

## 专论与综述

## 植物内生真菌产紫杉醇的研究\*

王建锋 吕华鹰 苏文金

(厦门大学生物学系 厦门 361005)

关键词: 紫杉醇, 内生真菌, 抗肿瘤

中图分类号: Q339 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)-01-058-03

紫杉醇(Taxol, 商品名 Paclitaxel)最早是由美国 Wani 等于 1971 年分离自短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的茎皮部<sup>[1]</sup>, 具有独特的抑制微管解聚和稳定微管的作用, 对多种临床恶性肿瘤具有突出的疗效, 是近年来发现的最重要的抗肿瘤药物之一。随着紫杉醇的需求量日益增大, 寻找紫杉醇的新来源已成为当务之急, 如化学合成紫杉醇的研究<sup>[2]</sup>, 以 10-乙酰巴卡亭 III 为原料半合成紫杉醇<sup>[3]</sup>, 利用红豆杉细胞培养技术生产紫杉醇等, 但目前尚不具备实用价值。自发现了产紫杉醇的植物内生真菌以后<sup>[4]</sup>, 用微生物发酵生产紫杉醇为解决紫杉醇药源危机提供了一种新途径。本文介绍植物内生真菌产紫杉醇的研究进展。

## 1 寻找产紫杉醇的微生物

1991 年, 蒙大拿州立大学植物病理系有机化学家 Andre Stierle 博士从短叶红豆杉的韧皮部分离到一株能产紫杉醇的真菌 *Taxomyces andreanae*<sup>[4]</sup>。Stierle 等人用质谱(MS)、免疫化学、色谱(TLC/HPLC)和放射性化学标记等方法证明了 *T. andreanae* 3 周培养物中存在紫杉醇及其类似物, 其中紫杉醇的含量为 24~50 ng/L<sup>[5]</sup>。除了短叶红豆杉外, 云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*), 西藏红豆杉(*Taxus wallachiana*), 南方红豆杉(*Taxus mairei*)等红豆杉植物内生真菌产紫杉醇的研究均有报道<sup>[6~8]</sup>。

除了红豆杉植物外, Li Jia-yao 等还从 *Taxodium distichum* 等裸柏的树皮、韧皮部和木质部中都分离到了 *Pestalotiopsis microspora*, 其中有些菌株能够产生紫杉醇, 产量为 14~1487 ng/L<sup>[9]</sup>。

## 2 提高真菌产紫杉醇产量的途径

2.1 影响紫杉醇产量的因素 Li Jiayao 等以分离自 *T. wallachiana* 的 *P. microspora* Ne-32 为实验菌, 以标准的 M-1D 培养基为基础培养基系统地研究了培养基中各种成分对紫杉醇产量的影响(M-1D, g/L: sucrose 30g, ammonium tartrate 5g, yeast extract 0.5g, soytone 1.0g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 280mg, KNO<sub>3</sub> 80mg, KCl 60mg, MgSO<sub>4</sub> 360mg, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 20mg, FeCl<sub>3</sub> 2.0mg, MnSO<sub>4</sub> 5.0mg, ZnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 2.5mg · H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1.4mg, KI 0.7mg)。结果表明用酒石酸铵或蛋白胨作 N 源时, Ne-32 生长较好, 紫杉醇的产量也明显比用亮氨酸、甘氨酸或丝氨酸作 N 源时要高; MnSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub> 和 ZnSO<sub>4</sub> 的最适浓度分别为 0.1, 0.001 和 1 g/L; 当培养基中磷酸钠含量较低(1 μg/L)时, 紫杉醇的产量比对照增高 20 倍<sup>[10]</sup>。由于每种真菌都具有各自的特性, 应针对不同的真菌选择合适的培养基, 探索发酵的最佳条件。

2.2 RNA 酶抑制剂(ribonuclease inhibitors)对紫杉醇产量的影响 Li Jiayao 等在 M-1D 中添加 0.1 ng/L 的 RNA 酶抑制剂硫酸氧钒(vanadyl sulphate)后, *P. microspora* Ne-32 发酵液中紫杉醇的含量从 0.8 μg/L 增加到 3.6 μg/L, 而其它 RNA 酶抑制剂 Bentonite、Lauryl sulphate 和 Polyvinyl sulphate 对该菌的紫杉醇产量的影响不明显<sup>[10]</sup>。RNA 酶抑制剂硫酸氧钒提高 Ne-32 发酵液中紫杉醇产量的具体机制尚不清楚, 推测该抑制剂可

\* 国家教育部博士点基金资助课题

收稿日期: 1998-12-25, 修回日期: 1999-04-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

能抑制了合成紫杉醇所需的某些酶的 mRNA 的降解,从而使紫杉醇的合成量增加。

**2.3 在培养基中添加合成紫杉醇的前体物** 有关研究指出,红豆杉树中有关紫杉醇及有关类似物的生物合成首先是其共同的二萜前体物 Geranylgeranyl diphosphate 经环化作用成为 Taxa-4(5), 11(12)-diene, 再经与氧化为主的修饰作用最后生成 Taxol<sup>[11]</sup>, 全过程估计有十多个不同的酶促反应步骤。Zamin 等用放射性同位素标记的前体物进行喂饲实验,结果表明紫杉醇的紫杉烷三环二萜骨架来自甲羟戊酸,乙酰基来自乙酸,而<sup>13</sup>C 位酯基侧链中 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHCHCOHCOO<sup>-</sup> 来自苯丙氨酸<sup>[12]</sup>; Stierle 等的研究表明苯丙氨酸是 *T. brevifolia* 合成紫杉醇的前体,而亮氨酸却不是<sup>[5]</sup>,虽然 Strobel 等用 [<sup>14</sup>C] 苯丙氨酸、[<sup>14</sup>C] 亮氨酸及 [1-<sup>14</sup>C] 乙酰钠作为前体喂饲短叶红豆杉无菌小树皮块,证明苯丙氨酸、亮氨酸和乙酰钠都是紫杉醇前体<sup>[13]</sup>,这表明植物和真菌合成紫杉醇的途径可能不尽相同。Li Jiayao 等在 M-1D 中添加 10μg/mL 的苯甲酸钠后, *P. microspora* Ne-32 发酵液中紫杉醇的含量从 0.8μg/L 增加到 3.3μg/L<sup>[10]</sup>,随着紫杉醇生物合成途径的逐渐明了,在培养基中添加紫杉醇前体物,有望大幅度提高微生物合成紫杉醇的产量。

**2.4 在培养基中添加代谢产物合成抑制剂** 真菌的次级代谢产物是十分丰富多样的,如果弄清楚紫杉醇与其他次级代谢物合成之间的关系,对于人为抑制其他次级代谢物的合成,促进紫杉醇的生物合成具有很重要的意义。*P. microspora* Ne-32 在培养过程中会产生大量的麦角甾醇(ergosterol, 50~100mg/L),甚至在培养基的表面形成结晶,因此在培养基中添加麦角甾醇合成抑制剂有可能抑制其合成,使 Geranyl-geranyl pyrophosphate 更多的向合成紫杉醇的方向转化。Li Jiayao 等在 *P. microspora* Ne-32 培养 8~10d 的发酵中添加 1.5mg/mL 的 Tebuconazole,再培养 10d,其紫杉醇含量比单用 M-2D 培养基发酵提高 50 倍<sup>[10]</sup>。

**2.5 寻找特殊的真菌调节剂** 在许多微生物与植物的互作体系中,宿主植物中某些极微量的化合物对微生物产生目的产物是必不可少的,它可启动微生物中的某些遗传功能,从而促进某些遗传产物的合成。因而可考虑在培养基中添加红豆杉的树皮或针叶等,有可能刺激真菌产紫杉醇产量的提高。但是这些添加物中

的成分很难确定,而且真菌自生和共生条件下,其代谢途径可能会有所差异,这方面的研究还有待更深入的进行。

### 3 微生物生物转化合成紫杉醇

Zhang 等<sup>[14]</sup>从云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*) 树皮中分离出 80 多株内生真菌,并从中筛选出 3 株能够有选择地将 10-deacetyl-7-epitaxol(A) 和 1β-hydroxy-baccatinI(B) 乙酰化和差象异构化的真菌(*Microsphaeropsis onychiuri*, *Mucor* sp. 和 *Alternaria alternata*)。他们在 *M. onychiuri*, *Mucor* sp. 发酵 3d 的发酵液(1.6L)中添加一定量的起始物 A,继续发酵 9d,结果从发酵液中得到 10-deacetyl baccatinV, 10-deacetyl taxol 和 10-deacetyl baccatinIII; 在 *A. alternata* 的发酵液中添加一定量的起始物 B,结果得到另外 3 种化合物: 5-deacetyl-1 β-hydroxy-baccatinI, 13-deacetyl-1 β-hydroxybaccatinI 和 5, 13-dideacetyl-1 β-hydroxybaccatinI。该实验为微生物转化生成紫杉醇提供了依据。利用特定的微生物在发酵过程中产生特异性酶催化紫杉醇前体物 A 或 B 定向生成紫杉醇从原理上讲是可行的。Denis 等曾成功地用 10-deacetyl baccatinIII 化学半合成紫杉醇过程中,得到比紫杉醇抗癌活性更高、水溶性更好的紫杉萜(Texotere)。因此,微生物转化法不仅可用于紫杉醇的合成,亦可用于对紫杉醇的类似物进行基团修饰以获得更高活性的新化合物。

### 4 植物与内生真菌的生态学问题

植物内生真菌是植物微生态系统中的天然组成成分,在进化过程中与宿主建立了和谐的联生关系,其次生代谢产物是十分丰富的。找到产紫杉醇的真菌的事实,很充分地说明保护生态系统中生物多样性是非常必要的。当然,这些紫杉醇产生菌是由于共进化作用还是由于基因转移而获得产紫杉醇的代谢机制,到目前为止还是个生态学的谜。推测真菌产生紫杉醇的代谢机制能够促使紫杉更好地适应其生态环境;同时,红豆杉属的内生菌株可能通过生产和耐受紫杉醇以便在与宿主关系中更好地模拟它的寄主的化学环境,加强了竞争能力,从而有利于它们的生存与进化。真菌是地球生物中最大的类群,可是人们对它们还知之甚少,其中 95% 甚至还没有加以分类。从真菌中发现紫杉醇等抗癌药物应能促使真菌学得到更大的资助和发展。

## 5 结束语

尽管植物内生真菌产紫杉醇的研究取得了相当进展,但目前为止还未达到工业化生产的要求,即紫杉醇的产量要达到 1mg/L 以上。除了上述提到的提高真菌产紫杉醇的途径外,还可以产紫杉醇能力较强的真菌作为出发菌株,诱变育种或用基因工程手段进行改造,并从中筛选出高产的菌株用于工业化生产。相信在不久的将来,人们能够很好地利用微生物解决紫杉醇的来源危机。

## 参 考 文 献

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E *et al.* J Am Chem Soc, 1971, 93:2325~2327.
- [2] Nicolaou K C, Yang Z, Liu J J *et al.* Nature, 1994, 367(6464):630~634.
- [3] Denis J N, Green A E, Gerencard D *et al.* J Am Chem Soc, 1988, 110(17):5917~5919.
- [4] Strobel G A, Stierle A. Mycotaxon, 1993, 47:71~80.
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Science, 1993,

260(9):214~216.

- [6] 邱德有,黄美娟,方晓华等. 真菌学报, 1994, 13(4): 314~316.
- [7] Strobel G, Yang X S, Sears J *et al.* Microbiology, 1996, 142:435~440.
- [8] 吕华鹰,胡志钰,黄耀坚等. 厦门市科学技术协会第二届青年学术年会暨中国科协第三届青年学术年会卫星会议论文集. 厦门:厦门大学出版社, 1998, 90~93.
- [9] Li J Y, Strobel G, Sidhu R *et al.* Microbiology, 1996, 142:2223~2226.
- [10] Li J Y, Sidhu R, Bollon A *et al.* Mycol Res, 1998, 102(4):461~464.
- [11] Lin X L, Hezari M, Koepp A E *et al.* Biochemistry, 1996, 35:2968~2977.
- [12] Zamir L O, Nadea M E, Garneau F X. Tetrahedron Lett, 1992, 33(36):5235~5236.
- [13] Strobel G A, Stierle T, Vankujik T J G M *et al.* Plant Sci, 1992, 84:65.
- [14] Zhang J Z, Zhang L H, Wang X H *et al.* J Nat Prod, 1998, 61:497~500.