

- Cratoxylum formosanum* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(4): 1195.
- [14] Chen T, Li J, Cao J, *et al.* A new flavanone isolated from rhizoma *Smilacis glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage [J]. *Planta Med*, 1999, 65(1): 56.
- [15] 植飞, 孔令义, 彭司勋. 中药大蓟的化学及药理研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(7): 664-667.
- [16] 贾天柱, 谢明, 许韵梅. 日本对止血药及炭药研究简介 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 541-542.
- [17] 张振杰. 药用罗布麻(红麻)叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 1974, 5(1): 21-24.
- [18] 云南省药物研究所. 红八角莲治疗慢性气管炎有效成分的分离 [J]. 中草药, 1977, 8(7): 296.
- [19] 王兆金, 王献龙. 红旱莲有效成分的研究 [J]. 药学报, 1980, 15(6): 365-367.
- [20] 西北植物研究所. 罗布麻叶治疗高血压临床观察 [J]. 中草药, 1972, 3(4): 12.
- [21] Saxena G, Farmer S W, Hancock R E, *et al.* Chlorchimidaphilin: A new antibiotic from *Moneses uniflora* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(1): 62-65.
- [22] Kagawa K, Tokura K, Uchida K, *et al.* Platelet aggregation inhibitors and inotropic constituents in *Pyrolae herba* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(8): 2083-2087.
- [23] 王西发, 张建民, 曹爱兰. 鹿衔草的化学成分 [J]. 中草药, 1988, 19(1): 8-11.
- [24] 张振凌, 周艳, 黄显峰. 茜草炭止血成分的研究 [J]. 中成药, 2007, 29(12): 1803-1805.
- [25] Li J, Wang P F, Zheng R, *et al.* Protection of Phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* against oxidative hemolysis *in vitro* [J]. *Planta Med*, 1993, 59(4): 315-317.
- [26] Liu Z M, Jia Z J. Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis striata* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(4): 1341.
- [27] Kasai R, Ogawa K, Ohtani K, *et al.* Phenolic glycosides from *Nuo-Mi-Xang-Cao*, a Chinese acanthaceous herb [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(4): 927-929.
- [28] Miyase T, Yamamoto R, Ueno A. Phenylethanoid glycosides from *Stachys officinalis* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 475-479.
- [29] 佟如新, 王普民, 王梳春, 等. 青花椒中活性成分香柑内酯的止血作用实验研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 1998, 5(11): 14-16.
- [30] 林启寿. 中草药成分化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [31] Kosuge T, Ishida H, Satoh T. Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. On antihemorrhagic principles in *Hypericum erectum* Thunb. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(1): 202-205.
- [32] Govindachari T R, Premila M S. The benzofuran norwedelic acid from *Wedelia calendulaceae* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(12): 3068-3069.
- [33] Ronlan A, Wickberg B. The structure of mezerein, a major toxic principle of *Daphne mezereum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1970, 49: 4261-4264.
- [34] 李清华. 小蓟止血成分的研究 [J]. 中草药, 1982, 13(9): 9-12.
- [35] Ohnishi M, Morishita H, Iwahashi H, *et al.* Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(3): 579-583.
- [36] 秦文娟, 吴秀娥, 福山爱保, 等. 苦丁茶化学成分的研究 () [J]. 中草药, 1988, 19(11): 486-488.
- [37] Khan I A, Rali T, Sticher O. Flavonoids and caffeic acid esters from *Dichrocephala bicolor* [J]. *Planta Med*, 1993, 59(3): 288.

紫杉醇前体生物合成途径及生物技术研究进展

刘万宏^{1,2}, 姚波¹, 祝顺琴², 廖志华^{2*}

(1. 重庆科技学院 生物系, 重庆 401331; 2. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要: 紫杉醇因其特殊的抗肿瘤作用成为当今天然产物研究的热门方向。综述了紫杉醇前体的生物合成途径及途径上的酶和基因; 利用红豆杉愈伤组织和细胞培养生产紫杉醇的方法; 前体饲喂提高细胞紫杉醇产量、通过内生真菌发酵生产紫杉醇及红豆杉遗传转化获取优质药源等相关研究。最后提出代谢工程策略是可能解决紫杉醇药源缺乏的理想途径。

关键词: 紫杉醇; 生物合成; 遗传转化; 内生真菌

中图分类号: R282.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)08-1327-05

Advances in studies on biosynthetic pathway of taxol precursor and its correlative biotechnology

LIU Wan-hong^{1,2}, YAO Bo¹, ZHU Shun-qin², LIAO Zhi-hua²

(1. Department of Biology, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China;

2. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Key words: taxol; biosynthesis; genetic transformation; endophytic fungi

紫杉醇(TaxolTM)是 20 世纪 70 年代由 Wani 等从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 树皮中提取出来的具有独特抗癌作用的天然产物^[1], 是目前最好的天然抗癌药物之一,

为治疗卵巢癌、乳腺癌的首选药物, 对白血病、肺癌、脑癌、直肠癌和其他一些实体瘤等均有很好的疗效, 并且其不良反应很小^[2]。在今后较长的一段时间内, 紫杉醇将仍然是治疗癌

* 收稿日期: 2009-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(紫杉醇前体依赖于 MEP 途径合成的分子调控机理, 30771238)

作者简介: 刘万宏(1979—), 男, 江西峡江人, 讲师, 硕士。主要从事药用植物次生代谢工程研究。

E-mail: liuwanh@163.com Tel: (023) 65022209

症的首选药物之一。由于紫杉醇的药源植物红豆杉是国家重点保护野生植物,生长缓慢且紫杉醇产量非常低,所以从天然红豆杉中提取的紫杉醇远远不能满足人们对紫杉醇日益增长的需要,同时紫杉醇的神奇疗效和药源的严重短缺使其价格极为昂贵。近年来,寻找及扩大紫杉醇药源是一个十分活跃的研究领域,并取得了较大的进展,主要包括以下 4 个方面:(1)利用传统育种技术培育红豆杉栽培品种;(2)化学合成紫杉醇^[3];(3)分离培养与红豆杉共生的产紫杉醇微生物^[4,5];(4)利用植物细胞培养技术生产紫杉醇^[6,7]。紫杉醇前体生物合成途径的分子生物学研究是开展紫杉醇基因工程的必要前提。因而克隆紫杉醇前体合成途径上的基因,进行功能验证和表达研究,考察目的基因在紫杉醇生物合成途径中的作用,确定其中的限速反应和鉴定编码关键酶的基因,进而为紫杉醇代谢工程提供候选基因和作用靶点。本文就紫杉醇前体生物合成途径的分子生物学和生物化学,及生物技术在扩大紫杉醇药源中的应用进行系统综述。

1 紫杉醇前体生物合成途径

萜类物质的生物合成均以 C5 活性单位异戊烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)与其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)头尾相连合成香叶基焦磷酸(geranyl diphosphate, GPP, C10),继而 GPP 与

IPP 在酶促反应下形成更大的异戊烯焦磷酸如法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP, C15)和香叶基香叶基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP, C20),其中可能通过环化、耦联、分子重排产生倍半萜和二萜的碳骨架^[8]。在红豆杉中,紫杉醇的生物合成途径分为 3 个部分:一是合成萜类化合物的通用前体 IPP 和 DMAPP;二是以 GGPPs 为起点经过约 20 步酶促反应合成紫杉醇母核 10-去乙酰巴卡亭(10-deacetylbaaccatin, 10-DAB)或巴卡亭(baccatin);三是合成与紫杉醇母核 C-13 位相连的苯基异丝氨酸链。

植物萜类(包括紫杉醇)前体物质 IPP 和 DMAPP 通常可由两条不同,但存在 IPP 相互转运的生物途径完成合成:一是经典的甲羟戊酸(又名甲瓦龙酸, mevalonic acid, MVA)途径;另一是 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径^[9](图 1)。长期以来,紫杉醇前体物 IPP 一直被认为是经甲羟戊酸途径合成的,但近年来,经¹³C 标记对植物和微生物萜类物质生物合成途径进行研究却发现许多与甲羟戊酸途径不一致的结果,并证明紫杉醇前体物的合成来自于新近发现的 MEP 途径^[10]。故在紫杉醇前体合成途径论述中主要以 MEP 途径上的基因与酶为主。

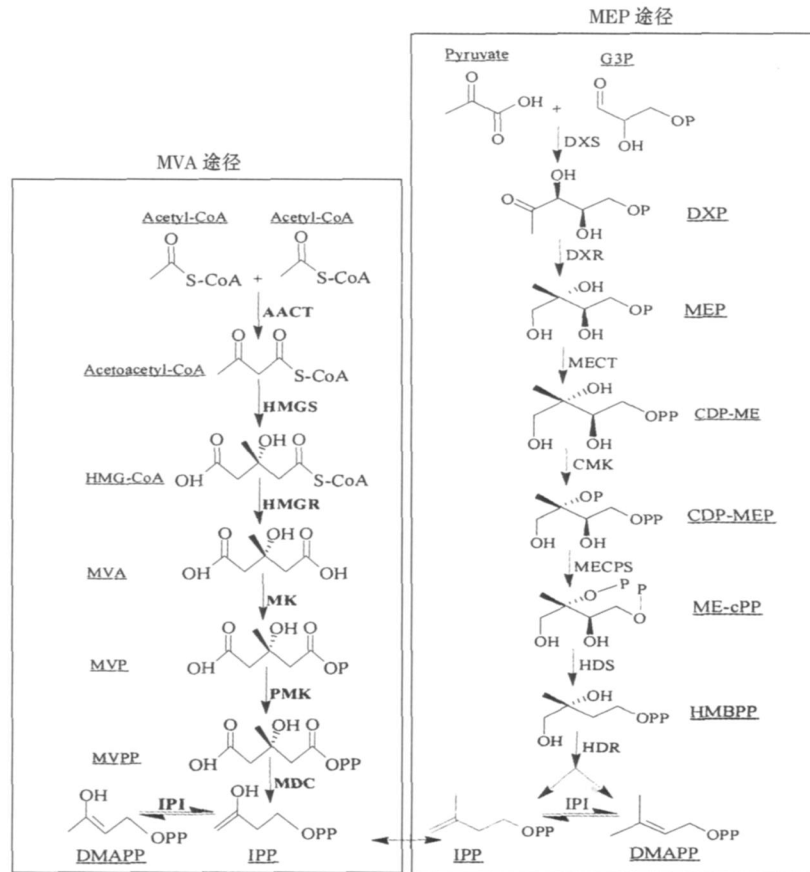


图 1 紫杉醇前体生物合成途径
Fig.1 Biosynthetic pathway of Taxol precursor

2 紫杉醇前体合成 MEP 途径中已克隆的基因

近年来,基因组学和生物信息学的快速发展,给植物代谢组学的研究带来了革命性的变化;自从 MEP 途径于 1994 年首次在植物中发现以来,由于分子遗传学和生物化学研究取得了很大进展,该途径中的所有基因在植物中都被克隆得到。本文将紫杉醇前体生物合成中 MEP 途径上已经克隆的 4 个基因综述如下。

2.1 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS):DXS 是 MEP 途径上的第一个酶,也是第一个关键酶,该反应依赖于硫胺素焦磷酸(thiamine pyrophosphate),其作用是催化丙酮酸和 3-磷酸甘油醛(G3P)生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 中,突变体 *clat1* 由于缺失 DXS 基因而呈现“白化”特征,当添加 1-脱氧-D-木酮糖(1-deoxy-D-xylulose, DX)后发现有新的色素生成,并证实 DXS 对植物叶绿体及白色体的发育具有重要的作用^[11]。MEP 途径上其他基因通常都只有一个拷贝(单基因),而众多数据表明 DXS 在植物基因组中有一个小基因家族^[9]。在挪威云杉 *Picea abies* (L.) Karst. 中,DXS 家族包含 3 个功能不尽相同的基因 *PaDXS1*、*PaDXS2A* 及 *PaDXS2B*。其中 *PaDXS1* 在树皮中表达量不受到伤害及真菌诱导的影响,为一组成型表达基因;在诱导子诱导下,*PaDXS2A* 响应壳聚糖、甲基水杨酸以及真菌 *Ceratocystis polonica* 刺激,*PaDXS2B* 能对甲基茉莉酸和壳聚糖的诱导做出应答,但对甲基水杨酸和真菌 *C. polonica* 的诱导没有任何响应,揭示 DXS 基因家族在防御食草动物或真菌侵袭起到不同的作用^[12]。在萜类物质的合成中,DXS 扮演了一个重要的角色。在宽叶薰衣草 *Lavandula latifolia* Vill. 中转入拟南芥的 DXS 基因,随着该基因的表达上调,转基因植株中精油的产量在叶和花中均有提高,叶中最高可增加 359.0%,花中最高可增加 74.1%^[13]。由此可见,DXS 是植物萜类前体生物合成中的关键酶和实现萜类代谢工程的重要靶点。Liao 等从曼地亚红豆杉 *Taxus media* Rehd. 中首次克隆到 DXS 基因(GenBank Accession number: AY644708),*TmDXS* 基因全长 1 776 bp,编码 476 个氨基酸。然而目前还未见红豆杉 DXS 基因功能分析及其在紫杉醇合成中的作用等相关研究报道。可以推断,利用红豆杉基因工程生产紫杉醇,提高代谢靶标产物的积累,DXS 将是一个重要的代谢工程靶点。

2.2 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR):在位于质体的 MEP 途径中,DXP 经过 DXR 催化,以 NADPH 作为还原剂,并依赖二价阳离子,经原子重排和还原生成 MEP^[14]。在拟南芥中,DXR 是一个单基因编码的蛋白,在所比对的所有植物蛋白序列中,N 端均含有定位于质体的转运肽,且切割位点保守;通过缺失 DXR 基因的致死突变 *E. coli* 菌株 EcAB1-2 验证了 DXR 蛋白的功能;克隆 DXR 基因的启动子序列,构建表达 GUS 蛋白的载体,证明 DXR 是植物 MEP 途径中限速酶^[15]。长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G Don 中,DXR 的表达量与单萜吲哚生物碱(monoterpenoid indole alkaloids, MIAs)的积累呈现显著的正相关,是萜类吲哚生物碱生

物合成重要的调节基因^[16]。Mahmoud 等^[17]以 DXR 的催化步骤作为靶点之一,在薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 中过量表达来源于薄荷的 DXR 和薄荷呋喃合酶(menthofuran synthase)两个基因,使得薄荷精油的量提高了 50%,表明突破 MEP 途径中上游限速瓶颈,可以实现对目标产物的代谢工程生产。在青蒿素的代谢工程研究中,利用大肠杆菌重建青蒿素前体生物合成途径,DXR 催化步骤也为首选靶点之一^[18]。可以推断,要提高红豆杉中紫杉醇的量,DXR 是一个很有效的代谢工程靶点。迄今为止,仅见郑清平等^[19]克隆了中国红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. DXR 基因的 535 bp 核心片段(GenBank Accession number: AY445651),Liao 等克隆了曼地亚红豆杉 DXR 的 cDNA 全长(GenBank Accession number: AY588-482),还未见关于红豆杉 DXR 基因功能鉴定及其在紫杉醇生物合成中作用的研究报道。因而克隆和鉴定红豆杉 DXR 基因有助于在分子水平阐明紫杉醇前体生物合成的一个限速反应,为紫杉醇的代谢工程提供一个理想的候选基因和作用靶点。

2.3 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸脱氢转移酶(MECT):MECT 属于胞嘧啶转移酶家族的一个成员,其参与催化 MEP 途径的第 3 步酶促反应,将 CDP 和 MEP 连接生成 CDP-ME,该酶促反应依赖于胞苷三磷酸(CTP)。Shi 等^[20]克隆并表达了来源结核分枝杆菌 H37RV (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv)的 MECT 基因,发现 *MtMECT* 具有很高的嘧啶碱基特异性且依赖于二价阳离子, Mg^{2+} 存在时酶活性最高。在植物中,编码 MECT 的基因和 MECT 酶已从拟南芥、银杏 *Ginkgo biloba* L. 中获得,但对酶功能的研究未见报道^[21]。为验证 MECT 蛋白功能,Rohdich 等^[22]提取大肠杆菌的 MECT,将其参与催化¹⁴C 标记的 MEP 途径上的酶促反应,结果生成带有¹⁴C 的 CDP-ME,将已标记的 CDP-ME 转入辣椒,在辣椒质体中检测到 CDP-ME 参与了类胡萝卜素生物合成,揭示 MECT 在萜类生物合成中起到重要的作用。刘万宏等^[23]首次从曼地亚红豆杉中克隆到编码该蛋白的基因 *TmMECT* (GenBank Accession number: EF534-010),cDNA 序列全长 1 301 bp,推测编码 312 个氨基酸残基的多肽;组织差异表达谱显示该基因在叶和树皮表达量较高,并采用颜色互补的方法验证了基因功能,为开展紫杉醇代谢工程提供了候选基因。

2.4 2-C-甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸合成酶(MECPS):MECPS 是 MEP 途径上的第 5 个酶,催化 CDP-MEP 生成 ME-cPP。由于 MEP 途径不存在于古细菌、真菌和动物中,且 MEP 途径中的酶与哺乳动物中的蛋白同源性很低,使得通过特异性地抑制途径来杀死病原菌成为可能。在结核分枝杆菌中证实 MECPS 可以作为治疗靶点,是具有潜在的药物功能测定作用的重要基因^[24]。长春花中 MECPS 全长 cDNA 为 994 碱基,其 ORF 编码一个相对分子质量为 2.5×10^4 的 236 个氨基酸残基的多肽,该多肽的氨基酸序列与大肠杆菌 MECPS 有 48% 一致性,其 N 端有引导该酶定位于质体的转运肽,长春花 MECPS 基因的表达量与长春花中单

萜呋啉生物碱 (MIAs) 的积累正相关,表明 MECPS 表达增强有利于代谢向更下游的方向流动^[16]。通过 Northern 杂交与原位杂交发现,MECPS 与其他 MEP 途径基因 (DXS 和 DXR) 及 MIAs 下游途径的基因 (geraniol 10-hydroxylase, GIOH) 一样,均显示相同的细胞特异性表达模式^[25],揭示 MECPS 在次生代谢产物合成途径中具有重要的地位。刘万宏等^[23]从曼地亚红豆杉中克隆到编码该蛋白的基因 *Tm-MECPS* (GenBank Accession number: EF534009), cDNA 序列全长 899 bp,推测编码 241 个氨基酸残基的多肽;组织差异表达谱显示基因在叶和树皮表达量较高,并采用颜色互补的方法验证该基因有效推动载有 pAC-BETA 质粒的大肠杆菌 - 类胡萝卜素积累,为绘制完整的 MEP 途径代谢图和紫杉醇代谢工程提供候选基因和作用靶点。

3 细胞培养合成紫杉醇的研究

3.1 培养基的选择:传统生产紫杉醇的方法产量低下,不足以满足需求,所以通过培养红豆杉细胞来生产紫杉醇是目前解决紫杉醇要求的重要手段之一^[26]。自 Christen 首次获得的利用红豆杉细胞生产紫杉醇的专利以来,现已经建立了多种红豆杉细胞培养系统,培养条件得到不断优化。在红豆杉细胞培养中,通常选用 B5 培养基,而碳源以果糖为最佳,而且在适当糖浓度下,紫杉醇的质量浓度可达到 1.43 mg/L^[27]。添加较低质量浓度的细胞分裂素 (小于 1 mg/L) 和较高质量浓度的 2,4-D (1 ~ 8 mg/L) 有利于愈伤组织的生长;附加 0.5 mg/L 的 GA3 能显著促进愈伤组织的生长,但不影响紫杉醇的量^[28]。对紫杉醇生产而言,IAA 与 BA 组合处理是最好的方案,紫杉醇的产量可达 (14.78 ± 0.86) mg/L^[29]。

3.2 诱导子对紫杉醇合成的影响:紫杉醇的积累通常认为是红豆杉类植物对外界特殊刺激生物响应的结果^[30]。诱导子是可以调节代谢途径上基因活性以改变代谢强度的一类物质,包括植物激素、无机盐、NO、乙烯、真菌培养物等。在红豆杉细胞培养研究中,添加 100 μmol/L 的甲基茉莉酸能促进紫杉醇的合成,产量可达 14.4 mg/L^[29]。将 NO 作用于云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K Fu 细胞能提高苯基丙氨酸氨基裂解酶活性,并且增加了紫杉醇的积累;20 mg/L 水杨酸与 MVA 途径专一抑制剂 Mevastatin 同时添加到南方红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee et L. Ól.) Cheng et L. K Fu 细胞中发现细胞死亡,但每克干质量细胞紫杉醇的量可达 1.626 mg。证实水杨酸促进紫杉醇的合成主要是通过增加 IPP 的产量,此结果与紫杉醇前体物质依赖于 MEP 途径的事实相吻合^[7]。Expósito 等用不同浓度的紫杉醇刺激欧洲红豆杉 *Taxus baccata* 细胞发现,在添加 200 mg/L 外源紫杉醇时,紫杉醇产量为对照组的 32.7 倍,但细胞活力有所下降;而且通过 RT-PCR 方法检测编码紫杉二烯合酶 (taxadiene synthase, TS) 与 DXS 的基因发现,外源紫杉醇明显诱导 2 个基因的表达,推测紫杉醇本身是主要的诱导因子^[31]。

4 产紫杉醇内生真菌的研究

Stierle 首次从太平洋红豆杉树皮韧皮部中分离到一个

新菌种 *Taxomyces andreanae*, 培养 3 周后发现具有稳定生产紫杉醇的能力,产量为 24 ~ 50 ng/L,此举开创了利用内生真菌发酵生产紫杉醇的先河,成为当今紫杉醇生物合成研究的热点之一^[4]。近年来,发现几乎所有的红豆杉植物都含有产紫杉醇真菌,且真菌的宿主多样。Li 等^[32]将产紫杉醇内生真菌 *Fusarium mairei* 培养液 (endophytic fungi culture broth, EFCB) 添加至东北红豆杉悬浮细胞中,紫杉醇最高产量可达 6.11 mg/L,比对照细胞高 2 ~ 6.8 倍;采用细胞与真菌共培养较 EFCB 处理细胞,紫杉醇产量提高 2 倍以上,可见内生真菌对红豆杉细胞生产紫杉醇具有重要意义。Zhang 等^[33]以紫杉醇生物合成途径中去乙酰基巴卡亭 -10-O-乙酰基转运酶基因和 C-13 类苯基丙烷侧链乙酰 CoA 转运酶基因为分子标记,采用 PCR 技术从来源于曼地亚红豆杉和云南红豆杉的 90 株内生真菌中筛选出 3 株产紫杉醇真菌,测定结果为每克干质量菌丝含 100 ~ 160 μg 紫杉醇。从生态保护和经济角度来看,利用微生物发酵比传统提取或半合成的方法具有生产周期短、操作简单、产量稳定的优势,但都存在紫杉醇产量低,难以进行工业化生产的难题。

5 红豆杉的遗传转化的研究

随着植物中 MEP 途径上的基因与酶的全面报道,这些基因与酶如何有效利用及紫杉醇代谢工程的实现,关键技术就是建立稳定高效的红豆杉遗传转化体系。对于红豆杉的遗传转化也进行了有益探索,通过构建 pCambia1302 + GFP 二元载体,转化东北红豆杉 *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. 悬浮细胞,Western Blot 杂交检测到 GFP 蛋白 (green fluorescent protein) 在细胞中表达,揭示红豆杉转入外源 GFP 基因能够瞬时表达^[34]。利用发根农杆菌 LBA9402 侵染曼地亚红豆杉获得毛状根,并且在 100 μmol/L 的甲基茉莉酸诱导下,每克干质量毛状根中的紫杉醇的量从 69 μg 提高到 210 μg^[35]。然而,这些遗传转化的方法并不能维持转基因毛状根或细胞遗传稳定性,对大规模生产无可操作性。Ketchum 等^[36]分别用野生型发根农杆菌 ATCC15834 携带二元载体 pCambia1301 根癌农杆菌 EHA105 携带二元载体 pCambia1305.2 转化东北红豆杉;用野生型发根农杆菌 ATCC25818 携带二元载体 pCambia1301 转化中国红豆杉。两个转基因东北红豆杉细胞株可以维持培养 20 个月以上,而转基因中国红豆杉细胞株可以维持培养 9 个月以上。揭示红豆杉遗传转化技术可稳定继代遗传,为紫杉醇代谢工程打下坚实基础。

6 展望

在这些不同研究领域中,培育高产紫杉醇的红豆杉栽培品种所需周期长、效率低,紫杉醇产量提高有限;紫杉醇化学全合成虽然已经成功,但是合成的步骤复杂,其他有毒或无用的副产品多,紫杉醇产率太低,使得紫杉醇的全化学合成成本高且不具有商业前景;生产紫杉醇的微生物绝大多数是与红豆杉共生的真菌,所含紫杉醇极微,并且这些真菌的培养和大规模发酵很困难,菌株的衰退也是一个难题,到目前还未见产业化前景。相比之下,利用基因工程遗传改良红豆

杉,开展紫杉醇代谢工程研究,进而生产紫杉醇就具有很大优势,主要表现在:(1)红豆杉离体培养和遗传转化的成功,为利用基因工程技术遗传改良红豆杉奠定了良好的实践基础;(2)把植物次生代谢途径中的关键酶基因导入植物或其他物种中高效表达用于生产有用的次生代谢物质有诸多成功报道。因而代谢工程是将来生产紫杉醇的理想途径,紫杉醇前体生物合成分子生物学研究在这方面起到决定作用,为最终实现紫杉醇商业化生产奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J American Chem Soc*, 1971, 93: 2325-2327.
- [2] Goldspiel B R. Clinical overview of the taxanes [J]. *Pharmacotherapy*, 1997, 17: 110-125.
- [3] Nicolaou K C, Yang Z, Liu J J, et al. Total synthesis of taxol [J]. *Nature*, 1994, 367: 630-634.
- [4] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [5] 金涛,王伟,刘军,等.东北红豆杉内生真菌的分离及产紫杉醇菌的鉴定[J].*中草药*, 2007, 38(5): 770-772.
- [6] Zhong J J. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxane [J]. *Biosci Bioeng*, 2002, 94: 591-599.
- [7] Wang Y D, Yuan Y J, Wu J C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *maiirei* [J]. *Biochem Eng J*, 2004, 19(13): 259-265.
- [8] Dubey V S, Bhalla R, Luthra R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants [J]. *J Biosci*, 2003, 28(5): 637-646.
- [9] Liao Z H, Chen M, Gong Y F, et al. Isoprenoid biosynthesis in plants: pathways, genes, regulation and metabolic engineering [J]. *J Biol Sci*, 2006, 6(1): 209-219.
- [10] Eisenreich W, Menhard B, Hylands P J, et al. Studies on biosynthesis of taxol: the carbon skeleton is not of mevalonate origin [J]. *Proceed Nation Acad Sci*, 1996, 93: 6431-6436.
- [11] Est óez J M, Cantero A, Romero C, et al. Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 95-103.
- [12] Phillips M A, Walter M H, Ralph S G, et al. Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*) [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 243-257.
- [13] Munoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, et al. Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142: 890-900.
- [14] Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, et al. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis [J]. *Proceed Nation Acad Sci*, 1998, 95: 9879-9884.
- [15] Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, et al. Expression and molecular analysis of the arabidopsis DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *Plant Physiol*, 2002, 151: 1581-1591.
- [16] Veau B, Courtois M, Oudin A, et al. Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Cartharanthus roseus* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1517: 159-163.
- [17] Mahmoud S S, Croteau R. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase [J]. *Proceed Nation Acad Sci*, 2001, 98: 8915-8920.
- [18] Nartin V J, Pitera D J, Withers S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. *Nature*, 2003, 21: 796-802.
- [19] 郑清平,余龙江,刘智,等.红豆杉细胞非甲羟戊酸途径关键酶基因 dxr 的克隆与分析[J].*生物工程学报*, 2004, 20(4): 548-553.
- [20] Shi W, Feng J, Zhang M, et al. Biosynthesis of isoprenoids: characterization of a functionally active recombinant 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (IspD) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(6): 911-920.
- [21] 刘万宏,陈敏,廖志华,等.银杏内酯得生物合成途径及生物技术研究进展[J].*中草药*, 2007, 38(6): 941-945.
- [22] Rohdich F, Wungsintaweekul J, Fellermeier M, et al. Cytidine 5-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol [J]. *Proceed Nation Acad Sci*, 1999, 96: 11758-11763.
- [23] 刘万宏.紫杉醇前体合成途径两个关键酶基因克隆和分析[D].重庆:西南大学,2008.
- [24] Buetow L, Brown A C, Parish T, et al. The structure of mycobacteria 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, an essential enzyme, provides a platform for drug discovery [J]. *BMC Structural Biol*, 2007, 7: 68-79.
- [25] Burlat V, Oudin A, Courtois M, et al. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Cartharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites [J]. *Plant J*, 2004, 38: 131-141.
- [26] Miller K, Neilan B, Sze D M. Development of taxol and other endophyte produced anticancer agents [J]. *Recent Patents Anti-cancer Drug Disc*, 2008, 3: 14-19.
- [27] Kim J H, Yun J H. A novel method of isolation taxane in *Taxus brevifolia* cell cultures: Effects of sugar [J]. *Biotechnol Lett*, 1995, 17: 101-106.
- [28] Fett-Nero A G, Zhang W Y. Kinetics of taxol production: growth and nutrient uptake in cell suspension of *Taxus* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44: 205-210.
- [29] Ketchum R E B, Gibson D M, Greenspan G L. Media optimization for maximum biomass production in cell-cultures of Pacific Yew (*Taxus brevifolia* Nutt.) [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1995, 42: 185-193.
- [30] Tabata H. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004, 87: 1-23.
- [31] Exp óito O, Bonfill M, Onrubia M, et al. Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in *Taxus baccata* suspension cultures [J]. *New Biotechnol*, 2009, 25(4): 252-259.
- [32] Li Y C, Tao W Y. Interactions of taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during taxol accumulation [J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(1): 102-112.
- [33] 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.
- [34] Kim C H, Kim K I, Chung I S. Expression of modified green fluorescent protein in suspension culture of *Taxus cuspidate* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2000, 10(1): 91-94.
- [35] Furmanowa M, Syklovska-Baranek K. Hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaaccation [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22: 683-686.
- [36] Ketchum R E, Wherland L, Croteau R. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26: 1025-1033.