

## 紫杉醇生物合成的研究进展

孔建强, 王伟\*, 朱平, 程克棣

(中国医学科学院·中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 紫杉醇是一种抗癌新药。紫杉醇及其衍生物还具有防治移植动脉硬化、抗瘢痕形成和抗血管生成等功能。目前,人们获得紫杉醇的方法主要有以下几种:直接从红豆杉中提取;化学全合成;化学半合成;细胞培养;内生真菌提取培养及代谢工程生产紫杉醇。已从红豆杉中克隆出了至少 14 个和紫杉醇生物合成相关的基因并进行了功能鉴定。紫杉醇生物合成途径的阐明带动了紫杉醇前体组合表达系统的研究。

**关键词:** 紫杉醇; 生物合成途径; 组合表达

中图分类号: R915 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)04-0358-08

## Recent advances in the biosynthesis of taxol

KONG Jian-qiang, WANG Wei\*, ZHU Ping, CHENG Ke-di

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Taxol is one of the most potent chemotherapeutic agents known, showing excellent activity against a range of cancers. In addition to anticancer, taxol has the effect of preventing graft arteriosclerosis, antiscarring formation and inhibiting angiogenesis. There are five possible routes to industrialize taxol production: isolation from the bark of the yew species, total synthesis, semisynthesis, tissue or cell culture, endophytic fungal fermentation and metabolism engineering. There are at least 14 genes related to the taxol biosynthesis had been cloned from yews and functionally expressed in different hosts. The combinational expression system of taxol makes progress as the clarification of biosynthetic pathway of taxol.

**Key words:** taxol; biosynthetic pathway; combinational expression

1964年,美国的 Wall和 Wani发现,太平洋红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮提取物对 P388 鼠白血病细胞株有抑制作用。1969年,他们分离到足够量的活性物质——紫杉醇。1971年确定了紫杉醇结构。1979年,Howitz等<sup>[1,2]</sup>报告了紫杉醇的作用机制,它作用于微管蛋白。微管是真核细胞的一种纤维蛋白,与细胞的有丝分裂紧密相关,对于迅速分裂的肿瘤细胞,紫杉醇能“冻结”有丝分裂纺锤体,从而使肿瘤细胞停止在 G2期和 M期,直至死亡。该药于 1990年进入 III期临床试验,1992年底获美国 FDA

批准用于临床治疗对常规化疗无效的卵巢癌和乳腺癌。1995年,我国北京协和药厂与海口制药厂分获二类新药批准文号,成为世界上第 2 个生产紫杉醇及其注射液的国家。

### 1 紫杉醇及其衍生物的化学结构

紫杉醇(C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub>),化学名:5β,20-环氧-1,2α,4,7β,10β,13α-六羟基紫杉烷-11-烯-9-酮-4,10-双乙酸酯-2-苯甲酸酯-13-酯-(2'R,3'S)-N-苯甲酰基-3-苯基异丝氨酸酯(图 1),其基本骨架是三环二萜,含有 11 个手性中心。另外,C-4,C-5及 C-20 构成一个特殊的四元氧环(oxetane),因此,紫杉醇为一个拥有多个取代基团的 6/8/6/4 四环结构的化合物。从人们对 taxol 结构修饰与其构效关系的研究来看,其 C-7,C-9 与 C-10 位的基团以及 C-11 和 C-

收稿日期: 2006-09-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20172071).

\* 通讯作者 Tel: 86-10-63165196,

E-mail: wwang@imm.ac.cn

12位的双键对其生物活性并无太大的影响,但是C-2, C-4位的基团以及D环和C-13位的侧链对taxol生物活性影响很大。

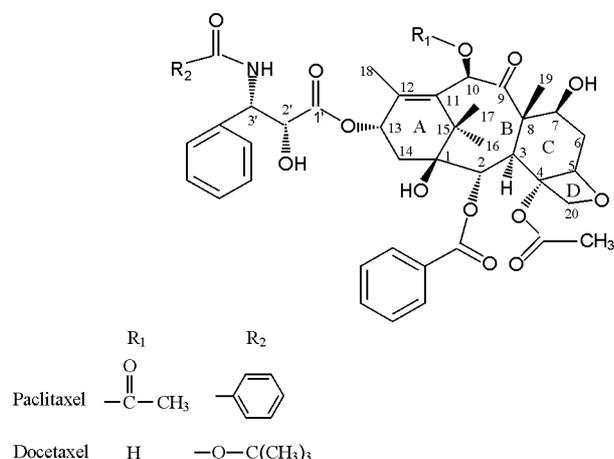


Figure 1 The structures of taxol and docetaxel<sup>[3]</sup>

多烯紫杉醇 (docetaxel, 图 1) 是一种半合成的紫杉烷类抗肿瘤药物, 由法国罗纳普朗克·安公司 1986 年首先生产的一种抗癌新药, 从红豆杉的树皮或针叶中提取的 10-去乙酰巴卡亭 III (10-DAB) 半合成得到的。多烯紫杉醇与紫杉醇化学结构的不同之处在于前者 C-10 位为羟基 (后者为乙酰氧基), C-13 位侧链的 C-3 氨基上为异丁酰基 (后者为苯甲酰基)<sup>[4,5]</sup>。

## 2 紫杉醇及其衍生物的功能

迄今为止, 紫杉醇及其衍生物主要用于治疗恶性肿瘤, 其药效研究有扩大的趋势, 但尚未进入临床应用。

**2.1 治疗恶性肿瘤** 紫杉醇及其衍生物治疗肿瘤的临床试验始于 20 世纪 80 年代, 1992 年美国 FDA 批准用于治疗卵巢癌, 1994 年批准用于乳腺癌。现在主要用于治疗非小细胞肺癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>、胃癌<sup>[8]</sup>、鼻咽癌<sup>[9]</sup>、卵巢癌<sup>[10]</sup>和宫颈癌<sup>[11]</sup>等恶性肿瘤。

**2.2 防治移植动脉硬化** 杨兆华等<sup>[12]</sup>采用大鼠胸腹主动脉移植模型, 探讨紫杉醇防治移植动脉硬化的作用, 结果发现, 紫杉醇可明显抑制异品系大鼠移植动脉内膜增生和炎症细胞浸润, 防治移植动脉硬化, 推测紫杉醇抗移植动脉硬化的作用机制不但与直接抑制平滑肌细胞的增殖有关, 而且还可能与减轻受体对移植物的免疫排斥反应有关。

**2.3 抗瘢痕形成** 任彦新等<sup>[13]</sup>将紫杉醇应用于青光眼小梁切除术, 发现术后有明显的降眼压作用, 减

少瘢痕形成, 而且未发现对视网膜有毒性反应。

**2.4 抗血管生成** 尹鸣等<sup>[14]</sup>以人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 为原代培养模型, 通过 MTT 法测定紫杉醇对 HUVEC 增殖的影响, 结果发现紫杉醇在非细胞毒浓度下具有抗血管生成作用。

紫杉醇其他药效作用的研究还处在早期阶段, 有待进一步深入研究。

## 3 紫杉醇的来源

目前, 人们可能获得紫杉醇的方法主要有以下几种。

**3.1 直接从红豆杉中提取** 全世界共有 11 种红豆杉, 我国有 4 种和 1 个变种, 即东北红豆杉、云南红豆杉、西藏红豆杉、中国红豆杉及其变种南方红豆杉。除澳洲的 *Austrotaxus spicata* 产于南半球外, 其余分别分布在北半球的温带至亚热带地区<sup>[15]</sup>。紫杉醇主要是从红豆杉的根、皮、茎、叶中提取<sup>[16]</sup>。我国的红豆杉都有一定含量的紫杉醇<sup>[17]</sup>。

**3.2 化学全合成** 1994 年初, Holton<sup>[18,19]</sup> 和 Nicolaou<sup>[20]</sup> 几乎同时宣告紫杉醇的全合成获得成功。这些合成方法极大地丰富了有机化学合成的研究, 同时也获得了大量的紫杉醇类似物<sup>[21]</sup>。

**3.3 化学半合成** 紫杉醇的半合成主要是以 10-去乙酰巴卡亭 III (10-deacetyl baccatin III, 10-DAB) 和巴卡亭 III 为前体。10-DAB 在部分红豆杉品种枝叶中的含量是紫杉醇的 3 倍以上, 通过以 10-DAB 作为合成的起始物, 从侧链合成开始只要约 10 个步骤就可合成紫杉醇, 这种方法称为半化学合成法, 以区别于全合成法。

半合成方法是目前世界上紫杉醇原料药提供的主要途径, 除了 10-DAB 在枝叶中的含量是紫杉醇的 3 倍以上外, 另一个重要因素是天然的紫杉醇经纯化后, 仍含有微量的杂质, 这些微量杂质随栽培方法、环境变化而异, 造成质量控制的困难。同样是纯度 99% 的天然紫杉醇, 也难以保证不同批原料的杂质是一致的, 这些杂质均须通过检验, 证明它们对人体无害, 才能进一步制成药剂。反之, 半合成紫杉醇经过合成步骤, 其纯度高且每批产品质量容易保持一致, 合乎药检的标准, 而且, 生产成本比天然紫杉醇并没有提高。因此, 与通过植物提取紫杉醇相比, 紫杉醇半合成的优点明显, 首先, 巴卡亭 III 和 10-DAB 在植物中的含量相对较高, 半合成紫杉醇可以大大地改善紫杉醇供应的短缺情况; 通过半合成, 还可以使紫杉醇的侧链具有更大的可变性, 有可能获得活性更高的紫杉醇衍生物<sup>[2]</sup>。

**3.4 细胞培养** 1989年,美国农业部首先发现短叶红豆杉的植物细胞能产生紫杉醇。但并不是所有的短叶红豆杉的植物细胞都产生紫杉醇。从一些红豆杉的皮、茎和针叶所得到的细胞株并不产生紫杉醇,但它们能产生其他的紫杉烷类化合物,如 C-14 氧取代化合物,这些化合物的含量可达细胞干重的 2%<sup>[21]</sup>。Navia-Osorio等<sup>[22]</sup>报道喜马拉雅红豆杉的悬浮培养细胞在气升式反应器中细胞培养的紫杉醇含量可达 20.84 mg·L<sup>-1</sup>/24 d, 巴卡亭 III 含量达 25.67 mg·L<sup>-1</sup>/28 d。

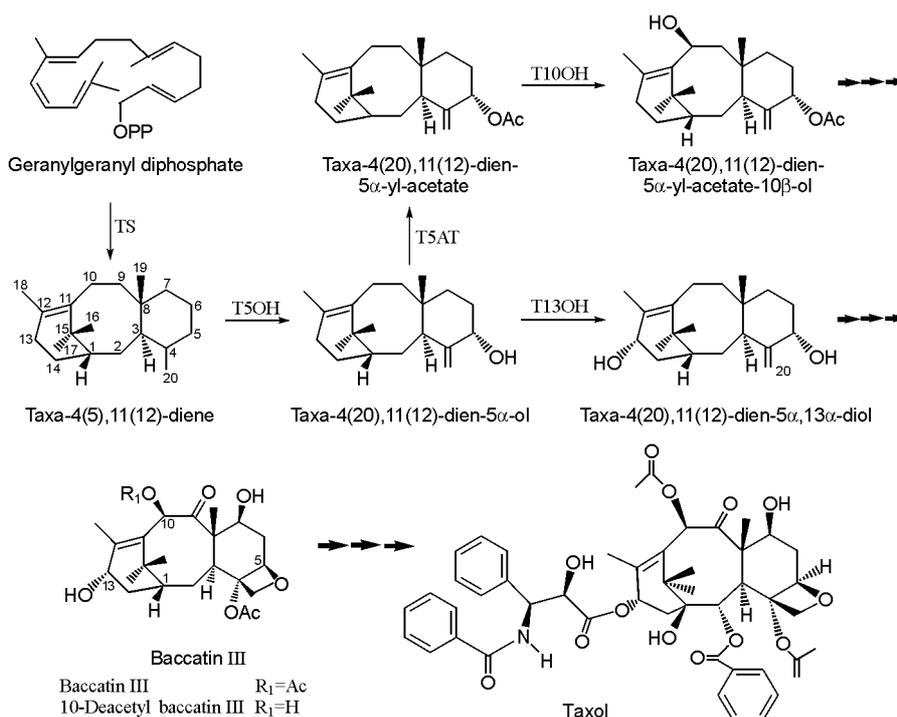
**3.5 内生真菌提取培养** 1993年,Stierle等<sup>[23]</sup>发现寄生于某一红豆杉上的真菌能产生紫杉醇后,又陆续发现了很多能产生紫杉醇的内生真菌<sup>[24,25]</sup>。虽然产率很低,仅 24~50 ng·L<sup>-1</sup>,但由于真菌的基因操作比植物容易得多,因而很可能通过传统的和基因工程结合的方法来增加紫杉醇在真菌中的产量<sup>[2]</sup>。

**3.6 代谢工程生产紫杉醇** 随着紫杉醇代谢途径的逐步阐明,利用组合表达系统来生产紫杉醇及其衍生物的研究迅速开展起来。迄今为止,已经在大肠杆菌和酵母<sup>[26-28]</sup>中组合产生了紫杉烯等紫杉醇前体物质。通过在微生物中构建紫杉醇代谢途径,利用微生物工厂来大量生产紫杉醇前体已呈现出越来越光明的前途。

**4 紫杉醇生物合成途径研究进展**

美国 Croteau R 教授的实验室在紫杉醇生物合成的研究中作了大量的、卓有成效的工作,经过十几年的努力,紫杉醇大部分生物合成途径已经明确。现已知从二萜共同前体 = 牛儿基 = 牛儿基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 到紫杉醇需要约 19 个酶促步骤。GGPP 是由异戊烯焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和甲基丙烯基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 在 GGPP 合酶的作用下生成的;然后,GGPP 在紫杉烯合酶的作用下生成紫杉烯,形成 6/8/6 环紫杉烷类化合物的 A, B, C 环。紧接着,通过连续的氧化反应,首先是 C5 和 C10, 然后是 C13, C2 和 C9, 接着是 C7, 最后是 C1 位的羟化,再经 D 环形成和依赖 C $\alpha$ -A 酰基化反应,形成 10-DAB, 进而形成紫杉醇 (图 2)。催化这些反应的酶基因大部分已经被克隆,而且其编码的蛋白也得到了功能鉴定 (表 1), 但紫杉醇特有的环氧丙烷环 (D 环), C9 酮基及 C1 羟基的形成机制和有关酶类还有待进一步研究。现将红豆杉中克隆的多个与紫杉醇生物合成相关的基因,简述如下。

**4.1 GGPP 合酶基因** 紫杉醇骨架中的 A, B, C 环是从 GGPP 经过环化衍生而来,而 GGPP 是由 GGPP 合酶催化 IPP 与 FPP 生成的, Hefner 等<sup>[29]</sup>成功地完成了 GGPP 合酶的基因分离、克隆及表达。以从加



**Figure 2** The biosynthesis pathway of taxol

**Table 1** The related genes of taxol biosynthesis

Genes	Length / bp
GGPP synthase	1 179
Taxadiene synthase	2 586
Cytochrome P450 taxadiene 5 $\alpha$ -hydroxylase	1 509
Taxadien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyltransferase	1 317
Taxadien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyltransferase	1 329
Cytochrome P450 taxane 10 $\beta$ -hydroxylase	1 494
Cytochrome P450 taxoid 7 $\beta$ -hydroxylase	1 503
Cytochrome P450 taxoid 2 $\alpha$ -hydroxylase	1 488
Taxane 13 $\alpha$ -hydroxylase	1 458
Taxane 2 $\alpha$ -O-benzoyltransferase	1 320
Taxoid 14 $\beta$ -hydroxylase	1 530
C-13 penylpropanoid side chain-CoA acyltransferase	1 335
C13-side-chain N-benzoyltransferase	1 323
10-Daceytlbaccatin III-10 $\beta$ -O-acetyl transferase	1 320

拿大红豆杉中克隆得到的类 GGPP合酶基因片段为探针,从加拿大红豆杉 (*Taxus canadensis*) cDNA文库中克隆出该基因的片段,并在酵母中得到了功能表达。该 DNA片段包含 1 179 bp 的开放阅读框,由此推出的蛋白质含 393 个氨基酸残基,分子量约 42.16 kDa。

**4.2 紫杉烯合酶基因** 紫杉烯合酶是紫杉烷类化合物生物合成的第一个关键酶,它催化 GGPP 环化生成紫杉烯 (taxa-4(5), 11(12)-diene),由于这一步反应是生成紫杉烷类化合物独特的骨架结构而成为紫杉醇生物合成途径中的第一个被阐明的步骤,更被认为是决定前体复合物是否能够合成紫杉醇的关键酶。其蛋白<sup>[30]</sup>和 cDNA<sup>[31]</sup>都已经获得。cDNA 是一个长为 2 586 bp 的开放阅读框,在其蛋白 N 末端,有一个长约 137 个氨基酸的质体转移肽,成熟蛋白长约 725 个氨基酸<sup>[30]</sup>。

**4.3 紫杉烯 5 $\alpha$  羟基化酶 (Cytochrome P450 taxadiene 5 $\alpha$ -hydroxylase)** 此酶催化的是紫杉醇生物合成中的第一个羟基化反应,在它的作用下, taxa-4(5), 11(12)-diene 被氧化成 taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol。5 $\alpha$  羟基化酶基因已经被克隆<sup>[32]</sup>。该基因长 1 509 bp,编码 502 个氨基酸,分子量是 57 kDa。已在酵母和昆虫细胞中表达了该基因,并进行了功能鉴定。

**4.4 紫杉烯醇 5 $\alpha$ -乙酰氧化基转移酶 (Taxadien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyltransferase)** 5 $\alpha$  乙酰基转移酶催化的是 taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol 的酰基化,生成 taxa-4(5), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -yl acetate。2000 年, Walker 等<sup>[33]</sup>克隆出了该酶的编码基因,基因长 1 317 bp,编码 439 个氨基酸,并且在大肠杆菌中进

行了功能鉴定。同源比较发现,它和别的乙酰转移酶有 64% ~ 67% 的相似性。2004 年, Chau 等<sup>[34]</sup>从红豆杉中又克隆得到了一个新的 taxadien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyltransferase 基因,该基因长 1 329 bp,编码 442 aa 蛋白,蛋白大小为 49.3 kDa。这两个酰基转移酶基因的相似性和同一性分别是 77% 和 61%,对底物 taxadien-5 $\alpha$ -ol 的  $K_m$  值都很低,也能将不同羟基化的紫杉烷类化合物转化成相应的酰化物,但前一个酰基转移酶更偏爱 C9 和 C10 位的酰化,而后一个酰基转移酶偏爱 C5 和 C13 位的酰化,生成不同的酰基化衍生物。

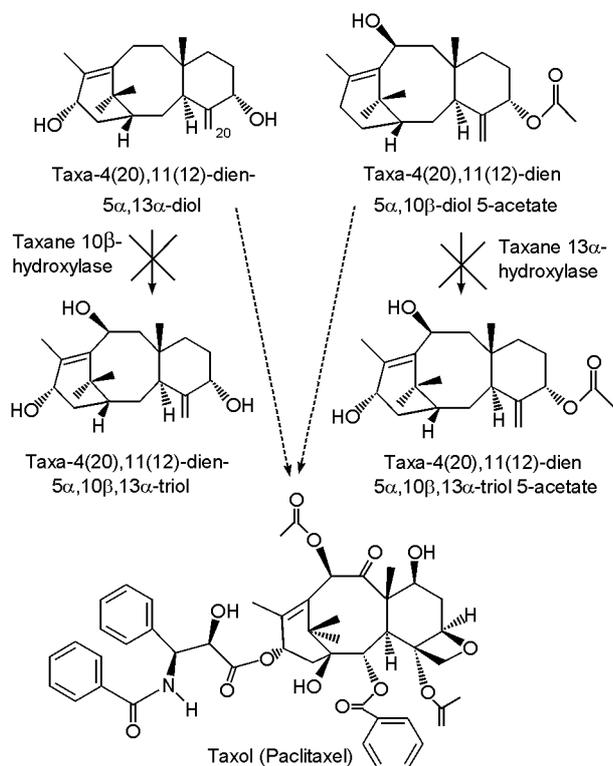
**4.5 紫杉烷 10 $\beta$  羟基化酶 (Cytochrome P450 taxane 10 $\beta$ -hydroxylase)** 该酶催化的是紫杉醇生物合成途径中的第三步,也就是第二个羟基化反应,该酶作用的底物是 C-5 乙酰化的紫杉烯。在它的作用下, taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -yl acetate 被氧化成 taxadien-5 $\alpha$ -acetoxyl-10 $\beta$ -ol。2001 年, Schoendorf 等<sup>[35]</sup>从红豆杉中克隆出了该酶的编码基因,并在酵母中进行了功能鉴定。该基因长 1 494 bp,编码 498 个氨基酸,分子量大小是 57 kDa。

**4.6 紫杉烷 7 $\beta$  羟基化酶 (Cytochrome P450 taxoid 7 $\beta$ -hydroxylase)** 含 1 503 bp,编码 501 个氨基酸,蛋白大小为 56 kDa。将含有此基因的载体导入酵母中进行功能鉴定,发现该基因的编码产物能将 taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 13 $\alpha$ -tetraol tetraacetate 转变成相应的羟化物。7 $\beta$ -hydroxylase 和以前从红豆杉中克隆到的羟基化酶具有很高的同一性和相似性,与 5 $\alpha$ -hydroxylase 的同一性是 63%,相似性为 82%;与 10 $\beta$ -hydroxylase 的同一性是 55%,相似性为 75%;和 13 $\alpha$ -hydroxylase 的同一性是 53%,相似性是 72%;与 14 $\beta$ -hydroxylase 的同一性是 53%,相似性是 72%。其中, 7 $\beta$ -hydroxylase 和 5 $\alpha$ -hydroxylase 序列的相似性最高<sup>[36]</sup>。

**4.7 紫杉烷 2 $\alpha$  羟基化酶 (Cytochrome P450 taxoid 2 $\alpha$ -hydroxylase)** 此酶大小为 55.5 kDa,包含 495 个氨基酸,由 1 488 bp 的阅读框编码。这个酶和以前从红豆杉中克隆到的羟基化酶具有很高的同一性和相似性。和 7 $\beta$ -hydroxylase 的相似性为 81%,而同一性为 65%;和 taxoid 5 $\alpha$ -hydroxylase 的相似性达 78%,同一性为 62%;和 10 $\beta$ -hydroxylase 具有 72% 的相似性和 54% 的同一性;与 13 $\alpha$ -hydroxylase 具有 71% 的相似性和 53% 的同一性;与 14 $\beta$ -hydroxylase 的相似性为 73%,而同一性则为 56%。其中 2 $\alpha$ -hydroxylase 在序列相似性、酶动力学

等方面和 7 $\beta$ -hydroxylase 最相似, 这两个酶都能利用 taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 13 $\alpha$ -tetraol tetraacetate (taxusin) 作为底物, 而且能互相将各自的羟基化物氧化, 即 taxoid 2 $\alpha$ -hydroxylase 能氧化 7 $\beta$ -hydro taxusin, 而 taxoid 7 $\beta$ -hydroxylase 能将 2 $\alpha$ -hydro taxusin 氧化, 但获得产物是同一个, 即 2 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihydroxytaxusin<sup>[37]</sup>。

**4.8 紫杉烷 13 $\alpha$ 羟基化酶 (Taxane 13 $\alpha$ -hydroxylase)** 该酶的编码基因含有一个 1 458 bp 的阅读框, 编码 485 aa 蛋白, 蛋白大小是 55 kDa。已经在昆虫细胞中进行了功能鉴定。对重组的羟基化酶进行底物选择性试验发现, 与 C-10 羟基化酶不同, 该酶的底物只能是 5 羟基紫杉烯, 而不是其乙酸酯形成 taxadien-5 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 13 $\alpha$ -triol。10 $\beta$ -hydroxylase 和 13 $\alpha$ -hydroxylase 的作用在早期不能发生交叉。因此有两条途径可生成紫杉醇 (图 3): 一是通过 taxadien-5 $\alpha$ , 10 $\beta$ -diol 5-acetate, 二是通过 taxadien-5 $\alpha$ , 13 $\alpha$ -diol, 这两条途径有可能在稍后发生交叉, 通过某个氧化酶的作用, 生成同一种氧化产物, 进而生成紫杉醇<sup>[38]</sup>。



**Figure 3** The two pathways by 10 $\beta$ -hydroxylase and 13 $\alpha$ -hydroxylase

**4.9 紫杉烷 2 $\alpha$ 苯甲基酰基转移酶 (Taxane 2 $\alpha$ -O-benzoyltransferase)** 该酶的编码基因长是 1 320 bp, 编码大小为 50 kDa 的 440 aa 蛋白。Walker

等<sup>[39]</sup>将该基因导入大肠杆菌进行功能鉴定, 发现该重组酶能将 2-debenzoyl-7, 13-diacetylbaaccatin III 转化成 7, 13-diacetylbaaccatin III。

**4.10 紫杉烷 14 $\beta$ 羟基化酶 (Taxoid 14 $\beta$ -hydroxylase)** 2003 年, Jennewein 等<sup>[40]</sup>从红豆杉文库中克隆到了 Taxoid 14 $\beta$ -hydroxylase 基因, 该基因长 1 530 bp, 编码 509 aa 的蛋白, 蛋白分子质量为 57 kDa。将此基因导入酵母进行功能鉴定, 发现重组菌能使 5 $\alpha$ -acetoxy-10 $\beta$ -hydroxy taxadiene 转化成 5 $\alpha$ -acetoxy-10 $\beta$ , 14 $\beta$ -dihydroxy taxadiene, 但对 5 $\alpha$ , 13 $\alpha$ -dihydroxy taxadiene 没作用, 考虑到在紫杉烷的结构中, 14 位并没有被氧化, 因此, 推断该酶可能没参与紫杉醇合成, 但参与紫杉烷类的支路合成途径, 催化紫杉烷类化合物的 14 位羟化, 形成 14 位氧化的紫杉醇衍生物。

**4.11 C13 苯基丙酸侧链-CoA 转移酶 (C-13 phenylpropanoic side chain-CoA acyltransferase)** C13 位侧链对紫杉醇生物活性有很大影响, 而 C13-苯基丙酸侧链-CoA 转移酶就是以  $\beta$ -phenylalanoyl CoA 作为酰基供体, 催化巴卡亭 III 13 位酰化。该酶的编码基因长是 1 335 bp, 编码 445 aa, 分子质量为 50.5 kDa 的蛋白<sup>[41]</sup>。

**4.12 紫杉烷 C13 侧链-N 苯甲酰转移酶 (C13-side chain N-benzoyltransferase)** 这个酶编码基因是由 Walker 等<sup>[42]</sup>于 2002 年从红豆杉 cDNA 文库中克隆出来的, 全基因长 1 323 bp, 编码 441 aa 蛋白, 蛋白大约 49 kDa。该酶催化紫杉醇生物合成途径中的最后一步, 负责将带有不完全侧链的紫杉醇前体 3'-N-debenzoyltaxol 催化形成紫杉醇, 将该基因导入大肠杆菌, 并进行了功能鉴定。

**4.13 10-去乙酰巴卡亭 III 10 $\beta$ -O-乙酰转移酶 (10-deacetylbaaccatin III-10 $\beta$ -O-acetyl transferase)** 这个酶催化 10-DAB 10 位的乙酰化。该酶大小是 440 个氨基酸, 分子质量 49 kDa, 由 1 320 个核苷酸编码。Walker 等<sup>[43]</sup>将这个基因克隆, 并在大肠杆菌中进行了功能鉴定。

### 5 组合表达紫杉醇合成相关中间产物的研究进展

从植物中提取紫杉醇是目前临床用药的一种来源, 但由于紫杉醇在红豆杉中含量极低, 只有树皮干重的 0.000 1% ~ 0.008%, 加之紫杉醇溶解性差, 使紫杉醇的可利用率更低<sup>[24]</sup>。而且红豆杉属植物全世界仅有 11 种, 生长缓慢, 种群密度小, 自身繁殖率低。供应 300 kg 紫杉醇需砍伐 40 ~ 80 万株 50 ~ 60 年生的红豆杉。以目前的提取分离方法, 这样大的

供应量已经威胁到红豆杉属植物的长期存留和地区分布,有资料显示,自20世纪90年代初开始的10年间,云南的红豆杉资源几乎消耗了80%。紫杉醇的发现,使已濒临消失的红豆杉更加危在旦夕。

由于树叶中10-去乙酰巴卡亭III及巴卡亭III含量较高,因此从植物中提取紫杉醇前体半合成成为目前临床用药的主要渠道,但通过10-去乙酰巴卡亭III或巴卡亭III半合成紫杉醇,也需要消耗大量的植物,因此,也面临着生态和资源的问题。

化学全合成的方法由于路线复杂,合成步骤多,至今尚未应用于工业生产。

通过细胞培养来生产紫杉醇,面临着诸如细胞株不稳定、放大培养困难、目的产物含量低和在线检测容易导致污染等技术问题,目前还没见工业化的报道<sup>[44]</sup>。而通过内生真菌来生产紫杉醇,由于紫杉醇含量和产量很低,并且目前对于内生真菌的相关遗传学和分子生物学的研究尚处于起步阶段,短期内可能不会有太大的突破。

通过代谢工程,在微生物中组合表达紫杉醇生物合成相关基因,利用“微生物工厂”来生产紫杉醇前体巴卡亭III,再半合成紫杉醇也是一种具有广阔前景的、较为可行的途径。迄今为止,已经在大肠杆菌和酵母中进行了紫杉醇组合表达的研究,取得了一系列令人鼓舞的成绩。2001年,Huang等<sup>[45]</sup>将IPP异构酶、GGPP合酶以及紫杉烯合酶3个基因导入*E. coli*,获得了 $1.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养物的紫杉烯,这是世界上第一例通过非紫杉烷类产生菌获得紫杉烷类化合物的报道,说明在微生物中可通过组合不同的紫杉醇生物合成相关基因来获得不同的目的产物。2005年,本实验室<sup>[46]</sup>通过构建紫杉烯组合表达系统,从大肠杆菌中检测到了紫杉醇前体紫杉烯。再次说明通过微生物组合表达系统,能够获得所需要的目标产物。尽管如此,但由于大肠杆菌不含有II型P450氧化酶,因此,它不能有效地对代谢中间产物进行氧化,也就不能获得羟基化的目的产物。于是,紫杉醇酵母组合表达系统成为紫杉醇组合表达的另一个选择。本实验室<sup>[28]</sup>构建了紫杉烯的酵母组合表达系统,将酵母的羟甲基戊二酰CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶基因和GGPP合酶基因组合构建了融合表达载体PGBT9/HG,同时构建了包含紫杉烯合酶基因的表达载体pADH/TS,将这两个表达载体共转化酵母细胞,GC-MS检测到了紫杉烯的存在。2006年,DeJong等<sup>[26]</sup>将GGPP合酶基因和紫杉烯合酶基因

在酵母中组合表达,获得了 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 紫杉烯;同时将GGPP合酶基因,紫杉烯合酶基因,taxadiene 5 $\alpha$ -hydroxylase基因,taxadien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyltransferase基因,taxane 10 $\beta$ -hydroxylase基因组合导入酵母,在酵母中检测到了 $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的taxadien-5 $\alpha$ -ol。紫杉醇组合表达系统虽然还处在起步阶段,但上述成绩使人们看到了利用生物技术生产紫杉醇前体的广阔前景。

紫杉醇是资源紧缺的重要抗癌药物,不仅如此,正在研究的新一代抗肿瘤多药耐药的药物也与紫杉烷化合物有密切关系。近年来,肿瘤多药耐药性问题受到极大关注,肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞对结构、细胞靶点和作用机制迥然不同的抗癌药物同时产生耐药的现象,是肿瘤化疗失败的主要原因。

从紫杉烷类化合物开发的逆转肿瘤多药耐药的新一代抗肿瘤药物(taxane-based MDR modulators)已进入II期临床(如SB-T-110131)。现在获得了数个抗肿瘤多药耐药活性很好的紫杉烷类化合物,正在深入研究。这些逆转肿瘤多药耐药化合物的前体是氧取代程度不同的紫杉烯醇中间体,在特定位置引入了特殊的氧取代基团,因此,紫杉烷类化合物在新一代抗癌药物的研发中仍然占有重要地位,其资源的需求和矛盾不可忽视。

2006年美国Croteau教授发表了题为“紫杉醇生物合成和分子遗传”的综述,对紫杉醇生物合成途径研究结果进行了综合分析,依据同位素标记底物的饲喂实验,无细胞酶促反应的试验结果提出了一些新的看法和极有启发性的意见<sup>[47]</sup>。文中对C9的羟基化予以特别的讨论,认为紫杉醇生物合成途径中C9的羟基化可能比此前估计的要早一些,并且获得了C9羟基化酶的基因,用C5, C13二羟基紫杉烯, C5, C10二羟基紫杉烯及其C5乙酸酯为底物进行了初步功能鉴定,都得到了9羟基化产物。作者认为在C5, C9, C10, C13四个羟基化酶共同存在时,可从紫杉烯形成C5, C9, C10, C13四氧取代的紫杉烯醇,但由于产物太少, NMR结构鉴定还在进行。采用替代底物研究羟基化反应顺序性的结果表明,用红豆杉心木含量较大的C5, C9, C10和C13四氧取代的taxusin为底物,分析C7和C2羟基化酶的功能,得到了C7和C2羟基化了的六氧取代的紫杉烷,表明C9的羟基化反应可能早于C7和C2位羟基化,还表明C7羟基化也可能早于C2羟基化,重新勾画了紫杉醇生物合成的羟基化反应顺序。文

中还提出了与环氧丙烷环形成有关的酶可能是 C4 $\beta$ , C20 环氧酶 (epoxidase), 且正在研究中, C9 氧化成酮基及环氧丙烷环的形成都是生物合成相对后期才发生的。该文还对紫杉醇生物合成研究的困难进行了分析, 紫杉烷合成途径中有多个羟基化反应, 在红豆杉中还有 15 个酰基 (acyl) 或芳酰基 (aroyl) 转移酶存在, 这些酶与不同顺序的羟基化反应底物相关联, 形成了结构丰富和多样性的紫杉烷化合物。由于在基因功能鉴定过程中所用的是人们选择的替代底物, 而生物合成途径中真正的底物是什么却不十分清楚, 反应步骤的顺序性也不很明确, 这给紫杉醇生物合成研究带来了难度, 也是后续研究需要突破的问题。采用生物化学和分子生物学的各种技术, 包括底物饲喂、基因敲除等手段, 可以期待在不久的将来克隆其他尚未鉴定的酶类和探明紫杉醇生物合成酶的特性, 还可将需要的基因转入红豆杉细胞, 采取各种方法来提高紫杉醇的含量。

## References

- [ 1 ] Ye JY, Gao F. Recent advance in studies on production of taxol with biological technology [ J ]. J Guizhou Univ ( Nat Sci ) ( 贵州大学学报 ), 1998, 15: 139 - 144.
- [ 2 ] Shen ZW, Wu LF. Advances in taxol research [ J ]. Prog Chem ( 化学进展 ), 1997, 9: 1 - 13.
- [ 3 ] Mastropaolo D, Cameman A, Luo Y, et al. Crystal and molecular structure of paclitaxel ( taxol ) [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 6920 - 6924.
- [ 4 ] Braga SF, Galvao DS. A structure-activity study of taxol, taxotere, and derivatives using the electronic indices methodology ( EIM ) [ J ]. J Chem Inf Comput Sci, 2003, 43: 699 - 706.
- [ 5 ] Lucatelli C, Viton F, Gimbert Y, et al. Synthesis of C-3' methyl taxotere ( docetaxel ) [ J ]. J Org Chem, 2002, 67: 9468 - 9470.
- [ 6 ] Lin GS, Cheng HH, Fu ZC. Concurrent chemoradiotherapy with low dose weekly paclitaxel in the treatment of stage III non-small-cell lung cancer [ J ]. China Oncol ( 中国癌症杂志 ), 2006, 16: 277 - 280.
- [ 7 ] Zeng XH, Zhou HW, Wang JJ, et al. Clinical research of dose-dense combined phamoubicin with paclitaxel in advanced breast cancer treatment [ J ]. J Chongqing Med Univ ( 重庆医科大学学报 ), 2005, 30: 873 - 877.
- [ 8 ] Zhong XM, Huang WB. Preliminary clinical observation of paclitaxel based chemotherapy in the treatment of advanced gastric cancer [ J ]. J Mod Oncol ( 现代肿瘤医学 ), 2006, 14: 203 - 204.
- [ 9 ] Ding WJ, Wang JH, Yang HH, et al. Nosocomial infection during radiotherapy with concomitant weekly paclitaxel for advanced nasopharyngeal carcinoma: a clinical investigation [ J ]. Chin J Nosocomiol ( 中华医院感染学杂志 ), 2006, 16: 398 - 400.
- [ 10 ] Xiang HY, Shen GH. Comparison between paclitaxel plus carboplatin and paclitaxel plus cisplatin in the treatment of advanced stage of ovarian cancer [ J ]. Chin J Clin Oncol Rehabil ( 中国肿瘤临床与康复 ), 2006, 13: 165 - 167.
- [ 11 ] Peng JW, Liang HL, Xiao JJ, et al. Clinical efficacy of docetaxel plus nedaplatin for advanced cervical cancer [ J ]. Chin J Clin Oncol Rehabil ( 中国肿瘤临床与康复 ), 2006, 13: 114 - 116.
- [ 12 ] Yang ZH, Hong T, Wang CS, et al. The study of antiproliferation agent paclitaxel on preventing graft arteriosclerosis [ J ]. Fudan Univ J Med Sci ( 复旦学报医学版 ), 2006, 33: 225 - 228.
- [ 13 ] Ren YX, Wei YC, Zhao F. Application of paclitaxel in glaucoma filtration surgery [ J ]. J Diffic Complicat Case ( 疑难病杂志 ), 2005, 4: 328 - 330.
- [ 14 ] Ying M, Chen LB, Geng HC, et al. An experimental study of paclitaxol on inhibiting angiogenesis [ J ]. Cancer Res Prev Treat ( 肿瘤防治研究 ), 2004, 31: 282 - 285.
- [ 15 ] <http://www.zghds.cn/jianjie.asp> [ DB/OL ].
- [ 16 ] <http://www.hongdoushanonline.com/js.htm> [ DB/OL ].
- [ 17 ] <http://www.hongdoushanonline.com/yyjzg.htm> [ DB/OL ].
- [ 18 ] Holton RA, Somoza C, Kim HB, et al. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring [ J ]. J Am Chem Soc, 1994, 116: 1597 - 1598.
- [ 19 ] Holton RA, Kim HB, Somoza C, et al. First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings [ J ]. J Am Chem Soc, 1994, 116: 1599 - 1600.
- [ 20 ] Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, et al. Total synthesis of taxol [ J ]. Nature, 1994, 367: 630 - 634.
- [ 21 ] Xu L, Wang FP. Total synthesis of taxol developed by nicolaou [ J ]. Chin J Org Chem ( 有机化学 ), 2001, 21: 493 - 504.
- [ 22 ] Navia-Osorio A, Garden H, Cusido RM, et al. Production of paclitaxel and baccatin III in a 20-L airlift bioreactor by a cell suspension of *Taxus wallichiana* [ J ]. Planta Med, 2002, 68: 336 - 340.
- [ 23 ] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreae*, an endophytic fungus of Pacific yew [ J ]. Science, 1993, 260: 214 - 216.
- [ 24 ] Ji Y, Bi JN, Yan B, et al. Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol [ J ]. Chin J Biotechnol ( 生物工程学报 ), 2006, 22: 1 - 6.
- [ 25 ] Qiu DY, Huang MJ, Fang XH, et al. Isolation of an endophytic fungus associated with *Taxus yunnanensis* etl.

- k. Fu [ J]. *Acta Mycol Sin (真菌学报)*, 1994, 13: 314 - 316.
- [ 26 ] DeJong JM, Liu YL, Bollon AP, et al. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae* [ J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93: 212 - 224.
- [ 27 ] Jennewein S, Park H, DeJong JM, et al. Coexpression in yeast of *Taxus* cytochrome P450 reductase with cytochrome P450 oxygenases involved in taxol biosynthesis [ J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89: 588 - 598.
- [ 28 ] Wang W, Meng C, Zhu P, et al. Preliminary study on metabolic engineering of yeast for producing taxadiene [ J]. *Chin Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2005, 25: 103 - 108.
- [ 29 ] Hefner J, Ketchum RE, Croteau R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production [ J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 360: 62 - 74.
- [ 30 ] Hezari M, Lewis NG, Croteau R. Purification and characterization of taxa-4(5), 11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis [ J]. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 322: 437 - 444.
- [ 31 ] Mark R, Wildung MR, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis [ J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 9201 - 9204.
- [ 32 ] Jennewein S, Long RM, Williams RM, et al. Cytochrome P450 taxadiene 5 $\alpha$ -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis [ J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 379 - 387.
- [ 33 ] Walker K, Schoendorf A, Croteau R. Molecular Cloning of a taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [ J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374: 371 - 380.
- [ 34 ] Chau MD, Walker K, Long R, et al. Regioselectivity of taxoid-O-acetyltransferases: heterologous expression and characterization of a new taxadien-5 $\alpha$ -ol-O-acetyltransferase [ J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 430: 237 - 246.
- [ 35 ] Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, et al. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 $\beta$ -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast [ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1501 - 1506.
- [ 36 ] Chau MD, Jennewein S, Walker K, et al. Taxol biosynthesis: molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7 $\beta$ -hydroxylase [ J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 663 - 672.
- [ 37 ] Chau MD, Croteau R. Molecular cloning and characterization of a cytochrome taxoid 2 $\alpha$ -hydroxylase involved in Taxol biosynthesis [ J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 427: 48 - 57.
- [ 38 ] Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, et al. Taxol biosynthesis: Taxane 13 $\alpha$ -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13595 - 13600.
- [ 39 ] Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2 $\alpha$ -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13591 - 13596.
- [ 40 ] Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, et al. Taxoid metabolism: Taxoid 14 $\beta$ -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [ J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 413: 262 - 270.
- [ 41 ] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 12715 - 12720.
- [ 42 ] Walker K, Long R, Croteau R. The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus* [ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9166 - 9171.
- [ 43 ] Walker K, Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 583 - 587.
- [ 44 ] Lü XH, Zang X, Yang DZ. The cell industrialization culture of *Taxus* [ J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2006, 17: 844 - 846.
- [ 45 ] Huang QL, Roessner CA, Croteau R, et al. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol [ J]. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9: 2237 - 2242.
- [ 46 ] Wang W, Kong JQ, Meng C, et al. Studies on combinatorial biosynthesis of taxadiene in *Escherichia coli* [ J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2005, 40: 1428 - 1431.
- [ 47 ] Croteau R, Ketchum REB, Long RM, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics [ J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 75 - 97.