

# 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选\*

徐年军 范晓 韩丽君 严小军 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 于 1997 年 4 月和 2000 年 5 月对山东沿海海藻进行较系统的采集,对其中 39 种海藻的 96 个样品采用高通量方法进行选择性细胞毒筛选。结果表明,小粘膜藻(*Leathesia difformis*)、多管藻(*Polysiphonia urcedata*)、萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)、海萝(*Gloiopeltis furcata*)、叉开网翼藻(*Dictyopteris divaricata*)、点叶菜(*Punctaria latifolia*)等对 KB 细胞或 HT-29 细胞具有选择性抑制活性。乙醇、氯仿的提取效率较高,多管藻的乙醇、氯仿提取物,萱藻的乙醇提取物和叉开网翼藻的正己烷提取物都有强的选择性细胞毒活性。

**关键词** 海藻,抗肿瘤活性,筛选,MTT 法

**中图分类号** R931.77

海洋生物活性物质是现代海洋生物学研究的热点(何家菀等,1999;张新宇等,2000),其中关于海藻抗肿瘤活性的报道很多(Lincoln *et al.*, 1991;纪明侯等,1960;史升耀等,1980)。70 年代以来美国等国家海洋生物资源进行了系统的筛选,发现了许多有抗肿瘤潜力的藻种和先导化合物(徐年军等,2000; Mizukoshi *et al.*, 1992; Cannell, 1993)。Patterson 等(1991)对 1500 株蓝藻提取物的筛选,发现 7% 的提取物具有抑制口腔癌 KB 细胞的活性。Gerwick 等(1994)对 501 种海藻提取物进行筛选,发现 42 种提取物具有对酶抑制剂的活性。Numata 等(1991)从 24 种大型海藻中筛选出抗 P388 白血病细胞的马尾藻属 *Sargassum tortile*。Harada 等(1997b)对日本沿海的 306 种海藻进行体外抗肿瘤活性筛选,发现了 80 种选择性抗 L1210 白血病细胞的藻种。我国海洋生物资源丰富,有海洋生物两万多种,其中海藻 2590 种以上(黄宗国,1994),但研究基础较差。要充分开发海洋生物资源,必须对我国海洋生物资源进行系统采集、活性筛选,以建立系统的资源库。本文对山东沿海海藻的筛选结果予以报道,从中发现了几种具有选择性抗肿瘤潜力的藻种,对不同溶剂的提取效果也作了比较研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

海藻样品采于青岛的太平角、湛山湾、团岛,以及威海的国际海水浴场、麻子山、小石岛、张村沙滩等地,采集时间主要为 2000 年 5 月,部分样品采于 1997 年 4 月。海藻样品由中国科学院海洋研究所夏邦美研究员和山东大学威海分校梅俊学副教授鉴定。肿瘤细

\* 国家自然科学基金重点资助项目,29932030 号;山东省自然科学基金项目资助,Q99E07 号。徐年军,男,出生于 1973 年 2 月,博士生,E-mail: fxiao@ms. qdio. ac. cn

收稿日期:2000-10-12,收修改稿日期:2001-01-10

胞株: 人口腔瘤 KB 细胞、HT-29 细胞和正常人体细胞 NIH-3T3 细胞均为中国医学科学院药物研究所提供。

## 1.2 方法

活性物质的提取: 分别以甲醇、酒精、乙酸乙酯、丙酮、正己烷、二氯甲烷、氯仿为提取溶剂。取清洗后晒干的海藻样品 15g, 粉碎后加入溶剂各 100ml, 室温提取 1d, 过滤。滤渣再重复提取一次, 合并两次的提取物, 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤, 真空旋转蒸发, 干燥后转入 Eppendorf 管低温保存, 待进行活性测定。

细胞毒活性筛选: 采用 MTT 法(韩锐, 1997), 对各海藻提取物进行 KB 细胞、HT-29 细胞和正常人体细胞 NIH-3T3 的活性筛选。取三种对数生长期的细胞, 加入适量 Trypin-EDTA 液, 使贴壁细胞脱落, 用 10ml 含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配成细胞悬液。用 96 孔培养板, 每孔依次加入稀释后的细胞悬液 100 $\mu$ l, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24h, 加入不同浓度梯度的海藻粗提物(250 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml), 相同条件下培养 2—4d, 加入 50 $\mu$ l MTT (浓度为 1mg/ml), 于 37 $^{\circ}$ C 培养 4h, 反应完毕后 MTT 还原成 Formazan, 吸出上清液, 用 150 $\mu$ l DMSO 溶解 Formazan, 用酶联免疫检测仪于 550nm 处测 OD 值。计算出各样品的半致死剂量 LD<sub>50</sub>值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 几种海藻的细胞毒活性筛选(表 1)

表 1 海藻的甲醇提取物对肿瘤细胞和正常细胞的半致死剂量 LD<sub>50</sub>( $\mu$ g/ml)

Tab. 1 LD<sub>50</sub>( $\mu$ g/ml) of methanol extract of marine algae toward tumor and normal cell

海藻名称	KB 细胞	HT- 29	NIH- 3T3	海藻名称	KB 细胞	HT- 29	NIH- 3T3
红藻门 Rhodophyta				绿藻门 Chlorophyta			
鸭毛藻( <i>Symphocladia latiuscula</i> )	36.20	43.34	> 50	孔石莼( <i>Ulva pertusa</i> )	29.93	14.93	23.89
松节藻( <i>Rhodomela confervoides</i> )	37.04	40.50	> 50	浒苔( <i>Enteromorpha</i> sp.)	> 50	> 50	> 50
多管藻( <i>Polysiphonia urcedata</i> )	40.00	26.01	42.36	刺松藻( <i>Codium fragile</i> )	> 50	> 50	> 50
细枝软骨藻( <i>Chondria tenuissima</i> )	42.79	> 50	> 50	褐藻门 Phaeophyta			
江蓠( <i>Graularia verucosa</i> )	> 50	> 50	> 50	小粘膜藻( <i>Leathesia difformes</i> )	12.65	40.60	> 50
蜈蚣藻( <i>Grateloupia</i> sp.)	> 50	> 50	> 50	点叶菜( <i>Punctaria latifolia</i> )	38.99	45.42	> 50
三叉仙菜( <i>Ceramium kondoi</i> )	> 50	> 50	> 50	粘膜藻( <i>Leathesia</i> sp.)	> 50	> 50	> 50
龙须菜( <i>Gracilaria sjostedtii</i> Kylin)	> 50	> 50	> 50	萱藻( <i>Scytosiphon lomentarius</i> )	—	—	—
日本仙菜( <i>Ceramium japonicum</i> Okam.)	> 50	49.33	> 50	鼠尾藻( <i>Sargassum thunbergii</i> )	> 50	> 50	> 50
波登仙菜( <i>Ceramium boydenii</i> Gepp)	> 50	> 50	> 50	海黍子( <i>Sargassum kjelimanianum</i> )	> 50	> 50	> 50
紫菜( <i>Porphyra</i> sp.)	> 50	50	> 50	单条肠髓藻( <i>Myelophycus simplex</i> )	> 50	> 50	> 50
扇形拟伊藻( <i>Ahrfeltiopsis flabelliformis</i> )	> 50	> 50	> 50	裙带菜( <i>Undaria pinnatifida</i> )	> 50	> 50	> 50
蜈蚣藻( <i>Grateloupia filicina</i> )	> 50	> 50	> 50	马尾藻( <i>Sargassum</i> sp.)	> 50	> 50	> 50
角叉菜( <i>Chondrus ocellatus</i> )	> 50	> 50	> 50	海带( <i>Laminaria japonica</i> )	> 50	> 50	> 50
小珊瑚藻( <i>Corallina officinales</i> )	> 50	> 50	> 50	水云( <i>Ectocarpus confervoides</i> )	> 50	> 50	> 50
海萝( <i>Gloiopeltis furcata</i> )	—	—	—	酸藻( <i>Desmarestia viridis</i> )	> 50	> 50	> 50
金膜藻( <i>Chrysmenon wrightii</i> )	> 50	> 50	> 50	绳藻( <i>Chorda filum</i> )	> 50	> 50	> 50
异管藻( <i>Heterosiphonia japonica</i> )	> 50	> 50	> 50	叉开网翼藻( <i>Dictyopteris divaricata</i> )	> 50	> 50	> 50
亮管藻( <i>Hyalosiphonia caespitosa</i> )	> 50	> 50	> 50	囊藻( <i>Calpomenia sinuosa</i> )	> 50	> 50	> 50
石花菜( <i>Gelidium amansii</i> Lamx)	> 50	> 50	> 50	厚点叶菜( <i>punctaria plantagina</i> )	> 50	> 50	> 50

实验结果表明,红藻门的鸭毛藻、松节藻、褐藻门的小粘膜藻、点叶菜的甲醇提取物具有较好的对 KB 细胞的选择性细胞毒活性。红藻门的多管藻、鸭毛藻、松节藻、褐藻门的小粘膜藻的甲醇提取物都具有较好的对 HT-29 细胞的选择性细胞毒活性。其中抗肿瘤活性最高的是小粘膜藻,其粗提物对 KB 细胞的  $LD_{50}$  为  $12.65\mu\text{g/ml}$ ,对 HT-29 细胞的  $LD_{50}$  为  $40.60\mu\text{g/ml}$ ,对正常细胞 NIH-3T3 基本上不具有毒性。孔石莼虽然对 KB 和 HT-29 细胞有较大的抑制活性( $LD_{50}$ 分别为  $29.93\mu\text{g/ml}$ 和  $14.93\mu\text{g/ml}$ ),但对正常细胞 NIH-3T3 也有毒性作用( $LD_{50}=23.89\mu\text{g/ml}$ )(表 1)。

本实验藻类均为常见海藻。Numata 等(1991)报道鼠尾藻、石花菜、江蓠都具有较强的对 P388 的抑制活性,而网翼藻不具有对 P388 的细胞毒活性,本实验结果表明,它们也不具有对 KB 和 HT-29 细胞的活性。殷丽明等(1988)报道红藻门的海萝、海头红(*Plocamium hamatum*)、蜈蚣藻、江蓠、软骨藻(*Chondria* sp.)的水提物在体外具有对 S-180 肿瘤细胞的直接抑制作用,而褐藻未发现对 S-180 有直接抑制作用。研究表明,不同时间和地点采集的同种海藻样品其活性也不一定相同(Patterson *et al.*, 1984)。由于肿瘤细胞系不同,同种海藻所生活的环境和采集时间也不相同,本实验结果与上述文献报道不尽相同,但海藻提取物对肿瘤细胞有抑制活性的实验结果是一致的。

抗肿瘤药物筛选中,选择性抑制作用是很重要的。本实验同时测定了活性组分对肿瘤细胞和正常细胞的作用,充分考虑了抗肿瘤组分的选择性活性。Harada 也注意了选择性抑制问题,他报道蜈蚣藻 *Grateloupia* 的 4 个种、角叉菜的水提物,软骨藻(*Chondria crassicaulis*)的甲醇提取物、粘膜藻和萱藻的水提物都能选择性抑制 L1210 活性,因而有可能分离出抗肿瘤物质。而刺松藻、*Enteromorpha intestinalis*、石花菜的甲醇提取物和网翼藻(*Dictyopteris* sp.)的甲醇提取物,海带、裙带菜的水提物,鼠尾藻的水、甲醇提取物同时具有对 L1210 和正常细胞 NIH-3T3 的抑制作用,这种非选择性的抑制作用在临床上几乎没有什么价值(Harada *et al.*, 1997a)。本实验筛选得到有选择性抑制肿瘤细胞的藻种有:小粘膜藻、多管藻、鸭毛藻、松节藻和点叶菜。

## 2.2 提取溶剂对海藻的提取效率的影响

在对所有海藻甲醇提取物细胞毒测试后,对 10 种分布量较大的海藻进行了溶剂提取效率实验。实验结果(表 2)表明,多管藻的酒精、氯仿提取物,萱藻的酒精提取物,叉开网翼藻的正己烷提取物具有对 KB 肿瘤细胞的强选择性活性,它们的  $LD_{50}$ 均小于  $4.40\mu\text{g/ml}$ 。萱藻的酒精提取物对 HT-29 肿瘤细胞还具有很强的选择性活性,其  $LD_{50}=1.49\mu\text{g/ml}$ 。多管藻的丙酮、正己烷提取物,鼠尾藻的丙酮、氯仿提取物,海萝的酒精、二氯甲烷、氯仿提取物,江蓠的乙酸乙酯提取物,叉开网翼藻的氯仿提取物都对 KB 细胞有一定的选择性抑制作用。多管藻的甲醇、正己烷提取物,海萝的乙酸乙酯提取物也具有一定的对 HT-29 细胞的选择性细胞毒活性。而蜈蚣藻、萱藻的粗提物具有对正常细胞的毒性。

从溶剂的提取效率看,酒精的提取效果最好,其次是氯仿。在 10 种海藻中,有 5 种海藻的酒精提取物具有强抗肿瘤活性,4 种海藻的氯仿提取物具有活性。对多管藻,丙酮和正己烷都是很好的溶剂,其提取物对 KB 细胞的  $LD_{50}$ 分别为  $14.31\mu\text{g/ml}$ 和  $23.54\mu\text{g/ml}$ 。江蓠的乙酸乙酯提取物具有对 KB 细胞的选择性活性, $LD_{50}=22.92\mu\text{g/ml}$ 。叉开网翼藻的正己烷

和氯仿提取物具有对 KB 细胞的活性, 其  $LD_{50}$  分别为  $4.40\mu\text{g/ml}$  和  $21.65\mu\text{g/ml}$ 。而常用于提取生物体有机物质的甲醇的提取效率并不好, 分析其原因为提取的物质较多, 活性成分含量较少,  $LD_{50}$  较大, 因而可能造成漏筛。

表 2 10 种海藻不同溶剂提取物的抗肿瘤活性 ( $LD_{50}$ )

Tab. 2 Antitumor activity ( $LD_{50}$ ) of different extracting solvent of ten species of algae

海藻	溶剂	KB 细胞 ( $\mu\text{g/ml}$ )	HT-29 ( $\mu\text{g/ml}$ )	NIH-3H3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	海藻	溶剂	KB 细胞 ( $\mu\text{g/ml}$ )	HT-29 ( $\mu\text{g/ml}$ )	NIH-3H3 ( $\mu\text{g/ml}$ )
多管藻	甲醇	40.00	26.01	42.36	海萝	酒精	11.83	> 50	> 50
	酒精	< 0.5	> 50	> 50		乙酸乙酯	39.33	12.26	> 50
	乙酸乙酯	> 50	50	> 50		正己烷	38.31	40.01	> 50
	丙酮	14.31	34.38	42.22		二氯甲烷	23.43	> 50	> 50
	正己烷	23.54	11.72	41.50		氯仿	19.83	> 50	> 50
	二氯甲烷	> 50	50	> 50					
	氯仿	2.02	> 50	> 50					
萱藻	酒精	2.60	1.49	35.30	江蓠	甲醇	> 50	> 50	> 50
	乙酸乙酯	51.78	17.24	25.92		酒精	> 50	> 50	> 50
	丙酮	> 50	> 50	> 50		乙酸乙酯	22.92	> 50	> 50
	正己烷	49.70	50	> 50		正己烷	> 50	> 50	> 50
	二氯甲烷	> 50	> 50	> 50		二氯甲烷	> 50	50	> 50
鼠尾藻	氯仿	> 50	> 50	> 50	叉开网翼藻	氯仿	> 50	> 50	> 50
	甲醇	> 50	> 50	> 50		甲醇	> 50	> 50	> 50
	酒精	> 50	> 50	> 50		酒精	> 50	> 50	> 50
	乙酸乙酯	> 50	> 50	> 50		乙酸乙酯	52.81	> 50	> 50
	丙酮	27.24	> 50	> 50		丙酮	> 50	> 50	> 50
孔石莼	正己烷	> 50	> 50	> 50	蜈蚣藻	正己烷	4.40	53.46	> 50
	二氯甲烷	> 50	> 50	> 50		二氯甲烷	47.10	42.84	> 50
	氯仿	25.05	> 50	> 50		氯仿	21.65	30.43	> 50
	甲醇	29.93	14.93	23.89		甲醇	> 50	> 50	> 50
	酒精	22.26	> 50	44.14		乙酸乙酯	25.90	> 50	> 50
浒苔	乙酸乙酯	33.91	47.44	43.14	蜈蚣藻	丙酮	59.82	46.52	34.90
	丙酮	44.82	27.44	44.96		正己烷	27.31	49.77	20.99
	正己烷	> 50	44.87	> 50		二氯甲烷	48.60	41.09	13.06
	氯仿	45.27	44.38	45.48		氯仿	47.56	38.63	25.92
	甲醇	> 50	> 50	> 50		甲醇	> 50	> 50	> 50
浒苔	酒精	> 50	42.42	> 50	蜈蚣藻	酒精	> 50	> 50	> 50
	乙酸乙酯	48.63	50	> 50		乙酸乙酯	46.15	50	> 50
	丙酮	43.71	50.86	42.42		丙酮	55.59	> 50	> 50
	正己烷	> 50	> 50	> 50		正己烷	> 26	26	> 50
	二氯甲烷	50.31	42.33	48.92		二氯甲烷	> 50	50	> 50
	氯仿	48.37	47.41	> 50	氯仿	60.42	> 50	> 50	

提取溶剂是活性筛选的一个重要因素,因为不同溶剂提取的成分不同。如甲醇和乙醇提取物包括极性和非极性成分,是常用的提取溶剂。正己烷仅提取非极性强的组分,水提取物为强极性物质。Patterson 等(1984)在进行抗肿瘤活性筛选时,对提取溶剂进行了探讨,结果显示不同溶剂的提取物活性相差很大。如多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)的二氯甲烷提取物在剂量为 6mg/kg 时,对 P388 淋巴白细胞的 T/C 值为 178%,而其正丁醇提取物在 33mg/kg 时的 T/C 值为 133%。Numata 等(1991)对日本沿海海藻的 CCl<sub>4</sub>、CHCl<sub>3</sub> 和正己烷组分进行了研究,如对红藻 *Amphiloa zonata* 活性提取物的溶解性研究表明,不同溶剂的提取物的化学性质有很大的差异,通过溶剂实验可大致知道活性成分的极性等性质,从而为进一步分离纯化活性化合物提供理论依据(Harada *et al.*, 1997a)。本实验分别以 7 种溶剂提取 10 种海藻样品,结果表明,不同海藻的活性组分不同,所以选择适宜的溶剂能更有效地得到提性物质。

本实验所筛选得到的几种海藻,通过重复实验证明具有很强的选择性抗肿瘤活性,并且有丰富的资源。从药物开发的角度看,充分具备了进一步开发研究的条件,有很好的开发利用前景。

### 参 考 文 献

- 史升耀, 纪明侯, 1965. 几种食用海藻中抗坏血酸含量的测定. 海洋与湖沼, 7(1): 67—72
- 纪明侯, 史升耀, 曾呈奎, 1960. 我国几种经济褐藻的含碘量测定. 海洋与湖沼, 3(3): 205—213
- 何家苑, 施之新, 张银华等, 1999. 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析. 海洋与湖沼, 30(2): 172—179
- 张新宇, 王 雷, 李光友等, 2000. 绿色巴夫藻硒多糖的提取、分离与纯化. 海洋与湖沼, 31(6): 643—646
- 徐年军, 范 晓, 韩丽君, 2000. 藻类抗肿瘤物质的研究. 中国海洋药物, 19(6): 30—36
- 殷丽明, 魏云莉, 丁 伟, 1988. 青岛沿海常见海藻抗肿瘤及抗菌活性初报. 中国海洋药物, 7(1/2): 39—41
- 黄宗国主编, 1994. 中国海洋生物种类与分布. 北京: 海洋出版社, 15—233
- 韩 锐主编, 1997. 抗癌药物研究与实验技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 284—286
- Canndl J P R, 1993. Algae as a source of biologically active products. Pestic Sci, 39: 147—153
- Gerwick W H, Roberts M A, Proteau P J *et al.*, 1994. Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity. J Appl Phycol, 6: 143—149
- Harada H, Kamei Y, 1997a. Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines. Cytotechnology, 25: 213—219
- Harada H, Noro T, Kamei Y, 1997b. Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coast. Biol Pharm Bull, 20(5): 541—546
- Lincoln A R, Strupinski K, Walker M J, 1991. Bioactive compounds from algae. Life Chem Rep, 8: 97—183
- Mizukoshi S, Matsuoka H, Katou H *et al.*, 1992. Search for bioactive substances from marine algae. Bull Fac Biosour Mie Univ Mieda Seibutsushigen Kiyu, 8: 27—34
- Numata A, Kanbara S, Takahashi C *et al.*, 1991. Cytotoxic activity of marine algae and a cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. Chem Pharm Bull, 39(8): 2129—2131
- Patterson G M L, Baldwin C L, Bplis C M *et al.*, 1991. Antineoplastic activity of cultured bluegreen algae (Cyanophyta). J Phycol, 27: 530—536
- Patterson G M L, Norton T R, Furusawa E *et al.*, 1984. Antineoplastic evaluation of marine algal extracts. Bot Mar, XXVII: 485—488

## SCREENING MARINE ALGAE FROM SHANDONG COAST FOR ANTITUMOR ACTIVITY

XU Nian-Jun, FAN Xiao, HAN Li-Jun, YAN Xiao-Jun, ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** In order to study the antitumor activity of extracts from Shandong marine algae, 96 crude extracts of 39 species belonging to the classes Rhodophyceae, Chlorophyceae and Phaeophyceae were assayed for anti-KB and HT-29 activity. The algae were collected from the coastal areas of Qingdao and Weihai, Shandong Province in April 1997 and May 2000. Some kinds of seaweed showed potential antineoplastic activities, such as *Leathesia difformes*, *Polysiphonia urcedata*, *Scytosiphon lomentarius*, *Gloiopeltis furcata*, *Dictyopteri divaricata*, *Punctaria latifolia*, *Symphyccladia latiuscula*, *Rhodomela confervoides*, and *Gracilaria verrucosa*.

The extracts of *Leathesia difformes* have most potent cytotoxicity to KB cells ( $LD_{50} = 12.65 \mu\text{g/ml}$ ) and low activities to normal cells ( $LD_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ ). The cytotoxic activities were found prominent in the methanolic extracts of *Polysiphonia urcedata* ( $LD_{50} = 26.01 \mu\text{g/ml}$  against Human Tumor-29). The other algae, *Symphyccladia latiuscula*, *Rhodomela confervoides* and *Punctaria latifolia*, had also shown marked inhibition of growth of KB cells, and the extracts of the *Symphyccladia latiuscula*, *Rhodomela confervoides* had shown selective activities against HT-29 cells.

Different extracting solvents of ten species of seaweed were each examined for their extracting efficiency. It turned out that ethanol was the best one, then chloroform, both of them were better than methanol. The extracts of ethanol and chloroform of *Polysiphonia urcedata*, the ethanolic extracts of *Scytosiphon lomentarius* and the hexane extracts of *Dictyopteri divaricata* have strong selective cytotoxic activities; all of the  $LD_{50}$  against KB are less than  $4.40 \mu\text{g/ml}$ . The ethanolic extracts of *Scytosiphon lomentarius* have mighty activities against HT-29 cells ( $LD_{50} = 1.49 \mu\text{g/ml}$ ).

As all the algae grew broadly on the Shandong coast and their extracts inhibited KB or HT-29 tumor cells with a low side effect, they are promising sources for antitumor drugs.

**Key words** Marine algae, Antitumor activity, Screening, MTT assay