36 Lin Yun-lian, et al. CA 109:54992n
37 Lin Yun-lian, et al. Heterocycles, 1988, 27(3):779
38 Lin Yun-lian, et al. Chem Pharm Bull, 1988, 36(7):2642
39 Lin Yun-lian, et al. Chem Pharm Bull, 1989, 37(3):582
40 Cole M. D. et al. Phytochem, 1990, 29(6):1793
41 Maria C. de la Torre, et al. Phytochem, 1992, 31(10):3639
42 Anderso James C, et al. CA 112:52277w
43 Klaus W, et al. CA 84:86745r
44 Kuo Yueh-hsiceng, et al. Chem Pharm Bull, 1988, 36(9):3619
45 Lin Yun-lian, et al. Planta Med, 1987, 53(6):507
46 许益民,等. 天然产物研究与开发,1992. 4(1):1
47 Ryu SH, et al. Planta Med, 1985, 51(5):462
48 Michinori K, et al. Planta Med, 1981, 47(2):194
49 Michinori K, et al. Chem Pharm Bull, 1985, 33(6):2411
50 周如珍,等. 中成药,1991,13(1):28
51 李忠,等. 中西医结合杂志,1989,9(11):698
52 Cole MD, et al. Phytochemistry, 1991, 30(4):1125
53 董建萍,等. 中草药,1992,23(12):619
54 Tomimori T, et al. Chem Pharm Bull, 1988, 36(9):3654
55 Wang Yung-qi, et al. Chem Pharm Bull, 1988, 36(8):3206
56 Popova TP, et al. CA 77:2787a
57 Nicollier C. F, et al. CA 95:183870n
58 Tomimori T et al. Chem Pharm Bull, 1986, 34(1):406
59 Davydor VS, et al. CA 116:2318K
60 刘美兰,等. 药学学报,1984,19(7):545
61 刘美兰,等. 中草药,1986,17(10):6
62 刘美兰,等. 药学学报,1986,21(9):706
63 于留荣,等. 药学学报,1984,19(5):397
64 刘永隆,等. 药学学报,1984,19(11):830
65 Popova TP, et al. CA 78:40407e
66 Beshko NP, et al. CA 84:27991v

# 242 红豆杉的细胞工程学研究进展

甘烦远 郑光植
(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

**摘 要** 利用红豆杉 Taxus 的培养细胞作为提取抗癌新药紫杉醇(Taxol)的原料来源的研究已取得了极大进展。到目前已知对红豆杉属的10个种或变种进行过细胞培养的研究,有些种培养细胞的紫杉醇含量高于原植物。通过加入生物合成前体和/或真菌诱导子等措施可以显著提高红豆杉培养细胞中紫杉醇的含量。紫杉醇酶标免疫含量测定的研究成功标志着培养细胞中紫杉醇的微量含量测定可以快速进行,为快速筛选高产紫杉醇细胞系提供了有力的检测手段。红豆杉的毛状根培养、固定化培养及胚培养等均已研究成功,为生产紫杉醇提供了多条途径。

**关键词** 红豆杉 紫杉醇 细胞培养 毛状根培养 胚培养

红豆杉属 Taxus 植物含有很多具有抗肿瘤活性的二萜化合物,其中以紫杉醇(Taxol)的活性最强[1]。对紫杉醇的化学、药理及临床均进行了详细的研究[2],并且已于1992年底被美国FDA批准为抗晚期卵巢癌新药上市[3]。但是,由于生产紫杉醇的资源——短叶红豆杉 Taxus brevifolia 树皮极其有限,并且含量极低[4],虽然后来又从不同的红豆杉植物或不同的生长部位中分离到紫杉醇[1,5],但紫杉醇仍供不应求,限制了它对其它癌症的临床研究。目前,紫杉醇的半合成虽然已成功[6],但其半合成的底物之一,10-去乙酰浆果赤霉素Ⅲ(10-deacetyl baccatin Ⅲ)仍要从欧洲红豆杉 T. baccata 等同属植物中才得到。化学全合成研究工作极其复杂,虽然亦有较大进展,但直到现在还未见报道成功[7,8]。红豆杉的栽培工作,尽管在扦插繁殖、选育优良品系等方面已取得一些进展,缩短了从种子到苗期的时间,但仍要5年以上才能收获,并且要占用很多土地。因此在今后一段时间内,紫杉醇的供给仍是很困难的事。近年来开展的

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

红豆杉细胞工程学的研究工作，利用红豆杉的培养细胞作为提取紫杉醇的原料来源，弥补红豆杉资源的不足，保护红豆杉的野生资源及其生存的生态环境已取得了很大进展[4,9,10]。本文拟报道此方面的研究进展。

## 1　红豆杉愈伤组织的诱导

红豆杉为红豆杉科红豆杉属植物，全世界约有11种，我国有4种及1变种[11]。到目前为止，已进行过下列10种红豆杉植物的细胞与组织培养研究(包括胚培养及胚状体培养)。

1. 短叶红豆杉 T. brevifolia，又称太平洋紫杉(Pacific yew)[9,12]。

2. 东北红豆杉 T. cuspidata，又称日本紫杉(Japanese yew)[10,13]。

3. 加拿大红豆杉 T. canadensis[10]。

4. 欧洲红豆杉 T. baccata，又称浆果红豆杉[14,15]。

5. 云南红豆杉 T. yunnanensis[14,16]。

6. 红豆杉 T. chinensis[14,16]。

7. 南方红豆杉 T. chinensis var. mairei，又称美丽红豆杉[16]。

8. T. media[17]。

9. T. media cv. Hicksii[18~20]。

10. 佛罗里达红豆杉 T. floaridana，又称佛罗里达紫杉(Florida yew)[21]。

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，因此，诱导红豆杉植物的愈伤组织是比较困难的，不同的红豆杉或不同的器官、组织及生长部位，外植体内紫杉醇的含量等等，对诱导愈伤组织的培养基组成、激素的种类、浓度及其组合、培养条件均不尽相同，给红豆杉的细胞培养研究带来了一定的困难。

迄今为止，选用的作为诱导红豆杉愈伤组织的外植体有红豆杉的针叶、幼茎、树皮、形成层、种子及假种皮等[9,10,12]，其中以幼茎、形成层或树皮诱导愈伤组织的效果较好，诱导率亦较高，其它的外植体诱导愈伤组织的效果较差或根本诱导不到愈伤组织。

诱导红豆杉愈伤组织使用过的培养基有：MS、B5、SH、6，7-V、Harvey、McCown等[12,13,16]，其中以B5、SH及6，7-V为佳，诱导率亦较高。培养基中激素的组成、浓度或组合对愈伤组织的诱导起着重要作用。一般来说，培养基中含1.0～2.0mg/L 2,4-D或含有2,4-D的激素组合，对愈伤组织的诱导极为有利，诱导率亦最高[10,12]。其它的激素如KT、NAA等对诱导愈伤组织亦有一定的作用。

已有报道表明[12]，外植体中紫杉醇的浓度对愈伤组织的诱导率没有明显的影响。愈伤组织诱导的最佳培养条件是：温度20～25℃，黑暗，培养基pH5.6～5.8。

## 2　愈伤组织培养

对诱导红豆杉愈伤组织而言，可利用多种培养基。但对愈伤组织的培养，维持其正常生长来说，绝大多数报道的均是基本的或经改良的B5培养基[10,12]，少数适用的还有SH等培养基[13]，其他培养基对维持愈伤组织的正常生长效果均不是很好。同样，培养基中含有1.0～2.0mg/L 2,4-D或5mg/L左右的NAA，或含有上述浓度的2,4-D或NAA的激素组合，对愈伤组织的正常生长是必需的[12,13]。如太平洋紫杉培养细胞要求的最佳培养基是：B5＋2%蔗糖＋0.1% CA(酪蛋白氨基酸)＋1.0～2.0mg/L 2,4-D[10]，而日本紫杉的培养细胞的最大细胞生物量是在SH＋5mg/L NAA，20℃，黑暗中培养4周后获得[13]。其它较适用的激素还有：KT、BA和$GA_3$等。光在通常情况下[12]，抑制愈伤组织的生长，在20℃下培养的愈伤组织有时比在25℃下培养生长得更快[13]。外植体中紫杉醇的含量不影响愈伤组织的继代生存能力[12]。以茎或形成层诱导的愈伤组织生长最好[9]。虽然理论上存在细胞的产物全能性，但一般情况下，选择紫杉醇含量较高的外植体，然后诱导愈伤组织并培养，可望从中更快地筛选到含紫杉醇高的培养细胞无性系[4]。

在愈伤组织继代培养过程中，愈伤组织会经常分泌色素或一些酚类物质到培养基中去，即使频频继代亦是如此[19]，是造成红豆杉培养细胞生长缓慢的主要原因之一。在培养基中添加一些还原剂或酚类吸收成分的物质等可以部

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

分地解决这些问题[10]。培养基中添加高含量的硝酸铵可以明显提高培养细胞的生长速率[9]，附加0.1%～0.2%CA也可以提高细胞的生长[10]。

## 3 培养细胞中紫杉醇的检测

由于红豆杉植物中紫杉烷(taxane)类化合物极多，它们结构相似并且复杂，因此使从中分离、纯化紫杉醇比较困难，工艺亦比较复杂、繁琐。而要定量地测定红豆杉中紫杉醇的含量就更困难了。不过，红豆杉培养细胞中的相对成分较为简单，因此从中提取紫杉醇的工艺或对培养细胞中紫杉醇的含量测定亦相对简单些。目前对红豆杉植物或培养细胞中紫杉醇的含量测定多采用HPLC法[10,19]。利用HPLC法测定紫杉醇的含量，要求样品的前期处理比较简单，分离效果亦较好，所需的样品量亦较少，但比较费时。近年来研究成功的采用ELISA法测定紫杉醇的含量，最低检出量可低至5ng[4,22]，其灵敏度极高，并且快速准确，为快速检测培养细胞中紫杉醇的含量提供了有力的手段，也为快速筛选高产紫杉醇细胞系提供了根本保证。

利用HPLC法，结合各种光谱和化学分析，已从一些红豆杉的培养细胞中分离到紫杉醇，有些培养细胞中紫杉醇的含量还要高于原植物的含量。如日本学者对太平洋及日本紫杉的组织培养，得到的培养细胞中紫杉醇的含量高达0.05%，比原植物的含量高5倍[13]；加拿大红豆杉和日本紫杉培养细胞中紫杉醇的含量为0.02%，亦高于原植物的含量[10]；T. media cv. Hicksii培养细胞中紫杉醇的含量为0.009%，高于原植物的3倍[19]。从培养细胞中除了得到紫杉醇之外，还分离到一些其他的化合物，如蜕皮激素及其它的紫杉烷化合物[23]。可以预料，通过采取各种措施，如筛选高产细胞系、加入生物合成前体、改变培养条件等等，肯定会使紫杉醇的含量进一步得到提高。

## 4 提高培养细胞中紫杉醇含量的方法

### 4.1 加入紫杉醇生物合成的前体

对紫杉醇进行了生物合成的一些研究[24]。加入[$^{14}$C-]标记的前体，如苯丙氨酸、亮氨酸等，在体外试验中，已表明能提高[$^{14}$C-]紫杉醇的形成[25]。在日本紫杉的组织培养中，加入紫杉醇侧链合成的前体，也能明显增加培养细胞中紫杉醇的含量[26]。加入前体的研究不是很多，但可以肯定，加入紫杉醇的生物合成前体进行生物合成或生物转化的研究可以提高紫杉醇的含量。

### 4.2 加入诱导子

在红豆杉培养细胞中加入一些生物性或非生物性诱导子，如座线孢属、青霉菌属、硫酸钒、3,4-二氯苯氧基二乙基胺等[9]，可以提高太平洋紫杉培养细胞中紫杉醇的含量，同时可以诱导紫杉醇分泌到培养基中，每升培养基可产生1.0～3.0mg紫杉醇，相当于20kg太平洋紫杉树皮的产量。加入一些寡糖混合物也可以明显提高体外试验系统中紫杉醇的含量[25]。

### 4.3 筛选高产紫杉醇细胞系

虽然到目前为止，还没有见到利用诸如平板培养等先进手段来筛选高产培养细胞中紫杉醇高产细胞系的报道。但利用愈伤组织的变异及异质性，已得到一些紫杉醇含量比较高的细胞无性系[19]。要使培养细胞中紫杉醇的含量有本质的提高并且产量稳定，从单细胞水平上筛选高产紫杉醇细胞系是必须要进行的，利用培养细胞的自然变异或采用各种物理的或化学的诱导方法可以达到这个目的[4]。

### 4.4 诱导产物外渗

上面已提及，加入诱导子可以诱导紫杉醇向培养基分泌，这样可以直接从培养基中提取紫杉醇。如利用Amberlite XAD-2吸收培养基中的紫杉醇，然后再用二氯甲烷从中提取紫杉醇[9]，这样可以延长培养细胞的生长时间，增加紫杉醇的产量。加入一些诱导外渗物质或进行固定化培养等方法也可以使紫杉醇向培养基中分泌。

### 4.5 改变培养条件及培养方法

培养基的组成以及各种培养条件都可以影响培养细胞中紫杉醇的含量。上面已提到培养基、激素种类、浓度以及其组合对愈伤组织诱导及培养的影响，一般来说，这些适应培养细胞生

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

长的条件也适应培养细胞中紫杉醇的生产。也有报道提及，喷洒 $GA_3$ 可以提高 T. media 针叶中紫杉醇的含量[27]。

改变培养方法也可以影响培养细胞中紫杉醇的含量。如固定化培养在玻璃纤维珠上的日本紫杉细胞，可以连续培养6个月，其中紫杉醇的含量可达0.012%[10]。红豆杉的毛状根培养是利用发根土壤杆菌 Agrobactium rhizogenes 感染红豆杉的不同生长部位或培养细胞后得到的激素自养型毛状根，其特点是毛状根分枝多，生长快。毛状根亦具有合成紫杉醇的能力，并且其含量要高于原植物的含量[4]。毛状根培养是红豆杉组织培养的另一种重要的手段，但由于在扩大培养时要求的生物反应器比较严格，限制了其培养的规模。随着这些问题的解决，毛状根将与培养细胞一样，成为提取紫杉醇的原料的重要来源。

## 5　红豆杉的胚培养研究

除了利用红豆杉培养细胞生产紫杉醇之外，对红豆杉细胞工程学的研究还有其他的方面。胚培养就是其中研究得较多的一个。Flores 等对不同红豆杉进行了胚培养的详细研究[17,20,21]，得到了胚萌发的最佳培养条件，从胚萌发的实生苗中，经放射前体研究证明，具有合成紫杉烷类化合物的能力。此外对红豆杉还进行了胚状体的研究[15,21]。这些研究对解决红豆杉资源的不足都有一定的意义。

## 6　结束语

尽管对红豆杉的细胞培养进行了较全面深入的研究，结果亦较为丰富，但目前红豆杉培养细胞的生长，特别是紫杉醇的含量均还较低。只有在这两方面的研究都取得了较好的进展之后，红豆杉的组织培养才会有一个飞跃，红豆杉培养细胞的工业化生产也有望实现了。

## 参考文献


1　陈未名．药学学报，1990，25：227
2　俞天骥．国外医学，药学分册，1993，20：72
3　胡润生．国外医药，植物药分册，1993，8：136（Scrip 1993，1783/1784：27）
4　Edgington SM. Bio/Technology，1991，9：933
5　Vidensek N，et al. J Nat Prod，1990，53，1609
6　Denis JN，et al. J Am Chem Soc，1988，110：5917
7　Wender PA，et al. J Am Chem Soc，1992，114：5878
8　韩广甸，等．有机化学，1993，13：337
9　Christen AA，et al. U.S. Patent 1991，5019504
10　Fett-Neto AG，et al. Bio/Technology 1992，10：1572
11　中国科学院中国植物志编委会．中国植物志．第七卷 北京：科学出版社，1978. 438
12　Gibson DM，et al. Plant Cell Reports，1993，12：479.
13　Saito K，et al. XV International Botanical Congress Abstracts，Yokohama，Japan，1993. 372
14　郑光植，等．中国植物学会六十周年年会学术报告及论文汇编．北京：中国科技出版社，1993. 390
15　尹光初．中国植物学会60周年年会学术报告及论文汇编．北京：中国科技出版社，1993. 497
16　朱蔚华，等．中药材，1991，14：5
17　Flores T，et al. Plant Physiology，1992，99：supp29
18　Wickremesinhe ERM，et al. In Vitro，1991，23(3) Ⅱ，109A
19　Wickremesinhe ERM，et al. Plant Physiology，1991，96：supp96
20　Sgrignoli P，et al. Plant Physiology，1991，96(1)：supp，97
21　Flores T，et al. Plant Physiology，1993，102：supp98
22　Jaziri M，et al. In Vitro，1991，27(3)，Ⅱ，109A
23　Gibson D，et al. Plant Physiology，1991，96：supp，96
24　Floss HG. XV International Botanical Congress Abstracts，Yoohama：Japan，1993. 105
25　Strobel GA，et al. Plant Science，1992，84：65
26　Fett-Neto AG，et al. Plant Physiology，1993，102：supp97
27　Collins M，et al. Plant Physiology，1993，102：supp96



# 欢迎订阅

国家医药管理局中草药情报中心站主办的《中草药》、《国外医药·植物药分册》杂志。


© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net