

信号转导通路与中药抗肿瘤作用的研究进展

李荣辉 赵富生 梁启超 潘洪明

肿瘤是机体在遗传和环境致癌因素的作用下,局部组织的细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控,导致克隆性异常增殖而形成的。从分子水平来讲,肿瘤的发生是一系列信号分子之间相互作用的结果,即从基因突变修复失败到子代细胞分裂增殖失控直至肿瘤的发生、侵袭和转移,这一系列的生物事件均伴有多种信号分子、信号途径之间的相互促进或相互抑制^[1]。细胞信号转导通路是由细胞外因子(第一信使)、细胞膜(胞内)受体、联结蛋白、G 蛋白、第二信使、蛋白激酶及下游效应分子等组成。在许多肿瘤细胞中往往可以见到信号转导通路上某些蛋白分子的磷酸化水平、刺激细胞生长的因子、蛋白酪氨酸激酶(PTK)等呈现过低或过高的异常表达。本文仅对目前中药抗肿瘤在细胞信号转导通路方面的影响及其作用做一阐述。

一、中药对环核苷酸类信号转导通路的影响及作用

环核苷酸类信号转导系统包括环腺苷酸(cAMP)和环鸟苷酸(cGMP)通路。1957 年,Earl W. Sutherland 提出 cAMP 是细胞内的第二信使,它是最早发现的第二信使物质,其在细胞内的水平与细胞的增殖与分化有密切的关系,被认为对细胞的增殖起着负调节作用。首先,cAMP 是通过腺苷酸环化酶(AC)催化 ATP 转化而成,随后,cAMP 激活 PKA;cAMP 最后被磷酸二酯酶(PDE)降解成 5'-AMP 而失活,终止信号^[2]。因此,cAMP 在细胞中的浓度除与 AC 有关,还与 PDE 活性有关。鸟苷酸环化酶(GC)催化水解 GTP 生成的 cGMP,其灭活也是由 PDE 完成的。cGMP 看似与 cAMP 信号转导通路相似,但它与 cAMP 信号转导通路作用又有不同,二者恰好相反。因此,在肿瘤发生后,肿瘤组织和外周血中普遍存在着 cAMP 浓度低于正常水平的现象,而

cGMP 浓度高于正常细胞中浓度。如中药能提高体内 cAMP(或 PKA)的水平降低 cGMP 浓度就能实现抗肿瘤的目的。目前有许多学者已做了相关的研究。

林成招等^[3]研究大豆异黄酮(soy isoflavones)对 SHZ-88 大鼠乳腺癌细胞内 cAMP-PKA 信号途径的影响,用 50 μ g/ml 大豆黄酮(daidzein)及 15 μ g/ml 染料木素(genistein)分别作用乳腺癌细胞后,大豆黄酮和染料木素组细胞内的 cAMP 浓度分别比对照组升高了;AC 则没有明显变化;PDE 活性分别较对照组降低;用药组细胞 PKA 活性分别比对照组升高。这些结果表明,大豆异黄酮能激活乳腺癌细胞内 cAMP-PKA 信号途径;且是通过抑制 PDE 的活性,导致胞内 cAMP 浓度升高而实现的。李震等^[4]用自拟清热解毒方中药煎剂给实验性肿瘤小鼠灌胃 21 天,抑瘤率达 53.07%、cAMP 比未给药组升高、cGMP 浓度降低、cAMP/cGMP 比值升高($P < 0.05$)。说明该方剂抗肿瘤作用与环核苷酸类信号转导通路有关。另外,许多研究已证明猪苓多糖有抗肿瘤的作用,这可能与它能降低磷酸二酯酶的活性,提高细胞内 cAMP 水平有关^[5]。

二、中药对蛋白酪氨酸激酶介导信号通路的影响及作用

酪氨酸磷酸化发生在多细胞生物体作为胚胎期和成熟组织形成过程细胞间通讯的结果,是共价修饰关键之一。这些共价修饰是通过蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinases,PTKs)执行的^[6]。PTKs 分为受体型(RPTK)和非受体型(nrTK),它们可以调节细胞生长、分化、迁移和代谢。PTKs 的活性受酪氨酸蛋白磷酸化调节,其异常催化活性(突变或过度表达)表现在许多病理条件下(包括癌症)起了非常重要的角色^[7]。人们发现在肿瘤细胞中,PTKs 的活力即磷酸化明显高于正常细胞。而当肿瘤细胞经诱导分化向成熟细胞转化的过程中,有些实验室发现其酪氨酸磷酸化水平降低^[5]。体内生长因子的受体例如表皮生长因子受体(EGFR)、纤维生长因子受体(FGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血小板衍生性生

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551522)

作者单位:157011 牡丹江医学院附属红旗医院检验科(李荣辉);157011 牡丹江医学院(赵富生、梁启超);161006 齐齐哈尔医学院(潘洪明)

长因子受体(PDGR)等本身具有蛋白酪氨酸激酶催化活性。nrTK 能诱导类似受体酪氨酸激酶反应,但没有内源催化活性,这些蛋白是以可溶性形式存在的,主要作为受体和最终效应分子之间的信号转导分子。其中,Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导途径是受体型 PTK(RTK)的主要作用机制。非受体型 PTK 介导的信号转导的典型例子如细胞因子介导的 JAK - STATs 通路。磷酸化的酪氨酸最后被酪氨酸磷酸酯酶水解,它是专一水解酪氨酸残基上磷酸根集团的酯酶。总之,肿瘤的发生、生长与抑制均与此信号转导通路有着密切的关系。当肿瘤细胞经诱导分化向成熟细胞转化的过程中,大多数实验室发现 PTK 活力下降而磷酸酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPP)活力升高^[5]。因此,用中药作用于该通路进行抗肿瘤具有重要意义。

杨江苏等^[5,8]研究猪苓多糖、香菇多糖和茯苓多糖对人早幼粒白血病细胞 HL - 60 酪氨酸蛋白磷酸化作用的影响,结果表明这些多糖对胞质和胞膜部分 PTK 活力均有不同程度的抑制作用,而磷酸酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPP)升高,使得 HL - 60 细胞酪氨酸蛋白磷酸化水平下降。香菇多糖对胞质和胞膜部分 PTK 抑制作用随浓度增加抑制作用增强,对 PTPP 激活作用呈现明显的量效关系。提示香菇、猪苓、茯苓多糖抗肿瘤作用机制可能与酪氨酸蛋白磷酸化作用有关。刘北忠等^[9]用不同浓度的苦参碱作用于 K562 细胞,观察苦参碱对 K562 细胞酪氨酸激酶与磷酸酶活性的影响。结果表明不同浓度的苦参碱对 K562 细胞的蛋白酪氨酸激酶的活性均有抑制作用,且在 0.1mg/ml 的浓度范围内,抑制作用具有浓度依赖性。从激酶活性下降的时相上看,膜相蛋白提取物中的蛋白酪氨酸激酶活性变化先于胞质蛋白提取物中蛋白酪氨酸激酶活性变化,提示信号有由外入内的跨膜传递过程。同时,蛋白酪氨酸磷酸酶的活性有一个显著的先降后升的过程。李士坤等^[10]用槲皮素作用食管癌 Eca - 109 细胞 48h 后,发现 VEGR、EGFR 表达下降,抑癌基因 p53 表达升高,原癌基因 c - myc 则表达下降。这些都提示肿瘤细胞的恶性程度下降,趋于细胞分化成熟。李荣辉等^[11,12]用树舌多糖作用胃癌 MGC - 803 细胞 72h 后,结果显示树舌多糖组 EGFR、PDGR β 表达较对照组的均下降,且树舌多糖能够阻止肿瘤细胞由 G₁ 期进入 S 期,使进入 S 和 G₂/M 期的细胞减少,延缓细胞周期的进程。

三、中药对磷酸肌醇信号转导系统的影响及作用

磷酸肌醇信号转导系统主要以三磷酸肌醇(肌

醇 - 1,4,5 三磷酸,IP3)和磷脂酰甘油(DAG)为第二信使介导信号通路。DAG 和 IP3 的生成是两条主要的信号转导途径的交点,一条是 G 蛋白偶联受体途径,即配体(激素)与受体结合 G 蛋白构象发生改变,继而激活 PLC β ^[1];另一条是直接或间接的 RTK 途径,受体与配体(生长因子)结合激活细胞内 PTK 使之磷酸化,PLC γ 含有 SH2 顺序——能特异地识别并结合受体的磷酸化的酪氨酸残基上,受体内在 PLC γ 上酪氨酸残基磷酸化随即被激活,该酶出现活性。PLC β 和 PLC γ 特异性水解膜的成分磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸(PIP2)生成 DAG 和 IP3。IP3 与内质网 IP3 受体结合使其构象发生改变,使 Ca²⁺ 通道开放,钙离子释放。DAG 生成后留在质膜上,在有磷脂酰丝氨酸(PS)和 Ca²⁺ 的配合下激活蛋白激酶 C(PKC)。PKC 通过对底物蛋白质中的 Ser/Thr 残基的磷酸化而作用于底物,从而产生一定的生理效应。另外,还有以 PI₃K 为中心的信号途径。所以,中药作用于这些非正常的信号转导途径上的某些关键点,可以显著抑制肿瘤细胞的生长。

1. 中药对 DAG - PKC 信号转导途径影响及作用。PKC 广泛地存在于机体的组织细胞内,其作用底物蛋白质包括质膜受体、膜蛋白、多种酶及转录因子等,参与膜离子的转运、机体的代谢、基因表达、细胞分化和增殖等多种生理功能。PKC 对基因的活化过程分为早期反应(磷酸化立早基因:c - fos,c - jun)和晚期反应(细胞周期调控蛋白)两个阶段。PKC 除了非正常活化使细胞生长紊乱发生癌变外,PKC 还可以参与细胞凋亡。促癌剂——佛波酯(phorbol ester)正是作为 PKC 的强激活剂而引起细胞持续增殖,诱导癌变的。另有报道称在胸腺细胞及 T 细胞中的 PKC 激活后导致细胞凋亡。

李勇等^[13]在探讨大蒜素(garlicin)诱导胃癌 BGC - 823 细胞凋亡的作用及机制时发现大蒜素可明显提高胃癌细胞的 cAMP 水平并降低 PKC 水平,使凋亡始动因子 Fas 基因及 bax 基因蛋白的表达增加,凋亡抑制基因 bcl - 2 的表达降低。以上结果表明大蒜素可通过第二信使系统 cAMP、PKC 的影响,增强 Fas 及 bax 基因的表达,降低 bcl - 2 的表达来促进细胞的凋亡,抑制细胞的过度生长。李宝元等^[14]用中药白龙片与 HMBA 对人胃癌不同周期细胞癌基因和抑癌基因表达影响时,发现用 3mg/ml 生药量中药白龙片培养液和 5mmol/L HMBA 培养液处理各个周期细胞 4h 后,PKC 的表达受到抑制。

2. 中药对 $IP_3 - Ca^{2+}$ 信号转导途径的作用及影响。癌症是当细胞增殖和细胞凋亡机制发生缺陷时引起的,而 Ca^{2+} 又是这两种机制的主要参与者。 Ca^{2+} 主要储存在细胞外间隙、细胞质、内质网和线粒体,他们参与细胞内 Ca^{2+} 的循环^[15]。 Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使,其在细胞内液的含量很低,且 90% 以上储存在细胞内钙库,游离 $Ca^{2+} \{ [Ca^{2+}]_i \}$ 含量更少。胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度升高的反应有两种:一是细胞质膜钙通道开放,使钙内流,二是细胞内钙库膜上钙通道开放,钙的释放。 $[Ca^{2+}]_i$ 控制各种细胞的进程,包括细胞的增殖、代谢、和基因的转录。然而在一定条件下,细胞内 Ca^{2+} 增加具有细胞毒作用^[16]。

有许多报道称 Ca^{2+} 在细胞内浓度可引起细胞凋亡。高世勇等^[17] 观察羊栖菜多糖 (SFPS) 对人胃癌细胞 (SGC - 7901) 内 Ca^{2+} 含量的变化,结果表明羊栖菜多糖通过引起肿瘤细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放使 Ca^{2+} 浓度升高,从而诱导肿瘤细胞凋亡。章国来等^[18] 用猪苓多糖 (polyporus polysaccharide) 作用于人 T24 膀胱癌细胞,发现当猪苓多糖剂量大于 1mg/L 时可使 T24 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高且维持高钙水平,且主要促进细胞核内的 Ca^{2+} 升高,胞质内 Ca^{2+} 无明显变化;提示猪苓多糖可能有诱导细胞凋亡的作用。汉黄芩素 (wogonic) 可以在体外诱导恶性 T 细胞白血病细胞凋亡和在体内抑制人 T 细胞白血病转移瘤的生长。这是通过汉黄芩素可以延长 PLC γ 1 活性,使 Ca^{2+} 浓度在恶性肿瘤细胞中持续增加,导致 Ca^{2+} 超负荷促使细胞凋亡。刘吉成等用不同浓度的姬松茸多糖 (PAB) 作用肝癌细胞 Bel - 7402 48h 后,细胞的凋亡率和胞质内游离 Ca^{2+} 浓度水平显著升高,而 PAB 对癌细胞 P53 蛋白的表达没影响。因此推断 PAB 诱导细胞凋亡可能是通过 Ca^{2+} 浓度升高从而激活 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖的内源性核酸内切酶,导致细胞 DNA 断裂引起细胞凋亡。有学者研究青蒿琥酯 (artemisinin, ART) 对人前列腺癌 PC - 3 细胞的凋亡以及细胞内游离 Ca^{2+} 浓度 $\{ [Ca^{2+}]_i \}$ 的影响时,发现 ART 诱导 PC - 3 细胞发生典型的凋亡形态学变化和 G₂/M 期阻滞;同时发现 ART 作用 PC - 3 细胞后, $[Ca^{2+}]_i$ 在 15 ~ 30min 内显著升高,0.5 ~ 1h 维持在较高水平,4 ~ 24h 后降到阴性对照组水平。说明青蒿琥酯有诱导人前列腺癌 PC - 3 细胞凋亡和周期阻滞的作用,上调 $[Ca^{2+}]_i$ 可能在其抗肿瘤机制中起重要作用。

四、中药对 PI_3K/PKB 信号转导途径的影响及作用

PI_3K/PKB 信号转导通路广泛存在细胞中,主要参与细胞的生长、增殖、分化调节。 PI_3K 可以特异地催化肌醇环 C3 上的羟基磷酸化,产物与 PKB 的 PH 区域结合导致 PKB 发生从胞质到胞膜的转位,促使其构象发生改变发生磷酸化。另外,PKB 的激活还需磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶 (PDK) 的参与。活化的 PKB 进一步激活其下游分子,如 Bcl2 家族、E2F、GSK3 等,发挥其调节细胞周期、凋亡和血管形成等作用。 PI_3K/PKB 信号转导途径受抑癌基因 PTEN 的调节,PTEN 能催化 PIP3 脱磷酸生成 PIP2,从而抑制 PKB 的活化,发挥抗肿瘤的作用。最近研究表明,PKB/AKT 在许多人类癌症持续被激活,这是由于 PKB/AKT 基因扩增或是信号分子的突变引起的。另外,PTEN 突变涉及人类许多种包括恶性胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌和甲状腺癌等肿瘤发生。

于赫等观察树舌多糖 GF 对 H22 肝癌移植瘤 PTEN 蛋白表达的影响。结果显示树舌多糖 GF 可以诱导 H22 肝癌移植瘤 PTEN 蛋白表达或阻止其缺失,从而达到抑制肿瘤生长的目的。Way 等研究发现,芹菜素作用于 HER2/neu 过表达的乳腺癌细胞能够以时间和浓度依赖性地抑制肿瘤细胞的生长,诱导其凋亡。而且对肿瘤细胞中 AKT 有抑制作用,这说明芹菜素是通过阻断 PI_3K 与 HER2/HER3 形成二聚体来抑制 AKT 活性。

综上所述,细胞信号转导系统是一个庞大、复杂而又精确的网络系统,各通路之间并非独立存在的,它们有着相互促进或相互制约的关系。如一条信息通路的成员可以参与另一条通路的激活或抑制,不同信息途径又可共同作用于同一种效应蛋白或同一基因,发挥调控作用。肿瘤发生与发展又是一个多因素作用、多基因参与、经过多阶段最终形成的、极其复杂的生物学现象。今后,中药抗肿瘤应继续发挥以中医中药的多条通路,多靶点的研究特点,将会在抗肿瘤方面具有越来越大的发展。

参考文献

- 苑林宏,吴坤. 黄酮类物质对肿瘤细胞信号转导途径的调节作用. 国外医学·卫生学分册,2005,32(6):333-337
- 查锡良. 医学分子生物学. 北京:人民卫生出版社,2003
- 林成招,马海田,邹思湘,等. 大豆异黄酮对大鼠乳腺癌细胞内 cAMP/PKA 信号途径的影响. 生理学报,2005,57(4):517-522
- 李震,李军山,李哲,等. 清热解毒方对肿瘤小鼠红细胞膜流动性及血浆环核苷酸水平的影响. 山东生物医学工程,2001,20(3):8

- 10

- 5 杨江苏,秦旭平,张娜,等. 两种真菌多糖对 HL-60 细胞酪氨酸蛋白磷酸化作用的影响. 中国药理学杂志,2000,35(5):303-305
- 6 Hubbard SR,Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. Annu Rev Biochem,2000,69:373-398
- 7 Hubbard SR. Protein tyrosine kinase:asutoregulation and small-molecule inhibition. Curr Opin Struct Biol,2002,12(6):735-741
- 8 杨江苏,张娜,颜卉君. 香菇多糖对 HL-60 细胞酪氨酸蛋白磷酸化作用. 长治医学院学报,2000,2:90-92
- 9 刘北忠,蒋纪恺,何於娟,等. 苦参碱诱导蛋白酪氨酸激酶与磷酸酶活性改变. 中草药,2003,34(1):48-51
- 10 李士坤,陈克河,任庆梅. 槲皮素对人食管癌 Eca-109 细胞的分化诱导作用. 中国实用医药,2007,2(36):14-15
- 11 李荣辉,王玉,郑丽红,等. 树舌多糖抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖及对 EGFR 表达的影响. 时珍国医国药,2010,21(3):582-584
- 12 李荣辉,王玉,郑丽红,等. 树舌多糖抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖及对 PDGFR β 表达的影响. 医学研究杂志,2009,38(11):52-

54

- 13 李勇,刘冀红,赵群,等. 大蒜素对人胃腺癌 BGC-823 细胞影响的研究. 中国中西医结合外科杂志,2001,7(5):307-310
- 14 李宝元,梁云燕,王代树. 中药白龙片与 HMBA 随人胃癌不同周期细胞癌基因与抑癌基因表达调控的共性研究. 中国中西医结合杂志,2001,21(4):286-290
- 15 Capod T, Shuba Y, Skvrma R, *et al.* Calcium signalling and cancer cell growth. Subcell biochem,2007,45:405-427
- 16 Roderick HL, Cook Sj. Ca^{2+} signalling checkpoints in cancer:remodelling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival. Nat Rev cancer, 2008,8(5):361-375
- 17 高世勇,季宇彬. 羊栖菜多糖对 SGC-7901 人胃癌细胞内 Ca^{2+} 的影响. 天津中医药,2003,20(4):62-63
- 18 章国来,曾星,梅玉屏,等. 猪苓多糖对膀胱癌细胞钙离子浓度的影响. 中国临床药理学与治疗学,2001,6(3):204-206

(收稿:2010-12-30)

(修回:2011-01-26)

肌钙蛋白自身抗体的检测和临床应用

鲁彦 李晓云 李德红

肌钙蛋白是心肌损伤敏感、特异的生物学指标。肌钙蛋白(cTn)是细肌丝组成成分,CTnC和钙离子结合,CTnT与原肌球蛋白结合,cTnI则抑制肌动蛋白与肌球蛋白结合,在肌肉的兴奋收缩偶联中起关键性作用。肌钙蛋白(cTnI和cTnT)主要位于肌肉细胞的肌质网内,小鼠心肌细胞膜上有少部分cTnI分布,生理条件下cTnI和机体免疫系统不接触。肌钙蛋白进入循环系统,暴露出的隐蔽抗原刺激免疫系统产生自身抗体(cTnI自身抗体)。肌钙蛋白是心肌细胞重要的功能蛋白,抗肌钙蛋白自身抗体和肌钙蛋白结合对心肌细胞的功能和心脏重构将产生重大影响。由于cTnI同时存在于心肌细胞胞质内和细胞膜表面,因此,cTnI自身抗体和心肌细胞表面的cTnI结合后诱发的变态反应能损伤心肌细胞,影响心脏功能。心肌表面没有cTnT,因此,cTnT自身抗体对心肌细胞不产生明显的病理学影响^[1]。

一、肌钙蛋白自身抗体的产生和病理生理学作用

正常情况下,cTnI主要分布于细胞内,小鼠心肌细胞表面有少量cTnI分布,在人类心肌细胞表面没

有cTnI分布。cTnT主要分布于心肌细胞内,人类和小鼠心肌细胞表面均无cTnT。小鼠cTnI 9号多肽105~122氨基酸残基是产生cTnI自身抗体最强的诱导剂;11号多肽131~148氨基酸残基是产生cTnI自身抗体次要的诱导剂。和人类的cTnI 104~121氨基酸残基对应。105~122氨基酸残基能够增加炎症因子[单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、单核细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)、单核细胞炎性蛋白-1 β (MIP-1 β)、单核细胞炎性蛋白-2(MIP-2)和嗜酸性粒活化因子释放。cTnI 105~122氨基酸形成的螺旋结构和cTnT(226~271)形成的螺旋结构平行,二者形成螺旋形盘旋,在心肌细胞的生理学功能中具有重要作用。

cTnI自身抗体能够降低小鼠心脏功能,增加心肌细胞L-钙通道电流。在4周龄BALB/c雌性小鼠腹腔注射cTnI单克隆抗体,8周后(12周龄),和同龄对照组小鼠比较,实验组小鼠左心室收缩末期压和舒张末期压增加,射血分数降低;右心房压力升高。在离体pdc1^{-/-}扩张型心肌病小鼠心室肌细胞和心房肌细胞,cTnI单克隆抗体对心室肌和心房肌细胞膜电容没有显著影响,但能增加心房肌和心室肌细胞最大电压依赖性L钙电流。蛋白激酶A不能逆转cTnI单

作者单位:730030 兰州,解放军第一医院检验科(鲁彦、李晓云);730000 兰州,甘肃省人民医院检验科(李德红)