

红豆杉细胞培养生产紫杉醇研究进展

天津大学化工系(300072) 韩金玉* 王传贵 那 平 元英进

摘 要 红豆杉细胞培养是解决紫杉醇资源问题的有效途径之一,本文综述国内外近年来有关红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究概况。分别就愈伤组织诱导、继代培养、悬浮培养等阶段的主要问题以及提高紫杉醇产率的各种新方法进行了总结和分析。

关键词 紫杉醇 细胞培养 红豆杉

1 前言

紫杉醇(taxol)是70年代由Wani等^[1]从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 树皮中提取出来的具有独特抗癌作用的天然产物,1992-12被美国FDA批准用于治疗卵巢癌,目前已在加拿大、以色列、荷兰、英国、挪威、瑞士、瑞典等国获准上市,是一非常有发展前途的抗癌新药。我国将紫杉醇作为二类西药审批,中国医学科学院药物研究所和海口制药厂于1995-10已获得新药证书。

迄今为止,紫杉醇仅见于裸子植物红豆杉科的红豆杉属 *Taxus* L. 和澳洲红豆杉属种。后者仅见于南半球,数量稀少。前者零星分布在北半球,极少成林,且生长缓慢。紫杉醇在该属植物的树皮中含量又极低,约为0.01%~0.06%。每提取1kg紫杉醇,要砍伐1000~2000棵树以剥取足够的树皮。按这种提取方法来获取临床及基础研究所需的紫杉醇,将给红豆杉属植物的长期存留及地区分布带来威胁。因此,紫杉醇的原料保障就成为该药能否长期供应的关键因素。

目前,人们着手从以下几个方面进行研究以解决紫杉醇的来源问题:(1)全合成,(2)半合成,(3)栽培法,(4)真菌生产,(5)植物组织细胞培养法。这几种方法各有利弊,其中组织细胞培养法由于具有以下优点而成为人们所期望的商业化生产的优选方法:①确保产

物无限、连续、均匀地生产,不易受病虫害、季节等因素的影响。②可以在生物反应器中大规模培养,并且通过控制培养条件诱导出大量的紫杉醇。③所得的产物从植物体内直接提取,可以大大简化分离和纯化步骤。④除提供紫杉醇外,还可以生产出紫杉醇半合成的前体物以及其他有抗癌活性的,原植体内不含有的化合物。目前,国内外在分化细胞株系和培养条件方面作了不少工作,摸索了外植体、光照、培养基组成等因素对细胞培养及紫杉醇生产的影响。工艺条件已基本摸清,正研究反应器的放大技术和新的技术生长点,可望实现由红豆杉细胞培养生产紫杉醇的突破。美国的有关大公司已完成4t的培养技术,现正进行20t规模的工业放大研究(与国外学者交流信息)。本文综述近年来有关红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究进展。

2 红豆杉愈伤组织的诱导

一般而言,植物组织培养可分为细胞培养和器官培养两大类。其中,细胞培养法因具有相对快速的繁殖率,培养条件易于优化和控制,产物分离较容易等优点而受到人们的关注。

用细胞培养法生产紫杉醇的一般步骤为:诱导愈伤组织→继代培养→建立悬浮培养→扩大培养。生产紫杉醇由于红豆杉属植物本身所具有的特殊性质,如为木本、裸子植

* Address: Han Jinyu, Department of Chemistry Engineering, Tianjin University, Tianjin

物等,因此,诱导红豆杉植物的愈伤组织是比较困难的。不同种属的红豆杉或不同的器官、组织及生长部位,外植体内紫杉醇含量不等,对应的诱导愈伤组织的培养基组成以及培养条件均对愈伤组织的诱导产生不同程度的影响。

2.1 外植体条件的影响:由于细胞系的生长和紫杉醇生产受到多种因素的影响,各外植体的诱导能力存在很大的差异,而且诱导出的细胞进一步培养及生产次生代谢物的能力不尽相同。

首先,外植体的诱导能力随植物种属的不同而有所差异。Smith^[2]、朱蔚华^[3]、Wickremesinha^[4]等均做了一定工作。其次,外植体的诱导能力与所选取的植物组织密切相关。迄今为止,选用的作为诱导红豆杉愈伤组织的外植体有针叶、幼茎、树皮、形成层、种子及假种皮等。一般而言,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,其他的外植体诱导能力较差或根本诱导不到愈伤组织。Fett-Neto 等^[5]比较了东北红豆杉 *T. cuspidata* 的不同组织的诱导能力,包括红、绿假种皮、种子、幼茎及针叶,其中幼茎是最佳的外植体。而 Ghislén 等^[6]在研究短叶红豆杉细胞培养时指出,树皮或形成层组织最适于建立愈伤组织。可见,不同种属有不同优选的组织作为外植体。还有一种观点认为应该选用紫杉醇含量较高的外植体。Gibson^[7]诱导并培养短叶红豆杉的愈伤组织时发现,外植体中紫杉醇的含量对于愈伤组织的诱导及以后的继代培养均无抑制作用,那么,获得高产细胞株系的第一步工作便是筛选紫杉醇含量高的外植体^[8]作为诱导材料,如短叶红豆杉的树皮或形成层组织,都可以形成高产紫杉醇的细胞系。而当以幼茎为外植体时,应选择 *T. media*,尤其是 *T. media* “Hicksii”的幼茎,因为该树种幼茎中紫杉醇的含量高于其他树种。

2.2 培养基及培养条件的影响:许多培养基,如 MS、B5、SH、6,7-V、Harvey、McCown

等,在添加蔗糖及外源生长素后均可诱导外植体形成愈伤组织。其中,以 B5、SH 及 6,7-V 为佳,诱导率亦较高。当然,选择最优的愈伤培养基应针对不同的细胞株系来进行。

培养基中激素组成、浓度或其组合对愈伤组织的诱导起重要的作用。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。Gibson^[7]发现了几种培养基能从短叶红豆杉树皮中诱导出愈伤组织。

培养基中的碳源一般为蔗糖,浓度是 1.0%~3.0%(w/v)。考虑到生物适应性问题,多数愈伤组织的诱导是在固体培养基上进行,而且通常使用的凝固剂是 0.6%~1.0%的琼脂。但 Cino 等^[9]认为用液体培养基进行愈伤组织的诱导,可以缩短从诱导到悬浮培养的生产周期。用液体培养基诱导愈伤组织的主要优点在于:在固体培养基上诱导的愈伤组织在转入液体培养基时,由于不能适应液体的新环境,可能会出现细胞畸形或自溶现象。因而,用固体培养基诱导出细胞后,还需要经过固体到液体的适应性培养,延长了生产周期。使用液体诱导培养基则可直接转入液体悬浮培养,无适应性的问题。但是,从 Cino 等^[9]的实验结果看,经 3 周悬浮培养后紫杉醇的产量仅为 0.01~0.02mg/L,可见用液体培养基诱导愈伤组织用于紫杉醇生产的方案还有待进一步改进。

无论使用何种培养基诱导红豆杉为何种外植体,其它最佳的诱导条件都为 20~25℃、黑暗、培养基灭菌前 pH 为 5.5~5.8。

3 愈伤组织继代培养

由外植体诱导形成的愈伤组织开始比较紧密,只有经过较长时间的多次继代培养,愈伤组织变得较疏松时,才能进行悬浮培养。在继代培养过程中,细胞的生长情况与外植体来源、培养基及培养条件密切相关。其中培养基中生长调节素的添加一直是人们研究的热点。

3.1 外植体的影响:Gibson^[7]的研究结果表

明,即使是从同一树种(短叶红豆杉)的不同个体的同一部位(树皮)所采集的外植体诱导出的愈伤组织,无论在外部形态还是在生长状况上均存在很大差异。可见外植体来源对细胞生长的影响是很大的。Fett-Neto 等^[5]用东北红豆杉的各组织作为外植体诱导愈伤组织,发现幼茎所得细胞的生长情况最好,针叶所得细胞的生长情况与幼茎相似,但生长速率减慢期开始得较早。Gibson^[7]在研究短叶红豆杉树皮诱导所得的细胞系的生长情况与各激素组合的关系时,发现激素对生长的刺激作用因细胞系的不同而异。Gibson 指出^[7],细胞生长受细胞株系影响最大,其次才是生长素类型和浓度。

3.2 愈伤组织早期形成时间的影响:并非愈伤组织形成越快越好,其早期生长时间对培养将产生显著的影响。Gibson^[7]在研究短叶红豆杉细胞时发现,较早形成(2周内)的愈伤组织在继代培养时,细胞并不增殖,组织发生褐化以至坏死。而在诱导培养基上4周~4个月形成的愈伤组织,以1~2个月的间隔进行继代培养时,愈伤组织可以持续生长。其中,以经1~3个月才开始形成的愈伤组织的继代培养存活率最高。

3.3 培养基及培养条件的影响:对诱导红豆杉愈伤组织而言,可利用多种培养基。但对于愈伤组织的培养,维持其正常生长来说,绝大多数报道的均是基本的或改良的B5培养基,少数适用的还有SH等,其它培养基对维持愈伤组织的正常生长效果均不是很好。

此外,Fett-Neto 等^[5]研究了不同的基础培养基对组织生长的影响。结果表明,对于东北红豆杉的幼茎所得的细胞系,除MS培养基抑制细胞组织的生长外,SH、SHN及B5培养基对生长的影响相似。一般认为,培养基中氮源的还原态和氧化态的相对含量对细胞的生长影响较大。培养基中添加高含量的 NH_4NO_3 可以明显提高培养细胞的生长速率。Christen^[6]曾指出,在补充有一定浓度 NH_4NO_3 的B5培养基上培养的细胞,其生

长速率为不补充 NH_4NO_3 的B5的2~3倍。而以 NH_4^+ 作为唯一氮源,却抑制组织的生长,如在含 NH_4^+ 较多(1650.00mg/L)的MS培养基上培养的细胞就符合这一规律。

植物细胞培养中生长调节剂的添加是一个重要环节。一般而言,培养基中含有1.0~2.0mg/L的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。

生长素(2,4-D等)和分裂素(KT)的不同比例,显著影响愈伤组织的生长。对东北红豆杉细胞生长的研究表明,高浓度的KT对细胞生长不利而相对高浓度的2,4-D对细胞生长则有促进作用。所观察到的这两种激素的交互作用非常明显,在一定程度上,2,4-D能够克服KT对生长的不利影响。

另外,赤霉素(GA3)的添加对细胞的生长亦能产生很大影响。Fett-Neto 等^[10]指出,向B5中补充0.5mg/L的GA3时,可使东北红豆杉的生长量提高近1倍左右,但更浓的GA3则对生长基本不产生影响。更全面地研究激素添加对细胞生长的影响,将是有效提高细胞生长量的重要途径。

红豆杉属细胞培养的生理碳源一般选用蔗糖^[11],此外,也可选用果糖、葡萄糖、麦芽糖等。糖类的浓度对细胞生长的影响很大。

在通常情况下,光照抑制愈伤组织的生长。但不同的细胞系对光的敏感程度有很大差异。大量文献报道,介于20~25℃之间的温度条件适于红豆杉愈伤组织的培养。也有报道20℃下培养的愈伤组织有时比在25℃下培养的生长得快。培养基在高压灭菌前pH一般调至5.8左右。

3.4 组织褐化的影响:红豆杉属细胞在生长过程中会分泌一些不利生长的酚类物质,这种酚类渗出物的积累会导致组织褐化,细胞死亡。这也是红豆杉细胞生长缓慢的主要原因之一。即使通过频繁的继代也无法根除这一现象。在培养基中添加一些还原剂或酚类吸收剂等可以部分地解决这一问题。Fett-

Neto 等^[5]在 B5 中加入一种可使酚类吸收的物质-聚乙烯吡咯烷酮(PVP),在不降低组织生产的同时又有效地吸收了酚类化合物,获得了满意的结果。

4 细胞的悬浮培养和紫杉醇的生产

已有许多文献报道成功地建立了红豆杉属植物的悬浮培养细胞系,在培养过程中它们均可向培养基中不断分泌紫杉醇等次生代谢物。如 Langsing 等建立起一些短叶红豆杉悬浮细胞系,同时获得能耐受 20mg/L 紫杉醇的培养物。此外,据 Edgington^[12]报道,用短叶红豆杉的树皮或形成层组织诱导的愈伤组织在锥形瓶中进行悬浮培养时,能分泌紫杉醇及其它一些化合物到培养基中,其产量可达 1.0~3.0mg/L,相当于 20g 干树皮的含量。以下将逐项讨论悬浮细胞的生长及生产紫杉醇的影响因素:

4.1 外植体的影响:采用不同红豆杉属植物的外植体诱导出的细胞进行悬浮培养时,各细胞系间生长及生产状况有所不同。前已述及,有人认为应采用紫杉醇含量高的外植体以获得高产的细胞系。主张外植体应该选用针叶和分生组织,其中以仅有 1 个月的新生针叶为最合适材料。另外,雌性配子体特别适合于诱导愈伤组织。值得一提的是,并非所有含紫杉醇的植物组织诱导出的细胞都可以生产出紫杉醇。Gibson^[7]的研究指出树皮适合建立愈伤组织。

4.2 培养基组成及培养条件的影响:一般用于愈伤组织及继代培养的基础培养基亦可用于悬浮培养。其中各组成成分对悬浮细胞生长的影响与继代培养的情形相似。值得注意的是,对东北红豆杉的幼茎所得的细胞系,MS 培养基抑制愈伤组织生长的同时,显著地利于紫杉醇的合成。红豆杉细胞的悬浮培养一般仍以蔗糖为碳源。Fett-Neto 等^[13]在研究了东北红豆杉幼茎愈伤组织的悬浮培养的营养摄取动力学后指出,干生物量的积累与糖的浓度密切相关,糖的补充可明显缩短悬浮细胞生物量增加的时间。此外还可看出,

当以葡萄糖的果糖为碳源时,前者的作用要优于后者。

植物生长调节剂对悬浮细胞的营养也有影响。Christen^[6]指出,不同浓度的 2,4-D 和 NAA 对短叶红豆杉悬浮培养细胞生长的作用不同。当有 2,4-D 和 NAA 存在时,KT 或 BAP 并不促进细胞的生长。Saito^[14]在研究短叶红豆杉雌性配子体悬浮细胞的生长时发现,只有在补充以 5mg/L NAA 培养基上培养时,生物量才能增长。

多数培养基(包括继代培养基)都补充了酪蛋白水解物(CA),可是 CA 在细胞培养中的作用还有争议。

与愈伤组织继代培养相似,黑暗无光有利于细胞的生长。在有光、无光两种条件下,紫杉醇的分布存在着明显差异,如在光照条件下培养的细胞生成的紫杉醇是在黑暗中的 2.8 倍,且胞外紫杉醇的分泌量也比黑暗中的明显提高,分别为 76% 和 56%。至于培养温度及 pH 值则基本同于继代培养的要求:温度范围 20~25℃,pH 优选 5.8。

4.3 气态组分的影响:氧气、二氧化碳、乙烯等气态组分对悬浮细胞的生长和紫杉醇的生产有显著的影响。已有文献报道,当向培养基中补充二氧化碳气体时可以使细胞维持较高的生长速率。Smith^[2]的研究结果表明,对于浆果红豆杉 *T. baccata* 的悬浮细胞,在培养基中维持低浓度的二氧化碳并移走乙烯可以促进紫杉醇的生产,但同时必须提供充足的氧气以促进细胞的生长。

5 提高细胞中紫杉醇含量的方法

紫杉醇的产率太低,致使工业化生产成本十分昂贵,这是采用细胞培养技术实现工业化生产的最大障碍。为了攻克这一难题,各国学者提出了一些新技术、新方法并取得了很大进展。

5.1 前体饲喂:Zamir 等^[15]用放射性同位素标记的前体进行饲喂,结果表明,紫杉醇的三环二萜骨架来自羟甲基戊酸, C₁₀ 位的乙酰基来自乙酸, C₁₃ 位酰基侧链中的 C₆H₃CHCH-

(OH)COO-来自 phe。向培养基中添加这些前体物可望提高紫杉醇的产量。

Fett-Neto 等^[10]在研究中发现,向培养基中补充 0.1mmol/L 的 phe 时,在不影响愈伤组织生长的同时使紫杉醇的产量翻番。他们^[16]还比较了不同浓度的 phe、丝氨酸、甘氨酸等对东北红豆杉愈伤组织生长及紫杉醇产量的影响,发现其中某些潜在的前体明显地影响紫杉醇的产量。此外,针对不同的组织来源,各种前体物对提高紫杉醇产量的影响有所不同。Stierle^[17]在研究短叶红豆杉树皮产生的愈伤组织时指出,异亮氨酸是最佳前体,乙酸盐也可作为前体物质加入。但随后的研究表明,从美国西北部太平洋沿岸采来的短叶红豆杉和 8 个其他红豆杉植株的细胞不能利用乙酸盐作前体。

5.2 诱导子的使用:在植物细胞的培养中引入诱导子一般可以提高次生物的产量,形成更有利的产物分布,同时可促进产物分泌到培养基中。针对红豆杉属的细胞培养,适用的诱导子主要分为以下两种^[18]:1)生物诱导子:主要指以高压灭活的真菌、细菌和酵母的细胞壁萃取物、滤液或孢子中得到的物质,其有效成分一般认为是葡聚糖。2)非生物诱导子:包括化学协调物质(如重金属、钒酸盐、铅、水银等)和一些原先来源于生物,但后来由人工合成的化合物(如阿魏酸、苯甲酸等),总体而言,诱导子的作用随诱导子的种类及植物种属的不同而异。诱导子的加入时间及使用剂量也是一个影响因素。大体说来,在细胞生长的指数期间引入诱导子最为有利。它不仅使次生物质定量地合成而且还影响产物的分布,另一方面, Lee^[19]的研究表明,在低浓度时,诱导子浓度改变可以显著影响次生物质的积累速率,但随着浓度的增加,这一影响逐渐减少,且当诱导子的浓度过量时,将对培养物产生毒副作用。

5.3 产物的原位提取(ISPR):产物的原位提取技术由于可以快速地从培养基中移走产物,清除产物与细胞间的相互干扰,提高产量而倍受青睐。针对红豆杉属细胞培养,人们着手从以下几方面进行研究:1)在培养过程中更换培养基。2)两相培养技术^[6],即在培养基中引入第二相,目的产物在原培养系统合成后,向第二相富集,从而减轻了产物的反馈抑制,不仅提高了产量,而且简化了后续处理。

6 结束语

紫杉醇以其独特的抗癌机制而引人注目,然而有限的资源和日益增长的需求量,使寻找生产紫杉醇的新方法成为期待解决的问题。随着研究的深入,我们深信采用细胞培养技术大规模生产紫杉醇不久将成为现实。

参考文献

- 1 Wan M C, et al. *J Am Chem Soc*, 1971, 93: 2325
- 2 Smith R J, et al. *PCT Int Appl*, WO 9310253
- 3 朱蔚华,等. *中药材*, 1991, 14(9): 5
- 4 Wickremesinha E R M, et al. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 35: 181
- 5 Fett-Neto A G, et al. *Bio/Technology*, 1992, 10(2): 1572
- 6 Christen A A, et al. *US* 5019504
- 7 Gibson D M, et al. *Plant Cell Report*, 1993, 12: 479
- 8 Artica R, et al. *PCT Int Appl*, WO 932355
- 9 Cino P M, et al. *Eur Pat App*, EP 0568821
- 10 Fett-Neto A G, et al. *Bio/Technology*, 1993, 11(6): 731
- 11 Kim J H, et al. *Biotechnology Lett*, 1995, 17(4): 101
- 12 Edgington S M. *Bio/Technology*, 1991, 9(1): 933
- 13 Fett-Neto A G, et al. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44(2): 205
- 14 Sailo K, et al. *PCT Int Appl*, WO 9213961
- 15 Zamir L D. *Tetrahedron Lett*, 1992, 33: 5235
- 16 Dicosmo F, et al. *Eur Pat Appl*, EP 577274
- 17 Stierle A, et al. *Science*, 1993, 260(9): 214
- 18 Hringi V, et al. *PCT Int Appl*, WO 9317121
- 19 Lee B, et al. *WO* 9502-063

(1995-12-12 收稿)

1996-04-05 修回)