

藤黄酸抗肿瘤细胞生物学机制

翟万银 周双雯¹ 贾春平 徐元森*

(中国科学院上海微系统与信息技术研究所纳米技术研究室, 上海 200050;

¹ 复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘要 藤黄酸是传统中药藤黄中的重要成分。近年来, 由于它显著的抗癌作用 and 低细胞毒性, 受到越来越多研究人员的关注。目前细胞生物学作用机制研究在(1)藤黄酸及其衍生物对肿瘤细胞增殖的抑制和促凋亡作用, (2)激活 T 淋巴细胞诱导肿瘤细胞凋亡, 以及(3)肿瘤血管生成的抑制作用等方面取得一系列重要进展。虽然其作用的分子机制有可能尚未被完全揭示, 但这些机制为后续研究及临床应用打下了良好的基础。

关键词 藤黄酸; 肿瘤; 凋亡; 血管生成

藤黄酸(gambogic acid, $C_{38}H_{44}O_8$, 分子量 628.76 Da, 图 1)是中药藤黄的主要活性成份。中药藤黄提取自藤黄科植物藤黄(*Garcinia hanburyi*, Hook F)的树脂, 呈橙黄色或褐色, 用作黄色染料。中医药学记载, 藤黄, 酸、涩、凉、有大毒^[1], 因此也有消肿、化毒、止血、杀虫的功效^[2]。1965 年 Ollis 等^[3]采用核磁共振、2002 年 Weakley 等^[4]用 X 射线晶体衍射确定了藤黄酸的分子结构(图 1)。其氧杂蒽酮环结构构成一个平面, 其上表面的桥式多元环结构和两异戊二烯链构成了憎水面, 下表面的羧酸和多元环上的羧基形成了亲水面^[4]。藤黄酸可溶于丙酮、乙腈、氯仿等有机溶剂并保持高度稳定。溶于甲醇或乙醇后, C-9 和 C-10 之间的双键发生亲电加成, 生成 gambogic acid (GOA), 抗癌活性下降^[5]。研究发现, 藤黄酸可以抑制多种肿瘤增殖, 本文综述了藤黄酸对这些肿瘤的作用机制和最新进展。

1 藤黄酸的抗癌功效

体外细胞实验及动物移植肿瘤实验证实, 藤黄酸可以抑制多种癌细胞的增殖, 包括胃癌^[6-9]、肺癌^[10]、胰腺癌^[11]、肝癌^[11,12]、神经胶质瘤^[11,13]、前列腺肿瘤^[14]、白血病^[15,16]、子宫癌^[16]、乳腺癌^[16,17]、结肠癌^[17]等肿瘤细胞。另外, 藤黄酸衍生物可抑制卵巢癌^[18]、宫颈癌^[18]等。其抑制效应均存在剂量和时间依赖效应(表 1), 与其他现有抗癌药物相比, 具有鲜见的低剂量和快速的特点。藤黄酸对各种肿瘤细胞作用 24 h 后的半抑制浓度(IC_{50}), 最低的是 H60 白血病细胞, 为 $0.115 \mu\text{mol/L}$, 最高的是肺癌 SPC-A1 细

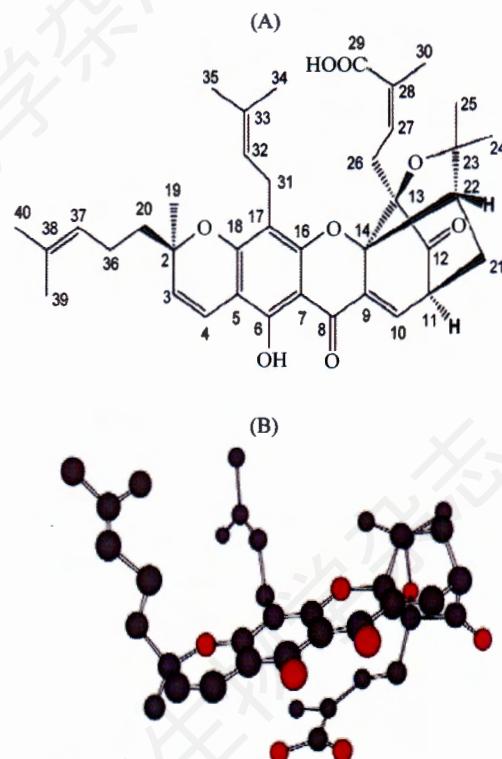


Fig.1 Chemical structure (A) and X-ray crystallographic structure (B) of gambogic acid^[11,17]

胞, 也仅为 $2.77 \mu\text{mol/L}$ 。此外, 还发现藤黄酸可以抑制人血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial

收稿日期: 2008-11-05 接受日期: 2009-05-15

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2006AA03Z334)、国家基础科学人才培养基金(No.J0630643)、上海市科委纳米专项(No.072NM019, No.0752NM021)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-62511070-801, Fax: 021-62511070-8714, E-mail: zhaiwy@mail.sic.ac.cn

Table 1 Gambogic acid inhibits growth in various tumor cell lines

Tumor	Cell line	IC ₅₀ (μmol/L)			References
		24 h	48 h	72 h	
Gastric Carcinoma	MGC-803		1.4		[6,9]
	BGC-823	2.30	1.41	1.02	[7,8]
	SGC-7901		1.47		[9,20,21]
Lung cancer	SPC-A1	2.77	1.61	1.29	[10]
Hepatoma	SMMC-7721		1.2		[11,12]
Glioblastoma	Rat C6 glioma	1.2	1.2		[11,13]
Prostate tumor	PC3	0.4			[14]
Leukemia	Jurkat T	1.51	0.98	0.67	[15,16]
	HL60	0.115			[16]
Uterine sarcoma	MES	0.3			[16]
	MES ADR	1.0			[16]
Breast cancer	ZR751	0.42			[16,17]
	T47D	0.63			[16,17]

cells, HUVEC的增殖,从而可抑制肿瘤的血管形成^[13,14,19]。

2 藤黄酸的抗癌作用机制

2.1 促凋亡作用

上述肿瘤细胞的抑制作用大都是由于藤黄酸促进了细胞的凋亡。在增殖受抑制的细胞中,细胞均出现形态改变、DNA片段化以及凋亡小体形成等现象,Annexin-V/PI双染色流式细胞仪检测显示,细胞凋亡比例上升。

Bcl-2与Bax是与细胞凋亡相关的两种蛋白质,虽然同属一种蛋白质家族,但Bcl-2抑制细胞凋亡,而Bax诱导细胞凋亡,两者相互制约。在藤黄酸作用下,肿瘤Bcl-2表达量下降,同时Bax表达量增加。Bax促进caspase-3裂解成活性形式,激活caspase通路,发挥促凋亡作用。此外,Bax还能插入到线粒体外膜,改变外膜通透性,释放细胞色素c进入胞质,启动线粒体通路,发挥促凋亡作用(图2)^[6,8,11]。

多药耐药性是很多肿瘤化疗时出现的棘手问题之一。研究发现肿瘤在对紫杉醇产生耐药性后,其凋亡蛋白抑制因子survivin转录量是之前的4倍,在许多肿瘤中survivin的表达与凋亡抑制以及不良预后相关。survivin通过抑制促凋亡的caspase-3和caspase-7的活性,控制细胞凋亡和促进细胞分裂。用藤黄酸处理抗多西紫杉醇的胃癌BGC-823/Doc细胞和无耐药性的BGC-823细胞^[22],发现0.1~0.3 μmol/L藤黄酸即可逆转BGC-823/Doc的耐药性,使其对多西紫杉醇的敏感性与非耐药细胞相当,1.6~6.4 μmol/L藤黄酸对二者的增殖抑制率相同。研究显示提高耐药细胞的敏感性,是由于藤黄酸极大地降低了

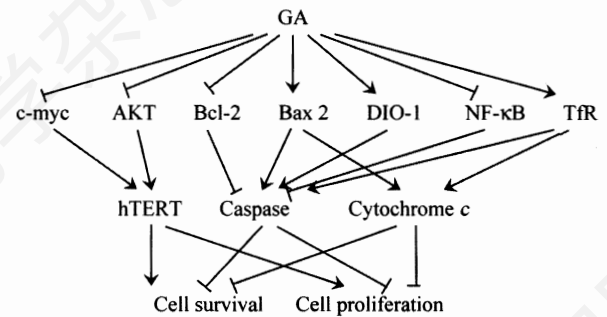


Fig.2 Signaling pathways for GA-mediated apoptosis

survivin的表达量。这说明藤黄酸有可能成为抑制survivin表达的新一代多药耐药性逆转药物。

死亡诱导因子删除因子1 (death inducer-oblitera-tor 1, DIO-1)是在促凋亡因子刺激后、于凋亡前表达上调的基因,并且细胞内如果DIO-1过表达将独立引起细胞凋亡。正常细胞中DIO-1定位于细胞质中,Ser/Thr残基被磷酸化。在凋亡诱导或过表达时,DIO-1则转移到细胞核中,Ser/Thr残基被去磷酸化,裂解caspase-3为2个亚单位p17和p20,从而活化caspase凋亡途径。正常组织中,DIO-1-caspase凋亡诱导途径和核转录因子κB (nuclear factor kappa B, NF-κB)促细胞增殖途径(启动抗凋亡基因转录),处于相互平衡状态;而在肿瘤组织中可能因NF-κB高表达,不可避免地抑制DIO-1-caspase凋亡诱导途径。藤黄酸处理白血病细胞时,DIO-1高表达、去磷酸化,并定位于核内,同时下调NF-κB的表达,削弱其抗凋亡的作用(图2)^[15]。

转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)是II型跨膜蛋白,在分裂细胞中表达升高,在各种类型的肿

瘤细胞中过表达。它与2种蛋白质发生相互作用: 转铁蛋白和细胞离子转运相关蛋白, 因而TfR可作为抗体介导的治疗靶标和络合离子进行饥饿治疗的靶标。Kasibhatla等^[10]报道, Jurkat、Mes、Mes、ADR和293T等肿瘤细胞受藤黄酸短暂作用即可引起凋亡。促凋亡能力不依赖转铁蛋白, 也不依赖Fe离子的存在, 推测藤黄酸及其衍生物可结合于TfR, 但该结合位点不与转铁蛋白结合位点重合。用siRNA下调TfR的表达时, 则细胞对藤黄酸诱导的凋亡敏感性下降, 证明藤黄酸诱导细胞凋亡的前提是必须与TfR结合。研究发现藤黄酸与TfR结合后抑制了TfR的内化, 裂解caspase-8, 激活caspase凋亡通路和线粒体凋亡通路, 引起细胞快速凋亡(图2)。

2.2 抑制端粒酶活性

端粒酶是由RNA和蛋白质组成的核糖核蛋白酶, 通过识别结合于富含G的端粒末端, 以自身RNA为模板, 由其逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)催化逆转录合成端粒, 维持染色体的末端稳定。端粒酶活性和hTERT水平随细胞分化而降低, 在正常成年体细胞中一般没有活性, 而在肿瘤细胞中则活性较高。hTERT基因的反式作用因子原癌基因c-myc在多种肿瘤细胞中过表达, 其编码的蛋白质c-MYC通过激活生长促进基因, 促进细胞增殖和转化。c-MYC与hTERT的启动子有多个结合位点。藤黄酸既可以下调c-Myc的表达, 又可以通过与这些结合位点结合, 降低hTERT的合成^[7,9,11,12]。同时hTERT转录后活性受蛋白激酶B (protein kinase B, PKB或AKT)调控。藤黄酸通过在473位Ser残基处抑制AKT的磷酸化, 进而抑制hTERT的824位Ser残基磷酸化, 抑制hTERT的活性, 最终使端粒酶失去活性(图2)^[7]。

2.3 诱导细胞周期在G₂/M期停滞

细胞有丝分裂有赖细胞周期蛋白(cyclin)-细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)和细胞周期蛋白激酶抑制因子(CDKI)的综合调控。CDKs与细胞周期蛋白结合后其活性被激活, 可对细胞周期进程相关蛋白的Ser/Thr等残基进行磷酸化。细胞周期蛋白B与细胞分裂素2/p34 (cell division cycle 2/p34, CDC2/p34)一起控制着G₂/M期进程, CDC2/p34激酶活性高则细胞分裂, 反之则细胞在G₂/M期阻滞。其中CDC2/p34在Thr14和Tyr15残基去磷酸化、在Thr161残基磷酸化才有激酶活性。CDK7可使前者去磷酸化而使后者磷酸化, 促进细胞通过G₂/M期。

藤黄酸处理食道癌BGC823细胞时, 抑制周期依赖性蛋白激酶活化激酶(CDK7/cyclin H)的活性, 下调CDC2/p34的合成, 引起Tyr15磷酸化而使CDC2/p34失活并积聚, 同时降低Thr161磷酸化而使有活性的CDC2/p34水平下降。不仅如此, 藤黄酸还抑制失活的CDC2/p34的Tyr15去磷酸化激酶活性, 使Tyr15不能去磷酸化, 以及抑制有活性的CDC2/p34 Thr161去磷酸化激酶活性, 不使Thr161磷酸化。高水平Thr14和Tyr15磷酸化的CDC2/p34和低水平Thr161磷酸化的CDC2/p34, 直接造成细胞周期在G₂期停滞。此外, 藤黄酸处理的胃癌细胞, CDK7 mRNA的转录水平和翻译水平降低, CDK7总激酶活性降低。这些因素共同在G₂/M期不可逆地阻断肿瘤细胞周期。

2.4 抑制核膜孔蛋白表达

核孔复合物是跨越核膜的疏水通道, 核膜孔蛋白除了参与核质转运, 还在细胞周期、信号转导、凋亡等生理过程中发挥非转运作用。某些核膜孔蛋白的表达异常直接影响原癌基因或抑癌基因产物以及信号转导分子等穿梭蛋白的核质转运。其中在正常组织中仅有弱表达的核膜孔蛋白Nup 88却在肿瘤组织中高表达, 并伴随肿瘤高度侵袭和转移倾向。舒文秀等^[23]发现藤黄酸剂量依赖性地抑制白血病H60细胞核膜孔蛋白Nup 88的表达, 1.6 mmol/L藤黄酸即可使核膜孔蛋白Nup 88的基因转录和蛋白质翻译降到最低水平。

2.5 抑制血管生成

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一个多功能的细胞因子, 能够刺激内皮细胞的迁移和分裂, 改变它们的基因表达模式, 促进新生血管的形成, 还能抑制细胞的凋亡和衰老。肿瘤细胞中过表达VEGF, 分泌后与血管内皮细胞表面的受体(VEGF receptors, VEGFR)结合, 促进肿瘤血管形成。VEGF的大多数生理性和病理性效应都是由VEGFR-2 (KDR/Flk-1)介导的。VEGFR-2是酪氨酸激酶受体, VEGF与之结合后使其二聚体化并自动磷酸化。活化的VEGFR-2 (KDR/Flk-1)激活p38促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK), 促进细胞迁移, 同时启动AKT信号通路, 促进细胞增殖。藤黄酸可抑制这个信号通路^[19], 造成肿瘤中的内皮细胞比肿瘤细胞更早凋亡^[24]。藤黄酸还可直接抑制VEGFR2, 使其在多个酪氨酸残基位点上去磷酸化, 导致AKT、c-Src和粘着斑激酶(focal

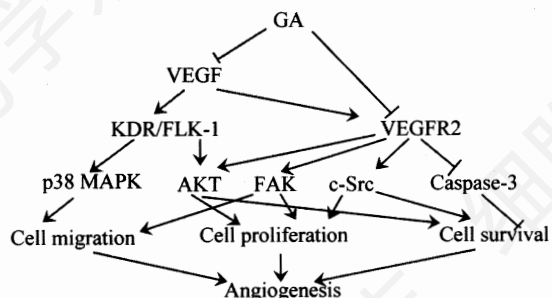


Fig.3 Signaling pathways for GA-mediated antiangiogenesis [14]

adhesion kinase, FAK) 不能磷酸化, 抑制使下游的信号通路。由于磷酸化的 C-Src 和 FAK 分别与细胞迁移和黏着斑转换有关, 导致内皮细胞不能迁移, 增殖被抑制, 细胞进入凋亡程序。此外, VEGFR2 对促凋亡的 caspase 的抑制也因藤黄酸的作用而被削弱^[14]。通过这些途径, 藤黄酸抑制了内皮细胞的增殖、转移、入侵以及肿瘤血管生成(图 3)^[13,14,19,24]。

2.6 激活 T 淋巴细胞对肿瘤细胞凋亡的诱导

在直接诱导肿瘤细胞凋亡之前, 藤黄酸可首先激活休眠状态的 T 淋巴细胞, 使其引起肿瘤细胞的凋亡, 可延长荷 H22 瘤的小鼠的寿命, 研究人员用 cDNA 芯片研究发现, 在藤黄酸造成所有表达上调的 48 个基因中, 有 22.92% 的(11 个)基因是免疫相关基因。RT-PCR 检测分析揭示, 藤黄酸上调 MHC-II 和 TCR 的转录, 提示藤黄酸活化 T 淋巴细胞, 从而诱导肿瘤细胞凋亡。小鼠服用藤黄酸后, T 淋巴细胞穿入肿瘤组织, 同时 CD4⁺ 和 CD8⁺ 表达, Annexin-V/PI 双染色和 DNA 梯状(ladder)分析均证实肿瘤细胞出现凋亡^[24]。

3 小结

藤黄酸研究有别于其他抗癌药物研究, 该研究是在继承了中医药学成果的基础上, 由中国科学家首先发现、以中国科学家研究工作为主题的研究领域。1949 年开始, 中国药理学家和临床医学家最先发现了藤黄酸的抗癌活性^[10]; 至上世纪 60 年代我国科学家对藤黄酸作了初步分离纯化并确定了分子结构^[25,26]; 1973 年陈葆仁^[25]证实藤黄酸、别藤黄酸为抗癌有效成分; 上世纪 80 年代我国藤黄酸抗肿瘤研究协作组(CGAD)确定了分子结构^[27], 并研究了藤黄酸在动物体内的抗癌功效以及吸收、分布、代谢和排泄, 并且抗癌活性也进入了临床试验^[6-8,10,28]。进入 21 世纪后, 中国药科大学等多家单位在藤黄酸研究方面取得一系列重要创新成果, 相关研究因论文在国际刊物上发

表, 而逐渐引起国外同行的关注^[14,16,17,21,24]。上述藤黄酸作用机制为后续研究及临床应用打下了良好的基础。藤黄酸体外抗肿瘤功效具有低剂量(IC₅₀<3 μmol/L)和快速(一般 24 h 即达到半抑制)的特点, 显示藤黄酸可能存在多种抗肿瘤机制, 很可能存在若干尚未发现的、乃至比较独特的机制。对这些机制的探索, 为新的药物靶标发现、临床有效应用藤黄酸和开发新的抗肿瘤药物都将有一定促进和帮助。希望这一有我国传统中医药背景又有以我为主的科研积累和临床应用基础的研究, 能够不断深入、继续保持领先地位。

参考文献(References)

- [1] 李时珍. 本草纲目, 第二册, 北京: 人民卫生出版社, 1977, 1344
- [2] 赵学敏. 本草纲目拾遗, 北京: 人民卫生出版社, 1957, 204
- [3] Ollis WD, Ramsay MVJ, Sutherland IO, et al. Constitution of gambogic acid, *Tetrahedron*, 1965, 21(6): 1453-1470
- [4] Weakley TJR, Cai SX, Zhang HZ, et al. Crystal structure of the pyridine salt of gambogic acid, *J Chem Crystallogr*, 2002, 31 (11-12): 501-505
- [5] Han QB, Cheung S, Tai J, et al. Stability and cytotoxicity of gambogic acid and its derivative, gambogic acid, *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(12): 2335-2337
- [6] Zhao L, Guo QL, You QD, et al. Gambogic acid induces apoptosis and regulates expressions of Bax and Bcl-2 protein in human gastric carcinoma MGC-803 cells, *Biol Pharm Bull*, 2004, 27 (7): 998-1003
- [7] Zhao Q, Yang Y, Yu J, et al. Posttranscriptional regulation of the telomerase hTERT by gambogic acid in human gastric carcinoma 823 cells, *Cancer Lett*, 2008, 262(2): 223-231
- [8] Liu W, Guo QL, You QD, et al. Anticancer effect and apoptosis induction of gambogic acid in human gastric cancer line BGC-823, *World J Gastroenterol*, 2006, 11(24): 3655-3659
- [9] Yu J, Guo QL, You QD, et al. Repression of telomerase reverse transcriptase mRNA and hTERT promoter by gambogic acid in human gastric carcinoma cells, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 58(4): 434-443
- [10] Wu ZQ, Guo QL, You QD, et al. gambogic acid inhibits proliferation of human lung carcinoma SPC-A1 cells *in vivo* and *in vitro* and represses telomerase activity and telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the cells, *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(11): 1769-1774
- [11] Yang Y, Yang L, You QD, et al. Differential apoptotic induction of gambogic acid, a novel anticancer natural product, on hepatoma cells and normal hepatocytes, *Cancer Lett*, 2007, 256 (2): 259-266
- [12] Guo QL, Lin SS, You QD, et al. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells, *Life Sci*, 2006, 78(11): 1238-1245
- [13] Qiang L, Yang Y, You QD, et al. Inhibition of glioblastoma growth and angiogenesis by gambogic acid: an *in vitro* and *in vivo*

- study, *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(5): 1083-1092
- [14] Yi TF, Yi ZF, Cho SG, *et al.* Gambogic acid inhibits angiogenesis and prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling, *Cancer Res*, 2008, 68(6): 1843-1850
- [15] Wang Y, Chen Y, Chen Z, *et al.* Gambogic acid Induces death inducer-obliterator 1-mediated apoptosis in Jurkat T cells, *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(3): 349-354
- [16] Kasibhatla S, Jessen KA, Maliartchouk S, *et al.* A role for transferrin receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(34): 12095-12100
- [17] Zhang HZ, Kasibhatla S, Wang Y, *et al.* Discovery, Characterization and SAR of gambogic acid as a potent apoptosis inducer by a HTS assay, *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(2): 309-317
- [18] Tao ZJ, Zhou YL, Lu JJ, *et al.* Caspase-8 preferentially senses the apoptosis-inducing action of NG-18, a gambogic acid derivative, in human leukemia HL-60 cells, *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(5): 691-696
- [19] Lu N, Yang Y, You QD, *et al.* Gambogic acid inhibits angiogenesis through suppressing vascular endothelial growth factor-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1, *Cancer Lett*, 2007, 258(1): 80-89
- [20] Guo QL, Zhao L, You QD, *et al.* Gambogic acid inducing apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells, *Chin J Nat Med*, 2004, 2(2): 106-110
- [21] Yu J, Guo QL, You QD, *et al.* Gambogic acid-induced G₂/M phase cell-cycle arrest via disturbing CDK7-mediated phosphorylation of CDC2/p34 in human gastric carcinoma BGC-823 cells, *Carcinogenesis*, 2007, 28(3): 632-638
- [22] Wang TT, Wei J, Qian XP, *et al.* Gambogic acid, a potent inhibitor of survivin, reverses docetaxel resistance in gastric cancer cells, *Cancer Lett*, 2008, 262(2): 214-222
- [23] 舒文秀, 陈燕, 何静. 藤黄酸调节急性白血病细胞 HL-60 核孔蛋白 Nup88 的意义, *中华肿瘤杂志*, 2008, 30(7): 484-486
- [24] Gu HY, You QD, Liu W, *et al.* Gambogic acid induced tumor cell apoptosis by T lymphocyte activation in H22 transplanted mice, *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(11): 1493-1502
- [25] 陈葆仁. 藤黄抗癌成份的研究, *江西医学院学报*, 1980, 37(2): 1-7
- [26] 杨企静, 贾淑杰, 李德华. 中药藤黄的近代研究, *中国肿瘤临床*, 1994, 21(6): 464-466
- [27] 吕归宝. 藤黄中新藤黄的分离及其结构, *药学学报*, 1984, 19(8): 636-639
- [28] 蕾秋模, 刘金妹. 藤黄抗癌作用研究的回顾与展望, *肿瘤防治杂志*, 2003, 10(2): 216-219

The Cytobiological Anti-cancer Mechanisms of Gambogic Acid

Wan-Yin Zhai, Shuang-Wen Zhou¹, Chun-Pin Jia, Yuan-Sen Xu*

(Lab of Nanotechnology, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; ¹School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200062, China)

Abstract Gambogic acid is the major active component isolated from the gamboge resin of *Garcinia hanburyi* tree. In recent years, its prominent anti-tumor activity and low side effect has aroused widespread interest among scholars. Its anti-tumor mechanisms have been elucidated in (1) inhibition on tumor cell proliferation and induction of apoptosis, (2) activation T lymphocytes which stimulate apoptosis of tumor cells, and (3) inhibition on tumor angiogenesis. Although the molecular mechanism of its anticancer activity remains insufficient understood, its achievements have paved its way to the research in future and clinical application.

Key words gambogic acid; tumor; apoptosis; angiogenesis

Received: November 5, 2008 Accepted: May 15, 2009

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2006AA03Z334), the National Fundamental Fund Project Subsidy Funds of Personnel Training (No.J0630643), and the Special Research Program in Nano-technology by Science and Technology Commission of Shanghai (No.072NM019 and No.0752NM021)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62511070-801, Fax: 86-21-62511070-8714, E-mail: zhaiwy@mail.sic.ac.cn