

# 芦荟苷对胶质瘤 U251 细胞增殖、迁移和凋亡的影响

刘海云<sup>1</sup>, 方永青<sup>1</sup>, 宋渺渺<sup>1</sup>, 林倩霞<sup>1</sup>, 侯本超<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医药大学中医学院, 江西 南昌 330004; 2. 南昌大学第一附属医院, 江西 南昌 330004)

**摘要:** 目的 研究芦荟苷对胶质瘤 U251 细胞增殖、迁移和凋亡的影响, 并探讨其可能的机制。方法 采用不同质量浓度芦荟苷处理胶质瘤 U251 细胞, 筛选实验剂量。细胞随机分为对照组 (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和芦荟苷 100、140、180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组。通过 MTS 实验检测细胞活性, 克隆形成实验检测细胞增殖能力, 划痕实验检测细胞迁移能力, Hoechst 和流式细胞实验检测细胞凋亡情况, Western blot 法检测相关蛋白 Bcl-2、MMP-2、Bax 表达。结果 与对照组比较, 芦荟苷组能抑制细胞增殖和迁移能力, 诱导细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 下调迁移相关蛋白 MMP-2 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 上调促凋亡蛋白 Bax 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 呈剂量依赖性。结论 芦荟苷可抑制胶质瘤 U251 细胞的增殖和迁移并诱导其凋亡, 其机制可能与下调 Bcl-2 蛋白表达和上调 Bax 蛋白表达有关。

**关键词:** 芦荟苷; 胶质瘤; 增殖; 迁移; 凋亡

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2022)12-4029-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.049

胶质瘤是最常见的恶性脑肿瘤之一, 多呈浸润性生长, 边界不清, 具有高度侵袭性, 手术不能完全切除, 术后复发率高, 对放、化疗不敏感<sup>[1]</sup>, 临床上预后差, 病死率高。目前研究虽肯定了替莫唑胺的抗肿瘤疗效和低毒副作用, 但由于耐药等多种因素使其仍没有达到最佳的治疗效果<sup>[2]</sup>。近年来越来越多专家将目光转向传统医学, 因此, 从天然产物中寻找新的高效低毒的抗胶质瘤药物成为当今重要的研究课题。

芦荟是常见的百合目百合科的多年生常绿肉质草本植物, 其主要药用成分以芦荟苷、芦荟大黄素、芦荟素等为主<sup>[3]</sup>。芦荟苷是从芦荟中分离出来的蒽醌类天然化合物之一<sup>[4]</sup>, 具有抗炎、抗癌<sup>[5]</sup>、抗氧化、降血糖、免疫保护等药理作用<sup>[6]</sup>, 在烧伤、炎症反应、糖尿病、高血压、溃疡、肿瘤以及免疫调节等方面发挥着积极作用<sup>[7]</sup>, 被认为是一种癌症潜在治疗选择。本实验研究芦荟苷对胶质瘤 U251 细胞增殖、迁移及凋亡的影响, 并初步探讨其抗肿瘤的可能机制, 为临床治疗胶质瘤提供重要的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞和药物** 胶质瘤 U251 细胞购自美国典型培养物保藏中心。芦荟苷 (纯度 98%, 货号 HSA8522) 购自北京索莱宝科技有限公司, 采用 DMSO 溶解制成母液备用。

**1.2 试剂** DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司; 二甲亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; 细胞凋亡检测试剂盒、MTS 试剂盒、BCA 试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限

公司; MMP-2、Bcl-2、PARP 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

**1.3 仪器** 超净工作台、生物安全柜购自美国 Thermo 公司; SPECTRAmax 190 型全波长酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司; 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司; 荧光显微镜购自德国 Leica 公司; 臭氧空气消毒机购自南昌市扬帆环保设备有限公司;  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱购自海尔集团公司。

**1.4 细胞培养** 胶质瘤 U251 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养, 待细胞长至融合度 90%~100% 时, 以 1:3 比例进行传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。

**1.5 MTS 实验测定细胞活力** U251 细胞以每孔  $3 \times 10^4$  个的密度接种于 96 孔培养板中, 待细胞贴壁后, 去除旧培养基, 加入不同质量浓度芦荟苷 (100、120、140、160、180、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 48 h 后, 加入含有 MTS 试剂的检测液 (10  $\mu\text{L}$  MTS 和 90  $\mu\text{L}$  无血清 DMEM), 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 30 min, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定每组细胞的光密度 (OD) 值, 并计算细胞存活率。

**1.6 显微镜下观察细胞形态** 取对数生长期 U251 细胞, 以每孔  $5 \times 10^5$  个的密度接种于 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后, 去除旧培养基, 分别加入 0、100、140、180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  芦荟苷, 继续培养 48 h 后, 显微镜下观察细胞密度及形态变化, 并拍摄照片。

**1.7 克隆形成实验观察细胞增殖能力** 取对数生长期

**收稿日期:** 2021-10-20

**基金项目:** 江西省教育厅科学技术研究项目 (200143, GJJ201210); 江西省卫健委科计划基金项目 (20195637, 20165401); 江西省中医药管理局科技项目 (2022B982); 江西省研究生创新专项项目 (YC2021-S484); 江西省大学生创新创业项目 (s202010412060, s202010412077); 江西中医药大学重点学科项目 (2020jzdxk025)

**作者简介:** 刘海云 (1979—), 女, 博士, 副教授, 从事中药抗肿瘤的研究。Tel: (0791) 87118930, E-mail: 547906147@qq.com

\* **通信作者:** 侯本超 (1986—), 男, 硕士, 主治医师, 从事肿瘤麻醉学的研究。Tel: (0791) 88692556, E-mail: 15236976@qq.com

U251 细胞, 以每孔 1 000 个的密度细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 去除旧培养基, 分别加入 0、100、140、180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  芦荟苷, 培养 10 d 后加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染液染色 20 min, 流水轻轻冲去染色液, 室温干燥, 于倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数, 并计算克隆形成率。

1.8 划痕实验观察细胞迁移能力 用记号笔在 6 孔板反面画一道黑线, 将对数生长期 U251 细胞接种于 6 孔板中, 细胞长至 80% ~ 90% 时, 用 100  $\mu\text{L}$  枪头垂直黑线划痕, 用 PBS 洗涤 2 次, 置于光镜下拍照, 记录划痕位置, 加入芦荟苷 (0、100、140、180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 后置于恒温培养箱中培养 24 h, 弃去处理液, PBS 洗涤 2 次后拍照, 记录细胞迁移情况。

1.9 Western blot 法检测细胞增殖、迁移、凋亡相关蛋白表达 细胞按“1.6”项下方法处理, 培养 48 h 后收集细胞, 加入含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液提取总蛋白, 用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 再将蛋白转至 PVDF 膜上, 经 5% 脱脂奶粉溶液封闭后加入一抗过夜孵育, 次日继续孵育二抗, 最后加显色液进行显色, 采用 Image J 软件分析条带灰度值, 计算目的蛋白的相对表达量。

1.10 Hoechst 33342 染色观察细胞凋亡情况 细胞按“1.6”项下方法处理, 培养 48 h 后, 弃上清, 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗涤 2 次, 加入 500  $\mu\text{L}$  抗荧光淬灭染色液, 荧光显微镜下观察细胞的荧光变化情况。

1.11 流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞按“1.6”项下方法处理, 培养 72 h 后收集细胞, 离心后 PBS 洗涤 2 次, 加入 195  $\mu\text{L}$  结合液重悬细胞, 再加入 5  $\mu\text{L}$  FITC 和 10  $\mu\text{L}$  PI 染液, 避光孵育 10~20 min, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

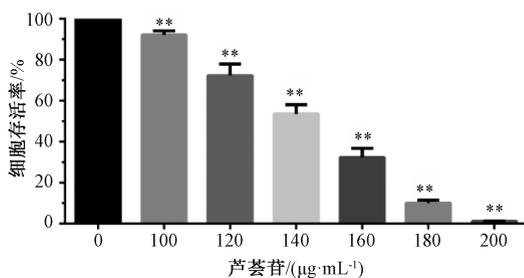
1.12 统计学分析 通过 SPSS 24.0 软件进行处理, 数据以 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 两两比较采用独立  $t$  检验。  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 芦荟苷对胶质瘤 U251 细胞活力的影响 如图 1 所示, 与对照组 (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 比较, 细胞存活率随芦荟苷质量浓度的增加而降低 ( $P<0.01$ ), 故选择 100、140、180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  芦荟苷进行后续实验。

2.2 芦荟苷对 U251 细胞生长状态的影响 如图 2 所示, 对照组细胞形态正常且生长状态良好; 与对照组比较, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  芦荟苷组细胞触角消失, 细胞萎缩, 体积开始变小, 胞体开始降解, 细胞状态差, 生长受抑制; 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  芦荟苷组较对照组细胞密度明显稀少, 空泡透亮死细胞明显增多, 活细胞生长受抑制, 触角几乎完全消失, 细胞状态差。

2.3 芦荟苷对 U251 细胞增殖能力的影响 与对照组比较, 芦荟苷组细胞克隆形成能力降低, 提示芦荟苷可抑制胶质瘤 U251 细胞的增殖, 见图 3。



注: 与对照组 (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 比较, \*\*  $P<0.01$ 。

图 1 不同质量浓度芦荟苷对 U251 细胞活力的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

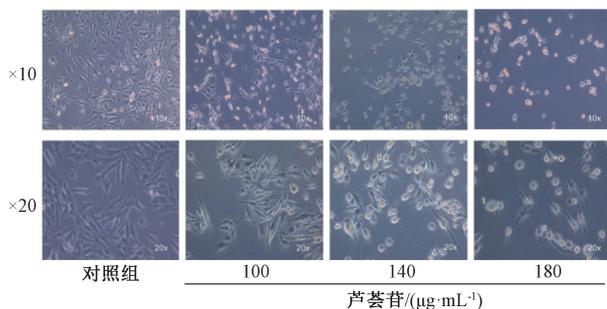


图 2 各组 U251 细胞的生长形态

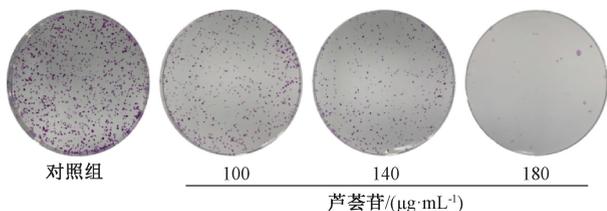


图 3 各组 U251 细胞的克隆形成能力

2.4 芦荟苷对 U251 细胞迁移能力的影响 与对照组比较, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  芦荟苷组可降低 U251 细胞的迁移能力, 140、180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  芦荟苷组对细胞迁移能力有明显的抑制作用, 见图 4。

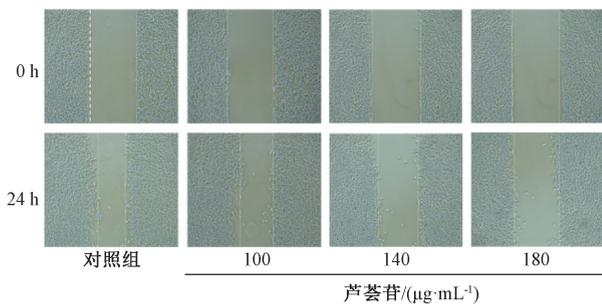
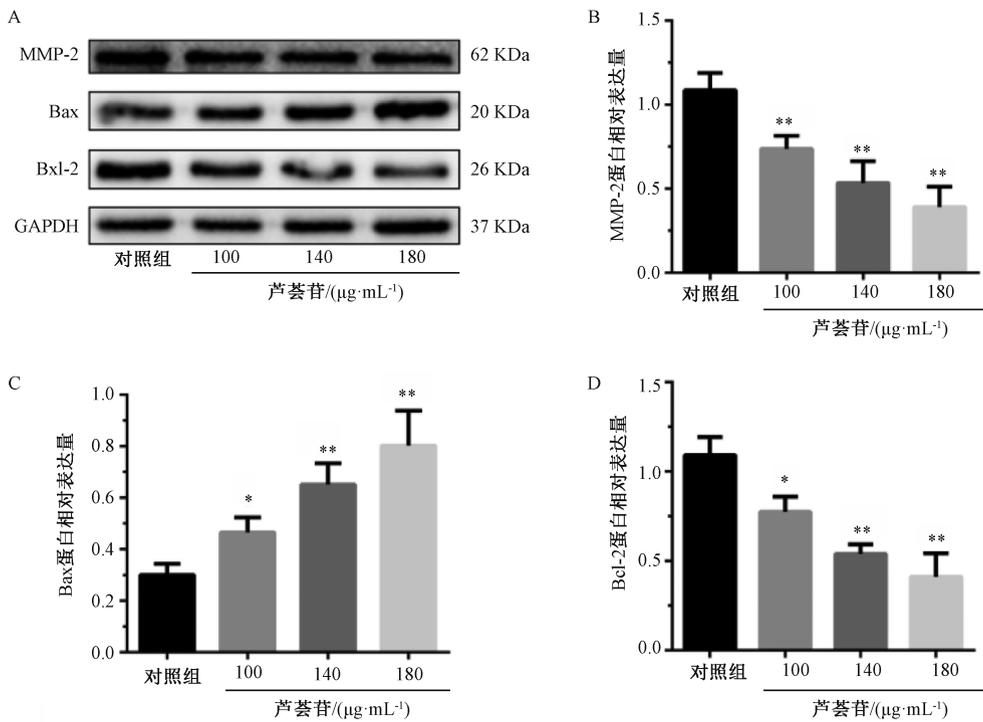


图 4 各组 U251 细胞的迁移能力

2.5 芦荟苷对 U251 细胞增殖、迁移、凋亡相关蛋白表达的影响 与对照组比较, 芦荟苷组迁移侵袭相关蛋白 MMP2 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 促凋亡蛋白 Bax 表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 并呈剂量依赖性, 表明芦荟苷可以促进细胞凋亡, 见图 5。



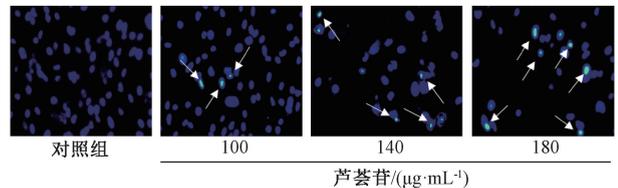
注：A 为各组细胞蛋白条带图，B-D 为 MMP-2、Bax、Bcl-2 蛋白相对表达量统计图。与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

图 5 芦荟苷对 U251 细胞增殖、迁移、凋亡相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

## 2.6 芦荟苷对 U251 细胞凋亡的影响

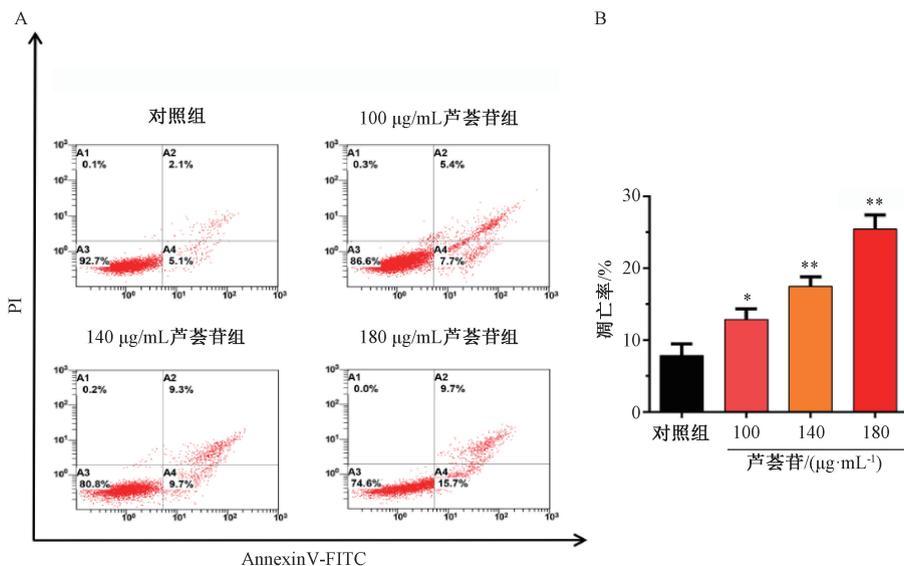
2.6.1 Hoechst 33342 染色 与对照组比较，芦荟苷组细胞核染色质固缩，蓝色荧光增强，部分细胞核碎裂形成凋亡小体，呈剂量依赖性，见图 6。

2.6.2 流式细胞术检测细胞凋亡率 与对照组比较，芦荟苷组细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，进一步表明芦荟苷可诱导细胞凋亡，见图 7。



注：箭头指示凋亡细胞。

图 6 各组 U251 细胞的凋亡情况



注：A 为各组细胞凋亡情况的流式图，B 为各组细胞凋亡率统计图。与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

图 7 芦荟苷对 U251 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

### 3 讨论

胶质瘤是源于神经胶质细胞最常见的原发性颅内恶性肿瘤,复发率和死亡率高,且治疗手段局限<sup>[8]</sup>。芦荟苷对各种恶性肿瘤有一定的抑制作用,已有研究证实芦荟苷通过阻断转录激活因子(STAT3)抑制肿瘤细胞血管内皮生长因子(VEGF)的分泌,从而抑制肿瘤血管生成与生长<sup>[9]</sup>;芦荟苷还能通过线粒体依赖途径改变细胞周期来抑制肿瘤细胞,导致细胞膜完整性丧失和凋亡<sup>[10]</sup>,从而抑制肿瘤细胞的增殖和迁移。研究发现,芦荟苷对于肺癌<sup>[11]</sup>、结直肠癌<sup>[12]</sup>、乳腺癌<sup>[13]</sup>的增殖有一定影响,并能诱导其凋亡。研究证实芦荟苷对肿瘤有一定的抑制作用,但其对胶质瘤的作用未见报道。

MMP2是金属基质蛋白酶的主要家族成员之一,在胶质瘤组织或细胞系中均高表达,其表达量与肿瘤的恶性度及侵袭潜能呈正相关<sup>[14]</sup>。本研究发现,芦荟苷可降低胶质瘤U251细胞活力、迁移能力,同时下调迁移相关蛋白MMP2的表达,表明芦荟苷可以抑制U251细胞的增殖、迁移能力。

Bcl-2家族蛋白可调控促凋亡和抗凋亡的胞内信号,是线粒体凋亡起主要作用的调控因子<sup>[15]</sup>,抗凋亡蛋白Bcl-2、促凋亡蛋白Bax是通过调节线粒体功能来调节细胞凋亡的同源蛋白<sup>[16]</sup>,Bax和Bcl-2比例的变化可影响细胞凋亡<sup>[17]</sup>,Bax/Bcl-2比值增大,细胞易发生凋亡<sup>[18]</sup>。本研究发现,芦荟苷可升高胶质瘤U251细胞促凋亡蛋白Bax表达,降低抗凋亡蛋白Bcl-2表达,且呈剂量依赖性,提示芦荟苷可促进胶质瘤U251细胞发生凋亡,进而抑制胶质瘤的发生发展。

综上所述,芦荟苷可抑制胶质瘤U251细胞的增殖、迁移,并诱导细胞凋亡,其机制可能与下调MMP2、Bcl-2蛋白表达和上调Bax蛋白表达有关,本实验从多层次证实芦荟苷可抑制胶质瘤细胞的发生发展,为芦荟苷对胶质瘤的临床治疗提供了理论依据。

#### 参考文献:

[1] Liu Y, Shete S, Hosking F, et al. Genetic advances in glioma: susceptibility genes and networks [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2010, 20(3): 239-244.

[2] Choi S, Yu Y, Grimmer M R, et al. Temozolomide-associated hypermutation in gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(10): 1300-1309.

[3] Nazeam J A, Gad H A, El-Hefnawy H M, et al. Chromatographic separation and detection methods of *Aloe arborescens* Miller constituents: A systematic review [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1058: 57-67.

[4] Harlev E, Nevo E, Lansky E P, et al. Anticancer potential of aloes: antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory attributes [J]. *Planta Med*, 2012, 78(9): 843-852.

[5] Lin J G, Chen G W, Li T M, et al. Aloe-emodin induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells through the p53 dependent apoptotic pathway [J]. *J Urol*, 2006, 175(1): 343-347.

[6] 杜毅超, 郑天翔, 石 昊, 等. 芦荟苷对肝癌MHCC97H细胞增殖、迁移及侵袭的作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(12): 1669-1671.

[7] Jing Y, Yang D X, Wang W, et al. Aloin protects against blood-brain barrier damage after traumatic brain injury in mice [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(6): 625-638.

[8] Zeng H J, Yang Z, Xu N B, et al. Connective tissue growth factor promotes temozolomide resistance in glioblastoma through TGF- $\beta$ 1-dependent activation of Smad/ERK signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): e2885.

[9] Jackson T C, Verrier J D, Kochanek P M. Anthraquinone-2-sulfonic acid (AQ2S) is a novel neurotherapeutic agent [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(1): e451.

[10] Buenz E J. Aloin induces apoptosis in Jurkat cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(2): 422-429.

[11] Wan L, Zhang L, Fan K, et al. Aloin promotes A549 cell apoptosis via the reactive oxygen species/mitogen activated protein kinase signaling pathway and p53 phosphorylation [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 5759-5768.

[12] Pan Q, Pan H, Lou H, et al. Inhibition of the angiogenesis and growth of aloin in human colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 69.

[13] Esmat A Y, Tomasetto C, Rio M C. Cytotoxicity of a natural anthraquinone (aloin) against human breast cancer cell lines with and without ErbB-2: Topoisomerase II- $\alpha$  coamplification [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(1): 97-103.

[14] Ma S Q, Pang C H, Song L J, et al. The expression of ATF3, MMP-2 and maspin in tissue chip of glioma [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(3 Suppl): 1059-1063.

[15] Ashkenazi A, Fairbrother W J, Levenson J D, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(4): 273-284.

[16] 李 舒, 杨从意, 鲁艳平, 等. 黄连素对人胃癌细胞SGC7901凋亡影响的研究 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(1): 59-62.

[17] 罗 斌, 田芳芳, 田俊斌, 等. 白杨素对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌Bax和Bcl-2表达的影响 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(1): 86-90.

[18] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1324-1337.