

# 山东海区大型海藻抗肿瘤及免疫活性\*

徐秀丽<sup>1,2</sup> 范晓<sup>1\*\*</sup> 韩丽君<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(<sup>2</sup>中国科学院研究生院 北京 100039)

**摘要** 对山东海区大型海藻进行系统采集,采用SRB法测定了40种海藻甲醇提取物对A549人肺腺癌细胞生长抑制率,MTT法测定了对HL-60人白血病细胞生长抑制率;并且测定了样品对T、B淋巴细胞的免疫活性和细胞毒性。结果表明:异枝凹项藻、细枝软骨藻、鸭毛藻、绳藻、叉开网翼藻具有较好的抗A549肿瘤细胞活性,鸭毛藻、异管藻和网地藻具有较好的抗HL-60肿瘤细胞活性;金膜藻、萱藻、绳藻、小粘膜藻和酸藻具有较好的免疫生物活性。

**关键词** 海藻,抗肿瘤,免疫

**中图分类号** R931.77 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)09-0044-05

海藻是海洋生物中的一大家族,已记载的超过24 000种,我国海藻2 590种以上<sup>[1]</sup>,仅分布广、数量大的经济海藻就有100多种。由于其常年生活在特殊生态环境下,海藻能产生很多独具特色的次级代谢产物,包括脂肪酸、芳香族、萜类、甾醇和含氮、含硫等各种类型的化合物,其中有许多具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗凝血等药理活性成分。近来各国学者对海洋生物进行了系统的筛选,Harada等<sup>[2]</sup>、Gerwick等<sup>[3]</sup>以及Nimuta等<sup>[4]</sup>通过对海藻进行体外抗肿瘤活性筛选,发现了许多有抗肿瘤潜力的藻种和先导化合物。

本文主要对山东海区常见40种大型海藻进行抗肿瘤活性筛选,采用磺酰罗丹明B(Sulforhodamine B, SRB)蛋白染色法<sup>[5]</sup>测定了其甲醇提取物对A549肿瘤细胞生长抑制率,四氮唑盐(Methyl-Thiazol-Tetrazolium, MTT)还原法<sup>[5]</sup>测定了对HL-60肿瘤细胞生长抑制率;并且测定了样品对T、B淋巴细胞的免疫活性和细胞毒性。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

实验用海藻的采集时间和地点见表1。海藻样品由中国科学院海洋研究所分类室鉴定。肿瘤细胞株:A549肿瘤细胞和HL-60肿瘤细胞均为上海国家新药筛选中心提供。

### 1.2 方法

1.2.1 活性物质的提取 取新鲜海藻样品,用海水清洗以去除杂藻和泥沙,剪碎后以甲醇为提取溶

剂,浸提3d,过滤,滤渣再重复浸提2次,合并3次提取液,真空旋转蒸干(温度 $\leq 50$ ℃),Eppendorf管低温保存,留待进行活性测定。

1.2.2 抗肿瘤生物活性体外筛选 采用磺酰罗丹明B(sulforhodamine B, SRB)蛋白染色法测定提取物对A549肿瘤细胞生长抑制率,作用时间为72h,用酶标仪在515nm波长处测定每个小孔的OD值;采用四氮唑盐(Methyl-Thiazol-Tetrazolium, MTT)还原法测定其对HL-60肿瘤细胞生长抑制率,作用时间为48h,在550nm波长处测定每个小孔的OD值,分别观察在5个不同浓度下甲醇提取物对肿瘤细胞的抑制率:

抑制率 = [(对照组 OD 值 - 一样品组 OD 值) / 对照组 OD 值] × 100 %

1.2.3 免疫生物活性体外筛选 进行T、B淋巴细胞的增殖反应及细胞毒实验。淋巴细胞在有丝分裂原ConA, LPS的刺激下,细胞的形态和代谢可发生一系列的变化,转化为母细胞,并分化增殖。本实验加入ConA(刀豆蛋白A)5 μg/mL诱导T淋巴细胞增殖,加入LPS(脂多糖)10 μg/mL诱导B淋巴细胞增殖,以<sup>3</sup>H-TdR掺入法定量测定细胞的增殖。活细胞内线粒

\* 国家自然科学基金重点项目B20001702,国家863计划项目2001AA620403,2001AA620503号。

\*\* 通讯作者。

第一作者:徐秀丽,出生于1976年,博士在读,主要从事海洋天然产物方面的研究。

收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-08-20

## 研究报告 REPORTS

体脱氢酶能将 MTT 由黄色还原成蓝色的甲胍，甲胍产量与活细胞成正比。用有机溶剂溶解后，可用酶标仪检测 OD 值。

淋巴细胞的增殖采用被测样品 CPM 值减对照孔 CPM 值，除以对照 CPM 值乘以 100 %

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗肿瘤活性

样品在 5 个浓度下对 A549 人肺腺癌细胞和 HL-60 人白血病细胞生长抑制率见表 2。

表 1 供筛选的海藻样品

Tab.1 Marine algae samples for screening

编号	中文名称	拉丁文名称	采集时间(年-月)	采集地点
1	异枝凹项藻	<i>Laurencia intermedia</i>	2002-01	青岛
2	细枝软骨藻	<i>Chondria tenuissima</i>	2002-01	青岛
3	海头红	<i>Plocamium telfairiae</i>	2001-05	威海
4	珊瑚藻	<i>Corallina officinalis</i>	2001-05	威海
5	扇形拟伊藻	<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	2001-05	威海
6	蜈蚣藻	<i>Grateloupia filicina</i>	2001-05	威海
7	鸭毛藻	<i>Symphyclocladia latiuscula</i>	2001-05	威海
8	海膜	<i>Halymenia sinensis</i>	2001-05	威海
9	松节藻	<i>Rhodomela confervoides</i>	2001-05	威海
10	海萝	<i>Gloiopeltis furcata</i>	2001-05	威海
11	角叉菜	<i>Chondrus ocellatus</i>	2001-05	威海
12	真江蓠	<i>Gracilaria asiatica</i>	2001-05	威海
13	龙须菜	<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	2001-10	威海
14	日本仙菜	<i>Ceramium japonicum</i>	2001-05	威海
15	三叉仙菜	<i>Ceramium kondoi</i>	2001-05	威海
16	石花菜	<i>Celidium amansii</i>	2001-05	威海
17	胶管藻	<i>Gloiosiphonia capillaris</i>	2001-05	威海
18	金膜藻	<i>Chrysiomenia wrightii</i>	2001-05	威海
19	异管藻	<i>Heterosiphonia japonica</i>	2001-05	威海
20	条斑紫菜	<i>Porphyra yezoensis</i>	2001-05	威海
21	皱波角叉菜	<i>Chondrus crispus</i>	2001-05	威海
22	粗枝软骨藻	<i>Chondria crassicaulis</i>	2000-12	威海
23	裂叶马尾藻	<i>Sargassum siliquastrum</i>	2001-05	威海
24	鼠尾藻	<i>Sargassum thunbergii</i>	2001-05	威海
25	网地藻	<i>Dictyota dichotoma</i>	2001-05	威海
26	海黍子	<i>Sargassum miyabei</i>	2001-05	威海
27	小粘膜藻	<i>Leathesia nana</i>	2001-05	威海
28	绳藻	<i>Chorda filum</i>	2001-05	威海
29	点叶藻	<i>Punctaria latifolia</i>	2001-05	威海
30	叉开网翼藻	<i>Dictyopteris divaricata</i>	2001-05	威海
31	单条髓藻	<i>Myelophycus simplex</i>	2001-05	威海
32	水云	<i>Ectocarpus arctus</i>	2001-05	威海
33	萱藻	<i>Scytosiphon lomentarius</i>	2001-05	威海
34	酸藻	<i>Desmarestia viridis</i>	2001-05	威海
35	裙带菜	<i>Undaria pinnatifida</i>	2001-05	威海
36	浒苔	<i>Enteromorpha prolifera</i>	2001-05	威海
37	刺松藻	<i>Codium fragile</i>	2001-05	威海
38	盘苔	<i>Blidingia miniata</i>	2001-05	威海
39	石莼	<i>Ulva lactuca</i>	2001-05	威海
40	孔石莼	<i>Ulva pertusa</i>	2001-05	威海

## 研究报告 REPORTS

表 2 样品对肿瘤细胞生长的抑制率( %)

Tab.2 Inhibiting rate of samples on tumor cell( %)

编号	中文名称	拉丁文名称	A-549					HL-60				
			浓度( mg/ mL)					浓度( mg/ mL)				
			1	0.25	0.063	0.016	0.0039	1	0.25	0.063	0.016	0.0039
1	异枝凹项藻	<i>Laurencia intermedia</i>	75.5	78.6	12.1	26.6	11.1	97.5	49.8	0	0	0
2	细枝软骨藻	<i>Chondria tenuissima</i>	78.3	77.4	17.8	28.6	18.6	91.0	44.9	0	0	0
3	海头红	<i>Placomium telphairiae</i>	62.4	79.3	19.3	31.7	26.7	98.5	78.5	0	0	0
4	珊瑚藻	<i>Corallina officinalis</i>	71.3	56.7	0	0	0	87.8	59.2	9.7	0	0
5	扇形拟伊藻	<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	75.6	72.3	0	0	0	98.9	64.8	0.4	0	0
6	蜈蚣藻	<i>Grateloupia filicina</i>	83.9	76.1	0.3	8.4	7.5	98.1	75.4	0	0	0
7	鸭毛藻	<i>Symphycloadia latiuscula</i>	63.2	79.2	72.4	60.2	41.1	78.6	83.9	51.4	18.7	3.4
8	海膜	<i>Halymenia sinensis</i>	74.2	74.0	0	0	0	95.9	65.3	0	0	0
9	松节藻	<i>Rhodomela confervoides</i>	54.5	42.1	0	0	0	45.9	0	0	0	0
10	海萝	<i>Gloiopeltis furcata</i>	53.9	78.6	0	0	0	81.2	54.3	0	0	0
11	角叉菜	<i>Chondrus ocellatus</i>	80.4	78.0	0	0	0	100	59.6	0	0	0
12	真江蓠	<i>Gracilaria asiatica</i>	96.5	87.3	15.1	0	0	97.7	65.0	4.6	0	0
13	龙须菜	<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	97.4	95.9	22.1	3.9	10.0	95.5	59.3	1.3	0	0
14	日本仙菜	<i>Ceramium japonicum</i>	97.1	86.4	38.5	10.2	6.7	100	79.1	15.0	0	0
15	三叉仙菜	<i>Ceramium kondoi</i>	95.6	92.4	14.4	0	0	98.1	90.7	6.8	0	0
16	石花菜	<i>Gelidium amansii</i>	97.0	95.7	24.9	5.3	5.7	100	85.8	4.4	0	0
17	胶管藻	<i>Gloiosiphonia capillaris</i>	96.1	91.3	24.9	0.0	0.3	100	35.8	0	0	0
18	金膜藻	<i>Chrysiomenia wrightii</i>	96.1	90.5	17.1	0	5.9	100	52.7	32.4	2.4	0
19	异管藻	<i>Heterosiphonia japonica</i>	95.1	92.8	17.2	0	0	100	40.0	8.5	1.7	5.6
20	条斑紫菜	<i>Porphyra yezoensis</i>	91.4	95.1	43.9	0	0	99.9	61.4	11.8	0	0
21	皱波角叉菜	<i>Chondrus crispus</i>	92.9	94.3	20.1	0	0	0	0	0	0	0
22	粗枝软骨藻	<i>Chondria crassicaulis</i>	95.6	88.3	27.9	0	0	100	22.2	1.8	0.9	0
23	裂叶马尾藻	<i>Sargassum siliquastrum</i>	67.3	78.3	0	0	0	88.9	74.5	0	0	0
24	鼠尾藻	<i>Sargassum thunbergii</i>	68.3	78.3	0	0	0	98.8	83.9	16.4	0	0
25	网地藻	<i>Dictyota dichotoma</i>	42.1	66.5	72.3	0	0	97.4	90.3	73.5	11.3	14.1
26	海黍子	<i>Sargassum miyabei</i>	63.7	77.6	0	0	0	89.8	88.8	36.1	1.2	0
27	小粘膜藻	<i>Leathesia nana</i>	97.2	96.1	19.5	1.0	0	100	84.3	2.4	0	0
28	绳藻	<i>Chorda filum</i>	97.7	97.3	42.0	23.0	15.2	91.3	91.1	36.3	0	0
29	点叶藻	<i>Punctaria latifolia</i>	90.1	96.3	17.7	0	0	100	7.8	0	0	0
30	叉开网翼藻	<i>Dictyopteria divaricata</i>	91.3	92.6	23.4	2.9	0.7	100	15.0	1.3	0	0
31	单条髓藻	<i>Myelophycus simplex</i>	95.2	91.9	22.6	0.9	0	100	56.7	0	0	0
32	水云	<i>Ectocarpus arctus</i>	95.1	89.1	21.5	0	0	100	56.9	0	0	0
33	萱藻	<i>Scytosiphon lomentarius</i>	97.3	89.6	15.2	0	0	89.0	100	52.8	0	0
34	酸藻	<i>Desmarestia viridis</i>	93.0	93.6	28.9	2.7	0	100	6.9	0	0	0
35	裙带菜	<i>Undaria pinnatifida</i>	90.8	93.3	32.1	0	0	62.5	0	0	0	0
36	浒苔	<i>Enteromorpha prolifera</i>	73.9	58.6	18.0	0	0	88.2	44.7	0	0	0
37	刺松藻	<i>Codium fragile</i>	66.6	72.6	4.5	1.5	0	92.1	45.1	0	0	0
38	盘苔	<i>Bliedingia minima</i>	95.2	90.2	24.4	4.4	1.3	100	60.9	0	0	0
39	石莼	<i>Ulva lactuca</i>	92.0	96.0	17.1	0	0	100	68.4	0	0	0
40	孔石莼	<i>Ulva pertusa</i>	91.6	90.8	4.5	0	0	100	71.9	0	0	0

实验结果表明：海藻甲醇提取物对 A-549 肿瘤细胞生长抑制率比 HL-60 肿瘤细胞生长抑制率普遍好，异枝凹项藻、细枝软骨藻、海头红、鸭毛藻、蜈蚣藻、龙须菜、日本仙菜、石花菜、胶管藻、金膜藻、绳藻、

## 研究报告 REPORTS

网翼藻和盘苔对 A549 肿瘤细胞生长抑制率较高,对 HL-60 肿瘤细胞生长抑制率较高的仅有鸭毛藻、异管藻和网地藻;样品中红藻的肿瘤生长抑制活性较好,褐藻其次,绿藻的抑制率最低;当样品浓度较大时抑制活性较好,部分样品可以达到 100%,很多可以达到 90%以上,抑制活性随样品浓度的降低而降低,当样

表 3 海藻样品对 T、B 淋巴细胞的免疫调节活性和细胞毒性

Tab.3 The immunocompetence and cell toxicity of the samples toward T and B lymphocyte

编号	中文名称	拉丁文名称	毒性(有/无)	T 细胞增殖(%)	B 细胞增殖(%)
1	异枝凹项藻	<i>Laurencia intermedia</i>	无	10	11
2	细枝软骨藻	<i>Chondria tenuissima</i>	无	25	26
3	海头红	<i>Plocamium tel Fairfieldae</i>	无	12	- 14
4	珊瑚藻	<i>Corallina officinalis</i>	无	6	4
5	扇形拟伊藻	<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	无	6	16
6	蜈蚣藻	<i>Grateloupia filicina</i>	无	25	18
7	鸭毛藻	<i>Symphycloadia latiuscula</i>	有	- 19	- 10
8	海膜	<i>Halymenia sinensis</i>	有	43	19
9	松节藻	<i>Rhodomela confervoides</i>	无	5	19
10	海萝	<i>Gloiopeltis furcata</i>	无	41	3
11	角叉菜	<i>Chondrus ocellatus</i>	无	26	2
12	真江蓠	<i>Gracilaria asiatica</i>	无	21	33
13	龙须菜	<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	无	14	98
14	日本仙菜	<i>Ceramium japonicum</i>	无	15	19
15	三叉仙菜	<i>Ceramium kondoi</i>	无	19	68
16	石花菜	<i>Gelidium amansii</i>	无	17	29
17	胶管藻	<i>Gloiosiphonia capillaris</i>	无	- 13	- 27
18	金膜藻	<i>Chrysiomenia wrightii</i>	无	- 46	- 33
19	异管藻	<i>Heterosiphonia japonica</i>	无	- 1	- 4
20	条斑紫菜	<i>Porphyra yezoensis</i>	无	11	- 20
21	皱波角叉菜	<i>Chondrus crispus</i>	无	21	4
22	粗枝软骨藻	<i>Chondria crassicaulis</i>	无	- 1	- 3
23	裂叶马尾藻	<i>Sargassum siliquastrum</i>	无	12	13
24	鼠尾藻	<i>Sargassum thunbergii</i>	无	11	9
25	网地藻	<i>Dictyota dichotoma</i>	无	- 27	25
26	海黍子	<i>Sargassum kjellmanianum</i>	无	0	7
27	小粘膜藻	<i>Leathesia nana</i>	无	3	64
28	绳藻	<i>Chorda filum</i>	无	12	85
29	点叶藻	<i>Punctaria latifolia</i>	无	- 2	- 1
30	叉开网翼藻	<i>Dictyopterus divaricata</i>	无	- 37	- 33
31	单条髓藻	<i>Myelophycus simplex</i>	无	- 40	- 25
32	水云	<i>Ectocarpus arctus</i>	无	- 27	- 42
33	萱藻	<i>Scytosiphon lomentarius</i>	无	- 12	- 40
34	酸藻	<i>Desmarestia viridis</i>	无	45	17
35	裙带菜	<i>Undaria pinnatifida</i>	无	20	2
36	浒苔	<i>Enteromorpha prolifera</i>	无	52	32
37	刺松藻	<i>Codium fragile</i>	无	15	26
38	盘苔	<i>Blidingia minima</i>	无	- 1	- 9
39	石莼	<i>Ulva lactuca</i>	无	- 37	- 25
40	孔石莼	<i>Ulva pertusa</i>	无	- 14	- 27

注:表中数据有负号表示此样品对 T、B 细胞有抑制作用,对由于淋巴细胞过度增殖而引起的某些自身免疫性疾病有效果;没有负号表示此样品对 T、B 细胞有增强作用,对各种免疫功能低下造成的疾病有效果。

## 研究报告 REPORTS

品浓度为 0.0039 mg/ mL 时,部分样品仍然具有较好的抑制活性,鸭毛藻抑制 A549 肿瘤细胞活性达到 41.1%,海头红达到 26.7%,是具有较好抗肿瘤活性的藻种。

### 2.2 免疫活性

样品在 10  $\mu$ g/ mL 浓度下对 T、B 淋巴细胞的免疫调节活性和细胞毒性结果见表 3。

实验结果表明:在所测样品浓度为 10  $\mu$ g/ mL 时,绝大部分均无细胞毒性。在无细胞毒性的前提下,金膜藻和单条髓藻对 T 淋巴细胞增殖有较好的抑制活性,水云和萱藻对 B 淋巴细胞增殖有较好的抑制活性;海萝、酸藻和浒苔对 T 淋巴细胞增殖有较好的增强活性,三叉仙菜、龙须菜、绳藻和小粘膜藻对 B 淋巴细胞增殖有较好的增强活性。虽然海膜对 T 淋巴细胞增殖有较好的增强活性,但具有细胞毒性。对于无细胞毒性且免疫活性较好的藻种,值得进一步进行活性跟踪和活性成分的分离,以期发现活性先导化合物。

### 2.3 结语

我国海域辽阔,海藻资源丰富,为了充分开发利用,

必须对我国海藻资源进行系统采集、活性筛选,以确定具有药用开发潜力的藻种。活性筛选对于有目的地寻找活性先导化合物和高效低毒的海洋药物,发挥着举足轻重的作用,为进一步的分离纯化工作提供指导性的数据。

### 参考文献

- 1 黄宗国主编. 中国海洋生物种类与分布. 北京:海洋出版社, 1994. 15-233
- 2 韩锐主编. 抗癌药物研究与实验技术. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 284-288
- 3 Harada H, Noro T, Kamei Y. Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coast. Biol Pharm Bull, 1997, 20(5): 541-546
- 4 Gerwick W H, Roberts M A, Proteau P J, et al. Screening cultured marine microalgae for anticancer type activity. J Appl Phycol, 1994, 6:143-149
- 5 Numata A, Kanbara S, Takahashi C, et al. Cytotoxic activity of marine algae and a cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. Chem Pharm Bull, 1991, 39(8): 2129-2131

## ANTI-TUMOR ACTIVITY AND IMMUNOCOMPETENCE OF MACROALGAE FROM SHANDONG SEA AREA

XU Xiu-Li<sup>1,2</sup> FAN Xiao<sup>1</sup> HAN Li-Jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

(<sup>2</sup> Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

Received: May, 21, 2002

Key Words: Marine algae, Antitumor activity, Immunocompetence

### Abstract

The crude extracts of 40 species belonging to the classes Rodophyceae, Chlorophyceae and Phaeophyceae were assayed for anti-A549 and HL-60 activity by using SRB assay and MTT assay respectively. The immunocompetence and cell toxicity of the samples toward T and B lymphocyte were determined. The algae were collected from Shandong sea area. Some species showed anti-A549 activity, such as *Lauencia intermedia*, *Chondria tenuissima*, *Symphyclocladia latiuscula*, *Chorda flum*, *Dictyota dichocata*; some species showed anti-HL-60 activity, such as *Symphyclocladia latiuscula*, *Heterosiphonia japonica*, *Dictyota dichocata*, *Chrysomenia wrightii*, *Scytosiphon lomentarius*, *Chorda flum*, *Leathesia nana* and *Desmarestia viridis* showed better immunocompetence.

(本文编辑:张培新)