

色氨酸及其衍生物对海南粗榧悬浮细胞合成三尖杉酯类碱的影响

蒋旋娴, 李永成*, 邵 丹, 潘亚华

海南大学食品学院, 海南 海口 570228

摘要: 目的 研究 *L*-色氨酸及其衍生物 5-甲基-*DL*-色氨酸 (5-MT) 对海南粗榧悬浮细胞生长及三尖杉酯类碱合成的影响。方法 在细胞培养第 15 天, 向海南粗榧悬浮培养物中添加一定量的 *L*-色氨酸或 5-MT, 测定细胞生长、产物量以及代谢途径中关键酶的活力。结果 *L*-色氨酸与 5-MT 都能促进三尖杉酯类碱的合成。添加 5 mg/L 5-MT 时, 产物量最高 (2.944 mg/L); 添加 10 mg/L *L*-色氨酸和 5 mg/L 5-MT 后, 三尖杉酯类碱产量分别是对照 (1.343 mg/L) 的 1.947、2.192 倍; 而悬浮细胞生物量分别比对照 (2.406 g/L) 降低了 9.35%、18.04%。同时, 3-脱氧-*D*-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶活性分别比对照 (0.67 U/mg) 降低了 12.4%、5.57%; 苯丙氨酸解氨酶活性分别比对照 (78.21 U/mg) 增加了 37.72%、28.02%; 酚类物质积累比对照 (0.36 mg/mL) 增加了 19.14%、9.61%。结论 *L*-色氨酸及其衍生物 5-MT 能抑制代谢支路, 促进代谢流向产物三尖杉酯类碱的方向。

关键词: 海南粗榧; 悬浮培养; *L*-色氨酸; 5-甲基-*DL*-色氨酸; 三尖杉酯类碱

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)20-3696-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.20.023

Effect of *L*-tryptophan and its derivatives on cephalotaxine production in *Cephalotaxu mannii* suspension cells

JIANG Xuan-xian, LI Yong-cheng, SHAO Dan, PAN Ya-hua

College of Food Science of Technology, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: Objective To investigate the effects of *L*-tryptophan and its derivative 5-methyl-*DL*-tryptophan (5-MT) on suspension cells growth and cephalotaxine production of *Cephalotaxu mannii*. **Methods** The cell suspension cultures were treated with *L*-tryptophan and 5-MT on day 15, respectively. Then the cell growth, cephalotaxine production, and activity of key enzymes in the metabolism pathway were determined. **Results** *L*-tryptophan and 5-MT could enhance cephalotaxine production. The cultures treated with 5 mg/L *L*-tryptophan showed the highest cephalotaxine yield (2.944 mg/L). While treated with 10 mg/L *L*-tryptophan and 5 mg/L 5-MT, the cephalotaxine yields were 1.947 and 2.192 times of the control culture (1.343 mg/L); The biomass of suspension cultures were decreased by 9.35% and 18.04%, respectively, less than those in the control group (2.406 g/L); The activity of 3-deoxy-*D*-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase was decreased by 12.4% and 5.57% compared with the control (0.67 U/mg); The activity of phenylalanine ammonium-lyase activity increased by 37.72% and 28.02% and the total phenolics content increased by 19.14% and 9.61% compared with the control (78.21 U/mg and 0.36 mg/mL). **Conclusion** *L*-tryptophan and its derivative 5-MT can inhibit the *L*-tryptophan biosynthetic pathway and promote the accumulation of cephalotaxus alkaloids.

Key words: *Cephalotaxu mannii* Hk. f.; suspension culture; *L*-tryptophan; 5-methyl-*DL*-tryptophan; cephalotaxus

海南粗榧 *Cephalotaxu mannii* Hk. f. 是三尖杉科三尖杉属的高大乔木, 是海南的特有植物, 也是三尖杉科植物中分布最南的一种^[1]。分布在我国境内的三尖杉科三尖杉属植物中, 海南粗榧中含有的抗癌活性生物碱三尖杉酯类碱三尖杉酯碱与高三尖酯碱量最高^[2]。由于其有较强的抗癌作用, 海南粗榧又

被称为“抗癌奇木”, 是生产抗癌药物三尖杉酯类生物碱的主要原料^[3]。三尖杉科植物资源有限, 其中有抗癌活性的酯类生物碱的量又极低, 远不能满足临床需要。面对日益增长的临床需求, 寻找资源保护与开发协调发展的道路具有重大现实意义^[4]。

植物细胞悬浮培养技术有不受地理环境、土壤

收稿日期: 2016-02-19

作者简介: 蒋旋娴, 女, 硕士研究生, 研究方向为植物细胞工程。Tel: 18789232036 E-mail: 2408418989@qq.com

*通信作者 李永成, 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为发酵工程和植物细胞工程。E-mail: lyc2360@sina.com

条件、季节变化等因素限制的优势,能确保产物均匀、连续的生产,并且提取方法简单^[5-6],是解决我国中药资源问题较有潜力的生产方法。其中促进植物悬浮细胞高效表达次生代谢物的策略主要有:高通量细胞系的选育、培养条件的优化、培养技术的选择、前体物的添加、诱导子和抑制剂的使用、合成代谢过程的优化、强化胞内产物释放、基因工程技术的应用等^[7-8]。

芳香族氨基酸酪氨酸和苯丙氨酸是三尖杉酯类碱合成的前体物。代谢途径如图 1 所示,植物细胞中磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)(糖酵解途径产物)和赤藓糖-4-磷酸(E4P)(磷酸戊糖途径产物)在 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶(3-deoxy-D-arabino-heptulos-onate-7-phosphate synthase, DS)的作用下缩合生成 DAHP,然后生成莽草酸,莽草酸转化为分支酸,分支酸分别转化为色氨酸和预苯酸,通过预苯酸生成前体物苯丙氨酸、酪氨酸,经历一个 1-苯乙基四氢异喹啉生物碱过程,最终生成三尖杉酯类生物碱^[9-10]。从以上合成途径可知,色氨酸是三尖杉酯类碱合成的代谢支路,它的形成会减少三尖杉酯类碱的前体物形成。*L*-色氨酸和 5-甲基-DL-色氨酸(5-MT)是色氨酸代谢支路抑制剂。余龙江等^[11]利用 5-MT 可以抑制由色氨酸产生的相关次生代谢物合成的作用,在红豆杉悬浮细胞培养基中外源添加 5-MT 等代谢抑制剂,其中添加 50 mg/L 5-MT 对细胞生长和对紫杉醇合成有较好的促进作用,能使产物紫杉醇产量提高近 10 倍。

本实验中采用添加代谢支路抑制剂的方法来切断代谢支路,提高目的产物代谢流。本实验将从代谢途径方面来探讨代谢支路抑制剂色氨酸及其衍生物 5-MT 对海南粗榧悬浮培养细胞生长及产物三尖杉酯类碱生物合成的影响。为提高海南粗榧表达具有抗癌作用次生代谢物提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

海南粗榧 *Cephalotaxus mannii* Hk. f. 外植体采自海南省儋州市热带植物园,经海南大学食品学院钟秋平教授鉴定。愈伤组织从其嫩叶中诱导获得^[12]。

1.2 仪器

JB-CJ-1FC 超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司);LRH-250S 生化培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司);SYQ-DSX-180B 手提式高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);TGL16G 台式

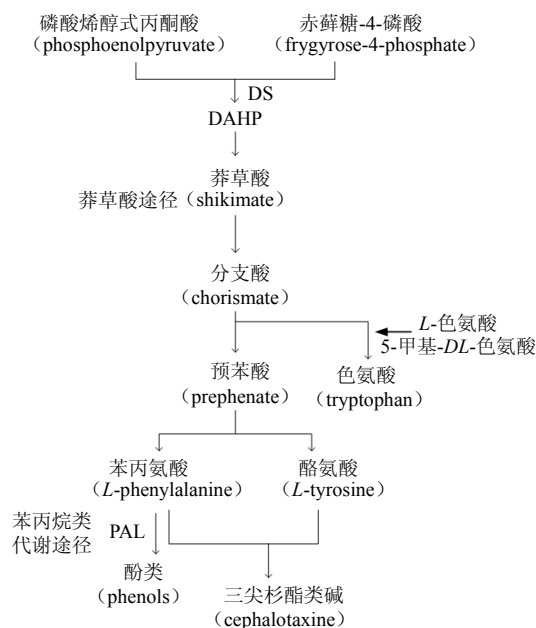


图 1 三尖杉酯类碱生物合成途径

Fig. 1 Schematic illustration of biosynthetic pathway of cephalotaxus ester alkaloids

高速离心机(上海安亭科学仪器厂);T6 新世纪紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);101-1-BS 电热鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);RE52-99 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.3 试剂

三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱对照品(中国食品药品鉴定研究院);*L*-色氨酸(国药集团化学试剂有限公司);5-甲基-DL-色氨酸(东京化成工业株式会社);MS 培养基,青岛日水生物技术有限公司;萘乙酸(NAA)、激动素(KT)、维生素 B1、酶水解酪蛋白,磷酸烯醇式丙酮酸(PEP),赤藓糖-4-磷酸(E4P),美国 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 植物细胞培养

基础培养基为 MS 培养基。在其中添加 4 mg/L 萘乙酸,0.15 mg/L KT,0.5 g/L PVP,1 g/L 酶水解酪蛋白,以及 35 g/L 蔗糖,固体培养基中另外添加 3 g/L 植物凝胶。用 1 mol/L NaOH 调节培养基 pH 至 5.8~6.0^[12]。

愈伤组织培养条件为 26 °C 黑暗培养,每 1 个月传代 1 次。种子液的制备是取 500 mL 三角瓶装 100 mL 液体培养基,接种 8 g 愈伤组织,黑暗培养,转速 100 r/min,温度(27±1)°C。种子液在使用前传代 3 次,每 12 d 传 1 代。接种时,用 250 mL

三角瓶装 80 mL 液体, 接种上述培养 3 代的植物悬浮培养细胞约 6 g。

2.2 代谢抑制剂的制备与添加

在海南粗榧悬浮细胞培养第 15 天, 分别添加 *L*-色氨酸至终质量浓度为 5、10、50、100 mg/L 或 5-MT 至终质量浓度为 1、5、10、50 mg/L, 每个质量浓度设 3 个平行。*L*-色氨酸及 5-MT 溶解于 0.1% NaOH 溶液中, 使用前高温灭菌。

2.3 培养液糖质量浓度测定

用苯酚-硫酸法测定悬浮培养培养基中残糖量, 即离心获得 1 mL 培养基上清液样品加 1 mL 5% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸, 混匀后在室温下反应 30 min, 以葡萄糖标准液做标准曲线, 在 480 nm 下测定其吸光度 (*A*)^[13], 计算其量。

2.4 细胞活力的测定

采用氯化三苯四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC) 还原法测定。离心去上清液获得约 200 mg 新鲜植物细胞, 加入 3 mL TTC 溶液 (取 0.6 g TTC 溶于 100 mL pH 7.5 的 0.5 mmol/L 磷酸缓冲液中), 25 °C 下反应 24 h, 吸去 TTC, 用蒸馏水清洗 2~3 次, 收集细胞; 加入 3 mL 95% 无水乙醇于 60 °C 恒温水浴 10 min, 以抽提酶反应生成的红色甲臍, 离心取上清液, 冷却, 于 492 nm 处测定其 *A* 值。细胞活力单位以每克湿细胞在 492 nm 处的 *A* 值表示^[14]。

2.5 DS 酶活测定

离心获取新鲜湿细胞约 300 mg, 加入 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 和少量石英砂, 冰浴研磨后, 4 °C, 10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液为酶粗提液。0.5 mL Tris-HCl (pH 7.5) 中加入 5 mmol/L E4P 50 μ L, 10 mmol/L PEP 25 μ L, 混匀后加入酶粗提液 100 μ L, 37 °C 反应 10 min, 加入 0.2 mL 10% 三氯乙酸 (TCA) 终止反应, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入 25 mmol/L 高碘酸 (用 125 mmol/L 硫酸配制) 0.25 mL, 室温下放置 45 min, 加入 0.5 mL 2% 亚硫酸钠混匀, 再加入 2 mL 0.3% 硫代巴比妥酸, 100 °C 煮沸 5 min, 离心, 于 549 nm 测 *A* 值。测定反应体系中 1 min 内 *A* 值的变化^[15]。

2.6 苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 的测定

离心获取新鲜湿细胞约 300 mg, 加入 3 mL 酶提取液 (含 5 mmol/L 巯基乙醇, 1% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.1 mol/L、pH 8.0 的硼酸缓冲液), 0.5 g PVP

和少量石英砂, 在冰上用研钵研磨, 然后 10 000 r/min 离心 20 min。上清液为酶粗提液。1 mL 酶液加 1 mL 0.02 mol/L 的苯丙氨酸, 2 mL 双蒸馏水, 总体积 4 mL。对照用 1 mL 蒸馏水代替酶液。反应前在 290 nm 处测定反应液的 *A* 值, 反应液在 30 °C 恒温水浴中保温 0.5 h 后再测定反应液的 *A* 值, 以反应前后每小时 *A* 值变化 0.01 所需的酶量定义为一个单位 (U)。细胞酶的活性以每克湿细胞的酶单位 (U/g) 表示^[16]。

2.7 总酚测定

取 2 mL 海南粗榧细胞培养基滤液, 加入 10 mL 醋酸乙酯, 超声振荡后静止萃取 2 h, 取 5 mL 醋酸乙酯组分自然风干后, 残留物溶于 3 mL 75% 的乙醇中, 在 280 nm 下测量其 *A* 值, 以 3 mL 75% 的乙醇为对照, 以水杨酸为标准, 以 1 μ g 水杨酸在 280 nm 处的 *A* 值代表一个单位的酚积累^[17]。

2.8 三尖杉酯类碱的提取与测定

2.8.1 胞内产物提取 抽滤收集湿细胞, 60 °C 下干燥, 加石英砂在研钵中研磨, 20 mL 甲醇浸泡 24 h, 在真空条件下浓缩至干, 最后用 1 mL 甲醇复溶, 并用 0.22 μ m 滤膜滤过待测。

2.8.2 胞外产物提取 加氨水调节培养液 pH 至 8.0 左右, 用三氯甲烷萃取 3 次, 在真空条件下浓缩至干, 最后用 1 mL 甲醇复溶, 并用 0.22 μ m 滤膜滤过待测。

2.8.3 样品测定 采用 HPLC, 色谱条件为 XDB C₁₈ 色谱柱 (150 nm $\times$ 4.6 nm, 5 μ m) 色谱柱, 进样量 10 μ L, 体积流量 0.8 mL/min, 流动相为 0.02 mol/L 乙酸铵-甲醇 (55:45), 柱温 25 °C, 检测波长为 280 nm^[18]。

2.8.4 对照品的制备 精密称取三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱对照品溶解于甲醇, 制成质量浓度为 40 mg/L 的对照品溶液。

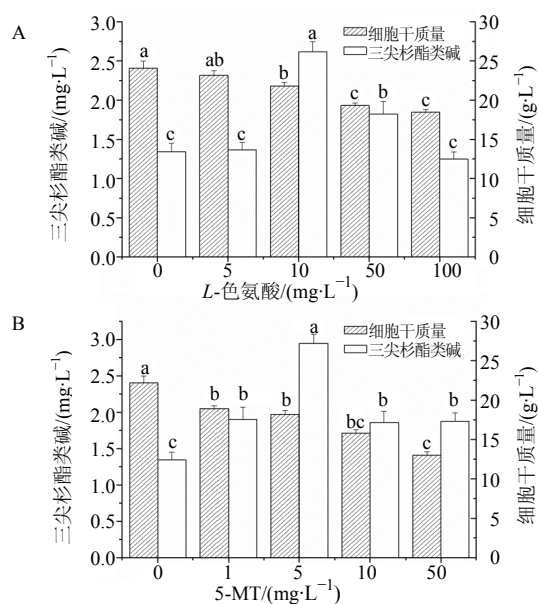
2.9 统计分析

本实验中, 每个处理重复 3 次, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。差异显著性分析用 Duncan 法进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

3 结果与分析

3.1 代谢抑制剂对细胞生长和产物合成的影响

由图 2 可以看出, 添加 *L*-色氨酸或 5-MT 后, 细胞生长均受到一定程度的抑制。添加 5、10、50、100 mg/L *L*-色氨酸后, 细胞生物量比对照 (2.406 g/L) 分别降低了 33.74%、9.35%、19.70%、23.19%; 添加 1、5、10、50 mg/L 5-MT 后, 细胞生物量分别降低了



不同字母表示差异显著 $P < 0.05$, 下同

Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$, same as below

图 2 不同质量浓度 L -色氨酸 (A) 或 5-MT (B) 对海南粗榧悬浮细胞生长和三尖杉酯类合成的影响

Fig. 2 Effects of L -tryptophan (A) or 5-MT (B) at different concentration on cell growth and cephalotaxine production of *C. mannii*

4.03%、18.04%、28.89%、41.48%。说明二者均对海南粗榧悬浮细胞的细胞生长有抑制作用, 且抑制作用随抑制剂浓度增高增强。同时, 由图 2 可以看出, 在添加 10 mg/L L -色氨酸, 5 mg/L 5-MT 时产物三尖杉酯类碱量(三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱之和)分别达到最高, 分别为 2.615、2.944 mg/L, 是对照 (1.343 mg/L) 的 1.947、2.192 倍。表明抑制剂 L -色氨酸及其衍生物 5-MT 对产物三尖杉酯类碱的积累有一定的促进作用, 并且 5-MT 的促进作用略强于 L -色氨酸。

3.2 代谢抑制剂对细胞活力与培养基糖耗的影响

为考察抑制剂 L -色氨酸及其衍生物 5-MT 对细胞初生代谢的抑制情况, 考察它们对细胞活力与糖代谢的影响。结果如图 3 所示。在添加抑制剂后, 海南粗榧悬浮细胞的细胞活力均受到一定的抑制作用, 处理的前 3 d 抑制作用较小 ($P > 0.05$), 随培养时间的增加, 细胞活力逐渐降低。

另外, 添加抑制剂后对耗糖影响如图 4 所示, 糖耗速率与对照相比先慢后快。经抑制剂处理后, 前 6 d 糖耗速率低于对照。添加 10 mg/L L -色氨酸

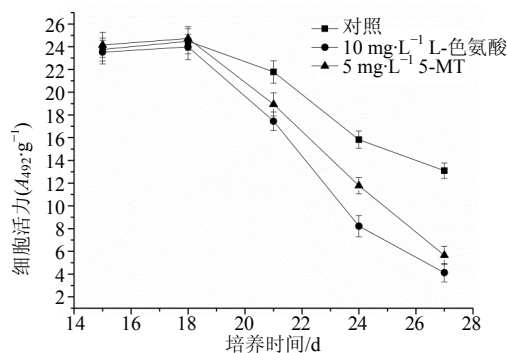


图 3 L -色氨酸或 5-MT 对海南粗榧细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of L -tryptophan or 5-MT on cell viability of *C. mannii*

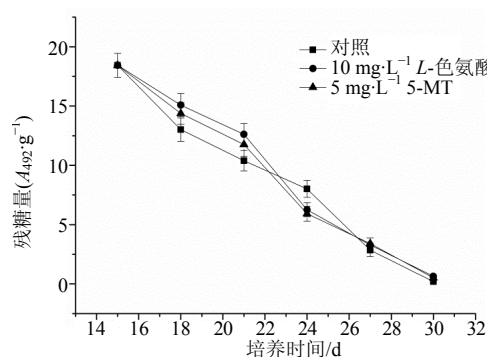


图 4 L -色氨酸或 5-MT 对海南粗榧悬浮培养液糖耗的影响

Fig. 4 Depletion curves of sugar in culture medium treated with L -tryptophan or 5-MT in suspension cultures of *C. mannii*

或 5 mg/L 5-MT 后, 第 6 天培养基中残糖量分别为 12.6、11.8 mg/mL, 比对照 (10.4 mg/mL) 升高了 21.35%、13.04%。随后, 耗糖速率与对照相比明显加快。但是细胞活性降低, 这说明植物细胞中营养物质可能是从初生代谢转向次级代谢, 有利于产物积累。

3.3 代谢合成途径关键酶 DS 酶的活性变化

莽草酸途径是三尖杉酯类碱合成的必经途径, 包含 7 步酶催化反应, 最终生成分支酸。在分支酸后分为 2 条途径, 一条生成酪氨酸和苯丙氨酸, 另一条生成色氨酸。DS 是莽草酸途径的第一个酶, 通过催化 PEP 和赤藓糖-4-磷酸(erythrose-4-phosphate, E4P) 之间的醛缩反应生成 DAHP, 是莽草酸途径中重要的限速酶; 同时也是该途径的关键酶, 受苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸反馈调节作用。

在添加抑制剂 48 h 后, 分别测定 DS 酶活力, 结果如图 5 所示, 与对照组 (0.67 U/mg) 相比均有所下降, 但添加 5 mg/L 5-MT 比添加 10 mg/L L -色氨酸对 DS 酶活力影响较小, 说明对代谢途径中莽草酸途径的抑制作用小。

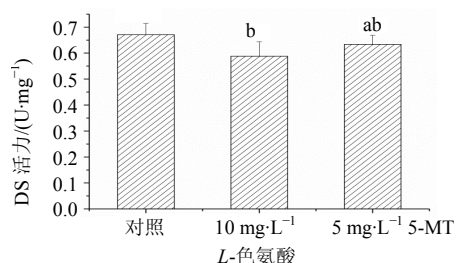


图 5 *L*-色氨酸或 5-MT 对海南粗榧悬浮细胞 DS 酶活力的影响
Fig. 5 Effects of *L*-tryptophan or 5-MT on DS enzyme activity of *C. mannii*

3.4 对 PAL 酶活力及酚类物质积累的影响

苯丙烷类代谢途径是植物细胞内经过苯丙氨酸的一条重要代谢途径，它参与合成一系列植物防卫反应相关化合物酚类、苯甲酸、植物信号分子等。在海南粗榧悬浮细胞产三尖杉酯类碱代谢途径中，苯丙烷类代谢途径还属于一条代谢支路，此代谢支路上的碳通量减少有利于产物积累。

PAL 是苯丙烷类代谢途径关键酶，在添加抑制剂 10 mg/L *L*-色氨酸及 5 mg/L 5-MT 48 h 后，PAL 酶活性增加，如图 6-A 所示，与对照组 (78.21 U/g) 相比分别增加了 37.72%、28.02%。酚类物质是苯丙烷类代谢途径的主要产物，其合成受到 PAL 酶的影响，酚类积累过多会抑制细胞生长，在添加外物时，悬浮细胞中总酚呈现一个快速的积累过程。同样测定 48 h 后总酚量，如图 6-B 所示，与对照 (0.359 mg/mL) 相比分别增加了 19.14%、9.61%。

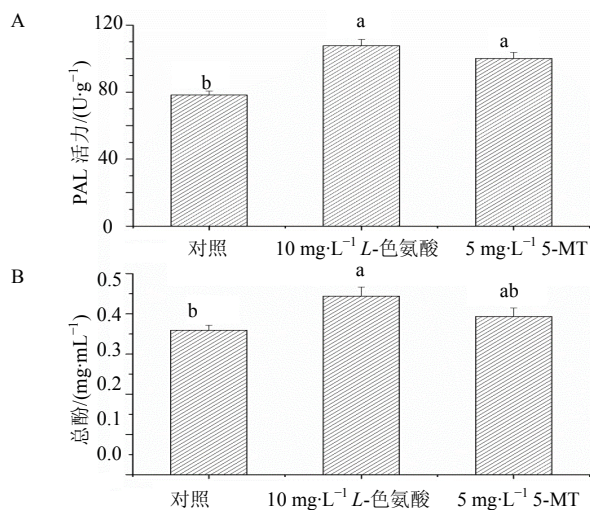


图 6 *L*-色氨酸或 5-MT 对海南粗榧悬浮细胞 PAL 酶活 (A) 与细胞培养液中总酚积累 (B) 的影响

Fig. 6 Effects of *L*-tryptophan or 5-MT on PAL enzyme activity (A) and phenolics accumulation (B) in *C. mannii* cell cultures

4 讨论

在本实验中，期望通过抑制三尖杉酯类碱代谢途径中代谢支路产生的色氨酸量，使得碳通量更多的流向酪氨酸和苯丙氨酸，即产物合成方向。大部分氨基酸合成代谢都有反馈抑制机制，即终产物抑制合成过程中相对独立的第一酶^[19-20]。根据此原理，添加 *L*-色氨酸或其衍生物 5-MT 来抑制产色氨酸代谢通路，从而促进产物三尖杉酯类碱的积累。

本研究表明，添加代谢抑制剂 10 mg/L *L*-色氨酸或 5 mg/L 5-MT 对海南粗榧产三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱都有显著的促进作用。高浓度的 *L*-色氨酸和 5-MT 对细胞生长的抑制作用较显著 (图 2)，过低生物量不利于产物的合成。在细胞生长趋于稳定期的第 15 天^[21]添加抑制剂对海南粗榧悬浮细胞的生长抑制作用较小。此时细胞生物量浓度较大，次生代谢能力相对较强，可以在一定程度上抵御外界刺激，对细胞的生长与细胞活力抑制作用较小，并且同时能促进植物细胞初生代谢转向次生代谢，有利于产物的合成。

三尖杉酯类碱合成途径如图 1 所示，DS 酶是三尖杉酯类碱合成途径中重要的关键酶，决定其合成产率和产量^[22]。但是由于 DS 酶受到色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸的反馈抑制，添加过量的色氨酸或者积累过多的苯丙氨酸和酪氨酸都会引起“瓶颈效应”^[23]，影响最终产物的合成。本实验研究结果表明，添加 10 mg/L *L*-色氨酸或 5 mg/L 5-MT 后，对 DS 酶均有一定的抑制作用。并且，添加 5 mg/L 5-MT 比添加 10 mg/L *L*-色氨酸对 DS 酶活力影响小 (图 5)。原因是添加浓度较低，低浓度的 5-MT 能在保证抑制色氨酸合成代谢支路的同时，也最大程度地减少对 DS 酶活力的影响。另外，色氨酸还是吲哚乙酸 (IAA) 的前体物，随着色氨酸代谢支路被抑制，IAA 的合成相应受到抑制，会抑制细胞的生长，加快细胞初生代谢转向次生代谢^[11]。

PAL 酶活力增加 (图 6-A)，在一定程度上 PAL 酶在较短时间内，活力得到明显的上升，有利于植物抗性形成与相应次生代谢物的合成^[24]。随后酶活力由植物自身代谢调节而下降。PAL 酶是三尖杉酯类碱合成途径中另外一条代谢支路苯丙烷途径的相关酶，能催化酚类物质的合成。PAL 酶活的变化会影响到酚类物质的积累。酚类物质和三尖杉酯类碱有共同前体物苯丙氨酸，酚类物质的过量积累不仅会抑制细胞生长还会消耗三尖杉酯类碱合成的前体

物。但是,细胞内适量的酚类积累也能刺激次生代谢。综上,添加代谢抑制剂 5 mg/L 5-MT 对海南粗榧产三尖杉酯类碱和高三尖杉酯类碱有最显著的促进作用。

参考文献

- [1] 傅立国. 中国高等植物 (第7卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 中国医学科学院药物研究所编著. 中草药现代研究第二卷 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996.
- [3] 王有生. 救救抗癌奇木——海南粗榧 [J]. 植物杂志, 1990(3): 8-9.
- [4] 王献溥, 王有生. 海南粗榧濒危的原因和保护措施 [J]. 广西植物, 1994, 14(4): 369-372.
- [5] Gibson D M, Ketchum R E B, Vance N C, *et al.* Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 479-482.
- [6] 董娟娥, 张康健, 梁宗锁. 植物次生代谢与调控 [M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2009.
- [7] Strohl W R. Biochemical engineering of nature product biosynthesis pathways [J]. *Metab Eng*, 2001, 3(1): 4.
- [8] Wilson S A, Roberts S C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecular [J]. *Plant Biotechnol*, 2012, 10: 249-268.
- [9] Gitterman A, Parry R J, Dufresne R, *et al.* Biosynthesis of the cephalotaxus alkaloids. Investigations of the biosynthesis of deoxyharringtonine, isoharringtonine, and harringtonine [J]. *Am Chem Soc*, 1980, 102: 2074-2081.
- [10] Parry R J, Chang M N, Schwab J M, *et al.* Biosynthesis of the cephalotaxus alkaloids. Investigations of the early and late stages of cephalotaxine biosynthesis [J]. *Am Chem Soc*, 1980, 102: 1099-1111.
- [11] 余龙江, 张长河. 抑制剂促进紫杉醇生物合成的初步研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1998, 11(3): 6-11.
- [12] 王成韬. 海南粗榧愈伤组织增殖及抗褐变研究 [D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [13] DuBois M, Gilles K, Hamilton J, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.
- [14] Iborra J L, Guardiola J, Montaner S, *et al.* 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for immobilized plant cells [J]. *Biotechnol Tech*, 1992, 6: 319-322.
- [15] Russell J, McCandless D, Michael D, *et al.* 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase: purification and molecular characterization of the phenylalanine-sensitive isoenzyme from *E. coli* [J]. *J Biol Chem*, 1978, 253: 4259-4265.
- [16] Yuan Y J, Li C, Hu Z D, *et al.* A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysporum* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 30: 774-778.
- [17] Anderson A J, Roger K, Teeper C S. Timing of molecular events following elicitor treatment of plant cells [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1991, 38(1): 1-13.
- [18] Li Y C. Enhanced cephalotaxine production in *Cephalotaxus mannii* suspension cultures by combining glycometabolic regulation [J]. *Process Biochem*, 2014, 2014: 2279-2284.
- [19] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学 (下册) [M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [20] 盛祖嘉. 微生物遗传学 [M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [21] 陈林, 李永成. 海南粗榧细胞悬浮培养体系的建立 [J]. 广东农业科学, 2014, 24: 54-59.
- [22] 李永辉. 芳香族氨基酸生物合成代谢途径调控研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2003.
- [23] 于金龙. 大肠杆菌芳香族氨基酸生物合成途径的代谢调控研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.
- [24] 李永成. 东北红豆杉悬浮细胞与内生真菌在紫杉醇合成中相互关系的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2009.