

红豆杉生物工程的研究进展*

甘烦远 沈月毛 郝小江

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

ADVANCE ON STUDIES OF BIOTECHNOLOGY FROM TAXUS

Gan Fanyuan Shen Yuemao Hao Xiaojiang

(Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Kunming 650204)

关键词 红豆杉, 紫杉醇, 生物合成, 生物工程

Key words *Taxus*, *Taxol*, Bio synthesis, Biotechnology

自从紫杉醇(*taxol*, 又称 paclitaxel, 结构见图 1) 被批准作为植源性抗癌药应用以来, 由于其天然资源的限制, 使得近几年来对寻找及扩大紫杉醇药源途径的研究取得了极大的进展。这些途径大致包括: (1) 筛选高产量红豆杉(*Taxus*) 栽培品种, (2) 化学合成, (3) 生物技术, (4) 微生物生产。在这些研究领域特别是生物技术研究领域中, 由于目前对紫杉醇的生物合成及关键酶研究所取得的进展, 已使人们相信通过基因工程手段作为最佳生产紫杉醇药源途径之一, 在不久的将来将会变为现实。本文报道的就是有关紫杉醇在生物工程方面的研究进展概况。

1 研究简史

红豆杉体外培养的研究始于 50 年代初, Larue 和 Tuleke 分别于 1953 年和 1959 年首先对红豆杉配子体及花粉进行了体外培养研究。自 1970 年以来, Le Page-Degivry 先后发表了一些有关红豆杉胚萌发的研究报道, 首篇有关愈伤组织增殖的报道发表于 1973 年, 随后 David 亦进行了一些研究, Amos 及 Barnes 分别于 1981 年及 1983 年报告了红豆杉的微繁殖研究结果^[1]。1989 年, Christen 等首次报道了通过红豆杉细胞培养方法生产紫杉醇的研究情况^[2]。1991 年以来, 有关红豆杉组织及细胞培养研究的文献报道逐年增加, 1994 年达到高峰, 据不完全统计, 目前已超过 100 篇。第 1 个有关通过组织培养生产紫杉醇的专利^[3]于 1991 年由美国的 Phyton Catalytic 公司申请并被批准。到目前为止, 申请并被批准的专利已超过 20 个, 其保护的经营范围包括红豆杉组织及细胞培养生物工程研究的几乎所有内容。1992 年, Zamir 等首次报告了有关紫杉醇生物合成的研究情况^[4], 1993 年后, Bloss 等发表了有关紫杉醇生物合成研究

收稿日: 1997-10-13, 修回日: 1998-06-22。第一作者: 男, 34 岁, 副研究员, 主要从事植物次生代谢产物的分子生物学研究。

* 中国科学院生物科学与技术研究特别支持费项目(STZ-1-11)和云南省人才培养基金及应用基础研究基金项目(97C025G)。

的数篇文献,基本阐明了紫杉醇生物合成途径框架^[5,6]。1992年,Croteau等首次证明从红豆杉树皮中提取到的粗酶提取物能催化 GGPP 进行环化反应,随后又证明从 GGPP 环化至 4(5),11(12)-taxadiene 是紫杉醇生物合成的一个限速步骤^[7],并于 1996 年首次成功克隆环化酶的 cDNA^[8],最近又成功地分离到了限速酶的基因^[9]。

2 红豆杉的细胞、组织及器官培养

通过不同的途径如脱分化及分化培养均可获得红豆杉的不同培养材料。用于诱导培养物的不同外植体可包括年幼的(如未成熟配子体、胚及实生苗等)及成熟的(如针叶、茎及皮层组织等)植物材料。

2.1 脱分化培养

到目前为止,所有不同种红豆杉均已建立起脱分化的愈伤组织及细胞悬浮培养系统。在诱导及维持红豆杉愈伤组织及细胞悬浮培养的培养基中,多数采用 B₅MS 及 WPM(木本植物培养基)等培养基,在这些培养基中经常添加一些有机添加剂^[1,10],如水解酪蛋白(CA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、ABA 及其他植物生长调节剂来刺激细胞的生长。Wickramesinhe 等筛选到一种驯化的愈伤组织无性系,此无性系可在不含激素的培养基中生长^[11]。有的无性系具有特定的器官组织结构^[12],因而又称为假的愈伤组织无性系。约有 10 个专利描述了红豆杉细胞脱分化培养情况。

在红豆杉组织接种后,经常会观察到细菌特别是真菌的污染。据知,目前从短叶红豆杉(*T. brevifolia*)中至少已分离到 300 种以上的内生真菌^[13]。因此外植体特别是老的外植体受这类真菌的污染是经常会出现的。

2.2 红豆杉植株的再生及繁殖

人们知道,次生代谢产物的生物合成及积累通常产生在植物发育的特定阶段的特殊器官及组织中,因此,利用分化的培养物生产次生产物可能要比脱分化的更为优越。红豆杉树因为生长很慢,并且种子要有一个很长的休眠期(1~2 年)才能萌发,因此改良其繁殖方法也是必要的。

1970 年 Le Page-Degivry 首次报道了欧洲红豆杉(*T. baccata*)合子胚的萌发情况,一旦内源 ABA 从成熟胚中除去,胚即可萌发^[1]。20 年后, Flores 利用短叶红豆杉和 *T. xmedia* 的未成熟胚作为研究萌发的材料,从早期萌发的胚中大约有 30% 形成完整实生苗^[14],类似的结果在其他红豆杉种中也有报道^[15]。Zhiri 等发明了一种简单有效的体外打破欧洲红豆杉种子休眠的方法:成熟胚用水龙头洗 7 天后放在改良的 MS 或 Heller 培养基中培养 7 天,胚的萌发率达 100%^[16]。

1995 年 Chee 等^[17]报道了短叶红豆杉组织培养的器官发生情况,合子胚在附加 10 μmol/L BA 的 1/2 B₅ 培养基中培养 14 天后,形成了不定丛芽;再经 3 个月的培养之后,大约 58% 的不定芽形成根,并且形成的小植株能健康生长。

Cardeira 等研究了 *T. xmedia* 的微繁殖方法,他们证明培养基中不同盐浓度对芽产生有不同作用,他们首先在含 1 mg/L KT 和 20 g/L 蔗糖的 Hoagland 培养基中诱导出苗,然后降低盐浓度可诱导根形成^[18]。Shimomura 等用东北红豆杉(*T. cuspidata*)作为植物材料亦建立了一套红豆杉微繁殖方法。

在 2,4-D (1 mg/L) 和谷氨酰胺存在下,从佛罗里达红豆杉(*T. floridana*)愈伤组织中可形成胚状体的悬浮培养细胞^[19]。有两个专利^[20,21]也描述了红豆杉体外胚状体的形成:利用未成熟胚作外植体,在 2,4-D 和 BA 的存在下,经 6 个月的培养,体外胚即可形成。

2.3 根癌及发根农杆菌的遗传转化

利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*A. rhizogenes*)的不同野生型株系均可成功地转移外源 DNA 进入红豆杉基因组中。Han 等于 1994 年描述的转移方法包括:利用短叶红豆杉和欧洲红豆杉成熟的茎切段作为开始材料,然后用 *A. tumefaciens* 的 Bo542 菌株感染,在欧洲红豆杉中,冠瘿瘤形成率最高为 28.3%^[22]。另有一专利也描述了通过根癌农杆菌感染红豆杉产生冠瘿瘤的情况,产生的冠瘿瘤具有合成紫杉醇等化合物的能力^[23]。

红豆杉毛状根诱导也已通过使用红豆杉胚作为初始材料而得到, 其转移率(由 *A. rhizogenes* 的 ATCC39207 和 CSBpGV 3296 菌株感染)通过加入 NAA、烟草饲喂层细胞或 acetosyringone 而得以明显提高。在 609 株感染的种子中, 只有 3 株种子得以成功地转移, 转移率仅为 0.49%。在 B₅ 液体培养基中添加 0.5 g/L L-谷氨酰胺, 可使毛状根的生物量达到最高^[24]。作者描述了一种获得转移红豆杉植株的两步法: 首先从培养于含 NAA (1 mg/L) 和 BA (0.1 mg/L) 的毛状根中获得愈伤组织, 然后把组织转移至含高浓度 BA (5 mg/L) 的培养基中, 在这些条件下, 经 8 周培养后, 组织显现出绿色芽。转移的再生红豆杉植株在性状上显现一些与天然植株在器官上的不同, 特别是叶片有皱纹并且比正常表型的偏大。还有一些文献及专利也详细报道了毛状根诱导及培养的结果, 同时证明了毛状根具有合成紫杉烷类化合物的能力^[25, 26]。

3 红豆杉培养物中紫杉烷类化合物产生的分析方法

目前文献报道的分析方法包括色谱法、免疫法、细胞生物试法及微管集合试法。

在色谱法中, HPLC 仍然是测定红豆杉细胞和组织培养中紫杉烷类化合物最常用的方法^[27]。通常采用的是反相色谱法, 使用 C₁₈、苯基、氰基或 Pentafluorophenyl- 键合柱, 通常使用 UV 作为紫杉烷类化合物的鉴定及定量检测, 更尖端的色谱分析如分子团动电学色谱法^[28] 也已应用到紫杉烷类化合物的分析上。

在组织培养中需要有一种快速、灵敏和精确的筛选方法来分析大量的处理样品。免疫测定法如 ELISA 或 RIA 具有比色谱法更节省时间和劳力的优点, 需要的样品量亦较少。为此已建立起了抗紫杉烷类化合物的抗体, 抗紫杉醇、10-deacetyl baccatin III、baccatin III 或所谓“紫杉烷二核苷架”的多克隆和单克隆抗体均已研制成功。在红豆杉植株、细胞培养及生物体内检测紫杉醇及相应化合物的免疫试法已有多篇报道^[29]。

由于紫杉醇的细胞毒活性, 通过利用中国仓鼠卵巢细胞建立的一种细胞生物试法, 已用来筛选红豆杉培养物中具有生物活性的紫杉烷类化合物¹⁾。然而, 这种细胞生物试法并非是专一性的, 因为这些不参与微管稳定的具有细胞毒作用的成分同时也抑制细胞生长及分裂。Zhiri 等^[30]发明了一种微管集合试法, 用来检测欧洲红豆杉愈伤组织提取物中色谱部分的紫杉烷类化合物的生物活性。

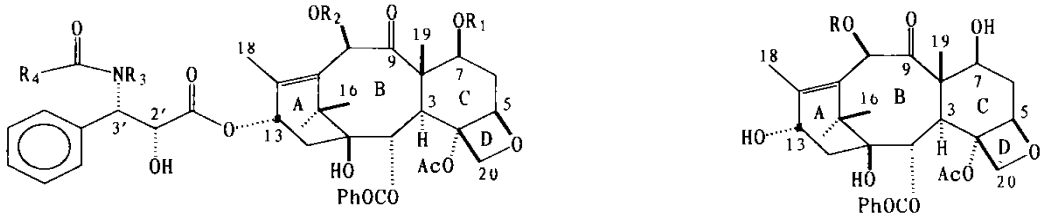
4 红豆杉培养物中的化学成分

到目前为止, 从红豆杉细胞培养物中至少已鉴定到 30 种以上的化学成分, 其中绝大多数与天然红豆杉的化学成分相同或相似(图 1), 证明了离体培养的细胞具有合成与天然植物一样的化合物的“全能性”。有些为新结构的化学成分。如 Ma 等从欧洲红豆杉细胞培养物中分离到 4 个新紫杉烷类化合物^[31], 他们的结构通过波谱分析得以证明, 两个是 taxol C 及 10-deacetyl taxol C 的 7-O-木糖配糖体, 第 3 个在侧链上有一甲基, 第 4 个, 命名为 taxcultine, 在侧链上有一 n-丙基组。所有 4 个化合物均具有提高微管凝集作用, 在 NCI 人细胞系筛选中发现 taxol C 具有良好的选择性细胞毒性。另外, 他们在美丽红豆杉 (*T. chinensis* var. *mairei*) 的细胞培养物中, 亦分离到 yunnanxane 及 4 个新的同源酯^[32]。进行红豆杉培养细胞中化学成分的研究, 不仅可以从中筛选到一些抗癌活性与紫杉醇相似, 但毒副作用更低、来源更丰富的化合物, 同时可深入进行对紫杉醇等化合物生物合成途径的探讨, 为最终通过基因工程手段来控制化合物的合成打下基础。

5 细胞生长与紫杉烷类化合物的生产

已报道的影响离体培养细胞生长速率及紫杉烷类化合物生产的因素有很多^[1, 10]。这些因素包括培

1) Shuler M L, Hirasuna T J, Willard D M. Kinetics of taxol production by tissue culture. In: Proc Natl Cancer Institute Workshop on Taxol and Taxus Alexandria VA. 1992. 20



化合物	Components	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	化合物	Components	R
Paclitaxel		H	Ac	H	C ₆ H ₅	Baccatin III		Ac
Cephalomannine		H	Ac	H	C ₄ H ₇	10-deacetyl baccatin III		H
7-xylosyl-10-deacetyl taxol		Xylosyl	H	H	C ₆ H ₅			
Taxol C		H	Ac	H	C ₅ H ₁₀			
10-deacetyl taxol C		H	H	H	C ₅ H ₁₀			
7-xylosyl taxol C		Xylosyl	Ac	H	C ₅ H ₁₀			
N-methyl taxol C		H	Ac	CH ₃	C ₅ H ₁₀			
Taxucutine		H	Ac	H	C ₅ H ₁₀			

图 1 红豆杉培养细胞中的化学成分及结构

Fig. 1 Structures of taxoids isolated from *Taxus* sp. cell and tissue

培养基成分、培养条件及培养方法、培养物的外界环境等等。可以说,影响细胞生长的一切因子亦均影响细胞中紫杉烷类化合物的积累,有时甚至不是正相关的。Ketchum 等^[33]通过改变培养基组分,建立的一种新的培养基可使红豆杉细胞生长的倍增期减少至 3.5~5.6 天,而一般红豆杉培养细胞的生长周期都在 20 天以上。Yukimune 等通过加入一种诱导子(100 μmol methyl jasmonate)可使紫杉醇的含量达到 0.6% 以上(110 mg/L),Baccatin III 的含量亦超过 0.2%,这是目前报道的紫杉醇含量达到最高的试验^[34]。同时还有不少报道已表明红豆杉培养细胞中紫杉醇的含量已超过 0.1%^[35,36],都已大大超过原植株中的含量。这些结果有力地刺激了红豆杉细胞培养向工业化生产过渡的进程。

次生代谢产物积累是产物形成、运输、贮存、循环和降解之间的一个动态平衡结果。细胞培养中紫杉烷类化合物含量低也可以归结于以下原因:细胞较低程度的分化、不适宜的发育状态、从次生代谢来的前体转移至初生代谢过程中、在脱分化细胞中关键酶的表达受到抑制或降低、或缺少合适的贮存场所等等。

紫杉醇在红豆杉植株的所有部位均存在,在植物组织或细胞培养中紫杉醇的实际贮存部位仍不十分清楚。最近,通过利用抗紫杉醇抗血清,Russin 等发明了一种在东北红豆杉组织中定位紫杉醇的免疫组织化学技术^[37]。使用低温技术和一水溶性黑色素树脂,发现紫杉醇几乎全部定位于韧皮部、维管形成层和木质部的细胞壁中,根据这些结果及紫杉醇的亲脂性质,他们认为紫杉醇或紫杉烷类化合物很可能分泌到外胞质部分中(如细胞壁),而不被胞内组分(如液泡、质粒)所吸收。由于紫杉醇影响很多有机体包括植物的微管,通过分泌使之从原生质体排入细胞壁应亦可认为是一种极佳的策略,以避免红豆杉细胞内具有生理活性的紫杉烷类化合物的毒性作用。根据这些观察结果,就应需要有更合适的紫杉烷类化合物的提取程序来加强这些化合物的恢复。但从这个免疫组织化学研究中,仍有一问题未弄清楚,即是否紫杉醇本身直接分泌到细胞壁,还是它的前体也一起分泌然后再进行修饰?在红豆杉植株中,已有实验证明紫杉醇合成最活跃的位点与其含量最高的位点不是一致的,也就是说紫杉醇可能是在植株的某一部分合成后才运输至另一部位中去的^[38]。

另外,还有报道证实,红豆杉组织或细胞培养用甲醇提尽之后,用木聚糖酶处理,这些组织能释放出具有紫杉烷类化合物抗体反应的成分^[39]。经木聚糖酶处理的组织培养物材料比对照出现多 300% 的未鉴定的紫杉烷类化合物成分。这个研究清楚地表明,显示一个免疫组织化学典型的紫杉烷环反应的相关成

分是与细胞壁及其胞外膜相联系的。

6 紫杉醇的生物合成

到目前为止,对细胞内紫杉烷类化合物生物合成的生理及发育调控的有关研究较少。然而,近来在紫杉烷类化合物生物化学领域研究所获得的结果,可能会导致在红豆杉植物和细胞培养中通过遗传修饰而大大提高这些化合物的含量。

紫杉醇及其相关的带有 C-13 位侧链化合物的生物合成途径大致可分为三个主要的生物合成步骤: (1) 紫杉环系统的生物合成, (2) 侧链的生物合成, (3) 紫杉环系统和侧链的酯化反应, 形成完整的紫杉醇分子(图 2)。

6.1 紫杉环骨架的生物合成

已知紫杉环系统是一类二萜化合物,因此它可能是通过异戊二烯途径由甲羟戊酸衍生而来的。这个已被 Zamir 等的实验所证实^[4],他们用带标记的(3R,S)(5R,S)(5-³H)甲羟戊酸接种至温室种的加拿大红豆杉(*Taxus canadensis*)的针叶中,能产生具有放射性标记的紫杉醇。

目前的实验已证明,紫杉环骨架是由 GGPP (geranylgeranyl pyrophosphate) 环化形成紫杉二烯(紫杉环骨架),然后此双萜烯中间体进行不同程度的氧化(官能化),形成完整的紫杉环系统^[7]。从太平洋紫杉(*T. brevifolia*)幼苗得到的游离细胞制备物能催化(1-³H)GGPP 形成一个环化的双萜烯,当接种到茎切段时,能以很高的放射化学产率转换成一些高度官能化的紫杉烷类化合物,如 10-deacetyl-baccatin III 及紫杉醇等。加入标记的 GGPP 到紫杉茎提取液中,并进行放射化学方面的分离,最后通过二维 NMR 光谱方法证实 GGPP 环化的产物紫杉二烯的结构为 4(5),11(12)-taxadiene。因此紫杉醇生物合成的第一步重要反应是自然界广泛存在的双萜烯前体 GGPP 环化形成 4(5),11(12)-taxadiene,而不是原先基于很多紫杉烯化合物在 4(20),11(12)位置存在的双键结构而推测的 4(20),11(12)-taxadiene^[6]。

6.2 紫杉环骨架的官能化反应

随着紫杉环骨架的建立,环上复杂的官能化反应亦随之发生。这些基团官能化包括:羟基化、羟基组上的酰基化、酮基化、苯基化以及环氧系统的生成等。目前已知的第一步官能化反应是紫杉二烯的 C-5 在细胞色素 P450 作用下的羟基化,形成 5 α -hydroxy-4(20),11(12)-taxadiene^[40]。其他的官能化反应发生的顺序目前还缺少直接的实验数据。但通过天然产生的紫杉烷类化合物的结构比较可获得一些信息^[5,6]。目前分离到的最低官能化产物至少有 3 个氧取代,于 C-5、C-10 和 C-13 或 C-2 位上,因此在反应顺序中此 3 个氧反应可能是首先进行的,然后是 C-9 位上氧化,但是存在于氧化基团上的一些酰基化反应可能先于新的氧化反应发生之前。C-7 及 C-1 位上氧化反应可能是较后进行的,后者可能甚至在氧环形成之后产生,环氧化反应及氧环形成是最后步骤,但先于 C-13 位与侧链前体的酰基化及 C-9 位上的酮基化反应^[5]。

研究清楚 C-13 位氧化顺序是非常重要的,上述推测的中间体或紫杉烷的官能化反应都不含有 C-13 位羟基,而目前从天然红豆杉中分离到的紫杉烷类化合物中绝大部分均含有 C-13 位羟基^[41]。经饲喂试验已证明诸如 taxusin^[5]等及其相应的四醇都不是紫杉醇生物合成的中间体,因此我们推测紫杉二萜中的 C-13 位羟基化,是该二萜骨架官能化作用的终止符。C-13 位羟基化反应形成之后(即形成 baccatin III)的生物合成反应在紫杉环骨架上是最没有骨架碳原子的官能化反应了。这些推测还需经过试验证明之后才能得以证实。

紫杉环骨架官能化反应的最终结果是形成紫杉醇的直接前体 baccatin III, baccatin III C-13 位羟基与侧链产生酯化反应生物合成终产物紫杉醇。这个结论已早有报道^[42]。

6.3 侧链的生物合成

早在 1966 年,Leete 和 Bodem 等就报道了紫杉烯中与紫杉醇中苯基异丝氨酸侧链相似结构的 W interstein's 酸(3-二甲氨基-3-苯丙酸)分子是从 L-苯丙氨酸而来的^[43]。后来,Zamir 等^[4]和 Strobel

等^[38]通过饲喂标记的 L-苯丙氨酸而加以证实。但是从苯丙氨酸形成紫杉醇侧链(N-苯酰基苯基异丝氨酸)的途径有两条: (1)通过 β -苯丙氨酸形成, (2)通过桂皮酸及其环氧化物形成。紫杉醇侧链通过哪条途径而来? 目前经试验已有初步的结论^[44]。1984 年, Haslam 等^[45]就发现从苯丙氨酸到 W interstein's 酸的转换源自侧链 C- 3 的前- S 氢的保留及前- R 氢的脱除。由于苯丙氨酸解氨酶是立体专一性地从苯丙氨酸 C- 3 位中移去前- S 氢(桂皮酸形成途径), 因此排除了此酶在此过程中的影响, 也就证明了桂皮酸不是 W interstein's 酸的前体。后来, Floss 等为了进一步证明侧链的来源, 合成了一系列带标记的可能的侧链合成中间体, 然后把这些前体分别饲喂到太平洋紫杉的茎及内皮层组织中, 共培养 96 小时后, 分析其中的化学成分。经分析后, 作者得出以下结论: 桂皮酸及其环氧化物未结合到紫杉醇上, L-苯丙氨酸、 β -苯丙氨酸和苯基异丝氨酸能明显地结合到紫杉醇上, 所有同位素均滞留在侧链上。这些结论无疑地表明紫杉醇侧链的酰基苯基异丝氨酸是通过 β -苯丙氨酸而来。N- 上的苯甲酰基亦是通过 β -苯丙氨酸而来的^[44]。

总之, 紫杉醇侧链是苯丙氨酸可能通过一个氨基变位酶的反应, 通过 β -苯丙氨酸而来的, 然后 C- 2 位进行羟基化反应及 N- 上的酰化反应^[45]。苯甲酰基分子也是通过 β -苯丙氨酸及可能的苯基异丝氨酸而不是通过桂皮酸而来的^[44]。

6.4 紫杉环系统与侧链的酯化反应

上面已提及, 紫杉环骨架形成及进行官能化反应后形成了紫杉醇的直接前体 baccatin III。此前体与侧链可能在酯基转移酶作用下进行酯化反应, 形成紫杉醇的一个中间体(去苯乙酰基紫杉醇)^[46], 然后此化合物侧链苯基异丝氨酸 N- 的苯甲酰化, 形成了紫杉醇。至于侧链 C- 2 位上的羟基的反应顺序, 最近经我们研究证实 C- 2 羟基在侧链与紫杉烷母核连接之前生成。

综上所述, 紫杉醇生物合成的基本途径已经明了(图 2), 但要完全研究清楚其每一步反应途径, 还需要进行大量的研究工作和加倍的努力^[47]。对紫杉醇生物合成途径的研究为我们进行其生物合成途径中关键酶的提取、分离及纯化, 最终克隆到其关键基因, 并通过基因工程手段来实现紫杉醇的工业化生产提供了基础。

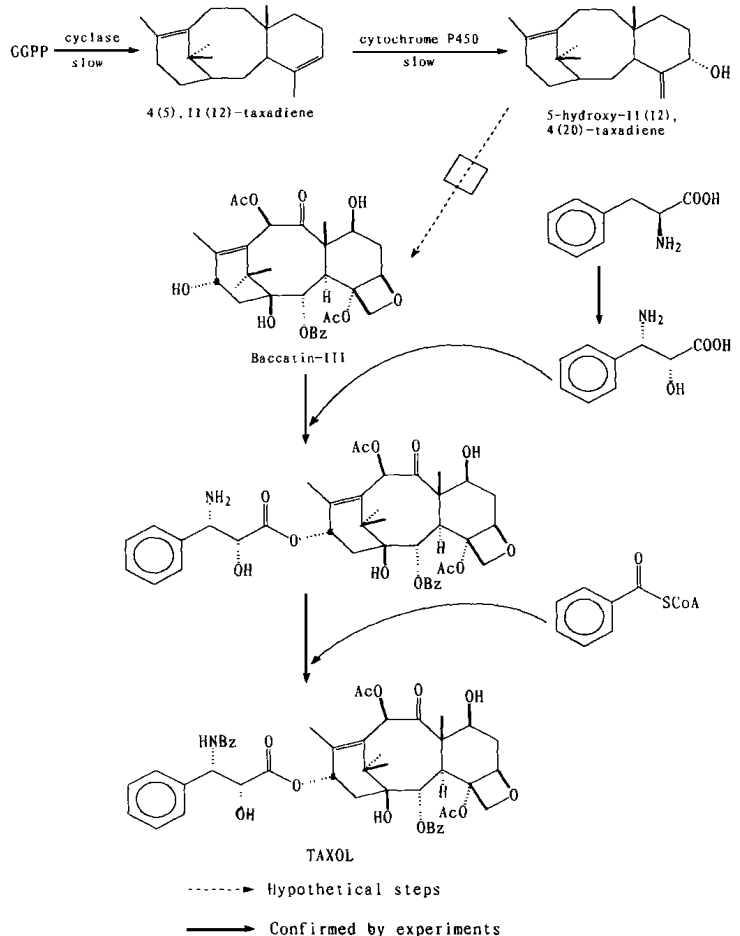


图 2 紫杉醇的生物合成途径

Fig. 2 The biosynthesis pathway of Taxol

7 紫杉醇生物合成中的关键酶

目前,对紫杉醇生物合成过程中的关键酶研究已取得一些积极进展^[8,48~50]。早在 1992 年, Lewis 和 Croteau 等人就从太平洋紫杉树皮中制备到一种粗酶提取物,这种粗酶提取物具有催化 GGPP 环化形成 4(5), 11(12)-taxadiene 的能力,只是反应的产率很低。此后他们部分纯化到了这种环化酶,又称紫杉二烯合成酶^[51],同时测定了此酶的性质。他们通过酶的催化反应证实,由 GGPP 环化成 4(5), 11(12)-taxadiene 的合成步骤是紫杉醇生物合成过程中的一个限速反应步骤^[7]。紫杉二烯合成酶与其他植物的萜类环化酶在很多性质上是相似的,但要纯化到足够量的酶来制备抗体及进行 cDNA 克隆是非常困难的。由于已经证实紫杉醇生物合成途径中,由 GGPP 环化成紫杉二烯是一个慢的或限速的反应步骤,因此增强环化反应就会提高紫杉醇的含量,所以环化酶就是一个用作基因分离的最好目标。Croteau 等在成功地分离到环化酶之后,于 1996 年又成功地克隆到了环化酶的 cDNA^[8]。为了获得相应的 cDNA 克隆,他们根据相关单萜、倍半萜及双萜环化酶一致的序列构建了一系列的简并引物。在这些引物中,两个能扩增在序列上与环化酶相似的片段的引物被用来作为筛选从太平洋紫杉茎中提取的 Poly(A)⁺ RNA 中构建的 cDNA 库的杂交探针。他们共分离到 12 个插入位点超过 1 kb 碱基对的独立的克隆,并且已部分得到他们的序列顺序。这些 cDNA 克隆中的一个在大肠杆菌中具有表达功能,产生的一个蛋白质具有催化活性,能催化 GGPP 形成 4(5), 11(12)-taxadiene。序列指定一个有 2 586 个核苷酸的公开可读的结构,一个完全推断的多肽,包括一个长的假定的质粒靶多肽,含有 862 个氨基酸残基,分子量为 98 303,而原先的酶的分子量为 79 000。与植物中单萜、倍半萜和双萜环化酶的序列相比较^[52],证明在这些酶之间具有相当高的同源性。此紫杉二烯合成酶与从冷杉中得到的一种二萜环化酶即松香烯合成酶最为相似(46% 同源)^[8]。此后,他们又成功地利用细胞色素 P450 中的氧化酶,实现了紫杉二烯中 C-5 位的羟基化,该反应也被认为是一个慢速反应^[40]。此外,有人报道在东北红豆杉(*Taxus cuspidata*) 细胞培养中,存在于微粒体中的 HMGR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase) 活性与紫杉醇积累之间的关系^[53],此酶对于甲羟戊酸的合成来说是必要的,并且在光生长的细胞中具有明显的活性。

最近,据报道美国的 CytoGenal 公司已得到产生在紫杉醇生物合成过程中关键限速步聚酶的红豆杉树基因的许可证^[9]。此基因也就是由 Croteau 等人分离到的,他们宣布:“已拥有能使我们简单地提高生产效率的基因”。虽然目前该公司尚未决定如何利用该基因,但其中一个可能是直接向产生紫杉醇的真菌中导入,以产生具有较高紫杉醇产量的转基因真菌。

因此我们可以预测,不久的将来,利用基因工程大量生产紫杉醇将成为现实。

8 体外培养生产紫杉醇的商业可行性

通过比较可利用的提取紫杉醇的资源,比如成年树(100 年老)的树皮、4 年老紫杉的针叶,可知利用红豆杉细胞培养进行商业化生产紫杉醇是可能的。迄今细胞培养中获得的最高紫杉醇含量已达 0.6% 以上,是成年树皮中含量的 35 倍以上,针叶含量的 100 倍以上^[54]。与人们所知的紫草素生产系统相比较,紫草细胞培养生产的紫草素比原植株含量高 14 倍,因此它已在工业规模上进行生产了。从文献报道上的数据来看^[53],红豆杉细胞培养能被考虑来作为一种直接生产紫杉醇的可能途径。当然,在生物量及紫杉醇产率的最佳位点上,仍需要进一步进行研究,特别是在筛选高产稳产细胞系方面的研究中,仍远远满足不了商业化生产的要求。目前最大的生产规模在 200 升左右^[54],离实际工业化生产还有相当长一段距离,而且与紫草细胞培养的工业化生产比较,红豆杉细胞培养的困难要大得多。

利用植物细胞培养方法大量生产有价值次生代谢产物的研究,至今远远不象原先人们想象中的那么理想。究其原因,我们认为除了如发酵技术、植物细胞生长特点及资金投入等等因素之外,关键仍在于人们对次生代谢产物的基础研究如生物合成途径、关键酶调控等等了解不够。因此,更加深入研究植物次生代谢产物的分子生物学是十分必要的。也许正象我们上面所述的那样,通过基因工程来大量生产紫

杉醇可能会是更佳途径。

不管怎样,当红豆杉细胞培养仍然不是一种有利可图的生产紫杉醇的方法之时,它仍然是一种了解紫杉醇生产的生物化学、酶学及分子生物学的有力工具。

9 结语及展望

在不同的组织培养系统,包括愈伤组织、细胞悬浮培养、苗、毛状根及胚状体等系统中,都已显示了具有生产紫杉醇及相关化合物的能力^[1]。今天,对于体外培养生产紫杉醇来说,细胞悬浮培养系统是较为先进的系统^[55],但是,对产物稳定性的研究迄今进行得很少。另外,红豆杉培养系统的建立,同时可以用来进行导致紫杉烷类化合物的生物合成反应。对于任何遗传工程计划来说,鉴定紫杉烷类化合物生物合成途径中的专一性关键酶是首要的研究内容。从这一点上说,在真菌中发现紫杉烷类化合物^[56,57]可认为是一个非常鼓舞人心的途径。的确,真菌和植物均能生产紫杉醇这点让人联想到在红豆杉树皮及真菌之间可能存在某些遗传交换机制。因此,在真菌中鉴定参与紫杉烷类化合物生物合成途径的关键酶可能亦是更容易达到的目标。

从以上综述我们可以看出,近年来对紫杉醇生物合成的研究已取得了极大的进展,紫杉醇生物合成的基本框架已经明了,其生物合成途径中的关键酶即环化酶的 cDNA 已经克隆成功,应用转基因的微生物来大量生产紫杉醇的曙光已经出现。

参 考 文 献

- Jaziri M, Zhiri A, Guo Y W *et al* *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1996, **45**: 59~ 75
- Christen A A, Bland J, Gibson D M. Cell culture as a means to produce taxol(Abs). *Proc Am Assoc Cancer Res*, 1989, **30**: A 2252
- Christen A A, Gibson D M, Bland J. Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture *US Patent*, 5019504, 1991
- Zamir L O, Nedeau M E, Garneau F X. Biosynthetic building blocks of *Taxus canadensis* taxanes. *Tetrahedron Lett*, 1992, **33**: 5 235~ 5 236
- Floss H G, Mocek U. Biosynthesis of taxol. In: Suffness M ed. *Taxol: Science and Applications*, London: CRC Press, 1995. 191~ 208
- Hezari M, Croteau R. Taxol biosynthesis: an update. *Planta Medica*, 1997, **63**: 291~ 295
- Koepp A E, Hezari M, Croteau R *et al*. Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxadiene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *J Bio Chem*, 1995, **270**: 8 686~ 8 690
- Wildung M R, Croteau R A. cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Bio Chem*, 1996, **271**: 9 201~ 9 204
- 孙雷心. 美国 Cytoclonal 公司试生产重组红豆杉醇. *生物技术通报*, 1997(1): 32
- 甘烦远, 郑光植. 红豆杉的细胞工程学研究进展. *国外医药·植物药分册*, 1994, **9**: 156~ 159
- Wickremesinhe E R M, Arteca R N. Habituated callus culture of *Taxus media* cv. *Hicksii* as a source of taxol. *Plant Physiol*, 1991, **96**: 96
- Smith R J. Synthesis of taxanes in culture using pseudocallus cells. *US Patent*, 5344775, 1994
- Stierle G A, Strobel G, Stierle D *et al*. The search for a taxol producing microorganism among the endophytic fungus of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J Nat Prod*, 1995, **58**: 1 315~ 1 324
- Flores H E, Sgrignoli P J. *In vitro* culture and precocious gemination of *Taxus* embryos. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, **27**: 139~ 142
- Chee P P. *In vitro* culture of zygotic embryos of *Taxus* species. *HortScience*, 1994, **29**: 695~ 697

- 16 Zhiri A, Jaziri M, Homes J *et al* Factors affecting the *in vitro* rapid gemination of *Taxus* embryos and the evaluation of taxol content in the plantlets *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1994, **39**: 261~ 263
- 17 Chee P P. Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures *Plant Cell Rep*, 1995, **14**: 560
- 18 Cerdeira R M, McChesney J D, Burandt C. Microcuttings of *Taxus × media* cv. Hicksii *In Vitro Cell Dev Biol*, 1994, **30**: 77
- 19 Salandy A, Grafton L, Uddin M R *et al* Establishing an embryogenic cell suspension culture system in Florida yew (*Taxus floridana*). *In Vitro Cell Dev Biol*, 1993, **29**: 75A
- 20 Wann S R, Goldner W R. Induction of somatic embryogenesis in *Taxus*, and the production of taxane-ring containing alkaloids therefrom. *WO Patent*, 93/19585, 1993
- 21 Lee B S, Son S H. A method for producing taxol and taxanes from embryo cultures of *Taxus* species *WO Patent*, 95/02063, 1995
- 22 Han K H, Fleming P, Walker K *et al*. Genetic transformation of mature *Taxus*: an approach to genetically control the *in vitro* production of the anticancer drug, taxol *Plant Sci*, 1994, **95**: 187~ 196
- 23 Stahlhut R W, Calif B. *In vivo* production of taxanes *US Patent*, 5279953, 1994
- 24 Plaut-Carcasson Y. Plant tissue culture method for taxol production *WO Patent*, 94/20606, 1994
- 25 Arteca R N, Wickrem sinhe E. Cultured *Taxus* tissues as a source of Taxol, related taxanes and other novel anti-tumor/antiviral compounds *WO Patent*, 93/23555, 1993
- 26 黄遵锡, 慕跃林, 周玉敏等. 发根农杆菌对短叶红豆杉的转化及毛状根中紫杉醇的产生 *云南植物研究*, 1997, **19**: 292~ 296
- 27 Ketchum R E B, Gibson D M. Rapid isocratic reverse phase HPLC of taxanes on new columns developed specifically for taxol analysis *J Liq Chromatogr*, 1993, **16**: 2 519~ 2 530
- 28 Chan K C, A Ivarado A B, McGuire M T *et al* HPLC and micellar electrokinetic chromatography of taxol and related taxanes from bark and needles extracts of *Taxus* species *J Chromatogr*, 1994, **657**: 301~ 306
- 29 Guo Y W, Vanhaelen-Fastre R, Diallo B *et al* Immunoenzymatic methods applied to the search for bioactive taxoids from *Taxus baccata* *J Nat Prod*, 1995, **58**: 1 015~ 1 023
- 30 Zhiri A, Jaziri M, Guo Y W *et al* Occurrence of 10-deacetyl baccatin III in *Taxus* callus cultures *Pham World Sci*, 1995, **17**: N 14
- 31 Ma W W, Park G L, Gomez G A *et al* New bioactive taxoids from cell cultures of *Taxus baccata* *J Nat Prod*, 1994, **57**: 116~ 122
- 32 Ma W W, Stahlhut R W, Adams T L *et al* Yunnanxane and its homologous esters from cell cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* *J Nat Prod*, 1994, **57**: 1 320~ 1 324
- 33 Ketchum R E B, Gibson D M, Gallo L G. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1995, **42**: 185~ 193
- 34 Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y *et al* Methyl jasmonate- induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures *Nature Biotech*, 1996, **14**: 11 29~ 1 131
- 35 甘烦远, 彭丽萍, 郑光植. 云南红豆杉细胞培养中紫杉醇的代谢调控 *云南植物研究*, 1996, **18**: 451~ 453
- 36 Venkataran B, Prakash G K, Marlboro M *et al* Enhanced production of taxol and taxanes by cell cultures of *Taxus* species *US Patent*, 5407816, 1995
- 37 Russin W A, Ellis D D, Gottwald J R *et al* Immunocytochemical localization of taxol in *Taxus cuspidata* *Int J Plant Sci*, 1995, **156**: 668~ 678
- 38 Strobel G A, Stierle A, Frederik J G M van Kuijk. Factors influencing the *in vitro* production of radiolabeled taxol by Pacific yew, *Taxus brevifolia* *Plant Sci*, 1992, **84**: 65~ 74
- 39 Durzan D J, Ventimiglia F. Free taxanes and the release of bound compounds having taxane antibody reactivity by xylanase in female, haploid-derived cell suspension cultures of *Taxus brevifolia* *In Vitro Cell Dev Biol*, 1994, **30**: 219~ 227

- 40 Hefner J, Rubenstein SM, Ketchum R E B *et al* Cytochrome P450 catalyzed hydroxylation of taxa-4(5), 11(12)-diene to taxa-4(20), 11(12)-diene-5- α -ol: the first oxygenation step in taxol biosynthesis *Chem Biol*, 1996, **3**: 479~ 489
- 41 Zhang J Z The chemistry and distribution of taxane diterpenoids and alkaloids from genus *Taxus Act Pham Sinica*, 1995, **30**: 862~ 880
- 42 Fleming P E, Floss H G, Haertel M *et al* Biosynthetic studies on taxol *Pure Appl Chem*, 1994, **66**: 2 045~ 2 048
- 43 Leete E, Boden G B. The biosynthesis of 3-dimethylamino-3-phenylpropanoic acid in yew. *Tetrahedron Lett*, 1966, 3925, 1966
- 44 Fleming P E, Mocek U, Floss H G Biosynthesis of taxoids: mode of formation of the taxol side chain *J Am Chem Soc*, 1993, **115**: 805~ 807
- 45 Platt R V, Opie C T, Haslam E Biosynthesis of flavan-3-ols and other secondary plant products from (2S)-phenylalanine *Phytochemistry*, 1984, **23**: 2 211~ 2 213
- 46 Fleming P E, Knaggs A R, Floss H G *et al* Biosynthesis of taxoids: mode of attachment of the taxol side chain *J Am Chem Soc*, 1994, **116**: 4 137~ 4 138
- 47 Heinstein P F, Chang C J. Taxol *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, **45**: 663~ 674
- 48 Hezari M, Lewis N G, Croteau R. Purification and characterization of taxa-4(5), 11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis *Arch Biochem Biophys*, 1995, **322**: 437~ 444
- 49 Lin X Y, Hezari M, Koepf A E *et al* Mechanism of taxadiene synthase, a diterpene cyclase that catalyzes the first step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *Biochemistry*, 1996, **35**: 2 968~ 2 977
- 50 Hezari M, Ketchum R E B, Gibson D M *et al* Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures *Arch Biochem Biophys*, 1997, **337**: 185~ 190
- 51 Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, **46**: 521~ 547
- 52 Fett-Neto A G, Pennington J J, DiCosmo F. Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata*. *J Plant Physiol*, 1995, **146**: 584~ 590
- 53 Mirjalili N, Linden J C. Gas phase composition effects on suspension cultures of *Taxus cuspidata*. *Biootechnol Bioeng*, 1995, **48**: 123~ 132
- 54 Pezzuto J. Taxol production in plant cell culture comes of age *Nature Biotechnol*, 1996, **14**: 1 083
- 55 Ketchum R E B, Gibson D M. Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1996, **46**: 9~ 17
- 56 Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, **260**: 214~ 216
- 57 Strobel G, Yang X S, Sears J *et al* Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* *Microbiology*, 1996, **142**: 435~ 440