

槟榔碱对细胞增殖、凋亡和炎症反应影响的研究进展

马永超, 皇甫超申, 刘彬* (河南大学神经生物学研究所, 河南 开封 475004)

摘要:目的与方法 综合整理并介绍槟榔碱及其衍生物对细胞增殖和凋亡影响的研究历程及新进展。结果与结论 槟榔碱及其衍生物通过产生亚硝胺类和活性氧族的广泛作用,对细胞多个靶点的进攻最终产生系统毒性作用,进一步抑制细胞增殖、阻断细胞周期、诱导细胞的凋亡。通过调节多种具有重要作用的细胞因子的表达,影响机体免疫功能并导致炎症反应的发生。对其结构中的某些基团进行修饰可能导致其生物学效应发生改变,为抗肿瘤新药的开发提供新的思路和途径。

关键词:槟榔碱;细胞增殖;细胞凋亡;炎症反应

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2009)02-0115-04

Effects of Arecoline on Proliferation, Apoptosis and Inflammation Response of Cells

MA Yongchao, HUANGFU Chaoshen, LIU Bin* (Institute of Neurobiology, Henan University, Kaifeng 475004, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE and METHODS To review and introduce the research progress of the effect of arecoline and its derivative on cell proliferation and apoptosis. **METHODS and CONCLUSION** Through the action of nitrosamine and reactive oxygen species, arecoline and its derivative attack multiple target of cell to finally generate systemic toxicity resulting in inhibiting cell proliferation, inducing the cell cycle arrest and cell apoptosis. Arecoline and its derivative could influence the function of immune system with regulating the expression of the important cytokines and resulting in inflammation response. If some groups of arecoline's structure were modified, its biology action would be changed and the arecoline derivatives were possible to be developed to be the anti-tumour drugs.

KEY WORDS: arecoline; cell proliferation; apoptosis; inflammation response

20 世纪初, Fells 观察咀嚼槟榔等习惯与口腔癌发病的关系时,发现印度西南海岸有咀嚼槟榔习惯居民的口腔癌发病率特别高。此后的大量流行病学调查引发了一系列的争论,多数研究结果认为造成口腔癌发病的主要原因并不是咀嚼槟榔的单一因素,而是由于人们同时拥有的抽烟或咀嚼烟草制品的习惯,咀嚼槟榔只不过是烟草等致癌物的致癌具有促进作用。少数研究结果显示,咀嚼槟榔可致癌,尽管证据不够充分,但引发了人们对槟榔及其槟榔碱的生物活性和药理作用机制研究的兴趣^[1]。

槟榔碱 (arecoline) 是槟榔中主要的有效成分之一。一般认为,槟榔提取物诱导细胞 DNA 断裂和不规则 DNA 合成等基因毒性作用可能与槟榔碱的作用有关,但槟榔碱的细胞毒作用及导致基因损伤的机制仍不清楚,尤其在细胞增殖调节方面,不同实验室对不同组织和不同细胞系的研究结果有较大差别。

1 槟榔碱的致基因损伤作用。

为了解槟榔及其重要活性成分槟榔碱对染色体和基因的损伤作用及其作用机制,早在 20 世纪 80 年代开始,人们就利用细菌、各种细胞系和动物实验展开研究工作。Shirname 等^[2]应用沙门菌属的 TA100, TA1535, TA98 和 TA1538 四个 typhimurium 测试株试验,发现槟榔碱和其代谢物槟榔次碱 (arecaidine) 对上述四菌株均具有明显的致突变作用。大量体外细胞试验也证明了槟榔碱的致基因损伤作用。多项利用中国仓鼠卵巢瘤 (CHO) 细胞株实验表明单独使用槟榔碱能引起细胞染色体位移,姐妹染色单体交联。但如果与尼古丁等强致突变剂同时作用于细胞,槟榔碱则可显著的促进致突变剂的致突变作用^[3]。用喉癌 Hep2 和齿龈角化细胞试验也得到类似结果,但用不同溶剂提取槟榔不同成分对细胞的基因毒性作用差别较大,说明不同槟榔成分可能通过不同机制和途径发挥作用,其中槟榔碱还有显著的抑制细胞 DNA 合成和细胞增殖抑制

作用^[4]。小鼠肾细胞体外实验证明槟榔水提取物能诱导 DNA 断裂,并在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度剂量可促进细胞分裂,而在 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时则显细胞毒作用,与单独应用槟榔碱相比较,槟榔水提取物的致癌作用远大于槟榔碱的作用,提示除槟榔碱之外,槟榔中可能还有其它致基因损伤的物质存在^[5]。动物实验(10~180 d)显示,鼠类长期服用槟榔制品可以促进包括苯并芘在内的多种致癌物质的致突变作用,尤其是口腔和肝脏肿瘤以及癌前病变的发生^[6]。通过对具有咀嚼槟榔习惯的口腔黏膜白斑症、口腔黏膜下层纤维化和口腔癌病人的观察和研究,发现槟榔中的某些成分及其代谢物可能改变 DNA、蛋白质和脂类的结构,进而产生某些抗原性产物刺激机体前列腺素、TNF- α 和白介素等物质产生,导致 T-淋巴细胞减少和亚型的改变,这也许能帮助人们了解咀嚼槟榔导致口腔疾病的免疫病理基础和制定相应的治疗策略^[7-8]。

槟榔碱致基因损伤的机制众说纷纭,目前众多研究者多集中在槟榔碱或槟榔提取物导致的亚硝胺类物质的作用和细胞内活性氧产生积聚两个方面。

Wenke 等^[9]利用动物模型首先观察到咀嚼槟榔可导致亚硝胺类致癌物的产生,并发现在槟榔咀嚼者唾液中亚硝胺等致癌物的浓度可达 $2.2 \sim 348 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,据此提出这种现象可能涉及使用槟榔和烟草的致癌机制。用培养人的口腔黏膜上皮细胞和喉癌 Hep2 细胞实验,均观察到槟榔提取物和槟榔碱可降低细胞的存活率并抑制细胞增殖,这种作用有剂量依赖性。究其原因,研究者发现槟榔碱等槟榔中活性物质的亚硝基衍生物能与 DNA 相互作用,导致 DNA 单链断裂、DNA-蛋白质交联并通过耗竭细胞内低分子量硫醇,影响膜的稳定性,提示槟榔碱致基因损伤的机制可能与亚硝胺类致癌物的产生有关^[10]。在印度,调查 72 例与使用槟榔和烟草相关的口腔鳞状上皮癌病人癌组织的 p53 基因突变情况,也提示可能是来自槟榔或烟草的亚硝胺类物质及其基因的加合物造成 p53 突变而导致肿瘤发生^[11]。因此,槟榔碱类物质亚硝基化产生的几种亚硝胺类物质,具有致突变作用和基因毒作用,并已证明可造成实验动物的肿瘤发生。

1988 年,加拿大不列颠哥伦比亚癌症研究中心的 Stich HF 课题组给印度 Kerala 地区的患有口腔黏膜白斑症的渔民提供 β -胡萝卜素和维生素 A。在不改变病人咀嚼烟草和槟榔习惯的条件下,观察口服 β -胡萝卜素和维生素 A 对病情进展的影响。结果显

示,服用 β -胡萝卜素($180 \text{ mg} \cdot \text{周}^{-1}$)和维生素 A($10 \text{ 万 u} \cdot \text{周}^{-1}$)6 个月可显著减轻口腔黏膜白斑症并抑制新的口腔黏膜白斑产生。由此提出咀嚼烟草或槟榔造成的口腔黏膜病变可能是大量活性氧族(reactive oxygen species, ROS)产生所致^[12]。给 swiss albino 鼠的腹腔注射槟榔碱(10~30 d)也可显著增加鼠肝谷胱甘肽 s-转移酶(GST)、细胞色素 b5、细胞色素 P-450 和丙二醛的含量,同时鼠肝巯基(-SH)含量降低,槟榔碱对鼠肝生物转化酶和底物系统的调节作用可能参与了其致突变作用的过程。由于咀嚼槟榔可导致口腔黏膜纤维化和牙周病的发生,许多实验室利用培养口腔黏膜成纤维细胞或口腔牙龈成纤维细胞作为研究工具,系统研究槟榔碱及其衍生物的细胞毒性作用和基因毒性作用的机制。用槟榔提取物或槟榔碱处理细胞后可降低细胞生存能力并抑制细胞增殖、附着和迁移能力,这种作用与细胞内 GSH 的大量消耗有关^[13]。用 GSH、半胱氨酸、香草甜素和 N-乙酰半胱氨酸(GSH 合成前体)均可有效防止槟榔碱的细胞毒作用,而用 GSH 合成抑制剂丁硫堇(buthionine sulfoximine)或 GSH 消耗剂二乙基马来酸(diethylmaleate)均可增强槟榔碱的细胞毒作用^[14]。有人认为槟榔碱耗竭 GSH 的作用可能是由于其显著降低 GST 活性所致,并不涉及氧自由基的攻击。槟榔碱不增加细胞的脂质过氧化反应,用甘露醇、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶(SOD)也不能预防槟榔碱对口腔黏膜成纤维细胞的损伤作用^[15]。但在小鼠骨髓细胞和人外周血淋巴细胞实验中,SOD 或缺氧条件下则能减少槟榔碱造成的染色体畸变现象^[16]。另外,在探究 GSH 耗竭能否造成基因损伤或基因突变的原因时,各个实验室或不同细胞系的实验结果相距甚远。口腔黏膜成纤维细胞的实验结果仅显示出细胞毒作用而没有基因毒作用;但在鼠骨髓细胞,槟榔碱可诱导与内源性 GSH 有关的染色体畸变。鉴于槟榔碱通过活性氧族作用进一步还可能影响细胞周期进程、线粒体功能^[17]、IL-6^[18]或 COX-2^[19]的表达,提示槟榔碱通过对细胞多个靶点的进攻最终产生系统毒性作用^[20]。

2 槟榔碱与细胞增殖和凋亡的关系

流行病学资料证明,槟榔提取物和槟榔碱与口腔癌的发生有关^[1],这使研究者对槟榔碱及其衍生物与细胞增殖的关系倍感关注。1986 年,Harvey 等^[21]报道了用槟榔中的生物碱对口腔黏膜成纤维细胞增殖作用的实验结果,发现槟榔碱和槟榔次碱均可刺激细胞胶原合成和增殖,尤以槟榔次碱效果明显。但以后

的实验结果绝大多数是则显示槟榔碱及其衍生物有显著抑制细胞增殖的作用,仅有个别实验室发现低浓度 ($<100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 槟榔碱及其衍生物能促进细胞增殖。细胞水平实验多应用口腔黏膜或齿龈成纤维细胞,槟榔碱浓度高于 $10 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时大多可抑制细胞增殖,低于 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 一般不具有细胞增殖抑制作用^[22]。Chang YC 等注意到,当培养液中槟榔碱浓度高于 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,人的口腔齿龈成纤维细胞增殖受到抑制,细胞由长梭形变圆且相互分离。细胞中乳酸脱氢酶(LDH)释放入培养液增多。当槟榔碱浓度高于 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,大量细胞开始从培养瓶底部脱落,悬浮在培养液中^[23]。

一些学者和临床医生试图通过调查病人标本癌基因或抑癌基因的表达、突变或缺失变化来寻找槟榔致病作用的机制。对我国台湾地区 36 例与咀嚼槟榔相关的口腔鳞状细胞癌患者 p53 基因突变情况的调查显示,仅有 8 例(22%)病人标本的 p53 外显子发生突变,远低于世界范围的口腔黏膜细胞癌 46% 的 p53 突变率,提示台湾地区槟榔致病作用可能与 p53 基因突变关系不大^[13]。在印度的 72 例口腔癌病人的调查也显示出类似的 p53 突变率(21%)。但在斯里兰卡 23 例口腔癌的调查中,p53 的外显子的突变或缺失率可达 43.5%,而且突变位置多集中在第五个外显子^[24]。上述矛盾的研究结果也许受各地处理槟榔方式的差异所致,但在斯里兰卡人们除咀嚼槟榔外,大多同时咀嚼烟草制品,烟草中所含的其它致突变物质是不容忽视的。另有报道槟榔碱可诱导 c-jun 和 IGF-1 的 mRNA 表达^[25]。这也进一步印证了槟榔碱或槟榔提取物导致的亚硝胺类和细胞内活性氧对细胞多个基因靶点进攻产生的作用。槟榔碱及其衍生物对细胞增殖的抑制作用也体现到使细胞增殖周期延长或阻断细胞周期的作用。大剂量槟榔碱可导致脐带静脉内皮细胞和人齿龈角化细胞的 G_2/M 期阻断,原因是槟榔碱可诱导 p21 蛋白表达水平,同时降低 CyclinB₁ 和 cdc2 蛋白表达^[26]。增大槟榔碱的浓度甚至可以诱导细胞的凋亡,这已在人口腔鳞状细胞癌、脾淋巴细胞和 KB 上皮细胞实验中得到证明^[27]。

3 槟榔碱与细胞免疫和炎症反应的关系

长期以来,许多人认为咀嚼槟榔导致口腔癌发病率增高可能是槟榔碱致突变所造成的细胞过度增殖所致。但上述大量实验结果则证明槟榔碱不但不刺激细胞增殖,还抑制细胞增殖、阻断细胞周期并诱导细胞凋亡。解释这种看似矛盾的现象需要从其它

角度研究槟榔碱的作用机制。Selvan 课题组^[28]用了近五年的时间,系统研究了槟榔碱对小鼠免疫系统的影响。首先发现皮下注射槟榔碱可导致小鼠胸腺明显缩小,脾脏、肠系膜淋巴结和肝脏的重量也有减轻,细胞耗氧量迅速降低。其后的实验证明槟榔碱能抑制小鼠迟发型变态反应、影响淋巴细胞的功能,明显降低 B 细胞介导的免疫反应,影响抗体的活性。槟榔碱作用于周围血的单个核细胞,使其产生的细胞因子如 IL-1、IL-2、TNF- α 和 TGF- β 显著降低^[29-30]。Wen 等^[31]用槟榔碱作用于 BALB/c 鼠四周,发现小鼠免疫各相关指数都受到了不同程度的抑制,且这种抑制作用与淋巴细胞 M 型胆碱能受体有关。槟榔碱对免疫系统的抑制作用已被许多实验证实,但这种抑制作用与槟榔导致的口腔疾病乃至口腔肿瘤发生的关系仍难以确定,需要进一步研究。Lin 等^[32]用高 ($800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、低浓度 ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的槟榔次碱喂食已用致癌剂 DMBA 处理过 8 周的仓鼠(Syrian golden hamsters),结果 4 周后所有的仓鼠均有肿瘤发生。单纯使用高浓度槟榔次碱,即使浓度达到 $3000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,也不能造成肿瘤产生,仅发现有过度角化症和炎症表现。异常和持续的炎症在组织纤维化进程和癌前病变中发挥重要作用。在对口腔黏膜纤维化病人标本和相应细胞学研究表明,槟榔碱能显著提高细胞内炎症因子如 IL-8、COX-2、PAI-1 和 IL-6 的产生^[33]。很显然,长期接触槟榔碱所导致的炎症反应极有可能在口腔黏膜癌前病变和癌症发生的漫长演变过程发挥重要作用。

4 结语

槟榔碱及其衍生物通过产生亚硝胺类和活性氧族的广泛作用,对细胞多个靶点的进攻最终产生系统毒性作用,进一步抑制细胞增殖、阻断细胞周期、诱导细胞的凋亡。通过调节多种具有重要作用的细胞因子的表达,影响机体免疫功能并导致炎症反应的发生。一般认为,槟榔碱及其衍生物在细胞增殖方面的作用可能与其结构的某些基团有关,对其结构中的某些基团进行修饰可能导致其生物学效应发生改变,这将为抗肿瘤新药的开发提供新的思路和途径。

REFERENCES

- [1] BOYLE P, MACFARLANE GJ, MAISONNEUVE P, et al. Epidemiology of mouth cancer in 1989: a review[J]. J R Soc Med, 1990, 83(11): 724-730.
- [2] SHIRNAME L P, MENON M M, NAIR J, et al. Correlation of mutagenicity and tumorigenicity of betel quid and its ingredients

- [J]. *Nutr Cancer*, 1983, 5(2): 87-91.
- [3] TRIVEDI A H, DAVE B J, ADHVARYU S C. Genotoxic effects of nicotine in combination with arecoline on CHO cells[J]. *Cancer Lett*, 1993, 74(1-2): 105-110.
 - [4] JENG J H, HAHN L J, LIN B R, et al. Effects of areca nut, inflorescence piper betle extracts and arecoline on cytotoxicity, total and unscheduled DNA synthesis in cultured gingival keratinocytes[J]. *J Oral Pathol Med*, 1999, 28(2): 64-71.
 - [5] WARY K K, SHARAN R N. J Aqueous extract of betel-nut of north-east India induces DNA-strand breaks and enhances rate of cell proliferation *in vitro*. Effects of betel-nut extract *in vitro* [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 1988, 114(6): 579-582.
 - [6] TANAKA T, KUNIYASU T, SHIMA H, et al. Carcinogenicity of betel quid. III. Enhancement of 4-nitroquinoline-1-oxide- and N-2-fluorenylacetamide-induced carcinogenesis in rats by subsequent administration of betel nut[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1986, 77(3): 777-781.
 - [7] ZIENOLDDIN S, AGUELON A M, MIRONOV N, et al. Genomic instability in oral squamous cell carcinoma: relationship to betel-quid chewing[J]. *Oral Oncol*, 2004, 40(3): 298-303.
 - [8] CHANG M C, CHIANG C P, LIN C L, et al. Cell-mediated immunity and head and neck cancer: with special emphasis on betel quid chewing habit[J]. *Oral Oncol*, 2005, 41(8): 757-775.
 - [9] WENKE G, BRUNNEMANN KD, HOFFMANN D, et al. A study of betel quid carcinogenesis. IV. Analysis of the saliva of betel chewers: a preliminary report [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 1984, 108(1): 110-113.
 - [10] WARY K K, SHARAN R N. Cytotoxic and cytostatic effects of arecoline and sodium nitrite on human cells *in vitro*. [J] *Int J Cancer*, 1991, 47(3): 396-400.
 - [11] KANNAN K, MUNIRAJAN A K, KRISHNAMURTHY J, et al. Low incidence of p53 mutations in betel quid and tobacco chewing-associated oral squamous carcinoma from India[J]. *Int J Oncol*, 1999, 5(6): 1133-1136.
 - [12] STICH H F, ANDERS F. The involvement of reactive oxygen species in oral cancers of betel quid/tobacco chewers[J]. *Mutat Res*, 1989, 214(1): 47-61.
 - [13] WONG Y K, LIU T Y, CHANG K W, et al. p53 alterations in betel quid- and tobacco-associated oral squamous cell carcinomas from Taiwan[J]. *J Oral Pathol Med*, 1998, 27(6): 243-248.
 - [14] JENG J H, TSAI C L, HAHN L J, et al. Arecoline cytotoxicity on human oral mucosal fibroblasts related to cellular thiol and esterase activities[J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(7): 751-756.
 - [15] CHANG Y C, HU C C, TSENG T H, et al. Synergistic effects of nicotine on arecoline-induced cytotoxicity in human buccal mucosal fibroblasts[J]. *J Oral Pathol Med*, 2001, 30(8): 458-464.
 - [16] KUMPAWAT K, DEB S, RAY S, et al. Genotoxic effect of raw betel-nut extract in relation to endogenous glutathione levels and its mechanism of action in mammalian cells[J]. *Mutat Res*, 2003, 538(1-2): 1-12.
 - [17] CHANG Y C, HU C C, LII C K, et al. Cytotoxicity and arecoline mechanisms in human gingival fibroblasts *in vitro*[J]. *Clin Oral Investig*, 2001, 5(1): 51-56.
 - [18] TSAI C H, YANG S F, CHEN Y J, et al. Regulation of interleukin-6 expression by arecoline in human buccal mucosal fibroblasts is related to intracellular glutathione levels[J]. *Oral Dis*, 2004, 10(6): 360-364.
 - [19] TSAI C H, CHOU M Y, CHANG Y C. The up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in human buccal mucosal fibroblasts by arecoline: a possible role in the pathogenesis of oral submucous fibrosis[J]. *J Oral Pathol Med*, 2003, 32(3): 146-153.
 - [20] DASGUPTA R, SAHA I, PAL S, et al. Immunosuppression, hepatotoxicity and depression of antioxidant status by arecoline in albino mice[J]. *Toxicology*, 2006, 227(1-2): 94-104.
 - [21] HARVEY W, SCUTT A, MEGHJI S, et al. Stimulation of human buccal mucosa fibroblasts *in vitro* by betel-nut alkaloids [J]. *Arch Oral Biol*, 1986, 31(1): 45-49.
 - [22] CHANG Y C, LII C K, TAI K W, et al. Adverse effects of arecoline and nicotine on human periodontal ligament fibroblasts *in vitro*[J]. *J Clin Periodontol*, 2001, 28(3): 277-282.
 - [23] CHANG Y C, TAI K W, LII C K, et al. Cytopathologic effects of arecoline on human gingival fibroblasts *in vitro* [J]. *Clin Oral Investig*, 1999, 3(1): 25-29.
 - [24] CHIBAL, MUTHUMALA M, YAMAZAKI Y, et al. Characteristics of mutations in the p53 gene of oral squamous-cell carcinomas associated with betel-quid chewing in Sri Lanka [J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(6): 839-842.
 - [25] TSAI C H, YANG S F, CHEN Y J, et al. The upregulation of insulin-like growth factor-1 in oral submucous fibrosis [J]. *Oral Oncol*, 2005, 41(9): 940-946.
 - [26] KUO F C, WU D C, YUAN SS, et al. Effects of arecoline in relaxing human umbilical vessels and inhibiting endothelial cell growth[J]. *J Perinat Med*, 2005, 33(5): 399-405.
 - [27] LEE P H, CHANG M C, CHANG W H, et al. Prolonged exposure to arecoline arrested human KB epithelial cell growth: regulatory mechanisms of cell cycle and apoptosis [J]. *Toxicology*, 2006, 220(2-3): 81-89.
 - [28] SELVAN R S, VENKATESWARAN K S, RAO A R. Influence of arecoline on immune system: I. Short term effects on general parameters and on the adrenal and lymphoid organs [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1989, 11(2-3): 347-377.
 - [29] CHENG Y A, TSAI C C. Nicotine- and arecoline-induced interleukin-1 secretion and intercellular adhesion molecular-1 expression in human oral epidermoid carcinoma cells *in vitro* [J]. *Arch Oral Biol*, 1999, 44(10): 843-851.
 - [30] HSU H J, CHANG K L, YANG Y H, et al. The effects of arecoline on the release of cytokines using cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with oral mucous diseases [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2001, 17(4): 175-82. Links
 - [31] WEN X M, ZHANG Y L, LIU X M, et al. Immune responses in mice to arecoline mediated by lymphocyte muscarinic acetylcholine receptor[J]. *Cell Biology International*, 2006, 30: 1048-1053.
 - [32] LIN L M, CHEN Y K, LAI D L, et al. Minimal arecaine concentrations showing a promotion effect during DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis [J]. *J Oral Pathol Med*, 1996, 25(2): 65-68.
 - [33] YANG S F, HSIEH Y S, TSAI C H, et al. The upregulation of type I plasminogen activator inhibitor in oral submucous fibrosis [J]. *Oral Oncol*, 2003, 39(4): 367-372.

收稿日期: 2007-08-21