

紫杉醇诱导细胞凋亡机制研究进展

厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室(厦门 361005) 王建锋 苏文金综述

摘要 总结近年来紫杉醇诱导细胞凋亡机制的研究进展, 阐述其多种可能的途径, 为临床应用该类药物提供更好的指导。

关键词 紫杉醇 细胞凋亡 信号传导

紫杉醇(taxol)是一种天然的抗肿瘤药物, 对多种癌细胞具有显著的疗效。一般认为紫杉醇的主要靶位点是微管蛋白/微管系统, 它能促进微管聚合, 抑制微管降解, 使细胞分裂阻滞在 G_2/M 期, 最终导致细胞死亡。近年来, 许多研究者发现紫杉醇能够诱导多种癌细胞的凋亡, 而且大量研究表明紫杉醇对微管系统的作用及对 G_2/M 期的阻滞并不是诱导细胞凋亡的唯一机制, 可能有许多其他的信号传导通路参与紫杉醇诱导的细胞凋亡。

一、紫杉醇诱导细胞凋亡与 Raf-1/Bcl-2 磷酸化的关系

Bcl-2 是一种 26kD 的蛋白质, C 端疏水能与各种细胞膜结合。研究表明 Bcl-2 能够抑制细胞的凋亡而促进细胞生长, 但是这种抑制机制目前仍不清楚。Bcl-2 在淋巴细胞等多种细胞和组织中表达, 最近发现对激素治疗有抗性的前列腺癌细胞常表达 Bcl-2, 而正常的前列腺细胞却不表达 Bcl-2 另外亦有多种对抗肿瘤药物有抗性的癌细胞能表达 Bcl-2, 并阻止细胞凋

者缺乏; 正义链转染细胞株中, p21 激活蛋白激酶 (PAK) 和 JNK 的活性升高, 证明 Tiam1 基因在 Bu 诱导的细胞凋亡过程中起关键作用。

三、抑制血管生成

抑制肿瘤的血管生成是肿瘤治疗的新策略。Lee 等^[16] 用原代培养的牛主动脉内皮细胞在 I 型胶原蛋白三维培养基中生成的毛细管样网络结构为模型, 观察 Bu 对血管生成的影响。经图像分析仪定量检测, 5nmol/L Bu 即可显著抑制毛细管的生成; FCM 分析可见血管内皮细胞阻滞于 G_2/M 期, 细胞增殖受到抑制。

结 语

Bu 是一种既能诱导细胞分化又能诱导凋亡的抗癌中药成分, 其发挥效用的浓度低于其他抗癌药物如顺铂、维甲酸、足叶乙甙等, 联用则产生强协同作用, 而且对正常细胞无诱导凋亡作用, 有望开发为新的抗癌药。

参 考 文 献

- Zhang L, Nakaya K, Yoshida T, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; 178(2): 686~693
- Zhang L, Nakaya K, Yoshida T, et al. *Cancer Res* 1992; 52(17): 4634~4641
- Jing Y, Watabe M, Hashimoto S, et al. *Anticancer Res*, 1994; 14(3A): 1193~1198
- Numazawa S, Inoue N, Nukura H, et al. *Biochem Pharmacol*, 1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

- 1996; 52(2): 321~329
- 5 Yamada K, Hino K, Tomoyasu S, et al. *Leuk Res* 1998; 22(7): 589~595
- 6 Numazawa S, Horma Y, Yamamoto T, et al. *Leuk Res* 1995; 19(12): 945~953
- 7 Jing Y, Ohizumi H, Kawazoe N, et al. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85(6): 645~651
- 8 Masuda Y, Kawazoe N, Nakajo S, et al. *Leuk Res* 1995; 19(8): 549~556
- 9 Hashimoto S, Jing Y, Kawazoe N, et al. *Leuk Res* 1997; 21(9): 875~883
- 10 Watabe M, Masuda Y, Nakajo S, et al. *J Biol Chem*, 1996; 271(24): 14067~14072
- 11 Watabe M, Ito K, Masuda Y, et al. *Oncogene*, 1998; 16(6): 779~787
- 12 Watabe M, Kawazoe N, Masuda Y, et al. *Cancer Res* 1997; 57(15): 3097~3100
- 13 Watabe M, Nakajo S, Yoshida T, et al. *Cell Growth Differ*, 1997; 8(8): 871~879
- 14 McGowan MH, Russell P, Carper DA, et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999; 289(3): 1559~1563
- 15 Kawazoe N, Watabe M, Masuda Y, et al. *Oncogene*, 1999; 18(15): 2413~2421
- 16 Lee DY, Yasuda M, Yamamoto T, et al. *Life Sci* 1997; 60(2): 127~134

亡^[1]。人们发现紫杉醇诱导的细胞凋亡往往伴随着 Bcl-2 的磷酸化^[2]。Haldar 等^[3]将白血病细胞用磷酸酶抑制剂处理后使 Bcl-2 磷酸化,从而使细胞死亡,发现紫杉醇能诱导前列腺癌细胞的 Bcl-2 磷酸化及细胞凋亡,不能诱导 Bcl-2 缺陷株的凋亡。Bcl-2 能与 Bax 形成异源二聚体导致细胞凋亡,但 Bax 的含量并没有因紫杉醇的处理而发生变化,推测稳定微管和 Bcl-2 磷酸化可能是紫杉醇和同一靶位点相互作用的结果,也许是通过刺激丝氨酸蛋白激酶途径^[1]。Haldar 等认为丝氨酸 70 是紫杉醇诱导 Bcl-2 磷酸化的一个重要作用位点,因为该位点被丙氨酸取代后,Bcl-2 的磷酸化被显著抑制^[4]。最近又有学者发现 Bcl-2 上的一段 60 个氨基的环状结构是 Bcl-2 对抗紫杉醇诱导细胞凋亡的重要区域,因为 Bcl-2 的磷酸化位点存在于该环中^[5]。Bcl-xL 与 Bcl-2 属同一家族,且 Bcl-xL 的过度表达也能抑制细胞生长,促进紫杉醇诱导的细胞凋亡,但却不能与紫杉醇结合^[6]。

Raf-1/Bcl-2 的磷酸化是细胞微管损伤导致死亡的一个重要步骤。有研究表明,Raf-1 是紫杉醇诱导细胞凋亡的重要介质,Raf-1 是细胞增殖和生长信号转换的一个重要介质,与上游酪氨酸激酶和下游的丝氨酸/苏氨酸激酶相联系,目前还不清楚 Raf-1 的活化是不是由于紫杉醇破坏了微管系统的正常结构而引起的。另外,紫杉醇激活 Raf-1 提示紫杉醇可能激活 Ras/Raf 信号传导途径。紫杉醇、长春新碱等抗微管的药物均能诱导 Bcl-2 的磷酸化并活化 Raf-1,诱导癌细胞的凋亡,但 DNA 损伤类、抗代谢类和烷基类药物却不能。Raf-1/Bcl-2 磷酸化代表了一个独特的抗微管药物诱导的细胞凋亡信号传导通路^[7]。

二、紫杉醇诱导细胞凋亡与 C-Mos 基因表达的关系

C-Mos 是 p39 原癌基因表达的一个重要的细胞抑制因子,它能稳定成熟因子(MPF),使细胞分裂停滞于分裂 II 期^[8]。Fukasawa 等报道,Swiss3T3 细胞转化 C-Mos 基因并使其大量表达,导致分裂阻滞,细胞凋亡,提示有可能是 C-Mos 蛋白启动了这种凋亡途径^[9]。

Ling 等发现紫杉醇能诱导 KB 细胞发生分裂阻滞,cyclinB1 表达增多,cdc2/cyclinB1 激酶的活化和细胞凋亡^[10]。他们用 50ng/ml(IC₅₀)的紫杉醇处理人卵巢癌 SKOV3 细胞后,亦观察到细胞分裂阻滞、cyclinB1 表达增多和 cdc2/cyclinB1 激酶的活化,24 小时后出现细胞凋亡,高峰出现在药物处理 48 小时后。C-Mos 基因的表达及活化出现在 24 小时后,与细胞凋亡同步。用喜树碱、长春新碱等作用于微管的抗癌药物处理

SKOV3 细胞,均能诱导 C-Mos 基因的表达及活化,而且这种作用发生在细胞分裂停滞之后,与细胞凋亡同步^[11]。Sagata 等报道,过量表达 C-Mos 基因的细胞往往停滞于 G₁/S 或 G₂/M 期,单层细胞变圆、分散并死亡,与用 C-Mos 处理后的情况相似^[12],提示紫杉醇诱导的细胞分裂阻滞与凋亡可能或多或少是由 C-Mos 基因的表达所介导的。关于紫杉醇诱导的 C-Mos 基因表达及活化与 Raf-1 激酶活化之间的关系正在进一步的研究中。

三、紫杉醇诱导细胞凋亡与 JNK/SAPK 的关系

JNK/SAPK (c-jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases)参与和 MAPK (mitogen-activated protein kinases)相平行的信号传导通路。活化的 JNK/SAPK 能够磷酸化多种转录因子,参与多种类型的癌细胞凋亡。Wang 等报道作用于微管的抗癌药物如紫杉醇能通过 Ras 和 ASK1 (apoptosis signal-regulating kinases)的信号传导激活多种癌细胞 JNK/SAPK,从而导致细胞凋亡,但不清楚 JNK/SAPK 的活化是否是紫杉醇诱导细胞凋亡所必需的^[13]。用紫杉醇处理 BR 卵巢癌细胞 2~4 小时后 JNK/SAPK 的活化即达到高峰,而此时细胞凋亡还十分微弱,说明 JNK/SAPK 的活化不是紫杉醇诱导细胞凋亡的次级反应。抑制 JNK/SAPK 信号级联能抑制紫杉醇诱导的细胞凋亡,却不能抑制顺铂诱导的细胞凋亡,提示 JNK/SAPK 活化是由于微管系统的失效而引起的^[14]。

JNK/SAPK 亦参与活化细胞凋亡所必需的 caspases 抑制 JNK/SAPK 级联能抑制经紫杉醇处理后细胞 caspases-3 的活化、PARP 的降解及 DNA 的片段化,提示 JNK/SAPK 是 caspases 活化的上游步骤。

wt-ASK1、wt-Rac 或 wt-JNK (wt; wild type)的过量表达均能促进 BR 细胞的凋亡,而 dn-ASK1、dn-Rac 或 dn-JNK (dn; dominant-negative)的表达只能暂时抑制紫杉醇诱导的细胞凋亡,当细胞处理 24~48 小时后,这些缺陷型信号因子就不能抑制紫杉醇诱导的 DNA 片段化,这与 JNK/SAPK 活化高峰出现于紫杉醇处理后 2~4 小时的现象相一致。由于 JNK/SAPK 信号级联不能改变细胞周期的变化,也不能影响用紫杉醇处理 24 小时后出现的分裂阻滞,G₂/M 期阻滞可能是紫杉醇诱导细胞凋亡后期的主要原因,说明紫杉醇诱导的细胞凋亡后期不依赖于 JNK/SAPK 的活性。

Wang 等的研究结果表明在 Rb 细胞中,JNK/SAPK 活性峰出现在 2 小时,而 Bcl-2 磷酸化及细胞周期阻滞需要紫杉醇处理 12~16 小时,这种时间上的差异表明 Bcl-2 磷酸化不太可能发生于 JNK/SAPK 活化

之前。抑制 JNK/SAPK 的活化不能影响紫杉醇诱导的 G₂/M 阻滞及 Bcl-2 的磷酸化,而且 Bcl-2 磷酸化只发生在 G₂/M 阻滞期,说明 JNK/SAPK 的活化和 Bcl-2 磷酸化属于不同的相独立的途径。以上研究提示紫杉醇诱导的细胞凋亡在早期依赖于 JNK/SAPK 的活化,而后期不依赖于 JNK/SAPK 的活化^[14]。

四、紫杉醇诱导细胞凋亡与 p53 的关系

了解细胞因子是否在肿瘤治疗中的作用是十分重要的。p53 是一种在肿瘤治疗中起重要作用的细胞因子,被认为是基因组的守护者。当细胞被作用于 DNA 的抗肿瘤药物处理后, p53 的含量会迅速上升, p53 含量的上升往往能激活一系列基因的表达从而导致细胞凋亡,癌细胞 p53 野生株往往比隐性株对许多抗肿瘤药物的敏感性要高。紫杉醇不能直接作用于 DNA,但能诱导某些细胞的 p53 表达,这主要是因为紫杉醇诱导了 Raf-1 的级联反应^[15]。另一些类型的细胞包括一株卵巢癌细胞经紫杉醇处理后,不能诱导 p53 的产生,而且野生型 p53 的表达与否不能改变其对紫杉醇的敏感性^[16]。Wahl 等报道,野生型 p53 的表达能降低紫杉醇对细胞的毒性,这可能是由于经紫杉醇处理后产生了一个依赖于 p53 的 G₁ 期阻滞,而阻止细胞进入紫杉醇发挥作用的 G₂/M 期^[17]。Wu 等报道破坏正常 p53 的作用导致紫杉醇对人卵巢癌细胞毒性降低^[18]。Fan 等对 8 株淋巴瘤细胞和淋巴母细胞(4 株 p53 野生型和 4 株 p53 突变型)研究发现,经 DNA 损伤性药物处理后, p53 突变型比野生型的生长抑制要轻,而用抗微管药物如紫杉醇或长春新碱处理后,二者的生长抑制没有明显的差别^[19]。看来 p53 的表达对紫杉醇的细胞毒性的影响与不同的细胞类型及实验条件有关。

为了确定紫杉醇的细胞毒性与 p53 的关系,Debernardis 等对 9 株人卵巢癌细胞进行了研究(包括 5 株 p53 野生型和 4 株 p53 突变型)。研究表明,紫杉醇对这 5 株 p53 野生型癌细胞与 4 株 p53 突变型癌细胞的 IC₅₀ 没有显著差异,将野生型 p53 导入 p53 突变株中,紫杉醇的细胞毒性亦没有显著变化。紫杉醇对这 9 株卵巢癌细胞的 IC₅₀ 足以诱导表达野生型 p53,而不足诱导突变型 p53, p53 含量的增加导致下游基因如 p21 waf-1 和 bax 的表达,但这并不能解释紫杉醇诱导的凋亡或细胞毒性的变化。用浓度接近 IC₅₀ 的紫杉醇处理这 9 株癌细胞,均未观察到细胞凋亡,提高紫杉醇浓度即能观察到 DNA 的梯度降解^[20]。Rakovitch 等报道结肠癌 RKO 细胞对紫杉醇的敏感性与 p53 的状态有关, p53 缺陷株比野生株对紫杉醇的敏感性强 4

倍,但他们认为紫杉醇的细胞毒性与 p53 的诱导是个相独立的过程^[21]。Woods 等的研究结果显示紫杉醇能诱导两种形式的细胞周期阻滞,导致两种不同途径的凋亡。一种是分裂前期阻滞导致 p53-非依赖性快速启动的凋亡途径,另一种是 G₁ 期阻滞导致的 p53-依赖性缓慢启动的凋亡途径^[19]。说明 p53 不是紫杉醇诱导对癌细胞毒性的决定因素,只有在细胞凋亡作用被激活时, p53 才有可能成为细胞对抗肿瘤药物起反应的决定因素。

五、紫杉醇诱导细胞凋亡具有浓度依赖性

微管在细胞分裂、胞内物质传递、细胞运动及维持细胞形态等方面具有重要作用。高浓度的紫杉醇能使细胞形成稳定的微管束,生成大量的微管聚合物,使细胞分裂停滞于 G₂/M 期。用低浓度(10nmol/L)的紫杉醇处理 HeLa 细胞(20 小时)能诱导 90% 的细胞停滞于 G₂/M 期,主要是由于抑制了纺锤体的运动而造成的,此浓度下紫杉醇已能使 HeLa 细胞发生凋亡。当除去培养基中的紫杉醇(10nmol/L ~ 1 000nmol/L)被阻滞的细胞不能继续繁殖,这些细胞不能通过分裂后期或胞质分裂期,而是进入一个类似于分裂间期的状态,没有额外的 DNA 合成和多倍体的形成, DNA 继续降解为核小体,细胞在 48 ~ 72 小时内死亡。这些观察结果表明紫杉醇诱导的细胞死亡有多种不同的机制,而且对药物的浓度有依赖性^[22],这对临床采用短时冲击疗法是有益的启示。

为了解不同浓度紫杉醇引起的细胞死亡是同一种还是不同机制造成的,有几个问题必须解决:① Raf-1 是不是低浓度诱导细胞死亡的一个重要步骤;②严重的微管破坏是否是激活 Raf-1 所必需的;③如何将激活 Raf-1 所需的浓度与紫杉醇诱导的周期阻滞相联系。Torres 等用不同浓度的紫杉醇(1nmol/L ~ 250nmol/L, 18 小时)处理一株肺癌细胞 A549 研究 DNA 含量的变化、Raf-1 的活化情况、微管的亚细胞结构和核形态的变化。当紫杉醇浓度 ≥ 9nmol/L 时, Raf-1 被活化;而在浓度为 1nmol/L ~ 7nmol/L 时,微管系统已开始遭受破坏,说明微管系统的破坏在 Raf-1 未活化之前就开始了;Raf-1 的活化与 G₂/M 期阻滞相同步, Raf-1 的缺失导致细胞停滞于 G₂/M 期,说明 Raf-1 在 G₂/M 期发挥重要作用。低浓度紫杉醇诱导细胞的死亡并不依赖于 Raf-1 的活化,在低于激活 Raf-1 所必需的浓度时, p53 及 p21 waf-1 都能被诱导产生。这说明紫杉醇诱导的细胞凋亡由二种机制产生,一是在低浓度时(< 9nmol/L)诱导细胞畸形分裂并死亡的 Raf-1 非依赖性机制;二是在高浓度时(≥ 9nmol/L)诱导细

胞分裂阻滞于 G₂/M 期并死亡的 Raf-1 依赖性机制^[23]。

总结及展望

紫杉醇抗癌机制的进一步明了,为更科学地制定临床治疗方案提供更可靠的指导,有利于发挥其最佳疗效。综上所述,紫杉醇进入细胞内可能诱导多条不同的凋亡途径,但这些途径大多是推理性的,不同的癌细胞及不同的实验条件对紫杉醇诱导细胞凋亡机制的研究有一定影响,不同癌细胞的凋亡途径亦不尽相同,目前为止还没有一个系统的理论来解释紫杉醇诱导的细胞凋亡。而且紫杉醇的抗肿瘤作用是多种机制共同作用的结果,有待进一步研究。相信随着分子生物学技术的发展和药理学研究的进一步深入,紫杉醇抗癌机制将会有突破性进展,其应用范围必将得到广泛拓展。

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(96038402)。

参考文献

- 1 Haklar S, Chintapalli J, Croce CM. *Cancer Res*, 1996; 56(5): 1253~1255
- 2 Scatena CD, Stewart ZA, Mays D, et al. *J Biol Chem*, 1998; 273(46): 30777~30784
- 3 Haklar S, Jena N, Croce CM, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92(10): 4507~4511
- 4 Haklar S, Basu A, Croce CM, et al. *Cancer Res*, 1998; 58(8): 1609~1615
- 5 Fang G, Chang BS, Kim CN, et al. *Cancer Res*, 1998; 58(15): 3202~3208
- 6 Ibrado AM, Liu L, Bhalla K, *Cancer Res*, 1997; 57(6): 1109~1115
- 7 Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, et al. *Cancer Res*

- 1996; 56(8): 1851~1854
- 8 Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, et al. *Nature*, 1989; 342(6249): 521~518
- 9 Fukasawa K, Rulong S, Resau J, et al. *Oncogene*, 1995; 10(1): 1~8
- 10 Ling YH, Consoh U, Tornos C, et al. *Int J Cancer*, 1998; 75(6): 925~932
- 11 Ling YH, Yang Y, Tomos C, et al. *Cancer Res*, 1998; 58(16): 3633~3640
- 12 Sagata N, *Bioessays*, 1997; 19(1): 13~21
- 13 Wang TH, Wang HS, Ichijo H, et al. *J Biol Chem*, 1998; 273(9): 4928~4936
- 14 Wang TH, Popp DM, Wang HS, et al. *J Biol Chem*, 1999; 274(12): 8208~8216
- 15 Blagosklonny MV, Schulte TW, Nguyen P, et al. *Cancer Res*, 1995; 55(20): 4623~4626
- 16 Graniela Sire EA, Vikhanskaya F, Broggin M. *Ann Oncol*, 1995; 6(6): 589~593
- 17 Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, et al. *Nat Med*, 1996; 2(1): 72~79
- 18 Wu GS, El Deiry WS. *Nat Med*, 1996; 2(3): 255~256
- 19 Fan S, Cherney B, Reinhold W, et al. *Clin Cancer Res*, 1998; 4(4): 1047~1054
- 20 Debernardis D, Sire EG, De Feudis P, et al. *Cancer Res*, 1997; 57(5): 870~874
- 21 Rakovitch E, Mellado W, Hall EJ, et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999; 44(5): 1119~1124
- 22 Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, et al. *Cancer Res*, 1996; 56(4): 816~825
- 23 Torres K, Horwitz S B. *Cancer Res*, 1998; 58(16): 3620~3626

(收稿:1999-12-29 修回:2000-02-31)

脑肿瘤诊治新技术(国家级继续教育)学习班通知

经卫生部批准(编号:2000-04-04-011)脑肿瘤诊治新技术学习班定于2000年10月16日至25日在苏州大学附属第二医院举办。请国内著名专家、教授授课(授18学分)。已开始报名,联系人周晓炜,苏州市三香路181号(邮编215004)苏州大学附属第二医院卫生部科教科。TEL:0512-8281647 转 3346, FAX:0512-8284303, Email: szqhdnah@pub.sz.jsinfo.cn.

苏州大学附属第二医院
2000.5.5