

# 大黄素通过线粒体通路诱导 HepG2 细胞凋亡

刘德明<sup>1</sup>, 周春燕<sup>2</sup>, 吴嘉思<sup>1</sup>, 王平<sup>1</sup>, 孟宪丽<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 610037; 2. 川北医学院护理学院, 四川南充 637300)

**[摘要]** **目的:**研究大黄素对 HepG2 细胞的毒性和可能的作用机制。**方法:**通过细胞增殖与活性检测试剂 (Am-blue) 测定大黄素对 HepG2 细胞的毒性;使用 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 和花青染料 (JC-1) 探针检测细胞内活性氧与线粒体膜电位水平;使用流式细胞仪,通过磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶 (Annexin V/PI) 双染色试剂盒检测大黄素对 HepG2 细胞凋亡的影响;通过蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测成熟型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3,8,9 (cleaved Caspase-3,8,9) 以及聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 (cleaved-PARP) 等凋亡相关蛋白表达。**结果:**与空白组比较,大黄素 (15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 HepG2 细胞具有增殖抑制作用 ( $P < 0.01$ ),并且具有浓度依赖性;大黄素 (15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能够升高细胞内活性氧水平,并且使细胞线粒体膜电位降低 ( $P < 0.01$ );大黄素 (15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能够使 HepG2 细胞早期和晚期凋亡增加 ( $P < 0.01$ );大黄素 (15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能够激活 cleaved Caspases-8,9,3 和 PARP 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ )。**结论:**大黄素对 HepG2 细胞有增殖抑制作用,说明大黄素具有潜在的肝脏毒性,其毒性作用机制是通过线粒体凋亡途径实现的。

**[关键词]** 大黄素;氧化应激;凋亡;成熟型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3)

**[中图分类号]** R243;R22;R273;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0104-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030104

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171106.1554.006.html>

**[网络出版时间]** 2017-11-06 15:54

## Emodin Induces Apoptosis in HepG2 Cells via Mitochondrial Pathway

LIU De-ming<sup>1</sup>, ZHOU Chun-yan<sup>2</sup>, WU Jia-si<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>1</sup>, MENG Xian-li<sup>1\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine College Pharmacy, Chengdu 610037, China;  
2. Department of Nursing, North Sichuan Medical College, Nanchong 637300, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of the study was to determine the potential cytotoxicity and the underlying mechanism of emodin on HepG2 cells. **Method:** Am-blue assay were used to detect the toxicity of emodin on HepG2 cells. The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by the DCFH-DA fluorescent dye, and the mitochondrial membrane potential was measured by the mitochondrial-specific lipophilic cationic fluorescent dye JC-1. The apoptotic cells were quantified by the Annexin V/PI double staining kit and analyzed by flow cytometry, and Western blot was used to detect the protein expression levels of cleaved Caspase-3, 8, 9, cleaved-PARP, and other apoptosis-related proteins. **Result:** As compared with blank control group, emodin (15, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) had significant toxicity on HepG2 cells in a dose-and time-dependent manner ( $P < 0.01$ ), promoted the production of intracellular ROS and reduced mitochondrial membrane potential ( $P < 0.01$ ). After treatment with emodin (15, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h, the early apoptotic and late apoptotic cells were increased obviously ( $P < 0.01$ ). Further studies by Western blot indicated that emodin (15, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) exposure to HepG2 cells up-regulated the levels of cleaved Caspases-8, 9, 3 and PARP in a dose-dependent manner ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Emodin has a toxic effect on HepG2 cells, indicating that emodin has potential

**[收稿日期]** 20170704(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473149)

**[第一作者]** 刘德明,在读博士,从事中药药效与毒理学研究,E-mail:scmyxs@hotmail.com

**[通信作者]** \*孟宪丽,博士,教授,从事中药药效与毒理学研究,Tel:028-87786551,E-mail:xlm999@cdutem.edu.cn

hepatotoxicity, and its toxic mechanism is *via* mitochondrial apoptotic pathway.

[Key words] emodin; oxidative stress; apoptotic; cleaved Caspase-3

大黄、何首乌、虎杖是常用中药,大黄素是从大黄、何首乌、虎杖中提取出的一种蒽醌类天然产物,是其主要的药效成分之一。近年来有研究表明其具有抗炎、抗菌、止咳、降血压、泻下、保护肝脏等作用<sup>[1-4]</sup>。也不断有研究发现其具有一定的毒性作用,王青秀<sup>[5]</sup>通过体内外研究发现大黄提取物在大鼠中毒性的靶器官是肝脏与肾脏,产生毒性的主要物质是大黄素、大黄酸、芦荟大黄素。美国国家毒理项目关于大黄素的研究结果显示,小鼠长期食用含有大黄素的食物,会产生肾小管色素沉着,雌性小鼠肾病的发病率升高<sup>[6]</sup>。也有研究报道,大黄素能够明显抑制 HK-2 细胞增殖,半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 130.65 μmol·L<sup>-1</sup>,并通过半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3 通路引起 HK-2 细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。同时有研究发现大黄素具有生殖毒性,其毒性原因在于影响雄性大鼠睾丸基因的表达<sup>[9]</sup>。关于大黄素肾脏毒性作用机制有较为明确的报道,但关于大黄素肝脏毒性作用机制还尚不明确,因此,本研究采用人肝脏肿瘤细胞系 HepG2 作为实验模型,研究研究大黄素对其毒性作用,并探讨大黄素对其凋亡的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** HepG2 细胞购于中国科学院上海生命科学院细胞资源中心,编号 HB8065。

**1.2 药物** 大黄素对照品,购于北京索莱宝科技有限公司,批号 20161025。

**1.3 试剂** 活性氧(ROS),还原型谷胱甘肽(GSH),氧化型谷胱甘肽(GSSG),三磷酸腺苷检测试剂盒(ATP),线粒体膜电位(MMP)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 040116160612, 061516160615, 061516160615, 041316160518, 041216160725);成熟型天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3),成熟型天冬氨酸蛋白水解酶-8(cleaved Caspase-8),成熟型天冬氨酸蛋白水解酶-9(cleaved Caspase-9)多克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 0005, 0007, 0009);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 00044915);二抗(成都正能生物技术有限公司,批号 FF0819)。

**1.4 仪器** Varioskan Flash 型全波长扫描多功能读数仪, DHP-9052 型恒温细胞培养箱(美国 Thermo

公司);Power Pac HC 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Cytotflex 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

## 2 方法

**2.1 Am-blue 检测大黄素对 HepG2 细胞增殖的影响** 将 HepG2 细胞置于含 10% DMEM 培养基(含 100 U·mL<sup>-1</sup>的青霉素,100 U·mL<sup>-1</sup>的链霉素,pH 7.2~7.4),于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,每隔 2 d 换液 1 次,当细胞面积达到培养皿面积 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化传代。取处于对数生长期的 HepG2 细胞,按照约 1 × 10<sup>4</sup> 个/孔,接种于 96 孔板,过夜培养,待细胞贴壁后,加入终浓度为 1, 15, 30 μmol·L<sup>-1</sup>的大黄素,空白组加入相同体积的二甲基亚砜(DMSO);药物分别作用 24, 48, 72 h 后,每孔加入 Am-blue 10 μL,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育 2 h,于多功能酶标仪 590 nm 发射波长,530 nm 激发波长检测吸光度 A。细胞增殖抑制率 =  $A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}} \times 100\%$ 。

**2.2 细胞内 ROS 水平测定** 取处于对数生长期的 HepG2 细胞,按照约 5 × 10<sup>5</sup> 个/孔,接种于 6 孔板,过夜培养,待细胞贴壁后,每孔加入终浓度为 1, 15, 30 μmol·L<sup>-1</sup>的大黄素,空白组加入相同体积的 DMSO;大黄素作用 24 h 后,吸出培养基,每孔加入终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup> DCFH-DA 的无血清培养基,轻微震荡,使其充分覆盖细胞,37 °C 于细胞培养箱中孵育 20 min。孵育结束后,用无血清培养基快速清洗 3 次,除去还未进入细胞内的 DCFH-DA。然后用 EDTA-0.25% 胰酶消化细胞,收集消化后细胞,用移液枪加入 96 孔板,使用多功能酶标仪,525 nm 发射波长,488 nm 激发波长测定 A。

**2.3 细胞内 GSH 与 GSSG 含量的测定** 按照 2.2 项下处理细胞;药物处理 24 h 后,弃培养基,用 PBS 1 mL 洗细胞 1 次,胰酶消化,收集细胞,4 °C, 1 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,吸弃上清。加入收集到细胞体积 3 倍的蛋白去除 M 试剂,在涡旋振荡器上充分振荡,用 37 °C 水浴和液氮进行 2 次快速冻融,将样品于冰浴上放置 5 min,4 °C, 10 000 × g,离心 10 min,取上清用于测定细胞总 GSH。取适量样品上清,按对照品 100 μL 加入稀释的 GSH 清除辅助液 5 μL,混匀,25 °C,孵育 1 h,作为测定 GSSG 样品。

**2.4 细胞内 ATP 含量测定** 按照 2.2 项下处理细

胞,药物作用 24 h 后,用移液枪吸走培养基,用预冷 PBS 1 mL 清洗细胞 1 次,6 孔板每孔加入 200  $\mu\text{L}$  裂解液,将 6 孔板放在定轨振荡器上,将细胞充分裂解,收集细胞裂解液,4  $^{\circ}\text{C}$ ,12 000  $\times g$ ,离心 5 min,取上清液,按照试剂盒操作要求测定细胞内 ATP 含量。

**2.5 测定线粒体膜电位** 按照 2.2 项下处理细胞,药物处理 24 h 后,吸出培养基,用 PBS 清洗细胞 1 次,加入细胞培养基 1 mL,然后再加入 JC-1 染色工作液 1 mL,充分混匀,放回细胞培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$ ,孵育 20 min。用 EDTA-0.25% 胰酶消化细胞,收集消化后细胞,使用多功能酶标仪,将激发波长设置为 525 nm,发射波长设置为 590 nm 检测 A。

**2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡** 按照 2.2 项下处理细胞,药物处理 24 h 后,消化收集细胞,用预冷 PBS 洗涤细胞 1 次,弃上清,加入 Annexin V-FITC 结合液 195  $\mu\text{L}$  重悬细胞,然后加入 Annexin V-FITC 5  $\mu\text{L}$ ,混匀,最后加入 PI 染色液 10  $\mu\text{L}$ ,轻轻混匀。室温避光孵育 20 min,用流式细胞仪检测。

**2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测凋亡相关蛋白表达** 按照 2.2 项下处理细胞,药物作用 24 h 后,消化收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次,吸除 PBS,每孔加入 RAPA 裂解液 150  $\mu\text{L}$ ,用细胞刮刀将细胞收集于 1.5 mL 离心管中,置于振荡器上震荡 20 min。然后 4  $^{\circ}\text{C}$ ,13 000  $\times g$ ,离心 10 min,取上清,加入蛋白上样缓冲液,沸水煮 5 min 变性。使用 15% SDS-PAGE 电泳分离,200 mA 恒流转膜 90 min,5% 脱脂奶粉,室温封闭 1 h;4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育一抗 (1:1 000);TBST 溶液洗 3 次,每次 5 min,室温孵育二抗 (1:5 000) 1 h;TBST 溶液洗 3 次,每次 5 min,然后使用 ECL 放光法检测蛋白。使用 Quantity One 软件对图像进行分析,以目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值表示该蛋白的相对表达量。

**2.8 统计学分析** 将所有数据输入 SPSS 19.0,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较,方差齐则按  $t$  检验统计,方差不齐按 Wilcoxon 秩和检验,以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

### 3 结果

**3.1 大黄素对 HepG2 细胞增殖抑制率的影响** 大黄素分别作用 24,48,72 h 后,与空白组比较,15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  大黄素作用 24 h 就能对 HepG2 细胞增殖产生抑制作用 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),大黄素的抑制率随着时间的延长而升高,呈现出明显的时间浓度依赖性。因此在后续实验中选择 1,15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  大黄素。见表 1。

表 1 大黄素对 HepG2 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of emodin on cell viability rate in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	100 $\pm$ 6	100 $\pm$ 8	100 $\pm$ 3
大黄素	1	102 $\pm$ 3	97 $\pm$ 4	99 $\pm$ 6
	15	91 $\pm$ 6 <sup>1)</sup>	84 $\pm$ 5 <sup>2)</sup>	77 $\pm$ 2 <sup>2)</sup>
	30	78 $\pm$ 6 <sup>2)</sup>	69 $\pm$ 4 <sup>2)</sup>	60 $\pm$ 5 <sup>2)</sup>
	50	68 $\pm$ 5 <sup>2)</sup>	49 $\pm$ 4 <sup>2)</sup>	42 $\pm$ 6 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 ~ 5 同)。

**3.2 大黄素对 HepG2 细胞内 ROS 水平的影响** 与空白组比较,大黄素 15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 均能显著升高细胞内 ROS 水平 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 大黄素对 HepG2 细胞 GSH, GSSG 含量的影响** 与空白组比较,大黄素 15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后均能够显著升高细胞内 GSSG 水平 ( $P < 0.01$ ),显著降低细胞内 GSH 水平 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 大黄素对 HepG2 细胞 ROS 水平和 GSH, GSSG 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of emodin on ROS, GSH, GSSG levels in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ROS / RLU	GSH / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	GSSG / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	67.9 $\pm$ 2.21	3.26 $\pm$ 0.18	0.65 $\pm$ 0.07
大黄素	1	67.5 $\pm$ 3.53	3.29 $\pm$ 0.10	0.67 $\pm$ 0.09
	15	107.6 $\pm$ 9.28 <sup>2)</sup>	2.48 $\pm$ 0.15 <sup>2)</sup>	1.15 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
	30	127.2 $\pm$ 9.16 <sup>2)</sup>	1.46 $\pm$ 0.18 <sup>2)</sup>	1.67 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>

**3.4 大黄素对 HepG2 细胞内 ATP 含量的影响** 与空白组比较,大黄素 15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  均能够降低细胞内 ATP 含量 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**3.5 大黄素对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响** 细胞内 ROS 能够作用于线粒体,造成线粒体膜电位降低,引起线粒体损伤。与空白组比较,大黄素 15,30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 能够降低线粒体膜电位 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**3.6 大黄素对 HepG2 细胞凋亡的影响** 与空白组比较,大黄素 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理细胞 24 h 后,活细胞数量降低,早期凋亡细胞明显增多 ( $P < 0.05$ ),晚期凋亡细胞显著增多 ( $P < 0.01$ );大黄素 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理细胞 24 h 后,活细胞数量显著降低,早期凋亡与晚期凋亡细胞显著增多 ( $P < 0.01$ )。流式结果表明,凋亡是大黄素导致 HepG2 细胞死亡的一条

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

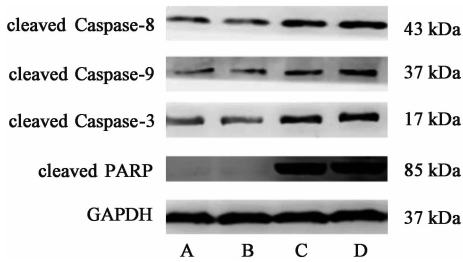
Table 3 Effect of emodin on ATP and mitochondrial membrane potential ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ATP/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MMP
空白	-	4.79 ± 0.42	108.34 ± 10.61
大黄素	1	4.71 ± 0.45	105.67 ± 15.04
	15	2.62 ± 0.33 <sup>2)</sup>	79.44 ± 7.69 <sup>1)</sup>
	30	1.20 ± 0.16 <sup>2)</sup>	53.88 ± 6.32 <sup>2)</sup>

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

Table 4 Effect of emodin on apoptosis rate in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	活细胞	早期凋亡细胞	晚期凋亡细胞	坏死细胞
空白	-	93.84 ± 0.47	2.41 ± 0.61	3.71 ± 0.36	0.24 ± 0.15
大黄素	1	94.13 ± 1.31	1.93 ± 0.89	3.72 ± 0.47	0.22 ± 0.12
	15	85.72 ± 2.72 <sup>1)</sup>	4.75 ± 1.26 <sup>1)</sup>	9.51 ± 1.96 <sup>2)</sup>	0.19 ± 0.09
	30	63.89 ± 3.36 <sup>2)</sup>	9.21 ± 1.56 <sup>2)</sup>	26.67 ± 3.02 <sup>2)</sup>	0.23 ± 0.11



A. 空白组; B ~ D. 大黄素 (1, 15, 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组

图 1 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of apoptosis-related protein expression in HepG2 cell

表 5 大黄素对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of emodin on apoptosis-related protein expression in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	cleaved Caspase-8/GAPDH	cleaved Caspase-9/GAPDH	cleaved Caspase-3/GAPDH	cleaved PARP/GAPDH
空白	-	0.39 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.30 ± 0.03
大黄素	1	0.41 ± 0.06	0.22 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.02
	15	0.56 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.43 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.48 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.61 ± 0.03 <sup>2)</sup>
	30	0.69 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.56 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.86 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.81 ± 0.02 <sup>2)</sup>

氨基转移酶 (ALT) 达到  $1\ 480\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$  (正常值  $< 22\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 达到  $711\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$  (正常值  $< 15\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 报告指出其肝脏损伤与芦荟提取物所含蒽醌类物质有很大关系; 许英<sup>[12]</sup>通过临床资料的回顾性分析, 认为排毒养颜胶囊含蒽醌类泻剂大黄, 如疗程过长, 剂量过大则引起胆红素代谢障碍, 加重黄疸。

大黄素是蒽醌类成分中含量最高的化合物之一, 其抗菌、止咳、降血压、泻下等治疗作用已经有了清晰的报导。近年来关于其抗肿瘤的报导也逐渐增多, 其可以诱导多种肿瘤细胞凋亡, 如人肺癌细胞

重要通路。见表 4。

3.7 大黄素对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白的影响与空白组比较, 大黄素  $15, 30\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  能够增加 cleaved Caspase-8, 9, 3 的表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 因此, 大黄素激活了 Caspase 通路, 并且大黄素也能够增加 cleaved PARP 的表达 ( $P < 0.01$ ), PARP 是 Caspase-3 的底物, 当 cleaved Caspase-3 表达增多时, 会剪切 PARP, 使 cleaved PARP 表达增加。见图 1, 表 5。

## 4 讨论

XING 等<sup>[10]</sup>以大黄水煎液灌胃四氯化碳致肝损伤大鼠 3 周, 停药后继续观察 1 个月, 结果表明大黄提取物具有肝损伤保护作用, 但随着大黄浓度增加及用药时间的延长, 这种保护作用逐渐减弱, 甚至转换成对肝脏的毒性作用。Rabe 等<sup>[11]</sup>报道 1 例服用芦荟提取物引起急性肝脏损伤的病例, 每日口服芦荟提取物 500 mg, 延缓衰老, 这种芦荟提取物具有抗炎、镇痛、肝脏保护、抗肿瘤、抗衰老等作用, 但服用 4 周后, 出现了明显的肝脏损伤, 丙氨酸

A549<sup>[13]</sup>, 人肾小管上皮细胞 HK-2<sup>[14]</sup>, 人宫颈癌细胞 HeLa<sup>[15]</sup> 等, 然而, 缺乏关于其肝脏毒性相关的报道, 其毒性作用机制还不完全清楚。本研究采用肝脏毒性研究常用细胞系 HepG2, 来研究大黄素毒性作用的机制, 发现  $15\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  大黄素作用 24 h 就能对 HepG2 细胞产生毒性作用, 并且随着浓度的增加, 毒性作用增强, 具有明显的时间、浓度依赖性。ROS 是细胞正常氧代谢的副产物, 并且在细胞信号传导, 和保持机体恒常性起很大作用, 过高的 ROS 水平会对细胞和基因结构造成损坏, 有研究发现线粒体是 ROS 打击的主要靶点<sup>[16]</sup>。本实验结果显

示,大黄素  $15,30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后能够显著升高细胞内 ROS 水平。GSH/GSSG 是衡量细胞内稳态的重要指标,研究表明 GSH 的主要生理功能是清除细胞内自由基、抗氧化、抗衰老<sup>[17]</sup>,当细胞内 ROS 水平较高时,会使细胞内 GSH 降低,GSSH 升高,本研究发现当大黄素  $15,30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后,细胞内 GSH 水平急剧降低,GSSG 水平迅速升高,GSH/GSSG 失衡,氧化应激加剧,细胞进一步受到损伤。大黄素  $15,30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后,细胞 ATP 水平显著降低,ATP 是细胞内中药的能量供应体,当细胞内 ATP 水平降低时,线粒体功能受到严重影响,同时,线粒体是 ROS 打击的主要靶点,因此线粒体功能受到严重影响。

细胞凋亡是由基因控制的细胞程序死亡,目前主要发现两条途径涉及细胞凋亡过程,内源性线粒体途径,外源性死亡受体途径<sup>[18-19]</sup>。在内源性线粒体通路中,凋亡启动时,线粒体功能发生障碍,线粒体结构被破坏,细胞色素 C (cyt-C) 释放到细胞浆中,与细胞质中的凋亡蛋白激活因子结合,导致 Caspase-9 原型活化、分裂,从而激活下游 Caspase-3<sup>[20]</sup>。Caspase-3 是细胞内源性凋亡程序中最关键的限速酶,是细胞凋亡的重要执行者<sup>[21]</sup>。本研究结果表明,大黄素  $15,30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后,线粒体膜电位降低,线粒体功能受损,激活了凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-8,9,3,PARP 的表达,能够显著增加 HepG2 细胞凋亡。

通过对上述实验结果的分析,可以证明大黄素对 HepG2 细胞有毒性作用,说明大黄素具有潜在的肝脏毒性,其毒性作用机制是通过线粒体凋亡途径实现的。

#### [参考文献]

[1] Hwang J K, Noh E M, Moon S J, et al. Emodin suppresses inflammatory responses and joint destruction in collagen-induced arthritic mice [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2013, 52(9): 1583-1591.

[2] Dey D, Ray R, Hazra B. Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7): 1014-1021.

[3] LIU Y, CHEN X, QIU M, et al. Emodin ameliorates ethanol-induced fatty liver injury in mice [J]. *Pharmacology*, 2014, 94(1/2): 71-77.

[4] 王梅,陈俊荣,宋翠荣,等. 酒大黄的镇痛抗炎作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(5): 255-257.

[5] 王青秀. 大黄及其主要成份的毒性毒理研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2007.

[6] NT Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies

of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 2001, 493: 1-278.

[7] WANG C, DAI X, LIU H, et al. Involvement of PPARgamma in emodin-induced HK-2 cell apoptosis [J]. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29(1): 228-233.

[8] 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.

[9] Oshida K, Hirakata M, Maeda A, et al. Toxicological effect of emodin in mouse testicular gene expression profile [J]. *J Appl Toxicol*, 2011, 31(8): 790-800.

[10] XING X Y, ZHAO Y L, KONG W J, et al. Investigation of the "dose-time-response" relationships of rhubarb on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(2): 575-581.

[11] Rabe C, Musch A, Schirmacher P, et al. Acute hepatitis induced by an Aloe vera preparation; a case report [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(2): 303-304.

[12] 许英. 中药的药物性肝损害 30 例临床分析 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2005, 8(5): 600-601.

[13] 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.

[14] 王青秀, 吴纯启, 周莉, 等. 大黄素诱导 HK-2 细胞凋亡的机制探讨 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 8(22): 2034-2038.

[15] Srinivas G, Anto R J, Srinivas P, et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly (ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of Caspase-9 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 473(2/3): 117-125.

[16] Schaar C E, Dues D J, Spielbauer K K, et al. Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(2): 100-122.

[17] Sentellas S, Morales-Ibanez O, Zanuy M, et al. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress [J]. *Toxicol In Vitro*, 2014, 28(5): 1006-1015.

[18] QIAO L, WONG B C. Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy [J]. *Drug Resist Updat*, 2009, 12(3): 55-64.

[19] Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D, Admoni L, et al. The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848(10 Pt B): 2547-2575.

[20] GUO H, CHEN L, CUI H, et al. Research advances on pathways of nickel-induced apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 17(1): 323-336.

[21] CHEN J, Mehta J L, Haider N, et al. Role of Caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2004, 94(3): 370-376.

[责任编辑 张丰丰]