

冬凌草甲素联合 IL-18 抗肿瘤作用机制的研究进展

孙金权 许 健

肿瘤是一种人类自身细胞的异常增生现象。肿瘤的迅速生长和扩散极大地威胁着人类的生命和健康。几乎所有的肿瘤细胞都有一个共同的特点:细胞周期调控机制失调,导致细胞失控性生长。肿瘤疾病是严重威胁人类生命的一类疾病,尽管现有治疗手段取得了一定疗效,但多数肿瘤患者生存时间有限,缺乏有效的可以治愈的药物,亟需开发新的药物来满足患者需要。

一、冬凌草甲素的抗肿瘤机制概述

冬凌草甲素(oridonin)是从系唇形科(Labtea)香茶菜属(*Rabdosia*)的冬凌草中提取的贝壳杉烯二萜类(ent-kaurene diterpenoid)天然有机化合物,有广泛的生物活性,具有抗炎、抗菌、降压等多种药理作用,最近研究表明该成分具有较强的抗肿瘤活性,对多种肿瘤有效,临床上主要用于肝癌、胰腺癌等的治疗^[1,2]。

近 10 年的研究发现,冬凌草甲素抗肿瘤作用机制主要包括:抑制肿瘤细胞增生、诱导肿瘤细胞凋亡信号转导途径及相关基因、增强其他抗肿瘤药物的疗效等,其中诱导肿瘤细胞凋亡信号转导途径方面的研究较为深入。

1. 抑制肿瘤细胞增生:(1)阻遏细胞周期:细胞周期是指细胞从一次分裂结束时起,到下一次分裂结束为止的一段时期。细胞周期有 4 个连续进行的过程,即 G₁、G₂、M 和 G₀ 期,其中以 G₁/S 和 G₂/M 最为重要。逆转细胞周期调控机制的失调或干扰其效应分子可抑制肿瘤细胞的增生^[3]。实验研究表明:冬凌草甲素能刺激 p21waf1 蛋白高表达,使其通过调节抑制细胞周期素和周期素依赖激酶,阻滞 G₁/S 的过渡,扰乱细胞进程而抑制细胞增生^[4]。此外不同的

细胞阻滞在不同的细胞时期,如朱国臣等^[5]分析冬凌草甲素诱导鼻咽癌 CNE-2 细胞发生凋亡和坏死,具有一定的量效关系,流式细胞检测发现 G₂/M 期比例增多;吴婕等^[6]发现冬凌草甲素在体外可显著抑制胃癌 BGC-823 细胞的生长,并可引起细胞 G₂/M 期的阻滞,并不提高 BGC-823 凋亡细胞的比例,在体内可显著抑制胃癌移植瘤的生长。(2)下调端粒酶活性:端粒酶是基本的核蛋白反转录酶,可利用其 RNA 为模板合成端粒,从而弥补复制过程中造成的端粒缩短,使细胞寿命延长甚至永生化。端粒酶在正常人体组织中的活性被抑制,在肿瘤中被重新激活,端粒酶参与恶性转化。冬凌草甲素可能是一种端粒酶的抑制剂,在抑制端粒酶 RNA 转录和直接抑制端粒酶蛋白活性两方面起作用。Zhang JF 等^[7]发现冬凌草甲素可显著抑制 BEL-7402 细胞的生长,诱导细胞发生凋亡,期间能降低端粒酶 hTERTmRNA 的表达水平和端粒酶活性,同时降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达和上调促凋亡蛋白 Bax 提示端粒酶可能参与凋亡调控。(3)抑制肿瘤细胞膜的钠泵转运活性:抑制肿瘤细胞从周围环境中摄取营养物质,以拮抗肿瘤细胞的快速增生,其作用机制可能通过直接抑制肿瘤细胞和间接地降低钠泵转运活性来实现。吴孔明等^[8]以 86Rb 示踪法,观察 3 种肿瘤细胞的钠泵转运活性及冬凌草甲素对其的影响,结果表明:冬凌草甲素能显著抑制艾氏腹腔积液癌细胞的钠泵转运功能;体外作用 12h,半数抑制浓度约为 5 μg/ml,在此浓度下,药物作用 1h 的抑制率为 22%。而且对钠泵活性高的人癌细胞系(7901, Hep22)的抑制作用较强。

2. 诱导肿瘤细胞凋亡:细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种形式,是细胞生理性、主动性的死亡过程,同时细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达以及受凋亡启动基因和凋亡抑制基因的严格调控等的作用。研究资料表明^[9,10],冬凌草甲素对体外培养的多种肿瘤细胞株具有明显的生长抑制及诱导凋亡作用,表现为直接杀死肿瘤细胞及通过线粒体、Fas/FasL 信号等多种不同途径诱导细胞凋亡,在细胞凋亡的过程中,细

基金项目:浙江省科技攻关项目、重点社会发展项目(2006C23024);浙江省自然科学基金资助项目(Y2080889, Y2080506)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学生命科学院

通讯作者:许健,副教授,博士,教研室主任。电子信箱:xujian832002@163.com

胞凋亡相关基因如 Bcl-2、PTEN 以及 caspases 等。

(1) 诱导肿瘤细胞凋亡的信号转导途径: 1) caspase 途径: caspase 是一组存在于细胞质中具有类似结构的半胱氨酸蛋白酶。参与细胞凋亡的 caspases 可分为两大类。一类是启动子 Caspases, 包括 caspase-8、9、10 等, 它们可与信号分子结合形成二聚体, 而后通过自身催化而激活; 另一类是效应子, 包括 caspase-3、6、7 等, 它们可被启动子 caspases 激活, 起凋亡执行者的作用。张春玲等^[11]研究发现冬凌草甲素作用于 HeLa 细胞后, caspase-3 的活性是显著增强。提示了冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞凋亡并激活了 caspase 途径。江永青等^[12]研究发现冬凌草甲素诱导人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡的过程有 Bid、Bcl-xl 和 caspase-3 基因的参与, 其分子机制可能是通过降低抗凋亡蛋白 Bcl-xl 的表达和上调抗凋亡蛋白 bid 的表达, 而激活 caspase-3 及其下游的 caspases, 诱导细胞凋亡。2) 线粒体相关信号途径: 线粒体作为细胞能量代谢的场所, 参与了细胞凋亡的两条主要途径, 是细胞凋亡的调控中心, 不仅能诱导细胞凋亡, 还是细胞凋亡的执行者。线粒体内的 Bcl-2 家族参与细胞凋亡的调节, 线粒体释放的细胞凋亡相关因子如细胞色素 C (Cyt C)、细胞凋亡诱导因子等参与凋亡的诱导。研究报道冬凌草甲素在诱导细胞凋亡过程中与线粒体相关信号途径有关。辛庆锋等^[13]的实验结果表明冬凌草甲素能显著抑制人胃癌 BGC-823 细胞的生长, 并呈剂量-时间依赖性。提示冬凌草甲素对 BGC-823 细胞的生长抑制和诱导凋亡作用机制可能是阻滞细胞分裂在 G₂/M 细胞时期, 诱导凋亡可能通过线粒体途径起作用。3) Fas/FasL 信号途径: Fas 是一种介导细胞凋亡的表面分子, 在机体许多细胞和组织中都有表达, 当靶细胞的 Fas 与效应细胞的 FasL 结合时, 就会诱发靶细胞的凋亡。Liu 等^[14]的研究表明, 冬凌草甲素可以通过 Fas/FasL 信号途径介导细胞外信号调节激酶激活, 进而释放 Cyt C, 激活 caspase 级联反应, 使 U937 细胞对冬凌草甲素诱导的细胞凋亡敏感。车宪平等^[15]实验研究表明冬凌草甲素对膀胱癌 MB49 有明显的抗肿瘤作用。冬凌草甲素可能主要通过 Fas/FasL 线粒体途径上调 Bax、下调 Bcl-2, 导致 MB49 细胞凋亡的发生。4) 核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路: NF- κ B 是一种多向性、多功能的核转录因子, 它参与机体的免疫应答、炎症反应、细胞增生和凋亡。NF- κ B 可介导细胞表面死亡受体凋亡途径和线粒体凋亡途径。

NF- κ B 主要依赖于肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受体超家族成员 (TNFR1, TNFR2, Fas, CD95) 介导细胞表面死亡受体凋亡途径, 依赖于 Bcl-2 蛋白家族介导线粒体凋亡途径。Leung 等^[16]向肝癌细胞 (HepG₂) 转入荧光素酶报告基因 pBII-X-luc (包含有两个衔接的重复 NF- κ B 结合位点) 和 pRL-TK 质粒载体。通过双荧光素酶报告基因检测系统来检测细胞培养上清中萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性, 从而反映 NF- κ B 的转录活性。利用该检测系统, 研究人员从中草药冬凌草甲素对 NF- κ B 转录活性具有抑制作用。(2) 诱导肿瘤细胞凋亡的相关基因: 1) Bcl-2 基因: B 细胞淋巴瘤基因-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族蛋白在细胞发生凋亡的分子机制中发挥着关键的作用。Bcl-2 基因家族成员分为两类: Bcl-2 类, 是凋亡抑制因子, 包括 Bcl-2、Bcl-xl 等; Bax 类, 为凋亡促进因子, 包括 Bax、Bid 等。Bcl-2 与 Bax 的比值决定了细胞接受凋亡信号后细胞的存活与否, 如果 Bax 占优势, 细胞死亡, 而 Bcl-2 占优势时, 细胞存活。研究报道, 在冬凌草甲素诱导肿瘤细胞的凋亡过程中, Bcl-2 家族成员起着关键的作用。张春玲等^[11,17]研究显示冬凌草甲素通过改变 Bax/Bcl-xL 表达激活 caspase-3 诱导人黑色素瘤 A375-S2 细胞凋亡。张俊峰等^[7]研究报道, 冬凌草甲素在诱导肝癌细胞 BEL-7402 发生细胞凋亡过程中, 能降低端粒酶 hTERT mRNA 的表达水平和端粒酶活性, 同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达的降低和促凋亡蛋白 Bax 上调。2) PTEN 基因: PTEN 基因又名 MMAC1 或 TEP1, 于 1997 年由 3 个不同的研究小组独立发现, 被认为是一个新的抑癌基因。该基因定位于人类第 10 号染色体 (10q23.3) 上, 由 9 个外显子组成。PTEN 蛋白分布于细胞质中, 具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶活性, 能使某些磷脂或蛋白激酶相应位点去磷酸化, 抑制细胞周期的运行, 介导细胞凋亡, 并调控细胞的黏附、迁移和分化。实验表明, 冬凌草甲素可以上调肝癌 HepG2 细胞 PTEN 基因的表达, 随着冬凌草甲素对肝癌细胞作用时间的延长, PTEN mRNA 表达逐渐增加, 细胞凋亡率也随之升高, 提示冬凌草甲素可能通过上调 PTEN 基因表达, 进而诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡^[18]。

3. 增强其他抗肿瘤药物的疗效: 冬凌草甲素与化学药物的联合应用具有协同作用, 既能增加化学药物对肿瘤细胞的抑制或杀伤能力, 又能保护正常细胞免受损伤。以肺癌 SPCA-1 细胞株为研究对象, 以不

同浓度的复方冬凌草甲素作用于体外培养的 SPCA - 1 细胞,结果表明复方冬凌草甲素对 SPCA - 1 细胞株具有明显的体外抗肿瘤作用,可能与端粒酶的活性有关^[19]。张松等^[20]用不同浓度比例的刺五加皂苷与冬凌草甲素作用于体外培养的 Eca - 109 细胞,结果提示两药起协同作用,能明显地抑制 Eca - 109 细胞的生长。

4. 其他:研究表明冬凌草甲素具有抗炎及抗菌作用及其机制,可能是阻断或灭活了诱变剂的诱变活性,并通过某种作用机制阻断了诱变剂对靶分子作用。

二、IL - 18 的抗肿瘤机制概述

IL - 18 是 Okamura 等^[21]1995 年首次自痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)和脂多糖(LPS)联合处理过的中毒性休克小鼠肝脏提取液中分离并克隆出来的一种新型细胞因子。IL - 18 主要由抗原递呈细胞(antigen presenting cell)合成和分泌,主要包括巨噬细胞、树突状细胞及胃肠道和呼吸道上皮细胞等。IL - 18 前体的生物学活性极低,在 APC 细胞内由 IL - 1 β 转化酶(ICE 或 caspase - 1)从 Asp - X 位点裂解去除 36 个氨基酸的前导序列后成为成熟的 IL - 18。IL - 18 主要通过以下几条途径发挥抗肿瘤作用^[22,23]:①IL - 18 可通过 NK 细胞发挥抗肿瘤作用;②IL - 18 也可通过 CTL 发挥抗肿瘤作用。在 NK 细胞的调节下,CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞逐渐被活化,CTL 发挥杀伤作用;③IL - 18 还可通过激活 Th1 细胞产生的细胞因子起作用。IL - 18 刺激 Th1 细胞分泌的 IL - 2 可以通过激活单核 - 吞噬细胞,增强杀伤活性;④IL - 18 能增强 Th1 细胞上功能性 FasL 的表达,选择性的扩增 FasL 介导的 Th1 细胞的细胞毒作用;⑤IL - 18 能促进血管增生。

IL - 18 是一种具有多向和多层次免疫调节功能的细胞因子,其细胞来源较广。它可通过 Fas/FasL、caspase、NF - κ B、p56LCK - MAPK、Perforin 等多个信号传导途径参与细胞凋亡以及 IFN - γ 分泌诱导及功能性免疫细胞活性的激活从而直接或间接激活 T 细胞、NK 细胞、PBMC、DC 等免疫细胞的增生、分化、抗原递呈、CTL 反应等,并诱导这些细胞分泌效应性细胞因子或延长免疫保护,进而促进免疫系统增强抗感染、抗肿瘤等免疫效应^[24]。相关研究表明在胃癌细胞中,IL - 18 与血管内皮生长因子(VEGF)之间可以互相调节并具有正量效关系。然而我们实验室研究发现在薏苡仁药物作用后,胰腺癌细胞的 IL - 18 的

表达是各药物组均明显高于空白组,48h 时达到高峰后回落。但胰腺癌细胞的 VEGF 表达水平在 24h 时明显低于空白组,48h 时持续下降,超过 48h 后渐渐上升,但水平仍低于同时间的空白组。由此可知,在胰腺癌细胞中,IL - 18 与血管内皮生长因子(VEGF)之间并没有正量效关系^[25]。

三、冬凌草甲素和 IL - 18 抗肿瘤的共同机制

1. Fas/FasL 信号途径:冬凌草甲素可以通过 Fas/FasL 信号途径介导细胞外信号调节激酶激活,进而释放 Cyt C,启动线粒体途径上调 Bax、下调 Bcl - 2,使肿瘤细胞对冬凌草甲素诱导的细胞凋亡敏感;IL - 18 可增强穿孔素及 FasL 介导的细胞毒作用,通过多种途径直接或间接抑制和杀伤恶性肿瘤,并在肿瘤的生物治疗中显示出广泛的应用前景。

2. caspase 途径:有研究表明,冬凌草甲素诱导肿瘤细胞的凋亡作用与 caspase 途径有关。冬凌草甲素可能是通过抑制 Bcl - xl 的表达和增强 Bid 的表达,而激活 caspase - 3,诱导细胞凋亡;caspase - 1 为 IL - 18 的转化酶,研究发现它们在恶性肿瘤凋亡、进展及生物学行为等方面有重要作用。它也称为白细胞介素 1 β 转换酶(ICE),在 Fas 和 TNFR1 介导的细胞凋亡信号中有重要的作用。

3. NF - κ B 信号通路:NF - κ B 是一种序列特异性转录因子。Liu 等^[26]的研究显示,冬凌草甲素可激活 NF - κ B 信号通路,促进巨噬细胞分泌 TNF - α 和 IL - 1 β ,进而增强巨噬细胞对凋亡的 U937 细胞的吞噬作用,提示冬凌草甲素具有诱导肿瘤细胞凋亡和增强吞噬凋亡细胞的双重作用;这与 Wang 等^[27]的研究结果一致,Wang 等研究表明 NF - κ B 参与胃癌的生长分化,进一步激活其下游靶基因 COX - 2,IL - 18,Bal - 2,凋亡抑制蛋白和 uPA,ICAM - 1 等表达,促进胃癌细胞增殖,减少凋亡从而促进肿瘤生长。

4. 抗炎及抗菌作用:相关的实验研究表明冬凌草甲素和 IL - 18 都具有抗炎及抗菌作用。机制可能是阻断或灭活了诱变剂的诱变活性和通过某种作用机制阻断了诱变剂对靶分子的作用。

四、展 望

冬凌草甲素是贝壳杉烯骨架的四环二萜类化合物,是中草药冬凌草抗肿瘤有效成分。它既可以抑制肿瘤细胞增殖,抑制 NF - κ B,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等相关信号通路防止肿瘤发生,诱导细胞凋亡,在细胞凋亡的过程中,细胞凋亡相关基因如 Bcl - 2、PTEN 以及 caspases,也可以抑制毒性药物损伤自

身细胞 DNA, 增强吞噬细胞吞噬作用等, 有望将其开发成新的抗肿瘤药物。IL-18 是一种具有多向性调节功能的细胞因子, 在机体的天然免疫和获得性免疫中, 具有重要作用, 可通过多种信号传导途径或细胞因子介导的方式参与免疫调节。应用 IL-18 或通过转基因方法将其基因转入效应细胞对多种肿瘤有明显的治疗作用, 使机体对肿瘤的再侵袭产生免疫能力。其作用机制可能通过巨噬细胞、NK 细胞和 T 细胞产生其他抗肿瘤因子加强机体对肿瘤的免疫力。

综上所述, 冬凌草甲素和 IL-18 在抗肿瘤作用机制方面具有相同的信号通路, 如 Fas/FasL 信号途径、caspase 途径、NF- κ B 信号通路, 最终引起细胞的凋亡。以此推测两者对肿瘤细胞具有的可能协同作用。这将有助于 IL-18 抗肿瘤机制的深入研究, 同时有机的把中草药和细胞因子结合来提高抗肿瘤的作用。为中西医结合抗肿瘤研究开辟新的道路。

参考文献

- Chen JH, Wang SB, Chen DY, *et al.* The Inhibitory Effect of Oridonin on the Growth of Fifteen Human Cancer Cell Lines[J]. Chin J Clin Oncol, 2007, 4 (1): 403-406
- Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, *et al.* Antiproliferation effects of oridonin on HPB-ALL cells and its mechanisms of action[J]. Am J Hematol, 2006, 81 (2): 86-94
- 詹启敏. 分子肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 325-375
- Ikezoe T, Chen SS, Tong XJ, *et al.* Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells[J]. Int J Oncol, 2003, 23(4): 1187-1193
- 朱国臣, 肖大江, 张亚男, 等. 冬凌草甲素对人鼻咽癌细胞 CNE-2 的抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 804-805
- 吴婕, 袁守军, 杨德宣. 冬凌草甲素抑制 BGC823 细胞的生长及 MMP-2/MMP-9 的表达[J]. 解放军药理学学报, 2007, 23(5): 344-347
- Zhang JF, Chen GH, Lu MQ, *et al.* Change of Bcl-2 expression and telomerase during apoptosis induced by oridonin on human hepatocellular carcinoma cells[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2006, 31 (21): 1811-1814
- 吴孔明, 张覃林, 王庆端, 等. 冬凌草甲素对肿瘤细胞钠泵活性的影响[J]. 肿瘤防治研究, 1994, 21(4): 208
- LIU JJ, HUANG RW, LIN DJ, *et al.* Apoptotic effect of oridonin on NB4 cells and its mechanism[J]. Leuk Lymphoma, 2005, 46(4): 593-597
- LIU JJ, HUANG RW, LIN DJ, *et al.* Oridonin-induced apoptosis in leukemia K562 cells and its mechanism[J]. Neoplasma, 2005, 52 (3): 225-230
- 张春玲, 吴立军, 田代真一, 等. 冬凌草甲素通过激活 Caspase 诱导 HeLa 细胞凋亡[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(5): 521
- 江永青, 熊向阳, 余乐涵, 等. 冬凌草甲素通过激活 caspase 途径诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡. 时珍国医国药, 2009, 20 (6): 1493-1495
- 辛庆锋, 陈俊辉, 王少彬, 等. 冬凌草甲素抑制人胃腺癌细胞生长和诱导凋亡作用研究. 中国药房, 2008, 19(15): 1123-1124
- Liu YQ, Mu ZQ, You S, *et al.* Fas/FasL signaling allows extracellular signal regulated kinase to regulate cytochrome c release in oridonin-induced apoptotic U937 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(9): 1873-1879
- 车宪平, 韩瑞发, 周晶, 等. 冬凌草甲素诱导膀胱癌 MB49 细胞凋亡及机制研究. 中草药, 2008, 39(8): 1219-1222
- Leung CH, Grill SP, W Lam, *et al.* Novel mechanism of inhibition of NF- κ B DNA binding activity by diterpenoids isolated from isodon rubescens[J]. Mol Pharmacol, 2005, 68: 286-297
- 张春玲, 吴立军, 左海军, 等. 冬凌草甲素通过线粒体途径诱导人黑色素瘤 A375-S2 细胞凋亡[J]. 中草药, 2004, 35(4): 423-426
- 李伯利, 朱敏, 王晨, 等. 冬凌草甲素上调人肝癌 HepG2 细胞 PTEN 基因表达与诱导凋亡作用. 医药导报, 2008, 27(9): 1038-1040
- 张守伟, 刘加军. 复方冬凌草甲素对肺癌 SPCA-1 细胞的端粒酶活性的影响[J]. 临床肺科杂志, 2005, 8(3): 204-206
- 张松, 王留兴, 樊青霞, 等. 刺五加叶皂苷联合冬凌草甲素对人食管癌 Eca-109 细胞的生长抑制作用. 肿瘤基础与临床, 2007, 20 (3): 226
- Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells[J]. Nature, 1995, 378 (6552): 88-91
- Tamura T, Nishi T, Goto T. Combination of IL-12 and IL-18 of electrogene therapy synergistically inhibits tumor growth. Anticancer Res, 2003, 23(2B): 1173-1179
- Moore MB, Kurago ZB, Fullenkamp CA, *et al.* Squamous cell carcinoma cells differentially stimulate NK cell effector functions: the role of IL-18. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52(2): 107-115
- Jin S, Shen JN, Wang J, *et al.* Oridonin induced apoptosis through Akt and MAPKs signaling pathways in human osteosarcoma cells[J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(2): 261-268
- 蔡琼, 许健, 沃兴德, 等. 薏苡仁油对人胰腺癌 BxPC-3 细胞影响 IL-18 表达的体外实验研究. 中医研究, 2010, 23(7): 11-14
- Liu YQ, You S, Tashiro S, *et al.* Roles of Ras and extracellular signal-regulated kinase-dependent IkappaBalpha degradation in oridonin-enhanced phagocytosis of apoptotic cells by human macrophage like U937 cells[J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(2): 260-268
- Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of NF- κ B and human telomerase reverse transcriptase in gastric cancer and precancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 177-181

(收稿: 2010-08-20)