

析[J]. 第一军医大学分校学报, 2002, 25(1): 50 - 51.

9 李静平, 赵海燕. 右侧股静脉至右心房入口距离测量及临床意义[J]. 中国误诊学杂志, 2003, 3(4): 552.

10 潘莉, 操静, 伍友春, 等. 两种颈内静脉置管固定方法的临床效果观察[J]. 护理研究, 2011, 25(20): 1833 - 1835.

11 范书山, 吕昭举, 赵守国, 等. 全胃肠外营养中心静脉导管感染危险因素 Logistic 回归分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(1): 29 - 32.

12 Eggimann P, Sax H, Pittet D. Catheter-related infections[J]. Microbes Infect, 2004, 6(11): 1033 - 1042.

13 赵洪峰, 任淑华, 董小勤, 等. ICU 患者中心静脉置管相关性感染危险因素分析[J]. 护理学报, 2009, 16(14): 63 - 64.

14 赵俊昭, 石彩晓. 儿童中心静脉导管感染的高危因素和护理干预[J]. 中国卫生产业, 2012, 9(20): 57 - 58.

15 Deshpande KS, Hatem C, Ulrich HL, et al. The incidence of infectious complications of central venous catheters at the subclavian, internal jugular, and femoral sites in an intensive care unit population[J]. Crit Care Med, 2005, 33(1): 234 - 235.

16 周永红, 刘惠莲, 孟宪萍, 等. 4 种深静脉置管的护理方法及应用比较[J]. 东南国防医药, 2005, 7(6): 419 - 420, 425.

17 钱君. 三种中心静脉穿刺置管途径的比较分析[J]. 浙江实用医学, 2000, 5(3): 38 - 39.

[收稿日期 2015-02-13][本文编辑 韦所芬]

### 新进展综述

# 去甲斑螫素的药理作用机制及其在肾脏病领域中的应用前景研究进展

叶琨, 郑娅莉(综述), 彭小梅(审校)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81260121)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院肾内科

作者简介: 叶琨(1975-), 女, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 肾小球疾病诊治、肾脏病理及肾脏纤维化的防治。E-mail: yezi5729@163.com

**[摘要]** 去甲斑螫素(NCTD)是斑螫素的重要衍生物, 其毒性低, 药理作用明确, 无骨髓抑制等不良反应, 在治疗癌症及疑难杂症方面具有独特疗效。近年有研究发现, NCTD 可降低肾病大鼠尿蛋白水平, 通过多种机制减轻肾间质纤维化, 可能在治疗免疫相关性肾病及防治肾间质纤维化方面具有良好的应用价值。该文对 NCTD 的药理作用机制及其在肾脏病领域中的应用前景作一综述。

**[关键词]** 去甲斑螫素; 细胞凋亡; 免疫; 肾间质纤维化; 转化生长因子-β1

**[中图分类号]** R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674 - 3806(2015)09 - 0880 - 04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.09.28

**Study progress and application prospect of norcantharidin on renal diseases** YE Kun, ZHENG Ya-li, PENG Xiao-mei. Department of Nephrology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

**[Abstract]** Norcantharidin(NCTD), an important derivative of cantharidin, has distinctive therapeutic effects on cancers and some incurable diseases. Norcantharidin has low toxicity and clear pharmacological effects without bone marrow suppression and other adverse reactions. Recently, some studies showed that NCTD could not only reduce urinary protein of rats with renal diseases, but also protect renal tubulointerstitial fibrosis by multiple mechanisms. NCTD may have a good value of application on immune-related nephropathy and renal interstitial fibrosis prevention. The pharmacological mechanism of NCTD and its potential treatment of renal diseases are reviewed in this paper.

**[Key words]** Norcantharidin; Apoptosis; Immunity; Renal interstitial fibrosis; Transforming growth factor-β1(TGF-β1)

古书记载,人类应用斑蝥医治病已有两千多年历史。斑蝥为鞘翅目芫菁科昆虫南方大斑蝥或黄黑小斑蝥的干燥虫体,其主要药用成分是斑蝥素。斑蝥素在治疗癌症和一些疑难杂症方面具有独特疗效。但因其毒性较大,对心肾器官有实质性损伤,在临床应用上受到很大限制。近20多年来,随着人们对斑蝥素的深入研究,相继合成了多种斑蝥素衍生物,去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)就是其中最重要的一种。它较斑蝥素毒性大大降低,并且药理作用更加明确。近年,有学者开创性地开展了NCTD治疗慢性肾脏病的实验研究,并有突破性发现。本文对NCTD的药理作用机制及其在肾脏病领域中的应用前景作一综述。

## 1 去甲斑蝥素的药理研究进展

**1.1 抗肿瘤机制** NCTD具有较强的抗肿瘤活性,其主要机制可能有如下几个方面。

**1.1.1 诱导肿瘤细胞凋亡** 细胞凋亡又称程序性细胞死亡,与细胞增殖、分化密切相关。研究认为诱导肿瘤细胞凋亡、抑制其增殖是NCTD抗肿瘤的重要机制之一。大量研究表明,NCTD对HeLa细胞、小鼠肺纤维瘤细胞(L929细胞)等生长均有明显抑制作用,并可诱导其凋亡<sup>[1,2]</sup>。NCTD诱导肿瘤细胞凋亡的信号转导途径较为复杂。研究发现,NCTD作用细胞后,caspase-3、caspase-8和caspase-9酶活力明显升高,而且caspase-3的底物caspase-激活的DNA酶的抑制物(inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD)蛋白表达量明显降低。细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)抑制剂PD98059和c-JunN-末端激酶(c-JunN-terminal kinase, JNK)抑制剂SP600125可明显抑制NCTD诱导的细胞凋亡;而磷酸化ERK和磷酸化JNK的蛋白表达在NCTD作用的不同时间均有明显增多,提示ERK和JNK均参与了NCTD诱导的细胞凋亡过程,且作用的阶段不同<sup>[1,3]</sup>。bcl-2家族在细胞凋亡中也起着重要作用。其家族成员具备双重功能,其中bcl-2、bcl-XL等抑制细胞凋亡,而Bax、bcl-XS等促进细胞凋亡。Bax通过与自身组成同源二聚体或与bcl-2、bcl-XL组成异源二聚体,抑制bcl-2或bcl-XL的活性,从而发挥其促进凋亡的作用。斑蝥素作用于癌细胞后,bcl-2蛋白表达水平下降,而Bax蛋白表达水平升高。说明斑蝥素可能通过改变bcl-2和Bax异源二聚体的调控平衡而诱导癌细胞凋亡<sup>[4]</sup>。近期研究发现,斑蝥素可能是通过下调凋亡抑制蛋白survivin的表达,进而促进凋亡

通路下游的caspase-3的活性,从而诱导凋亡<sup>[4]</sup>。另外,NCTD呈剂量依赖性抑制人胆囊癌细胞(GBC-SD)增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和Ki-67表达,抑制细胞增殖<sup>[5]</sup>。此外,在前列腺癌细胞DU145、膀胱癌细胞TSGH8301、乳腺癌细胞Bcap-37中,发现NCTD诱导肿瘤细胞凋亡均与胞内活性氧、线粒体通路有关<sup>[6-8]</sup>。不同浓度的NCTD(25~100 μmol)杀死前列腺癌细胞具有时间及浓度依赖性,可降低线粒体膜电位,诱导活性氧的生成及细胞色素c的释放,通过线粒体通路促进癌细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

**1.1.2 调节细胞因子的表达抑制肿瘤细胞扩散** 研究表明,5~20 μmol·L<sup>-1</sup>的斑蝥素作用高转移卵巢癌细胞HO-8910PM 24 h后,核因子-κB(NF-κB)(P65)蛋白表达水平明显下降,并呈一定的剂量效应关系;上调黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)表达,使FAK磷酸化水平降低,提示斑蝥素抗肿瘤的侵袭转移与NF-κB(P65)表达以及FAK磷酸化水平有关<sup>[9]</sup>。他们还发现,25~100 μmol·L<sup>-1</sup>斑蝥素作用于HO-8910PM细胞24 h后,明显下调NF-κB(P65)及Smad3的蛋白表达,并呈剂量效应<sup>[10]</sup>。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解和基底膜(basement membrane, BM)的破坏是癌细胞突破正常细胞基底膜在别处形成转移灶的关键步骤。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其组织抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)家族的动态平衡维持了BM和ECM的完整性。NCTD可通过干扰GBC-SD细胞MMP2分泌,增加TIMP2表达,以维持MMP2/TIMP2动态平衡,降低BM和ECM降解破坏,从而抑制GBC-SD细胞的侵袭、迁移运动能力<sup>[11]</sup>。NCTD还可诱导血管内皮细胞凋亡,直接破坏血管内皮细胞,改变血管内皮细胞增殖细胞核抗原(PCNA)/凋亡比,下调血管生长因子,上调血管抑制因子,从而抑制胆囊癌肿瘤血管生成,抑制肿瘤转移<sup>[12]</sup>。

**1.2 对免疫系统的影响** 早在1993年就发现NCTD选择性作用于被激活的淋巴细胞,表现出细胞毒性作用。NCTD可抑制乙型肝炎病毒的复制,对治疗风湿痛、银屑病等免疫性疾病也有特效。NCTD还可协同齐多夫定抗HIV-1(III B)<sup>[13]</sup>。另外,NCTD有效提高皮肤移植的存活率,无严重组织炎症反应,有望成为一种新型抗移植排斥的免疫抑制剂<sup>[14]</sup>。

**1.3 升白细胞作用** 大量研究已证明斑蝥素类药物有刺激骨髓的作用。有学者认为,NCTD的升白

细胞作用,早期是由于加速骨髓成熟或释放所致,后期可能与促进造血干细胞的增殖,并向粒-单系祖细胞不断分化有关<sup>[15]</sup>。亦有研究推测,NCTD可刺激产生多种细胞因子,如白细胞介素、集落刺激因子和肿瘤坏死因子,而这些细胞因子直接或间接地介导白细胞的升高。

## 2 去甲斑蝥素在肾脏病领域中的应用前景

原发性肾小球肾炎是一种免疫介导的肾脏炎症性疾病,目前临床上针对蛋白尿的治疗仍以激素和免疫抑制剂为主。但两者均有明显局限性,如部分病例出现激素依赖或激素抵抗,且长期使用会产生多种不良反应;环磷酰胺等免疫抑制剂则有可能导致骨髓抑制等严重副作用。中医药是我国传统医学的瑰宝,大量实验研究及临床观察也证实中西医结合治疗肾脏疾病具有巨大潜力。肾小管间质纤维化是终末期肾病的主要病理改变,其严重程度决定了慢性肾脏疾病的进程与预后。鉴于NCTD具有较强的细胞毒作用和调节免疫、升白细胞及抗组织纤维化<sup>[16]</sup>等药理特点,叶琨等首次将其用于干预大鼠蛋白负荷肾病,观察其对模型大鼠蛋白尿及肾脏病理的影响。结果显示,NCTD可显著降低肾病大鼠尿蛋白排泄量;肾组织光镜、电镜检查及免疫荧光染色均提示,NCTD组肾小球内免疫复合物沉积较模型组减少;从各组肾脏病理学改变的比较中还发现,NCTD组肾小管萎缩及间质淋巴、单核细胞浸润的区域较模型组明显缩小,提示NCTD可能具有改善肾小管间质损伤的作用。该实验初步表明,低浓度NCTD可降低蛋白负荷肾病大鼠的尿蛋白,同时延缓肾间质纤维化,且无明显肝肾毒性及骨髓抑制等严重不良反应<sup>[17,18]</sup>。体外实验也证实,NCTD可抑制白蛋白介导的肾小管上皮细胞纤维粘连蛋白的表达<sup>[19]</sup>。随后还发现,NCTD可抑制梗阻性肾病大鼠的肾间质纤维化<sup>[20]</sup>,还能在一定程度上减轻糖尿病肾病大鼠肾间质纤维化程度。上皮细胞间质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是启动和维持肾间质纤维化的关键机制之一,同时也是可逆阶段。因此,近年关于NCTD抗肾间质纤维化的机制研究主要从发生EMT的肾小管上皮细胞(HK-2细胞)着手,结合NCTD的抗肿瘤药理机制逐渐展开。在探讨NCTD抗癌机制中已报道斑蝥素作用于高转移卵巢癌细胞株HO-8910PM细胞后,可明显抑制NF- $\kappa$ B(P65)亚基的表达<sup>[9,10]</sup>。活化的NF- $\kappa$ B诱导产生的多种细胞因子和趋化因子最终导致大量单核巨噬细胞浸润,ECM增多,引起组织炎症纤维化。

另外,NF- $\kappa$ B激活后还可促进EMT作用,并刺激成纤维细胞增殖和分化。因此,抑制NF- $\kappa$ B的活性是防治肾间质纤维化的一个重要的新靶点。叶琨等<sup>[21]</sup>应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组化的实验方法发现,NCTD可抑制蛋白负荷肾病大鼠肾组织中NF- $\kappa$ B(P65)的过表达,从而延缓其肾间质纤维化的进展。已证实,NCTD可调节HO-8910PM细胞Smad3蛋白表达。转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/Smad是导致肾间质纤维化的关键信号转导通路。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)作为转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor, TGF- $\beta$ 1)是发挥生物学效应的下游因子,除了本身具有促组织纤维化的直接作用外,还介导TGF- $\beta$ 1的促细胞增殖和ECM合成等效应。叶琨等<sup>[21]</sup>的另一实验表明,NCTD可以通过下调肾组织CTGF mRNA及其蛋白表达水平,有效地防治蛋白负荷肾病大鼠肾间质纤维化。体外培养肾小管上皮细胞(HK-2细胞),使用低于抗癌剂量的NCTD干预TGF- $\beta$ 1诱导的HK-2细胞,探讨其对HK-2细胞EMT的影响。结果显示,低于抗癌剂量的NCTD可以显著下调TGF- $\beta$ 1诱导的HK-2细胞平滑肌肌动蛋白 $\alpha$ 的高表达,同时上调其对E-cadherin表达的抑制作用,在mRNA与蛋白质水平的检测结果一致,且呈浓度依赖性<sup>[22]</sup>。以上结果提示NCTD对体外TGF- $\beta$ 1诱导的HK-2细胞EMT具有抑制作用。已知Smad信号通路是TGF- $\beta$ 1介导EMT的重要信号通路,其中Smad2和Smad3的作用备受关注。进一步研究结果表明,NCTD可显著下调TGF- $\beta$ 1诱导下HK-2细胞Smad2、Smad3 mRNA表达,且呈浓度依赖性,Smad2/3蛋白水平亦表现相同的趋势。进一步观察磷酸化的Smad2/3表达水平发现,NCTD可明显抑制磷酸化Smad2/3蛋白在各时间点的表达水平。由此可见,NCTD抑制肾小管上皮细胞的EMT作用与阻断TGF- $\beta$ 1下游信号蛋白Smad的磷酸化激活有关<sup>[22]</sup>。据报道,NCTD能抑制钙调蛋白磷酸酶(calcineurin, CaN)的活性。CaN通路在糖尿病状态下可被活化,CaN则在糖尿病肾病肾小球硬化中起重要作用。NCTD能抑制糖尿病肾病大鼠肾小球CaN的表达,减轻肾小球硬化程度。而CaN主要在肾小管上皮细胞表达,研究提示,NCTD能下调肾小管上皮细胞CaN表达,阻断CaN/NFATc信号通路;但NCTD抑制高糖刺激后肾小管上皮细胞ECM的表达,与其阻断CaN/NFATc信号通路无关<sup>[23]</sup>。另外,系膜细胞的过度增殖与凋亡不足是多种肾小球疾病发展至肾小球硬化

的共同途径,肾小球细胞存在相对性凋亡不足是导致系膜细胞异常增殖的重要原因。因此,系膜细胞凋亡在肾脏病中的研究越来越受学者们的关注。叶琨等的前期研究表明,NCTD可抑制肾小球系膜细胞的增殖,呈时间及浓度依赖性;且NCTD可促进过度增殖的系膜细胞发生凋亡,呈时间及浓度依赖性。关于其诱导系膜细胞凋亡的机制正在努力探索中,这也将为NCTD用于治疗慢性肾脏病提供新的依据。

综上所述,最新研究提示,NCTD可能在治疗免疫相关性肾病及防治肾脏纤维化方面具有广阔的临床应用前景<sup>[24]</sup>,但还需大量的体内外实验和临床研究加以证实。

### 参考文献

- 安巍巍,王敏伟,龚显峰,等. 去甲斑蝥素通过半胱氨酸天冬氨酸酶诱导 HeLa 细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(3): 417-421.
- 安巍巍,薛莲,王敏伟,等. 去甲斑蝥素诱导小鼠肺纤维瘤 L929 细胞凋亡[J]. 中国癌症杂志,2005,15(1):22-25.
- 池岛乔,安巍巍,王敏伟. 去甲斑蝥素通过 caspase, MAPK 和线粒体途径诱导 HeLa 细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志,2003,19(11):1444.
- 张卫东,赵惠儒,阎影,等. 斑蝥素诱导人肺癌 A549 细胞凋亡及其分子机制的研究[J]. 中华肿瘤杂志,2005,27(6):330-334.
- Fan YZ, Zhao ZM, Fu JY, et al. Norcantharidin inhibits growth of human gallbladder carcinoma xenografted tumors in nude mice by inducing apoptosis and blocking the cell cycle in vivo[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9(4): 414-422.
- Shen B, He PJ, Shao CL, et al. Norcantharidin induced DU145 cell apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction and energy depletion[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e84610.
- Yu CC, Ko FY, Yu CS, et al. Norcantharidin triggers cell death and DNA damage through S-phase arrest and ROS-modulated apoptotic pathways in TSGH 8301 human urinary bladder carcinoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(3):1050-1060.
- Liu D, Shi P, Yin X, et al. Effect of norcantharidin on the human breast cancer Beap-37 cells[J]. *Connect Tissue Res*, 2012, 53(6): 508-512.
- 何太平,莫丽儿,梁念慈. 斑蝥素对高转移卵巢癌细胞 HO-8910PM 中 NF- $\kappa$ B (P65)、FAK 表达及 FAK 磷酸化水平的影响[J]. 中国药理学通报,2005,21(6):698-701.
- 何太平,何振辉,莫丽儿. 等. 斑蝥素抑制 NF- $\kappa$ B (P65) 及 Smad3 在高转移卵巢癌细胞株 HO-8910PM 中的表达[J]. 广东医学院学报,2005,23(2):111-114.
- 赵泽明,范跃祖,傅锦业,等. 去甲斑蝥素对荷瘤裸鼠胆囊癌种植瘤 nm23、基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶组织抑制因子-2 的影响[J]. 中华实验外科杂志,2005,22(3):307-308.
- Fan YZ, Chen CQ, Zhao ZM, et al. Effects of norcantharidin on angiogenesis of human gallbladder carcinoma and its anti-angiogenic mechanisms[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2006, 86(10):693-699.
- Peng ZG, Jiang JD, Wu DZ, et al. Inhibition of the replication of HIV-1 by norcantharidin in vitro[J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2010, 45(2): 224-227.
- Hsieh CH, Liao HF, Kuo CD, et al. Norcantharidin modulates development of dendritic cells and prolongs skin allograft survival[J]. *Transplantation*, 2011, 92(8): 848-857.
- 易受南,罗慧英,孙骏奇. 去甲斑蝥酸钠增加白细胞机理初探[J]. 湖南医学院学报,1988,13(4):327-330.
- 高振梅,万颀,王芮,等. 斑蝥素抑制 NIH/3T3 细胞增殖对防治器官组织纤维化的作用[J]. 中国临床康复,2004,8(2): 294-295.
- 叶琨,刘伏友,李瑛,等. 去甲斑蝥素对蛋白负荷肾病大鼠干预的研究[J]. 中华肾脏病杂志,2007, 23(2):82-86.
- Liu FY, Li Y, Peng YM, et al. Norcantharidin ameliorates proteinuria associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in protein overload nephropathy[J]. *Am J Nephrol*, 2008, 28(3):465-477.
- Li Y, Liu FY, Peng YM, et al. Norcantharidin inhibits proliferation and fibronectin expression of HK-2 cells induced by albumin in vitro[J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(12):1239-1241.
- 孙岩,李瑛,孙林,等. 去甲斑蝥素抑制单侧输尿管梗阻大鼠肾小管上皮-间充质转分化的实验研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2012,21(1):46-52.
- 叶琨,刘伏友,李瑛,等. 去甲斑蝥素对蛋白超负荷肾病大鼠 CTGF 及 NF- $\kappa$ Bp65 表达的影响[J]. 中国血液净化,2008,7(4):198-202.
- 孙岩,刘伏友,孙林,等. 去甲斑蝥素对 TGF- $\beta$ 1 诱导的人近端肾小管细胞上皮细胞转分化及信号蛋白 Smad2/3 表达的影响[J]. 中南药学,2010,8(3):170-174.
- 李瑛,陈琼,刘伏友,等. 去甲斑蝥素不依赖钙调蛋白磷酸酶信号通路抑制高糖刺激肾小管上皮细胞细胞外基质的表达[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2010,19(6):526-533.
- Li Y, Ge Y, Liu FY, et al. Norcantharidin, a protective therapeutic agent in renal tubulointerstitial fibrosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 361(1-2): 79-83.

[收稿日期 2015-02-15][本文编辑 谭毅 黄晓红]