

基于蟾蜍分泌腺转录组对蟾蜍二烯酸内酯合成途径关键基因的挖掘

张灵迁, 王普庆, 周罗静, 高继海, 侯飞侠*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 挖掘蟾蜍二烯酸内酯 (bufadienolides, BDs) 生物合成途径的关键基因。**方法** 使用激光捕获显微切割技术捕获中华大蟾蜍分泌腺[耳后浆液腺 (CE)、皮肤浆液腺 (CK) 和皮肤粘液腺 (CN)] 为实验材料, 在 DNBseq 测序平台进行转录组测序, 并进行生信分析及对转录组结果进行验证。**结果** 共得到 63.01 Gb 原始数据和 4 550 个差异基因, 其中 CE 和 CK 共有上调差异基因 880 个, 其 GO 和 KEGG 富集显示主要在甾类激素生物合成、胆汁酸合成和 C₂₁ 类固醇生物合成等功能; CN 上调差异基因主要富集在蛋白质糖基化、细胞黏结、体液免疫应答等功能。在 CE、CK 组上调的差异基因富集结果中发现有 28 种与 BDs 合成相关的物质的代谢、合成及运输等功能, 且参与调控的基因有 94 个。对上述基因进行蛋白互作网络分析 (protein-protein interaction network, PPI) 分析, 结果显示, 94 个基因中有 34 个存在互作关系, 其中基因 *AMACR*、*HSD17B4*、*SCP2* 及 *ACOT8* 参与调控胆汁酸合成, 基因 *LOC122926609* 参与调控石胆酸结合, 结合文献分析, 作者认为初级胆汁酸合成途径是 BDs 合成的下游途径, 石胆酸可能是 BDs 类成分的重要前体。进一步将存在互作关系的基因关联到表达量矩阵中, 结果显示大部分基因在样品 CE 和 CK 组中的表达量均大于 CN 组, 且上述 5 个基因的表达趋势一致 (CE、CK > CN), 认为这几个基因是调控 BDs 的下游合成途径的关键基因。在上述基础上选取 9 个与 BDs 合成相关的基因进行 qRT-PCR 分析, 结果与转录组测序基因表达趋势一致, 认为该结果具有准确性。**结论** 完成了中华大蟾蜍分泌腺的转录组研究, 推测出 BDs 下游合成途径的关键基因, 为蟾毒内酯类化合物的生物合成途径研究提供了丰富的参考数据, 也为深入研究该类化合物生物合成的分子机制奠定了基础。

关键词: 中华大蟾蜍; 分泌腺; 蟾蜍二烯酸内酯; 下游途径; 关键基因

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)01-0258-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.026

Mining key genes of BDs synthesis pathway based on the transcriptome of *Bufo bufo gargarizans* secretion gland

ZHANG Lingyu, WANG Puqing, ZHOU Luoqing, GAO Jihai, HOU Feixia

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To explore the key genes of bufadienolides (BDs) biosynthesis pathway. **Methods** The secretory glands of *Bufo bufo gargarizans* [retroauricular serous glands (CE), dermal serous glands (CK) and dermal mucous glands (CN)] were captured by laser capture microdissection technology as experimental materials. Transcriptome sequencing and biogenic analysis were performed on DNBseq sequencing platform, and the transcriptome results were analyzed and verified. **Result** A total of 63.01Gb of original data and 4 550 differential genes were obtained. There were 880 up-regulated differential genes of CE and CK, and their GO and KEGG enrichment showed that they were mainly involved in steroid hormone biosynthesis, bile acid synthesis and C₂₁ steroid biosynthesis. CN up-regulated differential genes were mainly concentrated in protein glycosylation, cell bonding, humoral immune response and other functions. In the up-regulated differential gene enrichment results of CE and CK groups, 28 kinds of substances related to BDs synthesis were found to have functions such as metabolism, synthesis and transportation, and 94 genes were involved in regulation. PPI analysis of the above genes showed that 34 of the 94 genes had interaction, among which *AMACR*, *HSD17B4*, *SCP2* and *ACOT8* were involved in the regulation of bile acid synthesis, and *LOC122926609* was involved in the regulation of lithic acid binding. Combined with literature analysis, the authors suggest that the primary bile acid synthesis

收稿日期: 2023-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903757); 四川省科技厅科技计划 (22CXTD0009, 2020ZYD058); 四川省药用动物规范化生产现状及可持续利用研究 (2023JDR0053)

作者简介: 张灵迁, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药品种、质量与资源开发应用研究。E-mail: zhanglingyu20190503@outlook.com

*通信作者: 侯飞侠, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: houfeixia123@163.com

pathway is the downstream pathway of BDs synthesis and lithic acid may be an important precursor of BDs components. The genes with interaction relationship were further associated into the expression matrix, the results showed that the expression levels of most of the genes in the CE and CK groups were higher than those in the CN group, and the expression trend of the above five genes was consistent (CE, CK > CN). It was considered that these genes were the key genes regulating the downstream synthesis pathway of BDs. Any 9 genes related to BDs synthesis were selected for qRT-PCR analysis, and the results were consistent with the gene expression trend of transcriptome sequencing, which suggested that the transcriptome results were accurate. **Conclusion** The transcriptome of the secretory gland of *Bufo bufo gargarizans* was studied, and the key genes of the downstream synthesis pathway of BDs were speculated, which provided rich reference data for the biosynthesis pathway of bufalin compounds, and laid a foundation for further study of the molecular mechanism of the biosynthesis of bufalin compounds.

Key words: *Bufo bufo gargarizans* Cantor; secretory gland; bufadienolides; downstream path; key gene

蟾酥是蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 皮肤腺体的干燥分泌物。蟾蜍皮肤存在 2 种外分泌腺：一种是黏液腺又称腺泡腺^[1-2]，负责产生黏多糖和黏蛋白多糖，黏多糖自发的分泌能使皮肤保持湿润；另一种是浆液腺又称为合胞腺^[1]，腺中充满肽类、胍衍生物、生物胺、甾体以及生物碱等内含物^[3]，其中甾体类物质蟾蜍二烯酸内酯 (bufadienolides, BDs) 是蟾蜍抵御天敌的主要毒性物质，也是蟾酥主要的药效成分^[4]。BDs 在细胞中作为一种 Na^+ , K^+ -ATP 酶抑制剂^[5]，可增加细胞内钙浓度，破坏细胞内钙稳态，并诱导不同类型的细胞凋亡，是重要的抗癌药物^[6-7]。目前 BDs 的主要获取途径是从蟾酥中提取，此方法依靠野生蟾蜍为主要原材料，势必会造成野生蟾蜍的衰退甚至灭绝。微生物转化和化学合成是替代从野生蟾蜍提取 BDs 的重要手段，但目前关于 BDs 生物合成途径的研究较少，导致现阶段对其合成的分子机制仍不清楚。

目前 BDs 合成途径研究显示，胆固醇是该类化合物的前体物质^[8]，涉及的基因家族包括 CYP450、UGTs、ATS 等；涉及的关键酶有 SRD5 β 、3 β -HSD 和 CYP11A1 等，研究人员从蟾蜍耳后腺中克隆了 3 β -羟基类固醇脱氢酶 (3 β HSD) 和类固醇 5 β -还原酶 (5 β SRD) ^[9-10]，并推测这 2 种酶是将 BDs 母核 A/B 环转化为顺式构型的关键酶，其中 3 β HSD 是类固醇生成组织中孕酮、雌激素和雄激素生物合成的重要步骤，可分别催化孕烯醇酮和脱氢表雄酮转化为孕酮和雄烯二酮；5 β SRD 催化孕酮为孕烯醇酮，可以将孕酮还原为 5 β -二氢孕酮；CYP11A1 在工程酵母试验中被鉴定为切割胆固醇侧链的酶^[11]。这些结果推动了 BDs 类化合物合成途径的研究进展，但到目前为止，人们对其合成途径中诸多中间体转化所涉及的基因和酶的了解仍处于初级阶段，还需进

一步挖掘和研究。

现代研究认为，不同细胞之间基因的表达水平及其功能存在显著差异^[12]。激光捕获显微切割 (laser capture microdissection, LCM) 是一种在不丢失空间信息的情况下探索局部细胞群体的强大技术^[13]，结合转录组研究可以在空间上探索细胞群体的基因表达情况。目前此技术在医学、农学和微生物感染等领域有所应用^[14-16]，而在天然药物的应用较少。本研究利用此技术捕获了中华大蟾蜍背部疣粒的浆液腺和黏液腺细胞以及耳后腺中浆液腺细胞，并利用微量建库的方法完成了 3 种分泌腺细胞的转录组研究。课题组推测，浆液腺中的上调基因可能与 BDs 的合成有关，以此筛选该类化合物合成途径的关键基因，探讨 BDs 生物合成的分子机制。

1 材料

中华大蟾蜍样品捕获于课题组自养 2 年龄材料，经成都中医药大学侯飞侠副教授鉴定为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor。

2 方法

2.1 样品采集和前处理

样品经无菌水洗净，乙醚麻醉后剪取皮肤，挑取背部疣粒和耳后腺体，置于磷酸缓冲盐 (phosphate buffered saline, PBS) 溶液中洗净，放入盛有 OCT 包埋剂的包埋盒中，立即放入液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存备用，实验设置 3 个重复。

2.2 蟾蜍腺体切片制备和显微观察

冷冻组织置 Thermo 冷冻切片机中切片，切片厚度 10~15 μm 。采用连续切片法，选取厚薄均匀、完整的切片，用 75%~90% 梯度酒精洗脱固定后染色。染色方法如下：苏木素染色 2~3 min，蒸馏水洗去浮色，分化液 3 min，伊红染色 3 s，蒸馏水洗去浮色，梯度乙醇 (90%~75%) 洗脱，风干，光学显微镜下观察。

2.3 激光显微切割捕获分泌腺

冷冻切片在无酶水中洗去包埋剂，浸泡在无乙醇：冰乙酸（19：1）溶液中固定 2~3 min，使用 LeicaDFC7000T 激光捕获显微切割仪器进行目标材料捕获。实验前调试焦距和激光强度等参数，选择合适的绘图工具分别切下耳后腺中浆液腺（CE）、背部疣粒中粘液腺（CN）和浆液腺（CK）3 种分泌腺，每种分泌腺细胞数量不少于 5 000 个。使用含细胞裂解液的无酶 PCR 管收集捕获的细胞，瞬时离心，-80 °C 冷冻后用于转录组测序。

2.4 转录组建库和测序

采用 DNBSEQ Low Input Smart-Seq Eukaryotic mRNA library 方法对捕获的分泌腺细胞进行建库，利用 DNBSEQ 和 PE100 方法测序。通过 SOAPnuke 软件清除原始数据里包含接头，未知碱基（N 含量大于 5%）以及低质量的 reads，获得 Clean reads。

2.5 生物信息学分析

2.5.1 转录组数据的质控、比对和定量分析 利用 FastQC、Fastp 软件对 Clean reads 进行质量评估及剪切、过滤接头和低质量序列，得到高质量 clean data。使用 STAR-2.6.1b^[17] 软件将转录本比对在参考基因组中（ASM1485885v1），计算每个样品的比对率。用 featureCounts（1.6.0）^[18] 计算定量获得表达矩阵。用 R 软件包 DESeq2 根据原始表达矩阵构建 dds 矩阵，计算差异表达基因及对样品做主成分分析，使用伪发现率（false discovery rate, FDR）来校正多次检测的 *P* 值（FDR ≤ 0.05），并使用表达水平差异的倍数的双对倍数（log₂FC）来确定基因表达的显著性差异（log₂FC ≥ 2）。

2.5.2 差异基因的功能富集分析 注释序列用蛋白序列（GCF-014858855.1-ASM1485885v1-protein.faa）在 eggNOG-mapper[eggNOG-mapper (embl.de)] 网站中注释，作为 GO 富集的背景基因集，使用 clusterProfiler（4.4.4）R 包^[19] 进行 GO 富集分析。同时将蛋白序列上传到 KAAS [KAAS-KEGG Automatic Annotation Server (genome.jp)] 数据库中，用单向最佳命中率（single-directional best-hit, SBH）方法，以非洲爪蟾 *Xenopus laevis*、热带爪蟾 *Xenopus tropicalis*、南非爪蟾 *Nanorana parkeri* 和人 *Homo sapiens* 作参考物种，预测功能并建立 KEGG 背景基因集，使用 clusterProfiler（4.4.4）R 包进行 KEGG 富集分析。

2.5.3 蟾酥药效成分合成相关基因的蛋白互作分析和表达量分析 根据差异基因的 GO 和 KEGG 富

集分析结果，结合 PubMed 文献库检索挑选出与甾体激素合成、类固醇合成代谢胆汁酸合成等相关功能和通路的基因，并在 STRING[STRING: functional protein association networks (string-db.org)] 网站中，以非洲爪蟾为参考背景建立蛋白互作网络，并用 Cytoscape（3.7.1）^[20] 绘制网络图。

选取上述分析后存在互作关系的基因，关联到样品表达量矩阵中，使用微生信网站（https://bioinformatics.com.cn/plot_basic_ballon_plot_048）的小工具绘制表达量气泡图。

2.6 荧光定量 PCR 验证

选取转录组中识别的 9 个参与 BDs 合成相关差异表达基因，进行荧光定量 PCR（qRT-PCR）验证。以测序实验同批次样品的 cDNA 为模板，使用 GAPDH 为内参基因，利用 CDS 序列和 Primer 5 软件设计 qRT-PCR 特异性引物。采用 SsoFast™ Eva Green Supermix（Bio-Rad, USA）进行定量表达检测，采用 2^{-ΔΔC_t} 方法计算基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 中华大蟾蜍分泌腺显微观察

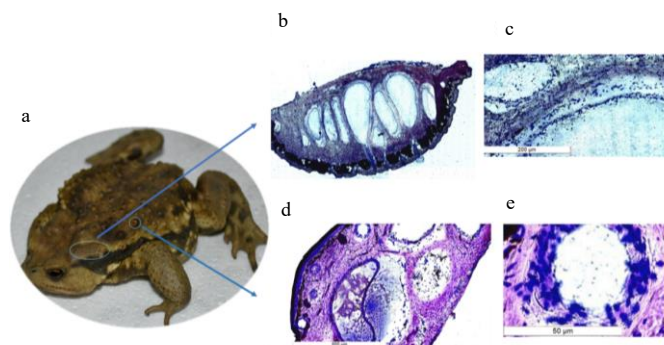
中华大蟾蜍背部疣粒的分布呈现从脊椎向两侧外延逐渐减少的趋势（图 1-a）。耳后腺显微切片观察发现其中的浆液腺形态呈椭圆形，几乎充满真皮层，腺体呈一字型紧密分布，两侧的浆液腺形态较小，中间的较大（图 1-b），其外围分布大量的分泌细胞（图 1-c）。背部疣粒切片可观察到疣粒中央散在分布有 2~4 个较大的圆形浆液腺（图 1-d），表皮下方分布 2~6 个圆形的粘液腺（图 1-e）。

3.2 转录组测序与比对结果

实验测得 9 个样品共计 clean reads 63.01 Gb，平均 GC 含量 44.45%，平均 Q₂₀ 96.85%，与参考基因组（ASM1485885v1）的平均比对率为 74.87%（表 1）。背景基因集注释了 26 064 条 GO terms，24 823 KEGG 通路，注释和比对质量较好，可用于后续实验。

3.3 差异基因表达分析及富集结果

3.3.1 差异基因表达基因分析 主成分分析显示各生物学重复的样本聚集，可得知每组样本之间具有特异性，表明了数据的可靠性（图 2-a）。3 种分泌腺中共检测到 4 550 个差异基因（DEGs），其中样品 CE 较 CK 上调 62 个基因，下调 254 个基因（图 2-b）；CE 较 CN 上调 1 062 个基因，下调 713 个基因（图 2-c）；CK 较 CN 上调 1 744 个基因，下调 712 个基因（图 2-d）；CE 和 CK 共有上调基因 880 个。



a-中华大蟾蜍形态, b-耳后腺显微结构 (10×5), c-耳后腺浆液腺显微结构 (10×20), d-背部疣粒显微结构 (10×10), e-背部疣粒粘液腺显微结构 (10×40)。

a-morphology *Bufo bufo gargarizans*, b-the microscopic structure of retroauricular glands (10 × 5), c-the microscopic magnification of the retroauricular serous glands (10 × 20), d-the microscopic structure of the dorsal wart granules (10 × 10), e-the microscopic structure of the dorsal wart granules mucous glands (10 × 40).

图 1 中华大蟾蜍形态及分泌腺显微结构图

Fig. 1 Morphology and secretory gland microstructure of *Bufo bufo gargarizans*

表 1 中华大蟾蜍分泌腺转录组测序及比对数据

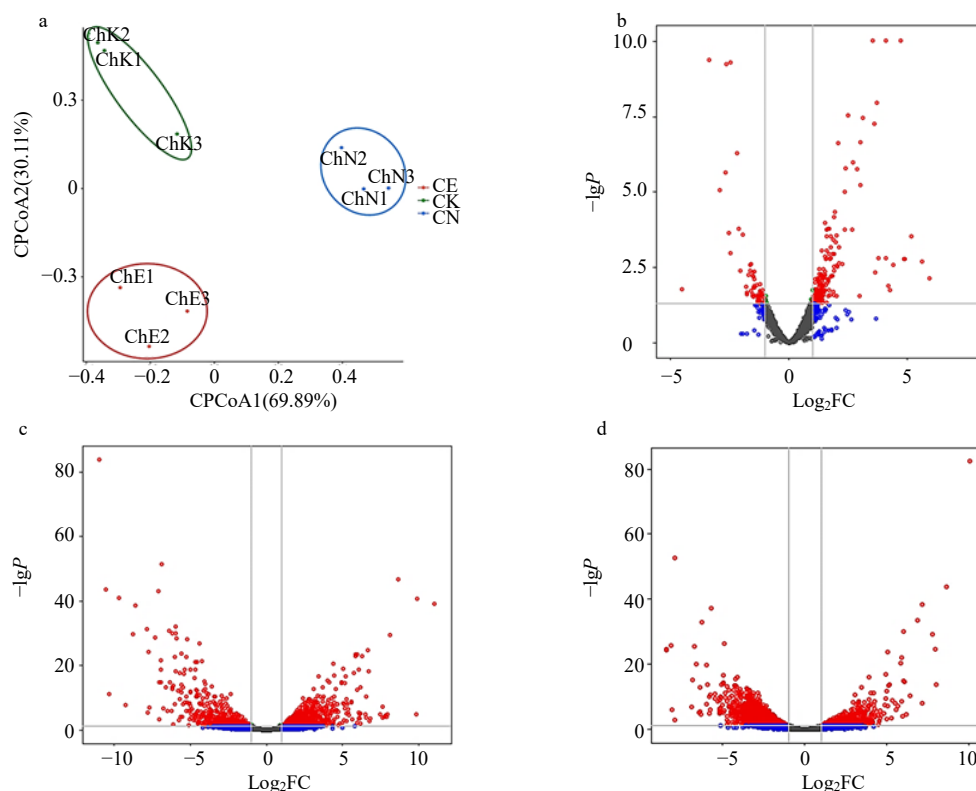
Table 1 Transcriptome sequencing and comparison data of secretory gland of *Bufo bufo gargarizans*

样品名	高质量读段	有效数据量	Q20/%	GC/%	比对率/%
CE1	36 109 934	7 221 986 800	96.64	44.80	75.76
CE2	27 576 380	5 515 276 000	96.57	44.83	74.74
CE3	31 713 520	6 342 704 000	96.88	44.79	74.74
CK1	35 211 188	7 042 237 600	96.42	44.36	74.01
CK2	36 016 109	7 203 221 800	96.99	44.83	76.10
CK3	28 404 783	5 680 956 600	96.78	44.74	75.18
CN1	36 121 513	7 224 302 600	96.98	43.94	73.62
CN2	36 010 299	7 202 059 800	97.11	43.87	74.13
CN3	36 036 680	7 207 336 000	97.27	43.91	75.58

3.3.2 差异基因富集分析 将差异基因进行 KEGG 和 GO 富集分析以深入了解差异基因的生物学功能。结果显示, 样品 CK 和 CE 共有 316 个 DEGs, 其中 CK 较 CE 上调 DEGs 254 个 ($P < 0.05$, $\log_2FC \geq 2$), GO 富集主要涉及含吡啶化合物的代谢 (GO:0072524)、脂肪酸分解代谢 (GO:0009062)、羧酸分解代谢 (GO:0046395) 和过氧化物酶体 (GO:0005777); KEGG 通路主要富集在甾类激素生物合成 (ko00140)、过氧酶体 (ko04146)、原代脂肪酸代谢 (ko00120) 和花生四烯酸途径 (ko00590) 等途径。CK 较 CE 下调 62 个 DEGs ($P < 0.05$, $\log_2FC \geq 2$), GO 富集功能主要在含吡啶化合物的代谢过程 (GO:0072524)、雌二醇-17 β -脱氢酶活性 (GO:0004303)、有机酸分解代谢过程 (GO:0016054)、羧酸分解代谢过程 (GO:0046395) 和甲基转移酶活性 (GO:0008168) 等; 在 KEGG 富集主要涉及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解 (ko00280)、甾类激素生物合成 (ko00140)、类固醇生物合成 (ko00100) 等。

样品 CE 和 CN 共存在 1 775 个 DEGs, 其中 CE 较 CN 上调 1062 个 DEGs ($P < 0.05$, $\log_2FC \geq 2$), GO 富集主要涉及类固醇的生物合成 (GO:0006694)、类固醇代谢过程的调节 (GO:0019218)、花生四烯酸的分泌 (GO:0050482) 和泛素样蛋白连接酶活性 (GO:0061659) 等; KEGG 富集涉及通路有甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (ko00260)、脂肪酸降解 (ko00071) 和乙醛酸和二羧酸代谢 (ko00630) 等。CE 较 CN 下调 713 个 DEGs ($P < 0.05$, $\log_2FC \geq 2$), GO 功能富集主要涉及粘液层 (GO:0070701)、蛋白-O-糖基化 (GO:0006493)、细胞对凝集素的反应 (GO:1990858) 和先天免疫反应激活细胞表面受体信号通路 (GO:00022200) 等; KEGG 富集主要涉及矿物质的吸收 (ko04978)、甲状腺激素信号通路 (ko04919)、细胞粘附 (ko04510) 和 JAK-STAT 信号通路和轴突导向 (ko04360) 等。

样品 CK 与 CN 共有 2 457 个 DEGs, 其中 CK 较 CN 上调 1 744 个 DEGs ($P < 0.05$, $\log_2FC \geq 2$), GO 富集主要涉及在有机酸分解代谢过程 (GO:0016054)、



a-组间样品主成分分析, 绿色圆圈为 CK 样本, 蓝色圆圈为 CN 样本, 红色圆圈为 CE 样本。b、c、d-分别为 CE 与 CK、CE 与 CN、CK 与 CN 的差异基因火山图 (红色圆点表示 $P < 0.05$, $\log_2 FC \geq 2$; 蓝色圆点表示 $P \geq 0.05$, $\log_2 FC \geq 2$; 灰色圆点表示 $P \geq 0.05$, $\log_2 FC < 2$; 绿色圆点表示 $P < 0.05$, $\log_2 FC < 2$)。

a-the principal component analysis of samples between groups. Green circle is the CK sample, the blue circle is the CN sample and the red circle is the CE sample b, c, d-differential genes volcano figures of CE and CK, CE and CN, CK and CN (red dots indicate $P < 0.05$, $\log_2 FC \geq 2$; blue dots indicate $P \geq 0.05$, $\log_2 FC \geq 2$; gray dots indicate $P \geq 0.05$, $\log_2 FC < 2$; green dots indicate $P < 0.05$, $\log_2 FC < 2$).

图 2 样品间差异表达基因数量统计及主成分分析图

Fig. 2 Number statistics and principal component analysis of differentially expressed genes among samples

类固醇生物合成的过程 (GO:0006694)、17-00 甾酮还原酶活性 (GO:0072555) 和 c21 甾体激素生物合成过程 (GO:0006700) 等; KEGG 富集主要涉及过氧酶体通路 (ko04146)、甾类激素生物合成 (ko00140)、P40 细胞色素对外源的代谢作用 (ko00980) 和氨基苯甲酸酯降解 (ko00627) 等。CK 较 CN 下调 712 个 DEGs ($P < 0.05$, $\log_2 FC \geq 2$), GO 功能富集主要有蛋白质糖基化 (GO:0006486)、刺激 C 型凝集素受体信号通路 (GO:0002223)、外源凝集素响应答 (GO:1990858) 和体液免疫应答 (GO:0006959) 等; KEGG 主要富集在 ECM-受体交互通路、细胞粘附 (ko04510) 和中性粒细胞外陷形成 (ko04613) 等通路。

3.4 蟾酥药效成分生物合成基因的筛选

BDs 生物合成途径很可能是复杂的网络结

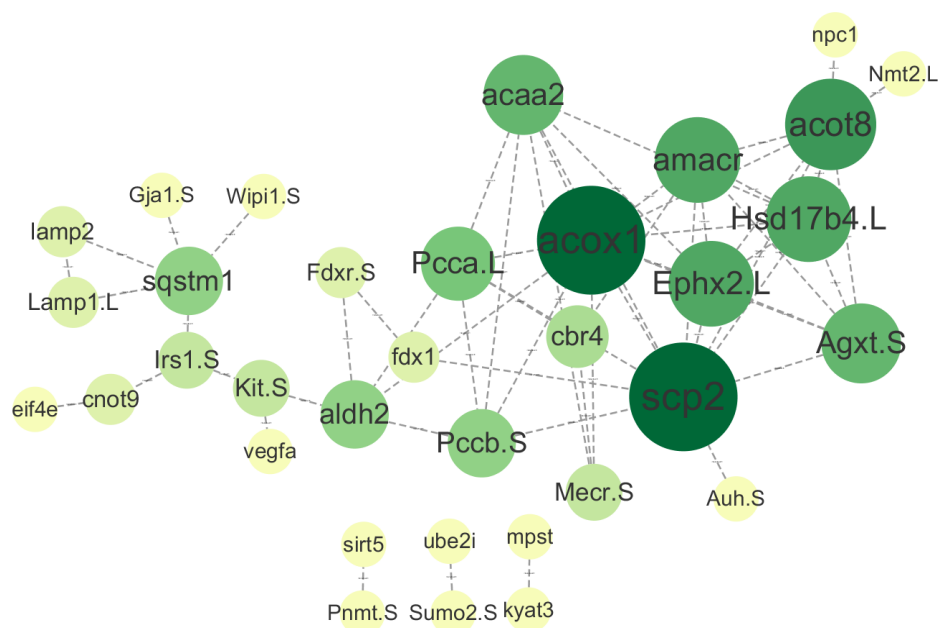
构^[20], 目前研究的途径主要有两种, 一是通过甲羟戊酸→胆固醇→孕烯醇酮→孕酮→强心甾类^[21], 二是胆固醇通过胆汁酸合成途径合成蟾毒内酯类化合物^[4], 结合相关文献, 在样品 CE、CK 上调差异基因的功能富集结果中检索出包括类固醇、甾酮、雌二醇、前列腺素、雄甾酮、花生四烯酸、石胆酸、胆汁酸在内的 28 种物质的代谢、合成及运输等功能, 发现 94 个基因参与调控, 见表 2。

3.4.1 相关基因的蛋白互作网络分析 为进一步探究上述基因之间的关系 (图 3), 利用近缘物种非洲爪蟾 *X. laevis* 作参考数据集, 将上述基因在 STRING 数据库中计算, 结果显示 94 个基因中有 34 个基因存在互作关系, 如图 4 所示, 主网络富集的 KEGG 途径是初级胆汁酸生物合成 (XLA00120); 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降 (XLA00280)、丙氨酸代谢

表 2 蟾酥药效成分合成相关功能基因展示

Table 2 Display of functional genes related to synthesis of drug constituents of *bufonis venenum*

生物功能	基因
甾酮生物合成过程(脱氢酶活性[NAD(P)]、17- β -脱氢酶[NADP ⁺])	HSD17B4、LOC122926609、ALDH2、AACS
类固醇代谢过程(内稳态、酯化、酯酶活性、分解代谢、结合、响应)	ARV1、OSBPL2、NPC1、STARD5、LOC122926609、LRP1、WASHC1、LOC122923132、LOC122942482、FDX1、LOC122920683、ARV1、LOC122945772、HSD17B4、EPHX2、LOC122937803、NSDHL、ACAA2、LOC122928538、FECH、FDXR、LOC122921886、LOC122926658、LOC122920446、LOC122923132、ACOX1、CCDC22、TMEM97、AGT、NCEH1、AACS
胆固醇生物合成过程(调节细胞内胆固醇转运、代谢过程、酯化、外排、吸收、输入、内稳态)	AACS、ARV1、LRP1、WASHC1、LOC122923132、LOC122942482、FDX1、EPHX2、AGT、WASHC1、LOC122926609、NPC1、STARD5、LOC122920683、LOC122945772、HSD17B4、LOC122937803、NSDHL、ACAA2、LOC122928538、FECH、LOC122921886、LOC122926658、LOC122920446、ACOX1、CCDC22、NPC1、TMEM97、ACOX1、OSBPL2、NPC1、STARD5、LOC122926658、OSBPL2
甾体生物合成过程(羟化酶活性、激素分泌、酯化、甾体脱氢酶活性、作用于 CH-OH 基团供体、NAD 或 NADP 为受体、分解代谢过程、C ₂₁ -甾体激素生物合成过程)	LOC122945772、LOC122935596、FZD4、AGT、WBP2、LOC122923919、PGRMC2、PGRMC2、UBE2I、CNOT9、LOC122940285、PAQR5、ADM、FDX1、FDXR、LOC122926658、LOC122942482、LOC122926609、HSD17B4、NSDHL、LOC122928538、LOC122921886、ARV1、LOC122937803、AMACR、OSBPL2、ACAA2、ACOT8、LOC122943473、NPC1、STARD5、LOC122923132、EPHX2、KIT、WBP2、UBE2I、CNOT9、LOC122923919、LOC122942482、AGT、WBP2、UBE2I、PGRMC2、PGRMC2、PAQR5、PAQR5、WBP2、UBE2I、CNOT9
酮类固醇单加氧酶活性, 17-酮类固醇还原酶活性	LOC122926609
倍半萜代谢过程	LOC122926609
次生代谢物生物合成过程	JAG2、MPST、AUH、LOC122932865、TH、LOC122926609、LOC122941639、CBR4、ARL1、LOC122923919、SQSTM1、LAMP2、LAMP1、LOC122940285、LOC122940285
视黄醇代谢过程	LOC122926609、LOC122938145
毒性物质代谢过程, 有毒物质结合	TH、LOC122941639、MPST、AUH、ARL1、LOC122932865、EPHX2、TMEM181
酮体生物合成过程(代谢过程、分解代谢过程)	LOC122926609、SIRT5、LOC122934973、AACS、ADM、FDXR、PNMT、FDX1、VEGFA、ACE、LOC122928892、HMBS、EIF4E、PTGER3、LOC122923919、LOC122923132、KYAT3、AGT、NMT1、LOC122935596、GPD1、IRS1、LOC122937803、LOC122935611、CBR4、LOC122933381、OAZ2、NUCB2、LOC122934973、XP_044157920
胆汁酸代谢过程的调节(胆汁酸跨膜转运蛋白活性、代谢过程)	KIT、LOC122926609、ARV1、LOC122945772、AMACR、OSBPL2、LOC122928538、ACOT8、LOC122943473、NPC1、STARD5
石胆酸结合	LOC122926609
调控白细胞介素-1 β 的产生, 正调控白细胞介素-1 β 的产生	LOC122942473、LOC122941114、LOC122928892
花生四烯酸分泌的调节	LOC122934300、ACE
前列腺素生物合成过程	PTGER3、LOC122926609、LOC122934300、ACOX1
聚酮代谢过程	LOC122926609、CBR4
激素生物合成过程(代谢过程、激素介导的信号通路、受体结合、分解代谢过程、内分泌激素分泌、C ₂₁ -甾体激素代谢过程)	LOC122926609、WBP2、UBE2I、CNOT9、LOC122923919、LOC122940285、PGRMC2、PAQR5、STAT1、SUMO2、MECR、WIPI1、FDX1、LOC122935721、AGT、ADM、LOC122938145、LOC122945772、LOC122935596、ACE、HSD17B4、PLEKHA1、LOC122928538、LOC122924578、FDXR、DIO3、DIO3、FZD4、GJA1、ANXA5
维生素代谢、维生素结合	PCCB、PCCA
雄酮脱氢酶活性, 雄酮脱氢酶(β 特异性)活性	LOC122926609
亚麻酸代谢过程	ACOX1、ACOT8
生物碱代谢过程	TH、LOC122935596
醛固酮分泌	AGT
醛脱氢酶[NAD(P) ⁺]活性、醇脱氢酶[NAD(P) ⁺]活性、5-雄甾-3 β 、17-二醇脱氢酶活性、17-羟基甾体脱氢酶(NADP ⁺)活性、二酮、15-羟基前列腺素-D-脱氢酶(NADP ⁺)活性	ALDH1L2、LOC122930767、LOC122944110、ALDH2、LOC122926609
白三烯生物合成过程	LOC122921397、LOC122921374、LOC122940887、ALOX5
内源性大麻素信号通路	MGLL



展示 34 个参与调控 BDs 合成途径基因的蛋白互作网络，圆圈标示蛋白名称，虚线标示互作关系。

The interaction networks of 34 genes involved in regulating the BDs synthesis pathway were shown. Circles indicated protein names and dotted lines indicated interaction relationships.

图 3 蟾酥药效成分合成相关基因蛋白互作网络图

Fig. 3 Interaction network diagram of gene proteins related to synthesis of effective component of *Bufonis venenum*

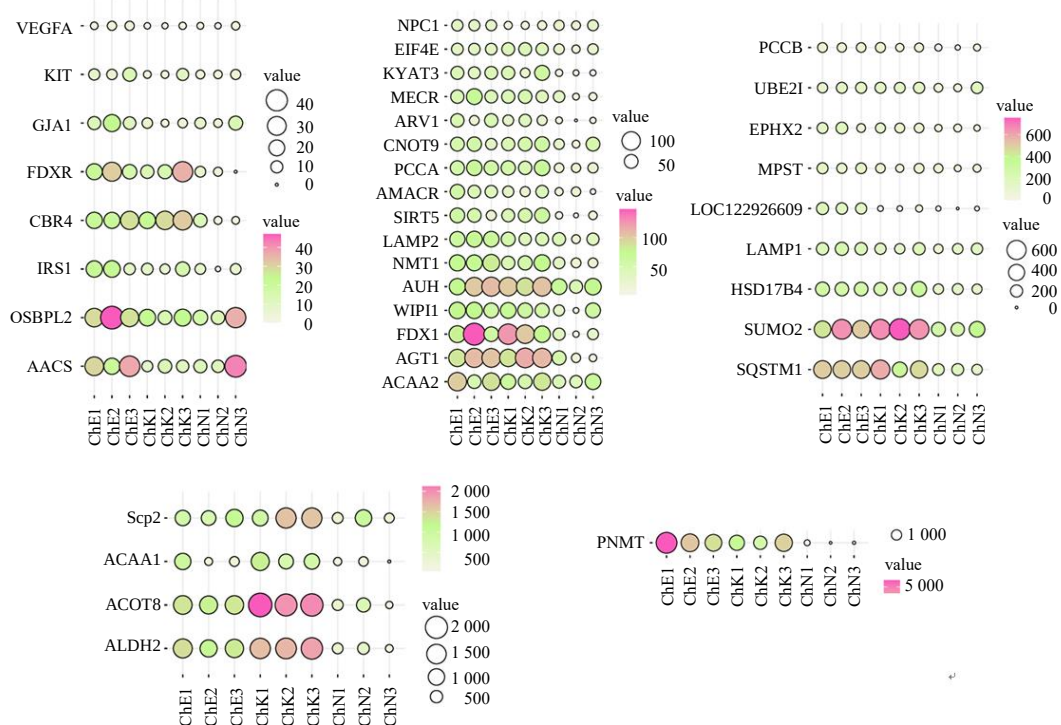
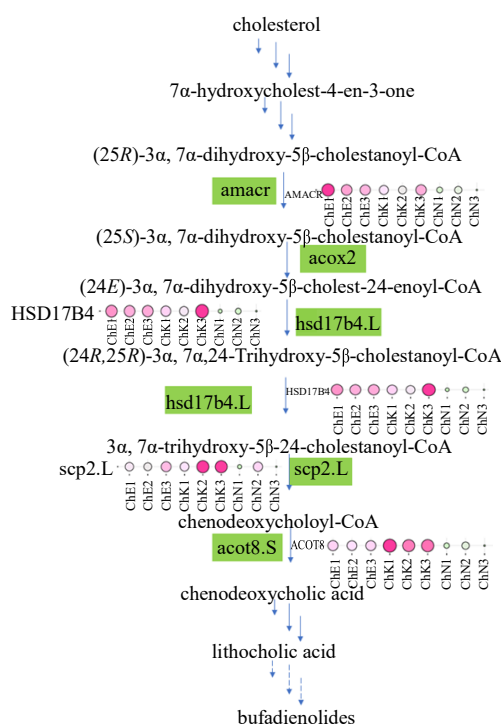


图 4 BDs 合成相关基因与表达量关联分析气泡图

Fig. 4 Bubble map of BDs synthesis-related genes correlated with expression levels

(XLA00640) 及脂肪酸生物合成 (XLA01040) 等。其中的 HUB 蛋白有: 酰基-CoA 氧化酶 1 (acyl-CoA oxidase 1, *acox1*)、甾醇载体蛋白 2 (sterol carrier protein 2, *scp2*)、酰基辅酶 A 硫代酯酶 8 (acyl-CoA thioesterase 8, *acot8*) 及羟基类固醇 17- β 脱氢酶 4 型 (hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4, *Hsd17b4.L*) 等。进一步根据 STING 网站计算的 KEGG 途径, 发现基因 *AMACR*、*HSD17B4*、*SCP2* 和 *ACOT8* 参与调控初级胆汁酸合成 (图 5), 基因 *LOC122926609* 参与调控石胆酸结合, 结合相关文献, 推测 BDs 合成途径之一是通过胆汁酸初级合成过程, 石胆酸可能是该途径中 BDs 类化合物的重要前体。

3.4.2 相关基因的表达量分析 为探求“2.4”项中的基因在样品 CE 组、CK 组和 CN 组的表达情况, 将上述存在互作关系的基因和参与石胆酸结合的基因 *LOC122926609* 均关联到表达量矩阵中。分析结果显示, 大部分基因在 CE 组和 CK 组的表达量大于在 CN 组; 通过与表达量数据关联及前面的蛋白互作分析, 可以侧面验证这些基因可能是 BDs 下游合成途径 (胆汁酸合成途径) 的关键基因。据前文描述, 发现基因 *AMACR*、*HSD17B4*、*SCP2* 和 *ACOT8* 参与调控初级胆汁酸合成, 将该途径调出, 并将上述基因表达气泡附上, 如图 5 所示, 推测该途径是 BDs 下游合成途径, 上述 4 个基因是调控该途径的关键基因。



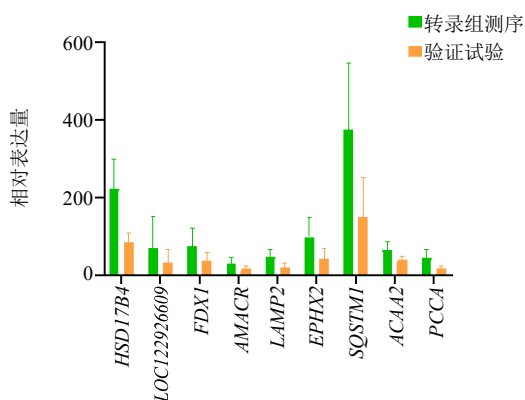


图 6 差异基因 qRT-PCR 验证

Fig. 6 qRT-PCR verification of differential genes

肤、腹部皮肤)的基因表达谱^[29],并阐述了耳后腺及背部皮肤富集了毒素成分相关的功能和通路。本研究从中华大蟾蜍耳后腺和背部皮肤腺体中分离出浆液腺和粘液腺,发现浆液腺整体上调差异基因的富集除基础的代谢外,主要有甾体激素的合成、胆固醇代谢、胆汁酸合成等;另外,在“2.4”项中发现存在互作关系的 34 个基因除个别基因 *LOC122926609*、*VEGFA* 等在 CE 中表达量高于 CK 外,其余大部分基因在 CE 和 CK 中表达相当,推测背侧浆液腺和耳后腺浆液腺都具有合成 BDs 类成分的潜力。

4.2 BDs 类化合物合成途径关键基因推测

BDs 类成分广泛用于各种癌症,在肝癌、胰腺癌和乳腺癌等多种癌细胞治疗具有较强的细胞毒性作用^[30-33],是癌症治疗的潜在药物,该化合物是一类甾体强心苷,在 C-17 位与六元不饱和内酯环(α -吡喃酮环)相连^[4]。目前对这类成分的研究,主要还是药理及化学合成方向,生物合成的研究较少。但早在 1998 年,研究者就对动植物中合成的 BDs 类成分的情况作出统计,在植物中,主要由景天科、风信子科、鸢尾科、楝树科、毛茛科及檀香科植物合成;动物则主要存在于蟾蜍、萤火虫、颈槽蛇属及某些哺乳动物中^[34],不过后续更加具体的工作进展缓慢。近几年开始兴起对该类化合物的合成途径关键基因的验证,如验证基因酶 *SRD5 β* 和 *3 β HSD* 在孕烯醇酮-孕酮-二氢孕酮转化等^[9-10]。除此之外,对 BDs 合成路线的推测的研究也有一定的进展,一是参考洋地黄苷(五元内酯环)的合成途径:甲羟戊酸 $\rightarrow$ 胆固醇 $\rightarrow$ 孕烯醇酮 $\rightarrow$ 孕酮 $\rightarrow$ 强心甾类,该途径的特点是胆固醇到孕烯醇酮的转化过程中,胆固醇侧链断开,后由丙二酰辅酶 A 提供酰基形成五元

内酯环^[21];二是胆固醇经胆汁酸初步合成途径合成石胆酸,以石胆酸为中间体经系列反应合成 BDs^[11]。

在本研究中对 BDs 合成路线的推导,更偏向于初级胆汁酸途径。本课题组在 CE、CK 样品上调的差异基因的富集分析中发现多个基因参与调控胆汁酸合成,且基因 *AMACR*、*HSD17B4*、*ACOT8* 及 *SCP2* 存在较强的互作关系,并在 CE 和 CK 中表达趋势一致,且并未发现有基因参与调控孕烯醇酮的转化。除此之外,查阅文献得知,同时给蟾蜍和红海葱接种孕烯醇酮-20-¹⁴C,孕烯醇酮是红海葱中 BDs 的良好前体,但在蟾蜍中并不能得到此结果,推测孕烯醇酮不是蟾蜍体内合成 BDs 的重要中间体^[35];另外有研究从蟾蜍毒液分离出 7- α 羟基胆固醇和 7- β 羟基胆固醇^[35],这 2 种化合物是胆汁酸生物合成的重要中间体,该结果表明蟾蜍 BDs 类化合物的合成经由胆固醇-胆汁酸盐途径^[36],由此,推测 BDs 生物合成经由胆汁酸初级合成途径合成石胆酸,再经系列反应合成 BDs 类成分母核。基因 *AMACR*、*HSD17B4*、*ACOT8* 和 *SCP2* 及 *LOC122926609* 该途径的关键基因,作者已开展对上述基因功能的验证,以期能探索 BDs 类成分的生物合成路线。

BDs 是一类重要的抗癌化合物,研究其生物合成途径是开发相关临床药物的重要基础,而其合成途径关键基因的挖掘是推进该途径的重要研究历程。本研究从微观的腺体细胞着手,探究中华大蟾蜍两种不同功能的外分泌腺差异基因的表达,通过生物信息学等手段推测出 BDs 下游合成途径的关键基因,旨在探究 BDs 生物合成的分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Regueira E, Dávila C, Sassone A G, et al. Post-metamorphic development of skin glands in a true toad: Parotoids versus dorsal skin [J]. *J Morphol*, 2017, 278(5): 652-664.
- [2] 吴文英,李丕鹏,陆宇燕.花背蟾蜍和中华蟾蜍皮肤腺体及耳后腺体的组织学研究[J].*蛇志*, 2011, 23(1): 20-25.
- [3] Regis-Alves E, Jared S G S, Maurício B, et al. Structural cutaneous adaptations for defense in toad (*Rhinella icterica*) parotoid macroglands [J]. *Toxicon*, 2017, 137: 128-134.
- [4] 陈文杰,胡耀廷,王如锋,等.蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物转化和生物合成研究进展[J].*中草药*, 2021, 52(15): 4741-4751.

- [5] Sousa L Q, Machado K D, Oliveira S F, *et al.* Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition [J]. *Toxicon*, 2017, 127: 63-76.
- [6] Qi F H, Li A Y, Inagaki Y, *et al.* Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3): 342-349.
- [7] 邓莎, 李梦园, 武小玲, 等. 蟾酥化学成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中成药*, 2022, 44(3): 884-890.
- [8] 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.
- [9] Zhang Y N, Li X, Xu D, *et al.* Cloning and characterization of steroid 5 β -reductase from the venom gland of *Bufo bufo gargarizans* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175: 67-78.
- [10] 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.
- [11] Li G L, An T Y, Li Y, *et al.* Transcriptome analysis and identification of the cholesterol side chain cleavage enzyme BbgCYP11A1 from *Bufo bufo gargarizans* [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 828877.
- [12] Antanaviciute A, Daly C, Crinnion L A, *et al.* GeneTIER: Prioritization of candidate disease genes using tissue-specific gene expression profiles [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(16): 2728-2735.
- [13] Huang P W, Kong Q, Gao W N, *et al.* Spatial proteome profiling by immunohistochemistry-based laser capture microdissection and data-independent acquisition proteomics [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1127: 140-148.
- [14] 李国庆, 李园园, 李茂玉, 等. 激光捕获显微切割纯化的人结肠癌组织的定量蛋白质组学研究 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(8): 3358-3367.
- [15] 杨静丽. 激光捕获显微切割联合分子生物学技术在研究组织病原学菌群多样性方面的应用 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [16] 蔡民华, 胡英考, 李雅轩, 等. 激光捕获显微切割技术在植物基因组研究中的应用 [J]. *遗传*, 2006, 28(10): 1325-1329.
- [17] Dobin A, Davis C A, Schlesinger F, *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(1): 15-21.
- [18] Liao Y, Smyth G K, Shi W. featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923-930.
- [19] Wu T Z, Hu E Q, Xu S B, *et al.* clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data [J]. *Innovation*, 2021, 2(3): 100141.
- [20] Kreis W, Hensel A, Stuhlemmer U. Cardenolide biosynthesis in Foxglove¹ [J]. *Planta Med*, 1998, 64(6): 491-499.
- [21] 曾步兵, 任江萌. 药用天然产物全合成: 合成路线精选 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2016: 36.
- [22] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [23] Maurer H C, Olive K P. Laser capture microdissection on frozen sections for extraction of high-quality nucleic acids [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1882: 253-259.
- [24] Zhou T H, Wang J. Laser capture microdissection of vascular endothelial cells from frozen heart tissues [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2319: 105-110.
- [25] Gordon A, Gousset K. Utilization of laser capture microdissection coupled to mass spectrometry to uncover the proteome of cellular protrusions [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2259: 25-45.
- [26] Balasubramanian V K, Purvine S O, Liang Y R, *et al.* Cell-type-specific proteomics analysis of a small number of plant cells by integrating laser capture microdissection with a nanodroplet sample processing platform [J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(5): e153.
- [27] Gautam V, Chatterjee S, Sarkar A K. Single cell type specific RNA isolation and gene expression analysis in rice using laser capture microdissection (LCM)-based method [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2238: 275-283.
- [28] Mazarella G, Iacomino G, Luca P, *et al.* Cell-type-specific gene expression profile by laser capture microdissection on mirror sections [J]. *J Immunol Methods*, 2022, 505: 113276.
- [29] Lan Y, He L W, Dong X, *et al.* Comparative transcriptomes of three different skin sites for the Asiatic toad (*Bufo gargarizans*) [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e12993.
- [30] Henn D, Venter A, Botha C. *In vitro* cytotoxicity induced by the bufadienolides 1 α , 2 α -epoxyscilliroside and lanceotoxin B on rat myocardial and mouse neuroblastoma cell lines [J]. *Toxins*, 2019, 11(1): 14.
- [31] Wei X L, Si N, Zhang Y F, *et al.* Evaluation of bufadienolides as the main antitumor components in cinobufacin injection for liver and gastric cancer therapy

- [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169141.
- [32] Huang A C, Yang M D, Hsiao Y T, *et al*. Bufalin inhibits gefitinib resistant NCI-H460 human lung cancer cell migration and invasion *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 1043-1050.
- [33] Kolodziejczyk-Czepas J, Stochmal A. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: An overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use [J]. *Phytochem Rev*, 2017, 16(6): 1155-1171.
- [34] Steyn P S, van Heerden F R. Bufadienolides of plant and animal origin [J]. *Nat Prod Rep*, 1998, 15(4): 397-413.
- [35] Li G L, An T Y, Li Y, *et al*. Transcriptome analysis and identification of the cholesterol side chain cleavage enzyme BbgCYP11A1 from *Bufo bufo gargarizans* [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 828877.
- [36] Porto A M, Gros E G. Biosynthesis of the bufadienolide marinobufagin in toads *Bufo paracnemis* from cholesterol-20-14C [J]. *Experientia*, 1971, 27(5): 506.
- [37] Chen C, Osuch M V. Biosynthesis of bufadienolides-3- β -hydroxycholestanates as precursors in *Bufo marinus* bufadienolides synthesis [J]. *Biochemical pharmacology*, 1969, 18(8): 1797-1802.

[责任编辑 时圣明]