

环烯醚萜苷类生物合成途径及相关酶的研究进展

杨 然¹, 方 磊^{1,2}, 李 佳¹, 张永清^{1*}

1. 山东中医药大学 天然药物化学教研室, 山东 济南 250200

2. 济南大学 药物化学教研室, 山东 济南 250000

摘 要: 环烯醚萜苷类化合物种类繁多, 近年来对此类化合物的广泛研究发现其具有多种生物活性, 如抗炎、抗肿瘤、保肝、心血管系统保护作用等。结合近年来国内外的研究, 将其生物合成途径、相关酶(GPPS、GES、G10H、10-HGO、IS、7-DLS、7-DLGT、7-DLH、LAMT 及 SLS) 及编码基因的研究进展进行综述, 一方面可达到人为调节其代谢产物生成的目的, 另一方面可为基于环烯醚萜苷类的新药发现提供参考。

关键词: 环烯醚萜苷类; 香叶醇; 生物合成途径; 相关酶; 编码基因

中图分类号: R282.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)10-2482-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.034

Research progress on biosynthetic pathways and related enzymes of iridoid glycosides

YANG Ran¹, FANG Lei^{1,2}, LI Jia¹, ZHANG Yong-qing¹

1. Key Laboratory of Natural Pharmaceutical Chemistry, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250200, China

2. Key Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, University of Jinan, Jinan 250000, China

Abstract: Iridoids glycosides are a class of compounds which have pharmacological functions of anti-inflammatory, antitumor, hepato-protection, cardio-protection, etc. This review summarizes the biosynthetic pathway, related enzymes (GPPS, GES, G10, G10H, 10-HGO, IS, 7-DLS, 7-DLGT, 7-DLH, LAMT, and SLS) and the application of functional genes in iridoids glycosides, in hopes of regulating the production of metabolites and providing the valuable reference for discovering new drugs.

Key words: iridoid glycosides; geraniol; biosynthetic pathway; related enzymes; functional genes

在种类繁多的植物家族中, 环烯醚萜苷类成分(iridoid/secoiridoid glycosides, IGs)广泛分布于爵床科(Acanthaceae)、夹竹桃科(Apocynaceae)、紫葳科(Bignoniaceae)、忍冬科(Caprifoliaceae)、龙胆科(Gentianaceae)、唇形科(Labiatae)、马钱科(Loganiaceae)、茜草科(Rubiaceae)、玄参科(Scrophulariaceae)等植物中^[1]。几乎所有的该类化合物都具有相似的骨架, 它们是 8~10 碳环戊烷单萜衍生物, 在 C-1 连接的单糖通常是 β -D-葡萄糖, 同时由于骨架上连接不同的功能基团导致其结构具有多样性^[2]。此外, 由于 IGs 可提供 C-10、C-9 或 C-8 片段, 其还可作为前体参与如夹竹桃科、马钱

科、茜草科等植物中单萜类吲哚生物碱(monoterpenoid indolopyridine alkaloid, MIA)和喹啉生物碱的生物合成^[3]。

IGs 具有广泛的药理活性, 包括抗癌、抗炎、抗真菌和保肝等, 其在药学上的价值不可忽视^[4-7]。此外, 部分 IGs 在代谢过程中会产生毒性化合物, 昆虫测试^[8-9]表明, 在较低的浓度下, 其可有效地防治虫害^[10]。因此, 为了更好地发挥 IGs 的价值, 有必要对其生物合成途径, 尤其一些关键酶进行研究, 从而实现对 IGs 的大规模人工合成或者衍生出新化合物, 以满足药学和农业生产的需求^[11]。

收稿日期: 2017-11-21

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-Y-SD-32); 山东省重点研发计划项目(2016GSF202009); 山东省重点研发计划项目(2016GSF202008); 山东省重点研发计划项目(2016GSF202001)

作者简介: 杨 然, 女, 在读博士研究生, 研究方向为天然药物化学。Tel: 13163078928 E-mail: cpu1045405@126.com

*通信作者: 张永清, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药资源质量控制及天然药物化学。E-mail: zyzq622003@126.com

1 IGs 的生物合成途径

追溯至 20 世纪,科学家便对 IGs 的合成途径展开了研究,但是内容尚不完整。近些年,随着基因测序技术更加普及、快速,科学家们已经收集了大量物种的基因序列,这将有助于更好地研究参与 IGs 生物合成的关键酶^[12]。

多数研究报道均表明,高等植物中用于不同萜类化合物(主要是单萜、双萜、四萜)合成的前体物异戊烯基二磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲烯丙基二磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)大多是经甲基赤藓醇 4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径形成的^[13-18],后有研究学者通过免疫细胞标记等方法进一步证明了该观点^[19]。

结合其他相关文献,IGs 的合成途径基本可以概括如下:MEP 途径提供了反应前体 IPP 和 DMAPP,这 2 个化合物在香叶基焦磷酸合酶(geranyl pyrophosphate synthase, GPPS)的催化下生成香叶基二磷酸酯(geranyl diphosphate),然后在香叶醇合酶(geraniol synthase, GES)的作用下生成香叶醇(geraniol)。接下来,在植物韧皮部表皮细胞(IPAP)内,由多种功能酶如香叶醇 10-羟基化酶(10-geraniol hydroxylase, G10H, 图 1-A)、香叶醇 10-羟基氧化还原酶(10-hydroxygeraniol oxidoreductase, 10-HGO, 图 1-B)、环烯醚萜合酶(iridoid synthase, IS, 图 1-C)、7-去氧番木鳖酸合成酶(7-deoxyloganetic acid synthase, 7-DLS, 图 1-D)、7-去氧番木鳖酸葡萄糖转移酶(7-deoxyloganetic acid glucosyltransferase, 7-DLGT, 图 1-E)及 7-去氧番木鳖酸羟化酶(7-deoxyloganic acid hydroxylase, 7-DLH, 图 1-F)参与了氧化、还原、糖基化及甲基化等反应,形成马钱子酸(loganic acid)^[11,18],随之马钱子酸在某种尚未阐明的机制下被运送到叶面表皮细胞^[17],在番木鳖酸 O-甲基转移酶(loganic acid methyltransferase, LAMT, 图 1-G)和裂环马钱子苷合成酶(secologanin synthase, SLS, 图 1-H)的作用下生成断马钱子苷(secologanin)。单萜化合物断马钱子具有 IGs 的骨架结构,还可在异胡豆苷合成酶(strictosidine synthase, STR, 图 1-I)的催化下与 typtamin 生成 MIA 的前体化合物胡豆苷(strictosidine)。合成中,有一部分植物会终止在生成 IGs 这一步,而不再向生物碱转化,或生成少量生物碱^[20,23-24]。IPAP 细胞和异细胞被认为是

多种活性物质的存储部位^[25],图 1 中方框内的反应发生在植物表皮细胞中,其他反应发生在 IPAP 细胞中;虚线箭头部分有关萜类吲哚生物碱 vinblastine 和 vincristine 的合成^[26]本文不再阐述。

2 IGs 生物合成途径中相关酶的研究

2.1 GPPS 和 GES

在 IPP 和 DAMPP 形成 GPP 的过程中,GPPS 是催化反应的关键酶。Rai 等^[27]对长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中 CrGPPS 的编码基因进行研究,发现其种类极其繁杂,因此,至今尚未有文献对其进行清晰的阐述。2013 年,Simkin 等^[28]首次从长春花鉴定了催化香叶二磷酸(geranyl diphosphate)生成香叶醇的酶 CrGES。

2.2 G10H 和 10-HGO

Collu 等^[29]在长春花中将 G10H 鉴定为 CYP76B6,同时 Höfer 等^[30]在对 CYP76s 家族的研究中发现鼠耳芥 *Arabidopsis thaliana* L. 及烟草 *Nicotiana benthamiana* Karel Domin 叶片中的 CYP76C4 也可催化香叶醇转变为 8-hydroxygeraniol 或 9-hydroxy-geraniol,二者为顺反异构体(图 2),即 CYP76C4 也属于 G10H。

2014 年 Miettinen 等^[21]在长春花中发现了 10-HGO (GenBank: AAQ55962.1)在 NAD⁺ 的辅助下可将 10-hydroxygeraniol、10-oxogeraniol 及 10-hydroxygeranial 催化生成 10-oxogeranial。

2.3 IS 催化 10-oxogeranial 的环化反应

IGs 的核心结构是由独特的环化反应形成的,该反应是由 IS 在 NADPH 的辅助下完成的。IS 是由 Geu-Flores 等^[11]采用转录组学方法在长春花中发现的,其可将 10-oxogeranial 环化为 *cis-trans*-nepetalactol, nepetalactol 是所有 IGs 的前体化合物。值得注意的是,研究人员之前报道的萜类合成酶均是采用香叶基焦磷酸(geranyl pyrophosphate)作为反应底物(图 3-A)^[31-36]。而 IS 则催化 10-oxogeranial 形成烯醇化物中间体(图 3-B),再通过狄尔斯-阿尔德(hertero Diels-Alder)或 Michael 反应形成 nepetalactol(图 3-B)。为阐明环化步骤是遵循狄尔斯-阿尔德还是 Michael 机制,Lindner 等^[37]合成了针对 2 种反应的特异性底物,结果倾向于由 Michael 反应完成环化。

对 IS 进一步研究,发现其属于被子植物的孕酮 P5-β 还原酶(progesterone 5β-reductase, P5βR)家族,Munkert 等^[38]对长春花中 6 个 P5βR 亚型(CrP5βR1~

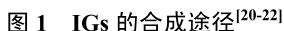


Fig. 1 Synthesis pathway of IGs^[20-22]

2.4 7-DLS 和 7-DLH 的鉴定

录组学和蛋白质组学的方法,发现 CYP76A26 可催化 硫 蚁 二 醛 (iridodial) 及 iridotrial 转 变 为 7-deoxyloganetic acid。尽管 *cis*-iridodial、*trans*-iridodial 与 *cis-trans*-nepetalactol 可发生自由转变^[11],但 CYP76A26 会优先催化 nepetalactol。研究者将 CYP76A26 命名为 7-DLS。2014 年,Salim 等^[20]在 长 春 花 中 发 现 7-DLS 催 化 iridodial-nepetalactol 合 成

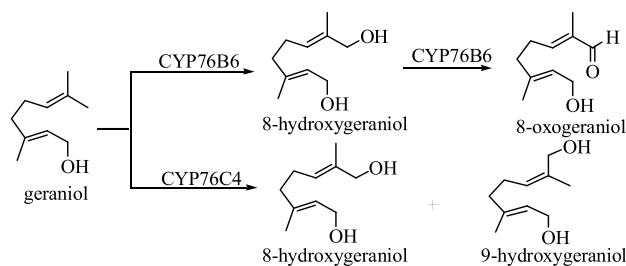


图 2 CYP76B6 与 CYP76C4 催化 geraniol 的反应途径

Fig. 2 Reaction of CYP76B6 and CYP76C4 catalyzing geraniol

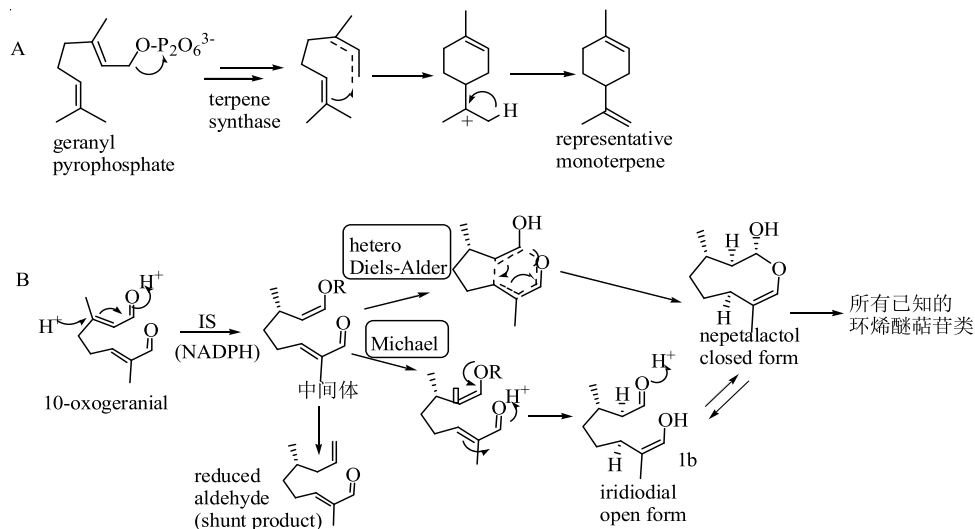


图 3 常见的萜类合成反应 (A) 和 IS 催化 10-oxogeraniol 的环化反应 (B)

Fig. 3 Common terpene synthesis reaction (A) and IS catalyzed cyclization of 10-oxogeraniol (B)

7-deoxyloganetic acid, 其实是由 7-DLS 参与了 3 步氧化反应 (图 1-D)。与此同时, Miettinen 等^[21]发现 CYP72A224 可催化去氧马钱子酸 (deoxyloganic acid) 为马钱子酸, 因此将其命名为 CYP72A224 为 7-DLH。

2.5 7-DLGT 催化糖基化反应

IGs 主要以 1 位羟基与糖成苷的形式存在于植物体内, 为了阐明合成中糖基化 (图 1-E) 和甲基化 (图 1-F) 的相对顺序, 研究人员对 7-DLGT 的底物进行了摸索。

2011 年, Nagatoshi 等^[3]在 梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 中鉴定了第一个 7-DLGT (UGT85A24), 采用 cDNA 逆转录法研究了 13 个候选基因, 结果表明 梔子中 7-DLGT (UGT85A24) 与 7-deoxyloganetin 的亲合度更高, 而对 7-deoxyloganetic acid 没有活性, 表明了在京尼平苷 (geniposide) 的合成过程中, 7-deoxyloganetic 先发生甲基化反应, 再发生糖基化反应。但是, 该发现

与 2002 年 Yamamoto 等^[39]的研究不一致, 该研究从金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 中分离出 7-deoxyloganetin 及 7-deoxyloganetic acid 两种化合物, 经过对金银花中糖基化转移酶的制备研究发现, 在京尼平苷的形成过程中, 7-deoxyloganetic acid 才是糖结合的底物。此外, Murata 等^[40]在长春花的研究中发现, LAMT 是在叶面表皮细胞中以马钱子酸为底物, 这也表明了甲基化发生在糖基化之后。

后续的报道也倾向于支持 Murata 等^[40]的发现, Miettinen 等^[21]鉴定长春花中的 UGT709C2 作为 7-DLGT 主要是以 7-deoxyloganetic acid 为底物。由此看出, 反应中糖基化与甲基化的相对顺序可能会根据植物的种属不同产生差异性。

2.6 LAMT 和 SLS 在叶面表皮细胞中参与催化反应

2008 年, Murata 等^[40]对长春花中 MIA 的合成途径进行研究, 发现 LAMT 可在植物叶面表皮细胞中特异表达, 尤其在新叶中活性较高, 该酶具有底物特异性, 仅能催化 loganic 和断马钱子酸, 在马钱

子酸的合成中发挥了重要作用。2000 年, Irmeler 等^[41]采用酶筛法, 将 SLS 鉴定为 CYP72A1。

3 相关酶的编码基因及应用

基于多数 IGs 和 MIA 具有重要的生物活性, 研究人员一直致力于从分子生物学水平阐明其生物合

成中酶的调节方式。通过检索 GenBank, 相关酶所对应的功能基因见表 1, 这就为将来利用基因工程方法进行基因整合、酶的位点改造、筛选获得高效表达的 IGs 工程菌奠定重要基础, 或为调控活性成分的积累、提高植物的品质提供帮助。

表 1 IGs 及 MIA 合成途径中的相关酶编码基因
Table 1 Genes that coding enzymes related to biosynthesis of IGs and MIA

相关酶	类型	相关植物	序列登录号
G10H (CYP76B6)	cytochrome P450	<i>Catharanthus roseus</i>	Q8VWZ7.1
G10H (CYP76C4)	cytochrome P450	<i>Arabidopsis thaliana</i>	OAP09091.1
10-HGO	dehydrogenase	<i>Catharanthus roseus</i>	AAQ55962.1
IS (P5βR)	oxidoreductase	<i>Digitalis purpurea</i>	CAC80137.1
IS (P5βR-type)	oxidoreductase	<i>Thymus vulgaris</i>	AFZ41791.1
IO/7-DLS (CYP76A26)	cytochrome P450	<i>Catharanthus roseus</i>	AHX24370.1
7-DLH (CYP72A224)	cytochrome P450	<i>Catharanthus roseus</i>	AGX93062.1
7-DLGT (UGT85A24)	glucosyltransferase	<i>Gardenia jasminoides</i>	F8WKW1.1
7-DLGT-type (UGT709C2)	glucosyltransferase	<i>Catharanthus roseus/Madagascar periwinkle</i>	U3U992.1
LAMT	O-methyltransferase	<i>Olea europaea</i>	AFS28696.1
SLS (CYP72A1)	cytochrome P450	<i>Catharanthus roseus/Madagascar periwinkle</i>	Q05047.1
STR	其他	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	BAB47180.1
STR-type	其他	<i>Catharanthus roseus</i>	CAA37671.1
TDC	decarboxylase	<i>Catharanthus roseus</i>	CAA47898.1

IGs 生物合成通路是 MIA 合成的前体途径之一, 也通常被认为是 MIA 合成的限速步骤^[42-43], 在 IGs 合成前期, G10H 起着重要关键酶的作用。抗癌药物二聚萜类生物碱长春碱 (vinblastine) 和长春新碱 (vincristine) 的来自于长春花的细胞和组织培养, 为了提高其产量, Pan 等^[44]对该植物中的 G10H 基因进行研究, 使得 G10H 基因和 ORCA3 基因在长春花中共表达或单独过表达 ORCA3 基因。基于 NMR 的代谢组学, 证实了 ORCA3 和 G10H 过表达可显著增加长春碱和长春新碱的前体胡豆苷 (strictosidine)、文朵灵 (vindoline) 及长春质碱 (catharanthine) 的积累。此外, 研究发现, MIA 生物合成的增强也可能会影响如氨基酸、有机酸、糖和苯丙素的含量变化。

已知 IGs 合成相关酶的编码基因, 朱孝轩^[45]采用 SOE-PCR 手段构建 GES、7-DLS 等模块, 将其连接到表达载体上, 使酶在酿酒酵母细胞中得到表达, 并且验证了其表达产物的正确性, 这将为建立高效表达的 IGs 工程菌奠定技术基础。韩梅等^[26]将长春碱和长春新碱的合成途径基因

G10H、SLS、STR 等克隆出来并构建在蛋白表达载体上, 并在大肠杆菌菌株 BL21 中表达, 经纯化成功获得了合成途径的蛋白, 这将大大提高长春碱和长春新碱的产率。

Lu 等^[46]在研究 IGs 及 MIA 相关酶基因的基础上, 通过 RNA 原位杂交与免疫细胞定位技术, 获取了 IGs 和 MIA 在植物中的表达部位, 这将有利于利用组织培养技术在植物体外进行代谢产物的生产。Valletta 等^[47]以枸杞 *Lycium barbarum* L. 子中萜类生物碱喜树碱 (CPT) 为例, 将喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 中 CPT 的积累模式与参与合成的 Ca-TDC1、Ca-TDC2 和 Ca-HGO 基因的表达模式进行比较。结果显示, CPT 主要积累在根部, Ca-TDC2 在茎和叶中表达。它是可诱导防御系统的一部分, 只有在植物体受到外界环境如干旱、高温时才有表达。Ca-HGO 基因在叶和茎中表达, 不在根中表达。Ca-TDC1 仅可在茎和叶中表达, 但由于考虑到前期 López-Meyer 等^[48]检测到一年生喜树的所有部位都有 Ca-TDC1 的表达, Yamazaki 等^[49]也在根中而非叶中检测到 TDC 的表达, Valletta 推

测有可能是该实验中转录物含量过低,使得未能在根部检测到Ca-TDC1表达。

4 展望

IGs具有多种药理活性,其合成途径是多酶催化的复杂过程,研究其生物合成途径、相关酶及功能基因,将为利用分子生物技术生产有价值的环烯醚萜苷类药物及新型衍生物提供有价值的参考。

由于IGs、MIA和喹啉生物碱具有相同的上游合成途径,一些有价值的萜类吲哚生物碱如长春碱、喜树碱的衍生物已被临床批准应用^[50]。因此,阐明其生物合成,对应用代谢工程的方法调控代谢产物流量,使其朝着预期产物的合成方向进行至关重要。

在未来研究中,随着现代分子生物技术和细胞培养技术的快速发展,关键酶及功能基因的鉴定工作以及这些酶是否发挥关键作用需进行深入研究,这将有助于定向调节IGs及下游生物碱的代谢合成,使之更好地应用到药学和农业生产中。

参考文献

- [1] 郑礼胜,刘向前.环烯醚萜类研究进展[J].天然产物研究与开发,2009,21(725):702-711.
- [2] Waterman, P G. The current status of chemical systematics [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(22/24): 2896-2903.
- [3] Nagatoshi M, Terasaka K, Nagatsu A, et al. Iridoid-specific Glucosyl transferase from *Gardenia jasminoides* [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(37): 32866-32874.
- [4] Dinda B, Chowdhury D R, Mohanta B C. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(8): 765-796.
- [5] Dinda B, Debnath S, Banik R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids [J]. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59(7): 803-833.
- [6] Dinda B, Debnath S, Harigaya Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(5): 689-728.
- [7] Tundis R, Loizzo M R, Menichini F, et al. Biological and pharmacological activities of iridoids: Recent developments [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2008, 8(4): 399-420.
- [8] Opitz S E, Jensen S R, Müller C. Sequestration of glucosinolates and iridoid glucosides in sawfly species of the genus *Athalia* and their role in defense against ants [J]. *J Chem Ecol*, 2010, 36(2): 148-157.
- [9] Lampert E C, Bowers M D. Host plant influences on iridoid glycoside sequestration of generalist and specialist caterpillars [J]. *J Chem Ecol*, 2010, 36(10): 1101-1104.
- [10] Dewhurst S Y, Pickett J A, Hardie J. Aphid pheromones [J]. *Vitam Horm*, 2010, 83(1): 551-574.
- [11] Geu-Flores F, Sherden N H, Courdavault V, et al. An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis [J]. *Nature*, 2012, 492(7427): 138-142.
- [12] De Luca V, Salim V, Thamm A, et al. Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: Progress on pathway elucidation [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 19(1): 35-42.
- [13] 张松涛,陈红丽,崔红,等.植物MEP途径的代谢调控机制[J].西北植物学报,2012,32(7):1500-1504.
- [14] Contin A, van der Heijden R, Lefeber A W, et al. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture [J]. *FEBS Lett*, 1998, 434(3): 413-416.
- [15] Eichinger D, Zenk M H, Eisenreich W, et al. Analysis of metabolic pathways via quantitative prediction of isotope labeling patterns: A retrobiosynthetic ¹³C NMR study on the monoterpene loganin [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(2): 223-236.
- [16] Hong S B, Hughes E H, Shanks J V, et al. Role of the non-mevalonate pathway in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(3): 1105-1108.
- [17] Burlat V, Oudin A, Courtois M, et al. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites [J]. *Plant J*, 2004, 38(1): 131-141.
- [18] 吴昕怡,刘小莉.环烯醚萜类成分生物合成途径及关键酶基因研究进展[J].中国民族民间医药,2017,26(8):44-48.
- [19] Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, et al. Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(1/2): 13-30.
- [20] Salim V, Wiens B, Masada Atsumi S, et al. 7-deoxyloganetic acid synthase catalyzes a key 3 step oxidation to form 7-deoxyloganetic acid in *Catharanthus roseus* iridoid biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 2014, 101(9): 23-31.
- [21] Miettinen K, Dong L, Navrot N, et al. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(4): 3606-3616.
- [22] De Luca V, Salim V, Thamm A, et al. Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: progress on pathway elucidation [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 19(5): 35-42.
- [23] Salim V, Yu F, Altarejos J, et al. Altarejos-Caballero J, et al. Virus induced gene silencing identifies *Catharanthus roseus* 7-deoxyloganic acid 7-hydroxylase, a step in iridoid and monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis [J]. *Plant J*, 2013, 76(5): 754-765.
- [24] Asada K, Salim V, Masada Atsumi S, et al. Iridoid glucosyltransferase expressed in internal phloem-associated parenchyma cells is involved in the assembly of secologanin and monoterpenoid indole alkaloids in

- Madagascar periwinkle [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(10): 4123-4134.
- [25] Yamamoto K, Takahashi K, Mizuno H, *et al.* Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with imaging MS and single-cell MS [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(14): 3891-3896.
- [26] 韩梅, 赵博, 安志刚, 等. 长春花萜类吲哚生物碱生物合成途径中重要酶 (DXR、SLS、G10H、STR) 基因的克隆与表达 [J]. *植物研究*, 2007, 27(5): 564-568.
- [27] Rai A, Smita S S, Singh A K, *et al.* Heteromeric and homomeric geranyl diphosphate synthases from *Catharanthus roseus* and their role in monoterpene indole alkaloid biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(5): 1531-1549.
- [28] Simkin A J, Miettinen K, Claudel P, *et al.* Characterization of the plastidial geraniol synthase from *Madagascar periwinkle* which initiates the monoterpene branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma [J]. *Phytochemistry*, 2013, 85(1): 36-43.
- [29] Collu G, Unver N, Peltenburg Looman A M, *et al.* Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis [J]. *FEBS Lett*, 2001, 508(2): 215-220.
- [30] Höfer R, Dong L, André F, *et al.* Geraniol hydroxylase and hydroxygeraniol oxidase activities of the CYP76 family of cytochrome P450 enzymes and potential for engineering the early steps of the (seco)iridoid pathway [J]. *Metab Eng*, 2013, 20(3): 221-223.
- [31] Uesato S, Ueda S, Kobayashi K, *et al.* Mechanism of iridane skeleton formation in the biosynthesis of iridoid glucosides in *Gardenia jasminoides* cell cultures [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(11): 4185-4188.
- [32] Uesato S, Matsuda S, Inouye H. Mechanism for iridane skeleton formation from acyclic monoterpenes in the biosynthesis of secologanin and vindoline in *Catharanthus roseus* and *Lonicera morrowii* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(4): 1671-1674.
- [33] Uesato S, Ikeda H, Fujita T, *et al.* Elucidation of iridodial formation mechanism. Partial purification and characterization of the novel monoterpene cyclase from *Rauwolfia serpentina* cell suspension cultures [J]. *Tetrahedr Lett*, 1987, 28(38): 4431-4434.
- [34] Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(15/16): 1621-1637.
- [35] Chen F, Tholl D, Bohlmann J, *et al.* The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 212-229.
- [36] Kim H J, Rusczycky M W, Liu H W. Current developments and challenges in the search for a naturally selected diels-alderase [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16(1/2): 124-131.
- [37] Lindner S, Geu-Flores F, Bräse S, *et al.* Conversion of substrate analogs suggests a michael cyclization in iridoid biosynthesis [J]. *Chem Biol*, 2014, 21(11): 1452-1456.
- [38] Munkert J, Pollier J, Miettinen K, *et al.* Iridoid synthase activity is common among the plant progesterone 5 β -reductase family [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 136-152.
- [39] Yamamoto H, Sha M, Kitamura Y, *et al.* Iridoid biosynthesis: 7-deoxyloganetic acid 1-O-glucosyl transferase in cultured *Lonicera japonica* cells [J]. *Plant Biotechnol*, 2002, 19(5): 295-301.
- [40] Murata J, Roepke J, Gordon H, *et al.* The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(3): 524-542.
- [41] Irmeler S, Schröder G, St-Pierre B, *et al.* Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: New enzyme activities and identification of cytochrome P450CYP72A1 as secologanin synthase [J]. *Plant J*, 2000, 24(6): 797-804.
- [42] Oudin A, Courtois M, Rideau M, *et al.* The iridoid pathway in *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6(5): 259-276.
- [43] Whitmer S, van der Heijden R, Verpoorte R. Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a strictosidine synthase over-expressing transgenic cell line S1 of *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2002, 69(1): 85-93.
- [44] Pan Q, Wang Q, Yuan F, *et al.* Overexpression of ORCA3 and G10H in *Catharanthus roseus* plants regulated alkaloid biosynthesis and metabolism revealed by NMR-metabolomics [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43038.
- [45] 朱孝轩. 长春花转录组与萜类吲哚生物碱代谢途径研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [46] Lu H, Gorman E, McKnight T D. Molecular characterisation of two anthranilate synthase alpha subunit genes in *Camptotheca acuminata* [J]. *Planta*, 2005, 221(2): 352-360.
- [47] Valletta A, Trainotti L, Santamaria A R, *et al.* Cell-specific expression of tryptophan decarboxylase and 10-hydroxygeraniol oxidoreductase, key genes involved in camptothecin biosynthesis in *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae) [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 1-10.
- [48] López-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(6): 1167-1175.
- [49] Yamazaki Y, Sudo Y, Yamazaki M, *et al.* Camptothecin biosynthetic genes in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*: Cloning, characterization, and differential expression in tissues and by stress compounds [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(4): 395-403.
- [50] Creemers J P, Despas R, Favalli G, *et al.* Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer: Results of a large European phase II study [J]. *J Clin Oncol*, 1996, 14(12): 3056-3061.