

实验研究

基于 Lable-free 蛋白质组学技术研究大黄素致大鼠肝损伤作用机制

杨晓伟¹ 张银环² 段飞鹏² 肖红斌²

(1 中国中医科学院中药研究所,北京,100700; 2 北京中医药大学中药分析与转化研究中心,北京,100029)

摘要 目的:探索连续4周服用大黄素对大鼠肝组织蛋白表达的影响。方法:选取以大黄折算临床剂量100倍的大黄素灌胃SD大鼠4周(HG1, HG2, HG3, HG4)为模型,采用Lable-free蛋白质组学方法检测肝组织蛋白表达,并对所得结果进行分析。结果:通过筛选, HG1、HG2、HG3、HG4组中分别有158个、650个、219个、378个差异蛋白,这些差异蛋白经GO分析发现主要与细胞和代谢过程相关。其中,4组中共有差异蛋白25个,GO分类表明25个蛋白中有10个为与催化活性相关的蛋白。大黄素的存在使 α -2-HS-糖蛋白(热稳定性糖蛋白)表达上调,该蛋白的浓度与肝病的严重程度正相关;并且组织蛋白酶家族蛋—富含半胱氨酸的蛋白酶表达下调。结论:长期服用大黄素会增加肝损伤的概率,其可能是由于含半胱氨酸蛋白酶的表达下调,使组织功能出现紊乱,导致肝损伤的出现,并且这一结果在低剂量组中也得到了印证。

关键词 大黄素;蛋白质组学;肝损伤;组织蛋白酶;机制;半胱氨酸

Study on Mechanism of Liver Injury in Rats Induced by Emodin Based on Lable-free Proteomics Technology

Yang Xiaowei¹, Zhang Yinhan², Duan Feipeng², Xiao Hongbin²

(1 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2 Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To investigate the influence of 4-week's emodin on protein expression of rat's liver tissue. **Methods:** SD rats were given emodin 100 times more than the clinical dose of Rhubarb for 4 weeks and were divided into four groups (HG1, HG2, HG3, HG4). Protein expression in liver tissue was detected by lable-free proteomic technology. **Results:** By screening, there were 158, 650, 219, and 378 differential proteins in HG1, HG2, HG3, and HG4 group respectively, which were found to be mainly associated with cellular and metabolic processes by GO analysis. Among them, there were 25 differential proteins in the four groups, and GO classification indicated that 10 of the 25 proteins were proteins related to catalytic activity. α -2-HS-glycoprotein (thermostable glycoprotein) expression was upregulated by the presence of emodin, and the concentration of this protein positively correlated with the severity of liver disease; and cathepsin family egg-cysteine-rich protease expression was downregulated. **Conclusion:** Long-term administration of emodin increases the probability of liver injury, which may be due to the down-regulation of the expression of cysteine-containing proteases, which leads to the disorder of tissue function and leads to the appearance of liver injury, and this result has also been confirmed in the low-dose group.

Key Words Emodin; Proteomics; Liver injury; Cathepsin; Mechanism; Cysteine

中图分类号:R284;R575 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.02.014

大黄素是一种蒽醌类衍生物,主要来源于蓼科植物掌叶大黄根茎,其化学名称为1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌(1,3,8-trihydroxy-6-methyl-anthraquinone),是中药大黄、何首乌、决明子等的主要有效单体物质。长期以来,大黄素被中医学认为其主要具有泻下、抗菌消炎、抗肿瘤、免疫抑制、保肝、抗肾纤维化

等药理作用^[1-6]。然而,近年来对于大黄蒽醌致肝损伤的报道层出不穷,发现大黄素在5种蒽醌中含量是相对较高的,且美国国家卫生研究院对大黄素的长期药用的毒性进行了详细的阐述并表明长期服用大黄素会导致大鼠出现肝损伤^[7];何首乌95%乙醇洗脱物是引起其肝损伤的主要物质,而大黄素是导

基金项目:国家科学技术重大专项(2014ZX09304307);国家自然科学基金项目(81573839,81703948)

作者简介:杨晓伟(1982.07—),女,博士,研究方向:大黄蒽醌肝损伤机制,E-mail:yxw0713@163.com

通信作者:肖红斌(1969.07—),男,博士,特聘教授,博士研究生导师,北京中医药大学中药分析与转化研究中心主任,研究方向:中药物质基础及作用机制系统分析,E-mail:hbxiao69@163.com

致肝细胞损伤的成分之一^[8]。何首乌主要有效成分大黄素、大黄酸和二苯乙烯苷在不同浓度下不同作用时间对肝细胞 L-02 和 BEL 肝癌细胞影响的研究认为蒽醌类成分大黄素和大黄酸是何首乌肝脏不良反应的主要成分^[9]。大黄素作为常用中草药的有效成分,使用频率之高使得我们对其安全性问题格外重视,但是目前对大黄素肝毒性的物质基础和作用机制尚不清楚,这严重制约了含有该成分的药物临床应用,因此进行相关的研究是十分有必要的。

本研究是基于课题组之前的研究成果^[10],运用蛋白质组学技术研究高剂量(1500 mg/kg 相当于大黄临床等效剂量的 100 倍)的大黄素在不同时间点(HG1, 给药 1 周;HG2, 给药 2 周;HG3, 给药 3 周;HG4, 给药 4 周)对大鼠肝脏的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 9 周龄, 体质量(200 ± 10) g。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。适应性喂养 1 周, 恒温, 恒湿, 自由饮水, 普通饲料。

1.1.2 药物 大黄素, 购自成都瑞芬思生物科技有限公司, CAS 号: 518-82-1, 纯度 ≥ 98%。

1.1.3 试剂与仪器 主要试剂: 十二烷基磺酸钠(SDS, 美国, Amresco, 货号: 151-21-3); 蛋白酶抑制剂(PMSF, 瑞士, Sigma, 货号: P8340-1ML); 胰蛋白酶(Trypsin Gold, 美国, Promega, 货号: V5280)、乙腈(Acetonitrile, CAN, 美国, Thermo fisher, 货号: A998-4); BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天, 货号: P0012)。

主要仪器: NE-C900 型压缩式雾化器(OMRON, NE-C900)、自制雾化箱(60 cm × 50 cm × 40 cm)、冷冻离心机(Eppendorf, 5810)、真空冷冻干燥机(Thermo savant, ModulyoD-230)、Easy-nLC 1000 系统(Thermo Scientific)、分析型液相色谱 Agilent 1200 (Agilent, 1200)、Q Exactive 系统(Thermo Scientific)、Protein Pilot 5.0 软件(AB SCIEX)。

1.2 方法

1.2.1 样本选择 本研究以课题组前期研究为基础, 意图利用蛋白质组学技术分析在不同时间点时, 高剂量与空白对照组之间的差异, 利用前期采集的样本, 进一步阐述大黄素致肝损伤的作用机制。

1.2.2 蛋白提取及酶解 100 mg 肝组织样本, 加入 500 μL 细胞和组织裂解液和 5 μL 蛋白酶抑制剂(PMSF), 低温匀浆、超声破碎。溶液 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 去除不容性杂质。上清

液即为组织的总蛋白溶液, 采用 BCA 测定提取的蛋白浓度并分装后储存于 -80 °C 备用。

取 20 μL 等浓度样本, 做十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE), 用考马斯亮蓝染色后, 将凝胶置于玻璃皿中, 切下条带, 然后将胶条带切成小块; 加入蒸馏水润洗 2 遍; 加入适量的脱色液, 置于 37 °C 恒温培养箱中, 脱色 30 min; 吸去脱色液, 加入适量的纯 ACN 润洗, 吸去 ACN, 再加入 ACN, 放置 10 min, 吸出 ACN, 用真空离心浓缩仪脱水使胶块干燥; 向干燥的胶块中加入 25 mmol/L DTT 溶液, 置于空气加热器中, 55 °C, 45 min; 加适量 ACN 润洗, 后吸干, 再加 ACN, 10 min, 吸去 ACN, 真空浓缩脱水; 加入适量的 55 mmol/L IAA (Iodoacetamide) 溶液, 避光 30 min; ACN 润洗, 后用 ACN 浸泡 10 min, 冷冻干燥脱水; 加胰蛋白酶, 将胶粒没过, 倒置于 37 °C 恒温箱中, 12 ~ 16 h; 用 1 μL 的 10% TFA 溶液终止酶解反应, 10 × g 离心, 是胶粒和溶液分开, 吸出溶液, 置于一个新的离心管中; 加入没过胶粒的萃取液(50% ACN, 0.1% FA), 37 °C, 30 min, 取上清液与之前的上清液合并。此步骤重复 2 次; 将上清液放在真空离心浓缩仪中浓缩, 剩 1 ~ 2 μL 的时候取出离心管, 加入 20 μL 的 0.1% FA 溶液复溶, 振荡混匀后离心, 重复 2 次; 将溶液加入质谱上样瓶中, 进质谱检测。

上述实验进行 3 次独立的生物学重复(即将每组的 12 个肺组织, 均匀混样为 3 个样品, 分别进行独立实验)。

1.2.3 液相色谱串联质谱分析

1.2.3.1 反向液相色谱分离 将制备好的样本用 Thermo-Dionex 终极 3000 高效液相色谱系统进行分离, 梯度洗脱 60 min, 流速 0.25 μL/min, 这是直接干扰热 LTQ-Orbitrap Velos 质谱仪。分析柱是自制的熔融石英毛细管柱(75 μm ID, 150 毫米长度; C-18 (300A, 5 μm; Varian, Lexington, MA)。流动相 A 由 0.1% 甲酸水组成, 流动相 B 由乙腈和 0.1% 甲酸组成。

1.2.3.2 质谱鉴定 质谱采用 LTQ-Orbitrap 系统(Thermo Scientific), 纳升喷雾离子源, 喷雾电压为 1.6 kV, 毛细管温度为 250 °C, 质谱扫描方式为数据依赖的采集工作模式下(DDA, Data Dependent Analysis), 每次全扫描后最多采集 20 个碎片图谱。全扫描分辨率: 70 000; MS/MS 分辨率: 30 000; 母离子扫描范围: 400 ~ 1 800 m/z; 碰撞能量: 35% CID。

1.2.4 Western blotting 验证试验 Western blot 试验利用目的蛋白的抗体作为一抗,HRP-IgG 作为二抗。肝组织中的蛋白通过 SDS-PAGE 进行初步分离后,转移到 0.45 μm 的硝酸纤维素膜上,转膜过程在低温下完成。转移到硝酸纤维素膜的蛋白用浓度为 5% 的脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h,封闭液为脱脂奶粉溶于含有 150 mmol/L NaCl、0.2% Tween 20 和 0.05% Triton X-100 的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 7.5)(TBST)。在封闭之后的硝酸纤维素膜用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中,目的蛋白与其一抗进行孵育,室温下 2 h。彻底清洗硝酸纤维素膜后,在室温下用 HSP-IgG(1:5 000 溶于含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 中)孵育 2 h。结合的抗体通过 Super Signal West Pico Trial Kit 的化学发光法进行检测。

1.3 统计学方法

1.3.1 蛋白鉴定及差异蛋白筛选 将通过实验得到的串联质谱数据与数据库模拟得到的理论质谱数据进行匹配,从而得到蛋白质鉴定的原始结果。数据处理采用含 Paragon algorithm 算法的 Protein Pilot Software v. 5.0(AB SCIEX, USA) 软件进行,本次实验使用的数据库为小鼠数据库,数据库来源于 UniProt。基于蛋白质鉴定的原始结果进行分析筛选得到可信蛋白。可信蛋白筛选标准:Peptide ≥ 1。

基于可信蛋白进行显著差异表达蛋白的筛选。差异蛋白筛选标准:首先将 3 次实验的可信蛋白数据进行合并,利用 v-lookup 函数,将 3 次实验中相同 ID 的蛋白合并到一起。然后利用组内比较设置矩阵数组,最后利用 t-test 算法计算出模型组与空白对照组的差异变化倍数 FC 以及差异显著性值 P,采用 P < 0.05,且 FC 变化为 1.5 倍进行差异蛋白筛选(即 FC > 1.5 或 FC < 0.67)。

1.3.2 生物信息学分析 基因本体论(Gene Ontology, GO)是基因本体联合会(Gene Ontology Consortium)建立的数据库,可以用一套具有动态形式的控制字集(Controlled Vocabulary),来描述基因及蛋白质在细胞内所扮演的角色,从而来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。本实验采用 Panther 和 Davide (<http://www.pantherdb.org/>和 <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)对筛选的差异表达蛋白质进行 GO 分类注释和富集分析。

蛋白互作基于 String 数据库进行分析,string 数据库是蛋白质间预测的功能相关性的一个数据库,可以搜寻已知蛋白质之间和预测蛋白质之间相互作用的系统。这种相互作用既包括蛋白质之间的物理

相互作用,也包括蛋白质之间的功能相关性。利用蛋白之间的相互作用关系,可以推测其作用方式及机制。

2 结果

2.1 差异蛋白筛选及 GO 富集 以 P < 0.05,FC 变化倍数大于 1.5 为标准筛选各组间差异蛋白。与空白组比较,HG1 组中有 158 种蛋白的表达有差异,HG2 组中由 650 个差异蛋白,HG3 中有 219 个差异蛋白,HG4 中有 378 个差异蛋白。通过 Panther 软件分析,发现各组中的差异蛋白均主要参与代谢过程和细胞过程(图 1)。

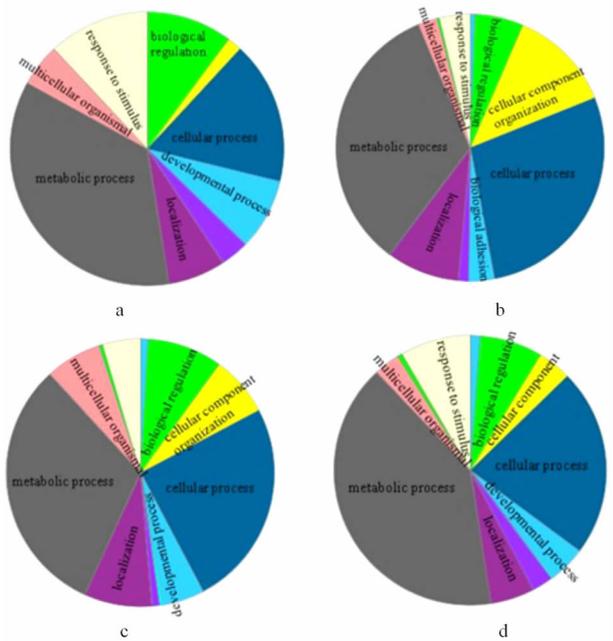


图 1 高剂量 1、2、3、4 周中各差异蛋白生物过程聚类分析 注:a、b、c、d 分别代表高剂量 HG1、HG2、HG3、HG4 组

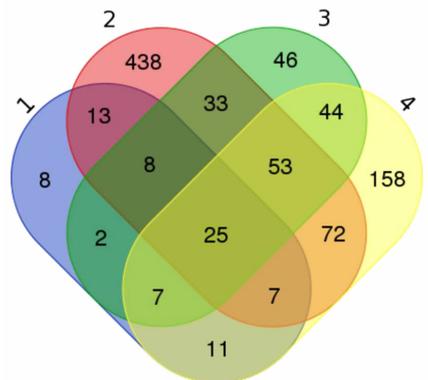


图 2 高剂量 4 组的韦恩图

注:1、2、3、4 分别代表 HG1、HG2、HG3 和 HG4 组

利用 4 组中的差异蛋白做韦恩图(图 2),结果发现有 25 个蛋白是在 4 组中都存在的(表 1)。随着时间的推移,大黄素对肝组织的破坏作用是逐步加重的,贯穿在 4 周中一直发生变化的蛋白是与大

表1 25个共有差异蛋白

蛋白 ID	名称	肽段覆盖率(%)	评估分数	上调/下调	P 值
F1LRJ9	硒结合蛋白 1	1 426.33	56.05	↑	0.016 549
Q4KM35	蛋白酶体亚基 β -10	52.81	19.05	↑	3.87E-05
P18420	蛋白酶体亚基 α -1	61.95	34.22	↑	0.002 676
Q9JJ19	Na(+)/H(+) 离子交换因子 NHE-RF1	70.17	31.74	↑	0.010 875
P24090	α -2-HS-糖蛋白(热稳定性糖蛋白)	64.88	19.03	↑	0.026 789
G3V710	过氧化物酶 3	18.72	4.67	↓	0.007 762
Q68FS4-2	氨基肽酶-2	598.58	39.55	↑	0.003 931
P40307	蛋白酶体亚基 β -2	275.10	35.32	↑	0.005 513
MORE00	微管蛋白 A	14.68	31.18	↑	0.000 213
P63018	热休克蛋白(71 kDa)	2 676.29	56.04	↑	1.57E-05
D3ZZR3	组织蛋白酶 S	15.67	10.03	↓	0.048 666
G3V9N8	AP-1 复合物 β -1	127.99	14.86	↓	0.035 801
MORDC5	乙酰 CoA 结合蛋白	215.67	66.28	↑	0.006 594
F1LSQ6	蛋白酶体亚基 α	252.78	48.03	↑	0.004 91
Q66H45	肽重复序列结构 36	43.65	23.66	↑	0.012 483
P61459	喋呤-4- α -甲醇胺脱水酶	226.90	64.42	↑	4.21E-06
B5DFD8	谷氨酸类蛋白	17.13	38.60	↑	0.014 419
D4A5X8	AhcyII 蛋白因子	14.53	1.89	↓	0.003 469
P01041	半胱氨酸蛋白酶抑制剂-B	29.20	51.02	↑	0.023 366
F1LRE1	谷胱甘肽还原酶	218.50	43.66	↑	0.029 557
P07632	超氧化物歧化酶 ^[Cu-Zn]	775.32	52.60	↑	0.002 428
D4A5L9	蛋白因子 LOC679794	130.13	49.52	↑	0.001 601
D4A3E2	氨基肽酶 1	67.89	17.48	↑	0.009 492
Q62669	蛋白因子 Hbb-b1	775.36	68.71	↑	0.019 457
Q6IRK9	羧肽酶 Q	485.77	35.81	↑	0.039 932

表2 10个与催化活性相关的蛋白

蛋白 ID	名称	肽段覆盖率(%)	评估分数	上调/下调	P 值
Q4KM35	蛋白酶体亚基 β -10	52.81	19.05	↑	3.87E-05
P18420	蛋白酶体亚基 α -1	61.95	34.22	↑	0.002 676
P24090	α -2-HS-糖蛋白(热稳定性糖蛋白)	64.88	19.03	↑	0.026 789
P40307	蛋白酶体亚基 β -2	275.10	35.32	↑	0.005 513
P63018	热休克蛋白(71 kDa)	2 676.29	56.04	↑	1.57E-05
D3ZZR3	组织蛋白酶 S	15.67	10.03	↓	0.048 666
P61459	喋呤-4- α -甲醇胺脱水酶	226.90	64.42	↑	4.21E-06
P07632	超氧化物歧化酶 ^[Cu-Zn]	775.32	52.60	↑	0.002 428
D4A5L9	蛋白因子 LOC679794	130.13	49.52	↑	0.001 601
Q6IRK9	羧肽酶 Q	485.77	35.81	↑	0.039 932

黄素的破坏作用直接相关的,在 25 个共有差异蛋白中,有 21 个蛋白在 4 组中均表达上调,4 个蛋白在 4 组中均表达下调。

2.2 25 个差异蛋白功能聚类分析 通过 Panther 软件的蛋白功能聚类分析发现,25 个蛋白中有 10 个蛋白是有催化活性,2 个有抗氧化活性,3 个与蛋白连接相关(图 3),且有 9 个蛋白表达上调(表 2),说明这 9 个蛋白与大黄素导致的肝损伤极为相关:3 个为蛋白酶体蛋白以及 1 个热休克蛋白 70 家族蛋白高表达;另外, α -2-HS-糖蛋白(热稳定性糖蛋白)在 4 组中的表达量均为上调。此外,10 个蛋白中有 1 个蛋白:组织蛋白酶 S,该酶为半胱氨酸蛋白酶家

族成员,富含半胱氨酸,而大黄素的存在影响了含半胱氨酸蛋白的正常表达,使组织蛋白酶 S 的功能不能正常发挥。

由图 4 可见,25 个相关蛋白主要可以分为两部分,一部分是与蛋白酶体相关的蛋白,主要是用来水解错误折叠的蛋白质;另一部分是 HSP70 相关通路。

2.3 Western blotting(WB)验证试验 蛋白质组学数据结果分析显示,大黄素的存在使 α -2-HS-糖蛋白(热稳定性糖蛋白)和 HSP70 表达上调,而与空白对照组相比组织蛋白酶 S 在各组中均为下调。结果如图 5 所示,随着时间的延长,各个蛋白的表达量与组学数据一致。并且无论是在高剂量组还是在低剂

量组,组织蛋白酶都有表达下调的趋势(图6)。

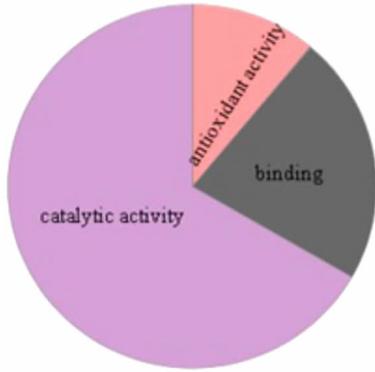


图3 25个共有差异蛋白功能聚类分析

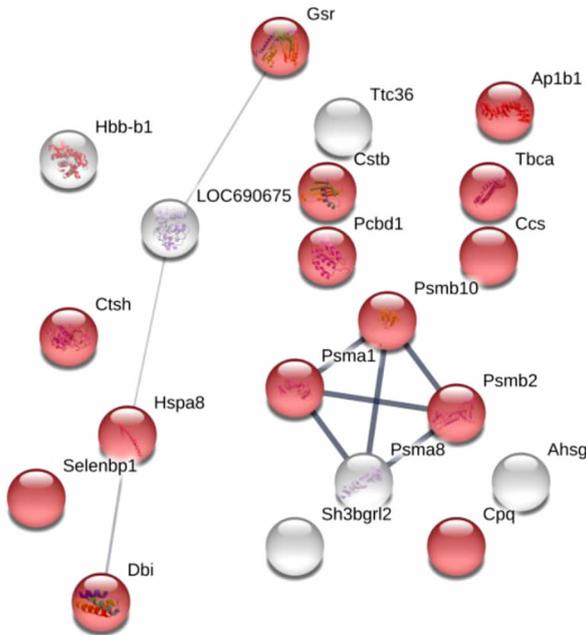


图4 大鼠肝组织中共有差异蛋白相互作用

注:圆球表示蛋白,直线线表示2个蛋白之间有相互作用关系,且线越粗作用方式越明显及多样,红色的圆球为14个在细胞基质中的蛋白

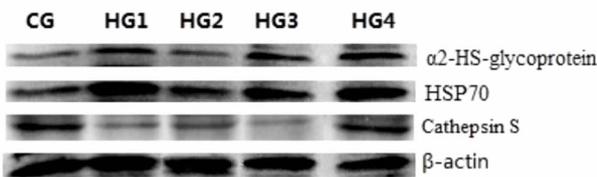


图5 各差异蛋白 WB 验证结果

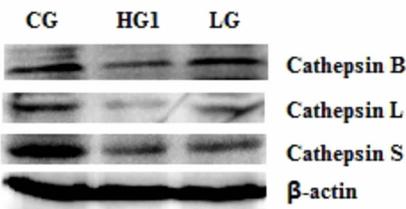


图6 各组织蛋白酶在高低剂量组中的表达

注:CG为空白对照组,HG1为高剂量1周组,LG为低剂量组

3 讨论

黄素在体外有良好的药理活性,如抗氧化^[11-13],抗炎^[14-15],抗血管生成^[16-17],诱导细胞凋亡^[18-20],但由于对大黄素体内代谢缺乏详细了解,大黄素的作用机制仍然是一个未解的问题。因此,为了清楚大黄素在体内与哪些蛋白有相互关系,是否安全,我们设计了一系列实验。前期研究发现,灌胃高剂量的大黄素时,大鼠肝组织切片内部会有炎症反应出现,并且随着时间的延长而加重,最终在第四周时出现脂肪空泡。HG1(第1周)组与空白对照组比较,有158个差异蛋白。经过数据分析发现,大黄素使肝细胞中的质子传输受到影响,进而影响能量代谢,并且这一影响也在低剂量组中也同样存在。既然灌胃高剂量大黄素1周时,肝组织蛋白变化明显,那么随着时间的推移,大黄素的影响是否会加剧?导致肝损伤出现的原因是什么?

本试验通过对高剂量给药4周4个时间点的大鼠肝组织做蛋白质组学数据分析发现,25个差异蛋白是在4组差异蛋白中共同存在的,21个蛋白在4组中均表达上调,4个蛋白在4组中均表达下调。蛋白酶体蛋白亚基及热休克蛋白70家族表达上调,蛋白酶体蛋白与热休克蛋白70家族均与蛋白质的高级结构密切相关,试验结果说明蛋白质高级结构错误概率增加,使一些蛋白质合成功能的出现紊乱。在催化活性的蛋白当中, α 2-HS-糖蛋白(热稳定性糖蛋白),该蛋白的含量可以在一定程度上指示肝病的发展状况,是一个新型的肝病早期预测指标^[21]。本实验中,4组中该蛋白表达量均为上调,说明随着时间的推移肝组织受到了一定程度的破坏,也进一步说明大黄素的长期用药可以导致肝损伤。此外,10个催化活性蛋白中有1个蛋白:组织蛋白酶S表达下调,该酶为半胱氨酸蛋白酶家族成员,富含半胱氨酸,该酶的下调可能是因为大黄素与半胱氨酸的加合反应导致合成蛋白的原料耗竭,无法正常合成该酶,这与文献报道结果相一致^[22]。并且这一结果在WB数据中也得到了证实:无论高剂量还是低剂量,大黄素都能引起含半胱氨酸的组织蛋白酶表达下调,这也说明长期服用大黄素会增加肝损伤的概率,不建议长期大剂量服用。

长期服用大黄素会导致大鼠肝组织出现炎症反应,有引起肝损伤的风险。通过蛋白质组学分析发现,大黄素可以使组织蛋白酶家族中的几个重要酶表达下调,影响正常的肝组织功能。并且无论是在高剂量组还是在低剂量组,这种影响都是存在的。

致谢:杨晓伟负责实验的设计、实施和论文的撰写;张银环、段飞鹏负责部分实验数据的整理;肖红斌为本实验提供了思路及指导。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 22-23.
- [2] Cho HC, Min HJ, Ha CY, et al. Reactivation of Pulmonary Tuberculosis in a Patient with Polygonum multiflorum Thunb-Induced Hepatitis [J]. Gut Liver, 2009, 3(1): 52-56.
- [3] Jung KA, Min HJ, Yoo SS, et al. Drug-Induced Liver Injury: Twenty Five Cases of Acute Hepatitis Following Ingestion of Polygonum multiflorum Thunb [J]. Gut Liver, 2011, 5(4): 493-499.
- [4] Dong H, Slain D, Cheng J, et al. Eighteen cases of liver injury following ingestion of Polygonum multiflorum [J]. Complement Ther Med, 2014, 22(1): 70-74.
- [5] Huang Q, Lu G, Shen HM, et al. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb [J]. Med Res Rev, 2007, 27(5): 609-630.
- [6] Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, et al. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors [J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 2800-2804.
- [7] National Toxicology 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.
- [8] 张瑞晨, 刘斌, 孙震晓, 等. 何首乌提取物对人正常肝细胞 L02 周期阻滞及凋亡的影响 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(6): 554-561.
- [9] 杨波. 何首乌临床应用中的不良反应分析 [J]. 医学信息, 2015, 28(6): 200-201.
- [10] Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride [J]. Pharmacol Toxicol, 2000, 87(5): 229-33.
- [11] Vargas F, Fraile G, Velásquez M, et al. Studies on the photostability and phototoxicity of aloe-emodin, emodin and rhein [J]. Pharmazie, 2002, 57(6): 399-404.
- [12] Li HL, Chen HL, Li H, et al. Regulatory effects of emodin on NF-kappaB activation and inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages [J]. Int J Mol Med, 2005, 16(1): 41-47.
- [13] Wu Y, Tu X, Lin G, et al. Emodin-mediated protection from acute myocardial infarction via inhibition of inflammation and apoptosis in local ischemic myocardium [J]. Life Sci, 2007, 81(17-18): 1332-1338.
- [14] Lu Y, Zhang J, Qian J. The effect of emodin on VEGF receptors in human colon cancer cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2008, 23(2): 222-228.
- [15] He ZH, He MF, Ma SC, et al. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(2): 313-317.
- [16] Huang Q, Shen HM, Ong CN. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68(2): 361-371.
- [17] Huang Q, Shen HM, Shui G, et al. Emodin inhibits tumor cell adhesion through disruption of the membrane lipid Raft-associated integrin signaling pathway [J]. Cancer Res, 2006, 66(11): 5807-5815.
- [18] Huang Q, Lu G, Shen HM, et al. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb [J]. Med Res Rev, 2007, 27(5): 609-630.
- [19] Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan PP, et al. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an anti-tumor agent [J]. Med Res Rev, 2007, 27(5): 591-608.
- [20] Su YT, Chang HL, Shyue SK, et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygenspecies-dependent mitochondrial signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(2): 229-241.
- [21] Kalabay L, Jakab L, Prohászka Z, et al. Human fetuin/alpha2HS-glycoprotein level as a novel indicator of liver cell function and short-term mortality in patients with liver cirrhosis and liver cancer [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002, 14(4): 389-394.
- [22] Wang C, Dai X, Liu H, et al. Involvement of PPARγ in emodin-induced HK-2 cell apoptosis [J]. Toxicol In Vitro, 2015, 29(1): 228-233.

(2018-01-18 收稿 责任编辑: 杨觉雄)