

金丝桃素提取物对乳腺癌细胞 MDA231 的光动力杀伤效应研究

王晓利¹, 张俊松^{1*}, 刘金钊^{1,2}, 杨汝德² (1. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东 深圳 518055; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510641)

摘要:目的 研究贯叶金丝桃中金丝桃素 (HY) 提取物对人乳腺癌细胞株 MDA231 的体外光动力杀伤效应。方法 通过测定胞内荧光强度来确定细胞对金丝桃素的吸收, 用显微镜观察、MTT法和 DNA电泳分析法来研究金丝桃素对细胞的生长抑制作用。结果 光活化的金丝桃素对 MDA231 细胞有显著的体外杀伤效应, 其抑制细胞生长的能力与 HY 的浓度及光照能量密切相关。结论 金丝桃素提取物在光照下能明显抑制乳腺癌细胞的生长, 金丝桃素用于治疗乳腺癌具有广阔的开发应用前景。

关键词: 金丝桃素; 金丝桃素提取物; 光动力治疗; 乳腺癌

中图分类号: R931.6; R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)01-0001-04

Photocytotoxic Effect of Hypericin Extract from *Hypericum Perforatum* L. on MDA231 Human Mammary Carcinoma Cell Lines *in vitro*

WANG Xiao-li¹, ZHANG Jun-song^{1*}, LIU Jin-chuan^{1,2}, YANG Ru-de² (1. College of Applied Chemical and Biological Engineering, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China; 2. College of Bioscience and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the photodynamic therapy (PDT) antitumoral effect *in vitro* of Hypericin extract from *Hypericum perforatum* L. on MDA231 human mammary carcinoma cell lines. **METHODS** The cellular uptake of Hypericin extract was investigated by detecting endocellular fluorescence, and the antitumoral effect of Hypericin extract was assessed by light microscopy, MTT assay and DNA ladder gel electrophoresis. **RESULTS** Light-activated Hypericin extract has an obvious inhibition effect against MDA231 cells *in vitro*, and its efficacy was correlated to the concentration of Hypericin extract and the light energy. **CONCLUSION** Hypericin extract can obviously decrease the growth of mammary carcinoma cells. Hypericin extract should be a powerful natural photosensitizer and have a good prospect for further investigation.

KEY WORDS: Hypericin (HY); Hypericin extract; photodynamic therapy (PDT); mammary carcinoma

金丝桃素 (hypericin, HY), 4, 4', 5, 5', 7, 7'-六羟基-2, 2'-二甲基-中位-萘并二萘酮, 是贯叶金丝桃 (*Hypericum perforatum* L.) 中一种具有高度生物活性的物质, 具有抗抑郁、抗病毒、抗炎及抗肿瘤等多种生物活性^[1]。目前金丝桃素在肿瘤的光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 方面的研究开发十分活跃, 但绝大多数仅限于价格昂贵的金丝桃素纯品, 国外虽有文献报道, 从贯叶金丝桃中提取出来的低纯度金丝桃素制品具有比金丝桃素纯品更好的抗肿瘤活性^[2-4], 但国内在上述领域的研究报道很少。笔者以 LED (light emitting diode, 发光二极管) 为 PDT 光源, 研究了贯叶金丝桃中金丝桃素提取物对乳腺癌细胞 MDA231 的生长抑制作用, 还研究了热疗实验对金丝桃素 PDT 作用的影响。

1 材料

1.1 主要材料

人乳腺癌细胞株 MDA231 由广州陆军总医院提供, 贯叶金丝桃的金丝桃素提取物由本实验室自制 (下简称 HY 样品, 经高效液相色谱法分析定量, 除含 HY 外, 还含有伪金丝桃素及糖类物质等, 用二甲基亚砷溶解配制, 样品浓度以 HY 含量计算), 金丝桃素纯品购自美国 Alexis 公司, RPMI 1640 培养基、胰酶 (Trypsin) 0.25% EDTA 购自美国 Gibco 公司, 二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司, 小牛血清购自杭州四季青生物工程公司, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 少量凋亡 DNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司, 100 bp DNA ladder 购自美国 BMA 公司, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 主要仪器

基金项目: 深圳市科技局科技项目 (03KJ5019)

作者简介: 王晓利, 女, 硕士, 副教授 * 通讯作者: 张俊松, 男, 硕士, 副教授
com. cn

Tel: (0755) 26019266

E-mail: junsongzhang@yahoo.

黄色 LED光源(主波长 590 nm,与金丝桃素最大吸收波长一致)购自深圳佳进光电技术有限公司,美国 Coming微孔细胞培养板,美国 Molecular Devices公司 Spectramax M2型连续光谱光密度荧光检测仪,德国 Binder二氧化碳孵箱,德国 Leica倒置荧光显微镜,日本爱德万 TQ8210型光纤功率计。

2 方法

2.1 细胞培养

细胞培养于含 10%小牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和 100 μg·mL⁻¹链霉素的 RPMI1640 培养液中,于 37℃,5% CO₂孵箱内单层贴壁生长,2~3 d传代一次。

2.2 细胞对药物的吸收

生长良好的细胞经胰酶消化制成细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板上,每孔 1×10⁴个细胞。培养至对数生长期后,吸去旧培养液,加入 HY浓度为 100 nmol·L⁻¹的 HY样品溶液,使各实验组细胞分别与 HY样品共孵育 0,1,2,4,6,8,24 h,吸去培养液,PBS漂洗一次,用 Spectramax M2型检测仪在 Ex=485 nm,Em=590 nm条件下测胞内荧光强度。

2.3 HY在避光条件下的细胞毒性

对数生长期的细胞经胰酶消化制成细胞悬液,接种于微孔板中,培养 24h后吸去旧培养液,加入不同浓度的 HY样品溶液,避光培养(不光照)24 h后用 MTT法比较各组细胞活力。

2.4 PDT程序

细胞在生长状况良好的前提下,加入不同浓度(所用浓度在避光条件下对细胞无毒性)的 HY样品,对照组加 DMSO,其他处理方式与实验组相同。避光孵育 6 h后,将波长为 590 nm的黄色 LED光源置于培养板正上方,用 TQ8210 型光纤功率计测得光照功率密度为 1.05 mW·cm⁻²,照射 30,60,90 min,积累能量分别为 3.78,7.54,11.3 J·cm⁻²。PDT后避光培养 24 h进行细胞形态观察以及各项药效评价实验。

2.5 细胞毒试验(MTT法)

将待检测的细胞弃去培养液,加入含 0.5 mg·mL⁻¹ MTT的无血清培养液 100 μL,继续培养 4h后,吸出各孔液体,加入含 0.1 mol·L⁻¹ HCl的异丙醇 100μL,振荡溶解 15 min,测定波长 570 nm下的各孔吸光度 A₅₇₀,计算细胞的生长抑制率(%)=(1-实验组平均 A₅₇₀/对照组平均 A₅₇₀)×100^[5],绘制细胞生长抑制曲线。

2.6 DNA电泳分析细胞的 DNA ladder

按试剂盒说明书提取 DNA ladder,1%琼脂糖凝胶电泳,50 V电泳 4 h左右。小心取出凝胶,浸入 0.5 μg·mL⁻¹的溴化乙锭水溶液中染色 30~45 min,后用清水浸泡 10 min,在紫外灯下观察,拍照。

2.7 热疗实验

细胞按常规 PDT程序光照 60 min后,立即放入 43℃的培养箱中 30 min,对照组放入 37℃培养箱。实验完成后后置 CO₂培养箱中避光培养 24 h,用 MTT法比较各组细胞的生长抑制率。

2.8 统计学分析

数据处理采用方差分析统计,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t检验,P<0.05为有显著差异,P<0.01为有极显著差异。

3 结果

3.1 细胞对 HY样品的吸收曲线

给药后不同时间 MDA231 细胞内的相对荧光值(Relative Fluorescence Unit, RFU)见图 1,其反映了细胞摄入的 HY量,可见细胞摄入 HY后细胞内的相对荧光值逐渐增强,并在给药 6 h后趋于饱和,24 h内基本维持在饱和水平不变。

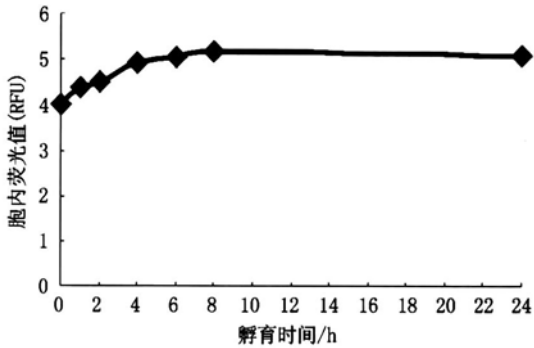


图 1 MDA231 细胞对 HY样品的吸收曲线

Fig 1 Absorption curve of uptake Hypericin extract on MDA231 cells

3.2 避光条件下 HY样品对细胞的毒性

避光条件下 HY样品对细胞的毒性很小,见表 1。细胞与 HY样品避光孵育 24h,低 HY浓度各组(≤500 nmol·L⁻¹)细胞形态与空白对照组无明显差异,只有当 HY浓度达到 5 000 nmol·L⁻¹才出现了较明显的抑制作用,显微镜下细胞显得较为肿胀,细胞数目较少,生长抑制率为 59.1%(与对照组相比 P<0.01)。因此研究 HY的光动力活性时,均采用 500 nmol·L⁻¹以下的浓度进行研究。

表 1 避光条件下 HY样品对 MDA231 细胞的毒性作用(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Cytotoxicity of HY sample to MDA231 cells in the dark (n=8, $\bar{x} \pm s$)

HY浓度 /nmol·L ⁻¹	A ₅₇₀	抑制率 /%
0	0.479 ±0.094	0
0.5	0.499 ±0.098	-4.18
5	0.465 ±0.082	2.92
50	0.473 ±0.097	1.25
500	0.415 ±0.096	13.4
5000	0.196 ±0.054	59.1 ¹⁾

注:与对照组比较,¹⁾ P<0.01

Note: Compared with the control group,¹⁾ P<0.01

3.3 HY样品对 MDA231 细胞的光动力杀伤效应

3.3.1 形态学变化 光照 60 min后 24 h的细胞形态图见图 2。MDA231 细胞一般呈梭形或多角形,正常情况下细胞轮廓清晰,生长旺盛,偶见漂浮细胞。当加入 HY样品溶液并加以适当的光照后,细胞可产生不同的形态变化,表现出细胞凋亡的特征:细胞逐渐变为圆形,从瓶壁脱落,悬浮细胞

增多,胞质浓缩,细胞体变小,凋亡程度与 HY 的浓度呈明显的正相关。

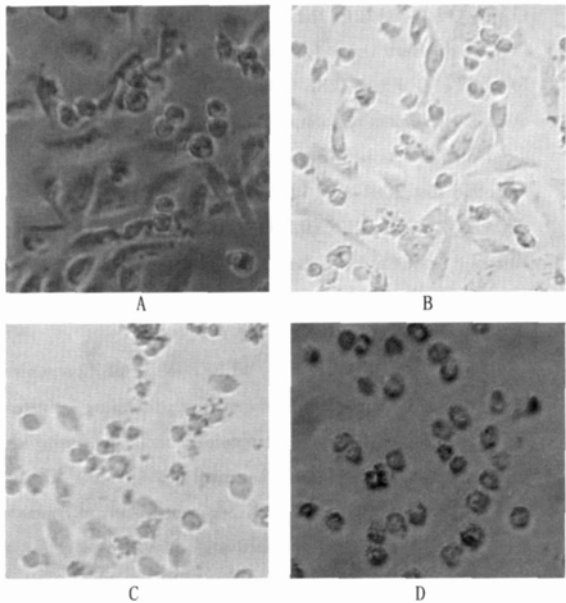


图 2 加入不同浓度 HY 样品 PDT 24 h 后 MDA231 细胞形态变化 (×200)

A - 对照组, 不给药; B - 10 nmol·L⁻¹ HY 样品; C - 50 nmol·L⁻¹ HY 样品; D - 100 nmol·L⁻¹ HY 样品

Fig 2 Photos of MDA231 cells with different concentration of Hypericin extract and 24 h after PDT (×200)

A - Control; B - 10 nmol·L⁻¹ HY; C - 50 nmol·L⁻¹ HY; D - 100 nmol·L⁻¹ HY

3.3.2 细胞抑制曲线 给药后 6 h 分别光照 30, 60, 90 min 的细胞生长抑制曲线见图 3。HY 的浓度分别为 10, 30, 50, 80, 100 nmol·L⁻¹。结果表明, HY 的光动活性与 HY 的浓度及光照的时间呈明显的正相关, 与形态学的变化趋势一致。与对照组比较, $P < 0.05$ 。在 HY 样品达到一定浓度后, 光照时间从 60 min 增加到 90 min 的抑制率增加值比光照时间从 30 min 增加到 60 min 的值小, 可能说明光照能量的作用有一定限度, 光照时间的延长并不能带来抑制率的持续上升。

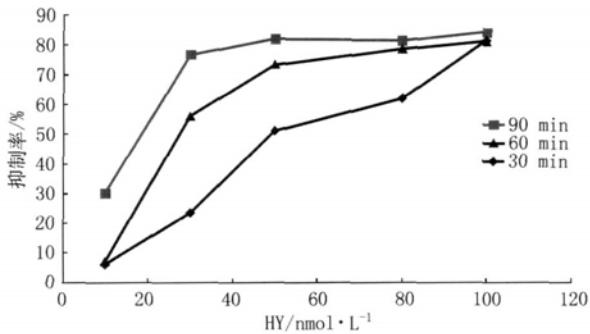


图 3 MDA231 细胞给药后 6 h 光照不同时间的抑制曲线

Fig 3 Inhibition curve for different light irradiation time after treating with Hypericin extract and incubating 6 h

3.3.3 HY 与 HY 提取物的细胞毒作用比较 HY 纯品与 HY 提取物对 MDA231 细胞的抑制作用的比较见图 4。HY

的浓度分别为 10, 30, 50, 80, 100 nmol·L⁻¹, 给药后 6 h 光照 90 min。结果表明, HY 提取物具有更大的细胞生长抑制活性, P 值 < 0.05 , 具有显著差异。

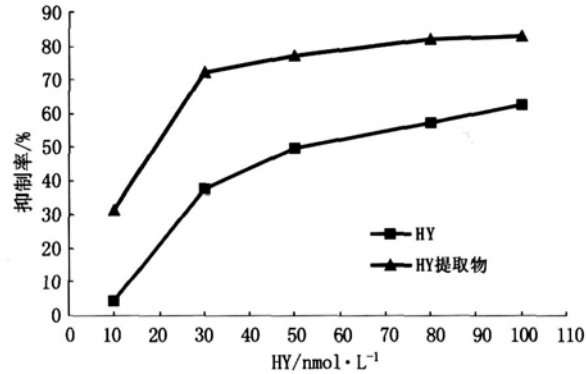


图 4 HY 和 HY 提取物抑制 MDA231 细胞生长的活性比较

Fig 4 Inhibition curve for HY and Hypericin extract

3.3.4 PDT 后细胞 DNA 检测 根据 PDT 后 MDA231 细胞 DNA 的电泳图谱了解细胞 DNA 的降解情况。发现乳腺癌细胞 MDA231 在 PDT 后 24 h, 实验组的 DNA 的降解虽未出现明显的 DNA ladder, 但可观察到一片弥散的 DNA 降解条带, 且 PDT 后 48 h 的电泳图谱也与之类似, 与对照组相比有明显的 DNA 降解。至于未出现明显的 DNA ladder, 可能说明 MDA231 细胞 DNA 降解后的片段较大且分子量较为接近。

3.4 热疗实验对 PDT 作用的影响

PDT 后立即进行热疗对细胞生长抑制率的影响见图 5。可见热疗对金丝桃素的 PDT 有一定的促进作用, 当 HY 浓度较低 (< 30 nmol·L⁻¹) 时促进作用显著 ($P < 0.05$); 当 HY 浓度较高 (≥ 50 nmol·L⁻¹), 即细胞抑制率达到一定限度以后其作用不显著 ($P > 0.05$)。

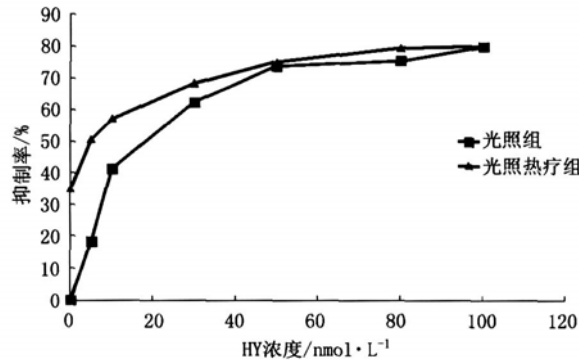


图 5 MDA231 细胞 PDT 后热疗的细胞抑制曲线

Fig 5 Growth inhibition curves of MDA231 cells treated with hyperthermia after PDT

4 讨论

乳腺癌是危害妇女身心健康的主要恶性肿瘤, 发病率、复发率和转移率都较高。乳腺癌传统的治疗方法包括手术、化疗、放疗和内分泌治疗, 部分患者经传统方法治疗后仍出现胸壁复发。对这种复发癌, 治疗方法虽然较多, 但疗效并不令人满意。且手术治疗有时还不易为患者心理所接受或会对患者心理造成一定影响。光动力治疗是一种微创、只引

起局部组织坏死的新兴治疗手段。有研究表明,金丝桃素光动力治疗乳腺癌是有效的^[6],金丝桃素还具有一定的抗转移活性^[7],因此用于治疗乳腺癌有良好的开发应用前景。本实验结果也证实了金丝桃素对乳腺癌细胞有良好的光动力杀伤活性,其效果呈明显的剂量依赖性和光照依赖性。而且本实验采用了低纯度的金丝桃素提取物进行研究,结果表明其与金丝桃素纯品一样具有良好的抗肿瘤效果,甚至抑制活性更高。这预示着在进行肿瘤的光动力治疗时,可能并不需要高纯度的金丝桃素作光敏剂,仅用粗提物就能达到较好的生长抑制作用,这将可能大大降低治疗成本,产生良好的社会效应。

HY是荧光物质,进入细胞后可积累在细胞内,使细胞产生橘红色荧光。因此给药后不同时间细胞内的相对荧光强度,间接反映了细胞摄入的HY量。细胞在不加药的情况下(即时间原点)也能发出橘红色荧光,这是肿瘤细胞自身分泌内源性卟啉而自体发荧光的正常现象。

高温具有选择性抑癌效应,正常细胞能较长时间耐受 42~43℃ 高热,而癌细胞对温度较敏感,在 42℃ 以上很快灭活。高温治癌已有百余年的历史,但单用高热治疗癌症,瘤体内的温度必须达到足够高并维持一段时间才能保证癌细胞全部被杀死,在临床上往往不易实现^[8],故多与其他抗癌方法联用。Chen等^[9]将荷瘤小鼠用金丝桃素光动力治疗后立即进行 43℃ 高温处理,实验证明两者的结合对直接杀死肿瘤细胞有促进效应,大大增强了金丝桃素的抗肿瘤作用。本实验对乳腺癌细胞采用 PDT 后 43℃ 热处理 30 min,结果证明热疗实验对金丝桃素的抑制作用确实起了一定的促进作用。对于像乳腺癌这样的体表肿瘤,在临床上较容易进行光照处理和能使肿瘤组织达到并维持预定的治疗温度,因此 PDT 法与热疗法联用治疗乳腺癌在临床上较容易实现。本实验结果可为临床上用金丝桃素 PDT 法,并辅以热疗治疗乳腺癌提供重要依据。

REFERENCES

- [1] LIANG Q L, GAO H C. The advance on research of hypericin[J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1999, 30(9): 705-708.
- [2] ROSCETTI G, FRANZESE O, COMANDINI A, *et al*. Cytotoxic activity of *Hypericum perforatum* L. on K562 erythroleukemic cells: differential effects between methanolic extract and hypericin[J]. Phytother Res, 2004, 18 (1): 66-72.
- [3] HOSTANSKA K, REICHLING J, BOMMER S, *et al*. Aqueous ethanolic extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) induces growth inhibition and apoptosis in human malignant cells *in vitro*[J]. Pharmazie, 2002, 57(5): 323-331.
- [4] HOSTANSKA K, BOMMER S, WEBER M, *et al*. Comparison of the growth-inhibitory effect of *Hypericum perforatum* L. extracts, differing in the concentration of phloroglucinols and flavonoids, on leukaemia cells[J]. J Pharm Pharmacol, 2003, 55(7): 973-980.
- [5] LIU X J, JU Y, MENG Y, *et al*. Experimental study of glioma cells induced by light-induced photoactivation of hypericin[J]. Chin J Lab Diagn (中国实验诊断学), 2001, 5(1): 29-30.
- [6] ANN L VANDENBOGAERDE, JOEL F CUVEELE, PIETER PROOT, *et al*. Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin[J]. J Photochem Photobiol B, 1997, 38: 136-142.
- [7] BLANK M, LAVIE G, MANDEL M, *et al*. Antimetastatic activity of the photodynamic agent hypericin in the dark[J]. Int J Cancer, 2004, 111: 596-603.
- [8] MA C, LUO Y, MA Q. The advance on research of treating cancer tradition and innovation[J]. Chin Med Infor (中国医药情报), 1998, 4(2): 114-119.
- [9] CHEN B, ROSKAMS T, DE WITTE PA. Enhancing the antitumoral effect of hypericin-mediated photodynamic therapy by hyperthermia[J]. Lasers Surg Med, 2002, 31 (3): 158-163.