海绵生物活性物质及海绵细胞离体培养

张骁英 赵权宇 薛 松 张 卫*

(中国科学院大连化学物理研究所生化工程室海洋生物产品组，大连 116023)

摘 要 介绍了来自海绵的生物活性物质种类、分布及其潜在的应用价值。讨论了其作为抗癌、抗病毒、抗细菌等药用的生物活性物质及其相关的海绵种属；强调海绵生物活性物质的商业化和临床应用所面临的"供给短缺问题"。作为解决这一问题的途径之一，海绵细胞离体培养是最有前景的技术。讨论了海绵细胞离体培养技术的研究现状，存在的问题及未来的发展趋势。对我国海域的海绵生物活性物质的研究开发现状进行总结，强调海绵研究对开发具有我国自主知识产权的新药、新化合物的必要性及重要性，并提出进行研发的可能优先领域。

关键词 海绵，生物活性物质，细胞离体培养

中图分类号 Q2-33 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2002)01-0010-06

海绵(Marine sponge)属于动物界多孔动物门(Porifera)，是一大类低等多细胞海洋动物，约占海洋物种总量的 1/15，是海洋中除珊瑚外的第二大生物量，全世界大约有10 000到15 000种左右，我国据称也有5 000种左右，有时它们也被称为多孔动物。由于他们不是经济类海洋物种，因此以前很少有人研究。

自从 1950 年首次报道从海绵中分离到活性物质[1,2]，海绵便引起了人们的关注。以后又从海绵中发现了大量的具有抗肿瘤、抗真菌、甚至抗 HIV 的活性物质。现在，每个月都有数篇从海绵中发现活性物质的报道公开发表，相关的专利也有上百个之多。

从海绵中发现活性物质的概率相对于它在海洋生物中所占的比例以及其它海洋生物来说非常高。据统计，海绵是迄今为止海洋天然产物的最大来源：1997 年和 1999 年"Natural Products Report"分别发表了两篇综述[3,4]，各自总结了800 种左右的海洋天然产物，其中来源于海绵的分别占到了40.2%(如图 1A)和 40.6%(如图 1B)。

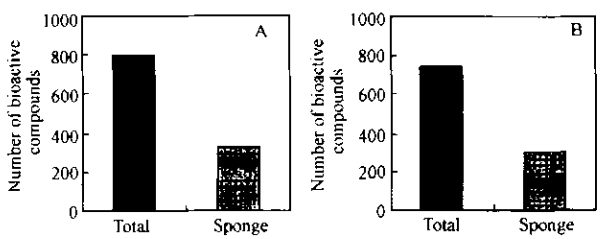

图 1 NPR 统计的海洋活性物质研究状况

Fig.1 Marine bioactive compounds research from NPR

A.1996; B.1997 ~ 1998

由此可见海绵在海洋生物资源的开发利用，尤其是海洋药物和海洋天然产物的研究开发中的重要地位。

1 海绵活性物质与海绵研究

1.1 海绵活性物质的活性、结构、种类及分布

从海绵中发现的最引人注目的生物活性物质是抗肿瘤[5,6]、抗细菌[7]和抗病毒(含 HIV 病毒)[8]的物质。除此之外，一些活性物质还具有特定的酶抑制剂活性[9]，抗污损能力[10,11]和抗真菌[12]活性等。有时，一种海绵中发现的一种或几种活性物质往往具有几种活性，例如马尔代夫共和国在 *Cribrochalina* 种海绵中发现的活性物质 Cribrostatins 3,4 和 5 具有明显的抗肿瘤活性，同时 Cribrostatins 1、2 和 Cribrostatins 3、4、5 都具有抗细菌和(或)抗真菌的活性[13]，使得该种海绵和这些化合物极具开发价值。有时，不同地域的同种海绵中的活性物质又有差异，符雄等人[14]对同种海绵 *Dysidea* sp. 的活性物质连续进行研究，总结探讨了不同地域同种海绵所含天然组份之间的关系，在研究海绵的活性物质与种属、地域之间的关系方面做出了有益的探索。

据不完全统计，1997 ~ 2000 年间 Chemical Abstract (CA)收录的关于海绵研究的论文共 684 篇(如图 2)，发现在此期间活性物质研究的论文占了总数的 41.7%，而其中发现抗肿瘤活性的报道又占了 52.6%，有 150 篇之多，涉及到的活性物质约 307 种。同时，在抗 HIV 活性物质的研究方面也令人鼓舞，相关报道累计 8 篇，发现了 15 种具有体外抗 HIV 活性的天然物质(如表 1)。

海绵活性物质具有天然高分子的普遍特点：多聚、成环、不饱和度高和杂原子含量高等特点。常见的海绵活性物质

收稿日期：2001-06-25，修回日期：2001-10-22。

* 通讯作者。Tel：86-411-4671991 ext 864；Fax：86-411-4691570；E-mail：Weizhang@dicp.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1　1997 ~ 2000 年海绵抗 HIV 活性物质发现统计(文献来源:Chemical Abstract)

Table 1　Anti-HIV marine sponges bioactivity compounds discovered in 1997 ~ 2000 (Data from Chemical Abstract)

No.	Name of Marine sponges	Source	Kinds and name of the compounds	References
1	*Hyrtios cf. Erecta*. (black marine sponge)	Fiji	Sesterterpene and alkaloids Homofascaplysin A, fascaplysin	[19]
2	*Halicortex* sp.	Mediterranean	Bromoindole alkaloid, Dragmacidin F	[20]
3	*Dactylospongia elegans*	Tropic	Sesquiterpene: pelorol, ilimaquinone	[21]
4	*Adocia* sp. (*Chalinidae*)	Australia	Adociasulfate 1 (Ⅰ), adociasulfate 7, and adociasulfate 8 (Ⅱ)	[8]
5	*Hippiospongia metachromia*	Unclear	(-)-Ilimaquinone	[22]
6	*Eurypongia* sp.	Unclear	Sesquiterpene hydroquinone: (-)-Frondosins A and D	[23]
7	*Niphates erecta*	Unclear	Glycoprotein: niphatevirin	[24]
8	*Hippospongia* sp.	Okinawan	Taurospongin A, novel acetylenic fatty acid	[25]

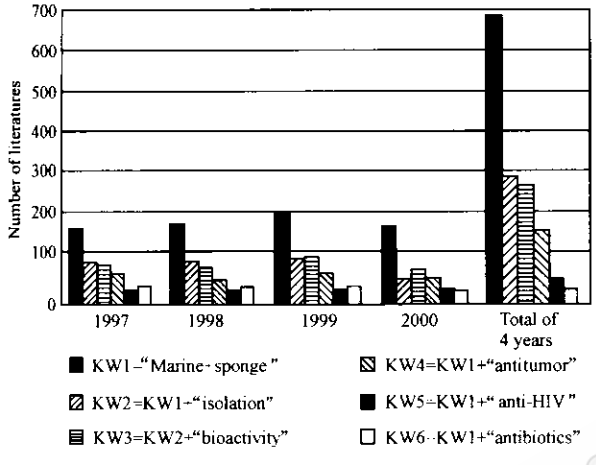

图 2　1997 ~ 2000 年 CA 海绵研究文献统计

Fig.2　1997 ~ 2000 literatures from CA about marine sponge research

的种类有倍半烯萜类[15]、固醇和类固醇[16]、生物碱类[17]、大环内酯类[18],此外还有环肽类、多聚乙酰类、多糖等类型。这些天然活性物质大多结构新颖,许多在陆地生物中从未发现过。

海绵中活性物质的种类如此之多可能与其特殊的生理结构和代谢方式有关。海绵是无选择过滤捕食性动物,依靠过滤吸收海水中的营养物质维持生命。几十万年的进化选择使它保留了对海水中各种物质的极强的代谢能力,这种能力使海绵降解或转化或合成了这些活性物质,往往同时富集于体内,从而形成了极佳的活性物质资源。

1.2　活性物质研究中海绵的种属分布特点

在 1997 至 2000 年的 CA 中,研究过的海绵在 110 ~ 150 种之间(其中一些种属未定)。研究较多的有:*Agelas*、*Amphimedon*、*Axinella*、*Callyspongia*、*Discodermia*、*Dysidea*、*Halichondria*、*Halicona*、*Hippospongia*、*Hyrtios*、*Mycale* 等十几个属。其中比较著名的是从 *Halichondria* 属发现的抗肿瘤活性的大田软海绵素 Halichondrins[26],*Discodermia* 属发现的极强抗肿瘤活性的 Discordermolide[27]。刘锡金[28]等对十几种南海海绵进行研究,发现来自海南岛的茄海绵 *Tetilla* sp. 的乙醇提取物具有明显的抑瘤活性,同时动物毒性较低。从 *Dysidea* 属发现的抗病毒活性物质 Avarol[29],从 *Hippiospongia metachromia* 中发现的 Ilimaquinone[22],除了具有抗肿瘤、抗细菌、抗炎症和抗 HIV 等活性外,同时也是一种酶抑制剂。根据统计,抗 HIV 的活性物质更易在一些稀有的海绵中发现,这可能是抗 HIV 活性物质发现远远少于抗肿瘤活性物质的原因。尽管如此,从海绵中发现抗 HIV 活性物质的比例还是远远高于其他来源的药物筛选。

1.3　海绵活性物质的新药开发现状

海绵来源的生物活性物质以每年上百种的速度增加,自然引起了医药工业界的重视。但是,迄今为止,能够顺利进行商业开发的海绵药物寥寥无几,基本上没有进入临床应用的化合物,多数停留在体外实验(*in vitro*)的阶段,进入体内实验(*in vivo*)的活性物质只有几种,相对于大量发现的活性物质少得可怜(如表 2)。唯一获得 FDA 批准应用于人体二期临床试验的海绵药物是来自隐南瓜海绵(*Cryptethia crypta*)的阿糖胞苷 Ara-A[29]。

表 2　海绵活性物质开发状况统计

Table 2　The exploit status of marine sponges bioacitivity compounds

Status	Compound(sponge/acitivity)
In vitro active	Millions
In vivo active	Isohomohalichondrin B (*Halichondria okadai*/antitumor) Discodermolide P (*Desmacididea batzella*/antitumor) Spongistatins/Altohyrtins/Cinchyrolide (antitumor) Avarol (*Dysidea avara*/anti-HIV) Manoealide (*Luffariella variabilis*/antitumor)
Pre-clinical	Halichondrin B (*Halichondria okadai*/antitumor)
Phase Ⅰ	Ara-A (*Cryptethia crypta*/antitumor)
Phase Ⅱ	—
Phase Ⅲ	—
Clinical	—

1.4　海绵活性物质药物开发中的共性问题——药源供给不足

造成海绵药物开发明显滞后的原因是"Supply Problem",也就是海绵活性物质研究人员所说的"药源供给不足"问题。

在海绵活性物质研究和发现中一个不容忽视的问题是:海绵体内的活性物质含量非常低。以 Halichondrin B 为例,从 1t 湿重海绵(*Halichondria okadai*)最终仅可提取获得 310mg 的纯品[30]。同时,捕捞海绵资源有限,还要破坏海洋生态环境。即使如此也不能满足临床前药理研究所需药品量。在海绵药物的开发过程中,由于无法获得足够药物开发所需的

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

药品量,使开发不能继续。

可行的商业生产技术方案除了采集野生海绵外,还包括水产养殖、化学合成、细胞和组织培养以及培养异源受体的转基因菌。尽管水产养殖是最容易低成本大量生产海绵生物量的方法,但其成功培养取决于不可预知和常常变化的自然环境,其代谢产物的高水平调控合成也难以实现。而且,不同的海绵生长速率不同,一些生长特别缓慢的海绵不适合通过水产养殖来生产生物量。另一方面,由于大多数海绵生物活性化合物是结构复杂的手性化合物,呈环状且不饱和度高,杂原子含量多,化学合成过程往往非常复杂,实验室虽然可行,但不能实现商业上的经济生产。此外,对海绵的许多基本的生物学和分子生物学规律还缺乏研究,将海绵代谢产物的生物合成基因转移至异源受体如大肠杆菌或酵母中尚有相当漫长的过程。因此,对许多海绵活性药物来说,海绵细胞和组织的生物反应器培养如果不能说是唯一的,也是目前最为可行的选择。

2 海绵细胞离体培养

2.1 海绵细胞培养工作的意义

海绵细胞离体培养其最显著的优点是培养系统完全可控并能够实现目的代谢物的调控和最优化生产。一方面适于工业放大,另一方面活性物质高水平生产的潜力使其经济可行,具有显著的应用开发价值。同时,由于海绵细胞非常适于进行动物细胞信号传导研究,因此对海绵细胞的离体培养的研究也具有很高的基础生物学科研价值。该领域已经吸引了包括德国、以色列、美国、西班牙、新西兰、澳大利亚、日本等许多国家的科研力量。

2.2 海绵细胞离体培养的早期研究

关于海绵细胞的研究很早就有,最早的是 Wilson (1898) 的一篇关于如何对海绵的胚细胞进行培养的技术[31]。但在1970年以前,关于海绵细胞的研究可以概括为,利用短时期的海绵细胞培养模型研究海绵生物学,而不是以生产海绵生物量为目的。但这一时期的工作为海绵细胞培养的研究探索了一些实验技术。例如,发现了 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对海绵细胞聚集的作用,这一现象被方便地用来分散海绵细胞[32]。

2.3 近年来海绵细胞离体培养的研究

从1970年至今,伴随着动物细胞培养技术的日益成熟,以及对海绵细胞认识的积累,人们开始关注长期连续的海绵细胞培养体系,以实现工业化大规模生产海绵生物量,最终生产海绵药物。近10年内,海绵细胞的离体培养研究已有了初步的方法和框架。

2.3.1 海绵细胞基本培养方法的探索:Pomponi 和 Willoughby[33] 将海绵细胞的培养过程大致分为三步:(1) 组织细胞的解离。可以选择机械分离法,即用细筛网挤压细胞使之分散。这种方法分离效率高但细胞损失大;化学法,即使用不含钙镁的人工海水使组织细胞自动解散,这种方法方便高效,细胞收率高,是目前普遍使用的方法;酶法,使用胰蛋白酶消解细胞;或者几种办法的结合来获得较好的分散细胞。(2) 细胞的筛选。海绵中的细胞分为上皮扁平细胞、原细胞(即阿米巴细胞)、领细胞、孔细胞几大类。其中,原细胞是分化能力最强的细胞,在海绵不同的生理和营养时期可以向每一种功能细胞转化。经过细胞筛选获得单一种类细胞的纯培养,有利于对活性物质的形成进行研究,甚至可以由此获得高产活性物质的优质细胞株。Maria 等人[34] 利用梯度密度离心和层析分离配合光学显微镜对生产抗癌活性物质 avarol 的海绵 *Dysidea avarol* 进行细胞分离和筛选,发现了活性物质 avarol 主要存在于领细胞内。但是,对不同类别细胞的筛选方法并不多,Maria 的研究方法是现在研究中普遍采用的方法。这类方法需要对欲筛选的海绵的细胞生物学特征进行准确的研究和掌握。即使这样,要想进行精确的细胞分类和分离也仍然是一件非常困难的工作。(3) 纯培养细胞系建立。条件是去除微生物杂菌污染。这一点对海绵细胞的培养似乎格外重要。几乎所有的海绵细胞培养的报道都采用了在高浓度抗生素存在的培养基中对细胞进行培养[33]。

2.3.2 培养基的探索:建立纯细胞系后,细胞能否长期存活、分化、生长及进行基础代谢,首先取决于合适培养基的开发。由于海绵生长在高盐、高渗、化学成分复杂、微生物环境复杂的海水环境中,海绵细胞对培养的要求也不同于普通动物细胞和微生物。Pomponi 等[33] (1994) 提出用于海绵细胞初级培养的培养基主要由5部分组成:人工合成培养基(如 RPMI1640)、磷酸缓冲液(pH7.0)、5% 牛血清、不含 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的人工海水(CMFSW)、抗生素。其中,CMFSW 的作用是使细胞在培养过程中保持分散状态,并提供海绵细胞所需的高渗透压。培养过程中必须始终保持高浓度的抗生素,培养基的浓度也要尽量低,原因是培养过程中微生物的污染非常严重。在没有采取这些措施时,细胞在培养开始后的1~3d内就全部污染[34]。海绵细胞培养的这个特点是因为海绵体内丰富的孔道水系内富集共生了大量的微生物,在海绵细胞分散后,它们会随着细胞进入培养体系。但持续高浓度的抗生素常常会对细胞的生长产生抑制作用,甚至导致细胞死亡。

避免微生物污染的另一个办法是采用尚未接触海水环境的海绵胚胎细胞作为培养细胞的种子。胚胎细胞的优点是再生潜力高。但是,胚细胞经冷冻保藏复苏后,细胞被污染的几率大大升高。这可能是由于胚细胞在复苏中处于较脆弱的状态,而细菌等污染生物却可以大量繁殖。研究一种可以保持胚细胞高再生能力、高分化能力的冷冻保藏方法,提供大量连续的胚细胞也是一个需要进一步研究的课题[35]。

McMahon 等人的专利对上述培养基进行了改进[36]。以商业培养基为基础,并用持续高浓度的抗生素控制微生物污染。不同的是,使用的人工海水中含有 1.35g/L 的镁和 0.4 g/L左右的钙,并且用4.3%的腹足类动物的血清代替了牛血清。用此种培养基对海绵 *Aplysina fistularis* 的细胞培养了17d后收获,使细胞由 9.3×10^7 增加到 8.18×10^9,细胞数量增加了88倍。对 *Acanthella cavernosa* 进行了同样类似的培

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

养,不但增加了细胞的生物量,而且同时获得了与野生海绵具有同样抗菌活性的活性物质。

两例细胞的生长状况如此理想可能是由于使用了特殊血清的缘故。但是,腹足类动物的血清非常难得而且相当昂贵,所以,这一方法显然只适用于实验室研究。

2.3.3 其他相关技术的研究:对细胞培养的其他相关技术也有研究,例如:冷藏与复苏条件。Rinkevich 认为[35]使用15%的 DMSO 或 10%甘油保护是现在常规的冷藏条件,但是几乎所有的冷藏海绵细胞都存在着增加污染几率和成活率低的问题[37]。

对海绵细胞生长中的物理因子(如压力、氧分压、CO_2 分压等)的考察几乎仍为空白。唯有 Anatoli 等人在考察乙烯对海绵基因表达的影响时使用了加压的海绵细胞培养装置[38],但并未考察压力对细胞生长的影响。此外,细胞培养温度的考察也尤为重要。在对 *Dysidea avara* 细胞[29]和 *Suberites domuncula* 细胞培养时[39],温度都采用 16℃。与该类海绵的自然生长温度接近。鉴于不同种类不同地域的海绵其生长温度不同,其细胞培养温度也必然会不同。

2.3.4 存在的其它问题:1998 年前适宜于连续稳定培养的海绵细胞系还未成功构建。海绵离体细胞尚不可能长期存活。在有限的尝试中,除了使用昂贵的腹足类动物血清外,也有使用牛血清进行培养,但是,海绵细胞的增殖活力很弱,必须借助外加的促有丝分裂试剂刺激细胞[33,40]。也有报道使用一些生长促进因子如表皮生长因子(EGF)、纤连因子(FGF),胰岛素等促进细胞分裂生长[35]。

2.4 海绵细胞离体培养的最新进展

2.4.1 端粒酶的活性与海绵细胞生长分化对接触的需求:海绵组织有非常强的再生能力,但它的细胞在离体培养时并不具有很强的繁殖能力。Custodio 等人的一个重要发现解释了以往不能够获得稳定的、长期存活的海绵细胞系的原因[41]。他们的研究发现,海绵组织中细胞保持着较高的端粒酶活性,而解离后的游离细胞则丧失了该酶的活性,且迅速转入死亡期[41]。端粒酶是与 DNA 正常复制密切相关的酶,丧失端粒酶的活性意味着细胞无法进行正常的 DNA 复制。海绵细胞需要细胞与细胞的相互接触来维持端粒酶的活性,从而维持细胞的增殖能力和生命力[42]。

2.4.2 海绵细胞团 primmorphs 的培养:基于这一认识,Custodio 等人首次对海绵 *Suberites domuncula* 的组织建立了以海绵细胞团为培养对象的体系[41]。所谓细胞团是由 2000 个左右的细胞聚集成为 1~3mm 左右的小团,称为 primmorph。在他们的尝试中,primmorphs 在培养基未补充的情况下维持了 5 个月。离散的海绵细胞在形成了 primmorphs 后很快由端粒酶阴性转为阳性。并且具有了 DNA 合成和细胞生长的能力。

primmorphs 的培养很快便应用于特定的海绵进行活性物质生产的考察,Muller 等人(2000)对一种名为 *Dysidea avara* 的海绵细胞进行了 primmorphs 的培养(如图 3)[29],观察到了海绵细胞的细胞团的形成、发展,使海绵细胞以细胞团的形式存活达 4 星期之久。并在排除了共生微生物生产活性物质可能性的前提下,证明了细胞团对活性物质 Ara-A(一种抗肿瘤代谢产物)的生产能力达到了野生海绵产量的 80%(重量比)。这一结果非常令人鼓舞,不仅因为 Ara-A 本身是一种很有价值的抗癌药物,也因为它证明了通过细胞团离体培养生产海绵活性物质的可能性。

2.4.3 海绵细胞团 primmorphs 培养中存在的问题:尽管 primmorphs 的初步培养已经成功,但一些重要的基础理论问

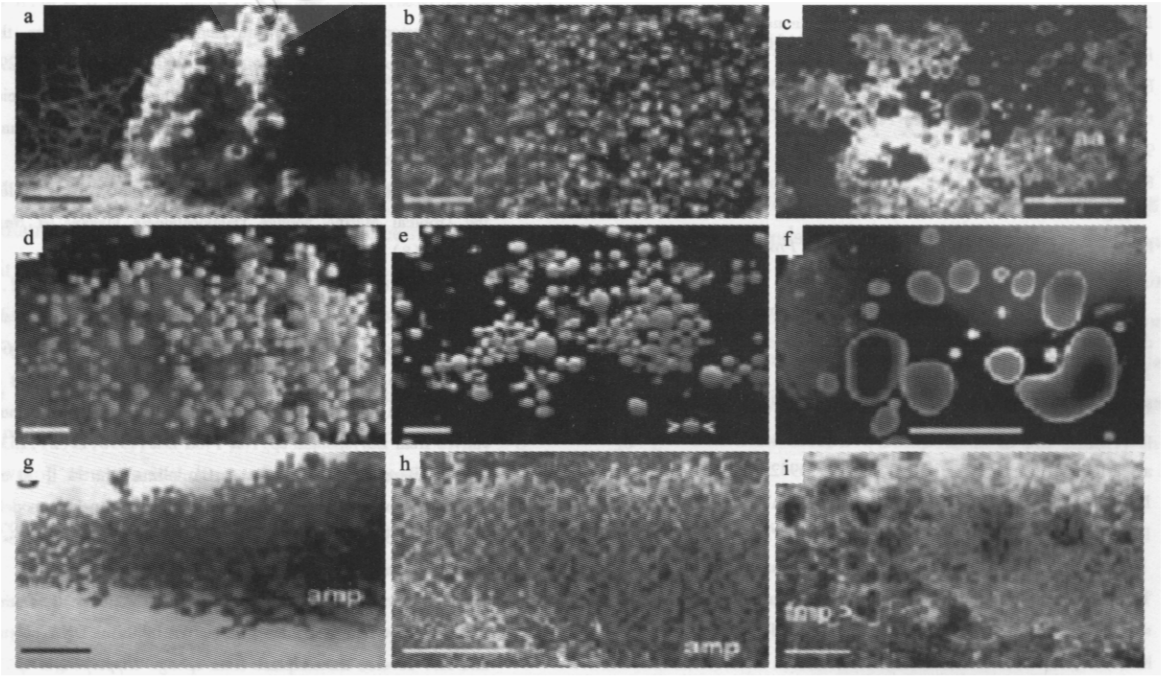

图 3　海绵 *Dysidea avara* 的细胞团形成过程

Fig.3　Formation of *Dysidea avara* primmorphs

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

题仍有待探讨。

首先，由于形成 primmorphs 是一个自然死亡淘汰选择细胞的过程，我们无法比较这一培养过程在生物量的生产上是否经济。而 Muller 研究小组尚无有关生物量增殖的报道。其次，primmorphs 形成的化学和生物学机制还不清楚。同时，细胞团的分化、生长及活性物质的合成机制以及与海绵种属之间的关系也有待详细的研究。培养基的开发方面来讲，主要是营养需求及其对细胞生长和代谢规律的调控及对活性物质生产的作用影响研究还是空白。最后，关于微生物的污染控制方面，目前 primmorphs 培养中仍然采用持续高浓度抗生素控制微生物的污染，而在某些海绵的活性物质产生过程中，正是这些海绵共生微生物起着重要的作用。寻找新的污染控制方法，同时深入的研究共生微生物对活性物质生产的作用也是海绵细胞团离体培养中有待解决的关键问题之一。

3 展 望

总的来说，海绵活性物质尤其是药物的开发将是一个大有前途的领域。在解决临床应用及商业开发的"药源供给不足"问题中，海绵细胞培养和活性物质高产细胞株的建立，相关的细胞培养营养学研究和培养基开发，培养条件的优化以及专用生物反应器和生物工艺过程的开发将至关重要。短期内，针对 primmorphs 的培养与海绵共生微生物的深入研究将最有可能实现以 primmorphs 培养模式培养海绵细胞生产海绵药物的商业应用。更为重要的是，这将为海绵细胞离体培养的新理论、新技术和新过程的研究开发打下坚实的知识和技术基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Bergmann W, Feeney R J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *J Am Chem Soc*, 1950, **72**: 2809 ~ 2810

[2] Bergmann W, Feeney R J *et al*. Nucleosides of sponges: discovery of the arabinose-based nucleosides-Tehya crypta. *J Org Chem*, 1951, **16**: 981 ~ 987

[3] Faulkner D J. Marine Natural Products. *Nat Prod Rep*, 1998, **15**: 113 ~ 158

[4] Faulkner D J. Marine Natural Products. *Nat Prod Rep*, 1999, **16**: 155 ~ 197

[5] Longley Ross E, Gunasekera Sarath P, Pomponi Shirley A. Discodermolide compounds useful for treatment of cancer U.S. US 5840750 A 24 1998, Nov, 31 pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 567, 442

[6] Pettit George R, Xu J P. Isolation and structural elucidation of the human cancer cell growth inhibitory compound devnominated "agelagalastatin" *PCT Int. Appl*. 1999, WO 9963942 A2 16 Dec, 22 pp. DESIGNATED STATES: W: CA, JP, US; RW: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

[7] Matsunaga Shigeki, Yamashita Takahiro, Tsukamoto Sachiko *et al*. Three new antibacterial alkaloids from a marine sponge Stelletta specines. *J Nat Prod*, 1999, **62**(8): 1202 ~ 1204

[8] Kalaitzis John A, de Leone Priscila, Harris, Lisa *et al*. Adociasulfates 1, 7, and 8: new bioactive hexaprenoid hydroquinones from the marine sponge *Adocia sp*. *J Org Chem*, 1999, **64**(15), 5571 ~ 5574

[9] Yoon Mi Young, Kim Young Chul, Saengyak Hakhoech *et al*. Toxicity and changes in hepatic metabolizing enzyme system induced by repeated administration of pectenotoxin 2 isolated from marine sponges. *Saengyak Hakhoechi*, 1997, **28**(4): 280 ~ 285

[10] Hirota Hiroshi, Okino Tatsufumi, Yoshimura Erina *et al*. Five new antifouling sesquiterpenes from two marine sponges of the genus Axinyssa and the nudibranch Phyllidia pustulosa. *Tetrahedron*, 1998, **54**(46): 13971 ~ 13980

[11] Sera Yutaka, Adachi Kyoko, Nishida Fumiko *et al*. A New Sesquiterpene as an Antifouling Substance from a Palauan Marine Sponge, Dysidea herbacea. *J Nat Prod*, 1999, **62**(2): 395 ~ 396

[12] Clark D P, Carroll Jennifer, Naylor Stephen *et al*. An antifungal cyclodepsipeptide, Cyclolithistide A, from the sponge Theonella swinhoei. *J Org Chem*, 1998, **63**(24): 8757 ~ 8764

[13] Pettit George R, Knight John C, Collins Jeremiah C *et al*. Antineoplastic agents 430. Isolation and structure of cribrostatins 3, 4, and 5 from the Republic of Maldives Cribrochalina species. *J Nat Prod*, 2000, **63**(6): 793 ~ 798

[14] FU X(符雄), SU J Y(苏镜娱), ZENG L M(曾陇梅). Dysamide U, a new trichlorinated diketopiperazine from the sponege *Dysidea* sp. *Chin J Chem*(中国化学), 2000, **18**(6): 882 ~ 885

[15] Gauvin A, Aknin M, Smadja J *et al*. Biologically active sesterterpenes from a marine sponge. *Riv Ital* EPPOS, 1998. (Spec. Num.): 622 ~ 626

[16] Aoki Shunji Yoshioka Yasuhiro, Miyamoto Yasuhisa *et al*. Agosterol A, a novel polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a marine sponge of *Spongia* sp. *Tetrahedron Lett*, 1998, **39**(35): 6303 ~ 6306

[17] Kashma Yoel, Koren-Goldshlager Ganit, Gravalos M D *et al*. Halitulin, a new cytotoxic alkaloid from the marine sponge *Haliclona tulearensis*. *Tetrahedron Lett*, 1999, **40**(5): 997 ~ 1000

[18] Horton Paul A, Koehn Frank, Longley Ross E *et al*. Cytotoxic macrolides and methods of use. U.S. US 5684036 A4, 1997, Nov, 14 pp. Cont.-in-part of U.S. 5,478,861

[19] Kirsch Gesa, Koeng Gabriele M, Wright Anthony D *et al*. A new bioactive sesterterpene and antiplasmodial alkaloids from themarine sponge *Hyrios cf. erecta*. *J Nat Prod*, 2000, **63**(6): 825 ~ 829

[20] Cutignano A, Bifulco Giuseppe, Bruno Ines *et al*. Dragmacidin F: a new antiviral bromoindole alkaloid from the Mediterranean sponge Halicortex sp. *Tetrahedron*, 2000, **56**(23), 3743 ~ 3748

[21] Goclik Eva, Koenig Gbriele M, Wright Anthony D *et al*. Pelorol from the Tropical Marine Sponge Dactylospongia elegans. *J Nat Prod*, 2000, **63**(8), 1150 ~ 1152

[22] Radeke Heike S, Digits Cheryl A, Casaubon Rebecca L *et al*. Interactions of (-)-ilimaquinone with methylation enzymes: implications for vesicular-mediated secretion. *Chem Biol*, 1999, **6**(9): 639 ~ 647

[23] Hallock Yali F, Cardellina John H Ⅱ, Boyd Michael R *et al*. (-)-Frondosins A and D, HIV-inhibitory sesquiterpene hydroquinone derivatives from Eurysponga sp. *Nat Prod Lett*, 1998, **11**(2): 153 ~ 160

[24] O'Keefe Barry R, Beutler John A, Cardellina John H Ⅱ *et al*. Isolation and characterization of niphatevirin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge Niphates erecta. *Eur J biochem*, 1997, **245**(1): 47 ~ 53

[25] Ishiyama Haruaki, Ishibashi Masami, Ogawa Akio *et al*. Taurospongin A, novel acetylenic fatty acid derivative inhibitin DNA polymerase b and HIV reverse transcriptase from sponge *Hippospongia sp*. *J. Org Chem*, 1997, **62**(12): 3831 ~ 3836

[26] Hirata Y, Uemura D *et al*. Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure Appl Chem*, 1986, **58**: 701 ~ 710.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[27] Longley Ross E, Gunasekera Sarath P, Pomponi Shirley *et al*. Discodermolide compounds and pharmaceutical compositions containing them for cancer therapy *PCT Int. Appl*. WO 9720835 A1 12 1997, Jun, 31 pp

[28] LIU X J(刘锡金) *et al*. The primary research of antitumor activity for eighteen kinds of sponges and soft corals in South China Sea. *Tropic Oceanology*(热带海洋), 1983, **2**(1): 74 ~ 77

[29] Muller W E G, Markus Bohm, Renato Batel *et al*. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: Synthesis of Avarol by primmorphs from *Dysidea avara*. *Journal of Natural Products*, 2000, Published on Web, Page EST: 4.7

[30] Ronald Osinga, Johannes Tramper, Rene H W. Cultivation of Marine Sponges. *Mar Biotechnol*, 1999, **1**, 509 ~ 532

[31] Wilson H V. On the feasibility of raising sponges from the egg. *Fish Commission Bull*, 1898, **16**: 241 ~ 245

[32] Humphreys T. Biochemical analysis of sponge cell aggregation. XXVth symposium of the zoological Society of London. In *Biology of the Porifera*. W. J. Fry, Ed. *Academic Press Inc*. New York, N. Y. 1970

[33] Pomponi S A, Willoughby R *et al*. Sponge cell culture for production of bioactive metablites. In: Sponges in Time and Space, Van Soest, R. W. M., Van Kempen, T. M. G., and Braekman, J. C. (eds.). rotterdam: A. A. Balkeman, 1994, 395 ~ 400

[34] Maria J Uriz, Turon X, Galera J, Tur J M *et al*. New light on the cell location of avarol within the sponge *Dysidea avara* (Dendroceratida). *Cell & Tissue Research*, 1996, **285**: 519 ~ 527

[35] Rinkevich B. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *Journal of Biotechnology*, 1999, **70**: 133 ~ 153

[36] McMahon. System for the cell culture and cryopreservation of marine invertebrates. *United States. Patent* 2000, No. 6, 054, 317

[37] Pomponi S A, Willoughby R *et al*. Devlopments of techniques for in vitro production of bioactive natural products from marine sponges. In: *Invertebrate cell culture: Novel Directions and Biotechnology Application*, Maramorosch, K., and Mitsuhashi, J. (eds.). Science Publishers, 1997, pp. 231 ~ 237

[38] Anatoli K, Heinz C, Schroder Sanja Perovic *et al*. Ethylene Modulates Gene Expression in Cells of the Marine Sponge *Suberites domuncula* and Reduces the Degree of Apoptosis. *J Bio Chem*, 1999, **274**(44): 31524 ~ 31530

[39] Werner E G, Muller Matthias Wiens, Renato Batel, *et al*. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Mar Ecol Prog Ser*, 1999, **178**: 205 ~ 219

[40] Ilan M, Contini H, Carmeli S *et al*. Progress towards cell cultures from a maine sponge that produces bioactive compounds. *J Mar Biotechnol*, 1996, **4**: 145 ~ 149

[41] Custodio M R, Prokic Ivo, Steffen Renate *et al*. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge Suberites domuncula: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech Ageing Dev*, 1998, **105**(1,2): 45 ~ 59

[42] Koziol Claudia, Borojevic Radovan, Steffen Renate *et al*. Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech Ageing Dev*, 1998, **100**(2): 107 ~ 120

Bioactive Compounds from Marine Sponges and Cell Culture of Marine Sponges

ZHANG Xiao-Ying ZHAO Quan-Yu XUE Song ZHANG Wei*

(*Marine Bioproducts Engineering Group, Biochemical Engineering Department, Dalian Institute of Chemical and Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian* 116023, *China*)

Abstract Presented a survey of bioactive compounds discovered from marine sponges in the recent five years, including the classes, distribution and their potential pharmaceutical uses. In particular, the compounds with antitumor, antivirus and antibacteria activity were discussed with their originating marine sponge species. Whereas the "Supply Problems" were identified to hinder the clinical tests and commercial applications of most of the sponge bioactive compounds. *In vitro* cell culture of marine sponges is one of the most promising approaches to solve this problem. The state-of-the art of marine sponge cell culture and the challenging areas were discussed. A brief summary of the R&D status was also given on the bioactive compounds from marine sponges in Chinese oceans. It is crucial to invest more efforts on studying marine sponges and their bioactive compounds in our country in order to develop new marine drugs of independent intellectual property.

Key words marine sponge, bioactive compounds, *in vitro* cell culture

Received: 06-25-2001

* Corresponding author. Tel: 86-411-4671991 ext 864; Fax: 86-411-4691570; E-mail: Weizhang@dicp.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn