

植物甾醇及其衍生物的生物合成途径研究进展

赵曼¹, 孔珂昕¹, 薛露¹, 张成玉¹, 周迎^{2*}, 颜晓晖^{1*}

1. 天津中医药大学 组分中药国家重点实验室, 天津 301617

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

摘要: 植物甾醇是一类在植物中广泛存在的、具有环戊烷多氢菲骨架的甾体类化合物, 是植物细胞膜的重要组成部分。植物甾醇在植物体内以游离形式和共轭形式存在, 游离甾醇是植物细胞膜的重要结构成分, 可维持细胞膜流动性、调节其立体结构, 共轭甾醇则在植物的生长发育及应激反应中发挥重要作用。植物甾醇的生物合成过程非常复杂, 可分为环阿屯醇的合成、4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇的合成及菜油甾醇、 β -谷甾醇、豆甾醇的合成 3 个阶段, 涉及近 30 步反应, 受角鲨烯合酶、甾醇侧链还原酶等多种酶的调控。总结了植物甾醇及其部分衍生物生物合成途径的研究进展, 以为利用合成生物学技术创建这类重要植物天然产物的人工生物合成体系提供参考。

关键词: 植物甾醇; 生物合成途径; 乙酰辅酶 A; 环阿屯醇; 菜油甾醇; β -谷甾醇; 豆甾醇; 油菜素内酯; 芸苔素内酯; 合成生物学

中图分类号: R282.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)18-5884-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.031

Research progress on biosynthesis of phytosterols and their derivatives

ZHAO Man¹, KONG Ke-xin¹, XUE Lu¹, ZHANG Cheng-yu¹, ZHOU Ying², YAN Xiao-hui¹

1. State Key Laboratory of Component-based Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Phytosterols are a family of steroids widely distributed in plants. They possess a cyclopentanoperhydrophenanthrene skeleton and are an essential component of the plant cell membranes. Phytosterols exist in the free and conjugated forms in plants. Free sterols can maintain the fluidity of the cell membrane and regulate its three-dimensional structure. Conjugated sterols play an indispensable role in the growth and stress response of plants. The biosynthesis process of phytosterols is very complex. It can be divided into three stages, synthesis of cycloartenol, synthesis of 24-methylenelophenol, and synthesis of campesterol, β -sitosterol and stigmasterol. The synthesis pathway of phytosterols involves nearly 30 steps of reaction, which is regulated by a variety of enzymes such as squalene synthase and sterol side chain reductase. Research progress on biosynthesis of phytosterols and their derivatives were summarized in this paper, in order to provide a basis for creating the artificial biosynthetic cells for this family of important plant natural products.

Key words: phytosterols; biosynthetic pathways; acetyl coenzyme A; cycloartenol; campesterol; β -sitosterol; stigmasterol; brassinolide; brassinolide; synthetic biology

甾醇是广泛存在于生物体内的一类天然活性成分, 具有抗肿瘤、调节激素水平、促进新陈代谢和预防心血管系统疾病等功效。甾醇是生物膜的重要组成部分之一, 通过将其侧链嵌入膜的疏水中心限制脂肪酰基链的活动, 从而有效调节膜的流动性和渗

透性^[1]。植物甾醇种类繁多、功能多样, 在植物的生长发育过程中发挥重要作用^[2-3]。目前自然界中已发现了近 300 种植物甾醇, 其中菜油甾醇、 β -谷甾醇和豆甾醇是大多数植物中主要的甾醇^[3]。植物甾醇的主要特点是含有环戊烷多氢菲母核以及 C₁₇ 位连有不

收稿日期: 2022-05-27

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项(2020YFA0907900)

作者简介: 赵曼(1998—), 女, 硕士研究生, 主要从事植物天然产物合成生物学研究。E-mail: 18235448582@163.com

*通信作者: 周迎(1981—), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事药剂学研究。E-mail: zhouyingbiopharm@163.com

颜晓晖(1979—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然产物的合成生物学研究。E-mail: yanxh@tjucm.edu.cn

同的烷烃侧链,多数植物甾醇的C₂₄位具有甲基或乙基。根据C₂₄位烷基类型不同,可将植物甾醇分为C₂₄甲基甾醇和C₂₄乙基甾醇,前者以菜油甾醇为典型代表,后者以β-谷甾醇和豆甾醇为典型代表^[3-4]。

植物甾醇在植物体内以游离甾醇和共轭甾醇的形式存在,共轭甾醇根据C₃位羟基结合的不同基团又分为甾醇酯、甾醇糖苷和酰基甾醇糖苷^[3]。甾醇酯在膜甾醇稳态中发挥核心作用,可以将细胞膜的游离甾醇维持在正常生理水平。同时,甾醇酯兼具植物甾醇与脂肪酸的双重功效,与游离甾醇相比具有更好的脂溶性和降胆固醇的效果^[5-6]。甾醇糖苷和酰基甾醇糖苷在质膜的脂筏中高度富集,在跨膜信号传递中起重要作用^[7]。大多数植物中甾醇糖苷和酰基甾醇糖苷的含量相对较低,通常少于总甾醇的20%,但番茄果实中的甾醇糖苷和酰基甾醇糖苷占总甾醇的85%以上^[8-10]。共轭甾醇可参与植物因冷热和干旱等非生物胁迫引起的应激反应^[7],冷胁迫和干旱胁迫导致拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh 中甾醇糖苷和酰基甾醇糖苷的浓度增加^[11],苹果树皮中酰基甾醇糖苷的浓度增加^[12]。油菜素内酯是菜油甾醇的衍生物,也是继生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸和乙烯之后发现的第6大类植物激素,可调节细胞伸长、细胞分裂、光形态发生、木质部分化和繁殖等多种过程,参与非生物和生物胁迫反应,对植物的生长发育具有重要的调控作用^[13]。

植物甾醇具有降胆固醇、降血糖和抗炎等多种药理活性,是一类对人体非常有利的次生代谢物质,被誉为“生命的钥匙”^[14]。植物甾醇可通过2个途径来降低体内胆固醇浓度:一方面,因其结构与胆固醇相似,在肠道内会竞争和阻碍胆固醇的吸收^[15-16];另一方面,植物甾醇可以与肠道中的胆固醇共结晶并通过粪便排出体外^[17]。因此,摄取植物甾醇可降低血液中总胆固醇的水平以及低密度脂蛋白胆固醇的浓度,降低心血管疾病患病风险。妊娠期糖尿病已成为全世界孕妇的严重健康风险之一,每日食用富含植物甾醇的人造黄油可改善妊娠期糖尿病患者的胰岛素抵抗和高血脂的症状^[18]。在小鼠饮食中加入适量的β-谷甾醇和豆甾醇可以有效改善由于葡聚糖硫酸钠诱导引起的结肠炎^[19],且豆甾醇比β-谷甾醇表现出更好的抗急性结肠炎活性。

人体自身无法合成植物甾醇,体内的植物甾醇都是通过食用植物油、水果、坚果、谷物和豆类等食物摄取的。当前植物甾醇主要从植物中提取,但提取过

程中存在甾醇含量低、提取步骤繁琐、污染环境等弊端。近年来,在微生物中构建植物天然产物的生物合成途径,并通过发酵生产植物天然产物具有生产周期短、发酵产物专一、减少对农业土地的竞争、易于分离纯化等优势,是一种高效绿色的生产模式。构建植物甾醇人工生物合成体系的前提是要解析其生物合成途径,多年来在这方面取得了许多研究进展。本文对植物甾醇及其主要衍生物的生物合成途径进行归纳总结,以期利用合成生物学技术构建生产植物甾醇的微生物细胞工厂提供理论支持。

1 植物甾醇的生物合成途径

植物甾醇的生物合成途径可分为3个阶段:乙酰辅酶A到环阿屯醇的合成、环阿屯醇到4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇的合成和24-亚甲基胆甾-7-烯醇到菜油甾醇、β-谷甾醇和豆甾醇的合成(图1)。前2个阶段是所有植物甾醇合成的共有部分,植物中以环阿屯醇为节点,一部分代谢流通往C₂₄-烷基植物甾醇通路,另一部分代谢流则走向胆固醇合成通路。第3个阶段以24-亚甲基胆甾-7-烯醇为节点,分为C₂₄-甲基甾醇合成途径(合成菜油甾醇)和C₂₄-乙基甾醇合成途径(合成β-谷甾醇和豆甾醇)。

1.1 乙酰辅酶A到环阿屯醇的生物合成途径

在环阿屯醇的生物合成中,经甲羟戊酸途径合成的异戊烯二磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)首先经过香叶基二磷酸合酶(geranyl diphosphate synthase, GPPS)和法尼基二磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPPS)的催化,转化为香叶基二磷酸(geranyl diphosphate, GPP)和法尼基二磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)。之后,2个FPP分子在角鲨烯合酶(squalene synthase, SQS)的作用下以头-头相接的方式缩合生成角鲨烯,后者在角鲨烯环氧化酶(squalene epoxidase, SQE)的作用下被氧化为2,3-环氧角鲨烯。最后,2,3-环氧角鲨烯经过环阿屯醇合成酶(cycloartenol synthase, CAS)的催化作用生成环阿屯醇(图2)。

3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)催化三羟基三甲基戊二酸单酰辅酶A转化为甲羟戊酸,是甲羟戊酸途径的限速酶^[20-21]。近年来,越来越多的证据表明HMGR在植物甾醇产量提升方面起着重要作用。川贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don 中HMGR(FcHMGR)完整蛋白不能在大肠杆菌中表达,而N

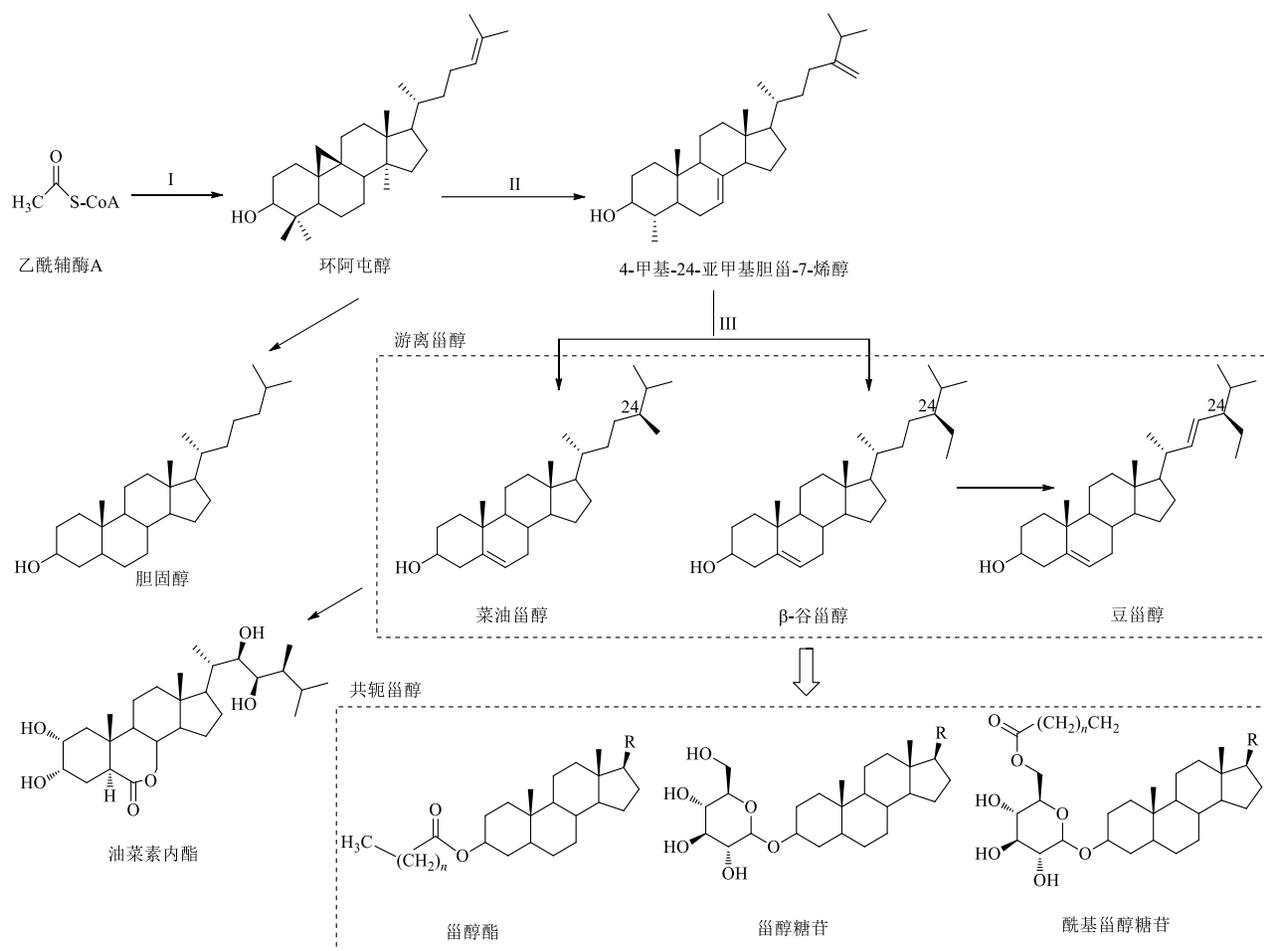


图1 植物甾醇的化学结构及简要生物合成途径

Fig. 1 Chemical structures and brief biosynthetic pathways of phytosterols

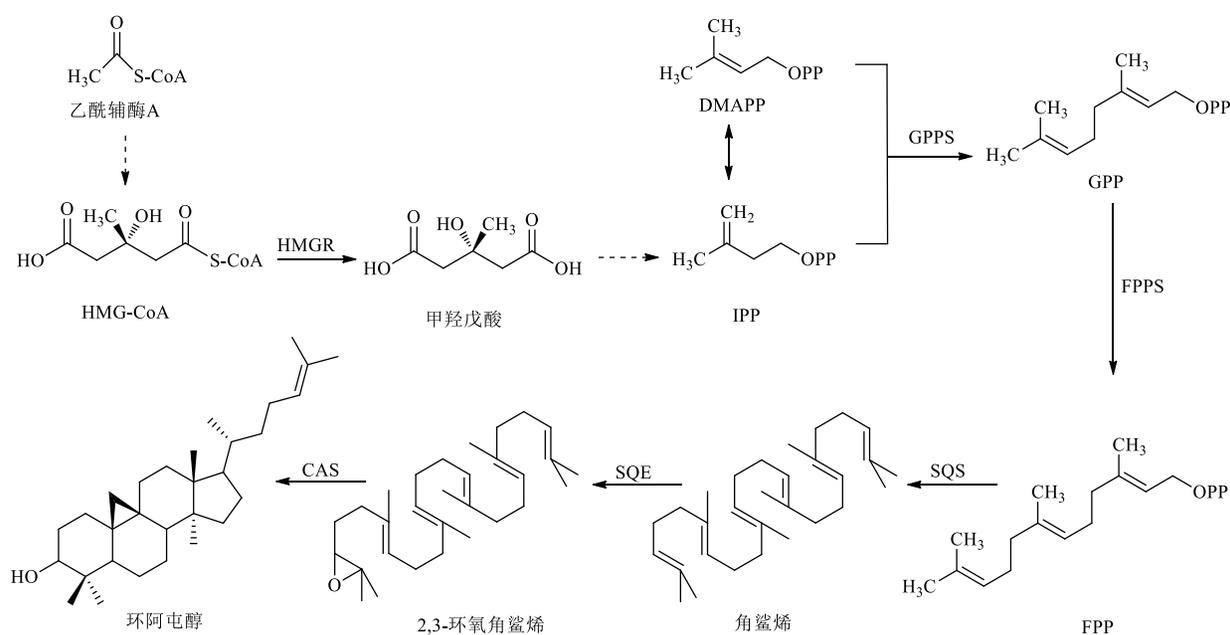


图2 环阿屯醇的生物合成途径

Fig. 2 Biosynthetic pathway of cycloartenol

端截短后的 FcHMGR 可以在大肠杆菌中成功表达, 体外实验也证明截短的 FcHMGR 具有还原酶活性^[22]。将人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 中的 *PgHMGR1* 基因在拟南芥中过表达, 突变植株中 β -谷甾醇含量提高了 2 倍, 菜油甾醇和环阿屯醇的含量均提高了 1.8 倍^[23], 证实了人参中 *HMGR* 基因在植物甾醇产量提升方面起重要调节作用。

SQS 催化 2 个 FPP 分子缩合生成角鲨烯的反应分 2 步进行。第 1 步, 2 个 FPP 分子头对头偶联形成 1 个稳定的环丙基羧基二磷酸中间体, 即前角鲨烯二磷酸 (presqualene diphosphate, PSPP); 第 2 步, PSPP 的环丙烷环在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 的还原作用下被打开, 碳骨架发生重排生成角鲨烯^[24]。据报道, 去除疏水性 C 末端部分可以促进可溶性重组蛋白的表达^[25], Dai 等^[26]在越南油茶 *Camellia vietnamensis* Huang 中 SQS 的 C 端删除了第 386~408 个氨基酸, 将截短的 CvSQS 蛋白克隆至载体 pET30a, 随后转化大肠杆菌 TOP10, 发现 CvSQS 被成功表达。随后该课题组以 FPP 为底物, 加入 NADPH 和 Mg^{2+} 进行体外实验, 证明了截短的 CvSQS 具有将 FPP 转化为角鲨烯的活性。SQS 缺失的苹果树叶片中 β -谷甾醇和菜油甾醇的含量显著减少, 实验组的菜油甾醇含量仅为对照组的 37%^[27], 这表明了 SQS 在植物甾醇生产中的重要性, 菜油甾醇的含量提升是提高下游油菜素内酯产量的关键。

CAS 是植物甾醇合成途径中的关键调控酶之一, 催化 2,3-环氧角鲨烯到环阿屯醇的生物合成, 属于氧化角鲨烯还原酶家族。烟草 NtCAS1 蛋白与拟南芥 AtCAS1 的序列相似性为 78%^[28], 在缺乏内源性羊毛甾醇合酶的酵母突变体中鉴定了 NtCAS1 催化环阿屯醇生成的功能。一些植物如白桦 *Betula platyphylla* Suk. 和远志 *Polygala tenuifolia* Willd 中含有 2 个 CAS 基因, 而重楼 *Paris polyphylla* Smith 中只含有 1 个 CAS 基因^[29]。PpCAS 蛋白具有 761 个氨基酸, 具有 1 个 DCTAE 基序和 4 个 QW(QXXXGXW 和 QXXXGXXXW) 基序。将 PpCAS 基因导入羊毛甾醇合酶缺失的酵母后, 重组菌株中产生了环阿屯醇, 表明 PpCAS 可以以 2,3-环氧角鲨烯为底物生成环阿屯醇, 这是首次对 PpCAS 进行功能表征。

1.2 环阿屯醇到 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇的生物合成途径

环阿屯醇到 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇的合

成需要经过 6 步反应, 首先在甾醇-C₂₄-甲基转移酶 1 (C₂₄-methyltransferase 1, SMT1) 的作用下生成 24-亚甲基环阿屯醇, 经过甾醇-4 α 甲基氧化酶 1 (sterol-4 α -methyl oxidase 1, SMO1) 的氧化脱去 C_{4 β} 位甲基得到环桉树醇, 环桉树醇环异构酶 (cyclopropyl sterol isomerase, CPI) 接下来催化环桉树醇环丙烷环的裂解产生钝叶醇。甾醇 C₁₄-去甲基化酶 (sterol C₁₄-demethylase, CYP51) 催化钝叶醇的 14 α -甲基的连续氧化, 依次得到 14 α -羟甲基、14 α -醛基, 最后 14 α -醛基以甲酸形式释放, 同时生成 $\Delta^{14,15}$ 双键, 得到 4 α -甲基-5 $\alpha,8,14,24(28)$ 麦角甾三烯-3 β -醇。最后在甾醇 C₁₄-还原酶 (sterol C₁₄ reductase, C₁₄-R) 和甾醇 C-8,7 异构酶 (sterol Δ^8 - Δ^7 isomerase, 8,7-SI) 的催化作用下发生 C₁₄-C₁₅ 位双键还原和双键异构化分别生成 4 α -甲基粪甾醇和 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇 (图 3-A)。

植物甾醇侧链上 C₂₄ 位的烷基化是由 SMT 催化的^[30]。SMT 家族的 SMT1 和 SMT2 先后在 C₂₄ 位引入烷基分别得到 C₂₄-甲基甾醇和 C₂₄-乙基甾醇, 在有些植物如拟南芥中也存在 SMT3, 与 SMT2 发挥相同作用, 都催化甾醇侧链 C₂₄ 位的乙基化^[31-33]。1996 年, 植物 SMT1 首次从大豆中被分离出来, 它在幼叶、根和茎中的表达要高于成熟叶; 表达大豆 SMT1 的大肠杆菌可以催化羊毛甾醇 C₂₄ 位的甲基化^[34]。重楼中有 2 个 SMT1 (PpSMT1-1 和 PpSMT1-2), 它们都包含 3 段高度保守的序列: VLDVCGGIG、NSFDAVYA 和 VLKPGQYFAA^[35]。在大肠杆菌 BL21 中异源表达 PpSMT1-1 和 PpSMT1-2, 将纯化的蛋白用于体外酶促反应, PpSMT1-1 可催化环阿屯醇转化为 24-亚甲基环阿屯醇, 而 PpSMT1-2 没有该催化活性。在烟草中过表达睡茄的 *SMT1* 基因, 重组植株中环阿屯醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇和豆甾醇的含量大幅提高, 最大增幅分别为 93%、161%、587%、68%。利用可诱导植物发生多种防御反应的 flg22 处理拟南芥植株, 与野生型相比, 突变体 *smt2* 和 *smt3* 产生的活性氧显著增加, 根的伸长等晚期防御反应受到抑制^[36], 表明 SMT2 和 SMT3 在植物免疫反应中发挥了重要作用。

在植物甾醇的生物合成中, SMO 负责去除 C₄ 位上的 2 个甲基。SMO1 去除 4,4-二甲基甾醇 24-亚甲基环阿屯醇 C_{4 β} 位的单个甲基, 生成环桉树醇, SMO2 则在植物甾醇生物合成的更下游步骤去除 C_{4 α} 位的甲基^[37-39]。拟南芥中的 *SMO1* 基因 (3 个亚型: *AtSMO1-1*、*AtSMO1-2* 和 *AtSMO1-3*) 和 *SMO2*

基因 (2 个亚型: *AtSMO2-1* 和 *AtSMO2-2*) 共 5 个 cDNA, 这些 *AtSMO* 的序列中都存在 3 个富含组氨酸的保守序列, 且表现出甾醇去饱和酶家族特有的基序^[37]。拟南芥 *AtSMO1* 和酵母中的 *SMO(ERG25)* 的 N 端序列同源性较低, *AtSMO1* 的 N 端结构域可能与识别 β 9,19-环丙基甾醇的特殊结构有关。异源表达 *AtSMO2* 可以恢复敲除 *ERG25* 基因的酿酒酵母菌株的生长和麦角固醇的生物合成, 而异源表达 *AtSMO1* 则不可恢复, 这说明了 *AtSMO1* 具有严格的底物特异性。

CPI 是植物特有的酶, 催化环桉树醇的环丙烷环打开, 生成钝叶醇, 这一反应是植物甾醇合成途径中的限速步骤之一^[40]。藻类、小立碗藓、水稻、玉米、小米、杨树和拟南芥等植物中的 *CPI1* 基因均为单拷贝, 它们编码的蛋白质序列相似性为 48%~90%, 且都具有 7 个跨膜结构域和 6 个亲水环^[41], 基于蛋白质同源性以及相似的结构域, 推测陆生植物中 *CPI1* 蛋白的功能高度保守。拟南芥的 *CPI1* 在大肠杆菌中异源表达后, 突变菌株的提取物可以将环桉树醇异构化为钝叶醇^[42]。羟胺可诱导拟南芥 *CPI* 发生点突变, 通过体外测定突变体酶活,

Gly28、*Glu29*、*Gly108* 和 *Asp260* 对 *CPI* 活性至关重要^[43], 对于酶的稳定性是必需的。Men 等^[40]筛选到一株拟南芥 *CPI1* 的转座子插入突变体 (*cpi1-1*), 反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 结果表明, 该突变体中没有 *CPI1* 的转录, 随后对其甾醇成分进行分析, 发现突变体中几种主要植物甾醇的含量几乎为零, 并且积累了大量的环桉树醇, 这证实了 *CPI* 基因编码环桉树醇环丙烷开环的反应。

CYP51 属于细胞色素 P450 超家族, 催化甾醇 14 α -甲基的羟基化反应^[30]。大多数 *CYP51* 有 6 个保守的结构域, 分别为 5 个底物识别位点和 1 个血红素辅基结合位点^[44]。*CYP51* 催化的反应分 3 步进行, 底物的 14 α -甲基先后被氧化为醇和醛, 然后以甲酸的形式去除同时生成 C₁₄-C₁₅ 位双键^[45](图-3B), 每一步反应都需要 1 个 O₂ 分子和 1 个 NADPH^[46]。小麦 *CYP51* 基因编码的蛋白与哺乳动物和真菌来源的 *CYP51* 蛋白有 32%~39% 的同源性, 表达小麦 *CYP51* 基因的酿酒酵母可催化钝叶醇的甲基化, 且比酵母内源的羊毛甾醇甲基化酶的催化效率更高^[47]。拟

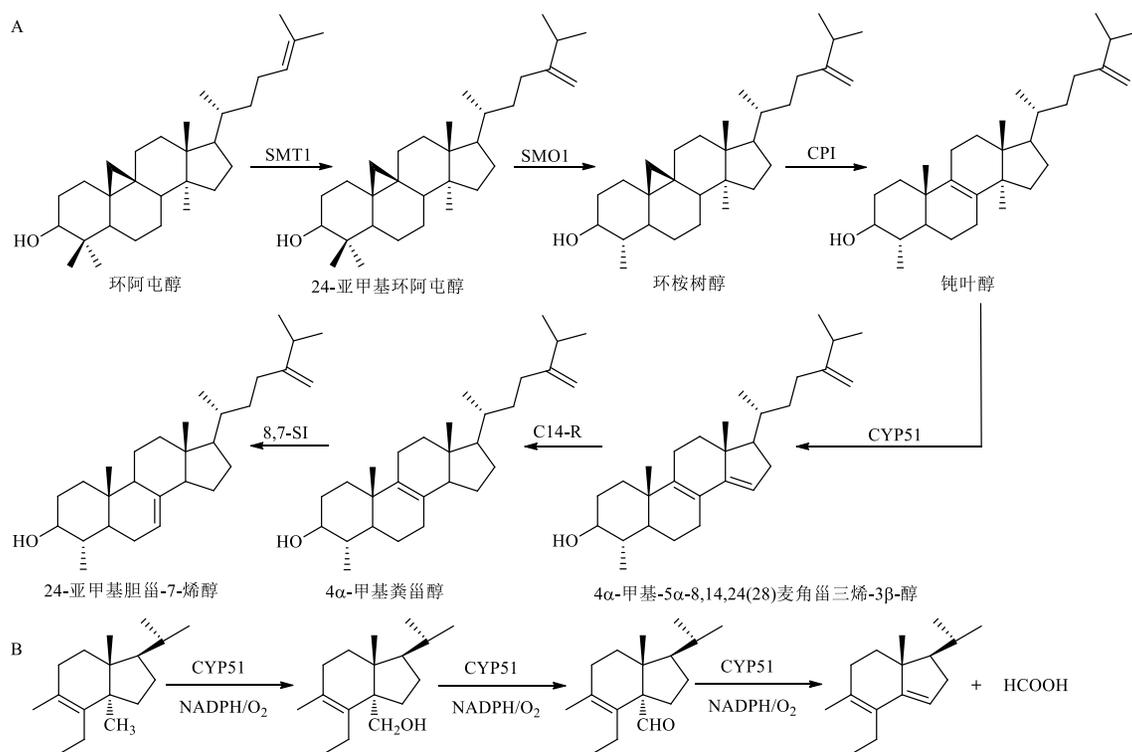


图 3 环阿屯醇到 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇的生物合成途径 (A) 和 CYP51 催化的甾醇 14 α -去甲基化反应 (B)

Fig. 3 Biosynthetic pathway from cycloartenol to 4-methyl-24-methylenelophenol (A) and CYP51-mediated sterol 14 α -demethylation reaction (B)

南芥中有 2 个 *CYP51* 基因(*CYP51A1* 和 *CYP51A2*)，序列分析和分子互补实验证明 *CYP51A1* 是 1 个假基因，*cyp51A2* 突变体中积累了大量的钝叶醇，菜油甾醇和 β -谷甾醇含量减少^[48-49]。

1.3 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇到菜油甾醇的生物合成途径

4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇到菜油甾醇的合

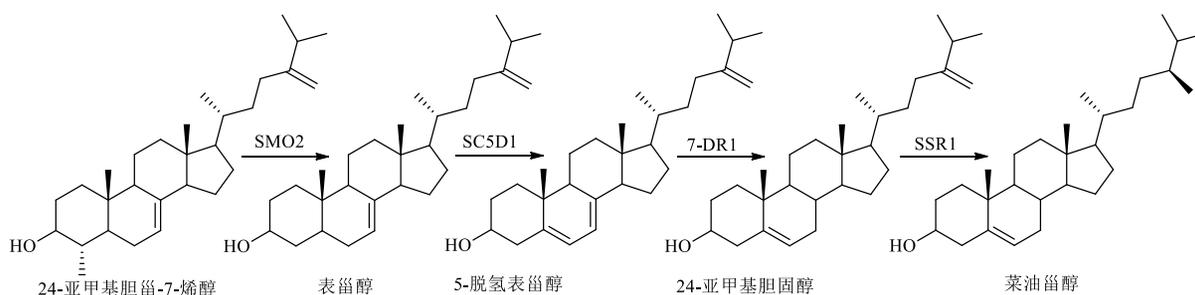


图 4 从 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇到菜油甾醇的生物合成途径

Fig. 4 Biosynthetic pathway from 4-methyl-24-methylenelophenol to campesterol

Gachotte 等^[50-51]利用甲基磺酸乙酯对拟南芥进行诱变处理，分离出突变株 *stel-1*，其 Δ^7 -甾醇含量增加，而 Δ^5 -甾醇含量减少，表明该突变株缺乏 SC5D 活性。用酿酒酵母中编码 SC5D 蛋白的 *ERG3* 基因转化 *stel-1* 突变株的根，其愈伤组织中 Δ^5 -甾醇含量增加了 1.7~2.8 倍， Δ^7 -甾醇含量减少，说明 *stel-1* 中 Δ^7 -甾醇的积累是由 SC5D 活性缺陷引起的，而后从拟南芥中分离了 SC5D。拟南芥中的 *DWF7* 基因是 *STE1* 的等位基因，不同植物的 SC5D 在序列和特定结构域高度保守，具有紧密排列的组氨酸残基 HX_3H ^[52]。黄色荧光蛋白融合实验表明，拟南芥的 SC5D 主要定位于内质网，在质膜和脂质颗粒中也有表达^[53]。番茄中存在 2 种 SC5D 蛋白 (SC5D1 和 SC5D2)，二者氨基酸序列相似性为 88%^[2]。SC5D1 参与菜油甾醇、 β -谷甾醇、和豆甾醇的生物合成，而 SC5D2 则在胆固醇的生物合成途径中发挥作用。

制菌霉素类多烯化合物的抗真菌作用依赖于麦角固醇中的 C_7 位不饱和键，酵母中的 *ERG2* 催化麦角固醇中 C_7 位双键的生成，因此 *ERG2* 基因敲除的酿酒酵母突变株表现出对制菌霉素的高度耐药性。通过拟南芥 cDNA 文库在酿酒酵母中的异源表达筛选出了拟南芥中的 7-DR1，从 10^5 个转化子中筛选出 1 个单克隆，其对制菌霉素的抗性达到 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，说明该 cDNA 编码的酶可催化麦角固醇 C_7 位双键

需要经过 4 步反应。首先，SMO2 去除 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇 C4 位的第二个甲基生成表甾醇，而后经甾醇 C_5 -去饱和酶 (sterol C_5 -desaturase, SC5D)、甾醇 Δ^7 -还原酶 (sterol Δ^7 -reductase, 7-DR) 和甾醇侧链还原酶 1 (sterol side chain reductase 1, SSR1SC5D1) 的脱氢和还原作用依次生成 5-脱氢表甾醇、24-亚甲基胆固醇和菜油甾醇 (图 4)。

的还原^[54]，将拟南芥的 7-DR1 基因导入酿酒酵母菌株，首次实现了菜油甾醇在酿酒酵母中的生物合成。将拟南芥的 7-DR1 基因与黄色荧光蛋白融合并转化酿酒酵母 W303-B1 菌株，显示 7-DR1 蛋白主要定位于内质网，并且观察到 $\Delta^5,7$ -甾醇如麦角固醇的 C_7 位双键被还原^[53]。

SSR1 催化菜油甾醇生物合成过程中的最后一步的 C_{24} 位亚甲基还原反应。SSR1 蛋白由 *DWF1* 基因编码，T-DNA 插入突变的拟南芥 *dwf1* 突变株中 24-亚甲基胆固醇的含量比野生型提高了 12 倍，而几乎没有菜油甾醇的产生^[55]。SSR1 蛋白中 N 段的 27~43 号残基含有跨膜结构域，可使其定位至内膜系统。在跨膜结构域下游是 FAD 结合结构域，FAD 是 SSR1 的 C_{24} 位亚甲基还原活性中的关键辅酶。缺失 *DWF1* 基因的植株中菜油甾醇和其下游的油菜素内酯的含量都显著下降，产生植株短小、叶子呈现深绿色、繁殖能力下降等一系列表型。

1.4 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇到 β -谷甾醇和豆甾醇的生物合成途径

4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇生成 β -谷甾醇需要经过 5 步反应。SMT2 在 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇的 C_{24} 位引入第 2 个甲基，生成 4-甲基-24-亚乙基-7-胆甾烯醇，将代谢流引入 C_{24} -乙基甾醇合成途径。随后 4-甲基-24-亚乙基-7-胆甾烯醇经过 SMO2 的转化脱去 C_4 位甲基生成 Δ^7 -燕麦甾醇，

SC5D1 催化 Δ^7 -燕麦甾醇的 C₅-C₆ 位脱氢生成 5-脱氢燕麦甾醇, 后者在 7-DR1 和 SSR1 的作用下依次发生 C₇-C₈ 位和 C₂₄-C₂₈ 位双键还原, 生成 β -谷甾醇

醇。最终 β -谷甾醇的 C₂₂ 位和 C₂₃ 位在甾醇 C₂₂-去饱和酶 (sterol C₂₂-desaturase, SC22D) 的作用下脱氢生成豆甾醇 (图 5)。

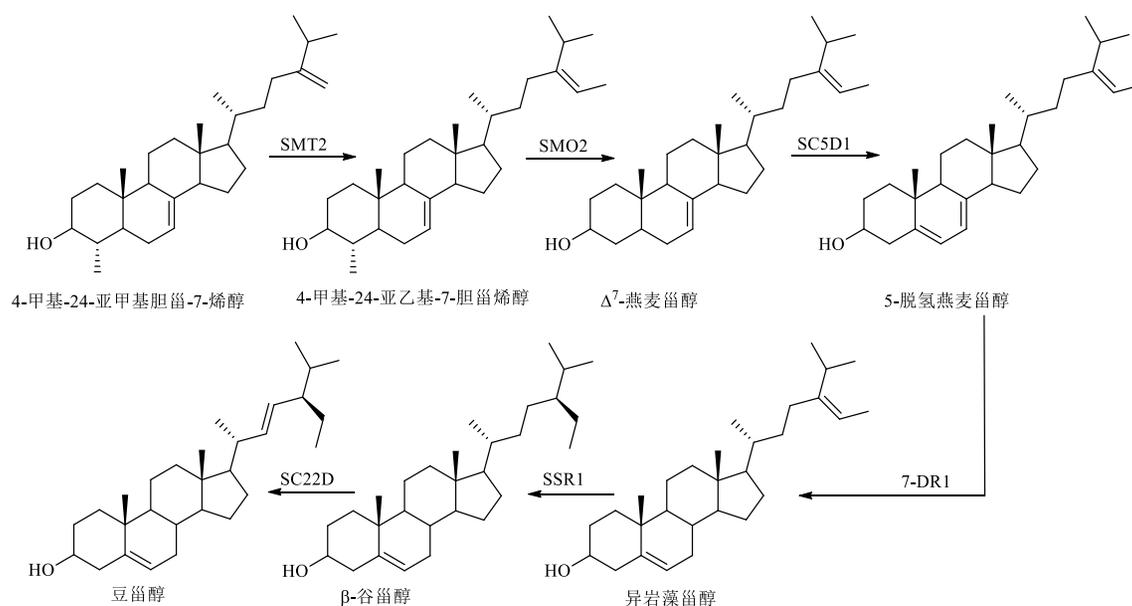


图 5 从 4-甲基-24-亚甲基胆甾-7-烯醇到 β -谷甾醇和豆甾醇的生物合成途径

Fig. 5 Biosynthetic route from 4-methyl-24-methylenelophenol to β -sitosterol and stigmasterol

豆甾醇与 β -谷甾醇的结构相似, 区别在于豆甾醇侧链上 C₂₂ 位和 C₂₃ 位之间存在双键, SC22D 催化 β -谷甾醇向豆甾醇转化。拟南芥中有 4 个编码 SC22 蛋白的基因 (*CYP710A1*~*A4*), 在不同组织和器官中表达水平有较大差异。*CYP710A1* 在根、叶和花等各种器官内的表达水平较高, 在茎和成熟长角果中的表达水平非常低, *CYP710A2* 在长角果中的表达水平也较低, *CYP710A3* 在茎中特异性表达, *CYP710A4* 在根中的表达较弱。在昆虫细胞中利用杆状病毒表达载体系统分别表达拟南芥的 *CYP710A1* 和 *CYP710A2* 以及番茄的 *CYP710A11*, 提取昆虫的微粒体部分进行体外催化实验, 发现这些重组蛋白均可以将 β -谷甾醇底物转化为豆甾醇^[56], *CYP710A2* 和 *CYP710A11* 对 β -谷甾醇的亲合力更高。此外, 同样在昆虫细胞中利用杆状病毒表达载体系统表达编码苔藓 SC22D 的 *CYP710A3* 和 *CYP710A4*, 验证了其编码蛋白的 C₂₂ 位去饱和活性^[57]。在本氏烟草中将番茄 SC22D 与绿色荧光蛋白融合表达, 发现该融合蛋白定位于内质网^[58]。进一步的研究表明, 番茄 SC22D 中的 N 端跨膜螺旋 (transmembrane-helix domain, TMH) 结构域可以使其靶向内质网。将完整的番茄 SC22D 和缺失 TMH 结构域的 SC22D 在本氏

烟草中分别表达, 发现表达完整 SC22D 的烟草中豆甾醇含量增加, 而缺失 TMH 结构域的 SC22D 没有去饱和酶活性。不同植物的 SC22D 中 TMH 结构域的长度和序列保守性均有较大差异, 但都含有大量的苏氨酸和丝氨酸残基^[58]。

2 植物甾醇衍生物的生物合成途径

2.1 甾醇酯、甾醇糖苷以及酰基甾醇糖苷的生物合成途径

甾醇酯是由游离甾醇的 C₃ 位羟基被酯化而形成的, 这一过程由甾醇酰基转移酶 (sterol acyltransferases, SATs) 催化 (图 6)。通常根据酰基供体的不同将 SATs 分为磷脂甾醇酰基转移酶 (phospholipid: sterol acyltransferases, PSATs) 和酰基辅酶 A 甾醇酰基转移酶 (acyl-CoA: sterol acyltransferases, ASATs) 2 类^[59]。磷脂和中性脂质, 包括二酰基甘油和三酰基甘油, 都可以作为酰基供体参与甾醇酯的生物合成^[60-62]。来源于拟南芥的甾醇酰基转移酶 AtPSAT 催化酰基从磷脂转移到各种游离甾醇的 C₃ 位^[63], 微粒体实验表明 AtPSAT 对不同游离植物甾醇具有底物特异性, 其底物偏好性依次为胆固醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇和豆甾醇。从酰基供体来考察, AtPSAT 优先利用磷脂酰乙醇胺, 其

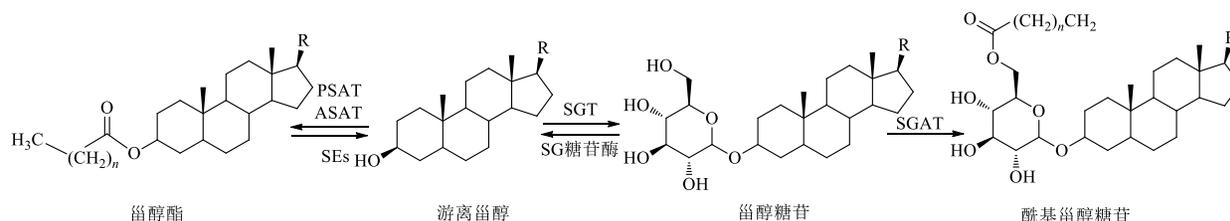


图6 共轭甾醇的生物合成途径

Fig. 6 Biosynthetic pathways of conjugated sterols

次是磷脂酰胆碱，几乎不能利用磷脂酸。在烟草和拟南芥中过表达 *AtPSAT1* 基因，检测到其 mRNA 的大量积累，但是在叶子和种子中并没有检测到总甾醇和甾醇酯水平的升高，这可能与甾醇稳态有关^[64]。水稻 *OsPSAT* 基因的表达水平与脱落酸含量和 *HMGR* 基因的表达呈正相关，当水稻处于干旱胁迫条件下时 *OsPSAT* 基因的表达水平升高，提示甾醇酯可能与植物的应激反应相关^[65]。番茄的 PSAT (*SIPSAT1*) 与 *AtPSAT* 的序列相似性为 75%，在缺乏 *AtPSAT* 基因的拟南芥突变株中表达 *SIPSAT1* 基因可逆转突变株中观察到的早期衰老表型，并使甾醇酯产量恢复至野生型水平^[59]。拟南芥的 *AtASAT* 定位于内质网，而番茄的 *SIASAT1* 则位于质膜，二者都对环阿屯醇有明显的底物偏好性^[59]。*SIPSAT1* 基因和 *SIASAT1* 基因响应不同外界刺激（脱落酸、茉莉酸甲酯、水杨酸、渗透、盐和冷胁迫等）时的反应有所不同，*SIPSAT1* 在胁迫条件下表现出明显的表达水平差异，而 *SIASAT1* 在不同处理下表达水平几乎保持不变^[59]。甾醇酯可以在甾醇酯酯酶的作用下转化为游离甾醇，以维持植物的甾醇稳态。

甾醇糖苷由甾醇糖基转移酶（sterol glycosyltransferase, SGT）催化游离甾醇的 C₃ 位羟基糖基化而产生^[66-67]（图6）。SGT 是糖基转移酶家族的成员，其 C 端含有 1 个糖结合域（AIIANPPAY）和 1 个甾醇结合域（VVHHGGAG）^[68-70]。目前，多种植物的 SGT 已经被克隆并在大肠杆菌中进行了异源表达，多数 SGT 都优先利用尿苷二磷酸葡萄糖作为糖基供体。研究表明，SGT 的活性受到细胞膜脂质环境的影响，带负电荷的磷脂可以增强 SGT 的活性，但这一现象的机制目前还不清楚^[71-74]。将拟南芥和燕麦中的膜结合 SGT 分别在大肠杆菌中表达并纯化，体外实验证实这 2 种酶可以催化相关膜甾醇的糖基化^[75]。睡茄叶子存在一种胞质 SGT，其仅以 β-谷甾醇、豆甾醇和薯蓣皂苷元等 C₃ 羟基甾

醇作为底物，且其催化 5-烯甾醇的糖基化效率比 5α-H 甾醇更高^[76]。拟南芥中的 2 个 SGT 功能有所不同，其中 *At3g07020* 基因编码的 UGT80A2 负责种子中主要甾醇糖苷的生产，而 *At1g43620* 基因编码的 UGT80B1 在甾醇糖苷的合成过程中起辅助作用^[77-78]。棉花中的 GhSGT1 主要利用胞质甾醇，而 GhSGT2 主要以质膜甾醇为底物^[79]。非离子表面活性剂 Triton X-100 对 GhSGT1 的活性有抑制作用，但可显著增强 GhSGT2 的活性。添加 NaCl 后，GhSGT1 的活性要强于 GhSGT2，而在添加 MgCl₂ 后则相反。真核生物的甾醇稳态依赖于游离甾醇和共轭甾醇的相互转化，甾醇糖苷可以在糖苷酶的作用下发生糖苷水解而生产游离甾醇。

甾醇糖苷中糖基的 C₆ 位可以被脂肪酸酯化形成酰基甾醇糖苷，这一过程由甾醇糖苷酰基转移酶（steryl glucoside acyltransferase, SGAT）催化（图6）。Forsee 等^[80]分离并纯化了棉花中的 SGAT，将该酶与 ¹⁴C 标记的磷脂、³H 标记的甾醇糖苷一同在体外做催化实验，在产物中检测到了 ¹⁴C, ³H 标记的酰基甾醇糖苷，证明了磷脂可以作为甾醇糖苷向酰基甾醇糖苷转化的酰基供体。来自茄叶的膜结合 SGAT 具有明显的底物特异性，在所有测试的甾醇糖苷底物中，当以胆固醇葡萄糖苷为底物时该酶的活性最高，以其他甾醇糖苷如 β-谷甾醇葡萄糖苷、豆甾醇葡萄糖苷和胆固醇半乳糖苷等为底物时酰基化效率较低^[81]。进一步的研究发现，酰基来源可以是不同类型的磷酸甘油酯，如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇和磷脂酰甘油等。

2.2 油菜素内酯的生物合成途径

目前已在不同植物中鉴定出几十种不同的油菜素内酯类植物激素，芸苔素内酯（brassinolide, BL）是第 1 个被鉴定的油菜素内酯类化合物，也是研究这类植物激素的生物合成途径的模式化合物。以 BL 为例介绍油菜素内酯类化合物的生物合成途径。BL

度更高,因此被认为是主要的BL合成途径。BL生物合成途径中的酶并不完全清晰,目前已解析的酶主要包括CYP90B1(*DWF4*)、CYP90A1、CYP90C1、CYP90D1、CYP85A1、CYP85A2和CYP85A3^[87-92]。

*DWF4*基因编码的类固醇22 α -羟化酶CYP90B1^[93],负责催化BL生物合成过程中如菜油甾醇、4-en-3-one、3-one、菜油烷醇、6-oxoCN等中间体的C₂₂位羟基化^[86],也是菜油甾醇合成BL途径中的第1个限速酶^[88]。T-DNA插入的*dwf4*突变植株表现出典型的油菜素内酯缺陷表型,这种表型可以被BL和C₂₂羟基化的油菜素内酯中间体恢复,但是不能被其他植物激素恢复^[94-96]。*DWF4*蛋白定位于内质网,RT-PCR和GUS染色显示*DWF4*主要在根尖、茎尖、花、幼苗、腋芽和角果中表达^[97]。在拟南芥中过表达*DWF4*后促进了植株的生长,同时BL产量增加。研究表明,拟南芥同源域亮氨酸拉链蛋白1可识别并结合到*DWF4*的启动子区域,同时联合油菜素内酯合成途径下游的转录因子BES1共同抑制*DWF4*的表达^[98]。染色体免疫共沉淀和凝胶迁移滞后实验发现转录因子TCPI可直接结合到*DWF4*启动子区的2个GGNCC靶序列上,提高CYP90B1的表达水平^[99]。

CYP90C1和CYP90D1都属于C₂₃羟基化酶,可负责特异性催化BL合成途径中C₂₂羟基化中间体的C₂₃位羟基化。体外催化实验表明,含有CYP90C1或CYP90D1的微粒体和纯化的拟南芥CYP450还原酶可将6-deoxoCT和长春花甾酮分别转化为6-deoxoTE和茶甾酮^[90]。此外,除了C₂₂羟基化途径和C₆氧化途径外,还存在另外一条绕过菜油烷醇和6-deoxoTE的新途径,即22-OH-3-one的C₂₃位在CYP90C1或CYP90D1的作用下发生羟基化,直接转化为6-deoxo3DT。

CYP85A1可催化晚期C-6氧化途径中不同中间体,如6-deoxoCS、6-deoxoTY、6-deoxo3DT和6-deoxoTE上C₆位的氧化反应,表明这一氧化酶具有良好的底物杂泛性。番茄和拟南芥中6-deoxoCS向CS的转化是由细胞色素P450的CYP85A家族催化的^[100-101]。目前,已经在水稻、葡萄、豌豆、番茄和拟南芥等多种植物中分离了CYP85A1。将豌豆的CYP85A1和CYP85A6分别在酿酒酵母中进行异源表达^[102],重组酿酒酵母与6-deoxoCS共同培养时,CYP85A1和CYP85A6均可将6-deoxoCS转化为CS。此外,将表达CYP85A1的酿酒酵母与CS一

起培养时,在代谢物中还产生了微量的BL,说明CYP85A1具有一定的催化Baeyer-Villiger反应产生BL的活性。而表达CYP85A6的重组酿酒酵母则不能将CS转化为BL。

从CS到BL的转化过程中,在CS的C₆和C₇位之间发生Baeyer-Villiger氧化,插入1个氧原子产生7-氧代-内酯B环,这一反应也是BL生物合成的限速步骤之一。异源表达拟南芥CYP85A2基因的酿酒酵母可以催化CS转化为BL^[101,103-104]。将CS和氘标记的CS添加到导入拟南芥CYP85A2的酵母培养基中,在代谢物中可同时检测到未标记和标记的BL^[104],证实了CYP85A2具有催化Baeyer-Villiger氧化反应的活性。在酵母中进行异源表达番茄中的CYP85A3基因,发现重组酵母菌株将大部分6-deoxoCS转化为CS,同时也观察到BL的产生^[92],说明CYP85A3也参与BL的生物合成。

3 合成生物学在植物甾醇及其衍生物生产中的应用

利用合成生物学技术高产植物甾醇的前提是对其生物合成途径进行挖掘。近年来,随着对植物甾醇生物合成途径研究的不断深入以及现代合成生物学技术的快速发展,已经成功在微生物细胞中成功构建了植物甾醇的合成途径。Du等^[105]在敲除内源C₂₂去饱和脱氢酶编码基因的解脂耶氏酵母中导入不同来源(水稻、褐家鼠、非洲爪蟾)的7-脱氢胆固醇还原酶编码基因*DHCR7*,实现了菜油甾醇在酵母中的发酵生产。在这些基因中,表达非洲爪蟾来源*DHCR7*基因的菌株中菜油甾醇产量最高,摇瓶产量达到106 mg/L。随后通过高密度补料分批发酵,以葵花籽油为碳源,最终菜油甾醇最高产量达到(453.0 \pm 24.7) mg/L。将来自不同物种的*DHCR7*基因在解脂耶氏酵母中表达以提高重组酵母中菜油甾醇的产量,发现来源于斑马鱼的*DHCR7*基因是合成菜油甾醇的最佳候选酶^[106]。过表达斑马鱼*DHCR7*基因、柠檬酸裂解酶和过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶2的重组酵母,在5 L发酵罐中的菜油甾醇最高产量达到942 mg/L。在高产角鲨烯的酵母底盘细胞中表达外源基因*DHCR7*,通过基因来源筛选、启动子以及发酵条件优化,最终菜油甾醇的产量达到了(916.88 \pm 11.23) mg/L^[107]。由此可见,通过合成生物学技术,将不同来源的基因在微生物细胞中有效整合,构建植物甾醇的人工生物合成途径,从而实现高值植物甾醇的发酵生产是可行的。

4 结语与展望

植物甾醇及其衍生物具有降血糖、调血脂^[108]、降胆固醇、抗肿瘤、抗炎、抗氧化和预防心血管疾病等生理活性，其生物合成途径在近年来也得到了较为深入的研究，本文对这些化合物的生物合成途径进行了总结。在植物甾醇的完整生物合成途径及调控机制方面还存在一些尚待解决的问题。首先，在 BL 的生物合成途径中，有一些反应的酶还没有被发现，如菜油甾醇到 4-en-one、3-one 到 6-oxoCN、22-OH-3-one 到 6-deoxoCT、6-deoxoCT 到 6-deoxoCS 以及 3DT 到 CS 的生物合成途径中的酶，需要进一步对这些未知的生物合成途径进行探究，通过筛选 BL 合成突变体，分离并鉴定新的酶，分析其功能和催化的反应步骤。第二，在植物甾醇的生物合成途径中，有的酶可以催化不同底物发生相同的反应，如 CYP85A1 可催化 BL 生物合成途径中多个中间体的 C₆ 位氧化反应；CYP90B1 催化晚期 C₂₂ 羟基化途径中多个底物的 C₂₂ 位羟基化；另外，不同的酶可以催化相同的反应过程，如 SMT2 和 SMT3 都可催化侧链 C₄ 位的乙基化。这些酶的功能比较复杂，需要进一步去探究它们的调控机制。第三，一些植物甾醇的生物合成途径比较长，且具有高度的复杂性，这种情况下酶的反应往往不完全，易产生限速步骤，有待于进一步优化生物合成途径，以提高产量。

通过合成生物学技术将植物甾醇的生物合成途径导入异源底盘微生物中，只需要利用廉价易得的碳源就可实现植物甾醇的从头合成，不仅能够高效获得目标产物，而且环境友好，具有广阔的市场发展前景及社会经济效益。对植物甾醇生物合成途径进行系统的研究将会为更好地利用现代合成生物学技术获得目标甾醇提供优选方案。随着对更多植物甾醇生物合成途径的解析和更多合成酶的发现与表征，以及关键催化酶的活性提升和底盘细胞的代谢工程改造，有望进一步提升植物甾醇在微生物细胞中的合成效率和产量，使植物甾醇的规模化发酵生产成为可能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张沙, 邓圣庭, 方成堃, 等. 植物甾醇的性质、生理功能及其在动物生产中的应用研究 [J]. 湖南饲料, 2022(1): 43-48.
- [2] Sonawane P D, Pollier J, Panda S, *et al.* Plant cholesterol

biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism [J]. *Nat Plants*, 2016, 3: 16205.

- [3] Zhang X, Lin K Q, Li Y X. Highlights to phytosterols accumulation and equilibrium in plants: Biosynthetic pathway and feedback regulation [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 155: 637-649.
- [4] Grosjean K, Mongrand S, Beney L, *et al.* Differential effect of plant lipids on membrane organization: Specificities of phytosphingolipids and phytosterols [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(9): 5810-5825.
- [5] 王学敏, 何梅, 高丽芳, 等. 两种不同植物甾醇酯降血脂效果的比较研究 [J]. 中国食物与营养, 2020, 26(2): 58-61.
- [6] 方祁利, 路雪纯, 肖婧泓, 等. 植物甾醇酯合成方法的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(1): 183-190.
- [7] Moreau R A, Nyström L, Whitaker B D, *et al.* Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses [J]. *Prog Lipid Res*, 2018, 70: 35-61.
- [8] Nyström L, Schär A, Lampi A M. Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2012, 114(6): 656-669.
- [9] Duperon R, Thiersault M, Duperon P. High level of glycosylated sterols in species of *Solanum* and sterol changes during the development of the tomato [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(4): 743-746.
- [10] Whitaker B D. Changes in the steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(11): 3411-3416.
- [11] Tarazona P, Feussner K, Feussner I. An enhanced plant lipidomics method based on multiplexed liquid chromatography-mass spectrometry reveals additional insights into cold- and drought-induced membrane remodeling [J]. *Plant J*, 2015, 84(3): 621-633.
- [12] Rudell D R, Buchanan D A, Leisso R S, *et al.* Ripening, storage temperature, ethylene action, and oxidative stress alter apple peel phytosterol metabolism [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(11/12): 1328-1340.
- [13] 兰雪, 王玮, 张少英. 油菜素内酯对植物根发育调控机制研究进展 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(4): 1162-1169.
- [14] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 植物甾醇生物合成与关键酶基因研究进展 [J]. 农业科学, 2018, 0(3): 5-7.
- [15] Li X, Xin Y, Mo Y Q, *et al.* The bioavailability and biological activities of phytosterols as modulators of cholesterol metabolism [J]. *Molecules*, 2022, 27(2): 523.
- [16] 姚扶有. 食物中的胆固醇“天敌”: 植物甾醇 [J]. 科学养生, 2019(1): 17-18.

- [17] Cabral C E, Klein M R S T. Phytosterols in the treatment of hypercholesterolemia and prevention of cardiovascular diseases [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2017, 109(5): 475-482.
- [18] Li Q, Xing B H. A phytosterol-enriched spread improves lipid profile and insulin resistance of women with gestational diabetes mellitus: A randomized, placebo-controlled double-blind clinical trial [J]. *Diabetes Technol Ther*, 2016, 18(8): 499-504.
- [19] 冯思敏, 宁可, 邵平, 等. β -谷甾醇和豆甾醇对小鼠急性结肠炎的治疗作用研究 [J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(12): 80-86.
- [20] de Vriese K, Pollier J, Goossens A, et al. Dissecting cholesterol and phytosterol biosynthesis via mutants and inhibitors [J]. *J Exp Bot*, 2021, 72(2): 241-253.
- [21] Valitova J N, Sulkarnayeva A G, Minibayeva F V. Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions [J]. *Biochemistry*, 2016, 81(8): 819-834.
- [22] Zhao Q, Li R, Chen X, et al. Cloning and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase from *Fritillaria cirrhosa* D. Don [J]. *Braz Arch Biol Technol*, 2018, 61: e18170788.
- [23] Kim Y J, Lee O R, Oh J Y, et al. Functional analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase encoding genes in triterpene saponin-producing ginseng [J]. *Plant Physiol*, 2014, 165(1): 373-387.
- [24] 谢琴鼎, 陈瑶, 唐亚琴, 等. 植物三萜代谢途径中角鲨烯合成酶研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(9): 2997-3005.
- [25] Devarenne T P, Shin D H, Back K, et al. Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 349(2): 205-215.
- [26] Dai J N, Zheng W, Yu J, et al. cDNA cloning, prokaryotic expression, and functional analysis of squalene synthase (SQS) in *Camellia vietnamensis* Huang [J]. *Protein Expr Purif*, 2022, 194: 106078.
- [27] Navarro Gallón S M, Elejalde-Palmett C, Daudu D, et al. Virus-induced gene silencing of the two squalene synthase isoforms of apple tree (*Malus domestica* L.) negatively impacts phytosterol biosynthesis, plastid pigmentation and leaf growth [J]. *Planta*, 2017, 246(1): 45-60.
- [28] Gas-Pascual E, Berna A, Bach T J, et al. Plant oxidosqualene metabolism: Cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109156.
- [29] Guo S Y, Yin Y, Lei T, et al. A cycloartenol synthase from the steroidal saponin biosynthesis pathway of *Paris polyphylla* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2021, 23(4): 353-362.
- [30] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 基于转录组测序的铁皮石斛植物甾醇生物合成相关基因分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2019, 27(6): 693-701.
- [31] Zhou W X, Warrilow A G S, Thomas C D, et al. Functional importance for developmental regulation of sterol biosynthesis in *Acanthamoeba castellanii* [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(10): 1164-1178.
- [32] Ramadan A M, Azeiz A A, Baabad S, et al. Control of β -sitosterol biosynthesis under light and watering in desert plant *Calotropis procera* [J]. *Steroids*, 2019, 141: 1-8.
- [33] Carland F, Fujioka S, Nelson T. The sterol methyltransferases SMT1, SMT2, and SMT3 influence *Arabidopsis* development through nonbrassinosteroid products [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(2): 741-756.
- [34] Shi J, Gonzales R A, Bhattacharyya M K. Identification and characterization of an *S*-adenosyl-*L*-methionine: Delta 24-sterol-*C*-methyltransferase cDNA from soybean [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(16): 9384-9389.
- [35] Guan H Y, Su P, Zhao Y J, et al. Cloning and functional analysis of two sterol- C_{24} -methyltransferase 1 (SMT1) genes from *Paris polyphylla* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(7): 595-604.
- [36] 钱虹萍, 林金星, 崔亚宁. 固醇合成途径关键基因 SMT2、SMT3 在植物免疫中的功能研究 [J]. *电子显微学报*, 2021, 40(2): 170-177.
- [37] Darnet S, Rahier A. Plant sterol biosynthesis: Identification of two distinct families of sterol 4 α -methyl oxidases [J]. *Biochem J*, 2004, 378(Pt 3): 889-898.
- [38] Rahier A. Dissecting the sterol C-4 demethylation process in higher plants. From structures and genes to catalytic mechanism [J]. *Steroids*, 2011, 76(4): 340-352.
- [39] Song J Q, Sun S L, Ren H W, et al. The SMO1 family of sterol 4 α -methyl oxidases is essential for auxin- and cytokinin-regulated embryogenesis [J]. *Plant Physiol*, 2019, 181(2): 578-594.
- [40] Men S Z, Boutté Y, Ikeda Y, et al. Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(2): 237-244.
- [41] 马学敏, 孙爽莉, 杨海灵, 等. 植物固醇合成途径关键基因 CPI1 的功能进化 [J]. *植物学报*, 2013, 48(4): 398-410.
- [42] Lovato M A, Hart E A, Segura M J, et al. Functional cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cycloeucaenol cycloisomerase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(18): 13394-13397.

- [43] Rahier A, Karst F. Plant cyclopropylsterol-cycloisomerase: Key amino acids affecting activity and substrate specificity [J]. *Biochem J*, 2014, 459(2): 289-299.
- [44] Lepesheva G I, Waterman M R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(3): 467-477.
- [45] Waterman M R, Lepesheva G I. Sterol 14 α -demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(1): 418-422.
- [46] 丁冠军. 羊毛甾醇 C-14 去甲基反应中 CYP51 酶催化体系的构建及功能研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2016.
- [47] Cabello-Hurtado F, Zimmerlin A, Rahier A, et al. Cloning and functional expression in yeast of a cDNA coding for an obtusifoliol 14 α -demethylase (CYP51) in wheat [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 230(2): 381-385.
- [48] Nelson D R, Schuler M A, Paquette S M, et al. Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(2): 756-772.
- [49] Kim H B, Schaller H, Goh C H, et al. *Arabidopsis* cyp51 mutant shows postembryonic seedling lethality associated with lack of membrane integrity [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(4): 2033-2047.
- [50] Gachotte D, Meens R, Benveniste P. An *Arabidopsis* mutant deficient in sterol biosynthesis: Heterologous complementation by ERG 3 encoding a Δ^7 -sterol-C-5-desaturase from yeast [J]. *Plant J*, 1995, 8(3): 407-416.
- [51] Gachotte D, Husselstein T, Bard M, et al. Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a Δ^7 -sterol-C-5-desaturase by functional complementation of a defective yeast mutant [J]. *Plant J*, 1996, 9(3): 391-398.
- [52] Choe S, Noguchi T, Fujioka S, et al. The *Arabidopsis* dwf7/ste1 mutant is defective in the Δ^7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(2): 207-221.
- [53] Silvestro D, Andersen T G, Schaller H, et al. Plant sterol metabolism. Δ^7 -sterol-C₅-desaturase (STE1/DWARF7), $\Delta^{5,7}$ -sterol- Δ^7 -reductase (DWARF5) and Δ^{24} -sterol- Δ^{24} -reductase (DIMINUTO/DWARF1) show multiple subcellular localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56429.
- [54] Lecain E, Chenivresse X, Spagnoli R, et al. Cloning by metabolic interference in yeast and enzymatic characterization of *Arabidopsis thaliana* sterol Δ^7 -reductase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(18): 10866-10873.
- [55] Choe S, Dilkes B P, Gregory B D, et al. The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119(3): 897-907.
- [56] Morikawa T, Mizutani M, Aoki N, et al. Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in *Arabidopsis* and tomato [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 1008-1022.
- [57] 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.
- [58] Gutiérrez-García L, Arró M, Altabella T, et al. Structural and functional analysis of tomato sterol C₂₂ desaturase [J]. *BMC Plant Biol*, 2021, 21(1): 141.
- [59] Lara J A, Burciaga-Monge A, Chávez A, et al. Identification and characterization of sterol acyltransferases responsible for steryl ester biosynthesis in tomato [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 588.
- [60] Nitbani F O, Tjitda P J P, Nurohmah B A, et al. Preparation of fatty acid and monoglyceride from vegetable oil [J]. *J Oleo Sci*, 2020, 69(4): 277-295.
- [61] Garcia R E, Mudd J B. Fatty acid and sterol specificity in the biosynthesis of steryl esters by enzyme preparations from spinach leaves [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1978, 190(1): 315-321.
- [62] Bouvier-Navé P, Benveniste P. Sterol acyl transferase and steryl ester hydrolase activities in a tobacco mutant which overproduces sterols [J]. *Plant Sci*, 1995, 110(1): 11-19.
- [63] Banas A, Carlsson A S, Huang B Q, et al. Cellular sterol ester synthesis in plants is performed by an enzyme (phospholipid: Sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA: Sterol acyltransferases [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(41): 34626-34634.
- [64] Bouvier-Navé P, Berna A, Noiriel A, et al. Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(1): 107-119.
- [65] Kumar M S S, Mawlong I, Ali K, et al. Regulation of phytosterol biosynthetic pathway during drought stress in rice [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 129: 11-20.
- [66] Heinz P, Glomb M A. Characterization and quantitation of steryl glycosides in *Solanum melongena* [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(43): 11398-11406.
- [67] 余劲夫, 李家儒. 植物中甾醇糖基转移酶的研究进展 [J]. *生物资源*, 2021, 43(1): 10-16.

- [68] Lim E K, Bowles D J. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis [J]. *EMBO J*, 2004, 23(15): 2915-2922.
- [69] Chaturvedi P, Misra P, Tuli R. Sterol glycosyltransferases: The enzymes that modify sterols [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(1): 47-68.
- [70] Mishra M K, Chaturvedi P, Singh R, et al. Overexpression of WsSGTL1 gene of *Withania somnifera* enhances salt tolerance, heat tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e63064.
- [71] Ullmann P, Rimmel D, Benveniste P, et al. Phospholipid-dependence of plant UDP-glucose-sterol- β -D-glucosyltransferase. II. Acetone-mediated delipidation and kinetic studies [J]. *Plant Sci Lett*, 1984, 36(1): 29-36.
- [72] Potocka A, Zimowski J. Metabolism of conjugated sterols in eggplant. part 1. UDP-glucose: Sterol glucosyltransferase [J]. *Acta Biochim Pol*, 2008, 55(1): 127-134.
- [73] Bouvier-Navé P, Ullmann P, Rimmel D, et al. Phospholipid-dependence of plant UDP-glucose-sterol- β -D-glucosyltransferase. I. Detergent-mediated delipidation by selective solubilization [J]. *Plant Sci Lett*, 1984, 36(1): 19-27.
- [74] Ferrer A, Altabella T, Arró M, et al. Emerging roles for conjugated sterols in plants [J]. *Prog Lipid Res*, 2017, 67: 27-37.
- [75] Warnecke D C, Heinz E. Purification of a membrane-bound UDP-glucose: Sterol β -D-glucosyltransferase based on its solubility in diethyl ether [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105(4): 1067-1073.
- [76] Madina B R, Sharma L K, Chaturvedi P, et al. Purification and physico-kinetic characterization of 3 β -hydroxy specific sterol glucosyltransferase from *Withania somnifera* L. and its stress response [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Proteins Proteom*, 2007, 1774(3): 392-402.
- [77] Stucky D F, Arpin J C, Schrick K. Functional diversification of two UGT80 enzymes required for steryl glucoside synthesis in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(1): 189-201.
- [78] DeBolt S, Scheible W R, Schrick K, et al. Mutations in UDP-Glucose: Sterol glucosyltransferase in *Arabidopsis* cause transparent testa phenotype and suberization defect in seeds [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(1): 78-87.
- [79] Li X L, Xia T, Huang J F, et al. Distinct biochemical activities and heat shock responses of two UDP-glucose sterol glucosyltransferases in cotton [J]. *Plant Sci*, 2014, 219/220: 1-8.
- [80] Forsee W T, Valkovich G, Elbein A D. Acylation of steryl glucosides by phospholipids. solubilization and properties of the acyl transferase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1976, 172(2): 410-418.
- [81] Potocka A, Zimowski J. Metabolism of conjugated sterols in eggplant. part 2. phospholipid: Steryl glucoside acyltransferase [J]. *Acta Biochim Pol*, 2008, 55(1): 135-140.
- [82] 白玉, 沙伟, 马天意. 油菜素内酯合成途径相关基因的研究进展 [J]. 高师理科学刊, 2021, 41(6): 69-74.
- [83] 任鸿雁, 王莉, 马青秀, 等. 油菜素内酯生物合成途径的研究进展 [J]. 植物学报, 2015, 50(6): 768-778.
- [84] Xu W J, Zheng B W, Bai Q W, et al. Functional study of the brassinosteroid biosynthetic genes from *Selaginella moellendorffii* in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0220038.
- [85] Ohnishi T. Recent advances in brassinosteroid biosynthetic pathway: Insight into novel brassinosteroid shortcut pathway [J]. *J Pestic Sci*, 2018, 43(3): 159-167.
- [86] Asami T, Nakano T, Fujioka S. Plant brassinosteroid hormones [J]. *Vitam Horm*, 2005, 72: 479-504.
- [87] Park C H, Jang M S, Yun J H, et al. Effects of secondary mutation in det2-1 on root growth and development in *Arabidopsis* [J]. *J Plant Biol*, 2014, 57(4): 255-263.
- [88] Fujita S, Ohnishi T, Watanabe B, et al. *Arabidopsis* CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols [J]. *Plant J*, 2006, 45(5): 765-774.
- [89] Ohnishi T, Godza B, Watanabe B, et al. CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of *Arabidopsis*, catalyzes C-3 oxidation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(37): 31551-31560.
- [90] Ohnishi T, Szatmari A M, Watanabe B, et al. C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 3275-3288.
- [91] Duan F M, Ding J, Lee D S, et al. Overexpression of SoCYP85A1, a spinach cytochrome P450 gene in transgenic tobacco enhances root development and drought stress tolerance [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1909.
- [92] Nomura T, Kushiro T, Yokota T, et al. The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 17873-17879.
- [93] 崔苗苗, 马琳, 张锦锦, 等. 紫花苜蓿 MsDWF4 的表达特性及耐盐性效应 [J]. 中国农业科学, 2020, 53(18): 3650-3664.
- [94] Azpiroz R, Wu Y W, LoCascio J C, et al. An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(2): 219-230.
- [95] Serrano-Cartagena J, Robles P, Ponce M R, et al. Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis*

- information service collection [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(4/5): 725-739.
- [96] Choe S, Dilkes B P, Fujioka S, *et al.* The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(2): 231-243.
- [97] Kim H B, Kwon M, Ryu H, *et al.* The regulation of DWARF4 expression is likely a critical mechanism in maintaining the homeostasis of bioactive brassinosteroids in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(2): 548-557.
- [98] Zhang D W, Ye H X, Guo H Q, *et al.* Transcription factor HAT1 is phosphorylated by BIN2 kinase and mediates brassinosteroid repressed gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2014, 77(1): 59-70.
- [99] Gao Y H, Zhang D Z, Li J. TCP1 modulates DWF4 expression via directly interacting with the GGNCCC motifs in the promoter region of DWF4 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Genet Genomics*, 2015, 42(7): 383-392.
- [100] 李小靖. 油菜素内酯合成基因 DWARF 在番茄生长发育中的功能 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [101] Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, *et al.* Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 770-779.
- [102] Jager C E, Symons G M, Nomura T, *et al.* Characterization of two brassinosteroid C-6 oxidase genes in pea [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(4): 1894-1904.
- [103] Shimada Y, Goda H, Nakamura A, *et al.* Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(1): 287-297.
- [104] Kim T W, Hwang J Y, Kim Y S, *et al.* *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2397-2412.
- [105] Du H X, Xiao W H, Wang Y, *et al.* Engineering *Yarrowia lipolytica* for campesterol overproduction [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146773.
- [106] Zhang Y, Wang Y, Yao M D, *et al.* Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(7): 1033-1039.
- [107] 周武林, 高惠芳, 吴玉玲, 等. 重组酿酒酵母生物合成菜油甾醇 [J]. *化工学报*, 2021, 72(8): 4314-4324.
- [108] 薛延团, 张晓凤, 张得钧. 植物甾醇降血脂作用的研究进展 [J]. *华西药理学杂志*, 2019, 34(1): 92-97.

[责任编辑 崔艳丽]

第四届中国中药资源大会银川成功召开



2022 年 8 月 18—19 日第四届中国中药资源大会在宁夏银川隆重召开。本届大会由中国中药协会、中国自然资源学会联合主办，以“中药资源与产业高质量发展——东西部科技合作助力黄河流域中药资源产业高质量发展”为主题，旨在贯彻习近平总书记关于黄河流域生态保护和高质量发展的重要指示要求和视察宁夏重要讲话精神，推动宁夏高水平建设全国东西部科技合作引领区，有效服务于国家乡村振兴和健康中国战略。

本届大会采用线上线下相结合的方式同步召开，来自全国 27 个省、自治区、直辖市和香港特别行政区的专家、学者、企业代表汇聚一堂。本届大会组委会主席、中国自然资源学会中药及天然药物资源专业委员会主任委员、南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心主任段金廛教授主持开幕式，大会学术委员会主席、中国工程院院士、国家中医药管理局副局长、中国中药协会会长黄璐琦，大会学术委员会名誉主席、中国工程院院士、国际著名药用植物与传统药物学家肖培根等 15 位中医药及农业领域知名专家做大会特邀报告。天津中草药杂志社陈常青总经理兼总编应邀参加并与各位到会专家深入交流，天津中草药杂志社作为一个中医药领域学术交流平台，努力在中药资源与产业高质量发展中作出更大贡献。

(本刊讯)