

紫杉醇类抗肿瘤原料药生产的研究进展

熊亮斌¹, 唐红菊¹, 宋新巍², 刘显舟¹, 张馨文¹, 计雨情¹, 徐 曼¹, 徐一新^{1*}

1. 上海健康医学院, 上海 201318

2. 黎明化工研究设计院有限责任公司, 河南 洛阳 471099

摘 要: 紫杉醇类化合物属二萜类生物碱, 是已知疗效最好的植物源抗肿瘤药物之一。目前, 工业上主要依赖半化学合成、植物提取及细胞培养等途径大规模获取紫杉醇类产物。针对主流方法存在的问题, 重点分析获取紫杉醇类活性产物的研发动向, 探讨采用红豆杉树皮细胞培养、内生真菌发酵生产紫杉醇的技术现状与困境, 简要梳理紫杉醇的天然合成途径, 讨论采用合成生物学方法异源合成紫杉醇及其前体的可能性, 为建立绿色、可持续的紫杉醇类活性产物生产路线提供参考。

关键词: 紫杉醇; 巴卡亭 III; 合成; 树皮细胞培养; 内生真菌; 合成生物学

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)15-4042-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.15.025

Recent advances in synthesis of paclitaxel antitumor pharmaceutical raw materials

XIONG Liang-bin¹, TANG Hong-ju¹, SONG Xin-wei², LIU Xian-zhou¹, ZHANG Xin-wen¹, JI Yu-qing¹, XU Man¹, XU Yi-xin¹

1. Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China

2. Liming Research & Design Institute of Chemical Industry Co., Ltd., Luoyang 471099, China

Abstract: Paclitaxel, a diterpenoid alkaloid, is known as one of the most effective plant antitumor drugs. At present, paclitaxel products are mainly obtained by semi-chemical synthesis, extraction from *Taxus* spp. plant and bark cell culture synthesis. This study emphatically analyzed the research progress in the production of paclitaxel. The identification of genes related to paclitaxel biosynthesis was summarized. Furthermore, it was assessed that the possibility of using the bark cell culture of *Taxus chinensis*, endophytic fungi fermentation and the synthetic biology heterologous synthesis to produce paclitaxel compounds. The review can provide theoretical reference for the establishment of green and sustainable industrial production methods of the paclitaxel active products and their precursors.

Key words: paclitaxel; baccatin III; synthesis; bark cell culture; endophytic fungi; synthetic biology

紫杉醇类化合物是以紫杉醇 (paclitaxel)、多烯紫杉醇 (docetaxel) 为代表, 结构具有紫杉烷骨架的一系列天然产物及衍生物。此类物质抗肿瘤机制独特, 主要通过增强微管纤维蛋白聚合, 使有丝分裂停止于 G₂/M 期, 诱发肿瘤细胞凋亡。紫杉醇属二萜类生物碱, 最早由美国科学家 Wani 和 Wall 于 1967 年从太平洋紫杉, 即短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 树皮分离获得^[1]。随后经 20 多年的临床研究, 紫杉醇注射液 (商品名 Taxol[®]) 于 1992 年上市, 目前累计销售已超 145 亿美金。1996 年,

与其结构仅相差 2 个基团的多烯紫杉醇 (商品名 Taxotere[®]) 通过评审, 后者在生物利用度、滞留时间、细胞内浓度及抗肿瘤活性等方面均明显优于前者, 可用于晚期乳腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌及胃癌等多种恶性肿瘤的治疗^[2-4]。2010 年, 多烯紫杉醇的 7,10-二甲醚产物卡巴他赛 (Cabazitaxel, 商品名 Jevtana[®]) 获批, 随即成为治疗晚期前列腺癌的一种重要二线药物。

早期, 紫杉醇类药物使用聚氧乙烯蓖麻油及聚山梨酯-80 等辅料, 会刺激机体释放组胺引起过敏

收稿日期: 2020-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31370080); 上海市教育委员会上海健康医学院医学技术 II 类高峰高原学科建设计划 (2018-2020); 上海高校青年教师培养资助计划 (ZZJKYX19011); 上海健康医学院师资人才百人库

作者简介: 熊亮斌 (1986—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为天然产物的代谢工程及合成生物学。

*通信作者 徐一新 (1968—), 女, 教授, 硕士生导师。Tel: (021)65887232 E-mail: xuyx@sumhs.edu.cn

反应。随后的多种改良剂型可有效降低不良反应，从而逐步占据了主要市场份额。2003 年上市的脂质体包埋型剂型力朴素（商品名 Lipusu®）是全球首个紫杉醇改良剂型。2005 年，Celgene 公司的白蛋白结合型紫杉醇 Abraxane® 获批，该剂型以人源白蛋白为载体，自上市以来销售逐年稳步增长。据统计，全球紫杉烷类药物年销售约 50 亿美元，其中 Abraxane 单品占比即高达 1/5（2018 年销售额 10.62 亿美金）。相比而言，我国同类产品的年销售额约 51 亿元，其中以力朴素销量最为突出（2017 年销售 21.7 亿元）。2018 年，随着石家庄制药集团有限公司和江苏恒瑞医药股份有限公司的白蛋白结合型仿制药先后上市，进一步充实了我国的紫杉醇类制剂品种，市场竞争也愈加激烈。

目前，获取紫杉醇类原料药主要依赖植物提取，化学/半化学合成及生物合成 3 种途径。作为疗效最好的抗肿瘤天然产物之一，紫杉醇最初源于短叶红豆杉的树皮提取物，后逐渐开发出从针叶中提取具有紫杉烷骨架且含量更高的结构类似物，再借助化学修饰的大规模生产方法。多烯紫杉醇便是在衍生化研究获得的半合成抗肿瘤药物。然而，现行的植物提取及半化学合成方法均严重依赖于自然资源或种植业。利用绿色环保、可持续生产的生物合成策略则有望彻底解决紫杉醇类活性产物的供需矛盾，对于天然产物的生产研究具有前瞻性战略价值。

1 现行紫杉醇获取途径

1.1 植物提取与化学合成

从红豆杉分离提取是早期获取紫杉醇的主要途径。红豆杉属共 15 种^[5]，包括短叶红豆杉、欧洲红豆杉 *T. baccata* L.、东北红豆杉 *T. cuspidata* S. et Z. 等，但含量普遍较低，即便是公认最高的短叶红豆杉内层树皮，也仅含 0.069% 的紫杉醇。利用现行工艺，可从 1 kg 干树皮提取约 0.1~0.5 g 紫杉醇^[6]，然而肿瘤患者单个疗程即消耗达 2 g，理论上至少需采集 4~8 棵生长超 50 年的野生红豆杉树皮。据保守估算，2018 年全球紫杉醇原料药产量已突破 2 000 kg，如单纯依靠植物提取，实难满足持续增长的临床用药需求。

利用化学合成是缓解天然产物供应不足的常用策略。紫杉醇化学名为 5β,20-环氧-1,2α,4,7β,10β,13α-六羟基紫杉烷-11-烯-9-酮-4,10-二乙酸酯-2-苯甲酸酯-13 [(2'R,3'S)-N-苯甲酰-3-苯基异丝氨酸酯]，结构新颖而复杂。虽然早在 1994 年就已建立多条全

合成方法，但由于路线长、产率低、成本高昂等原因，已有方案均未能应用于商业生产^[7]。利用人工培育的红豆杉针叶提取与紫杉醇结构类似的前体，如巴卡亭 III（baccatine III）、10-去乙酰巴卡亭 III（10-deacetyl baccatin III, 10-DAB）等，经几步催化，也可规模化生产（多烯）紫杉醇^[8-9]。由于半化学法使用的前体含量较高（约 0.1%）、提取于可再生资源、产物纯度高等，其产量目前已占世界总产量的近 2/3。然而半合成路线至少需经 35 步反应，最高产率仅为 0.4%，所使用的前体仍源于人工种植提取，从本质上并未彻底解决紫杉醇原料供应的难题。

1.2 树皮细胞培养

通过培养红豆杉树皮细胞生物合成紫杉醇，无需引入外源基因，可避免外源酶催化产物造成的细胞毒性，是一条无需消耗天然红豆杉资源、不依赖土壤种植的绿色生产方法。在商业生产领域，意大利 Indena 公司最早采用细胞培养生产紫杉醇原料药，而美国 Python Biotech 公司是同类工艺的领头公司，年产超 100 kg。然而树皮细胞的紫杉醇初始产量过低，同时由于对调控机制的解析不够、缺乏高效的工具等，很难使用常规的代谢工程策略大幅提升紫杉醇产率。通过培养条件优化、添加诱导因子等方法则可在一定程度上改善树皮细胞产量。2013 年，Han 等^[10]研究证实，搅拌式发酵的剪应力会破坏合成巴卡亭 III 及紫杉醇的上游中间体牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸（geranyl geranyl pyrophosphate, GGPP）的环化，影响巴卡亭 III 及紫杉醇产率，故使用气升式发酵可能更有利于产物合成。此外，培养温度也会显著影响紫杉醇产量，当温度为 24 °C 时，有利于细胞生长；而当温度升高至 29 °C 时，细胞则表现出加速合成紫杉醇的状态^[11]。

另一方面，通过向培养体系添加诱导子，增强上游基因表达，也可促进紫杉醇的生产。生长素、脱落酸和细胞分裂素等植物激素以及茉莉酸（JA）和水杨酸（SA）等常被作为诱导子调节植物次生代谢效率^[12]。JA 可通过调节多种生物碱合成关键基因的表达，影响产物产率^[13]，其甲酯形式茉莉酸甲酯（MeJA）是参与细胞信号转导的重要信号分子^[14]。通过向红豆杉树皮细胞培养体系添加 MeJA，上游途径的紫杉二烯合成酶（taxadiene synthase, TS）、紫杉烷-10β-羟基化酶（taxoid 10β-hydroxylase, T10βH）及 10-去乙酰巴卡亭 III-10-O-乙酰转移酶（10-deacetyl baccatin III-10-O-acetyltransferase，

DBAT) 等基因表达显著增强^[15-16], 从而可显著提高紫杉醇的产量。

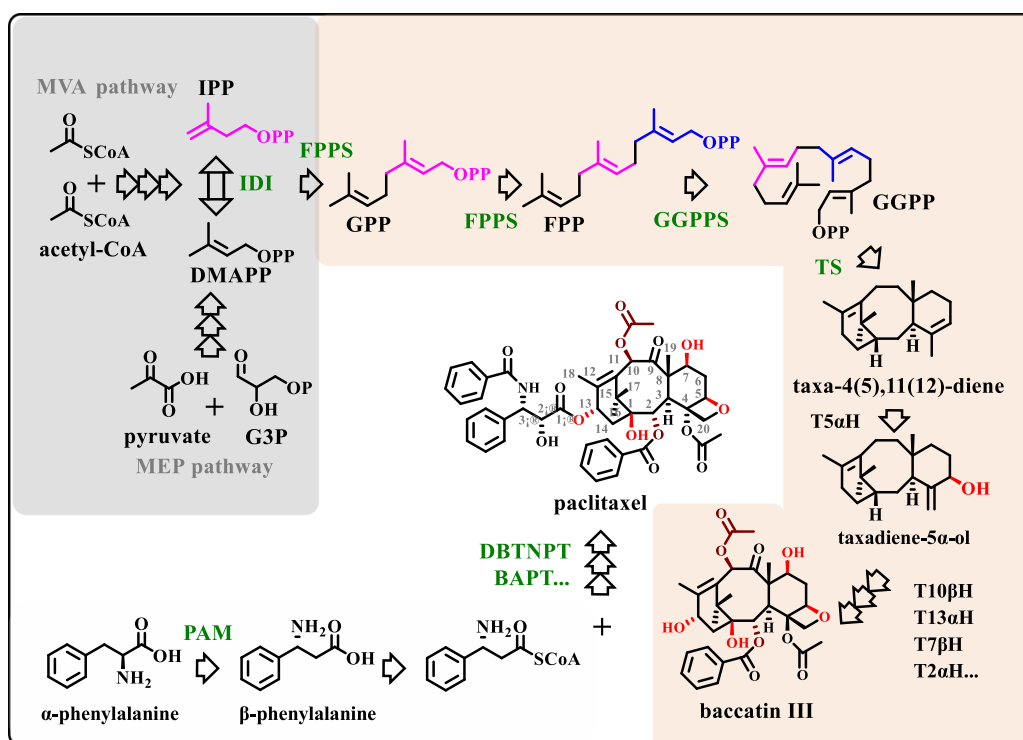
2 紫杉醇的合成代谢通路

紫杉醇为三环二萜类化合物, 结构稍显复杂, 其合成通路可分为 3 个典型阶段(图 1): (1) 紫杉烷环状母核结构的形成, 阶段产物为巴卡亭 III; (2) 苯基异丝氨酸侧链的合成; (3) 侧链与母核酰化连接, 再经侧链修饰形成紫杉醇^[17]。

利用乙酰辅酶 A 为出发原料, 通过胞质中的甲羟戊酸途径 (mevalonic acid pathway, MVA), 或以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸为出发原料, 通过甲基赤藓醇磷酸途径 (methylerythritol phosphate, MEP) 经 6~7 步反应, 可合成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP)。IPP 在对应的异戊烯基焦磷酸异构酶 (IDI) 的催化下, 转化为其异构体甲基丙烯基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。DMAPP 与 IPP 经法尼基焦磷酸合成酶 (farnesyl

pyrophosphate synthase, FPPS) 催化缩合, 可依次形成牻牛儿基焦磷酸 (geranylpyrophosphate, GPP)、法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP), 再经牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 (geranyl geranyl diphosphate synthase, GGPPS) 催化, 即可得 GGPP。

GGPP 是紫杉烷类产物生物合成的直接前体, 大约再经 19 步催化反应, 即可生成紫杉醇^[18]。首先, GGPP 经 TS 催化, 环化形成紫杉二烯 [taxa-4(5),11(12)-diene], 此为紫杉烷二环二萜骨架合成的第一步反应。随后, 紫杉二烯在细胞色素 P450 单加氧酶 (CYP) 的催化下, 分别在 C5、C10、C2、C9、C13、C7 及 C1 等碳位发生羟基化^[19], 继而, C2、C5 及 C10 位羟基进一步发生酰基化, C9 位羟基酮基化, 以及形成 4,5-环氧丙烷环等, 即可生成核心前体巴卡亭 III^[20], 此为现行半化学合成工艺的出发原料。需注意的是, 羟基化及酰基化等并非按



IPP-异戊烯基焦磷酸 DMAPP-甲基丙烯基焦磷酸 IDI-异戊烯基焦磷酸异构酶 GPP-牻牛儿基焦磷酸 FPP-法尼基焦磷酸 FPPS-法尼基焦磷酸合成酶 GGPP-牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 GGPPS-牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 TS-紫杉二烯合成酶 T5αH-紫杉二烯-5α-羟基化酶 T10βH-紫杉烷-10β-羟基化酶 T13αH-紫杉烷-13α-羟基化酶 T7βH-紫杉烷-7β-羟基化酶 T2αH-紫杉烷-2α-羟基化酶 PAM-苯丙氨酸氨基转移酶 BAPT-巴卡亭 III-3-氨基-3-苯丙酰基转移酶

IPP-isopentenyl diphosphate DMAPP-dimethylallyl diphosphate IDI-isopentenyl-diphosphate isomerase GPP-geranyl pyrophosphate FPP-farnesyl pyrophosphate FPPS-FPP synthase GGPP-geranyl geranyl pyrophosphate GGPPS-GGPP synthase TS-taxadiene synthase T5αH-taxadiene-5α-hydroxylase T10βH-taxoid-10β-hydroxylase T13αH-taxoid-13α-hydroxylase T7βH-taxoid-7β-hydroxylase T2αH-taxoid-2α-hydroxylase PAM-phenylalanine aminomutase BAPT-baccatin III-3-amino-3-phenylpropanoyl transferase

图 1 紫杉醇的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of paclitaxel

固定的顺序先后发生,某些酰基化反应的发生也可早于其他碳位的羟基化^[21]。截止目前,已有包括 C5^[22]、C10^[23]、C13^[24]、C7^[25]、C2^[26]及 C9^[27]位在内的至少 6 种羟基化酶基因被克隆与鉴定。

紫杉烷类产物 C13 位的苯基异丝氨酸侧链,是赋予其高效抗癌活性的核心因素。 α -苯丙氨酸受对应的变位酶(phenylalanine aminomutase, PAM)催化^[28],异构化为 β -苯丙氨酸,再结合乙酰-CoA,生成 β -苯丙氨酸-CoA。随后,经相应酰基转移酶(3-amino-3-phenylpropanoyltransferase, BAPT)催化^[29], β -苯丙氨酸-CoA 与巴卡亭 III C13 位羟基酰基连接,生成 β -苯丙胺酰基-巴卡亭 III (β -phenylalanyl-baccatin III),再经进一步的侧链羟基化,形成 3'-N-去苯甲酰紫杉醇(3'-N-debenzoyltaxol)。最后,经 3'-N-去苯甲酰-2'-脱氧紫杉醇-N-苯甲酰基转移酶(3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol-N-benzoyltransferase, DBTNBT)催化,3'-N-去苯甲酰紫杉醇侧链 C3'位的 N 发生苯甲酰化,即可生成紫杉醇^[29]。

3 潜在的紫杉醇获取途径

3.1 内生真菌培养

从红豆杉树皮分离可自主产生紫杉醇的内生真菌^[30-31]理论上可更快速、规模化的获得此天然产物。自 1993 年以来,累计已分离鉴定 60 株以上的相关内生真菌^[32]。由加拿大 Novo Pharma 公司分离的 *Alternaria alternate*,经培养优化后,紫杉醇最高产量可达 243.8 mg/L^[33],显示出极高的投产价值。然而,由于内生真菌与红豆杉之间的种属差异,已解析的催化酶及调控机制无法套用于针对内生真菌的代谢改造,因此有必要独立解析其特有的合成途径。近期, Miao 等^[34]通过测序注释紫杉醇产生菌 *Cladosporium cladosporioides* MD2,挖掘到 9 个可能参与萜类骨架合成的单基因,40 个可能参与从 GGPP 合成 10-DAB 的功能基因,为揭示内生真菌的紫杉醇合成途径提供了重要信息。利用内生真菌生产紫杉醇具有周期短、条件可控、成本低廉等众多优势^[35],可稳定、规模化地获取紫杉醇或关键前体,然而尽管相关研究已开展 30 余年,至今却未见产业化应用的报道。可预料的是,未来如能通过培养内生真菌直接生产紫杉醇类产物,其供需失衡问题必将随之解决。

3.2 利用合成生物学生产紫杉醇

基于合成生物学理念,通过植入关键的催化基

因/途径,重构对接底盘细胞的代谢通路,理论上可实现复杂产物的异源生物合成。利用底盘细胞的 MEP 途径或 MVA 途径等,提供 IPP 及 DMAPP 等基础原料,借助外源引入的关键酶催化,即可打通紫杉醇或其中间体的异源合成通路。近些年,利用大肠杆菌、酿酒酵母为代表的微生物底盘由于操作简便、易规模化培养等因素,相关研究较为丰富,而利用烟草等植物底盘表达植物源 CYP 具有显著的兼容性优势,也已成为一条颇具前景的研究方案。

3.2.1 利用微生物底盘合成紫杉醇前体 大肠杆菌生长迅速,代谢通路简单清晰,基因组小易于遗传操作,是异源生物合成的首选底盘。2010 年, Ajikumar 等^[36]使用多元模块代谢工程,改造大肠杆菌 MG1655 的衍生株,通过引入合成紫杉二烯所需的 GGPPS 及 TS 2 个催化酶基因,调节上游内源合成模块与下游外源模块间的代谢流平衡,紫杉二烯的摇瓶初始产量即已达到 0.3 g/L。随后,采用分批补料发酵,添加正十二烷的双液相发酵等优化手段,使紫杉二烯的产量提升到 1.02 g/L 的高水平。进一步地,借助后续引入的 T5aH 基因(截去跨膜蛋白编码区)与 P450 还原酶基因(缺失 N-端跨膜区)融合蛋白酶的催化作用,最终实现了 5 α -羟基紫杉二烯的异源生物合成,检测产量达 58 mg/L。2016 年, Biggs 等^[37]通过优化 CYP 及 P450 还原伴侣蛋白细胞色素还原酶(CPR)的相互作用机制, N-端修饰等,使大肠杆菌表达的氧化紫杉烷类产量达到 (570 $\pm$ 45) mg/L。上述工作利用模块化思路,优化重构途径的耦合,通过改造 CYP 基因,突破了其在大肠杆菌底盘活性表达的难题,然而从 GGPP 到紫杉醇的 19 步催化,其中 8~9 步是由 CYP 负责的羟基化反应,由于原核系统缺乏完整的内膜系统,难以定位高活性表达 P450 酶^[38]。此外,在植入较多的异源基因时,原核底盘将出现能量代谢障碍等,因此,利用酿酒酵母等真核表达系统,可能更适用于构建含多步羟基化的合成通路。

酿酒酵母系统可提供更充足的还原型辅酶 II (NADPH),其所具有的完整内膜系统可定位表达参与紫杉醇合成的众多 II 型 CYP 及 CPR 等^[39-41]。通过共转化参与紫杉醇合成的 GGPPS、TS、T5aH、T10 β H 及紫杉烯醇 5 α -乙酰氧化基转移酶(taxadienol 5 α -O-acetyl transferase, TAT), Dejong 等^[42]尝试打通从 IPP 直接合成 taxdiene-5 α -acetate-10 β -ol 的代谢通路,然而遗憾的是,检测结果显示

紫杉二烯的产量只有 1.0 mg/L, T5 α H 的催化产物 taxadiene-5 α -ol 积累量仅为 25 μ g/L, 未检测到 T10 β H 以及 TAT 对应的催化产物。由于从 MVA 途径出发, 不仅可产生萜类产物, 还可为甾体类物质的合成提供原料, 二者存在碳流量竞争关系。Engels 等^[43]通过引入 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 的同工酶 UPC2.1 基因, 促使酵母从外环境中吸收甾体, 抑制胞内甾体物质的合成。此外, 采用嗜酸热硫化叶菌来源的 GGPPS 替代红豆杉来源的 GGPPS, 赋予酵母利用 IPP 或 DMAPP 底物合成 GGPP 的能力, 避免与角鲨烯合成竞争 FPP, 辅助以密码子优化手段, 最终使酵母系统的 GGPP 表达量达到 33.1 mg/L, 紫杉二烯的产量达到 8.7 mg/L。尽管利用酿酒酵母更利于 CYP 和 CPR 的活性表达, 但由于 MVA 途径的代谢流量相对 MEP 途径较低, 前者可为下游合成提供的基础原料量远低于后者, 这很可能是引起利用大肠杆菌或酿酒酵母表达紫杉二烯产量相差几个数量级的关键因素。鉴于此, 2015 年, Zhou 等^[44]尝试通过大肠杆菌大量合成紫杉二烯, 供应已植入 T5 α H、T10 β H 及对应 CPR 的酿酒酵母底盘, 成功实现了工程化共培养合成 taxadien-5 α -acetate-10 β -ol (1 mg/L)。此项工作巧妙结合了 2 种经典底盘的优势, 通过合理设计极大拓宽了利用微生物底盘生产紫杉醇类活性产物的空间^[45]。

3.2.2 利用植物底盘合成紫杉醇前体 利用植物细胞异源合成复杂的天然产物, 相对微生物底盘具有多种优势。自养型的植物细胞, 直接同化 CO₂ 作为碳源, 借助光合作用产生充足的还原力, 同时可有效改善在微生物中极难实现的 CYP 高活性表达^[46-47]。目前, 已有多个研究组尝试利用人参根^[48]、烟草^[49]等表达 TS 异源合成紫杉二烯, 但最高报道产量仅为 27 μ g/g^[49], 似乎并未显示出植物底盘应有的优

势。Li 等^[19]采用叶绿体区室化策略, 定位表达 TS、T5 α H 及其对应的 CPR, 显著缩短了 GGPPS-TS-T5 α H/CPR 连续催化反应的空间位阻, 成功在本氏烟草中合成了 5 α -羟基紫杉二烯 (0.9 μ g/g)。随后, 通过选择性阻断 MVA 途径, 结合代谢工程手段, 最终使紫杉二烯合成量达到 56 μ g/g, 5 α -羟基紫杉二烯产量达到 1.3 μ g/g, 该项工作是近些年利用植物底盘合成紫杉醇前体所取得的重要突破。然而不难看出, 尽管利用植物底盘合成同样源于植物的天然产物具有理论上的优势, 但相比微生物底盘, 其在遗传操作难度、培养条件、规模化培养等方面所具有的先进性并不显著, 因此, 实现紫杉醇或其关键前体的异源植物细胞合成, 仍有待漫长的探索路程。

4 结语与展望

植物源次生代谢产物种类繁多、功能多样, 常对人体具有较强的生理活性, 已广泛应用于医药临床。在抗肿瘤药物市场, 销售较好的植物天然活性产物及相关衍生物主要有紫杉醇、多烯紫杉醇、羟基喜树碱^[50]及长春瑞宾^[51]等。通过从植物中分离提取药物前体或原料, 配合特定的化学修饰及生物转化, 仍是目前获得高活性药物的主要途径。如年销售额超 1 000 亿美元的甾体激素药物, 是仅次于抗生素的第二大类药物, 其合成基础便是利用植物源的甾醇类物质为出发原料, 经微生物转化为雄甾-4-烯-3,17-二酮 (AD)、雄甾-4-烯-3,17-二酮 (ADD) 及 9 α -羟基化-AD (9-OHAD) 等中间体, 再经后续的化学和生物转化, 几乎可获得所有种类的临床用甾体药物^[52-53]。

紫杉醇类药物市场需求庞大, 鉴于半化学合成、植物提取及细胞培养等主流方法存在的问题, 有必要针对性地开展研究逐个突破, 尝试彻底解决紫杉醇类原料药的供需失衡问题 (表 1)。

表 1 紫杉醇类抗肿瘤原料药生产路线

Table 1 Production route of paclitaxel antitumor pharmaceutical raw materials

方法	主要工艺流程	优势	问题
植物提取	采集红豆杉树皮, 直接提取	纯天然, 获取难度相对较低	含量过低, 破坏生态
化学合成	从头全化学合成	不依赖自然资源, 纯实验室合成	路线长, 产率低, 成本高
半化学合成	提取巴卡亭 III、10-DAB 前体, 半化学合成	人工培育提取含量较高的前体, 产物纯度高, 成本相对最低	依赖人工种植
树皮细胞培养	培养红豆杉树皮细胞, 提取产物	无需消耗天然资源, 不依赖种植	代谢改造难, 培养条件过高
内生真菌培养 ^[32]	培养产紫杉醇的内生真菌, 提取产物	周期短, 条件可控, 成本低廉	尚未确定合成途径, 产量不稳定
微生物异源合成 ^[36,44]	植入 TS、CYP/CPR 等, 耦合上游 MEP/MVA 途径供应原料, 合成关键前体或紫杉醇产物	微生物培养简单, 操作难度低, 可规模化培养	紫杉醇合成通路尚未全部解析, 异源活性植入难度较大
植物底盘合成 ^[19]		植物底盘适用于筛选和鉴定活性 CYP	

半化学合成依赖于从红豆杉中提取巴卡亭 III 前体, 后续化学修饰步骤太长, 产率过低。从红豆杉直接提取紫杉醇所引起的生态及环保问题严重。细胞培养法操作复杂, 对培养环境要求极高, 通常还需外源添加诱导物才能获得较高产量。相对于培养树皮细胞, 利用内生真菌获取紫杉醇具有菌体生长迅速、培养难度较小等优点, 是一条颇具研究价值的途径。然而, 内生真菌合成紫杉醇的产量不稳定, 常会随着传代数次的增加, 逐渐丧失紫杉醇的合成能力^[54]。通过从内生真菌中扩增催化合成紫杉醇的途径基因, 发现其序列与宿主红豆杉来源的同源基因具有极高的相似性, 推测内生真菌合成紫杉醇的能力可能是源于宿主的基因转移, 而非共进化的结果^[55], 此观点使得利用内生真菌培养获得紫杉醇的研发之路扑朔迷离。

基于合成生物学理念, 加州大学伯克利分校的 Keasling 院士团队^[40]建立了利用酿酒酵母直接合成青蒿酸, 再经修饰合成青蒿素的半化学生产路线。2013 年, 在先前引入的 P450 酶(CYP71V1)及 CPR1 基础之上, 通过协同表达新鉴定的青蒿酸醛脱氢酶、醇脱氢酶及细胞色素 b5 等, 借助这几个酶的协同催化, 从紫穗槐二烯合成青蒿酸的 3 步氧化反应效率得到大幅增强, 青蒿酸产量达到 25 g/L。同年, Sanofi-Aventis 公司与 Keasling 团队合作, 正式启动 60 万吨产能的青蒿素项目。此工作对于天然活性产物的合成生物学研究具有极其重要的借鉴与参考价值。对于紫杉醇的生物合成, 如利用植物底盘异源合成, 同样需实现数个 CYP 的活性表达, 由此, 通过集中研究突破红豆杉树皮细胞培养存在的瓶颈问题, 不失为一条更直接的方案。而利用真核微生物底盘具有生产周期短、代谢清晰、产物单一、易于分离、供应稳定等诸多优点, 对于结构复杂、手性中心多、化学合成成本高昂的天然产物及前体, 具有较好的研发及应用前景。近些年, 亚细胞区室化定位^[56], 蛋白支架或融合表达关键酶基因^[57]等代谢强化策略的出现, 显著降低了连续催化反应的传质位阻, 使异源合成目标产物的产率得到大幅提升。2018 年, Shao 等^[58]通过 15 轮的染色体融合, 成功将酿酒酵母的 16 条染色体融合, 创建了只有 1 条巨大染色体的酿酒酵母菌株。如能在此基础上, 通过进一步的基因删减构建具有极简基因组的酿酒酵母底盘, 则很可能为合成高值产物提供一款高效的表达系统。然而需注意的是, 由于紫杉二烯下游涉及

CYP 催化的多步羟基化反应, 其中尚有 4 个 CYP 酶未鉴定, 因此在异源合成紫杉醇或其关键前体的研究中, 除需解决 CYP 异源活性表达的难题之外, 还需预先实现对紫杉醇合成通路的全面解析。由此, 利用异源底盘合成天然产物的研究, 尚存在众多关键难题亟待解决^[19,59]。

参考文献

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, *et al.* Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] Crown J, O'Leary M, Ooi W. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: A review of clinical experience [J]. *Oncologist*, 2004, 9(Suppl 2): 24-32.
- [3] Beer T M, Eilers K M, Garzotto M, *et al.* Weekly high-dose calcitriol and docetaxel in metastatic androgen-independent prostate cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(4): 314-315.
- [4] Beer T M, Pierce W C, Lowe B A, *et al.* Phase II study of weekly docetaxel in symptomatic androgen-independent prostate cancer [J]. *Ann Oncol*, 2001, 12(9): 1273-1279.
- [5] Liu J, Milne R I, Möller M, *et al.* Integrating a comprehensive DNA barcode reference library with a global map of yews (*Taxus* L.) for forensic identification [J]. *Mol Ecol Resour*, 2018, 18(5): 1115-1131.
- [6] Herz W, Falk H, Kirby G W. *Progress in The Chemistry of Organic Natural Products* [M]. Vienna: Springer, 2002.
- [7] Julsing M K, Koulman A, Woerdenbag H J, *et al.* Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites [J]. *Biomol Eng*, 2006, 23(6): 265-279.
- [8] Holton R A. Method for preparation of taxol: EP, 0400971 [P]. 1990-12-05.
- [9] Holton R A. Method for preparation of taxol using β -lactam: US, 5175315 [P]. 1992-12-29.
- [10] Han P P, Ye T X, Qiao B, *et al.* Taxoids profiling of suspension *Taxus chinensis* var. *mairei* cells in response to shear stress [J]. *Biochem Eng J*, 2013, 77(16): 66-73.
- [11] Choi H K, Kim S I, Son J S, *et al.* Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis* [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2000, 27(8): 593-598.
- [12] Gantait S, Sinniah U R, All M, *et al.* Gibberellins-a multifaceted hormone in plant growth regulatory network [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2015, 16(5): 406-416.
- [13] Afrin S, Huang J J, Luo Z Y. JA-mediated transcriptional regulation of secondary metabolism in medicinal plants [J]. *Sci Bull*, 2015, 60(12): 1062-1072.

- [14] Giri C C, Zaheer M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: Recent trends and a sky eye view appraisal [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2016, 126(1): 1-18.
- [15] Sun G I, Yang Y F, Xie F L, *et al.* Deep sequencing reveals transcriptome re-programming of *Taxus x media* cells to the elicitation with methyl jasmonate [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62865.
- [16] Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, *et al.* Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(2): 211-219.
- [17] Howat S, Park B, Oh I S, *et al.* Paclitaxel: Biosynthesis, production and future prospects [J]. *New Biotechnol*, 2014, 31(3): 242-245.
- [18] Kaspera R, Croteau R. Cytochrome P450 oxygenases of taxol biosynthesis [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5(2/3): 433-444.
- [19] Li J, Mutanda I, Wang K, *et al.* Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 4850.
- [20] Kingston D G I. The shape of things to come: Structural and synthetic studies of taxol and related compounds [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(14): 1844-1854.
- [21] Fang W S, Liang X T. Recent progress in structure activity relationship and mechanistic studies of taxol analogues [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2005, 5(1): 1-12.
- [22] Jennewein S, Long R M, Williams R M, *et al.* Cytochrome P450 taxadiene 5 α -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis [J]. *Chem Biol*, 2004, 11(3): 379-387.
- [23] Schoendorf A, Rithner C D, Williams R M, *et al.* Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1501-1506.
- [24] Jennewein S, Rithner C D, Williams R M, *et al.* Taxol biosynthesis: Taxane 13 β -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13595-13600.
- [25] Chau M, Jennewein S, Walker K, *et al.* Taxol biosynthesis: Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7_{NL}-hydroxylase [J]. *Chem Biol*, 2004, 11(5): 663-672.
- [26] Chau M D, Croteau R. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 α -hydroxylase involved in taxol biosynthesis [J]. *Archiv Biochem Biophys*, 2004, 427(1): 48-57.
- [27] Zhang N, Han Z, Sun G, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 9 α -hydroxylase in *Ginkgo biloba* cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(3): 938-943.
- [28] Walker K D, Klettke K, Akiyama T, *et al.* Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 53947.
- [29] Walker K, Fujisaki S, Long R, *et al.* Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12715-12720.
- [30] 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.
- [31] Li J Y, Sidhu R S, Ford E J, *et al.* The induction of taxol production in the endophytic fungus-*Periconia* sp. from *Torreya grandifolia* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1998, 20(5): 259-264.
- [32] 赵 凯, 宇 璐, 金昱言, 等. 内生真菌紫杉醇生物合成的研究现状与展望 [J]. *生物工程学报*, 2016, 32(8): 1038-1051.
- [33] Dahiya J S. Fermentation for taxol production: WO, 96/32490 [P]. 1996-10-17.
- [34] Miao L Y, Mo X C, Xi X Y, *et al.* Transcriptome analysis of a taxol-producing endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* MD2 [J]. *AMB Express*, 2018, 8(1): 41.
- [35] 靳 瑞, 康冀川, 文庭池, 等. 一株产紫杉醇内生真菌液体发酵工艺的优化 [J]. *菌物学报*, 2011, 30(2): 235-241.
- [36] Ajikumar P K, Xiao W-H, Tyo K E J, *et al.* Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70-74.
- [37] Biggs B W, Lim C G, Sagliani K, *et al.* Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated taxol precursor synthesis in *Escherichia coli* [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(12): 3209-3214.
- [38] Sagwan-Barkdoll L, Anterola A M. Taxadiene-5 α -ol is a minor product of CYP725A4 when expressed in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65(3): 294-305.
- [39] Westfall P J, Pitera D J, Lenihan J R, *et al.* Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial

- agent artemisinin [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(3): 655-656.
- [40] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, *et al.* High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [41] Paddon C J, Keasling J D. Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(5): 355-367.
- [42] Dejong J H M, Liu Y, Bollon A P, *et al.* Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 93(2): 212-224.
- [43] 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): 201-206.
- [44] Zhou K, Qiao K, Edgar S, *et al.* Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(4): 377-383.
- [45] Sinatti V C, Gonçalves C A X, Romão-Dumaresq A S. Identification of metabolites identical and similar to drugs as candidates for metabolic engineering [J]. *J Biotechnol*, 2019, 302: 67-76.
- [46] Jiang Z, Kempinski C, Bush C J, *et al.* Engineering triterpene and methylated triterpene production in plants provides biochemical and physiological insights into terpene metabolism [J]. *Plant Physiol*, 2016, 170: 702-716.
- [47] Ikram N K B K, Zhan X, Pan X, *et al.* Stable heterologous expression of biologically active terpenoids in green plant cells [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 129.
- [48] Cha M, Shim S H, Kim S H, *et al.* Production of taxadiene from cultured ginseng roots transformed with taxadiene synthase gene [J]. *BMB Rep*, 2012, 45(10): 589-594.
- [49] Hasan M M, Kim H S, Jeon J H, *et al.* Metabolic engineering of *Nicotiana benthamiana* for the increased production of taxadiene [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(6): 895-904.
- [50] Sadre R, Magallanes-Lundback M, Pradhan S, *et al.* Metabolite diversity in alkaloid biosynthesis: A multilane (diastereomer) highway for camptothecin synthesis in *Camptotheca acuminata* [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(8): 1926-1944.
- [51] Pan Q F, Mustafa N R, Tang K, *et al.* Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: A literature review from genes to metabolites [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15(2): 221-250.
- [52] Zhao Y Q, Shen Y B, Ma S, *et al.* Production of 5 α -androstene-3,17-dione from phytosterols by coexpression of 5 α -reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in engineered *Mycobacterium neoaurum* [J]. *Green Chem*, 2019, 21: 1809-1815.
- [53] Xiong L B, Liu H H, Zhao M, *et al.* Enhancing the bioconversion of phytosterols to steroidal intermediates by the deficiency of *kasB* in the cell wall synthesis of *Mycobacterium neoaurum* [J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19: 80.
- [54] 陈刚, 周谦, 王旻, 等产紫杉醇植物内生真菌的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(4): 24-29.
- [55] 李嘉琳, 胡鸢雷, 陈维多, 等. 红豆杉内生真菌产紫杉醇相关基因 BAPT 的鉴定及初步研究 [J]. 生物技术通报, 2006, S1: 356-361.
- [56] Zhou Y J, Buijs N A, Zhu Z, *et al.* Harnessing yeast peroxisomes for biosynthesis of fatty acid-derived biofuels and chemicals with relieved side-pathway competition [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(47): 15368-15377.
- [57] Deloache W C, Russ Z N, Dueber J E. Towards repurposing the yeast peroxisome for compartmentalizing heterologous metabolic pathways [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11152.
- [58] Shao Y Y, Lu N, Wu Z F, *et al.* Creating a functional single-chromosome yeast [J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 331-335.
- [59] Mark P. Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance [J]. *Nature*, 2016, 530(7591): 389-390.