

榄香烯诱导肿瘤细胞凋亡分子机制研究进展

余佳文*,程斌*(浙江省肿瘤医院药剂科,杭州 310022)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3348-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.27

摘要 目的:了解近年来榄香烯在诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制研究中取得的进展。方法:以“榄香烯”和“细胞凋亡”为关键词,检索中国知网与PubMed数据库,查阅所有关于榄香烯诱导肿瘤细胞凋亡的基础研究文献。结果:榄香烯诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制主要包括降低Bcl-2与增强Bax的表达;上调天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶Caspase的水平,抑制真核细胞翻译起始因子,下调血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子;降低Survivin与低氧诱导因子1 α ;促使溶酶体破裂释放组织蛋白酶;增强程序性细胞凋亡因子5基因表达;下调转录因子ELK1的磷酸化水平等。结论:榄香烯可通过多途径诱导肿瘤细胞凋亡,从而达到抗肿瘤或辅助治疗的目的。

关键词 榄香烯;细胞凋亡;研究进展

榄香烯(Elemene)由我国自行开发研制,于1994年作为国家二类非细胞毒类抗肿瘤药上市。它是从姜科植物温郁金(莪术)中提取的以 β -榄香烯(化学名为1-甲基-1-乙炔基-2,4-二异丙基环己烷)为主要成分的萜烯类化合物。榄香烯不但具有直接的抗肿瘤作用,而且还有免疫保护作用、与放疗协同作用,可缓解癌性疼痛、升高白细胞和抑制血小板聚集等。榄香烯注射液具有广谱、高效、低毒且能通过血脑屏障等特点,因此目前广泛应用于恶性胸腹腔积液、多种实体瘤及脑转移癌等的治疗^[1]。关于榄香烯作用机制的研究结果表明,其抗肿瘤作用主要是通过直接抑杀肿瘤细胞、诱导肿瘤细胞凋亡和分化、抑制肿瘤血管生成、逆转多药耐药等途径实现的^[2]。其中,诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制是现今研究的热点之一。为此,笔者以“榄香烯”和“细胞凋亡”为关键词,检索了中国知网(CNKI)与PubMed数据库,查阅了所有关于榄香烯诱导肿瘤细胞凋亡的基础研究文献,现综述如下。

1 榄香烯诱导肿瘤细胞凋亡的途径

1.1 Bcl蛋白家族

细胞凋亡受基因调控,是细胞主动参与其自身有序的生理性死亡的过程。抗肿瘤药的治疗效果,依赖于凋亡调控基因诱导肿瘤细胞凋亡的能力。有研究显示,Bcl-2家族存在一个复杂的调控网络来控制凋亡和肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[3]。该家族的成员可分为两大类,包括抗凋亡的成员如Bcl-2、Bcl-X(L)和促进凋亡的成员如Bax、Bak等。这些Bcl-2家族蛋白通过二聚体网络的形式相互作用,不同二聚体间的精细平衡决定了细胞是继续存活还是凋亡。一般认为,无论在生理还是病理状态下的细胞凋亡,Bcl-2原位癌基因都是关键的调控因素。Li QQ等^[4]研究榄香烯在人卵巢癌细胞中对顺铂诱导的细胞凋亡的作用时发现,其对卵巢癌细胞A2780/CP和MCAS的促凋亡作用呈时间与剂量依赖性,榄香烯联合顺铂可明显降低Bcl-2和Bcl-X(L),同时增强促凋亡蛋白Bax的表达。Li QQ等^[5]还研究了榄香烯对人脑癌细胞株A172、CCF-STTG1和U-87MG的促细胞凋亡作用,通过Annexin V法同样提示榄香烯可提高早期与晚期细胞凋亡率,且在应用榄

香烯24~72 h时最为显著,并下调Bcl-2、Bcl-X(L)和上调Bax的表达。

1.2 Caspase家族

细胞凋亡的途径主要有两条,一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶Caspase,一条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活Caspase。这些活化的Caspase可将细胞内的重要蛋白降解,引起细胞凋亡。Caspase即天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Cysteine specific protease),曾被归为ICE/ced23家族,属于半胱氨酸蛋白酶,具有严格的底物特异性,能促进细胞凋亡和辅助促炎症功能,是一类在细胞凋亡中起关键作用的蛋白酶家族,其中Caspase-3最为关键。Caspase-3又是真核细胞翻译起始因子(eIF)的裂解酶^[6],其亚基eIF4E在蛋白质合成的起始阶段起着重要的调控作用,当eIF4E过度表达,一些重要的细胞生长调节因子如血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)将随之上调,从而促使肿瘤血管生成。Lei T等^[7]研究榄香烯在体内与体外对于喉癌的作用时发现,榄香烯在体外对喉癌细胞的抑制作用具有浓度与时间依赖性,榄香烯单药对细胞凋亡早期作用明显,而当其与顺铂联用时对细胞凋亡的作用更广泛;应用榄香烯12 h后肿瘤细胞中Caspase-3的浓度达到峰值,eIF4E、VEGF、bFGF mRNA与蛋白均显著降低,提示榄香烯通过上调Caspase水平、抑制eIF、下调VEGF和bFGF达到抑制肿瘤细胞增殖促使其凋亡的目的。

1.3 Survivin/HIF-1 α

近年来,新发现一类细胞抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)广泛存在于许多物种中。Survivin作为IAP家族中的重要成员,是一种活性很强的凋亡抑制蛋白,在细胞增殖与凋亡的联系上起着关键作用^[8]。Survivin在肿瘤细胞中表达更高,研究证实,其在细胞分裂G₂/M期可达峰值,可通过抑制微管蛋白聚集抑制细胞凋亡^[9]。Survivin又与低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)的表达有关,HIF-1 α 可通过与Survivin启动子结合从而起到调节其转录的目的^[10]。此外,Survivin及HIF-1 α 与放疗敏感性也密切相关,放疗后Survivin及HIF-1 α 的水平可显著提高,这也是引起人体对放疗敏感性降低的原因之一^[11]。Li GQ等^[12]研究了榄香烯对肺腺癌A549细胞株中Survivin及HIF-1 α 的表达的影响。结果显示,榄香烯无论单药或与放疗联合应用均可显著降低Survivin及HIF-1 α 的水平,最佳剂量为45 mg/kg。提

* 硕士研究生。研究方向:肿瘤相关临床药理学、药理学。电话:0571-88122120。E-mail:284694093@qq.com

通信作者:副主任医师。研究方向:临床药理学。电话:0571-88122202

示榄香烯单药可通过下调 Survivin 及 HIF-1 α 抑制肿瘤细胞凋亡,其增强放疗敏感性的机制也通过该途径实现。榄香烯对胶质瘤细胞的 Survivin 也有显著的下调作用,且 Zhang H 等^[13]的研究还证实榄香烯可破坏 Survivin 与 HBXIP(Caspase-9 活性调节剂)的联系,从而促进 Caspase-9 的表达。

1.4 “溶酶体-线粒体”通路

溶酶体在物质循环中起着重要作用,一旦溶酶体膜的完整性受到损害,溶酶体中的酶如组织蛋白酶 D 等释放入胞浆中,将通过水解生物大分子导致细胞死亡。近年来的研究^[14-15]表明,溶酶体膜通透化(LMP)可能发生在细胞凋亡早期,并且 LMP 也可能与线粒体功能障碍密切相关。Li LG 等^[16]通过研究榄香烯对肺癌 A549 细胞中 LMP 的影响时发现,应用榄香烯 20 $\mu\text{g/ml}$, 12 h 后出现溶酶体膜破裂,组织蛋白酶 D 显著升高,24 h 后细胞内线粒体膜电位降低、氧自由基(ROS)升高、谷胱甘肽(GSH)下降,发生 DNA 损伤;应用榄香烯 10~20 $\mu\text{g/ml}$, 36 h 后细胞凋亡。由此提示,榄香烯诱导细胞凋亡可通过“溶酶体-线粒体”通路,除释放组织蛋白酶外,还可引起细胞氧化损伤、DNA 破坏等。

1.5 程序性细胞凋亡因子 5(PDCD5)的表达

PDCD5 基因是在我国从白血病细胞株 TF-1 细胞中克隆得到并经证实的一个重要的凋亡正调控基因^[17]。Li H 等^[18]研究发现,PDCD5 在促细胞凋亡中的作用主要通过激活线粒体相关的凋亡通路,一方面激活 Caspase-3、Caspase-9;另一方面下调 Bcl-2/Bax 的比值。吉庆明^[19]在榄香烯对白血病 K562 细胞中凋亡相关基因 PDCD5 表达的影响的研究中发现,以榄香烯 40、60、80 mg/L 3 个不同浓度分别作用于细胞 12、24、48 h 后,对 K562 细胞中 PDCD5 蛋白表达具有上调作用,以 80 mg/L 榄香烯作用 48 h 后上调效应最明显。与空白对照组、培养液 DMEM 对照组两两比较,结果差异均有统计学意义($P < 0.05$)。由此提示,榄香烯可通过上调与细胞凋亡相关的 PDCD5 基因达到抗肿瘤作用,但具体的信号传导路径仍未明确。

1.6 转录因子 ELK1

转录因子 ELK1 属于 ETS 癌基因家族成员,当外界刺激 MARK 信号通路,将 ELK1 磷酸化后形成三元复合物,促进了 c-fos 原癌基因的表达,导致细胞的恶性增殖^[20]。陈小军等^[21]采用双荧光素酶报告系统、Western blot 等方法研究榄香烯乳对人宫颈癌 Hela 细胞转录因子 ELK1 及其靶基因的影响,结果发现人宫颈癌 Hela 细胞经 IC₅₀ 浓度的榄香烯乳处理 24 h 后,与对照组比较,荧光素酶活性下降,磷酸化的 ELK1 及其靶基因 c-fos 的表达均下调。由此提示,榄香烯抑制人宫颈癌 Hela 细胞生长的机制之一是下调了转录因子 ELK1 的磷酸化水平及其靶基因 c-fos 的表达。

2 展望

从分子水平来讲,肿瘤的产生是一系列信号分子之间相互作用的结果。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,这一系列生物事件均伴有多种分子、信号途径之间的相互促进或相互抑制。迄今为止的研究^[22]已表明,榄香烯注射液对于多种肿瘤细胞均有显著的抑杀作用,榄香烯诱导肿瘤细胞凋亡分子机制的研究也取得了一定进展,随着研究的深入将不断出现新的研究热点。从总体上看,既往对于榄香烯注射液抗肿瘤作用的靶点和机制的研究还比较肤浅,有的还缺乏说服力,有的还需要作进一步核实。因此,需要大力加强,特别提倡采用现代生物学高新

技术去作进一步深入研究,为榄香烯的临床应用开辟更加广阔的前景。

参考文献

- [1] Tan G, Wang ZY, Wang XG, *et al.* Immunotherapeutic effects of beta-elemene combined with interleukin-23 gene-modified dendritic cellonmurine pancreatic carcinoma [J]. *Ai Zheng*, 2006, 25(11):1 082.
- [2] 汤秀红,秦叔逵,谢恬,等.榄香烯注射液抗肿瘤作用基础研究现状和进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(3): 266.
- [3] Poljicanin A, Vukusic Pusic T, Vukojevic K, *et al.* The expression patterns of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human fetal and adult ovary[J]. *Acta Histochem*, 2013, 115(12):173.
- [4] Li QQ, Lee RX, Liang H, *et al.* Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by β -elemene in resistant human ovarian cancer cells[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1):424.
- [5] Li QQ, Lee RX, Liang H, *et al.* Anticancer activity of β -elemene and its synthetic analogs in human malignant brain tumor cells[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(1):65.
- [6] Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, *et al.* Morley SJ (2000) translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells[J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7(7):603.
- [7] Lei T, Zhou L, Zheng LY, *et al.* Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 58(1):24.
- [8] Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, *et al.* Apoptosis target of cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7):2 024.
- [9] Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms[J]. *Biochemistry*, 2010, 430(2):199.
- [10] Chen YQ, Zhao CL, Li W, *et al.* Effect of hypoxia-inducible factor-1 α on transcription of survivin in non-small cell lung cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 26(2):28.
- [11] Konduri S, Colon J, Baker CH, *et al.* Tolfenamic acid enhances pancreatic cancer cell and tumor response to radiation therapy by inhibiting survivin protein expression[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(3):533.
- [12] Li GQ, Xie BB, Li XL, *et al.* Down-Regulation of survivin and hypoxia-inducible factor-1 α by β -elemene enhances the radiosensitivity of lung adenocarcinoma xenograft[J]. *Cancer Biother Radiopharmaceu*, 2012, 27(1):56.
- [13] Zhang H, Xu F, Xie T, *et al.* β -elemene induces glioma cell apoptosis by downregulating survivin and its interaction with hepatitis B X-interacting protein[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6):2 083.
- [14] Li Z, Berk M, McIntyre TM, *et al.* The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2008, 47(5):1 495.
- [15] Kirkegaard T, Jaattelä M. Lysosomal involvement in cell death and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1 793

藏药固体制剂生产存在的共性技术难题与对策[△]

旺多^{1*},赵永强¹,赖先荣^{2#}(1.西藏自治区藏药厂,拉萨 850000;2.成都中医药大学,成都 611137)

中图分类号 R29;R291 文献标志码 C 文章编号 1001-0408(2013)35-3350-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.28

摘要 目的:研究藏药固体制剂生产存在的共性技术难题并提出对策。方法:回顾我国药品监督管理机构公开发布的药品质量公告,对藏药固体制剂产生质量问题的生产环节因素进行分析,从生产适应性角度提出解决共性技术难题的措施。结果:丸剂是藏药固体制剂的最主要的制剂剂型,在2004—2012年16个省级药品监督机构公开发布的药品质量公告中,共有83批次不合格藏药丸剂品种,与生产环节直接相关的质量问题主要有重量差异(38个批次,占45.78%)、水分(28个批次,占33.73%)、溶散时限(20个批次,占24.10%)、性状(11个批次,13.25%)、微生物限度(11个批次,占12.25%)。结论:从与藏药丸剂质量问题相关的关键检验项目出发,提出了加强制丸、干燥、灭菌等环节关键设备与技术方法的生产适应性研究思路与解决措施。

关键词 藏药;丸剂;共性技术难题;生产适应性;质量合格率

Common Technical Problems and Countermeasures for the Production of Tibetan Medicine Solid Preparation

WANG Duo¹, ZHAO Yong-qiang¹, LAI Xian-rong²(1.Tibetan Medicine Factory of Tibet Autonomous Region, Lasa 850000, China; 2.Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To analyze the common technical problems of Tibetan medicine solid preparations, and to propose countermeasures. **METHODS:** By retrospectively analyzing Drug Quality Bulletin issued by drug administration, the quality problems of Tibetan medicine solid preparations in production processes were analyzed, and the countermeasures to solve the common technical problem were proposed in the view of productive adaptability. **RESULTS:** Pills was main dosage form of Tibetan medicine solid preparations. Among Drug Quality Bulletin issued by drug administration of 16 provinces during 2004-2012, 83 batches of Tibetan medicine pills were unqualified varieties. The quality problems included the differences of weight (38 batches, accounting for 45.78%), the moisture content (28 batches, accounting for 33.73%), the disintegration time (20 batches, accounting for 24.10%), the character identification (11 batches, 13.25%), microbial limit (11 batches, accounting for 12.25%). **CONCLUSIONS:** From critical test items of the quality of Tibetan medicine pills, Productive adaptability idea and countermeasures of the key equipment and technologies were put forward in the production of pill preparation, drying and sterilization.

KEY WORDS Tibetan medicine; Pills; Common technical problem; Productive adaptability; Passing rate of quality

(4):746.

- [16] Li LG, Zhong LF, Jiang LP, *et al.* Lysosomal membrane permeabilization contributes to elemene emulsion-induced apoptosis in A549 cells[J]. *Free Radical Res*, 2011, 45(10):1 232.
- [17] Gao X, Zuo JH, Wang LF, *et al.* Expression of programmed cell death 5 and apoptosis during atrophy of the parotid gland cells[J]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*,

2012, 47(11):694.

- [18] Li H, Zhang X, Song X, *et al.* PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(9):822.
- [19] 吉庆明. 榄香烯对白血病K562细胞中凋亡相关基因PDCD5表达的影响[J]. *中国医药指南*, 2008, 6(3):16.
- [20] Dittmer J. The biology of the Ets1 proto-oncogene[J]. *Mol Cancer*, 2003, 2(8):29.
- [21] 陈小军, 顾立刚, 李佩文, 等. 榄香烯乳对人宫颈癌Hela细胞转录因子ELK1及其靶基因的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2008, 15(1):26.
- [22] 王茜莎, 杨威, 李明, 等. δ -榄香烯体内外抗肿瘤作用研究[J]. *中国药房*, 2009, 20(9):650.

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173360);四川省高校科研创新团队建设计划项目(No.11TD004);四川省科技厅科技支撑计划项目(No.2011SZ0298);成都中医药大学藏药学专业综合改革项目(No.2012-专业-13)

* 主管药师。研究方向:藏药制剂生产管理。电话:0891-6813363。E-mail:vegf@qq.com

通信作者:副研究员。研究方向:民族药创新研发。电话:028-61800160。E-mail:laixianrong@163.net

(收稿日期:2013-03-14 修回日期:2013-06-19)