

大黄素对人肝癌SMMC7721细胞增殖的抑制作用

王昕雯^{1*},朱国光²(1.南京医科大学附属淮安第一医院,江苏淮安 223300;2.南京医科大学附属淮安第一医院一分院,江苏淮安 223001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0058-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.19

摘要 目的:研究大黄素对人肝癌SMMC7721细胞增殖的抑制作用。方法:以0(阴性对照)、25、37.5、50、62.5、75、87.5、100 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-氟尿嘧啶(5-FU)培养SMMC7721细胞24、48、72 h,检测细胞光密度,计算增殖抑制率。以0(阴性对照)、25、50、75 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-FU培养SMMC7721细胞48 h,检测细胞凋亡率、周期分布和细胞Bax、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)基因表达。结果:与阴性对照比较,25、37.5、50、62.5、75、87.5、100 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-FU作用后细胞增殖抑制率升高,且与大黄素的浓度和作用时间呈正相关。与阴性对照比较,25、50、75 μmol/L大黄素和100 μmol/L 5-FU作用后细胞凋亡率升高、Bax基因表达增强、Bcl-2基因表达减弱,其中50、75 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-FU能明显滞留细胞于G₀/G₁期($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:大黄素能抑制SMMC7721细胞增殖,促进其凋亡,阻止其生长。

关键词 大黄素;人肝癌SMMC7721细胞;Bax;B淋巴细胞瘤-2;细胞周期;凋亡

Inhibitory Effects of Emodin on the Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma SMMC7721 Cells

WANG Xinwen¹, ZHU Guoguang²(1.The Affiliated Huaian First Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Huaian 223300, China; 2.No. 1 Branch Hospital, the Affiliated Huaian First Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Huaian 223001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of emodin on the proliferation of human hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells. METHODS: SMMC7721 cells were treated with 0 (negative control), 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5, 100 μmol/L emodin solution and 100 μmol/L 5-FU for 24 h, 48 h, 72 h. The optical density value of cells was detected, and inhibition rate was calculated. SMMC7721 cells were treated with 0 (negative control), 25, 50, 75 μmol/L emodin solution and 100 μmol/L 5-FU for 48 h, and cell apoptosis rate, cell cycle and the expression of Bax and Bcl-2 gene were detected. RESULTS: Compared with negative control, the rate of cell proliferation inhibition increased after treated with 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5, 100 μmol/L emodin and 100 μmol/L 5-FU, which was positively associated with the concentration and duration. Compared with negative control, the rate of cell apoptosis increased after treated with 25, 50, 75 μmol/L emodin solution and 100 μmol/L 5-FU; the expression of Bax increased and that of Bcl-2 decreased; 50, 75 μmol/L emodin solution and 100 μmol/L 5-FU could arrested cells at G₀/G₁ phase ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Emodin can inhibit the proliferation of SMMC7721, promote cell apoptosis and inhibit cell growth.

KEYWORDS Emodin; Human hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells; Bax; Bcl-2; Cell cycle; Apoptosis

- 2012,43(4):667.
- [2] 刘成彬,张少聪.中药蒲黄的药理与临床进展[J].世界中西医结合杂志,2009,4(2):149.
- [3] 柳红芳,高学敏.蒲黄水煎液对小鼠妊娠影响的实验研究[J].中药药理与临床,1994(2):26.
- [4] 高宇勤,郝霁萍.蒲黄对未孕大鼠离体子宫平滑肌运动的影响及机理探讨[J].时珍国医国药,2006,17(10):1986.
- [5] 王琪,刘宏,吕玲.子宫收缩的分子机制与相关调控药物的研究进展[J].中国医院药学杂志,2012,32(17):1393.
- [6] 杨亚君. COX 抑制剂对离体子宫平滑肌的作用研究[J].重庆医学,2009,38(16):2011.
- [7] 漆洪波.宫缩抑制剂临床应用的进展[J].中华围产医学杂志,2003,6(6):369.
- [8] 张玉林,赵纯全.缩宫素在妇产科临床的应用研究进展[J].中国药房,2014,25(44):4219.
- [9] 晏飞,董志,胡月,等.倍他福林对大鼠离体子宫平滑肌收缩作用的影响研究[J].中国药房,2013,24(33):3096.
- [10] 徐敬东,王文,杨惠霞,等.延胡索对未孕大鼠离体子宫平滑肌运动的抑制作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(21):4178.
- [11] 杜娟,周东仙,王英华,等.铁心甘草醇提取物对小鼠离体子宫平滑肌的舒张作用及其机制探讨[J].宁夏医科大学学报,2009,31(1):24.
- [12] 方明珠,王志举.大黄苷元对小鼠离体子宫平滑肌收缩的影响及机制研究[J].中医研究,2014,27(6):71.
- [13] 张蕾.大黄提取液对小鼠离体子宫平滑肌收缩性能的影响[J].实用临床医药杂志,2010,14(24):5.
- [14] 华永庆,段金殿,王言才,等.小鼠离体子宫收缩模型定量药理学研究[J].中国药理学通报,2009,25(11):1527.
- [15] 何焯,马力扬,李志强,等.大黄酸对大鼠离体子宫平滑肌运动的影响[J].沈阳药科大学学报,2007,24(4):242.
- [16] 张红,钟雪梅,秦大莲,等.固环止血胶囊对大鼠离体子宫收缩的影响[J].泸州医学院学报,2011,34(1):30.
- [17] 柯小平. COX-2及钙离子通道蛋白与子宫肌瘤发病机制间的关系研究[D].济南:山东大学,2014.
- [18] 张淑敏,曲桂武,解飞霞,等.蒲黄化学成分研究[J].中草药,2008,39(3):350.

*副主任药师。研究方向:医院药学、药事管理。E-mail:w6x8w9@aliyun.com

(收稿日期:2015-08-24 修回日期:2015-10-21)
(编辑:林静)

原发性肝癌,是我国高发的、危害极大的恶性肿瘤,病死率居恶性肿瘤第3位。其病因及确切分子机制尚不完全清楚,目前认为其发病是多因素、多步骤的复杂过程,受环境和饮食双重因素影响。现多采用传统化疗结合手术的方式对肝癌进行治疗,但疗效差强人意。近年来,随着肿瘤治疗实验性方法的深入开展,中医药在抗肿瘤药物研究中逐渐显示出其良好的应用价值;有目的、有计划地对传统中药有效部位和成分进行研究,寻找新的不良反应小、疗效好的中药化疗药物,不仅是当前肝癌治疗的热点,也是传统中药“老药新用”的需要。

大黄素,即1'3'8-三羟基-6-甲基蒽醌,是大黄、何首乌、虎杖等多种中药的主要有效成分之一,其药理作用包括抗氧化、清除自由基^[1],抑制炎症因子分泌^[2],诱导细胞色素P₄₅₀的产生,保护肝脏^[3]以及通过抑制细胞DNA合成从而诱导细胞凋亡^[4]等。本文主要研究大黄素对人肝癌SMMC7721细胞增殖的抑制作用,为其在肝癌治疗中的应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

450型全自动酶标仪(美国Bio-Rad公司);7500型实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)仪(美国ABI公司);Accuri C6型流式细胞仪(美国BD公司);5427R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

大黄素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110756-201304,纯度:≥98%);5-氟尿嘧啶(5-FU)注射液(阴性对照,悦康药业集团有限公司,批号:20140317,规格:10 ml:0.25 g);MTT(批号:M5655)、二甲基亚砜(DMSO,批号:D5879)(美国Sigma公司);RT-PCR试剂盒(大连宝生物工程有限公司,批号:20142517);RPMI 1640培养液、胰蛋白酶(美国HyClone公司);基因序列由北京博尔迈生物技术有限公司合成。

1.3 肿瘤细胞

人肝癌SMMC7721细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

2 方法

2.1 细胞的培养

采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液在37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱中培养SMMC7721细胞,24 h后换液,48 h时加入胰蛋白酶(2.5 g/L)消化传代以制成单层细胞悬液。

2.2 细胞增殖抑制率的检测

取对数生长期的SMMC7721细胞,以RPMI 1640培养液在96孔板上调整细胞密度至1×10⁵ ml⁻¹,并在37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱中培养。细胞贴壁后,以0(阴性对照)、25、37.5、50、62.5、75、87.5、100 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-FU培养细胞24、48、72 h,每个浓度平行操作6份。试验结束后弃去上清液,加入MTT溶液后继续培养4 h,再每孔加入200 μl DMSO终止反应,振荡15 min。采用全自动酶标仪在570 nm波长处测定各样本的光密度(OD),以(阴性对照OD值-试验OD值)/阴性对照OD值×100%计算细胞增殖抑制率。

2.3 细胞凋亡和周期分布的检测

按“2.2”项下方法培养细胞至贴壁后,以0(阴性对照)、25、50、75 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-FU培养细胞48 h,

每个浓度平行操作3份。细胞用0.25%的胰蛋白酶消化后,以离心半径13.5 cm、1 000 r/min离心10 min收集细胞,弃上清液,再用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞2次,加入结合缓冲液,轻轻混匀细胞后加5 μl 异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和5 μl 碘化丙啶(PI),室温避光反应10 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期分布。

2.4 Bax、Bcl-2基因表达的检测^[5]

按“2.2”项下方法培养细胞至贴壁后,以0(阴性对照)、25、50、75 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-FU培养细胞48 h,每个浓度平行操作3份。采用Trizol法提取细胞总RNA,按照RT-PCR试剂盒说明书操作检测细胞中Bax、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)基因表达。反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,退火1 min,74℃延伸1 min,39个循环。 β -actin(内参)上游引物:5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3',下游引物:5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3';片段长度:285 bp;退火温度:59.2℃。Bax上游引物:5'-CGAGTGTCCGGCGAA-TTG-3',下游引物:5'-ATGGTGAGCGAGGCGGTGAG-3';片段长度:381 bp;退火温度:62.9℃。Bcl-2上游引物:5'-GGTACCAGAGCGTTCAGT-3',下游引物:5'-CTGCTGCATT-GTCCCCGTAG-3';片段长度:302 bp;退火温度:60.9℃。以目标基因与内参的相对表达量为指标评价目标基因的表达水平。

2.5 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制情况

25、37.5、50、62.5、75、87.5、100 μmol/L大黄素和100 μmol/L 5-FU均能抑制细胞增殖,其中与大黄素的浓度和作用时间呈正相关。细胞增殖抑制率的测定结果见表1。

表1 细胞增殖抑制率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Results of cell proliferation inhibition rate($\bar{x} \pm s, n=6$)

药物	浓度, μmol/L	增殖抑制率, %		
		24 h	48 h	72 h
大黄素	25	-3.86 ± 2.84	4.97 ± 1.48	16.53 ± 5.02
	37.5	6.86 ± 1.05	11.47 ± 2.81	36.48 ± 1.33
	50	20.27 ± 2.43	37.69 ± 2.07	52.61 ± 1.45
	62.5	46.28 ± 1.25	76.83 ± 3.24	80.74 ± 1.52
	75	63.37 ± 1.29	82.41 ± 1.65	84.88 ± 3.06
	87.5	65.84 ± 1.17	84.52 ± 1.43	86.92 ± 2.71
	100	72.33 ± 2.08	85.18 ± 0.72	92.36 ± 0.64
5-FU	100	66.75 ± 1.06	80.24 ± 1.35	85.42 ± 0.58

3.2 细胞凋亡与周期变化

与阴性对照比较,25、50、75 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-FU作用后细胞凋亡率均升高($P < 0.01$),其中50、75 μmol/L大黄素溶液和100 μmol/L 5-FU作用细胞后G₀/G₁期细胞增加、S期细胞减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。这表明大黄素可促进SMMC7721细胞凋亡,使细胞滞留于G₀/G₁期,抑制其进入S期,从而阻止细胞的分裂和生长过程。细胞凋亡率和细胞周期分布的测定结果见表2。

3.3 细胞中Bax、Bcl-2基因表达变化

表2 细胞凋亡率和细胞周期分布的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Results of cell apoptotic rate and cell cycle distribution($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	浓度, $\mu\text{mol/L}$	凋亡率, %	G ₀ /G ₁ , %	S, %	G ₂ /M, %
	0(阴性对照)	1.53±0.31	42.57±2.43	43.16±3.35	14.27±1.04
大黄素	25	7.65±0.94**	46.64±1.95	41.29±2.86	12.07±1.15
	50	8.59±1.21**	53.14±1.72*	37.84±3.09*	9.02±1.27*
	75	11.46±1.35**	64.22±1.68**	30.53±2.94**	5.25±1.43**
5-FU	100	9.41±0.78**	65.63±1.05**	32.36±1.75**	2.01±0.87**

注:与阴性对照比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. negative control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

与阴性对照比较,25、50、75 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素溶液和100 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU作用后细胞中Bax基因相对表达量增强、Bcl-2基因相对表达量减弱($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。这表明大黄素可上调SMMC7721细胞中Bax基因表达,下调Bcl-2基因表达。细胞中Bax、Bcl-2基因相对表达量的测定结果见表3。

表3 细胞中Bax、Bcl-2基因相对表达量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Results of Bax, Bcl-2 gene relative expression in cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	浓度, $\mu\text{mol/L}$	Bax相对表达量	Bcl-2相对表达量
	0(阴性对照)	1	1
大黄素	25	1.16±0.14*	0.85±0.16*
	50	1.35±0.11*	0.72±0.08*
	75	1.67±0.09**	0.58±0.07**
5-FU	100	1.42±0.08*	0.70±0.12*

注:与阴性对照比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. negative control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

4 讨论

MTT法又称MTT比色法,是一种快捷检测细胞存活情况的方法。其原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臞(Formazan)并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。DMSO能溶解细胞中的甲臞,用酶标仪测定其光密度,可间接反映活细胞数,即整体细胞活力。在一定细胞数范围内,MTT结晶形成的量与活细胞数呈正相关^[6]。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测及大规模的抗肿瘤药物筛选中。本文通过MTT试验证明,以一定浓度大黄素培养SMMC7721细胞24、48、72 h后,可使细胞活力降低、细胞生长呈抑制状态,并且该抑制作用与浓度、作用时间呈正相关。

细胞周期包括G₁(间隙1期)、S(DNA合成期)、G₂(间隙2期)及M(有丝分裂期)。不再进行生长活动的细胞则处于G₀(静止期)。增加G₀/G₁期细胞比例,减少S期细胞比例是抑制细胞增殖、促进其凋亡的关键^[7-8]。本研究通过流式细胞仪检测表明,大黄素可显著促进SMMC7721细胞凋亡,使SMMC7721细胞滞留于G₀/G₁期,抑制其进入S期,从而阻止细胞的分裂和生长过程。

在细胞凋亡过程中,Bcl家族成员起着非常重要的作用。

Bcl家族可以分为两大类,一类是抗凋亡的,主要有Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W、Mcl-1、CED9等,在许多类型的细胞受到外界刺激时能保护细胞免于凋亡;另一类是促细胞凋亡的,主要包括Bax、Bak、Bcl-XS、Bad、Bik、Bid等,在细胞受到刺激时能加速其凋亡^[9-10]。本文通过RT-PCR试验证明,一定浓度的大黄素可上调SMMC7721细胞Bax基因表达,下调Bcl-2基因表达。

综上,大黄素能通过抑制SMMC7721细胞增殖促进其凋亡,并滞留细胞于G₀/G₁期阻止其生长,从而发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] Park MY, Kwon HJ, Sung MK. Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(4):828.
- [2] Wu Y, Tu X, Lin G, et al. Emodin-mediated protection from acute myocardial infarction via inhibition of inflammation and apoptosis in local ischemic myocardium[J]. *Life Sci*, 2007, 81(17/18):1 332.
- [3] Bhadauria M, Shrivastava S, Nirala SK, et al. Emodin reverses CCl₄ induced hepatic cytochrome P₄₅₀ (CYP) enzymatic and ultrastructural changes: the in vivo evidence[J]. *Hepatol Res*, 2009, 39(3):290.
- [4] Li X, Liu W, Wang Q, et al. Emodin suppresses cell proliferation and fibronectin expression via p38MAPK pathway in rat mesangial cells cultured under high glucose[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 307(1/2):157.
- [5] 王小康,蔡亚非,张凯,等.镉诱导小鼠睾丸细胞凋亡与Caspase-3、Bcl-2和Bax mRNA的表达[J].*激光生物学报*, 2008, 17(5):569.
- [6] 侯雪芹,张晓晶,王奇,等.体外抗AD药物筛选中MTT、Edu和RTCA法的比较研究[J].*时珍国医国药*, 2015, 26(3):741.
- [7] 高默杰,徐忠伟,王凤梅,等.钠钾泵抑制剂通过调节细胞周期相关蛋白的生成介导肝癌HepG2细胞周期S期阻滞与凋亡[J].*中国药理学通报*, 2010, 26(4):452.
- [8] 郑辉,薛松,连锋,等.人Gax基因转染对血管平滑肌细胞增殖、迁移和细胞周期的影响[J].*中国病理生理学杂志*, 2012, 28(2):216.
- [9] 许俏,罗俊,潘年松,等.皮鳞癌1号方对人皮肤鳞状癌A431细胞生长的抑制作用[J].*中国药房*, 2015, 26(7):904.
- [10] 董贤慧,贺小平,孙淑红,等. BYHWD对脊髓损伤大鼠脊髓组织Bcl-2和Bax表达的影响[J].*神经解剖学杂志*, 2014, 30(6):677.

(收稿日期:2015-10-15 修回日期:2015-12-03)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊,欢迎投稿、订阅