

大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞增殖和凋亡的影响

刘岸¹, 邓姿峰³, 胡金喜¹, 韩邵伟¹, 黄莉莉², 柯品好², 林胜璋^{1*}

1. 温州医学院附属第二医院 外科, 浙江 温州 325027

2. 温州医学院, 浙江 温州 325000

3. 温州医学院附属眼视光医院, 浙江 温州 325000

摘要: 目的 探讨大黄素对人胰腺癌细胞株 Panc-1 增殖和凋亡的影响。方法 人胰腺癌细胞株 Panc-1 经不同浓度大黄素 (10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用 24、48、72 h 后, 应用 CCK-8 法检测细胞增殖, 光学显微镜下观察细胞形态学改变, 流式细胞术检测细胞凋亡。结果 大黄素对 Panc-1 细胞的增殖抑制作用呈明显的浓度和时间依赖性, 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素作用 Panc-1 细胞 24 h 后凋亡率分别为 7.1%、15.2%、21.4%。结论 大黄素可显著抑制人胰腺癌 Panc-1 细胞生长, 大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞株的增殖抑制作用可能以诱导细胞凋亡方式为主。

关键词: 大黄素; 胰腺癌; 增殖; 凋亡; CCK-8 法

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0756-04

Effect of emodin on cell proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer cell line Panc-1

LIU An¹, DENG Zi-feng³, HU Jin-xi¹, HAN Shao-wei¹, HUANG Li-li², KE Pin-yu², LIN Sheng-zhang¹

1. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China

2. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

3. The Affiliated Eye Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

Key words: emodin; pancreatic neoplasm; proliferation; apoptosis; CCK-8 method

胰腺癌是较常见的消化系统恶性肿瘤, 近年来发病率持续上升。但目前传统化疗药如吉西他滨治疗胰腺癌的效果不理想, 吉西他滨总有效率 < 20%。因此寻求新的药物治疗胰腺癌从而改善病人预后显得尤为迫切。

大黄素 (emodin) 是从大黄属、蓼属、鼠李属植物和番泻叶中分离出来的主要有效成分, 其具有多种生物学功能, 如抗菌、抗炎、抗肿瘤、免疫抑制等^[1-9], 最新研究表明大黄素抑制人卵巢癌细胞增殖方式以诱导细胞凋亡为主^[4]。本研究探讨大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞体外增殖和凋亡的影响, 初步探讨大黄素用于胰腺癌治疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

大黄素 (质量分数 > 98%)、二甲基亚砷

(DMSO, Sigma 公司), 胎牛血清、RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司), CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术研究), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物发展有限公司)。

1.2 药物配制

大黄素用 DMSO 配制成 0.2 mmol/L, -20 °C 冰箱保存, DMSO 终体积分数小于 0.1% (此体积分数对细胞增殖无明显影响)。

1.3 细胞培养

人胰腺癌细胞株 Panc-1 购自 ATCC, 培养在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。细胞单层贴壁生长, 至 70%~80% 融合时胰蛋白酶消化传代。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖

收稿日期: 2010-07-31

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2080708)

作者简介: 刘岸, 男, 湖南省岳阳市人, 硕士在读。Tel: (0577)85323289 E-mail: hosrml@126.com

*通讯作者 林胜璋 Tel: (0577)85323899 E-mail: Wzf2Lsz@163.com

收集处于对数生长期的 Panc-1 细胞,制成单细胞悬液,以每孔 4×10^3 个细胞接种到 96 孔板,细胞贴壁后,分别加入不同浓度的大黄素(10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)培养 24、48、72 h,同时设空白调零组(不加细胞仅加入等量的 PBS),以及阴性对照组(加细胞同时加入等量的 0.1% DMSO 溶液)。药物作用结束前 1 h,各孔加入 CCK-8 0.01 mL,继续培养 1 h,酶标仪(Bio-Tek, ELX800)测定吸光度(A_{450})值,计算细胞存活率。实验重复 3 次。

细胞存活率 = (实验组 A_{450} 值 - 空白调零组 A_{450} 值) / (对照组 A_{450} 值 - 空白调零组 A_{450} 值)

1.5 形态学观察

浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的 Panc-1 细胞悬液接种于 6 孔培养板。每孔 5 mL,过夜贴壁后,第 2 天更换培养液,加入 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素分别培养 24 h 后,光学显微镜(Nikon, TS100)下观察细胞形态变化。

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期细胞以每孔 4×10^5 个接种在 6 孔培养板中,生长至 90%融合时,加入 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素分别培养 24 h 后,胰蛋白酶消化,1 000 r/min 离心 5 min。冷 PBS 洗 2 次,按试剂盒说明用 500 μL 结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μL AnnexinV-FITC 混匀后,再加入 5 μL PI,混匀,室温避光培养 15 min 后上机检测,检测细胞数为 1×10^4 个/组。激发波长 488 nm,发射波长 530 nm,Cell quest 软件分析。

1.7 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进

行 t 检验。

2 结果

2.1 大黄素对 Panc-1 细胞的增殖抑制作用

如图 1 所示,不同浓度的大黄素作用于 Panc-1 细胞,呈现出明显的增殖抑制作用($P < 0.05$),且具时间和剂量依赖性。20 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素作用于 Panc-1 细胞 24、48、72 h 后的细胞存活率分别为 79.74%、62.04%、51.3%; 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素作用于 Panc-1 细胞 24 h 后细胞存活率分别为 79.74%、69.41%、39.23%。

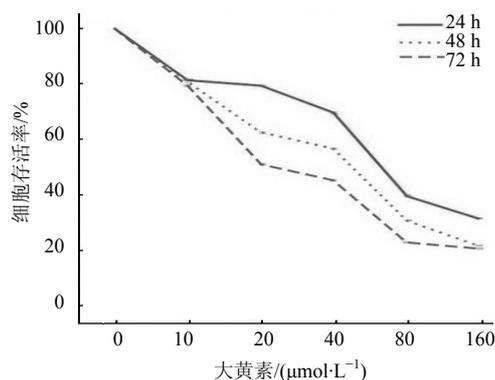


图 1 大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of emodin on proliferation of Panc-1 cells

2.2 形态学改变

正常 Panc-1 细胞呈圆形,贴壁生长,轮廓清楚,形态饱满,胞质丰富,生长旺盛;随着大黄素浓度增大,贴壁的正常细胞数逐渐减少,细胞间距变大,细胞出现体积缩小,胞浆中出现颗粒沉积,脱落漂浮的细胞增多,出现越来越多的凋亡及坏死细胞,见图 2。

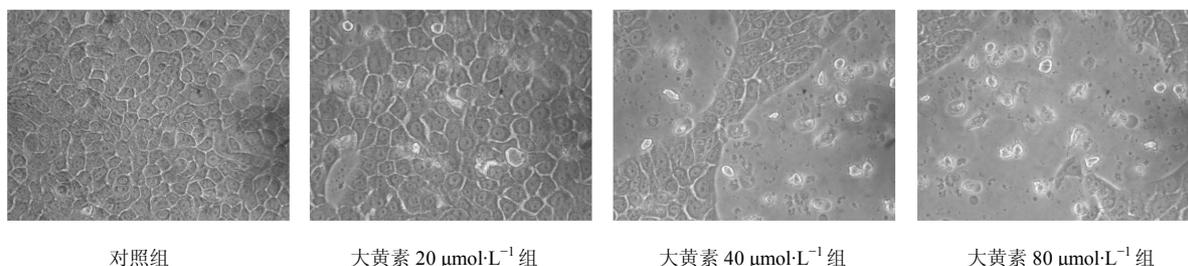


图 2 大黄素作用 24 h 后对 Panc-1 细胞形态变化的影响

Fig. 2 Effect of emodin on morphological changes of Panc-1 cells after 24 h

2.3 大黄素对 Panc-1 细胞凋亡率的影响

用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡。不同浓度大黄素作用于 Panc-1 细胞,流式细胞仪检测分析,计算早期凋亡细胞百分率,对照组仅产生 0.9%~3.1%的早期凋亡细胞,20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 大

黄素作用 Panc-1 细胞 24 h 后分别产生 $(7.1 \pm 1.2)\%$ 、 $(15.2 \pm 2.3)\%$ 和 $(21.4 \pm 4.1)\%$ 的早期凋亡细胞,与对照组相比均有统计学意义($P < 0.05$) (图 3)。表明大黄素可诱导人胰腺癌 Panc-1 细胞凋亡,呈浓度依赖性。

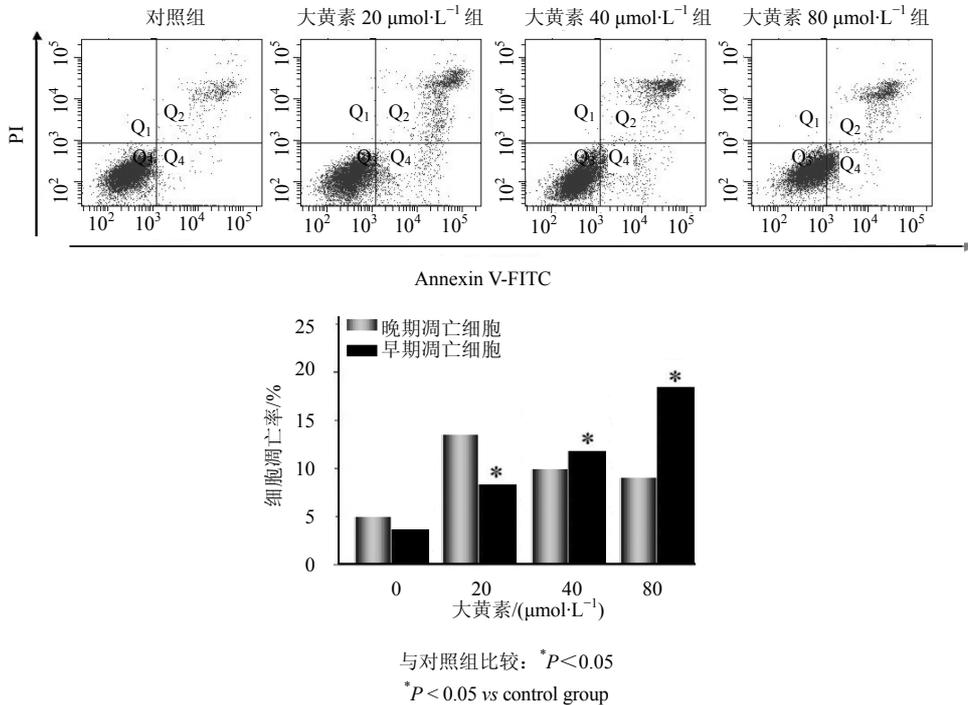


图 3 大黄素对 Panc-1 细胞凋亡的影响
Fig. 3 Effect of emodin on apoptosis of Panc-1 cells

3 讨论

由于进展期胰腺癌对传统化疗药物的耐药性以及早期转移，胰腺癌至今仍为人类最难治疗的恶性肿瘤之一。另外，许多病人诊断为胰腺癌时已属晚期，往往失去手术机会^[10]。化疗是治疗胰腺癌最重要的手段之一，但传统化疗药物单独应用会在胰腺癌治疗中产生明显的抗药性^[11-12]。因此，中医药抗肿瘤近年来受到越来越多的关注。

大黄素与阿霉素、柔红霉素等抗癌药同属蒽醌类化合物，是一种酪氨酸激酶 II 抑制剂^[13]，近年来国内外大量研究表明，大黄素可通过诱导依赖 p53 细胞途径^[14]、促使 ROS 产生^[15]和引发 caspases 级联反应^[16]等机制起到抑制肿瘤细胞生长和诱导细胞凋亡的作用。在分子水平，Wang 等^[17]应用电化学方法观察到大黄素通过和 DNA 结合，嵌入细胞 DNA 双链中，阻止肿瘤细胞分化和增殖。

最新报道大黄素能有效抑制大鼠胶质细胞瘤、乳腺癌等肿瘤细胞生长，其抑制细胞增殖方式以诱导细胞凋亡为主^[5-6]。本研究中笔者发现大黄素对人胰腺癌细胞株 Panc-1 有明确的增殖抑制作用，呈明显的浓度和时间依赖性，并且随着大黄素浓度增加，Panc-1 细胞呈现明显形态学改变，不仅漂浮细胞增多，典型凋亡细胞也不断增加。同时流式细胞术检

测结果表明大黄素作用人胰腺癌 Panc-1 细胞后可诱导更多的细胞发生早期凋亡，呈显著的浓度依赖性。流式细胞术检测结果与细胞增殖实验结果基本一致，从而表明大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞生长抑制方式可能也是以诱导细胞凋亡方式为主。

本研究表明大黄素可显著抑制人胰腺癌 Panc-1 细胞的增殖，大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞生长抑制方式可能是以诱导细胞凋亡方式为主。该研究结果将为大黄素用于临床胰腺癌治疗提供一定的实验依据，但还需进一步的体内实验和临床试验加以验证。

致谢：温州医学院科研平台金永国、何秋莎和王金丹对本实验的大力协助！

参考文献

- [1] Lu H F, Lai K C, Hsu S C, *et al.* Involvement of matrix metalloproteinases on the inhibition of cells invasion and migration by emodin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(9): 1575-1583.
- [2] 王春光, 刘北忠, 金丹婷, 等. 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 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 751-756.
- [3] 刘涛, 徐秋玲, 赵岩, 等. 大黄素对非酒精性脂肪

- 肝大鼠脂质水平及肝脏脂质代谢基因表达的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1516-1518.
- [4] 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.
- [5] Kuo T C, Yang J S, Lin M W, *et al.* Emodin has cytotoxic and protective effects in rat C6 glioma cells: roles of Mdr1a and nuclear factor kappaB in cell survival [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(3): 736-744.
- [6] Huang Z, Chen G, Shi P. Effects of emodin on the gene expression profiling of human breast carcinoma cells [J]. *Cancer Detect Prev*, 2009, 32(4): 286-291.
- [7] 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.
- [8] 林胜璋, 徐贤绸. 大黄素对大鼠肝移植排斥反应的抑制作用 [J]. 中华器官移植杂志, 2007, 28(3): 147-149.
- [9] 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): 1853-1858.
- [10] Espot N J, Brennan M F, Conlon K C. Patients with laparoscopically staged unresectable pancreatic adenocarcinoma do not require subsequent surgical biliary or gastric bypass [J]. *J Am Coll Surg*, 1999, 188(6): 649-655.
- [11] 郭双双, 江志敏. ERK 通路在胰腺癌细胞株 SW1990 吉西他滨化疗耐药中的作用 [J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(14): 829-832.
- [12] Pan X, Arumugam T, Yamamoto T, *et al.* Nuclear factor-kappaB p65/relA silencing induces apoptosis and increases gemcitabine effectiveness in a subset of pancreatic cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(24): 8143-8151.
- [13] Zhang L, Lau Y K, Xia W, *et al.* Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(2): 343-353.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Wang C, Wu X, Chen M, *et al.* Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells [J]. *Toxicology*, 2007, 231(2-3): 120-128.
- [17] Wang L, Lin L, Ye B. Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2006, 42(5): 625-629.