

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.003

· 专题报道 ·

木鳖子醇提物对黑素瘤 B16 细胞增殖的抑制及其可能机制

赵连梅¹, 韩丽娜¹, 商晓辉², 单保恩¹ (1. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011; 2. 河北工程大学 生物医学系, 河北 邯郸 023312)

[摘要] 目的: 观察木鳖子醇提物(ethanol extract from cochinchina momordica seed, CMSEE)对黑素瘤 B16 细胞增殖的影响, 初步探讨其作用机制。方法: MTT 法和克隆集落形成实验检测 CMSEE 对小鼠黑素瘤 B16 细胞生长的影响, 倒置相差显微镜和瑞氏-吉姆萨染色观察细胞形态学变化, 流式细胞技术(FCM)检测 B16 细胞周期分布和凋亡率的变化, 比色法检测 CMSEE 对 B16 细胞黑素生成和酪氨酸酶活性的影响, RT-PCR 法检测 CMSEE 对 B16 细胞中 *C-myc*、*P38* 和 *Tyr* 基因表达的影响。结果: CMSEE(10~100 mg/L)明显抑制 B16 细胞的增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$), 呈质量浓度和时间依赖性。10~40 mg/L CMSEE 处理后, B16 细胞呈现典型的细胞分化形态, 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, 黑素产生和酪氨酸酶活性增加($P < 0.01$), *C-myc* 基因表达下调, *P38* 和 *Tyr* 基因表达上调; 100 mg/L CMSEE 处理后的 B16 细胞呈现凋亡形态变化[凋亡率达 $(37.2 \pm 3.29)\%$], 黑素生成减少($P < 0.05$), 酪氨酸酶活性降低($P < 0.01$)。结论: CMSEE 体外对 B16 细胞增殖有明显的抑制作用, 其机制与其低剂量诱导分化和高剂量诱导凋亡有关。

[关键词] 木鳖子醇提物; 黑素瘤; B16 细胞; 增殖抑制; 分化; 凋亡

[中图分类号] R739.5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)01-0013-06

Inhibitory effect of cochinchina momordica seed ethanol extract on proliferation of melanoma B16 cells and its possible mechanism

ZHAO Lian-mei¹, HAN Li-na¹, SHANG Xiao-hui², SHAN Bao-en¹ (1. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Biotechnology, Biology Medical College of Hebei University of Engineering, Handan 056029, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of cochinchina momordica seed ethanol extract (CMSEE) on the proliferation of melanoma B16 cells and the underlying mechanism. **Methods:** MTT and clone formation assay were used to assess the effect of CMSEE on the growth of B16 cells. Morphological changes of B16 cells were observed under phase-contrast microscope and Giemsa staining. Cell cycle and apoptosis rate were examined by flow cytometry (FCM). The effect of CMSEE on melanin production and tyrosinase activity of B16 cells was assessed by colorimetry. The effect of CMSEE on the expression of *C-myc*, *P38*, and *Tyr* genes was examined by RT-PCR. **Results:** CMSEE (10-100 mg/L) inhibited the proliferation of B16 cell in a dose- and time-dependent manner. After treatment with 10-40 mg/L CMSEE, B16 cells showed typical differentiation morphology, and melanin production and tyrosinase activity were increased. B16 cells treated with 100 mg/L CMSEE showed apoptotic morphology, decreased melanin production and tyrosinase activity. B16 cell number in G_0/G_1 phase was significantly increased ($P < 0.01$); *C-myc* mRNA expression was down-regulated, and *P38*, *Tyr* mRNA expression was up-regulated in B16 cells after treatment with 10-40 mg/L CMSEE. **Conclusion:** CMSEE can markedly inhibit the proliferation of melanoma B16 cells, which is related to induction of differentiation and promotion of apoptosis of B16 cells.

[Key words] cochinchina momordica seed ethanol extract (CMSEE); melanoma; B16 cell; anti-proliferation; differentiation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 13-18]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30371753)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30371753)

[作者简介] 赵连梅(1981-), 女, 内蒙古敖汉旗人, 硕士, 主要从事中药抗肿瘤研究工作。E-mail: lianmeizhmail@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Bao-en, corresponding author), E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

黑素瘤是恶性程度很高的皮肤癌, 是黑素细胞去分化而产生的恶性肿瘤。目前化学治疗黑素瘤的效果较差, 其突出的特点为对多数化疗药耐药, 转移率和致死率高, 患者生存期仅为 6~10 个月^[1-2]。因此, 探求黑素瘤发生、发展、侵袭与转移的机制, 寻找敏感性强、作用靶点多的有效药物, 一直是肿瘤学者们关注的热点。近年来, 从植物药资源中寻找抗肿瘤活性成分受到了广泛的关注。中草药木鳖子始载于宋《开宝本草》, 是一味散血热、除痈毒之要药, 临床上主要用于治疗疮痈肿痛、多种关节炎及皮肤病, 疗效肯定。目前临床上发现木鳖子入药对多种癌症具有治疗作用^[3,4], 但是关于该药物的体内外抗黑素瘤的效果及机制, 迄今国内外尚未见报道。本课题组前期研究发现, 木鳖子醇提物(*cochinchina momordica seed ethanol extract*, CMSEE)对黑素瘤细胞具有生长抑制作用。本实验探讨木鳖子醇提物对恶性黑素瘤 B16 细胞的作用效果和机制, 为木鳖子醇提物抗黑素瘤的开发和利用提供有价值的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

中药木鳖子购自北京同仁堂药店, 经河北医科大学药学院生药学教研室鉴定为正品。PI 染料、MTT 试剂盒购自美国 Sigma 公司, 瑞-姬(Wright-Giemsa)染液购自 Baso 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, RPMI 1640 和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, 左旋多巴胺(Levodopa, L-Dopa)购自 Sigma 公司。RT-PCR 反转录和扩增试剂盒购自 Promega 公司。无水乙醇为国产分析纯。

1.2 木鳖子醇提物的制备和细胞培养

取一定量的木鳖子原药材, 粉碎后称取 10 g, 加入 10 倍体积的 95% 乙醇, 室温密闭浸泡 7 d, 纱布滤去渣滓, 加入 3% 活性炭, 80 °C 煮沸脱色 30 min, 2 500 × g 离心 20 min, 去除沉淀, 取上清液用旋转冷冻蒸发器减压蒸发成粉状物, 所得干粉视为木鳖子醇提物纯品。木鳖子醇提物纯品经无水乙醇溶解, 储存质量浓度为 2 000 mg/L, 保存于 -20 °C 冰箱, 使用时用无血清 RPMI 1640 培养基稀释, 并使乙醇终体积分数 < 0.1%。小鼠黑素瘤细胞株 B16 购自中科院上海细胞库, 以含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(含青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml)于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 以 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 MTT 法检测 CMSEE 对 B16 细胞生长的抑制率

取对数生长期 B16 细胞, 调密度至 1×10^5 /ml,

均匀接种于 96 孔培养板, 每孔 180 μl, 实验组各孔加入不同质量浓度的木鳖子醇提物各 20 μl, 使其终质量浓度分别为 100、40、20、10 mg/L; 阴性对照孔加入完全培养基, 同时设乙醇对照组(加入培养液和同等稀释质量浓度的乙醇), 每组均设 4 个复孔, 置于饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24、48、72 h 后, 各孔加入 MTT(5 mg/ml)20 μl, 继续培养 4 h, 弃去培养上清, 每孔加入 DMSO 150 μl, 混匀后以测定波长 492 nm、参考波长 620 nm 检测各孔光密度(D)值, 计算对细胞增殖的抑制率, 并根据软件计算出 24、48、72 h 的 IC₅₀。

细胞生长抑制率(inhibitory rate, IR; %) = (对照组 D 值 - 实验组 D 值) / (对照组 D 值 - 空白对照组 D 值) × 100%。

1.4 克隆形成实验观察 CMSEE 对 B16 细胞克隆形成的影响

取对数生长期 B16 细胞, 每孔接种 50 个细胞。呈现肉眼可见的克隆后弃去培养基, 倒置相差显微镜下照相并作克隆计数。

1.5 倒置相差显微镜观察 CMSEE 对 B16 细胞形态学的影响

调整 B16 细胞密度至 1×10^5 /ml, 加入 6 孔板中(孔内预先放置盖玻片), 每孔 2 ml, 待细胞在盖玻片上贴壁后, 加入 CMSEE 1 ml(终质量浓度分别为 100、40、20、10 mg/L), 培养 48 h, 倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化; 取出玻片, 生理盐水冲洗 3 次, 晾干, 滴加瑞-姬染料染色 1 min, 加入 3 倍体积的蒸馏水, 吹匀后静置 15 min, 冲洗干净, 显微镜下观察结果。

1.6 比色法检测 B16 细胞中黑素的生成^[5]

B16 细胞以每孔 2×10^5 细胞/2 ml 接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 加入 CMSEE 1 ml(终质量浓度分别为 100、40、20、10 mg/L), 以不加中药作为对照。将细胞在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 48 h, 倾去培养液, 用生理盐水洗 2 次, 0.25% 胰酶消化, 收集细胞, 1 200 × g 离心 5 min, 倾去上清液, 细胞团溶于 1 μmol/L NaOH(含 10% DMSO)300 μl, 转移至 96 孔培养板内, 在 37 °C 水浴保温 1 h, 于 405 nm 处测光密度值(D 值)。每个质量浓度设立 3 个复孔, 取其平均值。

1.7 比色法检测 B16 细胞酪氨酸酶的活性^[6-7]

96 孔板加入 B16 单细胞悬液, 使 8×10^3 个/孔, 待贴壁后加入含 CMSEE 的培养基, 使其终质量浓度为 100、40、20、10 mg/L, 培养 48 h 后弃去培养基, 用 pH 7.4 的 PBS 洗涤 2 次, 每孔加 1% TritonX-100 溶

液 50 μl , 迅速置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存 30 min, 随后室温融化使细胞完全破裂, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预温后加入 1% 左旋多巴溶液 (用 PBS 稀释, 使其 pH 值 <7) $10\text{ }\mu\text{l}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h 后测定 490 nm 处光密度 (D) 值, 以不加中药的细胞孔作为对照组。结果分析以 D_{490} 值表示酪氨酸酶的相对含量。实验样品 D 值/对照样品 D 值的比值 >1.0 为 CMSEE 处理组酪氨酸酶活性高于对照组, 比值 ≤ 1.0 为 CMSEE 处理组酪氨酸酶活性低于对照组。

1.8 流式细胞技术检测 B16 细胞的细胞周期和凋亡率

分别以 100、40、20、10 g/ml 的 CMSEE 作用于 B16 细胞 24 h, 收集细胞, 用预冷的 70% 乙醇固定 12 h; 离心弃固定液, PBS 重悬 5 min 后 300 目筛网

过滤; 加入 PI 染液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min, 流式细胞仪 (Beckman) 分析细胞周期及凋亡率。

1.9 RT-PCR 检测 B16 细胞中 *C-myc*、*P38* 和 *P53* mRNA 的表达

收集对照组和 10、20、40 mg/L CMSEE 处理 24 h 的 B16 细胞 5×10^6 个, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 反转录 (RT), 取 3 μl cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 引物由上海杰瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。扩增产物经 1.5% 凝胶电泳, 以 Gel-pro 凝胶分析软件对电泳谱带 mRNA 进行基因表达差异分析, 以目的基因灰度值/ β -actin 条带灰度值的比值表示 mRNA 水平。实验重复 3 次。

表 1 RT-PCR 检测所需要的引物序列
Tab. 1 Primer sequences of genes in RT-PCR assay

Gene	Primer sequence (sense)	Primer sequence (anti-sense)	Temperature of renaturation($t/^{\circ}\text{C}$)	Length (bp)
<i>P38</i>	5'-ATCGTGAAGTGCCAGAAG-3'	5'-TAGCCTGTCATCTCATCATC-3'	53.8	200
<i>Tyr</i>	5'-GCCTCCAGTTACCAACAC-3'	5'-CTCATAGTCCTCAGCATAGC-3'	53.7	250
<i>C-myc</i>	5'-AATTCAGGGATCTGGTCACG-3'	5'-CTGTGGAGAAGAGGCAAACC-3'	59.8	355
β -actin	5'-TGAGACCTTCAACACCCAG-3'	5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'	55.0	312

1.10 统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.5 统计软件, 进行单因素方差分析和 LSD, 以 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CMSEE 对 B16 细胞增殖的影响

增殖抑制实验结果显示, 10 ~ 100 mg/L 的 CMSEE 均能显著抑制 B16 细胞的生长, 且抑制率呈质量浓度和时间依赖性, 100 mg/L 的 CMSEE 对 B16 细胞的增殖抑制率显著高于其他药物组 ($P<0.01$, 表 2); CMSEE 作用 24、48、72 h 的半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 38.87、31.94、28.23 mg/L。

表 2 木鳖子醇提物对黑素瘤 B16 细胞增殖的抑制作用 (%)
Tab. 2 Inhibitory effect of CMSEE on proliferation of melanoma B16 cells (%)

CMSEE (ρ_{B} /mg $\cdot\text{L}^{-1}$)	24 h	48 h	72 h
Ctrl	1.24 $\pm$ 0.32	5.82 $\pm$ 0.03	6.24 $\pm$ 0.05 *
10	20.01 $\pm$ 3.32 *	20.24 $\pm$ 3.25 *	24.95 $\pm$ 1.27 *
20	28.97 $\pm$ 4.42 *	37.01 $\pm$ 4.01 *	40.62 $\pm$ 4.38 **
40	45.97 $\pm$ 5.83 **	49.78 $\pm$ 3.71 **	52.17 $\pm$ 6.17 **
100	77.54 $\pm$ 4.91 ** $\Delta\Delta$	82.97 $\pm$ 3.47 ** $\Delta\Delta$	84.06 $\pm$ 8.38 ** $\Delta\Delta$

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Ctrl; $\Delta\Delta$ $P<0.01$ vs other drug groups

2.2 CMSEE 对 B16 克隆形成的影响

各组细胞常规培养 3 d 后, RPMI1640 培养基对照组形成了肉眼可见的克隆, CMSEE 各质量浓度组均未出现明显的克隆。培养至第 6 天时 RPMI 1640 培养基

对照组出现满视野克隆集落, 10、20、40 mg/L CMSEE 处理组可见细胞克隆集落形成, 但细胞集落数及集落内细胞数量显著少于培养基对照 (图 1)。100 mg/L CMSEE 处理组细胞未见克隆集落形成, 仅见漂浮细胞。

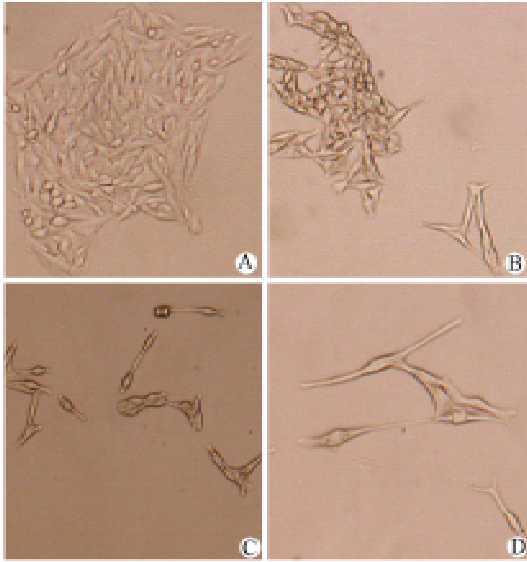


图 1 CMSEE 抑制 B16 细胞克隆形成(×200)

Fig. 1 CMSEE inhibited clone formation of B16 cells(×200)

A: Ctrl; B: 10 mg/L CMSEE;
C: 20 mg/L CMSEE; D: 40 mg/L CMSEE

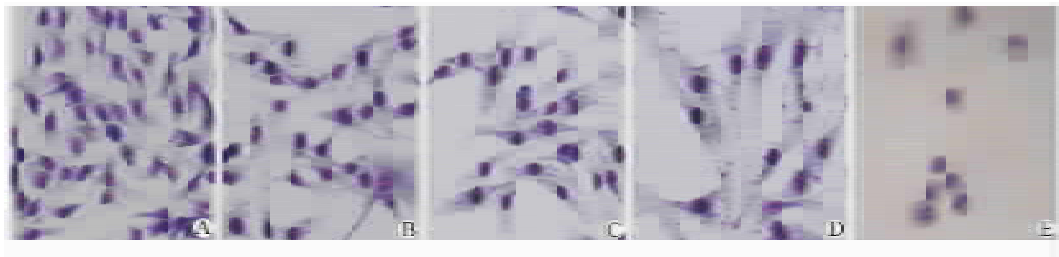


图 2 CMSEE 处理 B16 细胞 48 h 后的形态改变(×400)

Fig. 2 Morphological changes of B16 cells treated with CMSEE for 48 h(×400)

A: Ctrl; B: 10 mg/L CMSEE; C: 20 mg/L CMSEE; D: 40 mg/L CMSEE; E: 100 mg/L CMSEE

检测酪氨酸酶活性结果表明, 10、20、40 mg/L CMSEE 处理的 B16 细胞酪氨酸酶活性明显高于对照组, 且呈质量浓度依赖性; 而 100 mg/L CMSEE 可使 B16 黑素细胞酪氨酸酶活性降低。

2.5 CMSEE 对 B16 细胞周期和凋亡的影响

经 10~40 mg/L CMSEE 处理 48 h, B16 细胞凋亡率未发生明显变化; 而 100 mg/L CMSEE 处理后 B16 细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$, 表 4)。检测结果同时显示, 10~40 mg/L CMSEE 作用使 B16 细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期, 100 mg/L CMSEE 作用致细胞周期阻滞在 G_2/M 期(图 3, 表 4)。

2.6 CMSEE 对 B16 细胞 *C-myc*、*P38* 和 *Tyr* mRNA 表达的影响

RT-PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳的结果显示, 经 10~40 mg/L CMSEE 处理 48 h 后, B16 细胞 *C-myc* mRNA 表达水平降低, *P38* 和 *Tyr*

2.3 CMSEE 作用致 B16 细胞形态的改变

结果显示, 未经处理的 B16 细胞呈菱形或多边形, 形态饱满, 较大, 细胞核染色均匀, 核仁清晰可见; 10~40 mg/L CMSEE 处理过的 B16 细胞体积增大变成梭形, 排列成纤维状生长, 多数细胞出现树突状结构, 与空白对照组比较, 细胞变稀少, 不重叠, 为典型的细胞分化状态; 100 mg/L CMSEE 处理组细胞变圆, 胞质浓缩, 核着色不均匀, 核仁裂解, 呈现典型的凋亡细胞形态学改变(图 2)。

2.4 CMSEE 对 B16 细胞黑素生成和酪氨酸酶活性的影响

从表 3 中可以看出, 与未处理组相比, 10、20、40 mg/L 的 CMSEE 能使 B16 细胞黑素生成能力增强, 100 mg/L 的 CMSEE 使黑素生成能力下降, 差异有统计学意义。说明 10、20、40 mg/L 的 CMSEE 使 B16 黑素细胞向正常黑素细胞方向分化, 而 100 mg/L 的 CMSEE 则诱导 B16 细胞发生凋亡。酪氨酸酶是生物体合成黑素的关键酶, 通过调控其活性可以调控黑素的生成量。

mRNA 表达水平升高, 且均呈质量浓度依赖性(图 4, 表 5)。

表 3 CMSEE 对 B16 细胞产生黑素和酪氨酸酶活性的影响($n=4, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of CMSEE on melanin production and tyrosinase activity of B16 cells ($n=4, \bar{x} \pm s$)

CMSEE ($\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Melanin (D_{405})	Tyrosinase activity (Multiple)
Ctrl	0.037 ± 0.002	1.00
10	$0.057 \pm 0.007^*$	$1.39 \pm 0.32^*$
20	$0.173 \pm 0.005^{**}$	$2.00 \pm 0.44^*$
40	$0.249 \pm 0.002^{**}$	$2.80 \pm 0.52^{**}$
100	$0.020 \pm 0.004^*$	$0.57 \pm 0.34^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl

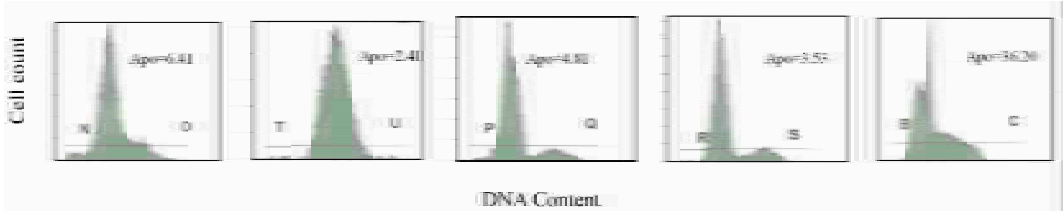


图3 FCM 检测 CMSEE 处理 24 h 对 B16 细胞凋亡率的影响

Fig. 3 Effect of CMSEE on apoptotic rate of B16 cells after 24 h as detected by FCM

A: Ctrl group; B: 10 mg/L CMSEE; C: 20 mg/L CMSEE; D: 40 mg/L CMSEE; E: 100 mg/L CMSEE

表 4 CMSEE 对 B16 细胞凋亡和周期分布的影响($n=4, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 4 Effects of CMSEE on apoptosis and cell cycle of B16 cells($n=4, \bar{x} \pm s, \%$)

CMSEE ($\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Cell cycle (%)			Apoptotic rate (%)
	G_0/G_1	S	G_2/M	
Ctrl	36.4 ± 7.9	56.3 ± 8.5	7.3 ± 2.3	6.17 ± 2.46
10	$50.4 \pm 8.0^*$	51.2 ± 8.6	2.1 ± 0.4	2.22 ± 0.37
20	$58.9 \pm 5.7^*$	$38.3 \pm 3.4^*$	8.1 ± 1.8	4.45 ± 0.94
40	$66.2 \pm 6.4^*$	$25.5 \pm 7.9^*$	11.0 ± 1.5	3.96 ± 0.73
100	23.6 ± 4.3	45.6 ± 5.7	$31.3 \pm 5.2^*$	$37.20 \pm 3.29^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs Ctrl

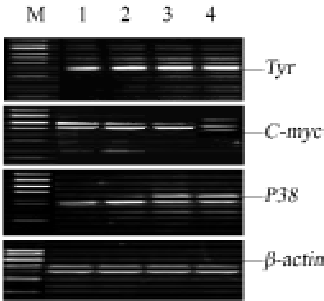


图 4 CMSEE 对 B16 细胞 *C-myc*、*P38* 和 *Tyr* mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of CMSEE on *C-myc*, *P38*, and *Tyr* mRNA expressions in B16 cells

1: Ctrl group; 2: 10 mg/L CMSEE; 3: 20 mg/L CMSEE; 4: 40 mg/L CMSEE

表 5 CMSEE 对 B16 细胞 *C-myc*、*P38* 和 *Tyr* mRNA 表达的影响

Tab. 5 Effects of CMSEE on mRNA expression of *C-myc*, *P38*, and *Tyr* in B16 cells

CMSEE ($\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>Tyr</i> mRNA	<i>C-myc</i> mRNA	<i>P38</i> mRNA
Ctrl	0.84 ± 0.03	1.02 ± 0.04	0.17 ± 0.02
10	0.72 ± 0.13	$0.89 \pm 0.12^*$	$0.67 \pm 0.07^*$
20	$0.51 \pm 0.03^*$	$0.57 \pm 0.03^*$	$0.85 \pm 0.04^*$
40	$0.27 \pm 0.05^*$	$0.24 \pm 0.01^*$	$0.98 \pm 0.11^{**}$

* $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs Ctrl

3 讨论

本研究发现,中药木鳖子醇提物能显著抑制恶性黑素瘤 B16 细胞的增殖和集落形成能力,且该作用呈时间和质量浓度依赖性。细胞形态观察结果显示,较高质量浓度的 CMSEE(100 mg/L)具有显著诱导黑素瘤 B16 细胞凋亡的作用,而较低质量浓度的 CMSEE(10 ~ 40 mg/L)则促进了恶性黑素瘤细胞向正常上皮细胞的分化。

小鼠黑素瘤 B16 细胞经较低质量浓度 CMSEE 作用后,细胞形态发生明显改变,细胞体积增大,细胞核大小均一,核浆比例减少,出现树突状和网状结构,呈梭形排列,此为典型正常黑素细胞的形态^[8]。为了进一步验证 CMSEE 对 B16 黑素细胞的分化诱导作用,本研究检测了标志黑素细胞发生分化的关键指标,即黑素的合成能力和酪氨酸酶活性。黑素瘤细胞与正常黑素细胞相比,黑素合成能力降低,当被诱导分化后,黑素合成能力增加^[9-10]。酪氨酸酶是黑素合成的限速酶,控制黑素的合成,具有多巴氧化酶和酪氨酸羟化酶的功能^[11]。本研究发现,B16 细胞经 CMSEE(10 ~ 40 mg/L)作用后,黑素合成能力和酪氨酸酶活性均明显增加,同时酪氨酸酶 *Tyr* 基因的 mRNA 表达水平升高,且呈质量浓度依赖性;说明 CMSEE 促进黑素合成与其提高酪氨酸酶的活性有关,且酪氨酸酶活性的增强可能与 CMSEE

介导的 *Tyr* 基因表达水平升高相关, 进一步证明了 CMSEE 对 B16 细胞的诱导分化作用。研究中还发现, 经 100 mg/L 的 CMSEE 作用后, B16 细胞显示典型的凋亡形态学变化, 黑素合成和酪氨酸酶活性明显降低, 说明较高剂量的 CMSEE 抑制 B16 细胞增殖是通过诱导其凋亡实现的。

众多研究表明, 应用诱导剂量提高癌细胞分化、抑制增殖循环周期中某一固定时相, 是目前降低肿瘤恶性程度, 减少其转移和复发的最为有效的治疗方法, 并且有人提出 G_1 期是细胞分化期, 也是药物作用的敏感期。本实验证实, 低剂量 CMSEE 作用于 B16 肿瘤细胞后, 细胞堆积于 G_1 期, 进入 S 期 DNA 合成细胞少, 相应进入 G_2 期的细胞数量减少, 证明了 CMSEE 对 B16 细胞诱导分化的作用。

p38 信号转导通路是 MAPK 通路最重要的分支之一, 是细胞信号从细胞表面到细胞核内的一条重要途径, 在肿瘤细胞的增殖、凋亡和分化中发挥重要的作用。研究证实, p38MAPK 通路激活和 P38 蛋白激酶活性的增强介导了黑素瘤 B16 2F2 细胞的分化^[12-13]。本实验结果也显示, 经 CMSEE (10 ~ 40 mg/L) 处理后, B16 细胞 P38 mRNA 表达升高, 提示 CMSEE 诱导黑素瘤 B16 细胞分化可能与其激活了 P38MAPK 通路有关, 但尚需更深入的实验来证实。C-myc 是 MAPK 家族下游的重要蛋白之一, 也是一种可使细胞无限增殖和获永生生化功能、促进细胞分裂的蛋白, 其表达产物在调节细胞生长、分化或恶性转化中发挥作用^[14-15]。Smith 等^[16]研究了 C-myc 的亮氨酸拉链区, 该区介导各种转录因子的二聚作用, 在亮氨酸重复部位的突变能显著降低 C-myc 抑制鼠红白血病 (MEL) 细胞分化能力; 同样地, 此区的插入突变能消除 C-Myc 的转化活性。正是这些 C-myc 结构成分的表达阻止了细胞进入细胞周期, 从而抑制许多细胞系的分化。本研究发现, CMSEE 能下调 C-myc 基因的表达, 说明 C-myc 基因表达的变化参与了 CMSEE 对 B16 细胞的分化作用。

本研究结果显示, 木鳖子醇提物能够诱导恶性黑素瘤 B16 细胞分化和凋亡, 可作为潜在的分化诱导剂用于治疗恶性黑素瘤, 但是木鳖子醇提物中诱导分化和凋亡作用的单体化合物及具体的诱导分化和凋亡的机制尚需深入的探究。

[参考文献]

- [1] Metelitsa AI, Dover DC, Smylie M, de Gara CJ, Lauzon GJ. A population-based study of cutaneous melanoma in Alberta, Canada (1993-2002) [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2010, 62(2): 227-

232.

- [2] Pruthi DK, Guilfoyle R, Nugent Z, Wiseman MC, Demers AA. Incidence and anatomic presentation of cutaneous malignant melanoma in central Canada during a 50-year period: 1956 to 2005 [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2009, 61(1): 44-50.
- [3] 林慧彬, 彭相君, 路俊仙, 林建群, 林建强. 木鳖子的本草考证 [J]. *四川中医*, 2009, 27(2): 54-56.
- [4] 阚连娣, 胡全, 巢志茂, 宋萧, 曹学礼. 木鳖子脂肪油不皂化物质的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(17): 1441-1444.
- [5] Verkruysse W, Svaasand LO, Franco W, Nelson JS. Remittance at a single wavelength of 390 nm to quantify epidermal melanin concentration [J]. *Biomed Opt*, 2009, 14(1): 014005.
- [6] Zhang L, Yoshida T, Kuroiwa Y. Stimulation of melanin synthesis of B16-F10 mouse melanoma cells by bufalin [J]. *Life Sci*, 1992, 51(1): 17-24.
- [7] Ogiwara K, Hata K. Melanoma cell differentiation induced by lupeol separates into two stages: morphological and functional changes [J]. *J Nat Med*, 2009, 63(2): 323-326.
- [8] Ma J, Shen JL, Zhang RZ. Effects of azelaic acid on melanin synthesis of human melanocyte and mouse B16 melanoma cells *in vitro* [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2006, 41(5): 503-505.
- [9] Kageyama A, Oka M, Okada T, Nakamura S, Ueyama T, Saito N. Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(26): 27774-27780.
- [10] Jia W, Aguilar G, Verkruysse W, Franco W, Nelson JS. Improvement of port wine stain laser therapy by skin preheating prior to cryogen spray cooling: a numerical simulation [J]. *Lasers Surg Med*, 2006, 38(2): 155-162.
- [11] Patel D, Bassi R, Hooper AT, Sun H, Huber J, Hicklin DJ. Enhanced suppression of melanoma tumor growth and metastasis by combined therapy with anti-VEGF receptor and anti-TYRP-1/gp75 monoclonal antibodies [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(5A): 2679-2686.
- [12] Hata K, Hori K, Takahashi S. Role of P38 MAPK in lupeol-induced B16 2F2 mouse melanoma cell differentiation [J]. *J Biochem*, 2003, 134(3): 441-445.
- [13] Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 nitrogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells [J]. *FEBS Lett*, 2000, 476(3): 198-202.
- [14] Singh AM, Dalton S. The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 141-149.
- [15] Creighton CJ. Multiple oncogenic pathway signatures show coordinate expression patterns in human prostate tumors [J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1816.
- [16] Smith G. C-myc-induced extrachromosomal elements carry active chromatin [J]. *Neoplasia*, 2003, 5(11): 134-142.

[收稿日期] 2009-11-25

[修回日期] 2009-12-30

[本文编辑] 韩丹