

• 研究论文 •

大黄素诱导癌细胞凋亡和抑制视黄醇 X 受体的转录激活功能

和付林¹, 王力¹, 张晓坤^{1,2}, 曾锦章^{1,2*}

(1. 中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200233; 2. 厦门大学生物医学研究院, 福建 厦门 361005)

摘要: 大黄素 (emodin) 对多种肿瘤细胞有较强的抑制增殖和诱导凋亡的作用, 但其作用机制尚不清楚。本研究通过配体-受体竞争结合实验以及报告基因检测了大黄素对维甲酸 X 受体 (retinoid X receptor alpha RXR α) 的结合和转录活性的调控, 并研究了大黄素对肺癌细胞 H460 和肝癌细胞 SMMC-7721 生长和凋亡的作用。结果发现, 大黄素对两种癌细胞有很强的抑制增殖作用, 加入 RXR α 的天然配体 9-顺式视黄酸 (9-*cis*-retinoic acid 9-*cis*-RA) 共同处理可显著缓解这种抑制作用。大黄素能浓度依赖地引起两种癌细胞系的凋亡, 使细胞核出现碎裂和染色质浓染。报告基因实验发现大黄素对 RXR α 同源和异源二聚体的转录激活有显著抑制作用。体外的配体竞争结合实验发现, 大黄素不直接结合 RXR α 的配体结合区。蛋白质免疫印迹实验发现, 大黄素不影响 RXR α 的蛋白表达。结果提示, 大黄素具有诱导肺癌细胞 H460 和肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡和抑制细胞生长的作用, 大黄素抑制 9-*cis*-RA 对 RXR 转录激活作用以及 9-*cis*-RA 具有一定程度拮抗大黄素对肺癌细胞 H460 和肝癌细胞 SMMC-7721 的生长抑制作用, 提示大黄素的抗癌作用可能与细胞内 RXR 的功能有关, 并以 RXR 转录非依赖性的方式起作用。配体竞争结合实验结果提示大黄素可能间接作用于 RXR。

关键词: 大黄素; 维甲酸受体; 肝肿瘤; 肺肿瘤; 细胞凋亡

中图分类号: R282.71; R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)04-0350-06

Emodin induces apoptosis of cancer cells and inhibits retinoid X receptor transcriptional activity

HE Fu-lin¹, WANG Li¹, ZHANG Xiao-kun^{1,2}, ZENG Jing-zhang^{1,2*}

(1. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China
2. Institute for Biomedical Research, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The mechanisms by which emodin induces apoptosis and inhibits proliferation of cancer cells remain unclear. In this study, we investigated whether the proapoptotic effect of emodin on human NCI-H460 lung cancer cells and SMMC-7721 liver cancer cells was related to regulating RXR expression and function. MTT assay and DAPI staining were used to detect the anti-proliferative and apoptotic effects of emodin with or without 9-*cis*-retinoic acid on H460 and SMMC-7721. The reporter assay was used to detect the effect of emodin on RXR homo- and hetero-dimer transactivation. Competitive ligand binding assay was carried out to detect whether emodin could directly bind to RXR. The result showed that emodin could strongly inhibit the proliferation and induce apoptosis of both cancer cell lines, which could be antagonized by 9-*cis*-RA. The reporter assay showed that emodin could inhibit the transcriptional effect of the homo- and hetero-dimer transactivation of RXR α dose-dependently. However, *in vitro* binding assay did not show that emodin bind to RXR α -LBD directly. The findings suggest that exhibition of emodin in its anti-cancer activity may be associated with involvement of RXR α signal transduction pathways.

收稿日期: 2007-08-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA09Z404); 国家自然科学基金资助项目 (30471939); 福建省重点资助项目 (2007J01021026); 上海市科委重大科技攻关项目 (02041915); 上海市优秀学科带头人项目 (06XD14021).

* 通讯作者 Tel: 86-592-2187221, Fax: 86-592-2181879, E-mail: jzzeng@xmu.edu.cn

Key words emodin, retinoid X receptor α , liver neoplasms, lung neoplasms, apoptosis

大黄素 (emodin) 属单蒽环类 1, 8-二羟基蒽醌衍生物, 与阿霉素、柔红霉素等抗癌药同属蒽醌类化合物, 是大黄、虎杖、何首乌等多种中药的有效成分之一^[1]。文献报道大黄素可以诱导多种癌细胞凋亡。Muto等^[2]发现 emodin 可以抑制 IL-6 诱导的 JAK2 激活和 STAT3 磷酸化, 引起人骨髓瘤细胞系 RPMI 8226 MM 细胞的凋亡; Su 等^[3]发现 emodin 作用于 A549 细胞, 可以引起细胞内细胞色素 C 的显著释放, caspase-2、-3 和 -9 的激活, 引起细胞内活性氧的改变进而引起凋亡; Lee 等^[4]报道 emodin 通过影响 caspase-3 下游的 PKC 表达水平来诱导 CH27 细胞的凋亡作用; Shieh 和 Srinivas 等^[5, 6]发现 emodin 诱导人肝癌细胞系 HepG2、HepG2/C3A、PLC/PRF/5、SK-HEP-1 以及宫颈癌细胞 Bu25TK 的凋亡, 其作用与 p53 和 p21 蛋白的激活表达和聚 ADP 核糖聚合酶的断裂有关。但是大黄素诱导癌细胞凋亡的机制尚不清楚。

维甲酸 X 受体 (RXR α) 属于核受体超家族成员^[7, 8], 是一种配体依赖的转录因子, 与 RAR 一同介导维生素 A 的信号转导。RXR 的天然配体为 9-顺式维甲酸^[9, 10], 另外, RXR 的功能可受结构不同的化合物如视黄醇、非饱和脂肪酸和一些天然药物成分的调控, 在调控细胞增殖和凋亡中具有重要作用^[11, 12]。本文探讨大黄素诱导癌细胞的凋亡作用与 RXR 之间的关系。

材料与方法

细胞系 非小细胞肺癌细胞系 H460 人肝癌细胞系 SMMC-7721、正常非洲绿猴肾细胞 CV1 均为本室保存。

实验试剂 大黄素为成都思科华生物技术有限公司产品, RPMI 1640 DMEM 和新生牛血清为 Gibco 公司产品, MTT 为 Sigma-Aldrich 公司产品, ³H 标记的乙酰辅酶 A 和 ³H 标记的 9-顺式维甲酸为 Amersham Pharmacia 产品, Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品。

细胞培养 H460 细胞用含 10% 新生牛血清、100 u·mL⁻¹ 青霉素和 100 u·mL⁻¹ 链霉素的 RPMI 1640 培养基培养, SMMC-7721 和 CV1 细胞用含 10% 新生牛血清、100 u·mL⁻¹ 青霉素和 100 u·mL⁻¹ 链霉素的 DMEM 培养基培养。细胞均在 37 °C、5%

CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中常规培养。

细胞增殖抑制 取对数生长期的细胞, 以细胞数 1 000/孔 (H460) 或 2 000/孔 (SMMC-7721) 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L 培养液。细胞培养过夜后加入药液, 试验组分别加入不同浓度的大黄素, 对照组加入 0.1% DMSO。细胞进行药物或对照处理 96 h, 每组重复 4 孔。实验终止前 4 h, 每孔加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 15 μ L, 置于培养箱 (5% CO₂, 37 °C) 中培养, 4 h 后弃上清液, 加入 DMSO 200 μ L/孔, 用酶联免疫仪于 492 nm 处测定吸收度 (A) 值, 所得数据计算 IC₅₀。实验重复 3 次。

细胞的凋亡染色及计数 取肿瘤细胞接种于 96 孔板, 每孔 1 \times 10⁴ 细胞, 培养 24 h 后, 在 0.5% 血清下用不同浓度的药物处理, 对照孔加相同体积的 0.1% DMSO。处理 24 h 后, 用 PBS 洗 3 遍, 3.7% 多聚甲醛固定, DAPI 染色, 荧光显微镜下观察得到凋亡照片。取肿瘤细胞接种于 6 孔板, 细胞数 2.5 \times 10⁵ /孔, 培养 24 h 后, 用不同浓度药物处理, 收集上清液和细胞, 细胞用 PBS 洗 3 遍, 3.7% 多聚甲醛固定, DAPI 染色后, 用荧光显微镜观察, 细胞出现碎裂和染色质浓缩的为凋亡细胞, 计数 250~300 个细胞。

流式细胞仪分析凋亡 取肿瘤细胞接种于 10 cm 平板, 细胞数 1 \times 10⁶ /孔, 培养 24 h 后, 在 0.5% 血清下用不同浓度的药物处理, 对照孔加相同体积的 0.1% DMSO, 处理 24 h 后, 用 PBS 洗 3 遍, 胰酶消化细胞, PBS 洗 1 遍, 用固定液固定 30 min 以上, 然后和 100 μ g·mL⁻¹ RNase 于 37 °C 共同孵育 0.5 h, PI (50 μ g·mL⁻¹) 染色, 流式细胞仪分析。

RXR α 的同源和异源二聚体的转录抑制 参考文献^[12], 按细胞数 5 \times 10⁴ /孔在 48 孔板中培养 CV1 细胞, 按以下比例混合质粒: (1) RXR 同源: 10 ng GFP-RXR α , 50 ng (TREpal) 2- κ -CAT, 50 ng β -gal; (2) RXR/TR3 异源: 10 ng GFP-RXR α , 20 ng GFP-TR3, 50 ng β -RARE, 50 ng β -gal; (3) RXR/RAR β 异源: 10 ng GFP-RXR α , 20 ng PECE-RAR β , 50 ng RARE- κ -CAT 报告基因质粒, 50 ng β -gal 用载体 DNA (pBlue-script) 补充到每孔 DNA 总量为 500 ng 各种质粒的构建方法见文献^[13, 14]。用 Lipofectamine 2000 进行转染, 18 h 后加入不同浓度的药物, 继续培养 24 h, 收集细胞, 用裂解液 40 μ L 裂解细胞, 取裂解液 10 μ L 测定 β -gal 值, 取裂解液 20 μ L 反应

6 h后用液闪仪测定 min^{-1} 值, relative CAT activity=每孔 min^{-1} 值/每孔 $\beta\text{-gal}$ 值, 做两个复孔, 重复两次。

配体竞争结合实验 参照文献^[15], 用 GST融合表达的人 RXR α 蛋白的配体结合区 (LBD 223-462), 与同位素标记的天然配体 [^3H] 9-*cis*-RA 结合, 加入不同浓度的 9-顺式维甲酸和大黄素共同孵育 16 h, 反应终止时加入谷胱甘肽, 用 TEG 缓冲液洗 3 遍, 用液闪仪测定 min^{-1} 值, 做两个复孔, 重复两次。

Western blotting 检测 取肿瘤细胞接种于 6 孔板, 每孔 5×10^4 细胞, 培养 24 h 后, 用不同浓度的药物处理, 对照孔加相同体积的 0.1% DMSO, 处理 24 h 后, 用 PBS 洗 3 遍, 加入新鲜配制的 RIPA 细胞裂解液和 cocktail 蛋白酶抑制剂, 立即用细胞刮刀刮下细胞使其与裂解液充分混合, 冰浴 1 h, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 16 000 g 离心 30 min, 收集上清液于新 Eppendorf 管中, 用标准 Bradford 法测定蛋白含量, 于 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离各蛋白, 然后转移印迹蛋白到 NEC 膜, 使用含 5% Tween-20 的脱脂奶粉的 TBS 溶液室温振摇封闭过夜, 用 TBST 溶液稀释一抗 (兔抗人 RXR α , Santa Cruz), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 室温润洗 3 次, 每次 5 min, 二抗 (兔抗 HRP 辣根过氧化物酶) 孵育 2 h, TBST 室温润洗 5 次, 每次 5 min, 用 ECL 显色, 使用柯达胶卷显影定影, 实验进行 3 次。

结果

1 大黄素对癌细胞的生长抑制作用

用不同浓度的大黄素处理人肺癌细胞 H460 和肝癌细胞 SMMC-7721 96 h 后, 细胞存活率明显下降 (图 1)。对 H460 细胞生长抑制作用, $\text{IC}_{50} \approx 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 对 SMMC7721 细胞生长抑制作用, $\text{IC}_{50} \approx 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

不同浓度的大黄素对 SMMC-7721 细胞的增殖有明显的抑制作用。当大黄素与核受体 RXR α 的天然配体 9-顺式维甲酸 ($1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 共同作用时, 大黄素对细胞的抑制曲线变得平缓, 提示 9-顺式维甲酸和大黄素可能具有拮抗作用 (图 2)。

2 大黄素诱导癌细胞凋亡

用 DAPI 染色, 在荧光显微镜下观察。如图 3 所示, 随着大黄素浓度的增加, 肿瘤细胞增殖明显受到抑制, 出现细胞核碎裂或染色质浓缩的细胞比例变大。图 4 结果表明, 大黄素诱导肿瘤细胞凋亡呈

明显的浓度依赖性特征。

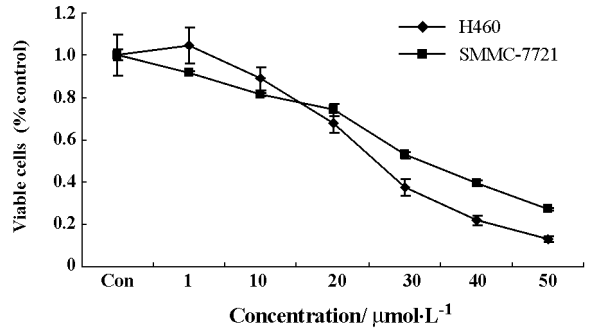


Figure 1 Inhibitory effect of emodin on viability of H460 and SMMC-7721 cells. The cells were treated with different concentrations of emodin for 96 h in 96-well plate. MTT method was used to measure the viable cells.

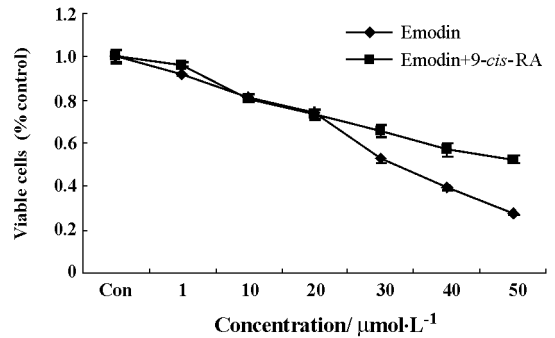


Figure 2 9-*cis*-RA attenuates the anti-proliferation effect of emodin on SMMC-7721 cells at high concentration. The cells were treated by different concentrations of emodin for 96 h in 96-well plate with or without 9-*cis*-RA. MTT method was used to measure the viable cells.

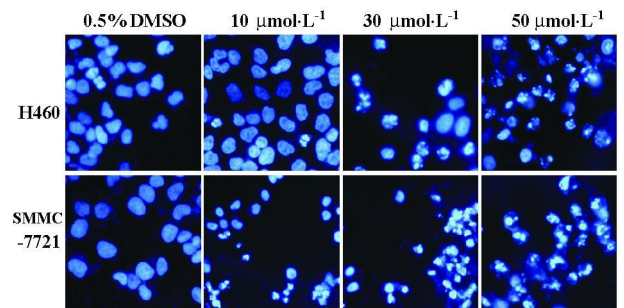


Figure 3 Emodin dose-dependently induced the apoptosis of H460 and SMMC-7721 cells. The cells were treated by different concentrations of emodin for 24 h in 96-cell plate. After treatment, the cells were washed with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde, stained with DAPI and visualized by fluorescence microscopy.

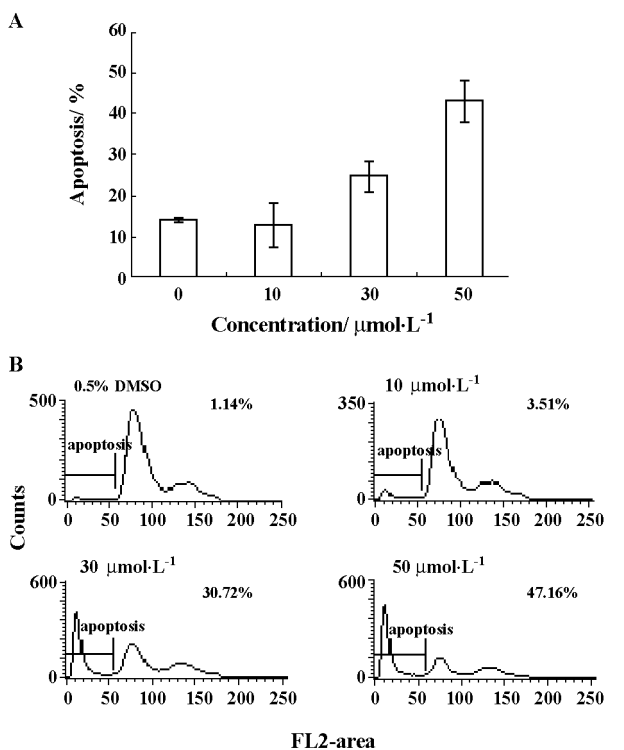


Figure 4 (A) Emodin induced the apoptosis of H460 cells. H460 cells were treated with vehicle alone (0.5% DMSO), different concentrations of emodin in the presence of 0.5% serum for 24 h. Apoptosis was determined by DAPI staining as shown in Figure 3 and scored by examining 300 cells for nuclear fragmentation and/or chromatin condensation. (B) Emodin induced the apoptosis of SMMC-7721 cells. SMMC-7721 cells were treated with vehicle alone (0.5% DMSO), different concentrations of emodin in the presence of 0.5% serum for 24 h. After treatment, cells were harvested and subjected to cytometric analysis. Apoptosis was measured by cell cycle analysis with propidium iodide staining and the percentage of hypodiploid cells was calculated.

3 大黄素抑制 RXR α 同源二聚体的转录激活

由于 9-顺式维甲酸可以拮抗大黄素的抗增殖作用, 提示大黄素可能会调控核受体 RXR α 的转录激活功能。由图 5 可见, 9-顺式维甲酸能够明显地诱导 CAT 的活性, 而单独使用大黄素对 CAT 活性没有影响, 但是当大黄素和 9-顺式维甲酸一起作用时, 9-顺式维甲酸的激活作用可被大黄素抑制, 呈浓度依赖性, 抑制率可达 50%。

4 大黄素抑制 RXR α 异源二聚体的转录激活

RXR α 可以和多种核受体形成异源二聚体, 比如孤儿受体 TR3、维甲酸受体 RAR β 和过氧化物激

活酶体增殖激活受体 PPAR 等。作者进一步对大黄素调控 RXR α 异源二聚体的激活功能进行研究, 由图 6 可见, RAR β 的配体全反式维甲酸和 RXR 的配体 SR11247 具有很强的诱导 CAT 的活性, 但是这种激活作用可以被大黄素浓度依赖性地抑制。

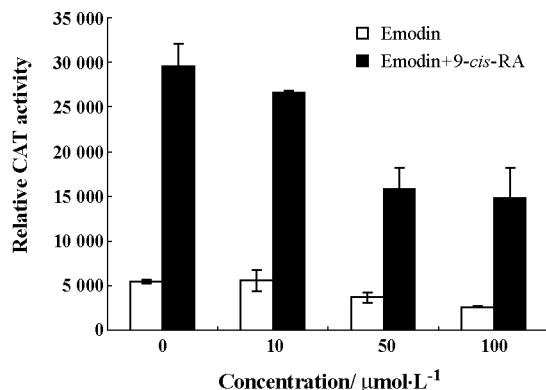


Figure 5 Emodin dose-dependently inhibited the transcription activation of RXR α homodimer. CV-1 cells were cotransfected with or without an expression vector for RXR (10 ng), a CAT reporter vector containing RXR homodimer responsive elements (TREpal)₂-tk-CAT (50 ng) and a β -gal expression vector (50 ng). Transfected cells were treated with different concentrations of emodin with or without 9-cis-RA ($1 \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. Relative CAT activities were determined and normalized to the β -galactase activity.

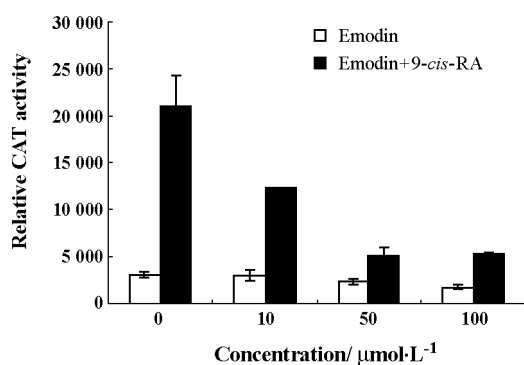


Figure 6 Emodin dose-dependently inhibited the transcription activation of RXR α -RAR β heterodimer. CV1 cells were cotransfected with GFP-RXR α (10 ng), PECE-RAR β (20 ng), RARE-tk-CAT reporter plasmid (50 ng) and a β -gal expression vector (50 ng), and treated with different concentrations of emodin with or without all-trans-RA ($1 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). CAT activities were determined as described above.

5 大黄素与 RXR α 相互作用的分析

从图 7 可见, RXR α 的天然配体可以与同 RXR α -LBD 区结合, 随着未标记的 9-顺式维甲酸的增加, 在 RXR α -LBD 上结合的 ^3H -9-顺式维甲酸呈浓度依赖地减少。而大黄素却没有这种浓度依赖作用。这一结果说明大黄素和 RXR α 的配体结合区不存在直接的相互作用 (图 8)。

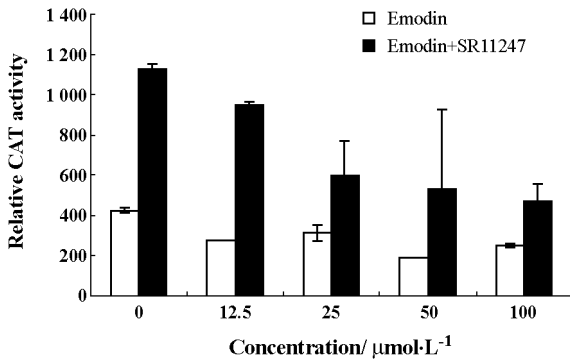


Figure 7 Emodin dose-dependently inhibited the transcription activation of RXR α -TR3 hetero-dimer. CV1 cells were cotransfected with GFP-RXR α (10 ng), GFP-TR3 (20 ng), RARE-tk-CAT reporter plasmid (50 ng) and a β -gal expression vector (50 ng), and then treated with different concentrations of emodin with or without SR11247 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). CAT activities were determined as described above.

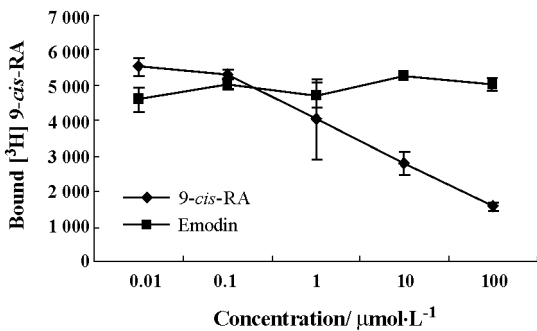


Figure 8 Emodin did not bind to RXR α -LBD *in vitro*. Human RXR α -LBD was incubated with $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [^3H] 9-cis-RA in the presence of different concentrations of unlabeled 9-cis-RA or emodin at 4°C for 14 h. [^3H] 9-cis-RA bound to RXR α was measured after capturing the RXR α -LBD by nickel-coated beads. The data represent the average of total bound cpm \pm SEM. The experiments were triplicated.

6 大黄素不影响 RXR α 的蛋白表达水平

从图 9 可见, 大黄素处理 H460 细胞并没有影响 RXR α 蛋白的表达变化。结果说明大黄素并不是通过影响 RXR α 的蛋白表达影响其转录抑制作用。

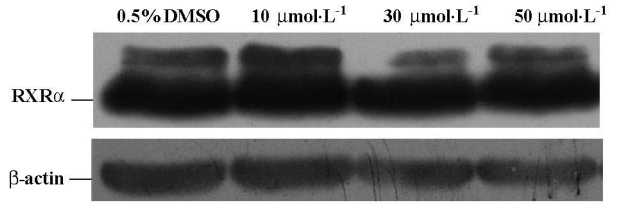


Figure 9 Emodin did not influence the expression of RXR α . H460 cells were treated with different concentrations of emodin or vehicle for 24 h. Cell lysates were immunoblotted with antibodies against human RXR α and β -actin.

讨论

本文的研究结果表明, 大黄素对 H460 和 SMMC-7721 的增殖均有很强的抑制作用, 通过对细胞凋亡分析发现, 大黄素可引起这两种癌细胞出现核碎裂、染色质浓染和凋亡小体等显著的细胞凋亡特征, 表明大黄素对 H460 细胞和 SMMC-7721 细胞生长抑制作用可能主要通过引起细胞凋亡起作用。

9-顺式维甲酸是 RXR α 的天然配体, 与大黄素共同作用时, 9-顺式维甲酸可缓解大黄素对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用, 说明大黄素的作用与 9-顺式维甲酸是相互拮抗的。通过同源二聚体和异源二聚体的报告基因实验, 发现大黄素对 RXR 的不同激动剂所产生的激活作用呈现拮抗作用, 通过进一步对大黄素作用后 RXR α 的表达进行检测, 发现大黄素不影响 RXR α 的表达水平, 说明大黄素抑制 RXR α 的转录功能不是由于蛋白表达水平的变化引起。通过配体-受体竞争结合实验, 发现大黄素与体外纯化的 RXR α 的配体结合区没有结合作用, 提示大黄素抑制 RXR 的转录激活作用可能通过间接的方式影响 RXR α 的功能, 其机制可能是通过作用于 RXR α 的共抑制因子或者抑制 RXR α 的共激活因子的活性来抑制 RXR α 的生物学作用。

大黄素是多种中药的重要有效成分之一, 本研究首次发现大黄素具有抑制 RXR 的转录激活功能, 提示大黄素可能通过以 RXR 转录非依赖性的的方式起作用, 这一发现将有助于理解大黄素的抗癌机制。

References

- [1] Lee HZ. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma [J]. Br J Pharmacol 2001, 134: 11–20.
- [2] Muto A, Hori M, Sasaki Y, et al. Emodin has a cytotoxic activity against human multiple myeloma as a Janus-activated kinase 2 inhibitor [J]. Mol Cancer Ther 2007, 6: 987–994.
- [3] Su YT, Chang HL, Shyue SK, 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.
- [4] Lee HZ. Protein kinase C involvement in aloe-emodin- and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell [J]. Br J Pharmacol 2001, 134: 1093–1103.
- [5] Shieh DE, Chen YY, Yen MH, et al. Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells [J]. Life Sci 2004, 74: 2279–2290.
- [6] Srinivas G, Anto RJ, 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: 117–125.
- [7] Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, et al. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway [J]. Nature 1990, 345: 224–229.
- [8] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily [J]. Science 1988, 240: 889–895.
- [9] Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, et al. 9-cis Retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor [J]. Cell 1992, 68: 397–406.
- [10] Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, et al. 9-cis Retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha [J]. Nature 1992, 355: 359–361.
- [11] Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists [J]. Nature 1997, 386: 407–410.
- [12] Zeng JZ, Sun DF, Wang L, et al. Hypericum sampsonii induces apoptosis and nuclear export of retinoid X receptor alpha [J]. Carcinogenesis 2006, 27: 1991–2000.
- [13] Zhang XK, Lehmann J, Hoffmann B, et al. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid [J]. Nature 1992, 358: 587–591.
- [14] Zhang XK, Hoffmann B, Tran PB, et al. Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors [J]. Nature 1992, 355: 441–446.
- [15] Kolluri SK, Corr M, James SY, et al. The R-enantiomer of the nonsteroidal antiinflammatory drug etodolac binds retinoid X receptor and induces tumor-selective apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102: 2525–2530.