

## 综述

## 沙蟾毒精抗癌活性及相关机制的研究进展

白雯会<sup>1</sup>, 沈淑坤<sup>2</sup>, 吴英理<sup>1</sup>

1. 上海交通大学基础医学院病理生理学系, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面-头颈肿瘤科, 上海 200011

**[摘要]** 蟾酥是一种具活性的蟾蜍提取物, 其炮制方法是将中华大蟾蜍皮肤腺和耳后腺分泌的毒液进行酒制或高温干燥而得。作为一种在中国被用来治疗疾病已有上千年历史的天然产物, 蟾酥具有强心、镇痛、抗心肌缺血、抗内毒素休克、抗癌等多种药理作用。沙蟾毒精 (arenobufagin, ARE) 是蟾酥的主要化学成分之一, 其抗癌机制也在近十年来被越来越多地阐明。ARE 可通过多种途径发挥抗癌作用, 如诱导癌细胞凋亡和/或自噬、坏死、细胞周期阻滞, 抑制癌细胞迁移和侵袭, 抑制血管生成等。目前有关 ARE 的研究主要关注在其癌细胞选择性毒性和抗癌分子机制方面, 多为细胞和动物水平。受限于 ARE 毒副作用较大、靶点不明确和药代动力特性不清楚等, ARE 尚未进入西医临床应用阶段。该文梳理了 ARE 的抗癌活性、抗癌分子机制以及与其他抗癌药物联合使用的相关研究成果, 以期完善 ARE 的抗癌机制研究提供新的方向。

**[关键词]** 沙蟾毒精; 蟾酥; 抗癌; 分子机制

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.03.012 **[中图分类号]** R453.9 **[文献标志码]** A

## Research progress in the anti-cancer activity and related mechanisms of arenobufagin

BAI Wenhui<sup>1</sup>, SHEN Shukun<sup>2</sup>, WU Yingli<sup>1</sup>1. Department of Pathophysiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China;  
2. Department of Oral and Maxillofacial-Head and Neck Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

**[Abstract]** Toad venom is an active extract of toad, which is processed by distilling or drying at high temperature the venom secreted from the skin glands and ear-side glands of Toad Chinensis. As a natural product that has been used to treat diseases in China for thousands of years, toad venom has many pharmacological effects such as heart strengthening, analgesia, anti-myocardial ischemia, anti-endotoxin shock, and anti-cancer. Arenobufagin (ARE) is one of the main chemical components of toad venom, and its anti-cancer mechanism has been increasingly clarified in the past decade. ARE can play an anti-cancer role through a variety of ways, such as inducing apoptosis and/or autophagy of cancer cells, necrosis, and cell cycle arrest, inhibiting cancer cell migration and invasion, and inhibiting angiogenesis. The current research on ARE mainly focuses on the selective toxicity of cancer cells and the molecular mechanism of anti-cancer, mostly at the cellular and animal levels. Due to the large toxic and side effects of ARE, unclear targets and unclear pharmacokinetic characteristics, ARE has not yet entered the clinical application in Western medicine. This article summarizes relevant research results on the anti-cancer activity and molecular mechanism of ARE, and its combination with other anti-cancer drugs in order to provide a new direction for improving the anti-cancer mechanism of ARE.

**[Key words]** arenobufagin (ARE); toad venom; anti-cancer; molecular mechanism

蟾蜍药用首载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>。蟾蜍的蟾皮和蟾酥是其两大药用来源, 其中蟾酥是由蟾蜍皮肤腺和耳后腺的白色浆液经酒制或干燥炮制而得。在中国古代, 蟾酥制剂主要被用于清热解毒、强心、镇痛、缓解咽喉肿痛等。在现代药理研究中, 蟾酥具有抗心

肌缺血、抗内毒素休克、抗癌等作用, 且药理活性较强。蟾酥化学成分复杂, 主要包括蟾蜍甙、吲哚生物碱类、蟾蜍二烯内酯类、甾醇类及其他类化合物。其中, 蟾蜍甙和吲哚生物碱类是现代医学研究中最清楚

的蟾蜍提取物<sup>[2]</sup>。沙蟾毒精 (arenobufagin, ARE)

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (82170145)。

**[作者简介]** 白雯会 (1999—), 女, 硕士生; 电子信箱: baiwenhui@sjtu.edu.cn。

**[通信作者]** 吴英理, 电子信箱: wuyingli@shsmu.edu.cn。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82170145)。

**[Corresponding Author]** WU Yingli, E-mail: wuyingli@shsmu.edu.cn。

是蟾蜍甙的主要活性成分之一, 其是C-17位含有一个吡咯烷酮环的C-24甙体类化合物, 分子式为 $C_{24}H_{32}O_6$ , 分子量为416.511<sup>[3]</sup>。功能研究<sup>[4]</sup>指出, ARE是一种强心类固醇, 可通过抑制钠-钾泵ATP酶产生心脏毒性。而生物活性研究<sup>[4]</sup>指出ARE不仅可以诱导癌细胞凋亡、自噬、氧化应激和铁死亡, 还可以抑制肿瘤血管生成、癌细胞迁移和侵袭、肿瘤细胞干性并造成癌细胞细胞周期阻滞。抗癌活性研究<sup>[4]</sup>显示ARE在肺癌、前列腺癌、乳腺癌等十余种恶性肿瘤中均有较明显的抗癌活性, 继而提示ARE的靶点不止钠-钾泵ATP酶。因此, 总结ARE的抗癌活性及相关机制有利于解读并完善ARE的抗癌机制、发掘ARE的新靶点及靶标分子。基于此, 本文就ARE的抗癌活性、抗癌分子机制以及与其他抗癌药物的联合使用进展进行综述。

## 1 ARE的抗癌活性

从2010年起, ARE的抗癌活性逐渐被揭示<sup>[3]</sup>, 如ARE在胰腺癌、肝癌、食管鳞状细胞癌、肺癌等多种实体瘤中均具有良好的抗癌活性, 癌细胞、耐药细胞分别比正常细胞、非耐药细胞对ARE更为敏感等, 继而提示ARE对癌细胞有选择性毒性作用, 并且有望成为治疗耐药性疾病的新策略。如下, 我们从动物水平、细胞水平对ARE的抗癌活性进行介绍。

### 1.1 ARE在动物水平的抗癌活性

在胰腺癌小鼠异种移植模型中, ARE(静脉注射给予)可以剂量和时间依赖的方式显著抑制胰腺癌细胞的增殖、胰腺肿瘤的生长速率, 并减少血液中癌细胞的密度<sup>[5-7]</sup>。在其他动物模型如肝癌细胞Hep3B的斑马鱼异种移植模型中, ARE组和索拉非尼(肝癌治疗药物)组均可显著抑制Hep3B细胞的肿瘤形成能力<sup>[7]</sup>。同时, 以食物喂养的方式给予ARE也可发挥较显著的抗癌效果。如LV等<sup>[8]</sup>对人食管癌细胞Eca-109的模型小鼠进行每隔1 d的4 mg/kg ARE喂养, 结果发现10次喂养后模型小鼠的肿瘤体积减小至对照组的46%, 肿瘤质量也呈时间依赖性的下降。

值得注意的是, 在胰腺癌小鼠模型研究<sup>[5-7]</sup>中, 每日分别行腹腔注射6.4 mg/kg ARE、37.1 mg/kg 吉

西他滨(胰腺癌治疗药物)后发现, ARE组肿瘤体积减小至对照组的37.19%, 而吉西他滨的抑制效果仅为46.68%, 这表明ARE较吉西他滨有更强的抗肿瘤活性。此外, 对耐药肝癌细胞株HepG2/ADM的异种移植模型小鼠进行为期28 d的3 mg/(kg·d) ARE喂养, 结果显示ARE处理组小鼠的肿瘤体积减小至对照组的49%, 且整个过程中该组小鼠的体质量正常增长、无饮食和行为异常<sup>[6]</sup>, 提示ARE对耐药肝癌细胞具有有效的抗癌活性。

综上, ARE的抗癌作用已在多种动物模型中得到了验证, 这些发现或可为ARE作为潜在的抗肿瘤药物提供有力的实验支持。尽管其在体内实验中表现良好, 但将其应用于临床治疗之前仍需要开展更多的抗癌机制研究、ARE靶标研究和临床试验, 从而对其安全性和有效性加以验证。

### 1.2 ARE在细胞水平的抗癌活性

大多数癌细胞的ARE半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )均为nmol/L量级(表1), 这与人正常外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的 $IC_{50}$ 有明显不同。研究<sup>[9]</sup>显示, ARE在PBMC中的 $IC_{50}$ 是人胰腺癌细胞系SW 1990、人胶质母细胞瘤细胞系U-87 MG的4~5倍。此外, 相同来源的癌细胞和正常细胞对ARE的敏感性也不尽相同。如ARE在人正常食管鳞状细胞的 $IC_{50}$ 约为11.8  $\mu$ mol/L, 而在食管鳞状癌细胞系Eca-109、TE-5和TE-11的 $IC_{50}$ 分别为0.8  $\mu$ mol/L、1.2  $\mu$ mol/L和3.6  $\mu$ mol/L; DONG等<sup>[10]</sup>采用选择性指数( $IC_{50-正常细胞}/IC_{50-癌细胞}$ )也证明了ARE对人正常肝细胞L-02和癌细胞的选择性, 即相比于正常肝细胞, ARE对肝癌细胞更为敏感。上述研究提示, 相比人正常细胞ARE对癌细胞具有更强的细胞毒性, 这一药物特性不仅可减少其对正常细胞的毒副作用, 还可提高ARE的治疗效果。

## 2 ARE的抗癌机制

### 2.1 诱导癌细胞死亡

ARE可通过多种途径诱导癌细胞发生不同类型的细胞死亡, 如细胞凋亡、细胞自噬和铁死亡等; 同时, 还可诱导含半胱氨酸的胱天蛋白酶3/8/9(cysteiny aspartate specific proteinase, CASPASE

表1 经ARE处理24 h的不同细胞的IC<sub>50</sub>

Tab 1 IC<sub>50</sub> of different cells treated with ARE for 24 h

Type of tumor	Type of cell	IC <sub>50</sub>
Pancreatic cancer	Panc-1	10 nmol/L <sup>[11]</sup>
	AsPC-1	1 nmol/L <sup>[11]</sup>
	SW 1990	9.9 nmol/L <sup>[12]</sup>
	BxPC-3	48.72 nmol/L <sup>[5]</sup>
Lung cancer	A549	10 nmol/L <sup>[13-14]</sup>
Breast cancer	MCF 7	485 nmol/L <sup>[10,15]</sup>
Esophageal carcinoma	Eca-109	0.8 μmol/L <sup>[8]</sup>
	TE-11	3.6 μmol/L <sup>[8]</sup>
Glioma	U-87 MG	10.3 nmol/L <sup>[9]</sup>
Cervical cancer	HELA	23 nmol/L <sup>[10]</sup>
Colon cancer	HT-29	25 nmol/L <sup>[10]</sup>

表2 由ARE诱导的细胞凋亡和自噬相关的蛋白

Tab 2 Proteins related to apoptosis and autophagy induced by ARE

Type of tumor	Type of cell	Up-regulation	Down-regulation
Pancreatic cancer, lung cancer, breast cancer, esophageal squamous cell carcinoma, osteosarcoma <sup>[6, 11, 16]</sup>	BxPC-3, SW 1900, A549, NCI-H460, MCF 7, Eca-109	Cleaved CASPASE 9	
Pancreatic cancer, lung cancer <sup>[11, 16]</sup>	BxPC-3, SW 1900, A549, NCI-H460	Cleaved CASPASE 3	
Pancreatic cancer, lung cancer, liver cancer, breast cancer <sup>[6, 11]</sup>	BxPC-3, SW 1900, A549, NCI-H460, HepG2/ADM, MCF 7	Cleaved PARP	
Esophageal squamous cell carcinoma <sup>[8]</sup>	Eca-109	Cleaved CASPASE 8	
Breast cancer <sup>[17]</sup>	MCF 7, MDA-MB-468	NOXA	
Breast cancer, esophageal squamous cell carcinoma, pancreatic cancer <sup>[5, 8, 15-16]</sup>	MCF 7, MDA-MB-468, Eca-109, SW 1990, BxPC-3	P53	
Liver cancer, breast cancer, lung cancer, acute leukemia <sup>[6, 13, 15, 18]</sup>	HepG2/ADM, MCF 7, A549, Jurkat, MV-4-11, PC-9	BAX	
Breast cancer <sup>[15]</sup>	MCF 7	P-JNK	
Acute leukemia <sup>[18]</sup>	Jurkat, MV-4-11	AIF	
Liver cancer <sup>[6]</sup>	HepG2/ADM	LC3 II	
Breast cancer <sup>[13]</sup>	HELA	ROS	
Pancreatic cancer <sup>[5]</sup>	SW 1990, BxPC-3	SMAD3	
Pancreatic cancer, breast cancer, lung cancer <sup>[11, 15, 19-20]</sup>	Panc-1, AsPC-1, PC-9		P-ERK
Pancreatic cancer, breast cancer <sup>[5, 6, 11, 21]</sup>	Panc-1, AsPC-1		P-AKT
Breast cancer <sup>[16]</sup>	MCF 7, MDA-MB-48		MCL-1
Lung cancer <sup>[19]</sup>	PC-9		P-MEK
Liver cancer, lung cancer <sup>[13, 19]</sup>	HepG2/ADM, A549, PC-9		BCL-2
Pancreatic cancer <sup>[5-6]</sup>	SW 1990, BxPC-3		PI3K
Lung cancer <sup>[6, 19]</sup>	PC-9		C-RAF
Pancreatic cancer <sup>[5-6]</sup>	SW 1990, BxPC-3		mTOR
Liver cancer <sup>[14]</sup>	HepG2		STAT3
Acute leukemia <sup>[18]</sup>	Jurkat, MV-4-11		XIAP
Liver cancer <sup>[6]</sup>	HepG2/ADM		LC3 I
Lung cancer <sup>[13]</sup>	A549		SOD

3/8/9)、磷酸酯酶 1 诱导蛋白 1 (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, PMAIP1, 又称 NOXA)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, BAX) 等凋亡蛋白以及微管相关蛋白 1 轻链 3 - II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 - II, LC3 II) 等自噬蛋白上调。如下,我们将 ARE 诱导癌细胞死亡时的相关蛋白进行总结 (表 2),并就 ARE 与各种类型细胞死亡的关系进行具体阐述。

**2.1.1 细胞凋亡** ARE 可诱导乳腺癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、宫颈癌、骨肉瘤、食管鳞状细胞癌、结肠癌、白血病等多种癌细胞发生凋亡。研究显示 ARE 引起的细胞凋亡通常为线粒体途径凋亡,即不仅能引

Continued Tab

Type of tumor	Type of cell	Up-regulation	Down-regulation
Lung cancer <sup>[20]</sup>	A549		GSH
Pancreatic cancer <sup>[5]</sup>	SW 1990, BxPC-3		AMPK
Pancreatic cancer <sup>[5]</sup>	SW 1990, BxPC-3		P62

**Note:** PARP—poly ADP-ribose polymerase; P53—tumor protein p53, also known as TP53; P-JNK—phosphatase c-Jun N-terminal kinase; AIF—apoptosis-inducing factor; ROS—reactive oxygen species; SMAD3—SMAD family member 3; P-ERK—phosphorylated extracellular regulated protein kinase; P-AKT—phosphorylated protein kinase B; MCL-1—myeloid cell leukemia-1; P-MEK—phosphorylated MAPK/ERK kinase; PI3K—phosphoinositide 3-kinase; RAF-1—rapidly accelerated fibrosarcoma-1, also known as C-RAF; mTOR—mammalian target of rapamycin; STAT3—signal transducer and activator of transcription 3; XIAP—X-linked inhibitor of apoptosis; SOD—superoxide dismutase; GSH—glutathione; AMPK—adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; P62—sequestosome 1, also known as SQSTM1.

起CASPASE 3/8/9蛋白活化、PARP切割<sup>[16,22]</sup>,还可引起癌细胞内*BAX*的表达增加、*BCL-2* mRNA水平降低<sup>[6,18-19]</sup>。也有研究指出ARE引起的细胞凋亡并非仅是线粒体途径凋亡,如由ARE引起的*BAX*表达上调与Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶1(Rho-associated coiled-coil containing kinase 1, ROCK1)信号通路的激活有关<sup>[18]</sup>,在ARE引起细胞凋亡时*P53*(一种抑癌基因)的表达有显著上调<sup>[8,15,23]</sup>且*P53*的上调与NOXA(属于*BCL-2*家族成员之一)表达上调有关<sup>[16]</sup>。尽管有研究指出ARE能够引起非线粒体途径的相关基因表达的改变,但大部分机制研究发现ARE引起的细胞凋亡仍为线粒体途径凋亡,这可能与ARE的多靶点性有关,继而提示探索ARE的新靶点或将为揭示其毒性机制提供帮助。

值得注意的是,有研究表明ARE引起的细胞凋亡常伴随着ROS水平的升高。LV等<sup>[8]</sup>采用2 mmol/L抗氧化剂N-乙酰基-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)预先处理癌细胞可显著降低cleaved-CASPASE水平,即可抵抗由ARE处理该细胞引起的高cleaved-CASPASE的效应;而未用NAC预处理的癌细胞在ARE处理下表现出ROS和cleaved-CASPASE水平均升高。继而提示,ARE引起的不同细胞死亡之间可能是相互影响的。

**2.1.2 细胞自噬** 有研究<sup>[6]</sup>显示,自噬标志物LC3 I经ARE处理后可转化成LC3 II,即ARE能够引起细胞自噬;而在ARE处理之前,用3-甲基腺嘌呤抑制自噬或敲除自噬基因则可使由ARE引起的自噬无法发生,同时还可增加其引起的细胞凋亡;这表明阻断自噬或可促进癌细胞受ARE诱导发生凋亡。

由ARE引起的癌细胞自噬的相关信号通路包括抑制表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR, 又称HER1或ErbB1)/细胞外信号

调控的激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB, 又称AKT)信号通路<sup>[11]</sup>、激活磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)/磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol3-kinase, PI3K)/AKT信号通路<sup>[5-6]</sup>、激活c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路<sup>[15]</sup>、抑制mTOR信号通路<sup>[6]</sup>、激活ROCK1信号通路<sup>[18]</sup>、抑制JAK激酶(Janus kinase, JAK)/STAT3信号通路<sup>[6]</sup>以及抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路。

**2.1.3 铁死亡** 铁死亡是一种新型程序性细胞死亡,其主要特征为铁代谢异常、谷胱甘肽生物合成减少、脂质过氧化增加等。有研究显示ARE具有诱导癌细胞发生铁死亡的能力。如在胃癌细胞MNK-45和BGC-823中使用未引起细胞凋亡的低浓度(10 μmol/L)ARE会引起铁含量、氧化型谷胱甘肽/还原型谷胱甘肽比率、丙二醛水平显著增加,铁死亡相关基因谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, *GPX4*)、溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, *SLC7A11*)、铁死亡抑制蛋白1(ferroptosis suppressor protein 1, *FSPI*)等表达下降,而使用铁死亡抑制剂Ferrostatin-1则可减轻上述现象,这表明低浓度ARE可引起癌细胞发生铁死亡<sup>[13,20]</sup>。进一步的机制研究表明,ARE引起的铁死亡与核受体亚家族1 D组成员1(nuclear receptor subfamily 1 group D member 1, NR1D1, 又称REV-ERBα)有关;使用激动剂GSK4112激活REV-ERBα会引起细胞发生铁死亡,敲除REV-ERBα则会消除ARE引起的铁死亡效应。

## 2.2 诱导癌细胞周期阻滞

多种证据表明<sup>[12-13]</sup>ARE可通过调节细胞周期相关蛋白等诱导癌细胞的细胞周期阻滞在G2/M期。一





项胰腺癌的研究<sup>[11]</sup>发现,经ARE处理后,Panc-1细胞中G2/M期细胞从3.22%增加至74.1%,AsPC-1细胞中G2/M期细胞从46.30%增加至65.1%,且该2种细胞的S期细胞均有减少。一项宫颈癌的研究<sup>[10]</sup>发现,ARE能将HELA细胞的细胞周期阻滞在S期和G2/M期,并以此抑制该细胞的增殖。

相关机制研究显示ARE可通过多种途径诱导肝癌细胞发生细胞周期阻滞,具体如下:①ARE可通过下调细胞分裂周期25C (cell division cycle 25C, CDC25C),抑制细胞周期蛋白依赖性激酶1-细胞周期蛋白B1 (cyclin-dependent kinase 1- cyclin B1, CDK1-cyclin B1)复合物的去磷酸化,阻滞肝癌细胞的细胞周期从G2期向M期转变。②ARE可激活共济失调-毛细血管扩张突变蛋白 (ataxia-telangiectasia mutated protein, ATM) /细胞周期检查点激酶2 (checkpoint kinase 2, CHK2) 和共济失调毛细血管扩张突变基因Rad3相关激酶 (ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related kinase, ATR) /细胞周期检查点激酶1 (checkpoint kinase 1, CHK1) 信号通路,其中CHK1和CHK2是细胞周期阻滞的关键调节因子,从而抑制肝癌细胞周期G2/M期的转变。③ARE能引起肝癌细胞HepG2内双链DNA断裂标志物磷酸化组蛋白H2AX (phosphorylated histone H2AX,  $\gamma$ -H2AX)显著上调。而在ARE处理前,预先使用ATM/ATR抑制剂处理HepG2细胞则可阻断 $\gamma$ -H2AX的升高,同时降低该癌细胞中阻滞在G2期的细胞比例(HepG2细胞中G2期细胞比例由34.4%减少为25.5%)。此外,生物素标记追踪也表明ARE可在体内、外自发与DNA直接结合<sup>[23]</sup>。这表明G2期阻滞是ARE诱导DNA损伤的下游效应<sup>[23]</sup>。④ARE可通过上调P53的表达阻滞细胞周期。研究<sup>[23]</sup>表明敲除P53会使肝癌细胞HepG2中阻滞在G2期的细胞减少35%,这也提示P53会促进细胞周期G2期的阻滞。

尽管大部分研究表明ARE会将细胞周期阻滞在G2/M期,但也有研究发现ARE还可以引起其他类型的细胞周期阻滞。如经ARE处理后,胰腺癌细胞BxPC-3表现出G0/G1、S期细胞的比例增加,G2/M期细胞的比例减少;而胰腺癌细胞Panc-1则表现为G0/G1、G2/M期细胞的比例增加,S期细胞的比例减少<sup>[5]</sup>。这表明由ARE引起的细胞周期改变具有一定的细胞差异性。

## 2.3 抑制癌细胞侵袭和迁移

癌细胞通过侵袭、迁移对其邻近组织和其他器官造成侵害,而上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在诸多恶性肿瘤的侵袭和迁移中起了十分重要的作用。当前,越来越多的研究表明ARE能通过抑制EMT来抑制癌细胞的迁移和侵袭。

研究<sup>[9,24]</sup>显示,由ARE引起的EMT抑制主要表现为EMT相关标志物[如扭曲家族bHLH转录因子1 (twist family bHLH transcription factor 1, TWIST1)、连环蛋白1 (beta-catenin 1, CTNNB1)等]表达的下调,且ARE对大部分EMT标志物表达的影响在mRNA水平,如连环蛋白/转录因子4 (catenin/transcription factor 4, CATENIN/TCF4)<sup>[25]</sup>、CTNNB1<sup>[26]</sup>。同时,少数机制研究发现抑制性 $\kappa$ B激酶 $\beta$  (inhibitor kappa B kinase beta, IKK $\beta$ ) /核因子 $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)信号通路与ARE抑制EMT有关。ZHAO等<sup>[24]</sup>发现ARE在抑制肺癌细胞H1299、A549迁移时,还会在蛋白水平显著下调P-IKK $\beta$ 和核因子 $\kappa$ B  $\alpha$ 磷酸化抑制剂 (phosphorylated inhibitor of nuclear factor kappa-B alpha, P-I $\kappa$ B $\alpha$ ),同时IKK $\beta$  siRNA能够显著抑制肺癌细胞的迁移和侵袭,因此ARE很可能通过靶向IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B信号级联反应来抑制肺癌细胞的EMT。

需要指出的是,目前关于ARE在抑制癌细胞迁移和侵袭方面的研究仍相对较少,且大部分研究均是在体外细胞中进行,因此其抑制的确切效果尚需开展更多的体内试验加以验证。

## 2.4 抑制癌细胞干性和血管生成

癌细胞干性是癌细胞保持未分化状态且具有自我更新能力的关键,抑制癌细胞干性是现代医学治疗肿瘤的重要手段。一项关于类固醇受体的研究<sup>[27]</sup>表明ARE可抑制癌细胞干性。由于类固醇受体共激活剂-1 (steroid receptor coactivator-1, SRC-1)可增强胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 细胞的干性,研究者用ARE处理GBM细胞48 h后发现,ARE能够抑制细胞增殖及SRC-1的表达且呈剂量依赖性;继而提示,ARE可能通过抑制GBM细胞中的SRC-1的表达来抑制癌细胞的增殖和干性。

肿瘤血管生成是肿瘤发生、发展、浸润与转移的重要条件,20世纪70年代,FOLKMAN<sup>[28]</sup>提出抑制

血管生成可作为肿瘤治疗的一种治疗策略。刘俊珊等<sup>[29]</sup>发现 nmol/L 量级的 ARE 可显著抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的生长,同时细胞形态相较于其他细胞也发生了明显变化;该作者在鸡胚绒毛尿囊膜(chick embryo chorioallantoic membrane, CAM)模型中也检测到 ARE 能够剂量依赖性地减少 CAM 新生血管。因此,我们推测 ARE 在细胞和动物水平均有抑制肿瘤血管生成的作用。

### 3 ARE 与其他抗癌药物的联合使用

癌症治疗中,单药治疗易导致患者耐药,而两种或多种药物的联合治疗对减少患者耐药、提高治疗效果、降低毒副作用、增加治疗安全性及扩大药物适应证等均有较大帮助。药物联合药效的相关研究发现,ARE 与化学治疗(化疗)药物联合使用有助于增强化疗药物的治疗效果。YUAN 等<sup>[30]</sup>发现 ARE 协同亚砷酸盐不仅可促进亚砷酸盐诱导的细胞发生凋亡、自噬、G2/M 期阻滞,还可促进亚砷酸盐对锯齿状典型 NOTCH 配体 1/NOTCH(jagged1/NOTCH, JAG1/NOTCH)信号通路的抑制。WANG 等<sup>[11]</sup>对吉西他滨耐药的 Panc-1 细胞联合使用 ARE 进行治疗后发现,联合用药的癌细胞的活力比单独使用吉西他滨下降了 20%~30%。

值得注意的是,耐药研究表明耐药癌细胞对 ARE 的敏感性比正常癌细胞更高。WANG 等<sup>[11]</sup>发现 ARE 可增强胰腺癌细胞对吉西他滨和 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的敏感性,还可改善该细胞的快速耐药性。ZHANG 等<sup>[6]</sup>发现多重耐药的肝癌细胞 HepG2/ADM 比亲本细胞 HepG2 对 ARE 更敏感。尽管多数研究发现 ARE 可以改善细胞的药物耐受程度,但也存在一些相反的观点。如他莫昔芬耐药细胞株 T47D/HER2 对 ARE 的敏感性比他莫昔芬敏感细胞株 T47D 更低<sup>[21]</sup>。综合上述研究,我们推测 ARE 对癌细胞耐药程度的影响可能与癌细胞的耐药机制有关,即 ARE 激活的信号通路或信号因子对引起耐药的相关分子是促进还是抑制作用以及作用程度决定了最终 ARE 对药物耐受的效应。

最近的一项动物水平的研究<sup>[31]</sup>显示 ARE 和顺铂在胃癌小鼠模型中联合使用可显著抑制其肿瘤生长,而 ARE 与顺铂协同抑制肿瘤生长的机制涉及抑制

NF- $\kappa$ B 活性、诱导细胞凋亡和碱死亡,其中碱死亡是 ARE 联合顺铂产生的新的细胞效应(即 ARE 或顺铂的单药处理无法产生),这提示我们药物联合使用的研究或许可揭示出新的抗癌机制。

以上为 ARE 联合其他抗癌药物在细胞和动物水平的研究成果,目前有关 ARE 在临床上的研究还未启动。

### 4 总结与展望

在中国,蟾酥是一种已沿用了一千多年的中药。随着现代病理学和分析技术的发展,蟾酥的强烈药理活性和对癌细胞的显著抑制效果已引起了广泛关注。ARE 是蟾酥提取物中抗癌活性最显著的成分之一,可诱导癌细胞发生凋亡、自噬、周期阻滞,抑制癌细胞的侵袭、迁移及干性等。

值得注意的是,ARE 对癌细胞具有一定的选择性,这对其临床应用具有积极意义。相关机制研究揭示了 ARE 诱导癌细胞死亡的分子机制,如活化 CASPASE、抑制 PI3K 信号通路、上调 P53 水平等。在这些机制中,我们发现调控细胞的氧化还原反应是 ARE 抗癌效应的重要方面,但 ARE 调控氧化还原反应具体的效应机制尚不清楚。此外,ARE 还具有抑制癌细胞干性的作用,然而目前仅有一项研究报道且该研究也仅提出了一个可能的相关蛋白——SRC-1,因此关于 ARE 抑制癌细胞干性的机制仍值得进一步探究。

ARE 虽然在抗癌活性方面有较显著的效果,但在机制和成药性方面还存在一些问题。如机制方面,ARE 的直接靶点不明确、对癌细胞选择性毒性的机制不清晰;成药性方面,ARE 作为强心苷类分子有较强的心脏毒性<sup>[32]</sup>,且 ARE 在体内细胞被摄取率较低。虽然 ARE 的部分成药性问题正被不断地解决,如有研究<sup>[33]</sup>提出了一种可有效降低 ARE 毒性的成纤维细胞活化蛋白 $\alpha$ ,有研究<sup>[34-35]</sup>设计出提高 ARE 细胞被摄取率的新型聚合物纳米胶束系统。但相关研究指出,明确 ARE 更具体的抗癌机制和直接靶点才能将 ARE 改造为具有良好药理特征和安全性的化合物,才能让 ARE 更好地发挥临床治疗作用。因此,通过化学生物学、定量蛋白质组学、生物信息学等多种方法揭示 ARE 的新的直接作用靶点,或将成为提高 ARE 的选择性、成药性的关键一步。

## 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

## 作者贡献/Authors' Contributions

白雯会、沈淑坤、吴英理负责文章的构思,白雯会负责论文的写作,白雯会、沈淑坤、吴英理负责论文的修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

BAI Wenhui, SHEN Shukun and WU Yingli were responsible for the idea of the article. BAI Wenhui was responsible for the writing of the article. BAI Wenhui, SHEN Shukun and WU Yingli were responsible for the revision of the article. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2023-07-26

• Accepted: 2024-01-02

• Published online: 2024-03-28

## 参·考·文·献

- [1] 姜珊, 谢明, 郑佳, 等. 蟾蜍类药材本草考证[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(12): 95-99.  
JIANG S, XIE M, ZHENG J, et al. Textual research on toad medicinal materials[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2020, 16(12): 95-99.
- [2] 刘京京, 王静宜, 郭夫江, 等. 中药蟾酥化学成分研究[J]. 中药材, 2021, 44(10): 2321-2325.  
LIU J J, WANG J Y, GUO F J, et al. Chemical constituents of bufonis venenum[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(10): 2321-2325.
- [3] TIAN H Y, WANG L, ZHANG X Q, et al. Bufogargarizins A and B: two novel 19-norbufadienolides with unprecedented skeletons from the venom of Bufo bufo gargarizans[J]. Chemistry, 2010, 16(36): 10989-10993.
- [4] LI F J, HU J H, REN X, et al. Toad venom: a comprehensive review of chemical constituents, anticancer activities, and mechanisms[J]. Arch Pharm, 2021, 354(7): e2100060.
- [5] WEI X L, YANG J, MAO Y Q, et al. Arenobufagin inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway and induces apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells[J]. Pancreas, 2020, 49(2): 261-272.
- [6] ZHANG D M, LIU J S, DENG L J, et al. Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6): 1331-1342.
- [7] DENG L J, LEI Y H, QUAN J Y, et al. 1 $\beta$ -OH-arenobufagin induces mitochondrial apoptosis in hepatocellular carcinoma through the suppression of mTOR signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 266: 113443.
- [8] LV J H, LIN S H, PENG P L, et al. Arenobufagin activates p53 to trigger esophageal squamous cell carcinoma cell apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 1261-1267.
- [9] YUAN B, HE J, KISOH K, et al. Effects of active bufadienolide compounds on human cancer cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in mitogen-activated human peripheral blood mononuclear cells[J]. Oncol Rep, 2016, 36(3): 1377-1384.
- [10] DONG Q, TURDU G, DONGMULATI N, et al. Bufadienolides from the Bufo viridis toad venom exert cytotoxic effects on cancer cells by inducing cell apoptosis and cell cycle arrest[J]. Toxicol In Vitro, 2023, 89: 105566.
- [11] WANG T J, ZHUANG Z M, ZHANG P, et al. Effect of arenobufagin on human pancreatic carcinoma cells[J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 4971-4976.
- [12] 高波, 魏晓露, 韩玲玉, 等. 华蟾素注射液中酯蟾毒配基的分离及体内外抗肿瘤活性筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 78-84.  
GAO B, WEI X L, HAN L Y, et al. Research on isolation of bufadienolides from cinobufacin injection and its activity screening of anti-cancer *in vivo* and *in vitro*[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2017, 23(16): 78-84.
- [13] KAN J, HUANG H F, JIANG Z Y, et al. Arenobufagin promoted oxidative stress-associated mitochondrial pathway apoptosis in A549 non-small-cell lung cancer cell line[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 8909171.
- [14] ZHAO L J, ZHAO H Y, WEI X L, et al. The lipid homeostasis regulation study of arenobufagin in zebrafish HepG2 xenograft model and HepG2 cells using integrated lipidomics-proteomics approach[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 260: 112943.
- [15] DENG L J, QI M, PENG Q L, et al. Arenobufagin induces MCF-7 cell apoptosis by promoting JNK-mediated multisite phosphorylation of Yes-associated protein[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 209.
- [16] MA L, ZHU Y D, FANG S, et al. Arenobufagin induces apoptotic cell death in human non-small-cell lung cancer cells *via* the Noxa-related pathway[J]. Molecules, 2017, 22(9): 1525.
- [17] ZHANG Y, YUAN B, BIAN B L, et al. Cytotoxic effects of hellebrigenin and arenobufagin against human breast cancer cells[J]. Front Oncol, 2021, 11: 711220.
- [18] 李志强, 姜秀星, 胡金娇, 等. 沙蟾毒精激活 Rho A/ROCK1 信号通路诱导急性白血病细胞凋亡的分子机制研究[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(7): 700-710.  
LI Z Q, JIANG X X, HU J J, et al. Arenobufagin induces apoptosis in acute leukemia cells by activating Rho a/ROCK1 signaling pathway[J]. Journal of Army Medical University, 2022, 44(7): 700-710.
- [19] 刘倩, 胡春萍, 曹鹏, 等. 沙蟾毒精诱导肺癌 PC-9 细胞的凋亡效应及其作用机制初探[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2030-2035.  
LIU Q, HU C P, CAO P, et al. The effects and mechanisms of apoptosis induced by arenobufagin in lung cancer PC-9 cells[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(12): 2030-2035.
- [20] CHEN K, LI A L, WANG J, et al. Arenobufagin causes ferroptosis in human gastric cancer cells by increasing rev-erb $\alpha$  expression[J]. J Tradit Complement Med, 2023, 13(1): 72-80.
- [21] WANG T J, MU L, JIN H F, et al. The effects of bufadienolides on HER2 overexpressing breast cancer cells[J]. Tumour Biol, 2016, 37(6): 7155-7163.
- [22] DELEBINSKI C I, GEORGI S, KLEINSIMON S, et al. Analysis of proliferation and apoptotic induction by 20 steroid glycosides in 143B osteosarcoma cells *in vitro*[J]. Cell Prolif, 2015, 48(5): 600-610.
- [23] DENG L J, PENG Q L, WANG L H, et al. Arenobufagin intercalates with DNA leading to G2 cell cycle arrest *via* ATM/ATR pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(33): 34258-34275.
- [24] ZHAO J M, ZHANG Q S, ZOU G Y, et al. Arenobufagin, isolated from toad venom, inhibited epithelial-to-mesenchymal transition and suppressed migration and invasion of lung cancer cells *via* targeting IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B signal cascade[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 250: 112492.
- [25] SRINIVAS N R. Arenobufagin: a potential novel opportunity for

- prostate cancer treatment - Intriguing mechanistic data but some questions on *in vivo* translatability[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 128: 400-401.
- [26] CHEN L P, MAI W Q, CHEN M F, et al. Arenobufagin inhibits prostate cancer epithelial-mesenchymal transition and metastasis by down-regulating  $\beta$ -catenin[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 123: 130-142.
- [27] GONG M M, WANG X, MU L, et al. Steroid receptor coactivator-1 enhances the stemness of glioblastoma by activating long noncoding RNA XIST/miR-152/KLF4 pathway[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(2): 604-618.
- [28] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [29] 刘俊珊, 张冬梅, 陈敏锋, 等. 沙蟾毒精抑制血管生成的作用[J]. *药学报*, 2011, 46(5): 527-533.
- LIU J S, ZHANG D M, CHEN M F, et al. Anti-angiogenic effect of arenobufagin *in vitro* and *in vivo*[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2011, 46(5): 527-533.
- [30] YUAN B, LI J M, MIYASHITA S I, et al. Enhanced cytotoxic effects of arenite in combination with active bufadienolide compounds against human glioblastoma cell line U-87[J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6577.
- [31] LIU C W, LI D C, WANG J, et al. Arenobufagin increases the sensitivity of gastric cancer to cisplatin *via* alkaliptosis[J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): e21110.
- [32] YUE Q X, ZHEN H, HUANG M, et al. Proteasome inhibition contributed to the cytotoxicity of arenobufagin after its binding with Na, K-ATPase in human cervical carcinoma HeLa cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159034.
- [33] DENG L J, WANG L H, PENG C K, et al. Fibroblast activation protein  $\alpha$  activated tripeptide bufadienolide antitumor prodrug with reduced cardiotoxicity[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(13): 5320-5333.
- [34] YUAN X, XIE Q, SU K Y, et al. Systemic delivery of the anticancer agent arenobufagin using polymeric nanomicelles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 4981-4989.
- [35] YANG J Y, SUN B, WEI X L, et al. Arenobufagin-loaded PEG-PLA nanoparticles for reducing toxicity and enhancing cancer therapy[J]. *Drug Deliv*, 2023, 30(1): 2177362.

[本文编辑] 邢宇洋

## 学术快讯

### 上海交通大学医学院附属第六人民医院张长青、高俊杰课题组等在《自然》子刊发表最新研究成果

2024年3月21日,上海交通大学医学院附属第六人民医院骨科张长青、高俊杰课题组再次联合西澳大利亚大学郑铭豪教授在《自然》子刊《自然通讯》在线发表论文,揭示了穿皮质血管(TCVs)生成的新机制——骨细胞通过线粒体转移促进血管内皮细胞成血管。该研究成果进一步揭示了骨细胞及其线粒体转移在维持骨稳态环境中的作用,为骨内血管发育研究以及心血管稳态与重构的调控机制研究提供了新思路。此外,本研究首次证实TCVs生成能促进骨愈合,为治疗临床骨血供不足类疾病提供了新方向。