

博宁霉素引起肿瘤细胞衰老的特征

张秀敏, 高 宁, 陈汝贤, 许鸿章, 何琪杨*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 鉴于细胞衰老是抑制肿瘤的重要步骤, 考察博宁霉素引起人肿瘤细胞衰老的特征。采用 MTT 法和克隆形成率实验检测细胞增殖抑制作用; 衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老; 流式细胞仪测定细胞周期分布以及细胞内活性氧自由基水平; Western blotting 检测蛋白的表达水平。结果表明, 博宁霉素对人口腔上皮癌 KB 细胞的作用, 明显强于人非小细胞肺癌 A549 细胞。与阳性对照药多柔比星的作用相似, 博宁霉素可引起这两种细胞均出现衰老特征, 这与细胞阻滞在 G₂/M 期、细胞内活性氧自由基增加有关。0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 博宁霉素可以诱导 KB 细胞衰老, 检测到衰老标志蛋白 P21 的表达明显增加; 而高浓度的博宁霉素激活细胞凋亡通路。本研究结果表明: 博宁霉素引起细胞衰老, 也是其抑制肿瘤细胞增殖的机制之一。

关键词: 博宁霉素; 博莱霉素族; 细胞衰老; 细胞凋亡; 抗肿瘤作用

中图分类号: R963; R979.1⁺4

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 05-0589-06

Characteristics of boningmycin induced cellular senescence of human tumor cells

ZHANG Xiu-min, GAO Ning, CHEN Ru-xian, XU Hong-zhang, HE Qi-yang*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Cellular senescence is one of the important steps against tumor. This study was to observe the characteristics of boningmycin induced senescence of human tumor cells. MTT method and clone formation assay were used to detect the growth-inhibitory effect. Cellular senescence was detected with senescence-associated beta-galactosidase staining. Cell cycle distribution and accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS) were analyzed with flow cytometry. Protein expression was detected by Western blotting. The results showed that the growth-inhibitory effect of boningmycin was obviously stronger on human oral epithelial carcinoma KB cells than that on non-small cell lung cancer A549 cells. Comparison to the similar action of doxorubicin, that boningmycin induced the features of cellular senescence in both cell lines, its due to the arrest at G₂/M phase and an increase of ROS level. The molecular senescence marker P21 increased significantly after boningmycin treatment at a dosage of 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, whereas a higher concentration of it induced apoptosis. The results indicated that cellular senescence induced by boningmycin was one of its mechanisms in tumor suppression.

Key words: boningmycin; bleomycin family; cellular senescence; apoptosis; antitumor effect

博宁霉素 (boningmycin, BON) 是从轮枝链霉菌
平阳新种 (*Streptomyces verticillus* var. *Pingyangensis*).

sp) 中分离得到的单一化学结构的抗生素, 属博莱霉素 (bleomycin, BLM) 族新化合物。与 BLM 的作用相似, BON 具有明显的抗肿瘤作用, 还具有抗乳头瘤病毒导致疾病的活性^[1, 2]; 初步的研究表明: BON 所致的肺纤维化副作用明显低于 BLM 和平阳霉素。为了深入阐明 BON 的抗肿瘤作用机制, 为开发应用打下良好的基础, 本研究对 BON 引起肿瘤细胞衰老的

收稿日期: 2009-12-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772284); 科技部“重大新药创制”综合性大平台项目 (2009ZX09301-003).

*通讯作者 Tel: 86-10-63131856, Fax: 86-10-63017302,

E-mail: qyh2000bj@yahoo.com.cn

特征进行了研究。

肿瘤细胞衰老 (tumor cellular senescence) 是近年来研究较多的课题。正常细胞转变成肿瘤细胞的过程中, 必须克服细胞凋亡和衰老机制的约束, 实现永生^[3]。此外, 启动肿瘤细胞的衰老程序, 明显地提高抗肿瘤药物环磷酰胺的疗效^[4]。抗肿瘤药物在低浓度下引起肿瘤细胞衰老, 是一种重要的抑瘤机制, 其中, 以临床常规使用的抗肿瘤药物多柔比星 (doxorubicin, DOX) 研究较多, DOX 可以诱导多数肿瘤细胞出现明显的衰老特征^[5, 6]。细胞体积膨大、扁平铺展、细胞内颗粒增加, 衰老特异的 β -半乳糖苷酶阳性。衰老标志分子 P21 表达明显升高。本研究采用 DOX 作为阳性对照药, 观察了 BON 诱导肿瘤细胞衰老的作用。

材料与方 法

试剂与抗体 胎牛血清购自天津灏海生物制品科技有限公司。二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、碘化丙锭 (propidium iodide, PI)、RNA 酶、PMSF、MTT、TEMED 及亮抑肽酶 (leupeptin) 均购自美国 Sigma 公司。蛋白酶抑制剂 (aprotinin) 购自瑞士 Roche 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠 (SDS)、Tris 碱、过硫酸铵和 Tween-20 均为美国 Amresco 公司生产。彩色预染蛋白 Marker 为美国 BIO-RAD 生产。PVDF 膜由美国 Millipore 公司提供。荧光探针 H₂DFFDA 和 1640 培养基为美国 Invitrogen 生产。鼠抗 p53 抗体、鼠抗 p21 抗体、兔抗 Actin 抗体以及兔抗 PARP 抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。博宁霉素为发酵分离^[1], 纯度大于 85%。

细胞培养 人口腔上皮癌 KB 细胞和人非小细胞肺癌 A549 细胞均来源于美国模式生物保藏中心 (ATCC)。细胞培养在添加 10%胎牛血清、100 u·mL⁻¹青霉素和 100 u·mL⁻¹链霉素的 1640 培养液中, 培养条件为 5% CO₂、37 °C。

细胞增殖抑制的测定 采用 MTT 法进行检测。取对数生长期细胞, 消化后计数, 按细胞数 4×10³/孔接种于 96 孔培养板。24 h 后, 用不同浓度的药物处理细胞, 每个浓度设 3 个平行孔。药物处理 72 h 后, 每孔加入 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 100 μL , 37 °C 孵育 2 h 后小心吸除培养液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 震荡 10 min 混匀, 用酶标仪测定 570 nm 吸收度 (*A*) 值。将各测试孔的 *A* 值减去本底 *A* 值 (完全培养基加 MTT, 无细胞), 根据各平行孔的 *A* 值计算 $\bar{x} \pm s$ 。细胞存活率 % = (加药细胞 *A* - 本底 *A*) / (对照细胞 *A* - 本底 *A*) ×

100%。绘制抑制曲线, 实验重复 3 次, 计算 IC₅₀ 值。

克隆形成率实验 将对数生长期细胞以细胞数 100/孔接种到 48 孔板中, 培养 24 h 后, 给予不同浓度的药物 (0.000 2、0.000 5、0.001、0.002、0.005、0.01、0.02 及 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每个浓度平行做 3 个孔。继续培养 7 d, 终止培养。弃去培养液, 用 PBS 洗 2 次。用甲醇固定 10 min, 弃甲醇, 加 0.02%氨基黑溶液染色 10 min, 然后洗去染液。在显微镜下, 计数大于 50 个细胞的克隆数, 实验重复 3 次。然后按公式计算克隆形成率: 克隆形成率 (%) = (克隆数/对照细胞克隆数)×100%。

细胞衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色实验 (senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -gal) 按照文献^[7]方法进行。取对数生长期的细胞以细胞数 4×10⁴/孔接种于 12 孔培养板, 24 h 后用药处理, 继续培养至 72 h, 换新鲜的培养基, 继续培养到 120 h 后检测衰老细胞。用 PBS 洗涤 3 次, 然后用固定液 (3%甲醛+2%戊醛) 室温固定 5 min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 然后每孔加 X-gal 染色液在 37 °C、无 CO₂ 条件下染色 16~24 h。在倒置显微镜下统计绿色 (加黄色滤光片) 的 β -半乳糖苷酶阳性细胞, 细胞总数为 300 个, 结果以阳性细胞数/总细胞数×100%表示。

流式细胞术检测细胞周期的变化 取对数生长期的细胞, 以细胞数 3×10⁵/孔接种于 6 孔板中, 24 h 后加药, 继续处理 24 h 后, 消化细胞, 离心收集细胞。然后缓缓加入 1 mL 预冷的 70%乙醇, 4 °C 固定过夜。染色前细胞用 PBS 洗 2 遍, 细胞重悬于含 RNase A 酶 (终质量浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 PBS (100 μL) 中, 37 °C 孵育 30 min 消化 RNA, 然后再加 PI 染液, 终质量浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 室温避光染色 1 h。最后, 细胞经 300 目尼龙网过滤后, 用流式细胞仪测定 PI 荧光强度, MODFIT 软件分析细胞周期变化。

流式细胞术测定细胞内活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的变化 取对数生长期的细胞, 以细胞数 4×10⁵/孔接种于 6 孔板中, 24 h 后用药处理细胞 24 h。吸弃各孔中含有药物的培养基, 用 PBS 洗 2 遍, 加活性氧自由基荧光探针 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂DFFDA, 在 37 °C 避光染色 60 min。PBS 洗 1 次后, 消化收集细胞, 经 300 目尼龙网过滤后, 用流式细胞仪检测荧光强度。

Western blotting 检测蛋白的表达 收集经药物处理后的细胞, 加入细胞裂解液 (25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5、150 mmol·L⁻¹氯化钠、10%甘油、10 mmol·L⁻¹磷酸甘油钠、2 mmol·L⁻¹ EDTA 和 0.5%

Triton X-100, 使用前加入 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白酶抑制剂 PMSF、 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ aprotinin 和 leupeptin), 在冰上裂解 30 min, 于 4°C 、 $12\ 000 \times g$ 离心 15 min, 取上清液。蛋白浓度测定采用 Bradford 法。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 常规一抗和二抗孵育后, 采用 ECL plus 超敏免疫印迹检测试剂 (Amersham 公司) 检测蛋白表达, 化学发光成像系统 ChemiImager 5500 (Alpha Innotech 公司) 捕获图像。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, IC_{50} 值均为 3 次实验结果的平均值。

结果

1 BON 明显抑制 KB 细胞和 A549 细胞的增殖

使用 MTT 法检测 BON 对 KB 和 A549 细胞增殖的影响, KB 细胞对 BON 很敏感, 较低浓度 ($0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) BON 的抑制率达到 19.8% (图 1A), IC_{50} 值为 $0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。DOX 对 KB 细胞的作用比 BON 略弱, IC_{50} 值为 $0.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。BON 和 DOX 对 A549 细胞的抑制作用特点正好与对 KB 细胞的作用相反, A549 细胞对 DOX 更为敏感, IC_{50} 值为 $0.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, BON 对 A549 细胞作用的 IC_{50} 值为 $3.38 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1B)。值得注意的是, 在一定的药物浓度范围内, 如 $0.1 \sim 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 处理 KB 细胞时, 药物浓度相差 10 倍, 但抑制率仅相差不足 15%, 可以观察到许多扁平铺展、体积膨大的细胞。

2 BON 抑制肿瘤细胞的克隆形成

为了更好地评价 BON 的作用特征, 追踪体积膨大细胞的命运, 进行了克隆形成率实验。虽然 BON 和 DOX 的抑制克隆形成的作用趋势与 MTT 的结果一致 (表 1), 但作用效果更为明显, 达到 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平。以对 KB 细胞的作用为例: 低浓度 ($0.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) BON 的抑制率为 5.0%, $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 的抑制率达到了 91.5%, 高浓度 ($20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 BON 处理组已经看不到细胞克隆。另外, 还观察到经过药物处理的细胞体积膨大, 不过这些膨大的细胞不能形成克隆。

3 BON 诱导 KB 细胞和 A549 细胞衰老

上述实验结果表明: 有不少经过药物处理的细胞体积膨大、扁平铺展及细胞内颗粒增加, 这些特征与衰老细胞相似。因此, 采用衰老特异的 SA- β -gal 染色实验予以证实。在倒置显微镜下 (目镜 25 倍), 对照组几乎观察不到染为蓝色的 β -半乳糖苷酶阳性细胞; BON 在较低的浓度即可诱导 KB 细胞衰老 (图 2)。

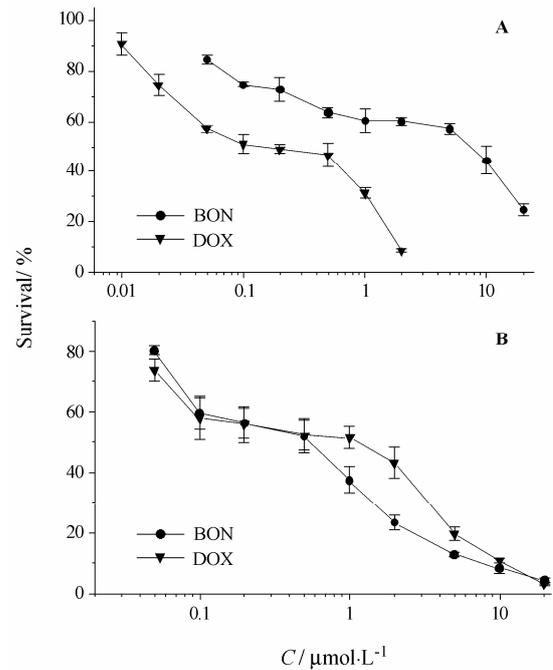


Figure 1 The growth-inhibitory effects of BON (boningmycin) and DOX (doxorubicin) on KB and A549 cells. A: KB cells; B: A549 cells. The cell viabilities were determined by MTT assay after treatment with drugs for 3 days. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ from three separated experiments

Table 1 The clonal formations of KB and A549 cells inhibited by BON and DOX

Cell line	BON ($\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	DOX ($\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
KB	1.60 ± 0.59	5.78 ± 0.92
A549	5.01 ± 0.51	2.88 ± 0.79

The cells at logarithmic growth phase were grown in a 48 well plate with 100 per well for 24 h and treated with the drugs. The number of the clone with more than 50 cells was counted after a week

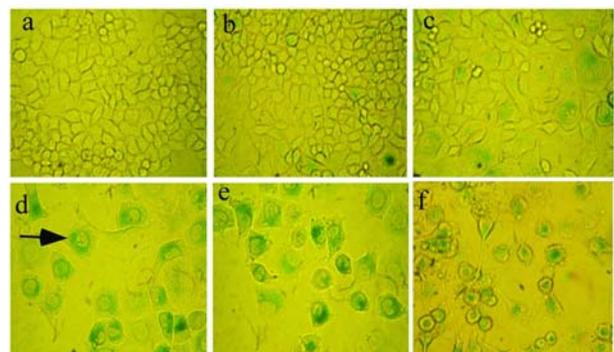


Figure 2 The cellular senescence of KB cells induced by BON and DOX for 3 days and cultivated continuously for 2 days. The senescent KB cells after exposure to BON. a: Control group; b, c, d, e: 0.01 , 0.02 , 0.05 , and $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON group, respectively; f: $0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX. The arrow shows the blue senescent cell

统计药物处理后的阳性细胞数, 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 处理后染色阳性细胞的百分率为 95.0%, 而 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 处理后染色阳性细胞的百分率为 72.9% (图 3A)。BON 也能够诱导 A549 细胞衰老, 出现明显的 SA- β -gal 阳性细胞 (形态特征的结果未显示)。不过, 所需的药物浓度较高, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 作用后染色阳性细胞的百分率为 50.0%, 而 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 处理后染色阳性细胞的百分率为 44.3% (图 3B)。

4 BON 阻断 KB 和 A549 细胞于 G₂/M 期

用不同浓度 BON 处理 KB 细胞 24 h 后, 用流式细胞仪检测 BON 对细胞周期分布的影响, 并与相同情况下 DOX 对细胞周期的阻断作用进行比较。结果表明: KB 细胞对 BON 非常敏感, 较低浓度 (0.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 就具有一定的作用, 使阻断在 G₂/M 期的细胞数增加了 25.9%, 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 使阻断在 G₂/M 期的细胞增加了 52.6%。相同情况下 DOX 对细胞周期阻断的作用略弱, 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用后使阻断在 G₂/M 期的细胞增加了 45.7% (图 4A)。

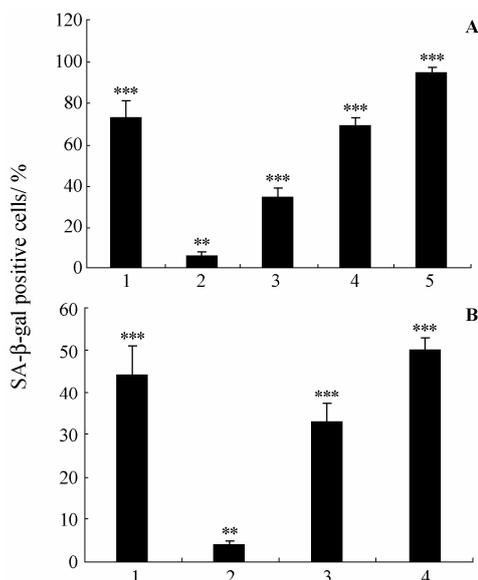


Figure 3 A: The percentage of cellular senescent KB cells induced by 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX (1), and 0.01 (2), 0.02 (3), 0.05 (4), and 0.1 (5) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON, respectively. B: The percentage of cellular senescent A549 cells induced by 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX (1), and 0.1 (2), 0.5 (3), and 1 (4) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON group, respectively. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group (0)

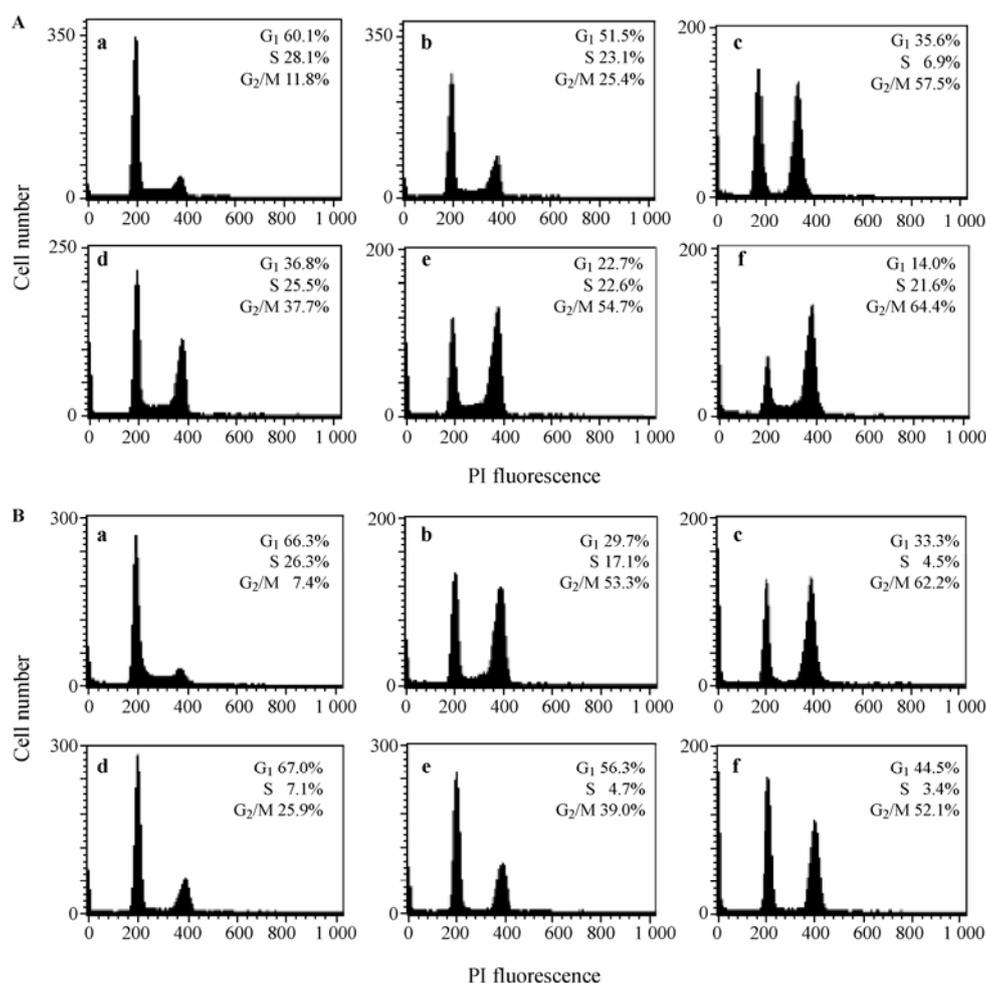


Figure 4 A: Effect of BON and DOX on cell cycle distribution of KB cells. Treated with the drugs for 24 h. a: Control group; b, c: 0.05 and 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX group; d, e, f: 0.02, 0.05, and 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON group, respectively. B: Effect of BON and DOX on cell cycle distribution of A549 cells. a: Control group; b, c: 0.1 and 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX group; d, e, f: 1, 2, and 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON group, respectively

与 KB 细胞不同, BON 在较高的浓度下才对 A549 细胞的周期有影响。1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 使阻断在 G₂/M 期的细胞数仅增加了 18.5%, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 作用组为 44.7%。而 DOX 对 A549 细胞的作用与 KB 细胞较为接近, 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 使阻断在 G₂/M 期的细胞数增加了 45.9% (图 4B)。

5 BON 增加 KB 和 A549 细胞中的 ROS 水平

通过流式细胞仪检测药物作用后细胞内 ROS 水平的变化。用不同浓度的 BON 和 DOX 作用 KB 细胞 24 h, 发现随着药物浓度的增加, 细胞内 ROS 逐渐增多, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 使细胞内 ROS 水平升高 1.4 倍, DOX 的作用强度与其接近 (图 5)。BON 对 A549 细胞的作用较弱, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON 使细胞内 ROS 水平升高 1.3 倍, 而 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 就使细胞内 ROS 水平升高近 1.3 倍 (结果未显示)。

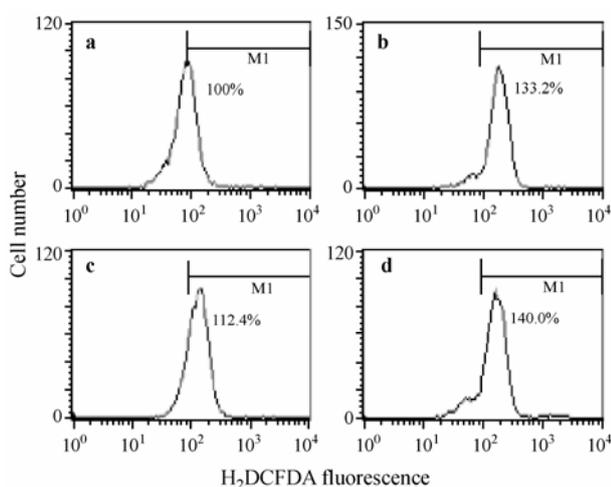


Figure 5 The generation of ROS in KB cells induced by BON and DOX. KB cells were treated for 24 h with 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX (b), and 0.1 (c) and 1 (d) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON, respectively. a: Control group

6 BON 引起 KB 细胞衰老的蛋白表达变化

为了深入研究 BON 诱导 KB 细胞衰老过程中的分子变化, 采用低浓度 (0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) BON 处理细胞, 收集不同时间样品, Western blotting 检测衰老通路相关蛋白的表达变化 (图 6)。衰老标志蛋白 P21 蛋白从 48 h 开始表达, 到 120 h 表达水平明显升高; P53 蛋白只是在 24 h 短暂表达增加外, 基本保持不变。与细胞凋亡不同的是, 细胞衰老过程中不会激活凋亡通路。结果显示, 在 72 h 出现少量 PARP 切割, 说明部分细胞发生了凋亡, 而其他时间点没有出现切割的片段。

7 高浓度的 BON 引起 KB 细胞凋亡

使用较高浓度的 BON 处理细胞 48 h 后, Western

blotting 检测蛋白的表达变化。随着浓度逐渐增加, 凋亡标志蛋白 PARP 的切割更加明显, 说明高浓度的 BON 处理后激活了凋亡通路。另外, P53 蛋白的表达也随着 BON 浓度增加而增加 (图 7)。

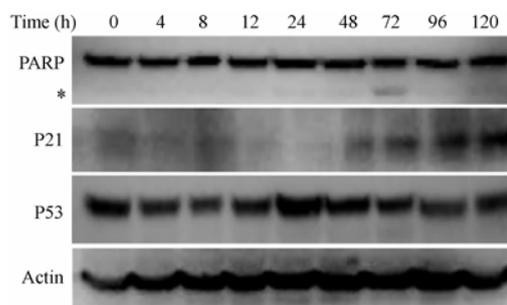


Figure 6 The protein expression of senescent KB cells induced by BON. The KB cells were collected at different time points after exposure to 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BON. The changes of senescence-related protein expression were detected by Western blotting. The asterisk indicates the cleavage fragment of PARP protein

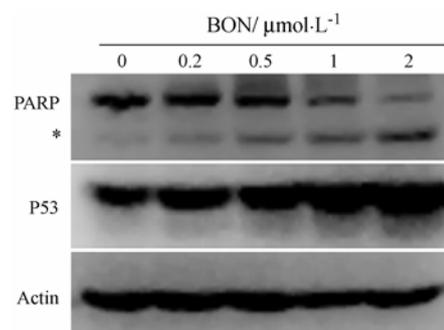


Figure 7 Activation of apoptotic pathway in the KB cells treated with different concentrations of BON. The cells were exposed to different concentrations of BON for 48 h and then collected. The changes of PARP and P53 were detected by Western blotting. The asterisk indicates the cleavage fragment of PARP protein

讨论

本研究通过多种方法证明: BON 除了引起肿瘤细胞凋亡外, 也能引起肿瘤细胞衰老, 本文的结果为该药的进一步开发建立了良好的药理基础。根据目前的研究, 肿瘤细胞的死亡方式可分为多种, 凋亡、自噬、衰老等^[8]; 细胞死亡方式可以转换。例如: 用 DOX 处理人神经母细胞瘤 SKN-CH 细胞引起凋亡时, 用凋亡的特异抑制剂 Q-VD-OPH 抑制凋亡后, 细胞启动衰老信号通路, 出现细胞衰老特征, SA- β -gal 阳性率明显增加^[9]。

在本研究中, MTT 法检测 BON 的抑制率在一定的浓度范围内不明显, 其原因是衰老细胞是活细胞, 能进行代谢活动; 而 MTT 法检测的原理是活细胞线

粒体内的氧化还原酶还原 MTT, 生成蓝紫色结晶物沉积在细胞中。因此, 对于抗肿瘤药物作用效果检测时, 需要考虑由于衰老细胞的存在而影响 MTT 实验结果的准确性问题。虽然克隆形成率的方法比较费时, 但明显地比 MTT 法准确和灵敏。

为了更准确地描述 BON 引起衰老的变化, 作者没有采用 BLM 作为阳性对照药, 而是选用了 DOX。与 DOX 作用相似, BLM 也能引起细胞衰老。BLM 处理正常人成纤维 NHF-3、MRC-5 细胞后出现衰老表型^[10]。使用 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BLM 处理人小细胞肺癌 A549 细胞 5 d, 细胞体积增大 3 倍, 80% 的细胞为 SA- β -gal 阳性, P21 蛋白的表达明显增加^[11]。本文的结果与 BLM 的作用特征一致。近几年的大量研究表明, 过氧化物引起细胞的损伤是细胞衰老的原因^[12, 13]。BON 不仅引起 ROS 升高, 也能造成 DNA 断裂而会引起细胞衰老或凋亡。这种作用特征与 DOX 相似, DOX 也能引起 ROS 的升高, 导致凋亡和细胞衰老^[14]。经过较长时间的追踪研究发现, DOX 诱导的衰老细胞的最终命运是发生凋亡^[6], 这也是本文在 BON 处理 72 h 后观察到少量凋亡细胞的原因 (图 6)。在 BON 诱导细胞衰老过程中, P53 蛋白只是瞬时的表达升高, 该实验结果与过氧化氢引起正常细胞衰老是一致的^[15]。

细胞衰老作为抑制肿瘤发生的机制, 在 2005 年得到了结论性的证明^[16-18]。另外, 细胞衰老与癌基因的作用密切相关, 例如: *ras* 基因引起很多肿瘤的发生, 是抗肿瘤药物的靶点^[19]。不过, *ras* 基因转染到正常细胞时, 导致正常细胞衰老而不是转变成肿瘤细胞。对于肿瘤细胞衰老机制的研究, 有助于开发新型的抗肿瘤药物。

References

- [1] Xu HZ, Yu L, Zhang XR, et al. Isolation, purification and structure determination of boningmycin (Z-893) [J]. *Chin J Antibio* (中国抗生素杂志), 2003, 28: 465-467.
- [2] Qi CM, Xu HZ, Chen RX. The efficacy observation of boningmycin cream on cow papilloma induced by cow papilloma virus [J]. *Chin J Antibio* (中国抗生素杂志), 2003, 28: 568-570.
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100: 57-70.
- [4] Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy [J]. *Cell*, 2002, 109: 335-346.
- [5] Chang BD, Xuan Y, Broude EV, et al. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs [J]. *Oncogene*, 1999, 18: 4808-4818.
- [6] Eom YW, Kim MA, Park SS, et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype [J]. *Oncogene*, 2005, 24: 4765-4777.
- [7] He QY, Liang YY, Wang DS, et al. Characteristics of mitotic cell death induced by enediyne antibiotic lidamycin in human epithelial tumor cells [J]. *Int J Oncol*, 2002, 20: 261-266.
- [8] Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 592-603.
- [9] Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, et al. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 2805-2811.
- [10] Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts [J]. *Oncogene*, 1998, 16: 1113-1123.
- [11] Aoshiba K, Tsuji T, Nagai A. Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells [J]. *Eur Respir J*, 2003, 22: 436-443.
- [12] Hou Y, Bao XQ, Liu GT. The role of vitagene in aging and Alzheimer's disease and relevant advances of pharmacological study [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2009, 44: 825-832.
- [13] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging [J]. *Cell*, 2005, 120: 483-495.
- [14] Song YS, Lee BY, Hwang ES. Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis [J]. *Mech Age Dev*, 2005, 126: 580-590.
- [15] Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, et al. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G₁ arrest but not cell replication [J]. *Biochem J*, 1998, 332: 43-50.
- [16] Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi [J]. *Nature*, 2005, 436: 720-724.
- [17] Campisi J. Suppressing cancer: the importance of being senescent [J]. *Science*, 2005, 309: 886-887.
- [18] Braig M, Lee S, Loddenkemper C, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development [J]. *Nature*, 2005, 436: 660-665.
- [19] Zhu YJ, Jiang FC. Progress in the study of antitumor drug targeting on the Ras signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2009, 44: 1-10.