

· 研究简报 ·

芦荟大黄素介导的光动力学作用对胃癌细胞的作用

段勤勤 白定群 李开庭 高青

【摘要】目的 探讨新型光敏剂芦荟大黄素介导的光动力学作用对人体胃癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 体外培养人体胃癌细胞 SGC-7901,不同浓度(0、0.1、1.0、10、20、30、40 和 50 μM) 芦荟大黄素处理胃癌细胞 24 h,四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测胃癌细胞 SGC-7901 增殖率的变化;将芦荟大黄素(10 μM)作用于胃癌细胞 SGC-7901 6 h 后,不同能量的紫外线(波长 430 nm,连续输出方式,功率密度 40 mW/cm^2)处理胃癌细胞,能量密度分别为 0、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 和 25.6 J/cm^2 ,采用 MTT 法检测胃癌细胞增殖率的变化;芦荟大黄素(10 μM)作用于胃癌细胞 SGC-7901 6 h 后,能量密度为 12.8 J/cm^2 的紫外线(波长 430 nm,连续输出方式,功率密度 40 mW/cm^2)处理胃癌细胞,采用透射电镜法检测胃癌细胞超微结构的变化;采用 TUNEL 法检测凋亡细胞形态学的变化;采用流式细胞仪检测胃癌细胞凋亡率的变化。**结果** 不同浓度芦荟大黄素作用于胃癌细胞 24 h,芦荟大黄素浓度低于 10 μM 对胃癌细胞的作用差异无统计学意义($P>0.05$),芦荟大黄素(10 μM)介导的光动力作用对胃癌细胞的抑制作用呈能量依赖性,光照能量密度为 3.2、6.4、12.8 和 25.6 J/cm^2 与 0 J/cm^2 比较对胃癌细胞的抑制作用差异有统计学意义($P<0.05$);透射电镜下能观察到明显的凋亡小体;TUNEL 法可观察到细胞核固缩、碎裂和凋亡小体;流式细胞仪检测到 PDT 组胃癌细胞的凋亡率明显高于空白对照组、单纯光照组和单纯药物组。**结论** 芦荟大黄素介导的光动力作用能有效的抑制胃癌细胞生长,其抑制胃癌细胞生长的机制与光动力作用所致的细胞凋亡有关系。

【关键词】 芦荟大黄素; 光动力; 胃癌细胞; 凋亡

光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)又称光化学疗法,是近年来兴起的治疗肿瘤的一种新方法,一般认为光敏剂对肿瘤组织并无明显的作用,只有被一定波长的光源照射后才产生一系列的光动力学反应,产生单态氧等细胞毒性物质,从而导致肿瘤细胞死亡。

芦荟大黄素(aloe-emodin, AE)是一种从芦荟、大黄等传统中药中提取的新型蒽醌化合物,具有抗多种肿瘤的作用,近年来研究发现其具有光敏活性,是潜在的光敏剂^[1]。有文献报道,AE 介导的 PDT 对肺癌细胞有一定的杀伤作用^[2-3]。胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,2010 年卫生统计年鉴显示,胃癌病死率占我国恶性肿瘤病死率的第三位^[4],目前对胃癌的治疗手段主要是手术、放疗和化疗,但其五年生存率并无明显提高,寻找新的有效治疗胃癌的方法显得十分重要。本研究将激光医学与祖国传统医学相结合,初步探讨以中药芦荟大黄素作为新型光敏剂介导光动力诱导胃癌细胞凋亡,旨在探讨芦荟大黄素介导的光动力疗法作为胃癌治疗的新途径。

材料与方法

一、材料和细胞株

芦荟大黄素(纯度 $\geq 98\%$)购自江西本草天工科技有限责任公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解后过滤浓度为 100 mmol/L 储存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用;四甲基偶氮唑盐

(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自美国 Sigma 公司;LED 购自重庆京渝激光生物研究有限公司;RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)购自 Hyclone 公司;优级胎牛血清购自 Bioind 公司;胃癌细胞株 SGC-7901 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心;一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(One Step TUNEL Apoptosis Assay Kit)购自碧云天生物技术研究所;细胞凋亡检测试剂盒膜联蛋白-V-FITC (Annexin-V-FITC)购自北京宝赛生物技术有限公司;细胞凋亡 4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色试剂盒购自美国凯基公司。

二、细胞培养

胃癌细胞 SGC-7901 在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养,每隔 1~2 d 传代一次,取对数生长期的细胞用于实验。

三、MTT 法检测

1. 检测 AE 对胃癌细胞增殖的影响:将贴壁细胞随机分为空白对照组和 AE 组。AE 组每孔加终浓度为(0.1、1.0、10、20、30、40 和 50 μM)的 AE 培养液,空白对照组每孔加等量的无 AE 培养液,避光培养 24 h。每孔加 MTT(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)20 μl 培养 4 h,每孔加 150 μl DMSO,震荡 10 min。酶标仪 570 nm 波长处测吸光度(optical density, OD)值,按公式(1)计算细胞存活率,重复 3 次。

$$\text{存活率} = \frac{\text{实验组平均 OD}}{\text{空白对照组平均 OD}} \times 100\% \quad (1)$$

2. 检测 AE 介导的光动力疗法对胃癌细胞增殖的影响:将贴壁细胞随机分为单纯光照组(不加 AE,只光照)和 PDT 组(加 10 μM 的 AE,加光照),避光培养 6 h。每孔换成含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的培养液,光照处理(蓝紫外光波长 430 nm,连续输出方式,功率密度 40 mW/cm^2 ,照射时间为 0、20、40、80、160、320 和 640 s;调整光斑面积使各组细胞实际接

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.08.022

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101692);重庆市自然科学基金资助项目(2011BS136)

作者单位:400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院消化内科(段勤勤、高青),骨科(李开庭),康复医学科(白定群)

通信作者:高青,Email:gaoqing27@aliyun.com

受到的光能量密度达 0、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 和 25.6 J/cm², 避光培养 24 h。每孔加 MTT(5 μg/ml) 20 μl 培养 4 h, 每孔加 150 μl DMSO, 震荡 10 min。酶标仪 570 nm 波长处测吸光度, 按公式(1)计算细胞存活率, 重复 3 次。

四、细胞存活率

将贴壁细胞随机分为空白对照组(不加 AE, 不光照)和 PDT 组(加 10 μM AE + 光照), 避光培养 6 h。每孔换成含 10% FBS 的培养液, PDT 组以 12.8 J/cm² 的能量密度进行光照处理, 分别计算光照处理前和处理后存活细胞数 A 和 B, 避光培养 12 h, 按公式(2)计算细胞存活率, 实验重复 3 次。

$$\text{存活率} = \frac{\text{光照处理后细胞数(B)}}{\text{光照处理前细胞数(A)}} \times 100\% \quad (2)$$

五、透射电镜法检测

用透射电镜法检测 AE 介导的光动力对胃癌细胞超微结构的影响。将细胞培养贴壁后, 加 10 μM 的 AE, 避光培养 6 h。每孔换成含 10% FBS 的培养液, 以 12.8 J/cm² 的能量密度进行光照处理, 避光培养 12 h。PBS 洗涤, 4% 戊二醛固定, 电镜观察胃癌细胞超微结构。

六、TUNEL 法检测

用 TUNEL 法检测 AE 介导光动力对胃癌细胞凋亡形态学变化。将贴壁细胞随机分为空白对照组(不加 AE, 不光照)、单纯光照组(不加 AE, 只光照)、单纯药物组(只加 10 μM 的 AE, 不光照)、PDT 组(加 10 μM 的 AE, 加光照), 避光培养 6 h。每孔换成含 10% 的 FBS 培养液, 单纯光照组和 PDT 组以 12.8 J/cm² 的能量密度进行光照处理, 避光培养 12 h。收集细胞, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 30 min, TUNEL 染液 37℃ 避光孵育 60 min, DAPI 染色, 甘油封片, 荧光显微镜下拍照。

七、流式细胞仪检测

用流式细胞仪检测 AE 介导的光动力对胃癌细胞凋亡率的影响。实验分组及处理同六, 收集细胞, 采用 Annexin V-PI 双染, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

八、统计学方法

实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 版软件包对各组数据进行正态检验和方差齐性检验, 多组数据间比较采用单因素方差分析及两因素方差分析, 组内两两比较采用 SNK-q 检验分析, 两组数据间采用 T 检验。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

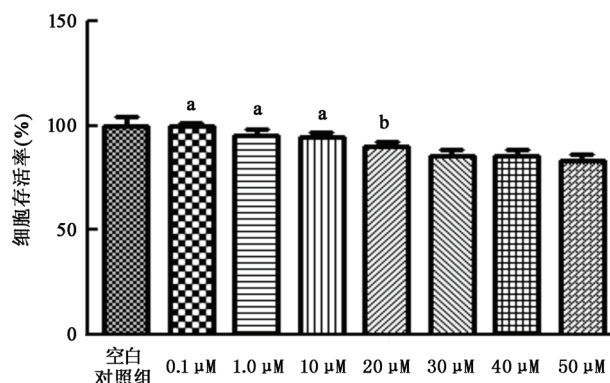
结 果

一、AE 对胃癌细胞增殖的影响

不同浓度的 AE(0.1、1.0、10、20、30、40 和 50 μM) 作用于胃癌细胞 24 h 后均有抑制作用, 且呈剂量依赖性, 即对照组与较低浓度(0.1、1.0、10 μM) 的 AE 组比较, 组间差异无统计学意义(P > 0.05); 对照组与较高浓度(20、30、40 和 50 μM) 的 AE 组比较, 组间差异有统计学意义(P < 0.05); AE 对胃癌细胞刚刚产生作用的浓度为 20 μM, 以下相关实验选用的药物浓度为 10 μM, 详见图 1。

二、AE 介导的光动力对胃癌细胞增殖的影响

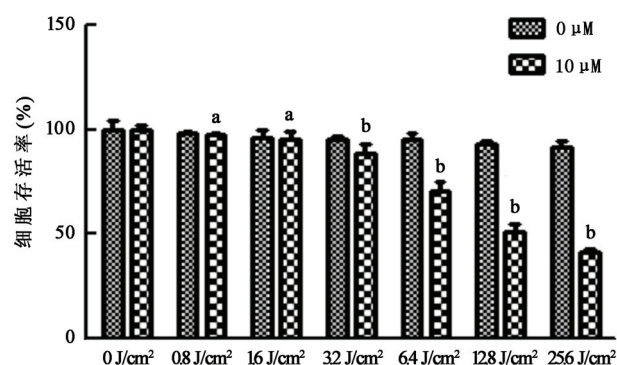
AE(10 μM 浓度) 介导的光动力(3.2、6.4、12.8 和 25.6 J/cm²) 作用于胃癌细胞 24 h 后均有抑制作用, 且呈能量依赖性; 单纯光照组对胃癌细胞抑制作用差异无统计学意义(P > 0.05); AE(10 μM) 介导的光动力, 当光照能量为 0.8 和



注: 与对照组比较, ^aP > 0.05; ^bP < 0.05

图 1 不同浓度的 AE 对胃癌细胞 SGC-7901 的细胞毒作用与对照组比较示意图

1.6 J/cm² 时, 与 0 J/cm² 比较, 其对胃癌细胞的抑制作用差异均无统计学意义(P > 0.05); 而光照能量为 3.2、6.4、12.8 和 25.6 J/cm² 时, 与 0 J/cm² 比较, 其对胃癌细胞的抑制作用差异均有统计学意义(P < 0.05); AE(10 μM 浓度) 介导的光动力处理胃癌细胞 24 h 的半数抑制浓度(inhibitory concentration, IC₅₀) 为 12.8 J/cm², 以下相关实验选用的光能量密度为 12.8 J/cm², 详见图 2。

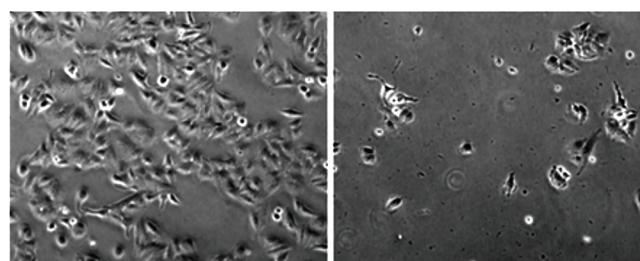


注: 与光照为 0 J/cm² 时比较, ^aP > 0.05; ^bP < 0.05

图 2 10 μM 的 AE 在不同光照能量密度作用下对胃癌细胞 SGC-7901 的细胞毒作用比较示意图

三、PDT 组细胞存活率

AE(10 μM) 介导的光动力(12.8 J/cm²) 作用于胃癌细胞 12 h 后, 细胞存活率显著低于空白对照组, 差异有统计学意义(P < 0.05), 详见图 3。



空白对照组

PDT 组

图 3 10 μM 的 AE 在 12.8 J/cm² 光照剂量作用下胃癌细胞镜下观(光学显微镜, ×400)

四、透射电镜观察 AE 介导的光动力对胃癌细胞超微结构的影响

AE (10 μM) 介导的光动力 (12.8 J/cm²) 作用于胃癌细胞 12 h 后, 能见到细胞结构破坏, 箭头所示为典型的凋亡小体形成, 详见图 4。

五、TUNEL 法观察 AE 介导光动力对胃癌细胞凋亡形态学变化

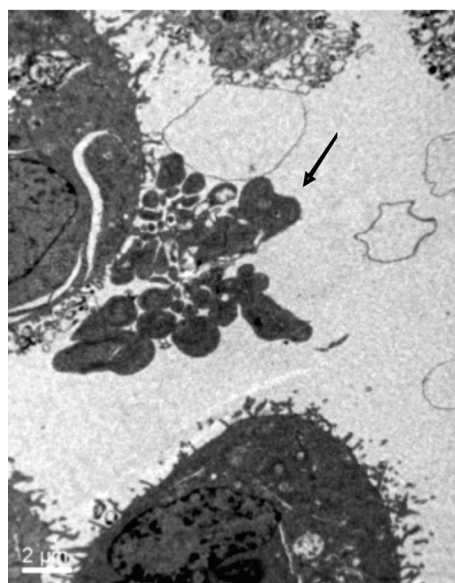
AE (10 μM) 介导的光动力 (12.8 J/cm²) 作用于胃癌细胞 12 h 后, TUNEL 染色于荧光显微镜下观察到 PDT 组出现典型的凋亡细胞形态学变化, 即贴壁细胞由铺路石样变为椭圆形, 细胞体积缩小, 核固缩, 核碎裂, 凋亡小体, 详见图 5。

六、流式细胞仪检测 AE 介导的光动力对胃癌细胞凋亡率的变化

AE (10 μM) 介导的光动力 (12.8 J/cm²) 作用于胃癌细胞 6 h 后, 采用 Annexin V-PI 染色后, 流式细胞仪对细胞凋亡率进行检测, PDT 组胃癌细胞凋亡率明显高于其它各组。

讨 论

目前 PDT 已经成为肿瘤治疗的新方法, 芦荟大黄素是从传统中药中提取的新型蒽醌化合物, 有大量的实验研究表明其具



注: 图中箭头示凋亡小体

图 4 10 μM 的 AE 在 12.8 J/cm² 光照剂量作用下诱导胃癌细胞超微结构镜下观 (透射电镜, $\times 4000$)

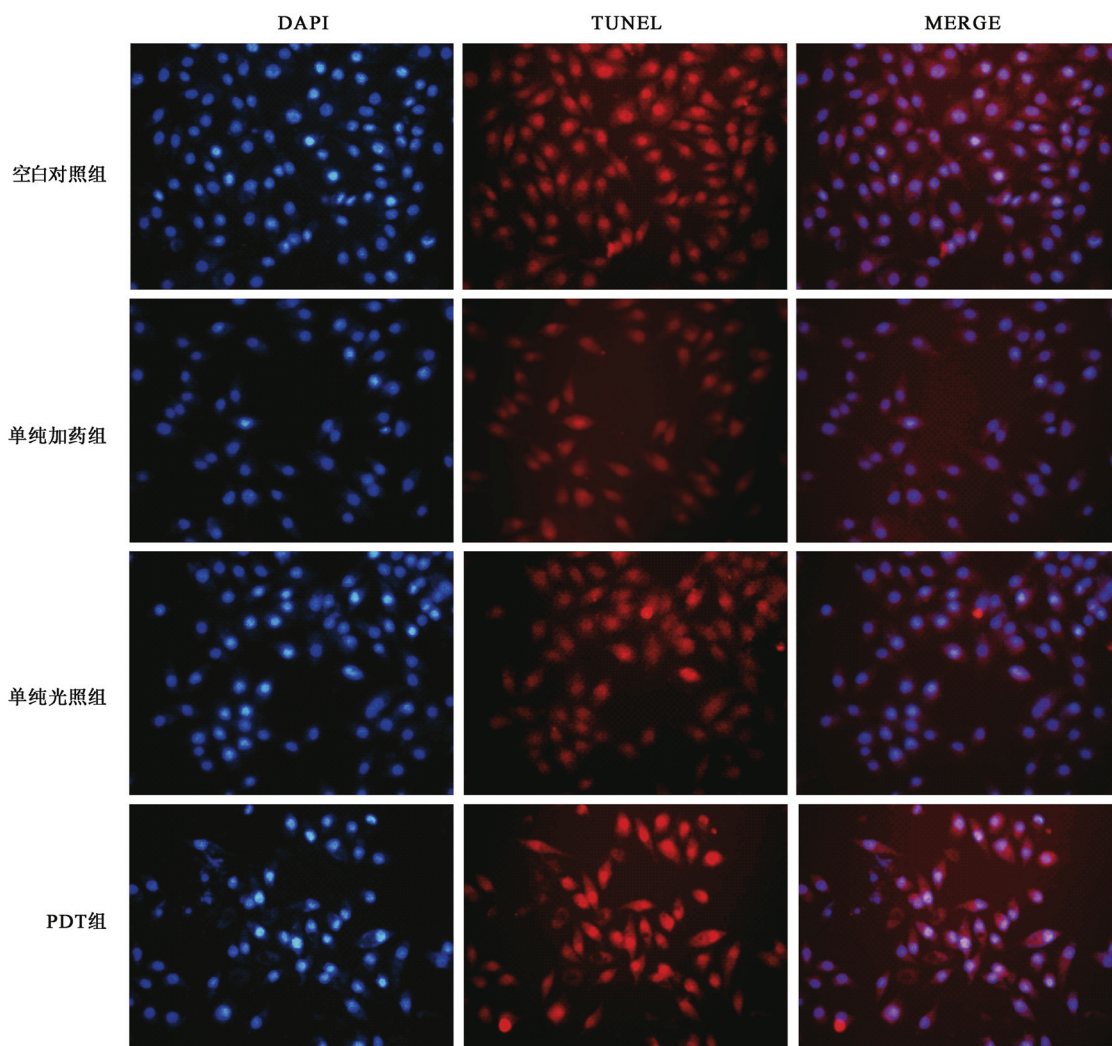


图 5 10 μM 的 AE 在 12.8 J/cm² 光照剂量作用下诱导各组胃癌细胞凋亡形态镜下观 (TUNEL 染色, $\times 400$)

有抗病毒、护肝、降脂、抗结核、泻下和促进溃疡愈合等功效^[5,7]。近期有研究发现,芦荟大黄素具有荧光性,其最大激发波长为 430 nm 左右,最大发射波长为 510 nm,且具有抗内皮细胞和肿瘤细胞血管生成的作用^[1,8],因而芦荟大黄素具有成为新型光敏剂的潜能。本课题组之前的实验基础^[9],研制出波长为 430 nm 的 LED 光源,该光源具有单色性好、能量密度高等特点,是目前比较先进的光动力疗法的激发光源。

本研究利用芦荟大黄素介导的光动力疗法,探讨其对胃癌细胞的杀伤作用。通过 MTT 法检测芦荟大黄素对胃癌细胞增殖的影响,结果显示,高浓度的芦荟大黄素本身具有一定抗肿瘤细胞增殖的作用,当芦荟大黄素的药物浓度为 0、0.1、1.0 和 10 μM 时,其对胃癌细胞的作用差异无统计学意义,而芦荟大黄素浓度为 20 μM 时开始对胃癌细胞有抑制作用。本实验主要是研究 AE 对胃癌细胞本身无作用时介导的光动力作用,结果表明,AE 浓度为 20 μM 时开始对胃癌细胞就有暗毒性作用,因此,后续实验所选药物浓度为 10 μM 。由于芦荟大黄素具有光敏活性,10 μM 芦荟大黄素在 430 nm 波长光源激发下,可产生具有显著杀伤肿瘤细胞的光动力效应,结果显示,芦荟大黄素介导光动力疗法对胃癌细胞的杀灭作用具有能量依赖性,光能量越大,肿瘤细胞的存活率越低。

肿瘤细胞死亡的方式主要是凋亡和坏死;凋亡是程序性细胞死亡过程,凋亡细胞可出现染色质浓缩,细胞缩小和核碎裂,甚至典型的凋亡小体^[10]。于钟等^[11]研究表明,PDT 可以诱导肿瘤细胞凋亡,也可以引起肿瘤细胞坏死,以哪一种为主则取决于肿瘤细胞的种类和 PDT 的剂量(包括光敏剂剂量和光照能量)。本研究在透射电镜下观察到芦荟大黄素介导光动力处理的胃癌细胞可出现典型的凋亡小体;荧光显微镜下观察到芦荟大黄素介导光动力处理的胃癌细胞出现显著的凋亡细胞形态学变化;流式细胞仪检测芦荟大黄素介导光动力处理的胃癌细胞,PDT 组出现的细胞凋亡率明显高于空白对照组、单纯药物组和单纯光照组。提示芦荟大黄素介导光动力作用杀灭胃癌细胞的主要机制可能为凋亡所致,但具体的凋亡途径有待下一步研究。

参 考 文 献

- [1] Cardenas C, Quesada AR, Medina MA. Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(24): 3083-3089.
- [2] Lee HZ, Yang WH, Bao BY, et al. Photodynamic activity of aloe-emodin induces resensitization of lung cancer cells to anoikis[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 648(1): 50-58.
- [3] Chang WT, You BJ, Yang WH, et al. Protein kinase C delta-mediated cytoskeleton remodeling is involved in aloe-emodin-induced photokilling of human lung cancer cells[J]. Anticancer Res, 2012, 32(9): 3707-3713.
- [4] 季鑫, 武爱文. 胃癌术后康复与治疗[J]. 癌症康复, 2012, 4(1): 16-20.
- [5] Kammoun M, Miladi S, Benali Y, et al. In vitro study of the PLA2 inhibition and antioxidant activities of aloe vera leaf skin extracts[J]. Lipids Health Dis, 2011, 10(1): 30.
- [6] Pisalkar PS, Jain NK, Jain SK. Osmo-drying of aloe vera gel cubes[J]. J Food Sci Technol, 2011, 48(2): 183-189.
- [7] Richard MM, John AO, Paul OO, et al. Methanolic extracts of aloe secundiflora engl inhibits in vitro growth of tuberculosis and diarrhea-causing bacteria[J]. Pharmacognosy Res, 2011, 3(2): 95-99.
- [8] 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.
- [9] 尚经轩, 谭勇, 许川山, 等. 芦荟大黄素介导光动力诱导人脐静脉内皮细胞凋亡适用性研究[J]. 激光杂志, 2010, 31(1): 68-69.
- [10] Lee HZ. Protein kinase C involvement in aloe-emodin-and Emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell[J]. Br J Pharmacol, 2001, 134(5): 1093-1103.
- [11] 于钟, 黄凤婷, 朱兆华, 等. 光动力作用诱导人胰腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. 岭南现代临床外科, 2011, 11(4): 274-277.

(修回日期: 2013-03-26)

(本文编辑: 汪 玲)

· 外刊摘英 ·

Treating full thickness chondral defects with Hyalograft C

BACKGROUND AND OBJECTIVE Autologous chondrocyte implantation has recently been introduced as a repair option for patients with full thickness chondral defects of the knee. Modifications of this procedure include matrix assisted autologous chondrocyte transplantation (MACT). This study assessed the long-term effect of MACT, using Hyalograft C autograft, for the treatment of the knee.

METHODS This prospective study included consecutive patients treated with Hyalograft C over a six-year period. The case series included 22 female and 31 male patients with a mean age of 32 years and a mean defect size of 4.4 cm^2 . Surgery comprised a two-step procedure. Four weeks after cells were harvested from healthy tissue, the cell seeded matrix was implanted through a mini-arthrotomy. Crutch assisted, non-weight-bearing ambulation was ordered for six weeks, with touchdown weight-bearing progressing to full weight-bearing from seven to 12 weeks. Outcome measures included the subjective International Knee Documentation Committee (IKDC) knee form, an objective IKDC knee score, a Lysholm score and a modified Cincinnati Knee Rating System score.

RESULTS The mean follow-up period was nine years, with a minimum follow-up of seven years. Treatment failure occurred in 12 of 53 patients at a mean of three years' post-surgery. Significant improvement was observed in all scores at all time points compared with pre-surgery levels ($P < 0.05$). Analysis demonstrated a significantly lower chance of graft survival in complex and salvage cases ($P < 0.001$).

CONCLUSION This study of consecutive patients with full thickness chondral defects found that treatment with Hyalograft C autograft can produce good, clinical, long-term outcomes.

【摘自: Brix MO, Stelzeneder D, Chiari C, et al. Treatment of full thickness chondral defects with Hylograft C in the knee: long-term results. Am J Sport Med, 2014, 42: 1426-1432.】