

山东沿海 21 种海洋无脊椎动物抗肿瘤活性初步筛选*

张立新 范晓 李宪瑾

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用四氮唑盐比色法 (MTT) 测定了 21 种青岛及其附近海域常见无脊椎动物 94% 乙醇粗提物对人白血病细胞 HL-60 和人肺腺癌细胞 A-549 的抑制率, 同时测定了海筒螈 *Tubularia marina* Torrey 等动物不同极性溶剂萃取物的活性。发现海燕 *Asterina pectinifera* 的正丁醇萃取物、海筒螈的乙酸乙酯萃取物、红条毛肤石鳖 *Acanthochiton rubrolineatus* 的 94% 的乙醇提取物对 HL-60 的抑制作用很强, 在浓度为 0.063 mg/mL 时抑制率分别为 96.7%、63.9%、50.5%; 海筒螈的乙酸乙酯萃取物对 A-549 的抑制率较高, 浓度为 0.063 mg/mL 时的抑制率可以达到 65.4%。

关键词 海洋无脊椎动物, 抗肿瘤, MTT 法

中图分类号 R931.77 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)07-0063-04

国际海洋药物研究的热潮自 20 世纪 60 年代开始, 70~80 年代开展了大规模筛选^[1]。迄今为止, 发现具有抗肿瘤、抗病毒、抗心血管疾病、增强免疫系统等活性的海洋生物活性物质 5 000 余种。海洋天然产物的药理活性侧重于抗肿瘤方面, 从海洋无脊椎动物中发现的抗肿瘤活性物质占有很重要的地位, 因为它们具有较好的生物多样性, 而且其多变的生态环境和原始的进化地位使其拥有许多结构独特的活性物质。例如, 从苔藓动物门的动物海洋草苔虫 *Bugula neritina* 中分离到的大环内酯类化合物 Brostatin 1 具有很好的抗肿瘤活性, 对淋巴细胞白血病、黑素瘤和肺癌等肿瘤细胞都有活性, 现已进入二期临床试验^[2,3]; 从多孔动物门的动物海绵 *Halichondria okadai* 中得到的 Halichondrin B 是一种分子较大的聚醚类化合物, 对乳腺癌、结肠癌和子宫癌均有活性^[4]; 另外还有从海兔 *Dolabella auricularia* 中分离到的环肽 Dolastatin 10, 是一种对白血病有特效的活性成分^[5]。

本文主要对青岛及其附近海域常见的海洋无脊椎动物进行了抗肿瘤活性筛选, 包括腔肠动物门、软体动物门、苔藓动物门、环节动物门、蠕虫门、节肢动物门、棘皮动物门和尾索动物亚门的 21 种海洋无脊椎动物, 测定了它们对人白血病细胞 HL-60 和人肺腺癌细胞 A-549 两种肿瘤细胞的抑制活性。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用海洋无脊椎动物的分属门类^[6]及采集时间和地点见表 1。新鲜动物去除杂物后, 用匀浆机打碎备用。

1.2 方法

1.2.1 粗提物的提取

已打碎的样品用含量约为 94% 的工业乙醇浸泡提取 7 d, 滤出提取液, 残渣再用同体积的乙醇提取 7 d, 合并两次提取液, 真空旋转蒸干, 以备做抗肿瘤活性筛选实验。

1.2.2 萃取

海燕等 3 种动物的粗提物分别加入 10 倍体积的蒸馏水, 充分混悬后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分为几个极性不同的部分, 分别真空旋转蒸干后做抗肿瘤活性实验。

* 国家 863 计划资助项目 2001AA620403 号。

第一作者: 张立新, 出生于 1968 年, 青岛大学化工学院副教授, 博士在读, 研究方向: 海洋药物化学。Email: zhanglixin01@sina.com

收稿日期: 2002-09-10; 修回日期: 2002-01-15

表 1 21 种海洋无脊椎动物来源

Tab.1 The names and resources of the 21 inveterbrate species

编号	样品名称	采样时间(年.月)	采样地点
腔肠动物门 Coelenterata			
水螅纲 Hydrozoa			
1	海筒螅 <i>Tubularia marina</i> Torrey	2001.8	青岛石老人
2	桧叶螅 <i>Sertularella</i> sp.	2000.11	山东莱州
珊瑚纲 Anthozoa			
3	侧花海葵 <i>Anthopleura</i> sp.	2001.12	青岛汇泉角
苔藓动物门 Bryozoa			
裸唇纲 Gymnolaemata			
4	大室膜孔苔虫 <i>Membranipora grandecella</i>	2000.11	山东莱州
棘皮动物门 Echinodermata			
海星纲 Asteroidea			
5	罗氏海盘车 <i>Asterias rollestoni</i>	2001.12	青岛汇泉角
6	海燕 <i>Asterina pectinifera</i>	2001.12	青岛汇泉角
海胆纲 Echinoidea			
7	海刺猬 <i>Glyptocidaris crenularis</i>	2001.12	青岛
海参纲 Holothuroidea			
8	刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	2001.12	青岛
环节动物门 Annelida			
多毛纲 Polychaeta			
9	双齿围沙蚕 <i>Perinereis aibuhitensis</i>	2001.12	青岛
10	岩虫 <i>Marphysa sanguinea</i>	2001.12	青岛
软体动物门 Mollusca			
多板纲 Polyplacophora			
11	红条毛肤石鳖 <i>Acanthochiton rubrolineatus</i>	2001.12	青岛
瓣鳃纲 Lamellibranchia			
12	菲律宾蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i>	2001.12	青岛
13	毛蚶 <i>Scapharca subcrenata</i>	2001.12	青岛
14	文蛤 <i>Meretrix meretrix</i>	2001.12	青岛
腹足纲 Gastropoda			
15	脉红螺 <i>Rapana venosa</i>	2001.12	青岛
16	疣荔枝螺 <i>Thais clavigera</i>	2001.12	青岛
17	广大扁玉螺 <i>Neverita ampla</i>	2001.12	青岛
18	虫家虫威 <i>Cellana toreuma</i>	2001.12	青岛燕儿岛
螭门 Echiura			
螭纲 Echiurida			
19	螭虫 <i>Echiuroroida</i> sp.	2001.12	青岛
节肢动物门 Arthropoda			
蔓足纲 Cirripedia			
20	白脊藤壶 <i>Balanus albicostatus</i>	2000.11	山东莱州
尾索动物亚门 Urochordata			
海鞘纲 Ascidiacea			
21	柄海鞘 <i>Styela clava</i>	2001.12	青岛汇泉角

1.2.3 抗肿瘤活性筛选方法

筛选采用 96 孔平板作微培养, 用 MTT 法^[7]观察细胞的杀伤或生长抑制。MTT 分析法是以代谢还原

3-(4, 5-dimethylthiazol-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)为基础。活细胞的线粒体中存在与 NADP 相关的脱氢酶, 可将黄色的 MTT 还原为不溶性的蓝紫色

的 Formazan, 而死细胞此酶消失, MIT 不被还原, 用 DMSO 溶解 Formazan 后, 可用酶标仪在 570 nm 波长处检测光密度。

具体操作方法是: 按不同肿瘤生长速率, 将一定数量处于对数生长期的肿瘤细胞 90 μL/孔接种于 96 孔微量培养板内, 培养 24 h 后加入样品液 10 μL/孔, 对每个细胞株, 每个浓度均为 3 个复孔。另设无细胞调零孔, 如果样品液有颜色要做相应浓度无细胞调零孔。肿瘤细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h 后, 加 5 mg/mL MIT 液(用生理盐水配制)20 μL/孔; 继续培养 4 h 后, 加入三联液 (10% SDS-5% 异丁醇-0.01

mol/LHCl) 50 μL/孔, 于 CO₂ 培养箱中过夜, 然后用酶标仪在 570 nm 波长处检测光密度 OD。按下列公式计算样品液对癌细胞生长的抑制率:

$$\text{肿瘤抑制率} = (\text{对照组 OD 值} - \text{样品组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100\%$$

2 结果与讨论

各种海洋无脊椎动物提取物对人白血病细胞 HL-60 和人肺腺癌细胞 A-549 的抑制率见表 2。每种样品共测试了 5 个浓度。

由表 2 中数据可见, 海燕 *Asterina pectinifera* 的正

表 2 样品对肿瘤细胞生长的抑制率 (%)

Tab.2 Inhibition effects on tumor cell HL-60 and A-549

编号	溶剂	HL-60					A-549				
		样品浓度(mg/mL)					样品浓度(mg/mL)				
		1	0.25	0.063	0.016	0.0039	1	0.25	0.063	0.016	0.0039
1	石油醚	99.6	97.2	35.3	18.9	12.6	75.6	81.0	0	0	0
	乙酸乙酯	93.0	9.9	63.9	14.9	7.9	56.2	74.6	65.4	0	0
	水	99.9	29.5	0	0	0	70.0	60.6	0	0	0
2	94%乙醇	100	60.4	0	0	0	77.2	71.0	0	0	0
3	94%乙醇	98.0	90.0	0	0	0	75.3	83.8	0	0	0
4	94%乙醇	97.4	93.9	34.8	19.0	7.1	65.7	79.0	25.0	0	0
5	石油醚	95.4	99.4	47.8	0	0	78.0	83.3	33.7	0	0
	乙酸乙酯	100	100	21.7	2.9	2.9	65.7	73.3	0	0	0
	正丁醇	100	100	14.4	0	0	78.5	66.5	1.1	18.2	0
	水	100	57.1	0	0	0	65.2	54.2	7.6	15.7	0
6	石油醚	100	100	14.4	0	0	72.0	71.2	18.5	0	0
	乙酸乙酯	94.8	97.5	0	0	0	76.4	78.3	0	0	0
	正丁醇	100	100	96.7	9.3	7.7	67.0	78.8	46.0	0	0
7	水	97.0	52.9	0	0	0	80.6	74.2	0	0	0
	94%乙醇(壳棘部分)	99.9	11.0	0	0	0	88.1	80.6	0	0	0
	94%乙醇(内脏部分)	95.9	100	0	0	0	95.3	91.5	0	0	0
8	94%乙醇	100	56.9	0	0	0	79.0	77.3	6.4	0.7	0.9
9	94%乙醇	61.3	98.1	20.7	0	0	86.4	80.0	0	0	0
10	94%乙醇	99.1	83.4	4.2	8.4	19.1	91.3	82.8	0	0	0
11	94%乙醇	97.0	100	50.5	26.9	0	81.9	87.3	0	0	0
12	94%乙醇	96.8	100	0	0	0	82.8	84.0	0	0	0
13	94%乙醇	94.7	99.0	31.0	0	0	85.1	86.4	0	0	0
14	94%乙醇	88.5	42.1	0	0	0	73.0	62.7	3.3	12.1	0
15	94%乙醇	97.8	91.6	0	0	0	82.3	81.7	0	0	0
16	94%乙醇	97.9	94.5	9.5	2.3	0	86.0	79.1	0	0	0
17	94%乙醇	98.9	72.3	0	0	0	86.4	64.2	0	0	0
18	94%乙醇	100	35.8	0	0	0	96.3	89.0	17.5	0	0
19	94%乙醇	90.5	97.1	0	0	0	83.1	86.1	0	0	0
20	94%乙醇	100	44.9	0	0	0	71.1	71.1	0	0	0
21	94%乙醇	95.3	99.9	37.5	0.9	2.4	78.3	78.5	0	0	0

丁醇萃取物、海筒蛄 *Tubularia marina* Torrey 的乙酸乙酯萃取物、红条毛肤石鳖 *Acanthochiton rubrolineatus* 的 94% 的乙醇提取物对 HL-60 的抑制作用很强, 在浓度为 0.063 mg/mL 时抑制率分别为 96.7%、63.9%、50.5%。另外, 罗氏海盘车 *Asterias rollestoni* 的乙酸乙酯萃取物、海筒蛄的石油醚萃取物和大室膜孔苔虫 *Membranipora grandecella*、岩虫 *Marphysa sanguinea*、柄海鞘 *Styela clava* 的 94% 乙醇提取液也对 HL-60 具有较好的抗肿瘤效果。

本次所做的 21 种海洋无脊椎动物粗提物对 A-549 的抑制活性比对 HL-60 的活性普遍要差一些。只有海筒蛄的乙酸乙酯萃取物对 A-549 的抑制率较高, 浓度为 0.063 mg/mL 时的抑制率可以达到 65.4%, 另外, 海燕 *Asterina pectinifera* 的石油醚和正丁醇萃取物、罗氏海盘车 *Asterias rollestoni* 的石油醚、正丁醇和水溶性部分、大室膜孔苔虫 *Membranipora grandecella*、刺参 *Apostichopus japonicus*、文蛤 *Meretrix meretrix* 和虫象虫 *Cellana toreuma* 的 94% 乙醇提取物也具有一定的抑制活性。

作者发现, 在 21 种海洋无脊椎动物中, 海燕的抗肿瘤活性是最突出的。其正丁醇萃取物对两种供试的肿瘤细胞均有较强的抑制活性, 浓度为 0.063 mg/mL 时的抑制率分别为 96.7% 和 46.0%。海燕为海生底栖动物, 属于棘皮动物门海星纲, 近年来, 有关海星纲无脊椎动物活性成分的研究日益受到国内外的关注, 已相继获得了十几类化合物, 包括海星皂甙、甾醇、氨基酸、多肽、多糖等十分值得注意的生物活性物质。它们具有抗癌、抗病毒、抗炎和抑菌等很多作用^[8]。Choi^[9]发现, 海燕甲醇提取物有较强的抗真菌活性。对于山东沿海的海燕, 郭承华^[10]等人曾研究其总皂甙的含量(0.05%), 并测定了总皂甙的溶血活性。我们可以在抗肿瘤活性跟踪的基础上, 进一步对海燕的活性成分进行提取分离, 希望最终能够发现对肿瘤细胞高活性的先导化合物。

由国际海洋生物活性物质研究的成功经验可以看出, 对海洋生物进行较大规模筛选是发现特有活性品种的关键。本研究工作所涉及的 21 种海洋无脊椎动物均为青岛及其附近海域十分常见的品种, 生物量都十分可观。例如大室膜孔苔虫和海筒蛄, 常常生长在养殖海产品的架子上, 作为有害的物质除去, 而从本次活性筛选结果可以看出, 这两种无脊椎动物对 HL-60 和 A-549 这两种肿瘤细胞均有较强的活性, 可以进一步的对它们的提取物进行分离, 从而确定产生

此活性的纯的单一化合物或几个化合物, 为发现新的海洋药物奠定基础。

对 HL-60 有较好活性的岩虫, 在青岛地区也是十分常见的一种无脊椎动物, 属于环节动物门多毛纲, 俗称“扁食”, 是广大钓鱼爱好者常用的一种鱼饵料, 产量十分可观, 对其活性成分进行研究也有很大的意义。

总之, 通过对这些动物的提取物和不同极性部位进行抗肿瘤活性筛选, 可以掌握它们的生物活性和活性部位, 为进一步地对这些动物进行研究和开发提供数据基础。

致谢: 衷心感谢海洋生物分类专家张素平、黄修明、廖玉麟、裴祖南、孙道元和唐质灿老师对生物样品的鉴定。

参考文献

- 1 Faulkner D J. Marine nature products. Nat Prod Rep, 1984, 1:251-280
- 2 Kraft A S, Woodley S, Pettit G R, et al. Comparison of the antitumor activity of bryostatins 1, 5, and 8, Cancer Chemother Pharmacol, 1996, 37(3):271-278
- 3 Mohammad R M, Varterasean M L, Almatchy V P, et al. Successful treatment 9 of human chronic lymphocytic leukemia xenografts with combination biological agents auristatin PE and bryostatin 1. Clin Cancer Res, 1998, 4(5):1 337-1 343
- 4 Murray J T, Kathleen A S, Jacqueline B, et al. In Vitro and In Vivo anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of Halichondrin B. Cancer Res, 2001, 61(3): 1 013-1 021
- 5 Bai R, Pettit G R, Hamel E. Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal. Inhibition of tubulin polymerization mediated through the vinca alkaloid binding domain. Biochem Pharmacol, 1990, 39(12): 1 941-1 949
- 6 杨德渐, 王永良. 中国北部海洋无脊椎动物. 北京: 高等教育出版社, 1996. 1-16
- 7 韩 锐主编. 肿瘤化学预防及药物治疗. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1991. 16
- 8 周 鹏, 顾谦群, 王长云. 海星皂甙及其他活性成分研究概况. 海洋科学, 2000, 24(2):35
- 9 Choi D H, Shin S, Park I K. Characterization of antimicrobial agents extracted from *Asterina pectinifera*. Int J Antimicrob Agents, 1999, 11(1):65-68
- 10 郭承华, 曹建国, 宁黔冀. 罗氏海盘车、海燕、金氏真蛇尾皂甙的制备及性质鉴定比较. 中国海洋药物, 2000, 4:28

研究报告 *REPORTS*

ANTICANCER ACTIVITY OF 21 MARINE INVERTEBRATE SPECIES

ZHANG Li-Xin FAN Xiao LI Xian-Cui

(*Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Received: Sep., 10, 2002

Key Words: Marine invertebrate, Anticancer, MIT

Abstract

The anticancer activity of 21 marine invertebrate species which are common near Qingdao seashore was determined by MIT method. It was found that the n-butanol part of *Asterina pectinifera*, the acetic ether part of *Tubuarina marina* Torrey, 94% ethanol extract of *Acanthochiton rubrolineatus* have much stronger inhibition rates on tumor cell HL-60, which are 96.7%, 63.9% and 50.5% respectively in the concentration of 0.063mg/mL. The inhibition rate of the acetic ether part of *Tubuarina marina* Torrey on the tumor cell A-549 is 65.4% in the concentration of 0.063 mg/mL.

(本文编辑:张培新)