

· 综 述 ·

紫杉醇生物合成与转录调控机制研究进展

孙凡淑, 党舒扬, 郑东然, 张贺, 王宇, 李玉花*, 吴昊*

东北林业大学生命科学学院 东北盐碱地植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

孙凡淑, 党舒扬, 郑东然, 张贺, 王宇, 李玉花, 吴昊. 紫杉醇生物合成与转录调控机制研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1380-1405.

SUN Fanshu, DANG Shuyang, ZHENG Dongran, ZHANG He, WANG Yu, LI Yuhua, WU Hao. Advances in paclitaxel biosynthesis and transcriptional regulation mechanisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1380-1405.

摘 要: 紫杉醇是一种珍贵的二萜类化合物, 通常从红豆杉树皮中提取获得, 具有显著的抗癌活性, 是治疗多种癌症的首选临床药物。然而, 由于紫杉醇在红豆杉树皮中的含量极低, 目前主要依赖于消耗红豆杉资源的化学半合成方法获得, 难以满足持续增长的临床需求。近年来, 研究者已经在紫杉醇的生物合成途径解析、转录调控机制及生物合成领域取得了显著进展。本文综述了利用化学合成法、异源生物合成法及利用细胞工程技术生产紫杉醇的研究进展, 详细介绍了紫杉醇生物合成途径与转录调控机制, 以期为生物合成紫杉醇相关研究提供参考。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 诱导子; 转录调控; 细胞工程技术

Advances in paclitaxel biosynthesis and transcriptional regulation mechanisms

SUN Fanshu, DANG Shuyang, ZHENG Dongran, ZHANG He, WANG Yu, LI Yuhua*, WU Hao*

Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

Abstract: Paclitaxel, a rare diterpene extracted from the bark of Chinese yew (*Taxus chinensis*), is renowned for its anti-cancer activity and serves as a primary drug for treating cancers. Due to the exceptionally low content of paclitaxel in the bark, a semi-synthetic method that depletes Chinese yew resources is used in the production of paclitaxel, which, however, fails to meet the

资助项目: 国家自然科学基金(U21A20243, 32271823); 黑龙江省自然科学基金(TD2022C001, YQ2021C003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U21A20243, 32271823) and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China (TD2022C001, YQ2021C003).

*Corresponding authors. E-mail: WU Hao, wuhao@nefu.edu.cn; LI Yuhua, lyhshen@126.com

Received: 2023-12-12; Accepted: 2024-02-05

escalating clinical demand. In recent years, researchers have achieved significant progress in heterologous biosynthesis and metabolic engineering for the production of paclitaxel. This article comprehensively reviews the advancements in paclitaxel production, encompassing chemical synthesis, heterologous biosynthesis, and cell engineering. It provides an in-depth introduction to the biosynthetic pathway and transcriptional regulation mechanisms of paclitaxel, aiming to provide a valuable reference for further research on paclitaxel biosynthesis. **Keywords:** Chinese yew (*Taxus chinensis*); paclitaxel; elicitors; transcriptional regulation; cell engineering

紫杉醇(paclitaxel, 简称 PT; 商品名 Taxol[®]) 作为一类源于红豆杉属植物的四环二萜类化合物, 拥有一种特异的 6-8-6-4 四环骨架结构, 并含有多达 11 个立体手性中心, 其分子结构因高度氧化作用而显得尤为复杂。该化合物最初是由短叶红豆杉(*Taxus brevifolia* Nutt.)树皮中提取得到, 该树皮在早期实验中便展现了抗肿瘤的潜在活性。经过化学家 Wani 等在 1966 年的反复实验探索, 终于从紫杉树皮中分离出了具有抗癌活性的成分——紫杉醇, 并于 1971 年借助 X 射线衍射及核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术, 明确了紫杉醇的化学结构^[1]。在随后数十年的研究中, 紫杉醇的作用机理被逐步揭示和阐明: 它通过稳定及增强微管蛋白的聚合作用, 促进微管结构的形成, 防止其解聚, 从而导致细胞停止分裂, 并触发细胞程序性死亡, 进而发挥其抗肿瘤的疗效。1992 年, 紫杉醇被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)正式批准用于治疗位居妇科癌症首位的卵巢癌^[2]。此后, 紫杉醇的应用领域迅速扩展, 其治疗适应症覆盖了包括前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、宫颈癌、食道癌、睾丸癌和胰腺癌。当前, 紫杉醇的研究应用正拓展至神经退行性疾病(如阿尔茨海默氏病或帕金森病^[3])以及与微管相关蛋白稳定有关的疾病(如牛皮癣^[4])。由于紫杉醇在癌症治疗领域的有效性, 其有可能成为历史

上最重要的抗肿瘤药物。根据市场分析, 紫杉醇注射液的全球市场在 2022 年约为 50.0 亿美元, 并预计在未来 10 年后, 即到 2032 年时, 市场规模将增长至超过 158.8 亿美元^[5]。尽管紫杉醇的医疗价值被广泛认可, 但它在自然界中的存在却极为稀少。据估算, 要想获取足够治疗一位患者所需的 2 g 紫杉醇, 必须砍伐 4 棵成熟的红豆杉^[6]。伴随着市场对紫杉醇需求量的持续增长, 野生红豆杉资源遭受了严重的破坏性采伐, 这不仅对生态环境产生了深远的负面影响, 而且这种依赖天然资源的生产方式明显不具备可持续性^[7]。因此, 迫切需要开发出一种可替代的、能够持续稳定供应紫杉醇的生产方法, 以减少对自然生态的影响, 实现药物生产的可持续性发展。本文将综述近年来在紫杉醇的化学合成、异源生物合成、本源植物细胞工程和转录调控等领域的研究进展, 以为紫杉醇类药物的生产提供理论基础及技术支持。

1 紫杉醇的化学合成研究进展

自 20 世纪 70 年代起, 紫杉醇因其结构的高度复杂性, 引起了国际化学界的广泛关注。全球众多化学家投身于合成紫杉醇的科学探索之中。1994 年, 佛罗里达州立大学的 Holton 教授团队, 首次以价廉易得的樟脑为起始原料, 经过长达 41 步的反应, 成功完成了紫杉醇的全合成^[8]。随后, 多位国际知名的合成化学家, 如

Nicolaou 等^[9]、Masters 等^[10]、Wender 等^[11]、Mukaiyama 等^[12]、Morihiro 等^[13]和 Kanda 等^[14]的研究团队相继宣布了紫杉醇的全合成成果。这些合成过程中,最简短者亦需 24 步,而最长者则需高达 60 步。2021 年,李闯创教授团队通过仅仅 21 步实现紫杉醇的不对称全合成,这是迄今为止最短的紫杉醇化学合成路线(图 1A)^[15]。2022 年, Iiyama 等报道了紫杉醇的第 10 例全合成,总步骤 50 步^[16]。2023 年, Imamura 等报道了紫杉醇的第 11 例全合成,总步骤 34 步^[17]。然而,所有这些从头合成的方法(图 1B)所得产率极低,获得的紫杉醇最高产率仅为 2.7%,远未达到工业化生产的要求。因此,如何高效、便捷地合成大量紫杉醇,仍然是当前科学研究面临的一大挑战。

1981 年,法国化学家 Potier 教授团队从欧洲红豆杉的叶片中分离出一种具备紫杉烷骨架的化合物——10-去乙酰基巴卡亭(10-deacetylbaecatin III, 10-DAB)^[18],该化合物不仅在结构上与紫杉醇极为相似,而且在红豆杉中的含量远超紫杉醇,每 kg 鲜叶能够提取约 1 g 的 10-DAB,而相同重量的干树皮中仅能获得 50 mg 的紫杉醇。更为关键的是,欧洲红豆杉作为一种四季常绿植物,其种植与养护成本较低,且收割其枝叶并不会影响其生长,这为可持续性地大规模获取 10-DAB 提供了可能。经过 8 年的研究和实验, Potier 教授团队的 Wahl 等开发出一条从 10-DAB 出发,仅需 4 步即可转化为紫杉醇的高效半合成路径^[18]。Holton 等在此基础上,开发了一条更为高效的半合成路线(图 1C)^[19],并最终被美国施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb, BMS)所采用,成为商业化生产紫杉醇的替代路线。在获得美国食品药品监督管理局批准后, BMS 公司开始使用 Holton 等的专利生产紫杉醇,从而停止了通过砍伐红豆杉来获取紫杉醇的方式。

尽管如此,紫杉醇半合成生产过程仍旧依赖于红豆杉的枝叶作为原料,而红豆杉的生长周期较长,同时, 10-DAB 在植物体中的含量也仅占干重的千分之一。因此,面对提取产率低、成本高的挑战,如何在不影响生态系统的前提下,实现紫杉醇的大规模、高效率合成,成为了现代科研中亟待解决的问题。

2 紫杉醇的异源生物合成研究进展

近年来,合成生物学和分子生物学技术的迅猛发展,为植物来源的天然药物的获取方式带来了革命性的变革。目前科学家们已经在微生物体系中实现了青蒿素^[20]的半合成及从头合成次丹参酮二烯^[21]、灯盏花素^[22]、PPT 型人参皂苷 F1 和 Rh1^[23]和阿片类药物^[24]等多种复杂结构的药用天然产物。为实现紫杉醇的异源生物合成,生物学家首先对紫杉醇的生物合成途径进行了深入解析。

2.1 紫杉醇的生物合成途径

紫杉醇的生物合成过程可划分为 3 个主要阶段:(1)紫杉烷二萜骨架——巴卡亭 III (baecatin III)的形成;(2) β -苯丙氨酸辅酶 A 侧链的合成;(3) β -苯丙氨酸辅酶 A 侧链的酰化连接以及侧链修饰(图 2)。侧链修饰这一步骤是紫杉醇合成的重要步骤,最终形成了紫杉醇这种化合物。

2.1.1 紫杉烷骨架结构——巴卡亭 III 的形成

紫杉醇的生物合成过程始于异戊二烯基二磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)与二甲基烯丙基二磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)的缩合反应。植物中,这两种前体物质由细胞质中的甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)和叶绿体中的甲基赤藓糖醇磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径合成^[25]。同时, IPP 和 DMAPP 可以在异戊烯基焦磷酸异

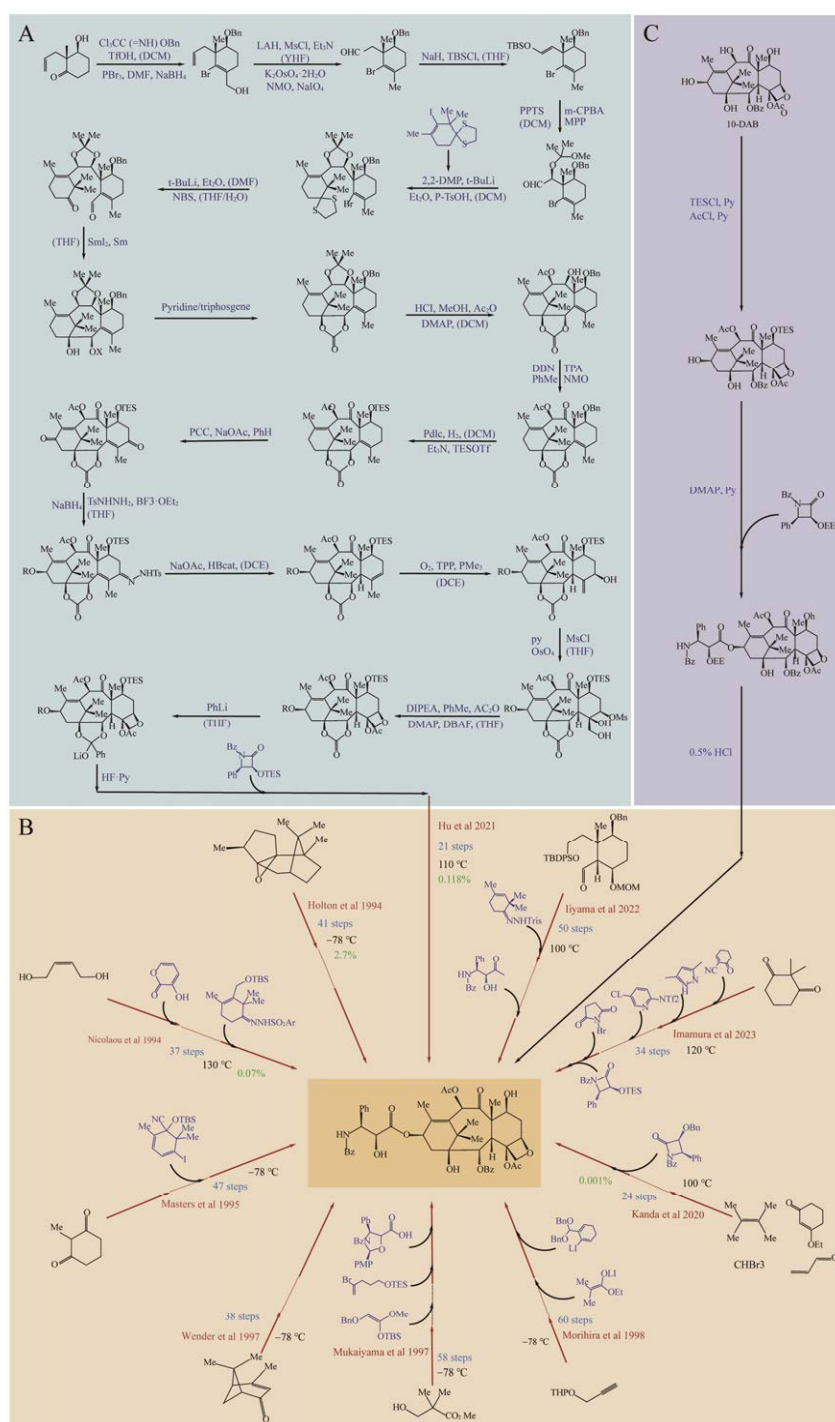


图1 紫杉醇化学全合成路径示意图 A: 李闯创教授团队21步紫杉醇的全合成路线^[15]。B: 紫杉醇的化学全合成路线, 红色箭头表示合成路径使用的有毒化合物, 温度表示在合成过程中的极端温度。C: Holton团队10-DAB出发的半合成路线^[19]。

Figure 1 Chemical total synthesis pathway of paclitaxel. A: 21 steps total synthesis of paclitaxel by Professor Li's team^[15]. B: The chemical total synthesis route of paclitaxel, the red arrow indicates the use of toxic substances in the synthesis pathway, and the temperature represents the extreme temperature during the synthesis process. C: Holton's team semi synthetic route starting from 10-DAB^[19].

构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI)的作用下进行异构体间的相互转换^[25]。接着,经过香叶基香叶基焦磷酸合酶(geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)的催化,IPP和DMAPP缩合生成香叶基香叶基二磷酸酯(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)^[26]。随后在紫杉二烯合成酶(taxadiene synthase, TS)的催化下,GGPP环化形成紫杉二烯[taxa-4(5),11(12)-diene]^[26]。接下来,该三环结构经历了紫杉二烯-5 α -羟基化酶(taxadiene-5 α -hydroxylase, T5 α H)介导的羟基化反应生成环氧化物中间体^[26]。进而,在T5 α H的再次催化下,在C5位发生羟基化,生成紫杉二烯-5 α -醇[taxa-4(5),11(12)-dien-5 α -ol]^[26]。然后,该中间体可能经历3种转化途径:(1)由紫杉烯醇-5 α -乙酰氧化基转移酶(taxadienol-5 α -O-acetyl transferase, TAT)催化C5 α 羟基的乙酰化,形成taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ylacetate,再由紫杉烷-10 β -羟基化酶(taxane-10 β -hydroxylase, T10 β H)催化,生成taxa-4(20),11(12)-dien-5 α ,10 β -diol-5-acetate^[27];(2)紫杉二烯-5 α -醇在紫杉二烯-13 α -羟基化酶(taxoid 13 α -hydroxylase, T13 α H)的催化下生成taxa-4(20),11(12)-dien-5 α ,13 α -diol^[27]。在生成taxa-4(20),11(12)-dien-5 α ,10 β -diol-5-acetate后,该中间体经历了包括C1、C2、C4和C7位的多次羟基化、C9的氧化,以及C4、C5双键的环氧化等一系列反应,最终生成2-去苯甲酰紫杉烷(2-debenzoyltaxane)^[27]。这些反应均由细胞色素P450介导^[27-28],但其发生的具体顺序尚不明确;(3)由T5 α H、紫杉烷-9 α -羟基化酶(taxane-9 α -hydroxylase, T9 α H)、紫杉烷-9 α -双加氧酶(T9- α -oxidase)和紫杉烷-1 β -羟基化酶(taxane-9 α -hydroxylase, T1 β OH)等一系列酶催化后生成10-脱乙酰-1-脱羟基巴卡亭III(10-deacetyl-1-dehydroxybaccatin III)^[29]。这表

明紫杉醇的生物合成并非单一线性途径,而是包含了合成其他类型紫杉烷结构的多个分支点。阐明这些顺序比反应更有难度,因为其中许多反应物有多个酰化位点,而酰化反应会产生大量的副产物^[30]。紫杉烷-2 α -苯甲酰基转移酶(taxane-2 α -O-benzoyltransferase, TBT)进一步催化2-去苯甲酰紫杉烷生成10-去乙酰基巴卡亭III(10-deacetyl baccatin III, 10-DAB)^[30]。接下来,其C10位羟基被10-去乙酰基巴卡亭III乙酰转移酶(10-deacetyl baccatin III-10-O-acetyltransferase, DBAT)乙酰化生成紫杉醇的骨架结构——巴卡亭III(baccatin III)^[30]。

2.1.2 β -苯丙氨酸辅酶A侧链的合成

紫杉醇的C13侧链是抗癌活性的关键基团,该侧链的合成主要经历异构化和酯化两个步骤, α -苯丙氨酸(α -phenylalanine)在苯丙氨酸氨基变位酶(phenylalanine aminomutase, PAM)作用下发生异构化反应,转化为其异构体 β -苯丙氨酸(β -phenylalanine)^[30]。接着,在 β -苯丙氨酸-辅酶A连接酶(β -phenylalanine-CoA ligase, PCL)作用下发生酯化反应,生成 β -苯丙氨酸辅酶A(β -phenylalanine-CoA)^[30]。

2.1.3 β -苯丙氨酸辅酶A侧链与母核结构酰化连接及其后续的侧链修饰

紫杉醇生物合成的一个重要步骤是巴卡亭III的C13羟基与 β -苯丙酰CoA侧链的乙酰化反应,该反应由3-氨基-3-苯基丙酰转移酶(3-amino-3-phenylpropanoyltransferase, BAPT)催化,生成 β -苯丙酰胺-巴卡亭III(β -phenylalanoyl baccatin III)^[27]。接着,该中间体在C2位被紫杉烷-2' α -羟基化酶(taxane-2' α -hydroxylase, T2' α OH)羟化,生成3' N -脱苯甲酰紫杉醇(3' N -debenzoyltaxol),并进一步被3' N -脱苯甲酰基-2'-脱氧紫杉醇- N -苯甲酰基转移酶(3' N -debenzoyl-2'-deoxytaxol N -benzoyltransferase, DBTNBT)催化,转化为最终产物紫杉醇^[27]。

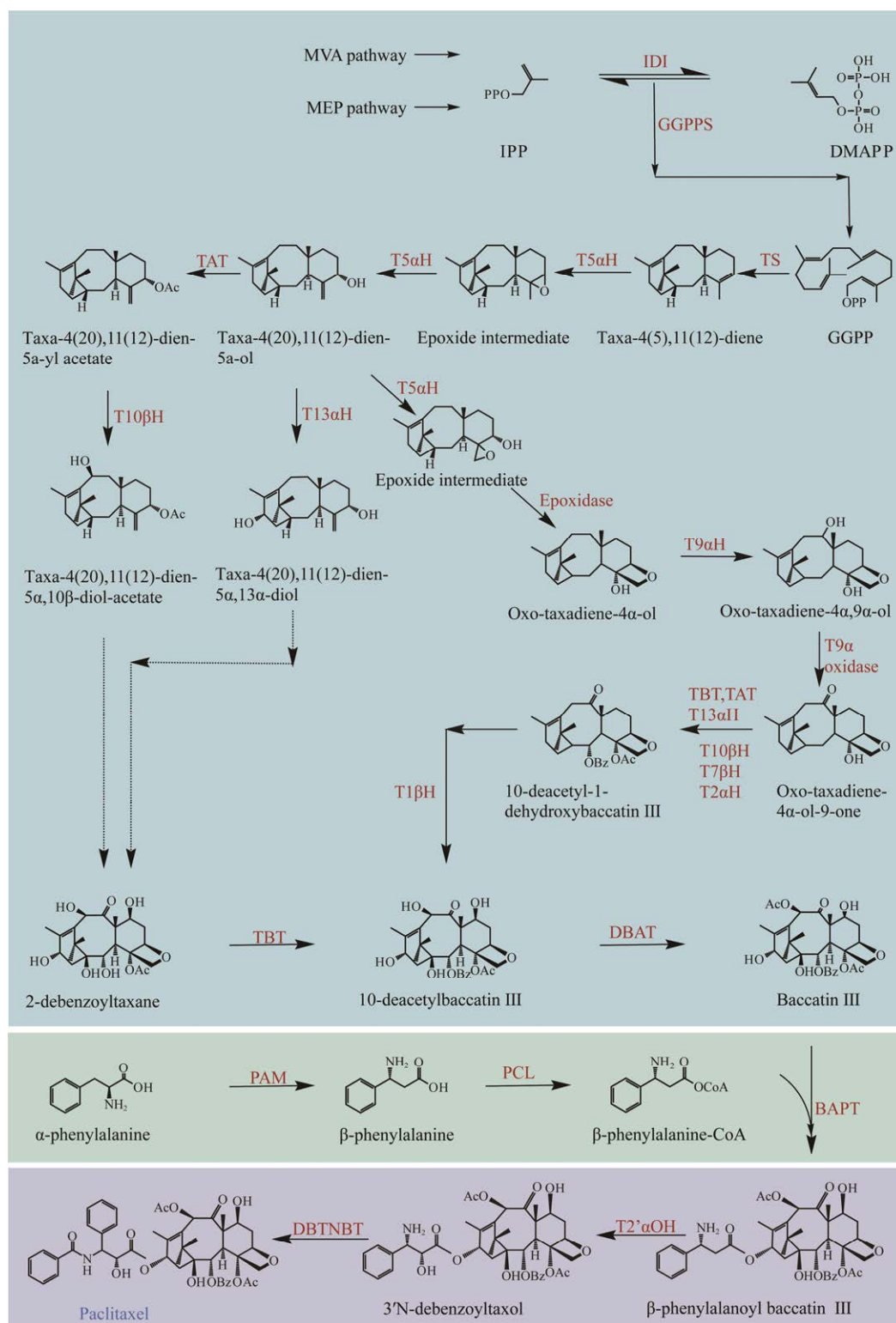


图 2 推测的紫杉醇生物合成途径 黑色实线箭头为已知的合成路径, 黑色虚线箭头为推测的合成路径. 不同背景颜色表示紫杉醇生物合成途径的 3 个阶段. MEP pathway: 甲基赤藓糖醇磷酸合成途径; MVA pathway: 甲羟戊酸合成途径; IPP: 异戊烯基二磷酸; DMAPP: 二甲基烯丙基二磷酸; IDI: 异

戊烯基焦磷酸异构酶; GGPPS: 香叶基香叶基焦磷酸合酶; GGPP: 香叶基香叶基二磷酸酯; TS: 紫杉烯合成酶; T5 α H: 紫杉二烯-5 α -羟基化酶; TAT: 紫杉烯醇-5 α -乙酰氧化基转移酶; T10 β H: 紫杉烷-10 β -羟基化酶; T13 α H: 紫杉二烯-13 α -羟基化酶; T9 α H: 紫杉烷-9 α -羟基化酶; T9 α oxidase: 紫杉烷-9 α -双加氧酶; T7 β H: 紫杉烷-7 β -羟基化酶; T2 α H: 紫杉烷-2 α -羟基化酶; T1 β H: 紫杉烷-1 β -羟基化酶; TBT: 紫杉烷-2 α -苯甲酰基转移酶; DBAT: 10 β -去乙酰巴卡亭III-乙酰氧基转移酶; PAM: 苯丙氨酸氨基变位酶; PCL: β -苯丙氨酸-辅酶 A 连接酶; BAPT: 巴卡亭 3-氨基 3-苯丙醇基转移酶; T2' α OH: 紫杉烷-2' α -羟化酶; DBTNBT: 3'-N-脱苯甲酰基-2'-脱氧紫杉醇-N-苯甲酰基转移酶

Figure 2 Speculated biosynthetic pathway of paclitaxel. The black solid arrows represent the known steps, the black dashed arrows represent putative steps. Different background colors represent the three stages of paclitaxel biosynthesis. MEP: Methylerythritol; MVA: Mevalonate; IPP: Isopentenyl pyrophosphate; DMAPP: Dimethylallyl pyrophosphate; IDI: Isopentenyl diphosphate isomerase; GGPPS: Geranylgeranyl diphosphate synthase; GGPP: Geranylgeranyl diphosphate; TS: Taxadiene synthase; T5 α H: Taxadiene-5 α -hydroxylase; TAT: Taxadienol-5 α -O-acetyl transferase; T10 β H: Taxane-10 β -hydroxylase; T13 α H: Taxoid-13 α -hydroxylase; T9 α H: Taxane-9 α -hydroxylase; T7 β H: Taxane-7 β -hydroxylase; T2 α H: Taxane-2 α -hydroxylase; T1 β H: Taxane-1 β -hydroxylase; TBT: Taxane-2 α -O-benzoyltransferase; DBAT: 10-deacetylbaicatin III-10-O-acetyltransferase; PAM: Phenylalanine aminomutase; PCL: β -phenylalanine-CoAligase; BAPT: 3-amino-3-phenylpropanoyltransferase; T2' α OH: Taxane-2' α -hydroxylase; DBTNBT: 3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol-N-benzoyltransferase.

2.2 内生真菌发酵液产紫杉醇

1993 年, Stierle 等从短叶红豆杉中分离到了一株能产紫杉醇的内生真菌^[31]。此后, 许多研究人员对产紫杉醇的内生真菌进行了分离和鉴定。至今, 已发现的内生真菌有约 20 个属, 存在于包括红豆杉在内的许多寄主和非红豆杉属植物中。2006 年, 胡凯等成功地从南方红豆杉中分离出 3 株能够产生紫杉醇的内生真菌, 分别为茎叶核菌属(*Ectostroma* sp.) XT5、葡萄孢属(*Botrytis* sp.) XT2、团丝核菌属(*Papulaspora* sp.) XT17, 紫杉醇的产量分别为 276.75、161.24、10.25 $\mu\text{g/L}$ ^[32]。2006 年, 田仁鹏等从南方红豆杉树中分离到一株产紫杉醇的交链格孢属(*Alternaria alternata* sp.)内生真菌 TPF6, 在其发酵液中紫杉醇含量可达 84.5 $\mu\text{g/L}$ ^[33]。2009 年, Zhang 等从曼地亚红豆杉树皮中分离出一种产紫杉醇的枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*) MD2, 其发酵产生的紫杉醇产量为 112 $\mu\text{g/L}$ ^[34]。2010 年, Kumaran 等在东北红豆杉树皮中分离到一株异色拟盘多毛孢菌

(*Pestalotiopsis versicolor*) BSL045, 其发酵液中紫杉醇产量为 478 $\mu\text{g/L}$ ^[35]。2013 年, Garyali 等对从喜马拉雅红豆杉中分离出的内生真菌产紫杉醇的能力进行了检测, 其中一株芳香镰孢菌(*Fusarium redolens*) TBPJ-B 发酵液中紫杉醇产量可达 66 $\mu\text{g/L}$ ^[36]。2015 年, Wang 等比较了内生真菌根瘤孢子菌 HDF54-26 产生的紫杉醇与从短叶红豆杉树皮中提取的紫杉醇在抑制癌细胞生长和导致癌细胞凋亡方面的活性; 他们使用细胞形态学、细胞计数、染色和流式细胞术分析来确定癌细胞系的凋亡状态, 证实了真菌产生的紫杉醇同样会使这些肿瘤细胞发生凋亡, 这与从红豆杉中提取的紫杉醇的作用机制相同^[37]。2019 年, El-Sayed 等从南方红豆杉中分离得到一株土壤真菌——黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*) ATCC 24487, 其发酵液中其紫杉醇产量最高可达 185 $\mu\text{g/L}$; 培养第 5 天时, 在培养物中加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 的氟康唑, 可使紫杉醇的产量增加 5 倍, 达到 850 $\mu\text{g/L}$ ^[38]。2021 年, 陈国晶等从曼地亚红豆杉中分离出一株产紫杉醇的内

生真菌 MF5 为链格孢属(*Alternaria* sp.), 其发酵液中紫杉醇含量为 0.58 mg/L, 同时添加 CuSO₄、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、GA₃ 这 3 种诱导子时, MF5 发酵液中紫杉醇含量最高, 可达到(12.58±0.80) mg/L^[39](表 1)。

尽管内生真菌也可以生产紫杉醇, 但在过程也有一些缺点, 如生长周期较长、真菌培养条件苛刻、培养过程中其他微生物的污染和代谢途径难以控制等, 这些对于大规模工业化生产来说都是不利因素。为了克服这些缺点, 研究人员也探索了其他生产紫杉醇的方法, 如使用工程细菌或者利用合成生物学的方法进行定向改造, 以提高产量和可控性。这样的方法可能有助于更有效地满足紫杉醇的市场需求。

2.3 利用异源底盘从头合成紫杉醇

随着紫杉醇生物合成途径的逐步阐明, 科学家们尝试将紫杉醇已知生物合成通路逐步组装到多种异源宿主中, 如大肠杆菌、酿酒酵母和烟草等微生物和植物, 已成功实现了紫杉醇前体物质(如紫杉二烯和紫杉二烯-5 α -醇)的异源生物合成。

2.3.1 大肠杆菌作为底盘的从头合成

大肠杆菌因其生长迅速、遗传背景清晰以及操作简便的特点而被认为是异源生物合成的理想底盘。2001 年, Huang 等在大肠杆菌中过

表达了 *IDI*、*GGPPS*、*TS*, 首次实现了在大肠杆菌中从 IPP 开始合成紫杉二烯, 产量约为 0.5 mg/L^[40]。2010 年, Ajikumar 等通过优化 MEP 途径, 显著提高了大肠杆菌中紫杉二烯的产量至 1 g/L, 约为对照的 15 000 倍^[41]。2016 年, Biggs 等通过对细胞色素 P450 酶的表达进行优化, 在大肠杆菌中获得了最高的含氧紫杉烷效价(570±45) mg/L^[42]。2022 年, Wu 等构建了一株重组大肠杆菌 BL21(DE3), 用于从头生产紫杉醇的关键前体紫杉二烯-5 α -醇。通过对关键酶的筛选和发酵条件的优化, 最终在 50 mL 摇瓶发酵中实现了总含氧紫杉烷产量达到 27 mg/L, 其中紫杉二烯-5 α -醇的产量为 7 mg/L^[43]。

2.3.2 酵母作为底盘的从头合成

由于酵母中具备天然的 MVA 途径, 可以提供丰富的 GGPP 前体物(如 IPP、DMAPP、FPP), 因此也被选为紫杉醇合成的优质底盘。2005 年王伟等首次在酵母细胞中成功构建紫杉二烯生物合成途径并在酵母工程菌的代谢产物中检测到了该产物^[44]。2006 年 Dejong 等首次尝试利用酿酒酵母作为底盘过量表达 5 个关键酶, 合成了少量的紫杉二烯(约 1 mg/L)^[45]。2008 年, Engels 等通过抑制竞争途径将紫杉二烯的合成量提升至 8.8 mg/L^[46]。2014 年, Ding 等在共表达最有效的 *GGPPS*、*erg20*、截短的 *HMGR* 和

表 1 不同宿主产生紫杉醇的内生真菌及其产量

Table 1 Endophytic fungi producing paclitaxel from different hosts and their yields

Endophytic fungi	Strain	Host	Production (μ g/L)	Reference
<i>Ectostroma</i> sp.	XT5	<i>Taxus chinensis</i>	276.75	[32]
<i>Botrytis</i> sp.	XT2	<i>Taxus chinensis</i>	161.24	[32]
<i>Papulaspora</i> sp.	XT17	<i>Taxus chinensis</i>	10.25	[32]
<i>Alternaria alternata</i> sp.	TPF6	<i>Taxus chinensis</i>	84.50	[33]
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MD2	<i>Taxus media</i>	112.00	[34]
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	BSL045	<i>Taxus cuspidata</i>	478.00	[35]
<i>Fusarium redolens</i>	TBPJ-B	<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	66.00	[36]
<i>Aspergillus flavipes</i>	ATCC 24487	<i>Taxus chinensis</i>	185.00	[38]
<i>Alternaria</i> sp.	MF5	<i>Taxus media</i>	580.00	[39]

TS 的酿酒酵母菌株中获得了更高产量的紫杉二烯, 为 72.8 mg/L^[47]。2020 年, Nowrouzi 等通过使用启动子 *GAL1* 和 60 个氨基酸截短的 *TS* 变异体, 构建 *LRS5* 菌株, 通过在 22 °C 下培养酿酒酵母细胞, 显著提高了紫杉二烯的含量, 使其达到(129±15) mg/L^[48]。2021 年, Walls 等在 *LRS5* 的基础上, 在其中增加了编码 *CYP725A4* 和细胞色素 P450 还原酶以及从东北红豆杉获得的 *TAT* 序列, 构建了 *LRS6* 菌株, 在酿酒酵母中提高了除紫杉二烯外其他产物如紫杉二烯-5 α -醇和 *taxa-4(20),11(12)-dien-5a-yl acetate* 的产量, 当使用 1 L 生物反应器时, *taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -yl acetate* 水平为 3.7 mg/L, 紫杉二烯-5 α -醇异构体的水平约为 20 mg/L, 总含氧紫杉烷含量增加了 2.7 倍, 达到 78 mg/L^[49]。2022 年, Walls 等又通过营养限制的微型培养基找到了延缓假菌丝生长的培养条件, 改进了 *LRS6* 在 1 L *BIOSTAT* 反应器中的培养条件, 进一步改善了紫杉烷积累, 使产量达到了 387 mg/L^[50]。

2.3.3 丝状真菌作为底盘的从头合成

2014 年, 辛燕花等将 *TS* 转入灵芝的原生质体中, 在灵芝菌丝中检测到了紫杉二烯^[51]。2017 年, Bian 等将 *MVA* 途径的相关基因转入链格孢菌 (*Alternaria Nees*) 中并进行改造, 使截短的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(*tHMG1*)、*IDI*、*TS* 在链格孢菌中共表达, 最终在链格孢菌中检测到紫杉二烯的含量为(61.9±6.3) μ g/L^[52]。2021 年, 朱泽燕等通过对苯丙氨酸氨基变位酶进行改造, 转入烟曲霉 *TMS-26* 中, 再对其发酵条件进行优化, 最终紫杉醇产量达到 721.87 μ g/L, 与原始菌株相比产量提高了 17.7%^[53]。

2.3.4 异源植物作为底盘的从头合成

与微生物底盘相比, 植物底盘在膜蛋白表达、前体供应、产物耐受和区室化合成等方面

具有显著优势, 特别是在紫杉醇的合成过程中, 需经历多个细胞色素 P450 酶的催化作用, 而这类膜蛋白在微生物中的表达效率通常较低。2004 年, Besumbes 等对 *TS* 进行改造后转入拟南芥中, 并观察到 *TS* 受到糖皮质激素地塞米松的诱导, 在喷药 2 d 后, *TS* 的表达达到最高水平, 且紫杉二烯的含量高达 600 ng/g (干重)^[54]。2007 年, Kovacs 等发现在黄果番茄品系中表达 *TS*, 可适用于生成类胡萝卜素的 *GGPP* 改变路线, 用于生产紫杉二烯, 这种方法的高纯度紫杉二烯的产量为 160 mg/kg (冷冻干燥)^[55]。2014 年, Hasan 等用根癌农杆菌转化本氏烟草过表达 *TS*, 获得能够合成紫杉二烯的转基因烟草, 进一步利用外源添加 *MeJA* 诱导提高了转基因植株中紫杉二烯的含量。同时, 由于 *PSY* 和 *PDS* 的催化导致前体物质 *GGPP* 参与四萜的合成, 所以在沉默 *PSY* 和 *PDS* 后, 获得了最高水平的紫杉二烯产量——50 μ g/g (干重)^[56]。2015 年, Li 等以生长快、富含萜类化合物的中草药黄花蒿为基因工程宿主生产紫杉二烯。将 *TS* 转入青蒿属植物, 经 *GC-MS* 分析证实紫杉二烯的积累高达 129.7 μ g/g (干重)^[57]。2019 年, Li 等将 *TS*、*T5 α H* 及其配套的还原酶 *CPR* 导入了本氏烟草中, 并通过区室化代谢工程策略对 *T5 α H* 及 P450 还原酶改造, 使 *GGPP-TS-T5 α H/CPR* 代谢通路消除了空间上的屏障, 使紫杉二烯的产量达到(56.6±3.2) μ g/g (鲜重); 进一步通过共同增强 *DXS* 和 *GGPPS* 的表达, 使紫杉二烯-5 α -醇的产量从 0.9 μ g/g (鲜重)提高至 1.3 μ g/g (鲜重)^[58]。2021 年, Fu 等将短叶红豆杉的 *TS* 基因的截短序列(不编码转运肽)融合叶绿体转运肽转化烟草, 将 *TS* 定位于叶绿体, 获得的转基因植株叶片中紫杉二烯的产量高达 87.8 μ g/g (干重)^[59]。最近 Zhang 等在阐明紫杉醇生物合成的

关键中间体巴卡亭 III 生物合成的缺失步骤后, 成功在本氏烟草中对其进行了合成, 并将其成功转化为紫杉醇, 制定了紫杉醇生物合成的完整“最小”途径^[29]。尽管产量太低, 无法在单个

模块中成功重建整个紫杉醇通路, 这表明通过合成生物学方法生产紫杉醇也是可能的。

综上, 科学家们在紫杉醇的异源合成领域已取得初步进展(表 2), 但是由于其 C1、C9 位氧

表 2 异源底盘中的紫杉醇合成途径工程化

Table 2 Paclitaxel pathway engineering in heterologous chassis

Metabolites	Biological chassis	Engineering strategy	Production	Reference
Baccatin III	<i>Nico-tiana benthamiana</i>	Coexpression of <i>T9αH</i> , <i>T9-α oxidase</i> , <i>T1βOH</i> and <i>PCL</i>	154.84 ng/g (FW)	[29]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Escherichia coli</i>	Overexpression of <i>IDI</i> , <i>GGPPS</i> , <i>TS</i>	About 0.50 mg/L	[40]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>E. coli</i>	Optimization MEP pathway	1 g/L	[41]
Oxygenated taxanes	<i>E. coli</i>	Optimizing the expression of cytochrome P450 enzyme	(570 \pm 45) mg/L	[42]
Taxa-4(5),11(12)-dien-5 α -ol	<i>E. coli</i>	Constructing an oxidative system mediated by <i>TS</i> and cytochrome P450	7 mg/L	[43]
Oxygenated taxanes	<i>E. coli</i>	Constructing an oxidative system mediated by <i>TS</i> and cytochrome P450	27 mg/L	[43]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Overexpression of <i>GGPPS</i> , <i>TS</i> , <i>T5αH</i> , <i>TAT</i> and <i>T10βH</i>	About 1 mg/L	[45]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>S. cerevisiae</i>	Inhibition of competitive pathways	8.80 mg/L	[46]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>S. cerevisiae</i>	Coexpression of <i>GGPPS</i> , <i>erg20</i> , Truncated <i>HMGR</i> and <i>TS</i>	72.80 mg/L	[47]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>S. cerevisiae</i>	Construction of LRS5	(129 \pm 15) mg/L	[48]
Oxygenated taxanes	<i>S. cerevisiae</i>	Constructed LRS6 strain	78 mg/L	[49]
Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -yl acetate	<i>S. cerevisiae</i>	Constructed LRS6 strain	3.70 mg/L	[49]
Taxadien-5 α -ol isomer	<i>S. cerevisiae</i>	Constructed LRS6 strain	20 mg/L	[49]
Taxane	<i>S. cerevisiae</i>	Improved the cultivation conditions of LRS6 in a 1L BIostat reactor	387 mg/L	[50]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Ganoderma lucidum</i>	Expression of <i>TS</i>	Detectable	[51]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Alternaria alternata</i>	Coexpression of <i>tHMGI</i> , <i>IDI</i> , <i>TS</i>	(61.90 \pm 6.30) μ g/L	[52]
Paclitaxel	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Transforming <i>PAM</i>	721.87 μ g/L	[53]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Arabidopsis</i>	Transforming <i>TS</i> and spray dexamethasone	600 ng/g (DW)	[54]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Yellow flesh</i>	Expression of <i>TS</i>	160 mg/kg	[55]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Overexpression of <i>TS</i> , virus-induced gene silencing <i>PSY</i> and <i>PDS</i>	50 μ g/g (DW)	[56]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Artemisia annua L.</i>	Expression of <i>TS</i>	129.70 μ g/g (DW)	[57]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Eliminated spatial barriers in GGPP-TS-T5 α H/CPR metabolic pathways	(56.60 \pm 3.20) μ g/g (FW)	[58]
Taxa-4(5),11(12)-dien-5 α -ol	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Eliminated spatial barriers in GGPP-TS-T5 α H/CPR metabolic pathways, coexpression of <i>DXS</i> and <i>GGPPS</i>	1.30 μ g/g (FW)	[58]
Taxa-4(5),11(12)-diene	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>Petit Havana</i>	Truncated sequence of <i>TS</i> fused with chloroplast transport peptide	87.80 μ g/g (DW)	[59]

化修饰, C4、C5 双键的环氧化反应的催化酶未被鉴定且不同羟基化反应的顺序未知, 导致目前从头合成的终产物均是中间体, 尚需进行多步的化学反应才能生成紫杉醇。因此, 利用合成生物学技术尚不能进行紫杉醇的规模化生产。

3 利用红豆杉细胞工程技术生产紫杉醇

植物细胞工程技术是指利用组织培养技术在无菌条件下培养、扩繁植物的细胞、组织或器官, 并通过基因工程技术改变植物细胞的遗传和代谢特性, 以实现植物的快速繁殖和特定性状的培育。培养红豆杉细胞以提高内源紫杉醇的产量, 这种方法既避免了砍伐天然红豆杉, 同时也无需转入外源基因, 从而减少了产生有毒物质的风险。这种细胞培养的方法为紫杉醇的生产提供了一种更可持续和环保的替代方案, 有望降低对自然资源的依赖, 减少对生态系统的影响。

1973 年, Rohr 在人工培养条件培育出了欧洲红豆杉雄配子体愈伤组织, 从此打开了红豆杉植物细胞工程的大门^[60]。美国农业部在 1989 年发现短叶红豆杉的植物细胞能产生紫杉醇^[61]。1993 年 Wickremesinhe 等首次利用组织培养技术, 成功从多种类型的红豆杉中诱导出愈伤组织。通过应用高效液相色谱(HPLC)分析技术, 证实这些细胞可以积累紫杉醇^[62]。这使通过植物细胞工程技术实现紫杉醇的高产量变为了可能, 于是许多研究人员开始尝试使用红豆杉的各种外植体来进行愈伤组织细胞的诱导。

3.1 外植体的选择

1995 年, Fett-Neto 等对东北红豆杉进行研究, 发现幼茎是最易形成愈伤组织的外植体^[63]。

1996 年, 张宗勤等以红豆杉雄球花剥除苞片部分、茎段、叶段为外植体进行诱导, 除叶片外均产生了愈伤组织^[64]。1998 年, 邱德有等以南方红豆杉的成熟胚为实验材料, 成功获得了胚性愈伤组织和体细胞胚^[65]。2001 年, 苏应娟等分别以南方红豆杉的茎段和芽为实验材料进行诱导, 研究发现芽与茎段相比, 愈伤组织产生的时间较早、诱导率较高且愈伤组织生长的速度更快^[66]。虽然如此, 但由于茎段的可获取性更高, 更多人还是选择了茎段作为诱导愈伤组织的外植体。

3.2 红豆杉细胞培养基的选择

在培养基的选择上, 因为不同的基本培养基如 B5、MS、SH 和 WPM 均可用于愈伤组织培养, 所以研究人员们又进行了研究来探索红豆杉愈伤组织生长的最适培养基。2010 年, 金贞兰等使用 B5、MS、WPM 几种培养基对红豆杉叶片进行诱导, 发现最适用于诱导东北红豆杉叶片产生愈伤组织的培养基为 WPM 添加 2.0 mg/L 2,4-D^[67]。2011 年, 王淑杰等对几种抑菌剂进行了研究, 发现农用链霉素在东北红豆杉的组织培养中可起到高效的抑菌效果, 与此同时还可以使愈伤组织的形成时间提前 6 d^[68]。

3.3 红豆杉细胞悬浮培养体系的建立及优化

植物细胞悬浮培养是指将植物细胞团悬浮在液体培养基如摇床或生物反应器中, 从而克服固体培养基营养成分梯度分布的缺点的培养方式。这种方式不仅可以避免植物物种过度开发、获取更高产量、缩短生产周期, 还具有良好的放大特性, 因此是大规模生产紫杉醇的最佳途径^[69]。1993 年, Wickremesinhe 等首次利用曼地亚红豆杉的愈伤组织建立红豆杉细胞的悬浮培养体系^[62], 后续的研究人员对悬浮培养的条件进行了优化。2014 年, 赵继鹏等发现曼地亚红

豆杉细胞悬浮培养条件为: B5+0.6 mg/L 2,4-D+0.8 mg/L NAA+1.0 mg/L KT+220 mg/L 柠檬酸+350 mg/L 聚乙烯吡咯烷酮+450 mg/L 水解乳蛋白+30 g/L 蔗糖(pH 5.8); 最佳培养条件为: 接种量为 0.1 g/mL, 在培养箱中 110 r/min、25 °C 暗培养^[70]。2018 年, 王淑杰等以东北红豆杉为材料, 对细胞悬浮诱导培养体系进行了优化, 发现最优维生素浓度组合为: 21.58 mg/L 维生素 B1、3.09 mg/L 维生素 B6、201.29 mg/L 肌醇和 1.77 mg/L 烟酸, 紫杉醇产量约为对照组的 1.22 倍, 可达 2.767 mg/L^[71]。2019 年, 徐志荣等进一步优化了南方红豆杉细胞悬浮培养体系, 发现南方红豆杉悬浮培养的最适培养基为: B5+0.4 mg/L 2,4-D+0.3 mg/L NAA+1.2–1.6 mg/L KT+30.0 g/L 蔗糖 (pH 5.8), 最佳接种量为 0.09 g/mL^[72]。目前, 在商业化生产领域, Phyton Biotech 公司作为该技术的先驱, 已在德国运营全球最大的药用植物细胞发酵 (plant cell fermentation, PCF) 设施超过 10 年。该公司拥有 75 000 L 的生产容量, 年产紫杉醇能力超过 100 kg, 成为同行业中的领军企业^[73]。

3.4 外源诱导子对红豆杉悬浮培养细胞中紫杉醇积累的影响

植物在遭受生物或非生物胁迫时, 往往会积累次生代谢产物来应对外界伤害。因此, 利用诱导子启动或增强植物细胞培养中次生代谢物的生物合成, 成为一种极为有效的生物技术策略。诱导子的种类及其浓度的精准选择, 是实现有效诱导的关键。特别是植物激素, 作为内源性信号分子, 在空间和时间上调控植物生理反应。将这些激素补充到培养基中, 以模拟应激环境, 可以有效地上调相关基因的表达, 从而促进次级代谢物的产生。在红豆杉悬浮细胞培养中, 通过在发酵过程中添加生物或非生物诱导子, 实施两阶段培养策略, 已被证明是

促进紫杉醇合成的一种有效方法。

3.4.1 生物诱导子

目前已经发现的可以促进紫杉醇积累的生物诱导子包括茉莉酸甲酯、水杨酸、冠菌素和环糊精等。

茉莉酸甲酯(methyl Jasmonate, MeJA)是一种常见于植物体中的有机化合物, 参与植物的化学防御过程。1996 年, Yukimune 等发现在曼地亚红豆杉细胞悬浮培养时, 添加 MeJA 可诱导产生紫杉醇, 其含量是对照组的 5.1 倍^[74]。随后, Qian 等发现与添加 MeJA 相比, 在中国红豆杉细胞悬浮培养时添加新型含羟基茉莉酸酯(2,3-dihydroxypropyljasmonate, DHPJA)时, 具有生物活性的紫杉醇 C 的积累增加得更多, 在 7 d 添加 100 μmol/L 的 DHPJA 时, 21 d 紫杉醇产量可达(47.2±0.5) mg/g^[75]。此外, Nail 等发现在东北红豆杉培养过程中加入茉莉酸(jasmonic acid, JA)可诱导增加紫杉烷类物质如上游巴卡亭 III 和 10-去乙酰巴卡亭 III 的积累, 在 12 d 左右达到最大值, 约为对照组的 6 倍^[76]。2010 年, Onrubia 等发现在欧洲红豆杉的悬浮培养体系中加入茉莉酸甲酯可使紫杉醇的含量提升 4 倍, 巴卡亭 III 的产量提升 3.6 倍^[77]。冠菌素(coronatine, COR)是植物细菌丁香假单胞菌在侵染植物过程中产生的一种植物生长调节物质^[78], 是异亮氨酸偶联形式的茉莉酸(JA-Ile)的分子类似物^[79]。2013 年, Onrubia 等发现在曼地亚红豆杉愈伤组织在优化生长的培养基培养 14 d 后转移至为次生代谢物产生的优化培养基后, 再加入冠菌素会显著提高细胞悬浮液中的紫杉烷含量, 与 14 d 的 8.14 mg/L 相比, 加入冠菌素的悬浮细胞液中紫杉烷含量在 16 d 后可达 77.46 mg/L, 添加 MeJA 的细胞悬浮液在 12 d 后紫杉烷含量也只有 21.48 mg/L^[80]。

水杨酸(salicylic acid, SA)是一种重要的植

物激素，它在调节植物生长发育以及参与各种胁迫响应中发挥重要作用^[81]。2000年，苗志奇等发现在南方红豆杉细胞培养体系中添加 0.1 mg/L 的水杨酸可使紫杉醇的产量提高 3 倍^[82]。2007年，Wang 等发现在悬浮培养的中国红豆杉中，添加 20 mg/L 的 SA 可诱导紫杉醇的生物合成，产量可达 1.581 mg/g (干重)^[83]。

环糊精(cyclodextrin, CD)是芽孢杆菌产生的环糊精葡萄糖基转移酶催化直链淀粉生成的一系列环状低聚糖的总称，因为其能够在植物细胞培养中作为诱导子而引起了广泛关注^[84]。2014年，Sabater-Jara 等发现在曼地亚红豆杉细胞悬浮液中添加环糊精可使其与紫杉醇和其他紫杉烷类形成络合物并获得高度水溶性的紫杉烷，除了可以降低细胞毒性外，还防止了这些化合物被细胞内的酶降解。同时证明，环糊精可与茉莉酸甲酯协同作用来增加悬浮细胞体系中紫杉醇的含量，可增加到对照组的 55 倍^[85]。

此外，真菌诱导子也可以促进红豆杉积累紫杉醇。2001年，张长平等发现在南方红豆杉细胞悬浮培养到达指数生长期的末期时，加入尖孢镰刀菌，可以使紫杉醇的产量显著提高至对照组的 5 倍^[86]。2009年，Li 等在 20 L 的搅拌生物反应器中实施了内生真菌诱导子美丽镰刀菌与东北红豆杉悬浮细胞的共培养实验，发现紫杉醇提取率可达 2.0–6.8 倍，最高产量为 6.11 mg/L，且在红豆杉悬浮细胞培养的 5 d 时加入真菌诱导子美丽镰刀菌紫杉醇积累量最高^[87]。邱涵等在南方红豆杉细胞悬浮培养第 8 天时加入 100 μg/mL 的灵芝诱导子，继续培养至 21 d 时，红豆杉细胞中紫杉醇总产量为 10.68 mg/L，是对照组的 2 倍，说明灵芝诱导子的添加促进了紫杉醇的合成^[88]。

3.4.2 非生物诱导子

目前已经发现的可以促进紫杉醇积累的非

生物诱导子包括稀土化合物、二甲基亚砷、臭氧和脉冲刺激等。

据报道，稀土元素铈(Ce)或镧(La)对动植物的发育、分化、损伤具有广泛的生物学效应^[89]。早在 1998年，Yuan 等就发现在东北红豆杉细胞悬浮培养指数期添加稀土化合物 La 和 Ce 明显提高了紫杉醇的生物合成，且 Ce⁴⁺比其他稀土离子 La³⁺和 Ce³⁺更有效，紫杉醇总量为对照组的 7 倍^[90]。2008年，他的团队又通过脂组学策略，结合多元分析和生化方法，发现 Ce⁴⁺诱导的细胞中磷脂酸酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 和磷脂酸酶 D (phospholipase D, PLD) 的高活性，进而促进了甘油磷脂的降解和膜的破坏，产生了一系列下游分子，促进了细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)和紫杉醇的产生，约为对照组的 4 倍^[91]。

二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)是一种硫酸盐化合物，最初用作工业溶剂。20 世纪 60 年代，人们认识到了这种溶剂的不同治疗效果，DMSO 增加了膜的通透性，使其被广泛用作促进药物通过生物膜的载体^[92]。2012年，Kajani 等发现非质子溶剂 DMSO 具有诱导欧洲红豆杉悬浮细胞合成紫杉烷的能力，还能促进紫杉醇的合成。在细胞生长指数后期加入 5% 的 DMSO，培养 7 d 后，紫杉醇产量达到最大值 3.34 mg/g (干重)，是对照组的 2.26 倍^[93]。

臭氧暴露是植物在自然条件下生长过程中的一种常见胁迫，次生代谢物的积累如芳香代谢物，已被证明是自然界中植物对臭氧暴露的早期反应之一^[94]。2011年，Xu 等发现臭氧暴露可诱导红豆杉悬浮细胞产生紫杉醇，紫杉醇产量在臭氧处理后 35 h 左右达到最高，是对照的 2.7 倍，此外他们还发现臭氧诱导的紫杉醇的产生部分依赖于脱落酸(abscisic acid, ABA)信号通路^[95]。

2010年，潘学武等在中国红豆杉悬浮培养

细胞生长的不同时期进行了脉冲电刺激和微交流电刺激。这两种电刺激都促进了紫杉醇的生

成，但使用脉冲电刺激时紫杉醇的含量更高，为对照组的 7–9 倍^[96] (表 3)。

表 3 可诱导红豆杉悬浮培养细胞中积累紫杉醇的诱导子

Table 3 Elicitors that can induce the accumulation of paclitaxel in suspension cultured cells of *Taxus*

Elicitors types	Elicitors name	Cell line source	Results	Reference
Biological inducer	MeJA	<i>Taxus media</i>	The content of paclitaxel is 5.1 times higher than that of the control group	[74]
	DHPJA	<i>Taxus chinensis</i>	On the 7th day, adding 100 $\mu\text{mol/L}$ of DHPJA resulted in a yield of (47.2 ± 0.5) mg/g on the 21st day	[75]
	JA	<i>Taxus cuspidate</i>	The accumulation of baccatine III and 10-deacetylated baccatine III increased, reaching their maximum value around the 12th day	[76]
	MeJA	<i>Taxus baccata</i>	The content of paclitaxel increased by 4.0 times, and the yield of baccatin III increased by 3.6 times	[77]
	SA	<i>Taxus wallichiana</i> <i>var. mairei</i>	Increased production of paclitaxel by 3.0 times	[82]
		<i>Taxus chinensis</i>	The yield of paclitaxel can reach 1.581 mg/g (DW)	[83]
	COR	<i>Taxus media</i>	The content of paclitaxel can reach 77.46 mg/L after 16 days	[80]
	CD	<i>Taxus media</i>	The content of paclitaxel can reach 55 times that of the control group	[85]
		<i>Fusarium oxysporum</i>	The yield of paclitaxel is 5.0 times higher than that of the control group	[86]
		<i>Fusarium mairei</i>	The accumulation of paclitaxel can reach 2.0–6.8 times, with a maximum yield of 6.11 mg/L	[87]
	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Taxus wallichiana</i> <i>var. mairei</i>	The total yield of paclitaxel can reach 10.68 mg/L, which is 2.0 times higher than the control group	[88]
Abiotic inducer	La, Ce	<i>Taxus cuspidate</i>	The total amount of paclitaxel was 7.0 times that of the control group	[90]
	Ce ⁴⁺	<i>Taxus cuspidate</i>	Increase the content of paclitaxel to approximately 4.0 times that of the control group	[91]
	DMSO	<i>Taxus baccata</i>	The yield of paclitaxel reached 3.34 mg/g (DW), which is 2.26 times that of the control group	[93]
	O ₃	<i>Taxus chinensis</i>	The yield of paclitaxel reached its peak around 35 hours after ozone treatment, which is 2.7 times higher than the control	[95]
	Pulse electrical stimulation and Micro AC electrical stimulation	<i>Taxus chinensis</i>	Both types of electrical stimulation promoted the generation of paclitaxel, but the content of paclitaxel was higher when using pulsed electrical stimulation, which was 7.0–9.0 times higher than the control group	[96]

尽管通过生物反应器结合外源诱导子的两阶段培养策略能够有效提升红豆杉悬浮培养细胞中紫杉醇的积累量,但诱导子的高昂的成本却使该方法的无法大规模应用。因此,探究红豆杉细胞应答外源诱导子合成紫杉醇的分子调控机制,进而运用基因工程、代谢工程以及基因编辑技术提高紫杉醇的合成效率,成为一个重要的研究方向。近年的研究表明,一些转录因子能够对外源诱导子的刺激作出响应,激活紫杉醇合成途径中关键酶的表达,从而特异性地增加紫杉醇的合成

量(表 3, 图 3)。这一发现为通过分子生物学手段提高紫杉醇生产效率提供了新的思路和方法。

4 紫杉醇生物合成的转录调控机制

转录因子(transcription factor, TF),也称反式作用因子,是一类能够结合于转录起始位点上游 50-5 000 bp 的顺式作用元件,并参与调控靶基因转录效率的蛋白质。近些年,对转录因

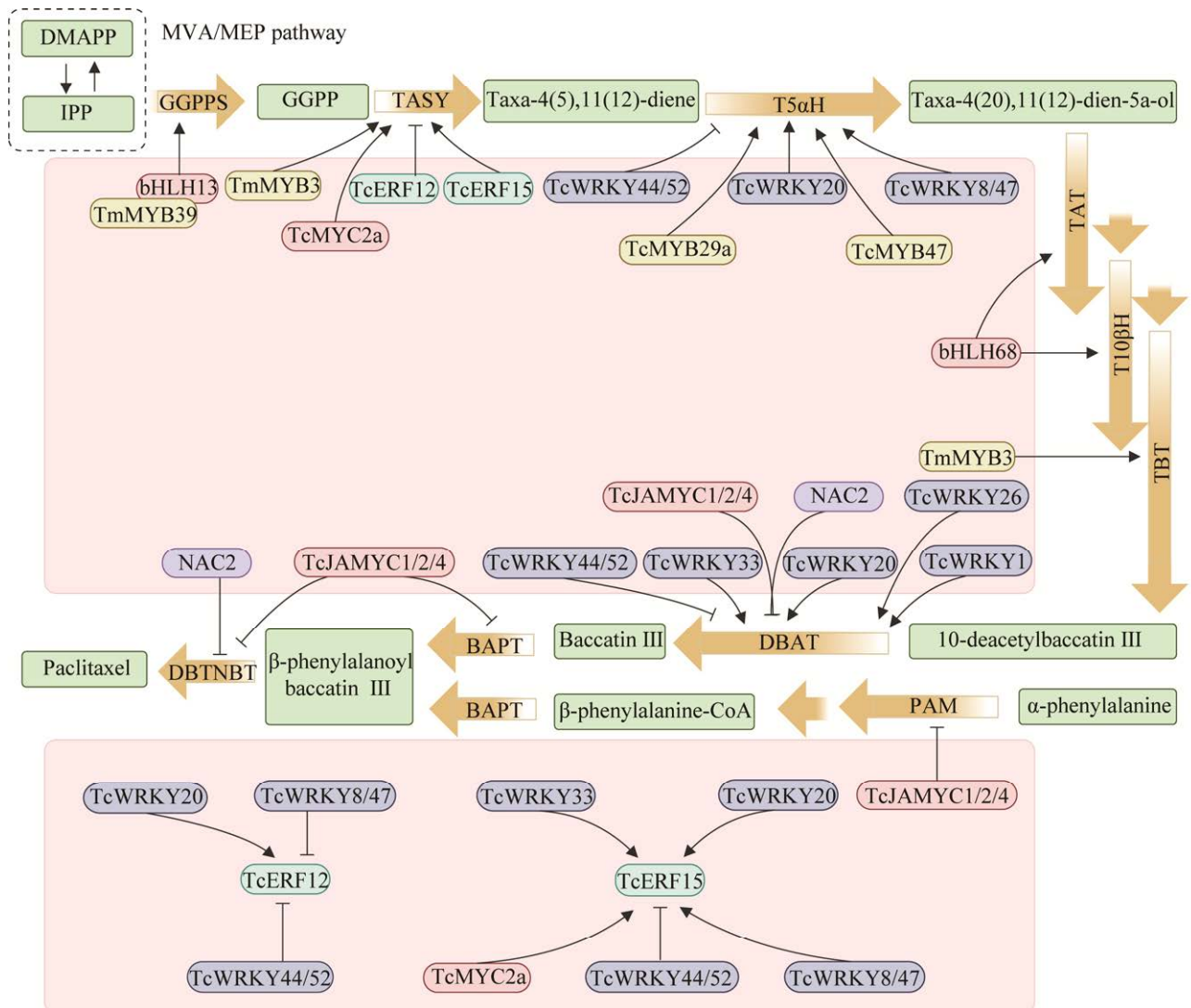


图 3 参与紫杉醇合成调控的转录因子

Figure 3 Transcription factors involved in the regulation of paclitaxel synthesis.

子在植物次生代谢途径中作用机制研究的不断深入, 转录调控成为了一种提高次生代谢产物含量的新手段。过表达转录因子能够全面调节代谢途径, 相较于过表达单个或多个结构基因, 效果更为显著。目前, 在紫杉醇生物合成研究较为广泛的转录因子包括 MYB、ERF、WRKY、MYC、NAC 和 bHLH 等类型(表 4)。

4.1 MYB 家族转录因子

MYB 蛋白家族是植物界已知的最大的转录因子家族之一, 它在调控植物生长和发育的各种过程以及响应生物和非生物胁迫的调控中发挥关键作用^[97]。2020 年, Yu 等通过代谢组学、蛋白质组学和植物化学分析进行研究发现韧皮部特异表达的 *TmMYB3* 在紫杉醇生物合成的转录调控中发挥重要作用。对韧皮部特异性表达的紫杉醇合成途径的关键酶进行分析, 鉴定出 *TASY*、*TBT*、*DBTNBT* 这 3 个潜在的靶基因, EMSA、ChIP-qPCR、双荧光素酶瞬时表达分析证明了 *TmMYB3* 对 *TASY* 和 *TBT* 基因的启动子具有转录激活活性, *TmMYB3* 可能通过激活 *TBT* 和 *TASY* 的表达而参与紫杉醇的生物合成^[98]。2022 年, Cao 等发现 *MYB29a* 基因在真菌诱导子处理后显示出高水平的表达, 结合 ChIP、Y1H、EMSA 和双荧光素酶等实验, 以及液相色谱实验, 发现在 *MYB29a* 过表达的愈伤组织中 10-DAB 的含量从(0.06±0.006) μg/g 增加到了(0.143±0.31) μg/g (干重), 巴卡亭 III 的含量从(0.04±0.017) μg/g 增加到(0.16±0.006) μg/g (干重), 紫杉醇的含量从(0.313±0.111) μg/g 增加到(1.31±0.111) μg/g (干重)。证实 *TcMYB29a* 能结合并激活 *T5aH* 的启动子来促进紫杉醇在中国红豆杉细胞中的积累^[99]。2022 年, Yu 等通过紫杉烷类化合物积累存在显著差异的曼地亚红豆杉雌雄植株中筛选得到一个雌雄株差异表达的转录因子 MYB39 及其互作蛋白 bHLH13。通过双

分子荧光和酵母双杂交的方法, 证明了 MYB39 和 bHLH13 的互作关系, 它们可以形成一个 MYB39-bHLH13 蛋白复合体, 共同调控下游靶基因的转录。通过原核表达得到 MYB39 的纯化蛋白, 首次证明了 MYB39-bHLH13 可以和 *GGPPS* 及 *T10βH* 基因启动子相结合, 并调控它们的表达, 进一步促进紫杉醇的合成^[100]。2023 年, Yu 等利用最新的质谱成像技术, 绘制了紫杉烷类化合物在红豆杉幼茎中的可视化分布图, 为揭示紫杉烷类化合物细胞群差异积累的调控机制打下了基础。同时通过 ScRNA 测序、启动子序列分析和共定位分析筛选到了 NAC2、WRKY31、MYB47 和 bHLH68 几个候选的转录因子, 通过 EMSA 实验发现 MYB47 与 *TASY* 和 *T5aH* 启动子中的 MBE 位点结合, bHLH68 与 *TAT* 和 *T10βH* 启动子中的 ABRE 位点结合, NAC2 与 *DBTNBT* 和 *DBAT* 启动子中的 ABRE 位点结合, WRKY31 和 *TAT* 启动子之间没有发现结合。为了测定体内 MYB47、bHLH68 和 NAC2 转录活性, 进行了双荧光素酶报告基因测定, 结果表明 MYB47 显著激活了 *T5aH* 表达, MYB47 过表达不影响 *TASY* 表达, bHLH68 显著激活 *TAT* 和 *T10βH* 表达, NAC2 显著抑制 *DBTNBT* 和 *DBAT* 表达。因此得出结论, MYB47 和 bHLH68 是潜在的转录激活剂, NAC2 是紫杉醇生物合成途径中潜在的转录抑制因子^[101]。

4.2 ERF 家族转录因子

乙烯响应因子(ethylene responsive factor, ERF)是植物中参与生长发育中信号转导过程的一类转录因子, 其家族成员都含有一个大约由 60 个氨基酸组成的非常保守的 DNA 结合域^[102]。2015 年, Zhang 等获得了一个 550 个碱基的 5'-侧翼序列, 缺失分析和启动子原位分析表明, 该片段具有茉莉酸(JA)响应元件, 以其为诱饵

表 4 紫杉醇生物合成相关转录因子

Table 4 Transcription factors related to paclitaxel biosynthesis

Types	Transcription factors name	Regulatory methods	Mechanism	Reference
MYB	TmMYB3	+	Activating the expression of <i>TASY</i> and <i>TBT</i> to promote the accumulation of paclitaxel	[98]
	TcMYB29a	+	Combine and activate promoter of <i>T5aH</i> , promotes the accumulation of paclitaxel in <i>Taxus Chinese</i>	[99]
Complex MYB	MYB39-bHLH13	+	Related to promoters of <i>GGPPS</i> and <i>T10βH</i> to enhance their activities	[100]
MYB	TcMYB47	+	Combine and activate the expression of <i>T5aH</i>	[101]
NAC	TcNAC2	-	Inhibiting the expression of <i>DBTNBT</i> and <i>DBAT</i> by binding to the ABRE sites in their promoters	[101]
bHLH	TcbHLH68	+	Upregulate the expression of <i>TAT</i> and <i>T10βH</i> by binding to the ABRE site in its promoters	[101]
ERF	TcERF12	-	Combining with GCC-box to inhibit the expression of <i>TASY</i> to inhibit the accumulation of paclitaxel	[103]
	TcERF15	+	Combining with GCC-box to inhibit the expression of <i>TASY</i> to inhibit the accumulation of paclitaxel	[103]
WRKY	TcWRKY1	+	Specifically bind to the W-box element within the <i>DBAT</i> promoter, activate the expression of <i>DBAT</i> to promote the accumulation of paclitaxel	[105]
	TcWRKY8	+	Upregulate the expression of <i>DBAT</i> , <i>T5aH</i> and <i>TcERF15</i> , while downregulating the expression of <i>TcERF12</i> to promote the accumulation of paclitaxel	[106]
	TcWRKY20	+	Promote the expression of <i>DBAT</i> , <i>T5aH</i> , <i>TcERF15</i> and <i>TcERF12</i> genes, it is a positive regulatory factor in the biosynthesis of paclitaxel	[106]
	TcWRKY26	+	Activating the expression of <i>DBAT</i> and promoting the accumulation of paclitaxel	[106]
	TcWRKY33	+	Interacting with the W-box in the <i>DBAT</i> promoter to activate the expression of <i>DBAT</i> ; it also increases the expression of <i>TcERF15</i> , thereby upregulating <i>TASY</i> and promoting the accumulation of paclitaxel	[107]
	TcWRKY44	-	Inhibition the expression of <i>DBAT</i> , <i>T5aH</i> , <i>TcERF15</i> and <i>TcERF12</i> , it is a negative regulatory factor in the biosynthesis of paclitaxel	[106]
	TcWRKY47	+	Upregulate the expression of <i>DBAT</i> , <i>T5aH</i> and <i>TcERF15</i> , while downregulating the expression of <i>TcERF12</i>	[106]
	TcWRKY52	-	Inhibition the expression of <i>DBAT</i> , <i>T5aH</i> , <i>TcERF15</i> and <i>TcERF12</i> , it is a negative regulatory factor in the biosynthesis of paclitaxel	[106]
MYC	TcJAMYC1	-	TcJAMYC1 inhibits the expression of <i>DBAT</i> , <i>PAM</i> , <i>BAPT</i> , and <i>DBTNT</i> , and inhibits the accumulation of late stage paclitaxel	[109]
	TcJAMYC2	-	TcJAMYC2 inhibits the expression of <i>DBAT</i> , <i>PAM</i> , <i>BAPT</i> , and <i>DBTNT</i> , and inhibits the accumulation of late stage paclitaxel	[109]
	TcJAMYC 4	-	TcJAMYC4 inhibits the expression of <i>DBAT</i> , <i>PAM</i> , <i>BAPT</i> , and <i>DBTNT</i> , and inhibits the accumulation of late stage paclitaxel	[109]
	TcMYC2a	+	(1) TcMYC2a can directly bind to T/G-, G-, and E-box in the promoter, thereby activating the expression of paclitaxel biosynthesis genes and promoting the accumulation of paclitaxel (2) TcMYC2a can mediate JA signaling by activating the expression of <i>TcERF15</i> , thereby regulating downstream genes to promote the accumulation of paclitaxel	[110]

+: Positive; -: Negative.

通过 Y1H 发现了两种结合蛋白 TcERF12 和 TcERF15, 并证实 TcERF15 和 TcERF12 通过与 GCC 盒结合来调控 *TASY* 基因的表达。TcERF15 和 TcERF12 的过表达实验进一步证实了 TcERF15 是 *TASY* 的激活子, TcERF12 是 *TASY* 的抑制因子^[103]。

4.3 WRKY 家族转录因子

WRKY 转录因子是在植物中发现的一大类转录因子家族。通过与靶基因的顺式作用元件结合来调控靶基因进而参与植物次级代谢产物的合成与代谢调控^[104]。2013年, Li等从中国红豆杉细胞中克隆了 *DBAT* 基因 5'-侧翼的 1 740 个碱基序列。通过缺失分析定位了 *DBAT* 启动子活性所需的重要调控元件。利用酵母单杂交系统, 以重要的调控元件为诱饵, 从中华红豆杉细胞 cDNA 文库中分离到一个新的 WRKY 转录因子 TcWRKY1。EMSA 实验和亚细胞定位实验表明, TcWRKY1 蛋白能够特异性结合于 *DBAT* 中的两个 W-box 序列。通过转基因实验的结果显示, TcWRKY1 的过表达增强了 *DBAT* 在红豆杉细胞中的表达, RNAi 降低了 *DBAT* 的转录水平。因此, TcWRKY1 可能通过与 *DBAT* 启动子的 W-box 结合而参与 *DBAT* 基因表达的激活, 从而促进紫杉醇的积累^[105]。2018年, Zhang 等通过隐马尔可夫模型搜索, 从中国红豆杉转录组数据集中识别出 61 个对紫杉醇生物合成的有影响转录本并选取了 6 个具有代表性的 TcWRKY 进行了分类。经茉莉酸甲酯和水杨酸处理后, 6 种 TcWRKY 均被茉莉酸甲酯处理上调。将这 6 个 TcWRKY 基因在紫杉醇细胞中过表达, 并对紫杉醇生物合成相关基因中含有 W-box 的 *DBAT*、*T5aH*、*TcERF15* 和 *TcERF12* 进行了 qRT-PCR 分析。结果表明, TcWRKY8 和 TcWRKY47 上调 *DBAT*、*T5aH*、*TcERF15* 基因的表达, 因此推测是紫杉醇生物合成的正调

控因子; 相反地, TcWRKY44 和 TcWRKY52 抑制了 *DBAT*、*T5aH*、*TcERF15* 和 *TcERF12* 基因的表达, 表明 TcWRKY44 和 TcWRKY52 可能是紫杉醇生物合成的负调控因子; 而 TcWRKY26 和 TcWRKY20 促进 *DBAT*、*T5aH*、*TcERF15* 和 *TcERF12* 基因的表达, 是紫杉醇生物合成的正调控因子^[106]。2021年, Chen 等在从转录组数据中选择的 7 个 TcWRKY 转录因子中, 其中只有 2 个在 SA 处理后上调表达。当 TcWRKY33 过表达时, 大多数紫杉醇生物合成基因的表达水平均提高了, 且在 TcWRKY33 过表达叶片中紫杉醇积累的水平比对照组高 1.20 倍, 10-DAB 水平比对照组高出 2.09 倍。同时, Y1H 和双荧光素酶报告实验证实, TcWRKY33 通过与 *DBAT* 启动子中的两个 W-box 相互作用来激活 *DBAT* 的表达, 此外, TcWRKY33 也可以通过与两个 W-box 结合而激活 *TcERF15*, 这些结果表明, TcWRKY33 有效改善了紫杉醇的生物合成^[107]。

4.4 MYC 家族转录因子

MYC 转录因子是 bHLH 家族中的重要成员, 在植物中可与逆境应答蛋白相互作用来参与植物抗逆过程, 不仅如此, 还参与了植物中次生代谢产物合成与代谢调控^[108]。2015年, Lenka 等在红豆杉中发现了 3 个受茉莉酸甲酯诱导的 MYC 转录因子 TcJAMYC1、TcJAMYC2、TcJAMYC4。但瞬时过表达实验结果表明这 3 个 MYC 因子对紫杉醇的合成起负调控作用^[109]。相反地, Zhang 等鉴定得到 TcMYC2a 是紫杉醇合成的正调控因子, TcMYC2a 能够通过与 *TASY* 和 TcERF12/15 启动子区的关键顺式元件 T/G-box、G-box、E-box 结合来影响紫杉醇的合成。进一步分析表明, TcMYC2a 能够与 TcJAZ3 在蛋白水平发生相互作用, 从而介导 MeJA 诱导紫杉醇合成积累的过程^[110]。

尽管大量参与紫杉醇合成的转录因子及其调控机制被解析,但受限于红豆杉的遗传转化体系,极少应用于紫杉醇的生产。近日,西班牙巴塞罗那大学 Mercedes Bonfill 团队通过 *Rhizobium rhizogenes* A4 介导的转化获得了不同的欧洲紫杉(*Taxus baccata*)愈伤组织细胞及毛状根的离体转化系。通过提高紫杉醇生物合成途径中关键限速酶 DBTNBT 和 BAPT 的表达,成功增加了培养细胞中紫杉醇含量,尤其是在未受诱导条件下的培养的第 8 天和第 16 天。此外,采用冠菌素和 β -环状糊精的双重诱导处理进一步增加了紫杉醇的生产,实现了高产量的生物合成。这是首例基于红豆杉细胞的代谢工程技术改良提升紫杉醇含量的研究报道。

5 结论与展望

虽然研究人员已经对紫杉醇的合成进行了数十年的研究,但是不依赖于红豆杉资源的紫杉醇生物合成仍然困难重重。

首先,紫杉醇的生物合成途径尚未完整解析,多个位置的羟基化、氧化及氧杂环丁烷修饰的催化酶尚未被鉴定。同时最新的研究对已知功能的酶进行了进一步的挖掘,有可能解析其新的功能,这表明紫杉醇的生物途径可能是代谢网络而不是线性途径,进一步提高了其解析难度^[29,111]。其次,在异源合成方面,植物来源的催化酶在微生物中表达效率低下或活性不足,同时紫杉醇合成代谢途径长且关键酶亚细胞定位不同,此外,还存在多种类型的后修饰且修饰顺序受到严格的时序调控。引入异源代谢途径可能给底盘细胞带来额外的代谢负担、紫杉醇或其前体可能对底盘细胞具有一定的毒性,限制了其在细胞内的积累。因此,如何调控合成途径与底盘的适配性,利用精准、智能、动态调控技术提高产量是亟待解决的难题。最后,尽管基于红豆杉

悬浮细胞培养技术的紫杉醇生产技术已经进入产业化、工业化阶段,并且紫杉醇合成的诱导机制及转录调控机制已得到初步阐明,但受限于红豆杉细胞的遗传转化效率低下和基因型的限制,利用代谢工程技术改良红豆杉细胞的紫杉醇生产能力仍面临巨大挑战。

近期,随着喜马拉雅红豆杉及南方红豆杉的染色体水平基因组序列被公布,结合质谱成像、激光显微切割等先进技术,对紫杉醇积累量最高的组织部位进行单细胞转录组测序的研究取得了显著进展。这些研究不仅有望揭示更多参与紫杉醇合成的催化酶和转录调控因子,而且为深入理解紫杉醇的生物合成机制提供了新的视角。此外,发育调节因子,如 *BBM-WUS2*、*GRF4-GIF1*、*GRF5* 等基因,在提高小麦、玉米、高粱等作物的再生效率方面已显示出显著效果,为红豆杉细胞的遗传操作提供了新的策略,尤其是在提高红豆杉细胞遗传转化效率方面具有重要意义。同时,结合 CRISPR/Cas9 等精准的基因编辑技术,可以对紫杉醇合成途径中的关键基因进行有效调控,从而进一步优化紫杉醇的生产过程。

本研究组长期从事药用植物不定根的诱导和规模化离体液体发酵培养,已成功扩繁人参、槲木、刺人参等多种植物的不定根,并在大型生物反应器中实现了人参根系的规模化液体发酵生产。最近,我们在东北红豆杉中也成功诱导了不定根并进行了离体液体发酵扩繁,但发现其紫杉醇含量相较于叶片偏低(未发表数据)。因此,仍需要通过基因编辑结合代谢工程策略进一步提升紫杉醇在离体不定根中的积累量。例如,通过调节关键酶的表达或引入外源基因,优化红豆杉细胞的代谢途径。包括提高底物的供应、改善反应通路中的限速步骤等;以及敲除负调控因子、增强关键酶的表达;进

一步利用多组学手段全面解析红豆杉不定根中紫杉醇生物合成的网络,有助于预测基因编辑和代谢工程策略的效果,从而更有效地设计和优化生物合成途径。通过这些综合手段的应用,有望实现在红豆杉离体培养过程中高效合成紫杉醇,为紫杉醇类药物的生产提供理论基础及技术支持。

REFERENCES

- [1] WANI MC, TAYLOR HL, WALL ME, COGGON P, McPHAIL AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] AMATO I. Chemists vie to make a better taxol[J]. Science, 1992, 256(5055): 311.
- [3] ZHANG B, MAITI A, SHIVELY S, LAKHANI F, MCDONALD-JONES G, BRUCE J, LEE EB, XIE SX, JOYCE S, LI C, TOLEIKIS PM, LEE VMY, TROJANOWSKI JQ. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(1): 227-231.
- [4] EHRLICH A, BOOHER S, BECERRA Y, BORRIS DL, FIGG WD, TURNER ML, BLAUVELT A. Micellar paclitaxel improves severe psoriasis in a prospective phase II pilot study[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2004, 50(4): 533-540.
- [5] Paclitaxel Injection Market (By End User: Cancer Research Centers, Hospital, Others)-Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2023-2032[EB/OL]. [2023-12-06] <https://www.precedenceresearch.com/paclitaxel-injection-market>.
- [6] 冯巍, 谈锋, 谢峻. 曼地亚红豆杉研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(10): 1589-1593.
FENG W, TAN F, XIE J. Advances in studies on *Taxus media*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(10): 1589-1593 (in Chinese).
- [7] FENG SG, HOU KL, ZHANG HS, CHEN C, HUANG JF, WU QC, ZHANG ZH, GAO YD, WU XM, WANG HZ, SHEN CJ. Investigation of the role of TmMYB16/123 and their targets (TmMTP1/11) in the tolerance of *Taxus media* to cadmium[J]. Tree Physiology, 2023, 43(6): 1009-1022.
- [8] HOLTON RA, KIM HB, SOMOZA C, LIANG F, BIEDIGER RJ, BOATMAN PD, SHINDO M, SMITH CC, KIM SC, NADIZADEH H, SUZUKI Y, TAO CL, VU P, TANG SH, ZHANG PS, MURTHI KK, GENTILE LN, LIU JH. First total synthesis of taxol. 2. Completion of the c-ring and d-ring [J]. Journal of the American Chemical Society, 1994, 116(4): 1599-1600.
- [9] NICOLAOU KC, YANG Z, LIU JJ, UENO H, NANTERMET PG, GUY RK, CLAIBORNE CF, RENAUD J, COULADOUROS EA, PAULVANNAN K. Total synthesis of taxol[J]. Nature, 1994, 367(6464): 630-634.
- [10] MASTERS JJ, LINK JT, SNYDER LB, YOUNG WB, DANISHEFSKY SJ. A total synthesis of taxol[J]. Angewandte Chemie International Edition in English, 1995, 34(16): 1723-1726.
- [11] WENDER PA, BADHAM NF, CONWAY SP, FLOREANCIG PE, GLASS TE, GRÄNICHER C, HOUZE JB, JÄNICHEN J, LEE D, MARQUESS DG, McGRANE PL, MENG W, MUCCIARO TP, MÜHLEBACH M, NATCHUS MG, PAULSEN H, RAWLINS DB, SATKOFISKY J, SHUKER AJ, SUTTON JC, et al. The pinene path to taxanes. 5. stereocontrolled synthesis of a versatile taxane precursor[J]. Journal of the American Chemical Society, 1997, 119(11): 2755-2756.
- [12] MUKAIYAMA T, SHIINA I, IWADARE H, SAKOH H, TANI YI, HASEGAWA M, SAITOH K. Asymmetric total synthesis of taxol[J]. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 1997, 73(6): 95-100.
- [13] MORIHIRA K, HARA R, KAWAHARA S, NISHIMORI T, NAKAMURA N, KUSAMA H, KUWAJIMA I. Enantioselective total synthesis of taxol[J]. Journal of the American Chemical Society, 1998, 120(49): 12980-12981.
- [14] KANDA Y, NAKAMURA H, UMEMIYA S, PUTHUKANOORI RK, APPALA VRM, GADDAMANUGU GK, PARASELLI BR, BARAN PS. Two-phase synthesis of taxol[J]. Journal of the American Chemical Society, 2020, 142(23): 10526-10533.
- [15] HU YJ, GU CC, WANG XF, MIN L, LI CC. Asymmetric total synthesis of taxol[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(42): 17862-17870.
- [16] IYAMA S, FUKAYA K, YAMAGUCHI Y, WATANABE A, YAMAMOTO H, MOCHIZUKI S,

- SAIO R, NOGUCHI T, OISHI T, SATO T, CHIDA N. Total synthesis of paclitaxel[J]. *Organic Letters*, 2022, 24(1): 202-206.
- [17] IMAMURA Y, TAKAOKA K, KOMORI Y, NAGATOMO M, INOUE M. Total synthesis of taxol enabled by inter- and intramolecular radical coupling reactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(10): e202219114.
- [18] WAHL A, GUÉRITTE-VOEGELEIN F, GUÉNARD D, Le GOFF MT, POTIER P. Rearrangement reactions of taxanes: structural modifications of 10-deacetylbaaccatin III[J]. *Tetrahedron*, 1992, 48(34): 6965-6974.
- [19] HOLTON ROBERT A. Method for preparation of taxol using an oxazinone.1990/11/13/Application date.
- [20] ZHAO L, ZHU YH, JIA HY, HAN YG, ZHENG XK, WANG M, FENG WS. From plant to yeast-advances in biosynthesis of artemisinin[J]. *Molecules*, 2022, 27(20): 6888.
- [21] 姜逢霖, 巩婷, 陈晶晶, 陈天娇, 杨金玲, 朱平. 植物来源药用天然产物的合成生物学研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1931-1951.
- JIANG FL, GONG T, CHEN JJ, CHEN TJ, YANG JL, ZHU P. Synthetic biology of plants-derived medicinal natural products[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(6): 1931-1951 (in Chinese).
- [22] LIU XN, CHENG J, ZHANG GH, DING WT, DUAN LJ, YANG J, KUI L, CHENG XZ, RUAN JX, FAN W, CHEN JW, LONG GQ, ZHAO Y, CAI J, WANG W, MA YH, DONG Y, YANG SC, JIANG HF. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 448.
- [23] LI XD, WANG YM, FAN ZJ, WANG Y, WANG PP, YAN X, ZHOU ZH. High-level sustainable production of the characteristic protopanaxatriol-type saponins from *Panax* species in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 66: 87-97.
- [24] LI YR, LI SJ, THODEY K, TRENCHARD I, CRAVENS A, SMOLKE CD. Complete biosynthesis of noscapine and halogenated alkaloids in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(17): E3922-E3931.
- [25] ROBERTS SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(7): 387-395.
- [26] ZHAO Y, LIANG FY, XIE YM, DUAN YT, ANDEADELLI A, PATERAKI I, MAKRIS AM, POMORSKI TG, STAERK D, KAMPRANIS SC. Oxetane ring formation in taxol biosynthesis is catalyzed by a bifunctional cytochrome P450 enzyme[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(1): 801-810.
- [27] 吴迎梅, 廖庆刚, 尚轶, 龚振平, 苟君波. 多组学助力紫杉醇合成生物学研究[J]. *植物科学学报*, 2022, 40(6): 853-866.
- WU YM, LIAO QG, SHANG Y, GONG ZP, GOU JB. Recent progress of paclitaxel biosynthesis aided by multi-omics[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(6): 853-866 (in Chinese).
- [28] JENNEWEIN S, CROTEAU R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(1): 13-19.
- [29] ZHANG YJ, WIESE L, FANG H, ALSEEKH S, PEREZ de SOUZA L, SCOSSA F, MOLLOY JJ, CHRISTMANN M, FERNIE AR. Synthetic biology identifies the minimal gene set required for paclitaxel biosynthesis in a plant chassis[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(12): 1951-1961.
- [30] HEINIG U, JENNEWEIN S. Taxol: a complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8: 1370-1385.
- [31] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [32] 胡凯, 谈锋, 唐克轩, 祝顺琴, 王微. 南方红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离和筛选[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 31(1): 134-137.
- HU K, TAN F, TANG KX, ZHU SQ, WANG W. Isolation and screening of endophytic fungi synthesizing taxol from *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2006, 31(1): 134-137 (in Chinese).
- [33] 田仁鹏, 杨桥, 周国玲, 谈静泉, 张珞珍, 方呈祥. 一株产紫杉醇的南方红豆杉内生真菌的分离及分类研究[J]. *武汉植物学研究*, 2006, 24(6): 541-545.
- TIAN RP, YANG Q, ZHOU GL, TAN JQ, ZHANG LZ, FANG CX. Taxonomic study on a taxol producing fungus isolated from bark of *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2006, 24(6): 541-545 (in Chinese).
- [34] ZHANG P, ZHOU PP, YU LJ. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2[J]. *Current*

- Microbiology, 2009, 59(3): 227-232.
- [35] KUMARAN RS, KIM HJ, HUR BK. Taxol promising fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidata*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(5): 541-546.
- [36] GARYALI S, KUMAR A, REDDY MS. Taxol production by an endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from Himalayan yew[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(10): 1372-1380.
- [37] WANG X, WANG C, SUN YT, SUN CZ, ZHANG Y, WANG XH, ZHAO K. Taxol produced from endophytic fungi induces apoptosis in human breast, cervical and ovarian cancer cells[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, 2015, 16(1): 125-131.
- [38] EL-SAYED ASA, ALI DMI, YASSIN MA, ZAYED RA, ALI GS. Sterol inhibitor “fluconazole” enhance the taxol yield and molecular expression of its encoding genes cluster from *Aspergillus flavipes*[J]. Process Biochemistry, 2019, 76: 55-67.
- [39] 陈国晶, 杨宁, 吴文静, 喻静, 金磊磊, 张爱华, 陈集双. 不同诱导子对曼地亚红豆杉内生真菌产紫杉醇的影响[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2021, 43(4): 535-539.
- CHEN GJ, YANG N, WU WJ, YU J, JIN LL, ZHANG AH, CHEN JS. Effects of different elicitors on paclitaxel productions of an endophytic fungus *Alternaria* sp. isolated from *Taxus media*[J]. Journal of Nanjing Tech University (Natural Science Edition), 2021, 43(4): 535-539 (in Chinese).
- [40] HUANG QL, ROESSNER CA, CROTEAU R, SCOTT AI. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, 9(9): 2237-2242.
- [41] AJIKUMAR PK, XIAO WH, TYO KEJ, WANG Y, SIMEON F, LEONARD E, MUCHA O, PHON TH, PFEIFER B, STEPHANOPOULOS G. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science, 2010, 330(6000): 70-74.
- [42] BIGGS BW, LIM CG, SAGLIANI K, SHANKAR S, STEPHANOPOULOS G, de MEY M, AJIKUMAR PK. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(12): 3209-3214.
- [43] WU QY, HUANG ZY, WANG JY, YU HL, XU JH. Construction of an *Escherichia coli* cell factory to synthesize taxadien-5 α -ol, the key precursor of anti-cancer drug paclitaxel[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9(1): 82.
- [44] 王伟, 孟超, 朱平, 程克棣. 代谢工程酵母菌合成紫杉烯的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(8): 103-108.
- WANG W, MENG C, ZHU P, CHENG KD. Preliminary study on metabolic engineering of yeast for producing taxadiene[J]. China Biotechnology, 2005, 25(8): 103-108 (in Chinese).
- [45] DEJONG JM, LIU YL, BOLLON AP, LONG RM, JENNEWEIN S, WILLIAMS D, CROTEAU RB. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 93(2): 212-224.
- [46] ENGELS B, DAHM P, JENNEWEIN S. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards taxol (paclitaxel) production[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(3/4): 201-206.
- [47] DING MZ, YAN HF, LI LF, ZHAI F, SHANG LQ, YIN Z, YUAN YJ. Biosynthesis of taxadiene in *Saccharomyces cerevisiae*: selection of geranylgeranyl diphosphate synthase directed by a computer-aided docking strategy[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109348.
- [48] NOWROUZI B, LI RA, WALLS LE, D’ESPAUX L, MALC₁ K, LIANG LG, JONGUITUD-BORREGO N, LERMA-ESCALERA AI, MORONES-RAMIREZ JR, KEASLING JD, RIOS-SOLIS L. Enhanced production of taxadiene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 200.
- [49] WALLS LE, MALC₁ K, NOWROUZI B, LI RA, D’ESPAUX L, WONG J, DENNIS JA, SEMIÃO AJC, WALLACE S, MARTINEZ JL, KEASLING JD, RIOS-SOLIS L. Optimizing the biosynthesis of oxygenated and acetylated taxol precursors in *Saccharomyces cerevisiae* using advanced bioprocessing strategies[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(1): 279-293.
- [50] WALLS L E, MARTINEZ J L, RIOS-SOLIS L. Enhancing *Saccharomyces cerevisiae* taxane biosynthesis and overcoming nutritional stress-induced pseudohyphal growth[J]. Microorganisms, 2022, 10(1): 163.
- [51] 辛燕花, 肖招燕, 尤琳烽, 郭丽琼, 林俊芳. 紫杉二烯合酶基因在灵芝中的表达[J]. 中国农业科学, 2014, 47(3): 546-552.
- XIN YH, XIAO ZY, YOU LF, GUO LQ, LIN JF.

- Heterologous expression of taxadiene synthase gene in *Ganoderma lucidum*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(3): 546-552 (in Chinese).
- [52] BIAN GK, YUAN YJ, TAO H, SHI XF, ZHONG XF, HAN YC, FU S, FANG CX, DENG ZX, LIU TG. Production of taxadiene by engineering of mevalonate pathway in *Escherichia coli* and endophytic fungus *Alternaria alternata* TPF6[J]. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(4): 1600697.
- [53] 朱泽燕, 李军超, 王启明, 杨淑慎. 农杆菌介导 Txpam 基因转化烟曲霉 TMS-26 及其产紫杉醇效果评价[J]. *菌物学报*, 2021, 40(8): 2087-2101.
- ZHU ZY, LI JC, WANG QM, YANG SS. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus* TMS-26 with a phenylalanine aminomutase gene and evaluation of the transformant potential for paclitaxel production[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(8): 2087-2101 (in Chinese).
- [54] BESUMBES O, SAURET-GÜETO S, PHILLIPS MA, IMPERIAL S, RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN M, BORONAT A. Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of taxol[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 88(2): 168-175.
- [55] KOVACS K, ZHANG LN, LINFORTH RST, WHITTAKER B, HAYES CJ, FRAY RG. Redirection of carotenoid metabolism for the efficient production of taxadiene (taxa-4(5),11(12)-diene) in transgenic tomato fruit[J]. *Transgenic Research*, 2007, 16(1): 121-126.
- [56] HASAN MM, KIM HS, JEON JH, KIM SH, MOON B, SONG JY, SHIM SH, BAEK KH. Metabolic engineering of *Nicotiana benthamiana* for the increased production of taxadiene[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(6): 895-904.
- [57] LI MY, JIANG FS, YU XL, MIAO ZQ. Engineering isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua* L. for the production of taxadiene: a key intermediate of taxol[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 504932.
- [58] LI JH, MUTANDA I, WANG KB, YANG L, WANG JW, WANG Y. Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4850.
- [59] FU JQ, XU WB, HUANG W, WANG BP, LI SC, ZHANG J, CHANG L. Importation of taxadiene synthase into chloroplast improves taxadiene production in tobacco[J]. *Planta*, 2021, 253(5): 107.
- [60] ROHR R. Production de cals par les gametophytes males de *Taxus Baccata* L. Cultives sur un milieu artificiel. Etude en microscopie photonique et electronique[J]. *Caryologia*, 1973, 25(sup1): 177-189.
- [61] 沈征武, 吴莲芬. 紫杉醇研究进展[J]. *化学进展*, 1997, 9(1): 1-13.
- SHEN ZW, WU LF. Research progress of paclitaxel[J]. *Progress in Chemistry*, 1997, 9(1): 1-13 (in Chinese).
- [62] WICKREMESINHE ERM, ARTEEA RN. *Taxus* callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 35(2): 181-193.
- [63] FETT-NETO AG, PENNINGTON JJ, DiCOSMO F. Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata* Sieb and Zucc.[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1995, 146(5/6): 584-590.
- [64] 张宗勤, 罗新谈, 王之, 郝联芳. 红豆杉的愈伤组织诱导及培养研究(初报)[J]. *西北植物学报*, 1996, 16(5): 16-18.
- ZHANG ZQ, LUO XT, WANG Z, HAO LF. Study on callus induction and culture of *Taxus chinensis* (preliminary report)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 1996, 16(5): 16-18 (in Chinese).
- [65] 邱德有, 李如玉, 李铃. 红豆杉及南方红豆杉体细胞胚胎发生的研究[J]. *林业科学*, 1998, 34(6): 50-54.
- QIU DY, LI RY, LI L. Study on somatic embryogenesis of *Taxus chinensis* and *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 1998, 34(6): 50-54 (in Chinese).
- [66] 苏应娟, 王艇, 杨礼香, 李雪雁, 范国宽, 柯亚永, 朱建明, 吴惠勤, 葛发欢. 南方红豆杉芽愈伤组织的诱导和培养[J]. *中草药*, 2001, 32(7): 637-639.
- SU YJ, WANG T, YANG LX, LI XY, FAN GK, KE YY, ZHU JM, WU HQ, GE FH. Induction and culture on callus of *Taxus chinensis* var. *mairei* bud[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2001, 32(7): 637-639 (in Chinese).
- [67] 金贞兰, 刘继生, 鲁京兰, 刘宪虎, 许明子. 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*, 2010, 38(19): 9993-9994, 9997.
- JIN ZL, LIU JS, LU JL, LIU XH, XU MZ. Effects of different medium on callus induction from *Taxus cuspidata* sieb. et Zucc.[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(19): 9993-9994, 9997 (in Chinese).
- [68] 王淑杰, 袁丽娜, 张健雄, 刘丽丽, 王赵玉. 抑菌剂在东北红豆杉开放式组培中的应用研究[J]. *园艺学报*, 2011, 38(S): 2638.

- WANG SJ, YUAN LN, ZHANG JX, LIU LL, WANG ZY. Application of antibacterial agents in open tissue culture of *Taxus cuspidata* Sieb and Zucc.[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(S): 2638 (in Chinese).
- [69] 余响华, 邵金华, 袁志辉, 赵昌会, 戴永强. 植物细胞工程技术生产紫杉醇研究进展[J]. 西北植物学报, 2013, 33(6): 1279-1284.
- YU XH, SHAO JH, YUAN ZH, ZHAO CH, DAI YQ. Research progress on production of taxol by plant cell engineering[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(6): 1279-1284 (in Chinese).
- [70] 赵继鹏, 杨淑慎. 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), 2014, 42(1): 189-195.
- ZHAO JP, YANG SS. Establishment of cell suspension culture system for *Taxus media*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2014, 42(1): 189-195 (in Chinese).
- [71] 王淑杰, 李晓卉, 白贺, 李瞳, 李纯, 王胡军. 东北红豆杉悬浮细胞诱导紫杉醇培养基优化研究[J]. 中国园艺学会 2018 年学术年会论文摘要集, 2018.
- WANG SJ, LI XH, BAI H, LI T, LI C, WANG HJ. Optimization of paclitaxel culture medium induced by suspension cells of *Taxus cuspidata* Sieb and Zucc.[J]. Collected abstracts of papers from the 2018 Academic Annual Conference of the Chinese Horticultural Society, 2018 (in Chinese).
- [72] 徐志荣, 王婷, 娄佳兰, 魏赛金. 南方红豆杉细胞悬浮培养体系优化及动力学研究[J]. 林业科学研究, 2019, 32(1): 8-14.
- XU ZR, WANG T, LOU JL, WEI SJ. Study on optimization of cell suspension culture system and kinetics of *Taxus chinensis* var. mairer[J]. Forest Research, 2019, 32(1): 8-14 (in Chinese).
- [73] MALIK S, CUSIDÓ RM, MIRJALILI MH, MOYANO E, PALAZÓN J, BONFILL M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 23-34.
- [74] YUKIMUNE Y, TABATA H, HIGASHI Y, HARA Y. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 1129-1132.
- [75] QIAN ZG, ZHAO ZJ, XU YF, QIAN XH, ZHONG JJ. Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signals for plant secondary metabolism[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 86(7): 809-816.
- [76] NAILL MC, ROBERTS SC. Cell cycle analysis of *Taxus* suspension cultures at the single cell level as an indicator of culture heterogeneity[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 90(4): 491-500.
- [77] ONRUBIA M, MOYANO E, BONFILL M, EXPÓSITO O, PALAZÓN J, CUSIDÓ RM. 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]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 53(1): 104-111.
- [78] BENDER CL, ALARCÓN-CHAIDEZ F, GROSS DC. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 1999, 63(2): 266-292.
- [79] KATSIR L, SCHILMILLER AL, STASWICK PE, HE SY, HOWE GA. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(19): 7100-7105.
- [80] ONRUBIA M, MOYANO E, BONFILL M, CUSIDÓ RM, GOOSSENS A, PALAZÓN J. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(2): 211-219.
- [81] 赵疆, 党昇荣, 姚阳阳, 李羽翥, 王宝民, 沙洁, 杨涛. 外源水杨酸和冠菌素对当归早期抽薹的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2023, 58(4): 137-145.
- ZHAO J, DANG SR, YAO YY, LI YF, WANG BM, SHA J, YANG T. Effects of exogenous salicylic acid and coronatine on early bolting of *Angelica sinensis*[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2023, 58(4): 137-145 (in Chinese).
- [82] 苗志奇, 未作君, 元英进. 水杨酸在紫杉醇生物合成中诱导作用的研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4): 509-513.
- MIAO ZQ, WEI ZJ, YUAN YJ. Study on the effects of salicylic acid on taxol biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(4): 509-513 (in Chinese).
- [83] WANG YD, WU JC, YUAN YJ. Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *maireri*[J]. Cell Biology International, 2007, 31(10): 1179-1183.
- [84] YAMAMOTO K, TANIKAWA T, TOMITA J, ISHIDA Y, NAKATA D, TERAOKA K, INOUE Y. Characterization, preparation, and promotion of plant growth of

- 1,3-diphenylurea/ β -cyclodextrin derivatives inclusion complexes[J]. ACS Omega, 2023, 8(38): 34972-34981.
- [85] SABATER-JARA AB, ONRUBIA M, MOYANO E, BONFILL M, PALAZÓN J, PEDREÑO MA, CUSIDÓ RM. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures[J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12(8): 1075-1084.
- [86] 张长平, 李春, 元英进, 孙安慈, 胡昌序. 真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞态势及紫杉醇合成的影响[J]. 生物工程学报, 2001, 17(4): 436-440.
- ZHANG CP, LI C, YUAN YJ, SUN AC, HU CX. Effects of fungal elicitor on cell status and taxol production in cells suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2001, 17(4): 436-440 (in Chinese).
- [87] LI YC, TAO WY. Interactions of taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during taxol accumulation[J]. Cell Biology International, 2009, 33(1): 106-112.
- [88] 邱涵, 孟丽媛, 杨婉婷, 凌树玉, 任凯利, 魏赛金. 灵芝诱导子对南方红豆杉悬浮培养细胞产紫杉醇的影响[J]. 河南农业科学, 2023, 52(10): 52-59.
- QIU H, MENG LY, YANG WT, LING SY, REN KL, WEI SJ. Effect of *Ganoderma lucidum* elicitor on paclitaxel production by *Taxus wallichiana* var. *mairei* suspension culture cells[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(10): 52-59 (in Chinese).
- [89] HE Y, LOH C. Cerium and lanthanum promote floral initiation and reproductive growth of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2000, 159(1): 117-124.
- [90] YUAN YJ, HU GW, WANG CG, JING Y, SHEN PW. Effect of La, Ce on *Taxus cuspidata* cell growth, biosynthesis and release of taxol[J]. Journal of Rare Earths, 1998, 16(4): 61-67.
- [91] YANG S, LU SH, YUAN YJ. Lipidomic analysis reveals differential defense responses of *Taxus cuspidata* cells to two elicitors, methyl jasmonate and cerium (Ce^{4+})[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2008, 1781(3): 123-134.
- [92] BONET IJM, ARALDI D, GREEN PG, LEVINE JD. Topical coapplication of hyaluronan with transdermal drug delivery enhancers attenuates inflammatory and neuropathic pain[J]. Pain, 2023, 164(12): 2653-2664.
- [93] KAJANI AA, MOGHIM S, MOFID MR. Enhanced taxane production and secretion from *Taxus baccata* cell culture by adding dimethylsulfoxide[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2012, 59(3): 223-227.
- [94] OKRAH A, LI SL, AGATHOKLEOUS E, FENG ZZ. Elevated ozone effects on potato leaf physiology, growth, and yield: a meta-analysis[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30(57): 120483-120495.
- [95] XU MJ, JIN HH, DONG JF, ZHANG M, XU XB, ZHOU T. Abscisic acid plays critical role in ozone-induced taxol production of *Taxus chinensis* suspension cell cultures[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(5): 1415-1420.
- [96] 潘学武, 董妍玲. 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, 2010, 27(10): 65-68.
- PAN XW, DONG YL. Effect of electric stimulation on suspension cell cultures of *Taxus chinensis* for taxol production[J]. Chemistry & Bioengineering, 2010, 27(10): 65-68 (in Chinese).
- [97] ZHANG L, XU Y, LI YT, ZHENG SS, ZHAO ZM, CHEN ML, YANG HJ, YI HL, WU JX. Transcription factor CsMYB77 negatively regulates fruit ripening and fruit size in citrus[J]. Plant Physiology, 2023: kiad592.
- [98] YU CN, LUO XJ, ZHANG CC, XU XY, HUANG JF, CHEN YY, FENG SG, ZHAN XR, ZHANG L, YUAN HW, ZHENG BS, WANG HZ, SHEN CJ. Tissue-specific study across the stem of *Taxus media* identifies a phloem-specific TmMYB3 involved in the transcriptional regulation of paclitaxel biosynthesis[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2020, 103(1): 95-110.
- [99] CAO XY, XU LX, LI LD, WAN W, JIANG JH. TcMYB29a, an ABA-responsive R2R3-MYB transcriptional factor, upregulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 804593.
- [100] YU CN, HUANG JF, WU QC, ZHANG CC, LI XL, XU XY, FENG SG, ZHAN XR, CHEN ZH, WANG HZ, SHEN CJ. Role of female-predominant MYB39-bHLH13 complex in sexually dimorphic accumulation of taxol in *Taxus media*[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhac062.
- [101] YU CN, HOU KL, ZHANG HS, LIANG XS, CHEN C, WANG ZJ, WU QC, CHEN GL, HE JX, BAI EH, LI XF, DU TR, WANG YF, WANG MS, FENG SG, WANG HZ, SHEN CJ. Integrated mass spectrometry imaging and single-cell transcriptome atlas strategies provide novel insights into taxoid biosynthesis and transport in *Taxus mairei* stems[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2023, 115(5): 1243-1260.

- [102] 许世达, 耿兴敏, 王露露. 植物乙烯响应因子(ERF)的结构、功能及表达调控研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2021, 38(3): 624-633.
XU SD, GENG XM, WANG LL. A review of the structure, function and expression regulation of ethylene response factors (ERF) in plant[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2021, 38(3): 624-633 (in Chinese).
- [103] ZHANG M, LI ST, NIE L, CHEN QP, XU XP, YU LJ, FU CH. Two jasmonate-responsive factors, TcERF12 and TcERF15, respectively act as repressor and activator of tasy gene of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis*[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 89(4): 463-473.
- [104] REN LP, WAN WY, YIN DD, DENG XH, MA ZX, GAO T, CAO XH. Genome-wide analysis of WRKY transcription factor genes in *Toona sinensis*: an insight into evolutionary characteristics and terpene synthesis[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 13: 1063850.
- [105] LI S, ZHANG P, ZHANG M, FU C, YU L. Functional analysis of a WRKY transcription factor involved in transcriptional activation of the DBAT gene in *Taxus chinensis*[J]. Plant Biology, 2013, 15(1): 19-26.
- [106] ZHANG M, CHEN Y, NIE L, JIN XF, LIAO WF, ZHAO SY, FU CH, YU LJ. Transcriptome-wide identification and screening of WRKY factors involved in the regulation of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis*[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 5197.
- [107] CHEN Y, ZHANG H, ZHANG M, ZHANG WL, OU ZQ, PENG ZH, FU CH, ZHAO CF, YU LJ. Salicylic acid-responsive factor *TcWRKY33* positively regulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* in direct and indirect ways[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 697476.
- [108] 李罡, 李文龙, 许雪梅, 李成浩. MYC₂ 转录因子参与植物发育调控的研究进展[J]. 植物生理学报, 2019, 55(2): 125-132.
LI G, LI WL, XU XM, LI CH. Research progress of MYC₂ transcription factors participating in plant development and regulation[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(2): 125-132 (in Chinese).
- [109] LENKA SK, NIMS NE, VONGPASEUTH K, BOSCHARA, ROBERTS SC, WALKER EL. Jasmonate-responsive expression of paclitaxel biosynthesis genes in *Taxus cuspidata* cultured cells is negatively regulated by the bHLH transcription factors TcJAMYC1, TcJAMYC2, and TcJAMYC4[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 115.
- [110] ZHANG M, JIN XF, CHEN Y, WEI M, LIAO WF, ZHAO SY, FU CH, YU LJ. TcMYC2a, a basic helix-loop-helix transcription factor, transduces JA-signals and regulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 863.
- [111] LIU JCT, de la PEÑA R, TOCOL C, SATTELY ES. Reconstitution of early paclitaxel biosynthetic network[J]. Nature Communications, 2024: 14(1): 1419.

(本文责编 郝丽芳)