

金丝桃素光动力学疗法与其诱导细胞凋亡、抗凋亡信号转导系统

白 洁^{1,2}, 杨得坡^{1,2*}

(1. 中山大学药学院 生药学与天然药物化学实验室, 广东 广州 510275;

2. 中山大学 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 金丝桃素在光诱导下产生活性氧, 利用其光动力学治疗(PDT)在肿瘤细胞中显示出细胞毒作用, 能以浓度和光依赖的方式诱导肿瘤细胞产生凋亡与坏死; 通过细胞凋亡、抗凋亡信号转导通路调节细胞死亡程序。临床上利用 PDT 的金丝桃素被认为是安全、有效的新型抗肿瘤药物。

关键词: 金丝桃素; 光动力学疗法; 细胞凋亡; 信号转导

中图分类号: R 285 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)01-0106-03

Photodynamic therapy with hypericin and its signaling pathway system of apoptosis and antiapoptosis

BAI Jie^{1,2}, YANG De-po^{1,2}

(1. Department of Natural Drug Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University,

Guangzhou 510275, China; 2. Gene Engineering Key Laboratory of Ministry of Education,

Sun Yet-sen University, Guangzhou 510275, China)

Key words: hypericin; photodynamic therapy (PDT); apoptosis; signaling pathway

金丝桃素(hypericin)为萘并二蒽酮类化合物, 存在于贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 及同属植物。1911 年, Cerny 命名 hypericin, 1957 年 Brockmann 从贯叶连翘和 *Hirsutum* 中首次分离得到金丝桃素, 并完成了全合成工作。金丝桃素除具有抗抑郁、抗炎、免疫等药理作用外^[1,2], 还是一种有效的光敏剂, 在光动力学治疗(Photodynamic Therapy, PDT)中表现出强的诱导肿瘤细胞凋亡与抗病毒的活性^[3,4]。近年来, 金丝桃素因其对人体无基因毒性与系统性毒性, 作为一种有效、安全的抗肿瘤药物, 引起人们的广泛兴趣。本文涉及金丝桃素 PDT 及其诱导细胞凋亡、抗凋亡的信号转导作用。

1 光动力学疗法(PDT)

PDT 是一种新的治疗肿瘤的技术, 将光敏剂集聚于恶性组织, 在与之吸收光谱相匹配的光激活下, 基态的光敏剂经短暂存在的激发态单线态转变成成为激发态三线态光敏剂, 后者一方面作用于组织底物, 其产物与氧作用生成各种氧化物; 另一方面它直接将能量转移给氧, 形成单线态氧¹O₂, 单线态氧和氧化物都具有细胞毒作用, 尤其是单线态氧是 PDT 诱导肿瘤损伤的主要形式, 它能对肿瘤细胞产生不可逆的光损伤, 除了直接引起肿瘤细胞的死亡以外, 在体内实验中 PDT 能使肿瘤血管发生重大变化, 导致血流阻滞、血管破裂或渗漏等^[5]。此外, PDT 也能引起细胞因子和其他炎症介质的释放, 产生炎症反应, 这种作用机制与组织类型及光敏剂的特性等因素有关。

2 金丝桃素的 PDT

2.1 金丝桃素的光敏性: 金丝桃素是最有效的光敏剂之一, 具有很大的三线态量子产额(quantum yield), 并能有效地产生¹O₂^[6]。体外实验表明金丝桃素可以抑制蛋白激酶 C (PKC)、上皮生长因子受体、酪氨酸激酶活性, 并且具有琥珀酸氧化酶的活性。金丝桃素的光敏作用可使呼吸控制比率和线粒体膜电势($\Delta\Psi_m$)下降^[7]。 $\Delta\Psi_m$ 降低, 目前被认为是细胞凋亡早期阶段的特征性表现: 细胞皱缩、细胞核裂解、DNA 片段化。此作用可能与线粒体通透性改变导致氧化磷酸化的解偶联以及产生超氧阴离子有关, 因此线粒体可能是金丝桃素的重要靶标, 并与其抗肿瘤活性有关^[8]。一项对接种 RIF-1 肿瘤的 C3H 小鼠的研究发现, 金丝桃素在光照条件下给药 0.5 h 后主要分布在肿瘤血管中; 而在无光照情况下, 6 h 后肿瘤细胞中药物浓度达到最大, 但在血管中荧光微弱, 由此说明血管损伤也是金丝桃素诱导的 PDT 抗肿瘤的重要途径^[9]。

2.2 金丝桃素的细胞毒作用: PDT 可以快速清除肿瘤细胞, 在肿瘤活组织检查中发现, 存在细胞凋亡与坏死区域。光敏剂诱导细胞凋亡和坏死的效价与细胞类型、光敏剂浓度、亚细胞定位、光照强度等因素有关^[6]。光敏剂的亚细胞定位决定了光损伤的细胞内位点, 是影响细胞死亡的关键因素。Hela 细胞能高度富集金丝桃素, 并对光诱导产生的细胞毒作用有良好的反应性。对癌细胞的检查发现金丝桃素位于细胞核周围, 很可能分布在内质网与高尔基体内^[7]。这种亚细

* 收稿日期: 2003-04-30

基金项目: 国家教育部高等学校骨干教师资助基金项目; 广州市科技局重大项目(2000-Z-101-01)

作者简介: 白 洁(1976—), 女(回族), 安徽省阜阳市人, 中山大学生命科学院博士生, 主要从事天然药物的研究与开发。

* 通讯作者 Tel: (020) 84113967 E-mail: ls39@zs.u.edu.cn

胞分布可在金丝桃素与癌细胞共同孵育 30 min 内达到, 并且不受细胞外金丝桃素的浓度和随后的光照条件的影响。增加金丝桃素浓度, 肿瘤细胞由凋亡转变为坏死。浓度在 80 ~ 250 nmol/L 光激活的金丝桃素引起的细胞死亡, 几乎都是由于诱导细胞凋亡引起的。在光照条件下, 增加金丝桃素的浓度达到 1 $\mu\text{mol/L}$ 时可产生细胞坏死^[6]。采用 125 nmol/L 的金丝桃素进行 PDT, 光照后很快就产生凋亡的特征性形态改变。需要强调的是, 在这个过程中细胞死亡严格地依赖光照, 因为在没有光照的条件下金丝桃素的浓度即使达到 10 $\mu\text{mol/L}$, 与对照组比较都没有显著性差异。细胞内 ATP 的水平是决定细胞死亡的关键因素。1 $\mu\text{mol/L}$ 光激活的金丝桃素还能导致细胞总 ATP 水平和线粒体呼吸功能显著不可逆地下降, 当细胞 ATP 耗竭达到临界值时凋亡信号可以转变为坏死信号^[10]。金丝桃素在 PDT 中促进细胞凋亡并不伴随主要的炎症反应, 但是否可以将其作为治疗优势还需进一步探讨。

3 金丝桃素 PDT 诱导细胞凋亡和抗凋亡信号转导通路

3.1 促凋亡 caspase 介导的信号通路: 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 caspases 介导了濒死细胞中高度特异的蛋白裂解活动, 集中体现了细胞凋亡的表型。Caspases 按结构和功能可分为上游/起始 caspases 和下游/效应 caspases。一旦被激活, 起始 caspases 即转活化其他的 caspases 酶原, 引起级联反应。Caspases 信号级联反应的发生主要通过 2 种机制实现, 即死亡受体介导的信号系统和线粒体调节的途径。PARP [poly (ADP-ribose) polymerase] 是效应 caspase-3 和 caspase-7 的细胞核底物之一, PARP 的断裂被作为细胞凋亡程序执行的标志。引起细胞凋亡浓度的光激活金丝桃素可以诱导 PARP 断裂成凋亡特征性的片断。zVAD-fmk 是广谱的 caspase 抑制剂, zDEVD-fmk 是 caspase-3 的专属抑制剂, 在给予光照之前均能有效地阻断凋亡状态下 PARP 的断裂。两者都能有效地拮抗金丝桃素诱导的凋亡, 特别是 zDEVD-fmk 能阻止膜空泡的形成。Serpins 类似物的抑制剂 CrmA (优先作用于 caspase-1 和-8) 在 HeLa 细胞中的过量表达不能保护由金丝桃素诱导的细胞凋亡。由于 CrmA 的过量表达能有效的阻断 TNF 和 Fas 在此细胞系中诱导的细胞凋亡, 认为金丝桃素诱导的凋亡不依赖于 TNF-R₁ 和 Fas 介导的 caspase 信号通路^[6,11]。使用单克隆抗体 Fas (SM 1/23), FasL (Nok-2), TNF-R₁ (M AB225) 和多克隆兔抗人 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) 抗血清对死亡受体的分析结果表明, TRAIL 抗体能阻断 TRAIL 与金丝桃素诱导的 Jurkat 细胞凋亡; 而 SM1/23 和 NOK-2 抗体不能阻断金丝桃素诱导的凋亡, M AB225 无效, 说明金丝桃素诱导的细胞凋亡部分地通过 TRAIL/TRAIL-受体系统和对上游的 caspase 的激活而起作用^[12]。金丝桃素在 Jurkat 细胞中诱导的细胞凋亡与 caspase-8 的激活作用有关, 能被 caspase-8 抑制剂 2-ETD-FMK 所阻断。因为 caspase-8 是细胞死亡受体的上游起始 caspase, 因此认为 TNF 受体家族可能参与金丝桃素诱导的细胞凋亡。Ali 等在研究金丝桃素对鼻咽癌细胞

的 PDT 中发现其能诱导死亡受体所介导的细胞凋亡^[13]。金丝桃素 PDT 的这种只对某些类型细胞 (如 Jurkat) 诱导 caspase-8 酶原的激活, 而对其他细胞无此作用的性质, 可能与其是否能产生有功能的死亡诱导信号复合物 (DISC) 有关^[14]。因此需进一步对多种类型的细胞进行研究, 以证明金丝桃素 PDT 诱导的细胞凋亡与死亡受体介导的通路有关。

金丝桃素作用于线粒体结合的己糖激酶, 导致能量代谢和神经胶质瘤细胞存活率的变化。在光照条件下, 长期存在于金丝桃素溶液中的神经胶质瘤细胞, 其凋亡特征性的 DNA 片段化, 金丝桃素诱导 HeLa 细胞的光敏作用可使线粒体释放细胞色素 C 和激活 caspase-3 酶原, 引起细胞凋亡。因此, 金丝桃素介导的 caspase 信号级联反应可通过非受体依赖的途径参与线粒体调节的机制而激活 caspase-3 酶原。在 125 $\mu\text{mol/L}$ 金丝桃素光敏化的细胞质中, 细胞色素 C 聚集很快, 24 h 后即可检测到; 1 $\mu\text{mol/L}$ 金丝桃素 PDT 可导致细胞色素 C 从线粒体到细胞质的快速释放。在这两种情况下, 细胞色素 C 的释放先于只在凋亡情况下才发生的 PARP 的断裂和细胞核片段的形成。由此可以推断 1 $\mu\text{mol/L}$ 光激活的金丝桃素启动了凋亡程序, 随后所发挥的是过量的光损害作用^[6]。

3.2 抗凋亡 JNK/p38 MAPK 信号通路: 由于线粒体激活的蛋白激酶 MAPK 信号通路在决定细胞死亡过程中起重要作用, Patrizia 等^[6]研究了金丝桃素的光敏活性对 MAPK 家族成员: 细胞外信号调节激酶 ERK、c-Jun N-末端激酶 JNK1 和 p38 MAPK 激酶的作用, 发现引起凋亡浓度的金丝桃素能快速持续性的激活 JNK1 和 p38 MAPK, 而严重抑制基础水平的 ERK2 的活性; 而未被光激活的金丝桃素对此 2 种激酶均无作用。在 HeLa 细胞中观察 PDT 对于 MAPK 活性的影响, 可认为是金丝桃素治疗作用在细胞水平上的反映。使用光敏剂苯卟啉衍生物 BPD 进行 PDT 表现出诱导 JNK1 和 p38 MAPK 的活性, 并且这些应激激酶的活性能被加入抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸所反转, 提示 ROS 抑制剂和激酶活性之间存在一定的关联。与此不同的是, 金丝桃素诱导的应激激酶的活性并不受抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸影响。使用 BPD 进行 PDT 时不抑制 ERK 通路, 但是金丝桃素进行 PDT 时却能抑制 ERK 通路^[15]。ERK 通路能促进细胞的增殖, JNK/p38 MAPK 信号通路能保护细胞, 是 PDT 中细胞反应的生存信号; JNK/p38 MAPK 和 ERK 的活性间存在的平衡决定了在细胞应激后是否激活细胞的程序性死亡。特别地, ERK 的失活和 JNK/p38 MAPK 的激活或者两者同时发生是影响细胞凋亡的关键性因素。另外, JNK1/p38 MAPK 通路和 caspase 激活作用在 PDT 中可能存在着相互关系, 光激活的金丝桃素对 JNK1 和 p38 MAPK 信号级联反应的作用并不需要激活 caspase-3, 因此认为 caspase 的激活作用是位于 JNK1 和 p38 MAPK 激活的下游或是其所不依赖的途径。

JNK1 和 p38 MAPK 可以保护 HeLa 细胞免受 PDT 诱导的细胞毒性, 很可能是通过诱导生存基因的转录, 直到细

胞毒的破坏作用达到引起细胞凋亡的临界阈值而延迟细胞凋亡的进程,但它们不能对抗由金丝桃素所诱导的细胞死亡。金丝桃素可以维持 JNK1 和 p38 MAPK 的活性,但与此同时其又能不可逆的抑制促生长的 ERK 信号系统,与保护

反应形成抗平衡而导致细胞的死亡。这种不能有效提高细胞存活反应可能也是金丝桃素 PDT 在体内抗肿瘤的原因之一^[7]。金丝桃素诱导的凋亡和抗凋亡的信号转导通路如图 1 所示。

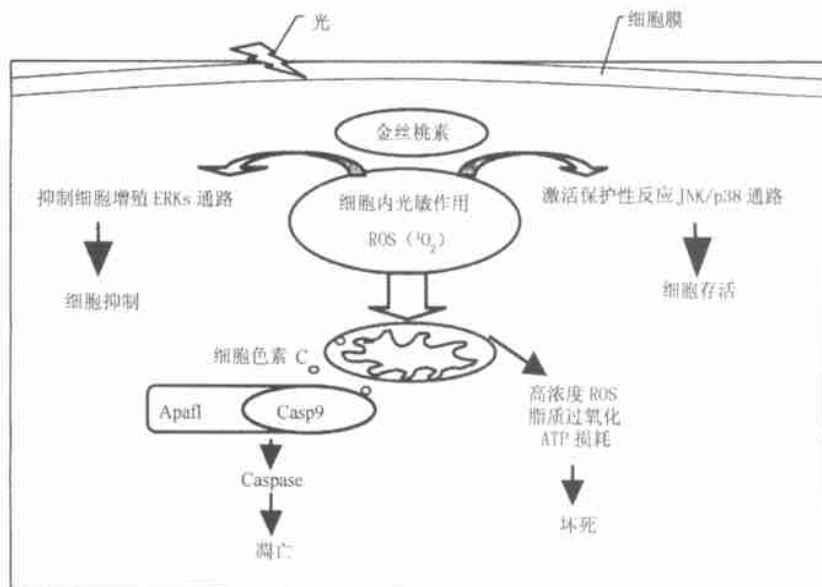


图 1 金丝桃素光动力学治疗诱导的信号转导通路

Fig. 1 Signaling pathways induced by hypericin with photodynamic therapy

4 结语

金丝桃素光细胞毒性作用的分子机制揭示其作为光敏剂以浓度和光依赖的方式诱导肿瘤细胞凋亡与坏死。金丝桃素 PDT 能通过对多种凋亡和抗凋亡信号转导通路的作用,对细胞的死亡程序产生正向或是负向调节,诱导细胞凋亡。临床上利用金丝桃素 PDT 有效的治疗了人类基底、鳞状细胞瘤和膀胱癌等^[16]。金丝桃素为安全、有效的天然药物,采用 PDT 技术,该化合物可以选择性地富集于肿瘤组织,而对健康组织的损伤很小,有关的分子药理学与临床试验证实,它是一种新型的抗肿瘤药物。

References:

- [1] Robert B R. Screen of receptor and uptake-site activity of hypericin component of St. John's Wort reveals receptor binding [J]. *Pharm Lett*, 1998, 62(16): 291-294.
- [2] Peter M B, Susanne B M, Lienhard S. Hypericin as a non-antioxidant inhibitor of NF- κ B [J]. *Planta Med*, 1999, 65: 277-300.
- [3] Miskovsky P. Hypericin—a new antiviral and antitumor photosensitizer mechanism of action and interaction with biological macromolecules [J]. *Curr Drug Targets*, 2002, 3(1): 55-84.
- [4] Prince A M, Pascual D, Merudo D. Strategies for evaluation of enveloped virus inactivation in red cell concentrates using hypericin [J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71(2): 188-195.
- [5] Dougherty T J, Gomer C J, Henerson B W, et al. Photodynamic therapy [J]. *Cancer Inst*, 1998, 90: 889-905.
- [6] Patrizia A, Zerihun A, Annelies V, et al. Apoptotic and anti-apoptotic signaling pathways induced by photodynamic therapy with hypericin [J]. *Advan Enzyme Regul*, 2000, 40: 157-182.
- [7] English D S, Doyle R T, Petrich J W, et al. Subcellular distributions and excited-state processes of hypericin in neurons [J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 69(3): 301-305.
- [8] Roman C, Patrice X P. Over-expression of bcl-2 does not protect cells from hypericin photo induced mitochondrial membrane depolarization, but delays subsequent events in the apoptotic pathway [J]. *FEBS Lett*, 1999, 462: 295-301.
- [9] Chen B, Xu Y, Roskams T. Efficacy of antitumoral photodynamic therapy with hypericin: relationship between biodistribution and photodynamic effects in the RIF-1 mouse tumor model [J]. *Int J Cancer*, 2001, 93(2): 275-282.
- [10] Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 1835-1840.
- [11] Patrizia A, Annelies V, Wilfried M, et al. Hypericin in cancer treatment: more light on the way [J]. *Internat J Biochem Cell Biol*, 2002, 34: 221-241.
- [12] Schempp C M, Simon-Haarhaus B, Termeer C C, et al. Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8 [J]. *FEBS Lett*, 2001, 493: 26-30.
- [13] Ali S M, Chee S K, Yuen G Y, et al. Hypericin induced death receptor-mediated apoptosis in photoactivated tumor cells [J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(6): 601-616.
- [14] Fulda S, Meyer E, Friesen C, et al. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 1063-1075.
- [15] Tao J, Sanghera J S, Pelech S L, et al. Stimulation of stress-activated protein kinase and p38 HOG1 kinase in murine keratinocytes following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 27107-27115.
- [16] Kamuhabwa A A, Cosserrat-Gerardin I, Didelon J, et al. Biodistribution of hypericin in orthotopic transitional cell carcinoma bladder tumors: implication for whole bladder wall photodynamic therapy [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(2): 253-260.