

盐霉素抗肿瘤机制的相关研究进展

黄龙,王毅*,汪翼

(南华大学附属第二医院泌尿外科,湖南 衡阳 421001)

摘要: 肿瘤干细胞(CSCs)是一群存在于肿瘤细胞中的亚群,具有自我更新和产生新的不同分化程度的肿瘤细胞。干细胞亚群的存在使得肿瘤可以逃避化疗药物、靶向治疗药物以及放射治疗等治疗手段的杀伤作用,也是肿瘤复发和转移的重要原因之一。盐霉素是由白色链霉菌发酵产生的属于聚醚类的一元羧酸,近年来研究发现盐霉素能高效杀死多种肿瘤干细胞,并对多种肿瘤有明显的抑制作用,是一种很有开发潜力的抗肿瘤药物。其作用机制可能与诱导肿瘤干细胞凋亡与抑制有关。

关键词: 盐霉素; 细胞凋亡; 抗肿瘤; 药物

中图分类号: R730 **文献标识码:** A

盐霉素(Salinomycin)属于聚醚类一元羧酸,由白色链霉菌(*Streptomyces albus*)发酵产生,具有特殊的环状结构,类似苯环样,盐霉素假环状结构中的聚醚部分能够与金属阳离子结合形成复合物,其分子表面的亲脂层又可以转运这些离子复合物穿过生物细胞膜,使得盐霉素具有杀死革兰阳性菌和抗禽类球虫病的作用,更是赋予了其稳定的生化特性,是一种典型的离子载体抗生素,上世纪70年代起,盐霉素主要用于抗鸡球虫病和促进畜禽生长^[1]。2009年,Gupta等^[2]在药物筛选实验时发现,盐霉素能选择性杀伤乳腺癌的肿瘤干细胞,提示盐霉素有望成为新型抗肿瘤药物。国内外近年来的研究亦发现盐霉素能显著抑制肿瘤细胞的生长、诱导肿瘤细胞凋亡;对多种肿瘤均有明显的抑制作用,盐霉素作为肿瘤干细胞的“杀手”,已经在多种细胞模型上得到了验证。Dong等^[3]研究发现,在结直肠癌的肿瘤干细胞中检测其对盐霉素的敏感,结果显示,运用盐霉素后,癌症细胞伴有上皮细胞等标志物的表达上调和抑制波形蛋白(间充质细胞标志)的形成,从而进一步促进抑制细胞增殖、集落形成、细胞迁移、侵袭作用。

1 盐霉素诱导肿瘤细胞自噬的发生

细胞自噬(autophagy)是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程。该过程中一

些损坏的蛋白或细胞器被双层膜结构的自噬小泡包裹后,送入溶酶体(动物)或液泡(酵母和植物)中进行降解并得以循环利用^[4]。细胞自噬可分为如下三种形式,微自噬(microautophagy)、巨自噬(macroautophagy)和分子伴侣介导的自噬(Chaperone-mediated autophagy,CMA)。随着科技的进步,对细胞自噬的了解也不断加深,细胞的自噬还参与着细胞程序性死亡,这种与自噬有关的程序性死亡被命名为自噬性细胞死亡。细胞自噬与细胞凋亡、细胞衰老一样,是十分重要的生物学行为,参与生物的发、生长等多种过程。

Kim等^[5]研究发现,盐霉素可以通过升高细胞内活性氧和使线粒体膜的去极化诱导前列腺癌细胞的凋亡。在肿瘤细胞中,Akt/NF-Kb通路的激活是很常见的一种现象。实验发现盐霉素能够阻断Akt蛋白的表达并抑制NF-kb的入核,通过有效抑制Akt/NF-Kb通路诱导卵巢癌细胞凋亡。另有研究发现^[6],盐霉素可以促进细胞进入自噬反应,引发线粒体膨胀、线粒体自噬、破坏线粒体结构以及细胞内ATP大量丧失,过度的自噬反应导致肿瘤细胞“自杀”。Verdoodt等^[7]研究发现,在结肠癌和乳腺癌中,应用盐霉素可诱导细胞自噬的发生,从而导致肿瘤细胞凋亡。通过观察到细胞死亡的伴随特征,形成多空泡的增加和自噬标记的摄取,而证实了盐霉素可诱导细胞自噬。此外,研究还观察到盐霉素可以诱导和激活与自噬性细胞死亡有关的ROS及JNK信号通路,促使细胞凋亡。Kuo等^[8]研究发现,在头颈部的鳞状细胞癌(鳞癌)干细胞中,盐霉素可

以激活 EMT 并诱导 Akt 的磷酸化,促使癌细胞凋亡。

2 盐霉素与 Wnt 通路促使肿瘤细胞凋亡

Wnt 基因为小鼠乳腺肿瘤病毒优先整合的位点,是一种癌基因,在细胞增殖和分化中起重要的作用。随后研究发现它与果蝇的无翅基因(wingless)属直相同源基因(orthologous gene),从而将二者结合命名为 Wnt 基因。Wnt 基因属于原癌基因,随着研究的不断深入,发现 Wnt 基因家族十分庞大,为多基因家族,其基因结构从低等的无脊椎动物到脊椎动物乃至人类具有高度保守性,其同源序列达 27%~83%,对动物的生长发育起着至关重要的作用^[9]。Wnt 基因编码的 Wnt 蛋白,可启动细胞内信号传导途径,传导生长刺激信号,参与不同的发育机制,如细胞分化,迁移,以及决定细胞命运的增殖等。因其启动蛋白为 Wnt 蛋白,因此命名为 Wnt 信号途径。

研究发现 Wnt 信号通路在哺乳动物的发育,干细胞的更新,和癌症的进展中均起着极其关键的作用。2011 年, Lu 等^[10] 研究发现盐霉素通过抑制 Wnt 通路导致慢性淋巴细胞性白血病细胞的凋亡,进一步研究表明,盐霉素影响 Wnt 通路是通过阻碍 Wnt 受体,诱导降解脂蛋白受体相关的磷酸化信号蛋白 6,进而导致肿瘤细胞的凋亡。另有研究报道^[11],在胰腺癌细胞中,盐霉素可抑制 Wnt/ β -catenin 信号相关的 β 蛋白,如 β -catenin 和 p-gsk-3 β ,而导致胰腺癌细胞的生长抑制、凋亡。Quann 等^[12] 利用荧光素酶研究发现在前列腺癌细胞中,盐霉素导致前列腺癌细胞的凋亡,可能与 MAPK 信号通路的激活相关,这一发现对研究癌症的发展十分关键。

然而,其确切的机制如何,盐霉素对复杂的癌症和肿瘤干细胞的信号通路的影响仍是未知,需要进一步研究和阐明。Haque 等^[13] 研究发现,盐霉素导致肺癌细胞的凋亡是通过激活了 p53 通路,促使凋亡蛋白 Caspase 家族的表达,从而导致了肺癌细胞的凋亡。另有研究发现,在前列腺癌细胞中,盐霉素是通过激活 Caspase-3 和 PARP-1 通路导致前列腺癌干细胞的凋亡。Ketola 等^[14] 研究发现,在前列腺癌细胞中,盐霉素通过增加氧化应激水平,累积活性氧和线粒体膜去极化,而抑制前列腺癌细胞的生长,导致前列腺癌细胞的凋亡。

3 盐霉素与 DNA 的损伤(P21 蛋白)

DNA 存储着生物体赖以生存及繁衍的遗传信息,因此维持 DNA 分子的完整性对细胞至关重要。许多因素都会导致 DNA 分子的损伤或改变,DNA 损伤是 DNA 复制过程中 DNA 核苷酸序列永久性改变,并导致遗传特征改变的生物学现象。1947 年, A. 凯尔纳等研究发现,链丝菌等微生物经过紫外线(Ultraviolet rays, UV)照射后,暴露在正常光下可以减少死亡,证明这是许多微生物固有的 DNA 损伤修复功能,并把这一修复功能称为光复活。1968 年 Cleaver 等^[15] 研究发现人常染色体隐性遗传的光化癌变疾病——着色性干皮病(Xeroderma Pigmentosum, XP),是由基因突变造成的 DNA 损伤切除修复功能的缺陷引起。为恶性肿瘤的发生机理提供了一个重要的分子生物学证据,使 DNA 损伤修复的研究进入了医学领域。Kim 等^[5,16] 研究表明,盐霉素与 DNA 损伤剂可导致 DNA 的损伤,使大量癌细胞的凋亡,通过增加 p53 和 H2AX 的表达,减少抗凋亡蛋白 p21 的表达,从而致 DNA 的损伤。另有研究发现,运用盐霉素可诱导阻滞 G2 期,使癌细胞对放射治疗更加敏感,抑制 p21 蛋白表达水平,促进 H2AX 和 p53 的激活与表达。Diehn 等^[17] 研究发现在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中,盐霉素增加组蛋白 H3 和 H4 的高度乙酰化致癌症细胞凋亡抑制细胞生长。

4 盐霉素与离子通道

1952 年, Hodgkin 等^[18] 研究发现 Na^+ 和 K^+ 的电流和电导是膜电位和时间的函数,提出了离子通道的概念。离子通道的活性,就是细胞通过离子通道的开放和关闭来调节相应物质进出细胞速度的能力,对实现细胞的各种功能及特性均具有十分重要的意义。相关研究发现,离子通道的转运与肿瘤细胞的增殖、凋亡、浸润和迁移相关联,这一发现成为癌症治疗的新靶点。相关研究发现属于离子载体抗生素的盐霉素可促进离子通过膜的脂质屏障,中断原核和真核细胞中的天然离子转运系统,为高度选择性的钾离子载体抗生素,影响钾通道,促进钾离子从线粒体和细胞质中流出,从而影响线粒体 PT 孔的开放、引起线粒体跨膜电位下降以及细胞色素 c 释放,进而促进癌症细胞凋亡。

5 盐霉素抗癌作用的局限性

Lu 等^[10]研究表明,在外周血单核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中,盐霉素需要 100 倍抗肿瘤细胞的浓度才能对正常的细胞产生毒副作用;同时, Scherzed 等^[19]研究发现,在人骨髓间充质干细胞(Human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSC)中,只有当盐霉素在剂量 $> 30 \mu\text{mol/L}$ 时,才会对正常细胞活力、迁移能力等造成影响。然而,在其他的“正常”细胞实验时,特别是其他骨髓细胞的做实验研究时,并没有得出可靠的实验数据支持。Boehmerie 等^[7,20]对盐霉素的毒性研究评价显示,在盐霉素处理人神经纤维细胞时,神经细胞内的 Na^+ 浓度增加,胞浆内的 Ca^{2+} 浓度蛋白酶活性升高,线粒体膜去极化,进而通过诱导 Caspase 家族蛋白导致正常细胞凋亡。研究发现,一些动物,如猫,狗,猪,马,甚至还有人,在过量或误食盐霉素后,可以出现严重的毒副作用。正如前面所述,盐霉素可影响 K^+ 离子通道而抗肿瘤,而 K^+ 通道不仅在肿瘤细胞或是肿瘤干细胞中存在,正常的组织细胞中也存在,所以,盐霉素除了可以影响肿瘤细胞和肿瘤干细胞,它也可以对正常神经细胞和造血干细胞产生毒性。因此,临床上,在一些特定的组织、器官肿瘤使用盐霉素进行治疗时,需要制定一个较严谨的有效策略,防止出现盐霉素在抗癌的同时,因使用不当对正常细胞产生毒副作用。为此, Huczynski 等^[21]研究表明,根据盐霉素的分子结构,合成了一套酰胺和酯衍生物和苯并三氮唑霉素,且进一步研究表明其与盐霉素的抗菌和抗癌活性的作用相差无几,为人类抗肿瘤事业提出新的思路。

6 结 论

综上所述,盐霉素抗成体肿瘤细胞机制进行了初步探讨,主要集中在以下几个方面:(1)通过诱导氧化应激类固醇代谢产物的升高及抗氧化的类固醇代谢产物的降低抑制肿瘤细胞的生长及转移;(2)通过抑制 $\text{wnt}/-\beta$ 连环蛋白途径或者降低细胞线粒体膜的膜电位,将细胞色素 C 释放到细胞质中,促进细胞的凋亡;(3)通过损害 DNA 降低抗凋亡蛋白 P21 的表达水平,促进细胞凋亡;(4)盐霉素对正常细胞的副作用虽然相对较少,但是在过量或误食盐霉素后,仍然可出现严重的毒副作用。所以需在相

对狭窄的治疗指数下使用盐霉素。考虑盐霉素潜在的不利毒副作用,未来的研究将主要集中盐霉素的构效关系(structure-activity relationship, SAR),即研究出细胞毒副作用较小、可用于临床的、选择性强的抗肿瘤药物,让盐霉素早日成为新型的抗肿瘤药物而造福于医疗事业。

参考文献:

- [1] Wang Y. Effects of salinomycin on cancer stem cell in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Med Chem, 2011, 7(2):106-111.
- [2] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening [J]. Cell, 2009, 138(4):645-659.
- [3] Dong TT, Zhou HM, Wang LL, et al. Salinomycin selectively targets 'CD133+' cell subpopulations and decreases malignant traits in colorectal cancer lines [J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(6):1797-1804.
- [4] Bernard A, Jin M, Xu Z, et al. A large-scale analysis of autophagy-related gene expression identifies new regulators of autophagy [J]. Autophagy, 2015, 11(11):2114-2122.
- [5] Kim KY, Yu SN, Lee SY, et al. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 413(1):80-86.
- [6] Schenk M, Aykut B, Teske C, et al. Salinomycin inhibits growth of pancreatic cancer and cancer cell migration by disruption of actin stress fiber integrity [J]. Cancer Lett, 2015, 358(2):161-169.
- [7] Verdoodt B, Vogt M, Schmitz I, et al. Salinomycin induces autophagy in colon and breast cancer cells with concomitant generation of reactive oxygen species [J]. PLoS One, 2012, 7(9):e44132.
- [8] Kuo SZ, Blair KJ, Rahimy E, et al. Salinomycin induces cell death and differentiation in head and neck squamous cell carcinoma stem cells despite activation of epithelial-mesenchymal transition and Akt [J]. BMC Cancer, 2012, 12:556.
- [9] Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, et al. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(9):691-701.
- [10] Lu D, Choi MY, Yu J, et al. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S

- A, 2011, 108(32):13253-13257.
- [11] Lu W, Li Y. Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(10):1799-1807.
- [12] Quann EJ, Khwaja F, Djakiew D. The p38 MAPK pathway mediates aryl propionic acid induced messenger rna stability of p75 NTR in prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(23):11402-11410.
- [13] Haque A, Rahman MA, Fuchs JR, et al. FLLL12 induces apoptosis in lung cancer cells through a p53/p73-independent but death receptor 5-dependent pathway[J]. *Cancer Lett*, 2015, 363(2):166-175.
- [14] Ketola K, Hilvo M, Hyotylainen T, et al. Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(1):99-106.
- [15] Cleaver JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. 1968 [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2004, 3(2):183-187.
- [16] Kim JH, Chae M, Kim WK, et al. Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(3):773-784.
- [17] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239):780-783.
- [18] Hodgkin AL, Huxley AF. Propagation of electrical signals along giant nerve fibers[J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1952, 140(899):177-183.
- [19] Scherzed A, Hackenberg S, Froelich K, et al. Effects of salinomycin on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 218(3):207-214.
- [20] Boehmerle W, Endres M. Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2(6):e168.
- [21] Huczynski A, Janczak J, Antoszczak M, et al. Antiproliferative activity of salinomycin and its derivatives[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(23):7146-7150.

(本文编辑:蒋湘莲)

(上接第 116 页)

- [30] Yeshchina O, Badalato GM, Wosnitzer MS, et al. Relative efficacy of perioperative gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, adriamycin, and cisplatin in the management of locally advanced urothelial carcinoma of the bladder[J]. *Urology*, 2012, 79(2):384-390.
- [31] Bellmunt J, vonder Maase H, Mead GM, et al. Randomized phase III study comparing paclitaxel/cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergroup Study 30987[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(10):1107-1113.
- [32] Grivas PD, Hussain M, Hafez K, et al. A phase II trial of neoadjuvant nab-paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine (ACaG) in patients with locally advanced carcinoma of the bladder[J]. *Urology*, 2013, 82(1):111-117.
- [33] Neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: a randomized controlled trial. International collaboration of trialists[J]. *Lancet*, 1999, 354(9178):533-540.
- [34] Halim A1, Abotouk N. Methotrexate-paclitaxel-epirubicin-carboplatin as second-line chemotherapy in patients with metastatic transitional cell carcinoma of the bladder pretreated with cisplatin-gemcitabine: a phase II study[J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2013, 9(1):60-65.
- [35] Tekin A, Ozen H. Adjuvant chemotherapy for non-organ confined disease after radical cystectomy[J]. *Int Urol Nephrol*, 2000, 32(1):59-62.
- [36] Bellmunt J, vonder Maase H, Mead GM, et al. Randomized phase III study comparing paclitaxel/cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergroup Study 30987[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(10):1107-1113.
- [37] Vale CL. Adjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data[J]. *Eur Urol*, 2005, 48(2):189-199.
- [38] Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer[J]. *J Urol*, 2005, 174(1):14-20.
- [39] Resorlu B, Turkolmez K, Ergun G, et al. The role of adjuvant chemotherapy in patients with locally advanced (pT3, pT4a) and/or lymph node-positive bladder cancer[J]. *Int Urol Nephrol*, 2010, 42(4):959-964.

(本文编辑:蒋湘莲)