维普资讯 http://www.cqvip.com

肿瘤，维生素A 维视黄醛，维甲酸，细胞凋亡

第22卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.22 No.4
1997 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1997

386-389

维生素甲类化合物与细胞凋亡的诱导

38

临床学院 血液科 刘小珊* 综述 娄陵生 曾淑蓉 审校

R73-361

中图分类号 Q582

维生素甲类化合物(Retiniods)包括维生素A及其衍生物视黄醛和维甲酸。生理学、营养学、胚胎学等多学科的研究证实维甲类化合物具有多种生物学功能。这类化合物对细胞增殖、分化的影响使其在肿瘤的预防和治疗中起着重要作用[1]。目前研究发现维甲类化合物在体外能诱导正常细胞和多种肿瘤细胞凋亡。细胞凋亡的产生同维甲类化合物的结构以及细胞类型有关[2]。近来研究表明肿瘤的发生与细胞凋亡的调节紊乱有密切联系，细胞凋亡规律失常是肿瘤发生与发展的一个重要因素。随着研究技术的不断发展，对细胞凋亡的认识已逐渐丰富。维甲类化合物诱导细胞凋亡的研究为细胞凋亡调控机理的阐明以及肿瘤的治愈提供了重要的物质基础。

1 维甲类化合物结构与分子细胞生物学

1909年Stepp最早报导了维甲类对动物生长的重要性。1920年这类化合物被正式命名为维生素A。在体内维生素A被氧化成维生素甲酸而发挥作用。维生素甲酸分子由环已烯、侧链和极性基团三部分组成[3]。化学改造末端极性基团得到"第一代维生素甲类化合物"，如维生素甲酰胺化合物N－4(羟基苯基)维生素甲酰胺(4－HPR)。改变环状末端得到"第二代维生素甲类化合物"，其典型代表为抗癣灵(etretinate)。多烯侧链环化则得到"第三代维生素甲类化合物"，其典型代表为维生素甲类苯甲酸衍生物或芳香维生素甲类化合物(arotinoids)TTNPB及其乙酯(Ro 13－6298)。为寻找毒性低、疗效高的肿瘤预防和治疗药，目前已合成了两千多种维生素甲类化合物。维甲类化合物的生物学功能多种多样，其对细胞的作用方式与途径仍不清楚。目前认为维甲酸是通过信号传递系统控制靶基因来影响细胞[4]。现已发现两大类维甲类受体即维甲酸受体(RARs)和维甲酸X受体(RXRs)，二者均为核受体。每一类又包括α、β、γ三个亚类和许多同分异构件。RARs和RXRs都由一个DNA结合区和一个配体结合区构成，它们均以二聚体形式同靶基因上的顺式反应元件(RARE)相结合调节基因转录。

2 细胞凋亡

凋亡(apoptosis)一词来源于希腊文，意为树叶的凋落。1972年Kerr从细胞形态学上注意到凋亡现象。细胞凋亡即细胞程序性死亡是细胞自然死亡的一种主要形式。凋亡与坏死不同。细胞坏死是病理状态，始于细胞膜的损伤内容物流出可在周围引起炎症反应;而细胞凋亡则为细胞的固有性质，始自细胞核，细胞虽有裂解，但内容物始终被胞膜包裹，对周围组织无影响。凋亡细胞有两个主要特征:一是形态上染色质压缩呈致密块状、核裂解、胞浆致密，最后形成凋亡小体;二是DNA分解为一系列规则片段，共大小差异均为180－200bp的倍数，在琼脂糖凝胶电泳上可看到特征性的梯形图谱。许多信息传递和基因表达都能影响细胞凋亡，但其发生机理与调控仍不清楚。

3 维甲类化合物诱导正常细胞的凋亡

在胚胎发育过程中，维甲酸过量会导致畸形发生。由于维甲酸可影响区域内细胞发生过度凋亡，因此维甲酸过量会导致畸形发生。Alles[5]等研究发现在小鼠胚胎的肢体发育过程中，有限的部分细胞发生生理性细胞死亡，当加入维甲酸时，这些细胞则发生过度凋亡，导致肢体发育缺陷，畸形发生。在正常肺组织，维甲酸对支气管粘膜上皮分化起重要作用。但有研究表明全反式维甲酸可诱

* 女，1967－11出生，住院医师

维普资讯 http://www.cqvip.com

导气管支气管上皮细胞株SPOC－1发生凋亡[6]。

4 维甲类化合物诱导肿瘤细胞的凋亡

4.1 血液系统肿瘤 维甲酸诱导白血病细胞分化成熟后伴随了细胞凋亡。Martin等[7]用全反式维甲酸诱导人急性粒系白血病细胞HL－60分化至成熟中性粒细胞后，用密度梯度离心法分离出富含成熟细胞的细胞层，经形态学及DNA凝胶电泳证实这部分成熟中性粒细胞发生了凋亡。这同外周血中衰老的粒细胞发生凋亡现象一致。

维甲类化合物也可直接诱导人白血病细胞凋亡，不伴有细胞分化的发生。4－HPR与全反式维甲酸分别作用人早幼粒白血病细胞NB4.5天后可发现全反式维甲酸组分化细胞占80～90%，而4－HPR组只占2～4%，多数细胞则出现凋亡的形态学特征。如果用4－HPR作用淋巴瘤细胞株DOHH、DHC－4、K_{422}以及对全反式维甲酸耐受的人白血病细胞株HL－60R和NB306细胞后也可发现作用浓度为3×10^{-6}mol/L的4－HPR诱导了这些细胞凋亡，凋亡发生时间仅在药物作用后6小时，但无分化细胞出现[8]。有研究发现能同时激活RPA和RXR的维甲类化合物9－顺式维甲酸在作用浓度为1μmol/L时诱导了HL－60细胞凋亡[8]。同样，先用作用于RAR的TTNPB与HL－60细胞共同培养72小时，后再同合成的可激活RXR的第三代维甲类化合物LG100268培养48小时，凋亡细胞数量明显上升。

4.2 肺癌 维甲酸在诱导SPOC－1细胞株凋亡的同时，也能诱导人肺腺癌细胞株NCI－H460细胞凋亡[6]。

4－HPR能诱导血液肿瘤细胞凋亡，同时也可诱导实体瘤细胞的凋亡。Kalemkeria等[10]用4－HPR与全反式维甲酸分别作用七个小细胞肺癌细胞株(SCLC)后常规镜检发现，0.1umol/L的4－HPR诱导了细胞形态学向细胞凋亡的改变，而1.0umol/L的全反式维甲酸则导致细胞分化倾向的改变。进一步对其中一细胞株NCI－H82研究发现0.5umol/L的4－HPR作用细胞24小时即可观察到凋亡的形态学改变，至48小时凋亡小体明显增多，后用DNA含量测定以及用原位末端转移酶(TdT)将标记的dUTP连接DNA断裂处测定凋亡细胞的方法也证实了细胞凋亡的发生，但是全反式维甲酸组以及对照组结果均为阴性。

4.3 成神经细胞瘤 全反式维甲酸在作用成神经瘤细胞株SK－N－BE(2)的亚群(2)－C(I－type)和BE(2)－M17(N－type)后可观察到BE(2)－C(I－type)细胞发生凋亡的形态学改变，BE(2)－M17(N－type)细胞则表现为分化的形态学特征[11]。但是，Ponzoni等[12]研究显示全反式维甲酸对各种表现型的人成神经细胞瘤均为诱导分化作用，发生终末分化后的部分细胞发生了凋亡。另有研究表明4－HPR可诱导各型成神经瘤细胞凋亡，与细胞表现型无关[13]。研究者采用临床癌预防用药的血药浓度(3umol/L)的4－HPR作用各型成神经瘤细胞3天时，细胞发生了凋亡。降低4－HPR的浓度诱导细胞10天，细胞未发生凋亡与分化。进一步研究发现4－HPR诱导成神经瘤细胞凋亡时与时间和剂量有关。1.25umol/L的4－HPR作用成神经瘤细胞LAN－5两天后约15%细胞呈现凋亡，5umol/L的4－HPR作用细胞8天时90%细胞发生凋亡[14]。

4.4 其它肿瘤 Fq是最具特征性的胚胎肿瘤细胞(EC)，来源于畸胎瘤中未分化的干细胞。全反式维甲酸对Fq细胞诱导分化作用是肯定的。有研究表明全反式维甲酸诱导Fq细胞3天时部分细胞发生了分化，同时用电镜、DNA凝胶电泳却发现部分细胞发生了凋亡[15]。

上皮组织是维甲类化合物正常生理作用组织。维甲类化合物可诱导多种鳞癌细胞株分化。Sacks等[16]研究发现当多种鳞癌细胞株混合培养时，β－全反式维甲酸诱导了部分细胞凋亡。

5 维甲类化合物诱导细胞凋亡的相关途径

5.1 维甲类受体RARs及RXRs

5.1.1 RAR－β 生理条件下RAR－β的表达与细胞死亡过程有关。有研究表明发育中的小鼠肢体细胞的RAR－β在肯定会发生细胞凋亡的间充质组织表达很高，提示维甲酸可能通过RAR－β的

维普资讯 http://www.cqvip.com

激活来诱导细胞凋亡[17]。另外小鼠胚胎指(或趾)间的间充质组织在形态发生中的生理性细胞死亡与RAR－β表达有密切联系。这种指(趾)间间充质细胞死亡过程的特征表现为细胞凋亡[16]。同样，Kochhar等[18]研究证实了维甲酸诱导小鼠肢芽核心的间充质细胞凋亡是通过RAR－β调节的。

5.1.2 RAR—α 维甲类化合物诱导正常细胞凋亡的途径也可通过RAR－α来进行。人气管支气管上皮细胞株SPOC－1有维甲类受体RAR－α，RAR－γ及RXR的表达。为了证实与细胞凋亡有关的维甲类受体，Jetten实验室[6]采用对受体有选择性作用的维甲酸及其拮抗剂作用细胞发现，选择性作用RAR的维甲酸SRI－6751－84以及作用RAR－α的Ro40－6055均分别诱导了细胞凋亡。而选择作用RAR－γ的CD437以及作用RXR的维甲类化合物SR11217均未诱导细胞凋亡。同样，细胞凋亡可被RAR－α拮抗剂Ro41－5253阻断。

5.1.3 RXR 人白血病细胞HL－60凋亡的诱导与RXR激活有关[20]。但也有研究表明HL－60细胞凋亡与RAR和RXR的同时激活有关，选择性作用于任一维甲类受体的维甲类化合物不能诱导HL－60细胞凋亡[9]。

5.2 组织转谷氨酰胺酶(TGaseⅡ)

转谷氨酰胺酶是一种Ca^{2+}依赖酶，催化多肽链间的酰基转移反应，导致稳定的蛋白交联(cross－linkings)形成。现已分离出Ⅰ型(上皮)转谷氨酰胺酶和Ⅱ型(组织)转谷氨酰胺酶(TGaseⅡ)。有些细胞类型中TGaseⅡ型的表达可能与细胞凋亡有关。细胞凋亡时TGaseⅡ的激活导致蛋白交联骨架的高度聚集，这种骨架暂时保持了死亡细胞的完整性，阻止了细胞内一些有害的大分子物质释放。维甲类化合物诱导细胞凋亡时可伴有TGaseⅡ的产生。Jetten实验室[8]研究发现维甲酸诱导SPOC－1细胞凋亡时伴有细胞内TGaseⅡmRNA含量增多和TGaseⅡ蛋白增加。但不能诱导细胞凋亡的维甲类化合物作用细胞时TGaseⅡ基因的表达则未改变。另也有研究发现维甲类化合物通过RAR与RXR的激活诱导白血病细胞凋亡时伴有TGaseⅡ活性的增加[9]。成神经瘤细胞在被全反式维甲酸诱导凋亡时，TGaseⅡmRNA、酶蛋白和酶活性均增高，但被诱导分化时，则没有发现与TGaseⅡ有关的变化。最近研究发现HL－60细胞在被维甲类化合物诱导分化时有TGaseⅡmRNA表达及其酶活性的升高，而4－HPR是例外，诱导凋亡时不伴有TGaseⅡmRNA表达及其酶活性增加[21]。

5.3 基因调控

5.3.1 bcl－2基因 bcl－2基因是1985年Tsujimoto等发现于滤泡型霍杰金氏淋巴瘤B细胞。多种癌细胞株都有bcl－2基因。单一bcl－2无致癌作用，但有阻断细胞程序性死亡的作用。许多与bcl－2具有同源顺序的基因构成bcl－2基因家族可调节细胞死亡过程，这些基因所表达的蛋白质间相互作用及意义均不清楚。维甲类化合物诱导某些类型细胞凋亡时与bcl－2基因调控有关。全反式维甲酸诱导HL－60细胞分化成熟的同时伴有bcl－2蛋白的下降，但这不能确定bcl－2蛋白下降是细胞分化的必要条件还是细胞分化后的结果[22]。用全反式维甲酸作用转染了bcl－2基因的HL－60细胞发现bcl－2在HL－60细胞中的过度表达对全反式维甲酸诱导细胞分化成熟没有影响，但使成熟后的细胞存活期延长[23－24]。表明了全反式维甲酸诱导HL－60细胞分化后的凋亡与bcl－2有关。但是，4－HPR诱导小细胞肺癌(SCLC)及全反式维甲酸诱导卵巢癌细胞株(N－1)凋亡时，bcl－2基因表达均无明显改变[6,25]。

细胞凋亡与细胞氧损伤有关，抗氧化剂可阻断细胞凋亡。Hockenbery等[26]报道bcl－2基因能抗凋亡是由于bcl－2蛋白对膜脂质的过氧化有保护作用，它可使产生氧自由基的系统不活化，减少氧自由基产生。但是4－HPR诱导血液肿瘤细胞凋亡时，加入抗氧剂阻断了细胞凋亡而bcl－2表达未受影响[6]。bcl－2在维甲类化合物诱导细胞凋亡中的调控有待进一步研究。

5.3.2 C－myc基因 C－myc基因为细胞增殖调控的早期反应基因。人类多种肿瘤细胞中发现有C－myc基因的高度表达。最近报道C－myc基因的持续表达可促进细胞凋亡[27]。C－myc基因与细胞增殖、凋亡的关系还不清楚。4－HPR诱导小细胞肺癌细胞凋亡时伴有C－myc基因的高度表达[10]，

维普资讯 http://www.cqvip.com

但在诱导血液肿瘤细胞凋亡时却与C－myc基因无关[5]。另外全反式维甲酸诱导卵巢癌细胞株(N－1)细胞凋亡的同时伴有C－myc基因的高度表达[25]随着作用细胞的全反式维甲酸浓度的增加，C－myc基因表达增加，细胞凋亡数量也增加。这种结果出乎人们意料。因为在C－myc基因起动区里未报道有维甲酸顺式反应元件(RAREs)。实验表明全反式维甲酸诱导(N－1)细胞中的C－myc基因的高度表达不依赖于维甲类受体而与磷酯酶活性有关。因为磷酯酶抑制剂可抑制全反式维甲酸诱导的C－myc基因的高度表达。C－myc基因的诱导信号可能产生于细胞膜的磷酯酶的激活。在调节基因表达时，这种间接途径较经典的RA－RAR－RARE途径快。

5.4 其它途径

4－HPR能诱导多种肿瘤细胞凋亡。许多研究表明其作用途径与全反式维甲酸不一样。Dalia[8]等研究报道RNA翻译及蛋白质合成抑制剂可抑制4－HPR诱导的血液肿瘤细胞凋亡，而DNA多聚酶抑制剂不影响细胞凋亡，表明4－HPR诱导血液肿瘤细胞凋亡时需要新的基因表达，而不是经RARs或RXRs作用。另外用蛋白激酶C激活剂时，细胞凋亡的产生受到抑制，说明蛋白激酶C在4－HPR诱导的细胞凋亡中起调节作用，与蛋白激酶C可激活而阻止DNA拓扑异构酶Ⅰ、Ⅱ抑制剂诱导的肿瘤细胞凋亡是一致的。抗氧剂也可阻断4－HPR诱导的血液肿瘤细胞凋亡，表明4－HPR诱导的细胞凋亡与氧损伤有关。总之，4－HPR对细胞凋亡的诱导是多因素参与的过程，对不同类型细胞其作用途径也不一样。

6 结语

过去对维甲类化合物抑制细胞增殖、诱导细胞分化的研究较多。随着对细胞死亡方式的重视，维甲类化合物在体外诱导肿瘤细胞凋亡的研究逐渐增多。目前应和诱导或恢复癌前细胞和癌细胞凋亡的各种制剂来进行癌预防和治疗已成为肿瘤治疗的一种新思维。维甲类化合物作用机理的基础研究处于同类研究的前沿、新的结构不断被报导、有诱人的研究开发前景，为临床治疗肿瘤建立一种低毒，高效的新疗法开辟新的途径。这些都必将为维甲类化合物在临床治疗肿瘤上的广泛运用打下基础。

参考文献

1.Smith MA, et al. J. Clin. Oncol. 1992;10:839
2.Lotan R. J. Natl. Cancer. Inst 1995;87:1655
3.韩 锐.肿瘤化学预防药物治疗. 1990年版，64
4.钟 华.国外医学《输血及血液学分册》 1996;19:150
5.Alles A, et al. Teratology. 1989;40:163
6.Zhang LX, et al. J. Biol. Chem. 1995;270:6022
7.Martin SJ, et al. Clin. Exp. Immunol. 1990;79:448
8.Dalia D, et al. Cancer Res. 1993;53:6036
9.Bobhm TM, et al. J. Med. Chem. 1993;38:3146
10.Kalemkerian GP, et al. J. Natl. Cancer. Inst. 1995;87:1674
11.Piacentini M, et al. Int. J. Cancer. 1992;52:271
12.Ponzoni M, et al. Cancer Res. 1995;55:853
13.Mariotti A, et al. J. Natl. Caner. Inst. 1994;86:1254
14.Vinci AD, et al. Int. J. Cancer. 1994;59:422
15.Atencia R, et al. Exp. cell Res. 1994;241:663
16.Sacks PA, et al. J. Cell. physiol. 1990;44:237
17.Dolle P, et al. Nature. 1989;342:702
18.Mendelsohm C, et al. Development. 1991;113:723
19.Kochhar DM, et al. Prog. Clin. Bio. Res. 1994;383B:815
20.Nagy L, et al. Mol. Cell Biol. 1995;15:3540
21.Benedetti L, et al. Blood. 1996;87:1939
22.Benito A, et al. Am. J. Pathol. 1995;146:481
23.Naumovski L, et al. Blood. 194;83:2261
24.Park JR, et al. Blood. 1994;84:440
25.Kruptiza G, et al. Int. J. Cancer. 1995;61:649
26.Hockenbery DM, et al. Cell. 1993;75:241
27.Pockham G, et al. Biochim. Biophys. Acta. 1995;1242:11

(收稿日期 1996－11－11)