

- [20] 高大勇. 独一味胶囊促进环状混合痔术后疤痕软化的疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(3): 66.
- [21] 王强, 薛秀芬. 藏药独一味治疗肛瘘手术后并发症 40 例临床观察[J]. 中国民族医药杂志, 1999, 5(1): 24.
- [22] 王炳玉. 独一味胶囊治疗上节育环后出血的疗效观察[J]. 黑龙江医学, 2002, 26(5): 359.
- [23] 朱剑文, 张艳, 万盈璐. 独一味胶囊治疗顽固性细菌性阴道病[J]. 医药导报, 2003, 23(7): 453.
- [24] 聂秀娟. 独一味配合米索前列醇用于人工流产效果观察[J]. 山东医药, 2005, 45(8): 77.
- [25] 陈朝凯, 李国芬. 独一味配合自体骨髓移植治疗骨囊肿 12 例[J]. 中国药业, 2002, 11(4): 74.
- [26] 童支援, 胡庆华. 独一味胶囊治疗肩关节脱位合并肱骨外科颈骨折[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(10): 57.
- [27] 林祥辉, 胡茂德, 黄玉魁. 独一味佐椎管注药法治疗腰椎间盘突出症的临床观察[J]. 中成药, 2001, 23(7): 538.
- [28] E 韬. 独一味治疗膝关节创伤性滑膜炎疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(9): 810.

收稿日期: 2005-09-21

抗肿瘤药物新靶点半胱天冬酶 - 10

丁力¹, 丁家崇², 郭葆玉¹ (1. 第二军医大学药学院生化药理学教研室, 上海 200433; 2. 湖南省马王堆医院, 湖南长沙 410016)

摘要: 细胞凋亡过程是依赖天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶(半胱天冬酶)产生的级联反应。半胱天冬酶-10 是凋亡途径中关键的启动子, 能够通过寡聚而自身切割活化, 并能激活下游其他半胱天冬酶, 参与细胞凋亡过程。半胱天冬酶-10 基因突变及其它表达异常可导致细胞凋亡和增殖失调, 从而参与某些肿瘤和免疫系统疾病的发生和发展。半胱天冬酶-10 有可能是抗肿瘤药物的新靶点。

关键词: 半胱天冬酶-10; 细胞凋亡; 半胱天冬酶-8; 肿瘤

中图分类号: Q74, Q291

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2006)02-0076-04

半胱天冬酶蛋白酶家族也称为 ICE/CED-3 家族, 是线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 死亡基因 CED-3 所编码蛋白的同源蛋白^[1,2], 在细胞凋亡中起着重要作用。迄今已发现并鉴定了 14 种哺乳动物的半胱天冬酶蛋白, 其中 11 种属于人类^[3]。参与细胞凋亡的半胱天冬酶可分为两类: 第一类是凋亡启动子, 包括半胱天冬酶-2, -8, -9, -10, 它们能在其他凋亡调控分子的参与下活化, 并激活下游的半胱天冬酶; 另一类是凋亡效应子, 包括半胱天冬酶-3, -6, -7, 该类分子被称为细胞凋亡的“执行者”: 一旦激活, 细胞将发生不可逆的细胞死亡。半胱天冬酶-10 是细胞凋亡过程中重要的中间环节: Fas 受体和肿瘤坏死因子受体-1 (TNFR-1) 感受到外界的刺激后, 可招募并活化半胱天冬酶-10 等启动分子, 进而激活半胱天冬酶级联反应, 参与细胞凋亡。本文就半胱天冬酶-10 的分子生物学特点, 分布与表达及其生物学功能作一综述。

1 半胱天冬酶-10 的基本特征

1.1 半胱天冬酶-10 的分子生物学特点 1996 年, Fernandes-Alnemri T^[4] 在人类 Jurkat T 淋巴细胞中发现并鉴定了半胱天冬酶-10。人类半胱天冬酶

-10 共有 4 种亚型, 半胱天冬酶-10/a (Mch4)^[4], -10/b (FLICE-2)^[5], -10/c 和 -10/d^[6], 它们大多数具有两个串联的死亡效应结构域 (DED), C14 肽酶, ICE_p20 和 p10 两个亚基和死亡类似结构域。这 4 种亚型是基因转录后不同的剪切产物, 其中半胱天冬酶-10/a 缺少外显子 6, 7, 11; -10/b 缺少外显子 10; -10/c 缺少外显子 7; -10/d 是完整的转录产物。各亚型具体的生物学功能均有所报道, 但是它们之间的相互关系还不是很清楚。在半胱天冬酶家族成员中, 半胱天冬酶-10 与 -8 的同源性很高, 它们的基因均定位于人类染色体 2q33-34, 其蛋白均具有 DED 结构域^[4]。

1.2 半胱天冬酶-10 的分布和表达 Northern 杂交分析发现, 半胱天冬酶-10 的分布比较广泛, 大部分组织均有表达, 但是大脑、肾脏、前列腺、睾丸和结肠的表达量比较低^[4]。半胱天冬酶-10 各亚型的 mRNA 在胎儿肺、肾和骨骼肌中均为高表达, 而在相应的成人组织中表达量很低甚至没有表达^[6]。免疫系统中, 半胱天冬酶-10 在初级 T 淋巴细胞, B 细胞和树突状细胞中表达量较高, 而在 Jurkat T 淋巴瘤细胞, 感染 Epstein-Barr 病毒的 B 细胞中表达相当低^[7]。Kischkel FC^[8] 分析了 55 种肺癌和乳腺癌细胞系, 大部分细胞系均存在半胱天冬酶-

10mRNA 的表达,而缺失蛋白的表达;Harada K^[9] 分析了 13 种小儿科肿瘤细胞系,也有类似的发现。

2 半胱天冬酶 -10 参与细胞凋亡

2.1 半胱天冬酶 -10 诱导细胞凋亡 半胱天冬酶 -10 与其同源蛋白半胱天冬酶 -8,由 Fas, TNF-R1, TRAIL(TNF 相关的凋亡诱导配体)受体 DR4 和 DR5 招募并活化,进而激活下游半胱天冬酶家族成员,参与了细胞凋亡过程^[8,10-12]。半胱天冬酶 -10 可以不依赖半胱天冬酶 -8,启动 Fas 和 TNF 相关的凋亡^[7]。Park SJ 等^[13]提出,紫杉醇通过活化 Fas 相关的死亡结构域(FADD)进而激活半胱天冬酶 -10,诱导了细胞凋亡;并且证明半胱天冬酶 -10 是细胞凋亡过程中重要的启动子,调控着下游半胱天冬酶家族成员的活化,抑制其活性可以完全阻断紫杉醇诱导的细胞凋亡。Fas 配体可以诱导半胱天冬酶 -8 天然缺失的 Jurkat 细胞(I9-2)的凋亡,伴随着半胱天冬酶 -10, -3, -7 的活化,Bid 蛋白的裂解,以及细胞色素 c 的释放,半胱天冬酶 -10 的表达水平与细胞对 Fas 配体的敏感性呈正相关,半胱天冬酶 -10 的抑制剂可以阻断细胞凋亡^[14]。半胱天冬酶 -10 突变病人正常表达 Fas, Fas 配体, TNF-R1, TNF-R2, FADD 和半胱天冬酶 -8,但是基因的突变导致半胱天冬酶 -10 酶活性降低,多个死亡受体诱导的细胞凋亡途径均被削弱^[15]。众所周知,半胱天冬酶 -8 在细胞凋亡中发挥着重要的承上启下作用,它的同源蛋白半胱天冬酶 -10 一方面可以与它共同活化,参与细胞凋亡,另一方面可以不依赖半胱天冬酶 -8 而产生凋亡效应。两者的生物学分工是什么,关系如何,引起学者们极大的兴趣。

2.2 半胱天冬酶 -10 和 -8 可能组成分子开关共同调控细胞凋亡 Fas 受体通过招募 FADD,半胱天冬酶 -8, -10, 诱导细胞凋亡,但是半胱天冬酶 -10 在 Fas 途径中的功能如何存在较大的争议,一方面它的过量表达可以绕过半胱天冬酶 -8 的缺失,重新恢复细胞对 Fas 配体的敏感性,导致细胞凋亡^[8],另一方面, Sprick MR^[11]等运用相同的策略无法恢复半胱天冬酶 -8 缺失细胞对 Fas 配体的敏感性。半胱天冬酶 -10 不同的表达水平或许可以解释以上矛盾,补救半胱天冬酶 -8 缺失对细胞凋亡的影响可能需要较高浓度的 Caspases -10。Goepel 等^[15]发现在多形核嗜中性粒细胞中, TNF- α 促进了半胱天冬酶 -8 的活化,同时抑制了半胱天冬酶 -10 的活化,最终导致细胞凋亡,并证明 TNF- α 诱导的凋亡取决于半胱天冬酶 -8 的活化;而该细胞的自然凋亡取决于半胱天冬酶 -10 的活化,与半胱天冬

酶 -8 无关。半胱天冬酶 -10 和 -8 在死亡信号转导上游途径中可能组成一个分子开关,此消彼长,以决定细胞的死亡途径:自然死亡或是受到类似 TNF- α 的炎症刺激因素调节的细胞凋亡,但是它们的关系还待进一步确证。

2.3 半胱天冬酶 -10 的作用底物和调控 细胞凋亡的调控是很多信号分子组成的复杂网络,半胱天冬酶 -10 是重要的中间环节:多个信号分子通过调控半胱天冬酶 -10 的活性进而影响其下游分子的生物学功能,共同调控细胞凋亡的过程,见图 1。已证实,半胱天冬酶 -10 可以活化半胱天冬酶家族中的 -3, -7^[4], -6^[13], 激发半胱天冬酶级联反应,参与细胞凋亡过程。Milhas D 等^[14]发现半胱天冬酶 -10 可以裂解并活化 Bid 蛋白,抑制半胱天冬酶 -10 的活性可以阻断 Bid 的生成,并且证明 Bid 是半胱天冬酶 -10 的直接作用底物,是半胱天冬酶 -10 激活线粒体凋亡途径的媒介分子。DNA 损伤化疗药物处理细胞后,半胱天冬酶 -10 的 mRNA 和蛋白表达水平均得到提高,而半胱天冬酶 -8 的表达未受影响,染色体免疫沉淀反应发现 p53 多个特异性的结合位点位于半胱天冬酶 -10 基因附近,因此推测 DNA 损伤可以通过活化 P53 向上调节半胱天冬酶 -10 的表达,启动细胞的凋亡^[17]。半胱天冬酶 -10 还可以激活 NF- κ B 途径,调节细胞凋亡^[18]。McDonald ER 3rd 等^[19]运用酵母双杂交的方法,分离出与半胱天冬酶 -8, -10 相关的含 RING 指状结构的蛋白(CARP),并发现如果该蛋白过量表达,可通过类似凋亡抑制蛋白的 RING 指状结构,促进半胱天冬酶 -8, -10 发生泛素调节的蛋白水解,抑制细胞凋亡。CARP 蛋白在肿瘤组织和肿瘤细胞系中表达量很高;该蛋白功能的沉寂将导致半胱天冬酶 -8, -10 活化能力的提高,进而迅速恢复高效率的凋亡;长时间抑制该蛋白的表达可以抑制肿瘤细胞的生长。P53 和 CARP 分别正向和负向调节半胱天冬酶 -10 的表达,进而影响细胞的生长;是否还有其他调控分子的存在, CARP 对半胱天冬酶 -8 和 -10 的调控是否有所区别,还待进一步研究。

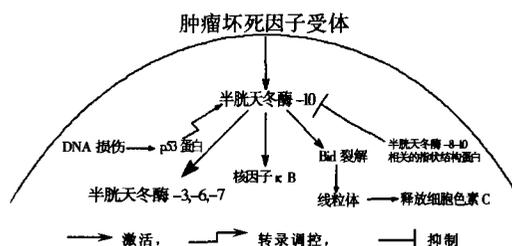


图 1 半胱天冬酶 -10 的调控

2.4 半胱天冬酶-10 与疾病、胚胎发育的关系

半胱天冬酶-10 广泛参与了细胞凋亡,与凋亡相关的生理病理过程有着密切的联系,它的基因突变以及表达异常与疾病密切相关。半胱天冬酶-10 可以诱导 MCF-7 乳腺癌细胞的凋亡^[6],可以使乳腺癌细胞更易发生 TRAIL 诱导的细胞凋亡,尤其是在 TRAIL 浓度较低时^[20]。117 例非霍奇金淋巴瘤中,17 例的半胱天冬酶-10 基因发生了突变,进而将突变基因转染至 293 细胞中,细胞凋亡受到抑制^[21];80 例非小细胞肺癌中,4 例发生了该基因的突变^[22]。另外,半胱天冬酶-10 在部分肿瘤细胞中有 mRNA 的表达而缺失蛋白的表达,我们推测半胱天冬酶-10 基因突变和表达异常造成细胞凋亡失常,是某些肿瘤发生发展的原因之一。

在免疫系统中,淋巴细胞的凋亡可以对抗它的增殖,以达到免疫系统的平衡,使得机体防御病原体的侵害并且避免自身免疫。Wang 等^[16]发现两例 II 型自身免疫性淋巴增生综合征(ALPS II)家族,伴随着淋巴细胞和树突状细胞的紊乱和半胱天冬酶-10 的错义突变,其主要特征是尽管 Fas 的表达和序列均正常,而 Fas 调控的淋巴细胞凋亡失常,因此推测半胱天冬酶-10 的突变造成了该综合征的发生和发展。但是最近有些 ALPS II 病人并没有发现半胱天冬酶-10 的缺失^[23],半胱天冬酶-10 突变和 ALPS II 的关系还待进一步考证。

半胱天冬酶-8 基因敲除小鼠均死于胚胎期,因而推测人类缺失半胱天冬酶-8 后也很难存活,而 Chun 等^[24]报道了一例半胱天冬酶-8 缺失的人类家族,因为淋巴细胞活化的缺失导致免疫缺陷,这一方面说明半胱天冬酶-8 在免疫系统自身平衡中发挥重要作用,另一方面也预示着该家族的成活可能得益于半胱天冬酶-10 的补救。半胱天冬酶-10 在人类胚胎组织中表达量都很高^[6],在小鼠中未发现该基因的表达^[23],这是否预示着半胱天冬酶-10 是半胱天冬酶-8 进化的产物,使两者的生物学分工更加明确。因此,从胚胎发育和生物进化的角度去研究半胱天冬酶-10 的功能将会有更多的发现。

3 小结和展望

细胞凋亡是一种在特定时空主动发生的、受基因严密调控的细胞逐渐死亡的现象。半胱天冬酶-10 是细胞凋亡启动阶段重要的调控分子,已发现它在免疫反应,肿瘤的发生和发展,胚胎发育等过程中起重要作用,半胱天冬酶-10 表达异常与疾病密切相关。近年来,对肿瘤生物学的研究进展非常迅速,

人们对癌症的了解已深入到分子水平,比如:癌基因与抑癌基因的发现,肿瘤抗原、DNA 修复、细胞凋亡学说的形成等,为抗癌药物的研究与发展提供了新的分子生物学理论基础。深入探讨半胱天冬酶-10 的功能将是非常有意义的工作,一方面将有利于全面阐述细胞凋亡调控的分子机制,另一方面也将有利于开发设计针对半胱天冬酶-10 调控环节的抗肿瘤药物。

参考文献:

- [1] Yuan J, Shaham S, Ledoux S, *et al.* The *C. elegans* cell death gene Ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme[J]. *Cell*, 1993, 75(4): 641.
- [2] Xue D, Shaham S, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease[J]. *Genes Dev*, 1996, 10(9): 1073.
- [3] Shi, Y. Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis[J]. *Mol. Cell*, 2002, 9(3): 459.
- [4] Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, *et al.* In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(15): 7464.
- [5] Vincenz C, Dixit VM. Fas-associated Death Domain Protein Interleukin-1 β -converting Enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 Homologue, Is Proximally Involved in CD95- and p55-mediated Death Signaling[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(10): 6578.
- [6] Ng PW, Porter AG, Janicke RU. Molecular Cloning and Characterization of Two Novel Pro-apoptotic Isoforms of caspase-10[J], *J Biol Chem*, 1999, 274(15): 10301.
- [7] Wang J, Chun HJ, Wong W, *et al.* caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(24): 13884.
- [8] Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, *et al.* Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase -8 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (49): 46639.
- [9] Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, *et al.* Deregulation of caspase-8 and -10 expression in pediatric tumors and cell lines [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(20): 5897.
- [10] Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, *et al.* Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5[J]. *Immunity*, 2000, 12(6): 611.
- [11] Sprick MR, Rieser E, Stahl H, *et al.* caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signaling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase -8. [J], *EMBO J*, 2002, 21(17): 4520.
- [12] Werner AB, de Vries E, Tait SW, *et al.* TRAIL Receptor and CD95 Signal to Mitochondria via FADD, caspase-8/10, Bid, and Bax but Differentially Regulate Events Downstream from Truncated Bid[J]. *J. Biol. Chem*, 2002, 277(43): 40760.
- [13] Park SJ, Wu CH, Gordon JD, *et al.* Taxol induces caspase-10

- dependent apoptosis[J]. J Biol Chem. 2004,279(49):51057.
- [14] Milhas D, Cu villier O, Therville N, et al. caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis[J]. J Biol Chem,2005, 280(20):19836.
- [15] Goepel F, Weinmann P, Schymeinsky J, et al. Identification of caspase-10 in human neutrophils and its role in spontaneous apoptosis[J]. Journal of Leukocyte Biology. 2004,75(5): 836.
- [16] Wang J, Zheng L, Lobito A, et al. Inherited human caspase-10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II[J]. Cell,1999,98(1):47.
- [17] Rikhof B, Corn PG, El-Deiry WS. Caspase-10 Levels are Increased Following DNA Damage in a p53-Dependent Manner[J], Cancer Biol Ther,2003,2(6):707.
- [18] Chaudhary PM, Eby MT, Jasmin A, et al. Activation of the NF-kappaB pathway by caspase-8 and its homologs[J]. Oncogene, 2000,19(39):4451.
- [19] McDonald ER 3rd, El-Deiry WS. Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A,2004,101(16):6170.
- [20] Engels IH, Totzke G, Fischer U, et al. caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase -3-dependent manner[J]. Mol Cell Biol,2005,25(7):2808.
- [21] Shin MS, Kim HS, Kang CS, et al. Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas[J]. Blood,99(11):4094.
- [22] Shin MS, Kim HS, Lee SH, et al. Alterations of Fas-pathway genes associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Oncogene,2002,21(26):4129.
- [23] Rieux-Laucat F, Le Deist F, Fischer A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways[J]. Cell Death Differ,2003,10(1):124.
- [24] Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency[J]. Nature,2002,419(6905):395.

收稿日期:2005-11-27

长白瑞香的化学成分及药理研究概况

扈晓佳¹,张卫东^{1,2},柳润辉²,张川²,苏娟²,徐希科²,袁鹰¹,张薇²,单磊²(1. 上海交通大学药学院,上海 200240; 2. 第二军医大学药学院,上海 200433)

摘要 目的:对中药长白瑞香的化学成分和药理活性作用进行综述。方法:查阅近30年的相关文献。结果:全草主要含有瑞香素、瑞香苷等香豆素类化合物。药理活性研究表明,长白瑞香具有抗炎、抗疟、抗寄生虫、抑制蛋白激酶活性、抗癌、抗氧化等作用。结论:中药长白瑞香具有广泛的药理活性,临床上主要用来治疗冠心病、风湿性关节炎、血栓闭塞性脉管炎等。长白瑞香在我国分布较少,对其进行进一步化学和药理学研究具有重要的意义。

关键词 长白瑞香;化学成分;药理活性

中图分类号:R931.71

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2006)02-0079-03

长白瑞香 *Daphne koreana* Nakai 为瑞香科 (Thymelaeaceae) 瑞香属植物朝鲜瑞香的全草,又名朝鲜瑞香、辣根草,为落叶小灌木,生于针阔叶林及针叶林下、林缘,海拔 600~1800m 之间均有分布。主要分布于中国东北一带,朝鲜亦产^[1]。主产地在吉林省安图、长白、和龙和抚松一带^[2]。长白瑞香性味辛、热,有温中散阳,行瘀止痛的功效,为民间治疗跌打损伤的常用药。临床上主要用来治疗冠心病、风湿性关节炎、血栓闭塞性脉管炎等。近年来,国内外对长白瑞香进行了一定的研究和应用,但未见综述,现将其化学成分和药理研究作一综述。

1 化学成分

长白瑞香全草主要含有香豆素和黄酮类成分。自 1977 年以来,从长白瑞香全草中共分离得到了 7 个香豆素类成分,分别为瑞香素、瑞香苷、瑞香素-8-O-β-D-葡萄糖苷、7,8-二甲氧基香豆素、七叶内酯、双白瑞香素和瑞香素-7-O-β-D-葡萄糖苷^[3-5],其中根皮中含有瑞香素约 0.1%。为本品的有效成分,现已合成,合成品已试用于临床^[6]。此外,还分得了 β-谷甾醇和柚皮素等成分^[3,5]。

2 药理活性

2.1 镇痛作用 在多种镇痛实验中,注射和灌服瑞香素具有明显的镇痛作用。在小鼠电热板,醋酸扭