

中药成分诱导肿瘤细胞自噬的研究进展

刘金坤¹, 应敏², 王琴¹, 吴斌^{1*}

(1. 重庆市中医院, 重庆 400021; 2. 重庆市肿瘤医院, 重庆 400030)

[摘要] 自噬是广泛存在于真核细胞中的一种程序性死亡方式,其通过单层或双层膜包裹自身细胞质蛋白或细胞器形成自噬体,再与溶酶体融合形成自噬溶酶体,最终使被包裹的内容物降解,以实现“自身消化”和细胞器更新的过程。自噬参与细胞诸多生理和病理过程,与肿瘤发生密切相关。正常情况下,自噬可清除细胞内异常的折叠蛋白、细胞器,抑制细胞的应激反应,降低肿瘤的发生率。但在某些肿瘤中,自噬可通过降解肿瘤细胞内变性的蛋白质和细胞器而促进肿瘤细胞的存活。目前越来越多的研究表明,中药有效部位如生物碱、黄酮、皂苷、强心苷等均能够诱导肿瘤细胞的自噬。本文以中药有效部位为基础,结合肿瘤细胞产生自噬的分子机制,对中药诱导肿瘤细胞自噬的研究进展进行综述,以期对中药防治肿瘤提供参考。

[关键词] 中药; 肿瘤细胞; 自噬; 生物碱; 黄酮; 皂苷; 强心苷

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0207-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030207

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1610.040.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 16:10

Mechanisms of Autophagy of Tumour Cells Induced by Traditional Chinese Medicine

LIU Jin-kun¹, YING Min², WANG Qin¹, WU Bin^{1*}

(1. *Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China;*

2. Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

[Abstract] Autophagy is a vital programmed cell death mode widely existing in the eukaryotic cells. During the process, cytoplasmic proteins and organelles are wrapped by single or double-membrane autophagosomes, and then integrated with lysosomes into auto-lysosomes, so as to finally degrade the wrapped content, and achieve self-digestion and organelles renewal. Autophagy gets involved in a wide variety of physiological and pathological processes and closely related to tumorigenesis. Under normal circumstances, autophagy could clear misfolded proteins and organelles, leading to the suppression of stress reaction and downregulation of cancer incidence. However, although autophagy is primarily a protective metabolic pathway for cells, it can also promote tumor viability by degrading abnormal proteins and organelles in cancer cells. In recent years, more and more experimental evidences have indicated that active components of traditional Chinese medicine (TCM), like alkaloids, flavonoids, saponins and cardiac glycosides, could induce autophagy of tumour cells. In this review, based on active components of TCM medicine and molecular mechanisms of autophagy in cancer cells, we summarize the research progress of autophagy induced by TCM, in order to provide reference for the prevention and treatment of tumour with TCM.

[Key words] traditional Chinese medicine; tumour cell; autophagy; alkaloids; flavonoids; saponins; cardiac glycosides

[收稿日期] 20160517(014)

[基金项目] 重庆市科委科技专项 (cstc2015jbky330025011)

[第一作者] 刘金坤, 执业药师, 从事中药药理作用机制研究, Tel:023-67633702, E-mail:liujinkun007@163.com

[通讯作者] * 吴斌, 主任医师, 博士, 从事风湿病免疫、老年病临床与科研工作, E-mail:wuubin@126.com

中药是在中医理论指导下用于预防、诊断、治疗疾病或调节人体机能的药物。多为植物药,也有动物药、矿物药及部分化学、生物制品类药物。中药所含化学成分复杂,含多种有效成分、无效成分,通常有糖类、氨基酸、蛋白质、油脂、蜡、酶、色素、维生素、有机酸、鞣质、无机盐、挥发油、生物碱、苷类等。中药之所以有医疗作用,主要因所含有效成分所致,提取其有效成分并进一步加以分离、纯化,得到有效单体是中药研究领域中的一项重要内容。

近年来越来越多的研究表明,中药有效成分能够诱导肿瘤细胞的自噬,在直接和辅助抗肿瘤方面发挥着独特的作用。中药有效成分如苦参碱, β -榄香烯,麦冬皂苷,姜黄素等均能够诱导肿瘤细胞的自噬,并结合分子生物学技术对有效成分诱导自噬作用机制进行了分析。中药有效成分诱导自噬往往从药理作用机制方面分类阐述,尚未从有效部位分类方面探讨的报道。因此,本文根据细胞自噬分子作用机制、自噬检测方法、中药有效部位分类等方面,对近 5 年国内外中药有效成分调节肿瘤细胞自噬的机制进行综述,从而为阐释中药有效成分的作用特点,中药防治肿瘤提供借鉴。

1 自噬的分子机制及检测

细胞自噬 (autophagy) 是指一些蛋白质和细胞器等胞浆物质被包裹并运进溶酶体降解的过程,广义上包括微自噬 (microautophagy), 分子伴侣介导型自噬 (chaperone-mediated autophagy) 和巨型自噬 (macroautophagy) 3 种类型。微自噬过程中底物因溶酶体膜直接内陷包裹进入溶酶体,而分子伴侣介导型自噬过程中胞质蛋白借助分子伴侣蛋白折叠效应直接跨膜进入溶酶体^[1]。巨型自噬的研究在目前最为深入,即通常所说的“细胞自噬”(自噬)。从酵母到哺乳动物,自噬是一个由自噬体 (autophosome) 介导的保守过程^[2]。自噬被诱导后,首先是亚显微结构改变,细胞内独立膜 (isolation membrane) 或吞饮泡的小囊泡逐渐形成并延伸、包裹胞浆,然后形成双层膜结构的自噬体,最后自噬体外层膜直接通过与内涵体融合或间接与溶酶体融合形成自噬溶酶体,介导被包裹物质连同自噬体内层膜的降解。由自噬降解产生的氨基酸和其他小分子物质重新运回胞浆中被再利用或产能^[2-3]。自噬在肿瘤发生、发展中均扮演着重要角色。其既可以作为一种防御机制保护肿瘤细胞度过不利环境,又可以诱导肿瘤细胞的死亡,发挥着双刃剑的作用^[4-5]。

研究者对肿瘤细胞自噬的分子机制进行了系统

研究,其信号传导途径如下^[6-7],①生长因子与其受体结合,刺激酪氨酸激酶活化 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt serine/threonine kinase 1 (Akt) 和 RAS proto-oncogene GTPase (RAS)。Akt 的磷酸化并抑制了 (tuberous sclerosis 1/2, TSC1/2) 蛋白复合体,并减弱 TSC1/2 对 Ras homolog enriched in brain (Rheb) 的抑制作用,导致 mechanistic target of rapamycin C1 (mTORC1) 和 Rheb 激活,进而通过抑制 unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) 激酶而抑制自噬。②phosphatase and tensin homolog (PTEN) 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,促进细胞自噬。③通过激活 serine/threonine kinase 11 (LKB1) 蛋白,可以使 protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 1 (AMPK) 被磷酸化。AMPK 磷酸化和活化 TSC1/2,导致 mTOR 的失活,从而引起自噬。磷酸化 AMPK 也可直接抑制 mTOR-Raptor 复合物引起 mTOR 的失活。此外,AMPK 活化 ULK1 激酶可诱导自噬。④RAF-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (RAF-1)-mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MEK1/2)-extracellular-signal regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) 的信号通路可以诱导自噬的产生。⑤核内 tumor protein p53 (p53) 激活 DNA damage regulated autophagy modulator 1 (DRAM) 和 sestrin 1-3 (sestrin) 蛋白,通过在转录依赖的方式激活自噬。但细胞质中的 p53 抑制自噬。⑥B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 抗凋亡蛋白家族与 Beclin1 (Beclin1, Beclin1/ATG6) 基因相互作用,抑制自噬。而 Bcl-2 促凋亡蛋白家族可通过干扰抗凋亡蛋白与 Beclin1 基因结合诱导自噬。⑦细胞内 inositol-trisphosphate 3-kinase B (IP3) 通过调控 mTOR 抑制自噬。

目前自噬的检测主要有通过透射电子显微镜观察自噬体、免疫印迹或免疫荧光检测 microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha/beta (LC3-I/LC3-II) 蛋白表达、丹(磺)酰戊二胺 (monodansyl cadaverine, MDC) 染色法等^[8]。通过透射电镜,可发现肿瘤细胞自噬通常具有如下特点,自噬体内含有细胞器、蛋白质和细胞质,部分细胞体积增大,细胞核无明显变化,染色质晚期出现凝聚现象,线粒体、内质网通常会出现膨胀。当哺乳动物细胞发生自噬时,细胞内 LC3-I 向 LC3-II 的转化明显增加。因此,通过检测细胞内 LC3-II 的含量变化,可以方便地判断细胞自噬是被激活还是被抑制^[9-10]。MDC 染色法是自噬发生过程检测自噬体方法^[11]。自噬

体形成依赖的第二个泛素样结合系统 (Atg8) 位于自噬囊泡膜上, 可与 MDC 发生特异性融合, 在荧光显微镜下可以观察判断细胞自噬程度, 但 MDC 法对检测早期自噬并不特异, 只对处于物质降解阶段的晚期自噬有特异性。除此之外, 哺乳动物细胞中的 Beclin1 是 Bcl-2 的一个相互作用蛋白^[12], 亦是正向调节自噬的一个关键因子。结合其他生化指标, 通过免疫印迹方法检测 Beclin1 表达水平, 也可对自噬进行动态检测与判断^[13]。

2 中药诱导肿瘤自噬

2.1 生物碱类诱导肿瘤自噬

生物碱是中药抗肿瘤的主要活性成分, 在植物中常与有机酸结合成盐而存在。ZHANG 等^[14]证实苦参碱诱导肝癌 HepG2 细胞、胃癌 SGC-7901 细胞发生自噬, 苦参碱抑制肿瘤细胞增殖, 阻滞细胞停留在 G₁ 期, 进而激活细胞自噬和凋亡。研究还发现 Beclin1 参与了苦参碱诱导的自噬, 促凋亡机制与其上调 Bax 蛋白表达有关。抑制自噬能够增强苦参碱诱导的细胞凋亡, 提示联合使用自噬抑制剂是进一步提高苦参碱抗肿瘤作用的有效策略^[14-15]。范悦等^[16]发现肝癌 HepG2 细胞经苦参碱处理后, 诱导了自噬泡的产生, 随着苦参碱浓度的增加其自噬泡逐渐增多增大。苦参碱干预后使部分 HepG2 细胞不能顺利进入 S 期进行 DNA 合成, 而是将肝癌 HepG2 细胞阻碍停滞在 G₁ 期, 最后使肝癌细胞的增殖受到了抑制。任莉莉等^[17]研究发现苦参碱呈浓度-时间依赖性抑制乳腺癌 Bcap-37 细胞增殖, 处理 Bcap-37 细胞后产生自噬, Cleaved PARP 和 LC3-II 蛋白表达均上调。苦参碱联合氯喹作用于 Bcap-37 细胞, 噻唑蓝 (MTT) 检测细胞增殖抑制作用明显增强, 说明自噬对 Bcap-37 细胞起保护作用。

黄连素是一种异喹啉类的生物碱, 大量的实验证实黄连素有抗肿瘤的作用, 主要是通过抑制细胞的增殖、诱导细胞凋亡以及阻止细胞周期的方式。HOU 等^[18]结果表明, 黄连素对 HepG2 和 SMMC7721 细胞呈剂量依赖性诱导自噬。黄连素可同时诱导细胞自噬性死亡和凋亡。随着黄连素浓度的提高, CD147 表达呈明显降低趋势, 过表达 CD147 的 SMMC7721 细胞中, 细胞死亡明显下降。

李俊霖等^[19]研究表明吴茱萸碱可诱导结肠癌 Lovo 细胞发生自噬, 自噬拮抗吴茱萸碱的抗肿瘤活性, 联合应用吴茱萸碱和自噬抑制剂可增强抗肿瘤作用, 逆转 Lovo 细胞对化疗药物的耐药性。XIA 等^[20]采用左旋一叶萩碱作用于 SW480 细胞, 2.5

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左旋一叶萩碱处理 48 h 后, 出现大量的自噬空泡, 细胞周期阻滞在 G₁ 期, Beclin1 蛋白表达增强, 左旋一叶萩碱诱导 SW480 细胞自噬的机制可能与 Beclin1 蛋白表达的上调有关。

高三尖杉酯碱 (homoharringtonin, HHT) 从我国特有植物海南粗榧分离出来的一种有效的抗癌药物, 是我国自主研发成功的高效抗白血病药物, 我国在世界上首先用于急性非淋巴细胞白血病治疗, 并取得显著疗效^[21], 可以抑制肿瘤细胞生长, 诱导分化凋亡^[22-23]。叶丽霖^[24]研究表明 HHT 诱导 K562 细胞发生自噬, 抑制 Bcl-2 和核转录因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 蛋白的表达。卢佩琳^[25]研究发现 HHT 诱导 K562 细胞后自噬减少凋亡增加, 这种凋亡增加是 Caspase 依赖性的, 在下调 Akt 的同时上调 ERK, Beclin1 表达, 过表达 member RAS oncogene family (RAB7B) 的 K562 细胞可增强 HHT 诱导 K562 细胞凋亡作用。

2.2 黄酮类诱导肿瘤自噬

黄酮类化合物是中药的常见活性成分。中药黄酮类化合物如槲皮素、黄芩素、汉黄芩素等均可以促进肿瘤细胞发生自噬性死亡。槲皮素对癌细胞凋亡和自噬作用已经被广泛报道, 研究发现槲皮素能够诱导 U373MG 细胞^[26], HeLa 细胞^[27]产生自噬, LC3-II, Beclin1 蛋白表达均上调, 联合应用自噬抑制剂氯喹, 3-Methyladenine (3-MA) 后细胞凋亡增加。WANG 等^[28]研究发现, 黄芩素明显抑制 HepG2 细胞增殖, 透射电镜下可明显看到自噬体。LC3-II 蛋白表达上调, 联合应用自噬抑制剂氯喹, 细胞凋亡增加。进一步的研究表明, 黄芩素呈浓度依赖性和时间依赖性下调 p-Akt (S473), p-ULK1 (S757), p-4EBP1 (T37 和 S65) 的表达。CHOW 等^[29]发现汉黄芩素诱导鼻咽癌细胞自噬, 干扰细胞的凋亡。汉黄芩素诱导自噬蛋白 LC3 I/LC3 II 表达降低, 自噬激活剂雷帕霉素通过抑制 mTOR /p70S6K 通路增加汉黄芩素诱导的鼻咽癌细胞自噬, 减弱汉黄芩素介导的细胞凋亡, 而自噬抑制剂 3-MA 或巴弗洛霉素 A1 增加细胞凋亡。此外, 汉黄芩素也抑制 RAF/ERK 途径。PI3K/Akt 抑制剂 SH6-Akt 激酶能够显著增加汉黄芩素诱导的鼻咽癌细胞凋亡。mitogen-activated protein kinase 7 (MEK) 抑制剂 PD98059 对其下游分子 ERK 失活, 诱导细胞凋亡。汉黄芩素通过 Akt 信号通路等多种途径诱导细胞自噬和凋亡。

2.3 皂苷类诱导肿瘤自噬

麦冬皂苷 B (Ophiopogonin B, OP-B) 是一种生物活性成分, 通常

被用在治疗肺部疾病。CHEN 等^[30]研究表明 OP-B 诱导非小细胞肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC) 细胞株 NCI-H157 和 NCI-H460 发生了自噬。OP-B 抑制两种细胞 Akt 磷酸化 (Ser473 位点, Thr308 位点), 同时也抑制了 NCI-H460 细胞的 ribosomal protein S6 kinase B1 (p70S6K) 磷酸化 (Thr389 位点)。OP-B 诱导 H460 细胞自噬与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关。此外, 研究者发现 OP-B 可诱导 A549 细胞发生自噬^[31]。LC3-II, Beclin1 蛋白表达水平升高, 透射电镜观察发现细胞中自噬体增多, 应用溶酶体抑制剂氯喹和 Beclin1-siRNA 的干扰均可以抑制自噬作用。许秋菊等^[32]发现 OP-B 可抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖, 自噬标志性蛋白 Beclin1, LC3 II/LC3 I 蛋白表达水平升高, 自噬抑制剂 3-MA 不但可以抑制该自噬作用, 而且几乎完全逆转其抗增殖作用, OP-B 抑制 Akt, mTOR 和 p70S6K 的磷酸化并上调 PTEN, 但并不引起 Caspase-3 的活化及 PARP 的裂解。

袁鹏等^[33]发现 HeLa 细胞经柴胡皂苷 D 处理后, 激光共聚焦显微镜观察到 GFP-LC3 斑点显著增加, LC3-II 蛋白表达上调, 但自噬关键蛋白 mTOR 没有变化。WONG 等^[34]发现柴胡皂苷 D 可导致 MCF-7 细胞质中 Ca^{2+} 浓度增加, 激活 Ca^{2+} -mitogen-activated protein kinase kinase (MKK)-protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 1 (AMPK)-mTOR 通路, 引起内质网应激以及破坏折叠蛋白, 从而导致 MCF-7 细胞自噬性死亡。罗颖颖等^[35-37]发现白头翁皂苷对 12 种肿瘤细胞均具有作用, 通过调控 Akt 蛋白及其相关通路蛋白, 影响肿瘤细胞能量代谢诱导肿瘤细胞自噬、凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用。此外, 白头翁皂苷 D 可通过激活 ERK 的磷酸化, 抑制 mTOR, p70S6K 的磷酸化, 增强抗宫颈癌 HeLa 细胞活性^[38]。人参皂苷 F₂ 通过上调乳腺癌干细胞 Atg7, Beclin1, LC3B 蛋白表达诱导自噬, 激活内在凋亡途径和线粒体功能障碍引起凋亡, 联合自噬抑制剂氯喹则能增强人参皂苷 F₂ 诱导的细胞凋亡^[39]。

2.4 强心苷类诱导肿瘤自噬 从蟾蜍的皮肤中提取的蟾蜍灵 (bufalin), 是蟾酥的主要组成部分, 对多种肿瘤发挥抗癌活性。MIAO 等^[40]发现, 100 nmol·L⁻¹ 蟾蜍灵即可诱导肝癌 HepG2 细胞自噬、凋亡。细胞处理后增强 Beclin1 表达水平升高, LC3-I 向 LC3-II 转化增多, p62 (general transcription factor II H subunit 1, p62) 和 mTOR 的表达水平降低。自噬

抑制剂 3-MA 联合蟾蜍灵处理 HepG2 细胞凋亡率下降, 表明蟾蜍灵诱导的自噬促进凋亡作用。蟾蜍灵促进 AMPK 磷酸化, AMPK 抑制剂减弱蟾蜍灵诱导的自噬。Tsai 等^[41]发现蟾蜍灵引发人肝癌 SK-HEP-1 细胞自噬性细胞死亡, 并通过抑制 Akt/mTOR 信号通路导致 SK-HEP-1 细胞阻滞在 G2/M 期。XIE 等^[42]研究了蟾蜍灵诱导人结肠癌 HT-29 和 Caco-2 细胞产生自噬, LC3-II 蛋白表达水平上调。蟾蜍灵诱导的细胞自噬与 reactive oxygen species (ROS) 的产生相关。ROS 通过 Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (JUN) 的 NH2 末端激酶 mitogen-activated protein kinase 8 (JNK) 激活细胞自噬。JNK 活化增加 Atg5 和 Beclin1 蛋白表达。活性抗氧化剂 (N-乙酰半胱氨酸和维生素 C), JNK 的特异性抑制剂 SP600125 和 JNK2-siRNA 抑制蟾蜍灵诱导自噬。揭示蟾蜍灵在结肠癌细胞中药物作用的一种新的机制, 通过 ROS 依赖自噬途径治疗大肠癌。Hsu 等^[43]研究发现蟾蜍灵具有抑制人肝癌 Huh7, Hep3B 和 HA22T 细胞生长的作用。蟾蜍灵协同 JNK 信号通路上调 Beclin1, MAPK 和 Atg8, 下调 Bcl-2 和 BH3 interacting domain death agonist (BID) 诱导肝癌细胞发生自噬。张晔等^[44]发现蟾蜍灵能明显抑制 SGC7901 细胞的生长, 并且诱导其发生自噬性保护。

2.5 萜类诱导肿瘤自噬 雷公藤甲素是雷公藤的主要活性成分之一, 是从卫矛科植物雷公藤的根、叶、花及果实中提取的一种环氧二萜内酯化合物。Mujumdar 等^[45]发现雷公藤甲素抑制胰腺癌细胞的体外生长, 并抑制体内肿瘤的生长, 雷公藤甲素诱导 MiaPaCa-2, CAPAN-1 和 BxPC-3 细胞凋亡, 并诱导 S2-013, S2-VPI0 和 HS766T 细胞发生自噬。雷公藤甲素诱导自噬与 ATG5, Beclin1, p70S6K, ERK1/2 等基因相关。最新研究发现^[46], 雷公藤甲素可以诱导 WEHI-3 细胞自噬, 自噬体数量明显增加, LC3-II, ATG5, ATG7 和 ATG12 的蛋白水平上调, 体内实验表明雷公藤甲素显著增加 T 细胞, B 细胞, 单核细胞和巨噬细胞的数量。LIU 等^[47-48]发现 β -榄香烯抑制 MGC-803 和 SGC7901, 786-0 细胞增殖, 同时细胞发生自噬, β -榄香烯能够上调 Atg5-Atg12 蛋白的表达, 抑制 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K。自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤或氯喹的能够明显增强 β -榄香烯的抗肿瘤作用。

冬凌草甲素是一种活性二萜, 冬凌草甲素磷酸盐是冬凌草甲素的衍生物之一, 能够抑制 MDA-MB-

436 和 MDA-MB-231 细胞的增殖^[49]。自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3-II 的表达水平上调,同时凋亡相关蛋白 Bax 的表达水平上调和 Bcl-2 的表达水平下调。3-MA 抑制冬凌草甲素磷酸诱导的细胞凋亡,说明冬凌草甲素磷酸盐诱导自噬促进了乳腺癌细胞凋亡。葫芦素 B 是从葫芦科等植物中分离得到的一类四环三萜类化合物,是葫芦素家族中含量最丰富的成员,具有广泛的药理活性。WU 等^[50]研究发现葫芦素 B 抑制大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤 PC12 细胞增殖,但是葫芦素 B 未诱导细胞凋亡而是产生自噬。细胞周期阻滞在 G₂/M 期,蛋白 LC3II 增加明显,葫芦素 B 上调 PC12 细胞中 Beclin-1, P-ULK1, Wee1, p21 和下调 mTOR, p70S6K, cell division cycle 25C (CDC25C), cyclin dependent kinase 1 (CDK1) 蛋白表达水平。齐墩果酸属于五环三萜类化合物,广泛存在于自然界中,具有多种显著的生物活性。NIE 等^[51]研究发现,齐墩果酸通过抑制 PI3K-Akt-mTOR 和 ERK 信号通路诱导人胃癌 MGC-803 细胞自噬,自噬抑制剂 3-MA 或经由 siRNA 沉默 Beclin1 可减少自噬。

2.6 其他类成分 姜黄素是从中药姜黄中提取的酚类色素,为姜黄的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用^[52]。张绪明等^[53]发现姜黄素呈剂量依赖性显著抑制 U87 细胞的增殖,姜黄素通过抑制 PI3K/Akt 信号传导通路,诱导 U87 细胞自噬性死亡的发生。Pifithrin α (PFT α) 能上调 U87 细胞自噬水平,并能协同增加姜黄素诱导的自噬。何聪等^[54]发现姜黄素能够明显抑制 A549 细胞增殖并诱导自噬,同时 mTOR 蛋白的表达水平降低。刘桂元等^[55]研究发现姜黄素诱导髓母细胞瘤 Daoy 细胞自噬并且抑制生长,Beclin1 和 LC3-II/LC3-I mRNA 和蛋白水平均增高,与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

表 1 中药诱导肿瘤细胞自噬及其分子机制

Table 1 Molecular mechanism of tumor cell autophagy induced by traditional Chinese medicine

肿瘤细胞类型	有效部位	有效成分	作用靶点	参考文献
HepG2, SGC-7901	生物碱类	苦参碱	上调 Beclin1, Bax 蛋白 HepG2 细胞阻碍停滞在 G1 期	[14-15]
HepG2	生物碱类	苦参碱	上调 Beclin1, Bax 蛋白	[16]
Bcap-37	生物碱类	苦参碱	Cleaved PARP 和 LC3-II 蛋白表达均上调	[17]
HepG2, SMMC7721	生物碱类	黄连素	抑制 CD147 蛋白表达	[18]
Lovo	生物碱类	吴茱萸碱	LC3-II, Beclin1 蛋白表达增强	[19]
SW480	生物碱类	左旋一叶萩碱	细胞周期阻滞在 G1 期, Beclin1 蛋白表达增强	[20]
K562	生物碱类	高三尖杉酯碱	抑制 Bcl-2 和 NF- κ B 蛋白的表达, 下调 Akt 的同时上调 ERK, Beclin1 表达	[24-25]

白藜芦醇是多酚类化合物,主要来源于花生、葡萄、虎杖、桑椹等植物。白藜芦醇是一种生物活性很强的天然多酚类物质,能够防止细胞癌变并阻止恶性肿瘤扩散,是肿瘤的化学预防剂^[56]。Varun Prabhu 等^[57]研究发现白藜芦醇可以诱导 MDA-MB231, HCT116 细胞中 LC3 II 蛋白含量增加产生自噬,自噬抑制剂 3-MA 可增强白藜芦醇诱导的肿瘤细胞细胞凋亡。另外,白藜芦醇通过诱导 ROS 激活的自噬途径引起 HT-29 细胞凋亡^[58],通过抑制 Akt/mTOR/p70S6K/4E-BP1 和激活 p38-MAPK 传导通路诱导 T-ALL 细胞周期停滞、细胞凋亡和自噬,自噬对 T-ALL 细胞产生保护作用^[59]。

陈菊英等^[60]用紫草素处理人乳腺癌 MCF-7 细胞,细胞的活力受到明显抑制,LC3-II/LC3-I 值增加,p62 表达减少,PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt 表达均减少,紫草素促进乳腺癌 MCF-7 细胞产生自噬,其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 通路有关。眼镜蛇神经毒素 (cobrotoxin) 对人肺腺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤有生长抑制作用,其抑制作用可能与诱导自噬和活化 p38-MAPK 通路有关^[61]。张璐璐等^[62]研究发现蝎毒多肽提取物可抑制 S180 肉瘤细胞生长,其机制可能与促进自噬相关因子 Beclin1, microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha (MAP1LC3A) 的表达及抑制肿瘤干细胞标志物 CD133 表达相关。廖政邦等^[63]研究发现褐藻素呈剂量依赖性地抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖,激活 Beclin1 蛋白,促进 LC3 I 转化为 LC3 II 以及自噬溶酶体的形成,褐藻素可通过抑制 Akt 信号通路诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬,且该自噬抑制细胞凋亡。

综述文献研究进展,本研究依据中药有效部位、有效成分及其作用靶点,对中药诱导肿瘤细胞自噬的机制总结见表 1。

续表 1

肿瘤细胞类型	有效部位	有效成分	作用靶点	参考文献
U373MG, HeLa	黄酮类	槲皮素	LC3- II, Beclin1 蛋白表达均上调	[26-27]
HepG2	黄酮类	黄芩素	上调 LC3- II 蛋白表达, 下调 p-Akt(S473), p-ULK1(S757), p-4EBP1(T37 和 S65) 的表达	[28]
NPC	黄酮类	汉黄芩素	Akt 信号通路等多种途径	[29]
NCI-H157	皂苷类	麦冬皂苷 B	抑制 Akt 磷酸化	[30]
NCI-H460	皂苷类	麦冬皂苷 B	抑制 Akt 磷酸化, p70S6K 磷酸化	[30]
A549	皂苷类	麦冬皂苷 B	LC3- II, Beclin1 蛋白表达水平升高	[31]
HeLa	皂苷类	麦冬皂苷 B	促进 Beclin1, LC3 II 蛋白表达水平升高, 抑制 Akt, mTOR 和 p70S6K 的磷酸化并上调 PTEN	[32]
HeLa	皂苷类	柴胡皂甙 D	LC3- II 蛋白表达上调	[33]
MCF-7	皂苷类	柴胡皂甙 D	激活 Ca ²⁺ -MKK-AMPK-mTOR 通路	[34]
12 种肿瘤细胞	皂苷类	白头翁皂苷	调控 Akt 蛋白及其相关路径成员	[35-37]
HeLa	皂苷类	白头翁皂苷 D	激活蛋白 ERK 的磷酸化, 抑制 mTOR, p70S6K 的磷酸化	[38]
CSC(breast cancer stem cells)	皂苷类	人参皂苷 F ₂	上调 Atg7, Beclin1, LC3B 蛋白	[39]
HepG2	强心苷类	蟾蜍灵	蛋白 Beclin1, LC3- II 表达水平升高, 促进 AMPK 磷酸化, 抑制 P62 和 mTOR 的表达	[40]
SK-HEP-1	强心苷类	蟾蜍灵	抑制 Akt/mTOR 信号通路	[41]
HT-29, Caco-2	强心苷类	蟾蜍灵	ROS 依赖的自噬途径	[42]
Huh7, Hep3B, HA22T	强心苷类	蟾蜍灵	上调 Beclin1, MAPK 和 Atg8, 下调 Bcl-2 和 BID	[43]
SGC7901	强心苷类	蟾蜍灵	蛋白 LC3- II 表达水平升高	[44]
S2-013, S2-VP10, HS766T	二萜类	雷公藤甲素	与 ATG5, Beclin1, p70S6K, ERK1/2 等蛋白相关	[45]
WEHI-3	二萜类	雷公藤甲素	上调 LC3- II, ATG5, ATG7 和 ATG12 的蛋白表达水平	[46]
MGC-803, SGC7901, 786-0	倍半萜烯类	β -榄香烯	上调 Atg5-Atg12 的表达, 抑制 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K	[47-48]
MDA-MB-436, MDA-MB-231	二萜类	冬凌草甲素磷酸盐	Bax, Beclin1 和 LC3- II 的表达水平均上调, Bcl-2 的表达水平下调	[49]
PC12	四环三萜类	葫芦素 B	上调 Beclin1, P-ULK1, Wee1, p21 和下调 mTOR, p70S6K, CDC25C, CDK1 蛋白表达	[50]
MGC-803	五环三萜类	齐墩果酸	抑制 PI3K-Akt-mTOR 和 ERK 信号通路	[51]
U87	多酚类	姜黄素	抑制 PI3K/Akt 信号通路	[53]
A549	多酚类	姜黄素	抑制 mTOR 蛋白	[54]
Daoy	多酚类	姜黄素	上调 Beclin1 和 LC3- II, 抑制 PI3k/Akt/mTOR 信号通路	[55]
MDA-MB231, HCT116	多酚类	白藜芦醇	LC3 II 蛋白含量增加	[57]
HT-29	多酚类	白藜芦醇	激活 ROS 通路	[58]
T-ALL	多酚类	白藜芦醇	抑制 Akt/mTOR/p70S6K/4E-BP1 和激活 p38-MAPK 通路	[59]
MCF-7	萜醌类	紫草素	抑制 PI3K/Akt 通路有关	[60]
A549	蛋白质类	眼睛蛇神经毒素	活化 P38-MAPK 通路	[61]
S180	多肽类	蝎毒多肽提取物	促进自噬相关因子 Beclin1, MAP1LC3A 的表达及抑制肿瘤干细胞标志物 CD133	[62]
HepG2	多糖类	褐藻素	抑制 Akt 信号通路	[63]

3 结语

通过以上可以看出, 中药有效成分诱导肿瘤细胞自噬, 主要表现为促进 LC3- I 向 LC3- II 的转换,

上调 Beclin1 蛋白表达水平, 调控 Akt/mTOR/p70S6K 和 MAPK 信号通路等。中药有效成分诱导的自噬可以促使肿瘤细胞死亡, 部分使肿瘤细胞

产生自我保护,因此要充分发掘中药有效成分抗肿瘤的作用,为肿瘤的治疗提供新的途径。

[参考文献]

- [1] Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(8):461-472.
- [2] García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguerro E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence [J]. *Nature*, 2016, 529(7584):37-42.
- [3] Klionsky D J, Abdalla F C, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8(4):445-544.
- [4] DOU Z, XU C, Donahue G, et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina [J]. *Nature*, 2015, 527(7576):105-109.
- [5] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12):961-967.
- [6] CHENG Y, REN X, Hait W N, et al. Therapeutic targeting of autophagy in disease: biology and pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(4):1162-1197.
- [7] Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke E H, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2):81-94.
- [8] White E. The role for autophagy in cancer [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1):42-46.
- [9] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing [J]. *EMBO J*, 2000, 19(21):5720-5728.
- [10] Fujita N, Itoh T, Omori H, et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5):2092-2100.
- [11] Niemann A, Takatsuki A, Elsässer H P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48(2):251-258.
- [12] LIANG X H, Kleeman L K, JIANG H H, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bel-2-interacting protein [J]. *J Virol*, 1998, 72(11):8586-8596.
- [13] Shvets E, Fass E, Elazar Z. Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells [J]. *Autophagy*, 2008, 4(5):621-628.
- [14] ZHANG J Q, LI Y M, LIU T, et al. Antitumor effect of matrine in human hepatoma G2 cells by inducing apoptosis and Autophagy [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(34):4281-4290.
- [15] ZHANG J Q, LI Y M, CHEN X H, et al. Autophagy is involved in anticancer Cancer effects of matrine on SGC-7901 human gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(1):115-124.
- [16] 范悦,王世明,石青青. 苦参碱对肝癌细胞增殖及其细胞自噬的影响 [J]. *中国当代医药*, 2013, 20(7):11-13.
- [17] 任莉莉,蓝天,王晓稼. 苦参碱诱导人乳腺癌 Bcap-37 细胞自噬及凋亡作用研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(11):2756-2759.
- [18] HOU Q, TANG X, LIU H, et al. Berberine induces cell death in human hepatoma cells *in vitro* by down regulating CD147 [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(7):1287-1292.
- [19] 李俊霖,韩少良,范霞,等. 吴茱萸碱对人结肠癌细吞噬的影响 [J]. *中华普通外科杂志*, 2011, 26(1):41-44.
- [20] XIA Y, CHENG C, YAO S, et al. l-Securinine induced the human colon cancer SW480 cell autophagy and its molecular mechanism [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8):1258-1264.
- [21] Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Garcia-Manero G, et al. Phase I/II study of subcutaneous homoharringtonine in patients with chronic myeloid leukemia who have failed prior therapy [J]. *Cancer*, 2007, 109(2):248-255.
- [22] CHEN R, GUO L, CHEN Y, et al. Homoharringtonine reduced Mcl-1 expression and induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2011, 117(1):156-164.
- [23] MENG H, LI L, LIU H, et al. Homoharringtonine acts synergistically with SG235-TRAIL, a conditionally replicating adenovirus, in human leukemia cell lines [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(11):1529-1536.
- [24] 叶丽霖. 高三尖杉酯碱诱导 K562 细胞自噬及其机制的研究 [D]. 南京:南京医科大学, 2013.
- [25] 卢佩琳. 新型小分子 RAB7B 在高三尖杉酯碱诱导 K562 细胞死亡及在自噬中的作用研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2011.
- [26] Kim H, Moon J Y, Ahn K S, et al. Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:596496.
- [27] WANG Y, ZHANG W, LV Q, et al. The critical role of quercetin in autophagy and apoptosis in HeLa cells [J].

- Tumour Biol, 2015, 37(1):925-929.
- [28] WANG Y F, LI T, TANG Z H, et al. Baicalein triggers autophagy and inhibits the protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway in hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(5):674-679.
- [29] CHOW S E, CHEN Y W, LIANG C A, et al. Wogonin induces cross-regulation between autophagy and apoptosis via a variety of Akt pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(11):3476-3485.
- [30] CHEN M, DU Y, QUI M, et al. Ophiopogonin B-induced autophagy in non-small cell lung cancer cells via inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(2):430-436.
- [31] CHEN M, GUO Y, ZHAO R, et al. Ophiopogonin B induces apoptosis, mitotic catastrophe and autophagy in A549 cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(1):316-324.
- [32] 许秋菊, 侯莉莉, 胡国强, 等. 麦冬皂苷 B 诱导人宫颈癌 HeLa 细胞自噬的机制 [J]. *药学报*, 2013, 48(6):855-859.
- [33] 袁鹏, 金琨琪, 程威, 等. 柴胡皂苷 D 通过非 mTOR 依赖途径诱导 HeLa 细胞自噬 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014, (9):27-29.
- [34] WONG V K, LI T, Law B Y, et al. Saikosaponin-d, a novel SERCA inhibitor, induces autophagic cell death in apoptosis-defective cells [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(7):720.
- [35] 罗颖颖. 白头翁皂苷抗肿瘤作用及机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [36] 罗颖颖, 陈兰英, 崔亚茹, 等. 白头翁皂苷抑制人 HT29 结肠癌细胞增殖及诱导凋亡作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(5):52-56.
- [37] 罗颖颖, 陈兰英, 简晖, 等. 白头翁皂苷调节 Bel-7402 人肝癌异体移植瘤裸鼠能量代谢的研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(7):973-977.
- [38] ZHANG Y, BAO J, WANG K, et al. Pulsatilla saponin D inhibits autophagic flux and synergistically enhances the anticancer activity of chemotherapeutic agents against HeLa cells [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(8):1657-1670.
- [39] MAI T T, Moon J, SONG Y, et al. Ginsenoside F2 induces apoptosis accompanied by protective autophagy in breast cancer stem cells [J]. *Cancer Lett*, 2012, 321(2):144-153.
- [40] MIAO Q, BI L L, LI X, et al. Anticancer effects of bufalin on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: roles of apoptosis and autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1):1370-1382.
- [41] Tsai S C, YANG J S, PENG S F, et al. Bufalin increases sensitivity to Akt/mTOR-induced autophagic cell death in SK-HEP-1 human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(4):1431-1442.
- [42] XIE C M, CHAN W Y, YU S, et al. Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1):1365-1375.
- [43] Hsu C M, Tsai Y, WAN L, et al. Bufalin induces G2/M phase arrest and triggers autophagy via the TNF, JNK, BECN-1 and ATG8 pathway in human hepatoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(1):338-348.
- [44] 张晔, 赵明芳, 刘云鹏, 等. 蟾蜍灵诱导人胃癌 SGC7901 细胞自噬与凋亡的研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(10):2155-2157.
- [45] Mujumdar N, Mackenzie T N, Dudeja V, et al. Triptolide induces cell death in pancreatic cancer cells by apoptotic and autophagic pathways [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(2):598-608.
- [46] CHAN S F, CHEN Y Y, LIN J J, et al. Triptolide induced cell death through apoptosis and autophagy in murine leukemia WEHI-3 cells in vitro and promoting immune responses in WEHI-3 generated leukemia mice in vivo [J]. *Environ Toxicol*, 2016, doi: 10.1002/tox.22259.
- [47] LIU J, ZHANG Y, QU J, et al. β -Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(1):183.
- [48] ZHAN Y H, LIU J, QU X J, et al. β -Elemene induces apoptosis in human renal-cell carcinoma 786-0 cells through inhibition of MAPK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signalling pathways [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(6):2739-2744.
- [49] LI Y, WANG Y, WANG S, et al. Oridomin phosphate - induced autophagy effectively enhances cell apoptosis of human breast cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1):1-8.
- [50] WU C, BAO J, HE C, et al. Cucurbitacin B inhibits proliferation, induces G2/M cycle arrest and autophagy without affecting apoptosis but enhances MTT reduction in PC12 cells [J]. *Bangladesh J Pharmacol*, 2015, 11(1):110-118.
- [51] NIE H, WANG Y, QIN Y, et al. Oleanolic acid induces autophagic death in human gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Biol Int*, 2016, doi:10.1002/cbin.

- 10612.
- [52] 范昊宁,佟丽,范钦. 姜黄素对肿瘤的抑制和放射增敏作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):333-335.
- [53] 张绪明,兰青. 姜黄素诱导自噬抑制脑胶质瘤 U87 细胞增殖的研究[J]. 中国微侵袭神经外科杂志,2010(5):231-233.
- [54] 何聪,陈清勇,王剑,等. 姜黄素下调 mTOR 诱导人肺癌 A549 细胞自噬的研究[J]. 肿瘤学杂志,2014,20(5):363-368.
- [55] 刘桂元,毛蜀,何密斯,等. 姜黄素诱导人髓母细胞瘤 Daoy 细胞自噬的实验研究[J]. 重庆医科大学学报,2014,38(3):332-336.
- [56] JIANG M, CAI L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, 275 (5297): 218-220.
- [57] Prabhu V, Srivastava P, Yadav N, et al. Resveratrol depletes mitochondrial DNA and inhibition of autophagy enhances resveratrol-induced caspase activation [J]. *Mitochondrion*, 2013, 13 (5): 493-499.
- [59] GE J, LIU Y, LI Q, et al. Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK [J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(11):902-911.
- [60] 陈菊英,刘朝纯,曾智,等. 紫草素通过 P13K/AKT 通路促进人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬[J]. 中国药理学通报,2013,29(2):194-198.
- [61] 申健,何靖康,唐兴,等. 自噬在眼镜蛇神经毒素诱导 A549 细胞死亡中的作用[J]. 中国肺癌杂志,2013,16(7):339-344.
- [62] 张璐璐,张维东,武力存,等. 蝎毒多肽提取物促进自噬抑制 S(180) 肉瘤作用机制的研究[J]. 中草药,2015,46(8):1190-1194.
- [63] 廖政邦,李明,谢松强. 褐藻素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):181-184.

[责任编辑 张丰丰]