

芦荟苦素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响

朱杨壮¹, 张飞², 焦肖宁¹, 苏琳¹, 韦璐瑶¹, 朱娴丹¹, 黄珍祯¹,
朱诗国¹, 陈晓¹, 邹纯朴^{1*}, 胥孜杭^{1*}

(1. 上海中医药大学基础医学院, 经方理论应用研究中心, 科技实验中心, 上海 201203;
2. 上海交通大学医学院附属新华医院, 上海 200092)

[摘要] 目的:研究芦荟苦素诱导人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) A549 细胞发生凋亡,从而抑制其增殖的作用机制。方法:取对数生长期的 A549 细胞,用细胞计数试剂(cell counting kit, CCK-8)检测考察不同浓度的芦荟苦素(0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 A549 细胞增殖的影响, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的顺铂作为阳性对照。用结晶紫染色测定芦荟苦素(0, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 A549 细胞克隆形成的数目以及克隆形成的大小的作用;磷脂酰丝氨酸结合蛋白 V/碘化丙啶(annexin V/propidium iodide, PI)凋亡试剂盒染色检测芦荟苦素对 A549 细胞凋亡的影响;赫斯特(Hoechst)染色检测细胞凋亡核固缩现象;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测芦荟苦素对 A549 细胞中的 B 细胞淋巴瘤-特大型蛋白(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xl), B 细胞淋巴瘤-特大型/B 细胞淋巴瘤-2 联合死亡促体(Bcl-xl/Bcl-2 associated death promoter, Bad), 裂解半胱天冬酶-3 [cleaved-Caspase3, cl-Caspase-3(Asp175)], 半胱天冬酶-3(Caspase-3), 裂解核糖聚合酶(cleaved-poly ADP-ribose polymerase, cl-PARP), 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)凋亡相关蛋白表达的影响。体内实验将 5 周龄裸鼠皮下接种 2×10^6 个 A549 细胞,并随机分为用药组和空白组,连续 4 周每天分别进行芦荟苦素或生理盐水腹腔注射,每周测量裸鼠肿瘤体积和小鼠体质量,并观察裸鼠的外观表现(精神、毛发、食欲、睡眠等)。结果:芦荟苦素呈浓度依赖性抑制 A549 细胞增殖及克隆形成的数量和大小($P < 0.05$)。经芦荟苦素处理后, A549 细胞凋亡的数量以及细胞发生核固缩的现象明显增加($P < 0.01$),同时,芦荟苦素还明显下调了凋亡相关蛋白 Bcl-xl 的表达($P < 0.05$),增加 Bad 蛋白表达($P < 0.01$),同时还明显升高了 cl-PARP ($P < 0.01$)和 cl-Caspase-3($P < 0.05$)表达水平。此外,在体内,芦荟苦素可明显缩小小鼠皮下肿瘤的体积,减轻肿瘤质量,并且小鼠外观表现优于空白组。结论:芦荟苦素可能通过诱导 A549 细胞凋亡从而达到抑制 NSCLC 的作用,并且用药安全。

[关键词] 芦荟苦素; 非小细胞肺癌; 抑制细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0013-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191323

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190318.1644.008.html>

[网络出版时间] 2019-03-20 9:09

Effect of Aloesin on Proliferation and Apoptosis of Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells

ZHU Yang-zhuang¹, ZHANG Fei², JIAO Xiao-ning¹, SU Lin¹, WEI Lu-yao¹, ZHU Xian-dan¹,
HUANG Zhen-zhen¹, ZHU Shi-guo¹, CHEN Xiao¹, ZOU Chun-pu^{1*}, XU Zi-hang^{1*}

(1. School of Basic Medical Science, Application and Research Center of Classical Prescription, Science and Technology Experiment Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of aloesin in inducing apoptosis in human non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells, so as to inhibit its proliferation. **Method:** A549 cells in logarithmic growth phase were collected, and cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the effect of different concentrations of

[收稿日期] 20190307(010)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81804017);中国博士后基金面上项目(2018M640416);上海市科学技术委员会科研计划项目(18YF1423500);经方理论应用研究中心项目(A1-Z183020110)

[第一作者] 朱杨壮, 硕士, 从事中医药抗肿瘤研究, E-mail: zyz005@hotmail.com

[通信作者] * 胥孜杭, 博士, 师资博士后, 从事中医药抗肿瘤研究, E-mail: xuzihang19881021@126.com;

* 邹纯朴, 博士, 副教授, 从事中医药抗肿瘤研究, E-mail: chunpuzou@shutcm.edu.cn

aloesin (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the proliferation of A549. Effect of aloesin (0, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the number of clones formed in A549 cells and the size of clone formation was determined by crystal violet staining. effect of aloesin on apoptosis of A549 cells was detected by annexin V/propidium iodide (PI) apoptosis kit staining. Hoechst staining was used to detect the phenomenon of apoptotic nuclear pyknosis. Western blot was used to detect aloesin's effect on death-related protein expressions of Bcl-xl/Bcl-2 associated death promoter (Bad), cleaved-Caspase-3, cl-Caspase-3 (Asp175), Caspase-3, cleaved poly ADP-ribose polymerase (cl-PARP), poly ADP-ribose polymerase (PARP) in A549 cells. *In vivo*, 5-week-old nude mice were subcutaneously inoculated with 2×10^6 A549 cells, and randomly divided into the medication group and the blank group. aloesin or normal saline was intraperitoneally injected for 4 weeks, and the tumor volume of nude mice was measured weekly. The body weight of the mice was observed, and the appearance of the nude mice was observed. **Result:** Aloesin inhibited the proliferation and cloning of A549 cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). After treatment with aloesin, the number of apoptosis and the phenomenon of nuclear pyknosis in A549 cells increased significantly ($P < 0.01$). At the same time, aloesin significantly down-regulated the expression of apoptosis-related protein Bcl-xl ($P < 0.05$), and increased the expression of Bad protein ($P < 0.01$). The expression levels of cl-PARP ($P < 0.01$) and cl-Caspase-3 ($P < 0.05$) were also significantly increased. In addition, *in vivo*, aloesin significantly shrank the volume of subcutaneous tumors in mice, reduced tumor weight, with a better appearance than that of the control group. **Conclusion:** Aloesin may inhibit the expression of NSCLC by inducing apoptosis of A549 cells, and is safe to use, with no inhibitory effect on the body weight of mice.

[**Key words**] aloesin; non-small cell lung cancer; inhibition of cell proliferation; apoptosis

根据近年的流行病学统计结果显示,全球范围内,无论是在发达国家还是在发展中国家的发达地区,肺癌已位居恶性肿瘤的榜首,成为发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1-2],其中非小细胞肺癌(NSCLC)为肺癌中最常见的类型,约占所有肺癌的80%~85%^[3]。对于肺癌的治疗目前仍以铂类化疗药为主,但同时其严重的副作用和耐药性,极大地影响了患者的预后与生活质量,故寻找更为安全、有效的药物成为亟需解决的问题。

芦荟为百合科芦荟属多年生肉质草本植物,从中医角度来说,其性寒、味苦,归肝、胃、大肠经,具有清肝泻火、健胃止泄、活血化痰、清热解暑、杀虫疗疔等功效。芦荟中含有多种有效成分及生物活性物质,如芦荟大黄素、芦荟宁、芦荟苦素、芦荟多糖、芦荟苷、有机酸、纤维素、酵素物质、微量元素、维生素等^[4]。其中,关于芦荟大黄素^[5-7]的报道颇丰,涉及诸多领域,但关于芦荟苦素的报道并不多,并且大多数是围绕芦荟苦素抑制黑素细胞的生长为主^[8-9],在抗肿瘤方面的研究甚少。芦荟苦素(aloesin)是从百合科植物芦荟的枝叶中提纯的蒽酮类复合物,其为白色针状结晶,分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_9$,在植物体内的质量分数为0.3%左右^[10],其可视为酪氨酸酶的竞争性抑制剂,通过阻断酪氨酸的活性抑制黑素细胞生长,在皮肤美容方面起到重要作用^[11],此外还有

报道发现芦荟苦素对卵巢癌细胞 SKOV3,骨肉瘤细胞 S180,肝癌细胞 H22,纤维肉瘤细胞 Meth A 等都有较好的增殖抑制效果^[12-13],但是关于芦荟苦素抑制非小细胞肺癌细胞的研究目前还尚未见有相关报道。本研究拟用芦荟苦素培养 A549 肺癌细胞,观察其对肺癌细胞增殖及凋亡的影响。

1 材料

1.1 细胞株及动物 人非小细胞肺癌细胞株 A549 购自中国科学院细胞库,编号 TCHu150,稳定传至 4~5 代。5 周龄裸鼠,体质量 18 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SYXK(沪)2014-0008,所有小鼠在上海中医药大学 SPF 级屏障系统中饲养。动物实验开展已获上海中医药大学伦理委员会的同意,伦理编号 PZSHUTCM18120703。

1.2 药物 芦荟苦素购自上海甄准生物科技有限公司,批号 Z-A575435,将购置的化合物溶解在二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 41640)中制备 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液,HPLC 分析其纯度 $\geq 95\%$ 。注射用顺铂作为阳性对照,购自上海交通大学附属新华医院。

1.3 试剂 青霉素-链霉素,10%胎牛血清,DMEM 培养基,含 0.25% 乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶,Hoechst 33342(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号分别为 15140122, 10091148, 11995065,

25200072, B2261); Annexin V / 碘化丙啶 (PI) 凋亡试剂盒 (美国 BD 公司, 批号 556547); B 细胞淋巴瘤-特大型蛋白 (Bcl-xl), B 细胞淋巴瘤-特大型/B 细胞淋巴瘤-2 联合死亡促体 (Bad), 裂解半胱氨酸天冬酶-3 [cl-Caspase-3 (Asp175)], 半胱氨酸天冬酶-3 (Caspase-3), 裂解核糖聚合酶 (cl-PARP), 核糖聚合酶 (PARP), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 2762, 9292, 9661, 9662, 9544, 9542, 97166); 增强型细胞计数试剂 (cell counting kit, CCK-8) 试剂盒, 结晶紫染色液 (美国 Millipore 公司, 批号分别为 WBKLS0500, C0121)。

1.4 仪器 JY2002 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); BD Accuri™ C6 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司); SpectraMax190 型酶标仪 (美国 Molecular 公司); Leica DMi1 型显微镜 (德国 Leica 公司); 1658001 小型垂直电泳槽及转膜槽, Gel Doc XR 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 A549 细胞用 DMEM 培养基 (含 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的青霉素-链霉素和 10% 的胎牛血清) 放置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱中孵育。用含 $0.25\% \text{ EDTA}$ 的胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期的 A549 细胞进行检测。

2.2 CCK-8 法检测细胞增殖 将 A549 细胞以 3 000 个/孔接种于 96 孔板中, 每孔 $100 \text{ } \mu\text{L}$, 每个浓度组设置 5 个复孔, 放置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中过夜, 随后用不同浓度 ($0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 芦荟苦素或 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂 (顺铂是 NSCLC 化疗的临床一线用药, 故根据其半数抑制浓度 (IC_{50}), 设置 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h, 每孔加入 CCK-8 试剂 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 并混匀, 在培养箱中孵育 4 h, 最后通过酶标仪于波长 450 nm 测定每孔吸光度 A , 并取 5 个复孔的平均值, 以此计算细胞存活率。

2.3 细胞凋亡检测 收集对数生长期的 A549 细胞, 将细胞密度调整至 5×10^5 个, 于培养箱中培养过夜。加入芦荟苦素 ($0, 16 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 孵育 48 h 后, 将细胞用结合缓冲液 500 mL 重悬, 然后与 PI (5 mL) 和 Annexin V (FITC 5 mL) 避光共同孵育 0.5 h , 用流式细胞仪和 Flowjo10 软件分析结果。仅被 Annexin V-FITC 染色的细胞为发生了早期凋亡, 被 Annexin V-FITC 和 PI 双染的细胞为发生了晚期凋亡。

2.4 克隆形成测定 将 A549 细胞以 500 个/孔接种于 6 孔板中, 并于培养箱中培养过夜。加入芦荟

苦素 ($0, 16 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 处理 48 h。在药物干预细胞后, 持续培养 1 周以促进集落形成, 后用 4% 多聚甲醛进行固定, 并使用 0.1% 结晶紫染色, 染色后将细胞用 PBS 洗涤 3 次, 空气干燥, 定量后在显微镜下拍照, 并计算克隆形成率, 克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

2.5 Hoechst 染色 收集芦荟苦素 ($0, 16 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h 的 A549 细胞, 用乙酸-乙醇固定, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 5 min , Hoechst 33258 工作液室温避光孵育 15 min , $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min , 用甘油-PBS $1:9$ 混合液或水溶性封片剂封片, 荧光显微镜观察。

2.6 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达 选取芦荟苦素 ($0, 16 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预 48 h 的 A549 细胞, 提取蛋白质, 进行 BCA 蛋白浓度测定。制备上样液, 并用 $10\% \sim 12\%$ SDS-PAGE 凝胶进行蛋白质分离。转膜后用脱脂牛奶封闭 1.5 h 阻断内源性反应。加入一抗 ($1:3\,000$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 在洗涤 3 次后将加入二抗 ($1:6\,000$) 室温孵育 1.5 h , 洗膜 3 次后使用增强化学发光 (ECL) 检测试剂显影。以 GAPDH 为内参, 用 Image lab 软件采集条带灰度值, 取目的条带和内参条带灰度值的比值作为蛋白表达量。

2.7 小鼠抑瘤率测定 小鼠适应性饲养 1 周后, 将 2×10^6 个 A549 细胞在小鼠的左侧进行皮下接种。然后将小鼠随机分成 2 组, 每组 5 只小鼠。每组每天腹腔内注射 PBS (空白组) 或 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的芦荟苦素。干预 4 周, 定期观察小鼠的外观表现 (毛发、精神、食欲等), 称取体质量, 将小鼠用 CO_2 进行安乐死, 收集肿瘤组织, 并称量计算抑瘤率, 抑瘤率 = (空白组瘤重 - 芦荟苦素组瘤重)/空白组瘤重 $\times 100\%$ 。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件, 所有的数据皆使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 芦荟苦素对 A549 细胞活性的影响 与空白组比较, 芦荟苦素的浓度越高 A549 的细胞活性越受抑制, 即芦荟苦素对 A549 细胞具有抑制作用 ($P < 0.05$), 呈浓度依赖性, IC_{50} 接近 $16 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 1)。选定芦荟苦素 $16 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行后续实验, 检测不同干预时间 ($24, 48 \text{ h}$) 芦荟苦素对 A549 细胞的抑制作用。结果显示, 芦荟苦素干预 48 h 时 A549 细胞活性为 $(62 \pm 2.87)\%$, 与干预 24 h (75 ± 5.21)% 时比较抑制作用明显 ($P < 0.05$), 故选择

16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 48 h 进行后续实验。

表 1 芦荟苦素对肺癌细胞活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

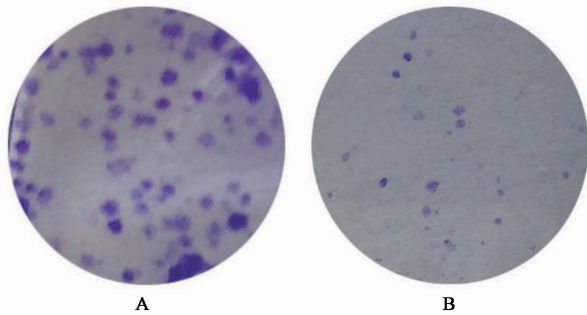
Table 1 Effect of different concentrations of aloesin on activity of lung cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	48 h/%
空白	-	100 \pm 8.15
顺铂	5	34 \pm 2.5 ²⁾
芦荟苦素	2	94 \pm 9.15
	4	85 \pm 7.18 ¹⁾
	8	65 \pm 7.21 ²⁾
	16	43 \pm 5.15 ²⁾
	32	32 \pm 4.22 ²⁾
	64	23 \pm 3.16 ²⁾
	128	12 \pm 1.19 ²⁾

注:与对空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3~6 同)。

3.2 芦荟苦素对 A549 细胞克隆形成能力的影响

经芦荟苦素处理 48 h 后培养 1 周,与空白组比较,增加芦荟苦素浓度可显著减少细胞克隆形成的数量 ($P < 0.01$),表明芦荟苦素对 NSCLC 细胞 A549 增殖抑制呈浓度依赖性(图 1,表 2)。



A. 空白组; B. 芦荟苦素 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(图 2,3 同)

图 1 芦荟苦素对 A549 细胞克隆形成数目的影响(结晶紫, $\times 40$)

Fig.1 Effect of Aloesin on number of clones formed in A549 cells (crystal violet, $\times 40$)

表 2 芦荟苦素对 A549 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of aloesin on clone formation in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	克隆形成率/%
空白	-	47.40 \pm 1.53
芦荟苦素	16	15.60 \pm 3.89 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 7 同)。

3.3 芦荟苦素对 A549 细胞凋亡的影响

与空白组比较,芦荟苦素 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 A549 细胞 48 h,能诱导发生凋亡细胞数显著增加 ($P < 0.01$) (表 3)。Hoechst 染色显示细胞凋亡的特征性核固缩表现,与空白组比较,芦荟苦素组 A549 细胞凋亡

率显著升高 ($P < 0.01$) (图 2,表 4)。蛋白免疫印迹法结果显示,与空白组比较,16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦荟苦素组 A549 细胞 Bcl-x1 蛋白水平显著下调 ($P < 0.05$), Bad, cl-PARP 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), cl-Caspase-3 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$),提示了芦荟苦素激活内在凋亡途径的能力(图 3,表 5)。

表 3 芦荟苦素对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of aloesin on apoptosis of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%
空白	-	2.30 \pm 0.70
芦荟苦素	16	1.40 \pm 1.50 ²⁾

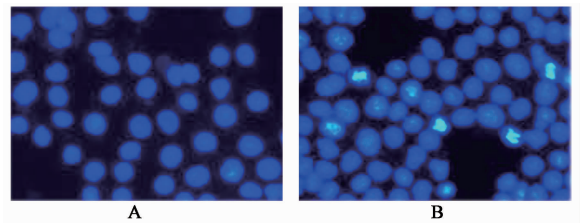


图 2 芦荟苦素对 A549 细胞核固缩的影响(Hoechst, $\times 100$)

Fig.2 Effect of aloesin on nuclear pyknosis of A549 cells (Hoechst, $\times 100$)

表 4 芦荟苦素对非小细胞肺癌细胞 A549 细胞核固缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Aloesin on nuclear pyknosis in non-small cell lung cancer cell line A549 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%
空白	-	2.01 \pm 0.92
芦荟苦素	16	16.12 \pm 2.01 ²⁾

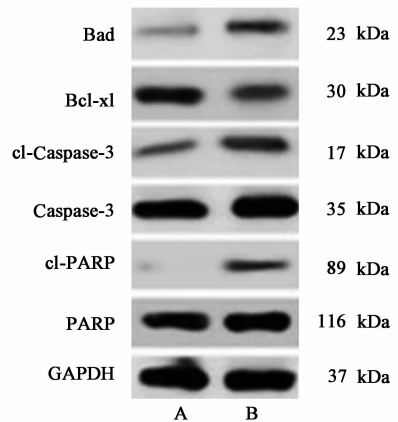


图 3 芦荟苦素作用 48 h A549 细胞凋亡相关蛋白 Bad, Bcl-x1, cl-Caspase-3, Caspase-3, cl-PARP, PARP 蛋白表达电泳

Fig.3 Electrophoresis of aloesin on expressions of apoptosis-related proteins Bad, Bcl-x1, cl-Caspase-3, Caspase-3, cl-PARP and PARP in A549 cells

表 5 芦荟苦素对非小细胞肺癌细胞 A549 细胞中凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of aloeisin on apoptosis-related proteins in non-small cell lung cancer cell line A549 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bad /GADPH	Bcl-xl /GADPH	cl-Caspase-3 /GADPH	Caspase-3 /GADPH	cl-PARP /GADPH	PARP /GADPH
空白	-	0.13 ± 0.02	0.76 ± 0.15	0.26 ± 0.05	0.96 ± 0.17	0.05 ± 0.01	0.76 ± 0.13
芦荟苦素	16	0.34 ± 0.07 ²⁾	0.35 ± 0.09 ¹⁾	0.43 ± 0.08 ¹⁾	1.10 ± 0.15	0.21 ± 0.05 ²⁾	0.81 ± 0.09

3.4 芦荟苦素对小鼠体内 NSCLC 肿瘤生长的影响 与空白组比较,芦荟苦素能够显著减弱肿瘤生长(图 4),并且芦荟苦素组小鼠的肿瘤体积以及瘤重与空白组比较都有明显减小 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (表 6,7)。芦荟苦素组小鼠的外观表现明显优于空白组(表 8),证实了芦荟苦素 NSCLC 肿瘤的抑制作用,且在其有效浓度中未发生体质量抑制。



A. 空白组; B. 芦荟苦素 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 4 芦荟苦素抑制小鼠体内肿瘤生长

Fig. 4 Effect of aloeisin in inhibiting tumor growth in mice

表 6 芦荟苦素对小鼠体内肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 6 Effect of aloeisin in inhibiting tumor growth in mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	首次给药 7 d	首次给药 14 d	首次给药 21 d	首次给药 28 d
空白	-	0.03 ± 0.08	0.18 ± 0.23	0.43 ± 0.44	0.87 ± 0.76
芦荟苦素	30	0.02 ± 0.08	0.12 ± 0.20	0.21 ± 0.30 ¹⁾	0.37 ± 0.55 ²⁾

表 7 芦荟苦素对小鼠体内瘤重增长的影响

Table 7 Effect of aloeisin in inhibiting tumor weight growth in mice

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	瘤重 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)/g	抑瘤率 /%
空白	-	0.84 ± 0.12	-
芦荟苦素	30	0.37 ± 0.07 ¹⁾	51.43

表 8 芦荟苦素对小鼠体质量增长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 8 Effect of aloeisin on weight gain of mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$) g

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	首次给药 7 d	首次给药 14 d	首次给药 21 d	首次给药 28 d
空白	-	19.21 ± 0.80	21.32 ± 0.51	22.32 ± 0.61	24.01 ± 0.93
芦荟苦素	30	18.91 ± 0.72	21.72 ± 0.83	22.03 ± 0.42	25.50 ± 0.90

4 讨论

NSCLC 的治疗目前仍以铂类化疗药为主要的治疗方式,但其广泛的不良反应以及耐药性显著降低了药物的疗效,还严重影响患者的生活质量^[14-15]。在现代肿瘤研究领域,中药作为天然产物,因其结构丰富多样且具有其较强的潜在应用前景^[16-17]。此次研究旨在发掘一种新型、有效和安全的中药单体。

Caspase 是蛋白水解酶家族,其功能是通过诱导程序性细胞死亡而介导细胞发生凋亡。其中,

Caspase-3 是一种细胞内蛋白酶,在凋亡过程的早期发挥至关重要的作用^[18-20]。检测 Caspase-3 活性可以有效的评估细胞凋亡的发生^[21]。Bcl-xl 蛋白在细胞凋亡中也发挥着重要作用,该蛋白质家族包括抗凋亡(例如 Bcl-xl)和促凋亡(例如 Bax)因子^[22]。抗凋亡蛋白 Bcl-xl 通过影响 Caspase-3 依赖性途径来控制细胞凋亡^[23]。随着 Bcl-xl 减少和 Bax 增加,线粒体被刺激释放细胞色素 C,而细胞色素 C 又激活 Caspase-3,最终导致细胞凋亡^[24]。

本研究证明了中药芦荟的有效成分芦荟苦素对 NSCLC 细胞株 A549 的活性具有抑制效果,且随着芦荟苦素浓度的增加其对 A549 细胞活性的抑制作用增强。同时,NSCLC 细胞 A549 与芦荟苦素共同孵育后,对 cl-Caspase-3 表达的影响具有明显的浓度依赖性,即芦荟苦素能够通过诱导 Caspase-3 来激活细胞凋亡途径,最终达到抑制 NSCLC 的作用。结果都显示出芦荟苦素抑制 A549 细胞增殖的效果,并且该作用可能是通过死亡受体 Caspase-3 所介导的细胞凋亡途径来实现的。

综上所述,芦荟中的有效成分芦荟苦素可明显缩小小鼠体内 NSCLC 肿瘤体积,减轻肿瘤质量,其潜在机制可能是通过 Caspase-3 介导的细胞凋亡,达到抑制 NSCLC 的作用。另外,芦荟苦素对于小鼠的

体质量没有影响,但可以改善小鼠的精神、毛发、饮食等外在表现,说明芦荟苦素有望成为一种新型、安全、有效的天然药物来治疗 NSCLC。

[参考文献]

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(1):7-30.

[2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018,doi: 10.3322/caac.21492.

[3] Sean B K, Phil A C, Haval B, et al. Progress and prospects of early detection in lung cancer [J]. Open Biol, 2017,doi: 10.1098/rsob.170070.

[4] 麦苏旦·艾山,再依奴热木·阿扎提. 芦荟的认识与利用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(46): 190-191.

[5] 王晓辉,王伊林,靳小石. 芦荟大黄素对肝癌 HepG2 细胞生长、迁移及纤维状肌动蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(11):111-116.

[6] 黎雅静,洪雪. 芦荟大黄素对人肝癌 HepG2 细胞端粒酶活性的影响及机制探讨[J]. 山东医药,2018,58(34):29-32.

[7] 宋吉宁,董锦忠,陈文礼. 芦荟大黄素对胃癌 SGC-7901 细胞株钙联蛋白/钙网蛋白循环及内质网应激凋亡的影响[J]. 中国临床研究, 2018, 31(6): 725-729.

[8] 兰海龙,王正辉,杨壮群,等. 芦荟苦素对黑素细胞与角质形成细胞混合培养模型中黑素合成的影响[J]. 中国美容医学,2007,16(3):310-313.

[9] Hollinger J C, Angra K, Halder R M. Are natural ingredients effective in the management of hyperpigmentation? A systematic review [J]. J Clin Aesthet Dermatol,2018,11(2):28-37.

[10] 杨月红. 芦荟苦素的提取与分离纯化工艺研究[D]. 上海:华东理工大学,2012.

[11] Wahedi H M, Jeong M, Chae J K, et al. Aloesin from Aloe vera accelerates skin wound healing by modulating MAPK/Rho and Smad signaling pathways *in vitro* and *in vivo*[J]. Phytomedicine,2017,28(15):19-26.

[12] ZHANG L Q, LV R W, QU X D, et al. Aloesin suppresses cell growth and metastasis in ovarian cancer SKOV3 cells through the inhibition of the MAPK signaling pathway [J]. Anal Cell Pathol; Amst, 2017, doi: 10.1155/2017/8158254.

[13] 王立强,苗立成,吴迪,等. 芦荟苦素对荷瘤小鼠的抑瘤率及对白血病小鼠生存期的影响[J]. 中国医院药

学杂志,2003(2):15-17.

[14] Rotow J, Bivona T G. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC[J]. Nat Rev Cancer, 2017,17(11):637-658.

[15] Rolfo C, Caglevic C, Santarpia M, et al. Immunotherapy in NSCLC: a promising and revolutionary weapon [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-53156-4_5.

[16] LIN W F, LU J Y, CHENG B B, et al. Progress in research on the effects of traditional Chinese medicine on the tumor microenvironment[J]. J Integr Med,2017,15(4):282-287.

[17] 朱元章,张贵彪,朱国福. 中药复方抗肿瘤机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(16): 227-234.

[18] HOU L, ZHANG Y, YU B L, et al. Oocyte-G₁ promotes male germ cell apoptosis through activation of Caspase-3 [J]. Gene, 2018, doi: 10.1016/j.gene.2018.05.099.

[19] Larsen B D, Sørensen C S. The Caspase-activated DNase: apoptosis and beyond [J]. FEBS J, 2017,284(8):1160-1170.

[20] Sergeeva T F, Shirmanova M V, Zlobovskaya O A. Relationship between intracellular pH, metabolic cofactors and Caspase-3 activation in cancer cells during apoptosis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017,1864(3):604-611.

[21] Paulsson J F, Schultz, S W, Köhler M, et al. Real-time monitoring of apoptosis by Caspase-3-like protease induced FRET reduction triggered by amyloid aggregation [J]. Exp Diabetes Res, 2008, doi: 10.1155/2008/865850.

[22] Schenk R L, Strasser A, Dewson G. Bcl-2: long and winding path from discovery to therapeutic target [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(3): 459-469.

[23] Wnęk A, Andrzejewska E, Kobos J, et al. Molecular and immunohistochemical expression of apoptotic proteins Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in infantile hemangioma tissues as an effect of propranolol treatment [J]. Immunol Lett, 2017, doi: 10.1016/j.imlet.2017.03.005.

[24] YOU F L, LI Q, JIN G F, et al. Genistein protects against A β 25-35 induced apoptosis of PC12 cells through JNK signaling and modulation of Bcl-2 family messengers[J]. BMC Neurosci, 2017, doi: 10.1186/s12868-016-0329-9.

[责任编辑 张丰丰]