

喜树碱的生物合成途径及生物技术研究进展

李连强, 潘夕春, 谈 锋*

(西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:喜树碱是从我国特有植物喜树中发现的一种具有抗癌活性的萜类吲哚生物碱, 具有很好的药用价值。主要介绍喜树碱的合成器官、生物合成途径上已知的酶和基因, 以及利用喜树愈伤组织和毛状根培养生产喜树碱的最新进展。

关键词:喜树碱; 合成途径; 合成器官; 愈伤组织; 毛状根

中图分类号:R282.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)04-0623-04

Advances in studies on biosynthetic pathway and biotechnology of camptothecin

LI Lian-qiang, PAN Xi-chun, TAN Feng

(Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Science, Southwest China University, Chongqing 400715, China)

Key words: camptothecin; biosynthetic pathway; synthetic organ; callus; hairy root

喜树碱(camptothecin)是 1966 年 Wall 等在我国特有植物喜树 *Camptotheca acuminata* Decaisne 木质部中分离到的一种具有抗肿瘤活性的萜类吲哚生物碱。后来又陆续在夹竹桃科的海木狗牙花 *Ervatamia heyneana* (Wall.) T. Cooke, 茶茱萸科的臭味假柴龙树 *Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer, 以及茜草科的短小蛇根草 *Ophiorrhiza pumila* Champ. ex Benth. 等植物中发现了喜树碱^[1]。喜树碱及其衍生物抗肿瘤作用的机制是通过抑制 DNA 拓扑异构酶 I (DNA topoisomerase I) 的活性, 从而抑制癌细胞的生长。喜树碱及其衍生物、紫杉醇以及维生素甲类化合物抗肿瘤作用的发现被誉为“20 世纪 90 年代抗癌药物的三大发现”^[2]。美国 FDA 指定的权威医学研究机构组织的临床实验表明, 喜树碱衍生物——伊诺替康 (Irenotecan) 和拓扑替康 (Topotecan) 的抗癌作用总体上与紫杉醇相当或优于后者。喜树碱及其衍生物对恶性肿瘤和实体肿瘤均有良好的疗效, 因此, 世界卫生组织已经把喜树碱及其衍生物的研究和开发作为抗癌药物研究的主攻方向之一^[3]。预计到 2010 年, 喜树碱及其衍生物类抗癌药物的总销售额将超过 10 亿美元^[4], 具有非常广阔的市场前景。而目前全世界喜树碱年产量仅为 600 kg, 远远不能满足市场的需要; 喜树碱的全合成已经取得成功, 但是由于路线长、产率低、生产成本高, 无法投入工业化生产。因此, 利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, 提高喜树碱产量已经成为目前研究的热点, 并且在近年来取得了一系列重大进展。

1 喜树碱的合成器官

据测定, 喜树嫩叶中喜树碱的量分别是种子中的 1.5

倍、树皮中的 2.5 倍, 这表明植物组织越幼嫩, 喜树碱量越高^[5]。Yamazaki 等^[6]利用放射性同位素标记, 证实了在幼叶中, 色胺不能结合形成喜树碱或者其前体化合物——直夹竹桃啶 (或异胡豆苷)。该结果表明尽管喜树碱在幼叶中量较高, 但幼叶并不是喜树碱合成的部位。该研究小组在研究喜树碱生物合成途径中胸关键酶——直夹竹桃啶合成酶 (strictosidine synthase, SSS) 的活性时, 也发现其编码基因只在植物体的局部表达来合成喜树碱, 然后转运到其他组织和器官。由此可以推测, 喜树碱的生物合成可能由一个非常幼嫩并且生长迅速的组织完成, 合成的喜树碱或其水溶性前体被转运到幼叶中; 喜树碱在其他组织中的积累可能是植物组织的一种自我保护策略^[7]。

1994 年, Lo'pez-Meyer 提出假说, 茎和叶并不是喜树碱的合成器官, 而只是积累器官; 喜树碱的合成器官很可能是根, 并通过某种方式转运到茎和叶^[8]。尽管目前在喜树的根中还没有喜树碱分泌导管的报道, 但在根中检测到喜树碱, 这表明叶和茎中的分泌结构只是喜树碱的积累器官, 而不是喜树碱的生物合成器官, 该发现和 Lo'pez-Meyer 等的研究结果一致。张冬艳等^[9]的研究也表明喜树碱的产生与愈伤组织根器官的分化有一定关系。因此, 根很可能是喜树碱合成的器官, 但是目前还没有发现喜树碱从根运送到其他器官的运输系统^[10]。喜树碱及其前体运输和储藏的确切机制还不清楚, 这类不溶于水的化合物转运机制可能是^[6]转化为水溶性更好的形式, 如配糖物, 然后再转运到植物的其他部分。

2 喜树碱生物合成途径及关键酶

2.1 喜树碱生物合成途径: 研究生物碱的生物合成途径, 最

收稿日期: 2005-08-08

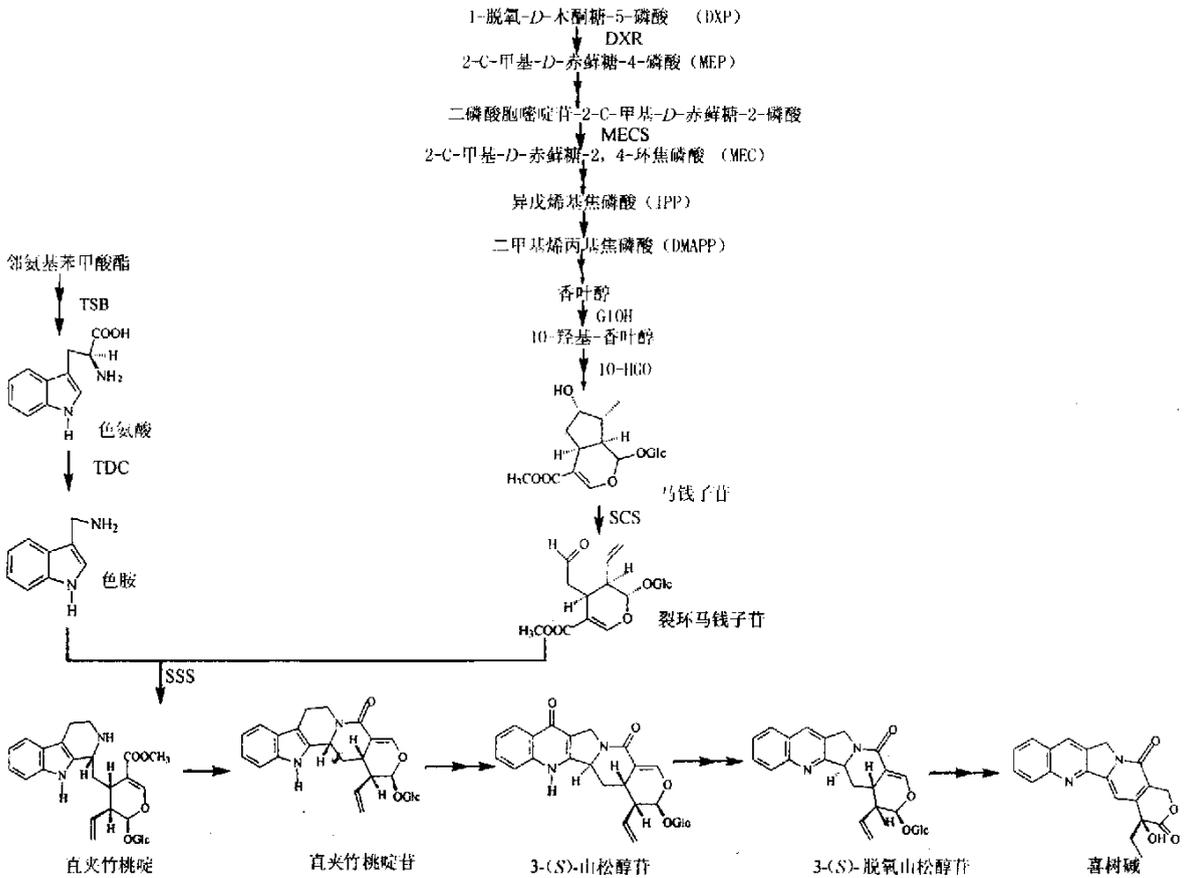
作者简介: 李连强 (1981—), 云南弥渡人, 生物化学与分子生物学专业硕士研究生, 主要从事药用植物生物技术与生化工程领域的研究。

Tel: (023) 68252698 Fax: (023) 68252365 E-mail: liliqiang1@swnu.edu.cn

* 通讯作者 谈 锋 Tel: (023) 68252698 E-mail: tanfeng@swnu.edu.cn Fax: 023(68252365)

初采用的方法是利用同位素示踪法对全株植物进行标记,找出目标生物合成途径,但效果并不理想;近年来通常利用放射性同位素饲喂悬浮细胞,通过核磁共振光谱分析中间产物

的结构,进而研究生物碱的生物合成途径。利用上述方法,目前已经清楚喜树碱由单萜吲哚生物途径合成,其生物合成途径如图 1。



两个箭头表示中间需要多个反应步骤;TSB:色氨酸合酶β亚单位;TDC:色氨酸脱羧酶;DXS:脱氧木酮糖-5-磷酸氧化还原酶;DXR:脱氧木酮糖-5-磷酸氧化还原酶;MECS:2-C-甲基-D-赤藓糖-2,4-环焦磷酸合酶;G10H:香叶醇-10-羟化酶;SCS:裂环马钱子苷合酶;SSS:直夹竹桃啶合酶;10-HGO:10-羟基香叶醇氧化还原酶。

Multiple arrows indicate multiple steps between intermediates; TSB:β-subunit of tryptophan synthase;TDC: tryptophan decarboxylase; DXS: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; MECS: 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate-synthase; G10H: geraniol-10-hydroxylase; SCS: secologanin synthase; SSS: strictosidine synthase; 10-HGO: 10-hydroxy geraniol oxidoreductase.

图 1 喜树碱生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of camptothecin

甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA) 一直被认为是所有植物类异戊二烯单体的唯一来源,但最近的研究表明^[11], 甲基磷酸赤藓糖途径 (methyl erythritol phosphate, MEP) 也可以生成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP)。Yamazaki 等^[12]以 [1-¹³C]葡萄糖饲喂臭味假柴龙树毛状根,并利用代谢途径特异性抑制因子[如 fosmidomycin 和 6-α-甲基致密素 (lovastatin)]对毛状根的喜树碱积累进行了差异分析。结果表明,喜树碱的马钱子苷 (loganin) 部分是通过 MEP 途径合成的,该途径定位于质体,提供合成单萜、倍半萜、二萜和类胡萝卜素的前体^[13]。

早期利用放射性同位素标记前体的方法,证实单萜吲哚

生物碱的吲哚环部分是来源于色氨酸 (tryptophan)^[14]。Yamazaki 等^[12]最近经原子代谢自动重建软件分析的研究显示来自色氨酸的喹啉骨架是经过莽草酸途径合成的;色氨酸经色氨酸脱羧酶 (TDC) 脱羧生成色胺 (tryptamine),色胺再共价结合到马钱子苷上,在直夹竹桃啶合酶催化下形成关键性中间产物直夹竹桃啶 (strictosidine),它是 1 200 多种吲哚生物碱包括喜树碱的关键前体物。直夹竹桃啶经过分子内环化作用转化为直夹竹桃啶苷 (strictosamide),同位素示踪法证明该化合物是喜树碱的前体。直夹竹桃啶和喜树碱之间的中间前体分子目前尚不清楚。在短小蛇根草毛状根中分离到的 3(S)-pumiloside、3(S)-deoxypumiloside 都可能是喜树碱的

直接前体^[15]。

2.2 代谢途径的关键酶:直夹竹桃啶是吲哚生物碱包括喜树碱的关键前体,被公认是所有茛菪类吲哚生物碱生物合成的核心前体。Whitmer 等^[16]以长春花为材料的实验表明:直夹竹桃啶的直接前体物裂环马钱子苷的合成是吲哚茛菪类生物碱生产的限制因素。10-羟基香叶醇作为裂环马钱子苷合成的间接前体,必然对裂环马钱子苷的形成有一定的影响。而 10-羟基香叶醇是香叶醇在香叶醇-10-羟化酶(G10H)的催化下合成的,因此,G10H 可能对茛菪类吲哚生物碱的合成有一定的调节作用。Collu 等^[17]从长春花细胞中纯化了 G10H,并根据氨基酸序列信息克隆了相应的 cDNA,其编码的 CYP76B6 蛋白在长春花和酵母细胞中表达时也有 G10H 活性。在长春花细胞培养中,应激激素茉莉酸甲酯能强烈地诱导 G10H 和其他茛菪类吲哚生物碱生物合成基因的协调表达。因此,他们认为 G10H 在裂环马钱子苷的形成过程中起关键性的调控作用。Canto 等^[18]则报道了一个针对纯化了 G10H 多肽的多克隆抗体,它能抑制 G10H 的活性,也能识别长春花和其他产单萜吲哚生物碱的植物中发现的 G10H 多肽,为研究 G10H 的调控建立了一个非常有效的生化工具。尽管目前 G10H 在喜树

中还没有类似的报道,但长春花中该酶作用的研究对喜树碱生物合成途径的相关研究依然有很好的借鉴意义。

在喜树碱的生物合成途径中,色胺和马钱子苷都是喜树碱生物合成途径中的重要前体。Andrea 等^[19]以不产喜树碱的喜树 CG1 细胞系为材料,研究了添加喜树碱的前体对喜树碱生物合成的影响,结果表明:添加色胺和马钱子苷对细胞的生物量和直夹竹桃啶或其他生物碱的形成都没有影响,推测可能是马钱子苷生成裂环马钱子苷的反应被阻断了,但是添加裂环马钱子苷后还是没有检测到喜树碱的合成。他们进一步的研究发现:在叶龄为 11 d 的 CG1 细胞中每毫克直夹竹桃啶合酶的活力仅为 0.1 pkat,在喜树的叶中每毫克直夹竹桃啶合酶的活力也仅为 1.1 pkat,与长春花悬浮培养细胞的每毫克 10~400 pkat 相比是很低的。由此表明,在悬浮培养的 CG1 细胞中,低活力的直夹竹桃啶合酶极有可能是限制喜树碱产量的关键酶,突破这个代谢瓶颈将有望大大提高喜树碱的产量。

2.3 喜树碱生物合成的相关基因:喜树碱生物合成途径中一些相关酶的编码基因已经从喜树中分离得到,包括 tdc1、tdc2、hmg1、hmg2、hmg3、tsb 和 10 hgo(表 1)。

表 1 已克隆的喜树碱生物合成途径相关基因

Table 1 Cloned gene associated with camptothecin biosynthetic pathway

基 因	基因编码的酶	表达产物的分布	影响表达水平的因素
Tsb ^[20]	色氨酸合酶的 β 亚单位 TSB	主要富集于脉管组织	在幼苗萌发过程中高表达
tdc1 ^[21]	色胺酰胺酶 TDC	在顶端、幼茎、树皮高表达	受发育调控,与生物碱积累有关
tdc2 ^[22]		叶盘、悬浮细胞	受伤害诱导真菌诱导子、MeJa 诱导
hmg1 ^[22]	3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶	只在幼苗中检测到	受创伤诱导,可被 MeJa 抑制
hmg2 ^[23]	HMGR	主要在表皮表达	不受创伤和 MeJa 诱导
hmg3 ^[23]		与萌发过程中 HCPT 的积累有关	不受创伤和 MeJa 诱导
sss ^[11] 或 str	直夹竹桃啶合酶或异胡豆苷合酶	目前只检测到幼叶中低水平表达	在臭味假柴龙树中会被水杨酸、NAA 抑制
10hgo ^[24]	香叶醇羟化酶	主要分布在内生初皮部	受发育调控

上述这些酶编码基因的克隆为通过代谢工程技术提高喜树碱合成奠定了基础。过量表达喜树中与喜树碱生物合成相关酶的基因或抑制与喜树碱生物合成竞争底物的酶的基因表达,可以定向调控喜树碱的生物合成,提高喜树碱的合成量。

3 利用生物技术生产喜树碱

3.1 愈伤组织培养:在植物次生代谢产物生产中,利用细胞悬浮培养技术生产次生代谢产物是一种有效的途径,目前已有利用植物细胞培养的方法生产喜树碱的报道。Sakato, Misava, Van Hengel, Wiedenfried 以及张冬艳等^[2]已经对喜树愈伤组织报道作过大量的研究,但是由于喜树碱的量太低而无法用于生产。刘文哲^[25]以含喜树碱最高的幼叶为外植体,进行了愈伤组织的诱导和培养,通过优良细胞系的筛选,使愈伤组织中喜树碱的量提高到 0.02%,达到了原植物的 33.3% 到 50%。Helmut 等^[26]则首次报道了在喜树苗和愈伤组织中含有 10-羟基喜树碱。

3.2 毛状根培养:由于生物碱的生物合成和积累受到细胞发育和环境因子的严格调控^[27],建立适合生物合成和积累的细胞类型是离体生产喜树碱所必需的。利用毛状根培养技术生产植物次生代谢产物是一种非常有效的方法,因为毛状根具有非常强大的次生代谢产物积累能力。毛状根培养是利用发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 将 Ri 质粒的 T-DNA 转

入植物组织中,使得植物体不需要生长激素诱导,就能产生生根,可避免植物体长期培养于生长激素中,导致生物碱合成能力下降。毛状根培养可避免植物来源短缺及环境限制,利用发根农杆菌转化产喜树碱的植物,建立毛状根培养生产喜树碱及其衍生物,是缓解喜树碱原料不足的有效途径。目前,产喜树碱的短小蛇根草和喜树的毛状根培养系统都已经建立。

Devanand 等^[28]以臭味假柴龙树未成熟的合子胚为材料,在添加了不同浓度的生长调节剂的 MS 基本培养基上建立了非转化的根培养,并研究了不同生长调节剂对培养根中的生物碱浓度的影响,结果表明:在 MS 培养基上添加了 NAA (71.36 μmol/L) 和 BA (8.87 μmol/L) 根得到最大数量的伸长和最大浓度的喜树碱(占干重的 0.01%)以及 9-甲氧基喜树碱(占干重的 0.0016%)。Saito 等^[29]报道了由短小蛇根草诱导的毛状根,每克干重毛状根中喜树碱可达到 1 mg。此外,他们还通过向培养基中添加 Diaion HP-20(一种聚苯乙烯树脂,能可逆的吸收喜树碱),可以在积累喜树碱的同时消除因喜树碱积累带来的反馈抑制效应,从而使培养基中喜树碱的总量有很大的提高。这对植物细胞悬浮培养、毛状根培养以及内生真菌培养过程中目的产物量的提高有很好的借鉴价值。

最近,Sudo 等^[30]利用短小蛇根草的毛状根培养来生产喜树碱的试验取得了重大的进展。他们利用改进了的生物反应

器建立了短小蛇根草的毛状根的大规模培养系统,发酵 8 星期后喜树碱的总产量为 22 mg,其中有大约 17% (3.6 mg)分泌到了培养基中;并且这种短小蛇根草毛状根能在一个较长的时期内(大概 5 年)保持较高的生长速率和较高的喜树碱产率,在 3 L 的生物反应器中依然能维持较高的产率。

Lorence 等^[31]通过 ATCC15834 和 R-1000 分别转化喜树的子叶、下胚轴和真叶都得到了喜树的毛状根。其中,用 ATCC15834 转化下胚轴得到的毛状根形态粗壮且分支较少,能向培养基中分泌与植株的根相同甚至更高水平的喜树碱和 10-羟基喜树碱(每克干重能生成 1.0 mg 喜树碱和 0.15 mg 羟基喜树碱),是一种非常有应用前景的毛状根培养系统。

4 展望

进入 21 世纪以来,癌症已经成了人类健康的一大隐患,严重威胁着人类的健康。传统的抗癌药物紫杉醇、长春碱等,由于价格昂贵、产量低,难以满足医药卫生事业的需求,寻找新型抗癌药物势在必行。喜树碱及其衍生物具有高效的抗癌作用,并且来源相对紫杉醇和长春碱更广,产量也大大超过前两者,是一类非常有开发前景的抗肿瘤药物。随着喜树碱生物合成途径研究的不断深入,利用现代生物技术尤其是代谢工程技术定向调控喜树碱生物合成途径,提高喜树碱产量,具有十分广泛的应用前景,目前国外一些研究机构已经在这方面提前起步并取得了一定成果。我国是喜树的原产地,拥有丰富的喜树资源,应该在这方面加大资金投入和研究力度,才能在未来喜树碱市场的世界竞争中取得优势。

References:

[1] Lorence A, Nessler C L. Camptothecin, over four decades of surprising findings [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2735-2749.

[2] Han R. *Anticancer Drug Research and Experimental Technology* (抗癌药研究与实验技术) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Chinese Union Medical University Unite Press, 1997.

[3] Zhang X Q, Tang J G, Yi Y, et al. *Camptotheca acuminata* resources and persistence exploitation countermeasure of China [J]. *J Guizhou Norm Univ; Nat Sci* (贵州师范大学学报:自然科学版), 2004, 2: 36-39.

[4] Li B, Ma J, Fu L. Synthesis of 10-hydroxycamptothecin. [J]. *J Beijing Univ Chem Technol* (北京化工大学学报), 2004, 31(1): 71-74.

[5] Chen Y, Cao F L, Li S X, et al. Adventitious bud induction and plantlet regeneration of *Camptotheca acuminata* [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2004, 40: 579-583.

[6] Yamazaki Y, Urano A, Sudo H, et al. Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 461-470.

[7] Zu Y G, Tang Z H, Yu J H, et al. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin accumulate differentially under specific developmental control in *Camptotheca acuminata* [J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(4): 494-499.

[8] Lo'pez-Meyer M, Nessler C L, McKnight T D. Sites of accumulation of the antitumor alkaloid camptothecin in *Camptotheca acuminata* [J]. *Planta Med*, 1994, 60: 558-560.

[9] Zhang D Y, Zhao X Q, Yu F, et al. Callus induction of *Camptotheca acuminata* and camptothecin production [J]. *J Northeast Norm Univ; Nat Sci* (东北师大学报:自然科学版), 2002, 34, (1): 45-48.

[10] Liu W Z. Secretory structures and their relationship to accumulation of camptothecin in *Camptotheca acuminata* (Nys-saceae) [J]. *Acta Bot Sin*, 2004, 46(10): 1242-1248.

[11] Rohmer M. A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate [J]. *Compreh Nat Prod Chem*, 1999, 2: 45-67.

[12] Yamazaki Y, Kitajima M, Arita M, et al. Biosynthesis of camptothecin in silico and *in vivo* tracer study from [¹⁻¹³C]-glucose. [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 161-170.

[13] Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A, et al. A deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 78-84.

[14] Sheriha G M, Rapoport H. Biosynthesis of *Camptotheca acuminata* alkaloids [J]. *Phytochemistry*, 1976, 15: 505-508.

[15] Kitajima M, Yoshida S, Yamagata K, et al. Camptothecin-related alkaloids from hairy roots of *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Tetrahedron*, 2002, 58: 9169-9178.

[16] Whitmer S, Canel C, Hallard D, et al. Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Cantharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116: 853-857.

[17] Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman A, et al. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. [J]. *FEBS Lett*, 2001, 508(2): 215-220.

[18] Canto-Canche B B, Meijer A H, Collu G, et al. Characterization of a polyclonal antiserum against the monoterpene monooxygenase, geraniol 10-hydroxylase from *Cantharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 162(4): 393-402.

[19] Silvestrini A, Pasqua G, Botta B, et al. Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 749-753.

[20] Lua H, McKnight T D. Tissue-specific expression of the β -subunit of tryptophan synthase in *Camptotheca acuminata*, an indole alkaloid-producing plant [J]. *Plant Physiol*, 1999, 20: 43-51.

[21] Lo'pez Meyer M, Nessler C L. Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed during development and stress [J]. *Plant J*, 1997, 11: 167-175.

[22] Burnett R J, Maldonado-Mendoza I E, McKnight J D, et al. Expression of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Camptotheca acuminata* is differentially regulated by wounding and methyl jasmonate [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103: 1-48.

[23] Maldonado-Mendoza I E, Vincent R M, Nessler C L. Molecular characterization of three differentially expressed members of the *Camptotheca acuminata* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) gene family [J]. *Plant Molec Biol*, 1997, 34: 781-790.

[24] Buriat V, Oudin A, Courtois M, et al. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Cantharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid derived primary metabolites. [J]. *Plant J*, 2004, 38: 131-141.

[25] Liu W Z, Zhang A X, Reinscheid U M. Effect of camptothecin on growth of fungal endophytes from *Camptotheca acuminata* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sic* (西北植物学报), 2003, 23(7): 1275-1278.

[26] Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, et al. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1997, 49: 213-218.

[27] De Luca, Pierre S. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 168-173.

[28] Fulzele D P, Ramesh K S. Untransformed root cultures of *Nothapodytes foetida* and production of camptothecin. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2002, 69: 285-288.

[29] Saito K, Sudo H, Yamazaki M, et al. Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 267-271.

[30] Sudo H, Yamakawa T, Yamazaki M, et al. Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 359-363.

[31] Lorence A, Medina-Bolivar F, Nessler C L. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 22: 437-441.