

· 综 述 ·

大黄素与细胞凋亡、自噬作用关系的研究进展

于晓政¹ 刘瑞霞² 阴赅宏¹

大黄素,化学名为 1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌,分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$,是一种天然的蒽醌衍生物,也是多种中草药的有效成分之一,包括大黄、虎杖、何首乌、芦荟叶、决明子等,这些药材作为传统中草药被广泛应用。近来发现大黄素发挥作用的机制与细胞凋亡和细胞自噬密切相关^[1,2],且这种联系被越来越多的学者所关注。

细胞自噬和细胞凋亡是细胞程序性死亡的两种主要表现。细胞凋亡,又称 I 型细胞程序性死亡,不同于细胞坏死的是,细胞凋亡是细胞主动实施的,一般在生理条件下,由体内某些因素触发了细胞内置死亡程序诱导了细胞死亡,细胞凋亡在维持机体动态平衡中发挥了重要作用。细胞自噬(II 型程序性死亡)是一种细胞选择性死亡机制,而且是细胞内一种代谢过程异常导致功能细胞器和蛋白的消化^[3]。细胞自噬和凋亡共同维持了细胞稳态。肿瘤、炎症、药物及外界环境等可破坏细胞内的稳态,研究发现,大黄素可通过调控细胞凋亡和自噬发挥其保护机体的作用^[1]。

1 大黄素与细胞凋亡

1.1 大黄素促进细胞凋亡作用 大部分研究显示大黄素可通过抑制相关基因合成、增加内质网应激反应、改变线粒体功能、介导细胞信号通路转导发挥促凋亡作用^[4-7]。

1.1.1 大黄素通过改变凋亡相关基因表达促细胞凋亡 大黄素是一种新型凋亡诱发剂,Wang L 等^[8]通过研究发现,大黄素在家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1 细胞中,可以协同促凋亡基因 BmDredd (B. mori Dredd gene) 的表达,使内源性半胱天冬酶-8(caspase-8)活化和凋亡比例增加。Fas 基因也是一种促凋亡基因,Fas 基因介导的 Fas 受体蛋白是一型跨膜糖蛋白,属于神经生长因子(nerve growth

factor,NGF)/肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体超家族中的一员,在机体中与它的天然配体相结合,参与一系列反应,促进细胞凋亡^[9,10]。与之相类似,Li WY 等^[11]利用大黄素干预的人肺腺癌 A549 细胞发现,Fas 配体基因表达上调,同时下调了原癌基因进而衰减了损伤修复作用,共同达到促凋亡的目的。大黄素还具有抑制癌细胞表观遗传修饰蛋白表达的作用,在人类膀胱癌组织中,两种表观遗传标记的组蛋白 H3K27 三甲基(H3K27me3)表达水平低,但是组蛋白 H3S10 磷酸酶(pH3Ser10)表达水平高,Cha TL 等^[12]通过对膀胱癌细胞株的研究显示,大黄素治疗后能够抑制 pH3Ser10 表达水平,增加 H3K27me3 的表达量,进而抑制细胞生长,达到促凋亡的目的。

1.1.2 大黄素通过介导内质网改变促进细胞凋亡 内质网是介导细胞凋亡的重要细胞器。在真核细胞中,内质网具有调节蛋白质合成、折叠与分泌功能,在细胞应激反应时发挥重要作用。当细胞受到环境毒物、缺氧、病毒、紫外线等刺激时内质网出现的腔内错误折叠、未折叠蛋白聚集以及 Ca^{2+} 平衡紊乱等,可引起内质网功能紊乱,称为内质网应激(ER stress, ERS)。ERS 是近年来发现介导细胞凋亡的重要途径之一,ERS 可促进内质网发生一系列生理变化,加速细胞清除蓄积在内质网腔内的错误折叠或未折叠蛋白,从而维持细胞的正常功能^[13]。大黄素可以通过增加 ERS 来促进细胞凋亡,ERS 介导细胞凋亡与几种关键蛋白的表达量有关,包括蛋白激酶样内质网激酶(protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase, PERK),磷酸化的 eIF2 α 激酶(phospho-eIF2 α)等^[14]。Li X 等^[15]通过大鼠非酒精性脂肪肝模型发现,大黄素能通过抑制内质网-SREBP1c 通路活化改善脂质积累,且大黄素干预组比空白对照组肝组织中的细胞凋亡相关蛋白 p-PERK, p-eIF2 α 以及活化转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)表达量明显增加,因此推测大黄素可能通过调控内质网 PERK-eIF2 α -ATF4 通路促进细胞凋亡,且可根据凋亡相关蛋白的表达量来观察大黄素的促凋亡水平。

1.1.3 大黄素通过介导线粒体功能改变促进细胞凋亡 线粒体功能改变作为凋亡的信号路径之一,

基金项目:北京市属高等学校科学研究项目(No. KM201910025007)

作者单位:1.首都医科大学附属北京妇产医院内科(北京 100026);2.首都医科大学附属北京妇产医院中心实验室(北京 100026)

通讯作者:阴赅宏, Tel: 010 - 63138748, E-mail: modscn@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20190127. 064

在细胞受到凋亡刺激时,线粒体释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子,从而激发下游的凋亡执行者半胱氨酸天冬蛋白酶 caspase-3,引发细胞凋亡^[16]。Wang YX 等^[17]研究发现大黄素通过诱导凋亡抑制人类宫颈癌 HeLa 细胞的增值,其诱导凋亡的途径主要是通过内在线粒体功能改变和外死亡受体表达增加的途径实现的。Xie MJ 等^[18]在人类结肠癌细胞 HCT116 细胞中的研究证实,大黄素通过诱发氧化应激,诱导线粒体跨膜电位损失,Bax 基因表达产物增加同时降低了 Bcl-2 相关蛋白的表达,线粒体易位,细胞色素 C 释放,诱发了凋亡。

1.1.4 大黄素通过调节凋亡相关信号通路促进细胞凋亡 大黄素也可以通过抑制神经胶质瘤细胞几条关键信号通路促进细胞凋亡进而有效阻止瘤细胞的增殖,如 Notch-1, b-catenin 和 STAT3 等^[17]。也有相关研究证明在肝细胞中大黄素能增强 TNF 相关凋亡诱导的能力,通过诱导死亡受体及降低生存蛋白的表达来实现^[19]。

1.2 大黄素抑制细胞凋亡作用 有学者认为,大黄素可通过介导线粒体信号通路抑制细胞凋亡,发挥细胞保护作用^[5]。

1.2.1 大黄素通过抗凋亡作用保护细胞免于药物损伤 尽管大部分研究显示大黄素具有促凋亡作用,但在某些情况下,大黄素也表现出抗凋亡效应。化疗药物顺铂导致的肾损伤进而导致肾小管上皮细胞凋亡是一个重要致病机理改变^[20],代智等^[21]证实大黄素可以通过影响细胞循环来保护人胚胎肺成纤维细胞 WI-38 细胞免于顺铂诱发的凋亡损伤,提示大黄素在某些药物诱发凋亡的情况下具有细胞保护作用。

1.2.2 大黄素通过线粒体信号通路抗细胞凋亡 在 C2C12 肌成纤维细胞里,通过 Hoechst 33342 染色分析和膜联蛋白 V/PI 分析,大黄素具有降低 TNF- α 诱导细胞凋亡的作用;在 TNF- α 刺激的 C2C12 肌成纤维细胞中,大黄素抑制线粒体膜蛋白崩解促进活性氧生成,研究显示大黄素治疗后 Bcl-2 的蛋白表达量增加,然而 Bax、解链的半胱天冬酶和聚腺苷二磷酸—核糖聚合酶却减少^[22]。这些数据证明在 TNF- α 刺激的 C2C12 肌成纤维细胞中大黄素通过影响线粒体信号通路抑制细胞凋亡。

2 大黄素与细胞自噬

2.1 大黄素通过介导溶酶体的改变促进细胞自噬 溶酶体是真核生物细胞中主要起降解作用的细胞器,含有多种消化酶如蛋白酶、核酸酶、磷酸酶、糖苷酶、脂肪酶、磷酸酯酶及硫酸脂酶等,是细胞内的消化

器官。自噬过程中关键一步是自噬体与溶酶体的融合,进而达到将自噬内容物进行消化吸收的目的。在血管平滑肌细胞中 (vascular smooth muscle cells, VSMC),高剂量的大黄素干预细胞后发现细胞内异染色质样波浪状染色体聚集、溶酶体的数量增加,异染色质的出现是细胞凋亡的重要表现,溶酶体数量的增加是自噬进程中的重要环节,因此大黄素干预 VSMC 后提示细胞有凋亡和自噬的发生^[23, 24]。组织蛋白酶 B (cathepsin B) 属于木瓜蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白水解酶,广泛分布于各种组织细胞的溶酶体中,主要降解各种组织蛋白。正常情况下,cathepsin B 以一种酶原形式储存在溶酶体中,相对分子量是 38;当外界环境发生变化,cathepsin B 一旦释放至胞浆,其可被溶酶体中其他蛋白水解酶水解或自身激活,形成相对分子质量为 27 的活性形式参与一系列的化学反应,如细胞凋亡与自噬。实验研究显示大黄素可以使 cathepsin B 活性形式增多、活性增强,提示大黄素可以增强溶酶体水解酶的量 and 活性,而溶酶体是自噬发生的关键细胞器,所以大黄素可能通过增强溶酶体的活性来影响细胞自噬^[25, 26]。

2.2 大黄素通过介导线粒体的改变促进细胞自噬 当机体处于疾病状态下,细胞内的线粒体功能受损,受损的线粒体易形成自体吞噬并成为被降解的目标。Jacob TG 等^[27]通过电子显微镜观察雨蛙素诱导的大鼠胰腺炎腺泡细胞的微细结构,发现细胞内的自噬体中包含的细胞器有线粒体。有学者研究证明,大黄素可以减少活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生与积累,线粒体呼吸运动的副产物是 ROS,ROS 能攻击蛋白质、脂质和核酸,并激发过氧化物酶链式反应,提示大黄素具有保护细胞免受 ROS 损伤的作用;同时大黄素还可诱导受损的线粒体被自噬体特异性吞没,后通过与溶酶体的结合选择性的被降解,进而维持一个稳定的细胞内环境^[28]。综上,大黄素诱导的自噬活动可能有助于平衡线粒体代谢,因此减少了 ROS 的产生进而减少了氧化应激压力对机体的损伤。

2.3 大黄素通过信号通路来调控自噬保护机体损伤 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它是调控细胞生长、增殖、翻译、代谢及自噬的关键蛋白激酶,最初因为其能被雷帕霉素抑制而被认识。研究表明,mTOR 在调节细胞自噬过程中起到重要作用^[29-31]。糖原合成激酶 (glycogen synthase kinase, GSK)-3 α 基因失活且衰老的小鼠伴发心脏肥大、心功能障碍、肌节的紊

乱,主要是因为机体解除了对 mTORC1 的抑制,抑制了自噬的发生。所以,抑制 mTORC1 通路能激活自噬发生进而达到保护心肌的作用。胡浩等^[29]采用大黄素干预 Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 进行饥饿诱导的大鼠肾小管上皮细胞,并观察其自噬发生情况及其机制,通过 Western blot 检测细胞自噬标志性蛋白——哺乳动物同类物微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) II/I, 其表达水平明显比未用大黄素处理的对照组高,进一步证实了大黄素通过阻断 mTOR 信号通路,抑制了 HBSS 诱导的肾小管上皮细胞 LC3 II 蛋白表达和自噬活化。在人类骨肉瘤细胞株 MG-63 细胞中,龙舌兰大黄素介导的光动力学疗法 (AE-mediated photodynamic therapy, AE-PDT) 观察所得 AE 可以直接绑定 mTORC2 并且抑制其激酶活性来抑制肿瘤细胞的生长,并能活化 ROS/JNK 信号通路,诱导细胞自噬和凋亡^[30]。AMP 依赖的蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK] 是细胞内导致 mTOR 激活的主要机制,其他的研究发现大黄素诱导自噬还通过介导 AMPK/mTOR 路径,大黄素通过激活 AMPK 并且抑制 mTOR 的信号路径诱导自噬,从而对细胞产生一种保护作用^[31]。

2.4 其他 大黄素还可以联合多种细胞因子,如 HIF-1 α 和 KGF 等,在低氧条件下,共同促进自噬相关基因的激活及相关蛋白的表达,增强细胞的自噬机制对细胞起保护作用^[32]。在顺铂诱发凋亡的人胚胎肺成纤维细胞 WI-38 细胞中,大黄素可以通过诱发自噬抵抗顺铂带来的细胞毒性损伤;大黄素的预处理加强了顺铂作用后的自噬水平,尤其在早期阶段,然而顺铂诱发的凋亡却被显著地削弱了^[21]。除此之外,大黄素对 TNF- α 刺激的 C2C12 肌成纤维细胞具有抑制其异常自噬的能力,大黄素通过上调磷酸化 Akt 蛋白量、抑制 LC3-II、Beclin-1 和 Atg7 的蛋白表达实现的^[22]。大黄素在 TNF- α 刺激的 C2C12 肌成纤维细胞中具有抑制细胞自噬和凋亡作用,进一步证实大黄素作用于机体时,凋亡与自噬是相互作用、相互影响的。

3 总结

大黄素通过调控相关基因如 Fas、pH3Ser10、H3K27me3 等表达,介导内质网应激,改变线粒体功能,调节关键信号通路如 Notch-1、b-catenin 和 STAT3 等促进细胞凋亡。然而在某些情况下大黄素也能抑制细胞凋亡,如在化疗药物顺铂引发的肾损伤时可以通过激发自噬来衰减凋亡作用、在 TNF- α 诱导

的 C2C12 肌成纤维细胞中可抑制线粒体膜蛋白崩解抑制凋亡等。在细胞生存代谢中,自噬和凋亡在同一细胞内受相同上游信号调制,但二者在细胞内的作用是彼此抑制的。线粒体自噬是自噬抑制凋亡的主要机制,线粒体是决定细胞生存或死亡的主要场所。这提示在不同细胞株及药物干预环境下,大黄素抑制细胞凋亡可能是通过减少线粒体功能损伤、激活线粒体自噬实现的。而近年关于自噬与大黄素的相关研究也发现,大黄素具有改变细胞器如溶酶体与线粒体功能,并能调节信号通路如 mTOR 信号通路、联合细胞因子 HIF-1 α 和 KGF 等来促进细胞自噬来达到保护机体的作用。因此,进一步研究大黄素与细胞自噬的关系,将是未来研究大黄素药理作用的重要方向。

参 考 文 献

- [1] Yu X, Li C, Song H, et al. Emodin attenuates autophagy response to protect the pancreas from acute pancreatitis failure [J]. *Pancreas*, 2018, 47 (7): 892 - 897.
- [2] 崔洪章. PBEF 在重症胰腺炎肺损伤发病机制中的作用及清胰汤干预的实验研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2017.
- [3] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15 (7): 713 - 720.
- [4] Su J, Yan Y, Qu J, et al. Emodin induces apoptosis of lung cancer cells through ER stress and the TRIB3/NF- κ B pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37 (3): 1565 - 1572.
- [5] Chen D, Liu J, Lu L, et al. Emodin attenuates TNF- α -induced apoptosis and autophagy in mouse C2C12 myoblasts through the phosphorylation of Akt [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34 (5): 107 - 113.
- [6] Zhang L, He D, Li K, et al. Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90 (7): 222 - 228.
- [7] Zu C, Qin G, Yang C, et al. Low dose Emodin induces tumor senescence for boosting breast cancer chemotherapy via silencing NRARP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505 (4): 973 - 978.
- [8] Wang L, Song J, Bao XY, et al. BmDredd is an initiator caspase and participates in Emodin-induced apoptosis in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Gene*, 2016, 591 (2): 362 - 368.
- [9] 许雅清, 李海龙, 邱家权, 等. 痛泻二草方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠相关基因的影响 [J]. *中医临床研究*, 2016, 8 (8): 3 - 7.

- [10] 潘敬芳, 曹志刚, 阮佼. 生大黄对急性胰腺炎患者外周血浆 Fas 和 Fas 配体表达的影响[J]. 临床内科杂志, 2015, 1(3): 205-206.
- [11] Li WY, Ng YF, Zhang H, et al. Emodin elicits cytotoxicity in human lung adenocarcinoma A549 cells through inducing apoptosis[J]. Inflammopharmacology, 2014, 2(2): 127-134.
- [12] Cha TL, Chuang MJ, Tang SH, et al. Emodin modulates epigenetic modifications and suppresses bladder carcinoma cell growth[J]. Mol Carcinog, 2015, 54(3): 167-177.
- [13] Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(11): 2977-2984.
- [14] Tiwari RV, Parajuli P, Sylvester PW. γ -Tocotrienol-induced endoplasmic reticulum stress and autophagy act concurrently to promote breast cancer cell death[J]. Biochem Cell Biol, 2015, 93(4): 306-320.
- [15] Li X, Xu Z, Wang S, et al. Emodin ameliorates hepatic steatosis through endoplasmic reticulum-stress sterol regulatory element-binding protein 1c pathway in liquid fructose-feeding rats[J]. Hepatol Res, 2016, 46(3): 105-117.
- [16] Dasgupta N, Ranjan S, Mishra D, et al. Thermal Co-reduction engineered silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human colon cancer cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis[J]. Chem Biol Interact, 2018, 295(11): 109-118.
- [17] Wang YX, Yu H, Zhang YY, et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 71.
- [18] Xie MJ, Ma YH, Miao L, et al. Emodin-provoked oxidative stress induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through a p53-mitochondrial apoptotic pathway[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(13): 5201-5205.
- [19] Subramaniam A, Loo SY, Rajendran P, et al. An anthraquinone derivative, emodin sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL induced apoptosis through the induction of death receptors and downregulation of cell survival proteins[J]. Apoptosis, 2013, 18(10): 1175-1187.
- [20] 屈云, 姚平, 李廷谦. 大黄素对肺成纤维细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2004, 35(1): 74-76.
- [21] 代智, 仲来福. 大黄素对顺铂所致人胚肺成纤维细胞毒性的作用[J]. 卫生毒理学杂志, 2004, 1(3): 148-150.
- [22] Dong X, Fu J, Yin X, et al. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics[J]. Phytother Res, 2016, 30(8): 1207-1218.
- [23] Wang X, Zou Y, Sun A, et al. Emodin induces growth arrest and death of human vascular smooth muscle cells through reactive oxygen species and p53[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 49(5): 253-260.
- [24] Xu K, Al-Ani MK, Wang C, et al. Emodin as a selective proliferative inhibitor of vascular smooth muscle cells versus endothelial cells suppress arterial intima formation[J]. Life Sci, 2018, 1(207): 9-14.
- [25] 王翠芬, 陈敏, 吴旭东, 等. 溶酶体 cathepsin B 参与大黄素诱导 HK-2 细胞凋亡[J]. 东南大学学报(医学版), 2008, 27(6): 404-408.
- [26] Han H, Li J, Feng X, et al. Autophagy-related genes are induced by histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid via the activation of cathepsin B in human breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(32): 53352-53365.
- [27] Jacob TG, Sreekumar VI, Roy TS, et al. Electron-microscopic evidence of mitochondria containing macroautophagy in experimental acute pancreatitis: implications for cell death[J]. Pancreatology, 2014, 14(6): 454-458.
- [28] Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging[J]. Rejuvenation Res, 2005, 8(1): 3-5.
- [29] 胡浩, 孙伟, 顾刘宝, 等. 大黄素抑制 HBSS 诱导的肾小管上皮细胞自噬的分子机制[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 1965-1970.
- [30] Huang PH, Huang CY, Chen MC, et al. Emodin and Aloe-Emodin suppress breast cancer cell proliferation through ER α inhibition[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 376123.
- [31] Liu H, Gu LB, Tu Y, et al. Emodin ameliorates cisplatin-induced apoptosis of rat renal tubular cells *in vitro* by activating autophagy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(2): 235-245.
- [32] 郑英. 大黄素联合 KGF 与 HIF-1 α 在低氧细胞应激损伤中的自噬机制研究[J]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2015.

(收稿: 2018-07-31 在线: 2019-03-04)

责任编辑: 汤 静