

海洋生物抗肿瘤活性肽*

ANTINEOPLASTIC PEPTIDES FROM MARINE ORGANISMS

林凡^{1,2} 秦松¹

(¹ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(² 中国科学院研究生院 北京 100039)

海洋未被利用的有效面积约为陆地的 5~10 倍,海洋生物中 99% 的物种尚未被利用,随着现代生物技术和化学技术的应用,反相高效液相色谱、FAB-MS、2D-NMR、手性色谱等技术的发展,近年来对海洋生物活性肽,特别是抗肿瘤活性肽的研究取得了很大进展,本文将予以综述,并展望开发利用的前景。

1 抗肿瘤活性肽的来源

1.1 海藻

藻类是海洋生物活性物质的重要来源。在已发现的海洋生物活性物质中 40.86% 来自藻类^[1],而其它海洋生物中发现的活性物质有可能最初也来源于藻类。如最初从海绵(*Halichondria odadai*)中分离出的大田软海绵酸(okadaic acid)的真正来源是与海绵共生的利马原甲藻(*Pilocentrum lima*)。

伪枝藻科(*Scytonema mataceae*)藻类提供了多种细胞毒素,其中许多具有抗肿瘤活性。如从奇异伪枝藻(*Scytonema nimbile*)BY8-1 藻株中分离出 38 种生物活性物质,其中有 24 种修饰多肽具有抗肿瘤活性,它们对 KB 细胞的 IC_{50} 为 0.01~10 mg/L。Patterson 等 1994 年从伪枝藻(*Scytonema pseudohummi*)中提取的 Scytophycin B,是一种结构特殊的多肽类大环内脂化合物,对体外培养的 KB 细胞、大鼠 $B_{6}H$ 白血病细胞和 Lewis 肺癌细胞具有强烈抑制作用。其作用机制是通过阻止 P 球蛋白的形成从而有效抑制肿瘤细胞增殖。在筒孢藻(*Cylindrocapsa sp.*)中也发现了 Scytophycin B 和 Scytophycin E 等,对 KB 细胞的 IC_{50} 为 2~10 mg/L。

Cryptophycins 是从念珠藻(*Nostoc sp.*)中提取的一系列多肽,共有 7 种,对小鼠移植的乳癌、卵巢癌、胰腺癌具有强烈抑制活性。其中 Cryptophycin 1 活性最

强,体内试验表明 Cryptophycin 1 对多药物抗性(multi-drug resistance, MDR)的肿瘤细胞系具有良好的活性。而 MDR 是影响肿瘤化疗效果的一个非常重要因素,这预示 Cryptophycin 1 在临床方面将有良好的前景。同时与 Cryptophycin 1 活性相似的 Cryptophycin 8 已被半合成成功^[5]。

Koehn 等人 1992 年从委内瑞拉水域的巨大鞘丝藻(*Lyngbya majuscula*)中分离出两种新颖的脂肽 Microcrodins A 和 B。体外实验显示对小鼠 $B_{6}H$ 白血病细胞有抑制作用, IC_{50} 为 0.4 mg/L。Gerwick 等 1994 年发现取自长尾背肛海兔消化腺中的去溴海兔毒素(Debromoaplysiatoxin)的真正来源也是巨大鞘丝藻。它具有抗白血病活性,对荷 $B_{6}H$ 白血病肿瘤的小鼠生命延长率可达 67%(1.5 g/L)。

在蓝藻、红藻、隐藻和部分甲藻中存在的光合作用天线色素蛋白——藻胆蛋白具有光敏效应,可开发成为光敏剂用于肿瘤的激光治疗。1988 年 Marcos 等与 1995 年蔡心涵分别报道了藻蓝蛋白对小鼠骨髓癌细胞、大肠癌细胞 HR8348 以及 S_{80} 的光动态治疗效果。国外藻胆蛋白已用于皮肤癌、乳腺癌的光动态治疗。

此外来自链丝藻(*Hormidium enteromorphaeoides*)的一种多肽,以及铜藻(*Sargassum horni*)、三角藻(*Sargassum tortile*)、半叶马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)、拳状松藻(*Codium pugniiformis*)、刺松藻(*Codium fragile*)、条纹紫菜(*Porphyra yezoensis*)等藻类的蛋白组分均有一定的抗肿瘤活性。

*国家高技术研究发展计划 2001 AA626040 号。

第一作者:林凡,出生于 1976 年,硕士研究生,青岛市南海路 7 号,中国科学院海洋研究所开放室,266071。E-mail: linfan@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2001-06-13; 修回日期:2002-07-18

1.2 海绵

海绵是最原始的多细胞动物,结构简单,无器官分化。目前发现的海洋生物活性物质中,来自于海绵的占 26.2%,仅次于海藻^[1]。而专利申请所涉及的海

洋生物种类中,海绵一直居于首位。在已公布的海绵活性物质中,抗肿瘤活性肽较多,主要分布于离海绵目、外射海绵目、石海绵目、软海绵目和硬海绵目(详见表 1^[6,7])。

表 1 海绵动物的抗肿瘤活性肽

| 活性肽 | 来源 | 结构 | 抗肿瘤活性 |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---|
| Are nastatin A | <i>Dysidea aeneana</i> | 缩酚肽 | 对 KB 细胞 IC ₅₀ 为 5 ng/L |
| Jaspamide | <i>Jaspis</i> | 环肽 | 对喉上皮组织癌细胞的 IC ₅₀ 为 0.32 mg/L |
| Geodia molidis A, B | <i>Geodia</i> sp. | 环肽 | 对 L ₂₁₀ 细胞 IC ₅₀ 分别为 0.032 与 0.0026 mg/L |
| Geodia molidis C~F | <i>Pseudoxinyssa</i> sp. | 环肽 | 对 L ₂₁₀ 细胞 IC ₅₀ 分别为 0.0025, 0.039, 0.014, 0.006 mg/L |
| Axinastatin 1 | <i>Axinella</i> sp. | 环肽 | 对 B ₈₈ 细胞 IC ₅₀ 为 0.21 mg/L |
| Axinastatins 2,3 | <i>Axinella</i> sp. | 环肽 | 对 6 种人癌细胞 IC ₅₀ 为 0.0072 ~ 0.35 g/L |
| Phakelostatins 1,10,11 | <i>Phakellia costata</i> | 环肽 | 对 B ₈₈ 细胞 ED ₅₀ 分别为 7.5 mg/L, 2.1 g/L, 2.2 g/L |
| Discodermin A | <i>Discodermia kiiensis</i> | 环肽 | 与大田软海绵酸合用,有显著抑瘤作用 |
| Polydiscamide A | <i>Discodermia</i> sp. | 环肽 | 对 A ₄₉ 细胞 IC ₅₀ 为 0.7 mg/L |
| Discokilidides A, B, C, D | <i>Discodermia kiiensis</i> | 环肽, 含有特殊的 β-羟基酸和 β-甲氧基苯氨酸 | 对 B ₈₈ 细胞 IC ₅₀ 为 2.6 mg/L 对 B ₆ 细胞 IC ₅₀ 为 1.6 mg/L 对 Lewis 细胞 IC ₅₀ 为 1.2 mg/L 对 Lu-99 细胞 IC ₅₀ 为 0.7 mg/L 对 HTF29 细胞 IC ₅₀ 为 1.2 mg/L 对 CCD-19cu 细胞 IC ₅₀ 为 0.57 mg/L |
| Milagsiatin | <i>Pseudoxinyssa</i> sp. | 环肽 | 能抑制 PS 活性 |
| Theonellapeptilides Ib, Ic, Id, Ie | <i>Theonella</i> sp. | 环肽 | 对 L ₂₁₀ 细胞 IC ₅₀ 分别为: 1.6, 1.3, 2.4, 1.4 g/L |
| Polythoamidides | <i>Theonella swinhoei</i> | 线性多肽 | B ₈₈ 细胞的 IC ₅₀ 为 0.07 mg/L |
| Mbtuporin | <i>Theonella swinhoei</i> | 环肽 | 对 B ₈₈ , A ₄₉ , HEY, Lolo, MCFT, U373 MG 细胞 IC ₅₀ 分别为: 6, 2.4, 2.8, 2.3, 12.4, 2.47 mg/L |
| Orbiculamide A | <i>Theonella swinhoei</i> | 多肽 | 中等细胞毒性 |
| Keramamidides B~D, F | <i>Theonella</i> sp. | 多肽 | 中等细胞毒性 |
| Hymenistatin 1 | <i>Hymeniacidon</i> sp. | 多肽 | 对 B ₈₈ 细胞 IC ₅₀ 为 0.26 mg/L |

1.3 海鞘

海鞘属于脊索动物门的尾索动物亚门,是被囊动物中种类最丰富的一类。近年来在海鞘代谢产物中发现了一系列具有抗肿瘤活性的肽类化合物,其中以环肽为主,少数为线性肽类(详见表 2^[8])。

1.4 腔肠动物

腔肠动物是一类出现原始组织分化的低等多细胞动物,目前发现的抗肿瘤活性肽不多,主要集中在海葵和珊瑚中。

海葵的刺丝囊中有多种有毒多肽和蛋白质。其中

来源于黄海葵 (*Anthopleum xanthogrammica*) ApA 和 ApB 是研究得最多的海洋肽类,具有较好的强心作用,而 Michael 等 1992 年注意到它们在抗肿瘤方面也有活性。Pettit 等 1982 年从沙海葵 (*Palythoa liscia*) 中分离的 4 种小肽 Palystatin A~D 具有强细胞毒。它们由 17 种氨基酸组成,其中 A 和 B 为糖基化肽, C 和 D 为非糖基化肽。体外对 B₈₈ 白血病细胞 ED₅₀ 分别为 0.0023, 0.020, 0.0018 和 0.0022 mg/L。体内 Palystatin A 的剂量为 0.15 × 10⁻⁶ 时,能延长患白血病动物 22% 的存活时间; Palystatin B 的剂量为 0.3 × 10⁻⁶ 和 0.08 × 10⁻⁶ 时,能相应延长 32% 和 22% 的存活时

表 2 海鞘动物的抗肿瘤活性肽

| 活性物质 | 来源 | 结构 | 抗肿瘤活性 |
|---------------------|-----------------------------|--------------------|---|
| Dide mnins | <i>Trididemnum solidum</i> | 环肽 | Dide mnin B对L ₂₁₀ 白血病细胞的IC ₅₀ 为7.5 × 10 ⁻⁴ mg/L, 临床研究结果表明它对非何杰金淋巴瘤 (non-Hodgkins) 和神经胶质母细胞具有较好抑制效果 |
| Cyclozoline | <i>Lissoclinum bistatum</i> | 环六肽, 具3个呈对称分布的恶唑啉环 | 对MRC5CV1成纤维细胞和T ₄ 膀胱癌细胞的IC ₅₀ 均为0.5 mg/L |
| Patella mide E | <i>Lissoclinum bistatum</i> | 环八肽, 含有二个恶唑啉环 | 对人结肠癌细胞有微弱细胞毒活性, IC ₅₀ 为125 mg/L, |
| Patella mide F | <i>Lissoclinum patella</i> | 环八肽, 含有二个恶唑啉环 | 对60种人类肿瘤细胞的平均IC ₅₀ 为13 mmol/L |
| Tawicyclamides A, B | <i>Lissoclinum patella</i> | 环肽, 有一个噻唑啉与2个噻唑氨基酸 | 对人结肠癌细胞有微弱细胞毒性 |
| Bistratamides A~D | <i>Lissoclinum patella</i> | 环六肽 | 具有微弱细胞毒活性 |
| Cyclodidemnamide | <i>Lissoclinum bistatum</i> | 环七肽 | 对人结肠癌细胞HCT-116 ED ₅₀ 为16 mg/L |
| Mollamide | <i>Didemnum molle</i> | 环七肽 | 对B ₈₈ , A ₄₉ , HT ₉ , CV的IC ₅₀ 分别为: 1, 2.5, 2.5, 2.5 mg/L |
| Patellin 6 | <i>Didemnum molle</i> | 环八肽 | 对B ₈₈ , A ₄₉ , HT ₉ , CV有中等细胞毒性 |
| Botryllamide D | <i>Lissoclinum</i> sp. | 苯丙氨酸衍生物 | 对HCT116细胞有抑制作用, IC ₅₀ 为17 mg/L |
| Caledonin | <i>Botryllus</i> sp. | 二肽 | 对KB细胞和B ₈₈ 细胞有弱细胞毒性 |
| Shimofuridin A | <i>Didemnum nodiguesi</i> | 核苷酸衍生物 | 对小鼠淋巴瘤L ₂₁₀ 细胞IC ₅₀ 为9.5 mg/L |

间。

从软珊瑚 *Simulani* 中分离得到一种环二肽, 由苯丙氨酸和精氨酸构成, 具有免疫调节功能和抗肿瘤的作用, 已于1990年由中山大学首次合成成功。Ding等1995等在丛生盔形珊瑚 (*Galaxea fascicularis*) 中发现一种蛋白。它对正常细胞 BL8L 在接触初期有一定杀伤作用, LD₅₀ 为 7.49 mg/L, 但培养 10 d 后 BL8L 即产生抗药性; 而对于肿瘤细胞 JB1 的 LD₅₀ 为 3.49 mg/L, 并在 96h 内完全死亡, 具有特殊的选择性。

1.5 软体动物

海兔毒素是 Pettit 等人从海兔 (*Dolabella auricularia*) 中分离到的小肽, 能使肿瘤细胞微管解聚并凋亡。已发现 dolastatin 1~16 和 18^[9,10], 其中研究得最多的是 dolastatin 3, 10 和 15。dolastatin 10 是最具有开发潜力的一种, 体外实验表明它对 B₈₈ 白血病细胞的

IC₅₀ 为 0.04 μg/L, 对 B16 黑色素瘤治疗剂量仅为 1.1 ng/L, 对人前列腺癌的 IC₅₀ 为 0.5 nmol/L, 此外对 LOX 人黑色素瘤及 M₀₇₆ 子宫瘤也有较好的疗效, 1995 年 11 月被 NCI 推荐进入临床试验阶段, 是目前已知抗肿瘤活性最强的化合物之一。

Dolastatins 的全合成、结构修饰和构效关系研究目前世界上有多个小组在同时进行。dolastatin 3, 10^[11] 和 15 的全合成均已成功, 修饰产物也具有较好的抗肿瘤效果。其中 dolastatin 10 的衍生物 TZF1027 对鼠荷人胃癌 (H81, H106, H30, H154), 乳癌 (H31, H62), 结肠癌 (H110, H143), 肺癌 (LC376, H74, Mqnu-1), 肝癌 (H181), 肾癌 (H12), 卵巢癌 (HOC3, SOG4) 等抑制效果较好^[12], 现已进入 I 期临床^[13]。

在黑斑海兔 (*Aplysia kurodai*) 中分离得到的糖蛋白 Aphysianins P 是一种选择性的细胞溶解因子。当剂量为 3~25 g/L 时能在不破坏红细胞、白细胞的情况

下,溶解所有实验的肿瘤细胞并延长 MM46 腹水癌小鼠存活时间^[14]。Aplysinin E 是由 3 个亚基组成、分子量为 25 kd 的蛋白,当浓度为 2~114 μg/L 时,能强烈抑制肿瘤细胞,而对正常红细胞、白细胞无明显抑制作用。

HB-II 是胡水根等 1997 年从圆背角无齿蚌中纯化得到的一种糖蛋白,具有抗肿瘤活性^[2]。此外从日本虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)、长砗磲 (*Tridacna maxima*) 中提取的糖蛋白也有一定的抗肿瘤活性。

1.6 其它生物

从粘球菌 *Chondromyces* 中发现的 *Chondramides A~D* 是强效抗癌剂,其结构是一类新型缩酚酸肽,体外对多种人癌细胞有极强的细胞毒性,如 KB-3-1(颈部肉瘤),K562, HL-60 和 PKK2 等,IC₅₀ 为 3~60 mg/L。海洋放线菌株 L13-ACM2-092 的菌丝块中有一种对 P₈₈, A₄₉ 和 MEL28 有很强细胞毒活性的多肽 thiocoraline,能与高度卷曲的 DNA 结合,并抑制 RNA 的合成^[15]。

鲨鱼软骨中存在一类多肽,能通过阻止肿瘤周围毛细血管生长而达到抑制肿瘤的作用,对肺癌、肝癌、乳腺癌、消化道肿瘤、子宫颈癌、骨癌等均有抑制作用。陈建鹤等 2000 年用盐酸胍抽提姥鲨软骨蛋白,采用超滤和分子筛柱层析等方法分离纯化获得新生血管抑制因子 Sp8。Sp8 在体外能抑制血管内皮细胞增殖,抑制新生血管生长,体内能抑制小鼠移植 S₈₀ 肉瘤生长^[3]。来自于海豹骨骼肌肉中的一种由 20 种氨基酸组成的多肽也有一定抗肿瘤效果。

2 开发应用前景

海洋环境的特殊性与生物物种的多样性造就了众多结构新颖、功能独特的海洋生物活性物质。从目前的研究情况来看,海洋中抗肿瘤活性肽的研究主要还只集中于海绵、海鞘和部分藻类等少数几类生物中,还有很大一部分没有发现或开发出来。而人们未知的任何海洋生物都可能成为抗肿瘤活性肽的生产者,需要大范围广泛地筛选,近年来发展起来的自动化、高通量药理筛选模型及筛选系统则为大规模筛选工作的进行提供了可能。其次,应利用多肽是基因编码的直接产物的特点,从基因分析的角度寻找新型抗肿瘤药用基因。在新世纪中,随着海洋生物基因组研究的逐步开展,越来越多的抗肿瘤药用基因必将被发现。

抗肿瘤海洋活性肽研究的最终目的是开发成为商品化的药品。现在虽然发现了众多活性物质,还有

一些已经进入临床研究阶段,但是尚无一种进行较大规模的商品化生产。究其原因主要是:(1)许多海洋抗肿瘤活性肽具有特殊的结构。如含有多种修饰基团、D型氨基酸、封闭的 N 末端等,给研究开发带来一定困难;(2)这些物质在具有明确的抗肿瘤活性同时,也存在一定的毒副作用,难以在临床上直接使用;(3)药源问题难以解决。面对这些难题,可以利用它们是基因表达产物的特点,一方面运用基因工程方法进行大规模生产,解决药源问题,另一方面利用蛋白质工程技术,对多肽分子进行合理设计、改造,选择性地增强其药效,降低毒副作用。目前这方面研究在一些分子量适中的直链肽中取得良好的进展。如秦松等从蓝藻中克隆了蓝藻别藻蓝蛋白(APC)基因^[16],转入大肠杆菌中高效表达基因重组藻胆蛋白(RAPC),解决了直接从原料藻中提取藻胆蛋白工艺复杂,成本高,而且得到的是色素蛋白复合物,构效不稳定,无法满足药物开发的要求的问题。试验表明,RAPC 与天然藻胆蛋白相比,为一化学单体,结构稳定,具有更强的抗肿瘤活性,能显著提高机体的免疫功能,且无毒无致突变性,是一种新型海洋生物抗肿瘤活性先导化合物^[14]。而对于众多的小分子肽则可以采用构建融合蛋白的方法,在既稳定其构象又不影响其活性的同时大量获取基因重组产品;也可在深入研究其代谢调控途径的基础上,通过调节代谢途径,主要是关键酶的活性,提高其在药源生物中的表达量。随着有机合成技术的进步,越来越多的海洋活性肽也可以运用半合成、全合成等方法直接合成,或通过化学修饰的方法加以改造。

总之随着人类社会的发展、环境的变化,各种各样的癌症正日益严重地威胁着人类的健康,人们日益重视海洋抗肿瘤药物的开发,随着海洋生物技术的发展,海洋抗肿瘤肽类药物的开发必将取得产业化成果。

参考文献

- 1 宋金明.中国海洋天然活性物质开发新技术 21 世纪发展战略,海洋科学,2001,25(4):50~53
- 2 胡水根,朱国平,吴萍萍等.圆背角无齿蚌抗肿瘤有效成份的研究 I HB-II 糖蛋白的分析鉴定,中国海洋药物,1997,16(1):23~25
- 3 陈建鹤,焦炳华.中国姥鲨软骨源新生血管抑制因子(Sp8)的分离纯化及生物学活性,第二军医大学学报,2000,21(2):107~110
- 4 唐书明,黄芳,窦昌贵等.基因重组别藻蓝蛋白对小鼠 S₈₀ 肉瘤的抑制作用,药物生物技术,1999,6(3):168~170
- 5 Panda D., Himes R.H., Moore R. et al.. Mechanism of

(下转 48 页)

- action of the unusually potent microtubule inhibitor cryptophycin 1, *Biochemistry*, 1997, **36**(42):12948~12953
- 6 Kobayashi M., Kitagawa I.. Marine spongean cytotoxins, *Journal of Natural Toxins*, 1999, **8**(2):249~258
- 7 Ōki S., Miramatsu I., Matsunaga S. *et al.*. A channel-forming peptide toxin: polytheonamide from marine sponge (*Theonella swinhoei*), *Nippon Yakugigaku Zasshi*, 1997, **110**(10):195~198
- 8 Kucuk O., Young M.L., Habermann T.M. *et al.*. Phase II trial of didemnin B in previously treated non-Hodgkin's lymphoma: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Study, *Am.J.Clin.Oncol.*, 2000, **23**(3):273~277
- 9 Pettit G.R., Xu J.P., Hogan F. *et al.*. Isolation and structure of the human cancer cell growth inhibitory cyclodepsipeptide dolastatin 16, *J.Nat.Prod.*, 1997, **60**(8):752~754
- 10 Pettit G.R., Xu J.P., Williams M.D. *et al.*. Isolation and structure of dolastatin 18, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 1997, **7**(7):827~832
- 11 Poncet J., Hortalá L., Busquet M. *et al.*. Synthesis and antiproliferative activity of a cyclic analog of dolastatin 10, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 1998, **8**:2855~2858
- 12 Fujita F., Koike M., Fujita M. *et al.*. Antitumor effects of TZF1027, a novel dolastatin 10 derivative, on human tumor xenografts in nude mice, *Cancer To Kagaku Ryoho*, 2000, **27**(3):451~458
- 13 Kobayashi M., Natsume T., Tamaoki S. *et al.*. Antitumor activity of TZF1027, a novel dolastatin 10 derivative, *Jpn.J.Cancer Res.*, 1997, **88**(3):316~327
- 14 Yamazaki M., Kisugi J., Iijima R.. Antineoplastic glycoproteins in marine invertebrates, *Jpn.J.Cancer Chem.*, 1997, **24**(11):1477~1485
- 15 Romero F., Espliego F., Baz J.P. *et al.*. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine microorganism. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities, *Journal of Antibiotics*, 1997, **50**(9):134~136
- 16 Qin S., Hiroyuki K. *et al.*. Cloning and sequencing of the allophycocyanin genes from *Spirulina maxima*, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 1998, **16**(Suppl):6~11

(本文编辑:刘珊珊)