

骨化二醇及骨化三醇生物合成研究进展

艾佳莹^{1,3}, 高吉凯^{2,3}, 殷子扬^{1,3}, 毛淑红^{3*}

1 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 天津市工业微生物学重点实验室, 天津 300457

3 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

艾佳莹, 高吉凯, 殷子扬, 毛淑红. 骨化二醇及骨化三醇生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1601-1619.

AI Jiaying, GAO Jikai, YIN Ziyang, MAO Shuhong. Biosynthesis of calcifediol and calcitriol: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1601-1619.

摘要: 维生素 D₃ 是对人体健康十分重要的维生素, 可以促进肠道对钙的吸收、防止佝偻病等。骨化二醇[25(OH)VD₃]和骨化三醇[1 α ,25(OH)₂VD₃]是维生素 D₃ 的两种活性衍生物, 在防治骨质疏松及调节人的生理功能方面发挥着重要作用。目前, 骨化二醇及骨化三醇的生产以化学合成居多, 但化学合成具有产物产量低、副产物多以及对环境不友好等缺点。因此开发一种绿色、安全、对环境友好的生物催化合成途径显得尤为重要。本文综述了骨化二醇及骨化三醇的生物催化合成途径, 并介绍了该途径中的关键酶 P450 酶, 包括 P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases, CYPs)和 P450 过加氧酶(unspecific peroxygenases, UPOs)。其中研究较为广泛的是 P450 单加氧酶, 通过解析其催化作用机制, 分析不同氧化还原伴侣适配以及关键氨基酸残基对酶催化活性的重要影响。此外, 对利用 H₂O₂ 驱动的 UPOs 的催化机理、高效异源表达策略以及 H₂O₂ 的原位再生等方面也进行了总结, UPOs 优势在于既不需要昂贵的辅因子也不需要氧化还原伴侣的参与, 是十分有前景的生物催化剂。本文为进一步开发或改造相关 P450 酶来高效生产 VD₃ 活性衍生物提供了重要的参考。

关键词: 骨化二醇; 骨化三醇; P450s; 生物催化合成

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFF1103702); 国家自然科学基金(21878233); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-KJGG-009-04)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFF1103702), the National Natural Science Foundation of China (21878233), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-009-04).

*Corresponding author. E-mail: shuhongmao@tust.edu.cn

Received: 2023-09-26; Accepted: 2024-01-02

Biosynthesis of calcifediol and calcitriol: a review

AI Jiaying^{1,3}, GAO Jikai^{2,3}, YIN Ziyang^{1,3}, MAO Shuhong^{3*}

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China

3 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: VD₃ is a crucial vitamin for human health, as it enhances calcium absorption in the intestines and prevent rickets. Calcifediol (25(OH)VD₃) and calcitriol (1 α ,25(OH)₂VD₃) are two derivatives of vitamin D₃ that play an important role in preventing and treating osteoporosis, as well as regulating human physiological functions. Currently, the production of calcifediol, and calcitriol primarily relies on chemical synthesis, which has disadvantages such as low product yield, numerous by-products, and environmental unfriendliness. Therefore, developing a green, safe, and environmentally friendly biocatalytic synthesis pathway is of utmost importance. This article mainly reviews the biocatalytic synthesis pathways of calcifediol, and calcitriol. The P450 enzymes, including P450 monooxygenases (cytochrome P450 monooxygenases, CYPs) and P450 peroxygenases (unspecific peroxygenases, UPOs), are crucial for the production of calcifediol and calcitriol. The catalytic mechanism of the extensively studied P450 monooxygenases, the selection of suitable redox partners, and the key residues involved in the enzyme's catalytic activity are analyzed. In addition, the review explores H₂O₂-driven UPOs, including their catalytic mechanism, strategies for high heterologous expression, and *in situ* regeneration of H₂O₂. UPOs are regarded as highly promising biocatalysts because they can facilitate reactions without the need for expensive cofactors and redox partners. This review offers insights into the engineering of P450 for the efficient production of vitamin D₃ derivatives.

Keywords: calcifediol; calcitriol; P450s; biocatalysis synthesis

骨化二醇 [25(OH)VD₃] 和骨化三醇 [1 α ,25(OH)₂VD₃] 是维生素 D₃ 的主要活性形式。人体肝脏和肾脏中存在的细胞色素 P450 酶, 可将维生素 D₃ 转化为 25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃^[1]。已有研究表明在角质形成细胞中可以同时表达 25 羟化酶(CYP27A1 和 CYP2R1)和 1 羟化酶(CYP27B1)^[2]。

维生素 D₃ 衍生物除骨化二醇和骨化三醇外, 还包括马沙骨化醇、帕立骨化醇、度骨化醇、卡泊三醇、阿法骨化醇和他卡西醇等^[3-5], 它们作为十分重要的外源补充剂, 已被临床用

于治疗慢性肾功能衰竭、甲状旁腺功能亢进、骨质疏松症^[6]、银屑病^[7]和白癜风^[8]等。其中, 骨质疏松是老年人的常见疾病, 主要表现为骨密度下降、骨组织结构破坏等^[9], 导致老年人容易发生骨折。目前我国人口老龄化发展迅速, 开发相关药物如骨化二醇、骨化三醇等用于预防和治疗骨质疏松具有非常重要的意义^[10-13]。同时, 骨化二醇和骨化三醇在维持生理功能方面也有着非常重要的作用, 例如骨化二醇是保持骨骼健康的重要营养素^[14], 也是检测 II 型糖尿病合并肾病的重要指标^[15]; 骨化三醇具有调

节血浆钙和磷酸盐稳态的作用,能促进细胞的分化、抑制细胞的增生^[16]。骨化三醇在结肠直肠癌^[17]、乳腺癌、前列腺癌中表现出抗肿瘤活性,同时对于调节眼部疾病相关炎症因子也发挥着重要作用^[18],并且其通过抑制过度的自噬和氧化应激可以改善血管生成,为糖尿病血管并发症的治疗提供了新的途径^[19]。

骨化二醇及骨化三醇目前在国内外已有多家企业进行生产。如市场上的骨化三醇产品有正大制药生产的“盖三淳”以及上海罗氏制药有限公司生产的“罗盖全”等。生产骨化二醇的国内企业有浙江花园生物;国际企业有荷兰帝斯曼等^[20]。

优化骨化二醇及骨化三醇的化学合成方法虽然可以降低生产成本提高收率,但在该过程中仍需使用化学试剂,对环境可能造成危害,因此如何绿色且高效地合成骨化二醇和骨化三醇是目前研究的热点问题之一,基于

此本文综述了骨化二醇和骨化三醇的生物合成现状,包括 P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases, CYPs)及非特异性过氧化物酶(unspecific peroxygenases, UPOs)催化 VD₃ 生成骨化二醇及骨化三醇等方面,为进一步提高骨化二醇和骨化三醇的生物合成效率提供了重要的参考。

1 骨化二醇及骨化三醇的合成

1.1 骨化二醇及骨化三醇的化学合成

目前,化学合成法生产 25(OH)VD₃ 及 1 α ,25(OH)₂VD₃ 已得到广泛研究。25(OH)VD₃ 的化学合成路线包括先开环法和后开环法^[14],先开环法(图 1)以麦角甾醇为起始原料,通过优化维生素 D₂ 生产方法并结合 Schaefer 等^[21]文中提及的后 5 步反应来合成 25(OH)VD₃,其总收率最高可达 19.8%;后开环法(图 2)同样以麦角甾醇为起始原料,但先进行羟基硅醚化保护,再

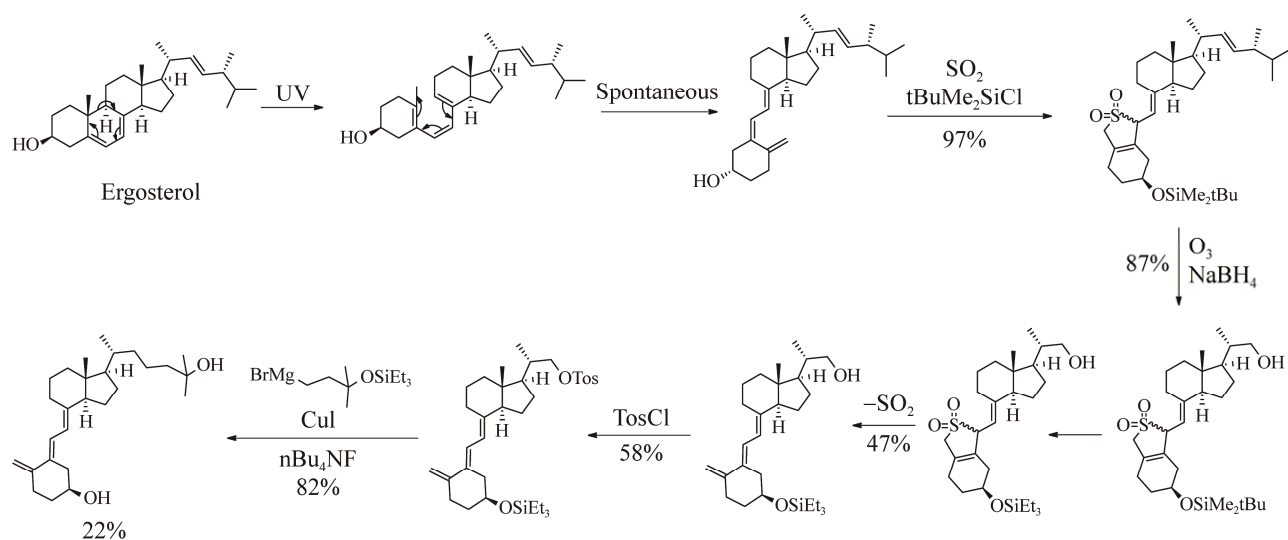


图 1 先开环法合成 25(OH)VD₃^[14] 流程图中数值如 97%,代表的是该步骤收率为 97%,其中 22%指后 5 个步骤的总收率为 22%

Figure 1 Synthesis of 25(OH)VD₃ by ring opening first^[14]. The value in the flow chart such as 97% indicates that the yield of this step is 97%, while the value 22% represents the total yield of the last five steps.

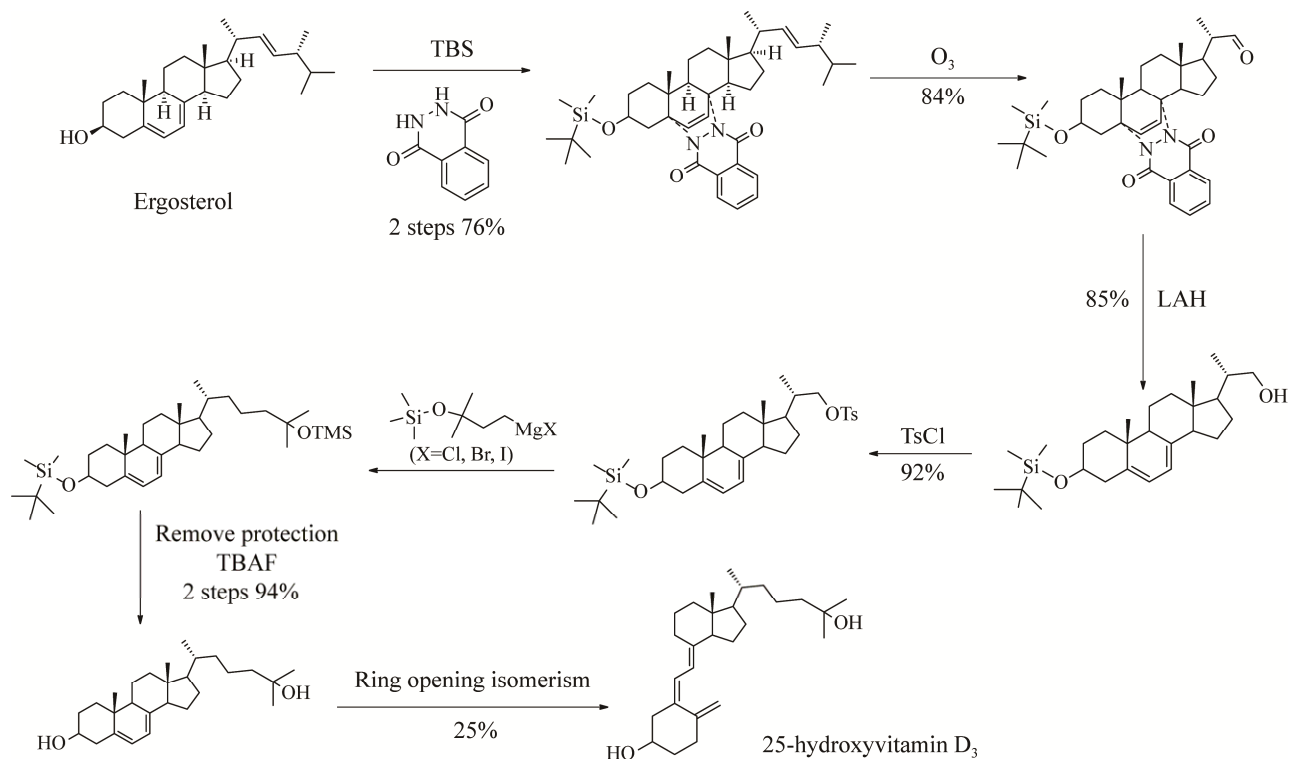


图2 后开环法合成 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ ^[14] 流程图中数值如 85%，代表的是该步骤收率为 85%；TBS 是叔丁基二甲基硅基，LAH 是四氢铝锂，TBAF 是四丁基氟化铵

Figure 2 Synthesis of $25(\text{OH})\text{VD}_3$ by post-opening method^[14]. The value in the flow chart such as 85% indicates the yield of the corresponding step. TBS is tert-butyldimethylsilyl, LAH is lithium aluminum hydride, and TBAF is tetrabutylammonium fluoride.

用苯肼保护共轭双键等，最后通过去保护、开环、异构等步骤得到 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ ，此时开环收率较低，可借鉴 Reichenbacher 等^[22]或 Doi 等^[23]所用的光照开环法，预计 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 的总收率可达到 35%–41%。除上述两种方法外，孙彬^[24]提供了以 5,7,24-三烯胆固醇为原料生成 25-羟基-7-脱氢胆固醇进而通过光照反应合成 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 的两种合成路线(图 3)，收率在 60% 以上。

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 的化学合成路线包括全合成与半合成。全合成(图 4)是以 CD 环、A 环以及侧链为起始原料，CD 环先与侧链进行连接，再与 A 环发生 Wittig 反应或 Suzuki-Miyaura 偶

联以制备 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ ，但产物总收率不足 10%^[25]。半合成则是对结构类似物直接进行修饰，包括以维生素 D_2 ^[26]、豆甾醇、25-羟基胆固醇和薯蓣皂苷元为原料合成目标产物^[25]。

化学合成方法有其优势，但也有不足之处，大多数化学合成路线较为复杂，使用的部分化学试剂较为昂贵且会对环境造成污染，同时目标产物收率较低，而生物催化可以简化合成步骤，反应条件也较为温和，原料易获取，因此开发一种绿色、安全、高效的生物合成路线十分必要。

1.2 骨化二醇及骨化三醇的生物合成概述

目前主要使用细胞色素 P450 酶来催化 VD_3 生成目标产物，包括 CYPs 和 UPOs。P450 单

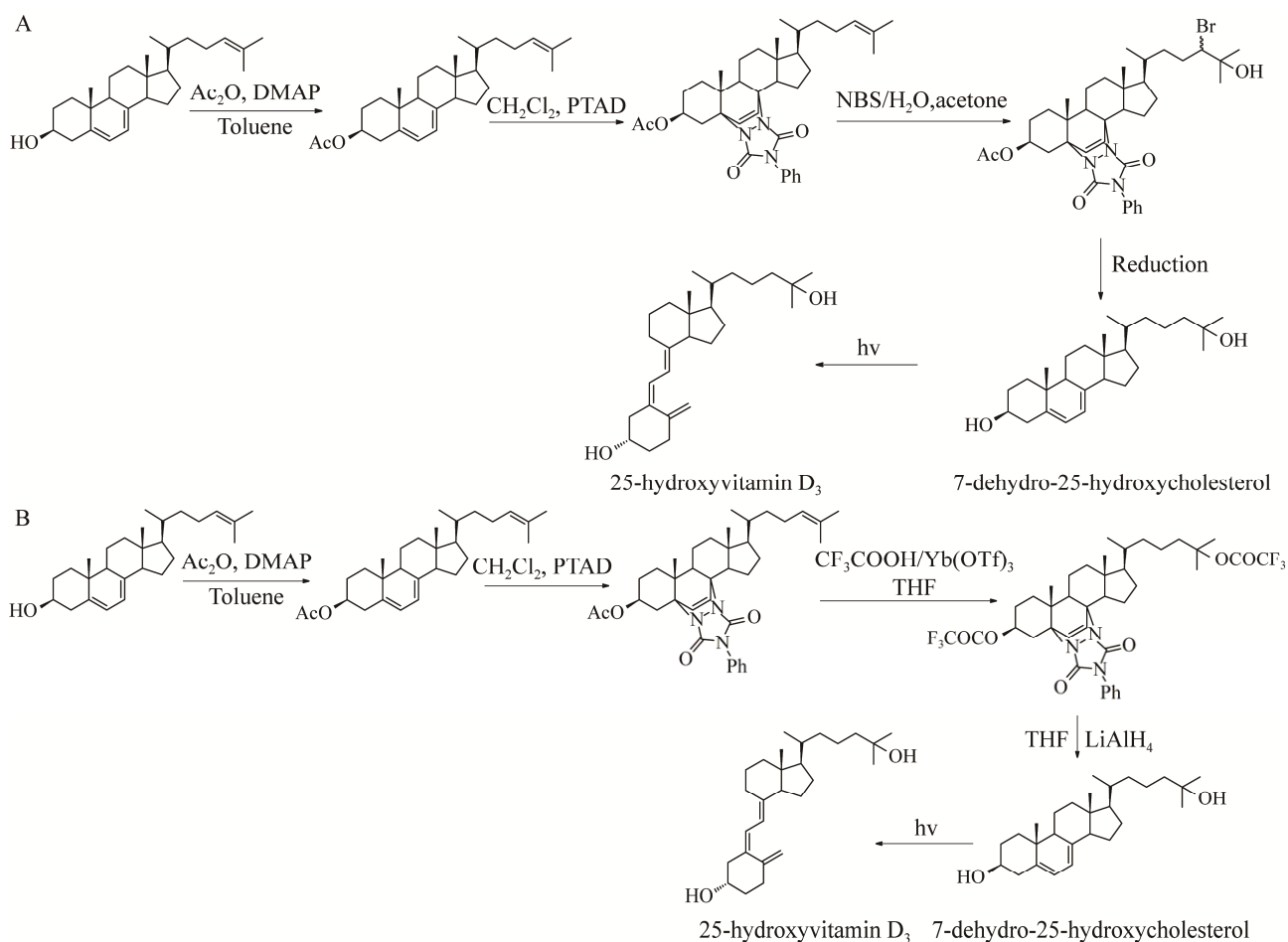


图3 以5,7,24-三烯胆固醇为原料合成25(OH)VD₃的两种方法(A)和(B)^[24] DMAP是4-二甲氨基吡啶, PTAD是4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮, NBS是N-溴代丁二酰亚胺, THF是四氢呋喃, hv是紫外光

Figure 3 Two methods (A) and (B) for the synthesis of 25 (OH) VD₃ from 5,7,24 triene cholesterol^[24]. DMAP is 4-dimethylaminopyridine, PTAD is 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione, NBS is N-bromosuccinimide, THF is tetrahydrofuran, and hv is ultraviolet.

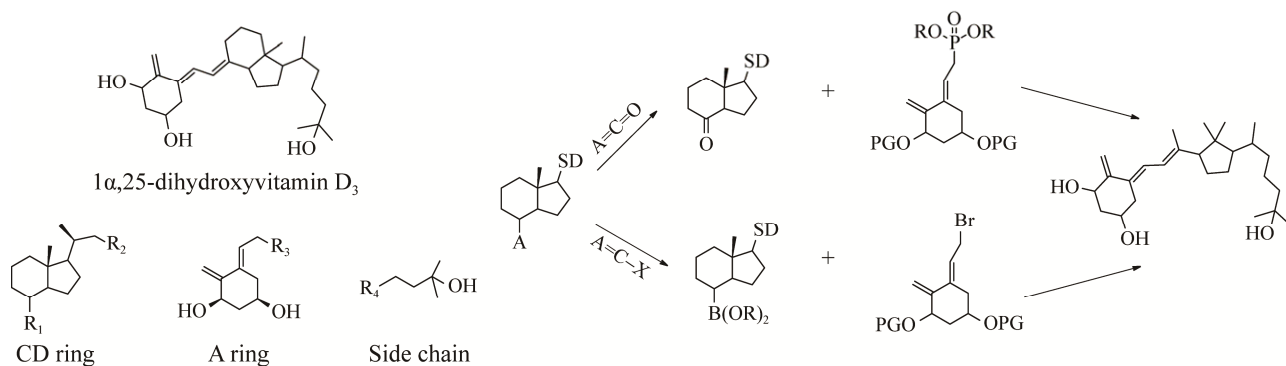


图4 全合成法合成1 α ,25(OH)₂VD₃^[25]

Figure 4 Total synthesis of 1 α , 25(OH)₂VD₃^[25].

加氧酶在原核生物、真核生物甚至病毒广泛存在, 研究较为深入的可以催化 VD_3 的 P450 单加氧酶主要来源于自养无枝酸菌 (*Amycolata autotrophica*)、自养假诺卡氏菌 NBRC 12743 (*Pseudonocardia autotrophica* NBRC 12743)、巨大芽孢杆菌 DSM319 (*Bacillus megaterium* DSM319) 等^[27-29]。在催化过程中, 大多数微生物单加氧酶依赖氧化还原伴侣(常用的氧化还原伴侣有 POR、Fdr/Fdx、AdR/Adx_{4.108} 等)来提供氧化还原当量^[30]。UPOs 是一类高度糖基化的硫代血红素酶, 归类于血红素硫酸盐过加氧酶 (heme-thiolate peroxidases, HTP)超家族, 主要存在于双核菌亚界(Dikarya)和高等真菌界的子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)中^[31]。有研究发现 UPOs 也可催化阿法骨化醇生成骨化三醇, 包括来自茶树菇 (*Agrocybe aegerita*)的 AaeUPO 以及来自真菌灰盖拟鬼伞 (*Coprinopsis cinerea*)的 CciUPO 等^[32]。UPOs 优势在于只需加入 H_2O_2 即可启动反应^[33], 相比于 P450 单加氧酶, 其不需要使用昂贵的辅因子 NAD(P)H, 不需要电子传递蛋白且区域选择性更高^[30,34-35], 是十分有前景的生物催化剂。目前深入研究的 P450 单加氧酶和 UPOs 如表 1 和表 2 所示。

2 P450 单加氧酶催化 VD_3 生成骨化二醇及骨化三醇

2.1 P450 单加氧酶催化机制解析

大多数 P450 催化系统由两个功能部分组成, 首先为含有半胱氨酸配体配位的血红素催化中心 Heme 区域, 然后是含有黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN)或黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 的 NAD(P)H 结合区域。而 P450 催化循环需要由

NAD(P)H 作为电子供体促使反应启动^[45-46], 在这一过程中催化循环一般分为 6 个步骤进行(图 5): (1) 三价铁还原。首先, 底物(RH)取代水配体与 P450 酶结合, 产生与底物结合的 P450, 在与 O_2 结合前, 该酶活性中心的 Fe^{3+} 接受氧化还原伴侣传递的第 1 个电子, 将其还原成更易于与氧结合的 Fe^{2+} ^[47]。(2) 分子氧的结合^[48]。P450 酶活性中心的亚铁血红素与分子氧结合后, 形成较稳定的中间体铁超氧态化合物 P-Fe(II)- O_2 。(3) 第二次还原及质子化。P-Fe(II)- O_2 经第 2 个单电子还原和质子化, 形成铁氢过氧复合物 P-Fe(III)-O-OH (compound 0 即 Cpd 0)^[49]。(4) 高活性氧合铁中间体的形成。P-Fe(III)-O-OH 经进一步的质子化后, 产生 1 个水分子和 1 个高活性氧合铁中间体(Cpd 1), 该中间体氧化能力较强。(5) 氧化底物。根据底物氢提取机制, 底物中的 1 个氢原子被 Cpd 1 提取出来, 形成 Cpd 2 和底物自由基 R^{\cdot} , 再通过自由基重组, 形成羟基化产物(ROH)^[45]。(6) 取代。水或新的底物将目标产物取代后, 使得目标产物脱离复合态, 完成一次循环。至此, 细胞色素 P450 完成了羟基化作用。

2.2 氧化还原伴侣的适配提高酶的催化活性

P450 单加氧酶的催化依赖氧化还原伴侣来提供氧化还原当量。根据氧化还原伴侣的不同, P450 可分为 I-X 这 10 类, 其中来源于原核生物类的 class I 类和真核生物类的 class II 类研究较为广泛^[48-51]。目前 class I 类 P450 单加氧酶较为常用的氧化还原伴侣为恶臭假单胞氧还蛋白及还原酶(Pdx/PdR), 菠菜来源铁氧还蛋白及还原酶(Fdx/FdR), 牛来源铁氧还蛋白及还原酶(Adx/AdR), 还包括不动杆菌 OC4 来源的氧还原伴侣 AciBC 以及红球菌来源的 Thc-CD 等。已报道催化 VD_3 的不同 P450 单加氧酶适配的氧化还原伴侣如表 3 所示。

表 1 不同来源的 P450 单加氧酶催化 VD₃ 及其衍生物得到的产物、产量及催化方式Table 1 The product, yields, and catalytic methods of VD₃ and its derivatives catalyzed by P450 monooxygenases from various sources

Source	Enzyme	Substrate	Product	Production of calcifediol (mg/L)	Production of calcitriol (mg/L)	Catalytic method	References
<i>Streptomyces sclerotialis</i>	<i>Streptomyces sclerotialis</i> FERM BP-1370 P450	1 α (OH)VD ₃	Calcitriol	–	0.051	Whole-cell conversion	[36]
		25(OH)VD ₃		–	0.020		
<i>Streptomyces roseosporus</i>	<i>Streptomyces roseosporus</i> FERM BP-1574 P450	1 α (OH)VD ₃	Calcitriol	–	0.050	Whole-cell conversion	[36]
		25(OH)VD ₃		–	0.025		
<i>P. autotrophica</i>	<i>P. autotrophica</i> FERM BP-1573 P450	VD ₃	Calcifediol	8.300	0.170		[37]
<i>Amycolata autotrophica</i>	P450 _{VD25}	VD ₃	Calcifediol	20.000	–		[27]
<i>Streptomyces griseolus</i>	CYP105A1	VD ₃	Calcitriol	–	–	<i>In vitro</i> conversion	[38]
	CYP105A1-R73V/R84A		Calcifediol	–	–	Whole-cell conversion	[39]
<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	Vdh (CYP107BR1)			–	–	<i>In vitro</i> conversion	[28]
NBRC 12743	Vdh-K1			–	–	Whole-cell conversion	[28]
	Vdh _{T107A}		Calcifediol	573.000	–	conversion	[40]
<i>Bacillus megaterium</i>	CYP109E1		Calcifediol	–	–	<i>In vitro</i> conversion	[41]
DSM319			Calcitriol	–	–	Whole-cell conversion	
	CYP109E1-I85A			45.000	–	conversion	
<i>Bacillus megaterium</i>	CYP109A2			16.000	–	<i>In vitro</i> conversion	[29]
DSM319				54.900	–	Whole-cell conversion	
	CYP109A2-T103A			69.600	–	conversion	[42]
<i>Bacillus lehensis</i>	CYP107CB2		Calcifediol	–	–	<i>In vitro</i> conversion	[43]
G1		1 α (OH)VD ₃	Calcitriol	–	–	conversion	

– indicates not mentioned.

Kawauchi 等^[27]将变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)作为 P450_{VD25} 宿主细胞成功催化 VD₃ 生成 25(OH)VD₃, 表明 P450_{VD25} 可与变铅青链霉菌中已有的氧化还原伴侣即铁氧还原蛋白和还原酶系统共同作用来催化底物。Sawada 等^[38]通过 NADPH-Fdr-Fdx-CYP105A1 电子传递链成功在体外催化 VD₃ 并生成 1 α ,25(OH)₂VD₃。Fujii 等^[28]通过 NADPH-Fdr-

Fdx-Vdh 电子传递途径对 VD₃ 进行体外催化反应, 生成 25(OH)VD₃、1 α ,25(OH)₂VD₃ 以及少量 26(OH)VD₃; 当 Vdh(CYP107BR1)以红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)作为宿主细胞, 且与氧化还原伴侣 ThcC 和 ThcD 共表达时, 25-羟化酶的活性可提高约 6 倍。郑裕国等^[52]也成功使用 NADH-FdR-Fdx-Vdh 电子传递链系统催化 VD₃ 生成 25(OH)VD₃。

表 2 不同来源的 UPOs 催化阿法骨化醇生成骨化三醇^[44]Table 2 UPOs from different sources catalyze alfacalcidol to produce calcitriol^[44]

Source	Enzyme	Substrate	Product	Yield (%)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	<i>Cci</i> UPO	Alfacalcidol	Calcitriol	45.00
<i>Agrocybe aegerita</i>	<i>Aae</i> UPO			99.65
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Cgl</i> UPO			45.00
<i>Marasmius rotula</i>	<i>Mro</i> UPO			55.00
<i>Marasmius wettsteinii</i>	<i>Mwe</i> UPO			48.00
<i>Collariellavirescens</i>	<i>Cv</i> UPO			45.00
<i>Myceliophthorafergusii</i>	<i>Mfe</i> UPO			75.00
<i>Myceliophthorahinnulea</i>	<i>Mhi</i> UPO			42.00
<i>Myceliophthorathermophila</i>	<i>Mth</i> UPO			44.00
<i>Thielaviaterrestris</i>	<i>Tte</i> UPO			47.00
<i>Humicolainsolens</i>	<i>Hin</i> UPO			45.00
<i>Coprinus verticillatus</i>	<i>Cve</i> UPO			55.00
<i>Coprinellus radians</i>	<i>Cra</i> UPO			45.00
<i>Psathyrellaaberdaensis</i>	<i>Pab</i> UPO			45.00

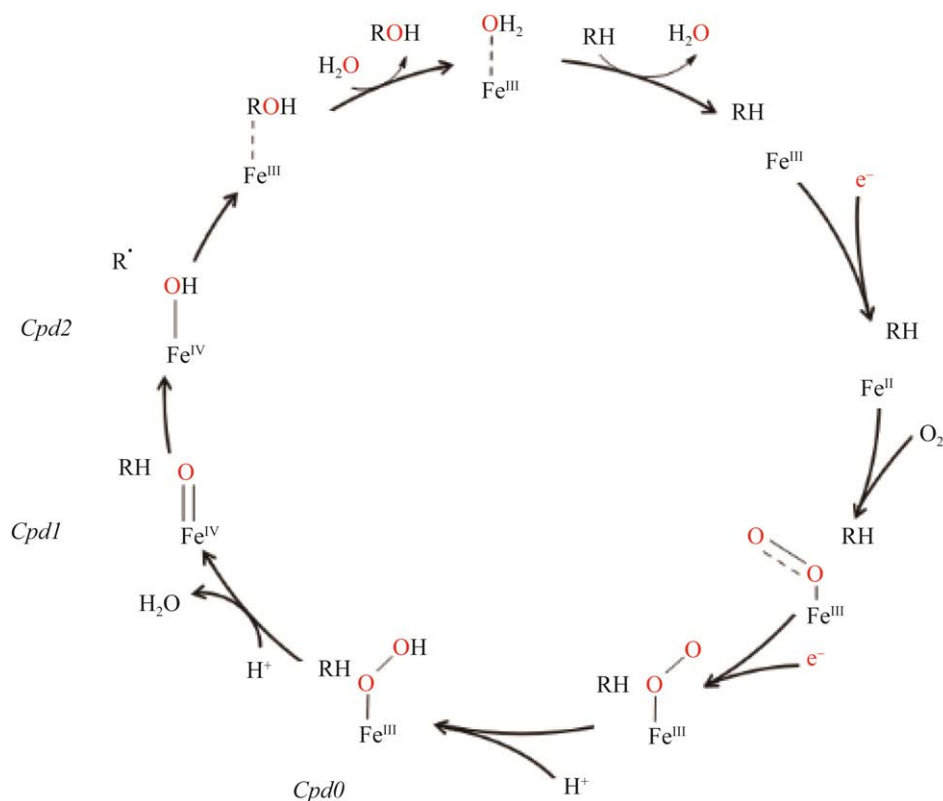
图 5 P450 单加氧酶催化机制^[45]Figure 5 Catalytic mechanism of P450 monooxygenase^[45].

表3 适配不同氧化还原伴侣的 CYPs 的产物

Table 3 Products of VD₃ and alfacalcidol catalyzed by CYPs coupled with different redox partners

Enzyme	Substrate	Redox partners	Product	References
P450 _{VD25}	VD ₃	Ferredoxin and reductase system of <i>S. lividans</i>	25(OH)VD ₃	[27]
CYP105A1	VD ₃	Fdr/Fdx	1 α ,25(OH) ₂ VD ₃	[38]
Vdh	VD ₃	Fdr/Fdx	25(OH)VD ₃	[28]
		ThcC/ThcD	1 α ,25(OH) ₂ VD ₃	
			26(OH)VD ₃	
VdhT107A	VD ₃	AciB(Fdx)/AciC(FdxR)	25(OH)VD ₃	[40]
CYP109E1	VD ₃	AdR/Adx ₄₋₁₀₈	25(OH)VD ₃	[41]
			1 α ,25(OH) ₂ VD ₃	
CYP109A2	VD ₃	BmCPR/Fdx2	25(OH)VD ₃	[29]
CYP107CB2	VD ₃ /Alfacalcidol	Ferredoxin and ferredoxin-NADP ⁺ reductase from <i>Spinacia oleracea</i>	25(OH)VD ₃	[43]
			1 α ,25(OH) ₂ VD ₃	

2016年, Abdulmughni 等使用 NADPH-AdR-Adx₄₋₁₀₈-CYP109E1 电子传递系统在体外成功催化 VD₃^[41]。2017年, 该团队在选择 CYP109A2 的氧化还原伴侣时, VD₃ 终浓度为 200 μ mol/L, 发现氧化还原伴侣 BmCPR-Fdx2 (VD₃ 转化率为 36%), 比 AdR-Adx₄₋₁₀₈ (VD₃ 转化率为 20%) 催化 VD₃ 的效果更好^[29], 说明同一种酶与不同的氧化还原伴侣共同作用时, 其催化活性相差非常大。Ang 等从 *B. lehensis* G1 中分离纯化出 CYP107CB2, 发现其与来自菠菜的铁氧还蛋白和铁氧还蛋白 NADP⁺ 还原酶共同作用时, 可以将 VD₃ 和 1 α (OH)VD₃ 分别催化生成 25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃^[43]。

在对 P450 单加氧酶的研究过程中, 本课题组成功克隆并表达了 CYP109E1, 在构建体外酶催化电子传递链时, 选用了 Adx₄₋₁₀₈ 分别与 Fpr 和 BmCPR 进行组合来催化 VD₃, 发现 NADPH-BmCPR-Adx₄₋₁₀₈-CYP109E1 催化 VD₃ 生成 25(OH)VD₃ 效果更好, 其转化率为 50.1%^[53], 但随后进行的重复实验以及全细胞催化实验, 结果均表明使用 Fpr-Adx₄₋₁₀₈ 催化终浓度为 200 μ mol/L 的 VD₃ 效果要优于 BmCPR-Adx₄₋₁₀₈, 且全细胞发酵法催化 24 h 后, 使用 Fpr-Adx₄₋₁₀₈ 可

生成 0.74 mg/L 的 25(OH)VD₃, 而 BmCPR-Adx₄₋₁₀₈ 则生成 0.32 mg/L 的 25(OH)VD₃。这进一步证明了合适的氧化还原伴侣可以有效提高 VD₃ 的产量。

基于上述结果可知, 选择合适的氧化还原伴侣对于提高 CYPs 酶的催化活性及特异性至关重要。随着相关技术发展, 会有更多潜在 P450 单加氧酶的氧化还原伴侣被挖掘出来, 可以通过对这些氧化还原伴侣进行不同的组合, 找到与相应羟化酶更适配的氧化还原伴侣。

2.3 P450 单加氧酶的构效分析及分子改造

P450 酶的应用为绿色、高效合成骨化二醇和骨化三醇等 VD₃ 衍生物提供了一条新路径。但天然的 P450 单加氧酶在催化 VD₃ 羟基化的反应中存在活性低、稳定性差和催化特异性差等问题。随着大量羟化酶晶体结构得到解析, 利用分子对接等手段, 对酶进行理性设计和定向改造, 可提高酶的催化效率、酶的稳定性以及对底物的催化特异性。

2.3.1 突变关键残基提高 P450 单加氧酶的催化活性

P450 单加氧酶是球状的三角形蛋白, 大多数酶包括 α 螺旋和 β 折叠, 部分酶还有 3₁₀ 螺

旋^[50,54-55]。核心催化结构域包含 1 个四螺旋束 (3 个平行螺旋 D、L、I 和反平行螺旋 E)、螺旋 J 和 K、2 个 β 折叠的部分区域, 以及 1 个作为血红素配体的末端环^[50]。以 CYP109E1 为例^[55], 其包含 13 个 α 螺旋、2 个 3_{10} 螺旋和 10 个 β 折叠, 血红素辅助因子结合在 I 和 L 螺旋之间 (图 6A)。其活性口袋附近有 6 个 P450 常见的底物识别位点(SRSs)^[55], BC 环(SRS1), F 和 G 螺旋的一部分(分别为 SRS2 和 SRS3), I 螺旋的中间部分(SRS4), 连接螺旋 K 和 β_5 的区域(SRS5) 和 β_9 - β_{10} (SRS6) (图 6B)。通过对酶晶体结构的研究, 可对常见底物识别位点、氧化还原伴侣结合位点或催化中心的关键氨基酸残基进

行突变, 以提高 P450 单加氧酶的催化活性。

Sawada 等^[38]发现 Arg73 和 Arg84 是影响 CYP105A1 活性的关键残基^[56], 对其进行定点突变, 提高酶催化活性。经研究发现 Arg84 会影响瞬态结合位点的位置与构象^[56-57], 当 Arg84 突变到 Ala 或 Val 时, 可稳定 P450 的氧化态^[54], 而 Arg73 会影响 VD₃ 在催化中心的位置与构象^[57], 同时突变 Arg73 和 Arg84 得到的双突变体对 VD₃ 的羟基化活性显著高于单突变体, 因此筛选出最佳突变体 CYP105A1-R73V/R84A^[39], 以 *S. lividans* TK23 为宿主细胞进行全细胞催化, 在反应 24 h 后, VD₃ 生成 25(OH)VD₃ 的转化率可达到 38.9%, 1 α ,25(OH)₂VD₃ 的转化率可达到

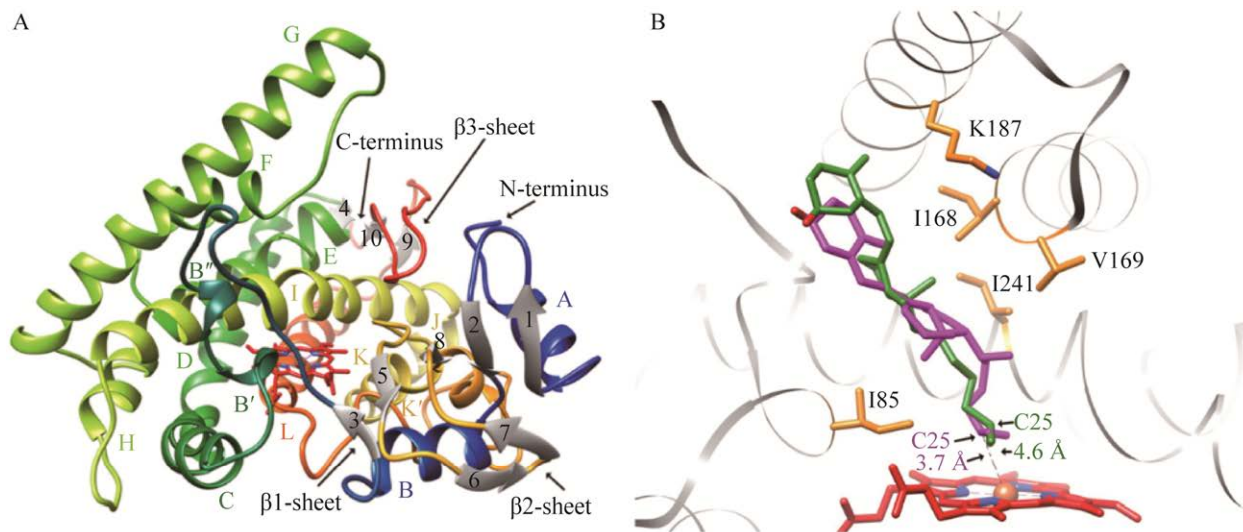


图 6 CYP109E1 整体结构和活性位点^[41,55] A: 整体结构从 N'端(蓝色)到 C'端(红色)以不同颜色进行表示. 血红素区域用红色表示, β 折叠用灰色表示. B: 将 VD₃ 与 CYP109E1 进行分子对接(洋红色), 并与 Vdh-VD₃ 的对接模型进行对比(绿色). 血红素区域用红色表示, 用于定点突变的氨基酸用橙色棒表示, 其中 I85 位于 BC 环(SRS1)、I168 和 V169 位于 F 螺旋(SRS2)、I241 位于 I 螺旋(SRS4)、K187 位于 G 螺旋(SRS3)

Figure 6 Overall structure and the active site of CYP109E1^[41,55]. A: Overall structure of CYP109E1 with different colors from the N' terminus (blue) to the C' (red) terminus. Heme areas are indicated in red and β folds in gray. B: Molecular docking of VD₃ with CYP109E1 (magenta) and comparison with docking model of Vdh-VD₃ (green). Heme areas are indicated in red. Amino acids such as I85 (BC-loop, substrate recognition site 1, SRS1), I168 and V169 (F-helix, SRS2), I241 (I-helix, SRS4) and K187 (G-helix, SRS3) selected for site-directed mutations are shown as orange sticks.

10.6%^[39]。同时该研究发现突变体 CYP105A1-R73V/R84A 对 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 的 C26(27)位也存在羟基化能力并生成 $1\alpha,25(\text{R}),26(\text{OH})_3\text{D}_3$, 该物质具有较高的抗增殖作用且钙化作用显著低于 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$, 因此 $1\alpha,25(\text{R}),26(\text{OH})_3\text{D}_3$ 将是一种非常具有潜力的抗癌药物^[39]。

Fujii 等^[28]以 *R. erythropolis* 作为宿主细胞表达 Vdh 时, 对该酶进行了随机突变, 并筛选出最佳突变体 Vdh-K1 (T70R, V156L, E216M 和 E384R), 该突变体对 VD_3 的羟基化活性比野生型高了 21.6 倍^[28]。

Jóźwik 等鉴定并分析了来源于 *B. megaterium* DSM319 中的 P450 单加氧酶 CYP109E1, 通过分析无底物的 CYP109E1 晶体结构发现在血红素远端有一个漏斗状的、开放的活性口袋^[55]。将 CYP109E1 与 VD_3 进行分子对接, 将 4 个位点 I85、I241、I168 和 V169 定点突变为丙氨酸, 分别对应于 Vdh 中的 I88、I235、L171 和 V172, 实验结果表明 I85A 为 CYP109E1 的最优突变点, 可以将 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 的产量提高到 45 mg/L ^[41]。而本课题组根据 CYP109E1 与 VD_3 对接的结果在酶活性口袋以及血红素催化中心附近挑选了 R69、R294 以及 R177 等位点突变成丙氨酸并进行发酵验证, 发现突变体 R294A 的酶催化活性几乎丧失, 而 R69A 和 R177A 也没有显著提高酶的催化活性^[53]。未来需要进一步分析出现该结果的原因, 并寻找新的可能提高酶催化活性的关键氨基酸残基。

2017 年, Abdulmughni 等鉴定并分析了同样来源于 *B. megaterium* DSM319 中的 CYP109A2, 通过对其晶体结构的解析^[29], 将 CYP109A2 的 4 个氨基酸位点(T103 以及邻近的残基 P104、R105 和 A106)进行定点突变, 发现只有突变体 T103A 可以提高 VD_3 的转化率, 在反应的 24 h 中近 90%的底物(终浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$)被转化,

产物浓度提高到 69.6 mg/L , 若继续补充底物反应至 48 h, 产物浓度可达到 282.7 mg/L ^[42]。

通过突变 P450 单加氧酶氧化还原伴侣结合位点的关键残基, 也可以提高酶催化活性。由于突变体 Vdh-K1 在 *R. erythropolis* 中的表达水平较低, Yasutake 等^[40,58]将 Vdh 的 Fdx 结合位点的 T107 突变成丙氨酸, 使 Vdh_{T107A} 在 *R. erythropolis* 中能够良好地表达并高效生产 $25(\text{OH})\text{VD}_3$; 对 Vdh_{T107A} 的晶体结构进行研究发现, Vdh_{T107A} 与 VD_3 结合呈封闭构象且 Vdh_{T107A} 的 Fdx 结合位点比野生型 Vdh 携带更多的正电荷, 更有利于与带负电荷的 Fdx 相结合, 从而提高酶的催化活性; 在体外重组实验中, Vdh_{T107A} 与来源于不动杆菌属 OC4 (*Acinetobacter* sp. OC4)的 AciB (Fdx)和 AciC (FdxR)蛋白共同催化 VD_3 , 其 25-羟基化活性约是野生型 Vdh 的 80 倍, 同时动力学分析也表明 Vdh_{T107A} 提高了与 Fdx 的结合亲和力。在经乳酸链球菌肽处理的 *R. erythropolis* JCM3201-GlcDH 中共表达 Vdh_{T107A} 进行生物催化时, 其转化效率最高, 仅 2 h 就产生了近 $300 \mu\text{g/mL}$ 的 $25(\text{OH})\text{VD}_3$, 说明 Vdh_{T107A} 比野生型 Vdh 以及突变体 Vdh-K1 更适合在 *R. erythropolis* 中催化 VD_3 生产 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ ^[40]。

上述研究证明利用解析出的酶晶体结构, 借助分子对接等手段进行分析, 对关键残基进行突变, 可以显著提高酶的催化活性。

2.3.2 定点突变改变酶的稳定性

在工业生产过程中使用的酶, 不仅要具有高活性, 其稳定性也十分重要。为提高其稳定性, 可以对酶进行分子改造, 也可以通过外部条件优化来提高酶的稳定性。

目前对 CYP105A1 催化活性研究较为广泛, 但对其稳定性研究较少。2022 年 Takita 等比较了 CYP105A1 及其 5 种突变体 R73A/R84A、M239A、R73A/R84A/M239A (=TriA)、TriA/E90A

和 TriA/E90D 的稳定性, 由非变性 PAGE 分析结果得到 CYP105A1 易发生自结合, 包括低聚化和聚集, 对酶的稳定性影响极大; 通过圆二色性分析发现 M239A 突变会降低酶的稳定性, 可能是因为该突变导致酶的局部构象发生变化, 影响了 Arg193-Glu232 之间的相互作用, 从而使该酶活性降低^[59]。Fujii 等^[28]发现纯化的 Vdh 活性不稳定且受盐离子影响, 在反应体系中分别加入 NaCl、KCl、硫酸铵或磷酸钾等可以提高对 VD₃ 的 25-羟基化活性, 并且实验结果表明 NaCl 或 KCl 的最佳浓度为 100 mmol/L。

2.3.3 关键氨基酸突变提高酶的区域选择性和底物特异性

不同的 P450 单加氧酶对 VD₃ 具有不同的催化特性。CYP109A2 对 VD₃ 进行催化时, 其自身区域选择性较高, 催化产物主要为 25(OH)VD₃ 且仅有 1 种副产物, CYP105A1 和 Vdh 催化 VD₃ 生成 3 种产物, 而 CYP109E1 催化 VD₃ 得到的产物多达 7 种^[29]。副产物较多不利于产物的分离鉴定而且会使目标产物的产量较低, 达不到工业生产要求。

2010 年 Yasutake 等探究了野生型 Vdh-WT 和突变体 Vdh-K1 (T70R、V156L、E216M 和 E384R) 的晶体结构, 发现 Vdh-WT 呈开放构象且与 VD₃ 的结合亲和力非常低, 而 Vdh-K1 呈封闭构象且与 25(OH)VD₃ 具有较高的结合亲和力, 并且突变体 Vdh-K1 中 384 位上的酸性残基 Glu 被碱性氨基酸 Arg 取代可能增加了封闭构象的稳定性, 但 Vdh-K1 并没有提高底物特异性^[60]。

CYP109E1 在体外催化 VD₃ 得到的产物高达 7 种, 以 *B. megaterium* MS941 作为宿主细胞进行全细胞转化来积累 VD₃ 衍生物并进行核磁共振分析, 发现该酶对 VD₃ 及副产物 24S(OH)VD₃ 均有 C25 位羟基化活性, 同时 25(OH)VD₃ 与

24S、25(OH)₂VD₃ 产量相当^[41]。在选择 I85、I168、V169 和 I241 进行定点突变后, 发现 I85A 为最优突变点, I85 位于靠近血红素的 SRS1 中 (图 6B), 突变该位点会影响酶的活性与区域选择性, 结果表明 I85A 不仅可以提高 25(OH)VD₃ 的产量, 而且副产物 24S、25(OH)₂VD₃ 的产量也有所降低^[41]。同时 V169A 和 I241A 也显著降低了 24S(OH)VD₃ 中间体向 24S、25(OH)₂VD₃ 的转化率^[41]。这些结果表明, CYP109E1 的氨基酸 I85 侧链对于 VD₃ 的区域选择性至关重要, V169 和 I241 对 CYP109E1 的底物特异性具有关键作用^[41]。

2.4 催化方式对产物生产的影响

目前常用的催化方式包括体外酶催化^[28-29,38,41,43]和全细胞催化, 其中全细胞催化又可细分为两类, 即发酵法^[28,36-37,39,42]和静息细胞催化^[40,61-62]。

体外酶催化在实验室规模应用较多, 可以同时检测不同氧化还原伴侣与该酶共同催化底物的效果, 如已知的 CYP105A1^[38]、CYP107BR1^[28]、CYP109E1^[41]、CYP109A2^[29]以及 CYP107CB2^[43]均可在体外成功催化 VD₃ 生成骨化二醇或骨化三醇, 但该方法纯化蛋白步骤烦琐, 若酶保存不当或反复冻融都会对酶的活性产生不利影响, 因此不适合工厂、企业等进行大规模生产应用。

全细胞催化则是以完整的菌体对底物进行催化, 成本较低, 可以避免酶的分离纯化^[61-62], 是非常有前景的产业化生产方式。其中发酵法在菌体生长和底物催化阶段均使用营养丰富培养基, CYP105A1-R73V/R84A^[39]、Vdh-K1^[28]、CYP109E1-I85A^[41]以及 CYP109A2-T103A^[42]等已成功通过发酵法催化 VD₃ 生成骨化二醇或骨化三醇, 并且 CYP109A2-T103A 催化 VD₃ 生成骨化二醇的产量可达 69.6 mg/L^[42] (表 1)。静息细胞催化则是在底物催化阶段更换为基本盐缓

冲体系^[40,61-62],使菌体不再生长,可以更好地进行底物催化,如 Kang 等^[61-62]在 75 L 发酵罐中,使用最佳生物转化培养基(15 mmol/L Trizma 碱、25 mmol/L 琥珀酸钠、2 mmol/L MgSO₄、0.08% β-环糊精、0.1% NaCl、0.2% K₂HPO₄ 和 0.03% MnCl₂)以及最优培养条件(曝气率为 0.2 vvm、静息细胞浓度为 4.7%且反应温度为 33 °C),利用假诺卡氏菌 KCTC 1029BP (*Pseudonocardia* sp. KCTC 1029BP)的静息细胞催化 VD₃,骨化二醇产量可达 356.2 mg/L。

相较于静息细胞催化,发酵法的生产工艺更为简单、便捷,但产物滴度较低且副产物较多,目标产物的分离纯化更为困难^[41];而静息细胞催化通常需要在第二阶段将细胞浓缩后在基本盐缓冲体系中进行催化,产物滴度较高且副产物少,在目标产物的分离纯化方面更有优势^[37,61]。本课题组在对 CYP109E1 的研究过程中,以大肠杆菌 BL21 为宿主细胞进行了发酵法以及静息细胞催化 VD₃ 的比较,使用 20 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液作为重悬液培养时,其催化效果并不理想,反应 24 h 后,25(OH)VD₃ 产量仅为 0.012 mg/L,该实验结果表明发酵法催化 VD₃ 的效果优于静息细胞。这也表明不同酶的最适生产方式不同,选择合适的催化方式可大幅度提高目标产物的产量。

然而,全细胞催化过程中仍存在急需解决的问题,例如蛋白的表达量、氧化还原伴侣与单加氧酶的比例不匹配,这一问题或可通过使用蛋白支架得到解决。

3 UPOs 催化 VD₃ 生成骨化二醇及骨化三醇

3.1 催化机制及其优势

UPOs 血红素上含有 1 个基态水分子,当催

化循环开始时, H₂O₂ 先将血红素上的基态水分子进行取代并形成中间体(compound 0, Cpd 0),再重排生成关键中间体铁-氧阳离子自由基络合物(compound 1), Cpd 1 具有较强的氧化作用,随后 Cpd 1 从底物中得到 1 个电子和 1 个质子,生成质子化化合物氢氧化铁配合物和底物自由基 R·,其迅速重组形成羟基化产物(R-OH)-铁酶复合物(compound 2),产物复合物随着羟基化产物的释放而解离,水分子与血红素铁配位,至此完成一次循环(图 7)^[31,35,63]。由此可见,UPOs 的优势在于其既不需要昂贵的辅因子 NADPH 也不需要氧化还原伴侣参与催化反应,只需加入 H₂O₂ 即可启动反应^[33]。

3.2 提高 UPOs 的表达量和催化活性

目前,UPOs 的异源表达效果不佳,UPOs 难以在大肠杆菌中实现异源表达,原因是原核宿主无法进行糖基化修饰,只有少数 UPOs 可以在毕赤酵母和酿酒酵母等真菌中进行异源表达,但其活性较低^[30,64-65]。更换启动子或信号肽等方法有助于实现 UPOs 的异源表达和分泌,通过对酶的关键位点进行突变可进一步提高酶的催化活性。

Püllmann 等^[66]对 UPOs 的最适信号肽和启动子进行了探究,发现对于 AaeUPO*酶,使用信号肽 Gma-UPO 比 Aae-UPO*效果更好,酶的活性提高了 1 倍多; MthUPO 的最适信号肽为 Sce-α-Galactosidase 和 Ani-α-Amylase,而 MroUPO 和 MweUPO 通过其天然信号肽 Mro-UPO SP 即可表达; TteUPO 最适信号肽为 Sce-Prepro 和 Sce-Invertase 2,当使用信号肽 Sce-Prepro 和启动子 P_{CATI} 时,可检测到其活性明显增加。该团队还使用质粒 pPAP003 和 P_{CATI} 启动子构建毕赤酵母表达系统,对 AaeUPO*、MroUPO、CglUPO、MthUPO 和 TteUPO 进行表达时,除 TteUPO 其余产量均显著提高,相比

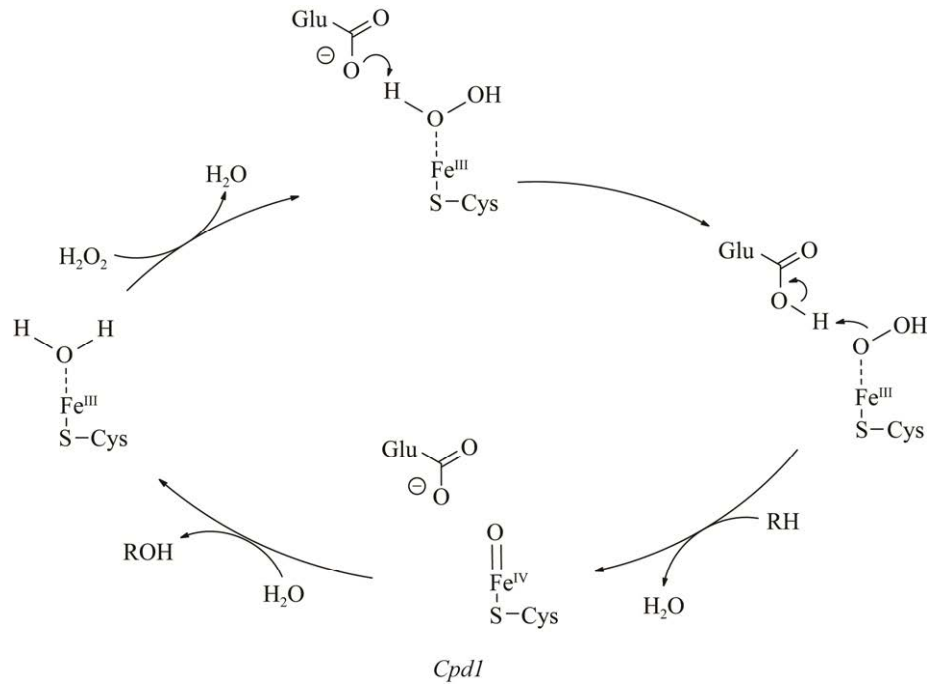


图7 UPOs 催化机制, 以 *AaeUPO* 为例^[35] Glu196 在 H_2O_2 驱动催化过程中起酸碱催化剂的作用
Figure 7 Catalytic mechanism of UPOs, taking *AaeUPO* as an example^[35]. Glu196 in *AaeUPO* was used as an acid-alcohol catalyst which plays an important role when activity of *AaeUPO* was driven by H_2O_2 .

于酿酒酵母表达系统, *MroUPO*、*CglUPO* 和 *MthUPO* 产量分别提高了 3、15 和 5 倍, 其中 *MthUPO* 的产量高达 24 mg/L^[66]。虽然更改信号肽或启动子对酶的活性有显著影响, 但信号肽与启动子的适配性也需要特别注意^[66-67]。同年, Püllmann 等还对 11 个启动子和 17 个信号肽进行重组得到了 187 个组合, 经筛选得到了 *AaeUPO**、*MfeUPO*、*MthUPO* 和 *TteUPO* 的最适启动子为 P_{HpFMD} , *MhiUPO* 的最适启动子为 P_{HpMOX} 。当 *AaeUPO** 使用 P_{HpFMD} 启动子和 *Gma-UPO* 信号肽时, 其蛋白产量可达到 12.6 mg/L, 而 *TteUPO* 使用 *Ani- α -Amylase* 信号肽和 P_{HpFMD} 启动子时, 其产量可达 21.9 mg/L, 均高于之前所报道的产量^[67]。

张武元等^[68]通过对 *AaeUPO* 的 5 个位点 V57A/L67F/V75I/I248V/F311L 进行突变, 得到突变体 Pada-I 过氧化物酶, 其活性显著提高。

纯化后的 Pada-I 与过氧化物(如 H_2O_2 、过氧化叔丁醇、四氢呋喃过氧化物等)在丙酮-缓冲液反应体系中可将维生素 D_3 催化生成阿法骨化醇, 若继续添加 Pada-I 与过氧化物可进一步生成骨化三醇。

Babot 等^[32]发现来自真菌 *C. cinerea* 的 *CciUPO* 具有较高的区域选择性, 催化 VD_3 只生成 25(OH) VD_3 。通过解析该酶晶体结构, 探究其高区域选择性的原因, 可以为其他 UPOs 的分子改造提供一定的理论基础。

3.3 H_2O_2 在 UPOs 催化 VD_3 生成骨化二醇和骨化三醇中的作用

UPOs 催化过程中以 H_2O_2 作为电子受体和氧供体, 由 H_2O_2 将氧原子引入到底物中, 进而对底物进行催化反应^[33]。其中 *AaeUPO*、*CciUPO*、*CglUPO* 等均可与 H_2O_2 共同作用催化 VD_3 或阿法骨化醇生成骨化二醇或骨化三醇^[32,44,69]

(表 2)。

UPOs 对 H_2O_2 浓度比较敏感, 其浓度过高会破坏血红素活性中心, 因此如何提供适量 H_2O_2 是十分重要的问题^[63,70]。目前, 可以通过光化学法和电化学法将 O_2 还原成 H_2O_2 , 但存在化学催化剂、相关设备昂贵且对环境具有潜在危害等问题, 并未广泛使用; 也可使用多酶级联催化法通过氧化酶将 O_2 还原成 H_2O_2 , 实现 H_2O_2 的原位再生^[63]。其中, 多酶级联催化法突出优势为不需要光电、其他设备的使用, 对环境影响也较小。目前, 仍需要开发新的、对环境友好的、原料设备价格较低的提供 H_2O_2 原位再生的方法, 进一步提高 UPOs 的催化活性。

4 总结与展望

通过 P450 酶催化 VD_3 生成骨化二醇和骨化三醇是一种反应条件更为温和且对环境更为友好的生产方式。与 P450 活性、稳定性以及催化特异性相关的研究有利于 P450 酶的工业化应用, 本文概述了关于 P450 单加氧酶的催化机制、氧化还原伴侣的适配以及相关的分子改造等进展, 这些策略为提高 P450 的催化活性提供了重要的参考。然而, 利用 P450 单加氧酶催化 VD_3 生产骨化二醇和骨化三醇的过程中仍然存在一些瓶颈, 如全细胞催化过程中辅因子 NADPH 供应不足、氧化还原伴侣与 CYPs 比例不匹配等。NADPH 作为电子供体是 P450 酶催化过程中的限速步骤, 利用基因工程等手段异源表达六磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose hexaphosphate dehydrogenase, ZWF)、甲酸脱氢酶等在宿主细胞内构建辅因子再生系统以提供充足的 NADPH 是解决限速步骤的关键; 另外, 通过蛋白支架等手段来调配 CYPs 与氧化还原伴侣之间的比例是非常有效的。这些策略能为进一步提高 VD_3 向骨化二醇和骨化三醇的生物转化提

供一些新思路。

值得注意的是, 在生物法催化 VD_3 中, UPOs 似乎比 P450 单加氧酶更具优势, 其不需要添加昂贵的辅因子参与反应, 也不需要氧化还原伴侣的参与, 同时利用 H_2O_2 驱动的 UPOs 具有更高区域选择性, 是更为理想的生物催化剂。但目前可用的 UPOs 并不充足, 而且 UPOs 的异源表达仍是一个重大挑战。

总体来说, 虽然生物法催化 VD_3 存在很多限制性因素, 但相较于化学合成的复杂步骤和低产率, 以维生素 D_3 作为底物通过生物法转化为骨化二醇和骨化三醇可能是较有前景的策略。

REFERENCES

- [1] WIKVALL K. Cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of vitamin D to its hormonal form (review)[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2001, 7(2): 201-209.
- [2] SHIN MH, LEE Y, KIM MK, LEE DH, CHUNG JH. UV increases skin-derived $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 production, leading to MMP-1 expression by altering the balance of vitamin D and cholesterol synthesis from 7-dehydrocholesterol[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 195: 105449.
- [3] 王华. 活性维生素 D_3 类药物马沙骨化醇和艾尔骨化醇及其衍生物的合成研究[J]. *辽宁化工*, 2021, 50(12): 1850-1853.
WANG H. Synthesis research of active vitamin D_3 drugs maxacalcitol, el calciferol and their derivatives[J]. *Liaoning Chemical Industry*, 2021, 50(12): 1850-1853 (in Chinese).
- [4] 魏鹏飞, 李琳, 唐甜, 杨丰科. 维生素 D 衍生物的临床应用及合成方法[J]. *当代化工*, 2018, 47(3): 614-617.
WEI PF, LI L, TANG T, YANG FK. Clinical application and synthesis of vitamin D derivatives[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2018, 47(3): 614-617 (in Chinese).
- [5] 赵国栋. 活性维生素 D_3 类药物马沙骨化醇和艾尔骨化醇及其衍生物的合成研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2017.
ZHAO GD. Synthesis of maxacalcitol, eldecacitol and

- 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ analogues[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2017 (in Chinese).
- [6] DEB S, REEVES AA, LAFORTUNE S. Simulation of physicochemical and pharmacokinetic properties of vitamin D₃ and its natural derivatives[J]. *Pharmaceuticals*, 2020, 13(8): 160.
- [7] 杜佳溪, 陈娇, 韩伊杨, 赵雨晴, 魏志平. 维生素 D 及其衍生物在银屑病发病机制和治疗中的作用[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2020, 27(1): 49-52, 56.
DU JX, CHEN J, HAN YY, ZHAO YQ, WEI ZP. The role of vitamin D and its derivatives in the pathogenesis and treatment of psoriasis[J]. *Journal of Diagnosis and Therapy on Dermato-Venereology*, 2020, 27(1): 49-52, 56 (in Chinese).
- [8] 陆小娟, 李其林. 维生素 D₃ 衍生物对黑素细胞调控作用的研究进展[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2014, 21(5): 427-430.
LU XJ, LI QL. Research progress on the regulatory effect of vitamin D₃ derivatives on melanocytes[J]. *Journal of Diagnosis and Therapy Dermato-venereology*, 2014, 21(5): 427-430 (in Chinese).
- [9] 王瑶, 王灵俊, 朱慧民. 老年性骨质疏松现状及骨质疏松性骨折的危险因素分析[J]. *中国现代医生*, 2023, 61(17): 59-63.
WANG Y, WANG LJ, ZHU HM. Status of osteoporosis and risk factors of osteoporotic fracture in the elderly[J]. *China Modern Doctor*, 2023, 61(17): 59-63 (in Chinese).
- [10] 段梦子, 张伟, 秦丛丛. 老年骨质疏松症流行状况及影响因素[J]. *中国卫生工程学*, 2023, 22(2): 205-207, 210.
DUAN MZ, ZHANG W, QIN CC. Prevalence and influencing factors of osteoporosis in the elderly[J]. *Chinese Journal of Public Health Engineering*, 2023, 22(2): 205-207, 210 (in Chinese).
- [11] 惠晓华. 人口老龄化文献研究综述[J]. *商展经济*, 2023(11): 165-168.
HUI XH. Literature review of population aging[J]. *Trade Fair Economy*, 2023(11): 165-168 (in Chinese).
- [12] LIAO EY, ZHANG ZL, XIA WB, LIN H, CHENG Q, WANG L, HAO YQ, CHEN DC, TANG H, PENG YD, YOU L, HE L, HU ZH, SONG CL, WEI F, WANG J, ZHANG L. Calcifediol (25-hydroxyvitamin D) improvement and calcium-phosphate metabolism of alendronate sodium/vitamin D₃ combination in Chinese women with postmenopausal osteoporosis: a post hoc efficacy analysis and safety reappraisal[J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2018, 19(1): 210.
- [13] HENRÍQUEZ MS, de TEJADA ROMERO MJG. Cholecalciferol or calcifediol in the management of vitamin D deficiency[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1617.
- [14] 廖艳金, 方泽华, 姚伟平, 蒙美壮. 25-羟基维生素 D₃ 的合成研究进展[J]. *广东化工*, 2022, 49(13): 111-113, 125.
LIAO YJ, FANG ZH, YAO WP, MENG MZ. Research progress of synthesis of 25-hydroxy vitamin D₃[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2022, 49(13): 111-113, 125 (in Chinese).
- [15] 褚建东. 25 羟维生素 D₃、同型半胱氨酸、 β_2 微球蛋白在 2 型糖尿病合并肾病患者中的表达及临床价值[J]. *辽宁医学杂志*, 2023, 37(2): 73-75.
CHU JD. Expression and clinical value of 25 hydroxyvitamin D, homocysteine and β_2 -microglobulin in patients with type 2 diabetes mellitus and nephropathy[J]. *Medical Journal of Liaoning*, 2023, 37(2): 73-75 (in Chinese).
- [16] 蔡祖辉. 近年活性维生素 D 类似物的合成进展概况[J]. *有机化学*, 2013, 33(10): 2244-2258.
CAI ZY. Recent progress in the syntheses of active vitamin D analogues[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2013, 33(10): 2244-2258 (in Chinese).
- [17] WANG PL, QIN X, LIU MY, WANG X. The burgeoning role of cytochrome P450-mediated vitamin D metabolites against colorectal cancer[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 133: 9-20.
- [18] NEBBIOSO M, BUOMPISCO G, PASCARELLA A, PESCOLIDIO N. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on eye disorders: a critical review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(3): 559-565.
- [19] XIONG Y, ZHOU F, LIU YY, YI ZM, WANG XY, WU YY, GONG P. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ promotes angiogenesis by alleviating AGEs-induced autophagy[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2021, 712: 109041.
- [20] 全球维生素 D₃ 龙头, 花园生物: 一纵一横打开发展天花板[Z]. [2023-11-30]. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1757531154929054903&wfr=spider&for=pc>.
- [21] SCHAEFER B. *Natural Products in the Chemical Industry*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- [22] REICHENBÄCHER M, GLIESING S, LANGE C, GONSCHIOR M, SCHÖNECKER B. Ein effektives verfahren zur herstellung von 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol (calcitriol) aus 1 α 3 β ,25-trihydroxy-

- cholesta-5,7-dien (procalcitriol)[J]. *Journal für Praktische Chemie*, 1996, 338(1): 634-641.
- [23] DOI T, YOSHIDA M, HIJIKURO I, TAKAHASHI T. Selective capture of $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-previtamin D}_3$ utilizing polymer-supported trialkylsilyl triflate in the synthesis of $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-vitamin D}_3$ [J]. *Tetrahedron Letters*, 2004, 45(29): 5727-5729.
- [24] 孙彬. 1α -羟基维生素 D_3 原及 25-羟基维生素 D_3 的合成[D]. 杭州: 浙江工业大学博士学位论文, 2016. SUN B. Synthesis of 1α -hydroxyvitamin D_3 and 25-hydroxyvitamin D_3 [D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University of Technology, 2016 (in Chinese).
- [25] 许文灏, 金灿. 1α -25-二羟基维生素 D_3 合成方法综述[J]. *浙江化工*, 2012, 43(11): 22-25. XU WH, JIN C. A review of the synthesis of $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D_3 [J]. *Zhejiang Chemical Industry*, 2012, 43(11): 22-25 (in Chinese).
- [26] 陈阳生, 翟翠云, 任莉. 骨化三醇的合成[J]. *中国新药杂志*, 2005, 14(1): 69-72. CHEN YS, ZHAI CY, REN L. Synthesis of calcitriol[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2005, 14(1): 69-72 (in Chinese).
- [27] KAWAUCHI H, SASAKI J, ADACHI T, HANADA K, BEPPU T, HORINOUCI S. Cloning and nucleotide sequence of a bacterial cytochrome *P-450_{VD25}* gene encoding vitamin D-3 25-hydroxylase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1994, 1219(1): 179-183.
- [28] FUJII Y, KABUMOTO H, NISHIMURA K, FUJII T, YANAI S, TAKEDA K, TAMURA N, ARISAWA A, TAMURA T. Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D_3 hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 385(2): 170-175.
- [29] ABDULMUGHNI A, JÓZWIK IK, BRILL E, HANNEMANN F, THUNNISSEN AM WH, BERNHARDT R. Biochemical and structural characterization of CYP109A2, a vitamin D_3 25-hydroxylase from *Bacillus megaterium*[J]. *The FEBS Journal*, 2017, 284(22): 3881-3894.
- [30] GROGAN G. Hemoprotein catalyzed oxygenations: P450s, UPOs, and progress toward scalable reactions[J]. *JACS Au*, 2021, 1(9): 1312-1329.
- [31] HOFRICHTER M, KELLNER H, PECYNA MJ, ULLRICH R. Fungal unspecific peroxygenases: heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome P450 properties[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, 851: 341-368.
- [32] BABOT ED, DEL RÍO JC, KALUM L, MARTÍNEZ AT, GUTIÉRREZ A. Regioselective hydroxylation in the production of 25-hydroxyvitamin D by *Coprinopsis cinerea* peroxygenase[J]. *ChemCatChem*, 2015, 7(2): 283-290.
- [33] KINNER A, ROSENTHAL K, LÜTZ S. Identification and expression of new unspecific peroxygenases-recent advances, challenges and opportunities[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 705630.
- [34] JOO H, LIN ZL, ARNOLD FH. Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation[J]. *Nature*, 1999, 399(6737): 670-673.
- [35] MA NN, CHEN ZF, CHEN J, CHEN JF, WANG C, ZHOU HF, YAO LS, SHOJI O, WATANABE Y, CONG ZQ. Dual-functional small molecules for generating an efficient cytochrome P450BM3 peroxygenase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(26): 7628-7633.
- [36] SASAKI J, MIKAMI A, MIZOUE K, OMURA S. Transformation of 25- and 1 alpha-hydroxyvitamin D_3 to 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D_3 by using *Streptomyces* sp. strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(10): 2841-2846.
- [37] WANG ZY, ZENG Y, JIA HM, YANG NP, LIU MS, JIANG MY, ZHENG YN. Bioconversion of vitamin D_3 to bioactive calcifediol and calcitriol as high-value compounds[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 109.
- [38] SAWADA N, SAKAKI T, YONEDA S, KUSUDO T, SHINKYO R, OHTA M, INOUE K. Conversion of vitamin D_3 to $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 320(1): 156-164.
- [39] HAYASHI K, YASUDA K, SUGIMOTO H, IKUSHIRO S, KAMAKURA M, KITAKA A, HORST RL, CHEN TC, OHTA M, SHIRO Y, SAKAKI T. Three-step hydroxylation of vitamin D_3 by a genetically engineered CYP105A1: enzymes and catalysis[J]. *The FEBS Journal*, 2010, 277(19): 3999-4009.
- [40] YASUTAKE Y, NISHIOKA T, IMOTO N, TAMURA T. A single mutation at the ferredoxin binding site of P450 Vdh enables efficient biocatalytic production of 25-hydroxyvitamin D(3)[J]. *Chembiochem: a European*

- Journal of Chemical Biology, 2013, 14(17): 2284-2291.
- [41] ABDULMUGHNI A, JÓŻWIK IK, PUTKARADZE N, BRILL E, ZAPP J, THUNNISSEN AM WH, HANNEMANN F, BERNHARDT R. Characterization of cytochrome P450 CYP109E1 from *Bacillus megaterium* as a novel vitamin D₃ hydroxylase[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 243: 38-47.
- [42] ABDULMUGHNI A, ERICHSEN B, HENSEL J, HANNEMANN F, BERNHARDT R. Improvement of the 25-hydroxyvitamin D₃ production in a CYP109A2-expressing *Bacillus megaterium* system[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 325: 355-359.
- [43] ANG SS, SALLEH AB, CHOR LT, NORMI YM, TEJO BA, RAHMAN MBA, FATIMA MA. Biochemical characterization of the cytochrome P450 CYP107CB2 from *Bacillus lehensis* G1[J]. The Protein Journal, 2018, 37(2): 180-193.
- [44] 张武元, 李元滢, 张鹏鹏, 李欢欢, 袁波, 孙周通, 马延和. 一种氧化酶羟化合成骨化三醇的方法: CN114717271A[P]. 2023-07-04.
ZHANG WY, LI YY, ZHANG PP, LI HH, YUAN B, SUN ZT, MA YH. Method for synthesizing calcitriol through oxidase hydroxylation: CN114717271A[P]. 2023-07-04 (in Chinese).
- [45] JEFFREYS LN, GIRVAN HM, MCLEAN KJ, MUNRO AW. Characterization of cytochrome P450 enzymes and their applications in synthetic biology[M]. Methods in Enzymology. Amsterdam: Elsevier, 2018: 189-261.
- [46] GUENGERICH FP. Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(12): 10964-10976.
- [47] 王斌, 李德远. 细胞色素 P450 的结构与催化机理[J]. 有机化学, 2009, 29(4): 658-662.
WANG B, LI DY. Structure and catalytic mechanism of cytochrome P450[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2009, 29(4): 658-662 (in Chinese).
- [48] MCLEAN KJ, LUCIAKOVA D, BELCHER J, TEE KL, MUNRO AW. Biological diversity of cytochrome P450 redox partner systems[M]. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2015: 299-317.
- [49] HANNEMANN F, BICHET A, EWEN KM, BERNHARDT R. Cytochrome P450 systems: biological variations of electron transport chains[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2007, 1770(3): 330-344.
- [50] HU BD, ZHAO XR, WANG ED, ZHOU JW, LI JH, CHEN J, DU GC. Efficient heterologous expression of cytochrome P450 enzymes in microorganisms for the biosynthesis of natural products[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(2): 227-241.
- [51] FINNIGAN JD, YOUNG C, COOK DJ, CHARNOCK SJ, BLACK GW. Cytochromes P450 (P450s): a review of the class system with a focus on prokaryotic P450s[J]. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 2020, 122: 289-320.
- [52] 柯霞, 丁冠军, 孙骏, 王露, 郑裕国. VD₃ 羟化酶及其电子传递链的体外构建及活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(5): 89-96.
KE X, DING GJ, SUN J, WANG L, ZHENG YG. Vitamin D₃ hydroxylase and its electronic transfer chain *in vitro* construction and activity analysis[J]. China Biotechnology, 2016, 36(5): 89-96 (in Chinese).
- [53] 王蓝蓝. 25 α 羟基维生素 D₃ 的生物催化合成研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2023.
WANG LL. Study on the biocatalytic synthesis of 25 α hydroxyvitamin D₃[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2023 (in Chinese).
- [54] SAKAKI T, SUGIMOTO H, HAYASHI K, YASUDA K, MUNETSUNA E, KAMAKURA M, IKUSHIRO S, SHIRO Y. Bioconversion of vitamin D to its active form by bacterial or mammalian cytochrome P450[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1814(1): 249-256.
- [55] JÓŻWIK IK, KISS FM, GRICMAN Ł, ABDULMUGHNI A, BRILL E, ZAPP J, PLEISS J, BERNHARDT R, THUNNISSEN AM WH. Structural basis of steroid binding and oxidation by the cytochrome P450 CYP109E1 from *Bacillus megaterium*[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(22): 4128-4148.
- [56] SUGIMOTO H, SHINKYO R, HAYASHI K, YONEDA S, YAMADA M, KAMAKURA M, IKUSHIRO SI, SHIRO Y, SAKAKI T. Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃[J]. Biochemistry, 2008, 47(13): 4017-4027.
- [57] HAYASHI K, SUGIMOTO H, SHINKYO R, YAMADA M, IKEDA S, IKUSHIRO S, KAMAKURA M, SHIRO Y, SAKAKI T. Structure-based design of a highly active vitamin D hydroxylase from *Streptomyces griseolus* CYP105A1[J]. Biochemistry, 2008, 47(46): 11964-11972.
- [58] YASUTAKE Y, KAMEDA T, TAMURA T. Structural

- insights into the mechanism of the drastic changes in enzymatic activity of the cytochrome P450 vitamin D₃ hydroxylase (CYP107BR1) caused by a mutation distant from the active site[J]. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 2017, 73(5): 266-275.
- [59] TAKITA T, SAKUMA H, OHASHI R, NILOUYAL S, NEMOTO S, WADA M, YOGO Y, YASUDA K, IKUSHIRO S, SAKAKI T, YASUKAWA K. Comparison of the stability of CYP105A1 and its variants engineered for production of active forms of vitamin D[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2022, 86(4): 444-454.
- [60] YASUTAKE Y, FUJII Y, NISHIOKA T, CHEON WK, ARISAWA A, TAMURA T. Structural evidence for enhancement of sequential vitamin D₃ hydroxylation activities by directed evolution of cytochrome P450 vitamin D₃ hydroxylase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(41): 31193-31201.
- [61] KANG DJ, IM JH, KANG JH, KIM KH. Bioconversion of vitamin D₃ to calcifediol by using resting cells of *Pseudonocardia* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(9): 1895-1904.
- [62] KANG DJ, IM JH, KANG JH, KIM KH. Whole cell bioconversion of vitamin D₃ to calcitriol using *Pseudonocardia* sp. KCTC 1029BP[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(7): 1281-1290.
- [63] 赖铭元, 韦健, 许建和, 郁惠蕾. 非特异性过氧酶(UPO)的研究综述[J]. *合成生物学*, 2022(6): 1235-1249.
- LAI MY, WEI J, XU JH, YU HL. Review of research on unspecific peroxygenases (UPOs)[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022(6): 1235-1249 (in Chinese).
- [64] HOFRICHTER M, KELLNER H, HERZOG R, KARICH A, KIEBIST J, SCHEIBNER K, ULLRICH R. Peroxide-mediated oxygenation of organic compounds by fungal peroxygenases[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(1): 163.
- [65] ROBINSON WXQ, MIELKE T, MELLING B, CUETOS A, PARKIN A, UNSWORTH WP, CARTWRIGHT J, GROGAN G. Comparing the catalytic and structural characteristics of a short' unspecific peroxygenase (UPO) expressed in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2023, 24(1): e202200558.
- [66] PÜLLMANN P, KNORRSCHIEDT A, MÜNCH J, PALME PR, HOEHENWARTER W, MARILLONNET S, ALCALDE M, WESTERMANN B, WEISSENBORN MJ. A modular two yeast species secretion system for the production and preparative application of unspecific peroxygenases[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 562.
- [67] PÜLLMANN P, WEISSENBORN MJ. Improving the heterologous production of fungal peroxygenases through an episomal *Pichia pastoris* promoter and signal peptide shuffling system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(6): 1360-1372.
- [68] 张武元, 李元滢, 袁波, 孙周通, 苏文成, 马延和. 一种氧化酶催化羟化维生素 D₃ 合成阿法骨化醇及骨化三醇的方法: CN114875077A[P]. 2023-09-05.
- ZHANG WY, LI YY, YUAN B, SUN ZT, SU WC, MA YH. Method for synthesizing alfacalcidol and calcitriol by catalyzing hydroxylation vitamin D₃ through oxidase: CN114875077A[P]. 2023-09-05 (in Chinese).
- [69] LI YY, ZHANG PP, SUN ZT, LI HH, GE R, SHENG X, ZHANG WY. Peroxygenase-catalyzed selective synthesis of calcitriol starting from alfacalcidol[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(6): 1044.
- [70] 李可欣, 杨庆远, 张鹏鹏, 张武元. 过氧化氢原位生成驱动过氧合酶催化反应研究进展[J]. *有机化学*, 2022, 42(3): 732-741.
- LI KX, YANG QY, ZHANG PP, ZHANG WY. Research progress of peroxygenase-catalyzed reactions driven by *in situ* generation of H₂O₂[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2022, 42(3): 732-741 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)