

· 实验研究 ·

芦荟多糖与大黄素配伍对人舌鳞状癌细胞活力及 VEGF 表达的影响※

● 李 静¹ 陈 力¹ 王 丹¹ 陈 燕^{2▲}

摘 要 目的:探讨芦荟多糖与大黄素不同配伍比例对 SCC15 人舌鳞状癌细胞的活力及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法:体外培养 SCC15 口腔癌细胞,分为实验空白组、芦荟多糖组、大黄素组、芦荟多糖与大黄素配伍 1:1 组、1:2 组、1:3 组、2:1 组、2:3 组、3:1 组 9 个不同的组别,观察 SCC15 的生长状态,免疫组化鉴定细胞,MTT 法检测细胞活性,免疫印迹法检测 VEGF 蛋白的表达。结果:① MTT 法检测细胞活性:与空白组比较,芦荟多糖单剂量组、大黄素单剂量组、各配伍组的细胞活性均显著降低($P < 0.05$),且随大黄素比例的增加抑制作用而增强,其中以芦荟多糖与大黄素配伍 1:2 组、2:3 组、1:3 组最为显著($P < 0.01$);② VEGF 蛋白的表达显示,空白组的 VEGF 蛋白表达较强,各给药组 VEGF 蛋白的表达均显著降低($P < 0.05$),其中以配伍组 1:3 最为明显。结论:芦荟多糖与大黄素配伍对体外培养的 SCC15 口腔癌细胞有显著抑制作用,且抑制作用随大黄素比例增加而增强(1:3 最佳),其机制可能与下调 VEGF 蛋白的表达有关。

关键词 口腔癌细胞;芦荟多糖;大黄素;配伍;细胞活性;VEGF

舌癌(carcinoma of the tongue)是口腔颌面部中最常见的恶性肿瘤之一^[1],多项研究证实近些年来舌癌的发病率在全球范围内呈现不断上升的趋势^[2]。研究显示,天然中草药中的有效成分或有效部位,比如具有药理功能的化合物或者生物碱,已成为目前抗癌研究的热点。大黄素是一种蒽醌类物质,大黄素具有抑制口腔鳞癌细胞株的增殖、并影响其细胞周期的作用^[3];芦荟具有较高的食用和药用价值,其中芦荟多糖(Aloe polysaccharide, AP)是芦荟凝胶中的主要生物活性物质,具有免疫调节、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等多种功效^[4]。因此,本文拟通过对芦荟多糖与大黄素不同配伍比例,考察中药提取物对 SCC15 活性的影响;同时,血管内皮生长因子(VEGF)能促进血管的形成,在肿瘤发生、

发展过程中发挥重要作用^[5],是肿瘤细胞发展过程中重要的生化指标。基于此,本文拟通过研究芦荟多糖与大黄素不同配比体外干预 SCC15 的活性,研究对 VEGF 蛋白表达的影响,初步探讨其作用机制,为临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂 无外泌体胎牛血清(上海宇玫博生物科技有限公司;UR50201);DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司,批号:904862);SCC15 口腔癌细胞(购自上海拜力生物有限公司);免疫印迹抗体:山羊抗小鼠 IgG 标记二抗(Biosharp 公司,批号:zs-256); β -actin(博奥森,批号:160517);VEGF 分装单克隆抗体(北京中杉,批号:20160717);四甲基偶氮唑盐(MTT)(Sigma 公司:0931);二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司,批号:0331);磷酸盐缓冲液(PBS)(武汉博士德);ECL 发光液(碧云天,批号:20160720);胰酶(Biosharp 公司,批号:20170530);芦荟多糖(江苏瑞多生物,批号:20161124,含量 70%);大黄素(CAS:518-82-1,

※基金项目 四川省医院独立资助项目(No. CYFY16DL-1)

▲通讯作者 陈燕,女,硕士。研究方向:新型抗肿瘤药物靶向递送系统及个体化用药。E-mail:cyfy1112@163.com

• 作者单位 1. 成都医学院第一附属医院(四川 成都 610500)2. 四川省肿瘤医院(四川 成都 610500)

货号:SF0024,陕西森弗)。

1.2 主要仪器 倒置显微镜(上海巨纳科技);超净工作台(苏州安泰);CO₂ 培养箱(日本三洋);S3006L 型高压匀质机(Niro Soavi 公司);酶标定量测定仪(Thermo Multiskan AsCant 公司);冷冻干燥机(abeco);垂直电泳仪、转膜仪(北京六一)。

1.3 细胞培养 (1)细胞复苏:SCC15 人舌鳞状癌细胞购自上海拜力生物有限公司,将细胞从液氮灌中取出,迅速投入 37℃ 超纯水中解冻,转移至离心管中,加 4mL DMEM 高糖培养基,离心 1500 r/min × 2min,弃去上清,加入 5mL 完全培养基(10% 胎牛血清),用巴士吸管轻轻吹打,将细胞吹散均呈悬浮状态,再将细胞接种于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。(2)细胞培养及传代:待细胞长至瓶底 80% 以上时,加入 1mL 0.25% 的胰酶消化(约 1min),然后 4mL 加入含 10% 血清的培养基终止消化,离心 1500 r/min × 2min,收集细胞,再加入适量完全培养基(10% 胎牛血清)轻轻吹打至悬浮,分别传代至 2~3 个培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中继续孵育;传 3 代待细胞生长稳定后便可用于下一步实验。

1.4 细胞鉴定 取进入对数生长期的细胞进行消化,离心后接种于无菌的盖玻片上,置于二氧化碳培养箱中继续培养,当细胞生长铺满至玻片的 50%~80% 时,弃去培养液,PBS 清洗 1 遍后,分别加入丙酮、甲醇各 1mL,室温固定 30min,弃上清,以 PBS 清洗 3 次,再加入 3% H₂O₂ 去离子水室温孵育 10min,弃上清,以 PBS 清洗 3 次,加入封闭用山羊血清在室温下继续孵育 30min,再滴加 c-kit 一抗(1:200)适量,将封闭后的玻片置于冰箱冷藏过夜,取出后再滴加山羊抗小鼠 IgG 标记二抗(1:100),置二氧化碳培养箱中继续孵育 30 min 后,在避光条件下置于电子显微镜下观察^[6]。

1.5 MTT 法测细胞增殖^[7] 取进入对数生长期的细胞,消化后稀释并将细胞密度调整为 2×10^4 个/mL,接种于 24 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,将细胞分为空白组、阳性组、芦荟多糖高、中、低剂量组,每组 6 个复孔。根据《药典》中成人最大剂量/人血浆容积(4000mL)换算芦荟多糖的最大剂量为 0.225μg/mL、大黄素的最大剂量为 0.056μg/mL。空白组:SCC15 给予不含药 DMEM 完全培养液,培养 48

h;给药组:给药剂量及比例见表 1。

表 1 不同配伍比例给药剂量

配伍组比例	芦荟多糖 给药剂量	大黄素 给药剂量
单剂量	0.225μg/mL	0.056μg/mL
芦荟多糖:大黄素 = 1:1	0.075μg/mL	0.019μg/mL
芦荟多糖:大黄素 1:2	0.075μg/mL	0.038μg/mL
芦荟多糖:大黄素 1:3	0.075μg/mL	0.056μg/mL
芦荟多糖:大黄素 2:1	0.15μg/mL	0.019μg/mL
芦荟多糖:大黄素 2:3	0.15μg/mL	0.056μg/mL
芦荟多糖:大黄素 3:1	0.225μg/mL	0.019μg/mL
芦荟多糖:大黄素 3:2	0.225μg/mL	0.038μg/mL

各给药组的 SCC15 口腔癌细胞培养 24 h 后,分别根据给予含芦荟多糖与大黄素不同配伍比例的 DMEM 完全培养液,以上各组药物干预后培养 24h 后,每孔加入 20μL 5mg/mL 的 MTT 溶液,在 CO₂ 培养箱中继续放置 4h 后,弃上清,每孔加入 150μL 的二甲基亚砜(DMSO),于摇床上振荡 10 min,酶标仪中设定 490 nm 波长处读取各组的 OD 值,计算均值、比较各组细胞的增殖情况。

1.6 Western-blot 检测 VEGF 蛋白的表达^[8] 药物干预后收集各组细胞,分别加入 100 μL 裂解液(Tris pH=7.5,1 mM EDTA 中,50 mM NaCl,0.5% Triton-X-100),振摇,并将温度保持为 4℃,持续 30min,裂解后再将各组细胞以 5000 r/min × 10 min 离心,收集上清液,转入预冷的离心管中,根据考马斯亮兰试剂盒检测各组细胞裂解后的蛋白浓度;样品中加入上样缓冲液稀释,并煮沸 5min 使蛋白变性,备用。SDS-PAGE 凝胶上样量 50 μL,在 150 V 的稳压电场中电泳约 90min,电泳后转移蛋白至硝酸纤维素滤膜(电流为 380 mA),最终加入脱脂奶粉封闭,室温下过夜,剪膜,根据分子量分开后分别以加 1:500 稀释的一抗(VEGF)及内参抗体(β-actin,1:2000)室温孵育 2 h,HRP 标记二抗(1:1000)孵育 1 h 后,洗膜,ECL 发光液发光后 X 光片曝光,扫描记录结果,Gel-analyze 分析软件分析条带灰度,进行半定量比较分析,以 IOD 值表示蛋白的表达水平。

1.7 统计学方法 采用 SPSS19.0 单因素方差分析(One-Way ANOVA),各组数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,各组所得数据与空白组比较,计量资料符合正态分布, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 c-kit 免疫荧光鉴定和细胞形态 细胞贴壁后,逐渐伸展,细胞密度低时排列疏松,形态特征明显,呈长条形或不规则形态,生长进入对数后,细胞增殖加快,体积变大且排列紧密,呈放射状(图 1);免疫染色后,胞体和突起明显着色,与邻近细胞相互连接成网状(图 2)。图片均在 100 倍镜下观察并拍照。

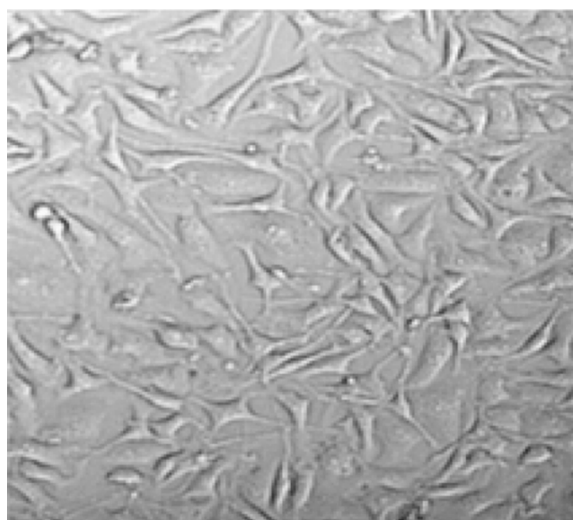


图 1 (空白组 × 100)

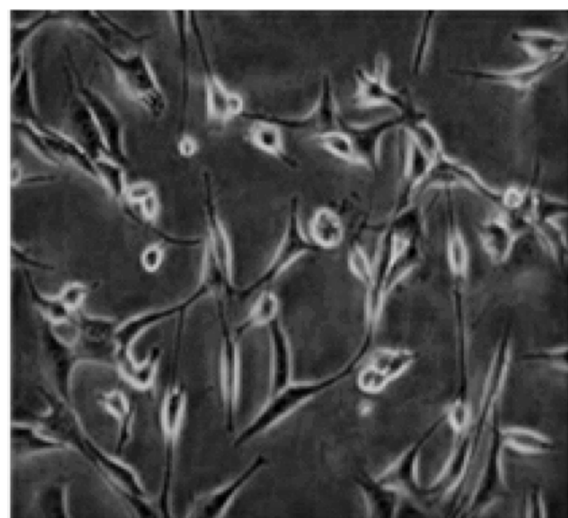


图 2 (c-kit 免疫染色 × 100)

2.2 MTT 检测细胞增殖情况 与空白组比较,芦荟多糖单剂量组、大黄素单剂量组、各配伍组的细胞活性均显著降低($P < 0.05$),且随大黄素比例的增加抑制作用而增强,其中以芦荟多糖与大黄素配伍 1:2 组、2:3、1:3 组最为显著($P < 0.01$),差异具有统计学意义。实验结果见表 2。

表 2 各组对 SCC15 口腔癌细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值(OD490)
空白组	0.947 ± 0.132
芦荟多糖单剂量组	0.776 ± 0.158 ^{**}
大黄素单剂量组	0.728 ± 0.173 [*]
芦荟多糖配伍大黄素 1:1 组	0.753 ± 0.054 [*]
芦荟多糖配伍大黄素 1:2 组	0.530 ± 0.120 ^{**}
芦荟多糖配伍大黄素 1:3 组	0.510 ± 0.111 ^{**}
芦荟多糖配伍大黄素 2:1 组	0.733 ± 0.098 [*]
芦荟多糖配伍大黄素 2:3 组	0.521 ± 0.133 ^{**}
芦荟多糖配伍大黄素 3:1 组	0.740 ± 0.068 ^{**}
芦荟多糖配伍大黄素 3:2 组	0.707 ± 0.135 ^{**}

注:与空白组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.3 VEGF 蛋白表达的变化 结果显示,空白组 VEGF 蛋白的表达较高,各给药组 VEGF 蛋白表达降低,其中芦荟多糖配伍大黄素 1:2、2:3、1:3 组 VEGF 蛋白的表达显著减弱,且当比例为 1:3 时,VEGF 蛋白的表达最低。说明:在本次实验中,VEGF 在 SCC15 口腔癌细胞中具有较高表达,大黄素与芦荟多糖配伍对 VEGF 蛋白的表达有显著抑制作用,且以 1:3 的比例效果最显著。结果如表 3、图 3 所示。

表 3 VEGF/内参(IOD 比值)的情况($\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-1/内参 IOD 比值
空白组	1.723 ± 0.221
芦荟多糖单剂量组	1.422 ± 0.446 [*]
大黄素单剂量组	1.379 ± 0.328 [*]
芦荟多糖配伍大黄素 1:2 组	0.772 ± 0.137 ^{**}
芦荟多糖配伍大黄素 2:3 组	0.571 ± 0.104 ^{**}
芦荟多糖配伍大黄素 1:3 组	0.532 ± 0.118 ^{**}

注:与空白组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

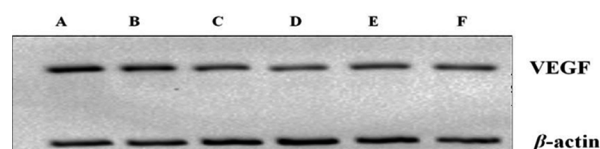


图 3 各组 VEGF 蛋白的表达

(A 代表空白组;B 表示芦荟多糖单剂量组;C 表示大黄素单剂量组;D 表示芦荟多糖配伍大黄素 1:2 组;E 表示配伍 2:3 组;F 表示配伍 1:3 组)

3 讨论

舌癌多数为鳞癌,恶性程度高,生长快,浸润性强,此外舌体还具有丰富的淋巴及血运循环,加之其频繁的机械运动,使得舌癌极易在发病的早期出现颈部淋巴结转移,预后较差^[9]。中医学认为舌癌归属于中医“舌疳”与“舌菌”范畴,发病病因主要是外感六淫,内伤七情,入里化火,火性炎上,舌上便生溃疡,加之吸烟,火毒熏烤,或阴虚火自内生,迫使火毒淤结,从而致生舌癌^[10]。目前舌癌治疗中医治疗方法初期主要清热解毒,清泻心火,行气化痰,除湿化浊,后期主扶正祛邪,攻补兼施,治宜补益心脾,清热解毒之法^[11]。而西医方法主导的是以手术为主的综合序列治疗,虽然近些年来舌癌的手术切除率已明显提高,手术患者的病死率明显下降,但其局部、区域性复发及转移率仍然较高^[12],因此,寻找出副作用低且对肿瘤增殖及侵袭转移有抑制作用的药物具有重要的现实意义。芦荟多糖(Aloe polysaccharide, AP)是芦荟凝胶部分除去水分以外的主要成分,AP 作为药用品种芦荟的主要活性物质之一,其抗肿瘤作用备受关注^[13]。有研究显示,芦荟多糖对 S₁₈₀、H₂₂ 荷瘤小鼠具有明显的抗肿瘤作用,延长小鼠生存期^[14]。大黄素是一种蒽醌类物质,最新研究显示,大黄素能够抑制小鼠肝癌、乳腺癌、艾氏腹水癌、淋巴肉瘤、黑色素瘤以及大鼠瓦克瘤,抑制率大于 30%^[15]。此外大黄素具有抑制口腔鳞癌细胞株的增殖并影响其细胞周期的作用。因此,本文拟通过体外培养 SCC15 细胞,观察芦荟多糖与大黄素不同配伍比例对其是否具有抑制作用及部分作用机制。

VEGF 通过血管内皮细胞表面 VEGFR2 受体激活下游信号,可诱导内皮细胞的生长、迁移和管状形成,促进新生血管形成、提高血管通透性,满足肿瘤细胞对氧和营养的需求,因此,阻断 VEGF-VEGFR2 信号通路抑制血管异常增生是肿瘤靶向治疗的重要策略^[12]。本研究中,通过 MTT 法检测细胞活性,发现芦荟多糖、大黄素单剂量组及其不同比例的配伍组对体外培养的 SCC15 细胞具有显著的抑制作用,且细胞活性随大黄素比例的增加而逐渐降低。根据细胞活性中的结果,将空白组、芦荟多糖与大黄素单剂量组、芦荟多糖配大黄素 1:2、2:3 组通过免疫印迹法检测 VEGF 蛋白的表达的检测,结果显示:肿瘤细胞 SCC15 中对 VEGF 具有高表达,给予药物干预后,各单剂量

组及配伍组均能抑制 VEGF 的表达,其中以芦荟多糖配大黄素 1:3 组尤为显著,说明芦荟多糖与大黄素配伍可能通过下调 VEGF 蛋白的高表达从而抑制 SCC15 细胞的增殖能力,在体外芦荟多糖与大黄素以 1:3 的比例干预,具有较好的抗肿瘤作用。

综上所述,芦荟多糖与大黄素配伍能降低 SCC15 细胞 VEGF 蛋白的高表达,从而达到抗癌作用,但本研究仅研究了部分机制且为体外研究,下一步可选择观察含药血清对 SCC15 细胞的抑制作用或口服汤剂对在体荷瘤小鼠的治疗作用,其作用通路及相关基因蛋白还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Nagata T, Ozeki S, Ohishi M, et al. Prediction of Cervical Lymph Node Metastasis in Carcinoma of The Tongue Using Fuzzy Inference[J]. *Mechanics of Materials*, 2017, 56:11-22.
- [2] 刘雪莹,黄旋平. 光学成像技术在舌癌研究与诊疗中的应用前景[J]. *广东医学*, 2016, 37(10):1580-1582.
- [3] 高路. 大黄素对口腔鳞癌模型大鼠中 TRPM8、LRG-1、SPHK1 表达影响实验研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(3):28-31.
- [4] 李亚辉,马艳弘,黄开红,等. 芦荟多糖的超声波辅助纤维素酶提取及抗肿瘤活性研究[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(11):91-96.
- [5] 罗晓丽. 癌基因 DEK 调节 VEGF 表达及其在血管生成中作用的初步研究[D]. 吉林大学, 2016.
- [6] 潘璐,王琼,周美玲,等. 口腔癌细胞/成纤维细胞三维共培养模型的建立和评价[J]. *口腔生物医学*, 2017, 8(2):70-74.
- [7] 赵斌,葛金芳,朱娟娟,等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC50 的计算方法[J]. *安徽医药*, 2007, 11(9):834-836.
- [8] 危由春,江毅,文冰,等. 口腔癌患者 VEGF-C、PTN 及 Fascin 的表达及与淋巴结转移的关系[J]. *口腔医学研究*, 2012, 28(7):702-704.
- [9] 高志彪,呼海燕,王原明,等. 舌鳞状细胞癌不同浸润方式增殖性研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(27):3050-3052.
- [10] 罗国钧. 中医治疗舌癌一例纪实[J]. *山西中医*, 1989, 5(1):24-24.
- [11] 周维顺,谢长生. 略论舌癌的中医诊治原则[J]. *实用中医药杂志*, 1997, 13(3):36.
- [12] 夏超,张纲. 保留下颌骨及牙列的舌癌根治术的预后评价[J]. *重庆医学*, 2015, 44(2):215-217.
- [13] 吴小芳,万金志,钟佳胜,等. 芦荟化学成分的研究进展[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(8):1542-1550.
- [14] 侯玮婷,罗佳波. 复方茯苓多糖口服液抗肿瘤作用和免疫调节功能的初步研究[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(2):78-81.
- [15] 杨静. VEGF 靶向抗体研制及其促肿瘤分子机制探讨[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.

(收稿日期:2018-08-22)

(本文编辑:金冠羽)