

## 大黄素诱导人肝癌 HepG2 细胞线粒体凋亡作用研究

熊思敏<sup>1,2,3</sup>, 张金晓<sup>2,3</sup>, 康玮<sup>2,3</sup>, 王磊<sup>2,3</sup>, 荆宝琴<sup>2,3</sup>, 张宗鹏<sup>2,3\*</sup>, 吕雄文<sup>1\*</sup>

1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032
2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301
3. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

**摘要:** **目的** 研究大黄素对人肝癌 HepG2 细胞线粒体凋亡的影响。**方法** 培养人肝癌 HepG2 细胞, 与 5、10、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$  的大黄素作用 24、48 h, MTS 法检测细胞增殖; 40、80、160  $\mu\text{mol/L}$  大黄素作用 HepG2 细胞 24 h, AO/EB 双荧光染色法观察细胞凋亡的形态学改变; Annexin V/PI 染色经流式细胞仪检测细胞凋亡; 分光光度法检测 caspase 3 活性; ATP 试剂盒检测细胞 ATP 含量, 不同荧光探针加载后流式细胞仪测定大黄素对 HepG2 细胞内活性氧 (ROS) 含量、 $\text{Ca}^{2+}$  浓度、线粒体膜电位 (MMP) 变化的影响。**结果** 大黄素抑制 HepG2 细胞生长, 且呈时间、浓度相关性, 半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $(77.42 \pm 1.25) \mu\text{mol/L}$ ; 随着大黄素浓度升高, AO/EB 双染观察到细胞核浓缩、碎裂、凋亡小体等凋亡形态; 与对照组比较, 大黄素 40、80、160  $\mu\text{mol/L}$  作用于 HepG2 细胞 24 h 后细胞凋亡率显著增加, caspase 3 活性显著增强, ROS 水平、 $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 80、160  $\mu\text{mol/L}$  组线粒体膜电位明显降低, ATP 含量显著下降 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。 **结论** 大黄素造成 HepG2 细胞内 ROS 堆积, ATP 合成功能障碍, 线粒体膜电位明显下降, 进而诱导线粒体通透转运孔开放, 导致钙离子和细胞色素 C 外流, 活化 caspase 蛋白家族, 导致细胞凋亡。

**关键词:** 大黄素; HepG2 细胞; 凋亡; 线粒体膜电位; 线粒体毒性; 活性氧;  $\text{Ca}^{2+}$  浓度

**中图分类号:** R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 05- 0773 - 07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.010

## Emodin induces mitochondrial apoptosis in human hepatoma HepG2 cells

XIONG Simin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Jinxiao<sup>2,3</sup>, KANG Wei<sup>2,3</sup>, WANG Lei<sup>2,3</sup>, JING Baoqin<sup>2,3</sup>, ZHANG Zongpeng<sup>2,3</sup>, LÜ Xiongwen<sup>1</sup>

1. College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China
2. Center for Drug Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China
3. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

**Abstract: Objective** To study the effect of emodin on mitochondrial apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). **Methods** HepG2 cells were treated with 5, 10, 20, 40, 60, 80, and 100  $\mu\text{mol/L}$  of emodin for 24 and 48 h, then the anti-proliferative effect was assessed by MTS assay. HepG2 cells were treated with 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$  of emodin for 24 h, and another control group was also established; The morphological changes of apoptosis were observed by AO/EB double fluorescence staining. Apoptosis was detected by flow cytometry (FCM) with Annexin V/PI staining. Caspase3 activity was detected by spectrophotometry. ATP assay kit was used to detect the content of ATP. Flow cytometry was used to determine the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, the content of ROS, and mitochondrial membrane potential (MMP) of emodin in HepG2 cells after loading with different fluorescence probes. **Results** Emodin could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells and showed a time and concentration correlation. The  $\text{IC}_{50}$  values were determined as  $(77.42 \pm 1.25) \mu\text{mol/L}$ . With the increase of emodin concentration, the apoptotic morphology of nucleus condensation, fragmentation and apoptotic bodies were observed by AO/EB double staining. Compared with the control group, after HepG2 cells treated with 40, 80, and 160  $\mu\text{mol/L}$  emodin for 24 h, the apoptosis rate increased

收稿日期: 2017-09-23

基金项目: 国家科技重大新药创制项目 (2015ZX09501004); 天津市科技计划项目 (16PTGCCX00090)

第一作者: 熊思敏 (1993-), 女 硕士研究生. E-mail: xsm5727@sina.com

\*通信作者: 吕雄文, 男, 教授, 硕士生导师. E-mail: lxw31288@aliyun.com

张宗鹏, 男, 研究员 E-mail: zhangzp@tjipr.com

significantly, the activity of caspase3 increased significantly, and the level of ROS and the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  increased significantly ( $P < 0.05, 0.01$  and  $0.001$ ). Mitochondrial membrane potential decreased significantly in 80 and 160  $\mu\text{mol/L}$  emodin group, and ATP content decreased significantly ( $P < 0.05, 0.01, \text{ and } 0.001$ ). **Conclusion** Emodin causes the accumulation of ROS in HepG2 cells, the dysfunction of ATP synthesis, the decrease of mitochondrial membrane potential, which leads to the opening of the mitochondrial permeable transport pores, resulting in the efflux of calcium ions and cytochrome C, activating the caspase protein family and promoting cell apoptosis.

**Key words:** emodin; HepG2 cells; apoptosis; mitochondrial membrane potential; mitochondrial toxicity; ROS;  $\text{Ca}^{2+}$  concentration

大黄素(1'3'8-三羟基-6-甲基蒽醌)属单蒽核类二羟基蒽醌衍生物,是大黄、虎杖、何首乌等多种中药的有效成分之一,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等多种生物学活性<sup>[1-3]</sup>。研究表明,大黄素可以抑制胃癌、胰腺癌、肺癌等多种肿瘤细胞的生长,主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制其增殖<sup>[4-10]</sup>发挥作用。细胞凋亡是当前肿瘤研究中的一个热点,很多药物通过影响肿瘤细胞增殖与凋亡达到治疗目的,本研究观察大黄素对肝癌细胞株 HepG2 增殖抑制及诱导线粒体途径凋亡的作用。

## 1 材料

### 1.1 药品与主要试剂

大黄素(西安泽朗生物科技有限公司,批号 XAZL161105-1,质量分数>98%);DMEM 高糖培养基(批号 8117092)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号 8116104)、0.25%胰蛋白酶(批号 1742078),均购自美国 GIBCO 公司;青链霉素混合液(批号 20160801)、二甲基亚砷(DMSO,批号 520C036)、AO-EB 双染试剂盒(批号 20170613)、Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(批号 20170710)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1,批号 20170722)、Fluo-4/AM  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针(批号 20170621)、活性氧(ROS)检测试剂盒(批号 20170608),均购自 Solarbio 公司;胎牛血清(CellMax,批号 20151103);Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS,北京 promega 公司,批号 0000208750);ATP 检测试剂(批号 080417171020)、Caspase-3 活性检测试剂盒(批号 062217170907)、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(批号 053117171005),购自 Beyotime 公司。

### 1.2 主要仪器

倒置荧光显微镜(NIKON, TS100-F);高压灭菌锅(SANYO,MLS-3750); $\text{CO}_2$ 培养箱(SANYO, MCO-18AIC);超净工作台(天津市拉贝尔实验设备有限公司);酶标仪(Thermo, Varioskan Flash);FASCAriaTM 流式细胞仪(BD 公司);小型台式冷

冻离心机(Thermo, Micro 17R);低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂,KA-1000);普通冰箱(海尔公司,BCD-215YD);超级恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司,DKB-501A);电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,BT224S)

### 1.3 细胞株

人肝癌(HepG2)细胞株,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞培养于含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素的 DMEM 高糖培养基中,在 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  饱和湿度的培养箱中培养。隔天换 1 次培养液,当细胞满度达到 70%~80% 时进行传代。

### 2.2 MTS 法检测药物对细胞增殖的影响

取对数期生长的 HepG2 细胞,胰酶消化后调整为  $2.5 \times 10^4/\text{mL}$ ,96 孔板每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液,常规培养 24 h 后,弃去培养基,加入含大黄素的培养基,使其终浓度分别为 5、10、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$ 。大黄素先用 DMSO 溶解,后用 DMEM 培养基稀释至终浓度,各加药组 DMSO 终浓度均为 1%,对照组为含 1% DMSO 的 DMEM,每组设 6 个复孔,培养 24、48 h。吸弃培养基,加入含有 10% MTS 的 DMEM 培养基 100  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A)值,计算细胞抑制率。设空白调零组,不接种细胞,加等体积培养基处理,实验重复 3 次。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{大黄素}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 AO/EB 荧光染色法观察细胞形态

取对数期生长的 HepG2 细胞,胰酶消化后调整为  $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ ,6 孔板每孔加入 2 mL 细胞悬液,常规培养 24 h 后,弃去培养基,加入新鲜含药培养基:大黄素 40、80、160  $\mu\text{mol/L}$ ,对照组加入等体积含 DMSO 的培养基,各实验组中 DMSO 的终浓度为 1%。培养 24 h 后,各孔吸弃上清,PBS 洗 3

次, 加入 1 mL PBS, 再加入 AO/EB 混合荧光染色液 20  $\mu\text{L}$ , 混匀染色, 室温放置 5 min 后荧光显微镜下观察细胞形态。

#### 2.4 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

细胞培养、种板、分组给药均同“2.3”项。培养 24 h 后, 各孔吸弃上清, 0.25%胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。加入 1 mL 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 用标记缓冲液重悬细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$ , 吹打混匀后, 取 100  $\mu\text{L}$  加入流式管, 向管中加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC, 室温, 避光, 轻轻地混匀, 孵育 10 min; 再加入 5  $\mu\text{L}$  PI, 室温, 避光, 孵育 5 min; 最后加入 PBS 补液至 500  $\mu\text{L}$ , 轻轻混匀, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

#### 2.5 凋亡蛋白酶 Caspase 3 活性检测

取对数生长期细胞接种到 25  $\text{cm}^2$  的培养瓶中, 培养过夜, 次日更换含大黄素 40、80、160  $\mu\text{mol/L}$  的培养基, 培养 24 h 后, 吸取细胞培养液, 备用。用胰酶消化细胞, 并收集至备用的细胞培养液中, 4  $^\circ\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 吸除上清, 确保细胞不被吸除, PBS 洗涤 1 次。同前吸尽上清后, 按照每 200 万加入 100  $\mu\text{L}$  裂解液的比例加入裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解 15 min 后, 4  $^\circ\text{C}$ 、16 000 r/min 离心 15 min, 将上清转移到冰浴预冷的离心管中, 按照试剂盒说明书进行检测。

#### 2.6 JC-1 探针细胞线粒体膜电位检测

细胞培养、种板、分组给药均同“2.3”项。培养 24 h 后, 各孔吸弃上清, PBS 洗 1 次, 加入 0.25% 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 重悬于 500  $\mu\text{L}$  细胞培养基中。按如下方法装载 JC-1 探针并用流式细胞术分析: 按说明书(产品编号 M8650)方法配制 JC-1 染色工作液和染色缓冲液(冰浴); 加入 500  $\mu\text{L}$  JC-1 染色工作液, 颠倒数次混匀, 细胞培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  孵育 20 min; 离心吸弃上清, 用冰浴的染色缓冲液洗涤细胞 2 次; 500  $\mu\text{L}$  染色缓冲液重悬细胞, 上流式细胞仪检测。激发波长 488 nm, 应用前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)设门后, 通过荧光通道 FL1(绿)和 FL2(红)检测荧光强度。

#### 2.7 ROS 水平的测定

利用荧光探针 DCFH-DA 进行 ROS 检测, 细胞培养、种板、分组给药均同“2.3”项。培养 24 h 后, 各孔吸弃上清后, PBS 洗 1 次, 加入 0.25% 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 加入用

无血清的 DMEM 培养基稀释的、终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的 DCFH-DA 探针溶液 500  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$  孵育 20 min。孵育结束后, 用无血清 DMEM 培养基洗涤 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 最后用 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞, 上流式细胞仪检测。激发波长 475 nm, 发射波长 525 nm。

#### 2.8 细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 含量的测定

利用钙离子荧光探针 Fluo-4 AM 进行细胞内钙离子含量检测。细胞培养、种板、分组给药均同“2.3”项。培养 24 h 后, 各孔吸弃上清后, 用不含钙镁的 HBSS 洗涤细胞 2 次后, 加入 0.25% 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。加入用 HBSS 稀释的、终浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$  的 Fluo-4 AM 探针溶液 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$  孵育 20 min, 再加入 500  $\mu\text{L}$  含有 1% 胎牛血清的 HBSS, 继续孵育 40 min。孵育结束后, 用 HBSS 洗涤细胞 3 次, 最后用 HBSS 溶液重悬细胞, 制成  $1 \times 10^5/\text{mL}$  的溶液, 37  $^\circ\text{C}$  培养 10 min 后, 上流式细胞仪检测。激发波长 494 nm, 发射波长 516 nm。

#### 2.9 细胞内 ATP 含量的测定

细胞培养、种板、分组给药均同“2.3”项。培养 24 h 后, 各孔吸弃上清, PBS 清洗 1 次, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  裂解液, 在冰上操作, 反复吹打使裂解液充分接触并裂解细胞, 裂解 2 min, 4  $^\circ\text{C}$ 、16 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 按照试剂盒说明书进行检测。

#### 2.10 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析。

### 3 结果

#### 3.1 对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

如图 1 所示, HepG2 细胞经不同浓度大黄素作用 24、48 h 后, 呈明显的时间、剂量相关性抑制细

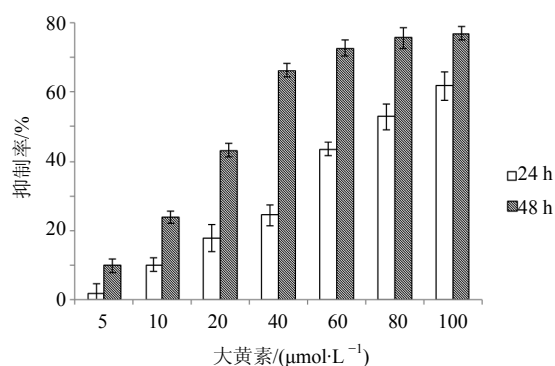


图 1 大黄素对 HepG 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Growth inhibition rate of emodin on hepatoma HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



胞增殖作用, 大黄素 80、100  $\mu\text{mol/L}$  组作用 24 h 后, 抑制率分别为  $(52.96 \pm 3.76)\%$ 、 $(61.87 \pm 4.06)\%$ , 经计算, 大黄素 24 h 半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $(77.42 \pm 1.25) \mu\text{mol/L}$ 。

### 3.2 AO-EB 双染法观察 HepG2 细胞凋亡的形态学不同浓度药物作用于 HepG2 细胞 24 h 后, 对

照组及 40  $\mu\text{mol/L}$  组细胞形态较为完整, 细胞核呈均匀绿色荧光, 无明显凋亡特征, 80、160  $\mu\text{mol/L}$  组亮绿色固缩状细胞和橙红色荧光细胞核数目逐渐增多, 细胞间距增大, 空泡化, 并出现核浓缩、碎裂、凋亡小体等, 提示早期凋亡或晚期凋亡细胞数增多。结果见图 2。

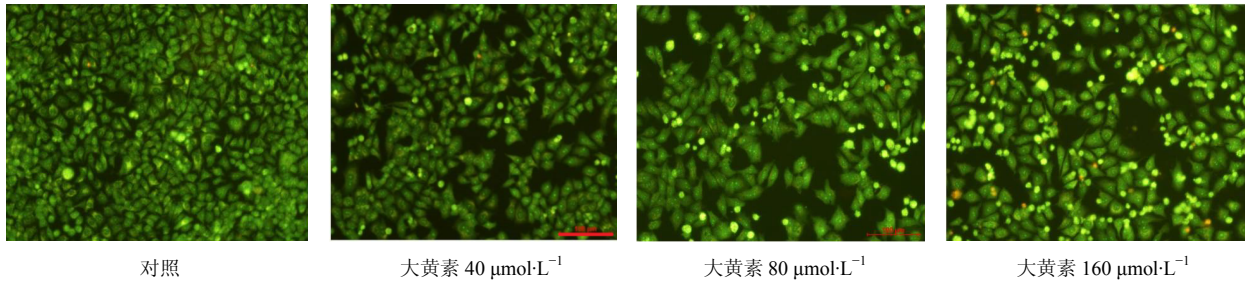


图 2 大黄素对 HepG2 细胞形态学影响

Fig. 2 Morphological effects of emodin on HepG2 cells

### 3.3 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡

Annexin V-FITC 标记早期凋亡细胞及正常细胞, PI 标记晚期凋亡及死亡细胞, 将 Annexin V-FITC 与 PI 匹配使用, 可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞区分开来。Q2 区 ( $\text{Annexin V}^+/\text{PI}^-$ ) 表示早中期凋亡

细胞比率, Q4 区 ( $\text{Annexin V}^+/\text{PI}^+$ ) 表示晚期凋亡细胞比率, 细胞总凋亡比率为 Q2 和 Q4 之和。如图 3、4 所示, 随大黄素浓度增加, HepG2 凋亡细胞率 (早中期+晚期) 逐渐增加, 与对照组比较, 40、80、160  $\mu\text{mol/L}$  组凋亡率均差异显著 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

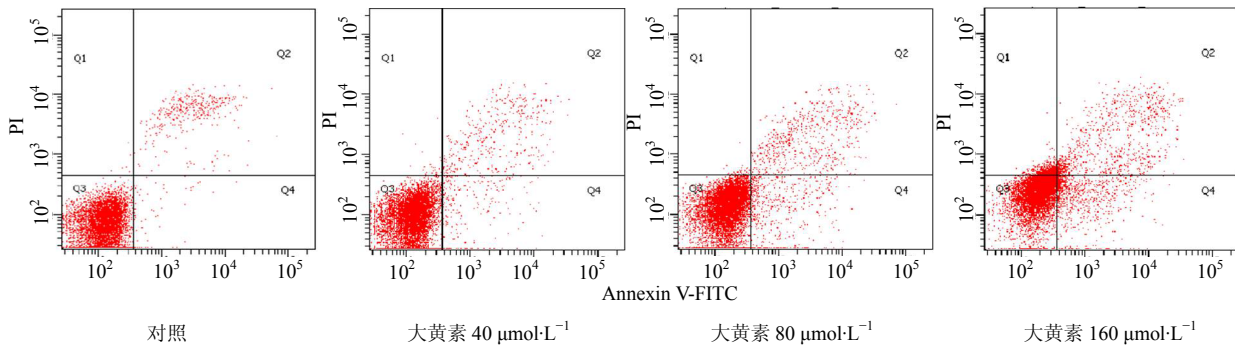


图 3 流式细胞术检测大黄素对 HepG2 细胞的凋亡作用

Fig. 3 Apoptotic effect of emodin on HepG2 cells by flow cytometry

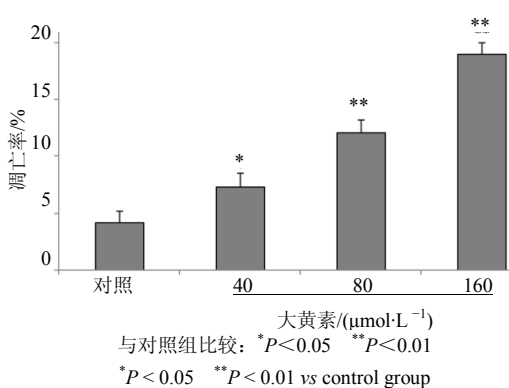


图 4 大黄素对 HepG2 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Apoptotic rate of HepG2 cells treated by emodin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 大黄素对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 是一种广泛用于检测线粒体跨膜电位的理想荧光探针, 在线粒体膜电位较高时, 产生红色荧光。在线粒体膜电位较低时, JC-1 为单体不能聚集在线粒体的基质中, 产生绿色荧光。可通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化, 本实验用绿红平均荧光强度比值来表示, 结果见表 1。随着大黄素浓度增加, 平均荧光强度比值变大, 说明绿色荧光比例增加, 表示线粒体膜电位下降。与对照组比较, 大黄素 80、160  $\mu\text{mol/L}$  组作用于 HepG2 细胞 24 h 后, 线粒体膜电位明显降低 ( $P < 0.05$ )。

表1 大黄素对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of emodin on mitochondrial membrane potential of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | 绿红平均荧光强度比值 |
|-----|---|------------|
| 对照  | —                                       | 1.61±0.11  |
| 大黄素 | 40                                      | 1.79±0.03  |
|     | 80                                      | 2.10±0.11* |
|     | 160                                     | 2.33±0.08* |

与对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

### 3.5 大黄素对 HepG2 细胞 caspase 3 活性的影响

试剂盒法检测大黄素对 HepG2 细胞中 caspase 3 活性, 结果用每毫克蛋白中 caspase 3 含量表示。如表 2 所示, 大黄素浓度为 40、80、160  $\mu\text{mol/L}$ , 细胞 caspase 3 活性与对照组比较均显著增加 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈浓度相关性。

### 3.6 大黄素对 HepG2 细胞内 ROS 的影响

如表 3 所示, 大黄素作用 HepG2 细胞 24 h, 细胞内 ROS 显著升高 ( $P < 0.001$ ), 且呈现明显的剂量相关性。

表2 大黄素对 HepG2 细胞 caspase 3 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of emodin on caspase 3 of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | caspase 3/ $(\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1})$ |
|-----|---|---|
| 对照  | —                                       | 26.64±1.19                                    |
| 大黄素 | 40                                      | 34.01±2.24*                                   |
|     | 80                                      | 44.65±1.92**                                  |
|     | 160                                     | 69.07±4.78***                                 |

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

表3 大黄素对 HepG2 细胞内 ROS 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of emodin on ROS of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | 平均荧光强度           |
|-----|---|------------------|
| 对照  | —                                       | 2 356.7±99.3     |
| 大黄素 | 40                                      | 4 574.7±59.2***  |
|     | 80                                      | 6 600.0±197.9*** |
|     | 160                                     | 9 138.7±297.2*** |

与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group

### 3.7 大黄素对 HepG2 细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的影响

Fluo-4 AM 穿透细胞膜进入细胞后被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo-4, 从而被滞留在细胞内, Fluo-4 若以游离配体形式存在时几乎是非荧光性的, 但是当它与细胞内钙离子结合后可以产生较强的荧光。如表 4 所示, 与对照组比较, 大黄素作用于 HepG2 细胞 24 h 后胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度显著升高 ( $P < 0.01$ 、0.001), 且呈现明显的剂量相关性。

### 3.8 大黄素对 HepG2 细胞内 ATP 含量的影响

利用萤火虫荧光素酶催化荧光素产生荧光时需要 ATP 提供能量的原理, 对样本进行 ATP 含量检测。大黄素和大黄酸作用 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞 ATP 浓度的变化如表 5 所示, 与对照组比较, 大黄素 80、160  $\mu\text{mol/L}$  作用于 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞 ATP 浓度显著下降 ( $P < 0.01$ 、0.001)

表4 大黄素对 HepG2 细胞内钙离子的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of emodin on  $\text{Ca}^{2+}$  of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | 平均荧光强度           |
|-----|---|------------------|
| 对照  | —                                       | 677.0±181.3      |
| 大黄素 | 40                                      | 3 333.7±350.0**  |
|     | 80                                      | 4 193.3±814.8**  |
|     | 160                                     | 4 392.0±478.4*** |

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

表5 大黄素对 HepG2 细胞内 ATP 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of emodin on ATP of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | ATP 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ |
|-----|---|---|
| 对照  | —                                       | 3.32±0.10                                   |
| 大黄素 | 40                                      | 3.33±0.04                                   |
|     | 80                                      | 1.85±0.08**                                 |
|     | 160                                     | 1.16±0.07***                                |

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

## 4 讨论

细胞凋亡由 Kerr 教授根据形态学特征于 1972 年首次提出, 是一种主动的、程序性的由基因控制的细胞自主性死亡方式, 又称为细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD<sup>[11]</sup>), 具有广泛的生理和病理作用, 正常机体大量的细胞凋亡会导致功能和组织损伤。但是对于癌细胞, 能够大量诱导其凋亡, 对肿瘤的增殖具有重要抑制作用。细胞凋亡是一个主动过程, 涉及一系列基因的激活、表达以及

调控等。越来越多的证据表明,线粒体是细胞凋亡调控的活动中心,是凋亡的 executor。本研究从线粒体损伤介导的细胞凋亡入手,初步探讨大黄素对肝癌 HepG2 细胞的作用机制。

结果显示,大黄素在体外对肝癌 HepG2 细胞的增殖具有明显抑制作用,可诱导细胞凋亡,大黄素处理细胞 24 h 后, AO/EB 染色荧光显微镜下观察,随着浓度的增加,细胞核固缩,核破裂,凋亡小体形成, Annexin V/PI 双染法结果显示,细胞凋亡率有增加的趋势,与对照组比较差异显著。

线粒体是细胞生命活动的控制中心,不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心,而且也是细胞凋亡的调控中心。线粒体功能损伤会导致生物能量代谢失常、ATP 合成下降、钙稳态失衡、自由基生成增多,从而诱发细胞凋亡<sup>[12]</sup>。线粒体是内源性 ROS 产生与代谢的主要场所,一方面 ROS 参与正常的各种代谢活动,另一方面即使 ROS 产生过量,也会被 ROS 清除剂清除,维持一定的动态平衡<sup>[13]</sup>;而当各种因素导致 ROS 过量时,极易攻击线粒体,尤其是线粒体 DNA<sup>[14]</sup>。当线粒体 DNA 受损时,又会引发过量 ROS 生成,导致 ATP 合成水平下降<sup>[15-16]</sup>。ROS 的生成极大依赖线粒体膜电位 MMP, MMP 的变化可以反映出线粒体受损的程度,并被认为是细胞凋亡的早期事件<sup>[17]</sup>。线粒体内 ROS 大量产生,可使其离子通透性丧失或者使线粒体膜通透性发生改变,导致线粒体膜电位下降,引起线粒体内外膜之间的通透性转换孔由关闭转换为开放,导致线粒体膜通透性增大,促使细胞凋亡启动因子(细胞色素 C、凋亡蛋白酶激活因子和细胞凋亡诱导因子 AIF 等)从线粒体内释放出来,细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子相互作用,激活 caspase 9,触发 caspase 级联反应,级联反应最终激活凋亡执行者 caspase 3,导致细胞凋亡<sup>[18]</sup>。

本研究采用 JC-1 荧光探针检测 HepG2 细胞线粒体膜电位变化,结果显示,与对照组比较,细胞线粒体膜电位随大黄素浓度的升高显著下降,同时对细胞内 ROS 含量、ATP 水平、Ca<sup>2+</sup>浓度、caspase 3 活性进行检测,结果发现细胞内 ROS 和 Ca<sup>2+</sup>明显升高,ATP 含量明显下降,caspase 3 活性显著增强。以上研究表明,大黄素造成 HepG2 细胞内 ROS 堆积,ATP 合成功能障碍,线粒体膜电位明显下降,进而诱导线粒体通透转运孔开放,导致钙离子和细胞色素 C 的外流,活化 caspase 蛋白家族,导致细

胞凋亡。

大黄素对 HepG2 增殖有明显的抑制作用,对细胞线粒体造成损伤,引起细胞凋亡。有关大黄素对线粒体凋亡通路相关蛋白表达的影响需要进行下一步研究。

#### 参考文献

- [1] 黄伟峰. 大黄素的药理作用研究进展 [J]. 柳州医学, 2013, 26(4): 241-244
- [2] 刘 晗, 高 云. 大黄素药理作用的分子机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(12): 1552-1555.
- [3] Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan P P, et al. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent [J]. Med Res Rev, 2007, 27(5): 591-608.
- [4] 保永亮, 龚晓燕, 黄金玲, 等. 大黄素对人胃癌 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖的影响 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 408-411.
- [5] 刘 岸, 邓姿峰, 胡金喜, 等. 大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 756-759.
- [6] Li J, Liu P, Mao H, et al. Emodin sensitizes paclitaxel resistant human ovarian cancer cells to paclitaxel induced apoptosis in vitro [J]. Oncol Rep, 2009, 21(6): 1605-1610.
- [7] Jelassi B, Anchemin M, Chamouton J, et al. Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(7): 1487-1496.
- [8] 宋永春, 廖子军, 陈晓泉, 等. 大黄素对肺癌细胞株 A549 凋亡及端粒酶逆转录酶表达的影响 [J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(23): 1371-1373.
- [9] 王春光, 刘北忠, 曾 丽, 等. 大黄素诱导裸鼠体内白血病 K562 细胞凋亡过程中 PI3K/AKT 通路相关分子表达的变化 [J]. 肿瘤, 2011, 31(7): 573-579.
- [10] 刘 畅, 罗英花, 蒋雪园, 等. 大黄素对人肝癌 Huh7 细胞的凋亡作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 367-371.
- [11] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. Br J Cancer, 1972, 26: 239-257.
- [12] 冯 玥, 霍 璇, 胡金芳, 等. 替芬泰对 HepG2 细胞的线粒体毒性 [J]. 中国药理学通报, 2016, 33(9): 1248-1252.
- [13] 杨亚萍, 汪亚帷, 李梦佳, 等. DSF-Cu 通过影响线粒体功能和细胞骨架诱导鼻咽癌 CNE-2Z 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(9): 1208-1217.

- [14] Cortassa S, O'rouke B, Aon M A. Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1837(2): 287-295.
- [15] 肖 芳, 钟才高. 外源化学物干扰肝细胞线粒体 ATP 合成体系机制的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2010, 24(3): 232-235.
- [16] Kaim G, Dimroth P. ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage [J]. *EMBO J*, 1999, 18(15): 4118-4127.
- [17] 任艳青, 田宇柔, 李 琛, 等. 京尼平昔及其体内代谢产物京尼平对 HepG2 细胞毒性的比较及机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(12): 1755-1761.
- [18] Long F Y, Chen Y S, Zhang L, et al. Pennogenyl saponin induce cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 112-120.