

- [8] Li Y J. Determination of pyrethroids pesticides multi-residues in tea by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2002, 30(7): 865-868.
- [9] Sun X Y. Determination of organophosphorus pesticide residues in Chinese traditional medicine by GC-PCI-MS [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2003, 22(3): 35-38.
- [10] Pan Y H. Rapid analysis of trace organophosphorus pesticides in water by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2000, 28(6): 666-671.
- [11] Granby K. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 520(1/2): 165-176.
- [12] Legang J. New development in determination of food pesticide residues [J]. *Food Sci*, 2002, 23(3): 148-152.
- [13] Ercegovich C D, Vallejo R P, Getting R R, et al. Development of a radio-immunoassay for parathion [J]. *J Agric Food Chem*, 1981, 29: 559-563.
- [14] Andreou V G, Clonis Y D. A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol-gel entrapped bromocresol purple for in-field use [J]. *Biosens Bioelec*, 2002, 17(1-2): 61-69.
- [15] Abad J M, Pariente F, Hernandez L, et al. Determination organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensor [J]. *Anal Chem*, 1998, 70(14): 2848-2855.
- [16] Lou X H, Wu Q F. Study on determination of heavy metal elements in *Paeonia lactiflora* by UV method [J]. *Guangdong Trace Elem Sci* (广东微量元素科学), 2004, 11(1): 38-40.
- [17] Wu Q F. Determination of heavy metals in *Corydalis yanhusuo*. W. T. Wang and its acetic acid procession by UV method [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2002, 19(5): 401-403.
- [18] Chen S T. Using flame atomic absorption to determine trace elements of heavy metals in vegetative samples [J]. *Mod Sci Instrum* (现代科学仪器), 1999, (3): 30-32.
- [19] Wang A P. Determination of the contents of As, Pb and Hg in Chinese medicinal materials by microwave-digestion and atomic fluorescence spectrometry [J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2003, 17(1): 26-28.
- [20] Qiao F X. Simultaneous determination of trace arsenic and antimony in root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry [J]. *J Hebei Univ; Nat Sci* (河北大学学报: 自然科学版), 2004, 24(2): 163-167.
- [21] Gu Y Z. Determination of micro heavy metal elements in *Radix Aconiti lateralis preparata* of Sichuan origin by ICP-AES [J]. *Sichuan Envir* (四川环境), 1999, 18(1): 1-4.
- [22] Liang S M. Determination of harmful heavy metals in powders of *Panax ginseng* [J]. *Chem Adhesion* (化学与粘合), 2003(4): 205-206.
- [23] Dolan S P. Analysis of dietary supplements for arsenic, cadmium, mercury, and lead using inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(5): 1307-1312.

白藜芦醇抗肿瘤作用机制的研究进展

刘宏胜

(天津市第一中心医院, 天津 300192)

白藜芦醇(resveratrol)是1940年Takaoka从毛叶藜芦中分离出来的一种多酚类化合物,化学名为芪三酚(3,5,4'-三羟基-均二苯代乙烯)。它是许多植物受到真菌感染、紫外线照射或病理状况下产生的一种抗毒素。70多种天然植物中含有白藜芦醇及其苷,包括藜芦、决明、虎杖、葡萄、桑子、花生、凤梨等。葡萄皮中的量最高,为50~100 μg/g;红葡萄酒中的量为1.5~12 mg/L^[1]。研究表明白藜芦醇不但具有抗血栓、抗突变、抗氧化、抗炎等作用,而且具有抑制肿瘤的作用^[2],本文就白藜芦醇的抗肿瘤作用机制进行综述。

1 促进细胞凋亡

细胞凋亡是细胞自身调节的主动性死亡过程,它不引起炎症反应,机体不会因此发生不良反应,因而细胞凋亡是肿瘤治疗研究的一个重要领域。白藜芦醇以诱导肿瘤细胞凋亡的方式抗肿瘤无疑显示了其在肿瘤治疗中的潜在应用价值。

研究发现白藜芦醇可促进多种肿瘤细胞凋亡。唐旭东等^[3]报道白藜芦醇诱导鼻咽癌细胞CNE-2Z凋亡过程中伴有caspase-3的活化。实验中用不同浓度的白藜芦醇处理CNE-2Z细胞,Western-blot检测到caspase-3的酶元减少,半定量RT-PCR发现caspase-3的mRNA水平呈浓度依赖性的升高($P < 0.01$),caspase-3的活性也呈浓度依赖性($P < 0.01$)。刘宏胜等^[4]报道采用不同浓度白藜芦醇处理C6

胶质瘤细胞和TJ905人脑恶性肿瘤细胞,MTT检测结果表明白藜芦醇对C6和TJ905细胞具有抑制作用,并呈时间-剂量依赖性。

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Cyt c释放、引起线粒体通透性改变,以及线粒体膜的去极化和caspase-9的活化等途径而引起多种细胞凋亡^[5,6],并能通过一个神奇的线粒体途径诱导CEM-CTH₂细胞凋亡^[7]。白藜芦醇还可通过p53依赖、NF-κB等其他途径诱导细胞凋亡^[8,9]。

周海波等^[10]研究发现不同浓度的白藜芦醇对胃癌细胞均有明显的抑制作用,且呈时间-剂量依赖性。进一步证实诱导细胞凋亡是白藜芦醇杀伤胃癌细胞的作用机制之一。Bcl-2和bax的比率决定了细胞凋亡的发生与否。研究结果表明,白藜芦醇可使胃癌细胞的bcl-2 mRNA表达水平和蛋白表达水平下调,而对bax则上调其mRNA表达水平和蛋白表达水平,从而使bcl-2和bax的比率下降,这可能是白藜芦醇诱导胃癌细胞凋亡的分子机制之一,即通过下调Bcl-2的表达和上调bax的表达而实现。

Lin等^[11]研究发现白藜芦醇对前列腺肿瘤细胞具有促凋亡活性,而对正常细胞无损伤。研究表明,白藜芦醇能引起

人表皮样瘤细胞 A431 发生不可逆的 G₁ 期细胞周期停滞而诱导该细胞凋亡。

Narayanan 在白藜芦醇诱导甲状腺瘤细胞系凋亡的实验中证明白藜芦醇是通过受体酪氨酸激酶 Ras-MAPK 和促分裂素原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号转导途径来促进 p53 的表达^[12,13]。白藜芦醇诱导的 NAG-1 基因的表达可能是由 p53 表达所介导的^[14], 但白藜芦醇提高肿瘤抑制蛋白 p53 的表达比 NAG-1 感应要早。NAG-1 的启动子区域的 p53 连接位点在控制白藜芦醇诱导的 p53 表达中起关键作用。

胜利等^[15]用 MTT、流式细胞术等方法探讨白藜芦醇对胆囊瘤细胞 (GBC) 和正常成纤维细胞 (3T3) 体外增殖的影响。结果显示白藜芦醇呈浓度依赖性抑制 GBC 细胞的生长与增殖, 抑制率最高可达 54%。白藜芦醇能明显诱导 GBC 细胞凋亡, 凋亡率最高为 30.52%; 处理组 G₁ 期细胞比例升高 (55.47±3.95)%, S 期细胞减少, 呈明显的 G₀/G₁ 期细胞阻滞现象。GBC 细胞的 bcl-2、c-myc 基因蛋白表达降低, 而 p53 基因蛋白表达增强。可见, 白藜芦醇能通过诱导 GBC 细胞凋亡而抑制其生长与增殖, 但对 3T3 细胞无此作用。

Delmas 等^[16]研究表明白藜芦醇作用于大肠癌细胞后, 不能增加肿瘤细胞表面死亡受体的数量, 但可引起 CD95 的重新分布, 逃避 Bcl-2 介导的抑制作用, 诱导肿瘤细胞凋亡。Liu 等^[17]发现白藜芦醇作用于 VW228-3 髓母细胞瘤可上调 CYP1A1 的表达, 下调 CYP1B1 的表达, 通过不依赖 Fas 途径诱导细胞凋亡, 从而抑制肿瘤细胞生长。

2 对细胞周期的作用

Ahmad 等^[18]报道白藜芦醇主要对 G₁-S 和 S-G₂ 细胞周期发挥作用。白藜芦醇以剂量和时间依赖方式诱导细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 (CDK) 抑制蛋白 p21^{WAF-1} 的产生, 并能减少细胞周期蛋白 (Cyclin) D1、D2、E 和 CDK2、CDK4、CDK6 的蛋白表达, 从而造成人表皮瘤 A431 细胞的 G₁ 期停滞, 使细胞不能完成从 G₁ 期至 S 期的转化, 并认为这一过程是不可逆的, 将最终导致细胞凋亡。

还有研究则认为白藜芦醇能通过阻断细胞 S 期和 G₂ 期的进展而抑制牛肺动脉内皮细胞增殖。Park 等^[19]则进一步发现白藜芦醇在低浓度 (30~60 mmol/L) 时能诱导细胞的 S 期停滞, 浓度过高反而无此活性, 同时还认为这一阻断过程是可逆的。

于良等^[20]利用小鼠移植性肝癌 H₂₂ 模型研究白藜芦醇的体内抗肿瘤效果。免疫组织化学法检测实验组与对照组小鼠肝癌及瘤旁肝组织 CyclinD1、CyclinB1 和 p34cdc2 蛋白的表达情况。结果白藜芦醇治疗组能不同程度抑制小鼠肝脏移植瘤的生长。10 mg/kg 和 15 mg/kg 的白藜芦醇的抑瘤分别为 36.3% 和 49.3%, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 白藜芦醇治疗组癌组织中 CyclinD1 的表达无明显变化 ($P > 0.05$), 而 CyclinB1 ($P < 0.05$) 和 p34cdc2 ($P < 0.05$) 的表达明显降低。揭示白藜芦醇抗肝癌的机制可能是通过抑制 CyclinB1 和 p34cdc2 的表达影响细胞周期的进程, 可能是白藜芦醇抗癌作用的机制之一。

朱青等^[21]应用流式细胞术检测白藜芦醇对人肝癌 HepG2 细胞周期影响, 结果显示白藜芦醇使 Hep G₂ 细胞周期明显阻滞于 G₁ 期。

Gao 等^[22]进行白藜芦醇对白血病 32Dp210 细胞的体内外试验。体外试验表明, 白藜芦醇的半数抑制浓度为 23 μmol/L, 可将细胞周期阻滞在 G₁-S 期, 提高 caspase-3 的活性, 切割 DNA 片断引起细胞的凋亡, 抑制 32Dp210 细胞的增殖。

3 抗氧化、抗自由基作用

氧化反应和自由基损伤被公认为是引起细胞 DNA 损伤进而导致细胞恶变的重要机制之一。最近研究表明^[23]白藜芦醇能以剂量依赖方式减轻由铬离子和 H₂O₂ 引起的 DNA 氧化损伤, 并指出这一保护作用与其直接清除羟自由基的能力有关。

朱振勤等^[24]以离体 HeLa 细胞为材料, 利用细胞培养法研究了白藜芦醇抗肿瘤活性的功效, 以及产生这种功效的途径。旨在从自由基生物学的角度进一步揭示白藜芦醇活性的机制。噻唑蓝法及流式细胞仪分析结果表明, 白藜芦醇能强烈抑制 HeLa 细胞增殖并阻断 HeLa 细胞由 S 期向 G₂ 期转变。HeLa 细胞内源性活性氧 (ROS) 及 HeLa 细胞内部氧化还原态的实验结果表明, 白藜芦醇对细胞自分泌的总 ROS 有一定的抑制作用; 同时, 白藜芦醇可明显提高 HeLa 细胞内源 SOD 的活性以及还原型谷胱甘肽 (GSH) 的水平, 但可使过氧化氢酶 (CAT) 的活性显著下降, 提示白藜芦醇能显著改变细胞内部的氧化还原态。以上结果为白藜芦醇抗癌机制提供了自由基生物学方面的实验依据。

4 拮抗雄、雌激素及改变自分泌生长调节因子

Serrero 等^[25]报道, 白藜芦醇能最大限度地抑制雌二醇介导的 ER⁺ 阳性乳腺癌 MCF-7 细胞生长, 但不影响细胞的活力。从分子水平看, 白藜芦醇实际上是剂量依赖性地拮抗 MCF-7 细胞生长刺激效应, 此种效应由 MCF-7 细胞中的雌二醇报告基因和孕酮受体基因表达所致。

Kuwajerwala 等^[26]发现白藜芦醇对雄激素敏感的前列腺癌 LNCaP 细胞 DNA 合成具有剂量及时间依赖性的双向作用, 即经 5~10 μmol/L 白藜芦醇处理 1 h, 可抑制细胞 DNA 合成, 而处理 24 h 后则刺激细胞 DNA 合成达 2~3 倍, 核蛋白 p21^{CIP1} 和 p27^{KIP1} 的表达水平明显降低, 而 CyclinA-CDA2 的活性相对增高, 这可能反应了低浓度白藜芦醇对细胞 DNA 合成的促进作用, 这种作用只发生在对雄激素敏感的 LNCaP 细胞, 而在与雄激素分泌无关的 DU145 细胞和 NIH3T3 细胞中未见这种现象。可见白藜芦醇还可以通过抑制前列腺癌细胞雄激素的活性及表达来拮抗雄激素的作用。

白藜芦醇也能抑制雌激素受体阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-468 的增殖。这一发现提示, 除了拮抗雌激素受体机制外, 白藜芦醇也能通过自分泌生长调节因子来抑制乳腺癌细胞的增殖^[27]。

5 抑制细胞色素酶

白藜芦醇抗肿瘤作用本质上与其抗异生素致癌活性相关。异生素是指非生物性来源的化学物质,如杀虫剂、工业污染物等。白藜芦醇能通过抑制二恶英受体(AhR)介导的CYP基因反式激活以及通过抑制自由基的产生,来控制肿瘤始发突变。Revel等^[28]的研究表明,白藜芦醇实际上也是AhR的竞争物,能在体外和体内的很多器官里,有效地阻断CYP1A1的表达。这些结果表明,白藜芦醇是细胞色素P₄₅₀的抑制剂。Potter等^[29,30]发现,白藜芦醇在细胞色素P₄₅₀酶CYP1B1的作用下,转化为一种羟基化产物,此产物已被证明是一种抗白血病因子。该发现提示,肿瘤内的CYP1B1能通过催化白藜芦醇生成羟基化产物而抑制肿瘤生长,而CYP1B1也就起着肿瘤抑制酶的作用。这些结果无疑对白藜芦醇在癌症防治方面的应用提供了新思路。

6 诱导解毒酶

解毒酶包括谷胱甘肽-S转移酶、鸟喙啉-双磷酸葡萄糖醛酰基转移和醌氧化还原酶等。白藜芦醇能诱导解毒酶,把致癌性的异生素共轭成无活性的化合物,从而通过新陈代谢将其排除。Kensler等^[31]研究表明,白藜芦醇能诱导鼠肝癌细胞中的醌氧化还原酶(药物代谢酶)将致癌物BaP转化为一种醌而解毒。这些解毒酶的转录是通过抗氧化剂(亲电子反应)诱导。虽然白藜芦醇能抑制异生素介导的CYP基因的反式激活,但对抗氧化剂诱导的解毒酶转录无抑制活性,因此白藜芦醇不能抑制解毒酶的产生。

7 结语

白藜芦醇这一广泛存在于自然界中的植物补体,是一种很有希望天然化学防癌剂。在不久的将来,很有希望用于临床肿瘤的治疗。因而大力开发白藜芦醇和富含白藜芦醇的植物,将具有重大的市场前景。

References:

- Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 2003, 275(5297): 218-220.
- Sun A Y, Simonyi A, Sun G Y. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of phylenods [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(4): 314-318.
- Tang X D, Zhou K Y. Activation of caspase-3 during resveratrol induced apoptosis of CNF-2Z cells [J]. *Immunol J*, 2003, 19(1): 23-29.
- Liu H S. Studies on effects of resveratrol in inhibiting growth of C6 and TJ905 glioma cell. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(11): 1695-1696.
- 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): 767-769.
- Dorrie J, Geraucher 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.
- 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.
- Huang C S, Ma W Y, Goranso A, et al. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 20(2): 237-242.
- Hsieh T C, Juan G, Darzynkiewica Z, et al. Resveratrol increase nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21^{WAF1/CIP1} and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G₂[J]. *Cancer Res*, 2000, 59: 2596-2601.
- Zhou H B, Su J Y. Molecule mechanism inducing gastric cancer apoptosis by resveratrol [J]. *China J Dig* (中华消化杂志), 2003, 23(30): 188-189.
- Lin H Y, Shih A, Davis F B, et al. Resveratrol induces serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line [J]. *J Urol*, 2002, 168(2): 748-755.
- Narayanan B A, Narayanan N K, Re G G, et al. Differential expression of genes induce by resveratrol in LNCap cells p53-mediated molecular targets [J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(2): 204-212.
- Shih A, Davis F B, Lin H Y, et al. Resberatrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK and p53 dependent mechanism [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(3): 1223-1232.
- Back S J, Wilsom L C, Eling T E. Resberatrol enhances the expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53 [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(3): 425-434.
- Sheng L, An L F. Research on resveratrol's effects of suppressing growth and inducing apoptosis of GBC cells [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(6): 489-491.
- Delmas D, Rebe C, Lacour S, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-unducing signaling complex in colon cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 41482-41490.
- Liu J, Wang Q, Wu D C. Differential regulation of CYPIA1 and CYPIB1 expression in resveratrol-treated human medulloblastoma cells [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 363(3): 257-261.
- Ahmad N, Adhami V M, Afaw F, et al. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cell [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1466-1473.
- Park J W, Choi Y J, Jang M A, et al. Chempreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells [J]. *Cancer Lett*, 2001, 163(1): 43-49.
- Yu L, Sun Z J. Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer [J]. *Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2002, 23(23): 2172-2175.
- Zhu Q, Zhang W G. Resveratrol induced apoptosis and cell arrest in cancer cells [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2005, 26(21): 1935-1937.
- Gao X, Xu Y X, Divine G, et al. Disparate *in vitro* and *in vivo* antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes [J]. *J Nutr*, 2002, 132(7): 2076-2081.
- Burkhardt S, Reiter R J, Tan D X, et al. DNA oxidatively damaged by chromium and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxy knuramine, esveratrol and uric acid [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(8): 775-783.
- Zhu Z Q, Zhang X. Tie free radical biological mechanism involved in the effect of resveratrol on the inhibition of tumor activity of human cervix cancer hela cells *in vitro* [J]. *J East China Normal Univ* (华东师范大学学报), 2002, 23(2): 178-182.
- Bhat K P, Pezzuto J M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 957: 210-229.
- Kuwajerwulu N, Cifuentes E, Cautam S, et al. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into a phase and inhibits DNA synthesis [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9): 2488-2492.
- Serrero G, Lu R. Effect of resveratrol on the expression of autocrine growth modulators in human breast cancer cell [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3(6): 969-979.
- Revel A, Raanani H, Younglai E, et al. Resveratrol, a natural arylhydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo (a) pyrene [J]. *Reprod Toxicol*, 2002, 15(5): 479-486.
- Potter G A, Patterson L H, Wanogho E, et al. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome p450 enzyme CYP1B1 [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(5): 774-778.
- Ki Y, Muura Y, Yagasaki I. Resveratrol suppresses hepatoma cell invasion independently of its anti-proliferative action [J]. *Cancer Lett*, 2001, 167(2): 151-156.
- Kensler T W. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes [J]. *Environ Health Perspect*, 1997, 105(4): 965-969.