

海洋微藻的体外抗肿瘤活性初筛*

卢圳域¹ 朱伟明^{1①} 顾谦群^{1①} 刘培培¹

刘茂新¹ 郭健² 管华诗¹

(1. 教育部海洋药物重点实验室 山东省海洋药物重点实验室 中国海洋大学医药学院

青岛 266003; 2. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

提要 采用小鼠乳腺癌细胞株 tsFT210 的细胞周期抑制、细胞凋亡诱导、细胞坏死以及对卤虫的毒性为活性指标,对 48 种海洋微藻的甲醇提取物的抗肿瘤活性进行了筛选。结果表明,以卤虫毒性为活性指标时,9 种海洋微藻显示了不同程度的抗肿瘤活性,以 tsFT210 为筛选模型时,也有 9 种具有抗肿瘤活性,其中 3 种为明显的细胞凋亡诱导活性、2 种为细胞坏死性活性、1 种为 G₂/M 期抑制活性,因此有必要进行开拓海洋微藻药用新资源的研究。

关键词 海洋微藻,抗肿瘤,卤虫毒性,细胞周期抑制,细胞凋亡

中图分类号 Q556.3

海洋微藻是海洋生态系统中的最主要初级生产者,也是海洋生物资源的重要组成部分。目前国外对微藻生物活性物质的研究集中在蓝藻(又称蓝细菌)和甲藻,从中发现了许多具有潜在药用价值的活性次级代谢产物,表现为抗肿瘤、抗病毒和免疫抑制活性。如来源于海洋蓝细菌 *Lyngbya majuscula* 的酰胺类化合物中的 Malyngamides J 表现出良好的细胞毒活性,已被美国国家肿瘤研究中心选择作深入研究(Wu *et al*, 1997)。长链的烯类化合物中的 Curacin A(来源于蓝细菌 *Lyngbya majuscula*)具有强烈的抗微管蛋白活性,能够抑制由谷氨酸盐或微管偶联蛋白诱发的微管集聚(IC₅₀ 1.4μmol/L)(Gerwick *et al*, 1994)。脂肽类物质 Antillatoxin(来源于蓝细菌 *Lyngbya majuscula*)具有很强的鱼毒性(LD₅₀ 0.05 μg/ml)以及 NMDA 受体介导的神经毒性和钠离子通道激动剂活性(EC₅₀ 0.18μmol/L)(Orjala *et al*, 1995);来源于海洋蓝细菌 *Symploca hydroides* 的 Symplostatin 1 在浓度为 1ng/ml 时,可引发 80% 的微管消失(IC₅₀ 为 0.3ng/ml)(Harrigan *et al*, 1998)。我国对微藻活性物质的研究则主要集中于

不饱和脂肪酸(PUFAS)、多糖、蛋白、类胡萝卜素等,而对其他小分子生物活性物质的研究则很少开展。为了开发我国丰富的海洋微藻资源,作者以小鼠乳腺癌 tsFT210 细胞的细胞周期抑制、细胞凋亡诱导、细胞坏死以及对卤虫(*Artemia salina* Leach)的生物毒性为活性筛选指标,研究了 48 种海洋微藻的甲醇提取物的抗肿瘤活性。从中发现了 9 种海洋微藻显示了不同程度的抗肿瘤活性。

1 仪器、材料与方法

1.1 仪器

美国 Coulter 公司 EPICS[®]XL 型流式细胞仪,日本 OLYMPUS 公司 CK40 型相差倒置显微镜,美国 Heraeus 公司 Biofuge fresco 型和 Biofuge primo 型冷冻离心机。

1.2 材料

微藻选自中国海洋大学微藻库,包括 10 株淡水蓝藻、13 株绿藻、11 株硅藻、11 株金藻和 3 株红藻。

卤虫[*Artemia salina* (Leach)]卵购于青岛海泰生物技术有限公司。

* 国家高科技发展计划资助,2003AA624020 号;中国海洋大学科研启动基金资助,2003—2005。卢圳域, E-mail: zhenyulu1981@yahoo.com.cn

① 通讯作者: E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn、guqianq@ouc.edu.cn

收稿日期: 2005-06-22, 收修改稿日期: 2006-04-13

胎牛血清(FBS)为 Hyclone 公司产品, 56℃ 灭活补体后, 于 -20℃ 冰箱中保存备用(Cat. No.STF721)产品; RPMI-1640 细胞培养基为 Gibco 公司产品; 碘化丙啶(PI)为 Sigma 公司产品; Triton X-100 为 Sigma 公司产品、华美生物工程公司分装。

1.3 方法

1.3.1 试剂配制 RPMI-1640 细胞培养液: 取 RPMI Medium 1640, 按标示量(每个包装净重 10.4g)加入 2.0g NaHCO₃、1L 双蒸水, 用磁力搅拌器搅拌至全部溶解后, 用无菌蔡氏(Zeiss)滤器经 0.22 μm 滤膜过滤。滤液分装于无菌玻璃瓶中, 于 4℃ 冰箱中保存备用。细胞培养基使用前, 按体积分数为 10% 比例加入胎牛血清, 轻轻摇匀即可。

PBS(Phosphate-Buffer Saline, pH 7.2)溶液: 取 8g NaCl、0.2g KCl、1.15g Na₂HPO₄、0.02g KH₂PO₄, 加双蒸水 1L 溶解, 于 4℃ 冰箱中保存。

PI 溶液: 取 5mg PI、100mg 柠檬酸钠、200mg Triton X-100, 加水 100ml 溶解, 用锡箔纸包裹避光, 4℃ 冰箱中保存。

1.3.2 供试样品的制备 微藻的培养: 采用 f/2 培养基, 于 25℃、10000 lx 光强条件下, 静置培养 14 天, 每株藻培养 65ml。离心分离, 分成藻体和藻液两部分。

藻体部分: 将藻体于冻干机上冻干 24h, 用适量的甲醇溶解, 超声破碎, 超声提取, 然后离心取上清液旋转蒸干制得藻体样品, 以甲醇为溶剂配成 2mg/ml 的溶液。

藻液部分: 将藻液旋转蒸干, 用乙酸乙酯超声提取, 水洗乙酸乙酯提取液, 乙酸乙酯提取液旋转蒸干。用水饱和的正丁醇萃取水液, 将正丁醇萃取液旋转蒸干, 所得的固体用甲醇转移, 弃去不溶物, 将甲醇液和乙酸乙酯提取物合并, 旋转蒸干得到藻液样品, 以甲醇为溶剂配成 2mg/ml 的溶液。

1.3.3 卤虫毒性测试(Hartl *et al*, 2000) 卤虫孵化: 注入 20—50ml 海水到孵化缸中, 洒少量卤虫卵于有盖一侧, 关上盖并打开日光灯, 24℃

孵化 2 天即可得成熟的卤虫无节幼体, 选取约 48h 健康的卤虫无节幼体供测试用。

样品测试: 将所得藻体提取液, 以甲醇为溶剂配成 2mg/ml 的溶液, 各取 5μl 待测溶液依次加入 96 孔板中, 再加入 200μl 的含卤虫活体的溶液, 24h 后观察、计数存活卤虫。

1.3.4 肿瘤细胞抑制活性测试(Cui *et al*, 2002a, b)

细胞培养: 小鼠乳腺癌温敏型 tsFT210 细胞, 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 在 32℃、通入 5% 二氧化碳的细胞培养箱中传代培养。

样品测试: 取对数生长期的 tsFT210 细胞, 用含 10% FBS 的新鲜 RPMI-1640 培养基配制成 2 × 10⁵ 个/ml 的细胞悬液, 接种到 24 孔板中, 每孔 0.5ml, 置 32℃ 细胞培养箱培养 1h。各孔加 5μl 样品溶液, 留复孔空白对照。在 32℃ 细胞培养箱中培养 17h 后, 首先在倒置显微镜下观察细胞形态, 判断有无细胞凋亡或细胞坏死的形态学变化, 需要时拍摄显微照片。将细胞形态变化不明显的细胞分别转移至 eppendorf 管中, 离心弃去上清液, 加 PBS 缓冲液 0.5ml 清洗细胞 1 次, 离心收集细胞, PI 染色后用流式细胞术检测细胞中 DNA 的含量分布。

2 结果与分析

2.1 卤虫毒性测试结果

在浓度为 2mg/ml 时, 分别测试了 48 种微藻的发酵产物对卤虫的生物毒性, 结果表明: 9 株微藻的藻体样品对卤虫表现出较强的生物毒性(表 1), 占微藻总数的 18.8%。

2.2 细胞镜检结果

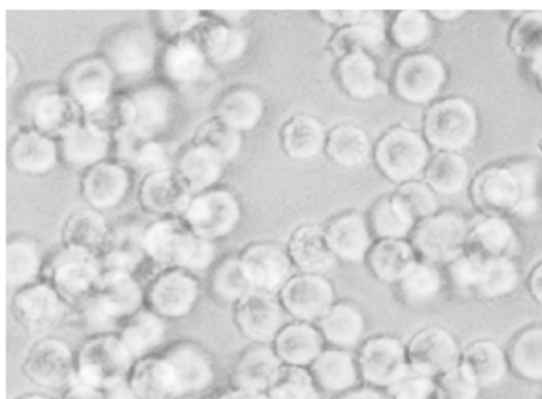
对 48 株微藻的发酵产物(藻体)的甲醇提取物用 tsFT210 细胞进行了体外抗肿瘤活性筛选。给药 17h 后(浓度为 2mg/ml)tsFT210 细胞形态变化的镜检结果表明, 共有 8 株微藻表现出抗肿瘤活性。其中 B132 (*Synedra fragilaroides* Fritsch et Rich)、H38 (*Platychrysis* sp.)、H55 (*Ruttenra spectabilis*)和 C18 (*Pseudostichococcus monallanoides*)为细胞凋亡诱导活性, B177 *Cylindrotheca*

表 1 部分微藻发酵产物(2mg/ml)对卤虫的生物致死活性

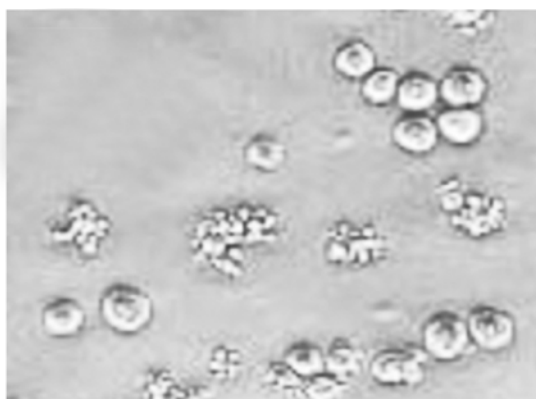
Tab.1 The biotoxicity of the methanol extracts of microalgae against *A. salina* Leach at 2mg/ml

藻株编号	卤虫死亡率(%)	藻株编号	卤虫死亡率(%)	藻株编号	卤虫死亡率(%)
B132(体)	100	B165(体)	86	H29(体)	54
H55(体)	100	B171(体)	85	B129(体)	50
H13(体)	92	B177(体)	64	B156(体)	42

注: 其他微藻样品没有卤虫毒性



空白对照



B-132 (1mg/ml)

图 1 给药 2h 后 tsFT210 细胞的形态变化

Fig.1 Effect on the morphologic change of tsFT210 cells by methanol extracts of *Synedra fragilaroides* B132
左图为空白对照, 右图为 B-132 (1mg/ml)

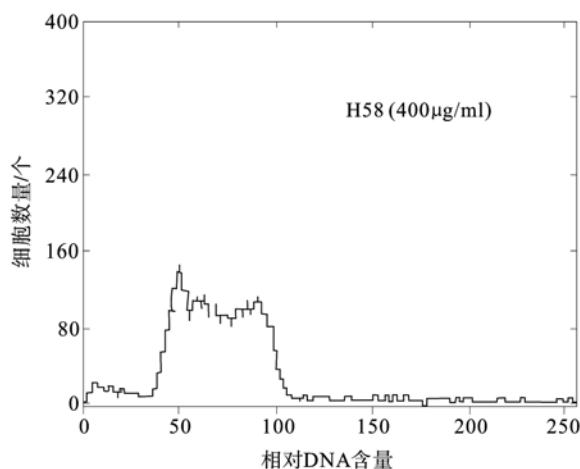
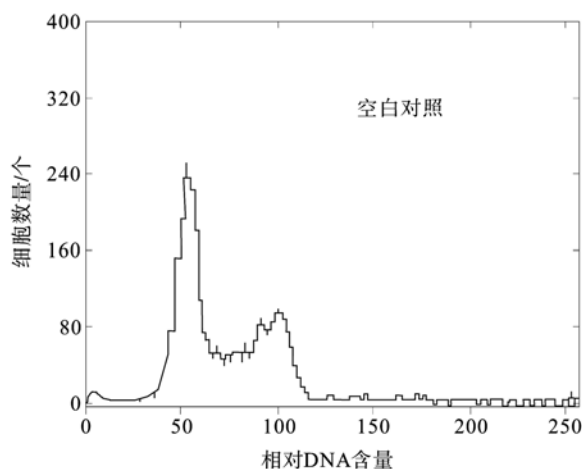


图 2 给药 17h 后 tsFT210 细胞的流式细胞术分析直方图

Fig.2 Flow cytometric histograms of tsFT210 cells treated with methanol extracts of *Cricosphaera* sp. H58 for 17h
左图为空白对照, 右图为 H58 (400μg/ml)

sp.)、H13 (*Cricosphaera gayraliae* Beuffe)、Y335 [*Anabaena inaequalis* (Kütz.) Born et Flah.] 和 B165 (*Cylindrotheca* sp.) 为细胞坏死活性(图 1 为空白对照和 B132 在给药 2h 后的细胞镜检照片)。

2.3 流式细胞术分析

流式细胞术分析表明, 微藻 H58 (*Cricosphaera* sp.) 的甲醇提取物在浓度为 400 μg/ml 时, 对 tsFT210 肿瘤细胞具有一定的 G₂/M 期抑制活性(图 2)。

3 讨论与结语

本文中对 48 株微藻次级代谢产物的体外抗肿瘤活性初步筛选的结果表明, 以卤虫毒性为活性指标时, 有 9 株海洋微藻表现出抗肿瘤活性, 阳性率 18.8%; 再用 tsFT210 癌细胞的细胞周期抑制、细胞凋亡诱导和细胞坏死为活性进行复筛时, 又得到具有抗肿瘤活性的海洋微藻 3 株, 复

筛阳性率 33.3%。单独以对 tsFT210 癌细胞的细胞周期抑制、细胞凋亡诱导和细胞坏死为活性指标进行筛选时, 共有 9 株海洋微藻表现出各种活性的抗肿瘤活性, 其中 1 株为细胞周期抑制活性(占总菌株的 2.1%)、4 株为细胞凋亡诱导活性(占总菌株的 8.3%)、4 株为细胞坏死活性(占总菌株的 8.3%)。这一研究结果表明, 海洋微藻中存在具有抗肿瘤活性的次级代谢产物, 值得深入研究。

参 考 文 献

- Cui C B, Yan S Y, Cai B *et al*, 2002a. Carbazole alkaloids as new cell cycle inhibitor and apoptosis inducers from *Clausena dunniana* Levl. *J Asian Nat Prod Res*, 4(4): 233—241
- Cui C B, Zhao Q, Cai C B *et al*, 2002b. Two new and four known polyphenolics obtained as new cell-cycle inhibitors from *Rubus aleaefolius* Poir. *J Asian Nat Prod Res*, 4(4): 243—252

- Gerwick W H, Proteau P J, Nagle D G *et al*, 1994. Structure of Curacin A, a novel antimitotic, antiproliferative and brine shrimp toxic natural product from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Org Chem*, 59(6): 1243—1245
- Harrigan G G, Luesch H, Yoshida W Y *et al*, 1998. Symplostatin 1: a dolastatin 10 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydroides*. *J Nat Prod*, 61(9): 1075—1077
- Hartl M, Humpf H U, 2000. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, 38(12): 1097—1102
- Orjala J, Nagle D G, Hsu V *et al*, 1995. Antillatoxin: an exceptionally ichthyotoxic cyclic lipopeptide from the tropical cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Am Chem Soc*, 117(31): 8281—8282
- Wu M, Milligan K E, Gerwick W H, 1997. Three new malyngamides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron*, 53(47): 15983—15990

ANTI-TUMOR ACTIVITY SCREENING OF METHANOL EXTRACTS OF MARINE MICROALGAE *IN VITRO*

LU Zhen-Yu¹, ZHU Wei-Ming¹, GU Qian-Qun¹, LIU Pei-Pei¹,
LIU Mao-Xin¹, GUO Jian², GUAN Hua-Shi¹

(1. Key Laboratory of Marine Drug of Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Marine Drug of Shandong Province, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, 266003;

2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Marine microalgae act as an important member in marine biological system with photosynthetic ability as major producers of biomass and organic compounds in the oceans. Many microalgal metabolites have unique structures and are formed in biosynthetic routes quite different from known terrestrial metabolites. These marine metabolites showed potential bioactivities *in vitro* assay, such as anti-tumor, antiviral and immunosuppressive activities. For example, malyngamide J, from marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, has been selected for *in vivo* evaluation by the NCI (National Cancer Institute) because of its unusual cytotoxicity in 60 cell lines and its structural novelty. However, the study on small molecule bioactive metabolites of marine microalgae in China has been unfortunately rare. In order to search for structurally novel and biologically active compounds from rich marine microalgae, 48 strains of marine microalgae were screened for their anti-tumor activities using brine shrimp, *Artemia salina* Leach, and the mouse temperature-sensitive p34^{cdc2} mutant cell line tsFT210. The methanol extract of the mycelium of 9 strains of tested microalgae, *Synedra fragilaroides* B132, *Ruttenra spectabilis* H55, *Cricosphaera gayraliae* H13, *Cylindrotheca* sp. B165, *Cylindrotheca* sp. B171, *Cylindrotheca* sp. B177, *Isochrysis galbana* H29, *Skeletonema costatum* B129 and *Cylindrotheca* sp. B156 showed biotoxicity against *A. salina* at concentration of 2mg/ml, and their lethality was 100%, 100%, 92%, 86%, 85%, 64%, 54%, 50% and 42%, respectively. At 2mg/ml in concentration, the methanol extract from the mycelium of 8 strains in tested microalgae exhibited cytotoxicity against tsFT210 cell, among which *Synedra fragilaroides* B132, *Platychrysis* sp. H38, *Ruttenra spectabilis* H55, and *Pseudostichococcus monallantoides* C18 showed apoptosis inducing activity, and *Cylindrotheca* sp. B177, *Cricosphaera gayraliae* H13, *Anabaena inaequalis* Y335 and *Cylindrotheca* sp. B165 showed necrosis activity, and *Cricosphaera* sp. H58 arrested the cell cycle at G₂/M phase by a flow cytometry. These results revealed that the metabolites of marine microalgae consisted of anti-tumor compounds and the marine microalgae. As a new pharmaceutical resource, further research is needed.

Key words Marine microalgae, Anti-tumor, Brine shrimp toxicity, Cell cycle inhibition, Apoptosis