

喜树碱生物合成途径及其相关酶研究现状及展望

王磊¹, 吴家胜¹, 廖亮²

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省乐清市林业局, 浙江 乐清 325600)

摘要: 喜树碱是从喜树 *Camptotheca acuminata* 中发现的单萜类吲哚生物碱, 已经成为继紫杉醇之后广泛使用的植物性抗癌药, 具有非常广阔的市场前景。研究喜树碱的生物合成途径, 对于了解喜树碱的合成机制, 提高次生代谢工程喜树碱的产量, 解决目前资源紧缺造成的供求矛盾等问题均具有重要的意义。在查阅、综合文献的基础上, 将喜树碱生物合成途径以异胡豆苷为分界线, 分为上游途径和下游途径; 并对各种中间产物合成、关键酶和关键基因等作了详细的阐述。在此基础上, 提出了调控喜树碱合成的可能方法, 并提出了喜树碱合成研究未来的研究重点。图 3 表 1 参 29
关键词: 植物学; 喜树碱; 生物合成; 关键酶

中图分类号: S718.43; Q541 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)06-0791-07

Camptothecin: a biosynthetic pathway with associated enzymes and genes

WANG Lei¹, WU Jia-sheng¹, LIAO Liang²

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China;

2. Forest Enterprise of Yueqing City, Yueqing 325600, Zhejiang, China)

Abstract: Camptothecin is a monoterpene indole alkaloid found in *Camptotheca acuminata*, which is native to China. After the discovery taxol as an anti-cancer agent, *C. acuminata* became a favored plant-based anti-cancer medicine with exceptional market prospects. Due to a lack of *Camptotheca* trees and the high demand of camptothecin, metabolic engineering has been employed to improve camptothecin yield. Thus, the biosynthetic pathway of camptothecin is being studied. Based on the literature, the camptothecin biosynthetic pathway can be divided into upper and lower pathways with strictosidine as the dividing line. In this paper the biosyntheses of many intermediate products in the pathway, including related enzymes and genes, are discussed in detail. Possible methods for regulating camptothecin biosynthesis along with key issues for future studies are also mentioned. [Ch, 3 fig. 1 tab. 29 ref.]

Key words: botany; camptothecin; biosynthetic pathway; key enzyme

喜树 *Camptotheca acuminata* 为珙桐科 Nysaceae 落叶乔木, 是我国特有树种。1966 年, Wall 博士^[1] 从喜树茎的提取物中分离得到了抗癌活性物质, 并命名为喜树碱 (compotothecin, CPT)。1985 年 Hisang 等^[2] 发现喜树碱是一种拓扑异构酶 I (topo I) 的抑制剂, 具有独特的抗癌活性。目前, 喜树碱已经成为继紫杉醇之后广泛使用的植物性抗癌药, 世界卫生组织也把喜树碱及其衍生物的研究和开发作为抗癌药物研究的主攻方向之一。然而, 到目前为止, 喜树碱均是从喜树植株体内提取的, 由于喜树碱在喜树体内各器官中含量较低, 单纯靠从植株中提取喜树碱远远不能满足市场的需求。利用植物细胞培养进行天然次生代谢物的生产已在多种药用植物上都取得了成功, 喜树碱的

收稿日期: 2007-12-05; 修回日期: 2008-04-01

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (M303393); “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAD18B0301)

作者简介: 王磊, 硕士研究生, 从事植物组织培养研究。E-mail: wanglei658@163.com 通信作者: 吴家胜, 副教授, 博士, 从事森林培育与统计遗传等研究。E-mail: wujsh@zjfc.edu.cn

生产也可通过细胞培养作为一种有益的尝试,但是喜树碱的生物合成途径及其相关酶的调控机制还不清楚,这在很大程度上制约了喜树碱商业化生产。鉴于此,文章综述了近年来喜树碱的生物合成途径、相关酶及其基因调控等相关研究方面的一些进展,指出研究中亟须解决的一些问题,并提出了未来的研究方向。

1 喜树碱生物合成途径

从生物合成来源来看,喜树碱是单萜吲哚生物碱(monoterpene indole alkaloids, MIAs),属于萜类生物碱(terpenoid indole alkaloids, TIAs)的一类,是具有重要药用价值的植物生物碱^[3]。TIAs具有普遍的前体物质异胡豆苷。异胡豆苷是由色胺(tryptamine)与裂环马钱子苷(secologanin)在异胡豆苷合成酶(strictosidinesynthase, STR)的催化下生成的。裂环马钱子苷为形成喜树碱提供萜类衍生物,而色胺提供吲哚环形成喜树碱的喹啉环。如果将喜树碱生物合成途径以异胡豆苷的生成为分界线,可以分为上游途径和下游途径(图1)。至目前为止,从异胡豆苷到喜树碱的生物合成这一下游途径还不清楚。

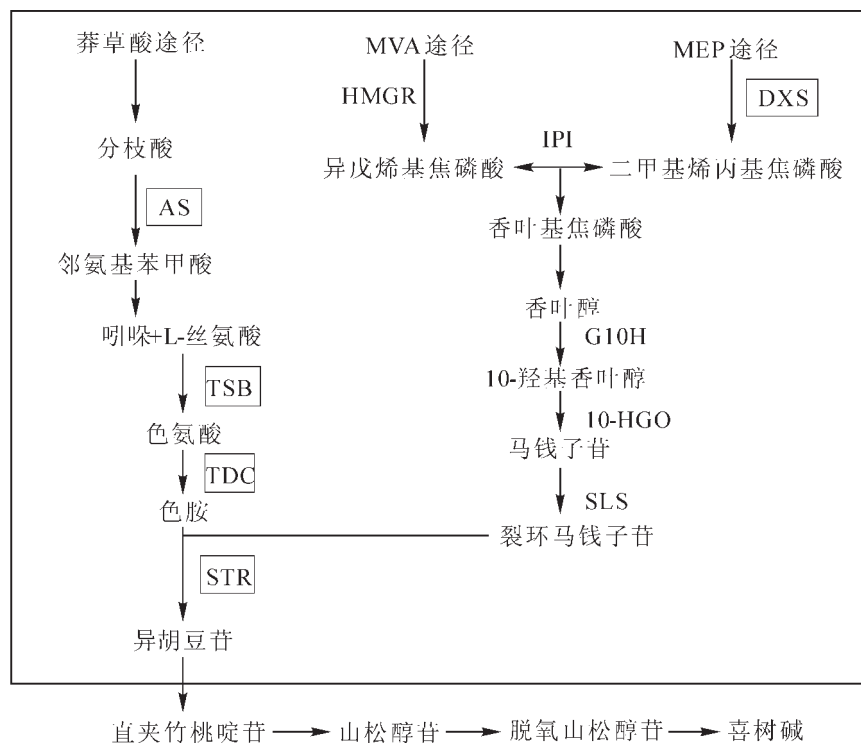


图1 喜树碱生物合成途径

大方框内是上游途径,为萜类生物碱生物合成的共有途径,大方框外为下游途径。小方框内表示的是受转录控制因子ORCA3的调节。

Figure 1 Camptothecin biosynthetic pathway

The upper pathway of all TIAs in common within the big pane and the lower pathway outside of big pane. The enzymes within small panes are regulated by ORCA3.

1.1 上游途径

喜树碱生物合成的上游途径是TIAs合成的共有途径,涉及到的大多数中间产物、酶和基因都在不同植物间是通用的。上游途径中,在异胡豆苷合成酶的催化下,色胺与裂环马钱子苷直接生成异胡豆苷。其中色胺来源于莽草酸途径,而裂环马钱子苷是由异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和它的异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)经多步反应生成的。IPP和DMAPP则来源于羟戊酸途径(MVA)或酮酸/磷酸甘油醛途径(MEP)。因此,上游途径可进一步分为吲哚途径和萜类途径,吲哚途径就是莽草酸途径,萜类途径包括MVA途径和MEP途径以及IPP和DMAPP到裂环马钱子苷的反应。

1.1.1 吲哚途径 吲哚途径广泛存在于植物、藻类、细菌、真菌以及原核生物中,不但为生物体提供

芳香族氨基酸，同时也为很多种植物次生代谢物的生物合成提供前体物质。吲哚途径中，先由 4-磷酸赤藓糖(E4P)和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)为原料经过莽草酸进行一系列的酶促反应生成分枝酸，再由分枝酸生成芳香族氨基酸以及许多中间产物。在喜树碱的生物合成中，分枝酸经邻氨基苯甲酸形成吲哚，吲哚和丝氨酸在色氨酸合成酶(TSB)的催化下形成色氨酸^[4]，色氨酸在色氨酸脱羧酶(TDC)的作用下生成色胺。整个吲哚途径中，邻氨基苯甲酸合成酶(AS)、色氨酸合成酶(TSB)和色氨酸脱羧酶(TDC)是关键酶，其中 TSB 和 TDC 连接了初生代谢和次生代谢^[5]。

1.1.2 萜类途径 萜类是由异戊二烯为单元组成的。有 5 个碳原子的 IPP 和其双键异构体 DMAPP 是生成各种萜类的前体。在高等植物中，IPP 和 DMAPP 主要是通过 MVA 和 MEP 途径生成的(图 2)。

① 甲羟戊酸途径(MVA)。甲羟戊酸途径是以乙酰辅酶 A 为原料，经甲羟戊酸形成 IPP 和 DMAPP 的一系列反应。这些反应均在细胞质中进行。具体步骤如下：首先以 3 个乙酰辅酶 A 在乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶(AACT)的作用下，缩合生成的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)，然后在 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)的作用下生成甲羟戊酸(MVA)，MVA 经甲瓦龙酸激酶(MK)和磷酸甲瓦龙酸激酶(PMK)两步磷酸化反应生成甲瓦龙酸 5-焦磷酸(MVPP)，MVPP 在甲瓦龙酸 5-焦磷酸脱羧酶(MVD)的作用下生成 IPP，而 IPP 在 IPP 异构酶(IPI)的催化下生成 DMAPP。HMGR 是 MVA 途径的限速酶，MVD 和 IPI 也是 MVA 途径中较为关键的酶。

② MEP 途径。MVA 途径在很长时间内被认为是萜类前体物 IPP 生物合成的唯一途径。后来人们在细菌和植物中发现完全不同于 MVA 的途径也可以生成 IPP^[6-7]。该途径定位于植物细胞质体。丙酮酸和 3-磷酸甘油醛，在 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)的催化下生成 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸(DXP)，随后 DXP 在 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)作用下，经过分子内重排和还原反应生成 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)，再经过一系列反

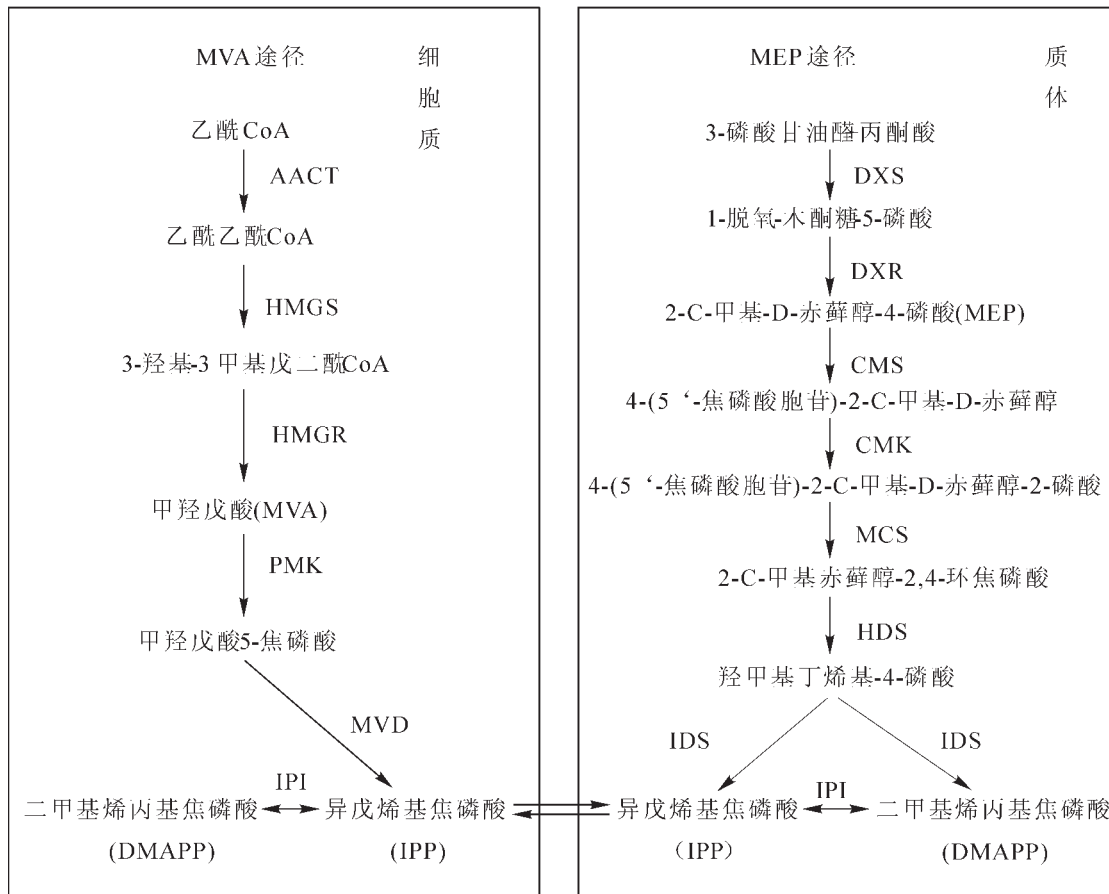


图 2 合成 IPP 的 2 个途径

Figure 2 Two pathways of IPP biosynthesis

应最后生成 IPP 和 DMAPP。MEP 途径中, DXS 和 DXR 是 2 个关键酶, 它们参与其中 2 个重要的限速反应。MVA 途径和 MEP 途径广泛存在于植物中, 虽然这 2 个途径在亚细胞空间上是隔离的, 但是它们之间存在交流^[8], IPP 是联系 2 个途径的纽带。在短小蛇根草和臭味假柴龙树的喜树碱合成研究中发现喜树碱的单萜部分来源于 MEP 途径^[9]。但是有关这 2 个途径的关系及其生理意义还不清楚。

③ 从 IPP 到裂环马钱子苷的反应。IPP 和 DMAPP 生成香叶基焦磷酸, 经过多步反应生成香叶醇, 在香叶醇-10-脱氢酶(G10H)催化下生成 10-羟基-香叶醇, 再经过多个反应生成马钱子苷, 马钱子苷在 SLS 催化下生成环裂马钱子苷, 这一系列反应是单萜和其他萜类的分水岭, G10H 是反应的限速酶。

1.2 下游途径

喜树碱与其他 TIAs 一样都是由异胡豆萜衍生来的, 所不同的是从异胡豆萜到喜树碱的途径很短, 只有不到 10 个反应^[10]。Stockigt 和 Zenk^[11]的研究证明喜树碱等吲哚生物碱的前体是异胡豆萜而不是胡豆萜, 异胡豆萜在通常条件下首先转化为直夹竹桃啶苷(strictosamide)^[12,13]。Yamazaki^[9]在研究喜树碱喹啉骨架的来源时, 发现直夹竹桃啶经过分子内环化作用转化为直夹竹桃啶, 同位素示踪法证明该化合物是喜树碱的前体。Aimi 等^[14]在短小蛇根草中鉴定出直夹竹桃啶保留葡萄糖部分是喜树碱生物合成途径区别于其他 TIAs 合成途径的一个特点。Huntchinson^[15]指出吡咯[3,4-b]喹啉环体系能氧化生成喜树碱 D 环(图 3)的吡咯酮结构。Carte 等^[10]在喜树提取物中分离得到了喜树碱生物合成途径的另一重要中间体山松醇苷, 并对从直夹竹桃啶到山松醇苷之间的中间体进行了推测, 认为喜树碱 B, C 环可能含有一个可重排及被氧化的吲哚结构, 而且仍含有从环裂马钱子苷中带来的葡萄糖部分, Yamazaki^[9]在短小蛇根草毛状根中也分离到 3(S)-山松醇苷、3(S)-脱氧山松醇苷, 并推测可能是喜树碱的直接前体。但是到目前为止从直夹竹桃啶到喜树碱中间的过程尚不清楚。

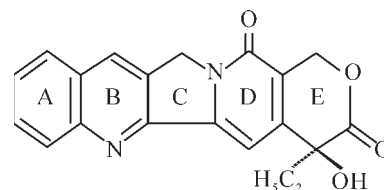


图 3 喜树碱结构式

Figure 3 Chemistry structure of camptothecin

2 合成途径中的关键酶和基因

2.1 莽草酸途径的关键酶和基因

莽草酸途径中, 最关键的酶就是 TDC, 能将色氨酸转化为色胺, 直接衔接了植物的初生和次生代谢。从喜树中分离了 TDC 的 2 个基因: *tdc1* 和 *tdc2*^[16], 它们在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中表达的产物都能将色氨酸脱羧转变成色胺, 但不能转化酪氨酸、苯丙氨酸和 3,4-二羟基苯丙氨酸, 从而引导代谢流向喜树碱的前体物方向发展。*tdc1* 受发育调控, 表达部位和喜树碱的积累部位相一致; *tdc2* 的表达则不受发育所调控, 在正常发育中的喜树组织中检测不到喜树碱, 然而环境胁迫下能诱导产生 *tdc2*。可见, 喜树碱的产生是喜树防御反应的结果。另外, 真菌诱导子或茉莉酸甲酯也可以诱导 *tdc2* 的表达, 但不能诱导 *tdc1* 的表达。该途径中的另 1 个关键酶为 TSB, 它催化 3-吲哚-3'-磷酸甘油醛到色氨酸的反应。到目前为止, 从喜树中仅克隆出 1 个 *tsb* 基因^[17], *tsb* 在喜树各组织中及植株发育过程中的表达与喜树碱的积累呈正相关性, 其编码蛋白 N 端的 68 个氨基酸不保守, 富含丝氨酸和苏氨酸, 具有质体转运肽的特点。

2.2 甲羟戊酸途径关键酶和基因

HMGR 是该途径的限速酶, 它催化 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 形成甲羟戊酸。HMGR 基因家族中的 3 个基因 *hmg 1*, *hmg 2* 和 *hmg 3*, 在喜树幼苗各组织中的 mRNA 表达量具有很强的组织特异性, 不同器官、不同时期 3 个基因的表达都不一致。*hmg 1* 和 *hmg 3* 可能与喜树碱的合成有关, 伤害和茉莉酸甲酯(MeJA)可诱导 *hmg 1* 的表达, 而对 *hmg 2*, *hmg 3* 的表达无关^[18]。*hmg 3* 在树皮中表达, 其 mRNA 水平与 10-羟基喜树碱的积累相平行。HMGR 还对来源于 MVA 途径的萜类物质代谢流的流向起决定性作用^[19], 因而该基因的表达模式多样, 受到多种因子的高度调节, 包括植物体自身的生长发育阶段和各种环境信号, 比如光、机械伤害、病菌感染、外源激素、除草剂和幽醇等。

2.3 MEP 途径的关键酶和基因

DXR 和 DXS 是 MEP 途径中重要的酶。DXR 催化 DXP 生成 MEP, 该反应是 MEP 途径上最重要的限速反应, 是碳流的分支点, 也是 MEP 途径次生代谢工程最理想的靶点, 已经成功用于薄荷的转化^[20]。在 TIA_s 的研究中发现 *dxr* 的表达量和 TIA_s 的积累呈正相关。目前还未见有关 DXS 和 DXR 在喜树碱的生物合成的报道。

2.4 从 IPP 到异胡豆苷的关键酶和基因

G10H 是一种细胞色素 P450 氧化酶, 它可以催化香叶醇生成 10-羟基-香叶醇, 这个反应是生成马钱子苷的第一个专属步骤。G10H 在裂环马钱子苷的形成过程中起关键性的调控作用, 在长春花 *Catharanthus roseus* 的研究中发现裂环马钱子苷的生成是 TIA_s 产量的限制因子之一。G10H 的活性和 TIA_s 的积累有密切的关系^[21], Canto-Canthe 等^[22]发现了能抑制 G10H 活性的抗体, 该抗体也能识别其他产 MIA_s 植物中发现的 G10H 多肽。至目前止, 有关 G10H 在喜树碱合成中作用还未见报道。

异胡豆苷合成酶 (STR) 是 TIA_s 生物合成途径中最重要的酶, 它可将色胺和裂环马钱子苷合成为 TIA_s 的前体化合物异胡豆苷, 该步反应是 TIA_s 生物合成中的瓶颈之一^[23], 也是该途径中的分支点。目前已经从长春花、马钱子 *Strychnos nux-vomica*, 蛇根草 *Ophiorrhiza* spp. (生产喜树碱和羟基喜树碱) 等植物中成功的克隆到 *str* 基因, 但在喜树中还没有克隆到 *str* 基因。在喜树细胞悬浮系中添加前体色胺和马钱子苷, 结果培养物中异胡豆苷和喜树碱含量都没有增加, 可能原因是低活力的 STR 造成的。廖志华^[24]将长春花的 *str* 与 *tdc* 基因转化到喜树细胞中, 结果喜树碱高达到 6.52 mg·g⁻¹ 干质量, 羟基喜树碱质量分数也高达到 1.87 mg·g⁻¹ 干质量。

2.5 ORCA 转录因子

MeJA 激活 TIA_s 合成基因的过程是通过 ORCA (octadecanoid-responsive *Catharanthus* AP2/ERF-domain) 转录因子来实现的, 现已分离出 2 个与 TIA_s 合成有关的转录因子: ORCA2 和 ORCA3。它们能和相关酶基因的启动子相结合, 增强它们的表达。在长春花中 *orca 3* 应答于茉莉酸甲酯的诱导, ORCA3 又可以增强 TIA_s 生物合成代谢途径上多个基因, 包括 *dxs*, *as*, *tdc*, *str* 和 *cpr* 的表达, 作为 TIA_s 生物合成代谢的中心调控者, ORCA3 是通过初对初级和次级代谢中的基因的调控来调节 TIA_s 合成的^[25]。

3 喜树碱合成的调控

喜树碱生物合成途径的调控方法有: ①增强喜树碱合成的关键酶活性(表 1)。②抑制与其相竞争的底物的合成; 因为植物体内存在多条代谢途径, 它们之间相互交叉相互影响, 例如喜树细胞在光下培养经常产生大量红色花色素苷^[26-27]。③添加相应的前体物质。通过各种培养方法定向调控代谢流, 使得细胞的代谢更加有利于喜树碱的生成和积累从而提高喜树碱的含量。

近年来在喜树碱次生代谢工程方面取得了一些进展, Lorence 等^[28]进行了喜树毛状根的遗传转化,

表 1 已克隆喜树碱生物合成途径相关基因

Table 1 Cloned gene associated with CTP biosynthetic pathway

基因	编码酶	功能
<i>tsb</i>	色氨酸合成酶 β 亚单位 TSB	和 CTP 积累有关, 在维管组织表达
<i>Tdc 1</i>	色氨酸脱羧酶 TDC	受发育调控, 和 CTP 积累有关
<i>Tdc 2</i>		受胁迫诱导, MeJA, 真菌诱导子可诱导
<i>Hmg 1</i>	3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶	伤害和 MeJA 可诱导
<i>Hmg 2</i>	A 还原酶 HMGR	
<i>Hmg 3</i>		发育中和 HCTP 积累相关
<i>str</i>	异胡豆苷合成酶 STR	受诱导子和生长素的调节
<i>g 10h</i>	香叶醇-10-脱氢酶 G10H	受发育调控, 和 CTP 积累有关

廖志华将 *str* 和 *tdc* 基因转化到喜树细胞中, Wang 等^[29]以叶子为外植体建立了喜树再生体系, 为喜树农杆菌基因转化生产喜树碱奠定了基础。

4 展望

癌症一直严重威胁着人类的生命和健康, 喜树碱以其独特的抗癌机理成为继紫杉醇和长春花碱之后最重要的抗癌药, 但是, 喜树的天然资源非常有限, 喜树植株中喜树碱及其衍生物含量甚微。另外, 化学合成喜树碱成本又太高。利用植物细胞培养技术生产次生代谢物可能是解决这一问题的有效途径。至目前为止, 有关喜树碱生物合成研究虽然取得了一些进展, 但相比较而言, 其研究进展大大落后于抗癌药紫杉醇和长春花碱, 还远不能达到商业化生产的要求。该领域存在的问题主要有: ①生物合成途径的下游途径还没阐明; ②有关喜树碱生物合成途径中转录因子研究较少; ③喜树碱的分解代谢没有引起人们的足够重视。分解代谢的研究不但有助于合成途径研究的突破, 同时对喜树碱的积累也有很重要的意义。因此, 我们应该在上述领域开展深入的研究, 相信随着喜树碱生物合成过程、机制以及相关酶基因表达调控机制的逐渐阐明, 大量生产喜树碱将成为现实。

参考文献:

- [1] WALL M E, WANI M C, COOK C E, *et al.* Plant antitumor agents(I) The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*[J]. *J Am Chem Soc*, 1966, **88**: 3 888 - 3 890.
- [2] HISANG Y H, HERTZBERG R, HECHT S, *et al.* Camptothecin induces protein linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 14 873 - 14 878.
- [3] PASQUALI G, PORTO D D, FETT-NEVO A G. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma [J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, **101**: 287 - 296.
- [4] 欧阳剑, 李家洋. 拟南芥色氨酸与吲哚乙酸生物合成的研究进展[J]. *生物工程进展*, 1998, **18** (2): 2 - 11.
- [5] NOE W, MOLLENSCHOTT C, BERLIN J. Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein[J]. *Plant Mol Biol*, 1984, **3**: 281 - 288.
- [6] ROHMER M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants [J]. *Nat Prod Rep*, 1999, **16** (5): 565 - 574.
- [7] FLESCH G, ROHMER M. Prokaryotic hopanoids: The biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose[J]. *Eur J Biochem*, 1988, **175**: 405 - 411.
- [8] LAULE O, FURHOLZ A, CHANG H S, *et al.* Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100**: 866 - 871.
- [9] YAMAZAKI Y, KITAJIMA M, ARITA M, *et al.* Biosynthesis of camptothecin in silico and in vivo tracer study from [1-¹³C]-glucose [J]. *Plant Physiol*, 2004, **134**: 161 - 170.
- [10] CARTE B K, DEBROSSE C, EGGLESTON D, *et al.* Isolation and characterization of a presumed biosynthetic precursor of camptothecin from extracts of *Camptotheca acuminata* [J]. *Tetrahedron*, 1990, **46**: 2 747 - 2 760.
- [11] STOCKIGT J, ZENK M H. Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids[J]. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1977, **1 818**: 646 - 648.
- [12] BATTERSBY A R, BURNETT A R, PARSONS P G, *et al.* Alkaloid biosynthesis. part XV. partial synthesis and isolation of vincoside and isovincoside; Biosynthesis of the three major classes of indole alkaloids from vincoside [J]. *J Chem Soc C*, 1969, **88**: 1 193 - 1 200.
- [13] HUTCHINSON C R, HECKENDORF A H, DADDONA P E, *et al.* Biosynthesis of camptothecin. . Definition of the overall pathway assisted by carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis[J]. *J Am Chem Soc*, 1974, **96**: 5 609 - 5 611.
- [14] AIMI N, NISHIMURA M, MIWA A, *et al.* Pumiloside and deoxypumiloside; plausible intermediates of camptothecin biosynthesis [J]. *Tetrahedron Lett*, 1989, **30**: 4 991 - 4 994.
- [15] HUTCHINSON C R. Camptothecin: chemistry, biogenesis and medicinal chemistry[J]. *Tetrahedron*, 1981, **37**: 1 047 - 1 065.

- [16] LOPEZ-MEYER M, NESSLER C L. Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed during development and stress [J]. *Plant J*, 1997, **11**: 1 167 – 1 175.
- [17] LU H, MCKNIGHT T D. Tissue specific expression of the beta-subunit of tryptophan synthase in *Camptotheca acuminata*, an indole alkaloid producing plant [J]. *Plant Physiol*, 1999, **120**: 43 – 52.
- [18] CAELLES C, FERRER A, BALCELLS L, *et al.* Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, **13**: 627 – 638.
- [19] BACH T J. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants-A review [J]. *Lipids*, 1995, **30**: 191 – 202.
- [20] MAHMOUD S S, CROTEAU R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **98**: 8 915 – 8 920.
- [21] COLLU G, GARCIA A A, VAN DER HEIJDEN R, *et al.* Activity of the cytochrome P450 enzyme geraniol 10-hydroxylase and alkaloid production in plant cell cultures[J]. *Plant Sci*, 2002, **162**: 165 – 172.
- [22] CANTO-CANCHE B B, MEIJER A H, COLLU G, *et al.* Characterization of a polyclonal antiserum against the monoterpene monooxygenase, geraniol 10-hydroxylase from *Cantharanthus roseus*[J]. *Plant Physiol*, 2005, **162** (4): 393 – 402.
- [23] MEMELINK J, VERPOORTE R, KIJNE J W. ORCA nization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**: 212 – 219.
- [24] 廖志华. 紫杉醇前体生物合成的分子生物学和抗癌萜类吲哚生物碱的代谢工程[D]. 上海：复旦大学，2004.
- [25] VAN DER FITS L, MEMELINK J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism[J]. *Science*, 2000, **289**: 295 – 297.
- [26] PASQUA G, MONACELLI B, MULINACCI N, *et al.* The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell cultures[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, **43**: 293 – 298.
- [27] 顾青, 朱睦元. 光照对喜树愈合组织生理及喜树碱合成的影响[J]. 浙江林学院学报, 2006, **23** (3): 280 – 284.
- [28] LORENCE A, MEDINA-BOLIVAR F, NESSLER C L. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, **22**: 437 – 441.
- [29] WANG H M, ZU Y G, WANG W J, *et al.* Establishment of *Camptotheca acuminata* regeneration from leaf explants [J]. *Biol Plantarum*, 2006, **50** (4): 725 – 728.