

华蟾素抗骨肉瘤作用中相关信号通路的研究进展

郑迪代 郭卫春

摘要 骨肉瘤是常发于青少年的恶性肿瘤,具有易转移、预后差的特点。随着诊疗水平的进步,骨肉瘤患者的 5 年生存率虽有明显提高,但仍有很大的提升空间。传统中药的抗肿瘤作用已被广泛关注,华蟾素是近些年来较为广泛使用的中药制剂,大量研究已经证实华蟾素能对骨肉瘤产生抑制作用,其中的分子机制复杂多样,尚未完全阐明。现就目前已研究的华蟾素抗骨肉瘤涉及的分子机制中相关信号通路进行综述,归纳起来,华蟾素可以通过抑制 GSK-3 β /NF- κ B 信号通路,激活 ROS/JNK/p38 信号通路,下调骨肉瘤细胞中的 Notch 信号从而发挥抗骨肉瘤的作用,为进一步探索华蟾素抗骨肉瘤的分子机制提供参考。

关键词 华蟾素 骨肉瘤 凋亡 信号通路 进展

中图分类号 R2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.02.004

骨肉瘤是常发于青少年的恶性肿瘤,10~20 岁为其发病高峰,具有易转移、预后差的特点^[1~3]。随着诊疗水平的进步,骨肉瘤患者的五年生存率虽有明显提高,但仍有很大进步空间。目前,对于骨肉瘤患者的治疗主要包括手术,放疗和化疗^[4]。然而,常用的化疗药物如顺铂阿霉素等伴有明显的毒性不良反应,而治疗效果也无法令人满意,因此,因此亟待寻找新的抗骨肉瘤药物。传统中药的抗肿瘤作用已被广泛关注,越来越多的研究者开始在中药里面探索新的、有效的、低毒性不良反应的抗肿瘤药物。华蟾素是蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍的全皮经提取加工制成的水溶性制剂^[5]。近年来的研究发现,华蟾素对骨肉瘤能产生明显的抑制作用,其中的分子机制复杂多样,尚未完全研究清楚。本文概述了目前已研究的华蟾素抗骨肉瘤涉及的分子机制中的相关信号通路,希望达到以下目的:①总结目前已研究的华蟾素抗骨肉瘤涉及的相关信号通路;②为进一步探索华蟾素抗骨肉瘤的分子机制提供参考;③指导进一步研究传统中药抗肿瘤作用的分子机制。

一、GSK-3 β /NF- κ B 信号

糖原合成激酶 3 β (GSK-3 β)是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,广泛参与肿瘤形成的 Wnt/ β -catenin/NF- κ B 等多个信号转导通路,其生物学作用与肿瘤细胞的生长、增殖及凋亡过程密切相关。

核因子 kappaB(NF- κ B)是重要的核内转录因子,其下游基因包括 Bcl-2、xIAP、cIAP-1 和 survivin 等,NF- κ B 通过调控靶基因的转录进而参与肿瘤细胞的生长,血管生成和转移等过程^[6,7]。Hoefflich 等^[8]在 2000 年首先报道了 GSK-3 β 在成纤维细胞中对 NF- κ B 的正性调节作用,Tang 等^[9]在 2012 年研究证明,GSK-3 β 在骨肉瘤细胞中对 NF- κ B 有正性调节作用,GSK-3 β /NF- κ B 信号通路对骨肉瘤细胞生存能力有着重要影响,因此,GSK-3 β /NF- κ B 信号通路或许可以作为骨肉瘤患者的治疗靶点。

2012 年,Yin 等^[10]首先证实了华蟾素可以通过下调骨肉瘤细胞中的 GSK-3 β /NF- κ B 信号通路,导致细胞凋亡,进而发挥抗骨肉瘤的作用。Yin 等^[10]用不同浓度的华蟾素处理 U2OS、MG-63、SaOS-2 3 种不同的骨肉瘤细胞和 hFOB 成骨细胞,结果显示华蟾素可以时间、剂量依赖性的抑制骨肉瘤细胞的生长,而对人成骨细胞的抑制作用较弱,华蟾素可以促进骨肉瘤细胞的凋亡和细胞周期阻滞于 G₂/M 期。进一步探究发现,U2OS 骨肉瘤细胞在华蟾素的处理下,细胞裂解液中抑凋亡蛋白 xIAP、cIAP-1、survivin 和 Bcl-2 表达水平明显下降,而促凋亡蛋白 Bax 明显上升,同时,用免疫印迹法检测到裂解的 PARP 水平的上升,根据以上结果,研究者认为华蟾素可以促进骨肉瘤细胞的凋亡进而起到抗骨肉瘤细胞的作用。由于 xIAP、cIAP-1 和 survivin 是核因子 κ B(NF- κ B)的下游基因,并且 GSK-3 β /NF- κ B 信号通路对骨肉瘤细胞生存能力发挥着重要作用,因此,研究者进一步探究 GSK-3 β /NF- κ B 信号通路在华蟾素所致骨肉瘤细胞凋亡中的作用。华蟾素处理的骨肉瘤

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81341078)

作者单位:430060 武汉大学人民医院骨科

通讯作者:郭卫春,教授,博士生导师,电子邮箱:guoweichun@

aliyun.com

细胞中,细胞核 P65 蛋白水平下降,细胞质中磷酸化的 GSK - 3 β (失活状态) 水平上升,这些结果提示 GSK - 3 β /NF - κ B 信号在华蟾素处理的癌细胞中的下调。进一步研究发现,用 GSK - 3 β - S9A - pcDNA3 质粒转染骨肉瘤细胞后,癌细胞中的 GSK - 3 β 上调,华蟾素所致的抗骨肉瘤细胞作用受到抑制,并且当同时使用华蟾素和 GSK - 3 β 抑制剂 SB216367 处理骨肉瘤细胞时,细胞生存能力相对于华蟾素单独处理大大降低。因此,Yin 等^[10]认为,华蟾素可以通过下调骨肉瘤细胞中的 GSK - 3 β /NF - κ B 信号通路,导致细胞凋亡,进而发挥抗骨肉瘤的作用。

GSK - 3 β /NF - κ B 信号在不同肿瘤中承担的角色是有差别的,如在消化系统肿瘤中起到促癌作用,在乳腺癌、肺癌等肿瘤中表现为抑制作用,而华蟾素则通过抑制骨肉瘤细胞中的 GSK - 3 β /NF - κ B 信号通路,进而导致癌细胞凋亡,从而发挥抗骨肉瘤的作用^[11]。

二、ROS/JNK 信号

活性氧簇(ROS)是细胞内一类活性含氧化合物的总称,包括超氧阴离子、过氧化氢和自由基(超氧化物、羟自由基)等,作为细胞内的一种信号分子,ROS 可通过多种途径激活 c - Jun 氨基末端激酶(JNK),ROS/JNK 信号作为细胞内信号转导的一条重要通路,广泛参与细胞增殖、分化、存活、死亡等许多生命过程,并且在细胞内存在着 ROS/JNK 通路直接或间接激活或调控细胞自噬的复杂机制^[12]。Hou 等^[13]2008 年首先报道了在骨肉瘤细胞中,HBI 可通过激活 ROS/JNK 信号通路进而发挥抗骨肉瘤细胞的作用。2015 年,Li 等^[14]研究证明南蛇藤醇可通过 ROS/JNK 信号通路诱导骨肉瘤细胞凋亡和自噬。由此,笔者认为通过对 ROS/JNK 信号通路的调控,或许可以为骨肉瘤患者的治疗提供新的方向。

2016 年,Ma 等^[15]首次证实华蟾素可通过 ROS/JNK/p38 信号通路诱导骨肉瘤细胞自噬性死亡从而发挥抗骨肉瘤细胞的作用。Ma 等^[15]用不同浓度的华蟾素处理 U2OS 骨肉瘤细胞 12、24、48h,结果显示华蟾素可以时间、剂量依赖性的抑制骨肉瘤细胞的增殖,促进 caspase 依赖的细胞凋亡,引起癌细胞自噬的发生,而当使用自噬抑制剂 CQ 或者 3 - MA 或者采用 RAN 干扰技术沉默 beclin - 1 基因(自噬基因)表达之后,华蟾素所致的骨肉瘤细胞凋亡作用被削弱了,这也就意味着华蟾素所致的癌细胞凋亡与自噬有关。进一步探究其中的分子机制发现,在华蟾素的处

理下,癌细胞中的 ROS 表达水平上升,而当使用 ROS 特异性抑制剂 NAC 预处理癌细胞后,华蟾素所引起的 LC3 - II/LC3 - I,裂解 caspase - 3 和裂解 PARP 的水平上升作用被削弱了,也就是说,NAC 可以对抗华蟾素所致的癌细胞凋亡和自噬作用,提示着 ROS 在华蟾素抗骨肉瘤细胞中的重要作用。进一步探究发现,华蟾素处理的癌细胞中 p - JNK、p - p38 水平上调,使用 JNK 或 p38 抑制剂预处理癌细胞可以减缓华蟾素所引起的 LC3 - II/LC3 - I,裂解 caspase - 3 和裂解 PARP 水平的上升,同时也发现在 ROS 特异性抑制剂 NAC 预处理的癌细胞中,华蟾素所引起的癌细胞中 p - JNK、p - p38 水平上调作用被削弱了。综合以上这些结果,Ma 等^[15]认为华蟾素可通过 ROS/JNK/p38 信号通路诱导骨肉瘤细胞自噬性死亡从而发挥抗骨肉瘤细胞的作用。

ROS/JNK 信号通路广泛参与细胞增殖、分化、存活、死亡等许多生命过程,许多研究已经证实,通过激活癌细胞中的 ROS/JNK 信号可以发挥抗肿瘤细胞的作用,Wang 等^[16]2016 年研究证明,毛兰素可通过激活 ROS/JNK 信号诱导骨肉瘤细胞凋亡,细胞周期阻滞于 G₂/M 期,引起细胞自噬从而发挥抗骨肉瘤细胞的作用;Wang 等^[17]证明,五硫化二砷通过激活 ROS/JNK 信号和抑制 Akt/mTOR 信号诱导骨肉瘤细胞凋亡和自噬。类似的,华蟾素也可通过 ROS/JNK/p38 信号通路的激活诱导骨肉瘤细胞自噬性死亡,从而发挥抗骨肉瘤细胞的作用。

三、Notch 信号

Notch 信号通路是由 Notch 配体(Jagged - 1、Jagged - 3、Delta - like - 1、Delta - like - 3、Delta - like - 4),Notch 受体(Notch1 ~ 4)和细胞内效应分子组成,进化上高度保守,在胚胎发育过程中以及出生后均发挥着重要作用^[18]。Notch 信号通路的激活是当信号发射细胞的 Notch 配体与信号接收细胞的 Notch 受体结合后,在 γ - 分泌酶的作用下,引起 Notch 胞内段(NICD)裂解并释放,转移到细胞核,从而影响下游基因(Hey - 1、Hes - 1、Hes - 5 等)的转录进而发挥作用。研究表明,生理状态下,Notch 信号参与调控细胞增殖、分化及凋亡,而病理情况下,Notch 信号通路的活化则发挥着促癌或者抑癌的作用。

2016 年,Cao 等^[19]研究证明华蟾素可以通过下调骨肉瘤细胞中的 Notch 信号,导致细胞凋亡,进而发挥抗骨肉瘤的作用。Cao 等^[19]用不同浓度的华蟾素处理 143B、U2OS、MG - 63 3 种不同的骨肉瘤细

胞,实验结果显示华蟾素可以时间和剂量依赖性的抑制骨肉瘤细胞的增殖,促进细胞凋亡,导致细胞周期阻滞于 S 期,同时,在细胞裂解液中用免疫印迹法检测到裂解的 caspase - 3 以及 caspase - 3 的量随华蟾素浓度的增加而增加。进一步探究发现,在华蟾素的作用下,Notch - 1 及其下游基因 Hes - 1、Hes - 5、Hey - 1 的 mRNA 表达水平降低,意味着华蟾素可以下调骨肉瘤细胞中的 Notch 信号通路,而当外源性上调 NICD 后,华蟾素致肿瘤细胞凋亡的作用明显减弱,抑制骨肉瘤细胞中的 Notch 信号通路之后,华蟾素致肿瘤细胞凋亡的作用得到增强。因此,Cao 等^[19]认为,华蟾素可以通过下调骨肉瘤细胞中的 Notch 信号,导致细胞凋亡,进而发挥抗骨肉瘤的作用。

Notch 信号通路对在骨肉瘤中的作用目前尚有争论,Li 等^[20]在 2012 年研究发现,姜黄素可以通过下调 Notch 信号通路从而抑制骨肉瘤细胞的增殖和侵袭。然而 2015 年,Ji 等的实验证明,阿霉素通过上调骨肉瘤细胞中的 Notch 信号通路进而抑制癌细胞的增殖。总结起来,可以得出这样的结论,不同的药物可以通过上调或下调 Notch 信号通路从而发挥抗骨肉瘤的作用,Notch 信号通路的上调或下调对骨肉瘤细胞的作用与药物种类有关,而华蟾素则是通过下调癌细胞中的 Notch 信号,进而导致癌细胞凋亡,从而发挥抗骨肉瘤的作用。

四、展 望

华蟾素作为一种广泛使用的中药制剂,最早被用来治疗感染和炎症,随着研究的不断进展,华蟾素的抗肿瘤作用逐渐被挖掘。目前,大量研究已经证实华蟾素能对肝癌细胞、胃癌细胞、乳腺癌细胞以及骨肉瘤细胞等产生抑制作用,而其中的分子机制尚未研究清楚。本文综述了目前已研究的华蟾素抗骨肉瘤涉及的分子机制中的相关信号通路,归纳起来,华蟾素可以通过抑制 GSK - 3 β /NF - κ B 信号通路,激活 ROS/JNK/p38 信号通路,下调骨肉瘤细胞中的 Notch 信号从而发挥抗骨肉瘤的作用,而这三者之间的相互影响以及是否涉及到其他分子机制目前尚不清楚,由于细胞内信号通路的复杂性,未来更多新的分子机制有待研究者们进一步发掘。

华蟾素作为一种传统的中药制剂,对骨肉瘤有明显的抑制作用,其具有毒性不良反应小、效果好等优点,可用于临床治疗骨肉瘤患者,其在临床上的应用,意义重大:①将激励更多的研究者们从传统中药里面

探索新的抗肿瘤药物;②必将大大推动中国传统医药的发展。相信今后会有更多的中药制剂应用于临床肿瘤患者的治疗。

参考文献

- Cheng S, Zhang X, Huang N, *et al.* Down - regulation of S100A9 inhibits osteosarcoma cell growth through inactivating MAPK and NF - κ B signaling pathways[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 253
- Bielack SS, Kempf - Bielack B, Delling G, *et al.* Prognostic factors in high - grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(3): 776 - 790
- Kempf - Bielack B, Bielack SS, Jütingens H, *et al.* Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS)[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(3): 559 - 568
- Ferguson WS, Goorin AM. Current treatment of osteosarcoma[J]. Cancer Inves, 2001, 19(3): 292 - 315
- 彭贝, 巩仔鹏, 陈涛. 华蟾素注射液治疗肝癌的基础和临床研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 1: 63 - 66
- Gyrd - Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF - κ B, inflammation and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(8): 561 - 574
- Perkins ND. The diverse and complex roles of NF - κ B subunits in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(2): 121 - 132
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, *et al.* Requirement for glycogen synthase kinase - 3 β in cell survival and NF - κ B activation[J]. Nature, 2000, 406(6791): 86 - 90
- Tang QL, Xie XB, Wang J, *et al.* Glycogen synthase kinase - 3 β , NF - kappa B signaling, and tumorigenesis of human osteosarcoma[J]. J Nat Cancer I, 2012, 104(10): 749 - 763
- Yin J, Wen L, Wu L, *et al.* The glycogen synthase kinase - 3 β /nuclear factor - kappa B pathway is involved in cinobufagin - induced apoptosis in cultured osteosarcoma cells[J]. Toxicol Lett, 2013, 218(2): 129 - 136
- 郭扬, 曲国蕃. GSK3 β 在恶性肿瘤中的作用及研究现状[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(22): 4390 - 4392
- 唐锦华, 吴江, 连继勤. ROS 介导的 JNK 信号通路及其对细胞自噬的调节[J]. 重庆医学, 2015, 6: 848 - 850
- Hou CH, Fong YC, Chen JT, *et al.* The novel isoflavone 7 - hydroxy - 3', 4' - benzoisoflavone induces cell apoptosis in human osteosarcoma cells[J]. Cancer Lett, 2008, 271(1): 117 - 128
- Li HY, Zhang J, Sun LL, *et al.* Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells: an in vitro and in vivo study[J]. Cell Death dis, 2015, 6(1): e1604
- Ma K, Zhang C, Huang MY, *et al.* Cinobufagin induces autophagy - mediated cell death in human osteosarcoma U2OS cells through the ROS/JNK/p38 signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 36(1): 90 - 98

(转第 8 页)

会产生局部炎症,炎症因子(如肿瘤坏死因子- α)激活鞘磷脂酶,从而将鞘磷脂(sphingomyelin, SM)转化成神经酰胺。因此,在肥胖状态下,无论是升高的饱和 FFA 还是炎症因子都会促进神经酰胺合成。

C16:0 神经酰胺可能是肥胖等代谢性疾病的重要靶标。肥胖时 C16:0 神经酰胺的含量增加,因此循环中 C16:0 神经酰胺的含量可能成为肥胖症和相关代谢功能障碍的检测指标^[9]。棕榈酸是 C16:0 神经酰胺合成所必需的底物。增强线粒体的脂肪酸 β 氧化可减少总体神经酰胺的形成、捕获 C16:0 神经酰胺合成所必需的棕榈酰辅酶 A,有利于减轻神经酰胺的有害作用,可能是肥胖症治疗的有效手段。

参考文献

- Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 711–725, e6
- Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(3): 704–713
- Chavez JA, Summers SA. A ceramide-centric view of insulin resistance [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(5): 585–594
- Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links [J]. *Cell*, 2012, 148(5): 852–871
- Chaurasia B, Summers SA. Ceramides – lipotoxic inducers of metabolic disorders [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(10): 538–550
- Contreras C, Gonzalez-Garcia I, Martinez-Sanchez N, *et al.* Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance [J]. *Cell Rep*, 2014, 9(1): 366–377
- Ramirez S, Martins L, Jacas J, *et al.* Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin [J]. *Diabetes*, 2013, 62(7): 2329–2337
- Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, *et al.* Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(10): 831–838
- Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM, *et al.* Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(4): 678–686
- Raichur S, Wang ST, Chan PW, *et al.* CerS2 haploinsufficiency in-

hibits beta-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(4): 687–695

- Blachnio-Zabielska AU, Koutsari C, Tehkonian T, *et al.* Sphingolipid content of human adipose tissue: relationship to adiponectin and insulin resistance [J]. *Obesity*: Silver Spring, 2012, 20(12): 2341–2347
- Gosejacob D, Jager PS, Vom Dorp K, *et al.* Ceramide synthase 5 is essential to maintain C16:0 – ceramide pools and contributes to the development of diet-induced obesity [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(13): 6989–7003
- Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, *et al.* Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance [J]. *Cell Metab*, 2007, 5(3): 167–179
- Zhao L, Spassieva S, Gable K, *et al.* Elevation of 20-carbon long chain bases due to a mutation in serine palmitoyltransferase small subunit b results in neurodegeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(42): 12962–12967
- Grosch S, Schiffmann S, Geisslinger G. Chain length-specific properties of ceramides [J]. *Prog Lipid Res*, 2012, 51(1): 50–62
- Cinar R, Godlewski G, Liu J, *et al.* Hepatic cannabinoid-1 receptors mediate diet-induced insulin resistance by increasing de novo synthesis of long-chain ceramides [J]. *Hepatology*, 2014, 59(1): 143–153
- Mullen TD, Spassieva S, Jenkins RW, *et al.* Selective knockdown of ceramide synthases reveals complex interregulation of sphingolipid metabolism [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(1): 68–77
- Ginkel C, Hartmann D, Vom Dorp K, *et al.* Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50): 41888–41902
- Weir JM, Wong G, Barlow CK, *et al.* Plasma lipid profiling in a large population-based cohort [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(10): 2898–2908
- Mamtani M, Meikle PJ, Kulkarni H, *et al.* Plasma dihydroceramide species associate with waist circumference in Mexican American families [J]. *Obesity*: Silver Spring, 2014, 22(3): 950–956

(收稿日期:2017-05-16)

(修回日期:2017-05-27)

(接第 15 页)

- Wang H, Zhang T, Sun W, *et al.* Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6): e2247
- Wang G, Zhang T, Sun W, *et al.* Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma [J]. *Free Rad Biol Med*, 2017, 106: 24–37

- 李志良, 杨操. Notch 信号通路在骨肉瘤中的研究进展 [J]. *中国骨与关节外科*, 2013, 5: 461–464
- Cao Y, Yu L, Dai G, *et al.* Cinobufagin induces apoptosis of osteosarcoma cells through inactivation of Notch signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 794: 77–84
- Li Y, Zhang J, Ma D, *et al.* Curcumin inhibits proliferation and invasion of osteosarcoma cells through inactivation of Notch-1 signaling [J]. *FEBS J*, 2012, 279(12): 2247–2259

(收稿日期:2017-05-12)

(修回日期:2017-05-31)