

海藻真菌抗肿瘤活性的初步研究

张 决, 郑忠辉*, 黄耀坚, 李盛英, 苏文金

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 从福建漳州浯屿岛和漳州浮宫海岸潮间带采集到的 10 种海藻中分离到 66 株海藻真菌, 采用 MTT 法对其发酵液乙酸乙酯抽提物的抗肿瘤活性进行检测, 发现 34 株菌株对 KB 和/或 Raji 肿瘤细胞具有显著的抑制活性, 占供测菌株的 52%。其中对 KB 细胞有抑制作用的菌株有 21 株, 对 Raji 细胞有抑制作用的菌株有 30 株, 对两种肿瘤细胞均有抑制作用的菌株有 17 株, 分别占活性菌株的 62%、88% 和 50%。实验结果表明, 海藻真菌是潜在的抗肿瘤药物资源。

关键词: 海藻; 海藻真菌; 抗肿瘤

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

海洋的面积占地球表面积的 71%, 广阔的海洋及其环境的特殊性不但导致了海洋生物物种及生态功能的多样性, 而且还致使海洋生物活性代谢产物化学类型与陆生生物有很大的差别, 其中有许多活性代谢产物是陆地生物所没有的。因此, 海洋生物已成为各国科学家寻找新药的宝贵资源。

近几十年来, 国内外已从海藻、海参、海绵、珊瑚、海鞘等不同的海洋动植物中分离到许多具有不同生物活性的新化合物, 其中有不少化合物具有很好的药用前景^[1, 2]。然而, 大多数海洋动植物不仅资源量非常少, 而且活性物质含量低、结构复杂, 因此直接利用这些海洋生物资源进行产业化开发或采用化学合成生产均受到限制。

海洋微生物是海洋生物的重要成员, 这类微生物不但可以产生与陆生生物不同的生物活性物质, 而且还可产生与其他海洋生物相同或相似的活性化合物。近年来的研究还表明, 一些海洋动植物产生的活性物质实际上是由与其共附生的海洋微生物所产生的^[2, 3]。此外, 海洋微生物还具有可以利用现代微生物发酵技术进行生产、不破坏海洋生态资源、无原

材料后顾之忧、易实现产业化等优势。因此, 这类微生物被认为是最具开发前景的可持续性利用药源。

海藻真菌是泛指生活在海藻体表或体内的一类真菌。海藻真菌不但宿主分布非常广泛, 而且具有丰富的种类多样性及代谢产物类型多样性。因此, 国外近年来对海藻真菌活性物质的研究逐渐增多。已从海藻真菌中发现了一些具有抗菌、抗肿瘤等作用的新型生物活性物质^[4~6]。如 Shigemori H 等^[4]从 1 株海洋来源的真菌中分离出 1 个具有抗菌活性的五肽, Seragakinone A; Yamada T 等^[5]从 1 株海藻真菌中分离的化合物 Leptonsins M, M₁, N 和 N₁ 均具有抗肿瘤活性。

我国海藻分布广, 种类多, 目前已鉴定的海藻就有 2 500 多种, 在这些海藻中广泛分布着各种海藻真菌, 具有得天独厚的海藻真菌资源优势。然而, 国内对海藻真菌的研究极少, 迄今为止鲜见对海藻真菌活性物质的研究报道。

本文对采自于福建漳州浯屿岛和漳州浮宫海岸潮间带的 10 种海藻真菌进行了较为系统的分离, 并从中筛选抗肿瘤活性物质产生菌, 旨在发掘具有潜在应用前景的抗肿瘤活性菌株, 为开发新的微生物药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1) 海藻样品及来源

收稿日期: 2003-07-14

基金项目: 国家“863”计划(2001AA620401)和自然科学基金(30070024)资助

作者简介: 张决(1978—), 男, 硕士研究生。

*Corresponding author

盘苔 (*Blidingia minima* Kylin)、蛎菜 (*Ulva conglobat* Kjellm)、狭叶海带 (*Laminaria angustata* Kjellman)、凹顶藻 (*Laurencia chinensis* Tseng)、小杉藻 (*Gigartina intermedia* Suringar)、珊瑚藻 (*Corallina officinalis* Linne)、刺松藻 (*Codium fragila* Hariod)、石花菜 (*Gelidium amansii* Lamx.) 和两种浒苔 (*Enteromorpha* sp. A 和 *Enteromorpha* sp. B)。这些海藻样品均采自福建漳州浯屿岛或漳州浮宫海岸潮间带。

2) 真菌培养基

分离培养基(水琼脂): 琼脂 15 g, 海水 1 000 mL, 倒平板之前加庆大霉素至终浓度 100 mg/L。

液体发酵培养基: 马铃薯葡萄糖(PD, Potato dextrose)培养基, 葡萄糖蛋白胨酵母膏(GPY, Glucose pepton yeast)培养基。

3) 细胞培养基

RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 1640 培养基, 加 10% 灭活(56℃, 30 min)的小牛血清和 1% 三抗(青霉素、链霉素和卡那霉素)。

4) 肿瘤细胞株

人口腔上皮癌 KB 细胞购于中科院上海细胞所; 人 B 淋巴瘤 Raji 细胞由厦门大学生命科学院兄弟实验室惠赠。

1.2 方法

1) 海藻真菌的分离

用自来水将海藻样品表面冲洗干净, 采用 75% 乙醇表面消毒 5~30 s, 接着用无菌水洗 3 次。根据海藻形状的不同, 将处理后样品剪成约 0.5 cm×0.5 cm 的小块或 0.5 cm 长的小段, 然后将其铺在含抗生素的分离培养基表面, 放置 25℃ 培养, 待菌丝长出后, 挑出单菌落于斜面上, 经过纯化后得到海藻真菌。

2) 菌株的培养及测定样品的制备

从活化斜面中取菌丝块或孢子分别接种于 PD 和 GPY 液体培养基中, 于 25℃、120 r/min 振荡培养 7 d。发酵液经冻融、匀浆后, 加入等体积的乙酸乙酯振荡萃取。上层有机相在 45℃ 下减压浓缩至干(抽提物), 加甲醇(1~1.5 mL)溶解后作为待测样品, 测定前再用细胞培养液进行适当稀释

3) 抗肿瘤活性测定

用 MTT 法^[7] 测定发酵液抽提物的抗肿瘤活性。把培养好的肿瘤细胞制成单细胞悬液, 用血细胞板计数并稀释至细胞浓度为 6×10⁴ 个/mL。于 96 孔板中接种细胞, 每孔 80 μL。另设 2 孔无细胞、仅

有 80 μL 培养液的用于仪器调零的空白对照孔。置 37℃, 5%CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 然后加入 20 μL 用培养液稀释好的样品。同时, 往阳性对照孔加 20 μL 顺铂, 往阴性对照孔和空白对照孔各加 20 μL 培养液。继续培养 72 h, 每孔加 10 μL 5 mg/mL MTT。37℃ 反应 3 h, 每孔加 100 μL 10% SDS-0.01N HCl 溶解过夜。酶标仪比色测定(测定波长 570 nm, 参考波长 655 nm)。

IC₅₀表示样品对肿瘤细胞的抑制率为 50%时的浓度。

对肿瘤细胞的抑制率按下式计算:

抑制率 =

$$\frac{\text{阴性对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{阴性对照组 OD 值}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 海藻真菌的分离

从福建省漳州浯屿岛和漳州浮宫海岸潮间带采集的盘苔、蛎菜、海带、凹顶藻等 10 种大型海藻中共分离得到 66 株海藻真菌。其中从蛎菜分离到的菌株数达 17 株, 占总分离菌株的比例最高; 从浒苔 A、浒苔 B 和盘苔分离到的菌株也较多, 分别占 21%、19% 和 9%。菌株的分离结果见表 1。

由表 1 可看出, 所采集的几种较大型海藻中均可以分离到生活于藻体内的海洋真菌, 但分离到菌株数差别较大, 分离率也有明显不同。大型海藻体内虽然都普遍存在着海洋真菌, 但藻体内真菌的丰度及种类的多少除了与宿主的种类有关外, 还受到藻龄(藻体生长期)的长短及其生长环境的生态因子等诸多因素的影响。初步分离结果看出, 藻龄的长短可能是主要的影响因素之一。所采集的样品如果生长期较长及藻体较大, 一般均可分离到较多的菌株。这可能与藻龄较长的藻体由于其生理状况和表面结构发生了较大的改变而变得较容易被真菌侵入, 以及藻龄较长的藻体有更多机会被真菌反复侵染有关。

2.2 海藻真菌的抗肿瘤活性

将分离到的 66 株海藻真菌分别用 PD 和 GPY 2 种液体培养基进行发酵, 以人口腔上皮癌 KB 细胞和人 B 淋巴瘤 Raji 细胞为指示瘤株, 采用 MTT 法对发酵液乙酸乙酯抽提物的抗肿瘤活性进行测定。结果(表 2)显示, 采用 PD 培养基发酵时有 28 株菌株对肿瘤细胞有抑制作用, 采用 GPY 培养基时则有 24 株有抑制作用。由于其中有 18 株菌株在 2 种培养基中发酵时均具有活性(表 3、表 4), 因此实际

筛选到对 KB 和/或 Raji 细胞有显著抑制作用的活性菌株一共是 34 株, 占供测菌株的 52%, 表明海藻

真菌中蕴藏着许多抗肿瘤活性菌株, 而且其宿主的分布较为广泛。

表 1 海藻内生真菌的分离结果*

Tab. 1 The isolation results of algicolous fungi in different alga

海藻种类	采集地	分离菌株数	比例/%
盘苔(<i>Blidingia minima</i> Kylin)	漳州浯屿岛	6	9
蛎菜(<i>Ulva. conglobat</i> Kjellm)	漳州浯屿岛	17	26
狭叶海带(<i>Laminaria angustata</i> Kjellman)	漳州浯屿岛	1	2
凹顶藻(<i>Laurencia chinensis</i> Tseng)	漳州浯屿岛	1	2
小杉藻(<i>Gigartina intermedia</i> Suringar)	漳州浯屿岛	1	2
珊瑚藻(<i>Corallina officinalis</i> Linne)	漳州浯屿岛	1	2
刺松藻(<i>Codium fragila</i> Hariod)	漳州浯屿岛	3	5
石花菜(<i>Gelidium amansii</i> Lamx.)	漳州浯屿岛	2	3
浒苔 A(<i>Enteromorpha</i> sp. A)	漳州浮宫	14	21
浒苔 B(<i>Enteromorpha</i> sp. B)	漳州浮宫	12	19
总计		66	100

*: 每种藻都用 5 个平板分离, 每个平板接 5 小块样品。

表 2 抗肿瘤活性菌株的宿主分布

Tab. 2 The host distribution of algicolous fungi with antitumor activitiy

宿主	供测菌株数	培养基	活性菌株数		
			抗 KB	抗 Raji	抗 KB 和 Raji
盘苔	6	PD			2
		GPY			1
蛎菜	17	PD	1	4	3
		GPY	1	2	1
狭叶海带	1	PD			
		GPY			
凹顶藻	1	PD			1
		GPY			
小杉藻	1	PD		1	
		GPY			
珊瑚藻	1	PD			
		GPY			
刺松藻	3	PD		1	
		GPY			1
石花菜	1	PD	1		
		GPY		1	
浒苔 A	14	PD	2	1	1
		GPY	2	4	1
浒苔 B	16	PD	1	7	2
		GPY		7	3
总计	66	PD	4	14	10
		GPY	4	14	6

表 3 PD 培养基发酵时海藻真菌的抗肿瘤活性^a
Tab. 3 The antitumor activity of algicolous fungi cultured on PD medium

菌株	分离源	抑制活性			
		KB 细胞		Raji 细胞	
		× 100	× 1 000	× 100	× 1 000
PT2	盘苔	+++	++	+++	+++
PT4	盘苔	+	-	+++	-
LC3	蛎菜	++	-	-	-
LC4	蛎菜	+	-	++	-
LC5	蛎菜	-	-	++	+
LC10	蛎菜	++	++	+++	+++
LC11	蛎菜	-	-	+++	-
LC13	蛎菜	++	-	+++	+++
LC15	蛎菜	-	-	+	-
LC16	蛎菜	-	-	+	-
XSZ1	小杉藻	-	-	++	++
SCH1	石花菜	++	-	-	-
CS2	刺松藻	-	-	+	+
AD1	凹顶藻	+	-	++	-
A1	浒苔 A	+	-	-	-
A2	浒苔 A	++	+	-	-
A13	浒苔 A	-	-	+++	+
A14	浒苔 A	+	-	+++	+++
B1	浒苔 B	-	-	+++	-
B2	浒苔 B	++	-	+++	+++
B3	浒苔 B	-	-	+++	-
B5	浒苔 B	-	-	+++	+++
B7	浒苔 B	-	-	+++	+++
B10	浒苔 B	-	-	++	-
B11	浒苔 B	-	-	+++	-
B12	浒苔 B	-	-	+++	++
B13	浒苔 B	+	+	+++	+++
B14	浒苔 B	+	-	+++	+

^a × 100、× 1 000 是指发酵液抽提物甲醇溶解液样品再稀释 100 倍或 1 000 倍; 空白对照(甲醇用培养基稀释 100 倍)对肿瘤细胞无抑制作用; +++: 抑制率= 100%; ++: 100% < 抑制率 ≥ 80%; +: 80% < 抑制率 ≥ 50%; -: 抑制率 < 50%

由表 3、4 可知, 在 34 株活性菌株中, 对 KB 细胞有抑制作用的菌株有 21 株, 对 Raji 细胞有抑制作用的菌株有 30 株, 对两种肿瘤细胞都有抑制作用的菌株有 17 株, 分别占活性菌株的 62%、88% 和 50%。在活性菌株中, 有不少菌株具有较高的抗肿瘤活性, 当其发酵液抽提物样品稀释 1 000 倍时, 对 KB 细胞或 Raji 细胞的抑制率仍然 ≥ 50%。

从表 3、4 中还可以看出, 同一批分离的菌株在 2

种不同的培养基中进行发酵, 所获得的活性菌株有较大的差别。PT4、LC3、LC4 等 10 株菌株采用 PD 培养基发酵时具有活性, 但用 GPY 培养基发酵时却没有活性; LC7、A4、A6 等 6 株菌株则只在 GPY 培养基中发酵时具有活性。一些菌株尽管在两种培养基中都具有活性, 但其活性代谢产物的抗癌谱及活性的强弱却有显著差异, 如 B2、LC16 和 SCH1 等菌株。不同的培养基对海洋真菌代谢产物的影响国外

已有一些报道, 如 Malmstrom 等人^[8] 发现海洋真菌 *Penicillium stekii* 在 MEA、CAT、SYES、CYA 和 YES 5 种不同培养基中不但菌株的生长情况有所不同, 而且代谢产物的成分也有较大的差异. 当该菌株用 CYA 培养基进行发酵时, 从发酵液中分离到 2 个新的化合物 tanzawaic acids E 和 F, 而以 YES 进行发酵时, 则分离到另外 1 个新代谢产物. Iwamoto 等人^[6,9] 在对 1 株海藻真菌活性代谢产物进行研究时也发现该菌株在不同的培养基中可产生不同的新活性物质. 我们的实验结果也表明, 不同的培养基对海藻真菌活性代谢产物的合成有较大的影响. 因此, 从海洋真菌中筛选抗肿瘤活性菌株时, 可选择多种培养基同时进行发酵. 这样不但可提高活性菌株的筛选得率, 而且有可能获得更多的新活性物质.

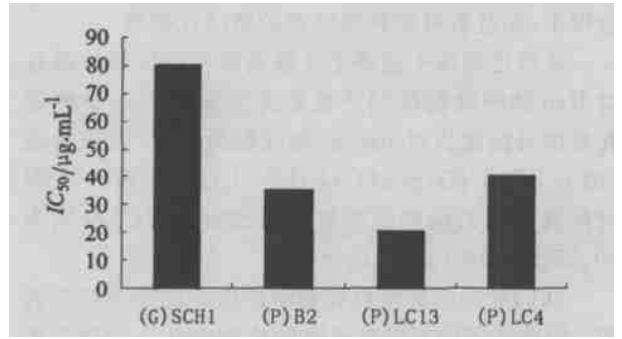


图 1 海藻真菌发酵液抽提物对 Raji 细胞的 IC₅₀ (G): 采用 GPY 培养基发酵; (P): 采用 PD 培养基发酵

Fig. 1 IC₅₀ of different algal fungus extracts against Raji cell

表 4 GPY 培养基发酵时海藻真菌的抗肿瘤活性*

Tab. 4 The antitumor activity of algal fungus cultured on GPY medium

菌株	分离源	抑制活性			
		KB 细胞		Raji 细胞	
		× 100	× 1 000	× 100	× 1 000
PT2	盘苔	++	+	+++	-
LC5	蛎菜	-	-	+++	-
LC7	蛎菜	++	-	-	-
LC11	蛎菜	-	-	+	-
LC16	蛎菜	++	-	+++	++
SCH1	石花菜	-	-	++	++
CS2	刺松藻	+	-	+	-
A1	浒苔 A	-	-	+++	-
A2	浒苔 A	++	+	-	-
A4	浒苔 A	-	-	+++	+++
A6	浒苔 A	++	+	+++	+++
A7	浒苔 A	-	-	+	-
A9	浒苔 A	+++	+	-	-
A13	浒苔 A	-	-	+	-
B1	浒苔 B	-	-	+++	++
B2	浒苔 B	-	-	+++	++
B3	浒苔 B	-	-	+++	+++
B4	浒苔 B	++	-	-	-
B5	浒苔 B	-	-	+++	+++
B7	浒苔 B	-	-	+++	+++
B11	浒苔 B	-	-	+++	++
B12	浒苔 B	+	-	+++	+
B13	浒苔 B	-	-	+++	+++
B14	浒苔 B	+	-	+++	-

*: 见表 3.

从活性菌株中选择了4株菌落特征比较特殊且对Raji肿瘤细胞抑制活性较高的菌株进一步测定其发酵液抽提物对Raji肿瘤细胞的 IC_{50} ,结果表明(图1),菌株(G)SCH1、(P)B2、(P)LC13和(P)LC4发酵液乙酸乙酯抽提物对Raji细胞的 IC_{50} 分别为80、35、20和40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

我们对海藻真菌抗肿瘤活性物质的初步研究表明,海藻真菌中蕴藏着丰富的抗肿瘤活性物质产生菌,是开发抗肿瘤新药的宝贵资源.

参考文献:

- [1] Monks N R, Lerner C, Henriques A T, et al. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 281: 1—12.
- [2] 刘志鸿,程力,牟海津.海洋微生物活性物质的研究概况[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(4):99—103.
- [3] Namiloshia M, Akano K, Koboyashi H. Distribution of marine filamentous fungi associated with marine sponges in coral reefs of palauan bunaken island, Indonesia[J].

- Journal of Tokyo University Fisheries 2002, 88: 15—20.
- [4] Shigemori H, Komatsu K, Mikami Y, et al. Seragakinone A, a new pentacyclic metaboite from a marine-derived fungus[J]. *Tetrahedron*, 1999, 55: 14 925—14 930.
- [5] Yamada T, Iwamoto C, Yamagaki N, et al. Leptosins M-N1, Cytotoxic metabolites from a Leptosphaeria species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities[J]. *Tetrahedron*, 2002, 58: 479—487.
- [6] Iwamoto C, Yamada T, Ito Y, et al. Cytotoxic cytochalasins from a *Penicillium* species separated from a marine alga[J]. *Tetrahedron*, 2001, 57: 2 997—3 004.
- [7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. *Immunol Methods* 1983, 65: 55—63.
- [8] Malmstruma J, Christophersena C, Frisvad J C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species[J]. *Phytochemistry*, 2000, 54: 301—309.
- [9] Iwamoto C, Minoura K, Oka T, et al. Absolute stereostructures of cytotoxic metabolites penostatins A-E, from a *Penicillium* species separated from an *Enteromorpha* alga[J]. *Tetrahedron*, 1999, 55: 14 353—14 368.

The Antitumor Activity of Algicolous Fungi

ZHANG Jue, ZHENG Zhong-hui^{*}, HUANG Yao-jian, LI Sheng-yin, SU Wen-jin

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Algicolous fungi refer to those fungi which distribute on the surface or inside of algae. Although almost one-third of all known higher marine fungi are associated with algae, algicolous fungi are relatively little investigated. Therefore, in this investigation, we focused on screening algicolous fungi for antitumor, activity and prepare for the future research of bioactive metabolizes. Ten marine algae samples investigated in this study were originated from different intertidal zones of Fujian Province, China. From those algae, sixty-six strains of algicolous fungi were isolated by using selective medium. Those fungi were cultured on PD medium and GPY medium. Organic extracts were screened by the way of MTT (Methyl Thiazolyltetrazolium). As a result, thirty-four strains of the fungi show antitumor activity. The ratio of such active fungi to total offered fungi is 52%. In those fungi, twenty-one strains of fungi demonstrated antitumor activity against KB cell, thirty against Raji cell and seventeen against both KB cell and Raji cell. The ratio of such fungi to total fungi with antitumor activity is 62%, 88% and 50% individually. Furthermore, four fungal extracts, namely (G)SCH1, (P)B2, (P)LC13 and (P)LC4, were chosen to study the IC_{50} against Raji cell. The value of them is 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. Those results indicated that algicolous fungi would be a promising resource of antitumor medicament.

Key words: alga; algicolous fungi; antitumor