

文章编号: 1000-5862(2016)01-0089-04

束生刚毛藻 *Cladophora fascicularis* 中 三萜化合物的活性研究

黄新苹^{1,2,3} 林文翰² 朱校斌³

(1. 郑州师范学院化学化工学院, 河南 郑州 450044; 2. 北京大学医学部天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191;
3. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 根据生物活性筛选为导向, 对采自青岛沿海的绿藻束生刚毛藻(*Cladophora fascicularis*) 的化学成分进行研究, 利用薄层制备色谱方法从中分离出一系列环阿廷类三萜化合物, 分别为环阿廷-24-过氧羟基-25-烯-3 β -醇(1)、环阿廷-25-过氧羟基-23-烯-3 β -醇(2)、环阿廷-23, 25-二烯-3 β -醇(3)、环阿廷-25-烯-3 β , 24-二醇(4)、环阿廷-23-烯-3 β , 25-二醇(5)和环阿廷-24-烯-3 β -醇(6)。对该类化合物首次进行体外对几种肿瘤细胞靶蛋白酶筛选, 化合物1~化合物6在浓度为1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对肿瘤细胞部分靶蛋白酶(ARK5、EGFR、B-RAFVE、EPHB₄、CK2 α 1、ERBB₂、FAK、CDK2/CycA、IGF₁R、SRC、CDK4/CycD1、VEGFR₂、VEGFR₃、AuroraA、INSR、AuroraB、MET、PDGFR β 、FLT3、COT、SAK、PLK1 like、TIE2)具有较强的抑制活性。该研究为束生刚毛藻(*C. fascicularis*)的进一步开发利用及药理活性研究提供理论依据。

关键词: 束生刚毛藻; 环阿廷类三萜; 生物活性

中图分类号: Q 945 文献标志码: A DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2016.01.16

0 引言

藻类在水生环境中生长, 特有的生理特征使其对水体生态环境的平衡有特殊的贡献。研究表明: 可以利用藻类对重金属的吸附作用治理水体因重金属超标造成的污染^[1]。同时, 藻类特有的光合作用, 可以吸收水中的N、P等造成水体富营养化元素、净化富营养化水质^[2-4]。前期, 作者通过研究, 利用几种海藻对水中N、P元素的吸收转化, 对青岛郊区水生养殖场的养殖废水进行处理, 进行循环利用, 其中刚毛藻的效果最佳^[5], 与文献[6-8]报道相符, 可能是绿藻具有更强的光合作用能力。关于对刚毛藻的次生代谢产物及其生物活性的研究, 文献报道较少, 仅有关于黑海刚毛藻(*Cladophora vagabunda*)^[9]和日本海域刚毛藻(*Cladophora fascicularis*)^[10]研究, 并从黑海刚毛藻中分离出甾体、三萜和挥发油, 从日本刚毛藻中分离出具有抗菌和抗炎活性的多溴代二苯醚类化合物。

束生刚毛藻(*Cladophora fascicularis* (Mert.))

Kuetzing) 在青岛浅水海域广泛分布, 作者以生物活性筛选为导向, 对其化学成分进行了研究^[11], 本文主要报导从*C. fascicularis*中分离出的一系列环阿廷类三萜化合物(化合物1~6, 见图1)的抗肿瘤活性。化合物1~6分别为环阿廷-24-过氧羟基-25-烯-3 β -醇(1)、环阿廷-25-过氧羟基-23-烯-3 β -醇(2)、环阿廷-23, 25-二烯-3 β -醇(3)、环阿廷-25-烯-3 β , 24-二醇(4)、环阿廷-23-烯-3 β , 25-二醇(5)和环阿廷-24-烯-3 β -醇(6), 其对肿瘤细胞部分靶蛋白酶的活性的研究为首次报道。

1 实验部分

1.1 生物样品

束生刚毛藻(*Cladophora fascicularis* (Mert.)) Kuetzing) 样品采自青岛, 时间为2013年11月, 由中国科学院海洋研究所范晓教授鉴定。细胞株: PC-3M-1E8(人前列腺癌细胞株)、BGC-823(人胃癌细胞株)、BEL-7402(人肝癌细胞株)、HL-60(人白血病细胞株)、MDA-MB 435(人乳腺癌细胞株)、HELA

收稿日期: 2015-09-15

基金项目: “863”国家高新技术发展计划(2011AA10A202-2)、河南省科技攻关重点项目(122102310260)和2012年度河南省高等学校青年骨干教师资助计划(206)资助项目。

作者简介: 黄新苹(1974-), 女, 河南偃师人, 副教授, 博士, 主要从事药物化学与化学生物学方面的研究。

(人宫颈癌),以上细胞株均购于北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室新药筛选中心. 四甲基偶氮唑盐(MTT, Methyl-Thiazol-Tetrazolium)

购于 Sigma 公司,配制成 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的生理盐水溶液, -20°C 保存; 溶剂: 二甲基亚砜(DMSO) 购自西安化学试剂厂,分析纯.

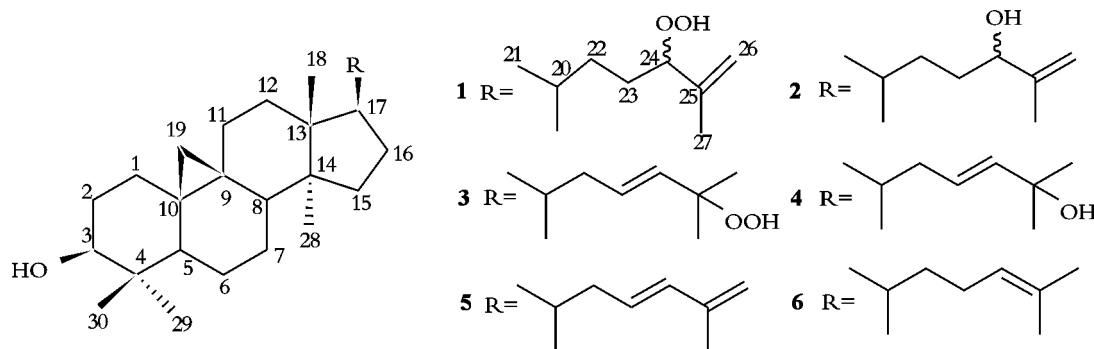


图1 环阿尔廷类三萜化合物 1~6 的结构

1.2 方法

1.2.1 MTT 法 (四甲基偶氮唑盐还原法),常用的细胞毒性试验,通过检测光密度值(OD)变化,间接反映药物对细胞生长的抑制或增殖作用,广泛用于抗癌药物的筛选. 本文主要测定所得化合物 1~6 对人白血病细胞(HL-60)的生长抑制活性. 化合物 1~6 与细胞充分接触 48 h,加入配置好的 MTT ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 工作液 $20 \mu\text{L}$,在 37°C 条件下,通入 $5\% \text{ CO}_2$,继续培养 4 h 后,将上清液用快翻法除去,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 的 DMSO 溶液,在微型振荡器中振荡 10 min,放置 72 h 后,用酶标仪测定每孔 OD 值,测定波长 570 nm .

抑制率 = $[1 - (\text{对照孔平均 OD 值} - \text{加药孔平均 OD 值}) / \text{对照孔平均 OD 值}] \times 100\%$.

1.2.2 磺酰罗丹明 B(Sulforhodamine B, SRB) 比色法 检测细胞增殖情况,本文主要测定所得化合物 1~6 对 PC-3M-1E8(人前列腺癌细胞株)、BGC-823(人胃癌细胞株)、BEL-7402(人肝癌细胞株)、MDA-MB-435(人乳腺癌细胞株)、HELA(人宫颈癌)的抑制率. 化合物 1~6 与细胞充分接触 48 h,在 96 孔细胞培养板中 $50 \mu\text{L}$ 预冷好的 4°C 的 $80\% \text{ TCA}$ 静置 2~5 min,移入冰箱,放置 1 h 后,取出用去离子水冲洗培养板 5 遍,室温晾干,至无湿痕时再加 $0.4\% \text{ SRB}$ 工作液 $50 \mu\text{L}$ 和 $100 \mu\text{L}$ pH 值为 10 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液,在微型振荡器中振荡 20 min,用酶标仪测定每孔 OD 值,测定波长为 540 nm .

2 结果

对束生刚毛藻 90% 乙醇提取物萃取后的石油醚部分(P. E.)、乙酸乙酯部分(EtOAc)、正丁醇部

分(*n*-BUOH)和水部分(H_2O)进行了体外抗肿瘤细胞毒活性筛选,结果见表 1.

表1 样品对体外不同肿瘤细胞生长的抑制率

对不同细胞株抑制率	样品编号	浓度/($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			评价
		$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-6}$	
PC-3M-1E8 (人前列腺癌细胞)	P. E.	10.90	-15.32	-15.67	无效
	EtOAc	-1.44	-15.45	-18.20	无效
	<i>n</i> -BUOH	36.42	12.28	2.64	无效
	H_2O	-0.25	-	-	无效
MDA-MB-435 (人乳腺癌细胞)	P. E.	-1.40	-1.14	-1.92	无效
	EtOAc	9.21	-5.03	-10.99	无效
	<i>n</i> -BUOH	21.57	4.59	-13.02	无效
	H_2O	6.20	-	-	无效
BGC-823 (人胃癌细胞)	P. E.	8.71	0.01	-3.95	无效
	EtOAc	65.36	7.24	2.96	无效
	<i>n</i> -BUOH	8.47	5.26	-3.42	无效
	H_2O	17.52	-	-	无效
Hela (人宫颈癌细胞)	P. E.	-4.87	-7.11	-12.01	无效
	EtOAc	-1.70	-5.51	-7.38	无效
	<i>n</i> -BUOH	5.88	-5.07	-4.65	无效
	H_2O	3.88	-	-	无效
Bel-7402 (人肝癌细胞)	P. E.	49.54	8.86	-4.60	无效
	EtOAc	26.54	9.64	5.53	无效
	<i>n</i> -BUOH	1.46	-3.85	0.73	无效
	H_2O	-3.05	-	-	无效
HL-60 (人白血病肿瘤细胞)	P. E.	19.00	14.64	0.7	无效
	EtOAc	1.58	3.52	1.15	无效
	<i>n</i> -BUOH	7.31	5.92	0.78	无效
	H_2O	20.57	-	-	无效

2.1 石油醚提取物分段的细胞毒活性筛选结果

根据 TLC 对石油醚部分进行分段,对所得 F2~F9 部分配置成 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液对 4 种人肿瘤细胞株: Bel-7402(人肝癌细胞)、HL-60(人白血病细胞)、KB(人鼻咽癌细胞)、BGC-823(人胃癌细胞)进

行细胞毒活性筛选,结果只有 F8、F9 段对 4 种肿瘤细胞有细胞毒性,其他部分都根据细胞毒评价标准为无效。

2.2 环阿尔廷化合物 1~6 对几种肿瘤细胞靶蛋白酶筛选结果

从 F8 和 F9 部分分离出环阿尔廷化合物 1~6,对这些化合物进行体外抗肿瘤细胞毒活性的筛选,没有显著的细胞毒活性。与肿瘤发生密切相关的几种酶: ERBB2、SAK、ARK5、CK2 α 1、EGFR(表皮生长因子受体)、CDK2/CycA、EPHB4(纤维原细胞生长因子及受体)、FAK(粘着斑激酶)、B-RafVE、VEGFR2(血管内皮生长因子受体 2)、CDK4/CycD1、IGF1R(胰岛素样生长因子受体 1)、SRC(非受体酪氨酸激酶)、MET、VEGFR3(血管内皮生长因子受体 3)、PLK1 like(激酶)、AKT1(鼠类胸腺瘤病毒)、AuroraA、FLT3(造血生长因子)、AuroraB、PDGFR β 、INSR(胰岛素受体)、COT(有丝分裂活性蛋白激酶)、TIE2(酪氨酸激酶样受体)对该类化合物进行体外对以上与肿瘤细胞靶蛋白酶的活性筛选,方法见参考文献[12]结果见表 2。

表 2 束生刚毛藻中环阿尔廷三萜类化合物 1~6 对几种肿瘤相关酶的抑制性评价

酶	样品					
	1	2	3	4	5	6
ERBB2	86	93	91	95	72	93
SAK	82	72	72	99	99	70
ARK5	88	85	99	97	99	89
CK2- α 1	99	99	99	99	99	99
EGFR	57	61	62	72	30	75
EPHB4	65	54	49	64	19	80
FAK	79	91	99	88	60	97
IGF1-R	60	59	68	70	11	54
SRC	32	33	45	37	10	48
VEGF-R2	66	47	99	90	36	85
VEGF-R3	79	75	95	80	40	92
AKT1	91	77	86	77	81	60
CK2- α 1	99	99	99	99	99	99
Aurora-A	96	94	99	96	98	98
Aurora-B	94	90	94	92	99	99
B-Raf-VE	92	96	99	99	94	98
CDK2/CycA	99	99	99	99	70	99
CDK4/CycD1	82	95	99	91	68	99
CK2- α 1	99	99	99	99	99	99
FLT3	90	95	99	89	55	99
INSR	99	99	99	95	56	90
MET	91	91	99	99	70	99

酶	样品					
	1	2	3	4	5	6
PDGFR- β	96	93	99	99	63	99
COT	98	78	99	86	34	99
PLK1	89	99	99	86	91	95
TIE2	54	99	99	99	56	64

注:样品浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。活性评价标准: >80% 为强活性; 60% ~ 80% 为较强活性; 40% ~ 60% 为弱活性; <40% 为无活性。

3 讨论

活性跟踪分离为导向对束生刚毛藻的化学成分进行研究,表 1 给出了束生刚毛藻初提物的分别被不同极性溶剂萃取后得到的 4 个极性分段: P. E. (石油醚段)、EtOAc(乙酸乙酯段)、*n*-BuOH(正丁醇段)和 H_2O (水提段),及石油醚分段部分 F2-F9 的体外抗肿瘤细胞毒活性的筛选结果,从中可以看出,各极性段没有显著的细胞毒活性,只有 F8 和 F9 部分对 Bel-7402(人肝癌细胞)、HL-60(人白血病细胞)、KB(人鼻咽癌细胞)、BGC-823(人胃癌细胞)有一定的细胞毒活性。以此生物活性为导向重点分离 F8 和 F9 的活性有效成分。

从束生刚毛藻石油醚部分 F8 和 F9 中分离得到的环阿尔廷三萜类化合物 1~6,对所得的化合物进行与肿瘤相关酶的抑制性评价,表 2 得到的结果表明在浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,化合物 1~6 对 ERBB2、SRC 非受体酪氨酸激酶、ARK5、AuroraA、AuroraB、B-RafVE、PLK1、CK2 α 1 和 CDK2/CycA,化合物 6 对 EPHB4,化合物 2、3、4 和 6 对 FAK,化合物 4、3 和 6 对 VEGFR2 和 VEGFR3,化合物 1 和 3、5、6 对 AKT1 鼠类胸腺瘤病毒,化合物 1、2、4、5 和 6 对 CDK4/CycD1,化合物 1、2、4、5 和 6 对 FLT3 和 INSR 胰岛素受体、MET 和 PDGFR β ,化合物 1、3、4 和 6 对 COT 有丝分裂活性蛋白激酶,化合物 1 和化合物 4 对 SAK,化合物 4、2 和化合物 3 对 TIE2 酪氨酸激酶样受体有强抑制。

4 参考文献

[1] 周雪玲,熊建秋,简敏菲,等. 乐安河-鄱阳湖湿地优势水生植物对重金属污染物的富集作用[J]. 江西师范大学学报:自然科学版 2013 37(2):210-215.
[2] 经博翰,袁龙义. 黑藻与苦草在不同水深下光合作用的比较研究[J]. 江西师范大学学报:自然科学版 2014,

- 38(6): 645-649.
- [3] 聂兰琴,付姍,吴琴,等.鄱阳湖典型沉水植物分布区 CO_2 、 CH_4 释放日变化特征 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2014, 38(4): 429-433.
- [4] 李守淳,柴文波,叶付粥,等.南昌市艾溪湖浮游藻类的多样性调查与评价 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2013, 37(3): 316-318.
- [5] 黄新苹,朱校斌,刘建国,等.几种海藻富集 N、P 净化水质的研究 [J]. 海洋科学 2004, 28(12): 39-42.
- [6] Steren P K, Sternberg R, Ryan W Dorn. Cadmium removal using *Cladophora* in batch semi-batch and flow reactors [J]. Bioresource Technology 2002, 81: 249-255.
- [7] Parr L B, Perkins R G, Mason C F. Reduction in photosynthetic efficiency of *Cladophora glomerata* induced by overlying canopies of *Lemna* spp. [J]. Water Research 2002, 36: 1735-1742.
- [8] Aksu Z, Kutsal T. Determination of kinetic parameters in the biosorption of copper(II) on *Cladophora* sp. [J]. Process Biochemistry, 1998, 33(1): 7-13.
- [9] Lorenzo D N, Silvana M, Luciano M, et al. Sterol composition of some mediterranean green algae [J]. Phytochemistry, 1982, 21(8): 1993-1994.
- [10] Ivaylo E, Tamara G, Petia H, et al. Terpenoids and sterols in *Cladophora vagabunda* [J]. Phytochemistry, 1995, 38(2): 457-459.
- [11] Huang Xinping, Zhu Xiaobin, Deng Liping, et al. Cycloartane triterpenes from marine green alga *Cladophora fascicularis* [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2006, 24(4): 443-448.
- [12] 韩光亮,尚念勇,杜冠华.酪氨酸蛋白激酶抑制剂的高通量筛选模型 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(5): 628-631.

The Pharmacological Study of Cycloart-Triterpenoids from *Cladophora fascicularis*

HUANG Xinping^{1 2 3}, LIN Wenhan², ZHU Xiaobin³

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering Zhengzhou Normal University Zhengzhou Henan 450044, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100191, China;

3. National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Qingdao Shandong 266071, China)

Abstract: According to pharmacological screen, six cycloartanes were isolated from ethanol extract of marine green alga *Cladophora fascicularis* by column chromatography. They are 24-hydroperoxycycloart-25-en- 3β -ol (1), 25-hydroperoxycycloart-23-en-3-ol (2), cycloart-23, 25-dien- 3β -ol (3), cycloart-25-en- 3β , 24-diol (4), cycloart-23-en-3, 25-diol (5) and cycloart-24-en- 3β -ol (6). The cycloart-triterpenoids (1-6) under $C = 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ showed good inhibition against several kinase (ARK5, EGFR, B-RAFVE, EPHB₄, CK2alpha1, ERBB₂, FAK, CDK2/CycA, IGF₁R, SRC, CDK4/CycD1, VEGFR₂, VEGFR₃, AuroraA, INSR, AuroraB, MET, PDGFRbeta, FLT3, COT, SAK, PLK1 like, TIE2). The paper brings forward prospect about *C. fascicularis* optimal utilization and pharmacological function research.

Key words: *Cladophora fascicularis*; cycloart-triterpenoids; pharmacological activity

(责任编辑: 刘显亮)