

大黄素通过 ROS 介导大肠癌细胞株 LOVO 凋亡的实验研究

李五生¹, 钟毅², 马亮¹ (1. 泸州医学院附属中医院肛肠外科, 四川 泸州 646000; 2. 泸州医学院附属医院心内科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 观察大黄素对人大肠癌细胞株 LOVO 凋亡的影响, 并探讨活性氧(ROS)是否介导了大黄素诱导细胞凋亡的过程。 **方法** 体外分组培养人大肠癌细胞株 LOVO, 设空白对照组和大黄素 3 个不同浓度干预组 (40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 大黄素干预时间分别为 12, 24, 48 h。以四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖率、Annexin V-FITC 和 PI 双染流式细胞术检测凋亡, 激光扫描共聚焦显微镜检测细胞内 ROS 水平, Western 印迹法检测 caspase-3 表达。 **结果** 与空白对照组比较, 大黄素干预组呈浓度依赖性诱导大肠癌细胞株 LOVO 凋亡, 细胞内 ROS 水平明显增加, caspase-3 的表达明显上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 大黄素通过 ROS 介导线粒体凋亡信号通路诱导大肠癌细胞凋亡, 可能是大肠癌细胞凋亡诱导途径之一。

关键词: 大黄素; 活性氧; 人大肠癌细胞株 LOVO; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0132-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.007

Role of Emodin in Apoptosis of Human Colon Cancer Cell Line LOVO Medicated by Reactive Oxygen Species

LI Wusheng¹, ZHONG Yi², MA Liang¹ (1. Surgery Department of Anorectal Disease, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000 Sichuan, China; 2. Department of Cardiac Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000 Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of emodin on the apoptosis of human colon cancer cell line LOVO and to explore the role of reactive oxygen species(ROS) in this process. **Methods** The LoVo cells were divided into blank control group and emodin treatment groups (emodin at the concentrations of 40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and the intervention time was 12, 24, 48 h, respectively. The proliferation of LOVO cells was assayed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, and the apoptosis was detected by Annexin V-FITC and PI double-staining flow cytometry. Cellular ROS level was detected by using a confocal laser scanning microscope. In addition, caspase-3 expression was analyzed by Western blotting method. **Results** Compared with the blank control group, emodin treatment groups induced the apoptosis ($P < 0.05$), increased the level of ROS ($P < 0.05$) in human colon cancer cell line LOVO, and up-regulated the expression of caspase-3 ($P < 0.05$) in dose-dependent manner, the difference being statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Emodin induces the apoptosis of human colon cancer cell line LOVO through ROS-mediated mitochondrial signaling pathway, which may be one of its apoptosis-inducing mechanisms.

Keywords: Emodin; Reactive oxygen species; Human colon cancer cell line LOVO; Apoptosis

大黄素(emodin)是从大黄属、蓼属、鼠李属植物和番泻叶中提取的有效单体, 化学名为1, 3, 8-三羟基-6-甲基蒽醌, 是一种蒽醌类衍生物, 具有较强的生物学活性, 其主要作用有抗肿瘤、抗菌、免疫抑制、解痉止咳及降压利尿等^[1-2]。国内外研究显示, 肿瘤的发生机制中重要环节是细胞凋亡不足导致其过度异常增殖。本研究采用大肠癌细胞株 LOVO 作为研究对象, 探讨大黄素对其凋亡的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人结肠癌 LOVO 细胞(ATCC, American type culture collection, 批号: CRL-11539)、RPMI-1640 培养基(批号: NVD0319)、胎牛血清(FBS, 批号: NTM0135)、胰蛋白酶(批号: 08071101), 美国 Gibco 公司; 大黄素, 批号: 110756-201208, Sigma 公司; Annexin V-FITC 和 PI 双染试剂盒(批号: 9106 9035)、检测 ROS 水平试剂盒(批号: 11685891510), 碧云天生物技术有限公司; 蛋白免疫印迹法一抗(cas-

收稿日期: 2012-09-07

作者简介: 李五生, 男, 副主任医师, 硕士。研究方向: 肛肠疾病治疗。Email: maliang198205@163.com。通讯作者: 马亮, Email: maliang198205@163.com。

pase-3, 批号: FA02011B)、二抗(山羊抗兔IgG, 批号: FE02010C), 美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞增殖率 实验分为空白对照组及大黄素 3 个不同浓度干预组(40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。细胞接种 96 孔培养板中(每孔 1×10^4 个细胞) 孵育 24 h, 换无血清 1640 培养基(同步化细胞) 24 h 后弃培养液, 各实验组分别加入不同浓度大黄素进行干预。20 h 后加入 MTT(5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 10 μL , 孵育 4 h, 终止反应。弃孔内培养液上清液加二甲基亚砜 100 μL 在 492 nm 处测定各孔吸光度值。细胞增殖率计算公式: 细胞增殖率(cell viability) = 处理孔 A_{492} / 对照孔 $A_{492} \times 100\%$ 。

1.2.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测caspase-3蛋白表达水平 细胞分别接种 6 孔培养板中孵育 24 h, 换无血清 1640 培养基(同步化细胞) 24 h 后弃培养液, 加入大黄素(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 孵育细胞 12, 24, 48 h。按照孵育时间收集细胞并加入细胞裂解液裂解细胞, 离心收集上清液, BCA 法测蛋白浓度。蛋白(30 μg) 经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转移至 PVDF 膜。5% 牛血清白蛋白室温封闭 4 h, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜、二抗室温孵育 2 h, 最后采用 Western blot 化学发光检测试剂盒检测, 按说明书操作。

1.2.3 Annexin V-FITC 和 PI 双染流式检测细胞凋亡 细胞接种 6 孔培养板中孵育 24 h, 换无血清 1640 培养基 24 h 后弃培养液, 大黄素各组按 40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度加入药物。按照说明书消化收集细胞, 计数后取 5×10^4 个重悬细胞, 1000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$) 避光孵育 10 min。使用铝箔进行避光。1000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 10 μL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。随即采用流式细胞仪检测。

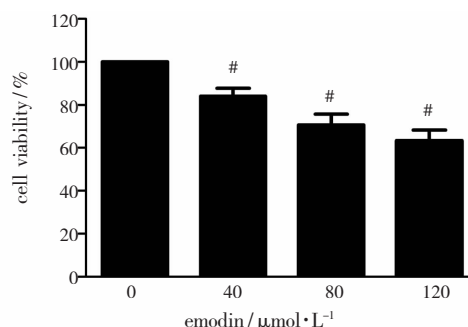
1.2.4 细胞ROS检测 接种细胞于 96 孔板, 接种细胞数为每孔 1.5×10^4 个细胞。DCFH-DA 孵育: 接种 24 h 后用含糖 earle's 液洗 2 次, 并换上终浓度为 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 培养箱孵育 30 min, DCFH-DA 孵育结束后, 再用含糖 earle's 液洗 2 次给予氧化应激处理。激光扫描共聚焦显微镜检测荧光, 488 nm 为激发波长, 590 nm 为吸收波长。

1.3 统计学处理方法 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因

素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。采用 SPSS 13.0 软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素对 LOVO 细胞增殖抑制影响 见图 1。大黄素在 40 ~ 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内可诱导 LOVO 细胞增殖抑制, 并呈浓度依赖性。大黄素各剂量组与空白对照组比较, 细胞抑制显著, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



与空白对照组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图1 大黄素对大肠癌细胞株LOVO生长抑制的影响

Figure 1 The inhibitory effect of emodin on the growth in human colon cancer cell line LOVO

2.2 大黄素对 LOVO 细胞 caspase-3 蛋白表达的影响

见图 2。大黄素作用于 LOVO 细胞不同时间后, 24 h 时 caspase-3 表达明显增强。

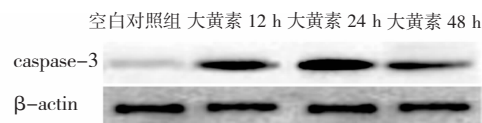


图2 大黄素对大肠癌细胞株LOVO中caspase-3表达的影响

Figure 2 Effects of emodin on caspase-3 expression in human colon cancer cell line LOVO

2.3 大黄素对细胞ROS的影响 见表1。荧光强度反映ROS水平。大黄素处理细胞 24 h 后细胞内的 ROS 浓度明显增加, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且 ROS 随大黄素剂量的增加而增高。

2.4 大黄素对 LOVO 细胞凋亡影响 见表 2。采用不同浓度的大黄素干预大肠癌细胞, 24 h 后细胞出现凋亡现象, 空白对照组中只有极少量的凋亡细胞存在。与空白对照组比较, 随着大黄素浓度的增高, 肿瘤细胞的凋亡率逐渐增加, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

细胞凋亡在肿瘤的发生发展过程中扮演重要角

表1 大黄素对大肠癌细胞株LOVO中ROS水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Effects of emodin on the level of ROS in human colon cancer cell line LOVO

组别	药物浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	荧光强度
空白对照组	0	45.12 $\pm$ 5.06
大黄素干预组	40	56.37 $\pm$ 6.85 [#]
大黄素干预组	80	76.38 $\pm$ 7.15 [#]
大黄素干预组	120	96.42 $\pm$ 8.76 [#]

注：与空白对照组比较，[#] $P < 0.05$ 。

表2 大黄素作用大肠癌细胞株LOVO 24 h后对细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Effects of the apoptosis rate in human colon cancer cell line LOVO induced by emodin for 24 h

组别	药物浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	荧光强度
空白对照组	0	1.35 $\pm$ 0.26
大黄素干预组	40	20.37 $\pm$ 3.86 [#]
大黄素干预组	80	36.38 $\pm$ 4.35 ^{#Δ}
大黄素干预组	120	56.42 $\pm$ 5.56 ^{#*}

注：与空白对照组比较，[#] $P < 0.01$ ；与40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素干预组比较， ^{Δ} $P < 0.01$ ；与80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素干预组比较，^{*} $P < 0.01$ 。

色，肿瘤发生是细胞的增殖和凋亡失去平衡所致，通过诱导肿瘤细胞的凋亡，以达到治疗肿瘤的目的。大黄素(Emodin)为蒽醌类物质，是大黄有效成分之一。目前有研究报道了大黄素能够抑制多种肿瘤细胞的生长，Su YT等^[3]研究表明，大黄素通过拮抗具有细胞保护作用ERK和AKT信号通路，触发线粒体功能紊乱及氧化损伤，增加Bax的表达，抑制Bcl-2的表达，释放细胞色素C，活化caspase，启动人肺腺癌细胞系A549的细胞凋亡^[3]。

线粒体及其相关的凋亡因子可以作为潜在的作用靶点，为肿瘤的治疗提供新途径^[4-5]。线粒体凋亡信号通路是caspase-9活化，活化以后激活下游的caspase-3，进而激活caspase级联反应，从而引起靶细胞凋亡。ROS是细胞有氧呼吸过程中产生的O₂代谢产物及其衍生的含氧物质的统称，包括所有的含氧自由基和过氧化物。ROS在凋亡中的作用日益受到重视，许多证据表明，在促凋亡信号作用下ROS的升高可能作为第二信使上调促凋亡蛋白表达，促进线粒体通透性转变孔的开放，激活天冬氨酸特异的caspase，参与Ca²⁺途径等，进而诱导细胞凋亡^[6]。

本研究发现，大黄素在一定浓度范围内浓度依赖性抑制结肠癌细胞凋亡。此实验发现与Lu等^[7]的研究结果研究相类似，均证实了大黄素可影响结肠癌细胞的生长及凋亡，但后者认为其作用机制是阻断

了血管内皮生长因子受体。童洪飞等^[8]通过研究发现，大黄素可能通过抑制肿瘤细胞增殖及促进肿瘤细胞的凋亡，从而抑制胰腺癌细胞株BXP-3细胞在裸鼠体内的生长。本研究还发现，大黄素作用于结肠癌细胞后ROS水平急剧上升，随干预浓度增加而增加，说明在大黄素作用下细胞内的氧化还原平衡打破。ROS是真核细胞有氧呼吸时的产物，具有较强的氧化能力，统称为ROS。凋亡刺激因子使ROS水平轻度升高可能作为活化信号触发线粒体凋亡信号通路，当凋亡启动后，ROS进一步升高可能起加速凋亡的作用^[9]。另外，经典理论认为，caspase-3是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶，在细胞凋亡过程中起到不可替代的作用^[10]。通过Western实验，我们发现caspase-3随着大黄素作用时间在24 h表达增加，提示大黄素对于结肠癌细胞线粒体凋亡信号通路具有一定的干预作用。

综上所述，大黄素通过影响结肠癌细胞ROS水平，打破氧化还原平衡，从而改变线粒体膜通透性，促进激活促凋亡因子，经过级联反应，诱导细胞凋亡。需要注意的是，细胞的凋亡信号途径众多，除了ROS影响线粒体膜通透性，其他如bcl-2基因家族的某些成员也可能影响细胞凋亡^[11]。因此，大黄素在此通路中的具体相关机制还需要进一步研究。

参考文献：

[1] Kuo YC, Meng HC, Tsai WJ. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from Polygonum hypoleucum Ohwi[J]. Inflamm Res, 2001, 50(2): 73-82.

[2] Srinivas G, Anto RJ, Srinivas P, et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly (ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 473 (2-3): 117-125.

[3] Su YT, Chang HL, Shyue SK, et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(2): 229-241.

[4] Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA. Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63 (24): 3083-3089.

[5] Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death[J]. J Clin Invest, 2005, 115 (10): 2640-2647.

[6] Szibor M, Richter C, Ghafourifar P. Redox control of mitochondrial functions[J]. Antioxid Redox Signal, 2001, 3(3): 515-523.

[7] Lu Y, Zhang J, Qian J. The effect of emodin on VEGF receptors in

- human colon cancer cells[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2008, 23 (2): 222-228.
- [8] 童洪飞, 林海舵, 张伟, 等. 大黄素对胰腺癌细胞BXP-3的体内抑制作用[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(8): 1211-1214.
- [9] Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, et al. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(11): 1649-65.
- [10] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1305-1308.
- [11] 杨宾, 付强, 王亚娟, 等. 芦荟大黄素对人结肠癌细胞SW480增殖周期及凋亡的影响[J]. *山西中医*, 2008, 24(6): 48-50.
- (编辑: 邓响潮)

酸枣仁总皂苷对过氧化氢损伤心肌细胞的保护作用及机制研究

黄宜生¹, 贾钰华² (1. 深圳市福永人民医院心血管内科, 广东 深圳 518103; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 观察酸枣仁总皂苷对过氧化氢损伤心肌细胞的保护作用及其机制。**方法** 采用差速贴壁法分离培养1~3 d Wistar新生乳鼠心肌细胞, 以过氧化氢作用心肌细胞建立氧化损伤模型, 将培养72 h的原代心肌细胞, 选择搏动良好、生长密度无明显差异的细胞按孔随机分为以下4组: ①空白对照组: 细胞培养过程中不给予任何处理; ②模型组: 心肌细胞培养基中加终浓度为400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢作用4 h; ③酸枣仁总皂苷治疗组: 操作同模型组, 造模前予酸枣仁总皂苷(20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)干预24 h; ④蛋白激酶C抑制剂组: 操作同治疗组, 但在造模前5 min予白屈菜红碱(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。倒置显微镜观察心肌细胞形态学变化; 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测心肌细胞活力; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; 免疫印迹技术检测心肌细胞膜蛋白中蛋白激酶C Epsilon亚型(PKC ϵ)的表达。**结果** 与空白对照组比较, 模型组经400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢作用4 h后, 细胞核暗淡, 伪足显著变细, 细胞间连接明显减少, 搏动节律减慢, 细胞活力显著下降($P < 0.001$), 细胞凋亡率显著增高($P < 0.001$), PKC ϵ 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较, 酸枣仁总皂苷能使心肌细胞形态明显改善, 显著提高细胞活力、降低细胞凋亡率及升高PKC ϵ 的表达, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。PKC抑制剂白屈菜红碱可显著减弱酸枣仁总皂苷的保护作用, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 酸枣仁总皂苷对过氧化氢损伤大鼠心肌细胞具有保护作用, 其机制可能与激活PKC ϵ 有关。

关键词: 酸枣仁总皂苷; 过氧化氢; 心肌细胞; 凋亡; 蛋白激酶C Epsilon亚型

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0135-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.008

Protective Effect and Mechanism of Total Saponin from Semen Ziziphi Spiosi in Damaged Myocardial Cells Induced by Hydrogen Peroxide

HUANG Yisheng¹, JIA Yuhua² (1. Department of Cardiovascular Medicine, People's Hospital of Fuyong, Shenzhen 518103 Guangdong, China; 2. Traditional Chinese Medicine School, Southern Medical University, Guangzhou 510515 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effect and mechanism of total saponin from Semen Ziziphi Spiosi (SZS-TS) on the damage of myocardial cells induced by hydrogen peroxide. **Methods** Primary cultures of cardiac myocytes were prepared from the ventricles of neonate Wistar rats aged 1 ~ 3 days, and then cultured for 72 hours. Hydrogen peroxide was used for the induction of oxidative injury myocardial cell models. The well-grown neonate rat myocardial cells were divided into four groups. The blank control group had no medication during the culture, the model group was treated with hydrogen peroxide at the final concentration of 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in the cell culture fluid for 4 hours.

收稿日期: 2012-12-26

作者简介: 黄宜生, 主治医师, 医学博士。研究方向: 中西医结合心血管疾病的临床和基础研究。Email: huangyisheng9501@sohu.com。