

专论与综述 Review

喜树碱的生物合成途径和代谢调控

皮妍¹, 蒋科技², 乔守怡¹, 唐克轩^{1,*}¹ 复旦大学生命科学学院, 上海 200433; ² 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090

Biosynthesis Pathway and Metabolic Regulation of Camptothecin

PI Yan¹, JIANG Ke-Ji², QIAO Shou-Yi¹, TANG Ke-Xuan^{1,*}¹School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; ²East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

摘要: 喜树碱是一种具有抗肿瘤活性的萜类吲哚生物碱, 最早是从我国特有植物喜树中分离获得的。本文概述喜树碱的天然分布合成途径和代谢调控的研究进展, 并对喜树碱未来的生产和发展研究作了展望。

关键词: 喜树碱; 生物合成; 代谢工程

生物碱一般指来源于生物体内的分子结构中 含有氮原子的有机化合物, 但迄今为止还没有严格的定义, 本文中指的是含有氮原子的植物次生代谢产物。现在大约有 100 000 种生物碱的化学结构是已知的, 其中一部分在植物体内起植保素或植物内生的抗虫化合物的作用, 有一些则是长期作为刺激性物质、麻醉镇静剂或毒药使用(van Der Heijden 等 2004; Sriram 等 2005)。临床上采用的来自植物的抗癌生物碱主要有喜树碱(camptothecin, CPT)、紫杉醇(taxol)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)等(Raskin 等 2002)。喜树碱属于萜类吲哚生物碱(terpenoid indole alkaloids, TIAs), 存在于夹竹桃科(Apocynaceae)[以长春花(*Catharanthus roseus*)为代表]、马钱科(Loganiaceae)、茜草科(Rubiaceae)和蓝果树科(Nyssaceae)[以喜树(*Camptotheca acuminata*)为代表]植物中, 是一大类有药用价值的植物生物碱(Memelink 等 2001)。

喜树碱最早于 1966 年 Wall 等从我国特有植物喜树的木质部中分离获得, 后来又陆续在夹竹桃科的海木狗牙花(*Ervatamia heyneana*)、茶茱萸科的臭味假柴龙树(*Nothapodytes foetida*)以及茜草科的短小蛇根草(*Ophiorrhiza pumila*)等植物中发现。喜树碱抗癌机制独特, 是迄今为止发现的唯一的一种专门通过抑制拓扑异构酶 I 发挥细胞毒性的天然植物活性成分(Hsiang 等 1985)。根据喜树碱和其他次生代谢产物的分布, 可以推测, 在早期进化过程中, 其合成途径中可能涉及到编码酶基因。这些基

因在进化过程中可能并没有丢失, 而只是在某个特定时期是关闭的, 而在以后某个时间点又再次开启。

从目前的研究情况和研究趋势来看, 喜树碱及其类似物主要从喜树中分离获得(Sriram 等 2005)。作为喜树中的一种天然次生代谢产物, 喜树碱的产量受到喜树生长发育和环境因素的影响, 而过去人们一直致力于提取工艺和产品的开发, 后来随着喜树碱市场的扩大, 生产喜树碱及其类似物所需的原料即成为这一产业中的制约瓶颈。并且随着喜树资源的逐渐枯竭, 亟需对喜树这一资源进行更深入的研究。因此, 本文就喜树碱合成途径及与喜树碱代谢有关的研究进展作简要介绍。

1 喜树碱的植物属种和在喜树体内的分布

植物的次生代谢产物彼此在进化上有很大的相似性, 根据植物都产生或不产生某种次生代谢产物的特性可以推断, 它们起源于共同的祖先, 彼此有亲缘关系。从喜树碱分布的分子分类与被子植物中的系统发生分类的比较中, 可以看到一个奇怪的例外现象(Wink 2003)。这就是, 从一些无相关种属关系的被子植物中也可以分离到多功能的 TIAs——喜树碱。它们分别属于卫矛目中的臭味假柴龙树(Aiyama 等 1988)、*Pyrenacantha klaineana*

收稿 2009-09-09 修定 2009-10-26

资助 上海市科委项目(08391911800)。

* 通讯作者(E-mail: kxtang1@163.com; Tel: 021-65643552)。

(Zhou 等 2000)和 *Merrilliodendron megacarpum* (Arisawa 等 1981), 山茱萸目中的喜树(Wallis 等 1997)、洛氏喜树(*Camptotheca lowreyana*)和云南喜树(*Camptotheca yunnanensis*) (Li 等 2002), 龙胆目中的蛇根草(*Ophiorrhiza mungos*) (Tafur 等 1976)、短小蛇根草、*Ophiorrhiza filistipula* (Saito 等 2001)、海木狗牙花(Gunasekera 等 1979)和 *Mostuea brunonis* (Dai 等 1999)。

喜树是我国特有的树种(中国科学院中国植物志编辑委员会 1983), 属于蓝果树科喜树属多年生亚热带落叶阔叶树, 别名有旱莲木、千丈树等, 喜树属仅喜树 1 个树种。自 20 世纪 90 年代以来, 美国、日本、加拿大和英国等国家都积极投入大量的人力和物力进行喜树引种和栽培的研究以及喜树碱的开发, 喜树已成为继红豆杉(*Taxus chinensis*)之后的第 2 个重要的木本抗癌药用植物(Wallis 等 1997)。至今, 已从喜树中分离出 20 多种化学成分, 其中喜树碱及其类似物有 8 种, 它们的共同点是结构中都具有 5 个环(图 1 中的 A、B、C、D、E 环), 包含一个吡咯[3,4-b]喹啉环, 一个共轭吡啶环和一个 α -羟基六元内脂环。其中, 10-羟基喜树碱(hydroxy-camptothecin, HCPT)是喜树碱分子的第 10 位碳原子上的氢被羟基取代后的喜树碱的天然衍生物, 来源于喜树的果实和叶, 也可由喜树碱通过化学合成转化而来, 为黄色柱状结晶, 不溶于水,

微溶于有机溶剂, 具有蓝色荧光, 其钠盐溶于水。10-羟基喜树碱同样也有显著的抗癌活性, 但比喜树碱采用的剂量小、毒性轻、抗癌广谱(Zhang 等 1998; Ping 等 2006)。

喜树碱终年分布在喜树各个部位, 从其变化的整个水平来看, 根皮中的喜树碱变化幅度较大。在不同组织器官中的喜树碱含量有较大差异, 不同的研究结果也不一致, 这可能是由于采样时间、部位和分析方法等引起的差异。过去一直认为果实中的喜树碱含量最高, 根皮、树根及树皮中次之, 树枝中含量较低。近年来有研究表明, 组织越幼嫩的, 喜树碱含量越高, 枝(叶)龄越小的, 含量越高, 皮部较木质部含量高(Liu 等 1998; 杨磊等 2008)。王玲丽和刘文哲(2005)分析不同种源喜树幼枝中喜树碱含量的结果表明, 喜树碱含量在叶、种子和幼枝(幼叶和幼茎)中较高, 木质部中较少, 髓中最低。两年树龄的喜树各器官中的喜树碱含量普遍比一年树龄的高, 幼枝中顶枝的喜树碱含量比侧枝高。在喜树果实中, 喜树碱含量由外向内(果皮、种皮、胚)是逐渐增高的(杨磊等 2008)。也有研究表明, 未萌发的喜树种子的胚乳中喜树碱含量最高, 在种子萌发的过程中, 胚乳中喜树碱含量始终最高, 但呈波动下降趋势(张玉红等 2002)。表 1 是喜树中喜树碱及其天然衍生物 10-羟基喜树碱的含量分布。

植物幼嫩的叶片主要用于生产某些植物激素,

表 1 喜树中喜树碱和 10-羟基喜树碱的含量

组织和部位	样品来源	喜树碱含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	10-羟基喜树碱含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	参考文献
幼叶	Texas, USA	4 000~5 000	20~30	Lopez-Meyer 等 1994
种子	Texas, USA	3 000	25	Lopez-Meyer 等 1994
树皮	Texas, USA	1 800~2 000	2~90	Lopez-Meyer 等 1994
根	Texas, USA	400	13~20	Lopez-Meyer 等 1994
幼叶	Texas, USA	2 421~3 022	—	Li 等 2002
老叶	Texas, USA	482	—	Li 等 2002
幼嫩的果实	Texas, USA	842	—	Li 等 2002
成熟的果实	Texas, USA	2 362	—	Li 等 2002
发根	Texas, USA	1 000	150	Lorence 等 2004
愈伤组织	上海	2 040~2 360	80~100	Wiedenfeld 等 1997
细胞培养物	上海	2.5~4.0	—	van Hengel 等 1992

并作为光合作用的主要场所, 它们的营养丰富, 而且在生理结构特征上也容易吸引食草动物和昆虫的攻击, 许多植物都通过合成次生代谢产物来保护它

们的幼嫩组织。这可能就是喜树幼嫩的叶片中喜树碱含量比成熟叶片中高 5~6 倍及幼苗中喜树碱含量处于高峰的生态原因(Lu 和 McKnight 1999;

Lorence 和 Nessler 2004)。也可认为这是幼嫩的叶片和幼苗避免食草动物和致病菌袭击的一种化学防御机制,已经有一些现象显示喜树碱可能在植物防御化学反应中起作用。在美国很少看到昆虫或致病菌袭击栽培的喜树,食用喜树叶片的山羊即会中毒(Liu 等 1998; Lorence 和 Nessler 2004)。喜树对白蚁有一定的耐受性,美国已有一项关于用喜树碱和喜树碱类似物预防白蚁的专利(Li 等 2002)。

2 喜树碱的生物合成途径和ORCA3 (octadecanoic-responsive *Catharanthus* AP2-domain protein 3) 转录因子对喜树碱合成的代谢调控

萜类化合物是植物天然产物中最大的一类化合物,所有的天然萜类都来源于两个基本的五碳通用前体:异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。根据参与组成萜类五碳单位前体数量的不同,可以将萜类分为不同类型:只有一个五碳单位的单萜(5C),2个五碳单位组成的单萜(10C),3个五碳单位的倍单萜(15C),4个五碳单位的二萜(20C),6个五碳单位的三萜(30C),以及更多五碳单位的多萜等(Dewick 2002)。虽然植物萜类都来源于IPP和DMAPP,但其生物合成则由两条截然不同的途径完成:一是经典的甲羟戊酸,又名甲瓦龙酸(mevalonate, MVA)途径,另一是后来发现的1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP)途径。这两条途径分别在不同的亚细胞区域中进行:MVA途径位于细胞质中,DXP途径位于质体中,而且这两条途径所涉及到的基因和酶也完全不同(Bick 和 Lange 2003)。

2.1 喜树碱合成的上游途径及关键酶基因 在高等植物中, MVA途径和 DXP途径是同时存在并发挥作用的(Lorence 和 Nessler 2004)。

2.1.1 萜类在细胞质中通过MVA途径生物合成 细胞质中的萜类衍生自通过CO₂固定和形成的乙酰CoA。两个乙酰CoA (acetyl-CoA)分子在乙酰CoA:乙酰CoA C-酰基转运酶(acetyl-CoA: acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT)催化下缩合生成乙酰乙酰CoA (acetoacetyl-CoA) (Gual等1992),乙酰乙酰CoA与乙酰CoA在3-羟基-3-甲基戊二酰CoA合成酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS)作用下缩合生成3-羟基-3-甲基戊二酰CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA) (Luskey和

Stevens 1985), HMG-CoA在3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)作用下还原为MVA,这一反应是MVA途径中的限速反应(Basson等1988),所以这条途径命名为MVA途径。MVA经由甲瓦龙酸激酶(mevalonate kinase, MK) (Lluch等2000)和磷酸甲瓦龙酸激酶(phosphomevalonate kinase, PMK) (Tsay和Robinson 1991)依次分别催化的两步磷酸化生成5-焦磷酸甲瓦龙酸(mevalonate 5-diphosphate);最后,5-焦磷酸甲瓦龙酸在5-焦磷酸甲瓦龙酸脱羧酶(mevalonate 5-diphosphate decarboxylase, MDC)作用下生成IPP (Dhe-Paganon等1994),IPP和其异构物DMAPP在IPP异构酶(IPP isomerase, IPI)作用下可以相互转化(Wouters等2003)。

HMGR是MVA途径中的限速酶,依赖于NADPH催化HMG-CoA生成MVA,此反应是MVA途径中最重要限速反应(Caelles等1989)。编码HMGR的基因已经从喜树(Maldonado-Mendoza等1997)、长春花(Maldonado-Mendoza等1992)、甜瓜(Kato-Emori等2001)、番茄(Park等1992)和拟南芥(Learned和Fink 1989)等多种植物中得到克隆。HMGR对来源于MVA途径的萜类物质代谢流的流向起决定性作用,因而此基因的表达模式多样,受到多种因子的高度调节,其中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、外源生长调节物质、除草剂和甾醇等(Bach 1995)。

2.1.2 萜类在质体中通过DXP途径生物合成 在过去的几十年中,MVA途径曾被认为是萜类生物合成的唯一途径。后来,在细菌(Rohmer等1993)和植物(McCaskill和Croteau 1995)中发现了另一条独立的萜类生物合成途径,这一途径位于质体中,其最原初的前体物质是丙酮酸(pyruvate)和3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde 3-phosphate, G3P)。丙酮酸和G3P在1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXPS)作用下生成DXP (Sprenger等1997),这一反应是质体中萜类生物合成的第一个限速反应(Estevez等2001),正因为如此,所以这条途径命名为DXP途径;接下来,在DXP还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR)作用下,DXP经原子重排和还原生成2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(2-C-me-

thyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) (Takahashi 等 1998), 此反应是DXP途径中最重要的限速反应, 也是萜类物质代谢工程中最重要靶点; MEP和CDP在2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸胱氨酰转移酶(MEP cytidyltransferase, MCT)作用下缩合生成4-(5-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇[4-(cytidine 5-diphospho)-2-C-methylerythritol, CDP-ME] (Rohdich 等 2000)。5'-焦磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶[4-(cytidine 5-diphospho)-2-C-methylerythritol kinase, CMK] (Steinbacher等2003)催化CDP-ME的磷酸化生成4-(5'-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇-2-磷酸(CDP-MEP)。CDP-MEP在2-C-甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸合成酶(2-C-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, MECPS)作用下转化为2-C-甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸(2-C-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate, MEC) (Herz 等 2000)。DXP途径中的最后两步反应是羟甲基丁烯基-4-磷酸合成酶(hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase, HDS)催化MEC生成羟甲基丁烯基-4-磷酸(hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate, HMBPP) (Baker等1992), 最后HMBPP在异戊烯基焦磷酸/二甲基烯丙基焦磷酸合成酶(IPP/DMAPP synthase, IDS) (Cunningham 和 Gantt 2000)作用下转化为IPP和DMAPP (5:1)。

植物MVA和DXP途径分别位于不同的亚细胞区域中(subcellular compartment)。MVA途径存在于细胞质和线粒体中, 主要为甾醇、特定的倍半萜和泛醌等提供前体物质; DXP途径的酶都带有一段质体定位的信号肽, 因此被认为是定位于质体中, 主要为半萜、单萜、二萜、多萜和类胡萝卜素的合成提供前体(Eisenreich等2001; Adam等2002)。但是, 这两条代谢途径并不是绝对隔离的, 事实上, 这两条途径之间是对话(cross-talk)的。近年来, 用放射性标记物对长春花悬浮细胞进行定量核磁共振波谱研究的结果表明, 在MVA和DXP/MEP途径之间的对话不能用简单的两个独立的模型来解释, 而是涉及到更复杂的调控机制, 因此需要更深入研究(Schuhr等2003)。在喜树碱合成中的作用还有待深入研究。

2.2 喜树碱合成的下游途径及关键酶基因 喜树碱是一类单萜类吲哚生物碱。所有的TIAs, 包括喜树碱, 都来源于共同的前体异胡豆苷(strictosidine)。

异胡豆苷是由莽草酸途径生成的色胺(tryptamine)和由甲羟戊酸途径经多步反应生成的裂环马钱子苷(secologanin), 在异胡豆苷合成酶作用下缩合而成(图1)(Kutchan 1995)。图1中所标示的已克隆到的异胡豆苷生物合成途径中的关键酶基因, 其中最重要的关键酶是D-1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)、色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase, TDC)、香叶醇-10-脱氢酶(geraniol 10-hydroxylase, G10H)和异胡豆苷合成酶(strictosidine synthase, STR), 黑底加框的表示甲基茉莉酸(methyl jasmonate, MeJA)可以促使长春花中表达上调(其实是受到长春花转录因子ORCA3的调控) (Burnett等1993; van der Fits和Memelink 2000; Collu等2001), 正是由于这个共同途径的存在, 所以喜树中的TIAs代谢工程研究成为可能。

其他的种属特异性的酶和自发的转化反应决定之后生成的各种最终形式的TIAs, 在喜树中异胡豆苷之后的中间代谢步骤至今还没有阐明, 推测其中可能包括一个称为吲哚环的氧化体系, 其可导致喜树碱结构的重排, 所形成的中间产物是一种喹啉类生物碱(pumiloside), 也称为短小蛇根草苷(pumiloside, PML), 它已从短小蛇根草及喜树中提取并鉴定出来, 接下来的中间体可能是脱氧短小蛇根草苷(deoxypumiloside), 这在短小蛇根草中也有过报道。从脱氧短小蛇根草苷到喜树碱之间还有3个左右的其他中间体, 但对此至今仍未最终确定(Carte等1990; Kitajima等1997; Yamazaki等2003)。

TDC催化色氨酸脱羧生成色胺, 色胺是TIAs的前体之一。TDC催化的这一步反应是TIAs生物合成上游途径中的一步关键步骤。同时, 由于色氨酸也参与初级代谢调控, 因此认为TDC在连接初级代谢和次级代谢中起作用(Lorence和Nessler 2004)。编码TDC的基因已经从长春花(De Luca等1989)、喜树(Lopez-Meyer和Nessler 1997)和短小蛇根草(Yamazaki等2003)等植物中得到克隆。长春花*tdc*基因是单拷贝, 在长春花幼苗发育过程中表达量较高, 而且在萌发的过程中甲基茉莉酸可增强TDC的活性, 从而促使生物碱积累。长春花*tdc*基因受转录因子ORCA3的正调控; 在长春花中超量表达*tdc*基因, 可导致色胺的大量积累, 但下游的TIAs积累并不明显, 而同时转化*tdc*和*str*基因

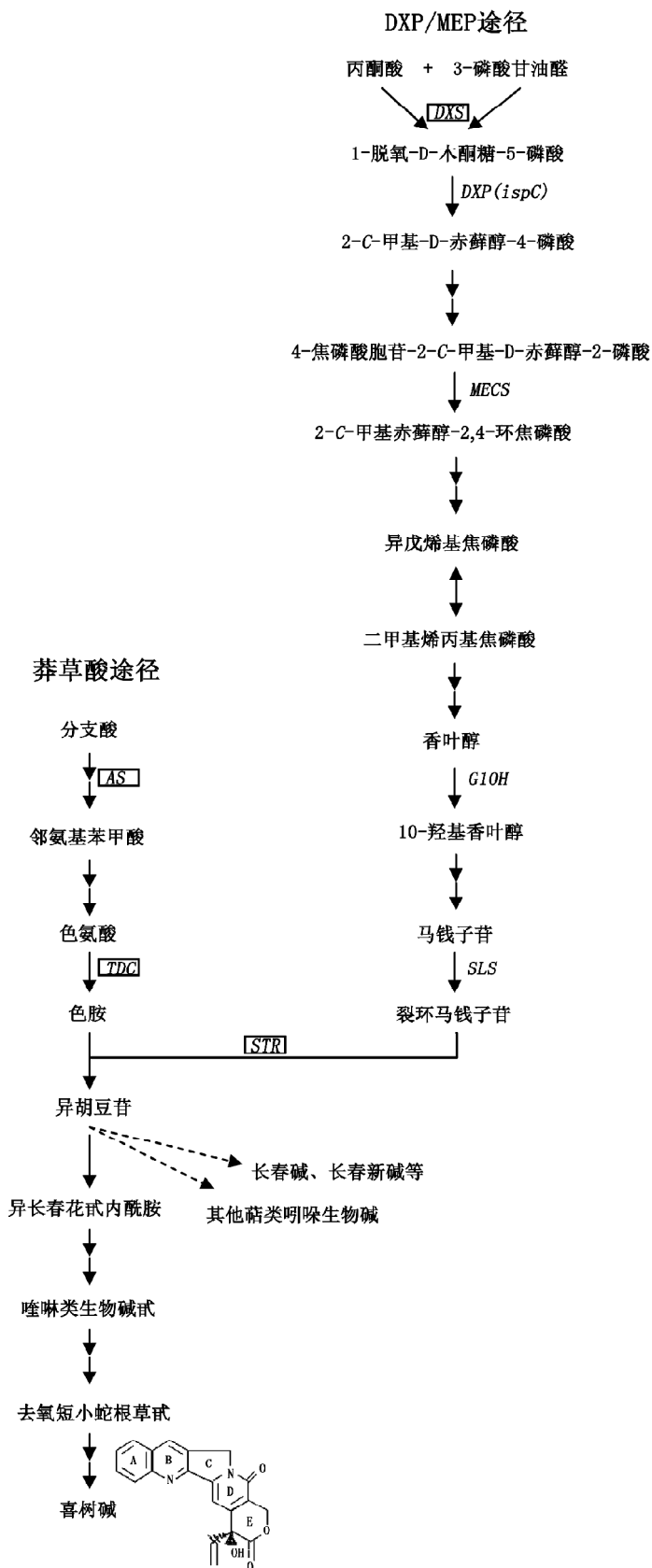


图1 喜树碱的生物合成途径(Lorence 和 Nessler 2004)
 多箭头表示中间有多个步骤, 相应步骤酶的编码基因和其对应的位置。

可促使下游 TIAs 积累增加(Canell 等 1998)。与长春花相比, 喜树中存在两个 TDC 的编码基因。其中 *tdc1* 受发育调控, 在叶尖、幼茎和树皮中, 喜树碱含量最高的组织其表达水平也最高。而且 *tdc1* 表达在幼苗发育期间也升高, 在种子萌发期间其与生物碱的积累有关。*tdc2* 只有在喜树叶盘和细胞培养时受真菌诱导物或以甲基茉莉酸处理时才会表达, 但是这些处理不会影响 *tdc1* 的表达。这说明喜树中 *tdc1* 可能是发育调控的化学机制中的一部分, 而 *tdc2* 是受病原菌诱导的防御机制的一部分(Lopez-Meyer 和 Nessler 1997)。

G10H是一种细胞色素P450氧化酶, 它可以在 C10 位置上羟化单萜类的前体物质——香叶基焦磷酸, 生成 10- 羟基香叶醇。迄今已经成功地从长春花中获得G10H的cDNA并对其功能进行了验证(Collu 等 2001)。Whitmer 等(1998)在长春花中的研究表明, 裂环马钱子苷的生成是TIAs生产的限制因素之一, 而G10H是裂环马钱子苷合成的关键调控位点: *g10h* 基因的超量表达, 可诱导裂环马钱子苷的积累; 而且, 在 MeJA 的诱导下, G10H 的活性从每毫克蛋白 $240 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ 上升至 $335 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$, 长春花培养细胞中的 TIAs 产量也同时增加, 说明 G10H 的活性与 TIAs 的产量有密切的关系(Collu 等 2002)。到目前为止, 还未见从喜树中克隆到 *g10h* 并进行功能研究的报道。

STR是TIAs生物合成途径中最重要的关键酶, 它将色胺和裂环马钱子苷耦合成成为 TIAs 的前体化合物异胡豆苷, 此步反应是 TIAs (包括各种 TIAs, 如长春花碱、长春新碱、喜树碱和羟基喜树碱等) 生物合成中的瓶颈之一(Memelink等2001; Yamazaki 等 2003)。这步反应是 TIAs 生物合成途径的中心反应, 也是此途径中的分支点, 生成的异胡豆苷是生成各类 TIAs 的通用前体, 故 STR 在 TIAs 代谢中具有至关重要的作用。Canell 等(1998)报道, 长春花 *str*、*tdc* 基因编码区在 CaMV 35S 启动子作用下, 用农杆菌转化(单转和共转化)长春花细胞; 共转化 *tdc* 和 *str* 的长春花中表现出 STR 和 TDC 的高酶活, 且转化细胞中的色胺、异胡豆苷和多种 TIAs 的产量都有所提高; 接着, 单转 *str* 基因的长春花细胞中的 TIAs 含量也有提高, 而单独转 *tdc* 的细胞中则没有出现类似的现象。由此可见, *str* 组成性超量表达可以导致 TIAs 产量的提高, STR 是

TIAs 代谢工程必选靶点。如果将长春花 *str* 在其他生产 TIAs 植物中表达, 也能提高 TIAs 的含量。Geerlings 等(1999)报道, 在金鸡纳树毛状根中超量表达长春花 *tdc* 和 *str* 基因后, TIAs 和奎宁类生物碱的含量大大提高。现在已经从长春花、马钱子、蛇根草(生产喜树碱和羟基喜树碱)等植物中均克隆到 *str* 基因, 但在喜树中的报道还未见。

2.3 ORCA3转录因子对生物碱合成的代谢调控 植物细胞必须调节其基础代谢途径以维持次级代谢产物的生物合成。甲基茉莉酸既诱导 TIAs 代谢途径中的基因, 又诱导合成 TIAs 前体的基础代谢基因。ORCA3是一个受甲基茉莉酸诱导的植物基础和次生代谢的转录调控因子。

ORCA3蛋白由203个氨基酸组成, 基因内部没有内含子结构, 是一种 AP2/ERF 结构域蛋白, 带有一个典型的 AP2 DNA 结合结构域。AP2/ERF 结构域转录因子在植物胁迫反应中起主要的调控作用。受 AP2/ERF 结构域转录因子调控的植物防御基因包括: 茉莉酸诱导的次级代谢中的基因、诱导物诱导的与植物疾病相关的基因、乙烯诱导的与植物疾病相关的基因以及寒冷和干旱诱导的基因等(Mem-elink 等 2001; van Der Heijden 等 2004)。

在长春花中, *orca3* 受甲基茉莉酸的诱导, 其过量表达还可诱导氨基苯甲酸合成酶基因(*as*)以及 *dxs* 基因的表达, 它们都是 TIAs 前体合成的初级代谢途径中涉及到的酶(图 1); 同时, *orca3* 还诱导 *tdc* 和 *str* 基因的表达(van der Fits 和 Memelink 2000)。*orca3* 过量表达的细胞中, 可以提供 TIAs 吲哚部分的色氨酸和色胺积累并含量提高。显然, 作为 TIAs 生物合成代谢的中心调控者, *orca3* 是通过调控初级和次级代谢中的基因来调节 TIAs 合成的。鉴于 TIAs 代谢途径上游的多数步骤都是共通的, 未来喜树中的 TIAs 代谢工程研究, 也可以通过过量表达转录调节因子 *orca3* 诱导 TIAs 代谢途径中的基因表达, 控制和调节喜树碱的生物合成。

在茉莉酸合成途径中, 丙二烯氧化物环化酶(allene oxide cyclase, AOC)是其中至关重要的酶, 它催化一种不稳定的丙二烯氧化物环化生成茉莉酸的最终前体 12- 氧植物二烯酸。通常 AOC 是调控茉莉酸合成途径中最优先考虑的靶点(Ziegler等2000; Stenzel 等 2003; Jiang 等 2009), 所以这方面的研究也可以考虑通过茉莉酸生物合成途径来施行植物次

生代谢工程,也就是通过茉莉酸来调控次生代谢途径中多个基因的表达,从而提高目的次生代谢产物的含量。我们实验室曾在烟草中采用过量表达莨菪AOC基因的方法,提高了转基因烟草中尼古丁的含量(Jiang等2009)。此外,在喜树中表达茉莉酸途径中的关键酶基因 *CaAOC*,开展喜树 TIAs 代谢工程研究,进而了解其对喜树碱和羟基喜树碱含量的影响,也是值得考虑的。

3 结语

近几年来,喜树碱及其系列衍生物已迅速成为世界抗肿瘤药物市场中受人们关注的热点。1996年,美国FDA批准“拓扑替康”上市,在短短几年内它已迅速成为抗肿瘤药物市场上的后起之秀。目前,喜树碱的化学全合成已经取得成功,但是由于路线长、产率低、生产成本低,一时还无法投入工业化生产。因此,采用现代生物技术尤其是基因工程技术对喜树碱的生物合成进行调控,从而提高喜树碱产量,已经成为当前这方面研究的焦点。

植物细胞培养具有生产喜树碱的巨大潜力,而且可以作为阐明喜树碱生物合成途径的一种策略之一。Sakato等(1974)最早报道,喜树组织培养的培养物中喜树碱含量为 $0.002 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW),喜树各组织中喜树碱含量为 $0.2\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。研究显示,它与其他许多生物碱一样,只有在严密的细胞培养条件下,喜树碱才可以合成和累积(Lopez-Meyer等1994)。最近有研究报道,采用内生真菌可能将成为改变植物次生代谢产物——喜树碱的有效途径之一(Kusari等2009)。

采用离体培养的喜树细胞生产喜树碱及其类似物是扩大喜树碱来源的途径之一,它具有不破坏自然资源和不受自然条件限制的优点。采用植物细胞培养技术生产次生代谢产物的方法比栽培整株植物有以下优点:(1)次生代谢物生产完全在人工控制条件下进行,可以通过改变培养条件和选择优良细胞系的方法得到超越整株植物产量的代谢产物;(2)培养细胞是在无菌条件下生长的,故而可以排除病菌和虫害的侵袭;(3)可以进行特定的生物转化反应;(4)可以探索新的合成路线和获得新的有用物质(Wiedenfeld等1997; Liu和Li 2001; Pasquali等2006)。

在扩大喜树资源研究中,人们采用生物技术集中在进行以下两方面的研究:(1)细胞培养的生物反

应器生产喜树碱;(2)用发根农杆菌的Ri质粒诱导并建立发根培养的无性繁殖体系。到目前为止,还未见到喜树转基因的报道,仅Lorence等(2004)报道获得了喜树的毛状根,并在喜树毛状根中检测到喜树碱和羟基喜树碱。但并未得到稳定遗传的与天然植物组织中的喜树碱含量相当的细胞系。因而,今后应在喜树碱生物合成途径的分子遗传学和生物化学背景研究清楚的基础上,结合酶学开展代谢工程的研究,可能才是解决喜树碱药源匮乏的有效方法。

参考文献

- 王玲丽,刘文哲(2005). 不同种源喜树幼枝中喜树碱的含量. 植物学通报, 22 (5): 584~589
- 杨磊,李晓娟,赵春建,李佳慧,祖元刚(2008). 喜树生物碱在喜树植株中的分布. 植物生理学通讯, 44 (5): 873~876
- 张玉红,王洋,阎秀峰(2002). 喜树种子萌发和幼苗发育过程中喜树碱含量的变化. 植物生理学通讯, 38 (6): 575~577
- Adam P, Hecht S, Eisenreich WG, Kaiser J, Grawert T, Arigoni D, Bacher A, Rohdich F (2002). Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 12108~12113
- Aiyama R, Nagai H, Nokata K, Shinohara C, Sawada S (1988). A camptothecin derivative from *Nothapodytes foetida*. Phytochemistry, 27: 3663~3664
- Arisawa M, Gunasekera SP, Cordell GA, Farnsworth NR (1981). Plant anticancer agents XXI. Constituents of *Merrilliodendron megacarpum*. Planta Med, 43: 404~407
- Bach TJ (1995). Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants—a review. Lipids, 30: 191~202
- Baker J, Franklin DB, Parker J (1992). Sequence and characterization of the *gcpE* gene of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 73: 175~180
- Basson ME, Thorsness M, Finer-Moore J, Stroud RM, Rine J (1988). Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. Mol Cell Biol, 8: 3797~3808
- Bick JA, Lange BM (2003). Metabolic crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. Arch Biochem Biophys, 415: 146~154
- Burnett RJ, Maldonado-Mendoza IE, McKnight TD, Nessler CL (1993). Expression of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Camptotheca acuminata* is differentially regulated by wounding and methyl jasmonate. Plant Physiol, 103: 41~48
- Caelles C, Ferrer A, Balcells L, Hegardt FG, Boronat A (1989). Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Plant Mol Biol, 13: 627~638

- Canell C, Lopes-Cardoso MI, Whitmer S, van der Fits L, Pasquali G, van der Heijden R, Hoge JHC, Verpoorte R (1998). Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 205: 414~419
- Carte BK, Debrosse C, Eggleston D, Hemling M, Mentzer M, Poehland B, Troupe N, Westley JW, Hecht SM (1990). Isolation and characterization of a presumed biosynthetic precursor of camptothecin from extracts of *Camptotheca acuminata*. *Tetrahedron*, 46: 2747~2760
- Collu G, Garcia AA, van der Heijden R, Verpoorte R (2002). Activity of the cytochrome P450 enzyme geraniol 10-hydroxylase and alkaloid production in plant cell cultures. *Plant Sci*, 162: 165~172
- Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman AMG, van der Heijden R, Verpoorte R, Memelink J (2001). Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett*, 508: 215~220
- Cunningham FX Jr, Gantt E (2000). Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol*, 41 (1): 119~123
- Dai JR, Hallock YF, Cardellina JH, Boyd MR (1999). 20-*O*- β -glucopyranosyl camptothecin from *Mostuea brunonis*: a potential camptothecin pro-drug with improved solubility. *Nat Prod*, 62: 1427~1429
- De Luca V, Marineau C, Brisson N (1989). Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2582~2586
- Dewick PM (2002). The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. *Nat Prod Rep*, 19: 181~222
- Dhe-Paganon S, Magrath J, Abeles RH (1994). Mechanism of mevalonate pyrophosphate decarboxylase: evidence for a carbocationic transition state. *Biochemistry*, 33: 133551~133562
- Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoid. *Trends Plant Sci*, 6 (2): 78~84
- Estevez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P (2001). 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem*, 276: 22901~22909
- Geerlings A, Hallard D, van der Heijden R, Verpoorte R (1999). Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'Ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep*, 19: 191~196
- Gual JC, Gonzalez-Bosch C, Dopazo J, Perez-Ortin JE (1992). Phylogenetic analysis of the thiolase family implications for the evolutionary origin of peroxisomes. *J Mol Evol*, 35: 147~155
- Gunasekera SP, Badawi MM, Cordell GA, Farnsworth NR, Chitnis M (1979). Plant anticancer agents X. Isolation of camptothecin and 9-methoxycamptothecin from *Ervatamia heyneana*. *J Nat Prod*, 42: 475~477
- Herz S, Wungsintaweekul J, Schuhr CA, Hecht S, Luttgen H, Sagner S, Fellermeier M, Eisenreich W, Zenk MH, Bacher A et al (2000). Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2486~2490
- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 260: 14873~14878
- Jiang KJ, Pi Y, Hou R, Jiang LL, Sun XF, Tang KX (2009). Promotion of nicotine biosynthesis in transgenic tobacco by overexpressing allene oxide cyclase from *Hyoscyamus niger*. *Planta*, 229 (5): 1057~1063
- Kato-Emori S, Higashi K, Hosoya K, Kobayashi T, Ezura H (2001). Cloning and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in melon (*Cucumis melo L. reticulatus*). *Mol Genet Genomics*, 265: 135~142
- Kitajima M, Masumoto S, Takayama H, Aimi N (1997). Isolation and partial synthesis of 3(*R*)- and 3(*S*)-deoxypumiloxide; structural revision of the key metabolite from the camptothecin producing plant, *Ophiorrhiza pumila*. *Tetrahedron Lett*, 38: 4255~4258
- Kusari S, Zuhlke S, Spitteller M (2009). An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *J Nat Prod*, 72: 2~7
- Kutchan TM (1995). Alkaloid biosynthesis—the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, 7: 1059~1070
- Learned RM, Fink GR (1989). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2779~2783
- Li SY, Yi YJ, Wang YJ, Zhang ZZ, Beasley RS (2002). Camptothecin accumulation and variations in *Camptotheca*. *Planta Med*, 68: 1010~1016
- Liu ZJ, Carpenter SB, Bourgeois WJ, Yu Y, Constantin RJ, Falcon MJ, Adams JC (1998). Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*. *Tree Physiol*, 18: 265~270
- Liu ZJ, Li ZH (2001). Micropropagation of *Camptotheca acuminata* decaisne from axillary buds, shoot tips. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 37: 84~88
- Lluch MA, Masferrer A, Arro M, Boronat A, Ferrer A (2000). Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate kinase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 42: 365~376
- Lopez-Meyer M, Nessler CL (1997). Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed

- during development and stress. *Plant J*, 11: 1167~1175
- Lopez-Meyer M, Nessler CL, McKnight TD (1994). Sites of accumulation of the antitumor alkaloid camptothecin in *Camptotheca acuminata*. *Planta Med*, 60: 558~560
- Lorence A, Medina-Bolivar F, Nessler CL (2004). Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. *Plant Cell Rep*, 22: 437~441
- Lorence A, Nessler CL (2004). Molecules of interest—camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*, 65: 2735~2749
- Lu H, McKnight TD (1999). Tissue-specific expression of the beta-subunit of tryptophan synthase in *Camptotheca acuminata*, an indole alkaloid-producing plant. *Plant Physiol*, 120: 43~51
- Luskey KL, Stevens B (1985). Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation. *J Biol Chem*, 260: 10271~10277
- Maldonado-Mendoza IE, Burnett RJ, Nessler CL (1992). Nucleotide sequence of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, 100: 1613~1614
- Maldonado-Mendoza IE, Vincent RM, Nessler CL (1997). Molecular characterization of three differentially expressed members of the *Camptotheca acuminata* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) gene family. *Plant Mol Biol*, 34: 781~790
- McCaskill D, Croteau R (1995). Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha × piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta*, 197 (1): 49~56
- Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW (2001). ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci*, 6: 212~219
- Park H, Denbow CJ, Cramer CL (1992). Structure and nucleotide sequence of tomato *HMG2* encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol Biol*, 20: 327~331
- Pasquali G, Porto DD, Fett-Neto AG (2006). Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. *J Biosci Bioeng*, 101: 287~296
- Ping YH, Lee HC, Lee JY, Wu PH, Ho LK, Chi CW, Lu MF, Wang JJ (2006). Anticancer effects of low-dose 10-hydroxycamptothecin in human colon cancer. *Oncol Rep*, 15: 1273~1279
- Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Llic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N et al (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol*, 20: 522~531
- Rohdich F, Wungsintaweekul J, Eisenreich W, Richter G, Schuhr CA, Hecht S, Zenk MH, Bacher A (2000). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6451~6456
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*, 295: 517~524
- Rothenberg ML (1997). Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol*, 8: 837~855
- Saito K, Sudo H, Yamazaki M, Koseki-Nakamura M, Kitajima M, Takayama H, Aimi N (2001). Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila*. *Plant Cell Rep*, 20: 267~271
- Sakato K, Tanaka H, Mukai N, Misawa M (1974). Isolation and identification of camptothecin from cells of *Camptotheca acuminata* suspension cultures. *Agr Biol Chem*, 38: 217~218
- Schuhr CA, Radykewicz T, Sagner S, Latzel C, Zenk MH, Arigoni D, Bacher A, Rohdich F, Eisenreich W (2003). Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochem Rev*, 2: 3~16
- Sprenger GA, Schorken U, Wiegert T, Grolle S, Graaf AAD, Taylor SV, Begley TP, Bringer-Meyer S, Sahn H (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 12857~12862
- Sriram D, Yogeewari P, Thirumurugan R, Bal TR (2005). Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential. *Nat Prod Res*, 19: 393~412
- Steinbacher S, Kaiser J, Eisenreich W, Huber R, Bacher A, Rohdich F (2003). Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J Biol Chem*, 278: 18401~18407
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 51: 895~911
- Tafur S, Nelson JD, DeLong DC, Svoboda GH (1976). Antiviral components of *Ophiorrhiza mungos* isolation of camptothecin and 10-methoxycamptothecin. *Lloydia*, 39: 261~262
- Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto HA (1998). A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 9879~9884
- Tsay YH, Robinson GW (1991). Cloning and characterization of *ERG8*, an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes phosphomevalonate kinase. *Mol Cell Biol*, 11: 620~631
- van der Fits L, Memelink J (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and second-

- ary metabolism. *Science*, 289: 295~297
- van Der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W, Hallared D, Verpoorte R (2004). The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem*, 11: 607~628
- van Hengel AJ, Harkes MP, Wichers HJ, Hesselink PGM, Buitelaar RM (1992). Characterization of callus formation and camptothecin production by cell-lines of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tiss Org Cul*, 28: 11~18
- Wallis JG, Wang HY, Guerra DJ (1997). Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures. *Plant Mol Biol*, 35: 323~330
- Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, Guzewska J, Gustowski W (1997). Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tiss Org Cul*, 49: 213~218
- Whitmer S, Canel C, Hallard D, Goncalves C, Verpoorte R (1998). Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, 116: 853~857
- Wink M (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3~19
- Wouters J, Oudjama Y, Ghosh S, Stalon V, Droogmans L, Oldfield E (2003). Structure and mechanism of action of isopentenylpyrophosphate-dimethylallylpyrophosphate isomerase. *J Am Chem Soc*, 125: 3198~3199
- Yamazaki Y, Sudo H, Yamazaki M, Aimi N, Saito K (2003). Camptothecin biosynthetic genes in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*: cloning, characterization and differential expression in tissues and by stress compounds. *Plant Cell Physiol*, 44: 395~403
- Zhang RW, Li YF, Cai QY, Liu TP, Sun H, Chambless B (1998). Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent 10-hydroxycamptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Chemoth Pharm*, 41: 257~267
- Zhou BN, Hoch JM, Johnson RK, Mattern MR, Eng WK, Ma J, Hecht SM, Newman DJ, Kingston DGI (2000). Use of COMPARE analysis to discover new natural product drugs: isolation of camptothecin and 9-methoxycamptothecin from a new source. *J Nat Prod*, 63: 1273~1276
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai M, Wasternack C (2000). Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J Biol Chem*, 275: 19132~19138