

蟾酥抗肿瘤临床应用及其疗效机制的研究进展

刘娟¹, 童明慧¹, 郭英球², 李娟^{1,3*}

¹湖南中医药大学; ²长沙欧邦生物科技有限公司; ³湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心,长沙 410208

摘要:蟾酥是我国传统名贵药材,至今已有悠久的用药历史,随着对蟾酥的深入研究,发现其在抗肿瘤方面具有独特的用药优势。近年来,诸多报道表明蟾酥及其制剂在临床治疗肿瘤中有良好的疗效,不仅有效抑制肿瘤的发展,而且有效改善患者机体免疫力。同时,大量的体内外实验亦证实蟾酥及其成分有确切的抗肿瘤作用。本文综述了近五年蟾酥及其制剂抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭,诱导肿瘤细胞凋亡和自噬,逆转肿瘤多药耐药等作用机制以及相关临床应用,为蟾酥抗肿瘤作用机制的深入研究和临床合理用药提供指导依据。

关键词:蟾酥;抗肿瘤;作用机制;临床应用;毒性

中图分类号:R285.6

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)8-1430-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.8.017

Research progress on clinical application and therapeutic mechanism of Bufonis Venenum for anti-tumor

LIU Juan¹, TONG Ming-hui¹, GUO Ying-qiu², LI Juan^{1,3*}

¹Hunan University of Chinese Medicine; ²Changsha Oubang Biotechnology Co., Ltd.;

³Hunan Province Engineering Research Center of Bioactive Substance Discovery of TCM, Changsha 410208, China

Abstract: Bufonis Venenum, as a precious traditional Chinese medicinal material, has a long medicinal history. With the continuous research, its unique drug advantages in anti-tumor have been found. Recently, numerous reports indicate that Bufonis Venenum and its preparations show good curative effect in the clinical treatment of tumors. It not only inhibits growth of tumors but also effectively improve the immunity of body. Meanwhile, Bufonis Venenum and its constituents have been considered very powerful in anti-tumors by a large number of *in vivo* and *in vitro* experimentations. This paper reviewed about the anti-tumor clinical application and mechanisms including inhibiting the proliferation, migration, invasion, inducing apoptosis, autophagy of tumor cells, as well as reversing multi-drug resistance of Bufonis Venenum and its preparations in the latest five years, so as to provide guidance for the further study of the anti-tumor mechanisms and clinical rational use of Bufonis Venenum.

Key words: Bufonis Venenum; anti-tumor; mechanisms; clinical application; toxicity

恶性肿瘤严重地威胁了人类健康及生命,临幊上主要以手术、靶向、药物及放化疗等手段综合治疗。中医药在治疗恶性肿瘤中,具有一定优势和特点,中医认为肿瘤的病机主要是正气虚弱,外邪入侵,根据恶性肿瘤的病因病机,中药治疗在辨证论治基础上,分别施以扶正固本、软坚散结、活血化瘀、理气行滞、清热解毒^[1]。蟾酥(Bufonis Venenum)为蟾

蜍科动物中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans* Cantor)或黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus* Schneider)的干燥分泌物。其性味辛,温,有毒、归心经,具有解毒、止痛,开窍醒神之功效,用于治疗痈疽疔疮,咽喉肿痛,中暑神昏,痧胀腹痛吐泻^[2],是一味优良的抗肿瘤中药。现代药学研究表明,蟾酥主含蟾蜍内酯类、蟾毒色胺类和甾醇类等化合物,已证明蟾蜍内酯类是蟾酥抗肿瘤的主要药效物质基础,目前,已从蟾酥中分离鉴定出142种该类成分^[3]。其主要成分蟾毒灵、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基在2020年版《中国药典》蟾酥药材质量标准中作为含量测定的指标成分,规定这三个化合物的总含量不低于7%。由蟾酥单味

收稿日期:2021-11-02 接受日期:2022-03-08

基金项目:长沙市科技计划(kh1902260);湖南省卫生健康委科研课题(202213055724),国家级大学生创新创业训练计划(202110541017);湖南中医药大学中药学一流学科项目(校行科学[2018]3号)

*通信作者 Tel:86-731-88459421; E-mail:forever_lujuan@163.com

药材开发的华蟾素三种剂型(注射液、胶囊和片剂)和蟾酥注射液,治疗中、晚期肿瘤具有较好的临床疗效,尤其是对原发性肝癌、肺癌、食管癌和胃癌作用效果显著,能增强机体免疫力,减少放化疗的毒副反应,并提高患者生存质量、延长寿命等^[4]。鉴于蟾酥优良的抗肿瘤作用,本文综述了近五年蟾酥及其制剂抗肿瘤的作用机理和临床应用,为蟾酥的深入研究和开发利用提供指导依据。

1 临床应用

蟾酥始载于《药性论》,原名蟾蜍眉脂。古籍《医学入门》记载:“主痈疽疗肿瘰疬,一切恶疮顽癣”;《本草纲目》载:“治发背疔疮,一切恶肿”。在古人用治恶疮肿毒的经验的启发之下,现代中医将其用于各种癌肿,有攻毒抗癌、消肿止痛之效。如

《抗癌治验本草》记载,以之与露蜂房、鸦胆子、玳瑁等配伍,治疗肺癌;以之与乳香、没药、雄黄等配伍,治疗乳腺癌等。基于前人的应用基础,采用现代药物制剂技术,将蟾酥开发成多种制剂。目前,已上市销售的用于治疗肿瘤的蟾酥制剂除单味药的华蟾素三种制剂和蟾酥注射液外,还有复方制剂鹤蟾片和仙蟾片等。近年来,国内外学者多采用随机对照的临床试验方法对蟾酥注射液,华蟾素及仙蟾片等进行临床评价,研究证实,蟾酥制剂在各种恶性肿瘤的治疗中效果显著。

1.1 单用蟾酥制剂的临床评价

临床常单用华蟾素制剂治疗多种中、晚期肿瘤,与白介素-2、水飞蓟宾葡甲胺片,以及硫酸吗啡控释片等相比,作用效果显著,不良反应少(见表1)。

表1 单用蟾酥制剂抗肿瘤的临床疗效

Table 1 Clinical efficacy of single use of Bufonis Venenum preparations for anti-tumor

蟾酥制剂 Bufonis Venenum preparation	研究类型 Type of study	临床治疗对象 Object of clinical treatment	治疗方案 Treatment plan	临床疗效 Clinical efficacy	参考文献 Ref.
华蟾素注射液	随机对照	晚期肿瘤所致湿热型 恶性腹水患者 60 例, 按照随机数字表以 3 : 1 的比例分为治疗组 45 例,对照组 15 例。	治疗组:腹腔灌注华蟾素注射液; 对照组:腹腔灌注白介素-2	治疗组和对照组有效率分别为 66.7% 和 46.7%,肿瘤标记物水平下降超过 50% 的比率, 分别为 53.3% 和 40%;与对照组相比, 治疗组患者腹水量得到更有效控制,恶心呕吐等不良反应发生率明显减少。	5
华蟾素片	随机盲法对照	晚期肺癌患者 60 例, 盲选法分为治疗组和 对照组各 30 例。	治疗组:华蟾素片; 对照组:硫酸吗啡缓释片	治疗组和对照组对疼痛的控制率分别为 93.33% 和 73.33%;与对照组相比,治疗组 患者血液中凝血指标纤维蛋白原、D-二聚体 水平有效降低,华蟾素片可有效减轻晚期肺 癌患者疼痛,改善机体的凝血功能。	6
华蟾素胶囊	随机对照	原发性肝癌患者 74 例, 随机分为治疗组 40 例, 对照组 34 例。	治疗组:华蟾素胶囊; 对照组:水飞蓟宾葡甲胺片	治疗组和对照组生活质量改善率分别为 70% 和 52.9%;与对照组相比,治疗组患者 肝细胞炎症生化指标 ALT、AST、GGT 水平 降低,CD3 ⁺ 、CD4 ⁺ 、CD8 ⁺ 等免疫指标升高。 治疗组和对照组的疼痛总缓解率分别为 95.45% 和 84.09%;与对照组相比,治疗组 患者睡眠、情绪、日常生活和独立活动能力 评分更高,生活质量得到明显改善。	7
	随机对照	口腔癌患者 88 例, 随机分为治疗组和对照 组各 44 例。	治疗组:华蟾素胶囊; 对照组:硫酸吗啡控释片		8

1.2 联合应用

蟾酥制剂常与放/化疗方案联用,治疗恶性肿瘤,不仅可以增加化疗药的疗效,显著降低肿瘤标志物水平,而且可以明显缓解临床症状、抑制炎症反应、减少患者复发与转移的作用趋势(见表2)。

1.3 不良反应

华蟾素注射液中吲哚类生物碱,主要成分 5-羟色胺对血管有强烈的刺激和收缩作用,静脉炎是发生率最高的不良反应^[22]。少数患者在治疗过程中

还会出现皮疹、发热、寒战、过敏性休克等症状,在接受对症处理后所有症状都得以缓解^[23]。目前没有华蟾素注射液致死的病例报告^[24]。另报道,华蟾素口服制剂给药期间,患者会出现腹痛,腹泻等胃肠道不适,但随着时间延长,这种情况多可耐受^[25]。上述研究结果提示,蟾酥制剂在临床应用存在一定的不良反应,但严格遵循说明书用药,加强用药监测,能有效保障其用药的安全性。

表 2 蟾酥制剂联合放/化疗方案抗肿瘤作用的临床疗效

Table 2 Clinical efficacy of Bufonis Venenum preparations combined with radiotherapy/chemotherapy regimen for anti-tumor

蟾酥制剂 Bufonis Venenum preparation	研究类型 Type of study	临床治疗对象 Object of clinical treatment	治疗方案 Treatment plan	临床疗效 Clinical efficacy	参考文献 Ref.
蟾酥注射液	随机对照	晚期胃癌(IV期)患者50例,随机分为治疗组和对照组各25例。	对照组:阿帕替尼; 治疗组:蟾酥注射液+阿帕替尼	治疗组和对照组治疗总有效率分别为20%和8%,疾病控制率分别为76%和48%;与对照组相比,联用蟾酥注射液可有效降低患者血清中肿瘤标志物糖类抗原199(CA199)、癌胚抗原(CEA)含量,减少贫血,白细胞、中性粒细胞减少等血液学不良反应发生率。 9	
	随机对照	铂敏感性复发的上皮性卵巢癌患者102例,按照随机数字表法分为治疗组和对照组各51例。	对照组:紫杉醇+卡铂(TC化疗方案); 治疗组:蟾酥注射液+TC方案	治疗组和对照组治疗总有效率分别为84.31%和66.67%;与对照组相比,联用蟾酥注射液可显著降低卵巢癌血清标志物糖类抗原125(CA125)水平,并增强机体免疫功能,减少骨髓抑制、恶心呕吐等不良反应的发生。 10	
华蟾素注射液	随机对照	原发性肝癌患者84例,按照随机数字表法分为治疗组和对照组各42例。	对照组:顺铂+阿霉素+丝裂霉素肝动脉化疔栓塞(TACE)介入治疗; 治疗组:华蟾素注射液+TACE介入治疗	治疗组和对照组治疗总有效率分别为61.9%和42.8%,生活质量改善率分别为35.7%和21.4%;与对照组相比,联用华蟾素注射液可显著降低患者血清总胆红素、谷丙转氨酶和甲胎蛋白水平,提高CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 以及自然杀伤细胞比率,增强机体免疫能力和化疗耐受性。 11	
	随机对照	CD20阳性弥漫大B细胞淋巴瘤患者84例,随机分为治疗组46例,对照组38例。	对照组:利妥昔单抗+环磷酰胺+吡柔比星+长春地辛+强的松(RCHOP方案); 治疗组:华蟾素注射液+RCHOP方案	治疗组和对照组治疗总有效率分别为73.9%和52.6%,生活质量改善率分别为82.6%和60.5%;两组患者均出现胃肠道反应、肝肾功能损害和骨髓抑制等不良反应,但是基本可控。 12	
	回顾性分析	晚期胃癌患者72例,按照随机数字表法分为治疗组和对照组各36例。	对照组:替吉奥+奥沙利铂(SOX方案); 治疗组:华蟾素注射液+SOX方案	治疗组和对照组的生活质量改善有效率分别为77.78%和52.78%;与对照组相比,联用华蟾素注射液可提高患者近期疗效、疼痛缓解程度,并减少神经毒性,肝功能异常,消化道反应等毒副作用发生率。 13	
华蟾素胶囊	随机对照	晚期非小细胞肺癌患者74例,按照随机数字表法分为治疗组和对照组各37例。	对照组:盐酸埃克替尼; 治疗组:华蟾素胶囊+盐酸埃克替尼	治疗组和对照组治疗总有效率分别为89.19%和70.27%;与对照组相比,联用华蟾素胶囊可减低患者炎症因子水平,改善肺功能指标,提高患者的生活质量。 14	
	随机对照	乳腺癌患者138例,按照随机数字表法分为治疗组和对照组各69例。	对照组:氟尿嘧啶+多柔比星+环磷酰胺(FAC化疗方案); 治疗组:华蟾素胶囊+FAC化疗方案	治疗组和对照组治疗总有效率分别为69.6%和50.7%,与对照组相比,联用华蟾素胶囊能有效降低患者三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、升高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平,改善内分泌药物导致的脂质代谢改变。 15	
	随机对照	乳腺癌患者128例,按照随机数字表法分为治疗组和对照组各64例。	对照组:多西他赛; 治疗组:华蟾素胶囊+多西他赛	治疗组和对照组治疗总有效率分别为90.6%和70.3%;与对照组相比,联用华蟾素胶囊可大幅度改善炎症因子和免疫功能指标,提高患者生存质量并缩短住院时间。 16	
	随机对照	晚期直肠癌患者68例,随机分为治疗组和对照组各34例。	对照组:亚叶酸钙+奥沙利铂+氟尿嘧啶(FOLFOX4)方案; 治疗组:华蟾素胶囊+FOLFOX4方案	治疗组和对照组治疗总有效率分别为64.7%和50%,生活质量改善率分别为41.2%和32.4%;与对照组相比,联用华蟾素胶囊能显著降低恶心、呕吐及白细胞减少等不良反应发生率。 17	

续表2(Continued Tab. 2)

蟾酥制剂 Bufonis Venenum preparations	研究类型 Type of study	临床治疗对象 Object of clinical treatment	治疗方案 Treatment plan	临床疗效 Clinical efficacy	参考文献 Ref.
	随机对照	多发性骨髓瘤化疗患者 95 例,随机分为治疗组 50 例,对照组 45 例。	对照组:硼替佐米 + 地塞米松 + 环磷酰胺 (PCD 方案); 治疗组:华蟾素胶囊 + PCD 方案	治疗组和对照组治疗总有效率分别为 74.0% 和 53.3%;与对照组相比,联用华蟾素胶囊可增加患者肠道有益菌群数量和肠道微生物的多样性,有效纠正患者肠道菌群失调,减轻化疗对机体肠胃粘膜的损伤,提高机体应对病原微生物入侵的抵抗能力。	18
华蟾素片	随机对照	晚期肺癌患者 122 例,按照随机数字表法分为研究组和对照组各 61 例。	对照组:吉西他滨 + 紫杉醇 + 顺铂; 治疗组:华蟾素片 + 吉西他滨 + 紫杉醇 + 顺铂	治疗组和对照组的客观缓解率分别为 85.24% 和 67.21%;与对照组相比,联用华蟾素片可降低患者血液中血小板、D-二聚体,血浆纤维蛋白原等凝血指标,有效改善血液高凝状态,提升生活质量。	19
	随机对照	晚期肝癌老年患者 120 例,按照随机数字表法分为治疗组和对照组各 60 例。	对照组:盐酸羟考酮缓释片; 治疗组:华蟾素片 + 盐酸羟考酮缓释片	治疗组和对照组疼痛缓解率分别为 88.3% 和 68.3%;与对照组相比,联用华蟾素片可提高患者疼痛缓解度,同时在用药期间伴随腹痛和腹泻等不良反应发生增多,但在建立药物耐受后,这种情况会自行消除。	20
仙蟾片	随机对照	食管癌老年患者 68 例,按照数字随机分组法分为治疗组和对照组各 34 例。	对照组:紫杉醇 + 亚叶酸钙 + 顺铂; 治疗组:仙蟾片 + 紫杉醇 + 亚叶酸钙 + 顺铂	治疗组和对照组治疗总有效率分别为 91.2% 和 70.6%;与对照组相比,联用仙蟾片可显著提高患者生活质量,增强机体免疫能力,降低肿瘤转移可能性。	21

华蟾素是临床应用最多的蟾酥制剂,自 20 世纪 80 年代投入临床应用以来,已广泛应用于各种中、晚期恶性肿瘤以及癌症疼痛的治疗,为二类中药保护品种,被收录于《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》和《国家基本药物目录》中。华蟾素制剂单用时,可有效控制腹水量、改善机体凝血功能、降低肝细胞炎症指标以及缓解疼痛,提高患者的生活质量;与化疗药物或其他治疗手段联用时,不仅可提升化疗药物的抗肿瘤作用,而且可减轻化疗药物引起的恶心呕吐、骨髓抑制、脂质代谢异常、肠胃粘膜损伤等一系列不良反应。蟾酥注射液作为一种肿瘤辅助治疗药物,常与化疗药物联合使用,与单用化疗药物相比,患者血清中 CA125、CA199 等癌症标志物的含量显著降低,并能有效纠正患者 T 淋巴细胞亚群比例失调,减轻免疫功能的损害。

2 作用机理研究

药学工作者对蟾酥中单体化合物及其制剂的抗肿瘤作用进行了深入研究。单体化合物主要集中在蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、蟾毒它灵、沙蟾毒精等蟾蜍内酯类成分,其制剂主要研究华蟾素三种制剂和蟾酥注射液,华蟾素是由中华大蟾蜍干燥皮经水提醇沉和不同工艺制备而成的制剂,主要含有蟾蜍内酯类、生物碱类、多肽类、胆固醇类等成分;蟾

酥注射液是由从中华大蟾蜍耳后腺和皮肤腺的干燥分泌物中提取的有效成分精制而成的灭菌水溶液,主含蟾毒内酯类、生物碱类成分。研究发现其主要通过抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移,促进肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞自噬,逆转肿瘤多药耐药等方面发挥抗肿瘤的作用。

2.1 诱导肿瘤细胞周期阻滞

细胞周期主要分为 DNA 合成期 (G1 期、S 期), G2 期) 和细胞分裂期 (M 期), 蟾酥可以通过调控周期蛋白依赖性激酶、细胞周期蛋白,以及一系列原癌基因的表达将细胞阻滞于不同时期(见表 3)。

2.2 诱导细胞凋亡

凋亡是一种基因控制的自杀程序,诱导癌细胞凋亡已被确定为治疗癌症的有效方法之一。目前对凋亡机制的研究主要汇集在三个方面:内源性途径、外源性途径、内质网应激介导凋亡途径。

内源性途径又称为线粒体途径,Bcl-2 家族蛋白是控制该途径的主要调节分子。Bcl-2 家族蛋白可分为抗凋亡因子 (Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-x、BAG 等) 和促凋亡因子 (Bax、Bid、Bak、Bad、Bcl-10、Bim 等),通过调控 Bcl-2 家族蛋白引起线粒体膜的通透性增强,细胞色素 (cytochrome, Cyto) C 的释放,从而诱导细胞凋亡。Han 等^[36] 证实异沙蟾毒精可上调结直肠

表3 蟾酥对肿瘤细胞周期的阻滞作用

Table 3 Inhibitory effect of Bufonis Venenum on tumor cell cycle

名称 Name	细胞系 Cell line	分子机制 Molecular mechanism	对细胞周期的影响 Effects on the cell cycle	参考文献 Ref.
华蟾素注射液	人胃癌细胞 MKN-45	降低细胞周期蛋白 (cyclin, Cyc) D1、Cyc B1 蛋白表达	阻滞于 S 期	26
华蟾素胶囊	人胃癌细胞 MGC-803、BGC-823	升高 p21 蛋白水平	阻滞于 G2/M 期	27
蟾酥注射液	人乳腺癌细胞 MCF-7 和人前列腺癌细胞 DU145	降低 Cyc D1 蛋白表达、抑制视网膜母细胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, Rb) 磷酸化	阻滞于 G1 期	28
蟾毒灵	人肝癌细胞 PLC5	降低细胞周期相关激酶 (cell cycle-related kinase, CCRK), β -连环蛋白 (β -catenin) 活性、Cyc D1 蛋白和表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 表达	阻滞于 G1 期	29
	人胰腺癌细胞 BxPC3、SW1990	降低 Cyc D1、Cyc E1 蛋白表达, 升高 p27 蛋白水平	阻滞于 S 期	30
	人胶质瘤细胞 U87-MG、U251	降低 NKA α 1 亚基 (ATP1A1) 基因表达、激活泛素-蛋白酶体途径	阻滞于 G2/M 期	31
蟾毒它灵	人黑色素瘤细胞 A375	降低周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependent kinase, CDK)-1、细胞分裂周期蛋白 (cell division cycle protein, CDC) 25C 表达, 升高细胞周期检测点激酶 (checkpoint kinase, Chk)-2 蛋白的水平	阻滞于 G2/M 期	32
嚏根草配基	人乳腺癌细胞 MCF-7	降低 CycD1、CycE1、CDC 25C 蛋白表达, 升高 p21 蛋白水平	阻滞于 G2/M 期	33
华蟾酥毒基	人鼻咽癌细胞 HK-1	降低 CDK-2 和 Cyc E 的蛋白表达水平	阻滞于 S 期	34
	人黑色素瘤细胞 A375	降低 Cdc25C、CDK-1 和 Cyc B 蛋白水平	阻滞于 G2/M 期	35

癌细胞 SW620 和 HCT116 中促凋亡蛋白 Bax 表达, 并协同线粒体内膜转运蛋白腺苷酸转运体 (adenine nucleotide transporter, ANT) 共同增强线粒体的膜通透性, 降低线粒体跨膜电位, 从而诱导细胞 SW620 和 HCT116 通过线粒体途径实现凋亡。活性氧 (reactive oxygen, ROS) 在细胞的凋亡中起着重要作用, 华蟾酥毒基刺激人骨肉瘤细胞 U2OS 和 143B 细胞产生过量 ROS, 诱导线粒体双层膜通透孔开放, 进而引起线粒体损伤, 最终导致细胞凋亡^[37]。Wu 等^[38]证明蟾毒灵可通过增加人结直肠癌细胞 HCT-116 和 SW620 中 ROS 的蓄积, 激活线粒体介导的半胱天冬酶 (caspase, Casp) 级联凋亡途径, 促进凋亡。除上述 ROS 介导的凋亡, 线粒体凋亡信号通路还涉及诸多促凋亡蛋白基因、抑癌基因的表达。蟾毒灵可破坏人恶性胶质瘤细胞 U87 线粒体膜的完整性, 触发氧化应激, 进而催化 U87 细胞 DNA 双键断裂, 诱导下游肿瘤抑制基因 p53 核转录增加、促使聚 ADP-核糖聚合酶 (poly-ADP-ribose polymerase,

PARP) 裂解, 上调凋亡相关蛋白 Bax、Casp-9 的表达, 从线粒体途径发挥诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[39]。

外源性途径又称为死亡受体途径, 是一条主要的细胞凋亡调控途径。细胞表面的死亡受体与特定的死亡配体结合后通过信号级联反应激活 Casps, 导致不同蛋白质的剪切, 进而启动细胞凋亡。蟾毒灵能够诱导人膀胱癌细胞 T24 外源性凋亡, 即上调死亡受体 (death receptor, DR)-5 蛋白水平, 激活 Casp-8, 活化下游效应分子 Casp-3、7, 并使 PARP 裂解, 从而促使细胞凋亡^[40]。Yang 等^[41]报道不同浓度华蟾素溶液可上调自杀相关因子 (factor associated suicide, Fas) 及其配体 FasL、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α R、DR-4 的蛋白水平诱导人膀胱癌细胞 T24 和 EJ 外源性凋亡, 并上调 Bax/Bcl-2 蛋白比例, 促使线粒体释放 Cyto C 激活线粒体途径, 放大凋亡信号, 促进肿瘤细胞凋亡, 从而抑制 T24 裸鼠异位移植瘤的生长。

内质网是细胞内 Ca^{2+} 含量最多的细胞器, Ca^{2+} 稳态失衡时, 细胞内环境被扰乱, 引起内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS), 并进一步激发未折叠蛋白反应, 诱导下游转录因子 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 表达, 激活 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路, 并活化 Casp-12 启动凋亡程序。蟾毒灵诱导 CHOP 表达以及蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 和跨膜蛋白肌醇需求酶 1 (inositol-requiring enzyme 1, IRE1) 磷酸化, 促使 Casp-12 激活, 触发 ERS 诱导人骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡^[42]。蟾毒灵可活化肝癌细胞 HepG-2 和 Huh-7, 白血病细胞 K562 和 K562/A02 中内质网跨膜蛋白 IRE1 α , 增加 JNK 蛋白磷酸化, 通过作用于 IRE-JNK 通路诱导 ERS, 致使细胞凋亡^[43,44]。

2.3 抑制肿瘤细胞侵袭和迁移

当肿瘤细胞具备高侵袭、高迁移能力时, 可从原发部位, 经淋巴道, 血管或体腔等途径到达其他部位继续生长。这一转移过程涉及细胞外基质 (extra-cellular matrix, ECM) 屏障被破坏、原部位肿瘤血管新生、上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 后细胞侵入体循环, 从循环系统再植入新的器官组织并随之增殖。华蟾素注射液可抑制人肝癌细胞 HepG2 中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factors, VEGFs)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)-2、9 蛋白过度表达, 避免 ECM 屏障被破坏, 使肿瘤细胞的侵袭和转移受阻^[45]。内皮细胞 HUVEC 的分裂和增殖是肿瘤血管生成的重要条件, 华蟾酥毒基剂量依赖性诱导 BALB/c 裸鼠结肠肿瘤组织中 HUVEC 内皮细胞 ROS 聚积, 下调 HUVEC 细胞中 Bcl-2 和低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor, HIF-1 α) 蛋白水平, 使蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt)/哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 磷酸化减少, 阻碍内皮细胞 Akt/mTOR/HIF-1 α 通路, 显著减少血管生成数目, 抑制裸鼠瘤体生长^[46]。蟾毒灵可通过抑制人肝癌细胞 BEL-7402 糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GS β -3 β) Ser9 位点的磷酸化和 β -catenin 的核转位, 下调 Wnt/ β -catenin 信号通路下游分子 MMP-7、环氧化酶 (cyclooxygenase, COX)-2 和 Cyc D1 蛋白表达, 增加细胞膜上肿瘤抑制因子 E-钙黏蛋白 (E-cadherin, E-Cad) 和 β -catenin 的表达, 从而增加 E-

Cad/ β -catenin 复合物数量, 以阻断 EMT^[47]。沙蟾毒精 (8 nM) 显著增加人前列腺癌细胞 PC3 细胞中 E-Cad 和胞质紧密粘连蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 表达, 降低 E-Cad 转录抑制因子 E 盒结合锌指蛋白 1 (zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1) 和波形蛋白 (vimentin, Vim) 表达, 抑制 EMT 的发生^[48]。

2.4 诱导肿瘤细胞自噬

华蟾素可上调自噬标志分子微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 以及 p62 蛋白表达, 提高 Bax/Bcl-2 的比例, 同时触发人膀胱癌细胞 T24 的凋亡和自噬^[49]。蟾毒灵使人结直肠癌细胞 LoVo 中自噬相关基因 (autophagy-related gene, Atg)-5、7、12 和 Beclin-1 蛋白表达增加, 同时, LC3-I 转化为 LC3-II, 通过自噬途径发挥抗肿瘤作用^[50]。研究表明, ROS-JNK 通路的激活与细胞自噬的关系密切。蟾毒灵在人结直肠癌细胞 HT-29 和 Caco-2 中可促进 ROS 的形成和积累, 进而激活 JNK 信号通路, 上调细胞中 LC3-II、Beclin-1、Atg-5 蛋白表达, 应用 ROS、JNK 抑制剂后, 可削弱蟾毒灵诱导自噬的能力, 提示蟾毒灵诱导人结直肠癌细胞自噬与 ROS-JNK 途径相关^[51]。同时, 华蟾酥毒基可通过 ROS/JNK/p38 途径诱导人骨肉瘤细胞 U2OS 发生自噬^[52]。蟾蜍硫堇下调 H22 肝癌荷瘤小鼠血清中白介素 (interleukin, IL)-6 水平, 抑制肿瘤组织中转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 3 和蛋白酪氨酸激酶 (janus kinase, JAK)-2 的过度激活, 发挥抗炎活性, 并上调自噬相关蛋白 LC3-II、Atg-5、7 和 Beclin-1 表达水平, 通过抑制 IL-6/JAK/STAT3 通路诱导细胞自噬的发生^[53]。

2.5 逆转肿瘤多药耐药

多药耐药是肿瘤临床治疗中导致治疗失败和疾病复发的主要原因之一, 多药耐药的诱发机制复杂, 蟾酥因其多靶点的优势在逆转肿瘤多药耐药应用中有巨大的潜力。华蟾毒灵可促进鼻咽癌细胞 5-8F 中抑癌基因 FOXO1 的表达, 进而抑制 5-8F 细胞相互蛋白非肌性肌球蛋白重链-9 (non-muscle myosin heavy chain 9, MYH9) 基因的表达, 增加顺铂化疗的敏感性, 协同抑制鼻咽癌细胞侵袭^[54]。华蟾毒灵与吉非替尼联用, 抑制肺癌细胞 A549 中 Cyc A、Cyc D、CDK-2、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 的蛋白表达, 阻碍肝细胞生长因子受体 c-Met 进一步扩增, 靶向 HGF/c-Met 通路降低细胞的

活力,加速细胞的凋亡进程^[55]。肿瘤干细胞具有极强的DNA损伤耐受能力,易对化疗药物产生耐药性。蟾毒灵显著抑制结直肠癌细胞HCT116和Lo-Vo的干性,降低干性标记物跨膜糖蛋白CD133、CD44,八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4,OCT4)以及耐药蛋白ABCG2的表达,在体内外均可逆转结直肠癌细胞对顺铂的耐药^[56]。

综上所述,蟾酥抗肿瘤作用涉及细胞增殖、侵袭、转移、凋亡及自噬等多个方面,从细胞水平研究蟾酥抗肿瘤机理,以蟾蜍中蟾蜍内酯类成分为主,蟾毒灵是其中研究最多的化合物,它可以通过促进抑癌基因的表达、调节ROS水平、诱导DNA损伤、阻断EMT的发生,上调自噬基因的表达以及逆转肿瘤细胞对顺铂的耐药性等,在肿瘤发生发展的各个阶段发挥作用。除蟾毒灵外,华蟾酥毒基、蟾毒它灵、沙蟾毒精等亦具有良好的抗肿瘤活性。

3 结语

临床应用中,蟾酥制剂除抗肿瘤作用外,还有显著的机体免疫调节作用,对比机制研究,并未检索到与免疫直接相关的报道,可能与主以蟾蜍内酯类单体化合物研究为主,这类成分无免疫调节作用。蟾酥制剂发挥免疫调节作用可能与华蟾素和蟾酥注射液的制备工艺中保留了大量活性多肽等水溶性物质有关,但相关研究报告极少^[57,58]。蟾酥抗肿瘤作用机制的研究报道较多,并涉及肿瘤发生发展的各个过程,但研究大部分集中在体外细胞实验,机制研究缺乏机体完整统一的内环境和神经体液调节。同时,多篇文献报道,蟾蜍内酯类成分在一定浓度范围内,对正常细胞有细胞毒作用,如,华蟾酥毒基对脑神经元细胞HCN-2的IC₅₀值42.5 μmol/L,其抑制作用主要与细胞中ROS以及Ca²⁺失衡有关^[59],并对人肺上皮细胞BEAS-2B的IC₅₀值22.3 μmol/L^[60];蟾毒灵和沙蟾毒精对人食管上皮细胞Het-1A的IC₅₀值分别为10.1和11.8 μmol/L^[61];脂蟾毒配基抑制胰腺导管上皮细胞HPDE的活力,IC₅₀值58.12 μmol/L^[62]。由此分析蟾蜍内酯类既是抗肿瘤的药效物质,又是毒性成分,但毒性是相对的,通过控制安全用药剂量,可降低对正常细胞的毒性作用。因此,在细胞水平的研究基础上,开展动物体内机制研究,明确蟾蜍内酯类成分的治疗剂量和毒性剂量,为指导临床安全、有效用药,是极其必要的。此外,在蟾蜍内酯类成分研究基础上,开展蟾酥多肽和蟾

毒色胺类等药效物质和机理研究,进一步研究蟾酥抗肿瘤的量-效-毒作用规律及作用机理,以充分发挥蟾酥扶正固本和清热解毒的治疗优势,为蟾酥抗肿瘤的安全、合理用药,扩大临床适应症提供重要的科学依据。

参考文献

- Yin DF. Precise treatment of malignant tumors guided by Chinese medicine theory [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2017, 58:572-574.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 401-402.
- Chen WJ, et al. Research progress on biotransformation and biosynthesis of bufadienolides [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52:4741-4751.
- Zhuang ZJ, et al. Exploring molecular mechanism of Bufonis Venenum for anti-cancer based on network pharmacology [J]. Tradit Chin Drug Res Pharmacol (中药新药与临床药理), 2019, 30:1233-1240.
- Zuo MH, et al. Clinical observation on the treatment of damp-heat malignant ascites by intraperitoneal perfusion of cinobufacinc injection and interleukin-2 [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med (中国中医基础医学杂志), 2014, 20:1101-1103.
- Zhao LL. Effect of cinobufacini tablets on coagulation state in patients with advanced lung cancer [J]. Chin J Thromb Hemost (血栓与止血学), 2022, 28 (1):127-128.
- Shen TB, et al. Clinical observation of cinobufacini capsule in the treatment of primary hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis (中西医结合肝病杂志), 2019, 29 (2):124-126.
- Liu Y. Clinical study on pain relief of patients with oral cancer treated with cinobufacini [J]. Electron J Clin Med Lit (临床医药文献电子杂志), 2017, 4:8131-8133.
- Tian Y, et al. Efficacy of toad venom injection combined with apatinib in patients with advanced gastric cancer [J]. J Pract Med (实用医学杂志), 2020, 36:2583-2586.
- Zhang J, et al. Clinical study of toad venom injection combined with TC regimen in the treatment of platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian cancer [J]. Pract Clin J Integr Tradit Chin West Med (实用中西医结合临床), 2020, 20 (8):46-47.
- Wang L, et al. Auxiliary role of cinobufacini injection in transcatheter arterial chemoembolization for primary liver cancer [J]. Chin J Pract Diagn Ther (中华实用诊断与治疗杂

- 志),2020,34:844-847.
- 12 Yang YL, et al. Effect of constant rate infusion of cinobufacini combined with RCHOP in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Inner Mongolia J Tradit Chin Med(内蒙古中医药),2019,38(3):53-54.
- 13 Dou SS, et al. The short-term curative effects of cinobufotalin injection combined with SOX scheme on advanced gastric cancer[J]. Hebei Med J(河北医药),2021,43:564-567.
- 14 Wang LJ. Effect of cinobufacini capsule combined with Icotinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. Chin J Clin Ration Drug Use(临床合理用药杂志), 2021,14(27):70-72.
- 15 Yu XQ, et al. The effect of huachansu capsule combined with endocrine drugs adjuvant chemotherapy in the treatment of breast cancer and its effect on blood lipids and immune function[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志),2019,28:3388-3390.
- 16 Liu ZQ, et al. Clinical analysis of huachansu capsule combined with docetaxel in the treatment of breast cancer[J]. J Syst Med(系统医学),2021,6(9):54-56.
- 17 Dong M. Observation on the clinical efficacy of cinobufotalin combined with chemotherapy in the treatment of advanced colon cancer[J]. Chin Commun Doct(中国社区医师), 2018,34(13):27-28.
- 18 Chen YN, et al. Efficacy of cinofadine capsule in multiple myeloma patients undergoing chemotherapy and its effects on cellular immunity and enterobacteria[J]. Chin J Micro-ecol(中国微生态学杂志),2020,32:1177-1181.
- 19 Zhao W. Intervention effect of cinobufotalin tablets on coagulation status and quality of life in patients with advanced lung cancer[J]. China Mod Med(中国当代医药), 2021, 28(1):128-131.
- 20 Zhang XG, et al. Effects of huachansu tablets combined with oxycodone hydrochloride sustained-release tablets on cancer pain and quality of life in elderly patients with advanced liver cancer[J]. Electron J Pract Clin Nurs Sci(实用临床护理学电子杂志),2019,4(37):38-39.
- 21 Zhang Y, et al. Clinical study of xianchan tablets combined with chemotherapy in the treatment of elderly patients with esophageal cancer[J]. J Clin Med Pract(实用临床医药杂志),2020,24(3):75-77.
- 22 Liu Q, et al. Adverse reactions and rational drug use of huachansu injection[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2012, 34:1409-1411.
- 23 Zhang DQ. Analysis on the reasons of 60 cases of adverse reactions caused by huachansu injection and the reasonable use of drugs[J]. Anti -Infect Pharm(抗感染药学),2017,14: 807-809.
- 24 Liu B. Adverse drug reactions induced by cinobufotalin injection: literature analysis of 252 cases[J]. China Pharm(中国药房),2011,22:1096-1098.
- 25 Fang LH, et al. Clinical observation of patients with primary liver cancer treated by sorafenib combined cinobufagin tablets[J]. Chin J Cancer(中国癌症杂志),2012,22:856-859.
- 26 He MQ, et al. Effects of cinobufotalin on cell cycle of human gastric cancer MKN-45 cells[J]. Chin J Cell Biol(中国细胞生物学学报),2019,41:674-680.
- 27 Ni T, et al. Huachansu capsule inhibits the proliferation of human gastric cancer cells via Akt/mTOR pathway[J]. Biomed Pharmacother,2019,118:109241.
- 28 Chang H, et al. Bufadienolides from Venenum Bufonis inhibit mTOR-mediated cyclin D1 and retinoblastoma protein leading to arrest of cell cycle in cancer cells[J]. Evid-Based Compl Alt,2018,3247402.
- 29 Yu Z, et al. Bufalin suppresses hepatocarcinogenesis by targeting β -catenin/TCF signaling via cell cycle-related kinase [J]. Sci Rep,2018,8:3891.
- 30 Liu X, et al. Bufalin inhibits pancreatic cancer by inducing cell cycle arrest via the c-Myc/NF- κ B pathway[J]. J Ethnopharmacol,2016,193:538-545.
- 31 Lan YL, et al. Bufalin inhibits glioblastoma growth by promoting proteasomal degradation of the Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ subunit[J]. Biomed Pharmacother,2018,103:204-215.
- 32 Pan Z, et al. Bufotalin induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human malignant melanoma A375 cells[J]. Oncol Rep,2019,41:2409-2417.
- 33 Zhang Y, et al. Cytotoxic effects of hellebrigenin and arenobufagin against human breast cancer cells[J]. Front Oncol, 2021,11:711220.
- 34 Pan Z, et al. Cinobufagin induces cell cycle arrest at the S phase and promotes apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother,2020,122:109763.
- 35 Pan Z, et al. Cinobufagin induces cell cycle arrest at the G2/M phase and promotes apoptosis in malignant melanoma cells [J]. Front Oncol,2019,9:853.
- 36 Han Q, et al. Bufarenogin induces intrinsic apoptosis via Bax and ANT cooperation[J]. Pharmacol Res Perspect,2021, 9(1):e00694.
- 37 Dai G, et al. Cinobufagin induces apoptosis in osteosarcoma cells via the mitochondria-mediated apoptotic pathway [J]. Cell Physiol Biochem,2018,46:1134-1147.
- 38 Wu D, et al. Bufalin induces apoptosis via mitochondrial ROS-mediated caspase-3 activation in HCT-116 and SW620 human colon cancer cells[J]. Drug Chem Toxicol,2019:42: 444-450.

- 39 Lan YL, et al. The sodium pump $\alpha 1$ subunit regulates bufalin sensitivity of human glioblastoma cells through the p53 signaling pathway [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2019, 35: 521-539.
- 40 Kang KH, et al. Bufalin sensitizes human bladder carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14: 853-859.
- 41 Yang T, et al. Huachansu suppresses human bladder cancer cell growth through the Fas/Fasl and TNF-alpha/TNFR1 pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Exp Clin Canc Res*, 2015, 34: 21.
- 42 Zhu YR, et al. Bufotalin-induced apoptosis in osteoblastoma cells is associated with endoplasmic reticulum stress activation [J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2014, 451(1): 112-118.
- 43 Hu F, et al. Blocking autophagy enhances the apoptosis effect of bufalin on human hepatocellular carcinoma cells through endoplasmic reticulum stress and JNK activation [J]. *Apoptosis*, 2014, 19: 210-223.
- 44 Xie Y, et al. The mechanism of bufalin-induced apoptosis of K562/A02 [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 2542-2552.
- 45 Chen D, et al. Effects of cinobufacini injection on hepatocarcinoma cell proliferation, invasion and metastasis [J]. *RSC Adv*, 2016, 6: 82417-82424.
- 46 Li X, et al. Cinobufagin suppresses colorectal cancer angiogenesis by disrupting endothelial mTOR/HIF-1 α axis [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110: 1724-1734.
- 47 Gai JQ, et al. The effect and mechanism of bufalin on regulating hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48: 338-348.
- 48 Chen L, et al. Arenobufagin inhibits prostate cancer epithelial-mesenchymal transition and metastasis by down-regulating β -catenin [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 123: 130-142.
- 49 Chen D, et al. Cinobufacini promotes apoptosis of bladder cancer cells by influencing the expression of autophagy-related genes [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15: 7104-7110.
- 50 Pan Z, et al. Bufalin suppresses colorectal cancer cell growth through promoting autophagy *in vivo* and *in vitro* [J]. *RSC Adv*, 2018, 8: 38910-38918.
- 51 Xie CM, et al. Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51: 1365-1375.
- 52 Ma K, et al. Cinobufagin induces autophagy-mediated cell death in human osteosarcoma U2OS cells through the ROS/JNK/p38 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36 (1): 90-98.
- 53 Kong WS, et al. Bufothionine induces autophagy in H22 hepatoma-bearing mice by inhibiting JAK2/STAT3 pathway, a possible anti-cancer mechanism of cinobufacini [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113848.
- 54 Li YH, et al. Chemical compound cinobufotalin potently induces FOXO1-stimulated cisplatin sensitivity by antagonizing its binding partner MYH9 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4 (1): 48.
- 55 Han Y, et al. Combined treatment of cinobufotalin and gefitinib exhibits potent efficacy against lung cancer [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2021: 6612365.
- 56 Sun J, et al. Bufalin reverses acquired drug resistance by inhibiting stemness in colorectal cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38: 1420-1430.
- 57 He R, et al. High resolution mass profile of bufadienolides and peptides combining with anti-tumor cell screening and multivariate analysis for the quality evaluation of bufonis venenum [J]. *Molecules*, 2019, 24 (10): 1943.
- 58 Gao F, et al. Identification of antitumor components from toad venom [J]. *Oncol lett*, 2017, 14 (1): 15-22.
- 59 Hsu SS, et al. Investigation of cytotoxic effect of the bufanolide steroid compound cinobufagin and its related underlying mechanism in brain cell models [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, e22862.
- 60 Peng P, et al. Cinobufagin, a bufadienolide, activates ROS-mediated pathways to trigger human lung cancer cell apoptosis *in vivo* [J]. *Rsc Adv*, 2017, 7: 25175-25181.
- 61 Lv J, et al. Arenobufagin activates p53 to trigger esophageal squamous cell carcinoma cell apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 1261-1267.
- 62 Liu L, et al. Resibufogenin suppresses transforming growth factor- β -activated kinase 1-mediated nuclear factor- κ B activity through protein kinase C-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109: 3611-3622.