台灣紅豆杉細胞培養生產紅豆杉醇

李承榆(1)、林芬蘭(1)、楊玉麟(1)、張錦得(1)
王麗華(2)、魏浩亮(2)、蔡新聲(3)

(1)工業技術研究院化學工業研究所
(2)永豐餘造紙股份有限公司
(3)台灣省農業試驗所

一、摘要

台灣紅豆杉葉片萃取液以HPLC分析結果顯示含有葉片鮮重0.007-0.0267%的紅豆杉醇，以及其他taxanes包括：10-deacetyltaxol、10-deacetylcephalomannine及10-deacetyl-baccatin III。植物細胞及組織培養技術提供生產紅豆杉醇的新方法。本試驗在探討台灣紅豆杉細胞培養生產紅豆杉醇及相關taxanes的技術。台灣紅豆杉的枝條及葉片以添加2 mg/l 2,4-D或NAA的Gamborg B5培養基培養，約二週後可誘導癒合組織產生。癒合組織繼代培養一個月其重量爲原來的五倍。乾物重約爲溼重的5-7%。懸浮培養二個月的細胞團可再生出紅豆杉的根。紅豆杉細胞三角瓶懸浮培養液，以RP-18的管柱及配有photo-diode array spectroscopy的HPLC分析，經三角瓶培養懸浮細胞一個月，可產生紅豆杉醇0.2 mg/l。培養液添加1 mM的phenylalanine，紅豆杉醇含量可達3 mg/l。

關鍵詞：台灣紅豆杉、紅豆杉醇、細胞懸浮培養、生物反應器、癒合組織。

二、前言

癌症一直是國內十大死亡原因之首，人人幾乎到達談癌症色變的程度。爲了對抗癌症，全世界各藥廠莫不致力於新抗癌藥物的開發。資料顯示抗癌藥物的需求在國際市場每年有80億美元，而國內市場則有三億台幣之銷售額。紅豆杉醇是1960-1981年美國國家癌症研究中心(NCI)爲對抗癌症，試驗十萬種以上動植物的萃取液，希望找出既安全又有效之藥物來對抗癌細胞，最後在十三萬多種樣品中找到紅豆杉醇。經臨床試驗發現對卵巢癌、乳癌、肺癌以及其他多種癌症患者非常有效。紅豆杉醇在1963年由美國太平洋紫杉(Taxus brevifolia)樹皮萃取出來(Parkinson et al., 1994)，被發現具有廣效的抗腫瘤作用。1966年分離出有效成份。1971年由Wani et al.將其構造定出。1983年開始進行臨床試驗，結果對固態癌例如卵巢癌非常有效。1992年已獲得美國FDA核准上市(Parkinson et al., 1994)，美國Bristol-Myers Squibb公司以Paclitaxel商品名出售。1993年初亦獲加拿大核准使用。目前爲止已獲得二十幾個國家核准使用。至於用在其他固態癌症的效果也正擴大臨床試驗中。它的使用量會逐年增加是可預見的。由於紅豆杉醇來源短缺，其原料單價約爲1000美元/公克。市場資料顯示1993年實際銷售金額爲一億五仟萬美元，1994年預估銷售金額二億五仟萬美元，1997年預估銷售金額將達五億美元。

目前此藥物開發最大的問題是紅豆杉醇來源的供應。由50年齡以上之紅豆杉樹木2-3棵的樹皮，才能萃取到一個病人使用之劑量(約2公克)。估計生產1公斤藥品需2000-4000棵紅豆杉。樹木也因剝皮而死亡。此種原料供應方式受到環境保護人士之抗議而受到限制。若以人工化學合成則非常困難，至少需20幾個步驟才能完成，不合經濟效益。目前現有的紅豆杉醇都是由紅豆杉樹皮萃取，由於來源有限而處於有行無市，原料持有者惜售。美國Hauser公司正有計畫的以大量栽培紅豆杉收取葉片來萃取紅豆杉醇。美國Montana大學Stierle et al. (1993)宣佈分離出產生紅豆杉醇的微生物，其產量在50 ng/l之程度，離商業化生產尚有一大段距離。Holton et al.(1994a ; 1994b)及Nicolaou et al. (1994)最近發表紅豆杉醇人工合成成功，但因合成步驟多，目前商業化生產仍有困難。美國Phytopharmaceuticals, Inc.預計在1994年以植物組織培養配合反應器培養技術商業化生產紅豆杉醇。最近資料報導已將此技術轉給韓國Sun Hill Glucose公司進行量產。

台灣紅豆杉(Taxus mairei)經分析鑑定其樹皮紅豆杉醇的含量不高，但樹葉中含有較高的紅豆杉醇及其它類同物(圖一)，其中如10-deacetyltaxol及10-deacetylcephalomannine等衍生物對癌症皆具治療效果，可發展爲新的抗癌藥物。台灣的紅豆杉由於木材質地堅硬爲雕刻之上好材料，長久以來經大量砍伐及盜伐嚴重，數量正在劇減中，目前已被立法加以保護，屬於國寶級之樹種。因此在台灣要開發紅豆杉醇的生產，若由植物體直接萃取，勢必會發生原料短缺之問題。以紅豆杉細胞培養方式來解決紅豆杉醇供應的問題，爲近幾年來熱門的研究方向。國外研究報告以美國，加拿大及日本爲主。它們都以太平洋紫杉或加拿大、日本種的紅豆杉爲材料(Fett-Neto et al., 1992; Fett-Neto et al., 1994; Wickremesinhe and Arteca, 1993)。本文有鑑於其開發潛力乃針對本省東勢林區及花蓮林區採得的台灣紅豆杉，進行細胞培養技術開發，以期發展出商業化規模的生產製程。

三、材料與方法

*1.*紅豆杉材料來源：

本試驗紅豆杉材料分別由林務局東勢及花蓮林區在海拔2000公尺左右採得。採取的紅豆杉小枝條保存在4 ℃冰箱中。

*2.*紅豆杉葉片含有紅豆杉醇及類同物含量測定：

取紅豆杉葉片5公克經研砵磨碎後，添加20 ml正己烷浸泡過夜。過濾後取過濾物添加甲醇20 ml萃取，萃取液濃縮加入(1 ： 9 ＝甲醇：二氯甲烷)：水＝1 ： 1的混合液萃，取有機層加以濃縮乾後以HPLC分析。

*3.*紅豆杉癒合組織誘導與細胞懸浮培養

紅豆杉枝條及葉片以次氯酸鈉2%消毒25分鐘。取出以無菌水清洗後培養於內含2,4-D的Gamborg B5改良培養基(Gamborg et al., 1968)誘導癒合組織產生。懸浮細胞培養時取生長良好的癒合組織，培養於B5培養液中以轉速100rpm ，振盪培養。

4. 紅豆杉細胞培養液紅豆杉醇分析方法 (Fett-Neto et al., 1992; Fett-Neto et al., 1994; Wani et al., 1971)

取懸浮培養一個月左右的細胞培養液，以甲醇及二氯甲烷混合溶劑振盪萃取，取有機層以氮氣吹乾。萃取物以適量的甲醇溶解，經過0.2u的millipore過濾後以HPLC分析。HPCL 的Column 材質爲RP-18 reverse phase。Detector配有photo-diode array spectro-scopy。紅豆杉醇標準品爲Sigma公司出品。配成1 mg/10ml的stock solution，使用時再稀釋。

四、試驗結果：

1. 台灣紅豆杉葉片紅豆杉醇及其類同物含量測定結果：

生長在台灣高山不同林區的紅豆杉葉片，以HPLC分析紅豆杉醇含量結果如表一，花蓮(H1-H3)及東勢(T1-T3)林區採得的紅豆杉葉片含有相當量的紅豆杉醇及cephalomannine。比起國外其他種的紅豆杉葉片含量高出很多(Schutzki et al., 1994)。因此台灣種的紅豆杉葉片爲非常優良的紅豆杉醇萃取材料。本試驗結果顯示不同地區的紅豆杉樹其紅豆杉醇含量差異頗大。此資料可做爲選擇優良母株進行癒合組織誘導之參考。

2. 台灣紅豆杉癒合組織誘導：

台灣紅豆杉枝條及葉片培養在改良B5培養基上二週後，即可產生癒合組織，經一個月生長，可形成大量的癒合組織(圖二及圖三)。2,4-D及NAA都能促進癒合組織生長，癒合組織經繼代培養後生長速率，與其他種類植物如日日春的癒合組織生長相比較顯得較慢。

3. 生長調節素濃度對癒合組織生長之影響：

表二爲2,4-D對紅豆杉癒合組織生長之影響，結果顯示，經一個月培養，2,4-D濃度在2ppm時癒合組織生長較快，2,4-D濃度太高癒合組織較快褐化。

4. 紅豆杉細胞懸浮培養生長曲線圖：

紅豆杉的癒合組織經繼代培養於含有液體培養基的三角瓶中，可形成懸浮狀況良好之細胞團(圖四)。培養25天後以細胞沉降體積(settled cell volume)測得之細胞量，增加爲原來的5-6倍，此時應可再進行繼代培養(圖五)。

5. 2,4-D濃度對懸浮培養細胞生長之影響：

圖六顯示，1-2ppm 2,4-D較適合紅豆衫之細胞懸浮培養，經36天培養後，細胞沉降體積可由0.6增加爲2.0，約爲起始濃度之三倍；而4 ppm 2,4-D結果稍差。

6. 紅豆杉癒合組織根的再生：

紅豆杉由種子發芽成苗仍甚困難，目前多以扦插方式育苗，但成活率也不太理想。因此由紅豆杉細胞培養再生成植株，亦是各研究人員追求的目標之一。本研究紅豆杉的癒合組織培養

於液體培養基中，經振盪培養二個月後仍可再生根(圖七），顯示由紅豆衫之懸浮細胞生產植株是可行的，目前正進行芽再生的誘導中。

7. 紅豆杉細胞懸浮培養紅豆杉醇的產出：

紅豆杉細胞以三角瓶懸浮培養一個月後，取樣以HPCL分析其紅豆杉醇含量約爲0.2 mg/l；若在培養液中添加1mM的phenylalanine，則紅豆杉醇含量可達3 mg/l（圖八）。此種結果顯示培養基組成的改進可提高紅豆杉醇的含量。本試驗結果証實台灣產的紅豆杉細胞，培養於適當的培養基能產出紅豆杉醇，非常值得進一步研究開發。

五、討論

本研究結果顯示台灣紅豆杉的葉片含有相當量的紅豆杉醇及其類同物，是非常值得開發的藥用植物。台灣紅豆杉之生長最適合環境屬於高海拔的山區，栽培地區有限且生長緩慢，大量栽培紅豆杉收集葉片有其困難。因此以細胞培養方式生產紅豆杉醇頗具開發潛力，未來應可藉細胞系選拔技術提高紅豆杉醇產率。細胞培養液的回收、分離及純化也比由紅豆杉樹皮或葉片的萃取簡單且效率高。由於紅豆杉醇沒有專利，於田間栽培有困難，化學合成成本又太高的情況下，植物細胞培養商業化生產非常有利。以太平洋紫杉樹皮萃取紅豆杉醇爲例：15公斤樹皮約可萃取1公克的紅豆杉醇，一棵50-100年生樹齡的樹皮約爲10公斤，治療一個患者約需要二公克紅豆杉醇，因此一個病患約需3-12棵50-100年生的太平洋紫衫。若以細胞培養3 mg/l的產量，只要一個300公升的反應器，培養一個月即可產出0.9 公克的紅豆杉醇，相當於一棵50-100年生的太平洋紫杉的樹皮產量。若能從細胞系改良及生產製程改進著手，則產量會更高，生產成本可再降低。本研究在工研院化工所、永豐餘造紙公司及農試所三個單位配合研究下，紅豆杉細胞培養生產紅豆杉醇的技術，已有相當的成果，目前正進行反應器培養技術及量產製程的開發，並進行紅豆杉醇的回收、純化技術探討。此外紅豆杉毛狀根培養亦是未來發展的研究重點。永豐餘造紙股份有限公司在微體繁殖法技術應用方面已有相當的成就，目前正對高附加價值的植物二次代謝產物的生產技術合作更積極開發。本研究爲民國82年工業局專案計畫補助下，由工研院化工所與永豐餘公司合作從事紅豆杉細胞系及紅豆杉醇分析技術開發的計畫。目前永豐餘公司也參與經濟部科技專案業界合作的“植物細胞反應器培養技術”的計畫，以期開發紅豆杉醇的大量生產技術。這種結合產業界與研究單位共同開發高附加價值的抗癌藥物，是產業落實及台灣製藥工業技術昇級的模式。

六、誌謝

本論文承蒙經濟部科技專案，經濟部工業局及永豐餘造紙股份有限公司提供經費。林務局東勢及花蓮林管區提供紅豆杉材料特此致謝。

七、引用文獻：

1. Fett-Neto, A.G., F. DiCosmo, W. F. Reynolds and K. Sakata. 1992. Cell culture of Taxus as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. Biotechnology 10:1572-

1575.

2. Fett-Neto, A. G., S. J. Melanson, S. A. Nicholson, J. J. Pennington and F. DiCosmo. 1994. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of Taxus cuspidata. Biotechnology and Bioengineering 44:967-971.

3. Gamborg,O.L., R. A. Miller and R. Ojima. 1968. Nutrient requirments of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 59:151-158.

4. Holton, R.A., C. Somoza, H. Kim, F. Liang, R. J. Biediser, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadisadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile and J. H. Liu. 1994a. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. J. Am. Chem. Soc. 116:1597-1598.

5. Holton, R.A., C. Somoza, H. Kim, F. Liang, R. J. Biediser, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadisadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile and J. H. Liu. 1994b. First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D ring. J. Am. Chem. Soc. 116:1599-1600.

6. Kingston, D. G. I. 1994. Taxol:the chemistry and structure -activity relationships of a novel anticancer agent. TIBTECH. 12:222-227.

7. Nicolaou, K.C., Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantormet, R. K. Guy, C. F. Clalborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan and E. J. Sorensen. 1994. Total synthesis of taxol. Nature 367:630-634.

8. Parkinson, D.R., S. G. Arbuck, T. Moore, J. M. Pluda, M. C. Christian. 1994. Clinical development of anticancer agents from nature products. Stem Cells 12:30-43.

9. Schutzki, R.E., A. Chandar and M.G. Nair. 1994. The effect of postharvest storage on taxol and cephalomannine concentrations in Taxus media 'Hichsii" Rehd. Phytochemistry 37:(2)405-408.

10. Stierle, A., G. Strobel, and D. Stierle. 1993. Taxol and taxane production by Taxomyces andreane, an endophytic fungus of pacific yew. Science 260:214-216.

11. Wani, M.C., H. L. Taylor, M. E. Wall. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. J. Am. Chem. Soci. 93:2325-2327.

12. Wickremesinhe, E.R.M. and R.N. Arteca. 1993. Taxus callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. Plant Cell Tissue and Organ Culture 35:181-193.

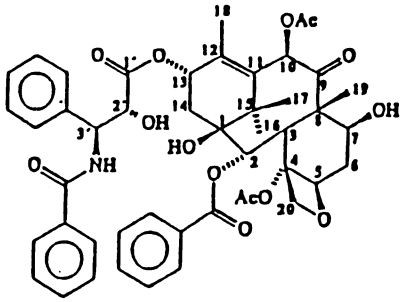
表一、台灣紅豆杉不同來源 taxanes 含量測定結果：

紅豆杉來源	Taxol (% of wet wt.)	Cephalomannine (% of wet wt.)
H1	0.0143	0.0056
H2	0.0253	0.0095
H3	0.0077	0.0086
T1	0.0182	0.0292
T2	0.0267	0.0221
T3	0.0028	0.0050

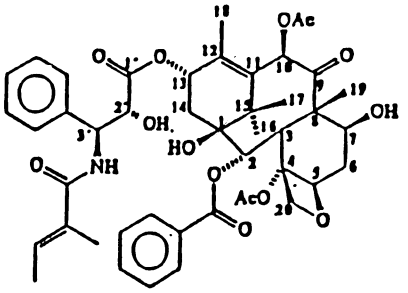
H1..H3 表花蓮林區
T1..T3 表東勢林區

表二、2,4-D 濃度對台灣紅豆杉癒合組織生長之影響

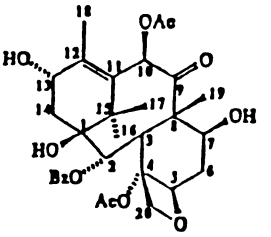
2,4-D濃	培養前重量(g)	培養後重量(g)	增加倍數
1ppm	0.3160	1.3304	4.21
2ppm	0.3250	1.5495	4.74
4ppm	0.3223	1.5019	4.66



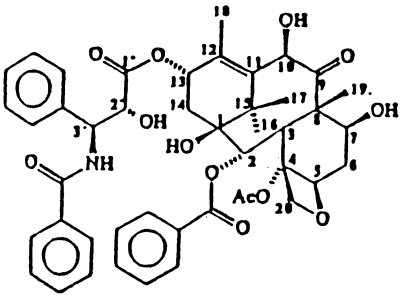
Taxol



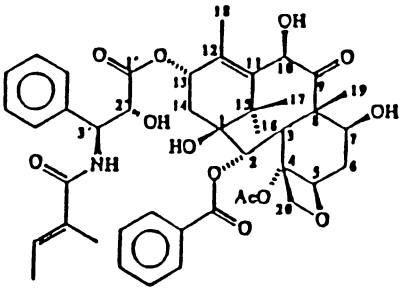
Cephalomannine



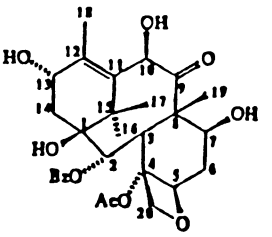
Baccatin III



10-Deacetyltaxol

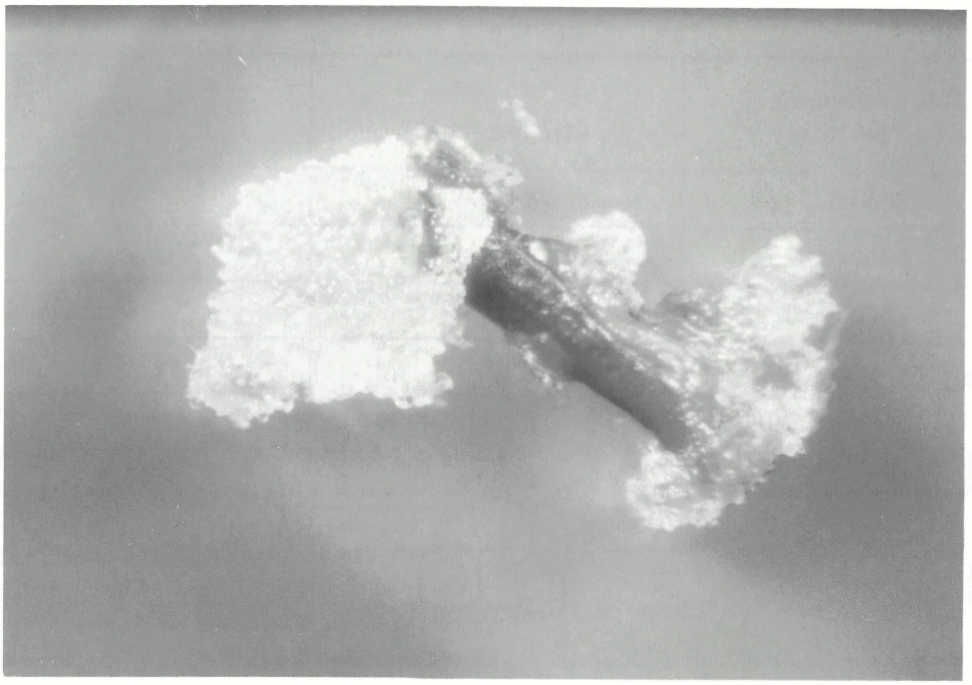


10-Deacetylcephalomannine

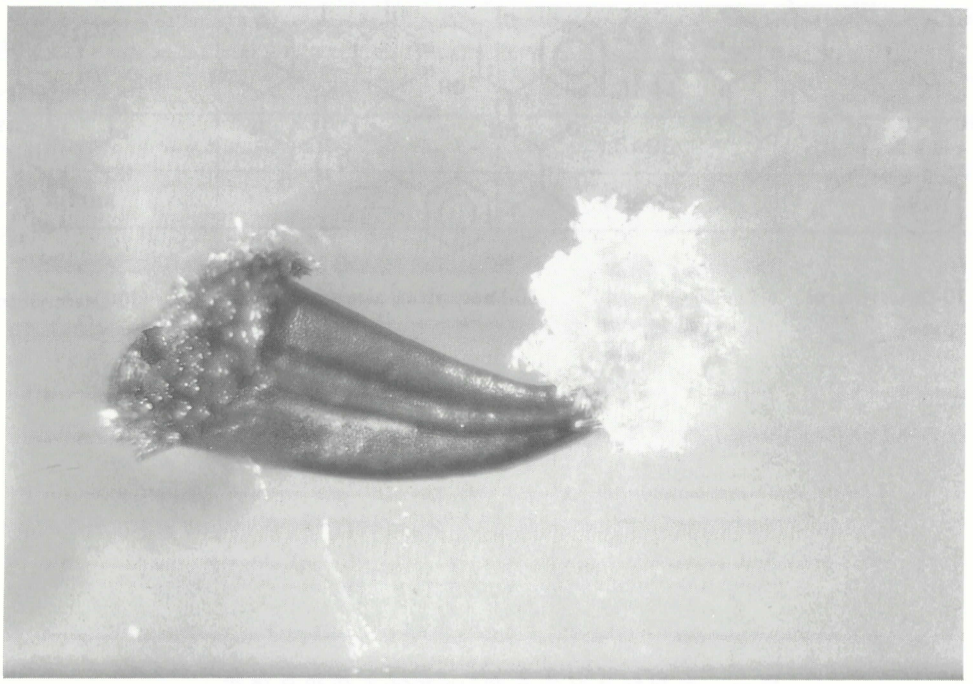


10-Deacetylbaccatin III

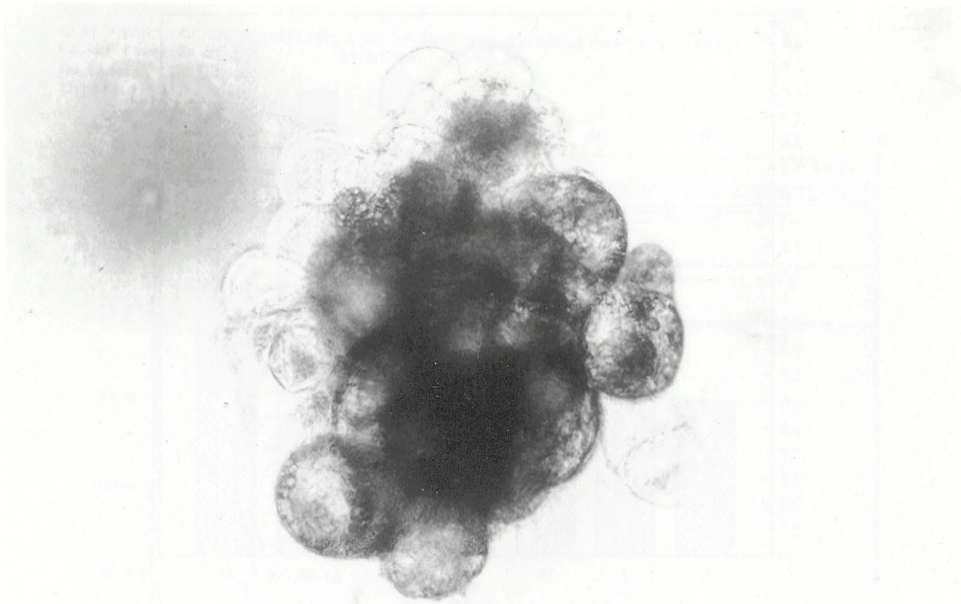
圖一　台灣紅豆杉葉片含Taxanes之種類及構造



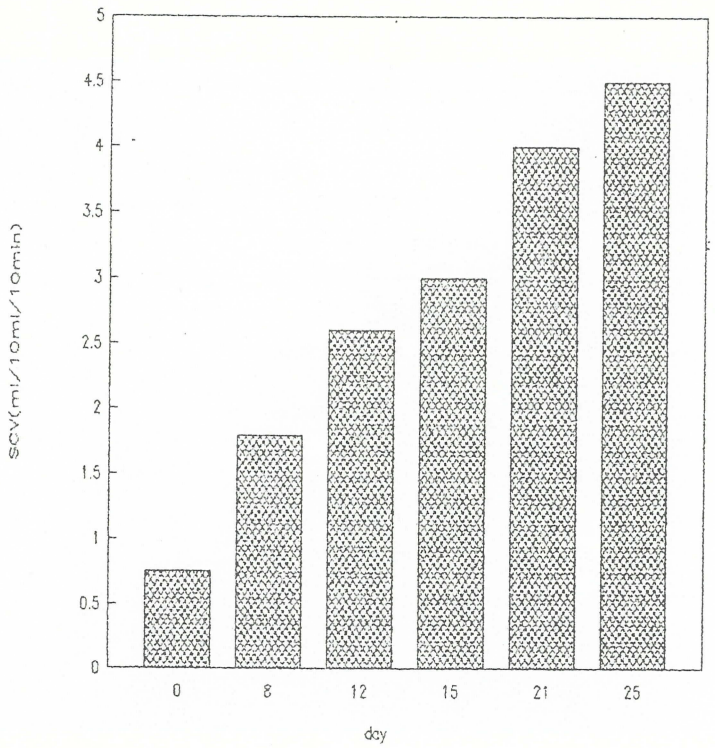
圖二　台灣紅豆杉枝條癒合組織之誘導



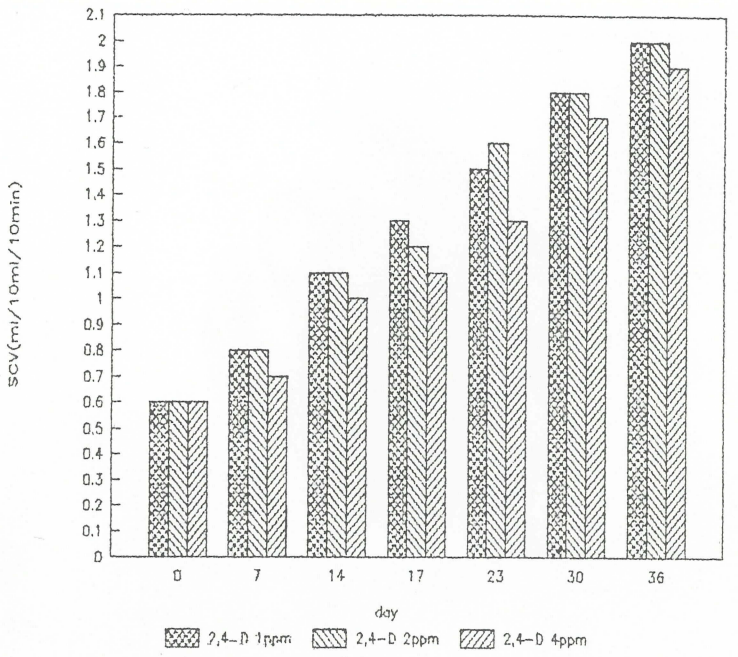
圖三　台灣紅豆杉葉片癒合組織之誘導



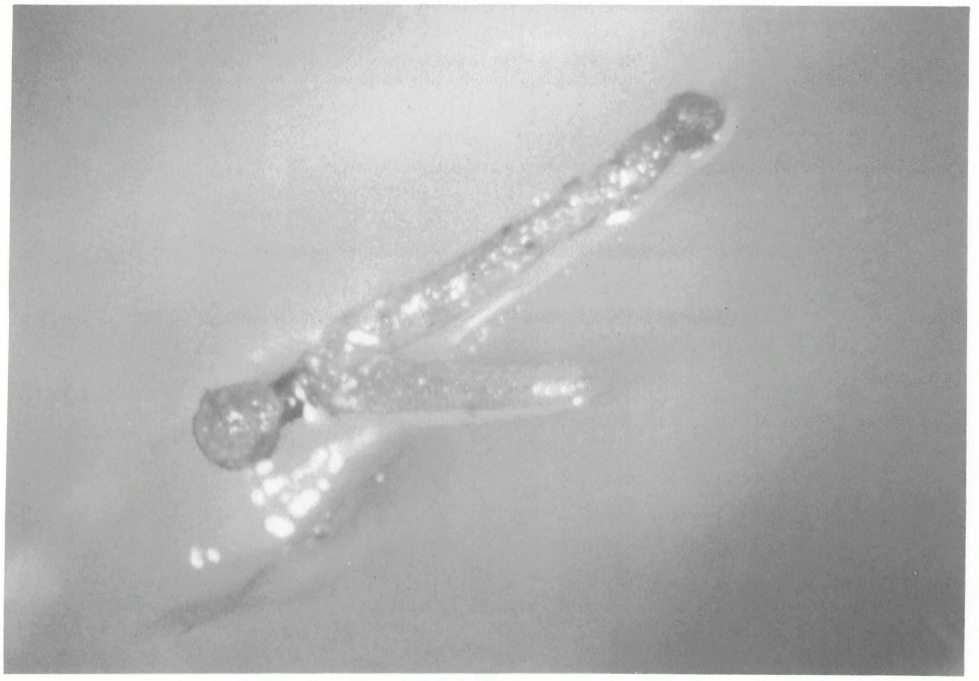
圖四　台灣紅豆杉細胞懸浮培養之細胞團



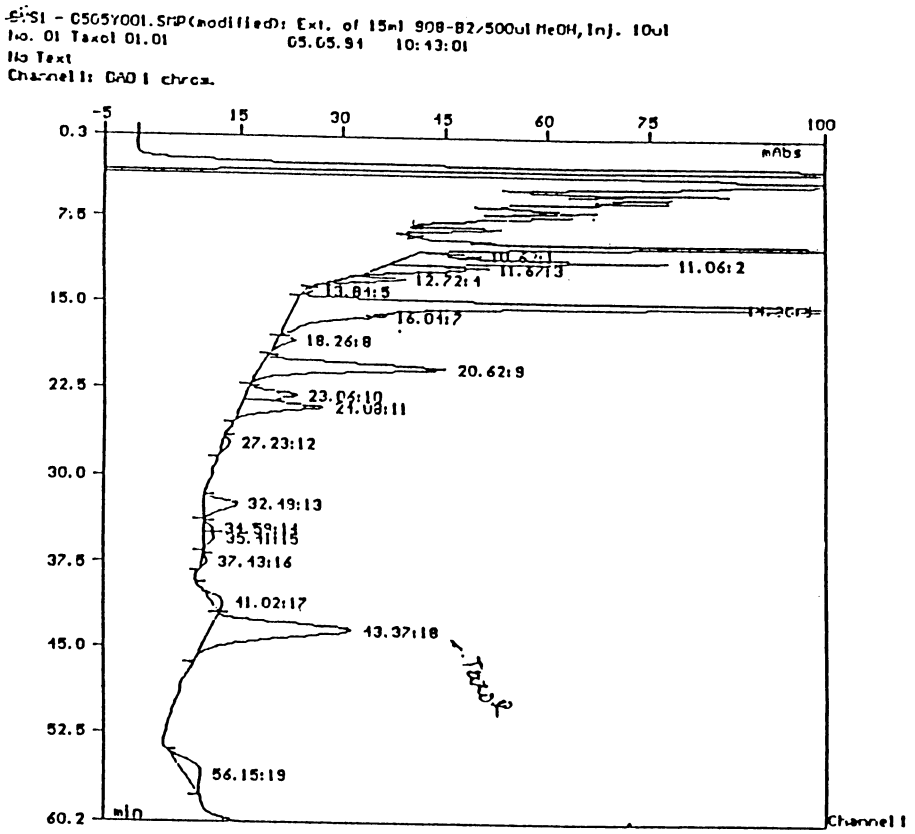
圖五　台灣紅豆杉細胞三角瓶懸浮培養生長情形

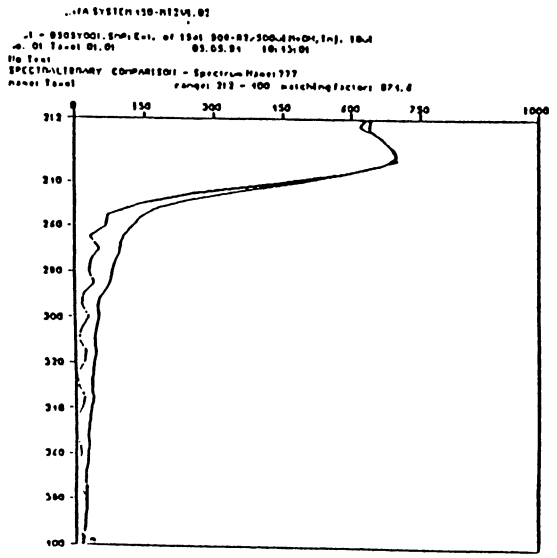


圖六　2,4-D濃度對台灣紅豆杉細胞懸浮培養之影響



圖七　台灣紅豆杉細胞培養根的再生





圖八　紅豆杉細胞三角瓶懸浮培養紅豆杉醇產出HPLC分析結果

Taxol Production by Cell Cultures of Taxus mairei

C. Y. Lee[1],F.L.Lin[1], Y.L. Yang[1], C. T. Chang[1], L. H. Wang[2], H. L. Wei[2] and H. S. Tsay[3]

1.Union Chemical Laboratories, Industrial Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan 30042, R O C.
2.Yuen Foong Yu Paper Mfg. Co., Ltd., 51, Sec. 2, Chung Ching S. Rd., Taipei, Taiwan, R O C.
3.Department of Agronomy, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan 41301, R O C.

Abstract

Needles extract of Taxus mairei was analyzed by high performance liquid chromatography. The taxol content of the extract was about 0.007-0.027 % on the fresh weight basis. Besides taxol, other taxanes 'such as 10-deacetyltaxol, 10-deacetylcephalomannine and 10-deacetylbaccatin III were also found in the needles extract. Plant cell and tissue culture methods offer a potential alternative for taxol production. This experiment was designed to produce taxol and related taxanes on the cell culture of Taxus mairei. Needles and stems from Taxus mairei were cultured on Gamborg's B5 medium supplemented with 2ppm 2,4-D or NAA. Callus was induced from the explants after 2 weeks. The biomass of callus increased about 5 times and dry matter content was 5-7% after one month in culture. Root formation was observed from suspension cell after 2 months in culture. Taxol produced by the cell suspension culture was analyzed by HPLC. HPLC analysis was performed on a RP-18 reverse phase column with a photo-diode array spectroscopy. Taxol content in the flask suspension cell was 0.2mg/l after one month cultivation. However, the yield increased to 3 mg/l by feeding 1mM phenylalanine to the medium.

Key words : Taxus mairei, taxol, cell suspension culture, bio-reactor, callus.