

紫杉醇及其产生菌的研究现状与展望

林福呈¹ 刘小红² 王洪凯² 章初龙²

(¹ 浙江大学生命科学学院 ² 浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

Recent Research and Prospect on Taxol and Its Producing Fungi

Lin Fucheng Liu Xiaohong Wang Hongkai Zhang Chulong

(¹ Life Sciences College of Zhejiang University, ² Biotechnology Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

关键词 紫杉醇, 内生真菌, 红豆杉

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)04-0534-05

紫杉醇(Paclitaxel, 商品名 Taxol)是一种二萜类衍生物,是当前公认的广谱、活性强的抗癌药物之一。

1 紫杉醇的发现

紫杉醇最早是于 1971 年, Wani 等^[1]从短枝红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中分离得到,命名为紫杉醇。随后 Schiff 等^[2]证实紫杉醇具有独特的抗癌机制,它作用于细胞微管(Microtubule),通过与微管蛋白 N 端第 31 位氨基酸和第 217~231 位氨基酸结合,诱导和稳定微管蛋白聚合,抑制其解聚,增加聚合程度,使微管束不能与微管组织中心相互连接,将细胞周期阻断于 G2/M 期,导致有丝分裂异常或停止,阻止癌细胞增殖^[3,4]。由于其独特的抗癌机制,对于普通抗癌药物无能为力的某些晚期肿瘤均有良好疗效,并且对于多种临床恶性肿瘤疗效突出,完全不同于以往上市的任何一种抗癌药。美国食品与药物管理局(FDA)于 1992 年 12 月正式批准紫杉醇用于临床^[5]。

目前对于紫杉醇的生产,主要是从红豆杉的树皮中提取。红豆杉又名紫杉,全世界有 23 种 1 变种,分布于北半球的温带至热带地区,其资源稀少,被列为世界珍稀树种加以保护。红豆杉的生长缓慢,资源缺乏(全世界野生红豆杉仅有 1000 万株左右),在红豆杉的不同部位紫杉醇的含量均很低^[4],紫杉醇在植物树皮中的含量仅为 0.01%,每提取 1kg 的紫杉醇就要砍剥 1000~2000 棵树的树皮。据估测(1993 年美国国际红豆杉资源会议^[5]),紫杉醇正式运用于临床以后,每年约需 200kg 以上,按现在的提取率 0.03% 计算,每年要收集 700 吨红豆杉树皮来提取,即使将全部的天然资源采伐,也只能满足短期需要。直接从红豆杉树皮中提取紫杉醇,必然严重破坏生态平衡,造成对森林和人类环境以及生物多样性不可弥补的损失。紫杉醇市场面临供求关系的严重失衡。

国内外学者已经致力于研究紫杉醇的生产,多方面寻找生产紫杉醇经济有效的原料。Holton^[6]和 Nicolaou^[7]分别完成了紫杉醇的全合成,尽管这些方法是化学研究上的杰作,但是合成路线复杂,反应条件难以控制,试剂繁多,制备成本昂贵,只能停留在实验室阶段,不能进行工业化生产,半合成方法^[8]中的前体物质紫杉素 III(Baccatin III)和 10-脱乙酰基紫杉素 III(10-Deacetyl baccatin III)仍然是从红豆

基金项目 国家自然科学基金(30080021)

作者简介 林福呈(1966-),男,浙江玉环市人,副教授,从事丝状真菌分子生物学等方面的研究。Tel: 86-571-86971185; Fax: 86-571-86971634; E-mail: fuchenglin@zju.edu.cn

收稿日期 2002-09-09, 修回日期 2003-04-11

杉中提取的,采用植物细胞培养及植物愈伤组织诱导培养制备紫杉醇是一种新途径,但是产量低,费用高,均未达到实用水平,要达到商品化生产还需要几年的时间。寻找生产紫杉醇的有效来源,已经成为当务之急。

2 利用微生物发酵法生产紫杉醇

早在 20 世纪 30 年代,日本的植物病理学家已经从几种特殊的真菌(*Gibberella fujikuroi*)中发现赤霉素,赤霉素是一种功能强大的二萜类物质,可以调节植物的生长。以赤霉素的生物合成为启发,紫杉醇作为一种萜类物质,同样可以找到能够产生紫杉醇的真菌。许多内生真菌都可以产生活性物质,例如赤霉素、青霉素的生产。紫杉醇也可以像青霉素一样进行发酵生产。

1993 年,美国 Montana 州大学植物病理系的 Stierle 博士等^[9]从短叶红豆杉(*T. brevifolia*)的韧皮部中分离得到一种能产生紫杉醇的内生真菌安德鲁紫杉菌(*Taxomyces andreanae*)。Stierle 等^[10]采用质谱(MS)、免疫化学、色谱(TLC、HPLC)和放射性同位素标记等方法,证明了安德鲁紫杉菌的 3 周培养物中存在紫杉醇及其类似物。能合成紫杉醇的红豆杉内生真菌的发现,是紫杉醇资源研究的重要进展。安德鲁紫杉菌的发现为紫杉醇的生产开拓了一条崭新的道路。

寻找可以产生紫杉醇的内生真菌,通过微生物发酵的方法生产紫杉醇,可以改善目前紫杉醇价格昂贵、供不应求的现状。

2.1 利用微生物发酵生产紫杉醇的优点

无论是从生态还是经济条件的角度来看,利用植物内生真菌作为药源是一项不会枯竭的资源,微生物发酵的方法具有以下优点(1)微生物作为工业生产的源泉,可以在发酵罐中进行,可以源源不断的进行生产(2)微生物发酵的方法容易扩大化,利于工业化生产(3)微生物的生长仅仅需要一般的培养技术,在收集紫杉醇之前,可以通过改善培养环境、改进技术来提高产量(4)微生物易于通过基因工程等方法筛选高产菌株,提高紫杉醇的产量(5)内生真菌生长迅速,易于培养,应用的培养基相对比较便宜;(6)可望满足市场的需求,降低紫杉醇的价格。

植物内生真菌是一类应用前景广阔的资源微生物,用微生物发酵的方法生产紫杉醇,是解决药源问题的有效途径。

2.2 产生紫杉醇的内生真菌

Stierle 工作小组已经从生长于 Montana、Washington、Idaho、Oregon 的红豆杉树皮和茎叶中分离到 300 多种内生真菌。仅从西藏红豆杉(*T. wallachiana*)的枝条中,Stierle 小组分离到至少 282 种内生真菌,分离到的最有代表性的内生真菌是炭角菌属(*Xylaria*)、茎点霉属(*Phoma*)、镰孢属(*Fusarium*)、木霉菌属(*Trichoderma*)和拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)。通过单抗免疫检测,大约有 5% 的真菌可以产生紫杉醇,其量大于 50ng/L。内生真菌安德鲁紫杉菌,仅在短枝红豆杉中发现,在其它的树种中没有发现,每升发酵液中可以提取到 24~25ng 的紫杉醇。

1994 年,我国邱德等有^[11]从云南红豆杉(*T. yunnanensis*)树皮中分离出一种内生真菌 YFI,形态类似于 Stierle 发现的安德鲁紫杉菌,经过 TLC 分析测定亦可产生紫杉醇,但是生物合成量很低。

1996 年,Strobel 等^[12]从西藏红豆杉(*T. wallachiana*)中分离到一株产生紫杉醇的内生真菌小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)。这种真菌的培养液可以产生紫杉醇的量达到 50 μ g/L;此后,又分离到尼泊尔盘端鹿角菌(*Seimatoantherium nepalense*),其真菌培养液产生紫杉醇的量为 62~80ng/L^[13]。2000 年,Wang 等^[14]从南方红豆杉(*T. mairei*)中分离到一种可以产生紫杉醇的内生真菌瘤座菌属(*Tubercularia* sp.)其产量为 185.4 μ g/L。周东坡等^[15,16]从东北红豆杉(*T. cuspidata*)中发现一种内生真菌—树状多节孢(*Nodulisporium* sp.)是我国的新记录属,可以产生紫杉醇,产量不高,51.06~125.70 μ g/L。

由此可见,当前利用微生物发酵方法产生紫杉醇的量很低,难以达到工业化生产的要求,因此,迫切需要进行进一步的研究,以提高内生真菌产紫杉醇的量,来满足市场的需求。

Zhang 等^[17]从云南红豆杉树皮中分离到 80 多种内生真菌,并从中筛选出 3 株能够有选择的将 10-乙酰基-7-差向紫杉醇(10-deacetyl-7-epitaxol)(A)和 1 β -羟基浆果赤雷京 I(1 β -hydroxy-baccatin I)(B)乙酰化和差象异构化的真菌(*Microspheeropsis onychiuri*、*Mucor* sp. 和 *Alternaria alternata*)。

从所有的红豆杉树种中,都能够分离到可以产生紫杉醇的内生真菌,在其它与红豆杉生长环境相同的植物中,同样能够找到可以产生紫杉醇的内生真菌,例如,团黑孢霉属(*Periconia* sp.)是从榧树(*Torreya grandifolia*)中分离得到的^[18,19]。

其中,分离得到的内生真菌 *Pestalotiopsis* spp. 具有广泛的遗传和生物多样性^[5]。从一棵落羽松树中的几个小枝中分离到 21 种内生真菌,根据形态学特征分类,其中 16 种属于拟盘多毛孢属,但只有两种的培养特征和生物学特性是完全相同的。在这 16 种中,有 9 种可以产生紫杉醇。通过二氯甲烷抽提,16 种内生真菌的提取物中可以提取到 4 种物质,通过 TLC 发现没有两个以上完全相同的。通过突变、遗传杂交表明,这种内生真菌存在着很大的可变性。小孢拟盘多毛孢是最为常见的一个种,它是次生代谢产物的微生物工厂,被称为雨林的“大肠杆菌”^[19]。

2.3 内生真菌的分离

内生真菌的分离可以采取两种方法:一种是,采用标准的真菌分离纯化的方法^[12,18]。取植物组织,用 70% 的酒精将其表面消毒,然后用灭菌的刀片将外层组织削去,将内部组织削成小片,小心置入水琼脂培养基中,待菌丝长成后,挑取不同菌丝末端置于 PDA 培养基中,观察生长情况。另外一种方法——平板灌注法^[20]。用灭菌的刀片去除外皮层和木质部,用 70% 的酒精消毒,无菌水冲洗,将红豆杉样品加入到适量的无菌水中,放入研钵中充分研磨,取匀浆注入融化的 PDA 培养基中,摇匀,倒平板,25℃ 培养。

内生真菌一般在 PDA 或 MID 培养基中不形成孢子,或者是在灭菌的寄主茎叶中也不形成孢子。然而,这些真菌可以在康乃馨的叶片上形成孢子。康乃馨叶片经过 γ 射线照射后,置于水琼脂培养基中,将分离得到的内生真菌接种到康乃馨叶片上,23℃ 下培养 1~2 个星期后,在康乃馨叶片上形成暗色的子实体结构,对于真菌的鉴定具有重要的作用。研究人员已经将小孢拟盘多毛孢的有性阶段研究清楚^[21]。内生真菌可以在 15% 的甘油中 -70℃ 保存^[11,18]。

从 2001 年至今,本实验室已经从浙江等地的野生百年红豆杉中分离得到近 200 株内生真菌,已经鉴定出来的内生真菌与相关报道相符合,并且与浙江大学第二附属医院合作,鉴定对各种肿瘤细胞的抑制作用,初步确定了小孢拟盘多毛孢可以产紫杉醇。

2.4 真菌发酵液中紫杉醇的检测

在真菌发酵液中,鉴定紫杉醇的存在,检测方法有薄层层析(TLC)的方法、质谱(MS)、高效液相层析(HPLC)、UV 免疫分析、生物学实验和放射性前体标记等。还有单抗免疫分析(Competitive inhibition enzyme immunoassay, CIEIA),它是利用 mAb3C6(对紫杉醇有专一特性的单抗)和 mAb8A10(对紫杉醇的类似物有专一性的单抗)进行生物测定,此方法简单易行且灵敏度高^[4,10]。

3 提高内生真菌产紫杉醇产量的途径

3.1 改变内生真菌生长的条件

在内生真菌发酵液中加入红豆杉针叶提取物,可以提高紫杉醇的产量^[4]。内生真菌脱离植物体后,往往次生代谢停止或延缓,加入红豆杉的提取液,提供产紫杉醇的诱导物可以提高紫杉醇的产量,可以启动紫杉醇的合成。这些添加物的成分很难确定,而且真菌自生和共生条件下,代谢途径会有所差异,这方面的研究有待于深入进行。

真菌发酵液中添加合成紫杉醇的前体物质,可以提高产量。浆果赤霉素 III(Baccatin III)、醋酸盐(Acetate)、苯基丙氨酸(Phenylalanine)、苯甲酸(Benzoic acid)和亮氨酸(Leucine)是红豆杉内生真菌产生紫杉醇的有效前体,但是苯甲酸和亮氨酸不是合成紫杉醇的直接前体物质^[14]。苯甲酸(0.01mmol/L)是产生紫杉

醇的最佳激活剂,这又说明红豆杉与内生真菌产生紫杉醇的途径不同。

寻找一些真菌调节剂,抑制其它的次生代谢途径,可以提高紫杉醇产量。植物体中的生长调节剂对于内生真菌产生紫杉醇有一定的调节作用。氯化胆碱(Chlorocholine chloride,CCC)对于内生真菌产紫杉醇有抑制作用,而N-二甲氨基琥珀酸(Alar,N-dimethylamino succinic acid)对其有提高产量的作用^[4,10]。

在真菌不同的发酵时期加入不同的糖类,同样可以提高紫杉醇的产量^[4]。依据内生真菌的生长条件,根据不同的真菌选择合适的培养基,发现最佳发酵条件^[22]。研究不同产紫杉醇真菌的生长条件,以期提高紫杉醇的产量已成为目前重要的研究内容。

3.2 构建工程菌株

红豆杉与内生真菌之间可能存在一种在两种生物体内遗传交换的分子机制,即基因与基因之间相互交换,已经有证据证明这个观点。众所周知,根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌基因与高等植物之间可以转移。但是内生真菌也可能有其独立的可以产生紫杉醇的系统,这方面有待于进一步的研究。内生真菌生存在一个竞争的环境中,红豆杉属的内生真菌可以通过生产和耐受紫杉醇,保证自己的竞争优势;红豆杉中有紫杉醇的存在,Strobel等^[19]认为可能与抵抗由根部侵入的真菌相关。

依据紫杉醇与内生真菌之间的相互关系,需要进一步研究产生紫杉醇的基因组,紫杉醇的代谢途径以及相关酶类。对能够产生紫杉醇的内生真菌进行遗传改造,构建高产紫杉醇内生真菌的工程菌株,提高紫杉醇的产量。可以利用各种生物工程技术,例如,原生质体融合技术^[23],原生质体的诱变、转化等,对内生真菌进行遗传改造。

2003年,本实验室将与中国航天科技集团公司航天科技创新中心合作,力争筛选高产紫杉醇的内生真菌。我们将真菌生物学与分子生物学的方法相结合,已经建立了原生质体的转化体系。

综上所述,从植物中寻找抗癌、抗肿瘤的天然活性物质,长期以来是新型药物研究的重要内容,植物内生真菌是天然药物的重要来源。紫杉醇市场具有广阔的前景,利用内生真菌生产紫杉醇受到国内外学者的关注。在内生真菌中发现紫杉醇,也可以启发我们寻找能够产生其它抗癌药物的内生真菌。

参 考 文 献

- [1] Wani M C, Taylor H L, Monroe F, et al. Plant antitumor agent VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971, **93**: 2325 ~ 2327.
- [2] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 1979, **277**: 665 ~ 667.
- [3] Horowitz S B, et al. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol Sci*, 1992, **13**: 134 ~ 136.
- [4] Stierle A, Stierle D, Strobel G A. The search for taxol producing microorganisms among the endophytic fungi of the Pacific yew. *Taxus brevifolia*. *J Nat Prod*, 1995, **58**: 1315.
- [5] Stone R. Surprise! A fungus factory for taxol? *Science*, 1993, **9** **260**(5150): 154 ~ 155.
- [6] Holton R A, Somoza C, Kim H B, et al. First total synthesis of taxol. *J Am Chem Soc*, 1994, **116**(4): 1597 ~ 1599.
- [7] Nicolaou K C, Yang Z, Liu J, et al. Total synthesis of taxol. *Nature (Lond.)*, 1994, **367**: 630 ~ 634.
- [8] Denis J N, Green A E, Gerenard D, et al. Highly efficient, practical approach to natural taxol. *J Am Chem Soc*, 1988, **110**(17): 5917 ~ 5919.
- [9] Strobel G A, Stierle A, Stierle D, et al. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon*, 1993, **XLVII**: 71 ~ 78.
- [10] Stierle A, Strobel G A, Stierle D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*. *Science*, 1993, **260**: 214 ~ 216.
- [11] 邱德有, 黄美娟, 方晓华, 等. 一种云南红豆杉内生真菌的分离. *真菌学报*, 1994, **13**(4): 314 ~ 316.
- [12] Strobel G A, Yang X S, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 1996, **142**: 435 ~ 440.
- [13] Bashyal B, Li J Y, Strobel G A, et al. *Seimatoantherium nepalense*, an endophytic taxol producing coelomycete from Himalayan yew. (*Taxus wallachiana*). *Mycotaxon*, 1999, **LXXII**: 33 ~ 42.

[14] Wang J W , Li G L , Lu H Y , *et al.* Taxol from *Tubercularia* sp. Strain TF5 , an endophytic fungi of *Taxus mairei* . *FEMS Microbiology Letters* , 2000 , **193** : 249 ~ 253 .

[15] 周东坡 ,孙剑秋 ,于寒颖 ,等 . 中国一新记录属——多节孢属 . 菌物系统 2001 **20**(2) :148 ~ 149 .

[16] 周东坡 ,平文祥 ,孙剑秋 ,等 . 紫杉醇产生菌分离的研究 . 微生物学杂志 2001 **21**(1) :18 ~ 20 .

[17] Zhang J Z , Zhang L H , Wang X H , *et al.* Microbial transformation of 10-deacetyl-7-epitaxol and 1 β -hydroxy-baccatin I , by fungi from the inner bark of *Taxus yunnanensis* . *J Nat Prod* , 1998 , **61** :497 ~ 500 .

[18] Li J Y , Strobel G A , Sidhu R , *et al.* Endophytic taxol producing fungi from Bald Cypress *Taxodium distichum* . *Microbiology* , 1996 , **142** :2223 ~ 2226 .

[19] Strobel G A . Microbial gifts from forests . *Can J Plant Pathol* , 2002 , **24** : 14 ~ 20 .

[20] Huang Y J , Wang J F , Li G L , *et al.* Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei* , *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis* . *FEMS Immunology and Medical Microbiology* , 2001 , **31** : 163 ~ 167 .

[21] Metz A , Haddad A , Worapong J , *et al.* Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora* , a taxol-producing fungi . *Microbiology* , 2000 , **146** :2079 ~ 2089 .

[22] 张亚妮 ,董兆麟 . 一株产紫杉醇真菌发酵条件的研究 . 西北大学学报(自然科学版) , 2002 , **32** (3) :310 ~ 312 .

[23] 周东坡 ,孙剑秋 ,马玉超 ,等 . 树状多节孢的双亲灭活原生质体融合 . 菌物系统 2002 **21**(3) :430 ~ 436 .

微 生 物 学 报

(双月刊 ,1953 年创刊)

第 43 卷 第 4 期 2003 年 8 月

ACTA MICROBIOLOGICA SINICA

(Bimonthly Started in 1953)

Vol.43 No.4 August 2003

编 辑 《微生物学报》编辑委员会
(北京海淀中关村中国科学院微生物
研究所内 , 邮编 100080)
电 话 : 010-62630422
E-mail : actamicro@sun.im.ac.cn

主 编 李 季 伦

主 办 中 国 微 生 物 学 会
中国科学院微生物研究所

出 版 科 学 出 版 社
(北京东黄城根北街 16 号 , 100717)

印 刷 装 订 北京中科印刷有限公司

总 发 行 处 北 京 报 刊 发 行 局

订 购 处 全 国 各 邮 电 局

国 外 总 发 行 中 国 国 际 图 书 贸 易 总 公 司
(北京 399 信箱 邮政编码 100044)

广告经营许可证 京东工商广字第 0034 号

Edited by Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica
(In the Institute of Microbiology , Chinese Academy
of Sciences , Zhongguancun , Beijing 100080 , China)
Tel 86-10-62630422
Http ://www.im.ac.cn/journals

Editor-in-Chief : Li Jilun

Sponsored by Chinese Society for Microbiology ;
Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences

Published by Science Press (16 Donghuangchenggen
North Street , Beijing 100717 , China)

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company

Distributed by Beijing Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Domestic Subscription : All Local Post Offices in China

Foreign Distribution : China International Book
Trading Corporation
(P . O . Box . 399 , Beijing 100044 , China)