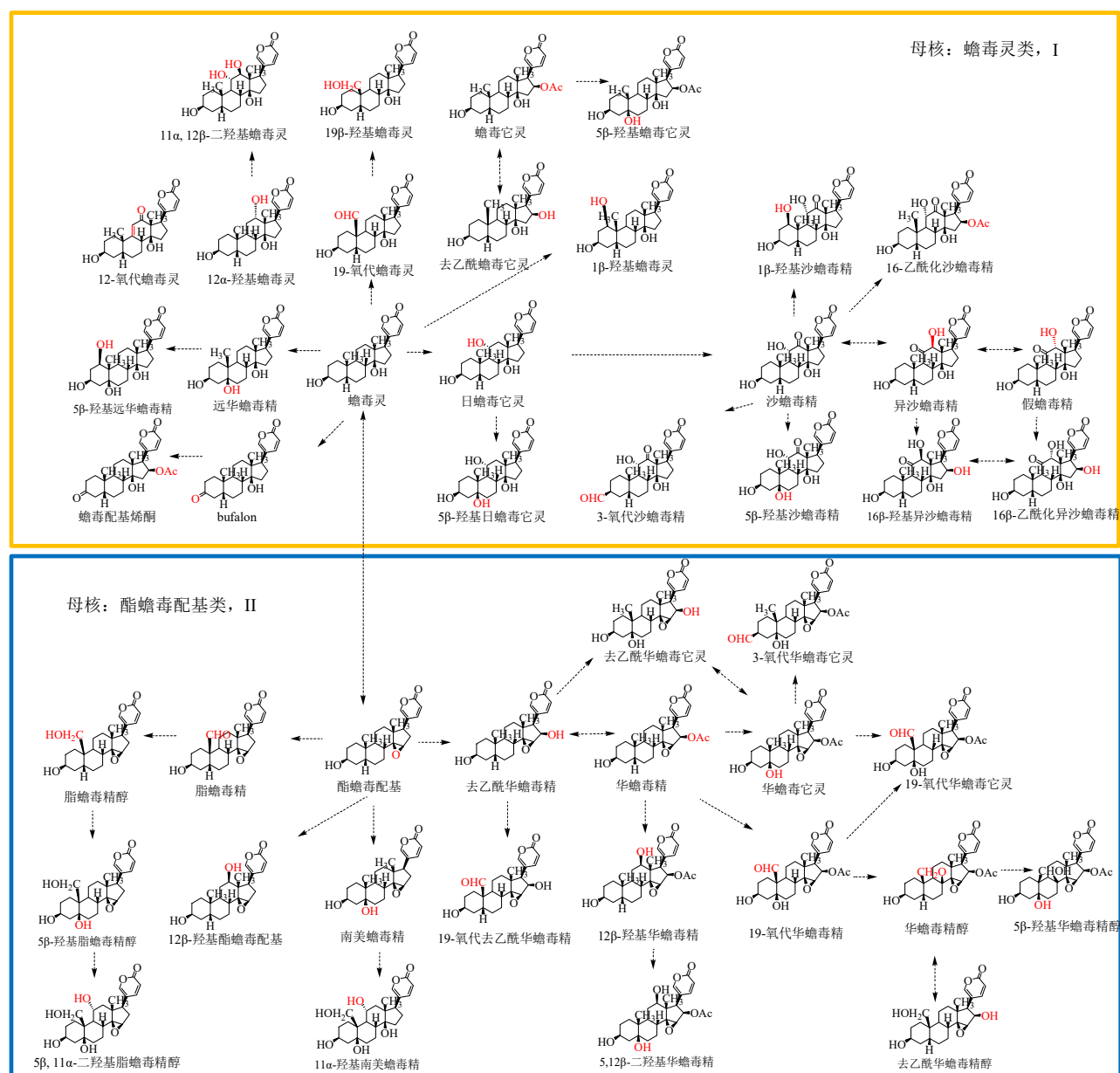


图5 蟾蜍二烯内酯类成分的生物转化路线图

Fig. 5 Roadmap of bufadienolides biotransformation

吡喃酮环的生物合成, Porto 等^[75]结果显示, 蟾蜍中蟾蜍二烯酸内酯类成分的 α -吡喃酮环可能直接来源于胆固醇的侧链。另外, 内酯环应该是在内核氧化之后产生的^[54]。最后, Chen 等^[54]讨论了不同蟾蜍二烯酸内酯类成分之间生物合成的可能顺序, 其推测酯蟾毒配基首先通过还原为蟾毒灵或进一步羟基化成为南美蟾毒精, 接着通过相似的还原或羟基化反应, 南美蟾毒精和蟾毒灵分别被代谢为远华蟾毒精。

4 总结与展望

目前, 蟾酥药用资源需求量与日俱增, 使得蟾蜍二烯酸内酯类成分成为研究热点。除了人工养殖蟾蜍以外, 获取蟾蜍二烯酸内酯类成分的途径还包括生物转化和生物合成等。生物转化在获取天然蟾蜍类药材中不存在的蟾蜍二烯酸内酯类成分方面具有较为突出的优势。基于合成生物学原理, 设计和改造微生物菌株来发酵生产天然产物, 是一种极具潜力的稀有天然活性成分获取办法。迄今为止, 蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成途径的解析已获得较大的进展。本文总结蟾蜍体内可能的蟾蜍二烯酸内酯类成分生物合成途径。推测蟾蜍中蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成可能分为 3 个阶段, 首先是类异戊二烯前体和胆固醇中间体的形成; 然后是胆固醇或胆汁酸盐甾体母核 A/B 环的脱氢异构化、母核 14 β -OH 或 14,15-环氧化以及胆固醇侧链修饰环合; 最后是蟾蜍二烯酸内酯类母核上取代基的修饰, 其涉及的基因家族可能包括 CYP450s、UGTs、ATs 等。现阶段, 蟾蜍二烯酸内酯类生物合成第 2、3 阶段的反应机制、反应顺序以及相关酶基因发现的研究报道很少。随着高通量测序及组学技术发展, 未来应该多学科联系攻关以推进蟾蜍二烯酸内酯类成分的合成生物学发展, 革新传统的生产方式, 使蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物合成成为蟾酥药用资源可持续利用的重要途径之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2579-2588.
- [2] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳, 等. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3185-3189.
- [3] 岳素荣, 贺吉香. 蟾酥研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(11): 222-224.
- [4] 赵强, 孟凡静, 刘安西. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药,

- 2004, 35(10): 附 4-附 7.
- [5] 高艳荣, 张莉, 张磊. 蟾酥及其有效成分的药理作用及机制研究进展 [J]. 武警医学院学报, 2003, 12(5): 406-408.
- [6] 刘俊珊, 张冬梅, 栗原博, 等. 蟾酥及其活性成分抗肿瘤作用研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(2): 115-120.
- [7] 巩丽丽, 李景香, 张会敏. 蟾酥药理作用及制剂工艺的研究进展 [J]. 食品与药品, 2007, 9(10): 51-53.
- [8] 辛秀兰, 张宝璟, 苏东海, 等. 中药蟾酥的药理作用研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(3): 588-590.
- [9] 汪姗姗, 李勇, 范维琥, 等. 麝香保心丸对实验性心肌梗塞大鼠心脏的促血管生成作用 [J]. 中成药, 2002, 24(6): 446-449.
- [10] 王受益, 戴瑞鸿, 金椿, 等. 麝香保心丸治疗冠心病心绞痛的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(12): 717-720.
- [11] 罗心平, 施海明, 范维琥, 等. 麝香保心丸的基础与临床 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(9): 718-720.
- [12] 高叶梅. 麝香保心丸 [J]. 大众健康, 2009, (5): 112-112.
- [13] 孙崇峰, 范圣此, 罗毅, 等. 蟾酥化学成分及其人工合成的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3183-3192.
- [14] 周婧, 王洪兰, 马宏跃, 等. 四级杆串联质谱分析苄嘧磺隆污染蟾蜍耳后腺中蟾蜍甾烯水平 [J]. 分析化学, 2015, 43(9): 1415-1421.
- [15] 牛会霞, 周婧, 马宏跃, 等. 液质联用技术评估汞接触污染蟾蜍泌酥中蟾蜍甾烯水平 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 39-43.
- [16] 王佳佳, 周婧, 马宏跃, 等. 铅暴露对中华大蟾蜍耳后腺分泌蟾蜍甾烯的影响 [J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 212-218.
- [17] Wei W L, Hou J J, Wang X, et al. Venenum bufonis: An overview of its traditional use, natural product chemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 237: 215-235.
- [18] 何珣, 陈怡露. 合成生物学促进中药活性成分的生物合成 [J]. 生物产业技术, 2012(4): 13-19.
- [19] 曾庆平, 鲍飞. 青蒿素合成生物学及代谢工程研究进展 [J]. 科学通报, 2011, 56(27): 2289-2297.
- [20] 高伟, 胡添源, 郭娟, 等. 丹参酮合成生物学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2486-2491.
- [21] 匡雪君, 王彩霞, 邹丽秋, 等. 紫杉醇生物合成途径及合成生物学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4144-4149.
- [22] 邹丽秋, 王彩霞, 匡雪君, 等. 黄酮类化合物合成途径及合成生物学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4124-4128.
- [23] 秦姿凡, 王保和. 中药蟾酥的研究进展概况 [J]. 中国

- 药物评价, 2014, 31(5): 306-309.
- [24] 张英, 邱鹰昆, 刘珂, 等. 中华大蟾蜍的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1905-1908.
- [25] 孙志国, 高国峰, 周珩. 中药活性成分微生物转化技术研究进展 [J]. 黑龙江科技信息, 2013(25): 75.
- [26] 叶敏, 宁黎丽, 占纪勋, 等. 雷公藤内酯及蟾毒配基类化合物的生物转化研究进展 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2004, 36(1): 82-89.
- [27] Ye M, Guo D A. Substrate specificity for the 12 β -hydroxylation of bufadienolides by *Alternaria alternata* [J]. *J Biotechnol*, 2005, 117(3): 253-262.
- [28] Ye M, Guo D A. A new bufadienolide obtained from the biotransformation of cinobufagin by *Alternaria alternata* [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(1): 26-30.
- [29] Zhan J X, Liu W H, Guo H Z, et al. Selective dehydrogenation of resibufogenin and cinobufagin at 3-OH by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Enzym Microb Technol*, 2003, 33(1): 29-32.
- [30] Ye M, Qu G Q, Guo H Z, et al. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 91(1/2): 87-98.
- [31] 叶敏. 华蟾毒精和蟾毒灵的生物转化研究 [D]. 北京: 北京大学, 2003.
- [32] Ye M, Han J, An D G, et al. New cytotoxic bufadienolides from the biotransformation of resibufogenin by *Mucor polymorphosporus* [J]. *Tetrahedron*, 2005, 61(37): 8947-8955.
- [33] Xin X L, Su D H, Sa D, et al. Novel microbial transformation of resibufogenin by *Fusarium solani* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(9): 831-837.
- [34] Xin X L, Sun J H, Wang X B, et al. Microbial transformation of resibufogenin by *Curvularia lunata* AS 3.4381 [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(3): 290-295.
- [35] Mou L Y, Xin X L, Chen L, et al. Biotransformation of resibufogenin by *Actinomucor elegans* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(6): 623-628.
- [36] Xin X L, Zhan L B, Li F Y, et al. Microbial transformation of bufotalin by *Alternaria alternata* AS 3.4578 [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(1): 7-11.
- [37] 张星. 三类活性天然产物—蟾蜍甾烯、姜黄素、土荆皮乙酸类化合物的生物转化研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2011.
- [38] Kamalakkannan V, Salim A A, Capon R J. Microbiome-mediated biotransformation of cane toad bufagenins [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(7): 2012-2017.
- [39] Ye M, Ning L L, Zhan J X, et al. Biotransformation of cinobufagin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* and *Platycodon grandiflorum* [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 22(1/2): 89-95.
- [40] Ye M, Dai J G, Guo H Z, et al. Glucosylation of cinobufagin by cultured suspension cells of *Catharanthus roseus* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(47): 8535-8538.
- [41] Zhao J, Guan S H, Chen X B, et al. Two new compounds derived from bufalin [J]. *Chin Chem Lett*, 2007, 18(11): 1316-1318.
- [42] Xin X L, Xie X H. Selective 3-OH isomerization of resibufogenin by cell suspension cultures of *Ginkgo biloba* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2005, 14(1): 10-12.
- [43] 李莉欣. 桔梗等植物组织培养体系对脂蟾毒配基等四种天然产物的生物转化研究 [D]. 北京: 北京大学, 2002.
- [44] Jacobsohn G M, Frey M J. Biosynthesis of cholesterol by seedlings of *Digitalis purpurea* [J]. *J Am Chem Soc*, 1967, 89(13): 3338-3340.
- [45] Caspi E, Lewis D O, Piatak D M, et al. Biosynthesis of plant sterols. Conversion of cholesterol to pregnenolone in *Digitalis purpurea* [J]. *Experientia*, 1966, 22(12): 856.
- [46] Wickramasinghe J A, Hirsch P C, Munavalli S M, et al. Biosynthesis of plant sterols. VII. The possible operation of several routes in the biosynthesis of cardenolides from cholesterol [J]. *Biochemistry*, 1968, 7(9): 3248-3253.
- [47] Caspi E, Lewis D O. Progesterone: Its possible role in the biosynthesis of cardenolides in *Digitalis lanata* [J]. *Science*, 1967, 156(3774): 519-520.
- [48] Bennett R D, Sauer H H, Heftmann E. Progesterone metabolism in *Digitalis lanata* [J]. *Phytochemistry*, 1968, 7(1): 41-50.
- [49] Porto A M, Gros E G. Biosynthesis of animal and plant bufadienolides. Parallel experiments with pregn-5-en-3- β -ol-20-one-20-14C in *Scilla maritima* and *Bufo paracnemis* [J]. *Experientia*, 1970, 26(1): 11.
- [50] 保罗·M. 戴维克. 药用天然产物的生物合成 [M]. 娄红祥主译. 北京: 化学工业出版社, 2008: 199-202.
- [51] Krenn L, Kopp B. Bufadienolides from animal and plant sources [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(1): 1-29.
- [52] Steyn P S, van Heerden F R. Bufadienolides of plant and animal origin [J]. *Nat Prod Rep*, 1998, 15(4): 397-413.
- [53] Siperstein M D, Murray A W, Titus E. Biosynthesis of cardiotonic sterols from cholesterol in the toad, *Bufo marinus* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1957, 67(1): 154-160.
- [54] Chen C, Osuch M V. Biosynthesis of bufadienolides: 3- β -hydroxycholestanates as precursors in *Bufo marinus* bufadienolides synthesis [J]. *Biochem Pharmacol*, 1969, 18(8): 1797-1802.

- [55] Porto A M, Gros E G. Biosynthesis of animal and plant bufadienolides. Parallel experiments with pregn-5-en-beta-ol-20-one-20-14C in *Scilla maritima* and *Bufo paracnemis* [J]. *Experientia*, 1970, 26(1): 11.
- [56] Dmitrieva R I, Bagrov A Y, Lalli E, et al. Mammalian bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage [J]. *Hypertension*, 2000, 36(3): 442-448.
- [57] Fedorova O V, Zernetkina V, Grigorova Y, et al. A novel pathway of biosynthesis of mammalian endogenous steroids: Adrenocortical bufadienolide marinobufagenin starts from bile acids [J]. *J Am Soc Hypertens*, 2015, 9(4): e11.
- [58] Fedorova O V, Zernetkina V I, Shilova V Y, et al. Synthesis of an endogenous steroidal Na pump inhibitor marinobufagenin, implicated in human cardiovascular diseases, is initiated by CYP27A1 via bile acid pathway [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2015, 8(5): 736-745.
- [59] Pikuleva I A. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 112(3): 761-773.
- [60] Li J H, Daly E, Campioli E, et al. De novo synthesis of steroids and oxysterols in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(2): 747-764.
- [61] Nelson E R, Wardell S E, Jasper J S, et al. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology [J]. *Science*, 2013, 342(6162): 1094-1098.
- [62] Uno Y, Hosaka S, Yamazaki H. Identification and analysis of CYP7A1, CYP17A1, CYP20A1, CYP27A1 and CYP51A1 in cynomolgus macaques [J]. *J Vet Med Sci*, 2014, 76(12): 1647-1650.
- [63] Garraffo H M, Gros E G. Biosynthesis of bufadienolides in toads. VI. experiments with [1, 2-3H] cholesterol, [21-14C] coprostanol, and 5 β -[21-14C] pregnanolone in the toad *Bufo arenarum* [J]. *Steroids*, 1986, 48(3/4): 251-257.
- [64] Santa Coloma T A, Garraffo H M, Pignataro O P, et al. Biosynthesis of bufadienolides in toads. V. the origin of the cholesterol used by toad parotoid glands for biosynthesis of bufadienolides [J]. *Steroids*, 1984, 44(1): 11-22.
- [65] 刘馨. 小麦赤霉病菌麦角甾醇生物合成途径中关键基因的功能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [66] 尹艳, 关红雨, 张夏楠. 甾体皂苷生物合成相关酶及基因研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(8): 1332-1336.
- [67] Xu D, Wu M Y, Li X, et al. Cloning, prokaryotic expression and function of the *Bufo bufo* gargarizans 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) gene [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt A): 673-682.
- [68] Thomas J L, Duax W L, Addlagatta A, et al. Structure/function relationships responsible for coenzyme specificity and the isomerase activity of human type 1 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(37): 35483-35490.
- [69] Dumas K J, Guo C F, Wang X, et al. Functional divergence of dafachronic acid pathways in the control of *C. elegans* development and lifespan [J]. *Dev Biol*, 2010, 340(2): 605-612.
- [70] Yang X, Dubnau E, Smith I, et al. Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(31): 9058-9067.
- [71] Zheng L, Grigorova Y, Ramirez K, et al. Marinobufagenin, a mammalian endogenous cardiotonic steroid, is synthesized from the intermediates in the classical bile acid pathway in Cyp27A1 knockout mice [J]. *FASEB J*, 2019, doi: 10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.lb331.
- [72] Schwarz M, Wright A C, Davis D L, et al. The bile acid synthetic gene 3beta-hydroxy-delta(5)-C(27)-steroid oxidoreductase is mutated in progressive intrahepatic cholestasis [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(9): 1175-1184.
- [73] Wikvall K. Purification and properties of a 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid oxidoreductase from rabbit liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1981, 256(7): 3376-3380.
- [74] Li K, Feng J, Kuang Y, et al. Enzymatic synthesis of bufadienolide O-glycosides as potent antitumor agents using a microbial glycosyltransferase [J]. *Adv Synth Catal*, 2017, 359(21): 3765-3772.
- [75] Porto A M, Gros E G. Biosynthesis of the bufadienolide marinobufagenin in toads *Bufo paracnemis* from cholesterol-20-14C [J]. *Experientia*, 1971, 27(5): 506.

[责任编辑 潘明佳]