论著

文章编号:1000-5404(2014)21-2162-05

芦荟大黄素复合光动力处理对人乳腺癌细胞抑制增殖和促进凋亡的体外观测

陈 青[1],李开庭[2],田 思[2],白定群[2],于廷和[3],虞乐华[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:康复医学科[1],妇产科[3];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院康复医学科[2])

[摘要] **目的** 探讨芦荟大黄素(aloe emodin,AE)介导的光动力对人乳腺癌MCF-7细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。**方法** AE介导的光动力(PDT)作用于人乳腺癌细胞株MCF-7,采用CCK-8法检测细胞增殖状态;Hoechst细胞核染色观察细胞凋亡的形态学变化;Anne-V/PI双染流式细胞技术检测细胞的凋亡率;DCFH-DA染色检测活性氧物质(ROS)产生;JC-1染色检测线粒体膜电位变化情况;Western blot检测Caspase-3、Bcl-2蛋白表达的变化。**结果** AE介导的光动力作用显著抑制人乳腺癌MCF-7细胞的生长,其抑制作用呈一定的剂量效应关系($P<0.05$);AE介导的光动力作用人乳腺癌MCF-7细胞发生凋亡和继发性坏死的比率均显著高于单纯光照射组、单纯AE光敏剂处理组和空白对照组($P<0.05$),而后3组间无明显差异($P>0.05$);AE介导的光动力在能量密度为12 J/cm^2(药物浓度10 μmol/L,光功率密度40 mW/cm^{2}持续照射时间为300 s)作用后Hoechst细胞核荧光染色可观察到细胞核固缩、碎裂,可见凋亡小体;DCFH-DA荧光染色发现PDT组细胞内ROS水平升高;JC-1荧光染色发现PDT实验组较对照组细胞膜电位下降;Western blot检测发现Caspase-3蛋白表达升高,Bcl-2蛋白表达略有降低。**结论** AE介导的光动力能有效抑制人乳腺癌MCF-7细胞生长并诱导其发生凋亡,且线粒体通路参与了AE介导的光动力诱导人乳腺癌细胞凋亡的过程。

[关键词] 光动力治疗;芦荟大黄素;凋亡;线粒体膜电位

[中图法分类号] R282.71; R730.59; R737.9 [文献标志码] A

Aloe emodin-induced photodynamic therapy inhibits proliferation and improves apoptosis in human breast cancer cells

Chen Qing[1], Li Kaiting[2], Tian Si[2], Bai Dingqun[2], Yu Tinghe[3], Yu Lehua[1] ([1]Department of Rehabilitation Medicine, [3]Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of photodynamic therapy (PDT) with aloe emodin (AE) as photosensitizer on the proliferation and apoptosis in breast cancer cells and investigate the underlying mechanism. **Methods** After breast cancer cell line MCF-7 were treated with AE-induced PDT, cell proliferation was measured by CCK-8 assay. Cellular apoptosis was detected by Hoechst nuclear staining and flow cytometry. The level of reactive oxygen species (ROS) were observed by DCFH-DA staining. Mitochondrial membrane potential was tested by JC-1 staining. The expression of Caspase-3 and Bcl-2 was assessed by Western blotting. **Results** Cell proliferation was significantly suppressed in the MCF-7 cells after AE-PDT in a dose-dependent manner ($P<0.05$). AE-PDT resulted in remarkable increased apoptotic rate and secondary necrotic rate in the cells compared with the photodynamic therapy cells, AE treated cells, and normal control cells ($P<0.05$), and there was no difference among the latter 3 groups ($P>0.05$). After the cells were treated by an energy density of 12 J/cm^2 (drug density 10 μmol/L, optical power density 40 mW/cm^2, for 300 s). Hoechst33342 staining displayed karyopyknosis, fragmentation, apoptotic bodies, DCFH-DA staining showed increased level of ROS, and JC-1 staining suggested decreased mitochondrial membrane potential, and Western blot analysis found that the protein level of Caspase-3 was increased and that of Bcl-2 decreased. **Conclusion** PDT with AE as photosensitizer significantly inhibits the proliferation and induces apoptosis in

[基金项目] 国家自然科学基金(81101692);重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5136)

[通信作者] 白定群,E-mail:baidingqun@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140918.0843.010.html(2014-09-18)

breast cancer MCF-7 cells. The mitochondrial pathway is involved in the AE-mediated PDT-induced apoptosis.

[**Key words**] photodynamic therapy; aloe-emodin; apoptosis; mitochondrial membrane potential

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81101692) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5136).
Corresponding author: Bai Dingqun, E-mail: baidingqun@163.com

近年来,乳腺癌患者日益增多,其所占比例已达到所有恶性肿瘤的20%,严重威胁到女性的生命及其生活质量。传统的治疗方法主要是手术切除,但因复发率较高而影响手术治疗的效果,且化疗因其较大的毒副作用及化疗药物耐药的产生,使得其在乳腺癌的临床应用中受到限制[1]。光动力疗法(photodynamic therapy,PDT)作为一种新型辅助治疗方法,因其低耐药及靶向作用已被用于许多肿瘤和非肿瘤性疾病的治疗[2-5]。芦荟大黄素(aloe emodin,AE)是从芦荟真皮中提取的具有生物活性瑰醌类物质,已经被广泛应用于中国传统医学[6-7]。最新研究发现,芦荟大黄素具有潜在光敏剂作用,可以在特定波长的LED光源激发下发挥其光敏的作用[8]。本课题通过探讨以AE作为光敏剂介导的光动力疗法对人乳腺癌MCF-7细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制,期望为乳腺癌的治疗提供一种新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及配制

芦荟大黄素(纯度≥98%,购于江西本草天工科技有限责任公司);二甲基亚砜(DMSO)溶解后过滤浓度为100 mmol/L储存液,过滤除菌后避光保存于-20 ℃的冰箱中备用;LED光源由本课题组自行研制;胎牛血清、胰蛋白酶、DMEM细胞培养基:美国HyClone公司产品;CCK-8(购于日本同仁公司);Anne V-PI双染检测试剂盒(美国凯基生物技术有限公司);荧光染料Hechst33342(Sigma),DCFH-DA(Sigma)和JC-1(goitrogen);Caspase-3抗体购于美国CST公司;Bcl-2抗体购于美国Immunology公司;β-actin抗体和相应的二抗均购于美国Santa Cruz公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌MCF-7细胞株购自上海复旦大学细胞库,于DMEM培养基(含50 μg/L青霉素、50 μg/L链霉素及10%胎牛血清)中培养,37 ℃、5% CO_2常规细胞培养、传代。

1.3 实验分组及光动力处理

将对数生长期的MCF-7细胞分成对照组和实验组。实验组为AE光动力实验组(加光敏剂和LED光照),对照组包括单纯AE处理组(只加光敏剂)、单纯光照组(只LED光照)和空白对照组(不加光敏剂的假照射组)。换液后光动力实验组及单纯AE处理组在暗室中加入终浓度为10 μmol/L的AE,单纯光照组和空白对照组加入等量DMEM培养基和等浓度的DMSO,37 ℃、5% CO_2孵育24 h,去掉含AE的DMEM培养液,用PBS缓冲液冲洗2遍后,再换成新的完全培养基;光动力实验组及单纯光照组使用集成LED特种光源照射,波长430 nm、连续输出方式、光功率密度40 mW/cm^2,照射时间为0、120、240、300、480 s。调整光斑面积使各组细胞实际接受到的光能量密度达到0、4.8、9.6、12、19.2 J/cm^2。在后期的PDT处理中,光能量密度选择的是12 J/cm^2。

1.4 细胞活性和增殖检测

人乳腺癌细胞株MCF-7培养至汇合率为70%时按5×10^3/孔接种于96孔培养板,培养24 h后将其分组(0、5、10、15、20 μmol/L),并进行光动力处理继续培养20 h;加入CCK-8溶液10 μL,37 ℃、5% CO_2孵育40 min。选择450 nm波长,在酶联免疫检测仪上检测各孔的光密度值,取平均值,按公式计算其细胞生存率=(实验组平均光密度值-阴性对照组光密度值)/空白对照组平均光密度值×100%。同一方法处理细胞分空白对照组、单纯光照组、单纯药物组和PDT组(活化10 μm的AE,能量密度为12 J/cm^2),分别检测12、24、36、48 h细胞的增殖情况。

1.5 PDT介导的光动力诱导MCF-7细胞的凋亡检测

人乳腺癌细胞株MCF-7培养至汇合率为70%时按1×10^5/孔接种于6孔培养板中,24 h后予以PDT处理:LED(12 J/cm^2)活化AE(10 μmol/L),6 h后,收集所有悬浮及贴壁细胞,进行Annex Inv-PI双染,采用流式细胞仪(美国BD Excalibur)检测细胞凋亡。24孔培养板中设置各组,同上处理后37 ℃、5% CO_2培养6 h,弃培养液后以冷PBS液冲洗2次,4%多聚甲醛固定30 min,0.1% Triton X-100破膜2 min,终浓度10 μg/mL Hoechst于37 ℃暗处染色15 min,在荧光显微镜下经紫外光激发观察并照相。

1.6 DCFH-DA染色检测ROS的水平

DCFH-DA是一种脂溶性,可自由通过细胞膜的没有荧光的复合物,一旦有氧自由基的产生即可转化为带有高强度荧光DCF。48孔培养板中设置各组,同上处理后37 ℃、5% CO_2培养2 h。弃培养液后以冷PBS液洗2次,加含10 μmol/L的DCFH-DA无血清的培养基,37 ℃培养30 min,弃培养液后以冷PBS液洗2次,荧光显微镜下经蓝光激发观察并照相(激发波长488 nm;发射波长525 nm)。

1.7 JC-1染色观察线粒体膜电位

48孔培养板中设置各组,同上处理后37 ℃、5% CO_2培养3 h,弃培养液后以冷PBS液洗2次,加含终浓度为10 μg/mL的JC-1溶液,37 ℃培养30 min,弃培养液后以冷PBS液洗2次,换新的培养基200 μL,加入CCK-8溶液20 μL,37 ℃、5% CO_2孵育40 min。在酶联免疫检测仪上按红色荧光(Ex=585 nm, Em=590 nm),绿色荧光(Ex=514 nm, Em=529 nm)设置波长,检测各孔的相对荧光强度值。相对荧光强度=红色荧光/绿色荧光,同时荧光显微镜下观察并照相。

1.8 蛋白质免疫印迹分析

收集实验组和对照组细胞,PBS洗涤,加入细胞裂解液裂解,取等量上述蛋白裂解液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-

PAGE,12%分离胶),采用湿转法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,室温封闭1 h(封闭液:含5%脱脂牛奶的TBST溶液)、洗脱后加入一抗稀释比例后4 ℃过夜,洗膜后以相应的二抗室温孵育1 h,显色采用ECL化学发光法,结果用β-actin进行校正。用Quantity one软件分析每一条带的灰度值,统计3次的实验结果。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件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。

2 结果

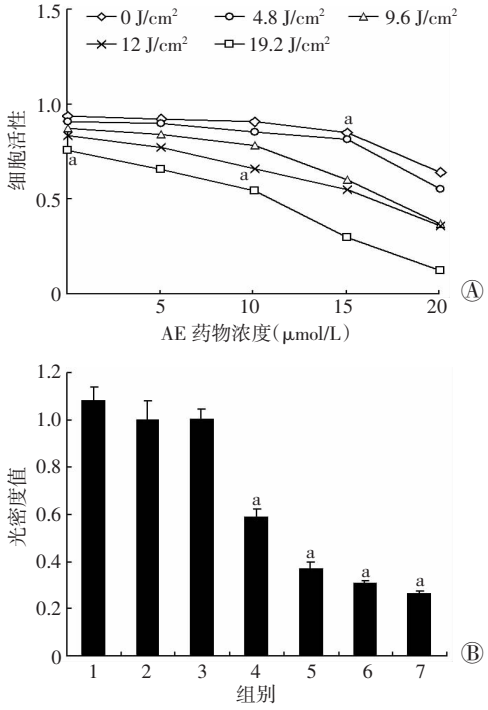
2.1 AE光动力作用对人乳腺癌MCF-7细胞生长的抑制作用

由图1A可见:1)光敏剂AE对人乳腺癌MCF-7细胞株活性有一定的影响,在低浓度(<10 μmol/L)情况下不影响细胞活性,但在高浓度时,特别是>20 μmol/L(20 μmol/L细胞活性0.755 9±0.028 7)的情况下会对细胞活性产生较大影响。因此,在后续的实验中使用浓度为10 μmol/L(细胞活性0.873 2±0.014 3,细胞生存率>85%)。2)光敏剂AE介导的光动力作用对人乳腺癌MCF-7细胞生长具有明显抑制作用,且其抑制作用呈剂量效应关系;光敏剂AE浓度越高,其杀伤作用越强。AE浓度在5~20 μmol/L时,各能量密度组间其生长抑制作用相差显著,且随着能量密度的增加,其生长抑制率升高更明显($P<0.05$);同时,在相同能量密度情况下,不同浓度的AE介导的PDT对人乳腺癌MCF-7细胞生长抑制作用差异明显($P<0.05$)。3)能量密度在4.8~12 J/cm^{2}时[光照时间120、240、300 s,细胞活性(0.923 4±0.009 7)、(0.905 3±0.018 0)、(0.850 9±0.017 7)],单纯光照组细胞生存率>85%,生长抑制作用较无光照组无明显差异($P>0.05$),而在能量密度19.2 J/cm^{2}时单纯光照组(480 s,细胞活性0.641 9±0.018 3)细胞生存率<85%,生长抑制作用较无光照组有明显差异($P<0.05$);因此我们在后续的实验中使用最终的能量密度是12 J/cm^2。4)单纯光照(300 s)和单纯光敏剂AE(10 μmol/L)处理对人乳腺癌MCF-7细胞生长均无显著抑制作用($P>0.05$)。5)AE在10 μmol/L能量密度为12 J/cm^{2}时(0.603 3±0.018 5),细胞生存率为53%,表明AE介导的光动力可以明显抑制细胞活性($P<0.05$)。

从图1B我们可以看出:1)在AE采用10 μmol/L、能量密度为12 J/cm^{2}时,PDT组对MCF-7细胞的增殖有明显的抑制作用,其抑制作用随时间的延长而增强,呈时间依赖效应($P<0.05$);2)单纯光照和单纯药物组对MCF-7细胞的增殖影响无统计学差异($P>0.05$)。

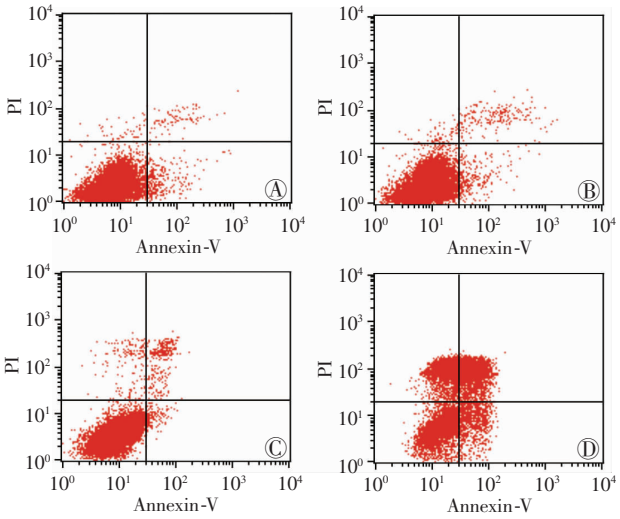
2.2 AE介导的光动力作用对人乳腺癌MCF-7细胞凋亡的诱导作用

Anne V-PI双染结合流式细胞仪定量检测结果(图2)显示:AE光动力实验组(24.833±3.675)人乳腺癌MCF-7细胞的继发性坏死或晚期凋亡发生率明显高于单纯光照对照组(5.963±1.430)、单纯AE对照组(6.447±2.330)和空白对照组(4.680±0.612,$P<0.05$),实验组依次是3个对照组的5.32、4.16倍和3.85倍,对照组间继发性坏死或晚期凋亡发生率无明显差异($P>0.05$)。因此,AE介导的光动力疗法可诱导MCF-7细胞的凋亡。



A:不同浓度的AE在不同光照能量密度作用下对MCF-7细胞活性的影响;a:$P<0.05$,与0 J/cm^2 0 μmol/L比较;B:AE介导的光动力对人乳腺癌MCF-7细胞增殖的影响;1:空白对照组;2:单纯药物组;3:单纯光照组;4:PDT 12 h组;5:PDT 24 h组;6:PDT 36 h组;7:PDT 48 h组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图1 AE介导的光动力对人乳腺癌MCF-7细胞活性及增殖的影响

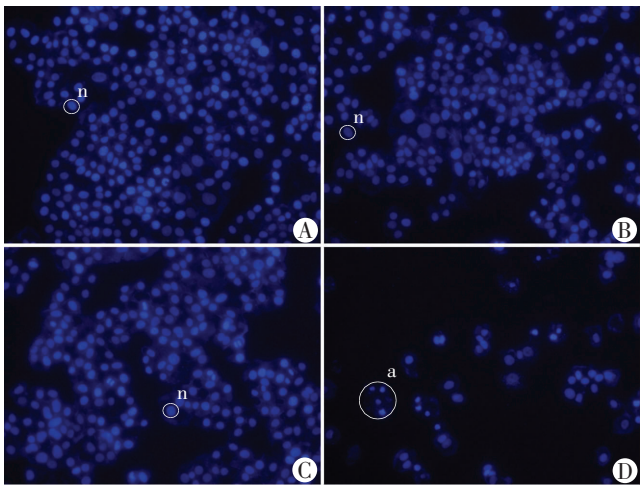


A:空白对照组;B:单纯药物组;C:单纯光照组;D:PDT组

图2 10 μmol/L AE在12 J/cm^{2}的光照剂量作用后6 h人乳腺癌MCF-7细胞的凋亡率

2.3 Hoechst33342染色观察AE介导的光动力作用后的人乳腺癌MCF-7细胞

AE介导的PDT组细胞核染色质密度增高,蓝染高亮,明显固缩、凝聚或碎裂,凋亡小体典型,且这类细胞明显多于单纯光照处理、单纯AE对照组和空白对照组($P<0.05$);对照组间这类细胞的比例无明显差异($P>0.05$),表明AE介导的光动力治疗能有效诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡。见图3。

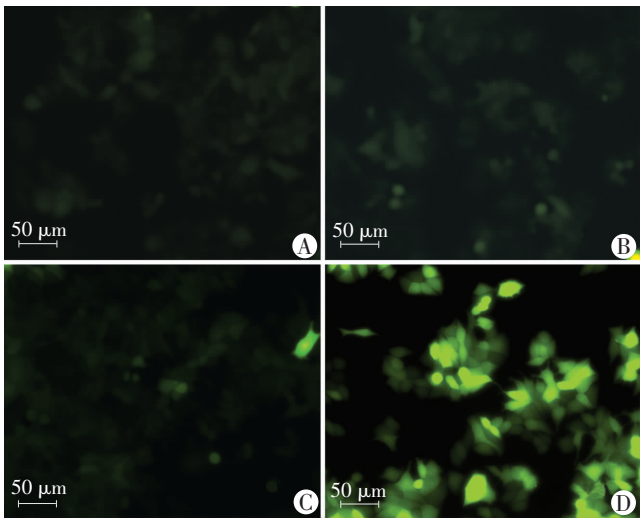


n:正常细胞;a:凋亡细胞
A:空白对照组;B:单纯药物组;C:单纯光照组;D:PDT 组

图 3　10 μmol/L AE 在 12 J/cm² 的光照剂量作用下诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡　(Hoechst33342 ×200)

2.4　AE 介导的光动力作用人乳腺癌 MCF-7 细胞后 ROS 的水平

DCFH-DA 染色发现 AE 介导的光动力组(0.842 ±0.049)绿色荧光细胞的比例明显高于单纯光照组(0.233 ±0.043)、单纯药物组(0.256 ±0.052)和空白对照组(0.235 ±0.038,$P<0.05$,图 4),表明 PDT 组产生的 ROS 明显高于单纯光照组、单纯药物组和空白对照组($P<0.05$);对照组 ROS 的水平无明显差异($P>0.05$)。表明 AE 介导的光动力治疗能有效的产生 ROS 来诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。

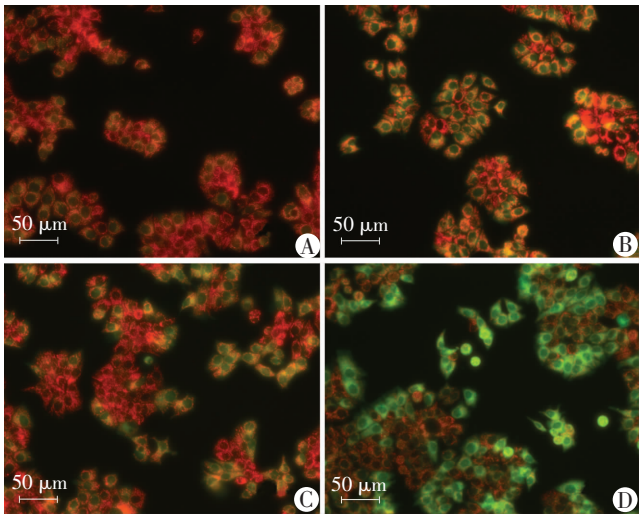


A:空白对照组;B:单纯药物组;C:单纯光照组;D:PDT 组

图 4　DCFH-DA 染色观察 10 μmol/L AE 在 12 J/cm² 的光照剂量作用下诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞 ROS 产生

2.5　AE 介导的光动力作用后人乳腺癌 MCF-7 细胞线粒体膜电位的改变

绿色荧光的细胞代表线粒体膜电位下降的细胞,橙色荧光的细胞代表线粒体膜电位无明显下降的细胞,相对荧光值(红色荧光/绿色荧光)的下降代表线粒体膜电位的下降;JC-1 染色结果(图 5)显示:反映线粒体膜电位的 JC-1 荧光在 AE 介导的光动力组呈现出绿色荧光的比例明显高于空白对照组、单纯光照组和单纯药物组($P<0.05$),PDT 组相对荧光值(2.103 ±0.075)小于对照组[空白对照组、单纯药物组、单纯光照组相对荧光值分别为(5.157 ±0.085)、(4.717 ±0.059)、(4.580 ±0.098)];对照组绿色荧光细胞的比例无明显差异($P>0.05$);PDT 组橙色荧光细胞的比例明显小于对照组($P<0.05$),对照组呈现出橘红色荧光细胞无明显差异($P>0.05$)。表明 AE 介导的 PDT 可以诱发线粒体膜电位降低。

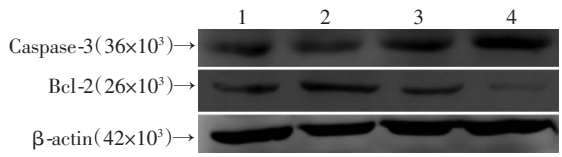


A:空白对照组;B:单纯药物组;C:单纯光照组;D:PDT 组

图 5　JC-1 染色观察 10 μmol/L AE 在 12 J/cm² 的光照剂量作用下诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞线粒体膜电位的下降

2.6　凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达

Caspase-3 蛋白的表达在 PDT 组依次是单纯药物组、单纯光照组和空白对照组的 1.51、1.45 倍和 1.62 倍,差异有统计学意义($P<0.05$),而单纯光照组、单纯药物组和空白对照组无统计学差异($P>0.05$),相反,Bcl-2 的表达在单纯光照组、单纯药物组和空白对照组是 PDT 组的 2.23、2.34 倍和 2.03 倍($P<0.05$),而单纯光照组、单纯药物组和空白对照组无明显差异($P>0.05$),表明 AE 介导的光动力可以诱导乳腺癌细胞的凋亡。见图 6。



1:空白对照组;2:单纯药物组;3:单纯光照组;4:PDT 组

图 6　Western blot 检测 Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达

3　讨论

乳腺癌的高发病率以及传统手术、放化疗和激素治疗在临床的缺陷,使得我们迫切需要寻找一种新型的治疗方法,以提高乳腺癌患者的生存率和患者预后。光动力疗法(PDT)作为一种无创、低毒、高效且稳定的治疗方法,有望成为治疗乳腺癌的新方法。而光动力疗法有 2 种作用机制:1)光敏剂和氧自由基之间的电

子转移;2)光敏剂的3个构像及氧之间的能量转移,最终产生单态氧。这2种方式都可以显著破坏细胞结构[5]。芦荟大黄素(AE)作为一种中药已经被证明有抗肿瘤、抗炎、抗增殖的作用[6],近来研究发现芦荟大黄素还具有潜在的光敏作用[8]。而AE-PDT的研究较少,本实验探索以AE作为光敏剂研究光动力抗乳腺癌细胞的作用机制。

本实验结果显示用LED光照能量为12 J/cm^{2}活化AE(10 μmol/L)时,可以明显抑制人乳腺癌MCF-7细胞生长,单纯AE(10 μmol/L)处理后乳腺癌MCF-7细胞和单独光照(300 s)处理后生存率均大于85%,表明AE介导的光动力可以明显诱导MCF-7细胞凋亡;而单独的药物和单独的光照则不会明显诱导细胞的凋亡,Hoechst细胞核荧光染色发现细胞核固缩、碎裂、凋亡小体形成,明显引起了MCF-7细胞凋亡。流式细胞仪检测发现:AE介导光动力实验组MCF-7细胞的凋亡发生率和继发性坏死率明显高于各对照组($P<0.05$),而对照组间无明显差异($P>0.05$)。以上结果显示诱导人乳腺癌MCF-7细胞发生凋亡可能是AE光动力抑制作用的重要机制之一。

光动力治疗(PDT)作用的主要机制为一定波长的光照后激发光敏剂产生活性氧物质(ROS),本实验通过DCFH-DA染色的方法发现实验组在PDT处理后细胞被染色;而对照组为阴性,从而证实了AE介导的光动力疗法产生了ROS而最终导致MCF-7细胞的凋亡。越来越多的研究表明线粒体是光动力治疗的重要靶点[9],PDT产生的活性氧(ROS)引起线粒体膜电位下降被认为是引起细胞凋亡事件的关键因子,包括膜间隙中的凋亡诱导因子(AIF)及细胞色素c被释放至胞质中,释放后的细胞色素c与凋亡蛋白酶活化因子(Apay-1)和Caspase-9形成多聚复合体,并使其自我剪切活化并启动Caspase级联反应,激活下游的Caspase-3,完成其相应底物的剪切,引起细胞凋亡[10-12]。我们进一步检测了Caspase-3的表达情况,发现在PDT处理后其表达增高;Bcl-2在调控线粒体凋亡通路中起到重要作用,作为抗凋亡蛋白,可以通过稳定线粒体膜电位水平,从而减少细胞色素c与Apay-1结合,促进细胞存活[13]。本研究发现,经AE-PDT处理的细胞,与对照组相比,Bcl-2在PDT组表达有降低。

综上所述,本实验证实AE介导的光动力治疗可以通过产生ROS诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡,表现出线粒体膜电位降低,Caspase-3表达升高,Bcl-2表达降低等一系列线粒体凋亡通路凋亡特征,提示线粒体凋亡通路参与了LED活化AE介导的光动力治疗人乳腺癌MCF-7细胞。但Xue等[14]在Pc-PDT诱导MCF-7细胞死亡的研究中认为细胞死亡是与细胞自噬相关,而与凋亡关系不明显,这与我们的研究结果存在一定差异,分析原因可能为芦荟大黄素(AE)作为一种新型光敏剂诱导MCF-7细胞死亡的途径可以形成相应前体Caspase-3蛋白,诱导MCF-7细胞的凋亡。至于是否存在细胞外源性及其他凋亡通路,以及其与线粒体凋亡通路的关系如何,将在下一步的研究中做深入的探讨。

参考文献:

[1] Kulbacka J, Nowak M, Skolucka N, *et al*. The influence of electroporation on *in vitro* photodynamic therapy of human breast carcinoma cells [J]. Folia Biol (Praha), 2011, 57(3): 112-118.

[2] Qumseya B J, David W, Wolfsen H C. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus and esophageal carcinoma[J]. Clin Endosc, 2013, 46(1): 30-37.

[3] Li J H, Chen Z Q, Huang Z, *et al*. *In vitro* study of low intensity ultrasound combined with different doses of PDT: effects on C6 glioma cells [J]. Oncol Lett, 2013, 5(2): 702-706.

[4] Nowak-Stepniowska A, Wiktorska K, Malecki M, *et al*. Cytotoxicity of $PP(Arg)_2$- and $PP(Ala)_2(Arg)_2$-based photodynamic therapy and early stage of apoptosis induction in human breast cancers *in vitro*[J]. Acta Biochim Pol, 2012, 59(4): 603-611.

[5] Pellosi D S, Batistela V R, Souza V R, *et al*. Evaluation of the photodynamic activity of xanthene dyes on Artemia salina described by chemometric approaches[J]. An Acad Bras Cienc, 2013, 85(4): 1267-1274.

[6] Hu B, Zhang H, Meng X, *et al*. Aloe-emodin from rhubarb (Rheum rhabarbarum) inhibits lipopolysaccharide induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153(3): 846-853.

[7] Luo J, Yuan Y, Chang P, *et al*. Combination of aloe-emodin with radiation enhances radiation effects and improves differentiation in human cervical cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2): 731-736.

[8] Lee H Z, Yang W H, Hour M J, *et al*. Photodynamic activity of aloe-emodin induces desensitization of lung cancer cells to anoints[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 648(1/3): 50-58.

[9] Huang W, Yang X, Yao S, *et al*. Reactive oxygen species burst induced by aluminum stress triggers mitochondria-dependent programmed cell death in peanut root tip cells[J]. Plant Physiol Biochem, 2014, 82: 76-84.

[10] Wu C S, Chen G S, Lin P Y, *et al*. Tazarotene Induces Apoptosis in Human Basal Cell Carcinoma *via* Activation of Caspase-8/t-Bid and the Reactive Oxygen Species-Dependent Mitochondrial Pathway[J]. DNA Cell Biol, 2014, [Epub ahead of print].

[11] Wang H, Yang Y, Chen H, *et al*. The predominant pathway of apoptosis in THP-1 macrophage-derived foam cells induced by 5-aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy is the mitochondria-caspase pathway despite the participation of endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(6): 1789-1801.

[12] Yoo J O, Ha K S. New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 295: 139-174.

[13] Bah N, Maillet L, Ryan J, *et al*. Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1291.

[14] Xue L Y, Chiu S M, Oleinick N L. Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy [J]. Autophagy, 2010, 6(2): 248-255.

(**收稿**: 2014-04-21;**修回**: 2014-07-22)

(编辑 汪勤俭)