

全缘马尾藻褐藻多酚的抗氧化和抗肿瘤细胞增殖作用研究

卢虹玉¹, 刘义², 吉宏武¹, 邵海艳¹

(1. 广东海洋大学水产品深加工广东普通高校重点实验室, 广东湛江 524088)

(2. 广东医学院广东天然药物研究与开发实验室, 广东湛江 524023)

摘要: 检测全缘马尾藻褐藻多酚提取物(IPTs)的抗氧化和抗肿瘤细胞增殖作用。通过萃取和超滤获得 4 种 IPTs 提取物-IPTa1、IPTa2、IPTe1 和 IPTe2, 总酚含量分别为 1.16、0.6、0.25 和 0.34 mg 没食子酸(GA)/g 海藻干基, 1.5 mg/L 时的总抗氧化能力(TCA)分别相当于 1.724、1.379、1.833、0.695 mg/L 的 Fe²⁺还原能力; MTT 结果显示, 4.4 μg/mL 时, 4 种 IPTs 提取物作用 sw579 细胞 24 h、48 h、72 h 后, 除了 IPTa2 外, IPTa1、IPTe1 和 IPTe2 均以时间依赖方式显著抑制肿瘤细胞的生长; 0.3125~5 μg/mL 浓度范围内, IPTa1 和 IPTe1 的抑制率与作用时间和浓度呈正相关, 最高抑制率达 90% 以上。

关键词: 全缘马尾藻; 褐藻多酚; 总抗氧化能力; 抗增殖

文章编号: 1673-9078(2013)4-702-705

Antioxidant Activity and Antiproliferation Effect on Tumor Cells of Phlorotannins from *Sargassum integerrimum*

LU Hong-yu¹, LIU Yi², JI Hong-wu¹, SHAO Hai-yan¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Advanced Processing of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China) (2. Guangdong key laboratory for research and development of natural drug, Guangdong Medical Collage, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: To investigate antioxidant activity and antiproliferation effect of phlorotannins extraction from *Sargassum integerrimum* (IPTs) IPTs was prepared by solvent extraction and ultrafiltration. Four extracts named IPTa1, IPTa2, IPTe1 and IPTe2 were attained. Total phenolic contents of the four IPTs were 1.16, 0.6, 0.25 and 0.34 mg GA/g algae dry base. Total antioxidant capacities of the four extracts at 1.5 mg/L were equal to reduction capacities of Fe²⁺ at 1.724, 1.379, 1.833 and 0.695 mg/L, respectively. MTT results showed that the four extracts except IPTa2 inhibited significantly proliferation of thyroid squamous cell carcinoma cells (sw579) at the concentration of 4.4 μg/mL and their inhibition rates increased in a time-dependant manner within 72 hours. Inhibition rates of IPTa1 and IPTe1 had a positive correlation with time and concentration at range of 0.3125~5 μg/mL and the highest inhibition rate was up to 90%.

Key words: *Sargassum integerrimum*; phlorotannins; total antioxidant capacity; antiproliferation

恶性肿瘤是最具挑战性的疾病之一, 一直以来, 研究者都在追寻效果好而副作用小的抗肿瘤药物。目前对大量陆生植物中多种成分进行了抗肿瘤效果研究, 然而真正应用到临床的非常少。海洋是一个生物种类丰富、特殊而又复杂的环境, 是生物活性多样的次生代谢产物来源。现代研究证实, 在海藻资源丰富的亚太地区国家, 作为传统食品的大型海藻含有多种抗肿瘤成分如硫酸多糖、多酚等^[1]。

全缘马尾藻 (*Sargassum integerrimum*) 是一种大型褐藻, 产于广东湛江硇洲岛, 为可食用海藻, 天然资源丰富。目前的研究表明, 来源于大型褐藻的褐藻多酚 (Phlorotannins, PTs) 具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌抗病毒、抗凝血等多种作用^[2-3]。因此, 在本研究中, 通过观察全缘马尾藻 PTs 提取物对恶性肿瘤细胞的增殖抑制作用, 为开发和利用海洋天然产物防治恶性肿瘤提供理论依据。

收稿日期: 2012-10-18

基金项目: 湛江市科技攻关计划项目 (2011C31070209)

作者简介: 卢虹玉(1976-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 海洋活性物质研究与开发

1 材料和方法

1.1 材料

全缘马尾藻采自硇洲岛; RPMI1640 培养基,

Gibco 公司; 小牛血清, 杭州四季青公司; 5-氟尿嘧啶 (5-Fu), 武汉华美科技有限公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), Sigma 公司。

1.2 仪器

N-1000 真空旋转蒸发器, 日本 EYELA 公司; 赛多利斯超滤器膜包, 截留分子量 10 k, 上海摩速科学器材有限公司; FDU-1100 真空冷冻干燥器, 日本 EYELA 公司; (SW-CJ-2FD 无菌超净工作台, 上海予腾生物科技有限公司; HERAcell240i CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo Heraeu 公司; 3001 varioskam splash 连续波段酶标仪, 美国 Thermo electron corporation 公司; 无菌针头滤器, 美国 PALL 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 IPTs的提取

全缘马尾藻干粉按质量体积比 1:10 (粉末: 甲醇) 加入 80% 甲醇溶液, 室温提取 12 h, 过滤, 滤渣按上述方法重复提取 2 次, 合并滤液, 真空浓缩去甲醇得 IPTs 粗提液, 依次用等体积正己烷和二氯甲烷各洗涤 2 次, 水层以乙酸乙酯萃取 2 次, 得水馏分和乙酸乙酯馏分, 超滤后得分子量大于 10 kD 的水馏分和乙酸乙酯馏分和分子量小于 10 kD 的水馏分和乙酸乙酯馏分, 分别命名为 IPTa1、IPTe1、IPTa2 和 IPTe2, 真空冷冻干燥成粉末待用。

1.3.2 总酚含量的检测^[4]

根据文献, 采用 Folin-Ciocalteu 比色法检测各 IPTs 提取物的总酚含量, 以没食子酸(GA)为标准进行定量, 以 mg GA/g 海藻干基表示。

1.3.3 总抗氧化能力 (TCA) 检测^[5]

FRAP 法检测 IPTs 提取物的 TCA。绘制标准曲线, 样品的抗氧化活性(FRAP 值)以达到相同吸光度所需 FeSO₄ 的浓度表示。

1.3.4 细胞增殖抑制检测

取对数生长期的 sw579 (人甲状腺鳞癌) 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, RPMI-1640 完全培养液调制成为 2.0×10⁴ 个/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔接种 100 μL (含 2.0×10³ 个细胞)。培养过夜后, 吸出培养液, 加入新鲜 1640 培养液 90 μL 及 IPTs 试样液 10 μL, 使终浓度相同。不同加药量设置 10 个平行孔。同时设置空白及 5-Fu (5-氟尿嘧啶) 阳性对照组。分别孵育时间为 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 继续培养 4~6 h, 每孔加入 DMSO 100 μL。在微型振荡器上摇匀 15 min, 结晶溶解后, 采用酶标仪在主波长为 570 nm, 参比波长为 630 nm 处测量 OD 值, 比色以空白孔调零。根据 OD 值衡量 IPTs 提取物对癌细胞增殖的影响。

将以上检测结果中对 sw579 生长表现出抑制作用的 IPTs 提取物配制成系列浓度 (0.3125~5 μg/mL), 重复上述实验操作。

细胞生长抑制率按下式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组OD值} - \text{样品组OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100\%$$

1.3.5 统计分析

采用 SPSS 软件进行分析统计, 数据采用平均数±标准差 (x±s) 表示, 进行 t 检验分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IPTs的提取和总酚含量检测

采用高浓度醇提取可去除海藻中大部分糖类和蛋白质, 正己烷可去除脂溶性色素, 二氯甲烷去除中等极性杂质, 所得水馏分和乙酸乙酯馏分分别水溶性 PTs 和脂溶性 PTs。根据没食子酸回归方程: $y=0.1409+0.0112x$, $R^2=0.9992$, 测得全缘马尾藻 IPTa1、IPTa2、IPTe1 和 IPTe2 提取物中总酚含量分别为 1.16、0.6、0.25 和 0.34 mg GA/g 海藻干基。

表 1 IPTs 总酚含量测定 (n=3)

Table 1 The total phenolic content of IPTs

样品名	IPTa1	IPTa2	IPTe1	IPTe2
总酚含量 (mg GA/g 海藻干基)	1.16±0.103	0.60±0.058	0.25±0.041	0.34±0.057

2.2 IPTs提取物TCA

结果表明 (表 2), 在相同浓度下, 不同 IPTs 提取物 TCA 差异较大, 大分子量馏分的 TCA 均强于小于分子量馏分, IPTe1 的 TCA 最高, 1.5 mg/L 相当于 1.833 mg/L 的 Fe²⁺ 还原能力, IPTe2 的 TCA 最低。

表 2 IPTs 的总抗氧化能力 (n=3)

Table 2 Total antioxidant activity of IPTs

样品名	IPTa1	IPTa2	IPTe1	IPTe2
相当 Fe ²⁺ 浓度/(mg/L)	1.724±0.108	1.379±0.110	1.833±0.22	0.695±0.084

注: 浓度均为 1.5 mg/L。

2.3 IPTs提取物对sw579细胞增殖的作用

表 3 表明, 4 种 IPTs 在终浓度为 4.4 μg/mL 时, 对 sw579 细胞的增殖作用差异显著。除了 IPTa2 对 sw579 细胞的增殖无抑制作用外, 其余 3 种提取物均能显著抑制 sw579 细胞的增殖。其中相对分子量较大的 IPTa1 和 IPTe1 显示出较强的抑制作用, IPTe1 在作用 24 h 就表现出较强的抑制作用, 随着作用时间的延长, 抑制率增大, 72 h 两者的抑制率分别为 80.43% 和 73.67%; IPTe2 随着作用时间的延长抑制率增加更为

显著。

表3 相同浓度 IPTs 对 sw579 细胞增殖的作用 (n=3)

Table 3 Antiproliferation effect of IPTs on sw579 cells at same concentration

名称	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
5-Fu (20 μ g/mL)	26.74 \pm 3.38*	25.28 \pm 0.73*	46.62 \pm 0.71**
IPTa1	33.80 \pm 4.20**	50.11 \pm 1.86**	80.43 \pm 6.18**
IPTa2	-	-	-
IPTe1	54.42 \pm 3.35**	67.98 \pm 4.88**	73.67 \pm 5.77**
IPTe2	28.28 \pm 10.54**	47.41 \pm 3.56**	64.62 \pm 8.77**

注: 所有样品终浓度均为 4.4 μ g/mL; -表示无抑制活性;

*P<0.05; **P<0.01。

2.4 不同浓度 IPTs 提取物对 sw579 细胞增殖的抑制率

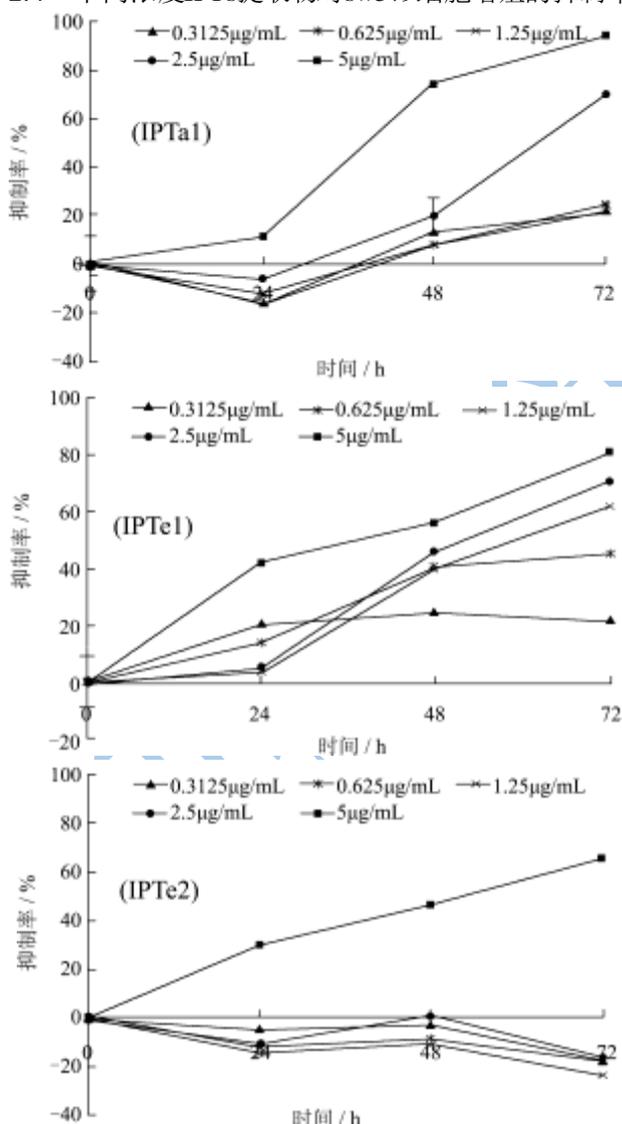


图1 不同浓度 IPTs 提取物对 sw579 细胞的增殖抑制作用

Fig 1 Antiproliferation effect of IPTs on sw579 cells at various concentrations

对上述3种表现出肿瘤增殖抑制作用的 IPTs 提取物进行系列浓度的检测。结果表明, IPTa1、IPTe1 和 IPTe2 对 sw579 细胞的增殖抑制作用均呈现出量效关系(图1)。其中 IPTa1 随着浓度的增加, 抑制率显著增加, 浓度为 5 μ g/mL 时, 作用 72 h 后抑制率最高, 可达 90% 以上; 在浓度较低(0.3125~2.5 μ g/mL) 和作用时间较短(24 h) 时, 不表现出抑制作用。因此, IPTa1 需要较高浓度以及较长的作用时间才能表现出较好的细胞增殖抑制作用。IPTe1 在低浓度(0.3125 μ g/mL) 时对 sw579 细胞有一定的抑制作用, 但随着作用时间的增加抑制率没有显著差异, 只有在较高浓度(0.625~5 μ g/mL) 时, 抑制率随着作用时间延长而增大。IPTe2 在 0.3125~2.5 μ g/mL 范围内对 sw579 细胞的增殖没有抑制作用, 5 μ g/mL 作用 24 h、48 h、72 h 时的抑制率分别为 30.3%、46.3% 和 65.5%。综合来看, 3 种提取物中 IPTe2 的抑制作用弱于其他两种。

3 讨论

海洋天然抗肿瘤药物的研究与开发在世界范围内备受关注。PTs 主要存在于褐藻中的单宁类多酚化合物^[6]。近年来, 较多研究表明, PTs 具有抗氧化和抗肿瘤细胞增殖作用。如 Athukorala 等^[7]报道褐藻 *E. cava* 粗多酚提取物对结肠癌 CT-26 细胞有显著的生长抑制作用, IC₅₀ 为 5.1 μ g/mL。Yvonne 等以醇提取了几种可食用海藻, 提取物经正丁醇萃取的馏分作用 HeLa 细胞 72 h 后, 对细胞的生长有一定的抑制作用, 0.5~5 mg/mL 范围内的抑制率分别为 0~78%、0~55%、0~69%^[8], 并发现其抗增殖活性与馏分中的总酚含量呈正相关, 推测其抗肿瘤细胞的作用是其中所含的多酚引起的。Kong 等^[9]的研究也证实了褐藻 *E. cava* PTs 的抗肿瘤效应, 他们发现 PTs 能够抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖, 并对其抑制机理进行了初步探讨, 认为 PTs 的抗肿瘤增殖作用可能与其促进肿瘤细胞凋亡有关。

本研究通过溶剂萃取和超滤的方法从全缘马尾藻中获得 4 种 PTs 提取物。4 种提取物中 IPTa1 中的总酚含量最高, 为 1.16 mg GA/g 海藻干基, 说明全缘马尾藻中, 水溶性的 PTs 占较大比例。魏玉西等在研究鼠尾藻多酚的抗肿瘤作用报道中, 同样采用了高浓度醇提取, 有机溶剂萃取洗涤的纯化制备方法, 最终的样品为两种不同分子量大小的水相。本研究采用了更加细化的纯化方法, 进一步将全缘马尾藻的 PTs 分成水相和乙酸乙酯相再进行分子量截留, 拟在比较不同分子量和不同极性的 PTs 的 TCA 和抗肿瘤效果。研究的结果证实了不同分子量和极性的全缘马尾藻 PTs 的

TCA 和细胞增殖抑制作用有很大差异。IPTe1 的总酚含量最低, 但 TCA 最大, 其还原能力强于相同浓度的 Fe^{2+} , 在 24 h 和 48 h 对 sw579 细胞的抑制作用最强, 推测可能与大分子量 IPTs 含有更多供电子基团有关; IPTa2 的总酚含量和 TCA 虽然较高, 但对肿瘤细胞无抑制作用, 其余 3 种在浓度为 4.4 $\mu\text{g/mL}$ 时均能抑制 sw579 细胞的增殖, 但抑制浓度及抑制率有较大的差别, 其中 IPTa1 的最大抑制率可达到 90% 以上, 说明了不同分子量及不同极性 PTs 对肿瘤细胞的作用不同。虽然大量研究表明, 抗氧化与抗肿瘤之间存在密切关系, 但由于不同抗氧化剂的作用机制不同, 在抗肿瘤方面表现各异。从本实验研究结果来看, IPTs 的 TCA 与抗肿瘤作用之间并未表现出直接明确的关系。最近国内一项研究海带 PTs 活性的研究表明, 海带乙酸乙酯萃取的 PTs 作用 BEL-7402 和 P388 癌细胞 48 h, 抑制率分别为 30.2% 和 43.44%^[9]。由此可见, 不同褐藻来源的 PTs 对肿瘤细胞的抑制作用有一定的差异。本研究中采用的 PTs 浓度相对较低, 抑制效果普遍较好, 但分子量以及极性的不同如何影响其作用的原因还不得而知, 具体的抗增殖作用机制也还需进一步研究。

4 结论

4.1 本文通过全缘马尾藻褐藻多酚的提取及其总抗氧化能力和抗肿瘤细胞增殖作用的研究得出如下结论: 通过高浓度醇提取可去除大部分杂质, 所得提取物多酚含量高。

4.2 全缘马尾藻褐藻多酚提取物的总抗氧化能力与分子量大小以及极性有密切关系, 大分子量 IPTs 组分的总抗氧化能力大于小分子量 IPTs 组分, 乙酸乙酯大分子量馏分的总抗氧化能力最强。

4.3 不同极性和分子量大小的全缘马尾藻褐藻多酚提取物对 sw579 细胞的抑制作用不同, 且与浓度相关; 大分子量提取物的抑制率高于小分子量提取物, 最高

抑制率可达 90% 以上, 但与总抗氧化作用结果不完全对应, 提示两种作用之间的关系较为复杂。

参考文献

- [1] Holdt, SL, Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation [J]. J Appl Phycol, 2011, 23: 543-597
- [2] Gupta S, Abu-Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds [J]. Trends Food Sci Technol, 2011, 22: 315-326
- [3] Kim SK, Himaya SWA. Medicinal effects of phlorotannins from marine brown algae [J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2011, 64: 97-109
- [4] 赖富饶, 李臻, 吴晖, 等. 甜玉米芯多酚的超声提取工艺优化 [J]. 现代食品科技, 2012, 28(1): 52-55
- [5] 刘志旭, 陈岳文, 刘东波. 苦瓜膳食纤维的抗氧化活性研究 [J]. 现代食品科技, 2012, 28(8): 933-935
- [6] Singh IP, Bharate SB. Phloroglucinol compounds of natural origin [J]. Nat Prod Rep, 2006, 23: 558-591
- [7] Athukorala Y, Kim KN, Jeon YJ. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava* [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44: 1065-1074
- [8] Kong CS, Kim JA, Yoon NY, et al. Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative from *Ecklonia cava* in MCF-7 human breast cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47: 1653-1658
- [9] Yvonne VY, Natalie AW. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds [J]. Food and Chem Toxicol, 2006, 44: 1144-1150
- [10] Yang Huicheng, Zeng Mingyong, Dong Shiyuan, et al. Anti-proliferative activity of phlorotannin extracts from brown algae *Laminaria japonica* Aresch [J]. Chin J Oceanol Limnol, 2010, 28(1): 122-130