

# 用植物细胞培养进行抗癌药物紫杉醇的生产

钟建江\*

(华东理工大学生化工程研究所, 上海200237)

郑光植

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明650204)

TQ463.23

A

**摘要** 紫杉醇由于其高效、低毒、广谱和作用机制独特而成为引人注目的抗癌新药。用植物组织细胞培养来进行紫杉醇的生产, 无疑具有巨大的应用前景。本文拟从植物细胞培养工程的角度, 就细胞培养的育种、动力学研究、生物过程耦合、引发、中间补料培养、高浓度培养以及生物反应器中的培养等方面进行动态报道, 并简要讨论用红豆杉细胞进行紫杉醇的工业化生产所必须解决的几个技术关键。

**关键词:** 植物细胞培养, 紫杉醇, 生物反应器, 培养过程优化, 红豆杉细胞

抗癌药

## 1 前言

在1969年, 美国Triangle研究所的Monroe Wall 教授及其同事宣布他们从太平洋短叶红豆杉(Pacific yew tree, *Taxus brevifolia*) 的树皮和木部得到的粗提物中发现了一种新的抗癌细胞的二萜类化合物。他们把它命名为紫杉醇(Taxol)。当时, 他们没有顾及专利权把研究结果发表在美国化学杂志上<sup>[1,2]</sup>。紫杉醇于1977年被批准作临床前开发的候选药物, 1979年纽约 Albert Einstein医学院的 S.B.Horwitz 教授及其同事阐明了紫杉醇的独特作用机理, 即能促进微管蛋白的聚合, 又能稳定微管不致解聚。1983年它被批准进入I期临床。紫杉醇由于其抗癌活性强、结构新颖、作用机制独特而引人注目。实际上, 紫杉醇被认为是美国癌症研究所(NCI)在近20年中发现的一个最重要的抗癌新药, 已成为一个新型的有价值的生物探针<sup>[3]</sup>。

癌和乳腺癌的治疗, 肺癌治疗也已进入临床试验, 预测很快又要被批准。据说, 目前它的国际市场价格每克高达1000美元。在美国, 光为治疗卵巢癌每年需求的紫杉醇就要超过20~25公斤, 今后每年的需求量将剧增。为寻求大量生产紫杉醇的途径。NCI 和 BMS (Bristol-Myers Squibb)公司已着手深入细致的研究工作。目前, NCI正通过35项资助项目, 每年总额超过430万美元以支持各种不同内容的研究项目。这些项目包括植物遗传学和繁殖学的研究、组织细胞培养、生物合成、半合成和全合成、分析和分离方法的改进、制剂的选择、药物的代谢、抗药性及影响紫杉醇与微管结合的因素, 等等<sup>[4,5]</sup>。

去年初, 美国佛罗里达州立大学的 R.A. Holton教授及其同事们、以及Scripps研究所和加州大学的K.C.Nicolaou教授及其同事们这两个独立的研究组几乎同时报道了紫杉醇全合成获得成功的研究结果, 这能使科技人

到目前为止, 紫杉醇已被批准用于卵巢

\* 通讯联系人。

员研究更为有效低毒的紫杉醇类药物。但是,这两种新的全合成方法,即使得到改进,可能也由于生产成本的原因难以用于工业化制造紫杉醇的商品<sup>[6]</sup>。

去年,美国 Montana 州立大学的 A. Stierle 等人报道了他们在附生于红豆杉树皮的真菌中发现含有紫杉醇。这一真菌经研究确定为新种新属,被命名为 *Taxomyces andreanae*。这是近年紫杉醇资源研究的一个重要进展。但就目前技术水平而言,从每升真菌培养液中仅能获得 24~50 纳克的紫杉醇<sup>[7]</sup>。据认为,要达到商业化生产,必须要求达到毫克级水平。因此,目前仍然需要解决若干技术关键。

## 2 植物细胞培养与紫杉醇的生产

植物组织细胞培养被认为是紫杉醇的一个有希望的长期资源。这是因为:(1)不破坏资源。尽管红豆杉植物的数量很少,但作为细胞培养的起始原料只需极少量,建立起组织培养后就不再需要红豆杉植物材料了,可一代代在全人工的控制下繁殖下去。还保护了红豆杉资源和维持了生态平衡。(2)不需要栽培,它不受地区、季节、病虫害及其它自然因子的影响。(3)细胞悬浮培养具有相对较快的增殖速率。(4)高产细胞株可通过从高产植物建立并筛选获得。(5)培养物为较均一的细胞,容易进行大规模培养。(6)可以通过改变培养基成分等进行培养条件的人为控制来得到理想的产量。

从已有的资料看,发现紫杉醇及其类似物生产的植物都属于红豆杉科。红豆杉属植物全世界共有 11 种,且全部分布于北半球。到目前为止,已对 10 种红豆杉植物的细胞与组织培养进行了研究(包括胚培养和胚状体培养)<sup>[8]</sup>。我国有 4 种及一变种,即东北红豆杉、云南红豆杉、西藏红豆杉、美丽红豆杉和红豆杉,这些植物都被证明含有紫杉醇或其类似物<sup>[9]</sup>。但是,由于红豆杉植物本身

所具有的特殊性质,如为木本、裸子植物等,给红豆杉的细胞培养研究带来了一定的困难。尽管如此,经过众多植物工作者的努力,至今已取得了一些令人振奋的结果。有关红豆杉的愈伤组织的诱导及培养,培养细胞中紫杉醇的分析检测,提高培养细胞中紫杉醇含量的方法以及胚培养等,最近已有了报道<sup>[8,9]</sup>,特别是甘和郑<sup>[8]</sup>从细胞工程学的角度进行了较全面、详细的介绍。本文主要从植物细胞培养和生化工程的角度,结合有关红豆杉细胞培养的最新动态进行讨论,以便加速实现用植物细胞培养手段进行紫杉醇的商业化生产。

## 3 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的最新研究动态

下面就红豆杉培养细胞的育种、细胞悬浮培养的动力学研究、培养过程偶合、引发、中间补料培养、高浓度培养、以及生物反应器中的培养这些方面进行介绍,力求避免与已有的综述内容相重复。

### 3.1 育种

建立高产、稳定的细胞株是培养体系的一个关键。目前,有关紫杉醇高产细胞株的选育基本上还限于自然选育。日本钢铁公司从短叶红豆杉 (*T. brevifolia*) 和东北红豆杉 (*T. cuspidata*) 中诱导获得愈伤组织,他们筛选得到的细胞 4 周后增殖 5 倍,紫杉醇的含量为 0.05%,比原植物树皮高出 10 倍<sup>[10]</sup>。Ketchum 等<sup>[11]</sup>从 6 种紫杉属植物中进行愈伤组织的诱导,以后他们获得了 37 个细胞株均能生产紫杉醇,其中 2 个细胞系悬浮培养分别超过 29 个月和 16 个月,在 21 天的培养中可生产紫杉醇多于 20mg/L。另外,中科院昆明植物所经过几年的研究,通过对多种红豆杉的不同外植体进行愈伤组织诱导、培养和液体培养,筛选出了紫杉醇高产细胞株。

### 3.2 动力学研究

对细胞生长、产物合成及营养成分消耗

的详尽的动力学解析是生物反应器大规模培养所十分必要的一环。Shuler 等<sup>[12]</sup>对东北红豆杉细胞培养中的营养成分的消耗规律进行了探讨。这些成分包括蔗糖、葡萄糖、果糖、磷源、氮源及钙、镁和铁离子。另外他们发现摄氧率与紫杉醇在培养中的分泌时期相关。Fett-Neto 等<sup>[13]</sup>也在东北红豆杉细胞悬浮培养中考察了紫杉醇的生产、细胞生长及营养基质消耗的动力学。他们的结果表明：细胞生长的倍增时间约为20天；在培养过程中单位克细胞干重的紫杉醇的含量最高为4微克；紫杉醇总生产量为0.15mg/L，其中66%分泌在培养基中、34%的产物在胞内。

### 3.3 生物过程偶合

生物过程偶合在近年受到极大关注，它是一种有前途的培养策略。在第一个申请用红豆杉细胞培养进行紫杉醇生产的专利中，Phyton Catalytic 公司就利用了 Amberlite XAD-2来吸附培养基中的紫杉醇，以解除产物可能的阻遏作用，提高了产率<sup>[14]</sup>。日本油脂公司也在红豆杉细胞培养中采用了一种能吸附酚类代谢物并能回收紫杉醇成分的物质<sup>[15]</sup>。美国Rutgers大学的H.Pedersen教授等讨论了应用液液分相体系进行胞外紫杉醇蓄积再分布的可能性<sup>[16]</sup>。

### 3.4 引发(Elicitation)

在一些植物细胞培养的场所，通过向培养液中添加引发物(或称诱导子, elicitor)可有效地提高代谢物的产率。在此，关键是找到一种合适的引发物。Christen和Gibson通过向短叶红豆杉培养液中添加灭菌过的壳囊孢属(*Cytospora abietis*)菌丝均浆液可导致紫杉醇的快速生产<sup>[14]</sup>。在*T. media*和加拿大红豆杉的两种培养液中，也可通过添加真菌抽提物促发紫杉烷类产物的形成<sup>[17]</sup>。类似的结果在其它场合也得到了报道<sup>[18,19]</sup>。

### 3.5 前体添加

这里指的是在培养过程中添加有利于产物蓄积的一些前体物质。比如，添加前体醋酸

盐有利于紫杉醇类物质的生产<sup>[17]</sup>；添加果糖，据称也有相仿的效果<sup>[12]</sup>。当然，从细胞培养工程角度，前体添加的策略是十分重要的。

### 3.6 高浓度培养

在东北红豆杉细胞培养中，Park 等<sup>[20]</sup>考查了培养基中起始糖浓度对细胞生长和紫杉醇形成的影响。他们的结果表明：在起始糖浓度20~100g/L范围内，当糖浓度为40g/L时，比生长速率达最大、为0.017/天，细胞浓度在60g/L糖浓度时达最大、为34g/L。高浓度糖提高了紫杉醇的产量，在80g/L糖时，产量为1.36mg/L，细胞内紫杉醇的含量为0.01%。

### 3.7 生物反应器培养

目前已出现应用生物反应器进行红豆杉属细胞培养生产紫杉醇的报道。Yoon & Park<sup>[21]</sup>在5升反应器培养中，*T. media* cv. *Hicksii*细胞的接种量为33.3%，经10天培养后，细胞干、湿重均可约增至4倍。但是紫杉醇产率不高，胞外紫杉醇类总量在第9天达最高，为1.8ppm，胞内在第8天为最大，为0.35ppm。昆明植物所在10升的生物反应器培养中，细胞生长和紫杉醇生产与摇瓶培养结果大致相同，达到了较为理想的水平(unpublished data)。

## 4 今后展望

从以上所述可以看到，有关红豆杉细胞培养生产紫杉醇的进展的确十分喜人，呈现了实际工业化生产的可能性。当然，目前的研究还有待于进一步的深入，以促使植物细胞培养生产紫杉醇的早日商业化。这需要植物生物工作者和工程技术人员等多方面的紧密合作。我们认为下一步的策略是如何实现生物反应器的理想放大。具体地说，以下几方面的课题需要作进一步探讨：

① 高产细胞株的进一步筛选。

② 生物反应器中培养环境的优化。这些包括反应器的结构、供氧条件和培养的剪切

环境<sup>[21]</sup>等等。

③培养过程的检测、模型化和控制。在植物细胞培养中,这方面的报道还很少,它对进一步提高培养效率、实现培养过程的人为调控是十分重要的<sup>[22]</sup>。

④进行生物反应器中培养细胞生理学和代谢规律的研究。

⑤反应器放大规律的研究。这主要是侧重于结合细胞培养过程,确立和验证关键放大因子。

致谢:笔者钟建江感谢国家教委留学回国人员基金的资助。昆明植物所的研究工作得到中科院“八五”攻关项目的资助,也特此鸣谢。

#### 参 考 文 献

- [1] Edgington, S. M. *Bio/Technol.*, 1991, 9(10), 933—4, 936, 938.
- [2] Wani, M. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, 93(9), 2325~2327.
- [3] 陈未名. *药学学报*, 1990, 25(3), 227~240.
- [4] Borman, S. *Chem. & Eng. News*, 1991, 69(35), 11~18.
- [5] Cragg, G. M. et al. *J. Nat. Prod.*, 1993, 56(10), 1657~1668.
- [6] Flam, F. *Science*, 1994, 263, 911.
- [7] Stierle, A. et al. *Science*, 1993, 260, 214~216.
- [8] 甘炳远, 郑光植. *国外医药·植物药分册*, 1994, 9(4), 156~9.
- [9] 康强胜, 侯嵩生. *天然产物研究与开发*, 1993, 5(3), 61~8.
- [10] Saito, K. et al. (Nippon Steel Corp.) 专利 WO93—13961.
- [11] Ketchum, R. E. B. & Gibson, D. M. *Plant Physiol.*, 1994, 105(1), Suppl., 49.
- [12] Shuler, M. L. et al. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 1994, 207 Meet., Pt. 2, BTEC21.
- [13] Fett-Neto, A. G. et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 44, 205~210.
- [14] Christen, A. A. et al. *US. Patent* 5019504.
- [15] Nippon-Oil Co. 专利 JP5244-971.
- [16] Collins, M. et al. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 1994, 207 Meet., Pt. 2, BTEC25.
- [17] Pennsylvania State Res. Found. 专利 WO9323—555.
- [18] Yoon, S. Y. & Park, J. M. *Proc. Asia-Pacific Biochem. Eng. Conf. (Singapore)*, 1994, June, 68~70.
- [19] Chang, C.-J. et al. 1994. *Abstr. International Congress of Plant Tissue & Cell Culture (Firenze, Italy)*, 1994, June 12—17, P242, S18—29.
- [20] Park, I.-S. et al. 1994. *Proc. Asia-Pacific Biochem. Eng. Conf. (Singapore)*, 1994, June, 131~133.
- [21] Zhong, J.-J. et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 44, 649~654.
- [22] 钟建江等. *工业微生物*, 1995, 25(1), 25—29.