

大黄素对抗顺铂引起的 WI-38 细胞凋亡

代 智, 仲来福*

(大连医科大学毒理学研究室, 辽宁 大连 116027)

摘要:目的 从细胞水平研究大黄素对顺铂引起 WI-38 细胞凋亡的影响。方法 采用 MTT 法检测细胞毒性, 用形态学观察、DNA 凝胶电泳及流式细胞仪检测细胞凋亡。结果 WI-38 细胞经大黄素和顺铂同时处理 22 h 后, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素可明显减轻顺铂引起的细胞毒性, 其 IC_{50} 值由 $(16 \pm 3) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加至 $(34 \pm 6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 可明显抑制顺铂引起的细胞形态学改变、核异染色质边集和 DNA 片段化, 使顺铂 10 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 导致的细胞凋亡率由 35.56% 和 33.99% 降至 9.21% 和 10.25%, S 期细胞百分数由 62.66% 和 48.46% 降至 48.67% 和 36.18%。结论 大黄素可对抗顺铂所致 WI-38 细胞凋亡, 可能与其对细胞周期的影响有关。

关键词: 顺铂; 大黄素; 凋亡; 细胞, WI-38; 电泳, 琼脂凝胶; 细胞周期

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)04-0276-05

顺铂(cisplatin, *cis*-diaminedichloroplatinum)是当前临床使用的主要抗癌药物之一, 治疗卵巢癌、睾丸癌、膀胱癌及头颈部癌等有很好的疗效^[1]。但是, 顺铂作为一种细胞毒药物, 在治疗肿瘤的同时, 亦可对肾脏、周围神经等正常组织造成损害^[2], 其中肾毒性是限制其临床用药剂量的主要因素。大黄素(emodin)又叫朱砂莲甲素, 是中药朱砂七、大黄和何首乌中的有效成分, 有抗菌、止咳和抗肿瘤作用^[3]。据报道^[4], 大黄素能增强正常细胞经顺铂所致 DNA 损伤的修复, 起到保护作用。至于其对顺铂细

胞毒性的其他影响, 作者尚未见报道。本文旨在从细胞水平探讨大黄素对抗顺铂引起细胞凋亡的作用及其可能的作用机制, 以拓宽大黄素临床应用领域, 为研制降低顺铂毒副作用而又不影响其治疗作用的化学药剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

顺铂由冶金部云南贵金属研究所提供, 纯度 > 96%; 大黄素购自复旦大学药学院天然药物研究所, 纯度 > 95%; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司; 小牛血清购自杭州四季公司; 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自上海化学试剂一厂; 噻唑蓝[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT]购自 Fluka 公司; 琼脂糖购自 Promega 公司; 碘化吡啶(propidium iodide, PI)购自 Sigma 公司。

1.2 仪器

CO_2 培养箱为美国 Forma Scientific 公司产品, 3550 型酶标仪为日本 Bio-Rad 公司产品, CK2 型倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品, 日立 H-300 型透射电镜, 电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品, E1591 型流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.3 人胚肺成纤维细胞培养与处理

将 WI-38 细胞(购自中国科学院上海生物学研究所)接种于 25 cm^2 培养瓶中, 加入含 12% 小牛血清及青霉素、链霉素各 $100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RPMI 1640 培养基, 于 37°C , 5% CO_2 条件下按常规传代培养, 待细胞处于对数生长期时, 按以下 3 种方式处理: ①加入不同终浓度的顺铂, 作用时间为 12, 22 和 35 h; ②加入不同终浓度的顺铂, 欲用大黄素干预时, 加入顺铂前先用终浓度为 15 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素预处理, 处理时间为 22 h; ③加入 10, 30 或 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂, 欲用大黄素干预时, 加入顺铂前用终浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素预处理, 接触时间为 22 h。同时设相应溶剂(DMSO)对照组。处理结束后, 用 0.5% 胰酶消

收稿日期: 2003-01-14 接受日期: 2003-04-17

作者简介: 代 智(1974-), 男, 辽宁省抚顺市人, 在读博士生; 仲来福(1941-), 男, 辽宁省大连市人, 教授, 主要从事生物化学与分子毒理学研究。

* 联系作者 E-mail: rdrczhong@dlmedu.edu.cn Tel: (0411)4720583 Fax: (0411)4720661

化收获细胞。

1.4 MTT 法检测细胞毒性

在 96 孔培养板中接种 1×10^4 WI-38 细胞, 经前述处理后, 每孔加入终浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT, 37°C 放置 4 h 后, 弃上清并加入溶解液 (50% 二甲基甲酰胺, 20% 十二烷基硫酸钠) $200 \mu\text{L}$, 4 h 后酶标仪检测 570 nm 对 650 nm 的吸光度值 (A)^[5]。抑制率计算方法为: (对照组 A - 实验组 A) / 对照组 $A \times 100\%$ 。

1.5 细胞形态学观察

接种于 24 孔板中生长的 WI-38 细胞经处理 22 h 后, 倒置显微镜观察并拍片。

1.6 透射电镜观察

将细胞收集于 5 mL 试管内, $2000 \times g$ 离心 5 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) pH 7.2 漂洗 2 次, 经 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛固定后按常规制备电镜标本。

1.7 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳

细胞收集于 1 mL 离心管内, 按以下步骤进行: 加 $80 \mu\text{L}$ DNA 提取液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰 RNA 酶, 0.5% 十二烷基硫酸钠) 重悬细胞, 37°C 温育 1 h; 加 $10 \mu\text{L}$ 蛋白酶 K, 终浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 50°C 温育 2 h; 加 $10 \mu\text{L}$ 水饱和酚, 充分混匀, $5700 \times g$ 离心 5 min, 上层水相移至新 Eppendorf 管内; 加氯仿和酚各 $50 \mu\text{L}$, 充分混匀, $5700 \times g$ 离心 5 min, 上层水相即含细胞 DNA; 取 $20 \mu\text{L}$ 样品进行 1.8% 琼脂糖凝胶电泳 (53 V , 1 h), 紫外线下观察并拍照。

1.8 流式细胞仪测定细胞凋亡

收集细胞于 PBS (pH 7.4) 中, 制成单细胞悬液, $2000 \times g$ 离心 5 min, 去上清。加入 70% 冷乙醇固定过夜, $2000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS $180 \mu\text{L}$, 混匀后, 加入 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ RNA 酶 $20 \mu\text{L}$, 37°C 水浴 30 min 后, 加入 $700 \mu\text{L}$ PBS, 混匀后加入 $100 \mu\text{L}$ PI ($800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 4°C 避光染色 20 min, 300 目滤膜过滤, 上机测试, 应用 Cell Quest 软件获取细胞 10 000 个, 进行凋亡细胞计数。以 Mod Fit 软件进行凋亡峰拟合及细胞周期分析。

1.9 数据均为 $\bar{x} \pm s$, 用 t 检验进行统计学显著性分析。

2 结果

2.1 顺铂所致 WI-38 细胞毒性的量效和时效关系

顺铂给药后 12, 22 和 35 h, 对 WI-38 细胞的抑

制率均随顺铂浓度的增加而增加, 呈明显的量效关系, 且在给药 22 h 后, 顺铂对 WI-38 细胞的抑制率均明显高于 12 和 35 h (图 1), 可见, 顺铂在 22 h 表现出最大的毒性作用, 可作为顺铂毒性研究的最佳时间点。

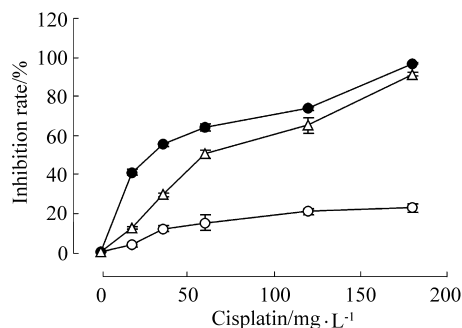


Fig 1. Cytotoxicity of cisplatin to WI-38 cells. The cytotoxicity of cisplatin was determined by MTT colorimetric method. (○) 12 h, (●) 22 h, and (△) 35 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

2.2 大黄素对顺铂所致 WI-38 细胞毒性的影响

经不同浓度大黄素和顺铂处理 22 h 后, 顺铂对 WI-38 细胞抑制率随着大黄素浓度的增加而减少 (图 2), 其中, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素 + 顺铂组 IC_{50} 值显著高于顺铂组 ($P < 0.05$), 可见, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可作为大黄素对抗顺铂引起 WI-38 细胞毒性研究的给药浓度。

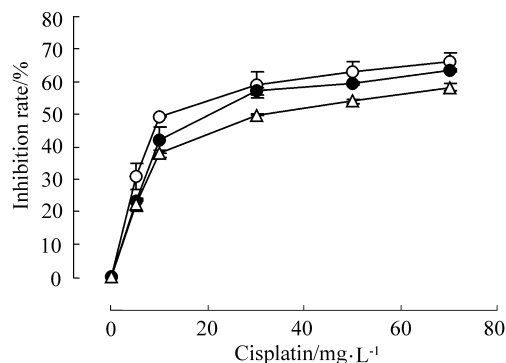


Fig 2. Reduction of the cytotoxicity of cisplatin to WI-38 cells by emodin. WI-38 cells were incubated with cisplatin and emodin for 22 h. The cytotoxicity of cisplatin was determined by MTT colorimetric method. (○) cisplatin, IC_{50} (16 ± 3) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; (●) cisplatin + $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin, IC_{50} (24 ± 4) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; (△) cisplatin + $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin, IC_{50} (34 ± 6) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

2.3 WI-38 细胞形态学变化

正常细胞排列紧密, 为细长梭形, 轮廓不清

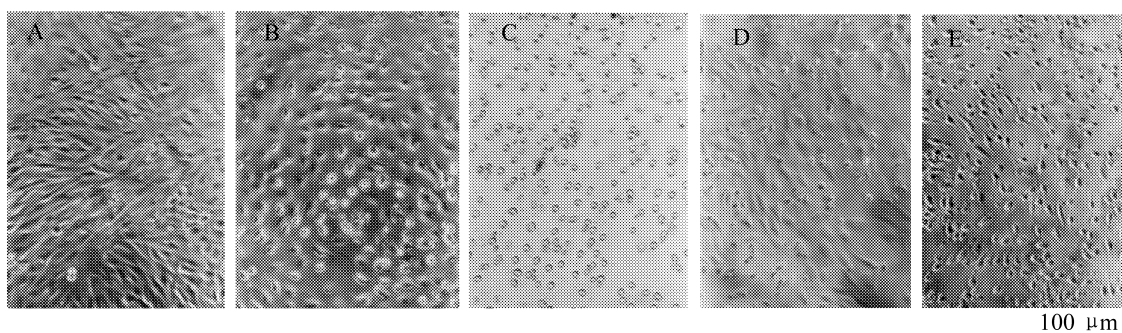


Fig 3. Morphology of WI-38 cells incubated with different concentrations of cisplatin or cisplatin + emodin for 22 h. A: control; B: $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin; C: $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin; D: $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin + $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin; E: $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin + $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin.

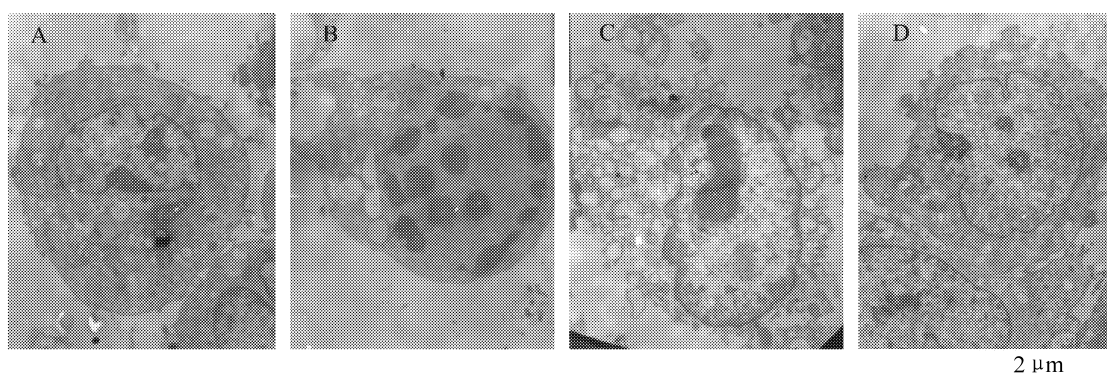


Fig 4. Ultrastructure of WI-38 cells incubated with cisplatin or cisplatin + emodin for 22 h. A: control; B and C: $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin; D: $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin + $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin.

(图 3A), 经 30 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂处理 22 h 后, 细胞逐渐圆化, 胞膜边界清晰(图 3B 和 3C), 经 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素干预后, 与相应顺铂组比较, 细胞质逐渐伸展(图 3D 和 3E)。

2.4 WI-38 细胞超微结构变化

正常细胞形态规则, 细胞表面无突起或较少突起, 细胞膜和核膜完整, 核仁清晰可见(图 4A)。经 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂处理 22 h 后, 部分细胞表面形成较大的胞质突起, 胞质内含有大大小小的空泡, 核内异染色质边集于核膜, 但质膜及核膜完整(图 4B); 部分细胞质膜破裂, 胞浆内有大量空泡形成(图 4C), $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素干预后细胞无明显形态学异常(图 4D)。

2.5 琼脂糖凝胶电泳

WI-38 细胞经 $10, 30$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂处理 22 h 后, 呈现典型 $180 \sim 200 \text{ bp}$ 整数倍的梯形条带, 并随浓度增加条带愈加明显(图 5C, 5D 和 5E), $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素干预后, 梯形条带几乎消失(图 5B)。

2.6 流式细胞仪检测

WI-38 细胞经 10 或 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂作用 22 h

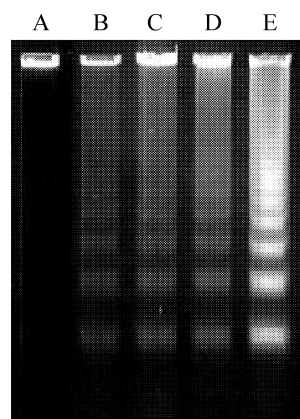


Fig 5. Electrophoresis of DNA from WI-38 cells incubated with different concentrations of cisplatin or cisplatin + emodin for 22 h. A: control, B: $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin + $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin, C: $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin, D: $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin, E: $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin.

后, 与对照组相比, S 期细胞百分数明显增加, G_0/G_1 期细胞百分数明显减少, 凋亡发生率分别为 35.56% 和 33.99% 。 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素干预后, 与

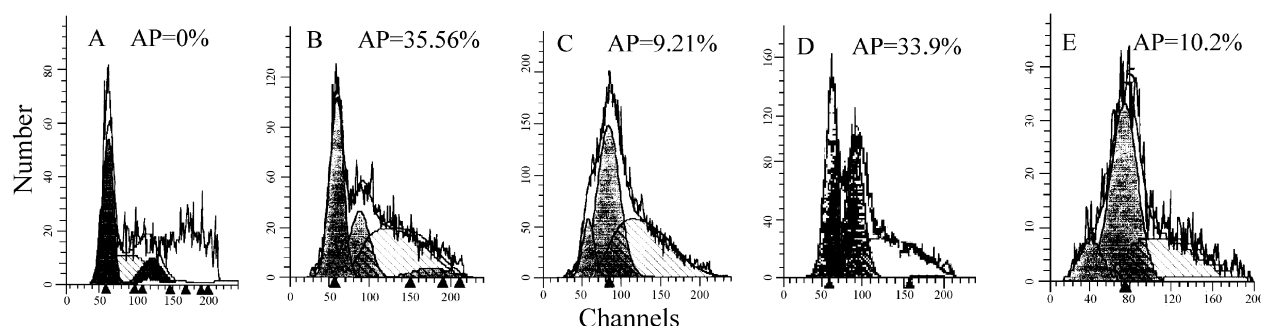


Fig 6. Flow cytometric assay of WI-38 cell treated with cisplatin or cisplatin + emodin for 22 h. AP: apoptotic peak. DNA of WI-38 were stained with promide iodine, determined by flow cytometry and analyzed by DNA analysis software modeling program. A: control; B: $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin; C: $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin + $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin; D: $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin; E: $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cisplatin + $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin.

相应顺铂组相比, S 期细胞百分数明显减少, G_0/G_1 期细胞百分数明显增加, 凋亡发生率明显下降, 分别为 9.21% 和 10.25% (图 6, 表 1)。

Tab 1. Effects of emodin on cell proliferation cycle induced by cisplatin in WI-38 cells

Cisplatin $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Emodin $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Cell cycle/%		
		G_0/G_1	S	G_2/M
0	0	48.51	33.85	17.63
10	0	29.52	62.66	7.82
30	0	39.08	58.46	2.46
10	30	51.33	48.67	0
30	30	60.87	36.18	2.95

WI-38 cells were incubated with different concentrations of cisplatin and emodin for 22 h. Cisplatin increased cell numbers in S phase and decreased cell numbers in G_0/G_1 and G_2/M . Emodin depressed the increase in cell numbers of S phase induced by cisplatin.

3 讨论

有关顺铂细胞毒性的机制尚未完全阐述清楚, 一种观点认为^[6,7], 脂质过氧化和氧化应激是顺铂细胞毒性机制之一; 另一种观点认为^[8], 顺铂可与细胞内 DNA 结合生成 Pt-DNA 加合物引起 DNA 损伤, 而这些加合物如何损伤细胞尚不清楚, 诱导细胞凋亡可能是一种重要的作用机制。

研究表明, 多数化疗药物导致细胞死亡的机制是细胞凋亡而不是细胞坏死^[9]。但是, 化疗药物如顺铂在治疗肿瘤过程中, 亦可能导致正常细胞凋亡而对正常组织造成损害。因此, 寻找能减少正常组织的细胞凋亡而又不影响疗效的新药具有重要意义。大黄素是从大黄中提纯的蒽醌类衍生物, 主要包括大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚和大

黄酚等 5 种成分。据报道^[4], 大黄素能提高切除修复基因 ERCC1 和 XPG 的表达, 降低顺铂所致的细胞毒性。本实验通过 MTT 法得出大黄素对抗顺铂细胞毒性的相同结论, 同时又通过形态学及生物化学研究证实顺铂可引起细胞凋亡, 表现为核异染色质边集、胞质空泡化及琼脂糖凝胶电泳时出现的梯状 DNA。大黄素可降低细胞凋亡率, 对顺铂诱导的细胞凋亡起到防护作用, 这为其作为一种预防顺铂毒副作用的化学药剂的临床应用提供了实验证据。

细胞凋亡的发生同细胞周期密切相关, 对细胞周期的调控也能阻止或促进细胞凋亡的发生^[10], 如原癌基因 (*c-Myc*, *Ras*, *Raf*, *Bcl-2*) 和肿瘤抑制基因 (*p53*, *Bax*) 表达的蛋白能同时影响细胞周期进程和细胞凋亡的发生。顺铂可通过对细胞周期检验点 G_0/G_1 , S 和 G_2/M 的调节而影响细胞凋亡的发生^[11]。本实验表明顺铂可使 WI-38 细胞顺利通过 G_0/G_1 检验点, 导致 G_0/G_1 期细胞数减少而 S 期细胞数相对增多, 可能是因为顺铂对 WI-38 细胞 DNA 损伤较重, 超出了机体细胞正常存在的损伤修复调控体系的修复能力。在大黄素干预下, 细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 是因为大黄素能增强切除修复基因的表达, 使 WI-38 细胞很快启动其 DNA 损伤修复调控体系, 抑制细胞周期运转, 使其阻滞于 G_0/G_1 期, 直到 DNA 损伤完全修复为止, 从而降低细胞凋亡率, 说明大黄素对抗顺铂诱导的细胞凋亡的发生可能与其对细胞周期的调节有关。

此外, 氧化应激可引起“死亡基因”表达改变而诱导细胞凋亡发生, 已证实顺铂可促使细胞产生氧自由基, 耗竭细胞内还原性谷胱甘肽, 抑制抗氧化酶的活性而诱发氧化应激^[6,7], 顺铂很有可能通过

这一途径来诱导 WI-38 细胞凋亡^[12]而大黄素对抗细胞凋亡也可能是其抗氧化作用的结果,关于大黄素对抗顺铂诱导细胞凋亡的机制尚需进一步探讨。

4 参考文献:

- [1] Rozenzweig M, von Hoff DD, Slavik M, Muggia FM. *cis*-Diaminedichloroplatinum(II). A new anticancer drug[J]. *Ann Intern Med*, 1977, **86**(6):803-812.
- [2] Walsh TJ, Clark AW, Parhad IM, Green WR. Neurotoxic effects of cisplatin therapy[J]. *Arch Neurol*, 1982, **39**(11):719-720.
- [3] Huang ZS, Wang ZW. Study on emodin and its pharmacological effects[J]. *Foreign Med Sci Tradit Chin Med Drug Fasc* (国外医学中医中药分册), 1997, **19**(5):9-12.
- [4] Chang LC, Sheu HM, Huang YS, Tsai TR, Kuo KW. A novel function of emodin:enhancement of the nucleotide excision repair of UV- and cisplatin-induced DNA damage in human cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, **58**(1):49-57.
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 1983, **65**(1):55-63.
- [6] Tsutsumishita Y, Onda T, Okada K, Takeda M, Endou H, Futaki S, *et al.* Involvement of H₂O₂ production in cisplatin-induced nephrotoxicity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **242**(2):310-312.
- [7] Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Diethyldithiocarbamate protection against cisplatin nephrotoxicity: antioxidant system[J]. *Drug Chem Toxicol*, 1995, **18**(2-3):151-170.
- [8] Reed E, Litterst CL, Thill CC, Yuspa SH, Poirier MC. *cis*-Diaminedichloroplatinum(II)-DNA adduct formation in renal, gonadal, and tumor tissues of male and female rats[J]. *Cancer Res*, 1987, **47**(3):718-722.
- [9] Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death[J]. *FASEB J*, 1992, **6**(7):2450-2455.
- [10] Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle[J]. *J Cell Biochem*, 1995, **58**(2):160-174.
- [11] Vaisman A, Varchenko M, Said I, Chaney SG. Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity[J]. *Cytometry*, 1997, **27**(1):54-64.
- [12] Trogano A, Fernandez C, Sancho P, Blas E, Aller P. Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(50):47107-47115.

Inhibitory effect of emodin on WI-38 cell apoptosis induced by cisplatin

DAI Zhi, ZHONG Lai-Fu

(Department of Toxicology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract: **AIM** To study if emodin could protect WI-38 cell against apoptosis induced by cisplatin(*cis*-diaminedichloroplatinum). **METHODS** Cell inhibition rate was determined by MTT colorimetry method. Cellular morphological characteristics was observed by optical microscopy and electron microscopy. DNA fragmentation was determined by flow cytometry and agarose gel electrophoresis. **RESULTS** After WI-38 cell was incubated with cisplatin and emodin(30 mg·L⁻¹) for 22 h, it was showed that cytotoxicity of cisplatin was reduced apparently by emodin, which was characterized by the increase in IC₅₀ from (16±3)mg·L⁻¹ to (34±6)mg·L⁻¹, that the changes of cellular morphology were recovered by

emodin, that chromatin condensation and DNA fragmentation were remarkably inhibited by emodin, that the apoptotic rate elevated by cisplatin (10, 30 mg·L⁻¹) was reduced by emodin from 35.56% and 33.99% to 9.21% and 10.25%, respectively, and that cell numbers in S phase were reduced by emodin from 62.66% and 48.46% to 48.67% and 36.18%, respectively. **CONCLUSION** Emodin can protect WI-38 cell against apoptosis induced by cisplatin, it might be correlated with its effect on cell cycle.

Key words: cisplatin; emodin; apoptosis; cells, WI-38; electrophoresis, agar gel; cell cycle

(本文编辑 石 涛)