

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：

計畫名稱：台灣軟珊瑚 *Sarcophyton tenuispiculatum* 所含天然成分之
研究

執行期間：99 年 6 月 25 日至 99 年 11 月 30 日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：王 貴 弘

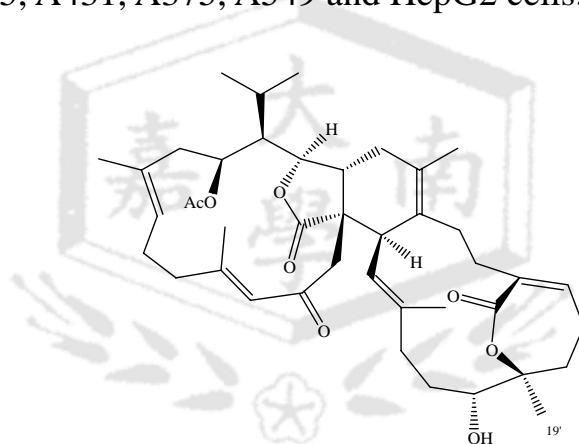
子計畫主持人：



中華民國 100 年 2 月 22 日

摘要

Soft corals are well known for their high content of diterpenes and particularly. In the course of our study on the chemical constituents of soft corals, we have isolated many chemically and biologically interesting secondary metabolites. Soft coral of the genus *Sarcophyton* (family, Alcyoniidae) have been reported to contain a variety of cembranoids. Unusual dimeric terpenoid skeletons have also been isolated from this genus, and these structures have been proposed to originate by Diels-Alder addition of two different cembranoid units. Recently, we isolation a new skeleton biscembranoid from the Formosan soft coral *Sarcophyton tenuispiculatum*. The structure was determined by 1D and 2D NMR spectral analysis. The relative stereochemistry of compound was secured by X-ray diffraction analysis. This study demonstrates the cytotoxic effects of this metabolite on SCC25, A431, A375, A549 and HepG2 cells.



Key words: *Sarcophyton tenuispiculatum*, cembranoids, cytotoxic

研究動機與研究問題

人類一直面對許多新興或難以治癒之疾病，因此開發新的藥物有其急迫性與重要性。長久以來，天然物學家或藥物學家大部份均以陸地生物所含活性成分為研究重點，如今，天然物學家正努力逐步揭開海洋生物潛在的價值，企圖尋找新的海洋天然物及具有藥物開發潛力之先導藥物。對海洋天然物資源的開發而言，珊瑚礁區之軟珊瑚或柳珊瑚均是良好的研究題材。就生態上而言，附著性的生物沒有逃避的能力及特化的防禦器官，因此他們勢必要發展有效的化學物質來防禦。珊瑚沒有免疫系統及有效的隔離構造（如皮膚）來抵抗微生物的感染，因此只有發展自體抗生物質來保護自己。海水具良好溶解性，其中存在的物質非常複雜，生物生活在其間，其本身的分泌物很容易經由海水擴散影響到其他生物，是以海生生物在生理生化上的抵抗機能勢必相當發達，以適應此一環境特性。

珊瑚是海洋重要的資產，生長於地球已有數億年之久，在中國悠久的歷史中也曾經對珊瑚的藥用性質有過紀錄，明朝李時珍所著「本草綱目」中就有記載珊瑚甘平無毒，去目中翳，消宿血；為末吹鼻，止鼻血；明目鎮心，指驚癇；點眼，去飛絲與“金漿，玉髓，久服長生不老”的記載。

海洋天然產物的研究從 1960 年左右開始，雖然發展的歷史短暫，但是可能因為海洋生物所處的環境演化上的特殊，至今於海洋生物中所取得的成果相當引人注目，充分展現海洋天然產物是發現新化合物、開發新藥的寶庫。全球到目前為止，在海洋天然化合物研究成果中，發現具有重要生物生理活性的海洋天然化合物也有數千種，且這些天然物分子的生合成路徑和分子構造相當特殊與陸地生物所產生之天然物差異頗大，因此海洋生物被認為是未來新藥開發的一個重要方向。近年來各

先進國家均投入大量之人力、財力，致力於海洋天然藥物的研究工作。至今已從海洋生物中找到一萬五千個以上的海洋天然化合物，其中超過一千個化合物被發現具有抗癌、抗病毒、抗菌、抗凝血、降血壓等藥物活性¹。目前已經有數十個海洋天然物已進入各種臨床前或臨床的應用(Table 1)²，2008 最新一期國際著名期刊 Natural Product Reports 報導在進行腫瘤臨床研究的海洋先導藥物共有九種(Table 2)³，由此可知，海洋生物所含的活性物質確實具有開發研究的價值。

Table 1. 進入臨床或臨床前試驗的海洋天然物

化合物名稱	基源	治療項目	臨床試驗期
Ziconotide	<i>Conus magnus</i> (mollusc)	神經痛	III
Ecteinascidin 743	<i>Ecteinascida turbinata</i> (tunicate)	癌症	II、III
Bryostatin 1	<i>Bugula neritina</i> (bryozoan)	癌症	II
Dolastatin 10	<i>Dolabella auricularia</i> (mollusc and later found in cyanobacteria)	癌症	II
Dehydrodidemnin B	<i>Aplidium albicans</i> (tunicate)	癌症	II
Kahalalide F	<i>Elysia rufescens/Bryopsis</i> sp. (mollusk/green alga)	癌症	II
Squalamine	<i>Squalus acanthias</i> (shark)	癌症	II
IPL-576092	<i>Petrosia contignata</i> (sponge)	牛皮癬	II
IPL-512602	<i>Petrosia contignata</i> (sponge)	氣喘/發炎	II
IPL-550260	<i>Petrosia contignata</i> (sponge)	發炎	I
Halichondrin B derivative	<i>Lissodendoryx</i> sp. (sponge)	癌症	I
Discodermolide	<i>Discodermia dissoluta</i> (sponge)	癌症	I
Hemiasterlin derivative	<i>Cymbastella</i> sp. (sponge)	癌症	I
Bengamide derivative	<i>Jaspis</i> sp. (sponge)	癌症	I
Agelasphin derivative	<i>Agelas mauritanus</i> (sponge)	癌症	I
Laulimalide	<i>Cacospongia myco. jiensis</i> (sponge)	癌症	臨床前
Vitilevamide	<i>Didemnum cucliferum</i> and <i>Polysyncraton lithrostrotum</i> (tunicate)	癌症	臨床前
Diazonamide	<i>Diazona angulata</i> (tunicate)	癌症	臨床前
Eleutherobin	<i>Eleutherobia</i> sp. and <i>Erythropodium caribaeotum</i> (soft coral)	癌症	臨床前
sarcodictyin	<i>Sarcodictyon roseum</i> (sponge)	癌症	臨床前
Peloruside A	<i>Mycale hentscheli</i> (sponge)	癌症	臨床前
Salicylhalimides A and B	<i>Haliclona</i> sp. (sponge)	癌症	臨床前
ES-285 (spisulosine)	<i>Spisila polynyma</i> (mollusc)	癌症	臨床前
thiocoraline	<i>Micromonospora marina</i> (bacteria)	癌症	臨床前

Table 2. Marine-derived compounds in oncology clinical trials

Lead compound and source	Name (synonym)	Mechanism of active	Development status	Developer
Ascidian				
Plitidepsin (aplidin)	Plitidepsin (Aplidin®)	VEGF and VEGFR 1 inhibitor, G1/G2 phase cell cycle inhibitor	Phase II	PharmaMar
Sponge				
Halichondrin B	Eribulin (E7389, NSC-707389)	Tubulin assembly inhibition	Phase II/III	Eisai
Hemiasterlin	E7974	Tubulin assembly inhibition	Phase I	Eisai
Psammaplin A	Panobinostat (LBH-589)	HDAC inhibition	Phase I/II/III	Novartis
Others				
Bryostatin 1	Bryostatin 1	Protein kinase C inhibition	Phase I/II	NCI
Jorumycin	Zalypsis® (PM00104/50)	DNA binding and transcriptional activity	Phase I	PharmaMar
Dolastatin 15	Tasidotin (synthadotin, ILX-651)	Tubulin assembly inhibition	Phase II	Genzyme
Dolastatin 10	Soblidotin (YHI-501, TZT-1027, auristatin PE)	Tubulin assembly inhibition	Phase II under preparation	Yakult Honsha (ASKA Pharmaceutical)
Kahalalide F	Kahalalide F	Alter lysosomal membrane function	Phase II	PharmaMar
	PM02734	Alter lysosomal membrane function	Phase I	PharmaMar

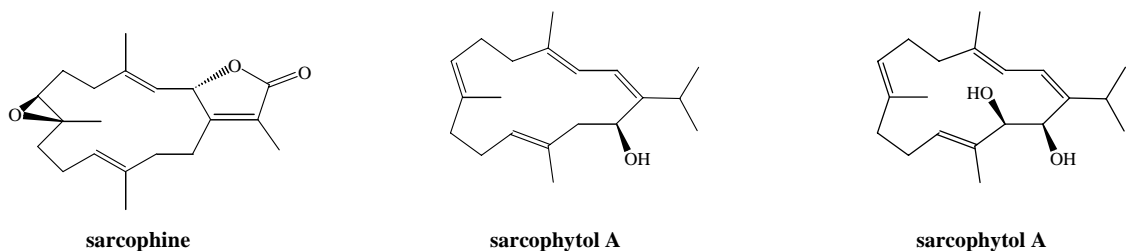
過去十多年，國內發展海洋天然物從無到有，已累積不錯的經驗和成果，且台灣地理位置優越，海洋生物種類繁多。目前國內生技製藥科技受到政府及產業界的重視，因此我國發展海洋先導藥物刻不容緩。

以人類目前的天文知識，地球是吾等唯一知道含有大量液體水的星球，海洋對人類而言總帶著一分神秘面紗，也許是這一份神秘引起人類探索海洋的興趣。迄今、

人類的科技突飛猛進，在海洋物理、海洋生物、海洋化學、海洋生物技術與海洋漁業等等海洋知識，比起二、三十年前，可說進步不少並有許多創新之壯舉。可是，當人類在面對海洋時，還是顯的那麼無知與渺小，因此探索海洋新世界與瞭解海洋無盡的知識，將是未來人類科技發展的重要方向。

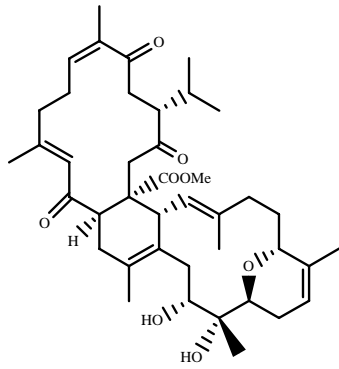
文獻回顧與探討

1974 年首次針對 *Sarcophyton* 屬軟珊瑚發表其活性化學成分的研究，至今約有 300 個化學分子被分離純化出來。第一個被研究的本屬軟珊瑚是 *S. glaucum*，從此軟珊瑚中分離到新化合物 sacophine (化學構造如前述)，此化合物具有顯著的魚毒性，這個現象正可證明無任何外在保護機制的軟珊瑚，為何能在競爭激烈的珊瑚礁生態中繁衍生存，軟珊瑚可能以體內代謝的有毒成分用來抵禦掠奪者⁴。1977 年 sacophine 還被發現對 phosphofructokinase 有抑制作用⁵，而且是 cholinesterase 的競爭抑制者⁶。1989 年 sarcophytol A 和 sarcophytol B 在老鼠背部皮膚 two-stage 致癌實驗中，被發現對致癌因子 teleocidin 具有抑制活性，但對正常細胞不具毒性⁷。

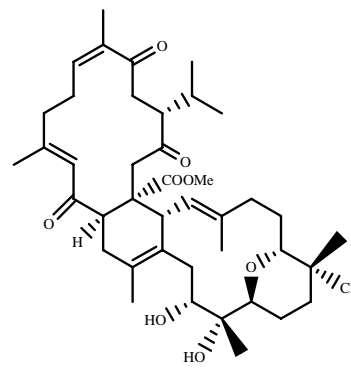


1990 年首次自 *Sarcophyton* 這一屬發現兩分子 cembranoids 化合物以類似 Diels-Alder 的反應方式結合，生合成為具有四十個碳數新骨架天然產物 methyl sarcophytoaeete 和 methyl chlorosarcophytoaeete，這兩個天然化合物對 KB 癌細胞株具有不錯的毒殺活性⁸，而這類新穎的天然物也陸續在 *Sarcophyton* 屬被發現，並有許

多人投入全合成的研究工作。



methyl sarcophytoae



methyl chlorosarcophytoae

近年來對於軟珊瑚組織中所含天然化合物具有的各種生物活性之測試成果，廣泛且深入地被研究發表著，顯示出軟珊瑚所代謝之成分種類豐富，結構新穎。因此本計畫所欲進行研究之軟珊瑚 *Sarcophyton tenuispiculatum* 經仔細的文獻蒐集，至今沒有任何有關其天然成分的文獻報導。因此 *S. tenuispiculatum* 所含活性化合物之研究，確實值得吾等去開發。

研究方法與步驟

一、採樣與萃取

聘任有經驗之潛水人員以浮潛或水肺潛水方式進行軟珊瑚樣品之採集，顧及生態平衡與避免破壞珊瑚礁環境，所採集之珊瑚不宜太大量採集。

採集之樣品部份保留作為鑑種之用，鑑種部分已委請國立台灣大學海洋研究所戴昌鳳教授和其研究生確定。

軟珊瑚組織先進行冷凍乾燥去除水分後稱重，再以刀具仔細將樣品切碎，以 95% 酒精溶劑進行重複多次萃取，酒精可溶粗萃物經乾燥秤重後以水與乙酸乙酯溶劑進行配比分離(partition)，即可獲得乙酸乙酯層(EtOAc layer)與水可溶之部分；水與乙酸乙酯配比分離後之水可溶部分再以正丁醇(*n*-Butanol)進行配比分離，即可再獲得正丁醇

可溶層(*n*-Butanol layer)與水(H₂O layer)可溶層。

獲得之乙酸乙酯層(EtOAc layer)經減壓濃縮後秤重再進行初步之分離，利用管柱層析法(column chromatography)將乙酸乙酯層分別以 100% 己烷逐步增加溶劑之極性至 100% 丙酮再調高移動相極性到丙酮：甲醇=1：4，如此將乙酸乙酯層粗萃物分成十數個不同極性的層析部分(fractions)。

二、分離純化與結構鑑定

綜合上述之層析與沉澱方法，共可獲得 95% 乙醇粗萃物、乙酸乙酯可溶層(EtOAc layer)、正丁醇可溶層(*n*-Butanol layer)、水可溶層(H₂O layer)與乙酸乙酯層所分離之十數個不同極性層析層。

運用各種層析方式(如：column chromatography；HPLC；MPLC；TLC...)加以重覆進行細部之分離純化，尋找具有活性的天然物成分。將前述所取得之各分層粗萃物先取樣進行生物活性試驗(bioassay)以作為研究導向的指標，具有活性之粗萃物先以 Silica gel 層析管柱逐步增加流動相溶劑之極性(hexane – EtOAc – MeoH)進行粗步分離，所得各分離層(fractions)進一步以管柱層析、TLC 以及 HPLC (固定相使用 RP-18 或 Silica gel)等方法去細部分離，以各種層析方式(chromatography)加以重覆分離，直到各組成成分純化。

而所純化出來的各種天然物將送至國科會貴重儀器中心分析判讀其質譜(MS)及各項光譜資料(UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMQC, HMBC, NOESY)，用來確立其分子結構。必要時則需將所得之天然物利用簡單的有機合成方法製備衍生物後再以回推的方式來解析其可能的分子結構；或將所得的天然物在適當之溶劑條件下，培養天然物成為單晶晶體，再利用國科會貴重儀器中心之 X-ray 繞射儀來判斷所得化合物之分子立體結構。

三、生物活性之篩檢

以往天然物的研究較注重化學成分得分析鑑定，而忽略了生物活性的測試，這樣導致了大量活性化合物的流失。到了 20 世紀 70 年代初期，人們逐漸認識到生物活性測試的重要性，建立了一些簡單的活性篩選模式，發現了許多具有良好生物活性的天然物。但這種方法還有很大的盲點，一些含量少、活性高的成分很容易丟失。

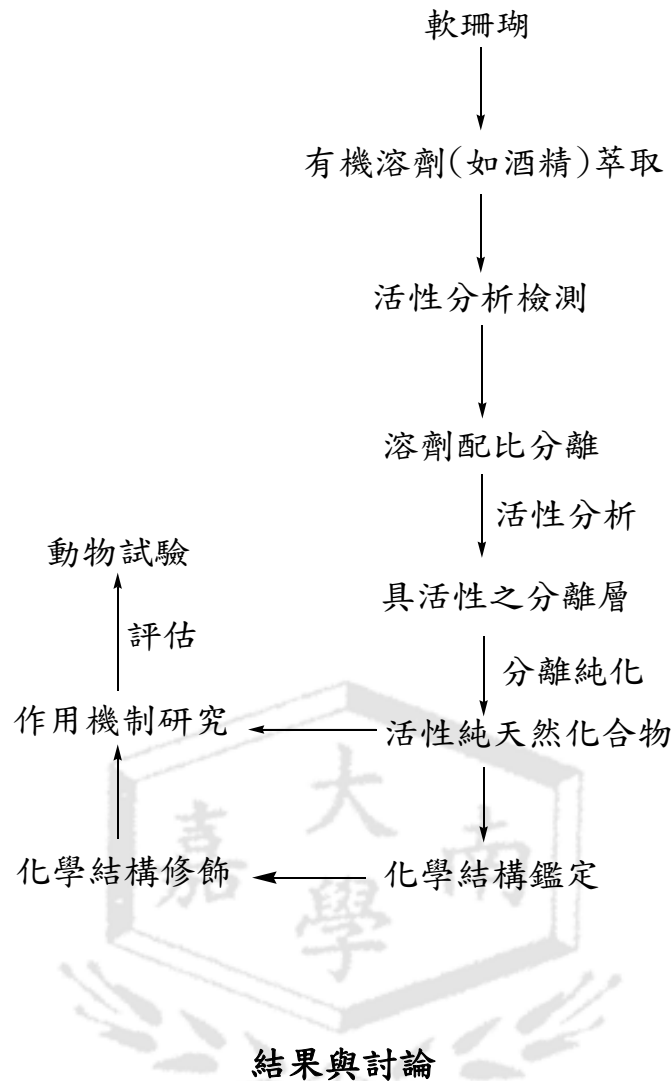
研究過程所獲得每一部份之粗萃物、每一分離層(fractions)與純化之天然化合物，進行多種生物活性之測試研究。

本計劃將以細胞毒殺活性(cytotoxicity)為整個活性篩選之基礎，並引導分離純化之方向(Bioactivity-guided separation)，進行癌細胞株毒殺活性試驗，具有癌細胞毒性之化合物將再進行機轉之研究，了解毒殺作用所引起之癌細胞株型態變化，並深入作用機制如細胞週期、細胞型態及細胞凋亡訊息傳遞等進行研究。

四錯鹽分析測試(法 MTS tetrazolium salt assay)

四錯鹽分析法是利用 metabolically active cells 的脫氫酵素(dehydrogenase)可將 MTS 還原產生強烈鮮紅色螢光的 formazan。此螢光物質 formazan 在吸收波長 490 nm 有最大吸光值，由此藉以測定活細胞數目。其步驟如下：將定量的細胞(1×10^4 /well)培養在 96-well multiplates (Nunclon, Denmark)，並在 37°C、5% CO₂ 培養箱中至少生長 16 小時以上。細胞於特定時間以藥物處理後，更換培養液，於每個 well 加入 20 μ l 的 MTS/PMS 溶液反應 3 小時後，使用酵素免疫分析儀(ELISA reader 312e, Bio-TEK)於波長 490 nm 下測定其 optical density。

本計劃之研究構想



本計畫主要針對台灣海域軟珊瑚 *S. tenuispiculatum* 所含生物活性的天然物分子進行分析研究，尋找活性指標成分，了解 *S. tenuispiculatum* 之天然產物結構之特異性。

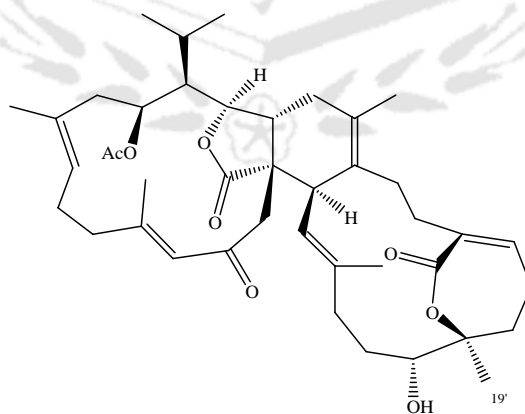
目前針對本計畫所要研究的軟珊瑚進行的研究，我們發現 *S. tenuispiculatum* 乙酸乙酯層之粗萃物針對 Hep-G2 細胞進行細胞毒殺活性測試(Table 3)，顯示這本種軟珊瑚有不錯之細胞毒殺活性。並且 *S. tenuispiculatum* 95% 乙醇的粗萃物對於四種抗氧化活性評估也顯示優異的抗氧化能力(Table 4)。目前已從 *S. tenuispiculatum* 也純化出一個純新天然化合物。經文獻的比對發現本化合物為以往文獻尚未發表之新天然化合物，並以培養出單晶完成 X-ray 的結構解析，此天然物結構相當複雜，具有 42 個碳數的 biscembranoid，為台灣軟珊瑚成分分析第一次被發現的天然物骨架。

Table 3. Hep-G2 growth inhibition of *S. tenuispiculatum*

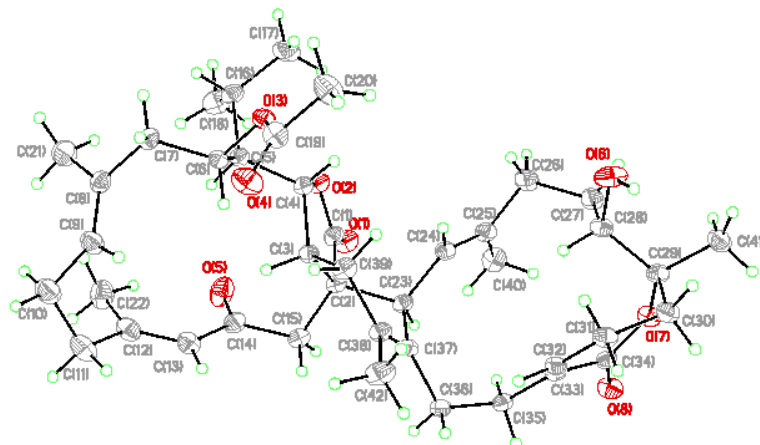
Sample	% Growth inhibition (Hep-G2)		
	10 ($\mu\text{g/mL}$)	50 ($\mu\text{g/mL}$)	100 ($\mu\text{g/mL}$)
control	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
<i>Sarcophyton numerosa</i>	14.27 \pm 1.35	78.35 \pm 2.03	82.26 \pm 6.78

Table 4. antioxidation on of *S. tenuispiculatum*

檢測樣品	檢測項目			
	IC ₅₀ (mg/L)			總抗氧化能力測試 (mM Trolox/g)
	DPPH 自由基 清除率評估	螯合亞鐵離 子能力評估	清除超氧陰 離子評估	
<i>Sarcophyton numerosa</i>	22.3	2830.6	68.6	204.2
Vitamin C	11.0	—	603.9	54.3
(+)-Catechin	—	8548.9	—	—



新天然物結構



新天然物 X-ray ORTEP 圖

嘉大南
參考文獻

1. Fusetani, N. "Drugs from the Sea" Basel, Karger (Switzerland), **2000**, pp. 1-5.
2. Salomon, C. E.; Magarvey, N. A.; Sherman, D. F. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 105-121.
3. Butler, M. S. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 475-516.
4. Bernstein, J.; Shmeuli, U.; Zadock, E.; Kashman, Y.; Neeman, I. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2817.
5. Erman, A.; Neeman, I. *Toxicon* **1977**, *15*, 207.
6. Weinheimer, A. J.; Matson, J. A.; Hossain, M. B.; Helm, D. Van der *Tetrahedron Lett.* **1977**, 2923.
7. Kobayashi, M.; Osabe, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 631.
8. Kusumi.; Igari, M.; Ishitsuka, M. O.; Ichikawa, A.; Itezono, Y.; Nakayama, N.; Kakisawa, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6286.