

- clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(21):14717-14727.
- [19] Mitchell RS, Chaudhuri R, Lindwasser OW, et al. Competition model for up-regulation of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain by human immunodeficiency virus type 1 Nef[J]. *J Virol*, 2008, 82(16):7756-7767.
- [20] Schindler M, Wurfl S, Benaroch P, et al. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles[J]. *J Virol*, 2003, 77(19):10548-10556.
- [21] Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugaet M, et al. HIV-1NefR impairs MHC class II antigen presentation and surface expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(21):12144-12149.
- [22] 李杰, 吴南屏. HIV-1NefR 下调 MHC-1 分子的研究进展 [J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2009, 36(4):255-258.
- [23] Pizzato M, Popova E, Gottlinger HG. Nef can enhance the infectivity of receptor-pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 particles [J]. *J Virol*, 2008, 82(21):10811-10819.
- [24] Zheng YH, Plemenitas A, Linnemann T, et al. Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(11):875-879.
- [25] Pizzato M, Helander A, Popova E, et al. Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 Infectivity by Nef [J]. *Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(16):6812-6817.
- [26] Bergonzini V, Calistri A, Salata C. Nef and cell signaling transduction: a possible involvement in the pathogenesis of human immunodeficiency virus-associated dementia [J]. *J Neurovirol*, 2009, 15(3):238-248.
- [27] Gerlach H, Laumann V, Martens S. HIV-1NefR membrane association depends on charge, curvature, composition and sequence [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(1):46-53.
- [28] Saksela K. HIV-1NefR and host cell protein kinases [J]. *Front Biosci*, 1997, 2(5):606-618.
- [29] Stevenson M. HIV-1 pathogenesis [J]. *Nat Med*, 2003, 9(7):853-860.
- [30] Renkema GH, Manninen A, Mann DA, et al. Identification of the Nef-associated kinase as P21-activated kinase 2 [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(23):1407-1410.
- [31] Balog K, Minarovits J. Nef: a pleiotropic modulator of primate lentivirus infectivity and pathogenesis [J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2006, 53(1):51-57.
- [32] Hoffman D, Seebach J, Cosma A, et al. Therapeutic vaccination reduces HIV sequence variability [J]. *Faseb J*, 2008, 22(2):437-444.
- [33] Erfle V, Goebel FD, Guzman CA, et al. Vaccines based on Nef and on Nef/Delta V2 Env [J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(14):1400-1404.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-05-18)

泛素化在人表皮生长因子受体降解中的研究进展

李 焘¹综述, 刘朝奇², 王雄伟¹审校

(三峡大学:1. 神经病学研究所;2. 分子生物研究所, 湖北宜昌 443003)

关键词:泛素化; 人类表皮生长因子受体; 内吞作用; 泛素-蛋白酶系统

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.04.036

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)04-0395-04

人类表皮生长因子受体(EGFR)是原癌基因 c-erbB-1 的表达产物,其编码的蛋白质属 I 型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体,由 3 部分组成:胞外区、跨膜区和膜内区,包括 EGFR、C-erbB-2、C-erbB-3、C-erbB-4 4 个成员,EGFR 与配体结合而激活后,胞内区的酪氨酸残基自磷酸化转为活性形式,诱发下游信号传导途径(如 PLC- γ 、Ras、PI3K、JAK2),引起级联反应,促进肿瘤的发生、增殖、转移、化疗抵抗。泛素化介导的 EGFR 降解是下调其活化的一个常见机制^[1]。本文对泛素化在 EGFR 降解中的研究进展综述如下。

1 泛素-蛋白酶系统(UPS)

UPS 是真核生物中必不可少的结构,它可以控制包括蛋白酶在内的多种蛋白。泛素是小分子多肽,可以通过 ATP 依赖途径激活,泛素与基质蛋白的结合需要 3 个酶的参与:Ub 活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)。E1 主要活化 Ub, E2 与活化的 Ub 作用后通过 E3 连接酶与酶作用物结合,进而促使了酶作用物的泛素化, E3 连接酶 HECT 结构域和 RING 结构域 2 个独特的类型。具有 HECT 的 E3 连接酶与 Ub 结合形成硫酯键,进而将 E3 连接酶直接转移到酶作用

物,具有 RING 结构域的 E3 连接酶不与 Ub 结合形成硫酯键,它主要是作为适配器来促使 E2 结合酶与酶作用物结合,进而促使泛素与酶作用物的结合^[2]。c-Cbl 是一个新发现的 E3 泛素连接酶,可以通过指环结构域与 E2 泛素结合酶结合,导致底物泛素化和降解。

表皮细胞生长因子(EGF)与受体结合,磷酸化的 c-Cbl 补充到细胞膜表面,并通过 TKB 与活化的 EGFR 的 Y1045 结合,随后共定位于核内体和多泡小体中, E2 泛素结合酶 Ubc4/5 与细胞膜上的 c-Cbl 协同作用,随后进入 Hrs 阳性核内体,提示 EGFR 在内化后被泛素化^[3]。Frey 等^[4]发现,EGFR 的泛素化需要 EGFR 激酶的活化和 Y1045 位点的磷酸化,此外,活化的 P38 也参与了此过程。在人胶质母细胞瘤结构性激活的 EGFRv III 中, Y1045 的突变抑制了 Cbl-b 介导的 EGFRv III 的泛素化和信号下调,因此加强了 EGFRv III 对细胞的转换能力^[5]。

Huang 等^[6]通过质谱分析法发现,EGF 介导了 EGFR 激酶域中亮氨酸富集序列的泛素化,亮氨酸残基在激酶域的突变可以阻止 EGFR 的泛素化和降解, Y1045 的突变可以很大程

度的减少但不能消除这些残基的泛素化,可能与 E3 连接酶或者非 Y1045 依赖性的 c-Cbl 的补充相关。Grb2 可以与磷酸化的 Y1068 或者活化的 EGFR 的 Y1068 直接结合,进而通过 SH3 域与 Cbl 结合,补充 Cbl 到 EGFR。Shc 是具有 Grb2 的复合物,可以与 EGFR 中磷酸化的 Y1148 和 Y1173 相结合,Cbl 也可能直接通过与 Shc 补充到 EGFR^[7]。

磷酸化的 EGFR 能够被下游通路中的 PKC 所抑制,PKC 介导的 T654 位点的磷酸化抑制了 EGFR 的磷酸化、泛素化及降解,使内在化的 EGFR 循环回到细胞膜^[8]。RALT 与 EGFR 的结合可以抑制 EGFR 活性的下调,而跨膜蛋白 LRIG1 与 EGFR 和 c-Cbl 结合、ACK1 与活化的 EGFR 的相互作用均可以促进 EGFR 活性的下调^[7,9]。

EGF 还可以激活 EGFR 的类泛素化修饰,进而加强随后的泛素化和挑选 EGFR 进行降解,EGFR 的类泛素化修饰与泛素化相互协调,加速了受体降解前的挑选^[10]。此外,网格蛋白依赖性和脂筏依赖性内吞作用也参与了 EGFR 分子的泛素化,EGFR 可以通过网格蛋白依赖性内吞作用内在化,然后循环回到细胞表面,与此相反,EGFR 通过脂筏依赖性内吞作用内在化后优先进行降解^[11]。

2 Cbl 对 EGFR 的调节

Cbl 家族中其他两个成员 Cbl-b 和 Cbl-3 也参与促进 EGFR 降解,活化的 EGFR 不仅可以降低 Cbl-b 及其酶作用物 Shc 和 Grb2 的降解,促进了 Shc 和 Grb2 相互作用,还增强了 Shc 和 Grb2 在细胞膜的补充。目前研究认为,有 3 个蛋白质(Nedd4、Itch 及 HECTE3 连接酶的 WW 域)参与了早期的内吞作用的调节,它们可以与 Cbl-b 结合并促进其在蛋白酶体中的降解,Nedd4 可以与 Cbl-b 结合并促进其在蛋白酶体中的降解,翻转 Cbl-b 对 EGFR 的泛素化和降解作用,并可以激活 c-Src,因此提供了另一个对 Cbl 酶作用物的直接调节的机制^[12]。

v-Cbl 和 70Z-Cbl 是 c-Cbl 的两个指环结构缺陷的致癌突变体。v-Cbl 是具有 355 个氨基酸的蛋白质,70Z-Cbl 是缺乏 17 个内在氨基酸的突变体,并且这 17 个内在氨基酸与指环结构存在部分重叠,指环域的突变可以导致 E3 连接酶的活性消失,但仍然不足以引起细胞的恶性转化,与此相反,与 SH2 和指环结构连接的高度保守的 α 螺旋结构的突变促使了 Cbl 蛋白的致癌作用,这可能是通过破坏 Cbl 和 Ubc 的 TKB 域导致 EGFR 的泛素化和下调功能的缺失。Baldys 等^[13]发现,c-Cbl 促进双调蛋白介导的 EGFR 循环回细胞膜,并介导了 ERK1/2MAPK 的磷酸化激活。此外,c-Cbl 还可以通过上调 MMP2 的水平增加胶质瘤细胞的侵袭性^[14]。

3 泛素化与早期内吞作用

SH2 结构域和指环结构在 EGFR 泛素化中扮演重要角色,c-Cbl 具有聚脯氨酸结构的 C 端与 CIN85(85 \times 10³ 长度的 c-Cbl 相互作用蛋白)N 端的 SH3 域结合,可以补充 CIN85-内吞蛋白复合物到活化的 EGFR,内吞蛋白通过 SH3 域与 CIN85 结合,在早期的内吞作用中调节细胞膜的内陷,c-Cbl 与 Sprouty2 的相互作用可以对 EGFR 进行调整,Sprouty2 与 CIN85 和 c-Cbl 构成了一个三位复合物,阻止 CIN85 介导的 c-Cbl 的聚集及 CIN85 对 EGFR 泛素化的阻断。Feng 等^[15]研究发现,Sprouty2 通过与 c-Cbl 共同作用增加 EGFR 的整体水平及磷酸化水平,进而降低大肠癌细胞对 EGFR 靶点药物 gefitinib 的敏感性。同样, β -Pix 的 SH3 域与 Cdc42 形成复合物,然后和 CIN85 一起与 c-Cbl 的脯氨酸富集区结合,进而抑制 c-Cbl 对 EGFR 负性调节功能,反之,c-Cbl 促进 β -Pix 的泛素化及降解^[16-17],此外,与 CIN85 相互作用的凋亡关联蛋白

ALG-2 相关蛋白 X(Alix)和具有 UBA 和 SH3 结构的 T 细胞 Ub 配体(TULA)通过与 CIN85 或者 c-Cbl 结合抑制 EGFR 泛素化^[18]。Wakasaki 等^[19]发现,CIN85 可以促进 TGF- α 介导的 RAS 及下游通路的激活,进而促进 HNSCC 肿瘤细胞的增殖,而不影响 EGFR 的磷酸化水平。

Hrs 和信号转换衔接分子(STAM)是 EGFR 内吞作用的调节因子,具有 UIM 域,Hrs 与 STAM 共同作用并共同定位于早期核内体膜表面。Hrs-STAM 复合物可以通过识别活化的 EGFR 的 Ub 挑选受体,并促使挑选的受体从早期的核内体进入多泡小体中(MVB)。EGF 激活作用上调后,Hrs 的 Y329 和 Y334 位点以 Cbl E3 连接酶依赖性的方式出现磷酸化,促进 Hrs 和 EGFR 的降解,Hrs 或者 STAM 的删除或者缺陷的哺乳动物细胞抑制 EGFR 的降解^[18]。去泛素化酶 USP8 与 Hrs 的作用相反,可以通过与 STAM 结合而减慢去泛素化过程,使得 EGFR 的降解减少^[20],而机体维持 Hrs 与 USP8 平衡的机制尚不清楚,可能与肿瘤细胞所处的微环境有关。

4 泛素化与晚期内吞作用

目前仍不完全清楚机体是通过何种机制精确调节 EGFR 的降解而不是回到细胞膜,研究认为泛素与转运必需内吞体分选复合物(ESCRT)的相互作用在 MVB 的挑选过程中发挥重要作用。

在酵母菌中,ESCRT-I 基因由 Vps23、Vps 28 及 Vps37 组成,Vps23 是哺乳动物易感基因 Tsg101 的同源体,ESCRT-I 编码产生一段 350 \times 10³ 长的保守蛋白复合物,可以短暂地从胞浆补充到核内体膜上^[1],ESCRT-II 是由 Vps22、Vps25 以及 Vps36 组成的复合物,编码产生 155 \times 10³ 的蛋白,ESCRT-III 是由 2 个功能性子复合物构成:一个由 Snf7/CHMP4a 和 Vps20/CHMP6 构成的近膜子复合物,另一个由 Vps2/CHMP2a 和 Vps24//CHMP3 构成的外围关联子复合物,ESCRT-III 易位到核内体的过程依赖于 ESCRT-II 的参与^[21]。

泛素化的 EGFR 被挑选进入 MVB 首先由 HRS(Hrs 蛋白调控酪氨酸激酶 ESCRT-0)触发,HRS 可以通过串联泛素结合模体(UIM)与泛素化的 EGFR 结合,进而通过 FYVE 域与 3 磷酸磷脂酰肌醇结合后定位到核内体膜。随后 HRS 通过 PSAP 序列域召集 ESCRT-1 到核内体膜上的着锚点,ESCRT-I 可以通过其组件中的 TSG101 中的 UEV 域识别泛素化的 EGFR,ESCRT-II 可以通过其 Vps36 的 Np14 锌指结构(NZF)识别泛素化的 EGFR,EGFR 随后通过 ESCRT-III 复合物聚集,泛素则通过去泛素化酶 DOA4 移除,聚集的 EGFR 被挑选进入 MVB 的囊泡中,ESCRT 复合物通过 ATP 酶相关活性蛋白 Vps4 分离出来^[22-23]。包括 HIV 在内的多种病毒具有泛素化的 GAG 蛋白,可以与 TSG101 结合,进而补充 ESCRT 到细胞膜表面,以及在 MVB 中通过同样的方式引起病毒颗粒的出胞作用^[24-25]。此外,AMSH、AMSH 结构样蛋白及其他的泛素分解酶(DUB)比如泛素特异蛋白酶 8(DOA4 的直系同源体),能够在泛素化的 EGFR 进入 MVB 之前将 Ub 残基分离,从而促使 Ub 循环回到细胞质^[18,26]。目前仍不清楚 DUB 在内吞作用中不同阶段协同 EGFR 去泛素化的机制。

5 ErbB2、ErbB3、ErbB4 与泛素化的关系

ErbB2 的高表达与肿瘤的预后不良呈正相关。EGF、神经调节蛋白和 ErbB2 特异性抑制性抗体都可以介导 ErbB2 的泛素化和降解,这些抗体与 ErbB2 结合后补充 c-Cbl 到 ErbB2 的 Y1112 位。Y1112 的突变可以阻碍抗体介导的 ErbB2 的降解^[27]。c-Cbl 参与配体介导的 EGFR 家族蛋白的降解,这个过程需要 EGFR 蛋白的 C 端激酶活化和酪氨酸磷酸化,在配体

依赖性机制中,只有受体所在部位的细胞膜被作为靶点,而 ErbB2 烷基化主要作用在位于 EGFR 核酸连接部位的半胱氨酸残基^[18]。ErbB2 和 Hsp90 抑制剂可以调节 UPS 介导的早期的和成熟的 ErbB2 的降解,E3 连接酶和 CHIP 也有可能参与调节这个过程^[28]。此外,具有指环结构域的 Nrdp1 可以激活 ErbB3 的泛素化和降解,Itch 的过度表达可以通过 WW 域与 ErbB4 受体结合,进而促进其聚泛素化和降解,但是不能与 EGFR、ErbB-2 及 ErbB-3 作用^[18]。

6 展 望

EGFR 的过度表达与肿瘤的发生、侵袭性、耐药性及放疗耐受相关,泛素化介导的 EGFR 降解是下调其活化的一个常见机制,泛素介导 EGFR 在细胞内的降解机制尚不完全清楚,相信这些问题的解决将有利于理解泛素化与 EGFR 相关性肿瘤发生发展中的关系,进而解释泛素化在肿瘤研究中的前景。

参考文献:

- [1] Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(12): 893-905.
- [2] Sun Y. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(6): 623-629.
- [3] Umebayashi K, Stenmark H, Yoshimori T. Ubc4/5 and c-Cbl continue to ubiquitinate EGF receptor after internalization to facilitate polyubiquitination and degradation[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(8): 3454-3462.
- [4] Frey MR, Dise RS, Edelblum KL, et al. p38 kinase regulates epidermal growth factor receptor downregulation and cellular migration[J]. *EMBO J*, 2006, 25(24): 5683-5692.
- [5] Davies GC, Ryan PE, Rahman L, et al. EGFRvIII undergoes activation-dependent downregulation mediated by the Cbl proteins[J]. *Oncogene*, 2006, 25(49): 6497-6509.
- [6] Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, et al. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain [J]. *Mol Cell*, 2006, 21(6): 737-748.
- [7] Swaminathan G, Tsygankov AY. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 209(1): 21-43.
- [8] Thiel KW, Carpenter G. Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49): 19238-19243.
- [9] Shen F, Lin Q, Gu Y, et al. Activated Cdc42-associated kinase 1 is a component of EGF receptor signaling complex and regulates EGF receptor degradation [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(3): 732-742.
- [10] Oved S, Mosesson Y, Zwang Y, et al. Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(31): 21640-21651.
- [11] Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, et al. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 209-219.
- [12] Balbis A, Parmar A, Wang Y, et al. Compartmentalization of signaling-competent epidermal growth factor receptors in endosomes [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(6): 2944-2954.
- [13] Baldys A, Gööz M, Morinelli TA, et al. Essential role of c-Cbl in amphiregulin-induced recycling and signaling of the endogenous epidermal growth factor receptor [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(7): 1462-1473.
- [14] Lee H, Tsygankov AY. c-Cbl regulates glioma invasion through matrix metalloproteinase 2 [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(5): 1169-1178.
- [15] Feng YH, Tsao CJ, Wu CL, et al. Sprouty2 protein enhances the response to gefitinib through epidermal growth factor receptor in colon cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(9): 2033-2038.
- [16] Swaminathan G, Tsygankov AY. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 209(1): 21-43.
- [17] Schmidt MH, Husnjak K, Szymkiewicz I, et al. Cbl escapes Cdc42-mediated inhibition by downregulation of the adaptor molecule β Pix [J]. *Oncogene*, 2006, 25(21): 3071-3078.
- [18] Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(17): 3093-3106.
- [19] Wakasaki T, Masuda M, Niuro H, et al. A critical role of c-Cbl-interacting protein of 85 kDa in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas through the ras-ERK pathway [J]. *Neoplasia*, 2010, 12(10): 789-796.
- [20] Berlin I, Schwartz H, Nash PD. Regulation of epidermal growth factor receptor ubiquitination and trafficking by the USP8 • STAM complex [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(45): 34909-349021.
- [21] Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, et al. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting [J]. *Dev Cell*, 2002, 3(2): 271-282.
- [22] Hurley JH. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(1): 4-11.
- [23] Williams RL, Urbe S. The emerging shape of the ESCRT machinery [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(5): 355-368.
- [24] Patton GS, Morris SA, Chung W, et al. Identification of domains in gag important for prototypic foamy virus egress [J]. *J Virol*, 2005, 79(10): 6392-6399.
- [25] Luttge BG, Shehu-Xhilaga M, Demirov DG, et al. Molecular Characterization of feline immunodeficiency virus budding [J]. *J Virol*, 2007, 82(5): 2106-2119.
- [26] Kirisits A, Pils D, Krainer M. Epidermal growth factor receptor degradation: an alternative view of oncogenic pathways [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(12): 2173-2182.
- [27] Klapper LN, Waterman H, Sela M, et al. Tumor-inhibito-

ry antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2[J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3384-3388.

c-ErbB2/Neu[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(20): 12847-12852.

[28] Xu W, Marcu M, Yuan X, et al. Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-06-11)

· 综 述 ·

熊果酸抗肿瘤作用及其机制研究进展

刘毅敏, 张定林, 肖 湘, 刘海红 综述, 赵先英[△] 审校

(第三军医大学药学院化学教研室, 重庆 400038)

关键词: 熊果酸; 抗肿瘤; 机制

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2012. 04. 037

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)04-0398-03

熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌索酸、乌苏酸,属五环三萜类化合物,广泛存在于天然植物如枇杷叶、夏枯草、车前草、熊果、女贞子、山楂、白花蛇舌草等中,以游离或与糖结合成苷形式存在。研究表明,熊果酸具有多种药理活性,尤其是抗肿瘤活性,它不仅对多种致癌、促癌物有抵抗作用,而且对多种恶性肿瘤有抑制和细胞毒作用^[1-2]。近年来,熊果酸抗肿瘤活性及其机制研究是其药理活性中最受关注的研究内容。

1 抗肿瘤作用

熊果酸对肺癌具有抗增殖和诱导凋亡的作用^[3-5]。刘茜等^[6]报道,熊果酸能明显抑制体外人肺癌 A549 细胞的生长,并呈时间和浓度依赖。熊果酸作用 24、48 h 后, A549 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,随后细胞呈现典型的凋亡核固缩表现,细胞核呈致密浓染的颗粒状或块状荧光。细胞质检测到活性激活环氧酶(cyclo-oxygenase, Caspase-3)蛋白的表达增强,并呈时间依赖,同时,核因子-κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)表达随时间延长而减弱。研究表明,熊果酸在体外对人肺癌 A549 细胞具有抗增殖和诱导凋亡的作用,其诱导凋亡机制可能是通过抑制 NF-κB 活性,激活 Caspase-3,从而诱导细胞的凋亡。

通过人肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤探讨了熊果酸的体内抗肿瘤作用^[7]。结果显示,熊果酸明显降低移植瘤的生长速度,治疗结束时,瘤质量及瘤体积明显减小,抑瘤率为 51.35%,表明熊果酸可以抑制肺癌移植瘤的生长。并且实验组裸鼠心、肝、肾、肺、脑组织苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色切片显示组织结构正常,未见异常病灶,也未发现裸鼠的其他药物不良反应,表明熊果酸抗肿瘤作用时对机体无明显的毒副作用。还检测了两组移植瘤组织内的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达、微血管密度计数以及癌细胞的凋亡指数,结果表明用熊果酸治疗的裸鼠 VEGF 表达和微血管密度(microvessel density, MVD)均明显降低。提示,熊果酸抗肿瘤机制可能与降低移植瘤促血管生成因子 VEGF 的表达、抑制新生血管的形成和促进肿瘤细胞凋亡有关。

2 抗乳腺癌作用

熊果酸可以抑制乳腺癌细胞增殖并诱导其凋亡^[8]。Her-2 是乳腺癌中一个重要的预后生物学因子, Her-2 过度表达与淋巴结转移、激素受体状态密切相关。SK-BR-3 细胞株是一种过度表达 Her-2/c-erb-2 基因产物的乳腺癌细胞株,研究表明,熊果酸明显抑制 SK-BR-3 细胞的增殖,并呈时间和浓度依赖性。经熊果酸处理后的细胞呈现典型的凋亡核固缩表现,细胞核呈

致密的颗粒状或块状。熊果酸作用 48 h 后, SK-BR-3 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期, DNA 大片段断裂, 说明熊果酸在体外对 SK-BR-3 细胞具有抗增殖和诱导凋亡的作用。

熊果酸有诱导 MCF-7 人乳腺癌细胞的凋亡作用^[9], 其机制涉及到 Bax/Bcl-2 比值升高引起线粒体释放 cytochrome c 所依赖的凋亡调节信号通路。也有研究表明熊果酸诱导 MCF-7 细胞凋亡可能是依赖于细胞内 Ca²⁺ 水平上调^[10]。

3 抗胃癌作用

熊果酸能够抗胃癌细胞增殖和诱导其凋亡。研究显示熊果酸可以抑制人胃癌 SGC-7901 细胞、胃癌 BGC-823 细胞的增殖^[11-13]。对胃癌细胞 BGC-823 增殖的抑制机制可能与下调 Bcl-2 基因和上调 Bax 基因表达、Caspase-3 及 Caspase-8 有关, 而熊果酸抑制 SGC-7901 细胞系的作用与 COX-2 途径有关。COX 是花生四烯酸生物合成前列腺素的限速酶, 包括 COX-1 和 COX-2。其中 COX-2 在正常组织中一般不表达, 但在细胞因子、肿瘤刺激物等诱导下迅速合成, COX-2 的高表达与肿瘤形成、复发、转移和浸润过程密切相关。研究表明, 熊果酸在抑制 SGC-7901 细胞增殖的同时, 可降低细胞的 COX-2 蛋白表达水平。

熊果酸可以导致胃癌细胞 BGC-823、SGC-7901 的凋亡^[11-14]。Mcl-1 与肿瘤的发生密切相关, 在多种肿瘤组织均有过度表达。有学者研究了熊果酸对体外胃癌细胞凋亡相关基因 Mcl-1 表达的影响^[11, 15], 结果显示, 熊果酸导致细胞凋亡的同时, 也能降低胃癌细胞 Mcl-1 基因的表达, 这可能是熊果酸抑制胃癌细胞的重要机制之一。但下调 Mcl-1 水平可增加肿瘤细胞对各种化疗药物的敏感性, 采用反义技术抑制 Mcl-1 基因的表达也可直接促进肿瘤细胞的凋亡^[16-17], 这提示可利用抑制 Mcl-1 基因表达的方法治疗胃癌。

4 抗结肠癌作用

熊果酸对结肠癌有较强的细胞毒和诱导细胞凋亡作用^[18-19]。用熊果酸对人结肠癌 HCT-15、HT-29 细胞进行处理, 结果显示, 细胞周期阻滞于 G₀ 和 G₁ 期, S 期细胞下降, 出现核固缩、碎裂、亚二倍体细胞, 表现出显著的细胞凋亡征象。在 HT-29 细胞凋亡过程中, 凋亡相关基因 Caspase-9 的表达增强, Bcl-2 的表达减弱。提示熊果酸诱导结肠癌 HT-29 细胞凋亡主要与促进 Caspase-9 的活化、下调 Bcl-2 的表达有关, 凋亡是熊果酸杀伤肿瘤细胞的机制之一。研究中还发现, 用 30 μmol/L 熊果酸作用 24 h 后, 检测到 HT-29 细胞碎片, 这一结果表明, 细胞毒性导致的细胞坏死可能也是熊果酸杀伤肿瘤

[△] 通讯作者, Tel: 13618380938.