

大黄素抑制体内外白血病生长的实验研究

陈莉莉¹ 唐小万¹ 江文华¹ 王友群¹ 李建华¹ 解晶¹

[摘要] 目的:探讨大黄素对白血病生长的影响及其机制。方法:不同浓度大黄素($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用人早幼粒白血病细胞株 HL-60 24 h后,Cell Counting Kit-8(CCK-8)法检测细胞存活率;流式细胞术检测细胞凋亡;Western blot 检测白血病细胞中 Survivin 的表达。建立裸鼠白血病皮下移植瘤模型,随机分为对照组、实验 I 组和实验 II 组 3 组($n=10$),第 3 周开始分别经灌胃给予溶媒(0.1%二甲亚砜)0.2 ml/只、大黄素 20 mg/kg、大黄素 40 mg/kg,每周 3 次,共 2 周。术后第 8 周处死裸鼠,测量肿瘤重并计算抑瘤率;免疫组织化学法检测肿瘤组织的 Ki-67 和 Survivin 的表达。结果:与对照组相比,大黄素可呈浓度依赖性抑制 HL-60 细胞生长,增加细胞凋亡;大黄素可明显抑制 Survivin 在 HL-60 细胞中表达,呈浓度依赖性;与对照组相比较, I 和 II 组裸鼠皮下移植瘤生长均被抑制, Ki-67 和 Survivin 表达下调,以实验 II 组显著。结论:大黄素具有抑制体内外白血病生长的作用,这可能是通过抑制白血病中 Survivin 的表达而实现。

[关键词] 大黄素;HL-60;Survivin

[中图分类号] R733.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)02-0070-05

Study on emodin in growth inhibition of human promyelocytic leukemia HL-60 cell line in vitro and in vivo

CHEN Lili TANG Xiaowan JIANG Wenhua WANG Youqun LI Jianhua XIE Jing
(Department of Hematology and Oncology, Taizhou First People's Hospital, Zhejiang, 318020, China)

Corresponding author: CHEN Lili, E-mail: tyylily@yahoo.com.cn

Abstract Objective: To investigate the effect and the mechanism of emodin in the growth inhibition of human promyelocytic leukemia HL-60 cell line in vitro and in vivo. **Method:** After human promyelocytic leukemia HL-60 cells were treated with different concentrations of emodin ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), the cellular proliferation was detected by Cell Counting Kit-8(CCK-8) assay. The flow cytometry(FCM) was used to determine apoptosis in HL-60 cells. Western blot was used to detect the protein expression of Survivin. HL-60 cells were injected subcutaneously into nude mice to establish leukemia xenograft tumors, and the mice were randomized into 3 groups ($n=10$): Control group, feed with 0.1% Dimethyl sulfoxide(DMSO) 0.2ml/D; Test group I, Emodin at dose of 20 mg/kg; Test group II, Emodin at dose of 20 mg/kg. All treatment lasted for two weeks, thrice per week. Eight weeks after implantation, tumor weight and inhibition rate were evaluated respectively after the mice were sacrificed. Immunohistochemistry was used to detect the positive expression of ki-67 and Survivin in the tumors. **Result:** Emodin induced a higher percentage of growth inhibition and apoptosis in HL-60 cell in a dose-dependent manner when compared with the control. The expression of Survivin was down-regulated in human promyelocytic leukemia HL-60 cells after treatment of emodin in a dose-dependent manner. In test group I and group II, the rate of inhibition of tumor was significantly lower than that in control group, the positive expression of ki-67 and Survivin in the tumors of two test groups were significantly lower than those in control group, especially in test group II. **Conclusion:** Emodin had the antitumor effect to the human promyelocytic leukemia HL-60 cells both in vitro and in vivo and the effect might be related to the down-regulation of Survivin.

Key words Emodin; HL-60 cell; Survivin

大黄素(Emodin, 6-甲基-1,3,8-三羟基蒽醌),是从大黄属、蓼属、鼠李属和番泻叶中分离出来的主要有效单体,研究发现大黄素拥有抗菌、抗炎、抗肿瘤、免疫抑制^[1]等多种生物学功能。最新研究表明,大黄素可抑制卵巢癌^[2]和肺癌^[3]生长。另外,大黄素还可抑制多重耐药前列腺癌细胞增殖^[4],显

示了大黄素抗肿瘤的广阔前景。本研究探讨大黄素对体内外早幼粒白血病 HL-60 细胞生长的影响及其可能机制,为临床用药提供有益的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

大黄素(纯度 > 98%)、二甲亚砜(DMSO)(Sigma 公司,美国);胎牛血清、RPMI-1640 培养液(Gibco 公司,美国);CCK-8 试剂盒(碧云天生物技术研究所,中国);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测

¹台州市第一人民医院血液肿瘤内科(浙江台州,318020)
通信作者:陈莉莉, E-mail: tyylily@yahoo.com.cn

试剂盒(南京凯基生物发展有限公司,中国);Survivin 抗体和 β -actin 抗体(Epitomics 公司,美国);ki-67 抗体(北京中杉金桥生物技术公司,中国)。大黄素用 DMSO 配制成 0.2 mmol/L, -20°C 冰箱保存, DMSO 的质量分数小于 0.1% (该浓度对细胞生长无明显影响)。

1.2 实验动物

4~6 周龄健康 BALB/c 雌性小鼠购于中科院上海实验动物中心, 体重 18~20 g, 饲养于 SPF 屏障系统的洁净层流架内(无特定病原体级), 室温控制在 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~60%。

1.3 细胞培养

人早幼粒白血病细胞株 HL-60 购自 ATCC, 被培养在含体积分数 10% 的胎牛血清、质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 培养条件为 37°C 、体积分数 5% 的 CO_2 、饱和湿度。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

收集处于对数生长期的 HL-60 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, 分别加入不同浓度大黄素 (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 80 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 作用白血病 HL-60 细胞 24 h, 或者加入 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 大黄素作用白血病 HL-60 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后, 同时设置空白调零组(不加细胞加入等量的 PBS), 以及阴性对照组(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 A450 值, 实验重复 3 次。

细胞存活率 = (实验组 A450 值 - 空白调零组 A450 值) / (对照组 A450 值 - 空白调零组 A450 值) $\times 100\%$

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将 4×10^5 个对数生长期 HL-60 细胞接种在 6 孔培养板中, 生长至 90% 融合时。加入不同浓度大黄素作用 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 Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μl PI, 混匀, 室温避光培养 15 min 上机检测, 每组检测细胞数为 1×10^4 个。激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm。Cellquest 软件分析。

1.6 Western 印迹检测 HL-60 细胞中 Survivin 表达

收集处于对数生长期的 HL-60 细胞, 大黄素作用同上后, RIPA 裂解液裂解细胞, 提取上清液, 测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品 (20 $\mu\text{g}/\text{孔}$), 8% 或 12% SDS-PAGE 电泳, 半干转膜仪转膜, 5%

脱脂奶粉封闭后滴加兔抗人 Survivin 抗体为第一抗体, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体, ECL 显色, X 线胶片曝光。

1.7 人白血病癌裸鼠移植瘤的建立和给药方案

选择 4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠, 将 1×10^7 个 HL-60 细胞悬浮于 0.2 ml 无血清 1640 培养液中, 注射到裸鼠背部靠近右侧后肢皮下建立人胰腺癌裸鼠移植瘤模型。接种 2 周后, 待移植瘤体积长至 100~150 mm^3 , 将荷瘤裸鼠随机分为对照组、实验 I 组和实验 II 组, 每组 10 只, 共 3 组, 分别灌胃给予溶媒 (0.1% 二甲基亚砜) 0.2 ml/只、大黄素 20 mg/kg 和大黄素 40 mg/kg^[13], 每周给药 3 次, 共 2 周。第 8 周处死动物留取肿瘤组织, 称重, 并测量肿瘤体积, 计算抑瘤率。抑瘤率 = [1 - (治疗组开始平均体积 - 结束平均体积) / (对照组开始平均体积 - 结束平均体积)] $\times 100\%$ 。

1.8 免疫组织化学法检测 Ki-67 和 Survivin 表达

每组分别选取 5 个肿瘤组织, 经石蜡切片常规脱蜡水化, 按照二步法试剂盒所示的操作步骤进行染色, 切片经脱水、透明、封片、镜检。在高倍镜 (400 \times) 随机选择 20 个视野, 计算镜下染色阳性细胞所占比例。

1.9 数据的统计处理

实验所得计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素对 HL-60 细胞增殖的变化

不同浓度大黄素作用 HL-60 细胞 24 h 后, 细胞存活率分别为 86%、74% 和 61% (图 1a)。40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 大黄素作用白血病 HL-60 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后, 细胞存活率分别为 74%、57% 和 42% (图 1b), 大黄素组与对照组相比较, 均差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。不同浓度大黄素作用 HL-60 细胞 24 h 后, 分别诱导 $(7.9\pm 1.2)\%$ 、 $(13.2\pm 2.3)\%$ 和 $(18.5\pm 1.9)\%$ 的 HL-60 细胞凋亡, 与对照组 $(3.10\pm 0.41\%)$ 相比较, 均差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 1b)。

2.2 大黄素对 HL-60 细胞凋亡的变化

不同浓度大黄素作用 HL-60 细胞 24 h 后, 分别诱导 $(7.9\pm 1.2)\%$ 、 $(13.2\pm 2.3)\%$ 和 $(18.5\pm 1.9)\%$ 的 HL-60 细胞凋亡, 与对照组 $(3.1\pm 0.41\%)$ 相比较, 均差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2)。

2.3 大黄素对 HL-60 细胞中 Survivin 表达的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 不同浓度大黄素作用 HL-60 细胞 24 h 后, HL-60 细胞中 Survivin 蛋白的表达明显被抑制, 呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。

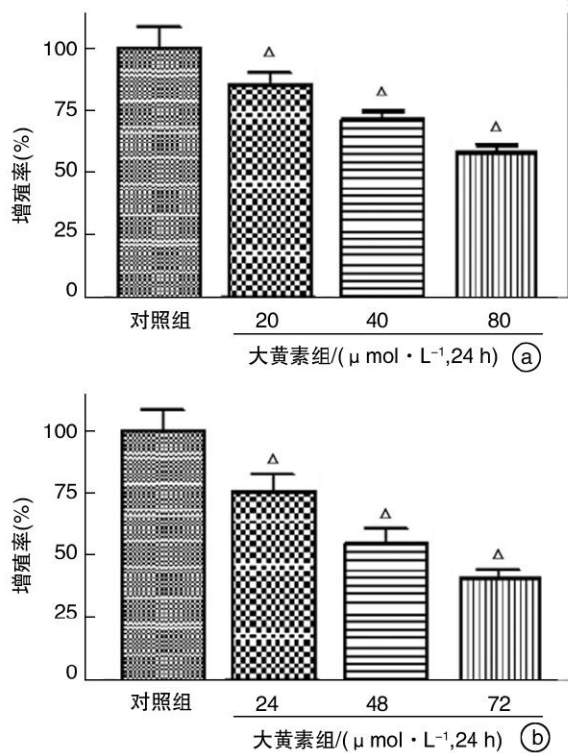


图 1 大黄素对体外培养的白血病 HL-60 细胞增殖的影响

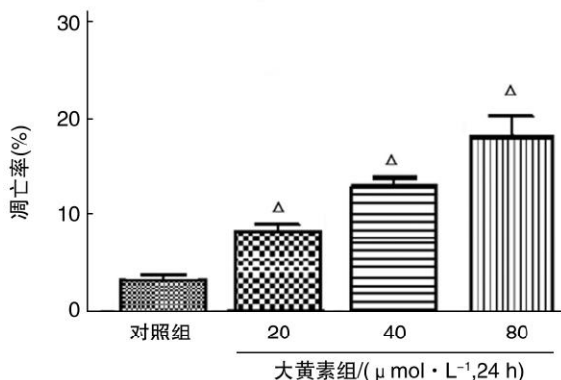


图 2 大黄素对体外培养的白血病 HL-60 细胞凋亡的影响

2.4 大黄素对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

实验期间,各组动物体重无显著变化。药物作用前,各组肿瘤平均体积为 $0.22\text{ cm}^3 \sim 0.31\text{ cm}^3$ 。实验第 56 天处死动物,对照组肿瘤平均体积为 $(1.24 \pm 0.24)\text{ cm}^3$;实验 I 组肿瘤平均体积为 $(0.81 \pm 0.13)\text{ cm}^3$,抑瘤率为 34.7%;实验 II 组肿瘤平均体积为 $(0.52 \pm 0.11)\text{ cm}^3$,抑瘤率为 58.1%。实验 I 组或 II 组与对照组相比较,均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 4)。

2.5 大黄素对裸鼠肿瘤组织 Ki-67 及 Survivin 表达的影响

免疫组织化学染色可见对照组中大量细胞 Ki-

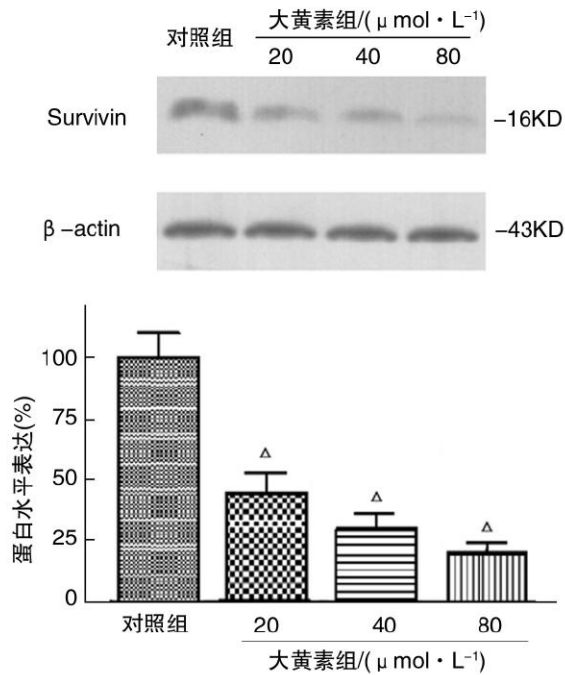


图 3 Western blot 检测大黄素对白血病 HL-60 细胞中 Survivin 蛋白表达的影响

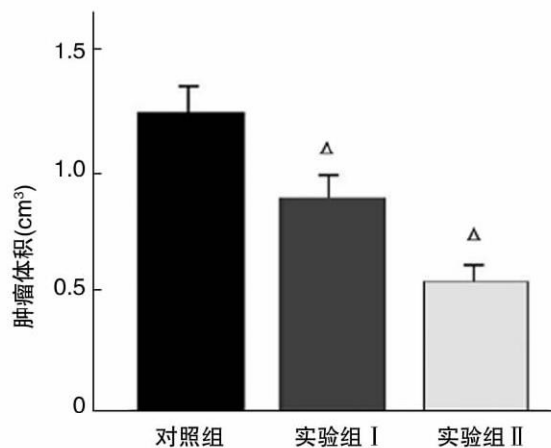


图 4 不同剂量大黄素对裸鼠白血病皮下移植瘤体积的影响

67 和 Survivin 阳性表达(图 5);实验 I 组和 II 组中 Ki-67 和 Survivin 阳性表达细胞显著减少 ($P < 0.05$),以实验 II 组中 Ki-67 和 Survivin 阳性表达减少最为显著(表 1)。各组肿瘤切片经 PBS 代替特异性一抗作为空白对照,肿瘤组织镜下均无阳性表达。

表 1 大黄素对裸鼠皮下移植瘤中 Ki-67 和 Survivin 阳性表达的影响 %

组别	Ki-67	Survivin
对照组	76.5 ± 4.6	86.4 ± 4.2
实验 I 组	$46.7 \pm 2.1^{1)}$	$57.6 \pm 1.7^{1)}$
实验 II 组	$16.5 \pm 0.8^{1)}$	$35.8 \pm 1.6^{1)}$

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

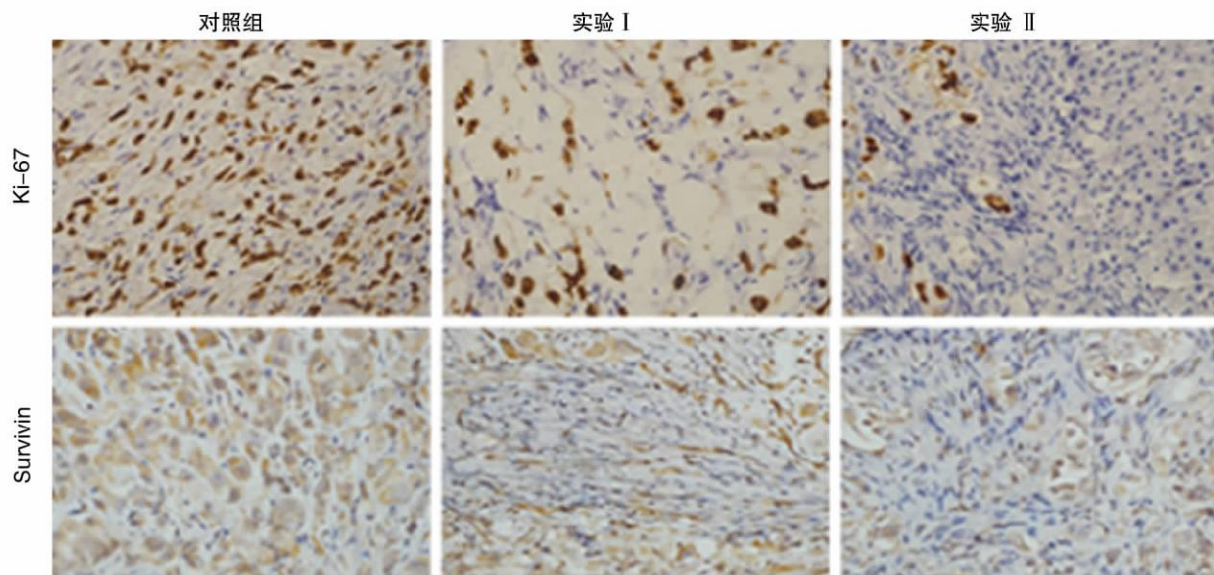


图 5 免疫组织化学法检测不同剂量大黄素对裸鼠白血病皮下移植瘤中 Ki-67 和 Survivin 表达的影响 ×400

3 讨论

研究表明大黄素对多种恶性肿瘤细胞有增殖抑制和促进凋亡的作用,而对正常细胞只有轻度生长抑制作用,没有药物毒性^[5]。本研究中笔者发现大黄素对人早幼粒白血病细胞株 HL-60 有明确的增殖抑制和诱导细胞凋亡作用,与文献报道相符。表明大黄素对 HL-60 细胞生长抑制方式可能也是以诱导细胞凋亡方式为主。在体内实验中,笔者建立起裸鼠白血病皮下移植瘤模型,观察到一定浓度大黄素可显著抑制体内白血病肿瘤生长,与体外实验结果相仿,同时在本实验中裸鼠在大黄素给药期间无明显体重下降,表明大黄素在对机体无明显影响的前提下可限制抑制白血病肿瘤生长。

在细胞凋亡过程中,IAPs 家族起到重要的抑制调节作用,IAPs 家族的重要成员 Survivin 可直接作用于细胞凋亡途径中的终末效应酶 Caspase-3 和 Caspase-7^[6],从而直接抑制细胞凋亡。在多种恶性肿瘤中,Survivin 表达上调,伴随明显的凋亡抑制^[7],并与细胞增殖^[8]和血管生成^[9]正相关。Survivin 表达上调预示着生存期缩短和预后不良,提示其在肿瘤的发生和演进中具有重要作用。

研究表明,抑制 Survivin 可增强传统化疗药物对恶性肿瘤的生长抑制作用^[10-11];有研究报道大黄素可通过下调肿瘤细胞 Survivin 水平从而诱导肿瘤细胞发生凋亡^[10]。在本试验中,大黄素不仅能下调体外白血病细胞中 Survivin 表达水平,同时笔者在胰腺癌裸鼠皮下移植瘤中也观察到类似的结果,与文献报道相符。表明大黄素能调控白血病细胞中 Survivin 蛋白,从而抑制体内外白血病生长。

总之,在本研究结果表明,大黄素可抑制体内外人早幼粒白血病 HL-60 细胞生长,其机制可能

与大黄素抑制 Survivin 在白血病细胞中的表达有关,但还需大量工作研究大黄素抗白血病生长的更多机制。

参考文献

- [1] HUANG Q, LU G, SHEN H M, et al. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb[J]. *Med Res Rev*, 2007, 27: 609-630.
- [2] 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: 1605-1610.
- [3] KO J C, SU Y J, LIN S T, et al. Suppression of ERCC1 and Rad51 expression through ERK1/2 inactivation is essential in emodin-mediated cytotoxicity in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79: 655-664.
- [4] HUANG X Z, WANG J, HUANG C, et al. Emodin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in prostate cancer cells: the mechanisms involve ROS-mediated suppression of multidrug resistance and hypoxia inducible factor-1[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 468-475.
- [5] 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: 229-241.
- [6] YANG L Q, FANG D C, WANG R Q, et al. Effect of NF-kappaB, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 22-25.
- [7] IDENOUE S, HIROHASHIY, TORIGOET, et al. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets

海藻糖联合葡萄糖负载红细胞不同时间下溶血情况*

姚根宏¹ 汪海蓉¹ 陈虎诚¹ 吴永政² 栾建凤¹ 朱培元¹ 叶东¹ 严京梅¹

[摘要] 目的:探索海藻糖和葡萄糖联合负载红细胞的最适时间,为冷冻干燥红细胞提供基础。方法:分别采用 0、0.125、0.250、0.500 和 1.000 mol/L 的海藻糖联合葡萄糖在 37℃ 负载红细胞 4、6 和 8 h。然后检测上清液中游离血红蛋白和乳酸脱氢酶含量。结果:负载液浓度为 1 mol/L 时,3 种负载时间下的细胞溶血程度较重,即上清中游离血红蛋白和乳酸脱氢酶浓度较高。在浓度低于 1 mol/L,负载时间为 4、6 h 时,上清中游离血红蛋白和乳酸脱氢酶浓度较低。而负载时间延长至 8 h 时,红细胞溶血程度较高。结论:在浓度小于 1 mol/L 时,海藻糖联合葡萄糖在 37℃ 情况下负载红细胞 6 h 时对细胞的损伤较小,能够满足冻存要求。

[关键词] 红细胞保存;冷冻干燥;最适时间;海藻糖;葡萄糖

[中图分类号] R318.52 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)02-0074-03

Hemolytic effect of trehalose and glucose loading red blood cells at different time

YAO Genhong¹ WANG Hairong¹ CHEN Hucheng¹ WU Yongzheng²
LUAN Jianfeng¹ ZHU Peiyuan¹ YE Dong¹ YAN Jingmei¹

(¹Department of Transfusion, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, 210002, China; ²School of Life Science, Jinling Nanjing College of Jinling University)

Corresponding author: YAO Genhong, E-mail: yaogenhong@sohu.com

Abstract Objective: To explore the optimum time of trehalose and glucose loading red blood cells for lyophilization. **Method:** The red blood cells were loaded with 0, 0.125, 0.250, 0.500 and 1.000 mol/L trehalose and glucose respectively in 37℃ for 4, 6, and 8 hours. Then, the levels of free hemoglobin and lactate dehydrogenase in the supernatants were determined. **Result:** The results showed that free hemoglobin and lactate dehydrogenase significantly increased in three groups of 1 mol/L trehalose and glucose (4, 6, and 8 h). When red blood cells were loading with 0.125, 0.250, and 0.500 mol/L trehalose and glucose for 4 and 6 h, the free hemoglobin and lactate dehydrogenase were low. However, when the incubation time extend to 8h (0.125, 0.250, and 0.500 mol/L), the red blood cells showed significant hemolysis. **Conclusion:** These results suggested that loading with trehalose and glucose (0.125, 0.250, and 0.500 mol/L) at 37℃ for 6h had little hemolytic effect on red blood cells and were qualified for loading red blood cells for purpose of lyophilization.

Key words human red blood cell preservation; Lyophilization; optimum time; Trehalose; Glucose

冰冻干燥红细胞便于长期保存、运输,对保障未来战争和突发性自然灾害的紧急供血、改善临床用血短缺和提高灾害医学救治水平有重要意义

义^[1-2]。近年来,理想的冻干保存剂和保存条件一直在研究和优化之中。我们以往的研究表明,用一定浓度海藻糖和葡萄糖联合组成的保护剂来负载红细胞,可以使细胞内海藻糖和葡萄糖含量达到冻干的要求,同时并不造成红细胞严重溶血^[3-4]。我们最近的研究表明,37℃时负载红细胞,不会造成红细胞严重溶血。但是,海藻糖和葡萄糖联合负载

* 基金项目:南京军区医学科技创新资助项目(No: 09MA087),南京军区南京总医院科研基金(No: 2011048)

¹南京军区南京总医院输血科(南京,210002)

²南京大学金陵学院化学与环境生物科学系

通信作者:姚根宏, E-mail: yaogenhong@sohu.com

Survivin, an inhibitor of apoptosis proteins [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 1474-1482.

[8] TARNAWSKI A, PAI R, CHIOU S K, et al. Rebamipide inhibits gastric cancer growth by targeting Survivin and Aurora-B [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334: 207-212.

[9] KAGA S, ZHAN L, ALTAF E, et al. Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and Survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium [J]. J Mol Cell Cardio, 2006, 40: 138-144.

[10] GUO Q, CHEN Y, ZHANG B, et al. Potentiation of the effect of gemcitabine by emodin in pancreatic cancer is associated with survivin inhibition [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77: 1674-83.

[11] KUNNUMAKKARA A B, GUHA S, KRISHNAN S, et al. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products [J]. Cancer Res, 2007, 67: 3853-3861.

(收稿日期: 2011-10-25)