

文章编号: 100121498(2009)0320439207

木本药用植物红豆杉研究的新进展

邱德有^{1*}, 吴小红², 黄璐琦³

(1 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 2 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 3 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 红豆杉是当今十分重要的一种木本药用植物, 从中提取出的二萜类抗癌化合物紫杉醇在全世界已广泛应用于卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等癌症的临床治疗, 效果显著。近年来, 人们还发现紫杉醇在其它疾病的治疗中也具有很好的作用。本文综述了近年来国内外在红豆杉人工栽培、紫杉醇化学半合成、红豆杉细胞培养、产紫杉醇内生真菌培养、代谢工程方面的最新研究进展, 对当前工作中存在的问题进行了探讨, 并对有关研究的发展前景进行了展望。

关键词: 红豆杉; 人工栽培; 紫杉醇; 化学半合成; 细胞培养; 内生真菌; 代谢工程

中图分类号: S795.7 **文献标识码:** A

Recent Advances in Research of the Woody Medicinal Plant *Taxus*

QIUDEYOU¹, WUXIAOHONG², HUANGLUQI³

(1 Research Institute of Forestry, CAF; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration Beijing 100091, China
2 Guang An Men Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China
3 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract *Taxus* is an important medicinal plant. Taxol (generic name paclitaxel), a complex diterpene amide derived firstly from the Pacific yew (*Taxus brevifolia*) tree, has been approved as an important pharmaceutical drug. This antitumor and antileukemic agent is effective against several cancers such as ovarian and breast carcinomas. More recently, taxol has shown promising results in drug-eluting coronary artery stents used in the treatment of diseased vasculature. In this paper, the recent research progresses in *Taxus* cultivation, Taxol chemical semi-synthesis, *Taxus* cell culture, endophytic fungus culture and Taxol metabolic engineering are surveyed. The problems and future perspectives for these research areas are discussed.

Key words *Taxus* cultivation, taxol, chemical semi-synthesis, cell culture, endophytic fungus, metabolic engineering

红豆杉 (*Taxus* sp.) 为红豆杉科 (Taxaceae) 红豆属 (*Taxus*) 的木本植物。红豆杉属植物全世界共有 11 种, 分布于北半球的温带至亚热带地区, 其中我国有 4 种和 1 个变种。Wall 等^[1] 在 1971 年从短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia* Nutt.) 树皮中分离得到二萜类抗癌化合物紫杉醇。紫杉醇抗癌的作用机制是

与细胞微管蛋白结合, 并促进其聚合, 从而抑制癌细胞的有丝分裂, 有效地阻止癌细胞的增殖。1992 年 12 月美国 FDA 批准紫杉醇作为治疗转移性卵巢癌的药物, 之后又批准可用于治疗转移性乳腺癌。国产紫杉醇注射液/紫素 0 于 1995 年 10 月开始生产。紫杉醇是一种广谱抗肿瘤药, 它已用于治疗卵巢癌、

收稿日期: 2008212208

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2007AA10Z182), 国家自然科学基金 (30671698), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2007201)

作者简介: 邱德有 (1967), 男, 福建上杭人, 研究员, 从事专业为植物生物化学与功能基因组学。

* 通讯作者 E-mail: qdyy@caf.ac.cn

乳腺癌、非小细胞肺癌、食管癌、胃癌、头颈部肿瘤、黑色素瘤、结肠癌等,新的研究成果还在不断延伸红豆杉和紫杉醇的治疗范围。据估计,全世界紫杉醇的年需求量至少在 1 000 kg 以上。

令人遗憾的是红豆杉的生长缓慢,资源量有限,特别是其紫杉醇含量低,仅占树皮干质量的 0.01%~0.02%^[2],所以,资源与开发矛盾相当突出。近年来,受利益的驱使,红豆杉的野生资源受到严重破坏,供求矛盾日趋尖锐。为了解决紫杉醇的长期供应问题,人们在人工栽培、紫杉醇化学合成(包括半合成和全合成)、内生真菌、细胞培养和基因工程等领域进行了探索,取得了不少进展^[3-6]。其中,人工栽培、紫杉醇的化学半合成已应用于生产,细胞培养、基因工程也取得了一些进展;而紫杉醇的化学全合成需近 30 步反应,尚无商业开发价值。近年来,有关方面的研究又取得了一些新进展。下面就红豆杉人工栽培、紫杉醇化学半合成、内生真菌培养、红豆杉细胞培养和代谢工程研究的最新进展作一简要的介绍和评述。

1 红豆杉的人工栽培

目前,我国广大地区已广泛开展了东北红豆杉(*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc)、中国红豆杉(*T. chinensis* (Pilg.) Rehd)、南方红豆杉(*T. chinensis* var. *mairei* Cheng et L. K. Fu)、西藏红豆杉(*T. walliiana* Zucc.)和云南红豆杉(*T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu)的人工栽培,有的面积多达 500~600 hm^2 。我国产东北红豆杉、中国红豆杉、南方红豆杉、西藏红豆杉和云南红豆杉的枝叶中紫杉醇的含量比树皮中紫杉醇的含量至少低一个数量级,通常仅为枝叶干质量的十万分之一左右;因此,红豆杉人工种植中,面临枝叶紫杉醇含量普遍偏低的问题。我国于 1996 年从国外引种了东北红豆杉和欧洲红豆杉的天然杂交种曼地亚红豆杉(*T. canadensis* Rehder)。曼地亚红豆杉的枝叶具有较高的紫杉醇含量。实际上,曼地亚红豆杉有数十个品系,其中,有一些品系如曼地亚红豆杉中的 *Taxus canadensis* Hicksii 品系紫杉醇的含量稍高,可占枝叶干质量的万分之 4 左右,而其他一些品系的紫杉醇含量也不高,应该加以区分。目前,我国广大地区人工栽植的红豆杉良种化程度很低,只要是红豆杉苗就栽,不分是否是优良种苗,所以,制定我国红豆杉种苗的标准、选择优良种苗进行栽培就显得很有必要。

人工种植需占大量土地,周期长,而且由于色素等干扰,使得从人工种植的红豆杉枝叶中提取紫杉醇及其半合成前体的难度要比从树皮中提取的难度大得多,得率要低,成本很高,所以,今后大规模栽培提取紫杉醇的红豆杉人工林时,必须选择生长快、紫杉醇含量高的红豆杉良种和优良苗木。对于那些未采用红豆杉良种、有种苗就栽的基地,除了生产紫杉醇外,还要利用其枝叶生产巴卡亭 III(baccatin III)、10-去乙酰巴卡亭 III(10-deacetylbaccatin III)等,用这些副产品(半合成前体)来补偿经济上的损失。此外,还应加强对红豆杉人工栽培技术的研究^[7],如深入研究不同人工施肥方法和菌根等对植株生长速度、紫杉醇和相关成分含量的影响,制定红豆杉人工栽培的技术规程,为红豆杉药材 GAP 基地的建设提供技术保障。

2 紫杉醇的化学半合成

美国 BMS(Bristol-Myers Squibb) 等公司利用从欧州红豆杉(*T. baicata* L.)等枝叶中提取分离巴卡亭 III(baccatin III)和 10-去乙酰巴卡亭 III(10-deacetylbaccatin III),将 10-去乙酰巴卡亭 III 转化为巴卡亭 III 后,经过化学半合成法生产紫杉醇,但其合成原料巴卡亭 III 还须从红豆杉树皮或枝叶中提取,成本仍然较高。紫杉醇半合成法的关键是前体巴卡亭 III 的获得和生产。除了继续从红豆杉枝叶中提取外,目前的发展趋势是利用工程微生物和酶法进行 baccatin III 的生产。美国密执根州立大学 Walker 实验室利用表达 10-去乙酰巴卡亭 III 10-去乙酰基转移酶基因的大肠杆菌将 10-去乙酰巴卡亭 III 转变成了巴卡亭 III^[8]。德国 Zocher 实验室利用中空纤维膜生物反应器培养含 10-去乙酰巴卡亭 III 10-去乙酰基转移酶重组基因的大肠杆菌,以 10-去乙酰巴卡亭 III 为底物,发现 1 周可生产 1.6~2.4 g 的巴卡亭 III,相当于 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的产量^[9-10]。

另外一个趋势是利用红豆杉树皮和枝叶提取紫杉醇时的副产品 7-木糖 210-去乙酰紫杉醇。广西桂林市晖昂生化药业公司于 2004 年完成了 7-木糖 210-去乙酰紫杉醇半合成紫杉醇的生产工艺的研究,达到了一次投含 20% 7-木糖 210-去乙酰紫杉醇料 150 kg 经过三步反应生产出了 10 kg 紫杉醇的规模,这种技术已申请了专利^[11]。以天然紫杉醇作对照,中国医学科学院药物研究所对这一半合成紫杉醇进行

了化学结构、质量以及抗肿瘤活性的全面检测,结果证明是一致的,符合美国药典半合成紫杉醇的质量标准。2005年1月广西壮族自治区科技厅组织专家对该成果进行了鉴定,获得了很高的评价。

3 红豆杉细胞培养

植物细胞培养由于不受气候和土壤的限制,所以植物细胞培养技术在20世纪60年代就开始尝试作为生产植物有用次生代谢物质的工具。在20世纪80年代,日本的科学家利用植物细胞培养技术成功进行了紫草素和人参皂甙的工业化生产。自1989年 Christen 首次报道利用红豆杉细胞悬浮培养技术生产紫杉醇后,国内外学者进行了大量红豆杉愈伤组织培养和细胞悬浮培养的研究,研究的植物几乎包括短叶红豆杉、欧洲红豆杉、东北红豆杉、中国红豆杉、加拿大红豆杉 (*T. canadensis* Marsh)、云南红豆杉和曼地亚红豆杉等主要的红豆杉,其中大部分已证实能够产生紫杉醇,但大多存在细胞易褐化、培养物生物量小、培养规模小、紫杉醇产率较低和生产稳定性差等问题,离紫杉醇工业化生产还有距离^[12]。在选择高产细胞系的同时,通过利用真菌诱导子、 La^{3+} 、变温处理、乙烯抑制剂 STS (silver thio2 sulfate) 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 等因子或方法可以使培养细胞的紫杉醇产量得到提高,其中最有效的是 MeJA^[12-14]。

早在1992年,美国 ESCA genetics 公司在 NCI 主持的第2次紫杉醇研讨会上就宣布他们用细胞培养法所得产物紫杉醇含量为树皮的2~5倍。目前,国际上至少有2~3家公司开始利用大型生物反应器生产紫杉醇。一个是韩国的 Samyang Genex 公司 (Taejon Korea), 1997年韩国就批准该公司利用红豆杉细胞生物反应器生产出的紫杉醇) Genexol上市。另一个公司是 Phytol (NY, USA), 该公司从1993年开始就与 Bristol Myers Squibb 合作进行红豆杉细胞的研究,在2002年 Phytol 与 Bristol Myers Squibb 签订了长期提供紫杉醇的合作协议。目前该公司最大的生物反应器已达75000L的规模。由于采用酶法半合成和利用红豆杉细胞生物反应器生产紫杉醇, Bristol Myers Squibb U. S 在2004年因此获得了美国环境保护机构 (EPA) 颁发的总统绿色化学挑战奖^[15]。第3个是日本的 Mitsu i 化学公司, 该公司建立了红豆杉细胞大规模培养系统, 他们利用二步培养结合高密度培养法使红豆杉细胞紫杉醇产量

达到 $295 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 并发现在200L的生物反应器中, 曼地亚红豆杉18批试验中紫杉醇的产量都表现得较稳定, 产量保持在 $140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $295 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 每天紫杉醇的产率为 $21.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[13]。这是目前唯一公开的对大规模生物反应器培养紫杉醇稳定性的报道。

我国在红豆杉细胞方面的研究也取得了一定的进展。早在1997年, 甘烦远等^[16]发现云南红豆杉细胞在发酵罐中生长速率达到 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 紫杉醇含量为 $1.19 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 大约是成年树树皮含量的12倍, 为栽培植株的40倍。近年来, 广东梅雁生物工程研究所也进行了红豆杉细胞不锈钢生物反应器的中试, 产量达到了 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 该单位下一步的计划是进行大规模生物反应器培养试验。

虽然国际上已有少数几个公司已经开始利用大型生物反应器生产紫杉醇, 但这些都是投入巨额研发经费的条件下取得的。在生物反应器中, 植物细胞比微生物生长慢, 而且生产时需要大型专用生物反应器, 所以, 生产成本将成为该技术工业化应用时必须认真考虑的问题, 同时还急需解决大规模生物反应器培养时紫杉醇生产的稳定性难题^[17]。如果红豆杉培养细胞中紫杉醇产量的稳定性难题能够得到有效地解决, 那么植物细胞培养技术生产紫杉醇将有可能成为一种具有竞争力的方法^[18]。

4 产紫杉醇内生真菌的培养

1993年, 美国蒙太拿州立大学的 Stierle 等^[5]从太平洋红豆杉的韧皮部分离到1株产紫杉醇的内生真菌 (*Taxomyces andreanae*), 发现该菌的发酵液含紫杉醇 $24 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随后, 该实验室又从西藏红豆杉枝条上分离到1株小孢拟盘多毛孢 (*Pestalotia2 sism irospora*), 紫杉醇的产量比 *Taxomyces andreanae* 高很多, 发酵液的紫杉醇含量高达 $60 \sim 70 \text{ Lg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[19]。随后人们在落叶松、松树 *Wollomia nobili* 和秃柏中分离出产紫杉醇的内生真菌^[20]。特别值得一提的是美国俄勒冈州波特兰大学的化学家安杰拉 # 霍夫曼等^[21]发现榛子树的叶、枝和果实中均含有紫杉醇, 含量为红豆杉的10%, 同时还发现生长在榛子树上的真菌也可产生紫杉醇。除红豆杉外, 榛子树是第2种能产紫杉醇的植物, 而且其内生真菌也能产紫杉醇。我国自1994年北京邱德有等^[22]人首先从云南红豆杉的树皮中分离出可产紫杉醇的内生真菌之后, 黑龙江大学、厦门大学、上海

交通大学、天津大学和华中科技大学、中国中医科学院等单位先后进行了产紫杉醇内生真菌的分离和培养的工作。国内外已报道的产紫杉醇真菌种类已超过 30 种, 这些真菌绝大多数是子囊菌或半知菌, 而且大都是红豆杉内共生菌^[20]。产紫杉醇真菌的筛选除了采用形态学和化学的方法外, 目前人们已开始用 PCR 进行有关菌株的快速筛选和鉴定^[23-24]。产紫杉醇的内生菌选育和发酵培养的研发尚未取得实质性进展, 因为内生真菌每升培养物仅有微克级紫杉醇, 产量很低。紫杉醇真菌的筛选只是第 1 步, 关键是提高真菌发酵时紫杉醇的产量。赵凯等^[25]成功通过原生质体诱变技术提高了真菌中的紫杉醇产量, 高达 $418 \text{ Lg} \# \text{ L}^{-1}$ 。最近, 他们通过 genome shuffling 的方法, 进一步提高了树状多节孢 (*Nodulisporium sylvifom*) F4226 紫杉醇的产量, 达到 $516.37 \text{ Lg} \# \text{ L}^{-1}$ ^[26]。尽管已经取得了很大的进展, 但要实现工业化生产, 还必须获得毫克级水平的紫杉醇产率。今后的研究重点应该是菌株的改造。至今还不清楚真菌中紫杉醇生物合成的途径, 到目前, 还没有一个真菌紫杉醇合成基因克隆的报道, 开展真菌紫杉醇合成基因克隆甚至基因组学的研究工作很有必要。弄清紫杉醇生物合成和调控的分子机理等过程, 是改造菌株的前提, 它将使有目的地、精确地改造产紫杉醇真菌菌株成为可能。笔者正与美国俄勒冈州波特兰大学的化学系的安杰拉·霍夫曼拟合作开展产紫杉醇真菌分子生物学的研究工作。可以相信, 随着有关研究工作的深入, 利用产紫杉醇真菌进行大规模发酵生产这一重要药物将很可能成为现实。

5 代谢工程的研究进展

5.1 红豆杉细胞紫杉醇代谢工程

培养细胞中紫杉醇的产量一般都不高, 即使偶尔获得较高的产量也都存在着紫杉醇产量不稳定的问题, 所以要利用基因工程的方法对紫杉醇生物合成与分支途径中有关基因进行调控, 以提高红豆杉培养细胞中紫杉醇产量及其稳定性就成为近年来红豆杉细胞代谢工程研究的重点^[27-28]。至今, 已确定红豆杉细胞从 FPP 和 IPP 开始到紫杉醇是由 20 个蛋白所催化完成的。它们分别是 GGPP 合成酶 (图 1 A)、紫杉二烯 (5), 11(12) 二烯合成酶 (图 1 B)、紫杉烷 5A 羟基化酶 (图 1 C)、紫杉烷 5A α 乙酰基转移酶 (图 1 D)、紫杉烷 10B 羟基化酶 (图 1 E)、紫杉烷

1A 羟基化酶 (图 1 F)、紫杉烷 2A 羟基化酶 (图 1 G)、紫杉烷 7A 羟基化酶 (图 1 H)、紫杉烷 9A 羟基化酶 (图 1 I)、紫杉烷 13A 羟基化酶 (图 1 J)、紫杉烷 2A α 苯甲酰基转移酶 (图 1 K)、紫杉烷 10B α 乙酰基转移酶 (图 1 L)、紫杉醇侧链 N 苯甲酰基转移酶 (图 1 M)、紫杉烷 C213 α 2 苯丙烷侧链乙酰 CoA 酰基转移酶 (图 1 N)、B 苯丙氨酸变位酶 (图 1 O)、乙酰 CoA 连接酶 (图 1 P)、B 苯丙氨酸水解酶 (图 1 Q)、9A 羟基氧化酶 (图 1 R)、4, 20 环氧化酶 (图 1 S)、环氧乙烷环氧四环变位酶 (图 1 T)。Croteau 实验室已经完成了其中 14 个基因的克隆。2003 年, 该实验室又成功地克隆了处于包括紫杉醇在内的各种 C213 氧取代的紫杉烷生物合成的分支途径中紫杉烷 14B 羟基化酶基因 (14OH) (图 1)^[29-30]。紫杉醇的生物合成涉及 20 个基因, 目前还没有找到有效的增产办法。和其它受多基因控制的化合物一样, 通过操作紫杉醇生物合成途径中的单个基因或某些转录因子有望提高其产量。国内外不少实验正在进行这方面的研究, 但还没有成功的报道。

作者认为对于紫杉醇生物合成调控而言, 处在紫杉醇生物合成竞争的分支途径中的基因也很重要。因为除了可以通过促进紫杉醇合成途径中有关基因的表达, 还可通过抑制其分支途径中有关基因的表达, 甚至可以通过既促进合成途径中基因的表达, 同时又能通过抑制其分支途径中基因的表达来实现有关目的。红豆杉植株中含有大量的 C214 氧取代的紫杉烷, 如 Taxuyunnanine C [2A, 5A, 10B, 14B 四乙酰氧基 24(20), 11 紫杉二烯] 及其类似物 2A, 5A, 10B α 乙酰氧基 214B α (2c 甲基 23c 羟基) 21 酰氧基 24(20), 11 紫杉二烯、2A, 5A, 10B α 乙酰氧基 214B α (2c 甲基) 21 酰氧基紫杉二烯等。红豆杉离体培养的细胞在产生极少量的紫杉醇时, 也产生大量 C214 氧取代的紫杉烷, 后者的总含量可达细胞干质量的 3.4%, 占红豆杉离体培养细胞所产生的紫杉烷总量的 89% 之多, 而包括紫杉醇在内的各种 C213 氧取代的紫杉烷占总量的 8.2%, 其中, 紫杉醇仅为 1%^[31]。

体外酶促反应试验时, 紫杉烷 14B 羟基化酶与负责紫杉醇合成的 13B 羟基化酶竞争共同的底物紫杉二烯 (20), 11(12) 二烯 25A, 10B 二烯醇。Ketchum 等^[32]发现添加茉莉酸甲酯后, 红豆杉细胞中 C214 氧取代的紫杉烷的总含量由 5% 减少到 2%, 而含 C2

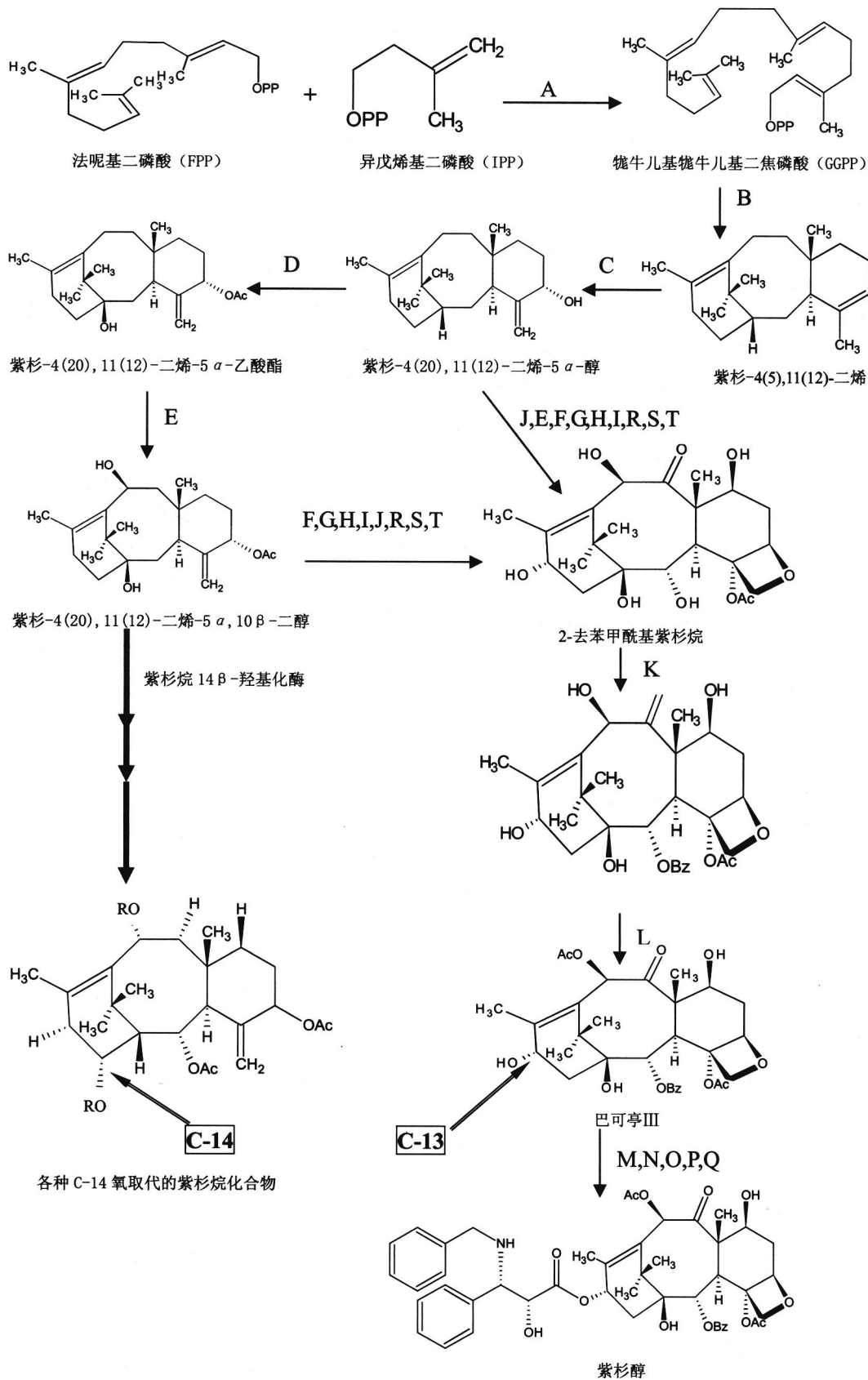


图 1 紫杉醇生物合成途径示意图

13 氧取代的紫杉烷 (紫杉醇, 巴可亭 III 和 10 脱乙酰基巴可亭 III) 则大大增加, 分别增加了 4.72 和 4.12 倍。因此, 紫杉烷 14B 羟基化酶是紫杉醇生物合成调控的十分重要的靶标。对红豆杉细胞该基因表达进行抑制后, 很可能阻断中间产物流向 C214 氧取代的紫杉烷这个分支途径, 使其向紫杉醇等 C213 氧取代紫杉烷的途径转变, 从而大幅度地提高后者的产量。Ketchum 等^[33] 利用代谢组学 (Metabolomics) 技术及同位素示踪技术, 进一步证实了紫杉烷 14B 羟基化酶和紫杉烷 13A 羟基化酶所催化的反应在紫杉醇生物合成中所起的关键调控作用。本文作者最近利用反义 RNA (antisense RNA) 和 RNA 干扰 (RNAi) 技术已成功地抑制了曼地亚红豆杉 TM3 细胞系中的 14B 羟基化酶基因的表达, 显著降低了 yunnanxan, sinenxan A, sinenxan C 3 种主要的 C214 氧取代的紫杉烷总量, 实现了对紫杉烷 14B 羟基化酶基因的调控, 下一步将对紫杉烷 13A 羟基化酶基因等紫杉醇生物合成途径中的关键基因和分支途径中的基因 (紫杉烷 14B 羟基化酶基因进行共调控, 即通过抑制紫杉烷 14B 羟基化酶基因的表达, 以阻断此分支途径, 并通过使紫杉烷 13A 羟基化酶基因等关键基因的过量表达来进一步增加紫杉醇等 C213 氧取代紫杉烷的含量。希望通过这种方法来获得能显著提高紫杉醇产量的细胞系, 克服世界上目前红豆杉细胞培养中紫杉醇产量低的难题。

5.2 利用微生物代谢工程生产紫杉醇及其前体

利用微生物表达红豆杉紫杉醇生物基因来生产紫杉醇的前体是近年来的一个有益探索。DeJong 等^[34] 利用 3 个质粒成功地把紫杉醇生物合成途径中的 8 个基因在酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中得到表达。Engels 等^[35] 利用代谢工程的方法使中国红豆杉紫杉二烯合成酶 (taxadiene synthase) 在酵母得到高水平地表达, 紫杉二烯的水平提高到 40 倍, 达到 $8.7 \times 10^5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。中国医学科学院协和医科大学药物研究所天然药物生物合成室也已克隆了中国红豆杉参与紫杉醇生物合成的 10 个酶的基因, 在此基础上, 应用大肠杆菌及酵母表达系统, 也已成功地合成了紫杉烷二萜化合物的母核)) 紫杉烯^[36]。目前正用代谢途径工程方法合成不同氧取代的紫杉烯, 企望为紫杉醇及其衍生物的合成提供必要的中间体。

利用微生物表达红豆杉紫杉醇生物基因来生产紫杉醇的前体已经成功, 但由于紫杉醇生物合成涉及

到 20 个步骤, 所以用微生物表达所有红豆杉紫杉醇生物基因生产紫杉醇的难度很大。近年来, 合成生物学技术的迅速发展, 有的关键技术 (如基因乃至基因组的人工精准合成) 正有望取得突破, 今后利用微生物代谢工程的方法直接生产紫杉醇不是不可能的。

6 小结

近年来, 国内外在红豆杉人工栽培、紫杉醇化学半合成、红豆杉细胞培养、产紫杉醇内生真菌培养、代谢工程方面的研究取得了很大进展, 使紫杉醇的供需矛盾得到了一定程度的缓解, 但远未真正、彻底解决红豆杉资源的供应与紫杉醇需求之间的矛盾。要解决这个矛盾, 需要全社会的共同努力, 需要有多条技术途径, 需要对人工栽培、紫杉醇化学半合成、红豆杉细胞培养、产紫杉醇内生真菌培养、代谢工程方面的关键技术继续进行深入的研究, 并力争在规模和生产成本方面取得突破。随着红豆杉和产紫杉醇内生真菌基因组学工作的开展, 红豆杉和有关内生真菌产紫杉醇的秘密及其调控机制将会逐渐被揭开, 有目的地培育红豆杉高产细胞系、优良个体和优良真菌株系将成为可能。到那时红豆杉资源利用与保护的矛盾将很可能不再是人们关注的焦点。

参考文献:

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol: a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc* 1971, 93: 2325- 2327
- [2] Craag G M, Scheparat S A, Suffness M, et al. The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents [J]. *J Nat Prod* 1993, 56: 1657- 1668
- [3] Nicolau K C, Yang Z, Liu J J, et al. Total synthesis of taxol [J]. *Nature* 1994, 367: 630- 634
- [4] Babgi E, Kingston D G A. New semisynthesis of paclitaxel from baccatin III [J]. *J Nat Prod* 1999, 62: 1068- 1071
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andranac*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science* 1993, 260: 214- 216
- [6] Fetzner A G, DiCosmo F, Reynolds W F, et al. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes [J]. *Biotechnology* 1992, 10: 1572- 1575
- [7] 王达明, 李蓬芳, 周云, 等. 云南红豆杉人工药用原料林的经营技术 [J]. *西部林业科学*, 2004, 33(1): 8- 14
- [8] Loncaric C, Merrweather E, Walker K D. Profiling a taxol pathway: 10B-acetyltransferase: assessment of the specificity and the production of baccatin III by *in vivo* acetylation in *E. coli* [J]. *Chem Biol*

- 2006, 13: 309- 317
- [9] Frense D, Lauckner G, Lisicki D, et al. Enzymatic drug production [J]. *BioTech* 2004, 15(11- 12): 20- 21
- [10] Pflieger C, Frense D, Beckmann D, et al. Membrane-supported extraction at enzymatic reactions in the presence of organic solvents [J]. *Chem Ing Tech* 2006, 78: 120- 123
- [11] 桂林晖昂生化药业有限责任公司. 合成紫杉烷的制备工艺: 中国 ZL200410021751.8 [P]. 2007- 03- 07
- [12] Tabata H. Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus species* [J]. *Current Drug Targets* 2006, 7: 453- 461
- [13] Tabata H. paclitaxel production by plant cell culture technology [J]. *Adv Biochem Engin/ Biotechnol*, 2004, 7: 1- 23
- [14] Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, et al. Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1129 - 1132
- [15] Frense D. Taxanes perspectives for biotechnological production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, 73(6): 1233- 1240
- [16] 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍, 等. 云南红豆杉细胞发酵培养的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 1997, 9(3): 97- 100
- [17] Kim B J, Gibson D M, Shuler M L. Effect of subculture and elicitation on instability of Taxol production in *Taxus sp* suspension cultures [J]. *Biotechnol Prog* 2004, 20: 1666- 1673
- [18] Vongpaseuth K, Roberts S C. Advances in the Understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2007, 8: 219- 236
- [19] Strobel G, Yang X Y, Sears J, et al. taxol from *Pestalotiopsis m2* crospora, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana* [J]. *Microbiology*, 1996, 142: 435- 440
- [20] 纪元, 毕建男, 严冰, 等. 产紫杉醇真菌的研究概况与紫杉醇工业生产的一个新思路 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22(1): 1 - 6
- [21] Hoffman A, Khan W, Worapong J, et al. Biospecting for taxol in angiosperm plant extracts [J]. *Spectroscopy* 1998, 13: 22- 32
- [22] 邱德有, 黄美娟, 方晓华, 等. 一种云南红豆杉内生真菌的分离 [J]. *真菌学报*, 1994, 13(4): 314- 316
- [23] Zhang P, Zhou P P, Jiang C, et al. Screening of taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus* [J]. *Biotechnol Lett* 2008, 30(12): 2119- 2123
- [24] Zhou X, Wang Z, Jiang K, et al. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Prk Biokh in Mikrobiol* 2007, 43(4): 490- 494
- [25] 赵凯, 周东坡, 平文祥, 等. 紫杉醇高产菌株的原生质体诱变选育及其遗传变异初探 [J]. *微生物学报*, 2005, 45(3): 355 - 358
- [26] Zhao K, Ping W X, Zhang L N, et al. Screening and breeding of high taxol-producing fungi by genome shuffling [J]. *Science in China Series C: Life Sciences* 2008, 51(3): 222- 231
- [27] 胡新玲, 徐妙云, 刘德虎, 等. 红豆杉紫杉烷 14 β -羟化酶基因片段的克隆及其植物表达载体的构建 [J]. *分子植物育种*, 2006(2): 243- 250
- [28] Roberts S C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture [J]. *Nature chemical biology* 2007, 3(7): 387- 395
- [29] Kaspera R, Croteau R. Cytochrome P450 oxygenases of Taxol biosynthesis [J]. *Phytochem Rev* 2006, 5: 433- 444
- [30] Croteau R, Ketchum R E B, Long R M, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics [J]. *Phytochemistry Reviews* 2006, 5: 75 - 97
- [31] Menhard B, Eisenreich W, Hylands P J, et al. Taxoids from cell cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Phytochemistry* 1998, 49: 113 - 125
- [32] Ketchum R E B, Rihner C D, Qiu D, et al. *Taxus* metabolites methyl jasmonate preferentially induces taxoids oxygenated at C213 in *Taxus s. madia* cell cultures [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 901 - 909
- [33] Ketchum R E, Horiguchi T, Qiu D, et al. Administering cultured *Taxus* cells with early precursors reveals bifurcations in the taxoid biosynthetic pathway [J]. *Phytochemistry* 2007, 68(3): 335- 341
- [34] DeJong J M, Liu Y L, Bollon A P, et al. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Bioeng* 2006, 93: 212- 224
- [35] Engels B, Dahm P, Jennewein S. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards taxol (paclitaxel) production [J]. *Metab Eng* 2008, 10(3- 4): 201- 206
- [36] 王伟, 孔建强, 孟超, 等. 大肠杆菌组合生物合成紫杉烯的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(18): 1428- 1431