

# 紅豆杉屬次級代謝物-紫杉醇之開發歷程 及應用生物反應器量產之研究概況

蕭翌柱<sup>1)</sup>、朱建鏞<sup>2)</sup>

- 1)行政院農業委員會農業試驗所生技組助理研究員，國立中興大學園藝學系博士班研究生。  
2)國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

## 摘要

「生物反應器」是一種可在無菌環境下應用營養液密集培養植物體的設備，此種設備能精密的監測和調控培育容器內之微環境條件並進行植物細胞懸浮培養以生產如紫杉醇、紫草素和喜樹鹼等具有藥用價值的次級代謝物。本文以「紫杉醇」為例，概述美國從西元1958年開始全力篩選超過110,000種天然抗癌藥物，至1971年發現紫杉醇後之開發歷程，並簡介利用紅豆杉屬植物瓶內培養技術誘導產生癒合組織，再培養此種細胞生產紫杉醇的方法。另在氣舉式生物反應器(Air lift loop reactor)之應用研究顯示，經選拔之優良細胞系懸浮培養於含甲基茉莉酸等誘導物質或前驅物之液體培養基中，能提高紫杉醇的產量由原先的3.4 mg/L增加為16.7 mg/L。我國自1995年起，也積極探討本土性台灣紅豆杉的發展潛力，經比較不同來源細胞系的生長情形與紫杉烷類含量發現，以1公升容積的小型反應器培養低密度細胞系(25-50 g/L)，再以每隔15天更換部分液體培養基的培養方式，經60天後細胞體積可增加10.7-11.5倍，紫杉醇含量最高可達16.8 mg/L。篩選生長快速且成分含量高的優良細胞系、嚴格管控細胞培養起始密度、培養基組成分、溫度、繼代時間和養液更新等條件並開發新型反應器設備以調控培養基pH值和含氧量等因子，或可提高商業量產紫杉醇的效率，未來應用生物反應器於其他中草藥次級代謝物的萃取和量產，其發展前景應值得期待。

## 一、前言

近代的生技產業約自西元1980年起開始蓬勃發展，至今其應用範圍深入農業、製藥工業、環保、食品和特用化學品等領域(李，2004)。以製藥工業為例，西元2000年全球化學製藥年產值約為3500億美元；而生物製藥年產值為160億美元，預估到2008年時可能增加為586億美元，生產的藥物種類包括利用基因工程製造的紅血球生成素、胰島素、干擾素以及由植物體萃取的紫杉醇、紫草素、喜樹鹼等次級代謝物質(何，

2003；蕭，2004)。

生物反應器為一種設計完善，且可在無菌環境下應用營養液密集培養植物體的設備，此種設備能精密的監測和調控培育容器內各種微環境條件(例如攪動，通氣，溫度，溶氧或pH值等)(Paek et al., 2005)，相較於使用傳統小容器的微體繁殖方式，自動化生物反應器能有效建立一套具有大規模植物繁殖潛能的系統，前者則需要較多且密集的勞力操作，也使其生產成本和市

關鍵詞：生物反應器；次級代謝物；組織培養



場競爭力受到限制(Levin and Tanny, 2004)。回顧最先發表將初級反應器應用於植物體培養試驗者，應是西元1981年時由日本Takayama氏和Misawa氏二人利用3公升容量且附有氣泡生成裝置之圓柱形發酵槽培育麗格秋海棠之芽體和苗株(Takayama and Misawa, 1981)，雖然其最終獲得的試驗結果，單位體積產量似乎略少於使用150 ml三角瓶液體振盪培養方式，但自此以後，應用於培育植物體的生物反應器系統及其附屬裝置即不斷地被創新和改良，甚至可以在不必更換容器的情形下，輕易地補充新鮮養液供給培植體生長所需(Maene and Debergh, 1985; Hale et al., 1992)。現階段，為使依據製藥程序所生產出來的各批次原、物料皆能維持穩定的質量，許多量產型的發酵槽或先進的反應器早已被各大藥廠廣泛的採用並列為營運所需之基本配備。

目前，運用各類型的生物反應器系統已被證實可培養包括新梢、鱗莖、微塊莖、球莖和體胚等多種植物器官(Paek et al., 2001)；藉由此一新式設備進行植物細胞懸浮培養並生產具有藥用價值的次級代謝物質，也可迅速邁向商業量產的階段(何，2003)。本文主要目的擬以天然抗癌藥物-「紫杉醇」為例，回顧論述1)紫杉醇被發現與開發的歷程；2)運用生物反應器培育紅豆杉屬(Taxus)植物細胞之情形；3)本土性台灣紅豆杉之開發；和4)影響紅豆杉細胞培養量產紫杉醇之因子，以期提供國人未來進行其他中草藥相關研究時之參考。

## 二、紫杉醇的發現與開發

自西元1958年開始，美國「國家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)」從35,000種以上不同的天然植物物種中，逐一篩檢超過110,000個可能的抗癌化合物(Tubbing and McDowell, 1995)，直到1971年時首度由科學家Monroe Wall博士在太平洋紫杉(Taxus brevifolia)樹皮萃取出

含量僅有0.006%的化合物，此種成分在體外具有抑制癌細胞的功能，於是將之命名為「紫杉醇(Taxol)」。紫杉醇經過多次分離純化及化學結構解析後，Susan Horwitz博士開始探討其抗癌腫瘤的藥理機制，最終發現紫杉醇能抑制細胞內微管次體蛋白的活性，由於此種蛋白在細胞分裂時扮演重要媒介，因此，可以降低癌細胞快速分裂與增殖作用(蕭，2004；Wani et al., 1971)；另外，在1977-1979年間施行的動物試驗，以及1983年國家癌症研究所(NCI)進行的第一次臨床試驗，結果都證實對於皮膚癌和婦女卵巢癌具有相當良好的療效；於1995年時，由美國藥物與食品管理局(American Food and Drug Administration，簡稱FDA)正式核准上市(張等人，2004)；後續的研究也發現，紫杉醇另有治療小細胞肺癌、黑色素瘤及白血病之效果(Rowinsky and Donehow, 1995)。

由於紫杉醇在太平洋紫杉樹皮中含量極低且溶解度很小，萃取技術異常困難，因此，國家癌症研究所在1991年委託美商必治妥-施貴實公司共同合作開發此種珍貴的藥用成分，最大規模純化實驗是搜集350,000公斤的樹皮(約38,000棵紫杉)，從中萃取得到25公斤的紫杉醇，假設治療一位卵巢癌或第二期乳癌重症病患需耗用0.48-0.5公克，則此次產量僅足夠救治12,000名(蕭，2004)。紫杉醇被研究發現後，初期售價非常昂貴，每1公斤原料藥價值高達800,000美元，統計資料也顯示，美國卵巢癌患者每年所使用的Taxol製劑，需砍伐50,000棵60-70年株齡的太平洋紫杉(Christopher, 1993)，由於大規模砍伐紫杉林木不但嚴重破壞自然生態，其極低的產率也無法充分供應醫療需求，於是，全世界頂尖科學家及研究人員開始積極尋求合成與生產紫杉醇的新技術。1994年化學家們經過30道以上複雜的程序，終於在試管內順利合成此一含雙萜化合物(diterpenoid)，但其產出率僅有0.05%(Nicolaou et

al., 1994), 此後再經多次的試驗和尋覓, 在紅豆杉旺盛的枝葉中萃取出濃度甚高的紫杉醇主要結構前驅物質10-去乙酰巴卡亭(簡稱10-DAB), 如以此種前驅物作為合成起始物質, 則僅需10個轉化步驟即可獲得珍貴的紫杉醇, 而且在實驗室的合成率可達80%以上(何, 2003)。

### 三、紫杉醇的生產及細胞培養

雖然紫杉醇的開發研究已超過十年光景, 原料藥價格也逐漸下降到每1公斤300,000美元, 但依舊屬於高價藥物, 估計全球總需求量仍有18億美元, 佔所有抗癌藥物市場之25%(何, 2003)。目前, 主要的產品製程, 還是仰賴歐洲紅豆杉枝葉提供10-DAB前驅物的「半化學合成法」, 此外, 學者專家也相繼發表紅豆杉利用瓶內培養技術誘導產生癒合組織、再由此種組織或細胞生產紫杉醇(Fett-Neto et al., 1992, 1994; Ketchum and Gibson, 1994; Wickremesinhe and Arteca, 1993; Zhiri et al., 1995; Stockigt et al., 1995; 李, 1998), 例如, 培養日本紅豆杉(*T. cuspidata*)莖段培植體, 在切口部位增生的癒合組織紫杉醇含量達到200 mg/L (Fett-Neto et al., 1993), 高於一般太平洋紫杉樹皮之平均萃取量(100 mg/L); 培養*T. baccata*和 *T. canadensis*等紅豆杉不同樹種的細胞系, 約有90%以上的紫杉醇可被釋放到液體培養基中(Ketchum et al., 1999), 顯示利用組織培養技術生產紫杉醇具有發展潛力。近年來的試驗也相繼發現, 在氣舉式生物反應器(Airlift loop reactor)之液體培養基中, 加入甲基茉莉酸等誘導物質或前驅物, 可使紫杉醇的產量由原先的3.4 mg/L增加為16.7 mg/L以上(Yuan et al., 2001)。

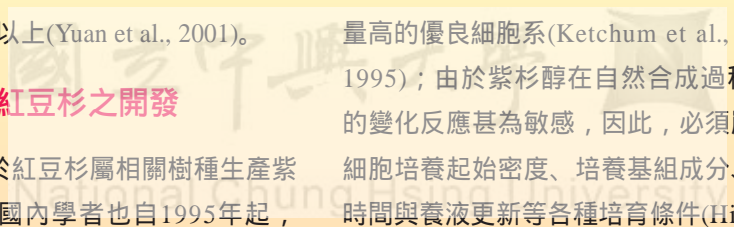
### 四、台灣紅豆杉之開發

正當全世界致力於紅豆杉屬相關樹種生產紫杉醇之開發研究時, 國內學者也自1995年起, 開始探討本土性台灣紅豆杉(*T. mairei*)的發展潛

力, 並且探討不同來源的母樹與營養系分株不同葉齡紫杉烷類含量之季節性變化(何等人, 2000)。台灣紅豆杉為紅豆杉屬常綠喬木, 零星分布於海拔1000-3000公尺之中央山脈, 其與檜木、台灣杉、香杉及台灣肖楠同時列名珍貴的針葉一級木(何, 2003)。台灣紅豆杉之組織培養研究顯示, 取6-12個月株齡的植株幼嫩針葉及莖段作為材料, 接種於含1/2MS (Murashige and Skoog, 1962)基本鹽類並添加5-7 mg/l 2,4-D或1-2.5 mg/l NAA的培養基, 經60天後可誘導產生略呈赭紅色的癒合組織; 分析不同來源癒合組織的紫杉醇含量, 發現細胞系間的產能差異也很大, 最低值趨近於0; 最高值則為每1公斤癒合組織之乾物重中, 含有439 mg紫杉醇(張等人, 1996)。此外, 由台灣紅豆杉取得的胚體、小苗株以及成熟樹葉片進行癒合組織之誘導, 並比較不同來源細胞系的生長情形與紫杉烷類含量, 試驗結果顯示, 以1公升體積的小型反應器培養低密度細胞系(25-50 g/L), 再以每隔15天更換部分液體培養基方式培養, 經60天後細胞體積可增加10.7-11.5倍, 紫杉醇含量最高可達16.8 mg/L (張等人, 2004)。

### 五、影響紅豆杉細胞培養量產紫杉醇之因素

誘導紅豆杉屬植物形成癒合組織, 進而建立細胞懸浮培養以生產昂貴的紫杉醇, 是目前除「半化學合成法」之外, 另一項值得開發研究的量產途徑, 根據學者研究指出, 要提高紫杉醇產量的首要步驟, 應慎重篩選生長快速且成分含量高的優良細胞系(Ketchum et al., 1999; Zhong, 1995); 由於紫杉醇在自然合成過程中, 對環境的變化反應甚為敏感, 因此, 必須嚴格管控包括細胞培養起始密度、培養基組成分、溫度、繼代時間與養液更新等各種培育條件(Hirasuna et al., 1996); 繼代培養時如能將新鮮培養液以7:3或





6:4的比率，混合含有細胞系之舊培養基，可以有效降低酚類物質累積，避免阻礙細胞增生(張等人，2004)；植物生長調節劑之種類及含量，也會影響長期培養細胞系生產次級代謝物質的穩定性(Ketchum and Gibson, 1996)；此外，開發應用新型生物反應器技術，調控培養基的酸鹼值和含氧量等因子，以及在培養液中添加前驅物質或吸附劑，將可提高商業量產紫杉醇的成功率(Yuan et al., 2001; Zhong, 1995)。

## 六、結語

自1980年代開始，生物反應器的設計與應用迅速發展，歷經多次的研究與改良，可商業量產植物次級代謝物質的大型發酵槽及其週邊設備，已普遍使用在相關製程中，例如，毛狀根培養、細胞培養或菇蕈類菌絲體培養等，最終產物包含生物鹼、多醣體、皂苷類或植物花青素等。世界衛生組織(WHO)曾調查指出，全球目前有將近四十億人曾經採用中草藥醫治痼疾，且病情也幸獲痊癒或得到一定程度的療效，然而，中醫理論與藥材炮製、歸經雖為歷史悠久的經驗醫學，卻因為未能運用科學定性和定量的方法證明其藥效及安全性，始終難以獲得西方醫學界之認同與肯定(劉和陳，2002)，近年來，我國傳統的針灸技術和中醫療法已普受注目，不但先進國家相繼投入經費用於減輕疼痛研究，也有極大部份專注於癌症治療，加上生物科技的創新發展一日千里，應用生物反應器於中草藥次級代謝物的萃取和量產，或可為此種人類珍貴的智慧財產注入一股新活力，並填補西藥治病不足之處。本文簡要的回顧紫杉醇的開發歷程及近代運用生物反應器培育其他紅豆杉屬(Taxus)植物細胞的概況，相信未來不論是天然中草藥製劑或利用生物技術量產藥用成分，其發展前景確實值得期待。

## 七、引用文獻

- 何政坤。2003。台灣紅豆杉-抗癌藥物紫杉醇的另一個家。科學發展364: 22-29。
- 何政坤、張淑華、蔡錦瑩。2000。台灣紅豆杉母樹與營養系分株不同葉齡紫杉烷類含量之季節性變化。台灣林業科學15: 365-377。
- 李承榆。1998。利用植物細胞培養生產醫藥品之展望。化工資訊月刊 12: 21-27。
- 李承榆。2004。植物細胞培養在中草藥資源之開發與應用。鍾仁賜主編。第41-50頁。藥用植物之栽培與利用研討會論文集。台灣大學。台北市。
- 張淑華、何政坤、蔡錦瑩。1996。台灣紅豆杉癒合組織之誘導、培養與紫杉醇生產。台灣林業科學11: 445-453。
- 張淑華、何政坤、蔡錦瑩。2004。台灣紅豆杉之細胞培養與紫杉烷類生產。台灣林業科學19: 43-52。
- 蕭世裕。2004。生物科技的應用：化學製藥與生物製藥產業。科學發展373:8-13。
- 劉剛均、陳復霞。2002。新藥研發的醫藥工程。Bio Tech生物科技(七月號):22-23。
- Christopher, J. 1993. Taxol: search for a cancer drug. Bioscience 43: 133-136.
- Fett-Neto, A. G., F. DiCosmo, W. F. Reynolds, and Ko Sakata. 1992. Cell culture of Taxus as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. Bio/tech. 10: 1572-1575.
- Fett-Neto, A. G., S. J. Melanson, Ko Sakata, and F. DiCosmo. 1993. Improved growth and taxol yield in developing calli of Taxus cuspidate by medium composition modification. Bio/tech. 11: 731-734.
- 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 cuspidate. Biotech. Bioeng. 44: 966-971.
- Hale, S. A., R. E. Young., J. W. Adelberg., R. J. Keese, and N. D. Camper. 1992. Bioreactor development for continual- flow , liquid plant tissue culture. 1992. Acta Hort. 319:107-112.
- Hirasuna, T. J., L. J. Pestchanker, V. Srinivasan, and M. L. Shuler. 1996. Taxol production in suspension cultures of Taxus baccata. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44: 95-102.
- Ketchum, R. E. B., and D. M. Gibson. 1994. Rapid production of taxol in suspension cultures of Taxus spp. Plant Physiol. 105:49.
- Ketchum, R. E. B., and D. M. Gibson. 1996. Paclitaxel production in suspension cell cultures of Taxus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46: 9-16.
- Ketchum, R. E., D. M. Gibson, R. B. Croteau, and M. L. Shuler. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of Taxus following elicitation with methyl jasmonate. Biotech. Bioeng 62: 97-105.
- Levin, R., and G. Tanny. 2004. Bioreactors as a low cost option for tissue culture. In: Low cost options for tissue culture

- technology in developing countries (Mohan Jain ed.). pp. 47-54. International Atomic Energy Agency (IAEA). Vienna, Austria.
- Maene, L. J., and P. C. Debergh. 1985. Liquid medium additions to establish tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 5:23-33.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nicolaou, K. C., Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, and E. J. Sorensen. 1994. Total synthesis of taxol. *Nature* 367: 630-634.
- Paek, K.Y., D. Chakrabarty, and E.J. Hahn. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 287-300.
- Paek, K. Y., E. J. Hahn, and S. H. Son. 2001. Application of bioreactors of large scale micropropagation systems of plants. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 37: 149-157.
- Rowinsky, E. K., and R. C. Donehow. 1995. Paclitaxel (Taxol). *N. Engl. J. Med.* 332: 1004-1014.
- Stockigt, J., P. Obitz, H. Falkenhagen, R. Lutterbach, and S. Endreb. 1995. Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43: 97-109.
- Takayama, S., and M. Misawa. 1981. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiol.* 22:461-467.
- Tubbing, H. J. M. M., and B. McDowell. 1995. The yew story: past, present and future of an extraordinary tree. *Taxane J.* 1: 14-20.
- Wani, M. C., H. I. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPHAIL. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem.* 93: 2325-2327.
- Wickremesinhe, E. R. M., and R. N. Arteca. 1993. *Taxus* callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35: 181-193.
- Yuan, Y. J., Z. J. Wei, Z. L. Wu, and J. C. Wu. 2001. Improved taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* by in situ extraction combined with precursor feeding and additional carbon source introduction in an airlift loop reactor. *Biotechnol Lett.* 23: 1659-1662.
- Zhiri, A., K. Maciejewska, M. Jaziri, J. Homes, and M. Vanhaelen. 1995. Establishment of *Taxus baccata* callus cultures and evaluation of taxoid production. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 60: 2111-2116.
- Zhong, J. J. 1995. Recent advances in cell cultures of *Taxus* spp. for production of the natural anticancer drug taxol. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* 1: 75-79.

