

中药体外诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制研究进展

陈武兵 蔡志毅

从天然资源中寻找高效低毒的抗肿瘤药物,是近年来国内外抗肿瘤药物研究的热点之一。随着分子生物学和分子药理学对肿瘤发生发展以及其作用机制的阐述,中药抗癌的研究水平也有了显著提高并展示出了广阔的前景。

细胞凋亡(apoptosis)是一种细胞程序性死亡过程,对于维护组织正常运行及预防癌症的发生起着非常重要的作用,其中包含许多因素对细胞凋亡的调节^[1-3]。目前研究发现,许多中药的有效成分可通过作用于细胞凋亡有关因子而诱导肿瘤细胞凋亡,本文就中药体外诱导肿瘤细胞凋亡的相关重要分子作用机制的最新研究进展综述如下。

一、细胞凋亡概述

多细胞动物通常需要清除体内多余的细胞,为此须采用一种积极的分子水平编程活动——细胞凋亡,又称程序性细胞死亡(programmed cell death),是指有核细胞接受某种信号的刺激后,触发内部程序,主要通过内源性DNA内切酶的激活而发生的“细胞自杀”过程。其特殊的形态学改变有:胞质变圆,细胞附着消失,与邻近细胞分离,胞质浓缩,核染色质高度密集在核膜周边,核仁裂解,核内出现多个空泡结构,进而胞膜内陷,裂解成数个“凋亡小体”。其主要意义有:①使细胞增生和细胞死亡处于动态平衡状态,以维持细胞总数相对恒定,防止细胞癌变;②维持胚胎正常发育及免疫系统反应中的克隆选择。

细胞凋亡包含一系列分子生物学事件,主要有两条途径:(1)外源性通路:主要由死亡受体介导,其中Fas与其配体(FasL)可以感受细胞外的死亡信号,两者相互结合后,与接头蛋白FADD偶联,进而激活caspase-8,从而激发一系列下游的caspase级联反应,诱发细胞凋亡。(2)内源性通路:细胞接到凋亡信号时,线粒体膜的通透性增加,释放各种蛋白质出

来,包括细胞色素C、Smac Diablo及AIF(apoptosis inducing factor)等,其中细胞色素C可与Apaf-1及pro-caspase-9相互作用形成凋亡体,从而导致caspase-9的活化,启动caspase级联反应,引起细胞凋亡^[4-7]。

二、caspase家族

caspase是一组具有相似结构的内源性核酸内切酶,在细胞凋亡过程中发挥关键的作用^[8]。目前报道的caspase家族可分两类:第一类是发挥起始作用的caspase,包括caspase-2、8、10蛋白等;第二类为效应功能性caspase,如caspase-3、7蛋白等^[4,5]。激活的caspase-2、8、10能水解活化caspase-3、7,再进一步裂解后者相应的底物,如PARP、ICAD等^[9]。外界刺激信号能通过不同的信号转导系统裂解激活caspase蛋白酶原,活化的caspase能选择性地水解细胞内的核酸内切酶和蛋白水解酶等蛋白质,从而导致细胞凋亡^[10,11]。

其中caspase-3在细胞凋亡过程中起着关键的作用,一旦被激活,细胞凋亡则不可避免。在采用蟾蜍毒素作用于胃癌MGC803细胞的实验结果中显示蟾蜍毒素可抑制细胞增殖,利用Western bolt法在20nmol/L及40nmol/L组可检测到非活化caspase-3蛋白表达,而80nmol/L组可检测到剪切型caspase-3蛋白表达,证实蟾蜍毒素在诱导MGC803细胞凋亡过程中,裂解活化了caspase-3,提示蟾蜍毒素可通过caspase-3依赖的方式诱导细胞凋亡^[12]。传统中药紫草素具有抗炎和抗病毒等多方面的作用,尤其在抗肿瘤方面已取得一定的疗效。以人急性髓系白血病细胞株HL-60为研究对象,在紫草素衍生物5,8-二甲基-2-β-羟基-异戊酰紫草素(SK36)作用下,成玲剑等^[13]采用FCM定量检测caspase-3活性,SK36作用细胞48h组的caspase-3活性明显高于24h组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄酮类化合物通过促凋亡作用发挥抗肿瘤作用也备受国内外广泛关注。在曹长姝等^[14]的实验中,用中药臭灵丹中黄酮类化合物3,5-二羟基-6,7,3',4'-四甲氧

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2012ZA132)

作者单位:325000 温州医学院第一临床医学院(陈武兵);

318000 浙江省台州市立医院耳鼻咽喉-头颈外科(蔡志毅)

通讯作者:蔡志毅,电子邮箱:caizy008@tom.com

基黄酮 (HTMF) 作用于人喉癌细胞 Hep-2, 不同时间 (0、6、12、24、48h) 分别收集细胞, 利用 Western blot 检测显示 caspase-3、caspase-9 被激活, 蛋白表达随着时间的延长而减少。

三、凋亡相关蛋白与基因

1. Bcl-2 家族: 在细胞凋亡的调控因素中, Bcl-2 蛋白家族备受瞩目, 它是于 1984 年最先被发现的细胞凋亡抑制基因^[15]。根据其所具有的 BH 结构域以及生物学效应的不同, Bcl-2 家族被分为 3 个亚家族: ① Bcl-2 亚系, 有 Bcl-2、Bcl-xL 等; ② Bax 亚系, 它们与 Bax 相似, 包括 Bax、Bak 等, 均为凋亡促进基因; ③ BH3 亚系, 有 Bad、Bid 等^[16]。其中 Bax 与 Bcl-2 可形成异二聚体或与自身形成二聚体, Bax 过表达, 细胞死亡增多, 而 Bcl-2 过度表达时, 它与 Bax 结合, 死亡被抑制, 因此 Bcl-2 与 Bax 的比列是决定细胞凋亡敏感性的变阻器^[17,18]。

近年来研究发现, 藤黄的抗肿瘤作用主要是由新藤黄酸 (neo-gambogic acid, NGA) 作为有效成分来发挥效应的^[19]。NGA 处理人肝细胞癌 HepG₂ 细胞株 12~36h 后, 利用流式细胞术检测给药组的凋亡细胞明显增多; Western blot 法检测显示, 随着 NGA 浓度逐渐增大, Bax 蛋白水平上升而 Bcl-2 蛋白表达降低, 表明随着 Bax/Bcl-2 比例升高, Bax 表达占优势, 从而增强了促细胞凋亡信号并诱导细胞凋亡^[20]。青蒿素是从菊科蒿属黄花蒿茎叶中提取的一种含过氧基团的倍半萜内酯, 其衍生物有青蒿琥酯、双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 及蒿甲醚等。近年来, 青蒿素抗肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡以及对活体移植瘤的抑制作用日益受到关注。MTT 法检测 DHA 对前列腺癌 PC-3 细胞具有抑制增殖作用; 免疫组化检测显示各浓度组细胞膜及细胞质内 Bcl-2 蛋白反应产物呈深棕色, DHA 浓度越高, 颜色越浅; 胞质内 Bax 蛋白反应产物为棕色, 且 DHA 浓度越高, 颜色越深; 随着 DHA 浓度的升高, 凋亡相关基因 Bcl-2 在 PC-3 细胞胞质与胞膜内的表达降低, 而 Bax 在胞质表达却显示增加。在刘凤仙等^[21] 研究中, 刺参酸性黏多糖诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡可能是通过调节凋亡相关蛋白 (Bcl-2/Bax) 的表达而实现的。

2. p53 基因: p53 是重要的肿瘤抑制基因, 在 DNA 损伤时, 细胞内 p53 蛋白即表达增加, 阻滞细胞周期并可诱导细胞凋亡。近年来研究发现, p53 可通过线粒体调控内源性凋亡途径, 胞质内 p53 的积聚可直接激活 Bax, 改变线粒体膜的通透性, 促进细胞色

素的释放, 诱导细胞凋亡。其功能类似于 Bcl-2 家族的 Bid 等, 可直接作用于 Bcl-xL 促使 Bax 的释放和激活。活化的 p53 也可通过增强细胞表面死亡受体的表达即外源性凋亡途径诱导凋亡。因此 p53 被称作细胞的“gate keeper”。

研究发现许多中药可通过调节 p53 基因的表达而诱导细胞凋亡。胡彬雅等采用流式细胞术和免疫组化法, 观察益气解毒颗粒对体外培养人鼻咽癌细胞株 HNE1 的细胞凋亡诱导活力, 发现益气解毒颗粒原方 15% 药物血清对 HNE1 的细胞凋亡诱导效应且具有时间和药物浓度双重依赖性的特点。益气解毒颗粒各组均能上调 p53 的表达, 推测诱导细胞表达 p53 蛋白很可能是益气解毒颗粒诱导细胞凋亡的途径之一。若 p53 基因受到致癌因素作用后可发生突变, 对细胞增殖的负调控转变为正调控, 可导致细胞增殖能力的提高, 诱发多种癌变。在用康尔爱片 (含桔梗、巴豆霜和麝香等) 和双苓扶正抗癌制剂 (含茯苓、炙黄芪、和土茯苓等) 分别处理胃癌 SGC-7901 细胞的两项实验中发现, 其 p53 蛋白水平显著降低并出现典型细胞凋亡, 提示其作用机制与 p53 基因的表达下降有关。

四、线粒体膜电位与细胞色素 C

在各种刺激所诱导的细胞凋亡实验中发现, 降低线粒体膜电位可促使线粒体膜的开放, 进而导致细胞色素 C 释放至胞质中, 以激活 caspase 级联反应诱导凋亡。实际上, Bcl-2 蛋白家族成员通过调控细胞色素 C 的释放来抑制 (Bcl-2, Bcl-xL) 或促进 (Bax, Bid, Bak) 细胞凋亡。在某种意义上, 线粒体可以决定细胞的生存或死亡。线粒体在细胞凋亡机制中的作用越来越引起人们的重视, 细胞色素 C 的释放是细胞凋亡信号转导过程的关键因素。

在紫草素衍生物 5,8-二甲基-2-β-羟基-异戊酰紫草素 (SK36) 对人白血病细胞株 HL-60 增殖及凋亡的影响实验中发现, SK36 能明显抑制 HL-60 细胞的增殖, 呈剂量和时间依赖性; 在光学显微镜下可见典型的细胞凋亡形态学变化; FCM 法检测 caspase-3 活性增加; 24h 和 48h 时线粒体跨膜电位崩塌的细胞所占比例明显升高。由此可见, SK36 可以引起 HL-60 细胞线粒体跨膜电位下降, 激活 caspase-3, 进一步启动 caspase 级联反应, 导致白血病细胞最终发生凋亡^[13]。尹军强等^[22] 研究了槲皮素对骨肉瘤细胞系 U-2OS/MTX300 增殖与凋亡的影响, 在不同浓度的槲皮素作用细胞 48h 后, FCM 检测到其细胞线粒体膜电位显著降低, 并呈浓度依赖

性,同时通过 Western blot 实验显示胞质蛋白中细胞色素 C 的水平随着药物浓度的增加而增高,表明随着细胞线粒体膜电位的降低,细胞色素 C 从线粒体中释放入细胞质中,从而发挥诱导骨肉瘤细胞系凋亡的作用。通关藤提取物作用于 U937 和 HL60 白血病细胞,结果发现在早期药物作用 1 天后就能明显地降低线粒体跨膜电位,随着时间延长,线粒体跨膜电位下降的细胞比例增加更加明显,且凋亡细胞的比例也不断增加;caspase-3 活化,caspase-3 底物 PARP 被剪切,提示通关藤能通过降低线粒体跨膜电位,触发细胞凋亡过程,从而抑制细胞增殖。

五、展 望

细胞凋亡存在于大多数肿瘤组织中,与肿瘤的发生、发展密切相关。在中药诱导肿瘤细胞凋亡机制的诸多研究中,主要集中在以死亡受体和线粒体为中心的信号转导途径上。caspase 作为细胞凋亡的中心执行者,由其抗凋亡成员(Bcl-2、Bcl-xL 等)和促凋亡成员(Bax、Bak 等)之间协同调控细胞凋亡。转录调节因子 p53 对细胞凋亡的诱导作用也很重要,大量的凋亡因子是依赖 p53 激活调节细胞凋亡的。线粒体早期关键的变化即引起线粒体跨膜电位的降低,从而使得细胞色素 C 的释放,它被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,一旦线粒体跨膜电位崩溃,细胞凋亡将不可逆转。

中药诱导细胞凋亡的作用机制还存在着一些尚待解决的问题:①中药诱导肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤机制是多靶点多方位的,细胞凋亡的信号转导途径极其复杂,因此其具体机制还有待深入探讨;②目前的研究主要集中在某一凋亡因子对细胞凋亡的影响,使得新的凋亡调控相关基因不断地被发现,但如何从整体上把握细胞凋亡的过程还需进一步的研究;③今后还需积累更多的动物实验数据和临床试验数据;④还可研究相关中药成分与其他化疗药物的协同效应,以及与手术和放疗等相结合的疗效,为恶性肿瘤的临床治疗提供更佳的手段。相信随着近年来中药有效成分提取技术的提高和药理研究的不断深入,以及对细胞凋亡发生、发展机制的系统研究,通过中药诱导肿瘤细胞凋亡的临床抗癌途径将会得到更大的突破。

参考文献

- 1 Wylie AH. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology[J]. *Mol Neurobiol*, 2010, 42(1): 4-9
- 2 Tchenev G, Nenof P. Dissecting the pathways of tumour escape: "a question of life and death?"[J]. *An Bras Dermatol*, 2010, 85(2): 248-259

- 3 王爱红,米志宽,符兆英. 抗癌中药诱导胃癌细胞凋亡机制研究进展[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2011, 24(2): 113-116
- 4 Oberst A, Bender C, Green D R, et al. Living with death: The evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(7): 1139-1146
- 5 Susan E. Apoptosis: a review of programmed Cell Death[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495-516
- 6 Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, et al. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cytoskeleton - talk between them [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2009, 16: 966-975
- 7 Ward TH, Cummings J, Dean E, et al. Biomarkers of apoptosis[J]. *British Journal of Cancer*, 2008, 99: 841-846
- 8 Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 414: 13-21
- 9 李运延,胡国华. 紫草素及其衍生物抗肿瘤作用的研究进展[J]. *陕西中医*, 2011, 32(7): 927-928
- 10 Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, et al. Apoptosis-associated caspase activation assays[J]. *Methods*, 2008, 44(3): 262-272
- 11 Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes[J]. *J Med Genet*, 2009, 46(8): 497-510
- 12 王籍,郁云龙,刘阳阳,等. 蟾蜍毒素对人胃癌细胞凋亡的诱导机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(2): 116-120
- 13 成玲剑,周文,李绍顺,等. 紫草素衍生物 SK36 对白血病 HL-60 细胞增殖及凋亡作用的影响[J]. *肿瘤*, 2010, 30(7): 581-585
- 14 曹长妹,沈伟哉,李药兰,等. 臭灵丹中黄酮类化合物对人喉癌细胞 Hep-2 凋亡的影响及机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(7): 1362-1365
- 15 Soriano ME, Scorrano L. The interplay between Bcl-2 family proteins and mitochondrial morphology in the regulation of apoptosis[J]. *Adv Exp Biol*, 2010, 687: 97-114
- 16 梁宏,王东. Bcl-2 家族与 2 型糖尿病胰岛 β 细胞凋亡[J]. *医学综述*, 2011, 17(8): 1192-1195
- 17 Azad N, Iyer A, Valyathan V, et al. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1203: 1-6
- 18 Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122: 437-441
- 19 Cheng H, Peng DY, Wang XS, et al. Antitumor effects of neogambogic acid both in vivo and in vitro[J]. *China Tradit Herb Drugs*, 2008, 39(2): 236-240
- 20 刘卫海,肖国丽,赖小平等. 新藤黄酸诱导 HepG2 细胞凋亡与 Bax 及 Bcl-2 的关系[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(3): 439-440
- 21 刘凤仙,宋扬. 刺参酸性黏多糖对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 基因表达的影响[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(12): 2089-2091
- 22 尹军强,谢显彪,贾强,等. 槲皮素对人骨肉瘤细胞 U-2OS/MTX300 增殖和凋亡的影响及其机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(5): 611-614

(收稿日期:2013-01-26)

(修回日期:2013-04-02)