大黄素对人胃癌 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖的影响

保永亮，龚晓燕，黄金玲*，侯晓燕，王桐生，方海燕，王训翠
安徽中医学院，安徽 合肥 230038

摘 要：目的 观察大黄素对人胃癌 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖的影响。**方法** 采用 MTT 法测定 MNK-45 细胞和 MGC8-03 细胞增殖抑制率；采用 AO/EB 双染观察细胞形态学变化；采用流式细胞仪测定细胞周期。**结果** 大黄素（5～80 μg/mL）对 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖均具有显著抑制作用（P＜0.01 或 0.05），且药物剂量越大，作用时间越长，其抑制作用越强（P＜0.01）；大黄素作用于两种细胞后荧光显微镜下观察均显示细胞凋亡特征；大黄素使 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖被阻滞于 G_0/G_1 期。**结论** 大黄素能抑制人胃癌 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖，诱导其凋亡，影响其细胞周期时相的分布。

关键词：大黄素；人胃癌细胞株；增殖抑制作用；细胞周期
中图分类号：R979.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 6376 (2012) 06 - 0408 - 04

Effects of emodin on proliferation of human gastric carcinoma cell lines MNK-45 and MGC8-03 *in vitro*

BAO Yong-liang, GONG Xiao-yan, HUANG Jin-ling, HOU Xiao-yan, WANG Tong-sheng, FANG Hai-yan, WANG Xun-cui
Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: Objective To observe the effects of emodin on the proliferation of human gastric carcinoma cell lines MNK-45 and MGC8-03. **Methods** MTT assay was used to measure the inhibitory rate on the cell growth of MNK-45 and MGC8-03. The morphological changes were determined using AO/EB staining. The changes of cell cycle were detected by flow cytometry. **Results** Emodin (5—80 μg/mL) had the significant inhibition on cell proliferation of MNK-45 and MGC8-03 (P < 0.01 or 0.05). In addition, the higher the dosage was, the longer the effective time was, and the stronger the inhibiton was (P < 0.01); After emodin treatment, the two cell lines showed the features of apoptosis; Emodin could make the cell proliferation of MNK-45 and MGC8-03 stay in the G_0/G_1 phase. **Conclusion** Emodin could inhibit the cell proliferation of human gastric carcinoma MNK-45 and MGC-803, induce the apoptosis of MNK-45 and MGC-803, and affect the distribution of cell cycle phase.

Key words: emodin; human gastric carcinoma cell line; proliferation inhibition; cell cycle

大黄（*Rhei Radix* et *Rhizoma*）药用历史悠久，是我国重要的传统中药，具有攻积滞、清湿热、泻火、凉血、祛瘀、解毒等功效。大黄素（emodin）是其主要药效成分。现代研究发现大黄素具有多种药理学作用，如抗炎、抑菌、抗氧化、调节免疫、保护肝肾、促进胃肠蠕动及抑制血小板聚集、改善微循环、抗肿瘤等作用[1]。近年来国内外关于大黄素抗肿瘤的报道日益增多，如抗肺癌、胆管癌、结肠癌等。本实验观察了大黄素对人胃癌 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖的影响。

1 材料

1.1 瘤株

人胃癌 MNK-45 细胞株，购自南京凯基生物科技有限公司；人胃癌 MGC8-03 细胞株，由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所提供。

1.2 药物

大黄素，南京郎泽医药科技有限公司，质量分数 98%，批号 ZL20111116DA，使用时溶于 DMSO。

1.3 主要仪器

Olympus CKX41 倒置显微镜和 Olympus BX51 荧光显微镜（日本 Olympus 公司）；96 孔平底培养

收稿日期：2012-09-13
基金项目：国家自然科学基金面上项目（81173171）
作者简介：保永亮（1984—），男，在读硕士研究生。Tel: 18855126364
***通讯作者** 黄金玲，女，博士，教授，硕士研究生导师。Tel: (0551)5169390 E-mail: jinling6181@126.com

板（美国 Coring costar 公司）；SPECTRAmax M2e 酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；MCO—175 CO_2 培养箱（日本三洋公司）；JW2502 电子分析天平（上海精密科学仪器有限公司产品）；LD4—8 型低速离心机（北京医用离心机厂）；FACS Calibur 流细式胞仪（美国 Becton Dickinson 公司）。

1.4 主要试剂

RPMI-1640 培养基干粉，Gibco 公司，批号 08612；新生小牛血清（NCS），杭州四季青生物工程公司，批号 110117；碘化丙啶（propidium iodide，PI），Sigma 公司，批号 20120315258；胰蛋白酶，Sigma 公司，批号 0458；曲拉通（Triton-100）、吖啶橙（AO）、溴化乙锭（EB），均为 Sigma 公司；四甲基偶氮唑蓝（MTT），Amresco 公司，批号 0793；二甲基亚枫（dimethyl sulfoxide，DMSO），Amresco 公司，批号 201110108662；其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养

分别将人胃癌 MNK-45、MGC8-03 细胞株常规培养于含 10%小牛血清、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中，置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养，48～72 h 消化传代 1 次。取对数生长期细胞用于实验。

2.2 对 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖的影响

按参考文献[2]用 MTT 法，分别将对数生长期人胃癌 MNK-45 和 MGC80-3 细胞经 0.25%胰蛋白酶消化后，用 RPMI-1640 培养液调整细胞数为 7×10^4、5×10^4 个/mL，分别接种于平底 96 孔板，每孔 200 μL，置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 24 h，吸出培养液，加入新鲜培养液 180 μL 及不同浓度 RPTS 溶液（大黄素用 DMSO 溶解，DMSO 终体积≤0.1%）20 μL，使大黄素终质量浓度分别为 2.5～80 μg/mL，同时设模型组，每组设 3 个平行复孔。各组分别培养 24、48、72 h 后，弃上清，加 20 μL MTT（0.25 mg/μL，模型组除外），继续培养 4 h 后，吸去上清，每孔加 DMSO 150 μL，置震荡器振荡 10 min，用自动酶标仪测定在 570 nm 波长处的吸光度（A）值。实验重复 3 次，按以下公式计算肿瘤细胞增殖抑制率：

抑制率＝（1－用药组平均 A 值/对照组平均 A 值）

2.3 肿瘤细胞形态学观察

按参考文献[3]用 AO/EB 法，取对数生长期的 MNK-45 和 MGC80-3 细胞，调整细胞数为 7×10^4、5.0×10^5 个/mL，分别接种于 6 孔板，每孔 2 mL，置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度细胞培养箱培养 24 h 后，吸出培养液，加入新鲜培养液及大黄素药液，使其终质量浓度为 40、20 μg/mL，同时设模型组，每组设 3 个平行复孔。继续培养 24 h，用预冷的 PBS 洗涤 2 次，消化、收集细胞置离心管，用预冷的 PBS 洗涤 1 次，加入 AO/EB 染液，37 ℃作用 10 min，吸取细胞悬液 1 滴于载玻片，上覆盖玻片，于荧光显微镜下观察并摄片。

2.4 对 MNK-45 和 MGC8-03 细胞周期的影响

按参考文献[4]、[5]操作，取对数生长期的人胃癌细胞 MNK-45 和 MGC80-3，调整细胞数为 7×10^4、5×10^4 个/mL，分别接种于 6 孔板，每孔 2 mL。置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度细胞培养箱培养 24 h 后，吸出培养液，加入大黄素药液，使其终质量浓度分别为 10、20 μg/mL，同时设模型组。继续培养 6 h 后，0.25%胰蛋白酶消化，收集细胞置离心管，2 000 r/min 离心 5 min，冷 PBS 洗 2 次，用 500 μL PBS 重悬细胞，加 PI 染液（含 10 mg PI，10 mg RnaseA，300 μL TritonX-100，1 g 柠檬酸钠，500 mg NaCl，1 L 去离子水），室温下避光染色 30 min，400 目筛网滤过，用流式细胞仪检测 DNA 含量，分析细胞周期。结果用 ModFit 软件分析。实验重复 3 次。

3 统计学处理

采用统计分析软件 SPSS 17.0 进行统计学处理。连续型变量用 $\bar{x}\pm s$ 表示，分别采用 Dunnett 法及重复测量方差分析（repeated measurment，RM）。

4 结果

4.1 对 MNK-45、MGC8-03 细胞增殖的影响

Dunnett 分析显示，各实验组与模型组比较，结果见表 1、2。RM 分析显示，不同时间之间大黄素对细胞的增殖抑制程度不同，时间与剂量间存在交互作用，即药物剂量越大，作用时间越长，抑制作用越强，呈显著的时间、剂量相关性（$P<0.01$）。

4.2 对 MNK-45、MGC8-03 细胞形态的影响

经 AO/EB 双染的 MNK-45 和 MGC8-03 细胞，在荧光显微镜下观察：模型组细胞呈现弥散均匀绿色荧光，偶见个别坏死和凋亡细胞。经大黄素处理 24 h 后，细胞均出现凋亡特征，细胞体积变小，呈橘红色，染色质固缩，核形态变化明显，见图 1。

4.3 大黄素对 MGC8-03 细胞周期的影响

大黄素可使胃癌细胞株 MNK-45 和 MGC8-03 的细胞周期发生明显改变，大黄素使 MNK-45 和

表 1 大黄素对人胃癌细胞 MNK-45 增殖的影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 1 Effect of emodin on cell proliferation of human gastric carcinoma MNK-45 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	浓度/(μg·mL^{-1})	24 h		48 h		72 h	
		A 值	抑制率/%	*A* 值	抑制率/%	*A* 值	抑制率/%
模型	—	0.576±0.012	—	0.729±0.029	—	1.204±0.085	—
大黄素	2.5	0.544±0.029	6.30	0.680±0.016*	7.52	1.067±0.053*	16.53
	5	0.505±0.008**	14.26	0.625±0.011**	16.01	1.104±0.036**	21.96
	10	0.459±0.009**	23.60	0.417±0.012**	48.20	0.955±0.081**	48.59
	20	0.432±0.008**	28.92	0.373±0.011**	54.94	0.557±0.059**	57.02
	40	0.390±0.014**	37.39	0.361±0.020**	56.75	0.490±0.027**	62.89
	80	0.378±0.031**	39.81	0.353±0.008**	58.03	0.387±0.035**	71.93

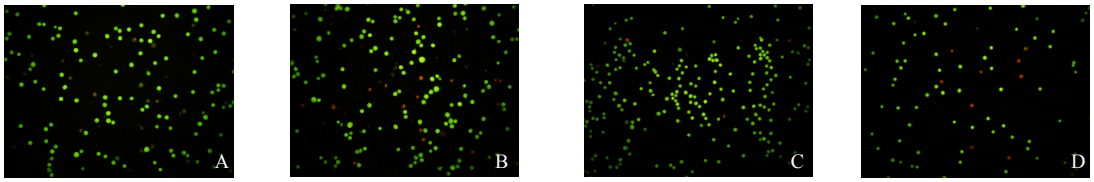
与模型组比较：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，下表同

$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$ *vs* model group, same as below

表 2 大黄素对人胃癌 MGC8-03 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 2 Effect of emodin on cell proliferation of human gastric carcinoma MGC8-03 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	浓度(μg·mL^{-1})	24 h		48 h		72 h	
		A 值	抑制率/%	*A* 值	抑制率/%	*A* 值	抑制率/%
模型	—	0.691±0.024	—	0.834±0.009	—	1.206±0.065	—
大黄素	2.5	0.653±0.036*	6.30	0.772±0.024**	8.23	1.049±0.013**	13.64
	5	0.576±0.017**	19.37	0.677±0.009**	20.68	0.909±0.074**	25.78
	10	0.459±0.017**	38.99	0.450±0.030**	50.58	0.601±0.035**	52.45
	20	0.378±0.033**	52.61	0.399±0.011**	57.33	0.530±0.030**	58.63
	40	0.350±0.025**	57.39	0.371±0.029**	60.95	0.489±0.008**	62.19
	80	0.342±0.012**	58.78	0.343±0.015**	64.64	0.301±0.054**	78.51



A- MNK-45（模型组） B- MNK-45（大黄素 40 μg·mL^{-1}） C- MGC8-03（模型组） D- MGC8-03（大黄素 20 μg·mL^{-1}）

A- MNK-45 (model group) B- MNK-45 (emodin 40 μg·mL^{-1}) C- MGC8-03 (model group) D- MGC8-03 (emodin 20 μg·mL^{-1})

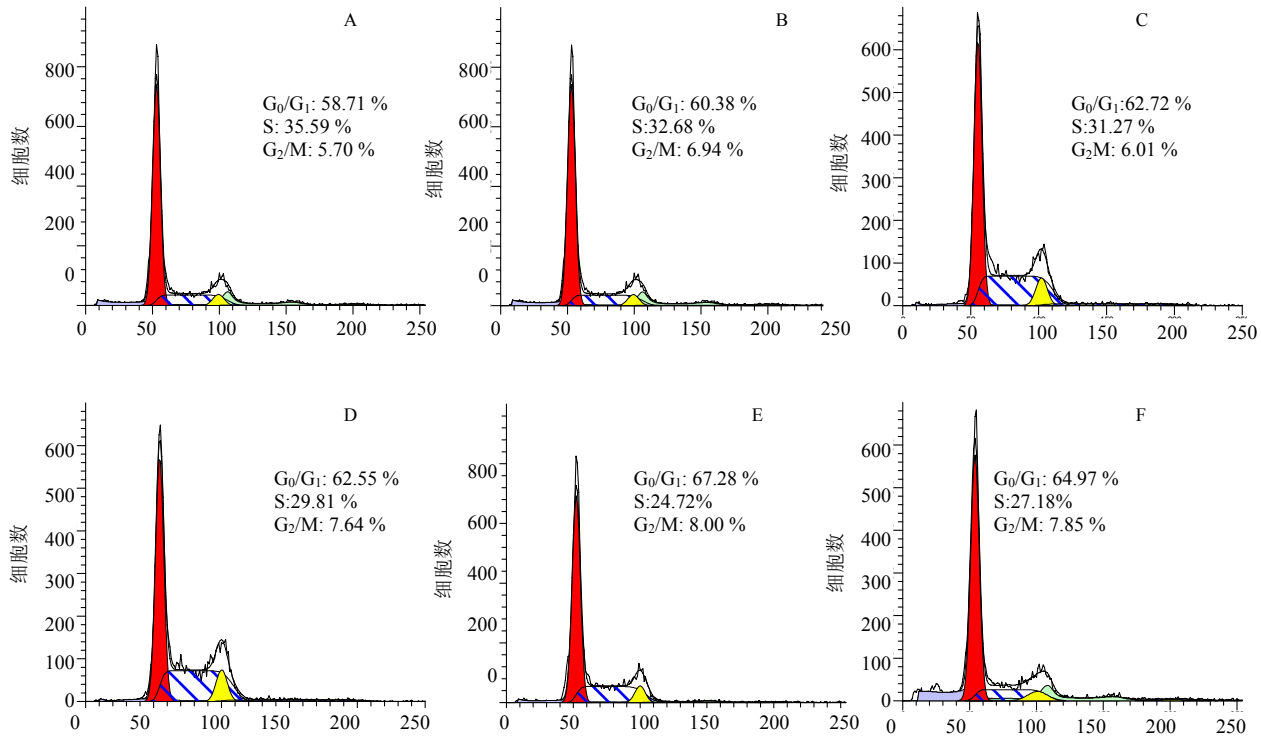
图 1 大黄素对人胃癌细胞 MNK-45 和 MGC8-03 的形态学变化影响

Fig. 1 Effects of emodin on morphological changes of human gastric carcinoma MNK-45 and MGC8-03

MGC8-03 细胞 G_0/G_1 期 DNA 含量增加，S 期 DNA 含量减少，G_2/M 期 DNA 含量变化不明显；因此大黄素可使 MNK-45 和 MGC8-03 细胞出现明显的 G_0/G_1 期阻滞。但是在大黄素质量浓度为 20 μg/mL 时，MGC8-03 细胞出现凋亡峰，凋亡率为 12.62%，且 G_0/G_1 期 DNA 含量大于大黄素质量浓度为 10 μg/mL 时的 DNA 含量，出现这一情况可能与出现的凋亡峰有关。结果见图 2。

5 讨论

现代分子生物学研究认为，细胞增殖与凋亡的失衡是肿瘤发生的重要机制。通过抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡可以达到治疗肿瘤的目的。近年来研究表明，许多新的抗肿瘤药均可诱导肿瘤细胞发生细胞凋亡（apoptosis，APO）或通过调控 APO 调控基因而达到治疗肿瘤的目的。APO 是有机体为调控机体发育，维持内环境，由基因控制的主动死亡过程。细胞的增殖、分化、衰老和凋亡均具有细胞周期依赖性。细胞周期（cell cycle）可分为 G_1 期（DNA 合成前期）、S 期（DNA 合成期）、G_2 期（DNA 合成后期）和 M 期（有丝分裂期期）4 个阶段，在细胞周期过程中，细胞内存在一系列的调控机制，以确保细胞周期严格有序地进行。



A- MNK-45（模型组） B- MNK-45（大黄素 10 μg·mL^{-1}） C- MNK-45（大黄素 20 μg·mL^{-1}）
D- MGC8-03（模型组） E- MGC8-03（大黄素 10 μg·mL^{-1}） F- MGC8-03（大黄素 20 μg·mL^{-1}）
A- MNK-45 (model group) B- MNK-45 (emodin 10 μg·mL^{-1}) C- MNK-45 (emodin 20 μg·mL^{-1})
D- MGC8-03 (model group) E- MGC8-03 (emodin 10 μg·mL^{-1}) F- MGC8-03 (emodin 20 μg·mL^{-1})

图 2 大黄素对人胃癌细胞 MNK-45 和 MGC8-03 的细胞周期影响

Fig. 2 Effect of emodin on cell cycle of human gastric carcinoma cells MNK-45 and MGC8-03

实验结果显示，大黄素对人胃癌细胞 MNK-45 和 MGC8-03 的生长有明显的抑制作用，其增殖抑制作用呈现明显的时效、量效关系（$P<0.01$）。AO 能透过胞膜完整的细胞，嵌入细胞核 DNA，使之发出明亮的绿色荧光。EB 仅能透过胞膜受损的细胞，嵌入核 DNA，发橘红色荧光。凋亡的细胞呈现为染色增强，荧光更为明亮，均匀一致的圆状或固缩状、团块状结构。非凋亡细胞核呈现荧光深浅不一的结构样特征。大黄素处理人胃癌 MNK-45 和 MGC8-03 细胞 24 h 后，能显示出细胞凋亡。大黄素可以使 MNK-45 和 MGC8-03 细胞的周期时相发生变化，使 MNK-45 和 MGC8-03 细胞均出现 G_0/G_1 期阻滞，但是大黄素质量浓度为 20 μg/mL 时，MGC8-03 出现凋亡峰，凋亡率为 12.62%，而 MNK-45 却没有明显的亡凋峰，出现凋亡峰可能的机制是通过影响细胞周期 G_0/G_1 期向 S 期的转变过程，细胞在 G_0/G_1 期大量堆积，达到一定程度导致肿瘤细胞快速凋亡。大黄的抗肿瘤作用与大黄素抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、调控细胞周期密切相关，关于大黄素对两种肿瘤细胞周期的调控机制正在研究中。

参考文献

[1] Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan P P, *et al*. Molecularmechanism of emodin action: Transition from laxative ingredient to an antitumor agent [J]. *Med Res Rev*, 2007, 27(5): 591-608.

[2] 司徒镇强, 吴正军. 细胞培养 [M]. 第 2 版. 西安: 世界图书出版社西安公司, 2007.

[3] 赵志远, 谢 瑞, 王 宇. EGCG 诱导人胶质瘤细胞 U251 凋亡及对 survivin 表达的影响 [J]. 长治医学院学报, 2012. 26(1): 16-18.

[4] 梁智辉, 朱慧芬, 陈九武, 等. 流式细胞术基本原理与实验 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2008..

[5] 陈志红, 龚先玲, 刘 义, 等. 重楼总皂苷对人肺癌细胞 A549 的增殖抑制作用及对细胞周期的影响 [J]. 实用医学杂志, 2010, 26(15): 2685-2687.