

# 白藜芦醇抑制细胞增殖研究新进展

钟 芳, 罗少军, 汤少明\*

(广东医学院附属医院整形外科研究所, 广东 湛江 524001)

**摘 要:** 白藜芦醇具有抗癌、抗增生性疾病的作用, 近年来, 有关其抑制细胞增殖的研究表明白藜芦醇能抑制 DNA 的复制; 干扰细胞周期, 使其发生  $G_1/S$  与  $S/G_2$  阻滞; 还能干预信号转导通路, 拮抗性激素等使细胞生长受阻。白藜芦醇也能通过诱导凋亡导致细胞数减少, 从而抑制细胞增殖。

**关键词:** 白藜芦醇; 细胞周期; 信号转导; 细胞凋亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)05-附 2-03

## Progress in study on mechanism of resveratrol inhibiting cell proliferation

ZHONG Fang, LUO Shao-jun, TANG Shao-ming

(Institute of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China)

**Key words:** resveratrol; cell cycle; signal transduction; cell apoptosis

白藜芦醇(resveratrol), 化学名为 三酚(3, 5, 4'-三羟基-均二苯乙炔), 分子式  $C_{14}H_{12}O_3$ , 相对分子质量 228.25, 有顺式和反式两种结构形式。白藜芦醇是一种天然活性成分, 于 1940 年首次从毛叶藜芦 *Veratrum grandiflorum* (Maxim.) Loes. f. 的根部提取获得。它广泛存在于种子植物中, 目前至少在虎杖、葡萄等 21 个科、31 个属的 72 种植物中有发现<sup>[1]</sup>。白藜芦醇具有抗炎、抗氧化、抑制血小板聚集等作用, 是多种中药治疗炎症、脂类代谢和心脏疾病等的有效成分。随着研究的深入, 人们发现白藜芦醇对肿瘤及其他增生性疾病具有治疗作用, 而抑制细胞增殖是其发挥治疗作用的重要机制之一。

### 1 白藜芦醇对异常增殖的抑制作用

作为一种肿瘤化学预防剂, 白藜芦醇在癌的起始、促进、进展三个主要阶段均起抑制作用, 其机制可能与其抗环氧化酶-1 有关。而作为一种肿瘤化学治疗剂, 抑制肿瘤细胞增殖可能是白藜芦醇抗癌的重要作用机制之一。Huang<sup>[2]</sup>的研究亦显示白藜芦醇可通过抑制肿瘤促进剂对启动细胞的增殖和上调凋亡来减少实验性肿瘤的发生。白藜芦醇能明显抑制人前列腺癌细胞株 LNCap, PG-3, DU-145 和 JAG-1 的生长, 且具有一定的剂量反应关系, 提示其作用机制可能与影响细胞有丝分裂及凋亡有关<sup>[3]</sup>。Clement 等在对 HL-60 的研究中亦得出类似的结论。

白藜芦醇除了能抑制肿瘤细胞增殖外, 对其他异常增殖的细胞也有抑制作用。肝成肌纤维细胞在肝纤维化和肝癌的进程、发展中起重要的作用, 人们的兴趣集中在寻求能使这些细胞失活的药物。白藜芦醇能诱导肝成纤维细胞表型的改变, 显著减少成细胞的增殖, 同时减少 I 型胶原蛋白的表达和金属蛋白酶 9 的分泌, 对肝纤维化和肝癌的治疗有重

要意义<sup>[4]</sup>。Kenichi 等<sup>[5]</sup>研究发现白藜芦醇能通过抑制 DNA 的合成来减少 AGEs 刺激的 SHRSP(中风倾向的自发高血压鼠)血管平滑肌细胞的增殖, 为动脉粥样硬化治疗提供更安全的替代药物。由此可见, 白藜芦醇抑制细胞增殖在抗增生性疾病中有重要的作用。

### 2 白藜芦醇干扰细胞生长

2.1 白藜芦醇抑制细胞 DNA 的复制: DNA 的复制是细胞分裂增殖的必要条件。白藜芦醇对鼠肥大细胞瘤细胞株 P815 和人髓性白血病细胞株 K562 都有很强的抑制 DNA 合成的能力, 其可能的机制是由于白藜芦醇有清除小蛋白 RNA 还原酶的酪氨酸基来抑制 RNA 还原酶的活性<sup>[6]</sup>。白藜芦醇还能抑制 DNA 聚合酶, 对该酶的抑制即可以从根本上降低 DNA 的合成能力, 从而达到抑制细胞增殖的作用<sup>[7]</sup>。这些充分提示干预 DNA 的复制是白藜芦醇抑制细胞增殖的重要机制之一。

2.2 白藜芦醇诱发细胞周期的阻滞: 机体组织的再生与修复, 肿瘤的发生与治疗都与细胞周期有密切的关系, 而白藜芦醇能使多种细胞发生细胞周期阻滞。Fulvio 等<sup>[8]</sup>发现白藜芦醇能干扰早幼粒白血病细胞株 HL-60 从 S 到  $G_2$  阶段进程。而在人前列腺癌细胞株 LNCap, PG-3, DU-145 和 JAG-1 中加入一定浓度白藜芦醇后, 可以引起细胞出现  $G_1$  期阻滞, 且有一定的剂量效应反应关系<sup>[3]</sup>。

细胞周期的调控有赖于细胞周期素依赖激酶(CDK), 细胞通过对 CDK 的正负调控作用来维持自身增殖分裂的平衡。其中 P21, P27 和 P16 等能使 CDK 失活, 为其负调节子。而细胞周期素(cyclin)能激活 CDK, 是 CDK 的正调节子。细胞通过调节子规律的表达和降解来介导细胞进入正常的细胞周期。研究中当白藜芦醇作用于 HL-60 后, 参与  $G_1$  期的

\* 收稿日期: 2002-08-21

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(B2001082)

作者简介: 钟 芳(1972—), 女, 湖南省湘阴县人, 硕士学位, 研究方向为烧伤晚期瘢痕的基础研究与临床治疗。Tel: 0759-2387408

CDK2, CDK4, CDK6, P21CIP1, P27Kip1 以及 cyclinD1, D2 和 D3 均未受影响, 而且作为 CDK2 和 CDK4/CDK6 激活标志的磷酸化 RB 蛋白的量与对照组相比无显著变化。但 cyclin A, cyclin E 有明显增加, 且作为进入 G<sub>2</sub>/M 期受阻标记的 Tyr15 磷酸化 CDK2 的累积也在实验中测得, 这与用流式细胞仪发现的细胞出现 S/G<sub>2</sub> 期阻滞这一结果相一致。白藜芦醇这种抑制细胞增殖的作用是可逆的, 实验中将药物撤去一定时间后, HL-60 细胞又可以恢复到正常的增殖活性, 表明白藜芦醇的干扰作用是非毒性方式的。白藜芦醇也能通过抑制 RB 蛋白的表达, 干扰人前列腺癌细胞株的生长周期, 使其不能完成从 G<sub>1</sub> 期到 S 期的转化<sup>[3]</sup>。由此可见, 白藜芦醇能通过影响细胞周期素的表达以及对 CDK 抑制的作用, 最终导致 CDK 活性降低, 从而通过细胞周期素—细胞周期素依赖激酶机制来实现细胞周期阻滞作用, 但其具体的阻滞路径则有细胞种属特异性。

野生型 p53 基因是一种肿瘤抑制基因, 能抑制细胞恶性转变, 同时亦是细胞周期相关蛋白, 它能通过对 G<sub>1</sub>/S 检校点的作用, 控制细胞增殖, 是细胞生长的负调节子。p53 的上调诱导 p21WAF1/CIP1 的转录, 后者是细胞周期调节关键的负性调节子, 阻滞细胞于各检校点。白藜芦醇能通过增加 p53, p21 的表达抑制牛肺动脉内皮细胞 (BPAE) 增殖, p53 的上调还可以通过与 DNA 自然的相互作用来保护基因组的完整性, 这些都造成了牛肺动脉内皮细胞的 G<sub>2</sub> 期阻滞。白藜芦醇也能通过上调 p53 来诱导凋亡相关基因 bax 表达, 从而诱导凋亡而抑制增殖<sup>[9]</sup>。可见诱导野生型 p53 表达增加可能也是白藜芦醇诱发细胞周期阻滞的作用机制之一。

2.3 白藜芦醇干预与细胞增殖有关的信号转导通路: AP-1 是一类由早基因编码的核转录因子, 细胞可通过多种机制活化 AP-1, 参与细胞周期的调控, 而 AP-1 信号转导通路的异常活化能使细胞增殖失控, 因而 AP-1 的活化状态与细胞的增殖密切相关。NF- $\kappa$ B 是另一个多效转录因子, 它在细胞增殖、凋亡等多种生物学过程中起关键作用。NF- $\kappa$ B 与 AP-1 又称为氧应激转录因子, 其活性受细胞内氧化还原状态的调控。在很多实验中, 活性氧可作为细胞对生长因子反应的第二信使, 促进细胞生长。白藜芦醇是超氧阴离子自由基和羟自由基很强的捕获剂, 同时它可以提高谷胱甘肽等的含量, 以抑制细胞内的活性氧, 影响细胞内氧化还原状态。白藜芦醇还可能通过阻滞 ROI 的产生和脂质过氧化来抑制 AP-1, NF- $\kappa$ B 及相关激酶 MEK 和 JNK 的活性, 从而抑制细胞增殖<sup>[10]</sup>。Kong 等<sup>[11]</sup>也发现一些酚类化合物如白藜芦醇能通过抑制 G-Src 非受体酪氨酸激酶来抑制 TPA 或 UV 诱导的 AP-1 活化, 提示白藜芦醇有可能通过抑制这些信号激酶来阻止细胞增殖。

花生四烯酸 (AA) 和它的代谢产物在细胞增殖调节中亦起重要作用。而 COX 能催化 AA 反应生成前列腺素 (PGs)。白藜芦醇作用于 3T6 成纤维细胞后, 能抑制 ROS 的产生, 从而减少活化 PLA<sub>2</sub> 的膜转位以及由此产生的 AA 释放和 PGE<sub>2</sub> 的产生, 抑制 3T6 细胞增殖。白藜芦醇还可以通过抑

制 NF- $\kappa$ B 介导的基因复制来抑制 COX, NOS, MMP-9 等的表达, 也可以通过抑制 PKC 的活性, 阻滞 AP-1 介导的基因表达来抑制 COX-2 的转录和活性, 或是直接对 COX-2 活性产生抑制作用, 从而来调节 AA 的释放和代谢, 抑制细胞增殖<sup>[10, 12, 13]</sup>。这些实验结果可以部分解释白藜芦醇对细胞的生长调节效应, 可见抑制 AP-1, NF- $\kappa$ B 的活化是白藜芦醇抑制细胞增殖的重要机制, 但其具体的机制尚不完全清楚。

白藜芦醇干预 MAPK 信号转导通路。Mowafy 等<sup>[14]</sup>发现将白藜芦醇短期作用于猪冠状动脉后, 能抑制血管平滑肌增殖和收缩, 并具有明显的 MAPK 活性抑制 (IC<sub>50</sub> = 37  $\mu$ mol/L), 用免疫印迹检测可发现 ERK-1/2 磷酸化水平增加, JNK1 和 p38 的下降。

2.4 白藜芦醇作为性激素的拮抗剂抑制细胞增殖: 在子宫内膜腺癌细胞 MCF-7 中, 白藜芦醇能拮抗由 17- $\beta$ -雌二醇诱导的生长促进子 (PR) 和黄体酮 (ER) 的表达, 从而抑制细胞增殖。另外, 在有或无 17- $\beta$ -雌二醇存在的条件下, 白藜芦醇都能抑制 MCF-7 的增殖, 诱发细胞 G<sub>2</sub> 期阻滞, 增加 cyclin A, cyclin E 的表达, 而 CDK2 的表达减少, 并呈现一定的时相反应特点。提示白藜芦醇在 MCF-7 中抗增殖作用的机制可能是雌激素依赖或非依赖的<sup>[15]</sup>。

也有极少报道白藜芦醇作为雌激素受体激动剂能刺激雌激素依赖的乳腺癌细胞增殖, 但该实验结果尚没有得到广泛印证和重复。对于雄激素依赖细胞, 白藜芦醇通过影响细胞周期和诱导凋亡来负性调节前列腺癌生长。而对于非雄激素敏感细胞的作用, 则有很多争议, 各实验结果尚不尽一致。

### 3 白藜芦醇促进细胞凋亡

细胞凋亡似乎是机体既去除内部的个别“破坏分子”又保持结构和功能正常的代价最小的方式, 因而促进细胞凋亡对于肿瘤治疗以及抗增生性疾病等具有重要的意义。研究发现白藜芦醇可促进多种细胞凋亡, 而且常伴有 CD95 (FasL) 的表达增加。Clement 等发现白藜芦醇是通过 CD95 信号依赖方式激活 caspase 家族而介导人白血病细胞株 HL-60 和乳腺癌细胞株 T4TD 细胞凋亡的。而其作用正常外周血淋巴细胞 PBLS 72 h 后, 对其细胞生存无明显影响, 认为这可能与作用后的 PBLS 细胞表面 CD95 表达无变化有关。

近年来发现线粒体在白藜芦醇诱导的细胞凋亡过程中亦起重要作用。已发现白藜芦醇能通过增加线粒体、促进线粒体 CytC 释放、引起线粒体通透性转变, 以及线粒体膜的极化和 caspase-9 的活化等途径而引起多种细胞凋亡<sup>[16, 17]</sup>, 并能通过一个神奇的线粒体途径诱导 CEM-CTH<sub>2</sub> 细胞凋亡<sup>[18]</sup>。白藜芦醇尚可通过 p53 依赖, NF- $\kappa$ B 等其他途径诱导细胞凋亡<sup>[2, 9]</sup>。然而, 也有报道白藜芦醇通过抑制 NF- $\kappa$ B 途径来抗凋亡<sup>[11]</sup>, 这与其抑制细胞增殖的作用相矛盾, 而 NF- $\kappa$ B 并不能抑制所有细胞凋亡可能是其合理的解释。

### 4 结语

机体通过保持其细胞增殖和分化的动态平衡来维持其自身的正常生理功能, 细胞过度增殖导致机体发生增生性病

变,甚至癌变。而肿瘤的本质就是细胞恶性过度增殖。白藜芦醇作为一种低毒的天然药物,能通过阻滞细胞生长和诱导凋亡两种途径来抑制细胞增殖,提示其在临床治疗增生性疾病甚至肿瘤上具有广阔的应用前景。然而有关这方面的分子机制尚不完全清楚,尚需进一步研究。

## References:

- [1] Tyler V E. Grape expectations compound in grapes may fight cancer includes related articles on grape-seed extract and on *Echinacea* [J]. *Prevention*, 1997, 49(6): 80-84.
- [2] Huang C S, Ma W Y, Goranso A, *et al.* Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway [J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(2): 237-242.
- [3] Hsieh T C, Wu J M. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 249: 109-115.
- [4] Sandrine G, Stephanie K, Baptiste C, *et al.* Deactivation of cultured human liver myofibroblasts by trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol [J]. *Hepatology*, 2000, 31(4): 922-931.
- [5] Mizutani K, Ikeda K, Yamoei Y. Resveratrol inhibits AGEs-induced proliferation and collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274: 61-67.
- [6] Fontecave M, Lepoivre M, Elieingand, *et al.* Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase [J]. *FEBS Lett*, 1998, 421: 277-279.
- [7] Sun N J, Woo S H, Cassady J M, *et al.* DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61: 362-366.
- [8] Ragione F D, Cucciolla V, Borriello A, *et al.* Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G<sub>2</sub> phase transition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250: 53-58.
- [9] Hsieh T C, Juan G, Darzynkiewicz Z, *et al.* Resveratrol increase nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G<sub>2</sub> [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 2596-2601.

- [10] Manna S K, Mukhopadhyay A, Aggarwal B B. Resveratrol suppress TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- $\kappa$ B, activator protein-1 and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation [J]. *J Immunol*, 2001, 164: 6509-6519.
- [11] Tongkong A N, Yu R, Hebbar V, *et al.* Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds [J]. *Mutat Res*, 2001, 481: 231-241.
- [12] Subbaramaiah K, Chang W J, Michaluart P, *et al.* Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cell [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(34): 21875-21882.
- [13] Moreno J J. Resveratrol modulates arachidonic acid release, prostaglandin synthesis, and 3T6 fibroblast growth [J]. 2000, 294(1): 333-338.
- [14] El-Mowafy A M, White R E. Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effect [J]. *FEBS Lett*, 1999, 451(1): 63-67.
- [15] Bhat K P, Pezzuto J M. Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 6137-6144.
- [16] Mouria M, Gukovskaya A, Jung Y, *et al.* Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis [J]. *Int J Cancer*, 2002, 8(5): 761-769.
- [17] Dorrie J, Gerauer H, Wadter Y, *et al.* Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activated caspase 9 in acute lymphoblastic leukemia cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4731-4739.
- [18] Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, *et al.* Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2 [J]. *FASEB J*, 2001, 15(9): 1613-1615.

(上接第 472 页)

“七五”国家重点科技攻关项目。其内容之一“丹参类专题研究”,对丹参类早已做好深入、细致、全面的研究,并有明确的结论:综合比较测定结果,以甘西鼠尾的有效成分含量高,药理作用最强,质量最好,植物资源又非常丰富,且已有商品在全国流通,值得推广使用,并于更深入的研究后建议药典收载<sup>[3]</sup>。

综上所述自建国以来,野生丹参资源量贫乏,分布零星,一直供不应求。近些年来有关丹参的研究日趋广泛和深入,含丹参的产品不断开发,市场需求日益增长。鉴于此情,建议国家药品监督管理局、国家药典委员会,不应忽视甘肃丹参,应组织有关部门和专家,对该品种进行详细考察,尽快使其成为药典品种;或将其作为部颁标准品种;或采取临时措施,作为各地方药监部门《登记备案》品种,使其合法地进入生产、经营流通领域。

甘肃丹参的产区,主要分布于我国西部地区的深山和高原,经济落后,大多是国家级贫困地区,其中定西还是联合国认定的世界级贫困地区之一。产区经济以林业、林副业和畜牧业为主,环境洁净、无

工业污染,属“绿色中药材”范畴。国家应尽快组织有关部门,积极开展野生变家种研究,走资源保护和开发利用相结合之路;按照国家中药材生产质量管理规范(GAP)的原则,建立像“云南三七”、“四川川芎”、“甘肃当归”、“甘肃大黄”等地道、适种的“甘肃丹参”产区,结合目前国际上兴起的“绿色保健”潮流,走“产品西移”之路,既可物尽其用,又能为贫穷的西部增加一项长期、永久的经济收入来源。

致谢:对本集团公司张德荣老师的帮助和指导表示感谢。

## References:

- [1] Peng S H, Yuan L M, Han M L. Survey of pharmacological study of *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2000, 24(9): 690.
- [2] Teng Y F. Advances in study on medicinal resource of *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Resource of Chinese Wild Plant (中国野生植物资源)*, 2001, (2): 1.
- [3] Jian Y H. *Special Study on Plants of Radix Salviae Miltiorrhizae Variety Sort and Quality Control of Common Chinese Medicinal Materials* [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 1994.
- [4] Deng Q H, Liang Z H, Zeng Y L. Proposals on quality control of *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2001, 24(7): 521.