文章编号:1673-1689(2010)06-0813-08

抗肿瘤药物诱导酵母细胞凋亡及其机制

吴静[1,2]， 闵 柔[1]， 邬敏辰*[1]， 陈 伟[1]
(1. 江南大学 医药学院,江苏 无锡 214122;2. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘 要: 细胞凋亡是各种抗肿瘤药物引发细胞死亡的主要方式,研究细胞凋亡发生和调节的机制,对改善和提高药物疗效,开发新型抗肿瘤药具有重要的意义。单细胞真核生物酵母能够发生细胞凋亡且凋亡机制从酵母到哺乳动物细胞高度保守,酵母已经成为研究细胞凋亡的重要模式生物。作者主要对以酵母为细胞模型,探讨常见的细胞毒类抗肿瘤药物诱导细胞凋亡过程中出现的典型凋亡特征、起关键作用的基因/蛋白,信号通路以及相关的凋亡表型等机制作一综述。

关键词: 抗肿瘤药物;酵母;细胞凋亡;凋亡机制
中图分类号:R 979.1 **文献标识码**: A

Anticancer Drug Induced Apoptosis in Yeast Cells and Its Mechanism

WU Jing[1,2], MIN Rou[1], WU Min-chen*[1], CHEN Wei[1]
(1. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China)

Abstract: A variety of anticancer drugs induced cell death in the major form of cell apoptosis. It is of great significance to study the mechanisms on cell apoptosis for improvement the efficacy and development of new antineoplastic agents. Yeast is the single cell eukaryote that can be induced to undergo apoptosis, and mechanism of apoptosis in cells from yeast to mammals, are highly conserved, and that the yeast has become an important research model organism. This review focused on yeast apoptosis induced by the cytotoxic anticancer drugs, including the typical characteristics of apoptosis, key regulators, signal pathway, and apoptosis-related phenotypes.

Key words: anticancer drugs, yeast, cell apoptosis, mechanism

细胞凋亡(apoptosis)是指细胞为了维持胞内微环境的稳定,由基因控制的主动有序的死亡过程。细胞凋亡作为细胞最基本的生命活动,与细胞周期调控、衰老等生理过程密切相关[1]。现代分子

收稿日期:2010-01-05
基金项目:国家自然科学基金项目(20776061);中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP10929);工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF200801)。
作者简介: 吴静(1981-),女,江苏盐城人,工学博士,副教授,主要从事生物制药研究。
Email: wujing@jiangnan.edu.cn
*通信作者: 邬敏辰(1962-),男,江苏无锡人,教授,博士生导师,主要从事酶工程与基因工程研究。
Email: bioch@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肿瘤学研究发现细胞凋亡与肿瘤的发生、发展，以及肿瘤治疗中的细胞死亡有着密切关系。肿瘤的发生是因为恶性转化的肿瘤细胞内凋亡机制受到抑制，不能进行正常的细胞死亡清除，过度增殖的结果。因此，以选择性地诱导肿瘤细胞凋亡为目标的理论和技术已经成为治疗恶性肿瘤的主要策略之一。实际上，目前临床上采用大多数化疗药物和生物治疗剂主要都是通过诱导细胞凋亡来清除肿瘤细胞[2]。探讨药物诱导肿瘤细胞凋亡发生和调节的机制，对改善和提高药物疗效，开发新型抗肿瘤药有着重要的意义。

长期以来，细胞凋亡的研究主要以线虫（低等生物）和哺乳动物（高等动物）细胞为研究模型，但由于高等真核细胞代谢通路复杂、具有种属和时空特异性、信号通路复杂交织，干扰因素较多，长期以来基于动物细胞的凋亡研究相对困难。因此，寻找简单而有效的凋亡模式生物成为细胞生物学领域的迫切需要。酿酒酵母作为低等真核细胞，是研究凋亡的最佳模式生物。这是因为[3]：(1)酵母细胞凋亡过程与动物细胞凋亡过程具有高度保守性。酵母细胞与动物细胞凋亡具有非常相似的形态和生化特征，如细胞核染色质收缩，细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻、染色质DNA片段化等；具有相同的凋亡标记，如活性氧物质的产生和细胞色素C释放；具有相同的核心元件和调控因子，包括哺乳动物caspase蛋白酶垂直同源物Metacaspase/YCA1p、细胞凋亡核介导因子以及人类AIF同源的细胞死亡线粒体相关诱导物等；(2)属于单细胞真核微生物，易利用简单培养基快速生长；(3)存在单倍体与双倍体两种形式而易于基因工程改造和筛选；(4)可通过多种代谢工程策略进行生长或代谢表型改造；(5)具有丰富的单倍体和二倍体单基因缺失菌株；(6)具有丰富的生理功能信息（SGD）和组学分析技术等[4]。

近年来，以酵母（yeast）作为模式生物应用于凋亡机制的研究，越来越得到人们的肯定，也取得了很多成果。作者概括了近年来细胞毒类抗肿瘤药物诱导酵母细胞凋亡及其作用机制研究概况。

1 酵母细胞凋亡的变化特征

1.1 形态学变化

酿酒酵母凋亡在形态学特征上与哺乳动物细胞相类似[4,5]：首先是细胞体积缩小，胞浆凝缩，内质网变疏松并与胞膜融合，核糖体、线粒体等聚集，但结构无明显改变，染色质逐渐凝聚成新月状附着在核膜周边，嗜碱性增强，细胞核固缩成均一的致密物进而断裂，胞膜仍完整。但位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸（Phosphatidylserine，PS），在细胞凋亡早期，从胞膜内侧翻转到膜的表面，暴露于细胞外环境，随后胞膜不断出芽脱落，细胞逐渐变成数个大小不等的由膜包裹的凋亡小体（Apoptotic bodies），最终凋亡小体被吞噬降解。在凋亡发生的全过程中，酵母细胞膜一直保持完整，胞内容物不释放出来。

1.2 线粒体变化

线粒体是凋亡的始动因素，在细胞凋亡过程中发挥关键作用。线粒体中含有许多重要的与细胞凋亡有关的蛋白和酶类，如Cytc、Caspases及bcl-2家族成员等。已发现的多种凋亡诱导因素（射线、热、砷、肿瘤坏死因子等）均可作用于线粒体，导致微环境变化，进而影响其结构和功能，介导或启动细胞凋亡过程[6]。线粒体结构改变主要表现为肿胀，并伴有线粒体嵴数减少或消失。线粒体肿胀严重时则使外膜破裂，从而有利于Cytc等小分子物质释放。

1.2.1 *细胞色素c（Cytc）释放* 细胞色素c（Cytc）是线粒体呼吸链的重要组成部分。大量研究表明，Cytc从线粒体释放至胞质是引发细胞凋亡的关键步骤。释放到胞质中的Cytc，与凋亡蛋白酶激活因子1（Apaf-1）结合，激活Procaspase 9蛋白。在dATP存在时，Caspase 9可直接活化Procasp 3，介导细胞凋亡。此外，Cytc释放还引起线粒体呼吸链中电子传递障碍，增加活性氧的产生，介导细胞凋亡。Sapienza等研究了阿司匹林对野生型和锰超氧化物歧化酶（MnSOD）缺陷型酵母菌株的作用，发现阿司匹林能诱导生长在非发酵型培养基上Mn-SOD⁻菌株凋亡。进一步研究发现，细胞呼吸和生长在一定程度上均受到抑制；而Cytc释放则导致线粒体膜电位下降。在阿司匹林作用96 h后，在细胞质中能检测到大多数Cytc，线粒体膜电位逐渐降低为野生型菌株的一半，这一结果与在Jurkat细胞和急性T白血病细胞凋亡中所观察到的现象一致，Cytc释放在caspases激活和膜电位下降发生之前[7]。另外，Bax、乙酸、交配信息素和ASF1/CIA1基因敲除所引起的细胞凋亡，均观察到Cytc释放[8]；Cytc的突变可以在一定程度上缓解乙酸诱导的细胞凋亡，产生Cytc信号通路的阻滞则能消除乙酸引起的凋亡，而α因子和胺碘酮处理Cytc缺陷型酵母突变体则不能导致凋亡，这些结果表明，Cytc参与了细胞凋亡过程[9]。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.2 线粒体活性氧产生　活性氧(reactive oxygen species,ROS)主要产生于线粒体、电子传递链、内质网和核膜等部位,其释放受线粒体呼吸能力、电子传递链活性、膜电位水平等因素决定[10-11]。大量研究表明,ROS 与细胞凋亡密切相关,是细胞凋亡的另一个关键标记。在由乙酸、过氧化氢、交配信息素和哺乳动物促凋亡基因如 Bcl-2 等诱导的酵母细胞凋亡过程中,均检测到 ROS 的产生。如在诱导细胞凋亡之前添加一定浓度的自由基清除剂,则会减少细胞凋亡的发生,这一结果表明 ROS 产生在促进凋亡的信号通路中发挥作用[8]。ROS 细胞凋亡通路的关键作用还体现在:线粒体膜电位的去极化、细胞色素 C 氧化酶(COX)活性降低、Cytc 的释放、caspase 活化、核 DNA 断裂等均导致线粒体膜电位的损失,引起细胞死亡[9,12]。

1.2.3 线粒体跨膜电位($\Delta\Psi m$)　线粒体跨膜电位($\Delta\Psi m$)降低是凋亡级联反应中最先发生的重要事情之一。$\Delta\Psi m$ 降低标志线粒体膜结构发生改变,内膜通透性增强,通透性转运孔(MPT)非生理性开放,基质中的溶质分子、离子和某些蛋白质过度释放,内膜 H^+ 梯度平衡失常甚至消失。这些改变促使线粒体释放激活细胞凋亡的某些分子进入细胞质,从而介导细胞凋亡。采用阳离子荧光染料罗丹明 123(Rhodamine 123)能检测到线粒体跨膜电位的显著变化[13]。如在用阿司匹林诱导 MnSOD$^-$ 酵母菌株凋亡时发现,细胞内胞质 pH 值降低,诱导凋亡 96 h 后,$\Delta\Psi m$ 与对照组比较,下降了 50%。但 $\Delta\Psi m$ 下降并不是 Cytc 释放的必要条件[7]。

1.3 DNA 片断化

酵母细胞凋亡的主要生化特征是其染色质发生浓缩,染色质 DNA 在核小体单位之间的连接处断裂,形成 50 - 300 kbp 长的 DNA 大片段,或 180 - 200 bp 整数倍的寡核苷酸片段,在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱(DNA ladder)。核酸内切酶包括 DNase I、DNase II 及 TIA-1 酶等的活化则是细胞凋亡中染色体改变、细胞核形态改变的根本原因[14]。10 mmol/L 的过氧化氢处理酵母细胞 10～200 min,凝胶电泳检测到显著变化的 DNA ladder;采用多聚甲醛固定酵母细胞后,再用 10 mmol/L 过氧化氢处理酵母细胞相同的时间,则难以检测到 DNA ladder。这一结果表明,酵母细胞凋亡过程中的 DNA 片段化需要活化的核酸内切酶参与[15]。

酵母细胞凋亡还会导致染色体 DNA 双链或单链断裂。正常或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂,凋亡发生时由于 DNA 断裂而产生大量的粘性 3′-OH 末端。基于这一发现,在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下,脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3′-OH 末端,从而形成了检测凋亡细胞的脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL 法)。在由过氧化氢或乙酸诱导的酵母细胞凋亡中,采用 TUNEL 法检测到明显的 DNA 双链或单链断裂。抗肿瘤药三氧化二砷、喜树碱以及阿霉素等引起的酵母细胞凋亡都与 DNA 单双链断裂有关[16]。

2 抗肿瘤药物诱导酵母细胞凋亡作用机制

人类肿瘤细胞的基因变化往往包括细胞周期的调节和/或细胞死亡过程的调控,所以,大多数抗癌药物都直接或间接以调节细胞凋亡为靶点。按照抗肿瘤药物的作用方式,分为:①DNA 损伤剂类,如阿霉素;②微管蛋白抑制剂类,如紫杉醇;③组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂类,如丙戊酸;④磷脂酰胆碱(PC)类似物/抑制剂,如依地福新;⑤拓扑异构酶抑制剂,如喜树碱;⑥抗代谢药物,如博莱霉素[16]。表 1 列出了典型的抗肿瘤药物及其诱导的酵母细胞凋亡表型。

表 1　诱导酵母细胞凋亡的抗肿瘤药物

Tab. 1　Kinds of anticancer drug that induced apoptosis in yeast

药物	凋亡表型
砷	DNA 片段化,线粒体 ROS 释放、$\Delta\Psi m$ 下降,PS 外翻,YCA1 基因依赖
丙戊酸	DNA 片段化,线粒体 ROS 释放,PS 外翻,YCA1、SIR 基因依赖,
紫杉醇	DNA 片段化,线粒体 ROS 释放
阿霉素	细胞形态改变,线粒体功能丧失,DNA 损伤
博莱霉素	DNA 片段化,染色质浓缩,凋亡小体
依地福新	DNA 片段化,线粒体 ROS 释放

三氧化二砷(As_2O_3)作为一种有毒的非金属抗癌制剂具有很长的研究历史。在砷剂诱导的细胞凋亡过程中,凋亡信号直接作用于线粒体,引起其结构与功能的改变,导致 caspase 级联激活,导致细胞发生凋亡。砷剂诱导线粒体膜通透性转运孔(MPT)开放、活性氧释放增加,导致线粒体膜电位($\Delta\Psi m$)下降,最终导致细胞凋亡[17]。Du 等人在研究线粒体在砷诱导的酿酒细胞凋亡过程中的作用时发现,45.8%经砷处理的酵母细胞出现 $\Delta\Psi m$ 下

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

降，野生型则很少出现 $\Delta\Psi m$ 变化(5.4%)，而敲除了线粒体基因的突变菌株(rho^0)则对砷所诱导的凋亡作用不敏感，但阻断活性氧清除酶 CuZnSOD(SOD1)则提高了酵母细胞对砷作用的敏感性。砷处理的 YCA1 缺陷型菌株 DNA 片段化程度只有1.5%，远小于野生型的 34.8%。YCA1 缺陷型菌株存活率(91.3%)远高于野生型菌株(50.3%)，表明 YCA1 基因是砷诱导酿酒酵母细胞凋亡所必需的[18]。

丙戊酸(Valproic acid，VPA)是一类短链脂肪酸，具有抑制组蛋白去乙酰化酶活性的作用，属于组蛋白去乙酞化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitpr，HDACI)，通过诱导细胞周期停滞、凋亡和分化以抑制肿瘤细胞生长增殖。Sun 等研究发现用 25 mmol/L VPA 处理酿酒酵母菌株，野生型细胞生长受到抑制并出现凋亡现象；而 YCA1 缺陷型正常生长，VPA 增大到 50 mmol/L 时，野生型和 YCA1 缺陷型菌株均出现不依赖于 YCA1 的自嗜性死亡，表明低浓度 VPA 在轻度损伤细胞生长的同时诱导细胞凋亡。进一步研究 VPA 的诱导凋亡机制是否与其组蛋白去乙酰化酶活性抑制作用有关，采用 20 mmol/L 的 VPA 作用于 HDAC 缺陷型菌株和 SIR2 过表达菌株(过量表达 NAD 依赖的 HDAC)，发现 HDAC 缺陷型菌株胞内 ROS 和中性脂质(甘油三酯 TAG)含量增高，出现凋亡特征。而 SIR2 过表达菌株则正常生长，表明 VPA 诱导酵母凋亡需要 Sir 蛋白参与[19]。

紫杉醇是目前唯一可通过促进微管聚合和稳定已聚合微管而发挥抗肿瘤作用的药物，通过 Bcl-2 蛋白的磷酸化而诱导细胞凋亡。Haldar 等发现紫杉醇能诱导前列腺癌细胞 Bcl-2 磷酸化及细胞凋亡，但不能诱导 Bcl-2 缺陷株细胞的凋亡[20]。然而，紫杉醇不能抑制酿酒酵母增殖，体外也不能与纯化的酵母微管蛋白结合。其可能的原因在于酵母微管蛋白缺少哺乳动物细胞上的 5 个氨基酸残基。Foland 等人将突变的 β-微管蛋白基因克隆到一株抑制了 ABC 膜转运子活性的酿酒酵母中，发现突变菌株对紫杉醇作用敏感，细胞生长受到抑制、DNA 发生断裂、产生 ROS、有丝分裂被阻断，最终导致细胞凋亡样死亡[21]。

阿霉素(Adriamycin，ADM)为蒽环类抗生素，其介导细胞凋亡的机理在于其嵌合于 DNA 碱基对之间并紧密结合到 DNA 上，抑制 DNA 及 DNA 依赖性 RNA 的合成，导致复制和转录障碍。此外，阿霉素还通过抑制 TOPOII、诱导 ROS 产生，降低胞内抗氧化作用，导致 DNA 损伤、脂质过氧化作用以及线粒体功能紊乱，引发细胞凋亡[16]。Keyhani 等研究阿霉素对产朊假丝酵母(*Candida utilis*)凋亡的影响，发现阿霉素在低质量浓度(<25 μg/mL)时，随着剂量增加，呼吸量、底物氧化和细胞色素合成均随着增加，当质量浓度为 25 μg/mL 时还引起细胞膜的形态改变。而在高质量浓度(>50 μg/mL)时，则引起质膜的改变和线粒体嵴组织形态的变化。当质量浓度继续增加到 200 μg/mL 时，则导致细胞凋亡。因此，细胞质膜改变是阿霉素介导酵母细胞凋亡的一个早期信号[22]。Xia 等在获得 71 个删除单基因突变菌株的基础上，发现保护细胞免受阿霉素伤害的基因涉及多个细胞生理功能，如 DNA 修复、RNA 的代谢、染色质重塑，氨基酸代谢、热休克反应等。此外，线粒体、渗透作用、空泡和核糖体功能中的蛋白也参与了细胞的保护机制。这些酵母单倍体基因均能在哺乳动物基因中找到类似功能的同源物[23]。Westmoreland 等采用等位基因缺失酵母菌株筛选对抗 DNA 损伤的基因，发现阿霉素耐药株与细胞周期检查点、重组修复和线粒体功能等相关。线粒体功能缺失导致 CCR4 基因和 POP2 缺陷型菌株的阿霉素耐药性增强，但并没有完全消除阿霉素所引起的细胞凋亡，这一结果表明，线粒体功能只能部分决定阿霉素作用后的存活率[24]。Huang 等发现小泛素相关修饰途径(small ubiquitin-related modifier，SUMO)是阿霉素引发细胞毒性的主要决定因素。SUMO 途径中的 5 个基因 SIZ1，SIZ2，MLP1，UIP3 和 NUP60 的缺失突变株对阿霉素(42.5 μmol/L)的抗性是野生型菌株的 1.6 到 6.5 倍[25]。Schenk 等发现酿酒酵母中 NPR2(氮通透调节因子) 缺失突变株对阿霉素耐药性是野生型的 4 倍[26]。尽管已经进行了广泛的研究，但阿霉素介导酵母细胞凋亡的生理机制还有待进一步深入研究。

博来霉素(Bleomycin，BLM)族抗生素为氨基糖肽类抗生素，具有良好的抗肿瘤活性，尤其对淋巴癌、磷状细胞癌、肺癌和睾丸癌等具有很好的疗效。BLM 引起肿瘤细胞凋亡的方式随着浓度的变化而不同，微量 BLM 阻滞细胞周期，大量 BLM 则使细胞产生凋亡样变化。Aouida 等在研究 BLM 诱导酿酒酵母细胞凋亡机制时发现，在 100 μmol/LBLM 作用下酵母细胞呈现凋亡小体、染色质浓缩、DNA 片段化等细胞凋亡特征。而博莱霉素抑制剂钴和 EDTA 能够阻止 BLM 引起的细胞凋亡，但 F0F1 - ATP 酶抑制剂寡霉素和呼吸链抑制剂抗霉素等则不能阻

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

止 BLM 介导的细胞凋亡。这一结果显示 BLM 引起的细胞凋亡与线粒体功能无关[27]。

依地福新(Edelfosine)为人工合成的醚酯类抗肿瘤药物,通过抑制肿瘤细胞分裂,导致细胞聚集在 G2/M 期和 G0/G1 期,形成多核细胞,随后通过凋亡的形式促使细胞死亡。依地福新选择性诱导肿瘤细胞凋亡的机理涉及 FAS/CD95 死亡受体、c - myc基因、线粒体、活性氧和 Caspase 3 等重要凋亡因子。张辉等将人 FAS 基因转染至野生型粟酒裂殖酵母细胞中证实了依地福新通过 FAS 途径诱导酵母细胞凋亡[28]。通过比较依地福新诱导人白血病细胞和酵母细胞凋亡的过程,发现依地福新以时间和浓度依赖的方式抑制酵母细胞增殖,介导酿酒酵母细胞凋亡,线粒体膜电位降低,释放 ROS。而鱼藤酮和维生素 E 干扰 ROS 的释放和酵母细胞的凋亡[29]。

3　抗肿瘤药物对酵母细胞毒性作用机制

尽管目前研究已经确定大多数细胞毒类抗肿瘤药物具有诱导酵母细胞凋亡的作用,然而上述几类抗肿瘤药物中还有部分药物,如 5-氟尿嘧啶等,虽然在酵母细胞中表现出细胞毒性作用,但由于缺少充分的实验证据至今尚未完全确定其对酵母细胞的作用属于诱导酵母细胞凋亡,这些药物也在表 2 中一并列出,并总结已有研究报道过的作用机制。

表 2　酵母细胞毒性作用的抗肿瘤药物

Tab. 2　Kinds of anticancer drug that exhibit toxic effect on yeast

药物	表 型
5-氟尿嘧啶	抑制细胞生长,G1/S 期抑制,DNA 损伤
法尼醇	抑制细胞生长,细胞周期基因(CDC9 等)抑制,线粒体 ROS 释放,
菲特霉素	G1 期抑制,线粒体 ROS 释放,
香豆素	细胞核功能丧失,线粒体功能丧失
柔红霉素	DNA 损伤
喜树碱	TOPO I 抑制,DNA 损伤

作为抗代谢类细胞毒药物,5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)通过与细胞内的 UMP 结合形成 5-FdUMP,再与胸苷酸合成酶(TS)形成紧密的共价结合物,抑制 TS 酶活性,导致 dTMP 合成受阻,影响 DNA 和 RNA 的生物合成,对细胞增殖各期特别是 S 期具有强烈的毒性作用,最终导致细胞核损伤和死亡[30]。Hoskins 等以酿酒酵母为模型,发现 5-FU 的细胞毒作用机理与干扰 DNA 和 RNA 有关,DNA 和 RNA 缺陷型菌株对 5-FU 高度敏感,野生型菌株对 5-FU 引起的损伤 UMP 比 dTMP 更严重,这一结果说明细胞毒性作用主要发生在 RNA[31];Matuo 等研究了修复蛋白缺陷型酵母菌株对 5-FU 及其代谢产物 FdUMP 的敏感性,发现碱基切除修复和错配修复发挥了重要的作用,而同源重组和后复制修复在 5-FU 诱导的凋亡修复中作用相对较小[32]。

法尼醇(Farnesol)属无环倍半萜醇类天然化合物,是胆固醇合成途径中的中间代谢产物,易介导正常细胞和肿瘤细胞凋亡。Machida 等发现法尼醇诱导野生型菌株 30 min 时所产生的 ROS 水平是正常细胞的 5 到 8 倍,但不影响线粒体呼吸链缺陷型菌株(rho^0)ROS 产生;进一步检测发现随着法尼醇浓度的添加,细胞内氧消耗逐渐降低,但不抑制线粒体内氧化酶的活性。甘油二酯可通过激活蛋白激酶 C(PKC)从而有效地抑制法尼醇诱导产生 ROS,表明在酿酒酵母中,法尼醇通过干扰磷酸肌醇信号通路,抑制线粒体电子传递链而加速 ROS 产生[11]。进一步研究发现法尼醇还可通过调节 F_0F_1-ATPase 活性加速 ATP 水解,引起线粒体膜电位超极化,加速 ROS 产生[33]。此外,25 μmol/L 法尼醇通过抑制细胞周期基因编码的 DNA 连接酶 cdc9 和组蛋白乙酰转移酶(hat2)的表达,抑制酿酒酵母细胞出芽繁殖,引起细胞周期抑制[34]。

菲特霉素(Fredericamycin,FMA)是链霉菌的代谢产物,在体内体外都有一定的抗肿瘤活性。FMA 可抑制小鼠白血病细胞 L1210 的生长,作用于 TOPO Ⅰ 型和 Ⅱ 型,但不引起 DNA 的断裂[35]。研究 FMA 对酿酒酵母作用机制,发现 FAM 将细胞生长阻滞在 G1 期,其对细胞毒性随剂量增加和作用时间延长而增强,对多药耐药基因缺陷型菌株 W303-MLC30 作用较野生型敏感(IC_{50}为 24 nmol/L),0.8 μmol/L 的 FMA 作用细胞 10 min 引起线粒体聚集,线粒体缺陷型菌株(rho^0)对 FMA 的抗性大约是野生型的 20 倍,但过量表达 FMA 则引起的线粒体聚集以及细胞凋亡的发生,线粒体是 FMA 作用酵母细胞的主要靶点[36]。

香豆素(Coumarin)是一类具有苯并 α 吡喃酮母核天然产物的总称,具有抗 HIV、抗肿瘤、降压、抗心律失常等多种生物活性,具有潜在的药用价

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

值，其中抗肿瘤作用是一个研究热点。Fong等报道吡喃香豆素类(Pyranocoumarin，PC)在10-30 pg/mL浓度时以剂量依赖的方式诱导HL-60细胞的DNA断裂，作用24 h后引起线粒体膜电位下降和细胞色素c释放，诱导线粒体Bax蛋白表达量增加，Caspase蛋白酶抑制剂ZVAD-fm能抑制HL-60细胞凋亡，表明PC通过线粒体途径诱导HL-60细胞凋亡[37]。Thati等发现香豆素可减少白色念珠菌致病酵母的呼吸作用，降低细胞的麦角固醇含量，增加氨基酸的跨膜泄漏，从而破坏细胞膜的完整性，阻断细胞色素的合成，并诱导细胞凋亡样的形态改变[38]。

柔红霉素(Daunorubicin)通过与DNA结合抑制不同基因的转录而发挥抗肿瘤作用。Rojas等以酿酒酵母为模型在转录组水平研究了亚致死量水平的柔红霉素对酵母调节子的选择性抑制，发现柔红霉素可使糖酵解途径中的几乎所有基因表达量下调，但对核糖体蛋白基因表达几乎没有作用，特异性抑制葡萄糖利用，但对细胞生长等功能影响较小[39]。这与在某些转录因子缺陷型酵母菌株中观察到的现象一致，研究结果对柔红霉素在肿瘤治疗中的应用具有启示作用。

喜树碱(Camptothecin，CPT)是DNA拓扑异构酶Ⅰ(DNA topoisomerase，TOPOⅠ)的抑制剂，抗肿瘤活性与其对酶-DNA分裂复合物的稳定性相关，通过稳定酶-DNA可分裂复合物，将酶转换成纤维毒素等。研究发现CPT处理Jurka细胞，导致线粒体相关蛋白(cyt c和cox IV等)表达特异增加、活化呼吸链、引起线粒体超极化、激活胞浆Caspase酶、最终导致细胞凋亡。CPT处理P53突变的人类结肠癌HT29细胞，发现凋亡诱导蛋白Bax、Fas、FasL等表达上调，抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少，Fas通路的死亡受体(Fas associated death domain，FADD)等能阻止由CPT介导的细胞凋亡[40]。尽管许多研究报道CPT诱导动物细胞凋亡，CPT诱导酵母细胞凋亡则鲜有报道。但CPT能抑制酿酒酵母生长，但对敲除TOP1基因的缺陷型酵母菌株没有作用，表明TOPI是喜树碱毒性作用的唯一靶点。Lotito等研究发现，酿酒酵母中的TOP1基因可通过提高转录效率而有利于酵母细胞增殖，而酿酒酵母对CPT引起的TOP1基因的抑制具有特异、敏感的转录反应，其选择性转录反应部分依赖细胞周期调节因子Mbp1和Swi4，没有观察到CPT诱导酵母细胞凋亡现象[41]。

4 展 望

近年来研究发现细胞凋亡是各种抗肿瘤药物引发细胞死亡的主要方式，从而使得细胞凋亡与肿瘤之间的关系及细胞凋亡在肿瘤治疗中的作用成为抗肿瘤研究的新焦点。以酵母为模式生物研究抗肿瘤药物诱导细胞凋亡的机制，不仅推动人们对凋亡这一保守的生物过程的深入了解，同时也为新型有效的以细胞凋亡为基础的抗肿瘤新药或制剂的开发提供有力的工具。尽管，目前研究发现，酵母可能缺乏某些哺乳动物细胞凋亡的重要调控因子的同源物，如Bcl-2、p53等，但可以通过在酵母细胞中异源表达哺乳动物的这些重要调控基因，研究细胞的凋亡机制。总之，酵母作为细胞凋亡模式生物的研究具有广阔的发展前景，有助于揭示复杂的凋亡通路之间的相互作用关系，阐明凋亡调节过程中未知的下游事件，寻找抗肿瘤药物作用的新的有效靶点。

参考文献(References)：

[1]Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. **Br J Cancer**, 1972, 26: 239－257.

[2] Irene M, Ghobrial M D, Thomas E, et al. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy[J]. **Cancer J Clin**, 2005, 55: 178－194.

[3] 姜俏，林琳，汪天虹. 研究细胞凋亡的新模式生物—酵母[J]. 生物化学与生物物理进展，2008，35(4)：361－367.
JIANG Qiao, LIN Lin, WANG Tian-hong. A nwe method for apoptosis research: yeast[J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 2008, 35(4): 361－367. (in Chinese)

[4] Madeo F, Engelhardt S, Herker E, et al. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine[J]. **Curr Genet**, 2002, 41: 208－216.

[5] Madeo F, Fröhlich E, Fröhlich KU. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis[J]. **J Cell Biol**, 1997, 139: 729－734.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[6] Pereira C, Silva RD, Saraiva L, et al. Mitochondria-dependent apoptosis in yeast [J]. **Biochim Biophys Acta**, 2008,1783: 1286－1302.

[7] Sapienza K, Bannister W, Balzan R. Mitochondrial involvement in aspirin-induced apoptosis in yeast[J]. **Microbiology**, 2008, 154: 2740－2747.

[8] Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, et al. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in Saccharomyces cerevisiae[J]. **Mol Biol Cell**, 2002, 13(8):2598－2606.

[9] Pozniakovsky AI, Knorre DA, Markova OV, et al. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast [J]. **J Cell Biol**, 2005, 168(2):257－269.

[10] Perrone G G, Tan S X, Dawes I W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis [J]. **Biochim Biophys Acta**, 2008 ,1783 (7):1354－1368.

[11] Machida K, Tanaka T, Fujita K, et al. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast Saccharomyces cerevisiae[J]. **J Bacteriol**, 1998 ,180(17):4460－4465.

[12] Eisenberg T, B ttner S, Kroemer G, et al. The mitochondrial pathway in yeast apoptosis[J]. **Apoptosis**, 2007, 12(5): 1011－23.

[13] Ludovico P, Sansonetty F, Corte-Real M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry[J]. **Microbiology**, 2001 ,147(Pt 12):3335－43.

[14] Burhans WC, Weinberger M, Marchetti MA, et al. Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects[J]. **Mutat Res**, 2003 , 532(1-2):227－243.

[15] Ribeiro GF, Corte-Real M, Johansson B. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock [J]. **Mol Biol Cell**, 2006,17(10):4584－4591.

[16] Almeida B, Silva A, Mesquita A, et al. Drug-induced apoptosis in yeast[J]. **Biochim Biophys Acta**, 2008, 1783(7):1436 －1448.

[17] Chen Y C, Lin Shiau, Lin J K. Involvement of reactive oxygen species and caspase3 activation in arsenite-induced apoptosis [J]. **J Cell Physiol**, 1998 ,177(2):324－333.

[18] Du L, Yu Y, Chen J, et al. Arsenic induces caspase- and mitochondria-mediated apoptosis in Saccharomyces cerevisiae [J]. **FEMS Yeast Res**,2007, 7(6):860－865.

[19] Sun Q, Bi L, Su X, et al. Valproate induces apoptosis by inducing accumulation of neutral lipids which was prevented by disruption of the SIR2 gene in Saccharomyces cerevisiae [J]. **FEBS Lett**,2007, 581(21):3991－3995.

[20] Haldar S, Chintapalli J, Croce C M. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells[J]. **Cancer Res**, 1996, 56(6):1253－1255.

[21] Foland T B, Dentler W L, Suprenant K A. Paclitaxel-induced microtubule stabilization causes mitotic block and apoptotic-like cell death in a paclitaxel-sensitive strain of Saccharomyces cerevisiae [J]. **Yeast**, 2005, 22(12):971－978.

[22] Keyhani E, Keyhani J. Plasma membrane alteration is an early signaling event in doxorubicin-induced apoptosis in the yeast Candida utilis [J]. **Ann N Y Acad Sci**, 2004,1030:369－376.

[23] Xia L, Jaafar L, Cashikar A, et al. Identification of genes required for protection from doxorubicin by a genome-wide screen in Saccharomyces cerevisiae[J]. **Cancer Res**, 2007, 67(23):11411－11418.

[24] Westmoreland T J, Wickramasekara S M, Guo A Y, et al. Comparative genome-wide screening identifies a conserved doxorubicin repair network that is diploid specific in Saccharomyces cerevisiae [J]. **PLoS One**, 2009, 4(6):e5830.

[25] Huang R Y, Kowalski D, Minderman H,et al. Small ubiquitin-related modifier pathway is a major determinant of doxorubicin cytotoxicity in Saccharomyces cerevisiae [J]. **Cancer Res**, 2007, 67(2):765－772.

[26] Schenk P W, Brok M, Boersma A W, et al. Anticancer drug resistance induced by disruption of the Saccharomyces cerevisiae NPR2 gene: a novel component involved in cisplatin- and doxorubicin-provoked cell kill [J]. **Mol Pharmacol**, 2003 , 64(2):259－268.

[27] Aouida M, Pag N, Leduc A, et al. A genome-wide screen in Saccharomyces cerevisiae reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin[J]. **Cancer Res**, 2004 , 64(3):1102－1109.

[28] 张辉,喻莉萍,王彬,等.依地福新诱导重组 Fas 基因酵母的凋亡[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008,25(5):373－376. ZHANG Hui, YU Li-ping, WANG Bin, et al. Apoptosis induced by edilfosine in S. pombe which cloned fas gene[J]. **The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy**,2008,25(5):373－376. (in Chinese)

[29] Zhang H, Gajate C, Yu LP, et al. Mitochondrial-derived ROS in edelfosine-induced apoptosis in yeasts and tumor cells

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[J]. **Acta Pharmacol Sin**, 2007,28(6):888－894.

[30] Seiple L, Jaruga P, Dizdaroglu M, et al. Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast [J]. **Nucleic Acids Res**, 2006,34(1):140－151.

[31] Hoskins J, Scott Butler J. Evidence for distinct DNA- and RNA-based mechanisms of 5-fluorouracil cytotoxicity in Saccharomyces cerevisiae [J]. **Yeast**, 2007, 24(10):861－870.

[32] Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, et al. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP [J]. **Biochem Pharmacol**, 2010, 79(2):147－153.

[33]Machida K, Tanaka T. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F(0)F(1)-ATPase in yeast [J]. **FEBS Lett**, 1999 Nov 26;462(1-2):108－12.

[34] Machida K, Tanaka T, Yano Y, et al. Farnesol-induced growth inhibition in Saccharomyces cerevisiae by a cell cycle mechanism[J]. **Microbiology**, 1999,145 (Pt 2):293－299.

[35] Latham MD, King CK, Gorycki P, et al. Inhibition of topoisomerases by fredericamycin A [J]. **Cancer Chemother Pharmacol**, 1989, 24(3):167－171.

[36] Imamura Y, Yukawa M, Kimura K, et al. Fredericamycin A affects mitochondrial inheritance and morphology in Saccharomyces cerevisiae[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2005 , 69(11):2213－2218.

[37] FONG W F, ZHANG J X, WU J Y, et al. Pyranocoumarin(＋/-)-4′-O-acetyl-3′-O-angeloyl-cis-khellactone induces mitochondrial-dependent apoptosis in HL-60 cells [J]. **Planta Med**, 2004 ,70(6):489－495.

[38] Thati B, Noble A, Rowan R, et al. Mechanism of action of coumarin and silver(I)-coumarin complexes against the pathog enic yeast Candida albicans[J]. **Toxicol In Vitro**, 2007, 21(5):801－808.

[39] Rojas M, Casado M, Portugal J, et al. Selective inhibition of yeast regulons by daunorubicin: a transcriptome-wide analysis[J]. **BMC Genomics**, 2008, 9:358－374.

[40] Pisano C, De Cesare M, Beretta GL, et al. Preclinical profile of antitumor activity of a novel hydrophilic camptothecin, ST1968[J]. **Mol Cancer Ther**, 2008 , 7(7):2051－2059.

[41] Lotito L, Russo A, Bueno S, et al. A specific transcriptional response of yeast cells to camptothecin dependent on the Swi4 and Mbp1 factors[J]. **Eur J Pharmacol**, 2009 ,603(1-3):29－36.

（责任编辑：朱明）

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net