

• 药理与临床 •

大黄素对裸鼠体内 K562 细胞移植瘤的抑制作用及其与调控 Caspase 3 和 Caspase 9 表达的关系

王春光, 刘北忠*, 金丹婷, 王 翀, 朱 丹, 吴 燕, 钟 梁

(重庆医科大学 医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘 要:目的 探讨大黄素对 K562 细胞裸鼠移植瘤的生长抑制作用及其与 Caspase 3 和 Caspase 9 表达变化的关系。方法 建立裸鼠 K562 细胞皮下移植瘤模型, 随机分为大黄素低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 3 个实验组, 以及模型组和羟基脲 (120 mg/kg) 阳性对照组, 每组 5 只, ip 连续给药 12 d, 测量各组裸鼠肿瘤体积, 称取瘤体质量, 计算抑瘤率。采用 HE 染色光镜和透射电镜观察肿瘤细胞的凋亡情况, 应用 RT-PCR 检测肿瘤组织中 caspase 3 和 caspase 9 mRNA 表达水平。Western blotting 法检测肿瘤组织中 proCaspase 3 和 proCaspase 9 蛋白的表达。结果 大黄素低、中、高剂量组肿瘤相对体积 (RTV) 分别为 5.23 ± 0.24 、 4.38 ± 0.17 、 3.57 ± 0.31 ; 与模型组 (10.45 ± 0.47) 相比, 大黄素处理组肿瘤体积明显缩小, 具有统计学意义 ($P < 0.01$)。光镜和电镜结果表明大黄素能够诱导 K562 细胞发生明显的凋亡。RT-PCR 结果表明不同剂量的大黄素能够引起 caspase 3 和 caspase 9 mRNA 的表达上调且有剂量依赖性。与模型组相比, 大黄素处理组的 proCaspase 3 和 proCaspase 9 蛋白均出现明显的下调。结论 大黄素能够明显抑制人 K562 细胞裸鼠移植瘤的生长, 其机制可能与激活 Caspase 3 和 Caspase 9 信号转导通路有关。

关键词: 大黄素; K562; 移植瘤; 裸鼠; 细胞凋亡; Caspase 3; Caspase 9

中图分类号: R733.73 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)05-0751-06

Inhibition of emodin on xenografted human K562 cells in nude mice and regulation on relationship of Caspase 3 and Caspase 9 expression

WANG Chun-guang, LIU Bei-zhong, JIN Dan-ting, WANG Chong, ZHU Dan, WU Yan, ZHONG Liang
(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine
in Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effects of emodin on xenografted human K562 cells in BALB/c nude mice and its relationship with the expression of Caspase 3 and Caspase 9. **Methods** The subcutaneously transplanted tumor models of human K562 cells in nude mice were established and then were divided randomly into five groups, including emodin (25, 50, and 100 mg/kg), negative control, and hydroxy urine group (120 mg/kg), each of which was composed of five nude mice and then received ip injection in the following 12 d. All mice were sacrificed, tumor volume was measured, and then the weights of tumors were recorded. And the tumor inhibition rate was calculated. Apoptosis morphological transformation of K562 cells induced by emodin was detected by transmission electron microscope and HE staining. RT-PCR was used to detect the expression of caspase 3 and caspase 9 mRNA. Expression of proCaspase 3 and proCaspase 9 protein was determined by Western blotting analysis. **Results** The relative tumor volume (RTV) was significantly lower in low, moderate, and high dose emodin than that in the negative control group. Compared to negative control group (5.23 ± 0.24 , 4.38 ± 0.17 , and 3.57 ± 0.31 vs 10.45 ± 0.47 , $P < 0.01$). All the emodin treatment groups showed more obvious inhibition rate ($P < 0.05$). Apoptosis and necrosis of tumor cells were found in emodin-treated groups under the light and electron microscope. The results of RT-PCR indicated emodin up-regulated the expression of caspase 3 and caspase 9 mRNA in a dose-dependent manner. Compared with negative control group, the expression of proCaspase 3 and proCaspase 9 protein was down-regulated by emodin at different dosages. **Conclusion**

①收稿日期: 2009-08-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300449); 国家中医药管理局资助项目 (0203ZP52); 重庆医科大学校级课题 (XBYB2007108)

作者简介: 王春光 (1978—), 男, 山东人, 硕士, 主要研究方向为中药抗肿瘤分子机制研究。

Tel: 13983354573 E-mail: wegrz@163.com

* 通讯作者 刘北忠 Tel: (023) 66645783 E-mail: liubeizhong@yahoo.com.cn

Emodin could significantly inhibit the growth of K562 cells xenografts in nude mice. The mechanism may be correlated to activate the Caspase 3 and Caspase 9 signaling pathway.

Key words: emodin; K562; xenograft; nude mouse; apoptosis; Caspase 3; Caspase 9

大黄素是从大黄及其他中药中提取出来的蒽醌类化合物,具有抗肿瘤、抗炎、促进成骨细胞分化等广泛的药理作用^[1~3]。尽管体外实验已证实其对多种肿瘤细胞有抑制作用,如乳腺癌^[4]、前列腺癌^[5]、膀胱癌^[6]、肺腺癌^[7]、胃癌^[8]、肝癌^[9]等,但其抗肿瘤的体内实验甚少报道,无法预测体内外实验可能存在的差异,而影响其临床应用。大黄素对常见的白血病细胞模型 K562 的体内抑制作用至今未见任何报道,而本课题组前期的研究表明大黄素在体外对 K562 细胞显示出很强的抗肿瘤效果^[10]。因此,本研究旨在通过建立白血病细胞 K562 的裸鼠皮下移植瘤模型,在体内观察不同剂量的大黄素对慢性粒细胞肿瘤生长的影响并探讨其作用机制,从而为大黄素的临床开发与合理应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料: BALB/c 裸鼠 30 只(雌性,4~6 周龄,体质量 15~21 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司,由重庆医科大学实验动物中心 SPF 级饲养。K562 细胞株本实验室保存,大黄素(质量分数大于 98%) 购自陕西森弗生物有限公司;兔抗人 pro-Caspase 3、proCaspase 9 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;PrimeScript™ RT reagent Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 荷瘤小鼠模型的建立:动物模型的建立参照文献方法^[11]。取对数生长期的 K562 细胞用 PBS 稀释成 5×10^7 的单细胞悬液,取 5 只裸鼠,每只裸鼠前肢腋下接种 0.2 mL,待 5 只裸鼠移植瘤长到 1 cm³ 时,无菌条件下剖取瘤组织,切成 0.2 cm³ 大小的瘤块。用剪刀在另外 25 只裸鼠的左或右上腹开一缺口,用眼科镊子通过缺口向左或右腋下近背部方向轻轻剥离,开一隧道。然后将肿瘤组织块用眼科镊子轻轻塞进隧道尽头,无菌条件下缝合切口。接种完毕后待瘤体直径至 0.5 cm 时开始用药。

1.3 分组与给药:25 只造模裸鼠随机分为 5 组,模型组:ip 含 1% DMSO 的生理盐水溶液,大黄素低、中、高剂量组:分别 ip 大黄素(25、50、100 mg/kg) 0.2 mL,阳性对照组:ip 羟基脲(120 mg/kg) 0.2 mL,各组均每天给药 1 次,连续 12 d。

1.4 肿瘤体积和抑瘤率的测定:每 2 天用游标尺测量一次肿瘤最长径(a)和最短径(b),计算肿瘤体

积(肿瘤体积 = $a \times b^2 / 2$),观察肿瘤体积的变化。计算相对肿瘤体积(RTV, $RTV = V / V_0$, V_0 为分组给药前的肿瘤体积, V 为用药处理过程中所测得的肿瘤体积)。动物处死后完整的剖取肿瘤块,称质量,计算抑瘤率[抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量 × 100%]。

1.5 病理组织学检查:解剖裸鼠,取瘤组织以 4% 多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋后,4 μm 切片,HE 染色在光学显微镜(×400)下进行组织学观察。

1.6 透射电子显微镜观察:取 0.5 mm³ 大小的肿瘤组织 2~3 块,迅速入预冷的 2.5% 戊二醛溶液固定 4 h,再用 1% 锇酸固定 2 h,乙醇、丙酮梯度脱水,环氧树脂渗透包埋,0.5 μm 超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,透射电镜观察并拍照,对肿瘤细胞凋亡进行定性分析。

1.7 RT-PCR 法检测肿瘤组织中 caspase 3 及 caspase 9 mRNA 的表达:用 Trizol 裂解瘤组织,提取瘤组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,然后 PCR 扩增。引物序列及主要反应参数如下: caspase 3 的上游引物为 5'-TGGCCAATTCTGCCATAAGG-3',下游引物为 5'-TGGTTCATCCCCATTGACTGT-3'; caspase 9 上游引物为:5'-GGGCTCACTCTGAAGACCTG-3',下游引物为:5'-CCCGAGTGAGACTTCTGGAG-3';β-actin 的上游引物为 5'-ACCCCACTGAAAAAGATGA-3',下游引物为 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3。RT-PCR 反应条件:(1) cDNA 合成和预变性:37 ℃、15 min,85 ℃、5 s。(2) PCR 扩增:94 ℃、45 s,55 ℃、45 s,72 ℃、60 s,30 个循环。(3)延伸:72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1.5 g/L 的琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像仪上成像,分析软件分析条带的亮度及丰度比值。

1.8 Western blotting 检测肿瘤组织中 proCaspase 3 和 proCaspase 9 蛋白的表达:称取 50 mg 新鲜肿瘤组织,提取蛋白质,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件为:60 V、30 min,150 V、2 h。电泳结束后电转移法将蛋白从凝胶中转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭过夜,一抗兔抗人 proCaspase 3 和 proCaspase 9 单克隆抗体 10 mL (1:5 000 稀释) 室温

孵育 2 h 后, PVDF 膜用 ECL 化学发光试剂盒处理并显影, 检测阳性蛋白的表达。

1.9 统计学处理: 数据用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组及组间比较采用方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 大黄素对裸鼠皮下肿瘤生长的影响: 治疗前各组裸鼠肿瘤大小差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示各组肿瘤体积具有可比性。治疗结束后大黄素

低、中、高剂量组和阳性对照组 RTV 分别为 5.23 ± 0.24 , 4.38 ± 0.17 , 3.17 ± 0.31 , 3.58 ± 0.15 , 与模型组 (RTV 为 10.45 ± 0.47) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。用药结束后裸鼠移植瘤生长情况见图 1, 移植瘤生长曲线见图 2。各组裸鼠体质量、瘤质量及抑瘤率见表 1。结果表明大黄素各剂量均有抑制移植瘤生长的作用, 大黄素高剂量组的抑瘤率与阳性对照组的抑瘤率间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

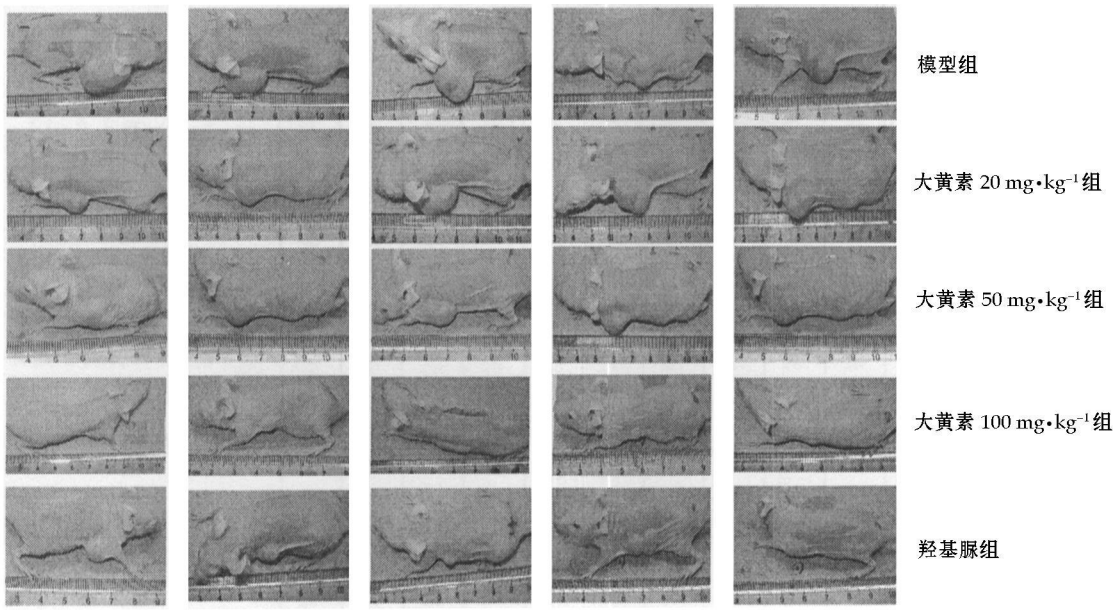


图 1 治疗结束后各组裸鼠 K562 细胞移植瘤大小

Fig. 1 Tumor size of xenografted tumor in nude mice with K562 cells in each group after treatment

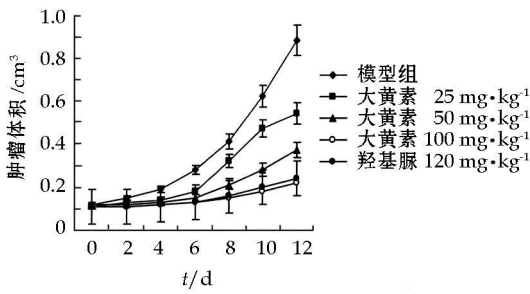


图 2 大黄素对裸鼠 K562 细胞移植瘤肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effect of emodin on volume of human K562 cell xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

2.2 移植瘤病理 HE 染色情况: 光学显微镜下观察各组肿瘤组织病理变化, 发现模型组瘤组织整齐排列, 细胞核大, 胞质少, 瘤细胞生长活跃, 核分裂多, 瘤细胞异型性大, 瘤块中央有少量坏死组织 (图 3-A); 大黄素低剂量组肿瘤细胞体积缩小, 核分裂可见, 出血坏死较模型组明显增多, 有较多肿瘤细胞凋亡 (图 3-B); 大黄素中剂量组肿瘤细胞体积变小, 偶

表 1 大黄素对裸鼠 K562 细胞移植瘤的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

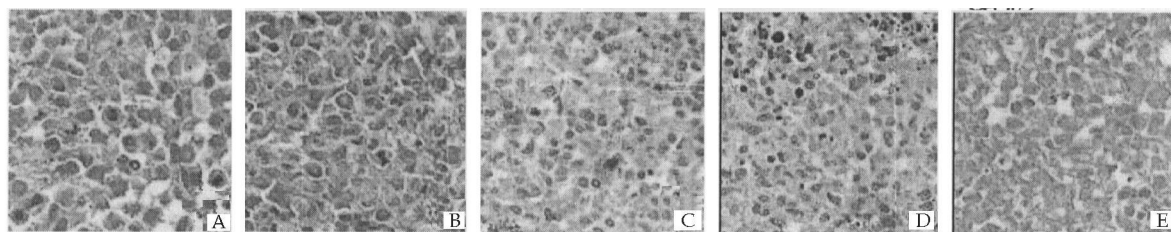
Table 1 Inhibition of emodin on growth of K562 cell xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)					
组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	体质量/g		瘤质量/ g	抑瘤率/ %
		用药前	用药后		
模型	-	21.19 ± 0.21	26.45 ± 0.15	1.66 ± 0.45	-
大黄素	25	22.65 ± 0.43	23.87 ± 0.32	1.02 ± 0.16*	38.5
	50	20.47 ± 0.61	21.23 ± 0.45	0.64 ± 0.12*	61.4
	100	21.38 ± 0.57	21.57 ± 0.36	0.36 ± 0.22**	78.3
	120	22.98 ± 0.51	23.59 ± 0.22	0.41 ± 0.18**	75.6

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

见核分裂像, 瘤组织中出血坏死多 (图 3-C); 大黄素高剂量组可见大片红染无结构的坏死区, 淋巴细胞浸润, 瘤细胞核深染, 固缩, 细胞质丰富并见成片的透明样变 (图 3-D); 羟基脲组肿瘤细胞体积明显变小, 极少见核分裂, 瘤组织见广泛的出血坏死现象 (图 3-E)。

2.3 透射电镜观察肿瘤细胞凋亡形态学特征: 模型



A 模型组 B~D 大黄素 25、50、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 E 羟基脲 (120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组

A model group B~D emodin 25, 50, and 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ groups E hydroxy urine (120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group

图 3 光镜观察 K562 肿瘤细胞 HE 染色结果

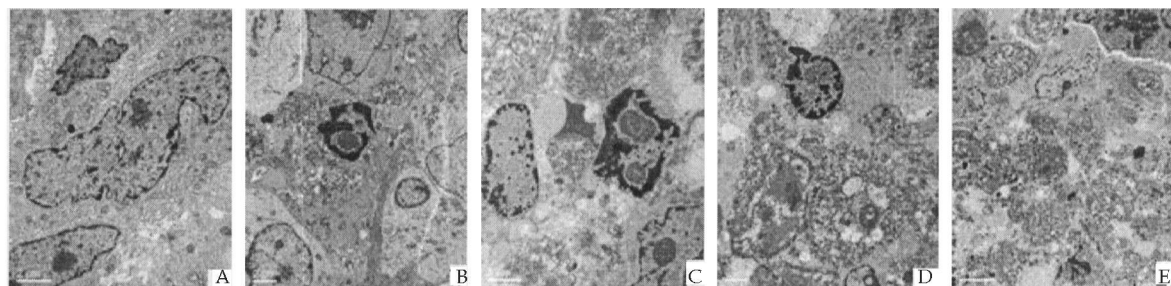
Fig. 3 HE Staining of K562 tumor cells under light microscope

组: 细胞结构清晰, 核膜薄而完整, 核仁明显, 染色质均匀, 细胞器丰富, 线粒体结构存在, 表明细胞增殖迅速, 能量合成较多, 瘤细胞生长活跃, 未见典型凋亡细胞 (图 4A)。大黄素用药组: 随着大黄素剂量的增加, 更多的细胞出现坏死凋亡; 瘤细胞固缩, 核膜凹陷或消失, 部分核结构不清; 异染色质凝集, 边聚逐渐明显; 有的形成典型的凋亡小体, 细胞器减少, 线粒体肿胀受损严重, 脊变低或消失; 部分空泡化, 内质网扩张, 部分胞质内可见电子致密颗粒 (图 4B~D)。阳性对照羟基脲组: 细胞微绒毛减少或消失, 线粒体等细胞器结构不清, 部分细胞核固缩或溶解, 以溶解坏死为主, 部分胞质中可见到大小不等的电子致密颗粒, 表明细胞坏死较多, 能量合成受阻,

瘤细胞活性降低 (图 4E)。

2.4 肿瘤组织中 caspase 3 和 caspase 9 mRNA 的表达: RT-PCR 结果用 Quantity One 软件分析, 电泳结果显示 (图 5), 大黄素各用药组随着药物剂量的增加, 裸鼠肿瘤细胞中 caspase 3 和 caspase 9 mRNA 的表达逐渐增加。以内参照 β -actin 校正, 以校正值做为基因的表达丰度, 表明大黄素低、中、高剂量组 caspase 3 和 caspase 9 mRNA 的表达丰度均成剂量-反应关系; 与模型组相比, 均有统计学意义 ($P < 0.05$, 0.01), 而大黄素高剂量组的 caspase 3 和 caspase 9 mRNA 的表达丰度与阳性对照组相比, 不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 肿瘤组织中 proCaspase 3 和 proCaspase 9 蛋



A 模型组 B~D 大黄素 25、50、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 E 羟基脲 (120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组

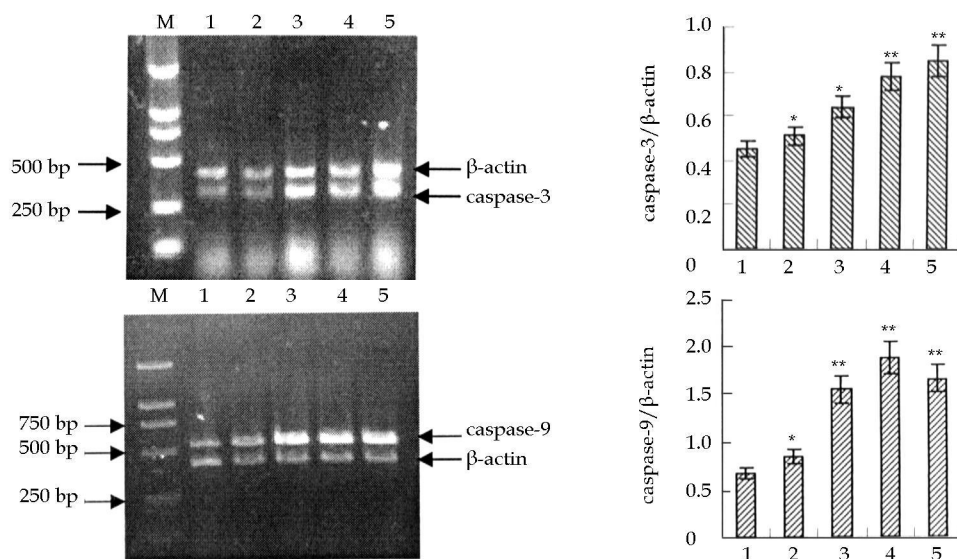
A model group B~D emodin 25, 50, and 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ groups E hydroxy urine (120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group

图 4 透射电镜观察 K562 肿瘤细胞形态变化

Fig. 4 Microstructural changes of K562 cells under transmission electron microscope

白的表达: 通常情况下 Caspase 处于非活化的酶原状态即 proCaspase, 凋亡开始后 proCaspase 才被水解产生有活性的 Caspase。为了更准确反映 Caspase 3 和 Caspase 9 是否在大黄素诱导 K562 细胞裸鼠移植瘤的凋亡中起作用以及其中的表达变化, 通过 Western 印迹来检测 proCaspase 3 和 proCaspase 9 的表达变化。结果表明大黄素作用后 proCaspase 3 和 proCaspase 9 蛋白的表达随着药物剂量的增大逐渐减少, 显著低于模型组 (图 6); 以内参照 β -actin 校正, 以校正值做为基因的表达丰

度, 表明大黄素低、中、高剂量组 proCaspase 9 和 proCaspase 9 蛋白的表达丰度均成剂量-反应关系; 与模型组相比, 均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而高剂量组的 proCaspase 9 和 proCaspase 3 蛋白的表达丰度与阳性对照组相比, 不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。在大黄素作用后 proCaspase 3 和 proCaspase 9 被激活形成了有活性的 Caspase 3 和 Caspase 9 参加凋亡反应。最终结果表明随着大黄素剂量的增加, Caspase 3 和 Caspase 9 的表达是逐渐升高的, 这与 RT-PCR 的结果是一致的。



M- Markers 1- 模型组 2~ 4- 大黄素 25、50、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 5 羟基脲 ($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
M- Markers 1- model group 2~ 4- emodin 25, 50, and 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ groups 5 hydroxy urine ($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group

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

图 5 大黄素对裸鼠 K562 细胞移植瘤组织 caspase 3 和 caspase 9 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig 5 Effect of emodin on mRNA expression of caspase 3 and caspase 9 in K562 cells xenograft tissue of nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

表 2 大黄素处理后移植瘤组织中 proCaspase 9 和 proCaspase 3 蛋白表达的半定量结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Semi quantity analysis on expression of proCaspase 9 and proCaspase 3 proteins in K562 cell xenograft tissue of nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组 别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	蛋白表达量	
		proCaspase 9/ β -actin	proCaspase 3/ β -actin
模型	—	2.15 $\pm$ 0.01	1.87 $\pm$ 0.08
大黄素	25	1.75 $\pm$ 0.08*	1.21 $\pm$ 0.11*
	50	1.36 $\pm$ 0.11*	0.65 $\pm$ 0.09*
	100	1.10 $\pm$ 0.09*	0.23 $\pm$ 0.04*
	120	1.07 $\pm$ 0.12*	0.21 $\pm$ 0.02*

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

量的大黄素对肿瘤的生长均有明显的抑制作用,其中以高剂量抑瘤作用最佳,与羟基脲处理组具有同等抑瘤效应,表明大黄素必须达到一定浓度才能最大限度地发挥抑瘤作用,虽然大黄素达到了很大的浓度,但其毒性作用并没有相应增加,这一点可以从用药后裸鼠体质量的改变看出。光镜和电镜观察表明大黄素低、中、高剂量均能明显诱导肿瘤细胞凋亡,其中以高剂量最为显著,而羟基脲组瘤细胞则以坏死为主。

细胞凋亡是受基因调控的一种程序性死亡,其特征性的形态学改变为 DNA 的裂解,染色质的固缩,膜的发泡,细胞的皱缩以及最终形成凋亡小体。目前认为至少有 3 条信号通路参与细胞的凋亡:线

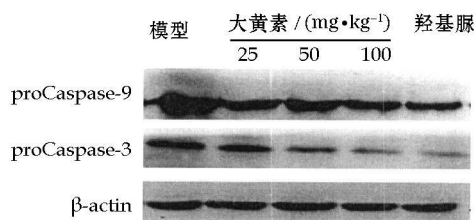


图 6 大黄素对裸鼠 K562 细胞移植瘤组织 proCaspase 3 和 proCaspase 9 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of emodin on expression of proCaspase 3 and proCaspase 9 in K562 cell xenograft tissue of nude mice

3 讨论

慢性粒细胞白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是一种与费城染色体有关的造血组织肿瘤性疾病,发病率和病死率高,化疗对晚期 CML 疗效不理想,而且长期化疗引起骨髓抑制,化疗耐药及停药后复发率高,加之骨髓配型成功率极低使得 CML 治疗成为世界性医学难题。某些中成药提取物具有广谱低毒的抗肿瘤作用。许多研究表明大黄素在体外对恶性肿瘤细胞具有显著的抑瘤作用^[2]。本课题组前期的研究表明大黄素在体外对 K562 细胞显示出极强的抗肿瘤效果,并且能够活化 Caspase 3 和 Caspase 9。为了进一步探讨大黄素对 CML 的作用机制,本课题组构建了 K562 细胞的裸鼠皮下肿瘤模型。通过研究表明低、中、高剂

粒体通路, 死亡受体通路, 内皮网通路。Caspase 是细胞凋亡的核心, 3 条凋亡通路中几乎涉及 Caspase 的级联反应^[12]。凋亡过程可最终划分为启动、效应与降解 3 个功能截然不同的阶段。Caspase 2、Caspase 8、Caspase 9 和 Caspase 10 是主要的凋亡启动分子, 而 Caspase 3、Caspase 6 和 Caspase 7 参与了凋亡的效应阶段。在细胞凋亡信号的刺激下细胞色素 C 从线粒体内释放到胞浆内, 当 dATP 存在时胞浆内细胞色素 C 与信号接头分子 Apaf 1 (apoptotic protease activating factor-1) 结合, 募集并激活 Caspase 9, 继而活化 Caspase 3, 活化的 Caspase 3 能裂解 DNA 修复相关分子, 凋亡抑制蛋白, 细胞外基质蛋白及骨架蛋白等使细胞凋亡^[13]。Caspase 3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。在通常情况下 Caspase 3 处于非活化的酶原状态 (pro-Caspase 3)。凋亡开始后, pro-Caspase 3 被水解产生有活性的 Caspase 3, 继而剪切另外的 Caspase 底物, 其中包括重要的多聚 (ADP 核糖) 聚合酶 PARP [poly-(ADP ribose) polymerase]^[14, 15]。Caspase 家族成员共同构成了复杂的相互作用网络, 调控细胞凋亡的发生, 因而成为肿瘤治疗的靶目标之一。普遍认为 Caspase 9 是凋亡的启动子, 是线粒体凋亡途径的关键蛋白酶, 处于 Caspase “瀑布式”激活的顶端; Caspase 3 是凋亡的主要执行者^[16]。

研究结果表明大黄素在诱导肺癌^[17]、宫颈癌^[18]等癌细胞凋亡时有 Caspase 3 和 Caspase 9 的激活。但大黄素对慢性粒细胞白血病细胞株 K562 的作用及其机制未见报道。本实验研究结果表明随着大黄素剂量的增加, 裸鼠肿瘤组织中 Caspase 3 和 Caspase 9 mRNA 的表达均呈现上调趋势, 与模型组相比具有统计学意义。同时 Western blotting 检测显示随着大黄素剂量的增加, 肿瘤组织中 pro-Caspase 3 和 pro-Caspase 9 量逐渐减少, 这也预示 pro-Caspase 3 和 pro-Caspase 9 发生裂解活化, 产生活性 Caspase 3 和 Caspase 9 量增多。因此, 研究表明大黄素处理荷 K562 细胞移植瘤的裸鼠后, pro-Caspase 9 首先被裂解活化产生有活性的 Caspase 9, 通过一些中间过程有活性的 Caspase 9 继而裂解 pro-Caspase 3 产生有活性的 Caspase 3, 有活性的 Caspase 3 继而剪切另外的 Caspase 底物引起级联反应, 最终导致移植瘤发生凋亡, 从而发挥体内抗肿瘤作用, 大黄素体内抑瘤作用的其他机制

尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 何太平, 莫丽儿, Chen G G, 等. 大黄素对人高转移卵巢癌细胞中癌相关基因表达的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1679-1684
- [2] 王春光, 刘北忠. 大黄素抗肿瘤机制研究进展 [J]. 国际中医中药杂志, 2008, 30(3): 228-230
- [3] 林文琴, 杨 潇, 荆 河, 等. 大黄素对大鼠肝移植排斥反应相关细胞因子的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1853-1855
- [4] Huang Z, Chen G, Shi P. Effect of emodin on the gene expression profiling of human breast carcinoma cells [J]. *Cancer Detect Prev*, 2009, 32(4): 286-291
- [5] Yu C X, Zhang X Q, Kang L D, *et al.* Emodin induces apoptosis in human prostate cancer cell LNCaP [J]. *Asian J Androl*, 2008, 10(4): 625-634
- [6] Lin J G, Chen G W, Li T M, *et al.* Aloe emodin induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells through the p53 dependent apoptotic pathway [J]. *J Urol*, 2006, 175(1): 343-347
- [7] Lee H Z. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(1): 11-20
- [8] Chen S H, Lin K Y, Chang C C, *et al.* Aloe emodin induced apoptosis in human gastric carcinoma cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(11): 2296-2303
- [9] Shieh D E, Chen Y Y, Yen M H, *et al.* Emodin induced apoptosis through p53 dependent pathway in human hepatoma cells [J]. *Life Sci*, 2004, 74(18): 2279-2290
- [10] 金丹婷, 刘北忠, 刘 畅, 等. 大黄素诱导白血病 K562 细胞凋亡及对 Caspase 3 基因表达的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(18): 1633-1636
- [11] 周定安, 黄文芳, 曾亚莉, 等. 辛伐他汀诱导裸鼠体内 K562 细胞凋亡过程中 NF- κ B 通路的分子变化 [J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(10): 1128-1130
- [12] Thornberry N A, Lazebnik Y. Caspases: enemies within [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1312-1316
- [13] Hu Y, Benedict M A, Ding L, *et al.* Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1 mediated caspase 9 activation and apoptosis [J]. *EMBO J*, 1999, 18(13): 3586-3595
- [14] Ko C H, Shen S C, Hsu C S, *et al.* Mitochondrial dependent, reactive oxygen species independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(6): 913-927
- [15] Wang I K, Lir Shiao S Y, Lin J K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase 9 and caspase 3 in leukaemia HL-60 cells [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(10): 1517-1525
- [16] Lai G H, Zhang Z, Sirica A E. Celecoxib acts in a cyclooxygenase 2-independent manner and in synergy with emodin to suppress rat cholangiocarcinoma growth *in vitro* through a mechanism involving enhanced Akt inactivation and increased activation of caspases 9 and -3 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(3): 265-271
- [17] Su Y T, Chang H L, Shyue S K, *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
- [18] Srinivas G, Anto R J, Srinivas P, *et al.* Emodin induce apoptosis of human cervical cancer cells through poly (ADPribose) polymerase cleavage and activation of caspase 9 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 473(2-3): 117-125