

发生肠道微生态紊乱,导致大肠杆菌等产 β 葡萄糖醛酸苷酶的细菌数量剧增, β 葡萄糖醛酸苷酶的量增加,进而导致黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠肠道分解加快,分解成容易吸收的黄芩素和汉黄芩素。黄芩素和汉黄芩素吸收后在体内很快又转换成黄芩苷和汉黄芩苷,最终表现为黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠血浆中的AUC显著增加。

本研究发现糖尿病状态下黄芩苷和汉黄芩苷的 $C_{\max}$ 1、 $C_{\max}$ 2、AUC₍₀₋₂₄₎明显增加,而且黄芩苷在糖尿病大鼠中的 $t_{1/2}$ 显著延长。这提示在临床上应用黄连解毒汤进行糖尿病及其并发症的治疗时必须进行剂量及给药间隔调整,以避免不良反应的出现。

参考文献

- [1] Kim Y C, Oh E Y, Kim S H, *et al*. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous torasemide in diabetic rats induced by alloxan or streptozotocin [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2005, 26(8): 371-378.
- [2] Price V F, Jollow D J. Strain differences in susceptibility of normal and diabetic rats to acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1986, 35(4): 687-695.
- [3] Watanabe K, Terada K, Sato J. Intestinal absorption of cephalexin in diabetes mellitus model rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2003, 19(2-3), 91-98.
- [4] Zhou H, Mineshita S. The effect of oren-gedoku-to on experimental colitis in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51(9): 1065-1074.
- [5] 陆付耳, 冷三华, 屠庆年, 等. 黄连解毒汤与黄连素对2型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢影响的比较研究 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2002, 31(6): 662-665.
- [6] Yotsumoto H, Yanagita T, Yamamoto K, *et al*. Inhibitory effects of oren-gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: Evidence from the cultured Hepa G2 cells and *in vitro* assay of ACAT [J]. *Planta Med*, 1997, 63(2): 141-145.
- [7] Sekiya N, Kainuma M, Hikami H, *et al*. Oren-gedoku-to and Keishibukuryo-gan-ryo inhibit the progression of atherosclerosis in diet-induced hypercholesterolemic rabbits [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(2): 294-298.
- [8] Xu J H, Murakami Y, Matsumoto K, *et al*. Protective effect of oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 73(3): 405-413.
- [9] Ikenoto S, Sugimura K, Yoshida N, *et al*. Antitumor effects of *Radix Scutellariae* and its components baicalin, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines [J]. *Urology*, 2000, 55(6): 951-955.
- [10] Wu J A, Attle A S, Zhang L, *et al*. Anti-HIV activity of medicinal herbs: Usage and potential development [J]. *Am J Chin Med*, 2001, 29(1): 69-81.
- [11] Shieh D E, Liu L T, Lin C C. Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalin, baicalin, and wogonin [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(5A): 2861-2865.
- [12] Shao Z H, Li C Q, Terry L, *et al*. Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(10): 1885-1895.
- [13] Lee H H, Yang L L, Wang C C, *et al*. Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate- and glucose deprivation-induced neuronal death [J]. *Brain Res*, 2003, 986(1-2): 103-113.
- [14] Deng Y X, Lu T, Liu X D, *et al*. High-performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic study of wogonoside in rat serum after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction [J]. *Bioméd Chromatogr*, 2006, 20(10): 1098-1102.
- [15] Thomas M C, Tikellis C, Kantharidis P, *et al*. The role of advanced glycation in reduced organic cation transport associated with experimental diabetes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 311(2): 456-466.
- [16] Akao T, Kawabata K, Yanagisawa E, *et al*. Baicalin, the predominant flavone glucuronide of *Radix Scutellariae*, is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52(12): 1563-1568.

芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞增殖和凋亡的作用及机制

胡 芬, 孙文武, 宋志成, 杨文修

(南开大学物理学院 生物物理系 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要: 目的 研究芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用, 并探讨可能的机制。方法 应用细胞计数测定增殖, Hoechst/PI 双染法及 DNA 片断化分析细胞凋亡特征, 流式细胞术检测细胞周期分布。进一步应用二氢乙锭荧光染色测量活性氧产物, Western blotting 检测胞浆细胞色素 C (Cyt-c) 的量, 比色法检测 caspase-3 和 caspase-9 活性。结果 芦荟大黄素剂量和时间依赖性抑制 Jurkat T 细胞增殖。芦荟大黄素诱发细胞核皱缩, 核 DNA 片断化, 细胞周期出现亚 G₁ 期凋亡峰, 且停滞于 G₂/M 期。芦荟大黄素介导细胞内活性氧水平显著提高, 线粒体释放 Cyt-c 量显著增加, caspase-3 和 caspase-9 活性显著增强。结论 芦荟大黄素剂量依赖性抑制 Jurkat T

收稿日期: 2007-05-28

基金项目: 天津市科委重点科技攻关项目 (983113411)

作者简介: 胡 芬 (1982—), 女, 湖北省天门人, 博士生, 主要从事细胞信号转导和调控网络的研究。

Tel: 13821252322 E-mail: vickyhufen@yahoo.com.cn

细胞增殖并诱导其凋亡。诱导凋亡的机制中,包括增加活性氧产物和线粒体损伤途径。

关键词: 芦荟大黄素; Jurkat T 细胞系; 增殖; 凋亡; 细胞周期; 活性氧; 线粒体

中图分类号: R 286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0231-06

Effects and mechanism of aloe-emodin on proliferation and apoptosis of Jurkat T cell line

HU Fen, SUN Wen-wu, SONG Zhi-cheng, YANG Wen-xiu

(Department of Biophysics in School of Physics, Key Laboratory of Bioactive Materials of Education Ministry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Objective To explore the effects and mechanism of aloe-emodin on proliferation and apoptosis of human leukemia cell line Jurkat T. **Methods** The effect of aloe-emodin on the proliferation of Jurkat T cells was studied through trypan blue exclusion. The effect of aloe-emodin on cell apoptosis was observed by Hoechst/PI dyeing and DNA fragmentation analysis. The distribution of cell cycle was examined by flow cytometry (FCM). ROS Production was analyzed using dihydroethidium fluorescent staining. Cytosolic C (Cyt-c) was measured by Western blotting and cytosolic caspases-3 and caspase-9 activities were estimated through colorimetric assay. **Results** Aloe-emodin inhibited Jurkat T cells proliferation on a time- and dose-dependent manner. Aloe-emodin induced nucleus crinkle of some cells and DNA fragmentation. Apoptosis peak sub G₁ appeared and the cell cycle was arrested in G₂/M after aloe-emodin treatment. Aloe-emodin mediated intracellular ROS level elevating, Cyt-c release from mitochondrion enhancing and cytosolic caspase-3 and caspase-9 activity increasing. **Conclusion** Aloe-emodin inhibits Jurkat T cell line proliferation and induces cell apoptosis on a dose-dependent manner. The mechanism of aloe-emodin induced cell apoptosis involves increasing ROS production and mitochondrial impairment pathway.

Key words: aloe-emodin; Jurkat T cell line; proliferation; apoptosis; cell cycle; ROS; mitochondria

大黄在临床上具有泻下、增强胃肠道运动、利胆、保肝、抗炎抑菌、抗病毒等多种作用。大黄的游离蒽醌类化合物包括大黄素、大黄酸、大黄素甲醚和芦荟大黄素等,是其主要的有效成分。近年国内外的药理学研究发现,大黄蒽醌类衍生物在抑癌、抗炎和抗病毒感染方面表现出较强的生物活性。其抑癌的作用途径包括:抑制癌细胞的生长、增殖、迁移、转化和诱导癌细胞凋亡^[1~4]。对芦荟大黄素抗肿瘤效应的研究表明,其可抑制人肝癌细胞系 HepG₂、Hep 3B^[1],肺癌细胞系 CH27、H460^[2,3]等实体肿瘤,但对白血病作用的研究较少,已报道芦荟大黄素能诱导人类早幼粒白血病细胞系 HL-60 凋亡^[4]。Jurkat T 细胞系是从人急性淋巴细胞白血病患者的外周血中提取构建的一种肿瘤细胞系,本实验以其作为标本,研究芦荟大黄素对其增殖和凋亡的作用特征及机制,从而为该类药物在临床上治疗肿瘤提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂: 芦荟大黄素购自天津药物研究院(质量分数 98%); RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司; 碘化丙啶 (PI)、Hoechst 33342、二氢乙锭 (DHE)、DM SO 购自 Sigma 公司; caspase-3、caspase-9 检测试剂盒

购自 Assay Designs 公司; 多克隆小鼠抗人细胞色素 C (Cyt-c) 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养及给药: Jurkat T 细胞系由南开大学生命科学院曹又佳教授馈赠。细胞于 RPMI-1640 (含 10% FBS) 完全培养基, 37℃、5% CO₂ 中进行培养, 维持浓度在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /mL。芦荟大黄素用 DM SO 溶解制成高浓度母液, 实验前稀释为指定浓度, 作用于细胞时 DM SO 体积分数 < 0.1%。

1.3 细胞增殖测定: 收获细胞, 铺入 96 孔板, 每孔 100 μ L, 细胞初始密度为 4×10^5 /mL, 在不同培养时间点用台盼蓝染色法进行活细胞计数。

1.4 Hoechst 33342/PI 双染法检测细胞凋亡: 收获细胞, 铺入 24 孔板, 每孔加入 20 μ g/mL PI 和 10 μ g/mL Hoechst 33342 染色 15 min, 荧光显微镜下检测, 激发波长为 340 nm。Hoechst 染色的凋亡细胞发射亮蓝色荧光, PI 染色的死亡细胞发射红色荧光。

1.5 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片断化: 收获细胞 (1×10^6 /mL), PBS 洗 2 次。加入细胞裂解液 (1% NP40, 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5) 充分裂解后 $1600 \times g$ 离心 5 min, 取上清液, 加入 1% SDS 和 100 μ g/mL RNase, 56℃ 作用 3 h。加入 200 μ g/mL 蛋白酶 K, 37℃ 作用 3 h。加

入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠和 2 倍体积的冰乙醇, 冰上过夜沉淀。5 000 × g 离心 15 min, 去上清, 干燥。TE 溶解沉淀。1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色并照相。细胞凋亡时染色质发生浓缩, 染色质 DNA 在核小体单位之间的连接处断裂, 形成 180~200 bp 整数倍的寡核苷酸片段, 在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱 (DNA ladder)。

1.6 流式细胞术检测细胞周期^[5]: 收获细胞 (2 × 10⁶/mL), PBS 洗 2 次后用 70% 冰乙醇 4 固定 24 h。去除固定液, PBS 洗 2 次后, 将细胞重悬于含 50 μg/mL RNase A 的 PBS 中, 37 孵育 30 min。加入 50 μg/mL PI, 37 孵育 30 min。400 目筛网滤过后进入流式细胞仪分析。

1.7 DHE 荧光染色观测活性氧变化: DHE 被活细胞摄入后, 可在细胞内超氧化物阴离子的作用下脱氢, 转化成溴化乙锭 (EB)。EB 可与 RNA 或 DNA 结合产生红色荧光, 荧光强度可代表活性氧水平。收集细胞于含 5% FBS 和 5 μmol/L DHE 的 RPMI-1640 培养液中, 37 孵育 40 min。用荧光显微镜观测各样本荧光强度的变化, 并通过 Meta-fluo 软件对荧光强度进行定量。激发波长为 488 nm, 发射波长为 610 nm。

1.8 Western blotting 检测胞浆 Cyt-c 释放量: 收获细胞 (1 × 10⁷/mL), PBS 洗 3 次, 加入细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, 0.5% 去氧胆酸钠, 1 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40, 1 mmol/L PMSE, 150 mmol/L NaCl) 冰上混匀处理 1 h。4 , 12 000 × g 离心 20 min 收上清, Bradford 法测定蛋白浓度。各取 50 μg 蛋白质加入 SDS 上样缓冲液, 100 变性 10 min。用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质后, 转移至硝酸纤维素膜。5% 的 BSA 封闭膜 2 h。膜与一抗 (多克隆小鼠抗人细胞色素 C 抗体) (稀释比例 1 1 000) 4 过夜培养, βactin 作为内参。TBST 洗膜后与二抗 (辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG) (稀释比例 1 20 000) 室温孵育 1 h 以上。TBST 洗膜 3 次, ECL (增强化学发光法) 显色, 显影, 定影, 拍下照片。

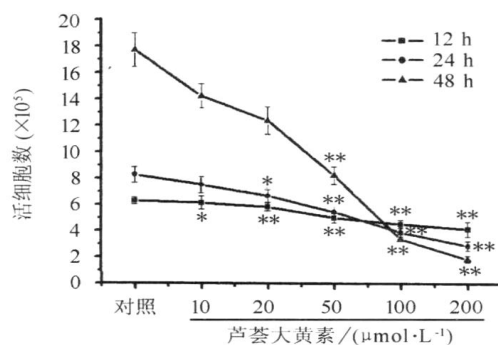
1.9 比色法检测 caspase-3, caspase-9 活性^[6]: caspase-3 和 caspase-9 的活性分别依据底物 DEVD-pNA 和 LEHD-pNA 被剪切成 pNA 后测定 405 nm 处的吸光度值而确定。收获细胞 (5 × 10⁶/mL), 冰 PBS 洗 3 次, 重悬于 200 μL RIPA 缓冲液中, 4 , 20 000 × g 离心 30 min, 取上清制备样本。以已知活性的标准品 caspase-3, caspase-9 测定标

准曲线, 并测定样本的 A₄₀₅ 值, 换算为标准单位 (U/mL)。

1.10 数据处理: 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异显著性用双侧 t 检验判别。Hoechst/PI 双染法的实验进行 3 次观测, 每次每种情况设置 5 个孔, 均得到相似结果, 选取一例代表性结果示于图中。琼脂糖凝胶电泳的实验重复 3 次, 得到相似结果, 选取一例代表性结果示于图中。

2 结果

2.1 芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞增殖的抑制作用: 设置正常培养液的对照组和不同浓度 10、20、50、100、200 μmol/L 芦荟大黄素的加药组, 分别于含 5% FBS 的 RPMI-1640 培养液, 37 、5% CO₂ 中培养, 进行活细胞计数。由图 1 可见, 培养 12、24、48 h 后, 芦荟大黄素浓度分别 > 10 μmol/L、> 20 μmol/L 和 > 50 μmol/L 与对照组比较, 差异显著。培养 24、48 h 后, 芦荟大黄素抑制作用的 IC₅₀ 分别为 100、50 μmol/L。表明芦荟大黄素对细胞增殖的抑制作用具有时间和剂量依赖性。



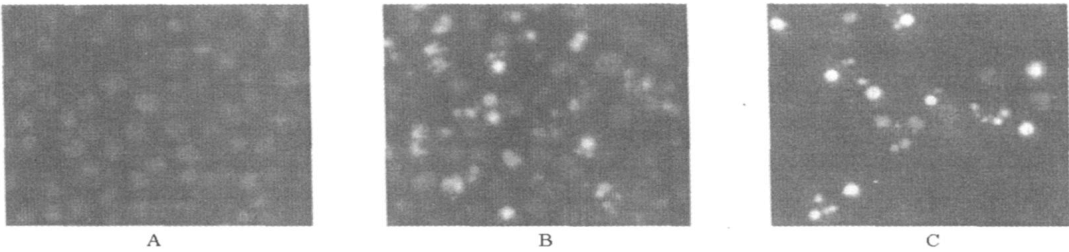
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

图 1 芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 1 Inhibition of aloesin on proliferation of Jurkat T cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.2 芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞核的影响: 选取培养 24 h 作为代表时间, 进一步研究芦荟大黄素对细胞核的影响。设置对照组和 20、100 μmol/L 的加药组, 培养 24 h 后, 用 Hoechst 和 PI 进行染色。正常细胞均呈暗蓝色荧光 (图 2-A), 凋亡细胞的染色质皱缩, Hoechst 染色后呈亮蓝色荧光 (图中亮点), 膜破损的死细胞被 PI 着色呈红色荧光 (图中次亮点)。在 20 μmol/L 芦荟大黄素的作用下, 部分细胞发生凋亡或已经死亡 (图 2-B)。图 2-C 中细胞数明显减少, 进一步证明 100 μmol/L 芦荟大黄素



A-对照组 B、C-20、100 μmol/L 芦荟大黄素组
A-control group B, C-20 and 100 μmol/L aloë-emodin group

图 2 Hoechst/PI 双染法检测芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞核的影响

Fig 2 Influence of aloë-emodin on cell nucleolus by Hoechst/PI dyeing

作用 24 h 后细胞增殖被显著抑制, 并且细胞凋亡和死亡比例显著增加。

2.3 芦荟大黄素诱导 Jurkat T 细胞核 DNA 片段化: 设置对照组和 20 μmol/L 芦荟大黄素的加药组, 培养 24 h 后, 通过琼脂糖凝胶电泳检测细胞核 DNA 的片段化情况。由图 3 可见, 在芦荟大黄素的作用下, 核染色质 DNA 呈现典型的梯形电泳图谱, 进一步证明了芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞的凋亡诱导作用。

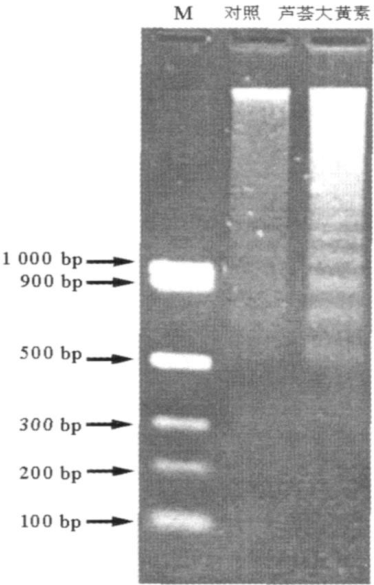


图 3 DNA Ladder 分析芦荟大黄素诱导的 Jurkat T 细胞核 DNA 片段化

Fig 3 DNA Ladder Analysis on cell nucleolus DNA fragmentation of Jurkat T cells induced by aloë-emodin

2.4 芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞周期时相分布的影响: 细胞经乙醇固定, 以 PI 染色后, 通过流式细胞仪分析细胞核 DNA 量的分布。表 1 结果显示, 20、100 μmol/L 芦荟大黄素作用 24 h 后, 均出现 DNA 低量颗粒区 (亚 G₁ 期凋亡峰), 同时, 随药物

表 1 芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 1 Effect of aloë-emodin on cell cycle of Jurkat T cells ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	C/ (μmol·L ⁻¹)	凋亡率/ %	细胞周期/%		
			G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	-	0	46.09±3.69	37.70±3.63	16.21±1.08
芦荟大黄素	20	24.32±3.83	31.50±1.94**	45.18±4.13**	23.32±2.20**
	100	42.93±2.89	17.49±3.43**	46.92±1.75**	35.59±3.05**

与对照组比较: **P<0.01

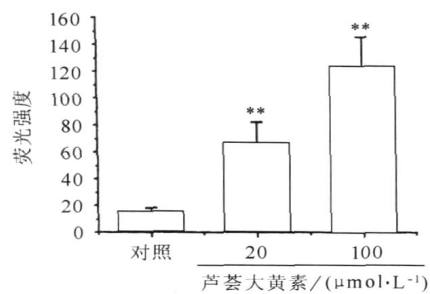
**P<0.01 vs control group

浓度增加, G₀/G₁ 期细胞比例逐渐降低, G₂/M 期逐渐升高, 进一步说明了芦荟大黄素对细胞增殖的抑制作用。

2.5 芦荟大黄素诱导 Jurkat T 细胞内活性氧升高: 为进一步探讨芦荟大黄素诱导细胞凋亡的信号通路中上游的相关信号分子, 用 DHE 与超氧阴离子反应物产生的荧光作为指示剂, 检测药物对细胞内活性氧的影响。设置对照组和 20、100 μmol/L 的加药组, 培养 12 h。图 4 显示, 芦荟大黄素作用 12 h 后细胞内活性氧水平明显提高, 20、100 μmol/L 芦荟大黄素作用下活性氧水平分别提高到对照组的 4.27 倍和 7.93 倍。

2.6 芦荟大黄素诱导 Jurkat T 细胞浆 Cyt-c 增加: 利用 Western blotting 检测胞浆 Cyt-c 水平, 如图 5 所示, 在 100 μmol/L 芦荟大黄素作用 12 h 后, 胞浆 Cyt-c 量显著增加。

2.7 芦荟大黄素诱导 Jurkat T 细胞胞浆 caspase-3 及 caspase-9 活性增加: 检测线粒体损伤途径中的关键效应子 caspase-3 和 caspase-9 的活性。由表 2 可见, 不同浓度的芦荟大黄素作用下, 细胞内 caspase-3 和 caspase-9 的活性均明显上调, 20、100 μmol/L 芦荟大黄素作用 12 h 后, caspase-3 的活性分别为基础值的 3.69 倍和 6.48 倍; caspase-9 的活性分别为基础值的 5.78 和 8.66 倍。



与对照组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group

图 4 芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞内活性氧的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Fig 4 Effect of aloe-emodin on ROS in Jurkat T cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

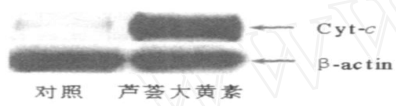


图 5 芦荟大黄素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 对 Jurkat T 细胞胞浆 Cyt-c 水平的影响

Fig 5 Effect of aloe-emodin (100 $\mu\text{mol/L}$) on Cyt-c content in Jurkat T cells

表 2 芦荟大黄素对 Jurkat T 细胞胞浆中 caspase-3 和 caspase-9 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Effect of aloe-emodin on cytosolic caspase-3 and caspase-9 activity in Jurkat T cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组 别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	caspase-3/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	caspase-9/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	-	7.57 $\pm$ 0.30	7.25 $\pm$ 0.10
芦荟大黄素	20	27.93 $\pm$ 0.66 **	41.90 $\pm$ 0.49 **
	100	49.02 $\pm$ 0.62 **	62.78 $\pm$ 0.22 **

与对照组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

本研究通过细胞计数、细胞核染色、DNA 片段化分析及细胞周期时相分布检测等一系列实验结果显示: 芦荟大黄素剂量依赖性的抑制 Jurkat T 细胞的增殖; 显著地诱导细胞凋亡和死亡; 芦荟大黄素导致 Jurkat T 细胞核 DNA 片段化; 芦荟大黄素作用下出现亚 G_1 期凋亡峰, 且停留在 G_2/M 期的细胞比例增加。根据研究报道^[7-10], 结合本研究结果, 推测芦荟大黄素抑制 Jurkat T 细胞增殖的作用途径可能是通过抑制调控细胞增殖信号通路上游的蛋白激酶活性, 进而抑制细胞周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶等的合成和活性, 使细胞停滞于 G_2/M 期和亚 G_1 期, 阻滞了细胞分裂的正常运行。为进一步了解与药物诱导细胞凋亡相关的信号途径, 分别检测了活性

氧产物、Cyt-c 的释放、caspase-3 及 caspase-9 活性的变化。结果表明: 芦荟大黄素作用 12 h 后, 显著增加了活性氧产物; 胞浆中 Cyt-c 水平显著增加; caspase-3 和 caspase-9 活性显著增加。

关于 ROS 参与细胞凋亡的信号传导途径, 除 ROS 直接氧化损伤细胞膜和线粒体膜的作用外, 近年研究表明, ROS 可通过增强蛋白激酶 MAPK 级联反应中的激酶活性参与介导凋亡过程^[11-13]。Lee^[2]等报道, 芦荟大黄素剂量依赖性诱导人肺癌细胞系 CH27 和 H460 发生凋亡。在细胞凋亡期间, 观察到 Bcl-2 家族成员的表达和转位, Cyt-c 从线粒体释放到胞浆, 并观察到 caspase-3、8、9 的活化。

本研究结果提示: 在芦荟大黄素诱导 Jurkat T 细胞凋亡的信号通路中, 增加的活性氧产物, 可能使 JNK 持续活化, 介导线粒体膜通透性孔洞 PT 的形成, 促使 Cyt-c 等释放, 进而活化 caspase 级联反应, 引起细胞核 DNA 片段化等一系列凋亡反应。关于芦荟大黄素如何介导活性氧的产生, 以及活性氧介导 Jurkat T 细胞凋亡的信号传导的具体途径还有待更深入的研究。

致谢: 南开大学生命科学院曹又佳教授对本项研究的指导和帮助。

参考文献:

[1] Kuo P L, Lin T C, Lin C C. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines [J]. *Life Sci*, 2002, 71: 1879-1892.

[2] Lee H Z, Hsu S L, Liu M C, et al. Effects and mechanism of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 431: 287-295.

[3] Lee H Z. Protein kinase C involvement in aloe-emodin- and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell [S]. *Brit J Pharmacol*, 2001, 134: 1093-1103.

[4] Chen H C, Hsieh W T, Chang W C, et al. Aloe-emodin induced in vitro G_2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42(8): 1251-1257.

[5] Vemes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 243: 167-190.

[6] Gurtu V, Kain S R, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis [J]. *Anal Biochem*, 1997, 251(1): 98-102.

[7] Sarno S, Moro S, Meggio F, et al. Toward the design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 93: 159-168.

[8] Ruzzene M, Penzo D, Pinna L A. Protein kinase CK2 inhibitor TBB induces apoptosis and caspase-dependent degradation of Hs1 in Jurkat cells [J]. *Biochem J*, 2002, 364(Pt 1): 41-47.

[9] Zhang L, Lau Y K, Xi L, et al. PTK inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu induced cellular transfor-

- mation and metatasis associated properties [J]. *Oncogene*, 1998, 16: 2855-2863.
- [10] Guo J, Xiao B, Zhang S, *et al* Growth inhibitory effects of gastric cancer cells with an increase in S phase and alkaline phosphatase activity repression by aloe-emodin [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(1): 85-88.
- [11] Tournier C, Hess P, Yang D D, *et al* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway [J]. *Science*, 2000, 288(5467): 870-874.
- [12] Zhang Y, Chen F. Reactive oxygen species (ROS), trouble-makers between nuclear factor- κ B (NF- κ B) and c-Jun NH (2)-terminal kinase (JNK) [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(6): 1902-1905.
- [13] Spierings D, McStay G, Saleh M, *et al* Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis [J]. *Science*, 2005, 310(5745): 66-67.

新藤黄酸体内外抗肿瘤作用研究

程 卉, 彭代银, 王效山, 汤立建, 黄 鹏, 李庆林*

(安徽中医学院 安徽省现代中药重点实验室, 安徽 合肥 230038)

摘 要: 目的 初步探讨新藤黄酸的体内外抗肿瘤作用。方法 采用MTT方法观察新藤黄酸对多种肿瘤细胞的增殖抑制作用; 采用4、8、16、32 mg/kg剂量新藤黄酸作用于人肿瘤裸小鼠(BALB/c-nude)模型, 观察新藤黄酸的体内抗肿瘤作用。结果 MTT法显示新藤黄酸对培养的人肿瘤细胞(人结肠癌细胞HCT-8、人肝癌细胞Bel-7402、人胃癌细胞BGC-823、人非小细胞肺癌细胞A549、人卵巢癌细胞A2780)增殖有一定的抑制作用, 作用72 h的 IC_{50} 在1.75~3 μ mol/L; 8、16、32 mg/kg新藤黄酸iv给药, 对人非小细胞肺癌A549细胞肿瘤移植的模型小鼠有一定的抑制肿瘤增长作用($P < 0.05$)。但4~16 mg/kg剂量的新藤黄酸iv给药, 对人肝癌Bel-7402肿瘤模型的抑制生长作用不明显。结论 新藤黄酸能够抑制培养的肿瘤细胞生长; iv给药时对A549细胞肿瘤移植的模型小鼠肿瘤增殖有明显的抑制作用。

关键词: 新藤黄酸; 肿瘤细胞; 细胞增殖; 抗肿瘤

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0236-05

Antitumor effects of neogambogic acid both in vivo and in vitro

CHENG Hui, PENG Dai-yin, WANG Xiao-shan, TANG Li-jian, HUANG Peng, LI Qing-lin

(Anhui Key Laboratory of Modern Chinese Materia Medica, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the antitumor effects of neogambogic acid both *in vivo* and *in vitro*. **Methods** Cancer cell lines were incubated with various concentrations of neogambogic acid for 24, 48, and 72 h, antiproliferative activities against cancer cells were measured by MTT assay; The BALB/c-nude mice were transplanted with cancer cells, then iv by 4, 8, 16, and 32 mg/kg neogambogic acid, the size and weight of the tumor were measured. **Results** Neogambogic acid could inhibit the proliferation of cancer cell lines (human colon carcinoma HCT-8 cell, human hepatoma Bel-7402 cell, human gastric carcinoma BGC-823 cell, human non-small cell lung cancer A549 cell, and human ovarian cancer A2780 cell). The 50% inhibiting concentration (IC_{50}) of neogambogic acid of 72 h was from 1.75 to 3 μ mol/L. It also showed the inhibition on the growth of A549 in nude mice at the doses of 8, 16, and 32 mg/kg of neogambogic acid intravenously ($P < 0.05$). However neogambogic acid did not show the obvious inhibition on the growth of tumor Bel-7402 at the dose from 4 to 16 mg/kg. **Conclusion** It suggests that neogambogic acid has the inhibitory effects on the proliferation of human cancer cell lines *in vitro* and on the tumor growth of nude mice transplanted with A549 cell *in vivo*.

Key words: neogambogic acid; tumor cells; cell proliferation; anti-tumor

藤黄系藤黄科植物藤黄 *Garcinia hanburyi* Hook. f. 所分泌的干燥树脂。主产于南亚等国, 同

收稿日期: 2007-06-13

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (070413128); 安徽省科技攻关重点项目 (0601313B)

作者简介: 程 卉 (1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤药理学。Tel: (0551) 5169051 E-mail: chenghui1983fxq@126.com

* 通讯作者 李庆林 Tel: (0551) 5169051 E-mail: qinglin.lee@hotmail.com