

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201412021

王沐兰 杨生超 郁步竹 等. 红豆杉高产悬浮细胞系建立及其紫杉醇诱导的研究进展 [J]. 广西植物, 2016, 36(9): 1137-1146
WANG ML, YANG SC, YU BZ et al. Research progress in high yielding suspension cell lines and the induction of Taxol in *Taxus* [J]. Guihaia, 2016, 36(9): 1137-1146

红豆杉高产悬浮细胞系建立及其紫杉醇诱导的研究进展

王沐兰¹, 杨生超¹, 郁步竹², 李唯奇^{2*}

(1. 云南农业大学 / 云南省优势中药材规范化种植工程研究中心, 昆明 650201;
2. 中国科学院昆明植物研究所 中国西南野生生物种质资源库, 昆明 650201)

摘要: 紫杉醇是一种四环二萜酰胺类化合物, 是从红豆杉科红豆杉属植物中提取分离出来的次生代谢物, 是世界公认广谱、活性强的天然抗癌新药。但直接从植物中提取紫杉醇的传统生产方式, 不仅产量低, 且会对野生红豆杉资源造成严重破坏, 同时紫杉醇的化学全合成也由于其结构复杂而不具备商业价值。与之相反, 细胞培养技术具有受外界影响少、生产成本低、次生代谢产物多、细胞生长周期短的优势, 是目前最具前景的紫杉醇生产方式。近年来随着科研水平的不断提升, 紫杉醇无论在生理代谢调控、关键基因挖掘, 还是新药物制剂与剂型及其类似物的开发和运用等方面, 都取得了进展, 但要建立紫杉醇商业化高产体系, 还必须和前人的研究经验相结合。该文对红豆杉高产悬浮细胞系建立及其紫杉醇诱导的研究进展进行了综述, 主要包括前人对红豆杉属植物组织与细胞培养相关的外植体、培养基、激素、培养条件、褐化等问题的研究, 以及从代谢调节、培养方式、基因工程等多方面提高紫杉醇含量的最新进展, 最后总结了当前研究的不足, 并对今后通过多种组合方式来提高紫杉醇含量的生产途径进行了展望。以期促进红豆杉组织培养技术的进步, 为药用资源保护和利用提供一定的理论基础与生产指导。

关键词: 红豆杉, 抗癌药物, 细胞培养, 悬浮细胞系建立, 紫杉醇诱导

中图分类号: Q943.1, Q946.889 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)09-1137-10

Research progress in high yielding suspension cell lines and the induction of Taxol in *Taxus*

WANG Mu-Lan¹, YANG Sheng-Chao¹, YU Bu-Zhu², LI Wei-Qi^{2*}

(1. Yunnan Research Center on Good Agriculture Practice for Dominant Chinese Medicinal Materials, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China; 2. Germplasm Bank of Wild Species, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: Taxol, a diterpene alkaloid secondary metabolite of *Taxus* species, has been considered as one of the most promising anticancer drugs used for the treatment of several types of cancer. However, due to the difficulties in obtaining enough this compound from *Taxus* trees, the traditional approach extracted directly from plants not only produces low yield, but also triggers serious damage to the wild resource of *Taxus*. At the same time, the complex structure Taxol has impeded efforts to find a method to fulfill an economically feasible strategy via total synthesis. By contrast, cell culture of *Taxus* is a potential alternative for the production of Taxol and analogue compounds in a large scale culture, which possesses a multitude of advantages such as high purity product of secondary metabolite, low production cost,

收稿日期: 2014-12-15 修回日期: 2015-07-06

基金项目: 国家自然科学基金(31070262) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(31070262)].

作者简介: 王沐兰(1991-), 女, 云南弥勒人, 硕士研究生, 研究方向为植物学 (E-mail) 670428366@qq.com。

* 通讯作者: 李唯奇, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为植物对非生物胁迫响应的信号过程 (E-mail) liweiqi@mail.kib.ac.cn。

short cell growth cycle and less influence from external factors. Huge efforts have been made to develop a more sustainable source of Taxol. The main target of ongoing *Taxus*-related research in recent years are on the regulation of *Taxus* metabolism, key genes mining, application and development in new pharmaceutical preparations. Different ways, including application of precursors and elicitors, optimizing of cultural conditions, screening of high yielding cell lines, optimization of growth and production media, have been already tested to improve the yield of Taxol in cultures of *Taxus*. It is necessary to take into account the latest achievements based on empirical procedures to establish a high yielding system. In this review, we have summarized the latest endeavors to establish a high yield suspension cell line and increase its yield of Taxol, with a special focus on the key issues related to tissue culture of *Taxus* such as explants, culture medium, hormone treatment, culture conditions, browning and other issues. Developments for new and more effective elicitation treatments and the application of metabolic engineering to design new transgenic cell lines of *Taxus* with an improved capacity for taxane production have also been described. In the end, the article discusses the faultiness of current researches and prospects various combinational methods for raising Taxol content. This paper is helpful for promoting technology progress of tissue culture in *Taxus* and it will provide the guidance for the protection and application of medicinal resources.

Key words: *Taxus*, anticancer drugs, cell culture, suspension cell lines, Taxol induced

红豆杉中的紫杉醇是公认的近三十年来发现的最有效的抗癌药物之一,它可以稳定微管聚集并防止微管正常的生理解聚,“冻结”有丝分裂的纺锤体,抑制细胞有丝分裂,使细胞活动终止于对放疗敏感的 G2 和 M 期,直至死亡 (Schiff et al, 1979)。紫杉醇在红豆杉植物细胞中含量极低,即使是当前公认含量最高的短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 树皮中也仅含 0.069% (周忠强等, 2001)。由于人们不合理的砍伐,树木数量锐减,红豆杉已经处于濒危状态。虽然目前可以通过巴卡亭 III 等前体物质人工半合成紫杉醇,但是伴随着如 Cabazitaxel (Cheetham & Petrylak, 2013) 等一系列紫杉醇类新药的研制,紫杉醇的使用药谱更广,市场需求更大。因此,使用细胞培养技术是提高紫杉醇产量、紫杉醇药源紧缺的当务之急。

要建立紫杉醇商业化高产体系,必须与前人研究经验相结合,不断优化悬浮体系建立的相关环节,并通过分子生物学手段探索紫杉醇的合成过程,从细胞水平与分子水平共同促进紫杉醇的生产。随着基因组学检测手段的不断进步,目前已知的紫杉醇生物合成过程包括 19 个步骤,紫杉环碳环骨架形成、侧链生物合成、紫杉烷环系统和侧链酯化反应三个阶段,其中 12 个酶测序已经完成,但仍有 7 个步骤依然未知 (Cusido et al, 2014)。本研究结合最新分子生物学进展与前人研究经验,从高产红豆杉愈伤组织培养建立以及紫杉醇诱导方法两个方面,综述了紫杉醇商业化高产体系建立的方法,并对今后

提高紫杉醇含量的生产途径进行了展望。

1 高产红豆杉愈伤组织培养体系的建立

1.1 诱导愈伤组织

诱导出符合要求的愈伤组织是建立高产悬浮细胞系的关键,后续的继代培养和悬浮细胞系的建立要求愈伤组织具备高的分化能力、质地松散、生长旺盛,而紫杉醇的诱导则要求诱导出颜色浅、块状或颗粒明显、次生代谢产物含量较高的细胞团。在实验操作的过程中,愈伤组织的诱导主要受到外植体、培养基、激素等因素影响。

1.1.1 外植体 红豆杉的茎段、芽、假种皮、叶、胚、根均可用于愈伤组织的诱导。愈伤组织中紫杉醇的含量是建立高产的悬浮细胞系选择外植体的重要依据。张芳芳等 (2010) 比较了南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei*)、曼地亚红豆杉 (*T. media*) 和短叶红豆杉不同外植体来源的愈伤组织的生长特点和紫杉醇含量,结果发现其中以南方红豆杉种胚为最佳外植体,其诱导的愈伤组织不仅紫杉醇含量高,而且污染率低。同时, Zhang et al (2000) 总结前人的研究发现当前紫杉醇产量在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的细胞株系都来自于胚诱导的愈伤组织。

1.1.2 培养基 诱导红豆杉愈伤组织常见的培养基为 MS、B5,但它们在愈伤组织诱导与紫杉醇积累中

的作用不同。杜亚填等(2006)认为南方红豆杉的最适诱导培养基为 MS, B5 则是愈伤组织的增殖、驯化和紫杉醇的最佳培养基。然而也有不同的研究结果报道。金贞兰等(2010)以东北红豆杉(*T. cuspidata*)茎为外植体,结果发现最好的基本培养基是 WPM,其次是 B5。因此,可以采用阶段培养法,根据不同种的红豆杉在细胞培养的不同生长阶段可以选择不同的培养基。

1.1.3 激素 诱导愈伤组织的激素与植物内源激素相关,葛丽丽等(2006)对红豆杉内源激素进行测定,发现红豆杉枝、叶中均含有 ABA、IAA、GA、ZA,因此培养基中激素的种类、浓度及不同的激素组合对愈伤组织诱导和培养起着重要作用。在适宜浓度范围内的 6-BA,对解除胚休眠和萌发具有显著促进作用。当 6-BA 添加浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,红豆杉的萌发率和成苗率分别较对照提高了 30.6% 和 17.5%(臧新等,2006)。翟雪霞(2009)的研究表明,对愈伤组织的诱导以 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 配合最佳。杜亚填等(2006)则发现当 NAA 浓度高于 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对愈伤组织诱导不利,单独使用 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 或与适宜浓度的 KT、6-BA、KT+GA₃ 相配合,有利于紫杉醇的合成。综上所述,适宜浓度的 2,4-D、6-BA、NAA、GA₃、KT 等都可促进红豆杉愈伤组织的诱导,但在愈伤组织产生的时间均表现出较显著差异,不同红豆杉品种、不同外植体愈伤组织的诱导应选用不同的培养基与不同浓度的激素组合。

1.1.4 培养条件 愈伤组织的培养条件主要是指培养基内的 pH、光照、温度等因素。红豆杉愈伤组织对 pH 要求较小,培养基的 pH 值在 4.8~7.8 时生长没有明显差异(Fett-Neto et al,1995)。同时,红豆杉细胞适宜的生长温度范围也较宽,在 20~30 °C 进行培养,均能诱导出愈伤组织。而光照条件对愈伤组织的影响较大,在黑暗条件下诱导的愈伤组织与光照条件相比不仅生长速度快,而且紫杉醇含量高。

1.1.5 添加物 向培养基中添加适量的有机附加物能对愈伤组织的生长率与紫杉醇的含量产生显著影响。研究表明添加水解酪蛋白能显著提高紫杉醇的含量,其浓度为 0.1% 时,紫杉醇含量最高(盛长忠,2000)。同时天然添加物椰子汁(甘烦远等,1996)、马铃薯汁(赵继鹏,2013)也对愈伤组织的生长有促进作用。然而能促进细胞培养的有机物仅是少部分,司徒琳莉和李振山(2001)发现附加 0.1% 的酵

母菌膏、0.1% 的玉米胚提取液、0.1% 的紫杉外植体粉末、0.1% 的土壤提取液或 0.1% 的牛肉蛋白胨浸膏,均对愈伤组织的生长速度无显著影响。

1.1.6 褐化的控制 在愈伤组织培养过程中形成的酚类物质易氧化,并会分泌出大量的棕色色素物质使其颜色加深,这种现象称为褐化。褐化抑制了细胞内多种酶的活性,扰乱了其正常代谢过程,且由于紫杉醇的次生代谢途径与防御反应相重叠,使得红豆杉褐化程度加剧。在培养基中,加入适量的抗氧化剂或吸附剂可达到抑制愈伤组织褐化的目的,如维生素 C(何康,2006;李丽等,2006)、活性炭(黄宁珍等,2007)、聚乙烯吡咯烷酮(郑超,2013;赵继鹏和杨叔慎,2014)、柠檬酸(赵继鹏,2013)等。除此之外,通过改变细胞培养环境中的氧水平(胡凯等,2004),调节培养过程中的光照(于娅和陈嘉棋,2012)、激素组合(韩晓红等,2013)、低温预处理(高明波等,2011)等手段,也能一定程度上减少褐化。

2 细胞悬浮培养及紫杉醇诱导

2.1 生物反应器

生物反应器培养是实现红豆杉细胞悬浮培养、大规模生产紫杉醇的最好途径,用于悬浮培养的生物反应器主要有机械搅拌式和气升式(余响华等,2013)。目前,加拿大的 Phytion Biotech、韩国的 Samyang Genex 和德国的 Nattermann 等世界一流制药公司生产紫杉醇的生物反应器已达 75 000 L (Malik et al,2011)。

对于悬浮细胞培养方式的研究,当前的热点主要集中在细胞培养的动力学过程。氧传质系数是表征反应器操作性能的重要参数,是反应器优化设计和放大的关键。张长银等(2013)通过测定了红豆杉悬浮细胞在 10 L 通气搅拌反应器中的氧传质系数,发现通气量对氧传质系数的影响大于搅拌转速对氧传质系数的影响,且随着细胞生物量增加,氧传质系数减少、摄氧率增加,比耗氧率呈现出先增加后缓慢下降的趋势。反应器中悬浮细胞的培养还与细胞生长状况的评价与控制相关。Zhang et al(2013)根据 Logistic 方程,建立了在 15 L 生物反应器中的悬浮细胞生长动力学模型,它由底物消耗的动力学非结构化模型、产物合成、流变行为和能量溢出四个部分构成,其中降低能量溢出能够优化紫杉醇的诱导过程。与实验室小规模培养不同,商业生产的大规

模生物反应器会产生巨大剪切力,它对细胞生长代谢会造成显著影响。Han et al(2013)研究了21种紫杉烷类物质在生物反应器剪切力作用下的代谢变化,结果表明除了紫杉醇和巴卡亭Ⅲ含量显著降低外,许多与紫杉醇代谢途径无关的紫杉烷类物质也显著降低。通过进一步定位检测,结果发现剪切力会破坏其前体GGPP的环化过程,扰乱后续羟化与酰基化顺序,影响官能团环氧丁烷环形成,从而限制了紫杉醇的合成。

2.2 代谢调节

2.2.1 添加诱导子 诱导子是诱发植物在抗病生理过程中产生植保素或引发过敏反应的因子,是调控植物次生代谢产物生物合成的重要手段。它能够显著提升紫杉醇及其衍生物的含量,具有专一性、快速性的特征(Khosroushahi et al,2006)。根据其来源不同,诱导子可分为生物诱导子与非生物诱导子。对新诱导子的筛选以及紫杉醇合成调控有关的信号分子与信号转导途径的研究是当前热点。

(1) 生物诱导子:生物诱导子是植物在防御过程中为对抗微生物感染而产生的物质,包括内生真菌与有机体产生的各种代谢物(仇燕等,2003)。

内生真菌是植物内环境中一种重要的组成部分,它能够选择性地诱导药用植物特定基因的表达,从而促进药用活性成分的积累(谭燕等,2013)。Jian et al(2013)从南方红豆杉树皮中分离出了192株内生真菌,经过检测,仅有真菌*Diaporthe phaseolorum*能产生紫杉醇的前体物质巴卡亭Ⅲ。Li et al(2009)将内生真菌诱导子美丽镰刀菌与红豆杉悬浮细胞在20L的搅拌式共生生物反应器中进行培养,结果表明共生系统中的紫杉醇含量和分泌率分别是对照的2倍与6.8倍。同时,作者还发现内生真菌的使用加速了培养基内的蔗糖消耗,这可能是由于内生真菌通过转化能量或激活膜上转运酶的方式促进了紫杉醇向胞外分泌从而消耗了糖份。

茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, MeJA)广泛存在于植物防御信号的传递途径中,它能将外部逆境信息传递给胞内大分子产生应激反应从而促进次生代谢产物的合成,是一种生物诱导子。MeJA的处理时间与浓度,都会显著影响紫杉醇的诱导效果(Ketchum et al,1999; Khosroushahi et al,2006)。当前研究表明,在MeJA诱导紫杉醇合成过程中,细胞色素氧化酶P450受到miRNA的调控,Qiu et al(2009)用Illumina测序研究红豆杉细胞中的小

RNA转录组,发现用MeJA诱导紫杉醇合成后,3个miRNA表达上调,14个表达下调。Li et al(2012)用高通量测序技术对MeJA处理后的红豆杉转录组进行了测序,得到了200bp序列读长和46581个非冗余重叠群,通过功能注释,发现MeJA处理后的代谢途径涉及茉莉酸、苯丙烷类和萜类化合物的生物信息学重建。但经过MeJA处理的悬浮细胞,具有不同细胞系之间紫杉醇分泌不稳定的缺点,Patil et al(2012)通过qRT-PCR技术研究了不稳定性的分子机制关系,结果发现不同细胞系紫杉醇合成途径基因的表达式均剧烈增加,虽系间产量差异巨大,但基因表达量的差异不显著。

冠菌素(Coronatine, Cor)是一种由菌株*Pseudomonas syringae*分泌于细胞外,结构及活性与茉莉酸相近的植物激素(梁焱,2011)。Cor能够作为茉莉酸-异亮氨酸复合物(jasmonoyl-isoleucine, JA-Ile)的强效抑制剂来启动植物防御反应(Katsir et al,2008)。Onrubia et al(2013)研究了Cor与MeJA对红豆杉悬浮细胞系中紫杉醇的诱导作用,结果发现Cor诱导的紫杉醇及其前体物质巴卡亭Ⅲ的含量为MeJA的4.8、3.6倍,较大地提高了萜类物质的产量。通过qRT-PCR检测,结果表明虽然冠菌素与茉莉酸甲酯的诱导效果差异较大,但两者基因诱导表达模式相似。

环糊精(Cyclodextrin, CD)是6~12个D-吡喃葡萄糖基由 α -1,4-葡萄糖苷键连接而成的环状低聚糖(沈海民等,2014)。它能够作用于细胞结构,形成环糊精包合物将不亲水的次生代谢物运送出胞外,促进细胞内次生代谢物向培养基的分泌。当向培养基中单独加入CD或茉莉酸甲酯时,其基因表达变化较小或表现不稳定,而同时添加两种物质时会出现协同效应,编码转运酶基因*BAPT*和*DBTNBT*表达量增加,紫杉醇含量增加到对照的55倍(Sabater-Jara et al,2014)。

随着学科之间的不断交融与渗透,交叉学科已经成为科学发展的重要趋势,这为紫杉醇诱导提供了新的视角。鲨烯素是存在动物各组织器官中,终止细胞增殖的信号分子。Amini et al(2014)研究了鲨烯素对紫杉醇以及巴卡亭Ⅲ产量的影响。结果表明,鲨烯素的处理提高了紫杉醇合成过程关键基因*ts*的表达,紫杉醇以及巴卡亭Ⅲ产量显著提高。同时H₂O₂含量也显著增加,H₂O₂可能是紫杉烷类物质合成过程的关键信号分子。

(2) 非生物诱导子: 非生物诱导子包括化学胁迫诱导子和物理胁迫诱导子, 如稀土元素铈(罗杰, 2003)、镧(梅兴国和田朝霞, 2000)、金属离子铜(胡蕾, 2012)、银(Zhang et al 2000)等。

Yang et al(2008)对稀土元素铈促进紫杉醇分泌的信号通路展开了研究, 结果发现其通过激活磷脂酶 A₂ 的高水平表达, 释放 LysoPC 和自由脂肪酸, 从而强化胞内茉莉酸不断积累, 促进紫杉醇的分泌。但铈同时也激活了磷脂酶 D, 产生高浓度信使分子磷脂酸, 启动下游凋亡途径。因此, 稀土元素的使用有一个最适使用范围, 高浓度会造成细胞活力下降, 甚至诱发细胞凋亡。

二甲基亚砜(DMSO)是一种非质子极性溶剂, 它能够溶解紫杉醇, 并具有抑制细胞的生长、诱导细胞凋亡的功能(Sánchez et al, 1999; Sharma et al, 1998)。Kajani et al(2012)发现二甲基亚砜不仅可以促进紫杉醇产量的提高, 还能增加细胞的紫杉醇的胞外释放率, 其最佳使用浓度为 5%。

潘学武和董妍玲(2010)研究了脉冲及微交流电刺激对中国红豆杉悬浮培养体系紫杉醇分泌与释放的影响。结果表明, 两种电刺激均能不同程度的促进了紫杉醇的诱导与释放, 其中在脉冲电刺激作用下, 紫杉醇最高产量达到 12.24 L · mg⁻¹, 为对照的 7~9 倍, 胞外释放率是对照的 4~5 倍。

O₃是一种强氧化剂, 它会迅速与细胞隙存在的 H₂O 反应, 产生大量的活性氧自由基(ROS), ROS 会导致蛋白质的氧化、脂质过氧化, 从而加速细胞衰老(Fuhrer & Booker, 2003; Kangasjarvi et al, 2005)。Xu et al(2011)发现暴露在 O₃环境中的中国红豆杉悬浮细胞 ABA 含量与紫杉醇产量显著上升。为了检测 ABA 是否促进了紫杉醇的产生, 作者用 ABA 抑制剂氟化物进行处理, 结果发现 ABA 的抑制不仅降低了 O₃对紫杉醇的诱导作用, 而且具有剂量效应。实验证明 ABA 在 O₃诱导中紫杉醇含量上升的过程中具有重要作用。鉴于 ABA 和紫杉醇合成的紧密关系, Li et al(2012)通过过表达 ABA 合成途径中的关键酶 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) 基因, 也获得了高产紫杉醇转基因细胞系。由此可见, 虽然人们可以通过挖掘调控紫杉醇代谢途径的转录因子, 构建多个关键酶基因组合表达的转基因细胞系、高表达相关转录因子来激活紫杉醇生物合成的关键酶, 但依靠基因工程来提高紫杉醇含量实现产业化生产依然需要其他因素的支撑。

(3) 生物与非生物诱导子的协同作用: 在植物的防御反应中, 会出现多个信号途径同时反应的情况(Zhao et al, 2005), 因此生物与非生物诱导子的联合使用可能具有协同效应, 能共同促进紫杉醇的生产。水杨酸是一种诱导多种植物对细菌、病毒产生抗性, 参与植物对病原防卫反应的生物诱导子。而超声波则通过增加膜透性, 促进细胞次生代谢物积累, 是一种非生物诱导子。Rezaei et al(2011)研究了超声波与水杨酸对红豆杉悬浮细胞系紫杉醇含量的影响, 结果发现其产量比两种诱导子单独使用时分别高出 4 倍与 1.2 倍, 比对照高出 8 倍。但并不是所有生物与非生物诱导子的联合使用都具有协同效应, 不同诱导子可能涉及不同的细胞防御机制, 因此会出现相互干扰的情况。Onrubia et al(2010)用 MeJA 与水合硫酸氧钒共同处理红豆杉悬浮细胞, 结果发现紫杉醇最高产量的出现时间要比对照与单独使用诱导子的情况延迟 4 d, 但其次生代谢物分泌量比单独使用 MeJA 作为诱导子时低。

2.2.2 前体饲喂 紫杉醇是一个基本骨架为紫杉烷类的三环二萜, 生物合成以乙酰辅酶 A 为原料, 经甲瓦龙酸、牛儿醇、牛儿醇基牛儿醇基焦磷酸、紫杉二烯等一系列步骤, 因此补加其生物合成过程的中间体可能促进细胞中紫杉醇的合成。翟雪霞和李友勇(2009)发现甘氨酸、丝氨酸、L-苯丙氨酸三种前体物质能提高细胞的紫杉醇合成能力, 但会抑制愈伤组织的生长; 与其不同的是 D-苯丙氨酸, 它不仅能促进愈伤组织的生长, 而且显著提高了紫杉醇合成能力, 经 D-苯丙氨酸处理后, 紫杉醇含量高达 0.224%。紫杉烷是红豆杉悬浮培养中具有五甲基十五碳烯骨架的二萜类产物的总称, 大部分都可以作为紫杉醇的半合成原料(程立超等, 2013)。周忠强等(2005)发现丙酮酸钠、苯甲酸钠、乙酸钠和丙酮酸钠等前体物质也能促进紫杉烷的合成, 其中苯甲酸钠可使 11-二烯产率提高 245.2%。

2.2.3 添加抑制剂 添加代谢旁路抑制剂能够抑制某些分支代谢中关键酶的活性, 从而使反应朝有利于特定化合物的合成方向进行。植物中存在两条合成萜类代谢的途径, 胞浆中的甲羟戊酸途径和质体中的非甲羟戊酸途径。刘智等(2005)采用甲羟戊酸途径抑制剂洛伐它汀和非甲羟戊酸途径抑制剂磷霉素, 对红豆杉悬浮细胞进行处理, 发现两种途径对紫杉醇的生物合成都有促进作用, 而非甲羟戊酸途径贡献较大。通过定量 PCR 技术分别检测两条

途径的关键酶 5-脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR) mRNA 水平变化,发现两种抑制剂都能够激活 HMGR 和 DXR 的转录,因此推断两种代谢途径存在协同作用,共同为紫杉醇的生物合成提供前体。Wang et al (2007) 的研究也表明在水杨酸存在条件下,DXP 途径的激活是紫杉醇前体 IPP 形成的主要原因。

2.2.4 前体、诱导子、抑制剂的协同诱导 在适宜的浓度范围内,多种因子的协同诱导较单因子诱导更能提高紫杉醇产量。李干雄等(2008)检测了在中国红豆杉悬浮细胞生长和紫杉醇积累的过程中,水杨酸、硝酸银、氨基酸前体、D-果糖和硫酸镧的添加时间的影响,发现这些促进剂的添加时间对细胞的生长没有显著的影响,但都能显著促进紫杉醇的合成。同时作者也发现蔗糖、柠檬酸三铵、水杨酸和氨基酸的组合对细胞生长和紫杉醇积累具有促进作用,在培养初始添加 $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸银,第 9 天添加 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖与 $1540 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸三铵显著提高紫杉醇的合成能力,紫杉醇达到可达到 $39.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (李干雄等 2010)。云南紫杉烷 C 是红豆杉悬浮培养的主要次生代谢产物之一,高明波等(2010, 2011)在特定时间用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,3-二羟丙基茉莉酸、 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ XAD-7HP 原位吸附进行处理,使得云南紫杉烷 C 产量达 $(1517 \pm 37) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,是对照处理的 11.1 倍;同时作者采用 RT-PCR 揭示了云南紫杉烷 C 合成过程中 6 个关键酶基因的动态变化,结果表明 2,3-二羟丙基茉莉酸的加入可使 6 个基因表达水平显著提高,而吸附剂的加入虽然会延缓基因表达水平的提高速度,但能使基因表达维持在较高水平(高明波等, 2010, 2011)。

2.3 基因工程

随着基因工程技术的发展,对红豆杉转基因器官的培养和目的基因的分离转化已经取得了突破性进展。Han et al(1994)用根癌农杆菌 B0542 和 C58 感染红豆杉幼茎,诱导出了可在不含植物激素培养基上快速生长的冠瘿瘤,并用 Southern 杂交检测到 T-DNA 的存在,首次证明了红豆杉可被农杆菌转化。苗莉云等(2013)通过构建 C-13 苯丙素侧链 CoA-乙酰转移酶基因 Bap1 的表达载体,采用根癌农杆菌介导法转化中国红豆杉细胞,qRT-PCR 结果显示,转基因细胞 Bap1 的 mRNA 表达量是未转化细胞的 1.26 倍,HPLC 检测其紫杉醇含量高达为 37.4

$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,是未转化细胞 1.87 倍。Zhang et al(2011)通过克隆 10-去乙酰巴卡亭 III-10 β -O-乙酰基转移酶基因 dbat,构建其表达载体 LBA4404 和 pCAM-BIA1303 转化中国红豆杉细胞系,经潮霉素抗性筛选获得转基因细胞系。分析结果表明,转基因细胞 dbat 的 mRNA 表达量是未转化细胞的 (5.3 ± 0.6) 倍,紫杉醇产量约为 $(35 \pm 0.61) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,是未转化细胞的 1.7 倍。作者同时对 3'-N-去苯甲酰紫杉醇 N-苯甲酰转移酶的基因 Dbtntb1 过表达,结果发现过表达 Dbtntb1 基因能提高中国红豆杉细胞中的紫杉醇产量约 37%(张鹏等,2014)。抑制特异基因的表达也能促进紫杉醇的合成,Li et al(2011)使用反义 RNA 技术抑制了合成紫杉醇侧链的紫杉烷 14 β -羟基化酶,结果表明三种主要的 C-14 氧取代紫杉烷类化合物 yunnanxane, taxuyunnanine C, sinenxan C 产量下降,紫杉醇含量提高。

2.4 其他处理

为克服组织培养过程中细胞具有的易变性的缺陷,科研人员把目光聚焦在了具有生长和遗传优势的植物干细胞上。Lee et al(2010)将去除木质部的红豆杉茎段在 B5 培养基上培养,获得了新生的干细胞。再将干细胞进行悬浮培养,发现它们生长速度快、性状稳定,在添加了诱导子茉莉酸甲酯、壳聚糖和前体物质苯丙胺酸的条件下,细胞分泌了 $102 \text{ kg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的紫杉醇,而同期由茎段和胚诱导的愈伤组织仅仅分泌了 $23.39 \text{ kg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。且由于干细胞具有游离生长、液泡分散的特性,对大规模工业化生产、不同规格的气升式、搅拌桨式生物反应器均具有较高适应性。

在悬浮培养过程中,细胞通常由于分裂的不均一性以聚集体形式存在,而细胞聚集体的大小通常与紫杉醇的含量有关。Kolewe et al(2010)研制了一种利用库尔特计数器来衡量细胞聚集体的方法,它可以让实验者在组织培养过程中实时监测细胞的生长状况,评价聚集体的大小及细胞的生物量的积累。且该方法比传统过滤与图像分析的方法操作更便捷、结果更为可靠。Bonfill et al(2006)将不同紫杉醇分泌能力的细胞系相混合,结果发现高产细胞系能够促进混合细胞系紫杉醇的分泌,但这种影响能力在多次继代后效果下降。

3 问题与展望

为提高细胞中紫杉醇的含量,前人对红豆杉悬

浮体系建立过程中的各个环节、紫杉醇生物合成的分子机制已进行了大量研究,对不同诱导子、前体物质、抑制剂的使用也已趋于成熟,可从细胞、分子不同水平,添加诱导子、前体饲喂等不同方式共同促进紫杉醇的生产。实验证明,云南红豆杉、东北红豆杉、曼地亚红豆杉等不同种均能建立起稳定的悬浮细胞系,但与此同时人类面临的癌症问题也日益严峻。目前全球每年新增癌症病人约 1 600 万,死亡人数约 720 万,据《全球癌症报告》预测,到 2025 年全球每年新增患癌病例将增至 1 900 万,到 2030 年将增至 2 200 万,这些癌症病人均为紫杉醇的主要使用者。而紫杉醇作为医院首选的抗肿瘤药物,其供应依然无法满足市场需求(Malik et al 2011)。

通过当前传统的方法来提高紫杉醇含量,主要面临两个问题:(一)大规模生物反应器生产紫杉醇不稳定,细胞表观形态、生长速率和紫杉醇合成能力在培养过程中均会发生显著变化。Fu et al(2012)发现经过 5 a 悬浮培养的红豆杉细胞系,颜色由棕色变为白色或无色,虽然生物量积累比率逐渐上升,但紫杉醇的产量逐渐降低。同时,由于悬浮细胞对培养基成分、细胞密度、温度等环境因素非常敏感,培养过程中细微的变化都会对显著影响悬浮系统的稳定性(Kim et al 2004)。(二)诱导子的使用会影响细胞的正常生长。紫杉醇是一种植保素,它在植物受到逆境胁迫时起防御作用,而诱导子则通过激活细胞的防御反应来改变红豆杉细胞合成紫杉醇的速率和积累,因此使用诱导子虽然可以在短期内促进紫杉醇含量提高,但不利用细胞长期培养。Patil et al(2014)发现茉莉酸甲酯会破坏细胞从 G1 期到 S 期的过渡过程,减缓细胞周期的进行,抑制细胞生长。而添加提取自 *Fusarium oxysprum* 的生物诱导子,则会在提升紫杉醇含量的同时直接造成细胞凋亡(Yuan et al 2002)。为解决这些问题,紫杉醇产量的提升可从以下几个方向发展:(一)研究红豆杉细胞在组织培养过程中发生遗传变异的影响因素,揭示紫杉醇在细胞离体培养中发生变化的分子调控机制。当前研究表明,长期培养的低产量细胞通常具有较高的甲基化水平(Fu et al 2012),而经过长时间限制生长保存的红豆杉愈伤组织在恢复处理过程中紫杉醇含量的降低也与基因的甲基化相关(Li et al 2013)。同时 Li et al(2009)也发现,紫杉醇含量下降的细胞系其代谢途径关键酶 *dxr*、*hmgr*、*ggpps*、*dbat* 转录水平降低。随着研究的不断深入,

以分子生物学手段解决次生代谢物不稳定性的问题指日可待。(二)利用代谢组学,研究诱导子促进作用与协同效应的分子机制,筛选低毒、高效、广谱、专一的诱导子,以不影响后续培养的方式激活紫杉醇的防御响应。内生真菌诱导子是一种具有发展潜力的生物诱导子,它不仅能在简单的培养基上生长良好,产生大量发酵产物(Zhou et al 2010),而且诱导效果高于普通诱导子(Li et al 2009),可进一步通过诱变育种等方式来提高菌种性能以促进紫杉醇的分泌。(三)开发出性能更高的生物反应器。大规模长期培养过程中,环境不稳定性是提升紫杉醇含量的阻碍之一,因此开发出即能建立稳定环境满足细胞生长需求,又考虑产物运输与贮藏以减少紫杉醇在贮运分解过程中损失的生物反应器,是实现细胞工程规模化生产紫杉醇的必经途径。(四)采用基因工程技术合成紫杉醇。随着紫杉醇生物合成分子生物学的深入研究,紫杉醇的生物合成过程已基本阐明,大部分功能与相关酶基因得到了克隆与表达。由于紫杉醇的合成主要受其下游调控,因此利用分子生物技术大规模生产紫杉醇,控制后生物合成特别是下游修饰过程以生产有特定性质的代谢产物,是未来实现紫杉醇的高效率生产的重要途径。

在紫杉醇生物合成过程研究不断深入条件下,其次生代谢调节途径不断清晰,届时将前人建立悬浮细胞的经验与最新生物技术相结合,将可以促进紫杉醇的大规模工业化生产,造福广大癌症病患者。

参考文献:

- AMINI SA, SHABANI L, AFGHANI L, et al, 2014. Squalenstatin-induced production of Taxol and baccatin in cell suspension culture of yew (*Taxus baccata* L.) [J]. *Turk J Biol* 38: 528-536.
- BONFILL M, EXPSITO O, MOYANO E, et al, 2006. Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures [J]. *In Vitro Cell Dev Biol* 42(5): 422-426.
- CHEETHAM P, PETRYLAK DP, 2013. Tubulin-targeted agents including docetaxel and cabazitaxel [J]. *Canc J* 19(1): 59-65.
- CHENG LT, XIE XK, HAN XB, et al, 2013. Influence factors of Taxane in *Taxus* [J]. *For By-Prod Spec Chin* 5: 103-106. [程立超, 谢孝坤, 韩小冰, 等, 2013. 红豆杉属植物中紫杉烷类物质含量影响因素综述 [J]. *中国林副特产* 5: 103-106.]
- CUSIDO RM, ONRUBIA M, SABATER-JARA AB, et al, 2014. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. [J]. *Biotechnol Adv* 32(6): 1157-1167.
- DU YT, CHEN JH, CU JY, et al, 2006. Influence of plant growth regulator on *Taxus chinensis* var. *mairei* callus culture and bio-

- synthesis of Taxol [J]. Nat Prod Res Dev ,18: 569-576. [杜亚填,陈建华,许建宇,等,2006.植物生长调节剂对南方红豆杉愈伤组织培养和紫杉醇合成的影响[J].天然产物研究与开发,18: 569-576.]
- FETT-NETO AG, PENNINGTON JJ, DICOSMO F, 1995. Effect of white light on Taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata* Sieb and Zucc [J]. J Plant Physiol, 146(5-6) : 584-590.
- FU CH, LI LQ, WU WJ, et al, 2012. Assessment of genetic and epigenetic variation during long-term *Taxus* cell culture [J]. Plant Cell Rep 31(7) : 1 321-1 331.
- FUHRER J, BOOKER F, 2003. Ecological issues related to ozone: agricultural issues [J]. Environ Int, 29(2-3) : 141-154.
- GAN FY, PENG LP, ZHEN GZ, 1996. Studies on callus culture and its Taxol production of *Taxus yunnanensis* [J]. Chin J Biotechnol S1: 308-311. [甘烦远,彭丽萍,郑光植,1996.云南红豆杉愈伤组织培养及其生产紫杉醇的研究[J].生物工程学报 S1: 308-311.]
- GAO MB, LI XT, RUAN CJ, 2011. Calli induction of *Taxus cuspidata* [J]. J Dalian Nat Univ ,13(3) : 256-259. [高明波,李兴泰,阮成江,2011.东北红豆杉的愈伤组织诱导[J].大连民族学院学报,13(3) : 256-259.]
- GAO MB, ZHANG W, LI XT, et al, 2010. Expression profiling of genes involved in *Taxuyunnanine* C biosynthesis in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* by repeated elicitation with a newly synthesized jasmonate, *in situ* absorption and sucrose feeding [J]. Chin Biotechnol 30(8) : 31-36. [高明波,张卫,李兴泰,等,2010.联合调控对中国红豆杉细胞关键酶基因表达的影响[J].中国生物工程杂志,30(8) : 31-36.]
- GAO MB, ZHANG W, LI XT, et al, 2011. Expression profiling of genes involved in *Taxuyunnanine* C biosynthesis in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* by repeated elicitation with a newly synthesized jasmonate and sucrose feeding [J]. Chin J Biotechnol 27(1) : 101-107. [高明波,张卫,李兴泰,等,2011.中国红豆杉细胞经重复诱导和蔗糖饲喂后云南紫杉烷C生产的相应基因表达变化[J].生物工程学报,27(1) : 101-107.]
- GE LL, GAO HB, ZHANG QC, et al, 2006. Changes of endogenous hormones in *Taxus cuspidata* during the development of female branch and leaf [J]. J Beihua Univ ,7(2) : 172-177. [葛丽丽,高红兵,张启昌,等,2006.东北红豆杉雌株枝、叶生长过程中内源激素变化的实验研究[J].北华大学学报,7(2) : 172-177.]
- HAN KH, FLEMING P, WLAKE K, et al, 1994. Genetic transformation of mature *Taxus*: an approach to genetically control the *in vitro* production of the anticancer drug, Taxol [J]. Plant Sci 95(2) : 187-196.
- HAN PP, YE TX, QIAO B, et al, 2013. Taxoids profiling of suspension *Taxus chinensis* var. *mairei* cells in response to shear stress [J]. Biochem Eng ,77(15) : 66-73.
- HAN XH, LI L, DUAN CH, 2013. Effect of different hormones on induction and proliferation of callus in *Taxus* [J]. J Green Sci Technol ,1: 173-174. [韩晓红,李磊,段春红,2013.不同激素对红豆杉愈伤组织诱导及增殖的影响[J].绿色科技,1: 173-174.]
- HE K, 2006. Two kinds of *Taxus* callus culture, browning inhibition and Taxol content detection [D]. Shanghai: Fudan University. [何康,2006.两种红豆杉植物愈伤组织培养、褐化抑制及紫杉醇含量检测[D].上海:复旦大学.]
- HUANG NZ, FU CM, HE CX, et al, 2007. Callus induction and subculture of *Taxus media* var. *hicks* [J]. Guangxi Sci ,14(3) : 306-311. [黄宁珍,付传明,何成新,等,2007.曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养研究[J].广西科学,14(3) : 306-311.]
- HU K, ZHU SQ, TAN F, et al, 2004. Studies on callus induction of *Taxus media* and darkening inhibition in callus subculture [J]. J SW Chin Norm Univ 29(04) : 659-663. [胡凯,祝顺琴,谈锋,等,2004.曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐化的研究[J].西南师范大学学报,29(04) : 659-663.]
- HU L, 2012. The different effect of elicitor on Taxol content of *Taxus media* [J]. Mod Agric Sci Technol ,5: 12-13. [胡蕾,2012.不同诱导子对曼地亚红豆杉紫杉醇含量的影响[J].现代农业科技,5: 12-13.]
- JIAN ZY, LI M, XU GF, et al, 2013. Isolation of an endophytic fungus producing baccatin III from *Taxus wallichiana* var. *mairei* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol 40(11) : 1 297-1 302.
- JIN ZL, LIU JS, LU JL, et al, 2010. Effects of different medium on callus induction from *Taxus cuspidata* Sied. et Zucc [J]. J Anhui Agric Sci 38(19) : 9 993-9 994. [金贞兰,刘继生,鲁京兰,等,2010.不同培养基对东北红豆杉愈伤组织诱导的影响[J].安徽农业科学,38(19) : 9 993-9 994.]
- KAJANI AA, MOGHIM S, MOFID MR, 2012. Enhanced taxane production and secretion from *Taxus baccata* cell culture by adding dimethylsulfoxide [J]. Biotechnol Appl Biochem ,59(3) : 223-227.
- KANGASJARVI J, JASPERS P, KOLLIST H, 2005. Signalling and cell death in ozone-exposed plants [J]. Plant Cell Environ 28: 1 021-1 036.
- KATSIR L, SCHILMILLER AL, STASWICK PE, et al, 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine [J]. P Natl Acad Sci USA , 105(19) : 7 100-7 105.
- KETCHUM REB, GIBSON DM, CROTEAU RB, et al, 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate [J]. Biotechnol Bioeng 62(1) : 97-105.
- KHOSROUSHAHI AY, VALIZADEH M, GHASEMPOUR A, et al, 2006. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* [J]. Cell Biol Int 30(3) : 262-269.
- KIM BJ, GIBSON DM, SHULER ML, 2004. Effect of subculture and elicitation on instability of Taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures [J]. Biotechnol Prog ,20(6) : 1 666-1 673.
- KOLEWE ME, ROBERTS SC, HENSON MA, 2010. Characterization of aggregate size in *Taxus* suspension cell culture [J]. Plant Cell Rep 29(5) : 485-494.
- LEE EK, JIN YW, PARK JH, et al, 2010. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products [J]. Nat Biotechnol 28(11) : 1 213-1 217.
- LIANG Y, 2011. Progress in biosynthesis of coronatine [J]. Mod Chem Ind ,31(5) : 25-29. [梁焱,2011.冠菌素生物合成的研究进展[J].现代化工,31(5) : 25-29.]
- LI FL, MA XJ, HU XL, et al, 2011. Antisense-induced suppression of taxoid 14b-hydroxylase gene expression in transgenic *Taxus × media* cells [J]. Afr J Biotechnol ,10(44) : 8 720-8 728.

- LI GX, LI LZ, ZENG FT, et al, 2008. Effect of the addition time of some enhancers on Taxol biosynthesis in cell suspension culture of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd [J]. *Nat Prod Res Dev*, 20: 876-879. [李干雄, 李志良, 曾腾锋, 等, 2008. 几种促进剂的添加时间对中国红豆杉细胞悬浮培养紫杉醇合成的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 20: 876-879.]
- LI GX, ZHANG JW, LUO XL, et al, 2010. The effect of combinational enhancers on Taxol biosynthesis in cell suspension of *Taxus chinensis* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 41(9): 1 552-1 555. [李干雄, 张京维, 骆雪兰, 等, 2010. 促进剂组合对中国红豆杉细胞悬浮培养紫杉醇合成的影响 [J]. *中草药*, 41(9): 1 552-1 555.]
- LI LQ, FU CH, ZHAO CF, et al, 2009. Efficient extraction of RNA and analysis of gene expression in a long-term *Taxus* cell culture using real-time RT-PCR. [J]. *Z Naturforsch C*, 64(1-2): 125-130.
- LI LQ, LI XL, FU CH, et al, 2013. Sustainable use of *Taxus media* cell cultures through minimal growth conservation and manipulation of genome methylation [J]. *Process Biochem*, 48(3): 525-531.
- LI L, ZHANG YF, HE K, et al, 2006. Callus induction and darkening inhibition in tissue culture of *Taxus chinensis* var. *mairei* and *Taxus media* [J]. *J Fudan Univ* 45(6): 702-707. [李丽, 张湮帆, 何康, 等, 2006. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制 [J]. *复旦学报* 45(6): 702-707.]
- LI ST, FU CH, ZHANG M, et al, 2012. Enhancing Taxol biosynthesis by overexpressing a 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase gene in transgenic cell lines of *Taxus chinensis* [J]. *Plant Mol Biol Rep* 30(5): 1 125-1 130.
- LI ST, ZHANG P, ZHANG M, et al, 2012. Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate [J]. *BMC Genomics*, 13(1): 295-305.
- LI YC, TAO WY, 2009. Interactions of Taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during Taxol accumulation [J]. *Cell Biol Int* 33(1): 106-112.
- LUO J, 2003. Influence of Taxol production by product extraction strategies in cell cultures of *Taxus chinensis* [J]. *J Wuhan Bot Res* 21(2): 165-169. [罗杰, 2003. 红豆杉细胞培养产物提取策略及其对紫杉醇的影响 [J]. *武汉植物学研究* 21(2): 165-169.]
- LIU Z, 2005. Effects of Fosmidomycin and Lovastatin treatment on Taxol biosynthesis in suspension culture cells of *Taxus chinensis* [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 31(2): 199-204. [刘智, 2005. 磷甘霉素和洛伐它汀处理对中国红豆杉悬浮培养细胞生物合成紫杉醇的影响 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 31(2): 199-204.]
- MALIK S, CUSIDÓ RM, MIRJALILI MH, et al, 2011. Production of the anticancer drug Taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review [J]. *Proc Biochem* 46(1): 23-34.
- MEI XG, TIAN CX, 2000. Increased accumulation of Taxol by some cell lines of *Taxus* in response to addition of Lanthanide [J]. *Nat Prod Res Dev*, 12(5): 38-41. [梅兴国, 田朝霞, 2000. 稀土化合物对悬浮培养红豆杉细胞紫杉醇生产和释放的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 12(5): 38-41.]
- MIAO LY, ZHANG P, LIU B, et al, 2013. Overexpression of a C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acetyltransferase gene promotes Taxol yield in *Taxus chinensis* cells [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 29(6): 549-554. [苗莉云, 张鹏, 刘博, 等, 2013. 过表达 *Bapt* 基因提高中国红豆杉细胞的紫杉醇产量 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* 29(6): 549-554.]
- ONRUBIA M, MOYANO E, BONFILL M, et al, 2010. An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: The role of *txs* and *bapt* gene expression [J]. *Biochem Eng J*, 53(1): 104-111.
- ONRUBIA M, MOYANO E, BONFILL M, et al, 2013. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate [J]. *J Plant Physiol*, 170(2): 211-219.
- PAN XW, DONG YL, 2010. Effect of electric stimulation on suspension cell cultures of *Taxus Chinensis* for Taxol production [J]. *Chem Bioeng*, 27(10): 65-68. [潘学武, 董妍玲, 2010. 电刺激对红豆杉悬浮培养细胞产紫杉醇的影响 [J]. *化学与生物工程* 27(10): 65-68.]
- PATIL RA, KOLEWE ME, NORMANLY J, et al, 2012. Contribution of taxane biosynthetic pathway gene expression to observed variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures [J]. *Biotechnol J* 7(3): 418-427.
- PATIL RA, LENKA SK, NORMANLY J, et al, 2014. Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells [J]. *Plant Cell Rep* 33(9): 1 479-1 492.
- QIU DY, PAN XP, WILSON I, et al, 2009. High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*) [J]. *Gene* 436(1-2): 37-44.
- QIU Y, JIA N, WANG L, et al, 2003. Progress of studies on elicitor's application in Taxol production in *Taxus* cell culture [J]. *Chin Bull Bot*, 20(2): 184-189. [仇燕, 贾宁, 王丽, 等, 2003. 诱导子在红豆杉细胞培养生产紫杉醇中的应用研究进展 [J]. *植物学通报* 20(2): 184-189.]
- REZAEI A, GHANATI F, DEHAGHI MA, 2011. Stimulation of Taxol production by combined salicylic acid elicitation and sonication in *Taxus baccata* cell culture [C]//Proceedings of international conference on life science and technology (Icist 2011): Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society (APCBEES): 193-197.
- SABATER-JARA AB, ONRUBIA M, MOYANO E, et al, 2014. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures [J]. *Plant Biotechnol J*, 12(8): 1 075-1 084.
- SÁNCHEZ A, MARTIN I, LLOBERA M, et al, 1999. Effects of growth and differentiation factors on the epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. [J]. *J Hepatol*, 31(5): 895-904.
- SCHIFF PB, FANT J, HORWITZ SB, 1979. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by Taxol [J]. *Nature* 277(5698): 665-667.
- SHARMA S, RAYMOND E, SODA H, et al, 1998. Dimethyl sulfoxide (DMSO) causes a reversible inhibition of telomerase activity in a Burkitt lymphoma cell line. [J]. *Leuk Res*, 22(8): 663-670.
- SHENG CZ, 2000. Studies on callus culture of Maire Yew (*Taxus chinensis* var. *mairei*) leaves [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 31(2): 130-132. [盛长忠, 2000. 南方红豆杉愈伤组织培养的研究 [J]. *中草药* 31(2): 130-132.]
- SHEN HM, JI HB, WU HK, et al, 2014. Recent advances in the

- immobilization of β -Cyclodextrin and their application [J]. *Chin J Org Chem*, 34: 1 549–1 572. [沈海民, 纪红兵, 武宏科 等, 2014. β -环糊精的固载及其应用最新研究进展 [J]. *有机化学*, 34: 1 549–1 572.]
- SITU LL, LI ZS, 2001. The relation between the cell growth, the volume of *Taxus cuspidata* and the composition of its cell culture medium [J]. *Hreditas*, 23(4): 325–328. [司徒琳莉, 李振山, 2001. 培养基成分对东北红豆杉细胞生长和紫杉醇产量的影响 [J]. *遗传*, 23(4): 325–328.]
- TAN Y, JIA R, TAO JH, et al, 2013. Regulation on biosynthesis of active constituents in medicinal plants by endophytic fungal elicitor [J]. *Chin Trad Herb Drugs* 44(14): 2 004–2 008. [谭燕, 贾茹, 陶金华 等, 2013. 内生真菌诱导子调控药用植物活性成分的生物合成 [J]. *中草药* 44(14): 2 004–2 008.]
- WANG YD, WU JC, YUAN YJ, 2007. Salicylic acid-induced Taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Cell Biol Int* 31(10): 1 179–1 183.
- XU MJ, JIN HH, DONG JF, et al, 2011. Abscisic acid plays critical role in ozone-induced Taxol production of *Taxus chinensis* suspension cell cultures. [J]. *Biotechnol Progr* 27(15): 1 415–1 420.
- YANG S, LU SH, YUAN Y, 2008. Lipidomic analysis reveals differential defense responses of *Taxus cuspidata* cells to two elicitors, methyl jasmonate and cerium (Ce^{4+}) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1781(3): 123–134.
- YUAN YJ, LI C, HU ZD, et al, 2002. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for Taxol production [J]. *Process Biochem* 38(2): 193–198.
- YU XH, SHAO JH, YUAN ZH, et al, 2013. Research progression production of Taxol by plant cell engineering [J]. *Acta Bot Boréal-Occident Sin* 33(6): 1 279–1 284. [余响华, 邵金华, 袁志辉 等, 2013. 植物细胞工程技术生产紫杉醇研究进展 [J]. *西北植物学报* 33(6): 1 279–1 284.]
- YU Y, CHEN JQ, 2012. Induction of callus tissue of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *J Wuhan Bioeng Inst*, 8(3): 171–176. [于娅, 陈嘉棋, 2012. 南方红豆杉愈伤组织诱导初探 [J]. *武汉生物工程学院学报* 8(3): 171–176.]
- ZANG X, LÜ XH, YANG DZ, et al, 2006. Effects of hormones on the embryo culture of two *T.* species *in vitro* [J]. *J Huazhong Agric Univ* 25(3): 310–312. [臧新, 吕晓辉, 杨冬之 等, 2006. 激素对 2 种红豆杉离体胚培养的影响 [J]. *华中农业大学学报* 25(3): 310–312.]
- ZHAI XX, 2009. Establishment and optimization of Taihang Mountain culture factors on *Taxus* cell line [D]. Xinxiang: Henan Normal University. [翟雪霞, 2009. 太行山红豆杉细胞系建立及培养因子优化研究 [D]. 新乡: 河南师范大学.]
- ZHAI XX, LI YY, 2009. Effect of amino acid precursors on callus growth and Taxol content [J]. *Hubei Agric Sci* 48(10): 2 494–2 496. [翟雪霞, 李友勇, 2009. 氨基酸前体物对红豆杉愈伤组织的生长和紫杉醇含量的影响 [J]. *湖北农业科学* 48(10): 2 494–2 496.]
- ZHANG CH, MEI XG, LIU L, et al, 2000. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Biotechnol Lett*, 22(19): 1 561–1 564.
- ZHANG CY, DONG YS, LI YL, et al, 2013. Unstructured models for suspension cultures of *Taxus media* cells in a bioreactor under substrate-sufficient conditions [J]. *Biochem Eng J*, 71: 62–71.
- ZHANG CY, DONG YS, LI YL, et al, 2013. Volumetric oxygen transfer coefficient of *Taxus media* cell suspension cultures in bioreactor [J]. *Chem Eng* 41(8): 1–5. [张长银, 董艳山, 李雅丽 等, 2013. 红豆杉细胞反应器悬浮培养氧传质系数的研究 [J]. *化学工程* 41(8): 1–5.]
- ZHANG FF, WANG P, JI DD, et al, 2010. Optimization of callus culture conditions for *Taxus chinensis* var. *mairei* and effect of gene expression of Taxol accumulation [J]. *Chin Trad Herb Drugs* 41(12): 2 058–2 062. [张芳芳, 王鹏, 姬丹丹 等, 2010. 南方红豆杉愈伤组织培养条件的优化及紫杉醇积累的基因表达效应分析 [J]. *中草药* 41(12): 2 058–2 062.]
- ZHANG P, LI ST, FU CH, et al, 2014. Overexpression of a 3'-N-Debenzoyltaxol N-benzoyltransferase gene promotes Taxol yield in *Taxus chinensis* cells [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 30(4): 377–382. [张鹏, 李书涛, 付春华 等, 2014. 过表达 *DbtNbt* 基因提高中国红豆杉细胞的紫杉醇含量 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* 30(4): 377–382.]
- ZHANG P, LI ST, LIU TT, et al, 2011. Overexpression of a 10-deacetylbaicatin III-10 β -O-acetyltransferase gene leads to increased Taxol yield in cells of *Taxus chinensis* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 106(1): 63–70.
- ZHANG ZH, 2000. Study on the regulation of Taxol production by cell culture [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology. [张长河, 2000. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的调控研究 [D]. 武汉: 华中理工大学华中科技大学.]
- ZHAO J, DAVIS LC, VERPOORTE R, 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites [J]. *Biotechnol Adv* 23(4): 283–333.
- ZHAO JP, 2013. Studies on regulation optimization of cell growth and Taxol production in *Taxus media* suspension culture [D]. Yangling: Northwest A & F University. [赵继鹏, 2013. 曼地亚红豆杉悬浮培养细胞产紫杉醇条件优化研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- ZHAO JP, YANG SS, 2014. Establishment of cell suspension culture system for *Taxus media* [J]. *J NW A & F Univ: Nat Sci Ed* 42(1): 189–195. [赵继鹏, 杨淑慎, 2014. 曼地亚红豆杉细胞悬浮培养体系的建立 [J]. *西北农林科技大学学报·自然科学版* 42(1): 189–195.]
- ZHENG C, 2013. Effects of three antioxidants on callus browning and its related substance contents in *Taxus media* Rehder [J]. *Plant Physiol J* 49(3): 259–263. [郑超, 2013. 三种抗氧化剂对曼地亚红豆杉愈伤组织褐化及相关物质含量的影响 [J]. *植物生理学报* 49(3): 259–263.]
- ZHOU XW, ZHANG HF, LIU L, et al, 2010. A review: recent advances and future prospects of Taxol-producing endophytic fungi [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86(6): 1 707–1 717.
- ZHOU ZQ, MEI XG, WU QJ, et al, 2001. Regulation of Taxol biosynthesis in cell suspension culture of *Taxus cuspidata* [J]. *Life Sci Res* 5(3): 238–241. [周忠强, 梅兴国, 吴奇君 等, 2001. 东北红豆杉细胞培养生产紫杉醇的调控研究 [J]. *生命科学研究* 5(3): 238–241.]
- ZHOU ZQ, MEI XG, 2005. Enhancement of Taxanes production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* by precursor-feeding [J]. *Chem Ind For Prod* 25(3): 51–54. [周忠强, 梅兴国, 2005. 前体饲喂对细胞培养生产紫杉醇的促进作用 [J]. *林产化学与工业* 25(3): 51–54.]