

体外培养产生喜树碱类药物的研究进展

潘学武, 董妍玲

(武汉生物工程学院 生物科学与技术系, 湖北 武汉 430415)

摘要:在对喜树碱类抗肿瘤药物进行简要介绍的基础上, 重点从植物细胞培养、毛状根培养和内生真菌培养 3 个方面, 论述了体外培养产生喜树碱类天然药物的研究进展。

关键词:喜树碱; 体外培养; 抗肿瘤药物

中图分类号:R 282.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0181-04

当前死于癌症的病人约占全球死亡病例的 1/8, 因此, 寻找高效低毒的抗肿瘤药物一直是人类孜孜以求的目标^[1]。自从 Wall 等^[2]从喜树(*Camptotheca acuminata* Decaisne)中发现喜树碱, Hisang 等^[3]发现喜树碱能抑制肿瘤细胞内拓扑异构酶 I 的活性以来, 喜树碱已成为抗肿瘤药物研发的热点^[1,4-5]。后来, 科学家在其它植物如蛇根草(*Ophiorrhiza* sp.)、假柴龙树(*Nothapodytes* sp.)等中也能产生喜树碱及其类似物^[1,4]。以喜树碱为原料合成的化合物 Irinotecan 和 Topotecan 已得到美国 FDA 批准用于临床, 其它多种衍生物正处于各级临床实验, 这些药物都以喜树碱为原料而合成^[4-5]。随着喜树碱类药物临床需求的扩大, 可持续获得喜树碱已成为当务之急。虽然喜树碱的化学全合成早已完成, 但是其合成路线长, 步骤多, 产量低而不具备商业价值。目前市场来源的喜树碱仍然是从野生植物中获取, 这势必造成自然资源的浪费和生态环境的破坏, 也远不能满足市场需求^[1,5]。因此, 利用体外培养技术产生喜树碱及其类似物可以避免这些缺陷, 该文就此方面的研究成果做以系统综述。

1 植物细胞培养

1.1 喜树细胞培养

喜树细胞培养的报道最早始于 1974 年 Sakato 等^[6]的研究, 但仅产生痕量的喜树碱。后来 Van-Hengel 等^[7]获取喜树茎来源愈伤组织的悬浮培养, 喜树碱含量为 4×10^{-3} % (干重), 仅为野生植株的 1/100 左右。1997 年

Wiedenfeld 等^[8]以喜树芽为材料诱导出愈伤组织, 喜树碱的含量为 0.086%~0.236% (干重), 10-羟基-喜树碱为 0.008%~0.08% (干重), 可达到或超过原植株, 这是迄今为止报道的喜树碱含量最高的喜树细胞培养物。Song 等^[9]通过添加酵母抽提液, 茉莉酸甲酯和茉莉酸, 可分别使喜树碱增加 4、6、11 倍左右。Kim 等^[10]详细研究了碳源对喜树碱积累的影响, 发现 6% 的蔗糖比 2% 的蔗糖可使喜树碱含量高 11 倍左右。Pan 等^[11-12]采用 MS 培养基氮源调节的两步培养, 可使细胞的生物量, 喜树碱含量分别提高 1.3 倍和 3.8 倍, 通过调节微量元素 I^- 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 和 MoO_4^{2-} 可使细胞干重, 喜树碱含量分别提高了 0.2 倍和 2.1 倍。该研究小组的后续研究还表明, 在喜树悬浮培养细胞的 15 d 加入终浓度 2 g/L 的植酸作为抗褐变剂, 再在 18 d 加入终浓度 30 mg/L 的米根霉真菌诱导子处理, 细胞干重和喜树碱总产量可分别达到对照的 1.2 倍和 9.0 倍^[13]。但上述所有研究均没有在生物反应器中进行放大培养。喜树细胞的转基因研究也在开展, Pi 等^[14]将在茉莉酸生物合成中起关键作用的丙二烯氧化物环化酶基因转入到喜树愈伤组织中过量表达, 结果发现, 转基因愈伤组织中喜树碱可达到细胞干重的 3.9%~1.08%, 而未转基因的愈伤组织中仅含有痕量的喜树碱, 这为 Song 等^[9]以前的工作提供了很好的分子生物学证据。

1.2 假柴龙树属植物细胞培养

在喜树碱药源植物中, 假柴龙树属(*Nothapodytes* sp.)植物喜树碱平均含量相对较高(最高可达干重的 0.3%)^[15]。1994 年, Roja 等^[16]在 *N. foetida* 种子来源的愈伤组织中, 测得 1×10^{-4} % 的 9-甲氧基-喜树碱和痕量的喜树碱, 但植株中 9-甲氧基-喜树碱可达 0.013%, 喜树碱可达 0.075%。后来, Fulzele 等^[17]采用 10.74 μ M 的 NAA 和 2.22 μ M 的 BA 的激素组合, 可使 *N. foetida* 培养细胞干重达到 31.3 g/L, 喜树碱和 9-氨基喜树碱产量可分别达到 35 mg/L 和 26 mg/L。Thengane 等^[18]通

第一作者简介:潘学武(1975-), 男, 湖北恩施人, 博士, 副教授, 现主要从事生物制药等研究工作。E-mail: xuewupan@sina.com.

责任作者:董妍玲(1977-), 女, 山东德州人, 博士, 副教授, 现主要从事基因工程等教学与科研工作。E-mail: whyldong@sina.com.

基金项目:湖北省教育厅科学研究资助项目(B20114606); 武汉市教育局科学研究资助项目(2010084)。

收稿日期:2014-03-13

过选择不同激素(2,4-D,BA和2,4,5-T)的配比,可使*N. foetida*子叶来源的愈伤组织产生绝对含量高达1.306%的喜树碱,这是目前为止得到的喜树碱绝对含量最高的植物细胞培养物。最近,Karwasara等^[15]成功建立了*N. nimmoniana*叶片来源的悬浮培养细胞,对培养基成分影响喜树碱的合成进行了详细研究,结果表明,蔗糖有利于喜树碱的积累,硝酸盐有利于细胞生长,而铵盐有利于喜树碱的合成,这与Kim等^[10]和Pan等^[12]在喜树组织培养中的研究结果很类似。通过优化磷酸盐、激素NAA和KT,不同时期补充不同的氮源和蔗糖,可使培养体系中喜树碱的胞内外含量分别提高1.7和2.3倍^[15]。

2 毛状根培养

相比细胞培养,植物毛状根培养物具有生长非常迅速,无需添加外源激素,生物合成能力强和遗传性稳定等优点,成为植物离体培养产生次生代谢产物的优选方案^[4-5,19],毛状根产生喜树碱的研究主要集中在Saito领导的日本研究小组的工作上。该研究小组用发根农杆菌15834菌株成功诱导*Ophiorrhiza pumila*的毛状根,毛状根在摇瓶中5周生物量可增加16倍,含量可达干重的0.1%,喜树碱能分泌到细胞外^[19]。随后,在3L生物反应器中培养,可产生22 mg/L的喜树碱,有16.5%的喜树碱分泌到培养液中^[20]。后来,该研究小组还成功诱导了*O. liukiensis*和*O. kuroiwxai*的毛状根,喜树碱含量能达到植株的水平,喜树碱能分泌到细胞外,茉莉酸甲酯能促进喜树碱总产量的增加,毛状根还能合成的10-甲氧基喜树碱^[21]。*O. pumila*、*O. liukiensis*和*O. kuroiwxai*的毛状根培养物喜树碱含量分别为788.5、83.0、219.3 $\mu\text{g/g}$ (干重),这反映了同属植物的不同毛状根产生喜树碱的遗传差异^[22]。最近,该研究小组在*O. pumila*的毛状根中,采用RNA干扰技术抑制喜树碱早期合成的2个关键酶(色氨酸脱羧酶和裂环马钱子苷合酶)的基因表达,发现喜树碱及其上游中间代谢物的合成受到明显抑制,这为代谢工程调控喜树碱的生物合成提供了一个很好的思路^[4-5]。

喜树的毛状根培养研究相对较少,Lorence等^[23]用发根农杆菌ATCC 15834和R-1000菌株成功诱导喜树毛状根,培养物中喜树碱和10-羟基喜树碱分别为干重的0.1%和0.015%,是植株中的2倍,2种代谢物都能分泌到细胞外;王伟等^[24]采用发根农杆菌C58C1菌株诱导的喜树毛状根,培养物喜树碱和羟基喜树碱含量分别为1.219 mg/g和0.305 mg/g,含量相对很低。

3 内生真菌培养

1993年加拿大科学家Stierle等开创性地从红豆杉中分离到产紫杉醇的内生真菌,由于真菌发酵培养具有

植物组织培养无可比伦的优势,从植物内生真菌中寻找与宿主相同或者相似的次生代谢产物迅速成为研究热点^[1,25],从植物内生真菌中筛选产喜树碱的内生真菌的研究近年来也取得了可喜进展。

3.1 喜树内生真菌培养

喜树内生真菌产喜树碱的工作始于2009年,闵长莉等^[26]从喜树果中分离到13株内生真菌,从树皮中分离到6株内生真菌^[27],各有1株无孢菌群(*Mycelia sterilia*)产生10-羟基喜树碱,产量分别为677 $\mu\text{g/L}$ ^[26]和410 $\mu\text{g/L}$ ^[27]。同时,Kusari等^[28]从喜树树皮中分离到11株内生真菌,其中1株*Fusarium solani*(镰刀菌属)产生喜树碱、10-羟基喜树碱和9-甲氧基喜树碱。Liu等^[29]纯化了42株喜树内生真菌中,有1株炭角菌属(*Xylaria* sp.)真菌在摇瓶培养中,添加水杨酸的诱导子,10-羟基喜树碱产量可达到5.4 mg/L,已达到理论上的工业化产量要求。最近,Pu等^[30]从喜树中分离得到3株喜树碱产生菌*Aspergillus* sp. LY341,*Aspergillus* sp. LY355和*Trichoderma atroviride* LY357,初始产量可分别达到7.93、42.92、197.82 $\mu\text{g/L}$,但喜树碱的合成能力在继代培养过程中逐渐减弱。通过优化培养基、培养条件,并加入茉莉酸诱导子和XAD16吸附剂,可使*T. atroviride* LY357菌株的喜树碱产量增加50~75倍左右,达到142.15 $\mu\text{g/L}$,仍没有达到初始含量(197.82 $\mu\text{g/L}$)。由此可以推测,喜树内生真菌在培养过程喜树碱合成能力减弱可能是一个普遍现象^[1,30-32]。最近,Ding等^[33]从喜树中分离得到*Botryosphaeria dothidea* X-4菌株产生9-甲氧基喜树碱,但未报道具体含量。

3.2 茶茱萸科植物内生真菌培养

从茶茱萸科植物得到产生喜树碱内生真菌的研究始于Puri等^[34-35]的工作,该研究小组从*N. foetida*茎中分离到52株内生菌株,其中1株内养囊霉属真菌(*Entrophospora infrequens*)摇瓶和生物反应器中培养,每100 g细胞干重的喜树碱产量可分别达到0.575、4.96 mg^[35]。Rehman等^[36]从*N. foetida*种子中分离到产喜树碱的多节孢菌属(*Nodulisporium* Sp.)菌株,在摇瓶和生物反应器中产量分别为550 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 和4500 $\mu\text{g}/100\text{g}$,折合成产量计算,在生物反应器中可达0.9 mg/L。Shweta等^[37]从*Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn的枝条和叶子中各分离到1株镰刀菌属(*Fusarium solan*)内生菌株MTCC 9667和MTCC 9668,可产生喜树碱及其类似物(10-羟基喜树碱、9-甲氧基喜树碱和10-甲氧基喜树碱)。在摇瓶培养中,MTCC 9667菌株和MTCC 9668菌株喜树碱产量可分别达到37 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 和53 $\mu\text{g}/100\text{g}$,在MTCC 9668菌株中10-羟基喜树碱和9-甲氧基喜树碱可分别达到8.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 和44.9 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。最近,印度的科研人员^[38-39]从植物

Miquelia dentate Bedd 果实中分离得到了 3 株内生真菌 *Fomitopsis* sp. P. Karst (MTCC 10177), *Alternaria alternate* (Fr.) Keissl (MTCC 5477) 和 *Phomopsis* sp. (Sacc.), 在摇瓶培养中都产生喜树碱, 9-甲氧基喜树碱和 10-羟基喜树碱, 这为研究人员扩大寻找喜树碱产生菌的宿主植物提供了新的思路。

4 问题与展望

虽然体外培养产生喜树碱及其类似物的工作取得了丰富的成果, 但是离真正的产业化还有很大的差距。主要表现在: 一是植物细胞培养产生喜树碱的研究仅处于愈伤组织和摇瓶悬浮培养阶段, 在生物反应器中的放大培养工作几乎没有报道; 二是毛状根培养产生喜树碱的工作主要集中在蛇根草属植物, 在其它植物研究相对较少, 而且放大培养仅有 1 例^[20]; 三是内生真菌培养工作进展较快, 但相对植物培养物而言, 内生真菌次生产物的产量要低得多, 按照次生物质产量达到 1 mg/L 的工业化要求, 只有 Liu 等^[29]的培养物可达到, 但无在生物反应器中放大培养结果。遗憾的是, 喜树碱的合成能力会逐渐消减^[31-32], 有关的基础理论研究有待进一步深入。

随着植物大规模培养技术的不断成熟, 产喜树碱及其类似物内生真菌的不断筛选, 各种培养条件的不断优化, 喜树碱生物合成以及植物与内生真菌共生关系等理论研究的逐步深入, 将现代基因工程育种技术与现代发酵技术方法相结合, 一定会得到高喜树碱产量的培养物, 进行工业化生产, 解决喜树碱药源的短缺, 保护生态环境, 造福人类社会。

参考文献

- [1] Kumar V, Rai S, Gaur P. Endophytic fungi: novel sources of anticancer molecules[M]. In: Verma V C and Gange A C. (eds.), *Advances in Endophytic Research*, Springer India, 2014: 389-422.
- [2] Wall M E, Wani M C, Cooke C E, et al. Plant antitumor agents, the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1966, 88: 3888-3890.
- [3] Hisang Y H, Herizberg R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260: 14873-14878.
- [4] Asano T, Kobayashi K, Kashiura E, et al. Suppression of camptothecin biosynthetic genes results in metabolic modification of secondary products in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*[J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 128-139.
- [5] Asano T, Sait K, Yamazaki M. Chapter 3, Camptothecin production and biosynthesis in plant cell cultures[J]. *Recent Advances in Phytochemistry*, 2013, 43: 43-54.
- [6] Sakato K, Tanaka H, Mukai N, et al. Isolation and identification of camptothecin from cells of *Camptotheca acuminata* suspension cultures[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1974, 38: 217-218.
- [7] Van Hengel A J, Harkes M P, Wichers H J, et al. Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 28: 11-18.
- [8] Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, et al. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 49: 213-218.
- [9] Song S H, Byun S Y. Characterization of cell growth and camptothecin production in cell cultures of *Camptotheca acuminata*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998(8): 631-638.
- [10] Kim S H, Hur B K, Byun S Y. Effect of sugar concentration on camptothecin production in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999(4): 277-280.
- [11] Pan X W, Xu H H, Liu X, et al. Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26: 1745-1748.
- [12] Pan X W, Shi Y Y, Liu X, et al. Influence of inorganic microelements on the production of camptothecin with suspension cultures of *Camptotheca acuminata*[J]. *Plant Growth Regulation*, 2004, 44: 59-63.
- [13] 潘学武, 董妍玲, 石亚亚. 真菌诱导子和抗褐变剂对喜树悬浮细胞生长及喜树碱生物合成的影响[J]. *中国农学通报*, 2010, 26: 21-26.
- [14] Pi Y, Jiang K, Lin J, et al. Effects of over-expression of allene oxide cyclase on camptothecin production by cell cultures of *Camptotheca acuminata*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012(11): 6535-6541.
- [15] Karwasara V S, Dixit V K. Culture medium optimization for camptothecin production in cell suspension cultures of *Nothapodytes nimmoniana* (J. Grah.) Mabblerley[J]. *Plant Biotechnology Report*, 2013(7): 357-369.
- [16] Roja G, Heble M R. The Quinoline alkaloids camptothecin and 9-methoxy camptothecin from tissue cultures and mature trees of *Nothapodytes foetida*[J]. *Phytochemistry*, 1994, 36: 65-66.
- [17] Fulzele D P, Satdive R K, Pol B B. Growth and production of camptothecin by cell suspension cultures of *Nothapodytes foetida*[J]. *Planta Medica*, 2001, 67: 150-152.
- [18] Thengane S R, Kulkarni D K, Shrikhande V A, et al. Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 72: 247-251.
- [19] Saito K, Sudo H, Yamazaki M, et al. Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila*[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 267-271.
- [20] Sudo H, Yamakawa T, Yamazaki M, et al. Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila*[J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24: 359-363.
- [21] Asano T, Watase I, Sudo H, et al. Camptothecin production by in vitro cultures of *Ophiorrhiza liukiensis* and *O. kuroiuxai*[J]. *Plant Biotechnology*, 2004, 21: 275-281.
- [22] Asano T, Sudo H, Yamazaki M, et al. Camptothecin Production by *In Vitro* Cultures and Plant Regeneration in *Ophiorrhiza* Species [M]//S. Mohan Jain and Praveen K. Saxena (eds.), *Methods in Molecular Biology, Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*. Humana Press, 2009, 547: 337-345.
- [23] Lorence A, Medina-Boliva F, Nessler C L. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots[J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22: 437-441.
- [24] 王伟, 陆杨, 李礼, 等. 喜树毛状根的诱导及其喜树碱含量分析[J]. *西北植物学报*, 2008, 28(12): 2416-2422.
- [25] Mohana Kumara P, Shweta S, Vasanthakumari M M, et al. Endophytes and Plant Secondary Metabolite Synthesis: Molecular and Evolutionary Per-

spective[M]. In: Verma V C and Gange A C. (eds.), Advances in Endophytic Research, Springer India, 2014; 177-190.

[26] 闵长莉,汪学军. 喜树产 10-羟基喜树碱内生真菌的分离鉴定[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 614-617.

[27] 闵长莉,袁萍. 喜树内生真菌的分离及产 10-羟基喜树碱菌的鉴定[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2009, 40(5): 94-99.

[28] Kusari S, Zuhlke S, Spiteller M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues [J]. Journal of Natural Products, 2009, 72; 2-7.

[29] Liu K H, Ding X W, Deng B W, et al. 10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata* [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32: 689-693.

[30] Pu X, Qu X, Chen F, et al. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 9365-9375.

[31] Kusari S, Zühlke S, Spiteller M. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis [J]. Journal of Natural Products, 2011, 74: 764-775.

[32] 蒲祥,李光州,肖青,等. 产喜树碱的喜树内生真菌 *Aspergillus* sp. LY013 的分离、退化及退化后的次级代谢产物[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19: 787-793.

[33] Ding X, Liu K, Deng B, et al. Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29: 1831-1838.

[34] Puri S C, Verma V, Amna T, et al. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces *Camptothecin* [J]. Journal of Natural Products, 2005, 68: 1717-1719.

[35] Amna T, Puri S C, Verma V, et al. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52: 189-196.

[36] Rehman S, Shawl A S, Kour A, et al. Comparative studies and identification of camptothecin produced by an endophyte at shake flask and bioreactor [J]. Natural Product Research, 2009, 23: 1050-1057.

[37] Shweta S, Zuehlke S, Ramesha B T, et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. Ex Arn (Icacinaeae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 117-122.

[38] Shweta S, Gurumurthy B R, Ravikanth G, et al. Endophytic fungi from *Miquelia dentate* Bedd produce the anti-cancer alkaloid, camptothecin [J]. Phytomedicine, 2013, 20: 337-342.

[39] Shweta S, HimaBindu J, Raghu J, et al. Isolation of endophytic bacteria producing the anti-cancer alkaloid camptothecin from *Miquelia dentata* Bedd (Icacinaeae) [J]. Phytomedicine, 2013, 20: 913-917.

Research Progress of the Production of Camptothecin(s) Drugs by *in vitro* Cultures

PAN Xue-wu, DONG Yan-ling

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

Abstract: *In vitro* cultures for the production of antitumor drugs-camptothecin(s) were introduced in this article, the focal point of which was the production of camptothecin and its analogues *via in vitro* cultures such as plant cell culture, hairy root cultures and endophytic fungi cultures.

Key words: camptothecin; *in vitro* culture; antitumor drugs

李子树枝干流胶的原因

李树流胶病主要为害枝干,果实也可以流胶。主干、主枝受害后,病部隆起,并流出树胶,雨后病情加重。树胶干燥后变为红褐色至茶褐色坚硬块状物。枝上病斑多时,常大量流胶,导致树势衰弱,严重者枝干枯死。果实染病,有黄色胶质溢出果面,病部硬化,后期发生龟裂,严重影响商品价值。

李树流胶病在生长期均可发病,而在高温、高湿的 6~8 月为发病盛期。树体的物理伤害,如人为的机械损伤和冻害、日灼等自然伤害成为发生流胶病的诱因;而土壤粘重、通风透光差、过度修剪、土壤含水量过高且持续时间长,以及病虫害严重等栽培管理措施不当也为流胶病的发生提供了条件。另外,李树流胶病也可以由半知菌亚门一种真菌侵染引起。

(来源:中国农业信息网,作者:宋伟利)