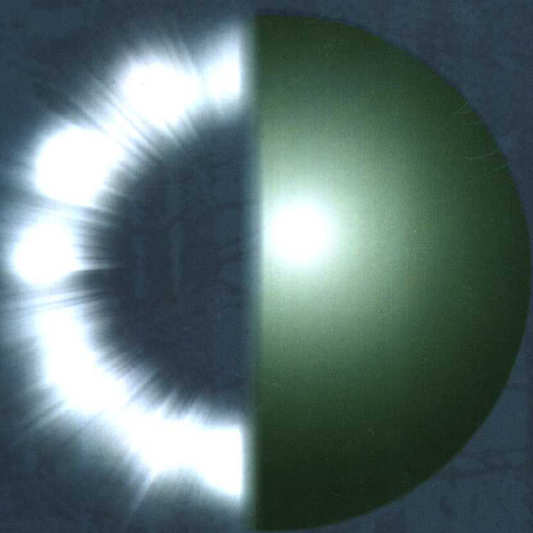


红豆杉细胞培养 生产紫杉醇

◎梅兴国 著



HONGDOUSHAN
XIBAOPEIYANG
SHENGCHAN ZISHANCHUN

华中科技大学出版社

红豆杉细胞培养生产紫杉醇

梅兴国 著

参加撰写人员

梅兴国 军事医学科学院

龚 伟 军事医学科学院

余 斐 Minnesota 大学

陈 菁 北京大学

常俊丽 华中科技大学

周爱文 华中科技大学

肖若蕾 咸宁医学院

华中科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

红豆杉细胞培养生产紫杉醇/梅兴国 著

武汉:华中科技大学出版社,2003年10月

ISBN 7-5609-3011-5

I. 红…

II. ①梅… ②龚… ③余…

III. 红豆杉-细胞培养-应用-抗癌药(中药)-药剂制法

IV. TQ461

红豆杉细胞培养生产紫杉醇

梅兴国 著

责任编辑:杨志锋

封面设计:潘 群

责任校对:朱 霞

责任监印:张正林

出版发行:华中科技大学出版社

武昌喻家山

邮编:430074

电话:(027)87545012

录 排:华中科技大学出版社照排室

印 刷:湖北新华印务有限公司

开本:850×1168 1/32

印张:16.75

字数:398 000

版次:2003年10月第1版

印次:2003年10月第1次印刷

定价:26.80元

ISBN 7-5609-3011-5/TQ·11

(本书若有印装质量问题,请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

本书系统地总结了国家重点研究项目——红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究经验和关键技术,介绍了红豆杉愈伤组织的诱导、高产细胞株的筛选、培养基的优化、紫杉醇生物合成途径及代谢调控、红豆杉细胞培养动力学及建模、红豆杉细胞大规模培养、紫杉醇分析检测、紫杉醇分离纯化与结构鉴定等方面的研究方法和结果。本专著可以为从事植物细胞培养、药物研究和生产工作的同仁们提供参考,也可供生物工程专业研究生和大学生阅读。

前 言

我们连续承担国家“八五”、“九五”和“863”重点项目,从事细胞培养生产紫杉醇研究,迄今已10年了。这期间,在中国生物工程开发中心领导的关心和支持下,我们围绕细胞培养生产紫杉醇技术的关键和难点,制订了系统的技术路线和方案,从细胞株筛选、紫杉醇生物合成的代谢调控、反应器培养及条件优化等主要方面开展研究工作。经过10年的艰苦努力,在红豆杉细胞培养生产紫杉醇研究方面取得了长足的进步,使该项研究工作一直处于国际先进水平。

长时间的研究积累,使我们在植物细胞大规模培养研究水平上产生了质的飞跃,获得了一系列红豆杉细胞培养及中试放大规模的突破性成果,特别是在摇瓶培养规模上,部分批次紫杉醇含量达到80~100mg/L,15L反应器培养规模部分批次达到50mg/L。我们的研究证实了红豆杉细胞培养生产紫杉醇产业化是完全可能的。同时我们也深刻认识到实现细胞培养生产紫杉醇产业化的关键所在。产业化的核心问题是细胞株的稳定性与定量的代谢调控技术。这些技术是基于对离体培养的红豆杉细胞本身的代谢规律与紫杉醇生物合成途径及其调控的透彻了解,然而直到目前,国内外对这些基本规律的认识和积累还不够。

因此,利用植物细胞大规模培养生产次生代谢药物的技术,还需要这个领域耕耘者的继续努力,以获得最后成功。为了系统地总结我们在红豆杉细胞培养生产紫杉醇研究工作中的经验和揭示存在的技术难点,我撰写这本书,总结了10年来我们在红豆杉愈伤组织的诱导、高产细胞株的筛选、培养基的优化、紫杉醇生物合成途径及代谢调控、红豆杉细胞培养动力学及建模、红豆杉细胞大规模培养、紫杉醇分析检测和紫杉醇分离纯化与结构鉴定等方面的

研究方法和结果。希望能提供给从事植物细胞培养、药物研究和生产工作的同仁们参考,也希望能对从事植物细胞培养生产次生代谢产物研究的研究生和大学生有指导作用。

肖若蕾参加了本书第一章的写作;龚伟参加了本书第五、六章的写作和部分章节的修改;余斐参加了本书第七章的写作;陈菁参加了本书第八章的写作;周爱文参加了本书第九章的写作;常俊丽参加了本书第十章的写作。

在本书的写作过程中,本人指导的97级研究生柯铁、黄伟、文芳、张舟宁、洪琦等参加了本书部分材料的整理,98级部分博士研究生、硕士研究生协助进行文字校对;本书文稿的打印及图文排版工作由梅月华完成,在此一并表示感谢!

囿于作者在细胞培养生产紫杉醇方面的研究工作积累不多和水平有限,本书难免有不妥甚至错讹之处,诚望各位读者予以指正。

自序

19 世纪的上半叶 Scheiden 和 Schwann 创立了细胞学说,即细胞是生物有机体的基本结构单位,特别是植物细胞又是具有潜在全能性的功能单位。1902 年法国植物学家 Haberlandt 根据细胞学说理论提出,高等植物的器官和组织可以不断分割直至单个细胞,而每个细胞都具有该植物的全部遗传信息,在适当条件下有再分化发育成完整植株的潜力。这就是植物组织和细胞培养技术的理论基础。

高等植物是许多药物和化工原料必不可少的来源,植物药在国际医药市场中占有重要地位。目前药用植物或从药用植物衍生的药品在美国占医药市场的 25% 以上,在我国占 40% 以上。植物中含有的具有生物活性的次生代谢物,是筛选新药和新药先导化合物的主要对象。然而,目前药用植物资源由于自然环境的破坏、无计划的采挖或栽培困难等原因而日益减少。此外,有些药物在植物中含量极低,有些药物受环境限制在植物体内极不稳定,这些都表明,仅依靠从天然植物中获取植物药这一传统途径已越来越不能满足社会发展的需要。用化学合成方法生产植物性药物也因技术、成本、环保及应用上的副作用等因素而受到限制,而大规模植物细胞培养技术因具有不受地区、季节、资源的影响,不破坏自然环境,通过自动控制细胞生长和合理调节代谢过程来降低成本和提高生产率等许多优点,已成为植物源药品的新来源。另一方面,因细胞培养技术在生物合成和转化新的化合物上有着无限的可能性,因此在寻找新药方面也有着广阔的应用前景。

我国的植物物种非常丰富,人们对植物药的依赖极大,但是具有知识产权的新药却较少。随着国际上对开发具有知识产权的植物新药及新药源的投资日益加大,我国医药界所处形势将日益严

峻。植物细胞大规模培养为开发具有知识产权的新药及新药源开辟了一条新的很有希望的途径,发展这一植物工程新技术产业对我国经济发展具有长远意义。

紫杉醇是美国化学家 Wall 等首先从太平洋红豆杉树皮中提取(1963)并确定结构(1971)的。目前供临床使用的紫杉醇主要是从红豆杉树皮中提取,紫杉醇在红豆杉植物中含量很低,约为 0.01%,每提取 1kg 紫杉醇需砍伐百年生红豆杉树数百株。据估计美国每年紫杉醇的需求量为数百公斤,单纯靠伐树剥皮生产紫杉醇,根本无法满足日益增长的需要量,所以,紫杉醇用于临床后最严峻的问题是药源紧缺。科学家们研究各种方法试图解决其药源危机。

1989 年美国农业部 Christon 和 Gibson 首次报道了细胞培养法生产紫杉醇,并于 1991 年 5 月申请到这方面的第一个专利。在我国,1991 年,中国医学科学院北京药物所朱蔚华教授首次报道了红豆杉的组织培养。1992 年美国 FDA 批准紫杉醇用于临床,这掀起了紫杉醇研究的高潮,红豆杉细胞培养生产紫杉醇研究在全世界广泛开展。美国、日本、加拿大、韩国、印度、捷克、俄罗斯等国的多所大学和科研机构及制药企业都开展了这项研究工作。在中国,红豆杉细胞大规模培养生产紫杉醇的研究被列为国家“八五”、“九五”重点攻关项目和“863”高技术发展计划项目。作者自 1991 年起连续承担了该项国家重点项目的研究工作,成功地建立了实验室水平细胞培养生产紫杉醇技术;系统进行了大规模细胞培养生产紫杉醇研究,研制了 5—1000 L 系列植物细胞培养生物反应器,建立了中试实验室,红豆杉细胞培养规模达到 400L 水平。并成功地建立了固定化培养、两相培养、连续培养和批式补料培养等培养工艺,取得了一些进展。

(1) 在优化高产细胞株的筛选方法的基础上,从不同种、不同类型的各种细胞株中筛选获得高产细胞株,含量达细胞干重的 1.8%左右。

(2) 对紫杉醇生物合成的代谢调控进行了重点研究,筛选获得促进紫杉醇合成的诱导子(如 chitosan、来自红豆杉树皮的真菌诱导子、硫代硫酸银、茉莉酸甲酯等)、前体及其代谢调节因子,并合成了部分紫杉醇前体,如苯基异丝氨酸、甲瓦龙酸内酯等,用于调节紫杉醇的合成,还优化了培养工艺。

(3) 研究了不同培养方式对红豆杉细胞合成紫杉醇的影响,建立了有利于促进紫杉醇合成与分泌的放大培养技术。

(4) 在摇瓶培养水平,紫杉醇最高含量达到 100 mg/L 左右;在 15 L 反应器培养规模,部分批次紫杉醇含量达到每月每升 50 mg 水平。

(5) 在 100 L 反应器培养基础上,成功地实现了 400 L 水平的红豆杉细胞大规模培养。100 L 反应器中,紫杉醇表达水平达到 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右。

(6) 建立了从细胞培养物中分离纯化紫杉醇的工艺,紫杉醇纯度大于 98.5%,总收率达到 65% 以上。

与此同时,国际上在细胞培养生产紫杉醇的研究领域也取得了一系列重大突破。Yukimune 等用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(MJ),在摇瓶中培养 *Taxus media* 细胞,紫杉醇表达水平达到 $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而 Shuler 等用 $200 \mu\text{mol}$ 的 MJ 在摇瓶中紫杉醇的最高表达水平达到 $117 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。M. Collins-Pavao 等进行了两相培养、2.0 L 机械搅拌 Cellitific 反应器、2.2 L LH 气升式反应器和摇瓶中东北红豆杉细胞紫杉醇的合成研究,细胞紫杉醇产量为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Shuler 等对东北红豆杉细胞在摇瓶中和在 1L Wilson 型鼓泡柱式生物反应器中的培养进行了比较,发现两者最高紫杉醇含量相当,都为 $22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这相当于 $1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的生产率,是至 1999 年为止国外公开报道的反应器中培养紫杉醇的最高含量。

Shuler 经过测算,认为紫杉醇产率达到 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (约 100 mg/L/月)后,就有工业化的价值。而从上述摇瓶水平研究结

果来看,红豆杉细胞在离体培养条件下具备产业化的基础。红豆杉细胞培养生产紫杉醇经过 10 年的发展,已取得了重大进展,紫杉醇表达水平已提高了近两个数量级。这些成就证实了红豆杉细胞具有产业化价值的潜能。但由于对离体培养的植物细胞遗传特性、生理状态及次生代谢的内在规律缺乏足够的认识,直到目前仍不能对离体培养红豆杉细胞在生长代谢过程中所表现的遗传不稳定性、细胞状态复杂多样性及次生代谢过程的多变性,进行有效的控制和调节。产量不稳表现为,同一批实验的不同摇瓶中紫杉醇产量差异很大,同一细胞株在不同的培养时段紫杉醇产量差异很大,有些时段、有些摇瓶中甚至完全没有紫杉醇。Ketchum, Gibson (1995), Hirasuna, Pestchanker, Srinivasan, Shuler (1996, 1999), Ketchum, Gibson (1999) 均报道了紫杉醇产量不稳的问题。我们的紫杉醇表达水平超过 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 也只是在部分实验的摇瓶中得到的。多数情况下紫杉醇产量都在低水平波动。在摇瓶中最优条件下紫杉醇产量的平均水平约为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由此可见,在世界范围内当前的培养规模和大规模培养下的产量还不能满足产业化的要求。

植物次生代谢产物产量的波动是一个相当普遍的现象。这也是采用植物细胞培养生产天然产物的尝试,经历了半个世纪努力,却只有屈指可数的几个工业化尝试的先例的重要原因之一。紫杉醇表达不稳定主要来源于两个原因,其一是对离体培养条件下红豆杉细胞自身的代谢规律缺乏足够的了解,其二是对紫杉醇合成的次生代谢过程未能实现精确调控。

的确,从现有对离体培养的植物细胞的研究积累来看,到全面掌握离体细胞的遗传特性、生理状态变化及次生代谢过程的内在规律,还需付出更多的努力,还需要待以时日。但从另一角度来看,正是因为植物细胞的复杂性,才使得植物细胞能合成出那些结构极为复杂、生物活性极高、作用效果特殊,并且是微生物和动物无能为力的产物。这就是说植物次生代谢产物具有不可取代性。同

时,我们不能不为植物细胞具有的能力所叹服,一个小小的红豆杉细胞竟然能合成达两百种结构复杂的紫杉烷类化合物,如果能对其进行定向调控,其生产效率将是惊人的。这就是植物细胞培养具有巨大的社会经济价值和市场潜力之所在。只要能全力解决上述关键难题,不仅使细胞培养生产紫杉醇产业化能够成功,而且将打开研究植物细胞培养生产其他植物药物的希望之门,开创植物细胞大规模培养生产天然产物的新纪元。

梅兴国

2003 年元月

于军事医学科学院毒物药物研究所

目 录

前言	(i)
自序	(I)
第一章 红豆杉属植物与紫杉醇	(1)
1.1 红豆杉属植物的种类和分布	(1)
1.2 红豆杉属植物的化学成分	(8)
1.3 紫杉醇及其衍生物的结构和性质	(10)
1.4 紫杉醇的抗癌作用与机理	(37)
1.5 紫杉醇的药源开发	(46)
参考文献	(60)
第二章 细胞培养基本原理与方法	(64)
2.1 植物细胞培养历史	(64)
2.2 植物细胞培养的应用及其优越性	(69)
2.3 植物细胞培养实验室及培养方法	(74)
2.4 植物细胞和组织的培养方式	(80)
2.5 植物细胞培养基	(84)
参考文献	(91)
第三章 红豆杉愈伤组织诱导与高产细胞株筛选	(94)
3.1 红豆杉愈伤组织的建立	(95)
3.2 愈伤组织防褐变研究	(103)
3.3 高产细胞系的建立	(106)
3.4 种质保存方法研究	(137)
参考文献	(141)

第四章 红豆杉细胞生长和生产培养基的优化………… (144)

- 4.1 红豆杉细胞基本培养基的建立 …………… (146)
- 4.2 红豆杉细胞生长培养基 M62 的建立 …………… (148)
- 4.3 M62 培养基的优化 …………… (153)
- 4.4 红豆杉细胞生产培养基的优化 …………… (177)
- 参考文献 …………… (188)

第五章 红豆杉细胞次生代谢启动机制………… (192)

- 5.1 诱导子与次生代谢 …………… (193)
- 5.2 红豆杉抗性细胞系的建立 …………… (203)
- 5.3 不同诱导子对红豆杉细胞次生代谢影响的差异 …… (209)
- 5.4 诱导子对红豆杉原型和抗性细胞次生代谢的
调控差异 …………… (227)
- 5.5 低剂量连续诱导对红豆杉细胞培养的影响 …………… (235)
- 5.6 红豆杉细胞生长周期时相、分裂指数与次生代谢强度
的关系 …………… (246)
- 参考文献 …………… (252)

第六章 紫杉醇合成代谢调节的研究………… (256)

- 6.1 紫杉烷类化合物的生物合成途径 …………… (256)
- 6.2 紫杉醇合成途径的调控 …………… (265)
- 参考文献 …………… (331)

第七章 红豆杉细胞批式培养动力学研究及建模…… (337)

- 7.1 红豆杉细胞一代培养周期与细胞浓度测定 …………… (338)
- 7.2 红豆杉细胞批式培养动力学 …………… (346)
- 7.3 培养过程动力学数学模型的建立 …………… (364)
- 7.4 红豆杉细胞悬浮培养结构化数学模型的建立 …… (380)

参考文献	(388)
第八章 红豆杉细胞大规模培养工艺	(391)
8.1 大规模培养时影响红豆杉细胞生物量和紫杉醇积累的因素	(392)
8.2 红豆杉细胞大规模培养的研究	(403)
8.3 反应器培养实验结果	(438)
参考文献	(439)
第九章 紫杉醇及其类似物的分析检测	(446)
9.1 红豆杉细胞胞内紫杉醇的提取	(447)
9.2 红豆杉细胞胞外紫杉醇的提取	(454)
9.3 紫杉醇的 HPLC 梯度洗脱分析方法	(456)
9.4 紫杉醇的高效毛细管电泳(HPCE)测定方法的建立	(460)
9.5 紫杉醇的 ELISA 检测方法	(474)
参考文献	(487)
第十章 紫杉醇及其类似物的提取、分离与结构鉴定	(490)
10.1 红豆杉细胞培养物的保存和预处理	(490)
10.2 紫杉醇的提取方法	(491)
10.3 紫杉醇的分离方法	(496)
10.4 紫杉醇的分离工艺	(500)
10.5 紫杉醇的精制工艺	(502)
10.6 紫杉醇的结构鉴定	(504)
参考文献	(518)

第一章 红豆杉属植物与紫杉醇

1856 年 Lucas H. 从欧洲红豆杉 (*Taxus baccata*) 的叶片中提取出粉末状碱性组分紫杉碱 (*Taxine*), 其后 100 多年间对该紫杉碱的研究进展缓慢, 直至 20 世纪 60 年代, 随着波谱技术的迅速发展, 才深入地对其进行了研究。1958 年美国国立癌症研究所 (NCI) 组织化学、生态、药理与临床等方面的研究人员对 3500 种植物进行抗癌活性筛选。1963 年 Wall M. E. 与 Wani A. C. 发现从太平洋红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 的树皮中获得的一种粗提物对离体培养的肿瘤细胞, 包括 L1210 和 P288 白血病、Walker 256 肉瘤癌、肉瘤 180 及 B16 黑素瘤细胞都具有很强的抑制作用, 便开始从粗提物中分离有抗癌活性的成分; 但由于该成分在树中含量极低, 加之分离困难, 直至 1971 年才与 McPhail A. T. 一起通过 X 射线分析确定了该活性成分的化学结构, 并将其命名为紫杉醇 (*Paclitaxel*, 商品名 Taxol[®])。

1.1 红豆杉属植物的种类和分布

1.1.1 概述

迄今为止, 天然的紫杉烷类化合物仅见于裸子植物红豆杉科 (*Taxaceae*) 的红豆杉属 (*Taxus*) 及澳洲红豆杉属 (*Austrotaxus*) 中, 但后者数量稀少, 仅见于南半球。目前供使用的紫杉烷类化合

物主要从红豆杉属植物中提取。红豆杉又名紫杉(yew),红豆杉属植物为针叶类植物,在分类上由于各学者看法不一致,因此各种文献上所报道的种类和学名比较混乱。

通常认为世界上红豆杉属植物有 11 种,中国有 4 种和 1 变种,分别是中国红豆杉(*Taxus chinensis*),西藏红豆杉或喜马拉雅红豆杉(*Taxus wallichiana* Zucc),云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*),东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)和南方红豆杉(美丽红豆杉,*Taxus chinensis* var. *mairei*)。国外红豆杉属植物常见的有 4 种,其名称分布和栽培历史见表 1-1,这 4 种植物广泛分布于欧洲和北美,由于长期隔离和适应的结果,出现许多地理品种(geographic races),它们的花果期、花和种子的形态或含有物都有一定的差异。为应用或描述方便,常用产地来命名,如 Irish yew、Dovasto yew、English yew、American yew 等。此外还有许多杂种,常见的有 *Taxus media* Rehd (*T. cuspidata* × *T. baccata*) 和 *T. hunnewelliana* Rehd (*T. cuspidata* × *T. canadensis*) 等。印度、尼泊尔、不丹、缅甸、阿富汗、朝鲜、日本、俄罗斯远东地区、加拿大和美国等地亦有分布,如印度产欧洲红豆杉(*Taxus baccata*),美国太平洋沿岸产太平洋紫杉(Pacific yew)学名短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*),加拿大产加拿大红豆杉(*Taxus canadensis*),美洲的紫杉因其原产地在中国称为红豆杉,又叫中国红豆杉(*Taxus chinensis* 或 Chinese yew)。

红豆杉属植物属北半球洲际分布的广布属,北温带至中亚热带均有分布。本属树种耐荫性强,在天然林中生长缓慢,分布星散,野生树木日渐减少,我国已把它列为二级保护树木。本属植物具有很高的观赏价值,是优美的庭园绿化树种,其木材的边材窄、心材红色、纹理均匀、结构细致、硬度大、防腐性好、韧性强,为珍贵的建筑、家具以及细木工、雕刻、乐器等用材。

红豆杉属植物为常绿乔木或灌木;小枝不规则互生,基部有少数或少数宿存的芽鳞,很少全部脱落;冬芽芽鳞覆瓦状排列,背部

表 1-1 国外主要红豆杉属植物的分布和栽培历史

名 称	学名及异名	分 布	栽培历史
太平洋红豆杉 (Pacific yew)	<i>T. brevifolia</i> Nutt Syn. <i>T. baccata</i> var <i>brevifolia</i> (Nutt). Koehne	阿拉斯加东部沿海岸至 Monterey 海湾, 加利福尼 亚洛基山区域(从加拿大不 列颠哥伦比亚省南部至美 国蒙大拿、爱达荷、华盛顿 至俄勒冈州)等	1854 年起
欧洲红豆杉 (English yew)	<i>T. baccata</i> L.	欧洲至非洲的阿尔及利亚、 伊朗北部和喜马拉雅	长期栽培
加拿大红豆杉 (Canada yew, American yew, ground hemlock)	<i>T. canadensis</i> Marsh Syn. <i>T.</i> <i>minor</i> (Michx) <i>Britt</i> <i>T. baccata</i> var. <i>canadensis</i> (Marsh.) Gray <i>T. baccata</i> var. <i>minor</i> <i>Michx T. baccata</i> var <i>procumbens</i> <i>Loud.</i>	从加拿大纽芬兰省至马尼 托巴省, 新斯科舍省南部, 从美国新英格兰山地至弗 吉尼亚州西部和肯塔基州 东北部、印第安那州中西 部、伊利诺伊斯州北部和衣 阿华州的东北部	1800 年起

纵脊明显或不明显;叶条形,螺旋状着生,基部扭转排成两列,直或镰状,下延生长,上面中脉隆起,下面有两条淡灰色、灰绿色或淡黄色的气孔带,叶内无树脂道。雌雄异株,球花单生叶腋;雄球花为圆球形,有梗,基部具覆瓦状排列的苞片,雄蕊 6~14 枚,盾状,花药 4~9 个,辐射排列;雌球花无梗,基部有多数覆瓦状排列的苞片,