

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.02.010

## 红豆杉提取紫杉醇利用技术进展

舒联方<sup>1</sup>, 辛虎<sup>2</sup>, 马均<sup>3</sup>

(1. 四川省林业调查规划院, 四川 成都 610081; 2. 四川省林业物资供销总公司, 四川 成都 610081;  
3. 四川农业大学, 四川 温江区 611130)

**摘要:**本文概述了红豆杉属植物繁殖及其替代途径生产紫杉醇的主要技术方法以及这些技术方法的研究进展、技术特点及存在问题。重点论述了组织培养育苗和细胞培养生产紫杉醇途径及其技术关键。为今后相关工作提供借鉴与帮助。

**关键词:**红豆杉; 紫杉醇; 技术进展

**中图分类号:**S723.1      **文献标识码:**A      **文章编号:**1003-5508(2017)03-0052-04

## Advances in Technology of Extracting Taxol from *Taxus chinensis*

SHU Lian-fang<sup>1</sup> XIN Hu<sup>2</sup> MA Jun<sup>3</sup>

(1. Sichuan Forest Inventory and Plan institute, Chengdu 610081, China; 2. Sichuan Forestry Material Supply and Marketing General Corporation, Chengdu 610081, China; 3. Sichuan Agriculture University, Wenjiang 611130, China)

**Abstract:** In this paper, a summary description is given of the technology of producing taxol from *Taxus chinensis*, its research advances, the main technical features and existent problems. Emphasis is put on dealing with the technology of tissue culture and cell culture for production of taxol.

**Key words:** *Taxus chinensis*, Taxol, Technical progressing

紫杉醇(Taxol)是从红豆杉(*Taxus chinensis*)树皮中提取的一种天然二萜类抗癌活性物质,对多种癌症均有明显疗效<sup>[1]</sup>。近来还发现紫杉醇对风湿性关节炎等疾病都有一定的疗效<sup>[2]</sup>。随着紫杉醇药理学研究的深入,其临床应用范围将会不断扩大<sup>[3]</sup>。但到目前为止发现紫杉醇只存在于红豆杉科的红豆杉属和澳洲红豆杉属中。而红豆杉原植物中的紫杉醇含量为干质量的0.005%~0.07%,不同种间和不同器官存在较大差异<sup>[4]</sup>。又由于红豆杉类植物属珍稀树种,生长也十分缓慢。因而造成紫杉醇生产原料供应匮乏,需要寻找新的植物资源和新技术生产紫杉醇。近年来,利用红豆杉的新手段和生产紫杉醇的新技术成为了人们的研究热点。本文综述了有关技术的研究进展。

### 1 红豆杉生物学、生态学特性

红豆杉是红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)植物的总称。在中国民间一般称“紫杉”。全世界有11种,分布于北半球温带至热带地区。为典型的阴性树种。常处于林冠下乔木第二、三层,散生,基本无纯林存在,也极少有团块分布。对生长环境要求严格,生长缓慢。且苗期过湿易染立枯病,喜阴、忌晒。

中国有4种1变种:东北红豆杉(*T. cuspidata* sieb, et Zucc)云南红豆杉(*T. yunnanensis* Chang et L. K. Fu.)西藏红豆杉(*T. wallichiana* Zucc.)中国红豆杉(*T. chinensis* (Pilger) Rehd.)南方红豆杉(*T. chinensis*

收稿日期:2017-02-10

作者简介:舒联方(1974-),男,高级工程师,硕士,主要从事林业调查规划设计工作。

var. *mairei* (Lenée et Levl.) Chang et L, K. Fu.)

## 2 红豆杉育苗繁殖生产紫杉醇

通过人工育苗和栽植以扩大红豆杉资源来供应紫杉醇生产的原材料。这种方法不仅繁殖周期长,且原植物体紫杉醇含量低,但它可以在满足紫杉醇生产的同时又保持了红豆杉的种质资源。通过先进的育苗技术快速繁殖红豆杉,营建药用原料林是保护红豆杉资源、满足紫杉醇生产的有效途径。

### 2.1 种子繁殖

红豆杉为雌雄异株、异花受粉植物,种子产生数量少,且有动物取食,使种子残存量更少。而且种子种皮厚,处于深休眠状态。自然状态下经两冬一夏才能萌发。而且即使萌发,形成的幼苗抗逆性差,成活率也很低。所以,几乎没有天然的红豆杉纯林存在<sup>[5]</sup>。即使经过人工催芽处理当年采收播种也要第3年才陆续萌发<sup>[6]</sup>,不能满足商业化、产业化的需求。

### 2.2 扦插繁殖

红豆杉扦插繁殖率和繁殖速度都比种子繁殖高。扦插繁殖所需插条长约10 cm左右,当年生枝、1 a~2 a生枝都能得到较高的扦插成活率,所以插条来源充足,繁殖率高。作者利用曼地亚红豆杉5 a生扦插母树1 a可采插条约10根,插穗长约5 cm便可获得95%以上的成活率。有报道东北红豆杉扦插成活率可达95%,中国红豆杉可达86%,云南红豆杉可达90%,南方红豆杉可达97%<sup>[7]</sup>。且在一定的设施下可全年进行。扦插繁殖还可缩短育苗时间,一般扦插后6个月可获得有完整根系的移栽苗。经过近多年的发展,多处大规模的红豆杉扦插基地已经建立。

### 2.3 组织培养快速繁殖

组织培养快速繁殖是指利用植物的器官、组织或细胞在无菌的条件下再生出完整植株的方法。组织培养育苗和常规传统育苗方法相比,有着巨大的优越性。它繁殖率高、繁殖速度快,不受时间和季节的限制可全年进行,繁殖出的无性系能保持母本的优良性状。利用组织培养实现红豆杉的快速繁殖主要有以下4种方法:离体胚培养法、嫩芽增殖法、愈伤组织再生植株法、体细胞胚发生法。红豆杉种子去掉假种皮后,用自来水冲洗7次后进行接种,萌发率可达100%,且均可完全成苗<sup>[8]</sup>。陈永勤用红豆杉成熟胚在自己设计的培养基和B<sub>5</sub>培养基上,97%

以上可萌动,80%以上的萌动胚成苗<sup>[9]</sup>。离体胚培养法克服了红豆杉种子难以萌发的缺点,可提高萌发率,缩短萌芽时间。但种胚来源有限,且得到的苗木为有性繁殖苗,不能保证保持母本的优良性状。嫩芽增殖法的关键是获得大量的不定芽以实现快速增殖。而不定芽和不定根的产生主要取决于培养基的激素水平和母树的树龄。作者通过选择腋芽增殖启动培养、壮苗培养、生根培养各阶段的最优培养基和培养技术,可获得完整的曼地亚红豆杉试管苗。1月~3月是曼地亚红豆杉腋芽增殖启动培养最适的取材时间;树体上部枝条是启动培养的适宜外植体;升汞连续两次消毒(6+6) min是曼地亚红豆杉外植体消毒的适宜时间。生长调节剂不同浓度及其组合对芽的启动有极显著影响;MS+6-BA0.05 mg·L<sup>-1</sup>+NAA0.5 mg·L<sup>-1</sup>是曼地亚红豆杉腋芽增殖启动培养的适宜培养基。MS(有机物加倍)培养基是曼地亚红豆杉腋芽增殖壮苗培养的适宜培养基,有效芽率为72.73%,平均芽长3.3 cm。将已经生根的小苗转移到不含激素的WPM培养基上30 d后,平均根数可达5.5条,平均根长达1.6 cm,最长根长5.2 cm。培养条件为光照时间12 h·d<sup>-1</sup>,光照强度1 500 lx,培养温度25±1℃。用IBA 1 000 mg·L<sup>-1</sup>作生根促进剂处理30 s瓶外生根,生根率最高,达到58.33%。是进行曼地亚红豆杉组培无根苗生根诱导的适宜处理方式。利用红豆杉组织培养技术,在人工环境中对红豆杉组织细胞进行培养,筛选高产紫杉醇细胞系,可以实现大量、连续地生产目的产物紫杉醇<sup>[10]</sup>。国内外都已有了红豆杉体细胞胚发生的专利和报道,证明红豆杉体细胞胚的诱导是可行的。由于红豆杉属植物本身的特性和组织培养方法没有较强的可普遍运用的规律的特殊性,近期要达到快速繁殖以及工厂化育苗还不容易,有待于进一步深入研究。但应用细胞工程技术,选育高产细胞系,诱导成苗,进行大规模工业化栽培,可克服大规模细胞培养时容易染菌和对生物反应器要求苛刻的弱点,以满足对紫杉醇的需求,所以利用组织培养快速繁殖红豆杉仍然是大有希望的。

## 3 细胞培养生产紫杉醇

自1983年紫草宁及其衍生物成为细胞培养的第一个商品以来,植物细胞培养(PTC)技术便成为工厂化生产有用次生代谢物的一个重要手段<sup>[11]</sup>。我国的红豆杉属4种1变种都含有紫杉醇及其类似

物,并都已建立了细胞悬浮培养系统。与愈伤组织相比,悬浮培养的细胞生长周期短,细胞生物量增加快,细胞培养与原植物相比,紫杉醇含量要高。反应器中细胞中紫杉醇的产量可达 $0.1\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 细胞干重,为一般红豆杉树皮中的10倍,总紫杉醇的产量也较高<sup>[12]</sup>。这也是人们选择此种方式来生产次生代谢物的主要原因。

### 3.1 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的主要技术环节

利用红豆杉细胞培养生产紫杉醇主要包括以下几个技术环节:愈伤组织诱导——继代培养——悬浮细胞培养——扩大培养——分离、鉴定。

愈伤组织的诱导的研究前面已作介绍,不再累述。一般认为疏松的愈伤组织更有利于细胞分散进行悬浮培养。继代培养可以缩短愈伤组织的生长周期,提高愈伤组织的生长量,而且通过多次继代能够减轻褐化,更有利于悬浮培养生产紫杉醇。愈伤组织的培养及维持其正常生长,多数用的是基本的或改良的B<sub>5</sub>培养基。用于愈伤组织诱导及继代的基本培养基亦适用于细胞悬浮培养。如MS、B<sub>5</sub>、WHITE等。激素与愈伤组织继代培养的激素组合相同,适当提高NAA的浓度更有利于生长。悬浮培养时采用较短的继代周期,可使细胞始终保持在对数生长期,保持旺盛生长,延迟进入稳定期、死亡期<sup>[13]</sup>。悬浮培养中,接种量的大小往往对细胞生长的影响较大,须达到一定的起始浓度,但细胞过多又需消耗大量的养分。张立莹等认为采用 $2.0\text{ g}$ 鲜重·瓶<sup>-1</sup>较为适宜<sup>[14]</sup>。目前使用的生物反应器一般为 $10\text{ L}$ 或 $20\text{ L}$ ,且多数报道认为在反应器中细胞生长速度和紫杉醇含量都较悬浮培养时低。这可能是由于受到生物反应器的剪切力、通气水平、气体成分的影响<sup>[15,16]</sup>。

### 3.2 提高细胞培养紫杉醇产量的方法

#### 3.2.1 高产细胞系的筛选

在红豆杉属的11个种中发现有紫杉醇及其衍生物的存在,但不同种之间,紫杉醇及其衍生物含量有显著差异;同一种内不同个体之间的差异更大;同一树种不同产地之间紫杉醇及其衍生物也存在显著差异<sup>[12]</sup>。而且在离体培养条件下植物体细胞较易发生变异是个普遍现象,这又为选择变异体创造了条件。因此,就有可能筛选出生长又快又能高产的细胞系。石梦蝶从自然界收集南方红豆杉的细胞系,并通过实验室建立的细胞培养体系和高效液相色谱检测方法对获得的细胞系材料进行筛选,获得了4个紫杉醇含量高于 $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的细胞系:A26、

B8、B35和B85<sup>[17]</sup>。

#### 3.2.2 诱导子的加入

紫杉醇是红豆杉属植物产生的一种次生代谢产物,生物或非生物诱导子可诱导红豆杉细胞产生抗逆反应,启动次生代谢途径,从而导致紫杉醇的大量合成。诱导子可分为内源诱导子、外源诱导子或生物诱导子和非生物诱导子<sup>[18]</sup>。在红豆杉细胞培养过程中经常采用的诱导子主要有:硫酸铜、茉莉酸甲酯、水杨酸、苯丙氨酸、赤霉素及其它。诱导物浓度越高,促进紫杉醇含量增高的作用越强,但诱导物浓度超过最适点后,随着诱导子浓度提高,各处理的愈伤组织细胞生长不同程度地受限制。当硫酸铜浓度为 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,紫杉醇含量最高达到 $0.057\%$ ;当水杨酸浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,紫杉醇含量最高达到 $0.072\%$ ;当茉莉酸甲酯浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,紫杉醇含量最高达到 $0.087\%$ <sup>[19]</sup>。

#### 3.2.3 细胞培养过程中紫杉醇的原位提取

由于紫杉醇是一种细胞毒素,其在细胞内的大量积累势必影响细胞本身的生理代谢,从而影响次生代谢物的产生。必须要在不降低细胞活性及紫杉醇合成能力的情况下促使紫杉醇向细胞外分泌,减少其对细胞的毒害,有利于提高紫杉醇的产量。要实现紫杉醇的胞外释放,常加入促释放剂。如加入DMSO、甘露醇等。采用两液相培养,用有机溶剂对代谢产物进行原位提取也是提高培养次生代谢产物产量的一条有效途径,它能使胞外紫杉醇产量提高了10倍。但它也存在着有机相对细胞的毒性,有机溶剂对部分细胞生长所必须的培养基成分的溶解的问题<sup>[20]</sup>。

## 4 红豆杉替代资源途径

### 4.1 产生紫杉醇真菌的发酵培养

微生物发酵途径是一条最具潜力的途径。近年来的研究发现,从植物内生真菌中发酵生产紫杉醇被证明是有效途径之一。已发现多种可利用的内寄生真菌能产生紫杉醇,比如:从短叶红豆杉,西藏红豆杉中分离出的内生真菌。从紫杉醇的含量来看,从真菌培养液中仅获得纳克级的紫杉醇<sup>[21]</sup>。随着现代分子生物学技术和微生物发酵工程的发展,工业上大规模发酵生产紫杉醇将有望实现<sup>[22]</sup>。

### 4.2 遗传转化

利用根癌农杆菌(Ri质粒)和发根农杆菌(Ti质粒)的不同野生型株系,以叶片、茎段、块茎和培

养材料等为受体均可成功的将外源 DNA 转移进入红豆杉基因组中,引起植物产生冠瘿瘤或瘤性“毛状根”。这种瘤性组织生长速度大大超过正常植物及悬浮培养细胞的生长速度,产物产量高且稳定,而且在培养过程中无需添加外源性激素<sup>[23]</sup>。有报道用发根农杆菌感染短叶红豆杉芽外植体,诱导毛状根<sup>[24]</sup>。但农杆菌的寄主范围主要是被子植物的双子叶植物和少数的单子叶植物,而红豆杉是裸子植物,而且由于 T-DNA 可以在植物染色体的任何部位插入,有可能导致与紫杉醇全成有关的基因失活。所以对于高产紫杉醇的细胞系的筛选是非常重要的。

冠瘿组织或毛状根培养虽然有许多不可比拟的优点,但其代谢产物中同时产生胭脂碱及冠瘿碱,这种物质对于人及哺乳动物具有致命的毒害,而提纯以去掉冠瘿碱的过程花费很大,阻碍了冠瘿组织或毛状根培养用于商业化生产。

#### 4.3 化学合成

化学合成方法由于其反应过程复杂,费用较高,难以形成商业化生产。半合成主要是依赖自然资源提取获得的紫杉醇前体 baccatinIII, 10-DAC-baccatinIII 等,也要以牺牲自然资源为代价,不能从根本上解决紫杉醇来源问题。

## 5 利用的前景展望

目前,南方红豆杉繁殖技术的研究已取得了可喜的成就,尤其在实生苗繁殖和扦插苗繁殖方面,已可用于大规模的工业化生产。为了更好的发展南方红豆杉产业,今后应加大力度研究南方红豆杉的组培育苗技术及加强其优良品种的筛选和培育。选取紫杉醇含量高,生长快,易成活,抗逆性强的优良品种进行培育可更有效的扩大南方红豆杉的资源,满足市场需求。

紫杉醇由于其巨大的医药和商业价值,目前已成为许多科研机构 and 科学工作者研究的热点。但由于红豆杉自身的生物学、生态学特性和紫杉醇的特殊化学特性,紫杉醇的各种生产手段都还未取得实质性的突破。但我们应当看到,这些生产手段都具有着巨大的生产潜力,随着研究的不断深入,实现紫杉醇的优质高效生产是大有希望的。

#### 参考文献:

[1] 陈艳,堵锡华. 紫杉醇类似物抗癌活性与分子结构的定量构效

关系[J]. 中草药,2011,42(2):318~323.

- [2] 朱婉萍,陈锐,鲁潇,等. 紫杉醇脂质体对佐剂关节炎模型鼠的治疗作用研究[J]. 浙江中医杂志,2012,47(6):406~407.
- [3] 谢嵩,张平平,张鉴,等. 紫杉醇药理学及其相关代谢酶的遗传药理学研究进展[J]. 山东医药,2008,48(4):114~115.
- [4] 王玉震,全川,柯春婷. 红豆杉植株紫杉醇含量研究进展[J]. 亚热带植物科学,2008,37(4):59~63.
- [5] 包维楷,陈庆恒. 中国红豆杉资源及其开发研究现状与发展对策[J]. 自然资源学报,1998,13(4):375~380.
- [6] 宋丽莉,姜育龙,赵华强. 红豆杉种苗繁育技术及生长影响因素研究进展[J]. 园艺与种苗,2011(5):103~105.
- [7] 郭喜军,荣俊冬,陈礼光,等. 红豆杉繁殖与栽培研究进展[J]. 亚热带农业研究,2007,3(4):250~257.
- [8] Zhiri A, Jaziri M, Himes J, et al. Factors affecting the in vitro rapid germination of *Taxus* embryos and the evaluation of taxol content in the plantlets[J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1994(39).
- [9] 陈永勤,戴均贵,等. 红豆杉成熟胚的离体培养(简报)[J]. 植物生理学通讯,1998,34(3).
- [10] 秦宇. 红豆杉组织培养体系建立与优化[J]. 湖南农业大学,2012.
- [11] 王兴军,毕玉平. 利用细胞培养进行药物生产的研究[J]. 生物技术,1997,7(1):1~3.
- [12] 赵继鹏,杨淑慎. 曼地亚红豆杉细胞悬浮培养体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报自然科学版,2014,42(1):189~195.
- [13] 凡利. 南方红豆杉细胞悬浮培养产紫杉醇的研究[J]. 中南林业科技大学,2012.
- [14] 张立莹,刘丽萍,贾景明,等. 东北红豆杉细胞悬浮培养研究[J]. 沈阳农业大学学报,1997,28(3):180~185.
- [15] 商桂敏,施中东,未作君,等. 剪切应力对红豆杉细胞悬浮培养的影响及 CFD 模拟研究[J]. 高校化学工程学报,2002,16(5):542~548.
- [16] Mirjalili N, Linden J C. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidate*: ethylene interaction and induction models. Biotechnology Progress, 1996, 12(1).
- [17] 石梦蝶. 南方红豆杉紫杉醇高产细胞系的选育研究[J]. 湖南农业大学,2013.
- [18] 仇燕,贾宁,王丽. 诱导子在红豆杉细胞培养生产紫杉醇中的应用研究进展[J]. 植物学通报. 2003, 20(2):184~189.
- [19] 胡蕾,梅忠,李真. 不同诱导子对曼地亚红豆杉紫杉醇含量的影响[J]. 现代农业科技,2012(5):12~13.
- [20] 许素文,胡佳丽,郭军,等. 红豆杉中紫杉醇的提取和纯化工艺研究[J]. 广州化工,2015(15):82~85.
- [21] 陈毅坚,张灼,王艳,等. 云南红豆杉内生真菌中产紫杉醇真菌的筛选[J]. 生物技术,2003,13(2):10~11.
- [22] 康冀川,靳瑞,文庭池,等. 内生真菌产紫杉醇研究的回顾与展望[J]. 菌物学报,2011,30(2):168~179.
- [23] 许想平,于小青,董艳山,等. 农杆菌介导的曼地亚红豆杉细胞遗传转化体系的建立[J]. 山地农业生物学报,2012,31(5):406~411.
- [24] 王颖芳,韩彬,李钟,等. 南方红豆杉毛状根诱导体系的建立及毛状根中紫杉醇的分离纯化研究[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(7):49~52.