

海洋苔藓虫中生物活性物质的研究进展*

A REVIEW OF CHEMICAL COMPOSITION AND BIOACTIVITY OF OCEANIC BRYOZOAN

张立新 范晓

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

海洋苔藓虫属真体腔动物,是海洋底栖动物的重要组成部分之一,种类多,分布广,常常形成群体,密布在岩壁、鱼网、船底、浮标等物体上,在海洋污损生物中的出现频率很大。世界上现有苔藓虫 5 000 多种,中国海估计有 700 多种。其中,总合草苔虫(*Bugula neritina* Linnaeus, 又称多室草苔虫)除南北极外,广泛地生息在世界各个海域中,该群体为紫褐色或褐色,幼年时呈扇形,老熟后似草丛,常常长到 10 cm 以上,每只有个虫两列,交互排列。

1982 年,美国亚里桑那州立大学 Pettit 研究小组成功地从采集于加利福尼亚海域的总合草苔虫中分离得到第一个具有抗癌活性的单体 bryostatin 1,并用质谱、X 射线衍射等方法确定了它的结构是大环内酯类化合物。在体外试验中,对 P388 淋巴细胞白血病细胞株具有一定的活性(ED_{50} 为 0.89 $\mu\text{g/ml}$),而在体内试验中,以 10~70 mg/kg 剂量给药,其延长寿命率达 52%~92%。至今为止,该小组已从此苔藓虫中得到 18 个活性单体(bryostatin 1~bryostatin 18),其中 bryostatin 1 和 bryostatin 4 经美国国立癌症研究院(NCI)的生物鉴定,已进入 II 期临床试验。另外,我国第二军医大学药学院林厚文等也已从中国南海总合草苔虫中分离提取到 bryostatin 19 等活性物质,并对其抗肿瘤活性作了一些初步的试验。

对于苔藓虫中的生物碱成分的研究,文献报道也很多,有些含溴生物碱有较强的抑菌能力。本文主要对苔藓虫化学成分的提取分离鉴定方法以及生物活性加以概述。

1 bryostatin 类化合物

1.1 提取分离鉴定方法

Pettit 研究小组将采集于加利福尼亚太平洋蒙特内海湾的总合草苔虫的 CH_2Cl_2 提取物经生物鉴定指标跟踪,采用硅胶、Sephadex LH20 等各种柱层析反复

分离精制,得到第一个具有生物活性的结晶 bryostatin 1,并用 IR、MS、NMR 等方法鉴定了其结构。

bryostatin 类化合物是脂溶性化合物,新鲜采集的标本容易腐烂变质,通常将新鲜的动物浸泡在异丙醇溶液中保存,可存放 30 个月。因为 bryostatin 类化合物的分离是采用活性追踪的方法,如何将提取物中的非活性部分除去,寻找其活性最强部分,研究者对其做了长时间的努力。Pettit 研究小组摸索出了一套行之有效的办法。至 1996 年,Pettit 小组已从 *B. neritina* 中分离提取到 18 种 bryostatin 类化合物,结构见图 1 及表 1。

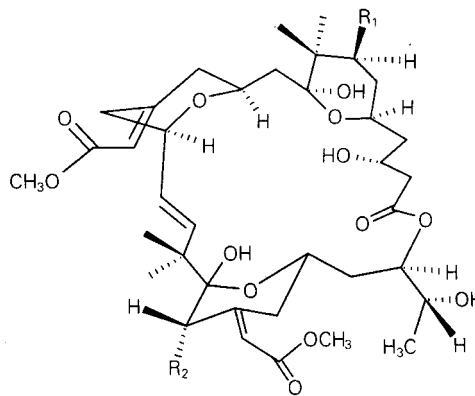


图 1 Bryostatin 类化合物的结构

* 国家 863 计划资助项目 AA620403 号。

第一作者:张立新,出生于 1968 年,青岛大学化学系副教授,博士在读,研究方向:海洋药物化学。E-mail:zhanglixin01@sina.com

收稿日期:2001-08-27;修回日期:2002-04-26

表 1 Bryostatin 类化合物的结构

bryostatins	R	R _c
1	OCOCH ₃	OCOCH = CHCH = CH ₂ CH ₂ CH ₃
2	OH	OCOCH = CHCH = CH ₂ CH ₂ CH ₃
3 ¹⁾	OCOCH ₃	OCOCH = CHCH = CH ₂ CH ₂ CH ₃
4	OCO(CH ₃) ₃	OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃
5	OCO(CH ₃) ₃	OCOCH ₃
6	OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃	OCOCH ₃
7	OCOCH ₃	OCOCH ₃
8	OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃	OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃
9	OCOCH ₃	OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃
10	OCO(CH ₃) ₃	H
11	OCOCH ₃	H
12	OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃	OCOCH = CHCH = CH ₂ CH ₂ CH ₃
13	OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃	H
14	OCO(CH ₃) ₃	OH
15	OCOCH ₃	OCOCH = CHCH = CH ₂ CH ₂ CH ₃
16 ²⁾	OCO(CH ₃) ₃	H
17 ³⁾	OCO(CH ₃) ₃	H
18	OCO(CH ₃) ₃	H
19 ⁴⁾	OCO(CH ₃) ₃	OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃

¹⁾ 19 位羟基与 21 位侧链形成六元环内酯; ²⁾ 19 位无羟基; ³⁾ 19 位无羟基, 且与 bryostatin 16 的 35 位构型不同; ⁴⁾ 35 位与 22 位形成五元环内酯。

Pettit 小组还用此法从苔藓虫 *Amthia concoluta* 中分离提取到 bryostatin 4, 5, 6, 8, 并讨论了它们的来源, 认为 bryostatin 4, 5, 6 的存在可能是因为与 *B. neritina* 共存造成的, 而 bryostatin 8 是 *A. concoluta* 本身含有的。

Bryostatin 19 是林厚文等^[1]自我国南海采集的总合草苔虫中经多种层析方法分离鉴定的一种新的大环内酯类化合物, 体外抗癌活性试验表明, 该化合物对 L1937 单核细胞白血病细胞株有极强的杀灭作用 (ED₅₀ = 2.8 × 10⁻⁵ μg/ml), 同时对 HL-60 早幼粒白血病和 K562 红白细胞白血病等细胞株均有显著的抑制作用。

另外, 林厚文等^[2]在进行总活性成分抗癌活性试验时, 此苔藓虫内酯的混合物对人红白细胞白血病细胞株 K562 有超强杀灭作用 (ED₅₀ < 10⁻⁸ μg/ml), 比单体内酯强 10¹⁵ 倍。其机理尚不清楚。

1.2 生物活性研究

1.2.1 抗肿瘤活性

Pettit 最初发现 *B. neritina* 的抗肿瘤活性是它的粗提物对 P388 淋巴瘤白血病细胞株具有活性。之后, 通过大量体内体外试验, 人们陆续发现 bryostatin 类化合物 (主要为 bryostatin 1) 对许多肿瘤都有活性 (见表 2)。

表 2 Bryostatin 1 所抗肿瘤类型

肿瘤类型	文南出处
人 B16 黑色素瘤小鼠转移模型	Schuchter (1991)
人非何杰金氏 B 淋巴细胞瘤细胞株	Mahmoud (1993)
人弥散型大细胞淋巴瘤细胞株 WSJDLCL2	Mahmoud ^[3]
鼠黑色素瘤 K1735-ML	Kraft ^[4]
人 B 细胞慢性淋巴细胞白血病	Mahmoud ^[5]
人慢性髓性白血病	Thijssen ^[6]

bryostatin 1 的抗肿瘤机理是非常复杂的。首先, Bryostatin 1 的抗肿瘤活性与蛋白激酶 C (Protein ki-

nase-C, PKC) 的作用密切相关。PKC 是传递各种细胞信息的重要酶, 其对生长因子、激素以及某些外源性

物质通过对蛋白质的磷酸化而起作用,以此影响细胞的生长、分化及其它功能。bryostatin 1 能与 PKC 结合并激活 PKC,从而抑制佛波酯(TPA),诱导人白血病细胞的分化。另外 bryostatin 1 对 PKC 还有部分拮抗活性。

bryostatin 1 还可以诱导人白血病细胞株 THP1 细胞的单细胞分化,这是通过作用于蛋白酪氨酸激酶(PTK)而实现的^[7]。Jarvis^[8]指出,肿瘤细胞的生存由促凋亡作用和抗凋亡作用的标志物决定,值得注意的是,抗凋亡作用的标志物是 PKC 同工酶系,而 bryostatin 1 抑制非肿瘤促进的 PKC 的活性,可以用于肿瘤的慢性治疗。Wall^[9]发现,bryostatin 1 可以诱导人急性淋巴细胞白血病细胞株 BCL2 中辅酶 R 和蛋白酶的降解,另外,还可以降低 BLC2 细胞中 mRNA 的表达,从而起到抗肿瘤作用。

1.2.2 免疫促进作用

除细胞毒作用外,bryostatin 1 的免疫促进作用也是很有意义的,它能激活免疫系统杀死恶性肿瘤细胞。bryostatin 1 可以刺激肌体释放白细胞间素-2(IL-2),在钙离子载体的存在下,bryostatin 1 可以引起 T 细胞增殖。与 IL-2 联合用药,有更好的抗肿瘤效果。bryostatin 1 可以激活多形核中性白细胞和单核细胞氧化代谢,从而有抗肿瘤活性,可以激活依赖于磷酸脂的 PKC,而不激活依赖 cGMP 或 cAMP 的 PKC^[10]。另外,bryostatin 1,2,5 均有免疫刺激作用(对人嗜碱性细胞和组织巨细胞进行作用),释放组胺能力是 TPA 的 30 倍^[11]。

May 发现,bryostatin 1 可以促进造血祖细胞生长,激活中性粒细胞。bryostatin 1 既有抗肿瘤活性又有促进造血的活性,此种双重作用具有重要的临床价值。在化疗药物中,迄今尚无具此双重性的药物,对 bryostatin 1 的深入研究,不仅有助于阐明某些生物学的基本理论,而且可望开发出一种具有双重作用的化疗药物。在临床治疗上,对癌症患者处于骨髓衰竭状态的治疗几乎是束手无策的,bryostatin 1 的深化研究为此类患者的治疗开拓了新的途径。

1.3 I 期和 II 期临床研究

Prendiville 对 bryostatin 1 的 I 期临床研究中,对 19 个晚期癌症病人静脉给药 1 h,每两周一次,连续 3 个疗程,剂量 5 ~ 65 mg/m²,发现最大耐受剂量为 50 mg/m²,肌肉痛是最大的限制剂量的副作用。剂量

50 mg/m² 以上则引起蜂窝组织炎和血栓性静脉炎,这有可能是 60% 的乙醇稀释造成的。65 mg/m² 剂量 24 h 以内可引起血小板、白细胞、中性粒细胞和淋巴细胞记数降低,但并没出现出血现象,剂量降低和停药后均可缓解。

为了解 bryostatin 1 如何能在临床更好地作为抗肿瘤药物,Zhang^[12]以 C₂₆-³H- 标记的 bryostatin 1 用小鼠做试验,研究了 bryostatin 1 的药物动力学,给进一步的临床试验奠定了基础。

Bryostatin 1 临床用药的主要的副作用是肌肉痛、关节痛和短暂的血小板降低,但剂量减小后可显著缓解^[4]。另外,bryostatin 1 还有一定的肾毒性^[13]。

Varterasian^[14]对患有复发的低级非何杰金淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的 25 位病人作临床 II 期试验,静脉连续给药 72 h,每 2 周进行一次,发现有一例完全缓解,两例部分缓解,与长春新碱联合用药,效果有显著提高,二药有明显的协同作用。在 bryostatin 1 的临床研究中,很多人都发现它与其它抗癌药物联合用药效果比较明显^[15]。

2 生物碱类化合物

1980 年 Carle 从苔藓虫 *Flustm phiacea* 中分离并鉴定了两种含溴生物碱 flustramine A 和 B,二者为同分异构体(图 2 之 1、2)。1981 年 Carle 又从此苔藓虫中提取分离到生物碱 flustramine C 以及 flustraminol A 和 B(图 2 之 3、4、5)。Wulff 在 *F. phiacea* 中提取分离到 flustramide A 和 6-溴-N-甲基-formyltryptamine。Ayo Sato 将冷冻干燥的苔藓虫 *Zoobotryon weticillatum* 除脂后用乙酸乙酯抽提,经硅胶柱和中压硅胶柱分离后,得到两种含溴生物碱(图 2 之 6、7)。Morris^[16]从 *Amthia wilsoni* 中分离到 6 个新的二溴代生物碱 amthaspiramides A-F。Hashima^[17]从苔藓虫 *Amthia corvoluta* 中分离得到新型 2,4,6-三溴-3-甲氧-苯乙胺类生物碱 convolutamines 和 lutamides,并研究了它们的合成,还发现它们对 P388 和 KB 细胞均有活性。另外,还曾从 *Cnricellina cnbrania* 和 *Catericella cnbrania* 中得到过 β-咪啉类生物碱,并且具有一定的细胞毒活性和抑菌活性。

总之,海洋苔藓虫中含有许多种含溴生物碱,具有一定的抑菌作用,若能进一步深入研究,可望发现苔藓虫新的应用领域。

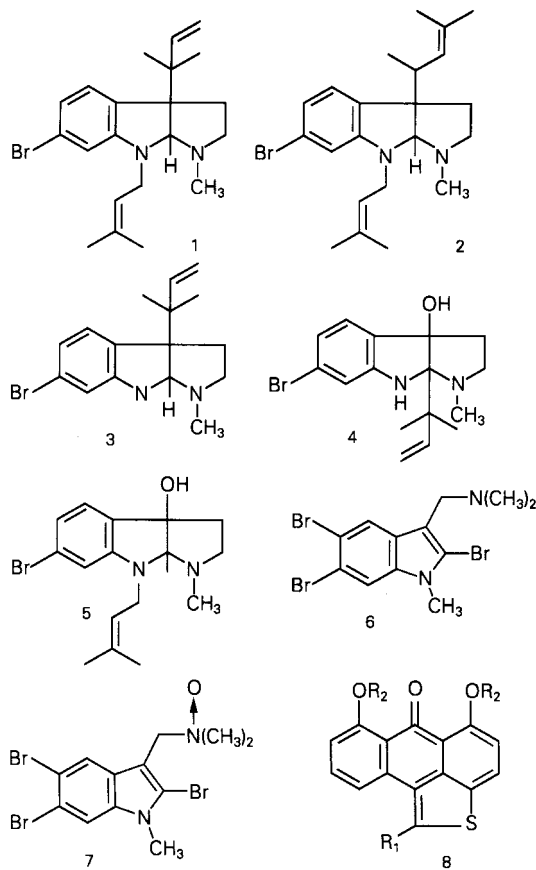


图 2 生物碱及其它化合物的结构

3 其它化学成分

除 bryostatin 类和生物碱类化合物外,海洋苔藓虫中其他化学成分的研究也有许多报道。Shindo 从日本海湾养殖珍珠的器具上采集到苔藓虫 *Dalain subowidea*, 将其在室温下用甲醇提取, 然后用层析法将其脂溶性部分进行分离, 得到一纯净化合物 5, 7-二羟基-1-羟甲基-6-O-6H-蒽并[1,9-bc]噻吩(图 2 之 8), 同时得到两个此化合物的衍生物。6H-蒽并[1,9-bc]噻吩环系虽然曾被合成作为染料, 但在自然界中是第一次发现。Shindo 发现这 3 种化合物对小鼠肝微粒体脂质过氧化物形成均有较强的抑制作用, 这对于抗氧化物质研究很有意义。

Yu^[18] 从苔藓虫 *Dendrobeatia nurnyana* 中分离到一种特殊的 21 碳骨架的四环萜内酯 Mirrayanlide。Lee^[19] 从大西洋苔藓虫 *Anathia altemata* 中分离得到 4 种溴代色胺肽抗生素, 发现它对许多种 G⁺ 菌有抑制

作用。Kerr^[20] 分离并测定了 *Bugula neritina* 中的甾醇, 主要甾醇是胆固醇, C₂₈、C₂₉ 和 C₃₀ 甾醇含量很少, 其中胆固醇是体内合成的, 其它甾醇都是以食物为来源的。

海洋苔藓虫是一类种属很多的海洋低等动物, 我国自渤海至南海均有分布, 研究其中的具有抗肿瘤或抑菌等活性的成分, 是海洋天然产物研究的十分重要的一个部分。

参考文献

- 林厚文, 易杨华, 李文林等. 中国南海总合草苔虫中的抗癌活性成分 Bryostatin 19, 中国海洋药物, 1998, 1:1~3
- 林厚文, 易杨华, 姚新生等. 中国南海总合草苔虫抗癌活性成分研究 II 总草苔虫内酯的超强抗癌活性, 中国海洋药物, 2000, 2:1~3
- Mohammad R. M., Diwakaran H., Maki A. et al. . Bryostatin 1 induces apoptosis and augments inhibitory effects of vincristine in human diffuse large cell lymphoma, *Leuk. Res.*, 1995, 19(9):667~673
- 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):271~178
- Mohammad R. M., Varterasean M. L., Almatchy V. P. et al. . Successful treatment of human chronic lymphocytic leukemia xenografts with combination biological agents auristatin PE and bryostatin 1, *Clin. Cancer Res.*, 1998, 4(5):1337~1343
- Thijssen S. F., Schuurhuis G. J., van Oostveen J. W. et al. . Effects of bryostatin 1 on chronic myeloid leukemia derived hematopoietic progenitors, *Br. J. Cancer*, 1999, 79(9~10):1406~1412
- Li Y., Mohammad R. M., Al-Katib A. et al. . Bryostatin 1 induced monocytic differentiation in THP1 human leukemia cells is associated with enhanced c-fyn tyrosine kinase and MCSF receptors, *Leuk. Res.*, 1997, 21(5):391~397
- Jarvis W. D., Grant S. . Protein kinase C targeting in antineoplastic treatment strategies, *Invest New Drugs*, 1999, 17(3):227~240
- Wall N. R., Mohammad R. M., Reddy K. B. et al. . Bryostatin 1 induces ubiquitination and proteasome degradation of Bcl-2 in the human acute lymphoblastic leukemia cell line, *Int. J. Mol. Med.*, 2000, 5(2):165~171
- Esa A. H., Warren J. T., Hess A. D. et al. . Bryostatins trigger human polymorphonuclear neutrophil and monocyte oxidative metabolism: association with in vitro antineoplastic activity, *Immunol. Res.*, 1995, 14(6):351~361

- 11 Patella V., Casolaro V., Ciccarelly A. *et al* . . The antineoplastic bryostatins affect human basophils and mast cells differently, *Blood*, 1995, **85**(5) : 1 272 ~ 1 281
- 12 Zhang X., Zhang R., Zhao H. *et al* . . Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent bryostatin 1, an activator of protein kinase C, *Cancer Res.*, 1996, **56**(4) :802 ~ 808
- 13 Gescher A., Modulators of signal transduction ad cancer chemotherapeutic agents-novel mechanisms and toxicities, *Toxicol. Lett.*, 1995, 82 ~ 83 :159 ~ 165
- 14 Varterasian M. L., Mohammad R. M., Shurafa M. S. *et at* . . Phase II trial of bryostatin 1 in patients with relapsed low grade non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**(3) : 825 ~ 828
- 15 Ahmad I., Al-Katib A. M., Beck F. W. *et al* . . Sequential treatment of a resistant chronic lymphocytic leukemia patient with bryostatin 1 followed by 2-chlorodeoxyadenosine : case report, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**(4) :1 328 ~ 1 332
- 16 Morris B. D., Prinsep M. R. . Amathaspiramides A-F, novel brominated alkaloids from the marine bryozoan *Anathia wilsoni*, *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**(5) :688 ~ 693
- 17 Hashima H., Hayashi M., Kamano Y. *et al* . . Synthesis and biological activities of the marine bryozoan alkaloids convolutamides A, C and F, and lutamides A and C, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, **8**(7) :1 757 ~ 1 766
- 18 Yu C. M., Wright J. T., Murrayanotide, an unusual C21 tetracyclic terpenoid lactone from the marine bryozoan *Dendrobeania murrayana* *J. Nat. prod.*, 1995, **58**(12) : 1 978 ~ 1 982
- 19 Lee N. K., Fenical W., Lindquist N. . Alternatamides A-D: new bromotryptamine peptide antibiotics from the Atlantic marine bryozoan *Anathia alternata*, *J. Nat. Prod.*, 1997, **60**(7) :697 ~ 699
- 20 Kerr R. G., Vicchiarelli R., Kerr S. S. . Identification and biosynthetic origins of sterols in the marine bryozoan *bugula neritina*, *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**(3) :468 ~ 470