

红豆杉文史新考及产紫杉醇技术研究进展

贺宗毅^{1,2,3}, 张德利^{1,2,3}, 李卿¹, 邢康康^{1,2,3}, 陈仕江^{1,2,3*}

¹重庆市中药研究院; ²濒危药材繁育国家工程实验室; ³中国中医科学院 中药资源中心重庆分中心, 重庆 400065

摘要: 红豆杉属药材是我国种植面积大, 经济效益好的中药材(民族药材)之一, 是抗癌药物紫杉醇的主要来源。由于紫杉醇对乳腺癌、卵巢癌有确切疗效, 全世界研究趋热。古代无红豆杉之名, 致人们对其悠久的历史不甚了解。因此, 本文在查阅典籍文献的基础上对红豆杉的名实、本草史进行了新的考证, 同时根据第四次全国中药资源普查的情况对红豆杉人工培植情况、产紫杉醇技术研究进展进行了梳理总结, 分析了存在的问题, 并提出了将来的研究重点和方向。

关键词: 红豆杉; 考证; 癌症; 紫杉醇; 研究进展

中图分类号: R931.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.041

The New Textual Research on Concept, Content and Research Progress on Producing Taxol of *Taxus*

HE Zong-yi^{1,2,3}, ZHANG De-li^{1,2,3}, LI Qing¹, XING Kang-kang^{1,2,3}, CHEN Shi-jiang^{1,2,3*}

¹Chongqing Academy of Chinese Materia Medica; ²National Engineering Laboratory of Endangered Species Breeding;

³Chongqing Sub-Center of the National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Chongqing 400065, China

Abstract: *Taxus* spp. is one of the traditional Chinese medicine (National Medicine), which have a large planting area and good economic benefit. *Taxus* is the source plant of anti-cancer drug paclitaxel and its biosynthetic precursor, analogs and derivatives. The world is very enthusiastic about the study of *taxus*. People have insufficient appreciation of centuries-old historical document and abundant connotation of *taxus*, because the '*axus*' has no name in ancient times. So, this paper did a great deal of analysis and textual research focusing synonym and herbal history of *taxus*. At the same time, based on The fourth national survey of traditional Chinese medicine resources, the artificial cultivation and the new research progress on producing taxol of *taxus* were summarized. The existing problems and the possible research emphases or development direction had been presented aimed to provide ideas and reference for the researchers in the paper.

Key words: *Taxus* spp.; textual research; cancer; taxol; research progress

红豆杉属植物为第四纪冰川遗留的树种, 在地球上已有 250 万年的历史。隶属于裸子植物门 (*Gymnospermae*)、松杉纲 (*Coniferopsoda*)、红豆杉目 (*Taxales*)、红豆杉科 (*Taxaceae*)、红豆杉属 (*Taxus*)。全球共有 11 种, 主要分布于北半球。红豆杉药材被广泛认识始于紫杉醇的发现, 由于其对乳腺癌、卵巢癌确切的疗效引起全世界的专注^[1]。紫杉醇在红豆杉属植物中含量极微, 仅占树皮干重的 0.01% ~ 0.03%, 提取需要消耗大量红豆杉植株, 造成红豆杉的资源危机^[2,3]。为缓解紫杉醇来源危机, 国内外

学者在红豆杉胚胎学^[4]、细胞培养^[5,6]、红豆杉属种间关系^[7,8]、红豆杉代谢指纹图谱^[9]、功能基因克隆^[10]、红豆杉内生菌选育^[11]等领域开展了广泛研究, 为红豆杉细胞产紫杉醇的调控、候选活性物质的筛选、功能基因的表达、种质鉴定等提供了研究方向。但由于古代并无红豆杉之名的记载, 人们对红豆杉悠久的历史仍缺乏较深入的认识, 现代药用植物工具书中仍存在名称混乱或名称记载错误的现象。因此, 本文在查阅典籍文献的基础上对红豆杉的名实、本草史进行了新的考证, 同时根据第四次全国中药资源普查的情况对红豆杉人工培植情况、产紫杉醇技术研究进展进行了梳理总结, 分析了存在的问题, 并提出了将来的研究重点和方向。以期紫杉醇原料的增产开拓思路, 有助于珍稀濒危红豆

收稿日期: 2017-04-27

接收日期: 2017-05-15

基金项目: 重庆市卫生局中医药科研项目 (zy201602093); 重庆市基本科研业务计划 (2015cstc-jbky-01906)

* 通信作者 Tel: 86-23-89029078; E-mail: shijiangchen@163.com

杉资源的保护。

1 红豆杉文史新考

红豆杉属植物虽有悠久的历史,但古代没有科属种之生物分类系统,至清代以前我国未有红豆杉正式名称的报道。考证发现,红豆杉古称紫杉、榭、赤杉,最早是作木材使用,如最早记载红豆杉的书籍《说文解字》:“榭,木也。从木要,黏声”^[12]。榭就是红豆杉的古名。《尔雅翼》:“榭,木类。类松而劲,直叶附枝,生若刺针”^[13];至明代《江西通志》载:“紫杉,良材也”^[14]。《明文衡》书云:“宋子闲居见家人夏季改火不用桑柘,取赤榭二尺中析之,一剜成小空,空侧开以小隙,一副圆大与空齐稍锐,其两端上端截竹三寸冒之下端置空内以细绠缠其腰,别藉卉毛于隙下,左手执竹右手引绠急旋转之,二榭相轧摩空木成尘烟辄起,尘自隙流毛上,候其烟蓊蓊以虚掌覆空鬱之则火欲燄生矣”^[15]。

红豆杉药用历史较晚,较早的本草典籍《经史证类备急本草》第14卷:“丹桎木皮,主痒风,取一握,去上黑,打碎煎如糖,涂风上,桎木似杉木,生江南深山”^[16]。文中丹桎木即红豆杉木,丹桎木皮即红豆杉皮。至明朝嘉靖年间《本草纲目》有红豆杉入药的记载,释名:时珍曰:按:魏子才《六书精蕴》云:万木皆向阳,而柏独西指,盖阴木而贞德者,故字从白。白者,西方也。陆佃《埤雅》云:柏之指西,犹针之指南也。柏有数种,入药惟取叶扁而侧生者,故

曰侧柏^[17]。从释名中可看出古人将红豆杉统称为“柏”,“而柏独西指,盖阴木”说明是喜阴植物,“入药惟取叶扁而侧生者”的形态学描述与红豆杉属植物相符。现代本草及民族药典籍对红豆杉的药用记载主要集中于利尿通经、消肿治食积、驱虫等方面。《维吾尔药志:下册》记载:红豆杉名扎日纳甫,药用部位为枝、叶,性温,驱风散寒、镇咳平喘、利尿通经。主要用于脾胃虚寒、食欲不振、咳嗽气喘、淋病、血尿、水肿及糖尿病等症^[18];《中华本草》载:“紫杉”即东北红豆杉利尿消肿。主治肾炎浮肿,小便不利^[19];《东北药用植物志》载:“叶为通经及利尿药”;《吉林中草药》载:“通经利尿。治肾脏病、糖尿病”;《浙江天目山药用植物志》载:“治食积,驱蛔虫”。《中药辞海》载:“功效:驱虫”^[20]。

2 红豆杉培植进展

分布在我国的红豆杉属植物共有3种3变种,即密叶红豆杉(*Taxus fuana*)、须弥红豆杉(*Taxus wallichiana*)、东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)、须弥红豆杉(原变种)(*Taxus wallichiana* var. *wallichiana*)、红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *chinensis*)、南方红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *mairei*)^[21]。现提取或半合成紫杉醇用红豆杉均为人工培植品。由于红豆杉经济效益可观,我国人工培植热情极高,在资源普查基础上,对我国红豆杉药材培植情况进行了归纳总结,结果见表1。

表1 我国红豆杉属药材人工培植现状

Table 1 The information of *Taxus* artificial cultivation

种类 Breed	来源 Origin	分布 Distribution	普查基地数量 Bases	培植面积 Area (hm ²)
曼地亚红豆杉 <i>Taxus madia</i>	加拿大引种	分布于长江以南大部分地区	42	6770.2
南方红豆杉 <i>Taxus wallichiana</i> var. <i>mairei</i>	中国	主要分布于海拔在100~3500 m的长江以南省份	26	3084.3
须弥红豆杉(原变种) <i>Taxus wallichiana</i> var. <i>wallichiana</i>	中国	主要分布在2000~3500 m的混交林,如四川西南、云南、西藏东南部	5	449.3
红豆杉 <i>Taxus wallichiana</i> var. <i>chinensis</i>	中国	主要分布在1100~2700 m的阔叶混交林,南方大部分省份均有分布	3	259
东北红豆杉 <i>Taxus cuspidata</i>	中国	主要分布在海拔500~1000 m的地区,东北、辽宁、吉林、日本、朝鲜均有分布	7	28.7
密叶红豆杉 <i>Taxus fuana</i>	中国	主要分布于喜马拉雅山脉2500~3400 m的范围,分布较狭窄,如西藏、印度北部、尼泊尔、巴基斯坦北部	未见人工培植	0

红豆杉属植物主要分布于北半球温带至中亚热带地区。从表1可看出,除密叶红豆杉未见人工培

植外,其它种均有人工培植。我国曼地亚红豆杉人工培植面积最广,达6770.2 hm²,这与曼地亚红豆

杉生长速度快、紫杉醇含量高相关;其次是南方红豆杉 3084.3 hm²、须弥红豆杉(原变种)449.3 hm²、红豆杉 259 hm² 和东北红豆杉 28.7 hm²。

3 产紫杉醇研究进展

3.1 直接提取

紫杉醇(C₄₇H₅₁NO₁₄)是从红豆杉属植物中分离出来的三环二萜类化合物。获得的主要途径是规模化、集约化营造红豆杉人工原料林,从人工栽培的枝条中提取紫杉醇是缓解紫杉醇原料紧缺的最现实、最快捷的方法。从红豆杉属植物中提取紫杉醇流程示意图见图1所示。目前较成熟的方法有如下几种:

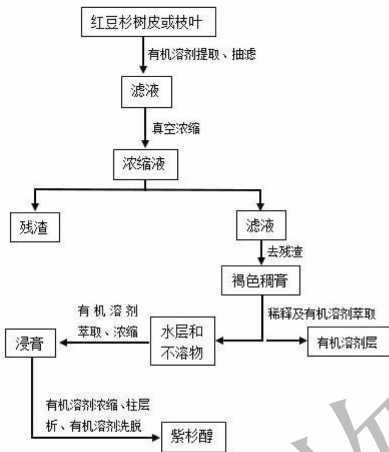


图1 紫杉醇分离、提取流程示意图

Fig. 1 The schematic diagram of taxol separation and extraction

3.1.1 溶剂萃取法

该法运用最为普遍,较易获得紫杉醇。如 Mcpartland 等^[22]在对细胞培养物中的紫杉醇分离纯化,对不同溶剂紫杉醇分散系数进行了比较研究,表明单一溶剂甲醇萃取效果较好;陈海涛^[23]等根据紫杉醇光敏性和热敏性的特点,优化提出了有机溶剂-紫杉醇-水-甲醇的多元萃取法,大大提高了紫杉醇的分离效果;杨宪等^[24]采用正交试验法对提取过程中乙醇浓度、乙醇用量、提取次数、提取时间4因素进行优选试验,并确定了优化后的工艺乙醇浓度95%、乙醇用量8 mL/g、提取次数2 h、提取时间2 h;随着超声技术的新起,Xu 等^[25]用甲醇-二氯甲烷萃取红豆杉粉末时采用超声技术,发现萃取时间大大缩短。

3.1.2 固相萃取法

由于红豆杉属植物中成分复杂,紫杉醇含量极低,与紫杉醇结构相似的紫杉烷类物质多,提取分离

较困难。固相萃取法可快速除去紫杉醇浸膏中的脂、色素及蜡等杂质,有效地将紫杉醇与干扰组分分离。Mattina 等^[26]采用 C18 固相柱和固相萃取盘对红豆杉甲醇粗提物进行提取,固相萃取盘所得紫杉醇效果优、成本较低,回收率达 115.8%;张志强等^[27]采用氧化铝层析从云南红豆杉植物浸膏中转化生成和分离提纯了紫杉醇。考察了氧化铝的类型、流动相中水和甲醇的添加、反应时间以及洗脱速度和洗脱剂组成等层析操作条件对紫杉醇回收和分离的影响。研究表明,采用碱性氧化铝柱层析分离和回收紫杉醇效果显著,通过对紫杉醇转化和分离条件的优化,经一步氧化铝柱层析,可以使紫杉醇的含量从小于 1.0% 提高到大于 27%,紫杉醇的回收率大于 170%。

3.1.3 超临界萃取法

超临界液体萃取技术是近代化工行业中出现的一种高新技术,由于其溶剂是 CO₂,减少了含氯有机溶剂的使用,该法具有高效、环保、安全的特点。Vandana 等^[28]用含有乙醇的超临界 CO₂ 流体从短叶红豆杉树皮中提取到 0.008% 的紫杉醇;陈建民等^[29]利用超临界 CO₂ 流体萃取法从欧洲短叶红豆杉枝叶中提取分离紫杉醇及其伴生物,用反相高效液相色谱法(HPLC)测定萃取物中的紫杉醇及其伴生物含量,并用液质联用(LC/MS/MS)进行产物鉴定。与传统的乙醇三次提取方法相比,超临界流体萃取法流程简单,步骤少,耗时短,废渣无溶剂残留,是一种环境友好的提取方法

3.1.4 柱层析法

李勇超等^[30]采用 D4020 型大孔树脂对红豆杉产紫杉醇内生真菌发酵液的粗提液进行吸附和洗脱试验,同时应用 HPLC 进行分析检测。结果表明: D4020 型吸附树脂对紫杉醇有吸附分离效果明显,回收率达 90%;Chen 等^[31]研究发现 D101 和 WLD-3 树脂按比例混合使用对紫杉醇分离效果明显,回收率达 93%;吴倩等^[32]以除杂率、脱色率和紫杉醇回收率为指标,比较了传统液液萃取法和离子交换树脂法的优劣。萃取法与树脂层析法处理的结果分别为:除杂率分别为 63.7%、77.8%;脱色率分别为 56.7%、71.8%,紫杉醇回收率分别为 64.8%、98.5%,结果表明离子交换树脂法效果显著优于其它方法。

3.1.5 膜分离法

Carvdr 等^[33]采用膜式组件,对反渗透膜及超滤膜

在红豆杉植物中提取紫杉烷类物质进行了研究,结果表明该法可使紫杉烷类物质浓度提高5倍;Raymond等^[34]分别用聚偏二氟乙烯膜和尼龙膜处理红豆杉细胞组培液时发现,尼龙膜能够截留几乎所有的紫杉醇,并可用不同浓度的甲醇水溶液洗脱下来。聚偏二氟乙烯膜虽也可截留几乎所有的紫杉烷类物质但有选择地从聚偏二氟乙烯膜上洗脱紫杉烷类各组分未获成功。

上述方法在生产中已得到了规模化运用,但红豆杉属植物非优势树种且自身生长缓慢,紫杉醇含量低等原因导致仅从红豆杉植株中提取紫杉醇难以满足临床药用的需求,大量砍伐红豆杉属植物势必给天然红豆杉属资源及生态带来极大的威胁和挑战。大量使用有机溶剂易造成环境污染,寻求绿色、成本较低、易于工业化生产的技术方法迫在眉睫。

3.2 化学合成法

3.2.1 化学全合成

化学全合成法是解决紫杉醇原料紧缺的最直接办法,全合成的整体策略为:紫杉醇由4个环的母核(分别标记为A、B、C、D环)和1个带有酰胺等基团的苯丙酸酯侧链构成,其中A环和C环为六元碳环、B环为八元碳环、D环为含氧四元环,如图2、图3所示。主要有三种全合成策略,Holton等^[35]以氧化绿叶烯为起始反应物,先得到A环化合物,再依次顺序合成ABC环化合物,从而得到含有紫杉醇母核结构的巴卡亭III后通过酰化反应引入侧链后即得紫杉醇;而Nicolaou等^[36]采用了颇具新颖的合成策略,其先合成A环和C环化合物,通过反应将A环和C环化合物连接起来,在连接的过程中形成在中间含有八元环的B环,后构建D环化合物和引入侧链,最终得到紫杉醇。Mukaiyama等^[37]采取的另一种策略是先合成B环化合物,再得到BC环化合物骨架,由此骨架构建含ABC环骨架的化合物,以此合成含ABCD环的化合物,而后合成baccatin III,最后引入侧链和去保护基团得到紫杉醇。

虽实现了紫杉醇的全合成,但由于化学全合成反应路径长、合成步骤多、收率低、反应条件极难控

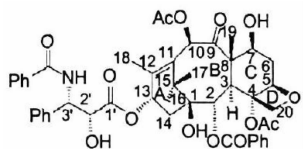


图2 紫杉醇的化学结构

Fig. 2 The chemical structure of taxol

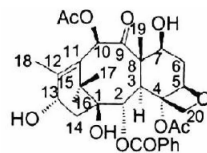


图3 巴卡亭 III 的化学结构

Fig. 3 The chemical structure of Baccatin III

制等问题,仍不适合工业化生产。新的策略、路径和反应的优化仍需进一步研究。

3.2.2 化学半合成

半合成法是在紫杉醇全合成无法工业化生产的大背景下提出的。已报道的半合成紫杉醇主要以10-去乙酰巴卡亭III(10-DAB)和10-去乙酰紫杉醇为原料,这两类化合物在红豆杉属植株枝叶中的含量较高,可保证在不毁灭红豆杉属植株的基础上可为紫杉醇半合成提供充足原料。其半合成路径大多采用选择性保护7位羟基,再酰化10位羟基,进而缩合,最后去除保护基团得到紫杉醇。如Rao等^[38]用10-去乙酰紫杉醇为原料先用乙酸酐酰化,后进行柱层析及重结晶等步后获得了紫杉醇。王九一等^[39]将N-苯甲酰-3-苯基异丝氨酸与7-TES-Baccatin III缩合,在水盐酸溶液中水解去除硅烷保护基团后得紫杉醇;Kanazawa等^[40]以(4S,5R)-2-对甲氧基苯基-3-苯甲酰基-4-苯基恶唑-5-羧酸与7-TES-Baccatin III在DCC和DMAP下缩合,后经盐酸水解即得紫杉醇。该法虽可缓解紫杉醇原料来源问题但其利用大量的枝叶,仍难以摆脱对红豆杉资源的依赖,在本质上与直接提取紫杉醇的方法没有区别。

3.3 细胞培养法

利用红豆杉细胞离体培养生产紫杉醇一直被认为是解决紫杉醇药源较有希望的途径之一,通过优化并构建红豆杉细胞培养体系^[41]及通过向培养体系中添加前体物、代谢旁路抑制剂和诱导因子等方法,显著提高细胞内紫杉醇的含量^[42]。该法具有不破坏野生植物资源的优势,但存在红豆杉离体细胞遗传与生理不稳定、褐化现象^[43,44]、高产细胞系不能高效表达、对反应器及培养条件要求高、价格昂贵等急需解决的问题。

3.4 微生物泌药法

微生物泌药法是将能够分泌紫杉醇或紫杉醇前体物质的微生物分离、筛选后,通过液态培养等生物技术手段大规模表达目的产物的一种方法。Stierle

等^[45]首次从短叶红豆杉中分离出可产紫杉醇的安德鲁紫杉菌(*Taxomyces andreanae*)后,至今已有30余种产紫杉醇真菌被分离^[46]。随后通过诱变选育后的菌株产紫杉醇能力逐渐提高^[47],可见该法不再依赖红豆杉植物资源,是有望解决紫杉醇药源最有前景的方法之一^[48]。

3.5 合成生物法

合成生物是一种基因和基因组的基本要素及其组合,改造、重建或制造生物大分子、生物体部件、生物反应系统、代谢途径至整个生命活动的细胞和生物个体的方法^[49],虽然合成生物学的兴起只有短短10余年,但其在天然药物中的应用已取得实质性进展,通过基因重组等手段获得目的产物已成为现实。Ro等^[50]以酿酒酵母为宿主,导入*ads*基因及细胞色素P450氧化酶基因*cyp 71av1*及还原酶基因*cpr*,优化重组后酵母以100 mg/L的产量产生青蒿酸。在此基础上,Padon等^[51]发现青蒿酸的合成还需要青蒿醇脱氢酶和青蒿醛脱氢酶,将编码这两个酶的基因导入重组后的酿酒酵母后经启动子调整及发酵条件优化后,青蒿酸产量达到25 g/L,从而建立了较低成本的青蒿素制备工艺。Lim等^[52]运用合成生物学设计构建了白藜芦醇高效生产菌株,通过对不同来源芪类合酶(STS)进行同源建模对比,挑选出性能较好的STS,然后比较不同的启动子、表达体系和宿主表现,优选了表达较好的组合,改造后的大肠杆菌合成白藜芦醇产量达到2.3 g/L。在抗生素领域取得的进展非常值得借鉴,Hwang等^[53]将8.1 kb的*orfX*基因(编码膜蛋白)转入野生型除虫链霉菌中,其结果是刺激了阿弗菌素的生物合成,使阿弗菌素的产量提高了3.5倍。Chen等^[54]将野生型除虫链霉菌中*Ave1*缺失后,阿维菌素Bla组分的产量提高了16倍。结合到紫醇醇生物合成领域,Huang等^[55]将IPP异构酶、GGPPS(焦磷酸香叶基香叶酯合酶)和TS(紫杉烯合酶)3个基因导入大肠杆菌中共同表达,最终在培养物中得到1.3 mg/L的紫杉烯(紫杉醇合成前体)。证明了可将不同来源的酶基因进行组合,导入微生物体内,获取目的产物。酵母作为外源微生物的应用越来越多,Dejong等^[56]通过将重组的质粒pESCU-GGPPS-TS、p425GPD-THY5a与pESCW-TAT-THY10b与共转化酵母细胞,将GGPPS、TS、THY5a、TAT和THY10b 5个基因导入酵母中,最终紫杉二烯的产量为1 mg/L,效果良好。可见通过合成生物学指导构建全新的生物体,稳定、高

效率产生天然药物具有其它方法无法比拟的优势。

4 结语及展望

红豆杉属药材虽有大面积培植,但其远不能满足市场需求。冯永林等^[57]分析了不同采收时期曼地亚枝条中紫杉醇的含量,在最佳采收时期下紫杉醇含量仅为0.052%;邵国栋等^[58]研究了分别施用放射性土壤杆菌肥料、荧光假单胞菌肥料和微球菌肥料对曼地利红豆杉中紫杉醇含量的影响,结果表明施用微球菌肥料后紫杉醇含量最高,达0.0317%。其结果对指导红豆杉属药材施肥有重要意义,但仍无法显著性地提高紫杉醇的产量。表明通过外部环境因子的干预对提高现有红豆杉中紫杉醇的含量作用有限,要想从根本上提高红豆杉属药材中紫杉醇含量需从本质上解决如下问题:①选育优质的红豆杉新品种:红豆杉属植物是一古老的树种,在北半球有11个种。迄今为止,世界范围内已培育获得了200余个品种。我国红豆杉属植物有3个种3个变种,资源丰富,但红豆杉属植物的品种选育基础非常薄弱,急需生长速度快、有效成分含量高的新品种。②缺乏规范化培植生产基地:道地药材的形成是药材在长期生产及临床实践中所形成的宝贵经验,建立和发展道地药材生产的规范基地是解决药材质量的一个重要方面^[59]。目前,红豆杉人工培植基地具有数量多、面积小、分散化的特点,红豆杉栽培资源量高,但紫杉醇含量偏低,达不到药用提取的要求特点,尚无通过GAP认证的红豆杉培植基地。③缺乏产业化的工程菌株:国内外已报道具有产紫杉醇的真菌有30余株,但产紫杉醇的能力均无法达到产业化的要求。因此,如何获得高表达的菌株是摆在科研工作者面前的一个系统工程问题。

针对以上问题,笔者认为进一步的研究工作可关注以下几点:(1)选育优良红豆杉新品种:优良的红豆杉药用品种直接关系着紫杉醇的产量及工业提取成本。通过种内、种间杂交技术,研究杂交子代紫杉醇或紫杉烷类物质的生成规律,以期选育出达到药用要求的红豆杉新品种;(2)引导建立红豆杉GAP培植基地:规范化的红豆杉培植基地是保证有效成分含量的关键。在分析各地区土壤、气候及是否具有野生生长历史的基础上,规范红豆杉种质种苗、移栽时机及培植技术规程,指导培植人员进行规范化种植。同时可利用现代科技加强对培植的红豆杉药用植株的质量控制。比如以化学指纹图谱和标

志性成分含量测定、株高及地上部分植株生物量相结合的方法定性定量综合评价红豆杉药用质量;

(3)多策略、多方法的综合运用:在众多产紫杉醇的方法中,微生物发酵法无疑是最具应用前景的方法,无论是从生态还是经济的角度,均是解决紫杉醇原料的最实际的途径。但以往的研究重点均集中于产紫杉醇内生菌的生物多样性及紫杉醇产物代谢合成途径上,对综合应用多种方法的研究不够。在今后的研究中在筛选到产紫杉醇内生菌物的基础上可综合应用蛋白质工程、代谢工程、生物合成等策略重新设计内生菌物,通过重组、改造后的内生菌物来产生有价值的目的产物。

参考文献

- 1 Wani MC, *et al.* Plant antitumor agents VI: the isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971, 93 :2325-2327.
- 2 Chen LT(陈龙涛), *et al.* Interspecific association and niche characteristics of *Taxus chinensis* var. *mairiei* communities in Lingchuan. *Plant Science Journal* (植物科学学报), 2016, (04):521-529.
- 3 Tang BY(唐博言), *et al.* Niches and Interspecific association of dominant tree populations of *Taxus chinensis* in Wuling Damu Mountain Nature Reserve. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), 2014, (05):668-674.
- 4 Bian FY(卞方圆), *et al.* Morphology of fresh seeds and germination of in vitro embryos for *Taxus yunnanensis*. *Acta Ecologica Sin*(生态学报), 2015, 24:8211-8220.
- 5 Yao X(姚晓), *et al.* Tissue culture and analysis on taxane diterpenoids in callus of *Taxus chinensis* var. *mairiei*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 18:2696-2702.
- 6 Han PP, *et al.* Lipidomic analysis reveals activation of phospholipid signaling in mechanotransduction of *Taxus cuspidata* cells in response to shear stress. *Faseb J*, 2009, 23:623-630.
- 7 Hao DC, *et al.* Phylogenetic relationship with in the genus *Taxus* inferred from protein-coding genes and non-protein-coding DNA sequences. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31:260-265.
- 8 Liu J, *et al.* DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., *Taxaceae*) and the discovery of cryptic species. *Mol Ecol Resour*, 2011, 11:89-100.
- 9 Ge GB, *et al.* Chemotaxonomic study of medicinal *taxus* species with fingerprint and multivariate analysis. *Planta Med*, 2008, 74:773-779.
- 10 Li ST, *et al.* Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. *BMC Genomics*, 2012, 13:295-306.
- 11 Zhang P, *et al.* An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology*, 2009, 59:227-232.
- 12 Xu S(许慎). *Shuo Wen Jie Zi* (说文解字). Beijing: Zhong Hua Press, 1985. 116.
- 13 Lu Y(罗愿). *Er Ya Yi Wen Yuan Si Ku Quan Shu* (尔雅翼文渊阁四库全书). Vol 222, Taipei: The Commercial Press of Taiwan Limited by Share Ltd, 1986. 239.
- 14 Xie M(谢旻). *Wen Yuan Si Ku Quan Shu* (文渊阁四库全书). Vol 518, Taipei: The Commercial Press of Taiwan Limited by Share Ltd, 1986. 1.
- 15 Chen MZ(程敏政). *Ming Wen Heng Wen Yuan Ge Si Ku Quan Shu* (明文衡文渊阁四库全书). Vol 1373, Taipei: The Commercial Press of Taiwan Limited by Share Ltd, 1986. 483.
- 16 Tang SW(唐慎微). *Zhen Lei Ben Cao Wen Yuan Si Ku Quan Shu* (证类本草文渊四库全书). Vol 740, Taipei: The Commercial Press of Taiwan Limited by Share Ltd, 1986. 1.
- 17 Li SZ(李时珍). *Compendium of Materia Medica* (本草纲目). Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.
- 18 Liu YM(刘勇民). *Uighur Medicine* (维吾尔药志). Vol 2, Wulumuqi: Xinjiang Science and Technology Publishing House, 1999. 306-310.
- 19 The State Administration of Traditional Chinese Medicine (国家中医药管理局). *Chinese Materia Medica* (中华本草). Vol 4. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2004. 343.
- 20 Yu CL(余传隆), *et al.* Dictionary of Traditional Chinese Medicine (中药辞海). Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press, 1999. 2395.
- 21 Editorial Board of the Institute of Plant, Science Chinese Academy of Science. *Flora of China*. Vol 4. Beijing: Science Press, 1999. 1-3.
- 22 Mcpartland TJ, *et al.* Liquid-liquid extraction for recovery of paclitaxel from plant cell culture: solvent evaluation and use of extractants for partitioning and selectivity. *Biotechnol Prog*, 2012, 28:990-997.
- 23 Chen HT(陈海涛), *et al.* Basic study on taxol separation from the organic solvents in two-liquid-phase cultures of *Taxus* Cells. *Chemical Industry and Engineering* (化学工业与工程), 2001, 02:99-102 + 124.
- 24 Yang X(杨宪), *et al.* Optimization of taxol extraction from *Taxus baccata* L. *J Third Military Med Univer* (第三军医大学学报), 2007, 29:1886-1888.
- 25 Xu LX, *et al.* Determination of taxol in the extract of *Taxus chinensis* by HPLC method. *Acts Pharm*, 1991, 26:537-540.
- 26 Mattina MJ, *et al.* Extraction, purification by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic analy-

- sis of taxanes from ornamental *Taxus* needles. *J Chromatography A*, 1994, 679: 269-275.
- 27 Zhang ZQ(张志强), *et al.* The conversion and separation of taxol with Al₂O₃ chromatography from *taxus Yunnannensis* extract. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(03): 1-6.
- 28 Vandana V, *et al.* Supercritical extraction and HPLC analysis of taxol from *taxus brevifolia* using nitrous oxide and nitrous oxide + ethanol mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 1996, 116: 162-169.
- 29 Chen JM(陈建民), *et al.* Purification of taxol and its related analogues by supercritical CO₂ fluid extraction. *Research and Exploration in Laboratory* (实验室研究与探索), 2004, 23(08): 17-19.
- 30 Li YC(李勇超), *et al.* The study of purification of taxol from endophytic fungi fermentation broth by D4020 macroporous resin. *J Food Sci Biotechnology* (食品与生物技术学报), 2010, 29: 710-714.
- 31 Chen JX, *et al.* Method for separating taxol and related taxane compounds. *Process Biochemistry*, 2011, 42: 97-121.
- 32 Wu Q(吴倩), *et al.* Comparison of resin and liquid-liquid extraction methods in taxol pretreatment. *Chem Engineer* (化学工程师), 2007, 04: 56-57 + 60.
- 33 Carver DR, *et al.* Reverse osmosis and ultrafiltration methods for solutions to isolate desired solutes including taxane. US, 1996(2): 419.
- 34 Ketchum REB, *et al.* Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. *Plant cell Tissue and organ culture*, 1996, 46(1): 9-16.
- 35 Holton RA, *et al.* First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J American Chem Society*, 1994, 116: 1597-1598.
- 36 Nicolaou KC, *et al.* Total synthesis of taxol. *Nature*, 1994, 367: 630-634.
- 37 Mukaiyama T, *et al.* Asymmetric total synthesis of taxol. *Chemistry A European Journal*, 1999, 5: 121-161.
- 38 Rao KV, *et al.* Synthesis and evaluation of some 10-mono- and 2, 10-diesters of 10-deacetylpaclitaxel. *J Med Chem*, 1995, 38: 3411-3414.
- 39 Wang JY(王九一), *et al.* Semisynthesis of taxol. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1999, 9(01): 59-61.
- 40 Kanazawa AM, *et al.* Direct, stereoselective synthesis of the protected paclitaxel side chain and high yield transformation to paclitaxel. *J Chem Soc Chem Commun*, 1994, 22: 2591-2592.
- 41 Lou J(娄静), *et al.* Recent progresses in the studies of taxane-producing fungi. *Mycosystema* (菌物学报), 2011, 30: 158-167.
- 42 Ma X(马玺), *et al.* Production of Taxol by *Taxus* cell culture. *Pharmaceutical Biotechnology* (药物生物技术), 2004, 11: 401-405.
- 43 Li DJ, *et al.* Relationship between culture medium and culture condition and avoiding browning in cell culture of *Taxus*. *Plant Physiology Communications*, 2005, 41(01): 95-98.
- 44 Zheng C(郑超), *et al.* Effects of three antioxidants on callus browning and its related substance contents in *Taxus media rehder*. *Plant Physiology Communications* (植物生理学报), 2013, 03: 259-263.
- 45 Stierle A, *et al.* Taxol and taxane production by *taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Sci*, 1993, 260: 214-216.
- 46 Kang JC(康冀川), *et al.* Recent research advances on endophytic fungi producing taxol. *Mycosystema* (菌物学报), 2011, (02): 168-179.
- 47 Deng BW, *et al.* *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25: 139-143.
- 48 Wang YM(汪友明), *et al.* Isolation and screening of Endophytic fungi producing taxol from *Taxus chinensis* of Huangshan. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 10: 1624-1627.
- 49 Xiong Y(熊燕), *et al.* Progress and perspective of synthetic biology. *Chin Bull Life Sci* (生命科学), 2011, (9): 826-837.
- 50 Ro DK, *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nat*, 2006, 440: 940-943.
- 51 Paddon CJ, *et al.* High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nat*, 2013, 496: 528-532.
- 52 Lim CG, *et al.* High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 3451-3460.
- 53 Hwang YS, *et al.* Cloning and analysis of a DNA fragment stimulating avermectin production in various *Streptomyces avermitilis* strains. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 1263-1269.
- 54 Chen L, *et al.* Characterization of a negative regulator Avel for avermectin biosynthesis in *streptomyces avermitilis* NR-RL8165. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80: 277-286.
- 55 Huang Q, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorganic Med Chem*, 2001, 9: 2237-2242.
- 56 Dejonge JM, *et al.* Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93: 212-224.