

## 常山酮抗肿瘤作用机制研究进展

车玉梅<sup>1</sup>, 何小鹏<sup>2</sup>, 徐洁<sup>1</sup>, 马超英<sup>1\*</sup>, 吕爱平<sup>2\*</sup>

1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031

2. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700

**摘要:** 常山酮(HF)是中药有效成分常山碱的衍生物, 长期作为广谱抗球虫药使用。近年来, 研究发现 HF 可促进伤口修复、抑制组织纤维化, 其在抗肿瘤临床前研究中表现尤为突出, 展示了 HF 抗肿瘤的巨大潜力。查阅近年来国内外相关文献, 从抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、抗血管新生、抑制纤维母细胞活化和抗炎等方面, 综述了 HF 抗肿瘤研究进展, 同时为 HF 的深入研究提供参考。

**关键词:** 常山酮; 肿瘤; 细胞凋亡; 血管新生; 炎症; Th17 细胞

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)05-0745-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.027

## Research progress on anticancer mechanisms of halofuginone

CHE Yu-mei<sup>1</sup>, HE Xiao-juan<sup>2</sup>, XU Jie<sup>1</sup>, MA Chao-ying<sup>1</sup>, LV Ai-ping<sup>2</sup>

1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical science, Beijing 100700, China

**Key words:** halofuginone; tumor; cell apoptosis; angiogenesis; inflammation; Th17 cells

肿瘤仍是当今世界危及人类生命最常见、最严重的疾病之一。因此, 全世界一直在寻找有效治疗肿瘤的方法和药物。常山酮(halofuginone, HF)是一种生物碱, 是中药有效成分常山碱的衍生物, 其分子式是  $C_{16}H_{17}BrClN_3O_3 \cdot HBr$ , 为白色或淡灰色结晶性粉末, 无臭, 味苦。关于 HF 的研究最早始于 1975 年, 很长一段时间其一直作为广谱抗球虫药使用。近年来, 随着对 HF 的深入研究, 发现 HF 可促进伤口修复、抑制组织纤维化<sup>[1]</sup>, 其在抗肿瘤临床前研究中表现尤为突出, 对肝癌、肉瘤、脑癌、膀胱癌、乳腺癌及前列腺癌等诸多癌症模型有显著的抑制作用, 本文现将其抗肿瘤作用机制研究进展进行综述。

### 1 抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡

HF 可以通过抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡来发挥抗肿瘤作用。研究表明, HF 在体内和体外均对多发性骨髓瘤(MM)有生长抑制作用,

HF 能显著抑制人白血病细胞株 NB4 增殖( $P < 0.001$ )并诱导凋亡( $P = 0.002$ ), 其效应具有剂量依赖性。低剂量的 HF 可将细胞周期停滞于 G<sub>1</sub>/S 过渡, 较高剂量 HF 使细胞在 G<sub>2</sub>+M 期大量积累<sup>[2]</sup>。

HF 抑制细胞增殖的作用与转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号通路有关, 但 HF 对 TGF- $\beta$  信号通路影响结果尚未定论, 有学者认为 HF 引起 TGF- $\beta$  水平升高, 刺激人母亲 DPP 同源物 3 (Smad3) 的磷酸化, 随后与 Smad4 形成二聚体复合物进入细胞核, 下调 MYC 启动子基因的表达, 产生了正反馈循环, 放大 P21 和 P15 的表达, 从而发挥抑制肿瘤细胞生长的作用<sup>[2]</sup>。也有研究表明, HF 作用平滑肌瘤和自体子宫肌层 2 种细胞, 引起 2 种细胞中 TGF- $\beta$ 1 mRNA、I 型胶原、III 型胶原 mRNA 水平的显著降低, 从而抑制细胞中 DNA 合成<sup>[3]</sup>。

p38 丝裂素活化蛋白激酶 (p38MAPK) 信号通路参与 HF 诱导肿瘤细胞凋亡。有研究发现, 即使

收稿日期: 2013-11-27

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-019); 国家自然科学基金资助项目(30902000)

作者简介: 车玉梅(1989—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药复方及物质基础和作用机制研究。

Tel: 18380276183 E-mail: bunnydrop@163.com

\*通信作者 马超英 Tel: (028)87601838 E-mail: mcy195888@126.com

吕爱平 Tel: (010)64014411 E-mail: lap64067611@126.com

在胰岛素样生长因子 1 或者白细胞介素-6 (IL-6) 存在的前提下, HF 亦可诱导 MM 细胞凋亡, 并且对正常组织中白细胞分化抗原 (CD40) 激活的外周血单核细胞无毒性。蛋白免疫印迹分析显示 HF 引起聚腺苷二磷酸核糖聚合酶, 半胱天冬蛋白酶 (caspases) -3、8 的裂解, 以及 caspases-9 量降低, 伴随着线粒体膜电位消耗, 并具有剂量依赖性。在 OPM2 和 RPMI-S 两种多发性骨髓瘤细胞中发现, 经 HF 处理后热休克蛋白 90 (Hsp-90) 水平显著升高, Hsp-27 量显著下降。此外, HF 上调促凋亡蛋白凋亡诱导因子 (AIF), 下调抗凋亡作用蛋白, 如髓样细胞白血病 1 蛋白 (Mcl-1)、连锁凋亡抑制蛋白 (X-IAP) 的表达。HF 诱导凋亡作用可能归功于 HF 对 p38MAPK 的激活作用, HF 诱导 c-jun 蛋白及下游 c-jun 的 N 端激酶 (JNKs) 磷酸化, 激活 JNK 是调节肿瘤细胞凋亡的重要途径之一。JNKs 通过反式激活特异性转录因子上调促凋亡基因, 或通过磷酸化事件直接调节线粒体促凋亡蛋白的活性<sup>[4]</sup>, 对 HF 抗肿瘤作用有重要贡献。

## 2 抑制肿瘤血管新生

肿瘤血管的生成对原发性肿瘤和转移性恶性肿瘤的生长至关重要。无血管生成的肿瘤其生长直径不超过几毫米。因此阻断肿瘤血管新生是一种有效的治疗肿瘤途径。血管新生是一个分子机制复杂的过程, 很难通过抑制某单一靶点达到抑制血管新生的效果。HF 能影响血管新生进程中诸多重要环节, 诸如抑制血管内皮细胞中金属蛋白酶 2 (MMP-2) 基因的表达、基底膜侵袭、毛细血管形成、血管发芽、以及皮下细胞外基质 (ECM) 沉积<sup>[5]</sup>, 从而有效抑制血管新生, 阻止肿瘤细胞的生长、转移和扩散。Elkin 等<sup>[6]</sup>采用异种移植和化学诱导的膀胱癌模型评估 HF 抗肿瘤作用, 尽管 HF 未能成功抑制新生小鼠增生性肿瘤出现前的改变, 但其有效抑制血管新生, 抑制胶原合成和 ECM 沉积, 有效阻止肿瘤细胞进入恶性入侵阶段。HF 在抑制原发肿瘤基质间质支持、血管新生和扩散转移方面卓有成效。此外, Abramovitch 等<sup>[7]</sup>利用磁共振成像技术, 监测了 HF 对植入转移性大鼠脑肿瘤模型中肿瘤进程和血管生成的影响。发现 HF 有效地抑制血管生成以及成熟、肿瘤生长, 并改变了肿瘤形态。

HF 抑制肿瘤血管新生作用与抑制 I 型胶原合成和金属蛋白酶 (MMPs) 有关。Gross 等<sup>[8]</sup>将临床获取的 VHL 嗜铬细胞瘤组织碎块移植于裸鼠, 观察

HF 对荷瘤小鼠和正常小鼠的影响, 实验结果表明: HF 降低血管密度、I 型胶原量、抑制 MMP-2 和 MMP-9 活性。另有研究表明<sup>[9]</sup>, HF 抑制肝癌细胞作用有限, 但能显著抑制其血管新生, 抑制肝癌的肺转移, 肝正常组织和病变组织中 MMP-2 和 MMP-9 的活性显著被抑制, 而以上 2 种蛋白在肿瘤转移中的重要性已经被广泛证实<sup>[10]</sup>。Zcharia 等<sup>[11]</sup>对 HF 抗肿瘤的分子机制进行了探索, 发现早期生长应答因子 1 (Egr-1) 结合 MMP-2 启动子从而抑制 MMP-2 的活性, HF 上调 Egr-1 和结合蛋白 2 (Nab-2), 进而加强对 MMP-2 的抑制作用, 而且 HF 的这一作用具有剂量和时间依赖性。

## 3 抑制纤维母细胞活化

纤维母细胞与肿瘤发展进程各个阶段密切相关, 其分泌的生长因子、趋化因子以及 ECM 促使内皮细胞和周细胞的血管生成补充。肿瘤微环境中纤维母细胞活化, 向肌成纤维细胞过渡。肌成纤维细胞是基质细胞的一种, 主要负责合成 ECM 和浸润肿瘤, 为肿瘤的生长、浸润和转移提供了重要的微环境<sup>[12]</sup>, 因此抑制纤维母细胞活化可作为癌症治疗的重要靶点。HF 通过抑制 TGF- $\beta$ /SRF 信号通路下游 Smad3 的磷酸化, 抑制了  $\alpha$  平滑肌收缩蛋白 ( $\alpha$ SMA) 和胶原的合成, 有效抑制肿瘤微环境中纤维母细胞向肌成纤维细胞过渡<sup>[13-14]</sup>, 控制了肿瘤细胞侵袭和转移, 使肿瘤细胞的生长和发展受到显著抑制。另有研究表明, HF 能引起纤维母细胞凋亡, 抑制 TGF- $\beta$ /Smad3 信号通路, 阻止基质细胞浸润并使 ECM 水平降低<sup>[15]</sup>, 从而有效抑制胰腺肿瘤细胞的发展。

## 4 对炎症反应的作用

细胞的微环境在肿瘤的发生和发展过程中有着重要作用, 炎症的调节因子和细胞效应分子是肿瘤微环境的重要组成部分, 在某些肿瘤中, 炎症出现于肿瘤发生之前, 或者原癌基因的变化诱导炎症, 进而促进肿瘤的发生, 如结肠炎病人患结肠癌风险高, 乙型肝炎是肝癌的主要诱因。炎症与肿瘤密切相关。总而言之, 肿瘤环境中的炎症对肿瘤的发生都有促进作用<sup>[16]</sup>。

HF 具有抗炎活性, 采用迟发超敏 (DTH) 小鼠模型评估 HF 这一作用, HF 有效抑制 DTH 反应, 表明 HF 可抑制 T 细胞介导的炎性反应。同时体外实验发现, HF 有效抑制活化 T 细胞中的核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、p38MAPK 以及炎性细胞因子的表达。

NF- $\kappa$ B 是关键的转录因子,通过对 NF- $\kappa$ B 的抑制,可避免致癌基因和抗凋亡基因活化,如生存素、细胞周期素 D1、原癌基因和 Bcl-xL、Bfl-1 等,增加细胞对凋亡的敏感性。这为 HF 作为抗肿瘤和抗炎潜在药物提供重要依据<sup>[17]</sup>。

### 5 抑制 Th17 细胞分化

目前认为, Th17 细胞在肿瘤中的作用依赖于发病背景,一方面, Th17 细胞特征性分泌的 IL-17 可通过诱导 IL-6 活化信号传导与转录激活因子 3 (Stat3) 途径,上调抗凋亡、促生长和促血管生成基因的表达,发挥促进肿瘤生长的作用;另一方面, IL-17 也能通过诱导趋化因子招募树突状细胞及杀伤性效应细胞至肿瘤位置,从而间接起到抗肿瘤的作用<sup>[18]</sup>。在肺癌、肝癌、胃癌等多种肿瘤患者癌组织的肿瘤浸润性淋巴细胞中, Th17 细胞明显上升,且 IL-17 水平与微血管、淋巴管密度成正比,可成为评估肿瘤疗效、判断预后和指导治疗的有效指标。在对 Th17 及其细胞因子升高的肿瘤微环境研究发现,肿瘤细胞可以分泌受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子 (RANTES)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 及促炎因子等,促进 Th17 的分化发育及维持 Th17 细胞生存。肿瘤相关单核细胞分泌的细胞因子如 IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 也可以调节 Th17 细胞分化发育,活化的 Th17 细胞分泌 IL-17、IL-21、IL-22 等促炎性因子<sup>[19-20]</sup>。因此,针对微环境中 Th17 及其细胞因子升高的肿瘤,可以 Th17 为作用靶点,抑制肿瘤发展进程。

HF 能选择性抑制人和小鼠 Th17 细胞分化,而不影响 IL-2、TNF、 $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 水平,以及效应 T 细胞产生的细胞因子的表达。Sundrud 等<sup>[21]</sup>进一步探索研究发现, HF 并未直接作用 TGF- $\beta$  和 IL-6 这两个指导 Th17 分化的主要细胞因子,对早期 IL-6 引起的 STAT3 蛋白磷酸化也没有抑制作用,但能在 HF 刺激后的 12 h 内,减少 STAT3 的持续激活,提示 HF 间接调节维持 STAT3 信号通路的细胞因子。HF 作用后, 81 个基因表达上调,其中大部分参与氨基酸运输、生物转化和蛋白质合成一系列氨基酸饥饿反应 (AAR) 包含的过程。HF 能显著激活 GCN2 蛋白,活化的 GCN2 磷酸化后作用于翻译起始因子 2A (eIF2 $\alpha$ ),导致蛋白质合成急剧减少,转录激活因子 4 (ATF4) 增多,最终激活 AAR, HF 这一作用不局限于 Th17 细胞。加入过剩的氨基酸后, AAR 激活被抑制,同时, HF 不再抑制 Th17

细胞分化。故推测 HF 通过激活 AAR 达到抑制 Th17 细胞分化的效果。

### 6 结语

HF 能明显增强多种人肿瘤细胞辐射敏感度<sup>[22]</sup>,增强低剂量化疗的抗肿瘤效果,同时避免高剂量化疗的毒副作用。HF 联合传统抗肿瘤制剂治疗实体瘤,如前列腺癌和肾胚胎瘤<sup>[14]</sup>,取得了较好的效果。HF 联合抗骨髓瘤制剂如雷利度胺、美法仑、阿霉素以及地塞米松,亦显示出协同细胞毒性<sup>[4]</sup>。HF 还可以预防肿瘤放射治疗后出现的腿痉挛,减轻正常组织在放射治疗后的纤维化<sup>[25]</sup>。HF 通过 TGF $\beta$  信号通路达到目的效果,如抑制 Smad2/3 的磷酸化,减少膜 TGF- $\beta$ RII 量,减少凝血酶敏感蛋白 (TSP1) 水平,以上信号分子中, TSP1 可作为合适的 HF 效应标志物<sup>[26]</sup>。

HF 从抗肿瘤血管新生,抗肿瘤细胞增殖、转移等多个重要环节有效抑制肿瘤发展进程,有作用靶点多和毒副作用小的优势。而且 HF 作为抗肿瘤辅助制剂可以提高低剂量化疗药物疗效,避免了高剂量化疗药物的毒副作用。有关 HF 抗肿瘤的研究已经深入到分子水平, TGF- $\beta$ /Smad3 信号通路是 HF 抗肿瘤作用的重要靶点。目前,临床前研究表明, HF 是非常有前景的抗肿瘤制剂,在国外 HF 已进入 I 期临床研究<sup>[27]</sup>,药动学研究表明, HF 最大耐受剂量为 3.5 mg/d,表现为恶心、呕吐及疲倦的剂量限制性毒性。国内尚未见 HF 抗肿瘤相关方面文献报道,本文对 HF 抗肿瘤研究现状进行了简述,以为后续深入研究提供参考。

### 参考文献

- [1] 梁洁, 张蓓, 刘佳宝, 等. 常山酮对大鼠肝纤维化的影响及其机制 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3352-3358.
- [2] De figueiredo-pontes L L, Assis P A, Santana-lemos B A, et al. Halofuginone has anti-proliferative effects in acute promyelocytic leukemia by modulating the transforming growth factor beta signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26713.
- [3] Young S L, Al-hendy A, Copland J A. Potential nonhormonal therapeutics for medical treatment of leiomyomas [J]. *Semin Reprod Med*, 2004, 22(2): 121-130.
- [4] Leiba M, Jakubikova J, Klippel S, et al. Halofuginone inhibits multiple myeloma growth in vitro and in vivo and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents [J]. *British J Haematol*, 2012, 157(6): 718-731.

- [5] Elkin M, Miao H Q, Nagler A, *et al.* Halofuginone: a potent inhibitor of critical steps in angiogenesis progression [J]. *FASEB J*, 2000, 14(15): 2477-2485.
- [6] Elkin M, Reich R, Nagler A, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression and bladder carcinoma metastasis by halofuginone [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(8): 1982-1988.
- [7] Abramovitch R, Itzik A, Harel H, *et al.* Halofuginone inhibits angiogenesis and growth in implanted metastatic rat brain tumor model—an MRI study [J]. *Neoplasia*, 2004, 6(5): 480-489.
- [8] Gross D J, Reibstein I, Weiss L, *et al.* Treatment with halofuginone results in marked growth inhibition of a von Hippel-Lindau pheochromocytoma *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(10 Pt 1): 3788-3793.
- [9] Taras D, Blanc J F, Rullier A, *et al.* Halofuginone suppresses the lung metastasis of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats through MMP inhibition [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(4): 312-318.
- [10] Egebland M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-174.
- [11] Zcharia E, Atzmon R, Nagler A, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinase-2 by halofuginone is mediated by the Egr1 transcription factor [J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2012, 23(10): 1022-1031.
- [12] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 392-401.
- [13] McGaha T L, Phelps R G, Spiera H, *et al.* Halofuginone, an inhibitor of type-I collagen synthesis and skin sclerosis, blocks transforming-growth-factor-beta-mediated Smad3 activation in fibroblasts [J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 118(3): 461-470.
- [14] Sheffer Y, Leon O, Pinthus J H, *et al.* Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(2): 570-577.
- [15] Spector I, Zilberstein Y, Lavy A, *et al.* Involvement of host stroma cells and tissue fibrosis in pancreatic tumor development in transgenic mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41833.
- [16] Mantovani A, Allavena P, Sica A, *et al.* Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.
- [17] Leiba M, Cahalon L, Shimoni A, *et al.* Halofuginone inhibits NF-kappa B and p38 MAPK in activated T cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(2): 399-406.
- [18] Zou W, Restifo N P. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(4): 248-256.
- [19] Su X M, Ye J, Hsueh E C, *et al.* Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells [J]. *J Immunol*, 2010, 184(3): 1630-1641.
- [20] Zhu X W, Mulcahy L A, Mohammed R A A, *et al.* IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(6): 95-105.
- [21] Sundrud M S, Koralov S B, Feuerer M, *et al.* Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response [J]. *Science*, 2009, 324(5932): 1334-1338.
- [22] Cook J A, Choudhuri R, Degrafe W, *et al.* Halofuginone enhances the radiation sensitivity of human tumor cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2010, 289(1): 119-126.
- [23] Chinnaiyan P, Allen G W, Harari P M. Radiation and new molecular agents, part II: Targeting HDAC, HSP90, IGF-1R, PI3K, and ras [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2006, 16(1): 59-64.
- [24] Harari P M, Huang S. Radiation combined with EGFR signal inhibitors: head and neck cancer focus [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2006, 16(1): 38-44.
- [25] Xavier S, Piek E, Fujii M, *et al.* Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15167-15176.
- [26] Ishii H, Choudhuri R, Mathias A, *et al.* Halofuginone mediated protection against radiation-induced leg contracture [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(2): 315-319.
- [27] De jonge M J, Dumez H, Verweij J, *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of halofuginone, an oral quinazolinone derivative in patients with advanced solid tumours [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(12): 1768-1774.