

白杨素抗肿瘤效应及其机制的研究进展

邹雅茹 童建菁 叶 静 陈 宇

摘 要 白杨素(chrysin)是一种天然的黄酮类化合物,近期发现它具有抗肿瘤活性。在多种体内外肿瘤实验研究中,白杨素表现出抑制增殖和诱导凋亡的活性,研究表明其作用机制主要包括白杨素激活 caspase 活性诱发凋亡级联反应;下调 PI₃K/Akt 信号通路;改变基于谷胱甘肽的氧化还原系统以及抑制肿瘤新生血管形成等。已有研究表明,白杨素的化学结构满足黄酮类化合物在肿瘤细胞内发挥细胞毒性的必需结构,是一种很有潜力的新型抗肿瘤药物。

关键词 白杨素 肿瘤 凋亡

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.047

白杨素是从许多植物、蜂蜜和蜂胶中提取的一种天然的具有生物活性的黄酮类化合物。它具有强大的抗炎、抗氧化和抗肿瘤特性。本文的目的是总结关于白杨素在肿瘤细胞凋亡过程中的活化机制的研究结果以及其对肿瘤细胞增殖的影响。已有的实验研究证明,白杨素具有抗肿瘤作用,是一种很有潜力的化学治疗或化学预防的抗肿瘤药物。

一、黄酮类化合物与白杨素

黄酮类化合物是一种分布广泛的植物色素,水果和蔬菜等食物中几乎无所不在。黄酮类化合物易于被人体摄取、吸收,并且由于其在各种食物中的高含量存在,因此成为人类饮食的一个重要组成部分。目前,已经有超过 4000 种的具有生物学活性的黄酮类化合物被识别^[1]。黄酮类化合物可以进一步划分为黄酮醇、黄酮、黄烷醇、黄烷酮、花青素和异黄酮等子类。黄酮有着共同的化学结构,它包括融合的 A 环和 C 环,还有连接在 C 环 2 位上的苯基 B 环^[2]。黄酮,如芹黄素、黄芩甙元、白杨素和野黄芩素,最近被证实它们在血管生成和抗炎抗氧化等方面扮演着重要的角色^[3]。

白杨素是本文重点介绍的一种黄酮。白杨素拥有常见黄酮的结构,此外在 A 环的 5 位和 7 位有两个羟基。白杨素已被证实有减低糖尿病罹患风险的作用

用^[2,4]。同时,它也显示出抗炎、抗氧化和抗肿瘤的作用^[5,6]。大量研究显示,对于一些人类和小鼠的肿瘤细胞,白杨素具有抑制增殖和诱导凋亡的效应,显示出其抗肿瘤活性。

二、白杨素对肿瘤细胞凋亡过程的影响

细胞凋亡的激活是大部分抗肿瘤药物的主要分子机制,白杨素也不例外。尽管白杨素因为化学结构是在 A 环的 5,7 位只有两个羟基而在一些肿瘤细胞中表现较低的细胞毒性,但在体外研究中,白杨素已经在人类宫颈癌、白血病、食管鳞状细胞癌、肾癌、恶性胶质瘤、乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)和结肠癌等肿瘤细胞中显示出抗肿瘤效应^[1,7-13]。细胞凋亡是基因调控的细胞死亡。一般说来,细胞凋亡有两种主要途径:①由一种被肿瘤坏死因子(TNF)受体所激发的外部信号诱导产生的,受体包括 Fas(TNF 受体超家族,成员 6)、TRAIL-R1 和 R2(TNF 相关凋亡诱导配体 R1 和 R2);②由线粒体和促凋亡蛋白(包括细胞色素 C)介导的^[14]。

诱导凋亡是白杨素治疗作用的重要机制之一^[15,16]。有研究显示,以黄酮类为主要组成成分的蜂胶诱导细胞凋亡的机制依赖于化合物类型和蜂胶提取物的浓度^[15]。另有研究表明,虾青素和黄酮类化合物可以保护 SH-SY5Y 细胞免受 β -淀粉样蛋白诱导的凋亡威胁^[17]。尽管分子机制尚未完全明确,但白杨素在许多类型的肿瘤细胞实验研究中显示出诱导凋亡的活性。白杨素(5、7.5 和 10 μ mol/L)在 U937 细胞诱导凋亡,这是通过 PI₃K/Akt 信号途径的失活、NF- κ B 的下调以及 IAP(inhibitor of apoptosis proteins)的激活实现的,它们能激活 caspase-3,进而启动凋亡^[18]。另外,用白杨素(7.5 和 10 μ mol/L)处

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170491,81270433)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院急诊科(邹雅茹、童建菁、叶静);200040 上海,复旦大学附属华山医院血液科(陈宇)

通讯作者:陈宇,电子信箱:drchenzi@163.com

理 12h 的 U937 细胞的细胞色素 C 从线粒体中流到胞质中,这有可能是白杨素启动凋亡的内在途径^[18]。

另一些研究已经表明,白杨素在人类大肠癌细胞 HCT116、人类肝癌细胞 HepG2 和人类鼻咽癌细胞 CNE-1 细胞中参与凋亡的内在途径^[19]。在用 1ng/ml TNF- α 联合 10、20 和 40 μ mol/L 白杨素处理后, HCT116, HepG2 和 CNE-1 细胞的的凋亡率明显上升。白杨素通过 caspase 级联(caspase-8 和 caspase-3 的活化)显著提高了细胞对 TNF- α 诱导的凋亡的敏感度。并且,用 40 μ mol/L 白杨素和 1ng/ml TNF- α 预处理的 HCT116 细胞相比于只用 TNF- α 的一组($P < 0.01$)能明显呈现出 I- κ B 激酶活性的抑制,抑制 NF- κ B 转录活性进而抑制 c-FLIP 基因的表达。这些研究表明,白杨素对 TNF- α 诱导的细胞凋亡具有敏化作用,抑制 TNF- α 介导的 NF- κ B 激活,从而减少 c-FLIP 在 HCT116 细胞的表达,促使细胞凋亡。

综上所述,目前已知的白杨素在肿瘤细胞诱导凋亡的机制主要包括:①激活 caspase 级联;②抑制抗凋亡蛋白,如 IAP、c-FLIP、PI₃K/Akt 等;③抑制 I- κ B 激酶和 NF- κ B 活性。尽管也有研究结果显示白杨素有促癌活性,但更多结果显示出了其抑癌活性,例如中国蜂胶已经被表明有抑制神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 凋亡的作用,并可以观察到 caspase-3 活化和细胞色素 c 的释放到胞质。

三氧化二砷是一种治疗急性早幼粒细胞白血病的有效药,但是这种制剂的有效应用需要使用敏化策略。目前的工作表明,白杨素与三氧化二砷联合可以在人白血病细胞株 U937、THP-1、HL-60 中起到诱导凋亡的作用。两药联合使用引起线粒体膜电位降低,激活线粒体凋亡通路。白杨素单药使用或与三氧化二砷联合,在降低 Akt 的同时也降低细胞内谷胱甘肽(GSH)含量。另有研究表明,新型白杨素类似物 8-溴-7-甲氧基白杨素(BrMC)单药使用或与三氧化二砷联合也具有相同作用,硫醇抗氧化剂 NAC 和外源性 GSH 可以恢复 GSH 含量,并且减少由三氧化二砷联合 BrMC 治疗所诱导的凋亡。这些发现均表明,白杨素及其类似物可能是通过作用于基于谷胱甘肽的氧化还原系统诱导肿瘤细胞凋亡的。

三、白杨素对肿瘤细胞增殖过程的影响

肿瘤细胞的特点是不受控制的生长,这是由 cyclin 和 Cdk 的复合体控制的细胞周期调控基因的功能异常造成的。细胞周期的过程受 p53 蛋白的调控,与

DNA 损伤增加 Cdk 抑制剂(如 p16、p21 和 p27 蛋白)水平有关^[20]。通过对 DNA 损伤检查点的调节,可以使组织加快或减慢老化,同理也可以加快或减慢老化相关的肿瘤形成^[21]。近来有研究表明,白杨素能够特异性减低端粒位置效应(TPE),影响端粒完整性,降低端粒对 DNA 损伤的保护作用,从而使细胞加快走向凋亡^[22]。

在小鼠的 C6 神经胶质瘤细胞中,研究者进行了白杨素对肿瘤增殖影响的研究,经 10~50 μ mol/L 白杨素作用 72h 后,C6 细胞的增殖和生长速度下降了约 30%~90%。此外,在 30~50 μ mol/L 浓度白杨素作用下,G₁ 期 C6 神经胶质瘤细胞的数量由 69% 增加到 83%,S 期的细胞数量从 11.4% 下降到 2.8%。50 μ mol/L 浓度的白杨素使 CDK2/cyclinE 的活性减少到 8.9%,CDK4/cyclinD 的活性减少到 5.7%。这是由于 Cdk 抑制因子 p21 在 C6 神经胶质瘤细胞被过度活化造成的。这项研究表明,白杨素能导致 C6 神经胶质瘤 G₁ 期细胞增殖阻滞。另外的一项研究表明,经白杨素与铜整合的复合物 50 μ mol/L 处理 24h 后,黑色素瘤细胞 518A2 会在 G₂/M 期被阻滞,但其机制仍未可知。

四、白杨素对不同肿瘤细胞的作用

1. 白血病:Zaric 等^[7]指出白杨素在 MOLT-4 和 JVM-13 两种细胞株的几个重要影响:①白杨素介导线粒体细胞色素 C 从线粒体释放到胞质;②白杨素诱导 caspase-3 活性增高和下游靶点蛋白水解;③白杨素诱导激活促凋亡的 Bax 基因同时降低抗凋亡的 Bcl-2 基因表达。笔者从而得出结论,白杨素是一种天然无毒的物质,其在白血病的化学治疗和预防上有着巨大潜力。这些结果表明,白杨素诱导的凋亡可能是 caspase 和线粒体依赖的,这个结论与其他类似研究相一致,白杨素单独使用或其他化合物联用会减少 Akt 磷酸化,并可能导致白血病细胞的线粒体功能障碍。白杨素还可以通过抑制 PI₃K 通路消除干细胞因子(SCF)/c-Kit 信号。此外,Monasterio 等报道,黄酮类化合物,包括白杨素、诱导凋亡通过激活的 caspase-3 和 caspase-8 诱导凋亡,表明白杨素诱导凋亡可能是通过配体-受体依赖的机制。本研究还提出了在细胞中 Akt 和 NF- κ B 信号通路之间的关系。然而,在白杨素治疗的白血病细胞中需要更多研究,以进一步评估 Akt 和 NF- κ B 信号通路之间的关系。

在用 60ng/ml 马尼萨蜂胶处理白血病细胞时,人

类端粒酶反转录酶(hTERT)表达水平明显降低,这归功于蜂胶中白杨素下调 hTERT 的能力。其他研究,如 Josipovic 等的研究表明白杨素在白血病细胞显示高水平的细胞毒性。另外,白杨素的甲醇提取物也呈现出强大的抗肿瘤活性。所有这些研究均表明白杨素具有潜在抗肿瘤活性,有可能成为一个潜在的抗肿瘤药物。白杨素的生物活性,也许可以通过联合其他黄酮类化合物来进行提高。多数黄酮类化合物,包括白杨素的抑制白血病细胞增殖效果是存在剂量依赖的。此外,构效关系研究表明,在 A 环的 3、5、7 位至少有两个羟基才能起到诱导凋亡的作用,而 B 环的 3'和(或)4'位的羟化会增加促凋亡活性,白杨素的化学结构(A 环的 5 位和 7 位有两个羟基)很可能满足黄酮类化合物在白血病细胞内发挥细胞毒性的必需结构。

2. 宫颈癌:以往研究显示:肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)能选择性的杀死各种类型的肿瘤细胞而不伤害正常细胞。而最近有研究发现,蜂胶提取物中的白杨素可以使宫颈癌 HeLa 细胞系对 TRAIL 诱导的凋亡更加敏感^[8]。白杨素的 TRAIL 敏化作用不是由抑制 TRAIL 诱导的 NF- κ B 的激活或是谷胱甘肽的消耗所介导的,而是通过抑制 STAT3 下调 Mcl-1 基因表达,从而选择性的降低 Mcl-1 蛋白的水平。这表明白杨素可以作为 TRAIL 的增敏剂来发挥其抗肿瘤作用的。

3. 食管鳞状细胞癌:食管癌是常见的消化道肿瘤,全世界每年约有 30 万人死于食管癌。我国是世界上食管癌高发地区之一,每年平均病死约 15 万人。体外研究表明,用白杨素处理食管鳞癌 KYSE-510 细胞,可以引起 G₂/M 期阻滞和细胞凋亡,从而产生细胞毒性作用。进一步探究其机制,研究发现,白杨素在 mRNA 和蛋白水平上,上调 p21^{waf1}且下调 cyclin B1 表达,并通过上调 PIG3 的同时使 caspase-9 与 caspase-3 分离来触发非 P53 依赖的线粒体介导的凋亡通路,从而诱导肿瘤细胞的凋亡。

4. 恶性胶质瘤:血管生成是所有肿瘤进展和侵袭所必需的,许多实体性肿瘤通过产生血管生成因子来诱导血管生长,其中效果最明显的是血管内皮生长因子(VEGF)。一项关于恶性胶质瘤的体外研究表明,白杨素等黄酮类化合物可以减少 VEGF 释放,从而阻碍肿瘤进展。神经胶质瘤是最常见的恶性肿瘤之一,威胁着中枢神经系统的正常运作,一项药物筛选试验表明,白杨素及其衍生物 8-溴-7 甲基白杨素

(BrMChR)能抑制神经胶质瘤细胞的生长并诱导其凋亡,但具体机制尚不清楚。

5. 肺癌:二氢二醇脱氢酶(DDH)是醛酮基还原酶超家族(AKR1C1 - AKR1C4)成员之一,在类固醇激素前列腺素和外源性化学物质的代谢中发挥重要作用。DDH 过表达是非小细胞肺癌(NSCLC)中作为预后不良和药物抗性的指标,还与慢性炎症密切相关。Wang 等在非小细胞肺癌细胞中对炎症反应,DDH 表达及耐药性之间关系的研究表明,非小细胞肺癌细胞的 AKR1C1/1C2 表达及耐药性可以被白杨素所抑制,在这一进程中蛋白激酶 C 通路可能发挥重要作用。A549 细胞为人肺腺癌细胞,有研究发现,经白杨素作用,A549 细胞对 TRAIL 诱导的凋亡的敏感度明显增强。Samarghandian 等的研究发现,白杨素通过对 Bcl-2 家族的调控和激活 caspase-3、caspase-9 诱导肿瘤细胞凋亡,从而抑制肺癌细胞生长的。

白杨素在大多数实验细胞中抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡,其效果不尽相同。对其作用机制的研究表明,白杨素有激活 caspase 和使 Akt 信号通路失活的能力。白杨素的生物活性,也许可以通过联合其他黄酮类化合物和修饰分子结构改善。尽管大多数研究都支持这样的结论,白杨素在不同肿瘤细胞系可以诱导凋亡,但其诱导凋亡的机制仍不清楚。到目前为止已发表的研究有一定差异性甚至是矛盾的。因此,要明确白杨素的诱导肿瘤细胞凋亡和抑制细胞增殖的确切机制,开展进一步研究是十分必要的。

参考文献

- 1 Sak K. Characteristic features of cytotoxic activity of flavonoids on human cervical cancer cells[J]. APJCP, 2014, 15(19):8007-8019
- 2 Feng X, Qin H, Shi Q, et al. Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status via activating PPARgamma[J]. Biochemical Pharmacology, 2014, 89(4):503-514
- 3 Araujo JR, Goncalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines[J]. Nutrition Research: New York, 2011, 31(2):77-87
- 4 Sirovina D, Orsolic N, Koncic MZ, et al. Quercetin vs chrysin: effect on liver histopathology in diabetic mice[J]. Human & Experimental Toxicology, 2013, 32(10):1058-1066
- 5 Yu XM, Phan T, Patel PN, et al. Chrysin activates Notch1 signaling and suppresses tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo[J]. Cancer, 2013, 119(4):774-781
- 6 Sultana S, Verma K, Khan R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 64(6):872-881

(下转第 186 页)

- er Res, 2010, 70(14):5942-5952
- 12 Zhang J, Yang Z, Xie L, *et al.* Statins, autophagy and cancer metastasis[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2012, 4(5):745-752
 - 13 Peng Y, Shi Y, Shen Y, *et al.* Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy[J]. PLoS One, 2013, 8(9):e74407
 - 14 Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, *et al.* Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. [J]. Cancer Research, 2003, 63(11):2742-2746
 - 15 Hwa J, Ro S, Cao J, *et al.* mTOR regulation of autophagy[J]. FEBS Letters, 2010, 584(7):1287-1295
 - 16 Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(8):4240-4245
 - 17 Sourbier C, Lindner V, Lang H, *et al.* The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy [J]. Cancer Research, 2006, 66(10):5130-5142
 - 18 Akil H, Mototsugu O, Atsushi U, *et al.* Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma [J]. Journal of Urology, 2003, 169(2):710-713
 - 19 Dalby K, Tekedereli I. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer[J]. Autophagy, 2010, 6:322-329
 - 20 Chang NC, Nguyen M, Germain M, *et al.* Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1 [J]. EMBO J, 2010, 29(3):606-618
 - 21 Zong W, Moll U. P53 in autophagy control [J]. Cell Cycle, 2008, 7(19):2947
 - 22 Porter PL, Gown AM, Krmap SG, *et al.* Wide spread p53 over expression in human malignant tumor [J]. American Journal of Pathology, 1992, 140(1):145-153
 - 23 Lorne J, Hussain S, Harris C. p53: 25 years after its discovery [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2004, 25:177-181
 - 24 Bensaad K, Vousden KH. P53: new roles in metabolism [J]. Trends Cell Biol 2007, 17(6):286-291
 - 25 张涛, 罗志刚. 肾癌的基因研究进展 [J]. 当代医学, 2011, 09:25-26
(收稿日期:2014-11-20)
(修回日期:2014-11-24)
-
- (上接第 167 页)
- 7 Zarc M, Mitrovic M, Nikolic I, *et al.* Chrysin induces apoptosis in peripheral blood lymphocytes isolated from human chronic lymphocytic leukemia [J]. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2014, 15(2):189-195
 - 8 Lirdpramongkol K, Sakurai H, Abdelhamed S, *et al.* Chrysin overcomes TRAIL resistance of cancer cells through Mcl-1 downregulation by inhibiting STAT3 phosphorylation [J]. International Journal of Oncology, 2013, 43(1):329-337
 - 9 Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, *et al.* Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: plausible role of NF-kappaB [J]. Toxicology Letters, 2013, 216(2-3):146-158
 - 10 Deng X, Zhao X, Lan Z, *et al.* Anti-tumor effects of flavonoids from the ethnic medicine Docynia delavayi (Franch.) Schneid. and its possible mechanism [J]. Journal of Medicinal Food, 2014, 17(7):787-794
 - 11 Huang C, Chen YJ, Chen WJ, *et al.* Combined treatment with chrysin and 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose synergistically inhibits LRP6 and Skp2 activation in triple-negative breast cancer and xenografts [J]. Molecular Carcinogenesis, 2014, epub online
 - 12 Szliszka E, Sokol-Letowska A, Kucharska AZ, *et al.* Ethanolic extract of Polish propolis: chemical composition and TRAIL-R2 death receptor targeting apoptotic activity against prostate cancer cells [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013:757628
 - 13 Jaganathan SK, Mandal M. Involvement of non-protein thiols, mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species and p53 in honey-induced apoptosis [J]. Investigational New Drugs, 2010, 28(5):624-633
 - 14 Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC [J]. Nature, 1999, 399(6735):483-487
 - 15 Sawicka D, Car H, Borawska MH, *et al.* The anticancer activity of propolis [J]. Folia histochemica et cytobiologica, 2012, 50(1):25-37
 - 16 Choudhari MK, Haghniaz R, Rajwade JM, *et al.* Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an in vitro study [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013:928280
 - 17 Wang HQ, Sun XB, Xu YX, *et al.* Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells [J]. Brain Research, 2010, 1360:159-167
 - 18 Woo KJ, Jeong YJ, Park JW, *et al.* Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 325(4):1215-1222
 - 19 Li X, Huang Q, Ong CN, *et al.* Chrysin sensitizes tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human tumor cells via suppression of nuclear factor-kappaB [J]. Cancer Letters, 2010, 293(1):109-116
 - 20 Hong B, van den Heuvel AP, Prabhu VV, *et al.* Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities [J]. Current Drug Targets, 2014, 15(1):80-89
 - 21 Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012, 13(9):579-590
 - 22 Boussouar A, Barette C, Nadon R, *et al.* Acacetin and chrysin, two polyphenolic compounds, alleviate telomeric position effect in human cells [J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2013, 2:e116
(收稿日期:2014-12-01)
(修回日期:2014-12-11)