

有关 HSYA 对新生血管生成过程中其他环节如 VEC 迁移、黏附等方面的作用, 因此对于 HSYA 是如何通过促进 VEC 增殖途径导致新血管生成的具体机制仍不清楚, 需要在今后的实验中进一步阐明。

VEGF 已被证实具有强大促 VEC 增殖作用, 其可由内皮细胞释放, 特异性作用于 VEC, 是当今发现的最强的内源性 VEC 分裂原^[11]。HSYA 在 1×10^{-3} mol/L 浓度下与 VEGF 2.6×10^{-7} mol/L 在各时间点对 VEC 的促增殖作用强度相当, 表明 HSYA 作为天然化合物, 对 VEC 增殖有着较强的活性, 这可能是其促新血管生成的细胞学基础。从本实验结果可以进一步考虑, 在当今从天然药物中寻找高效低毒的治疗心脑血管死性疾病药物的国际呼声日趋高涨的形势下, 与国外运用的高通量活性筛选方法相比, 以传统的活血化瘀类中药作为切入点, 则不失为寻找开发促血管新生药物的一条捷径。

致谢: 山东省天然药物工程技术研究中心马成俊博士提供 HSYA。

参考文献:

[1] Gibaldi M. Regulating angiogenesis: a new therapeutic strategy [J]. *J Clin Pharmacol*, 1998, 38: 898-903.
 [2] Hendel R C, Henry T D, Rocha-Singh K, et al. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for dose-dependent effect [J]. *Circulation*, 2000, 101: 118-121.
 [3] 臧宝霞, 金 鸣, 李金荣. 羟基红花黄色素 A 抗凝作用的研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(5): 741-743.
 [4] 金 鸣, 李金荣, 吴 伟. 羟基红花黄色素 A 抗氧化作用的研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(6): 665-666.
 [5] Zhu H B, Wang Z H, Ma C J, et al. Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 429-433.
 [6] Gargett C E, Bucak K, Roger P A. Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(2): 293-301.
 [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
 [8] 陈丽华, 金伯泉, 贾 卫, 等. 一种新的人内皮细胞可诱变性粘附分子 PTAL 的表达、调变及粘附功能 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2000, 16(1): 23-26.
 [9] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996.
 [10] Schumacher B, Pecher P, von Specht B U, et al. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors [J]. *Circulation*, 1998, 97(7): 645-650.
 [11] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 669-676.

鼠尾藻多酚的抗肿瘤活性研究

魏玉西¹, 孙 岫², 王长云³, 王春波^{1*}

(1. 青岛大学医学院, 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学 科研处, 山东 青岛 266071; 3. 中国海洋大学医药学院 海洋药物研究所 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 目的 研究鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* 多酚对肺癌 A-549 细胞和肝癌 BEL-7402 细胞体外增殖的抑制作用。方法 采用有机溶剂提取、透析法获得鼠尾藻多酚 STK1 (相对分子质量 $> 1 \times 10^4$) 和 STK2 (相对分子质量 $< 1 \times 10^4$), 采用磺酰罗丹明 B (SRB) 蛋白染色法检测体外细胞增殖抑制率。结果 STK1 在质量浓度为 87.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制率分别为 90.7% 和 89.3%; STK2 在质量浓度为 340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制率分别为 89.9% 和 90.1%。在相同质量浓度下 STK1 比 STK2 活性强。结论 鼠尾藻多酚化合物 (STK1 和 STK2) 对人肺腺癌 A549 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞均有较强的抑制作用, 相对分子质量高的 STK1 具有更强的抑制活性。

关键词: 鼠尾藻; 多酚; 肺癌 A-549 细胞; 肝癌 BEL-7402 细胞; 增殖

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)01-0093-03

鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* (Mert.) O. Kuntze 是一种广布于我国沿海的一种褐藻, 系统分类上隶属于马尾藻科、马尾藻属。该藻集生于中潮带和低潮带岩石, 或在高、中潮带的水陆或石沼中。研究表明, 鼠尾藻中除富含胶质、甘露醇、碘、钾、锌、铜等有效成分外, 尚含有由间苯三酚作为单体组成的

褐藻多酚类物质, 它们作为次级代谢产物具有许多生物活性, 如抗氧化^[1,2]、抑菌^[3]、拒食等^[4]。因此, 鼠尾藻除在海洋生态系统中占有重要地位外, 在医药、保健、水产养殖及化学工业等行业中也具有许多可开发的潜力^[5,6]。到目前为止, 对鼠尾藻的抗肿瘤活性研究多以多糖成分或粗提物为研究对象, 如鼠尾

* 收稿日期: 2007-03-01
 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572314); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目 (BS07002)
 作者简介: 魏玉西 (1964—), 男, 山东青岛人, 博士, 教授, 研究方向为海藻化学与海洋药物。
 Tel: (0532) 85953227 E-mail: yuxiw729@163.com

藻多糖对艾氏腹水瘤有显著抑制效果^[7], 明显抑制 Lewis 肺癌转移^[8]; 鼠尾藻醇提取物能抑制人食道癌细胞生长, 对小鼠 S₁₈₀肉瘤也有抑制作用^[9], 但未见有关鼠尾藻中多酚类化合物抗肿瘤活性的研究报道。本实验研究鼠尾藻多酚对 A-549 人肺腺癌细胞株和 BEL-7402 人肝癌细胞株增殖的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料: 鼠尾藻 *S. thunbergii* (Mert.) O. Kuntze 采于青岛太平角海滨, 由中国科学院海洋研究所陆保仁研究员鉴定; 人肺腺癌 A-549 细胞株、人肝癌 BEL-7402 细胞株 (购于上海生物化学与细胞生物研究所); RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司生产)。小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司生产), 磺酰罗丹明 B (SRB, 美国 Sigma 公司); 其他试剂均为分析纯。酶联免疫检测仪 (Bio-Rad M3550), 96 孔培养板 (FaLCON), CO₂ 培养箱。

1.2 鼠尾藻多酚的制备: 参照文献方法^[4]。取新鲜藻体顶部, 用组织捣碎机破碎, 85% 乙醇溶液室温避光提取 12 h 得粗提液, 经减压蒸馏除去乙醇后, 滤过, 所得滤液分别用 1/2 体积乙醚和氯仿各洗涤两次, 静置分层。弃去有机相, 水相经醇析、减压蒸馏得褐藻多酚精提液。将此精提液对蒸馏水透析, 透析内、外液分别经减压浓缩、微孔滤膜滤过, 得鼠尾藻多酚 STK1 (相对分子质量 > 1 × 10⁴, 3.5 mg/mL) 和 STK2 (相对分子质量 < 1 × 10⁴, 13.6 mg/mL), 4 保存备用。多酚定量见文献方法^[10]。

1.3 细胞培养: 将 A-549 细胞、BEL-7402 细胞培养于含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中传代培养。

1.4 鼠尾藻多酚处理及其对 A-549 细胞、BEL-7402 细胞生长抑制率的测定: 采用 SRB 蛋白染色法^[11]检测细胞增殖抑制率。取对数生长期的 A-549 细胞、BEL-7402 细胞, 用新鲜的 RPMI-1640 培养基配制成 2 × 10⁵/mL 的细胞悬液, 按每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 每孔加入用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液配制成的样品液 100 μL。每种肿瘤细胞共测定 5 个药物质量浓度, 即分别将初始质量浓度 STK1 (3.5 mg/mL) 和 STK2 (13.6 mg/mL) 稀释 10、40、160、640、2 560 倍, 使 STK1 的终质量浓度分别为 350、87.5、21.9、5.47、1.37 μg/mL, STK2 的终质量浓度分别为 1 360、340、85、21.25、5.31 μg/mL。对照组加入等量的含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 设 8~10 个平行孔, STK1 和 STK2 实验组每个质量浓度设 3 个平行

孔。37 °C 下培养 72 h 后, 每小孔加预冷的 30% 三氯醋酸 (TCA) 50 μL, 置于 4 °C 固定 1 h, 倒掉固定液, 用去离子水洗 5 遍, 甩干, 空气干燥; 每孔加入 0.4% SRB 的醋酸溶液 100 μL 并在室温静置 30 min。未与蛋白结合的 SRB 用 1% 醋酸水洗 5 遍, 空气干燥; 结合的 SRB 用 150 μL 非缓冲 Tris 碱液 (10 mmol/L, pH 10.5) 溶解, 用酶标仪测定每孔在 515 nm 处的吸光度 (A) 值。因 STK1 和 STK2 分别呈深褐色、褐色, 故要做相应药物质量浓度无细胞调零。各孔 A 值先做相应无细胞调零, 再取 3 孔平均 A 值, 按下式计算细胞增殖抑制率:

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 STK1 的抑制作用: 不同质量浓度的 STK1 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制作用见图 1。可见, 鼠尾藻多酚 STK1 对两种细胞株均有增殖抑制活性, 且呈相同的变化趋势。在 STK1 质量浓度 < 87.5 μg/mL 时, 随着 STK1 质量浓度的升高, 其对两种细胞株的增殖抑制率也随之升高。STK1 质量浓度 < 5.47 μg/mL 时抑制率在 10% 以下。在 STK1 质量浓度为 87.5 μg/mL 时对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制率分别高达 90.7% 和 89.3%。但 STK1 质量浓度 > 87.5 μg/mL 时, 对两种细胞株的增殖抑制率呈下降趋势, STK1 为 350 μg/mL 时, 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制率分别降为 86.1% 和 73.1%, 对 A-549 细胞增殖的抑制作用相对强些。因此, 对 STK1 来说存在一个最佳的抑制质量浓度 (80~100 μg/mL), 在此质量浓度范围内鼠尾藻多酚 STK1 对 A-549 和 BEL-7402 细胞株增殖抑制率最高。

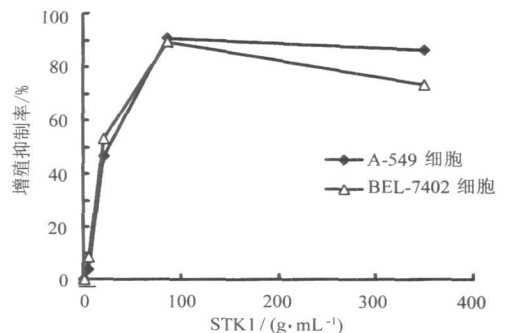


图1 STK1 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Inhibition of STK1 on proliferation of A-549 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.2 STK2 的抑制作用: 不同质量浓度的 STK2 对

A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制作用见图2。可以看出,鼠尾藻多酚 STK2 在质量浓度 $< 21.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 A-549 细胞增殖的抑制率在 20% 以下,而对 BEL-7402 细胞则完全无抑制作用,说明在低质量浓度情况下鼠尾藻多酚 STK2 对两种细胞的抑制活性弱于 STK1。但当 STK2 质量浓度升至 $85 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其对两种细胞增殖抑制率迅速升至 88.3% 和 74.2%,当 STK2 质量浓度为 $340 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时达最高值,分别为 89.9% 和 90.1%,二者十分接近。当 STK2 质量浓度为 $1360 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制率分别降为 83.7% 和 71.0%,仍保持较高水平。

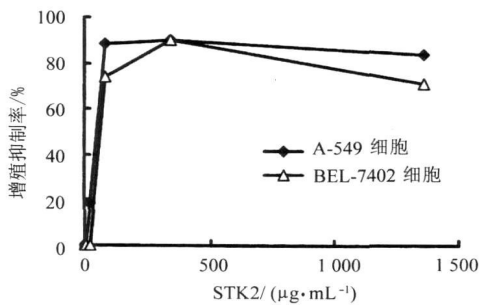


图2 STK2 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Inhibition of STK2 on proliferation of A-549 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

结果表明在受试适宜质量浓度范围内,STK1 和 STK2 对 A-549 和 BEL-7402 细胞增殖均表现抑制作用:对 A-549 细胞增殖的抑制率可达 80% 以上,对 BEL-7402 细胞增殖的抑制率均可达 70% 以上。多酚质量浓度与其对两种肿瘤细胞增殖的抑制率无正相关关系。另外,虽然 STK2 在较大质量浓度范围 ($> 85.0 \text{ mg}/\text{L}$) 内,对两种受试细胞都有强抑制活性,对 A-549 细胞尤其如此,但其最佳活性质量浓度范围比 STK1 高,应在 $200 \sim 400 \text{ mg}/\text{L}$ 。由此可见,相对分子质量高的鼠尾藻多酚 STK1 具有更强的抗肿瘤活性。

3 讨论

肿瘤是细胞异常增生性疾病,严重危及人类的生命,尤其是癌肿。中医药在抗癌药物中占有重要地位,长期以来,人们为寻找安全有效的抗癌药物,已对大量中药材进行抗癌活性筛选,以期发现先导化

合物。海洋生物是重要的中药资源,海洋生物抗肿瘤活性研究是海洋生物活性物质开发与海洋药物研究的重要方面^[12]。本实验结果表明,在受试适宜质量浓度范围内,鼠尾藻多酚化合物对人肺腺癌 A-549 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞均有较强的增殖抑制作用:对 A-549 细胞增殖的抑制率可达 80% 以上,对 BEL-7402 细胞增殖的抑制率均可达 70% 以上。而且,相对分子质量高的鼠尾藻多酚具有更强的抗肿瘤活性。另外,研究还发现鼠尾藻多酚质量浓度过大反而降低其对肿瘤细胞的抑制作用,但其原因未知。尽管 Blunden 等^[13]曾报道从泡叶藻、齿缘墨角藻、墨角藻提取的高相对分子质量多酚化合物能裂解 DNA,但关于鼠尾藻多酚体外对癌细胞增殖的抑制作用机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 魏玉西,徐祖洪.褐藻中高相对分子质量褐藻多酚的抗氧化活性研究[J].中草药,2003,34(4):317-319.
- [2] Wei Y X, Li Z E, Hu Y F, et al. Inhibition of mouse lipid peroxidation by high molecular weight phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum* [J]. *J Appl Phycol*, 2003, 15: 507-511.
- [3] 林超,于曙光,郭道森,等.鼠尾藻中褐藻多酚化合物的抑菌活性研究[J].海洋科学,2006,30(3):94-97.
- [4] Targett N M, Arnold T M. The role of algal phlorotannins in marine plant-herbivore Interactions [J]. *J Phycol*, 1998, 34(2): 195-205.
- [5] 姜凤梧,张玉顺.中国海洋药物辞典[M].北京:中国海洋出版社,1993.
- [6] 韩晓弟,李岚萍.鼠尾藻特性特征与利用[J].特种经济动植物,2005(1):27-29.
- [7] 王学琦,齐汝斌,张尔贤.鼠尾藻多糖对人粒细胞超氧阴离子自由基释放的影响[J].中国海洋药物,1992,11(2):4-6.
- [8] Itoh H, Noda H, Amano H, et al. Immunological analysis of inhibition of lung metastases by Fucoidan (Giv-A) prepared from brown seaweed *Sargassum thunbergii* [J]. *Anticancer Res*, 1995, 15: 1937-1948.
- [9] 张尔贤,俞丽君,范益华,等.鼠尾藻醇提取物的生理活性和若干生化性质研究[J].药物生物技术,1994,1(1):30-34.
- [10] 严小军.中国常见褐藻的多酚含量测定[A].海洋科学集刊[C].北京:科学出版社,1996.
- [11] Kubata T, Takahara T, Nagata M, et al. Colorimetric chemosensitivity testing using sulforhodamine B [J]. *J Surg Oncol*, 1993, 52(2): 83-88.
- [12] 梁盈,黄大川,石松林,等.牡蛎低分子活性肽对人肺腺癌 A549 细胞形态与超微结构变化的影响[J].厦门大学学报:自然科学版,2002,41(5):614-617.
- [13] Blunden G, Currie J, Thurston D E. Cleavage of DNA by brown algal polyphenols [J]. *J Appl Phycol*, 1994, 6: 281-284.