

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.007

· 基础研究 ·

木鳖子醇提物诱导小鼠黑素瘤 B16 细胞分化的作用机制

赵连梅¹, 韩丽娜², 耿艺曼¹, 杜彦艳², 刘丽华¹, 胡彩霞³, 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. 河北医科大学第四医院 检验科, 河北 石家庄 050011; 3. 河北医科大学第四医院 皮肤性病科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**探讨木鳖子醇提物(ethanol extract of cochinchina momordica seed, CMSEE)诱导黑素瘤 B16 细胞分化的作用机制。**方法:**CMSEE 处理 B16 细胞后,瑞氏染色法观察 B16 细胞的形态变化;比色法检测 B16 细胞的黑素含量。Western blotting 检测经 CMSEE 和 p38、ERK 通路抑制剂 SB203580、SD98059 分别处理后 B16 细胞中 p-p38、p-ERK 表达的变化。**结果:**CMSEE 可诱导 B16 细胞分化,使细胞的黑素量含量明显升高($P < 0.01$),10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ CMSEE 处理组 B16 细胞的黑素量 D 值分别为(0.057 ± 0.007)、(0.173 ± 0.005)和(0.249 ± 0.002),而对照组为(0.037 ± 0.002)。20 $\mu\text{g/ml}$ CMSEE 处理 B16 细胞后,p-p38 蛋白表达水平明显升高,处理 60 min 时的相对表达量最高,为对照组的 5.6 倍;而 p-ERK 表达水平明显降低($P < 0.01$),处理 60 min 时的相对表达量为对照组的 25% 倍。p38 通路抑制剂 SB203580 可阻断 CMSEE 对 B16 细胞的分化诱导作用,而 ERK 通路抑制剂 SD98059 可增强 CMSEE 对 B16 细胞的分化诱导作用。**结论:**p38 通路和 ERK 通路的活化参与了 CMSEE 对 B16 细胞的分化诱导作用。

[关键词] 木鳖子醇提物;黑素瘤;B16;分化;p38 通路;ERK 通路

[中图分类号] R739.5; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)04-0381-06

Mechanism of differentiation of mouse melanoma B16 cells induced by ethanol extract of cochinchina momordica seed

ZHAO Lian-mei¹, HAN Li-na¹, GENG Yi-man¹, DU Yan-yan², LIU Li-hua, HU Cai-xia³, SHAN Bao-en¹(1. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Clinical Laboratory, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 3. Dermatological Department, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of the differentiation of mouse melanoma B16 cells induced by ethanol extract of cochinchina momordica seed (CMSEE). **Methods:** After treated with CMSEE, morphological changes of B16 cells were observed by Giemsa staining, and melanin level was assessed by colorimetric method. Western blotting was used to measure the expression changes of phosphorylation p38 (p-p38) and ERK (p-ERK) in B16 cells after treatment with CMSEE and p38, ERK pathway inhibitors, SB203580 and SD98059. **Results:** CMSEE could induce the differentiation of B16 cells. The melanin level in B16 cells was significantly increased after CMSEE treatment ($P < 0.01$), with D value being (0.057 ± 0.007), (0.173 ± 0.005) and (0.249 ± 0.002) for 10, 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ CMSEE and (0.037 ± 0.002) for control group. 20 $\mu\text{g/ml}$ CMSEE elevated the level of p-p38 protein and blocked the expression of p-ERK ($P < 0.01$) in B16 cells, and the expression level of p-p38 protein was 5.6 fold and p-ERK was 0.25 fold that of the control group after treatment with CMSEE for 60 min. SB203580, the inhibitor of p38 pathway, blocked CMSEE-induced B16 cell differentiation, and PD98059, the inhibitor of ERK pathway, elevated CMSEE-induced B16 cell differentiation. **Conclusion:** p38 and ERK signal pathway activations are involved in the differentiation of B16 melanoma cells induced by

[基金项目] 河北省中医药管理局资助项目(No. 2011011)。Project supported by the Foundation of Administration of Traditional Chinese Medicine in Hebei Province (No. 2011011)

[作者简介] 赵连梅(1981-),女,内蒙古敖汉旗人,博士生,助理研究员,从事抗肿瘤中药筛选和机制研究。E-mail: Lianmeizhmail@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Bao-en, corresponding author), E-mail: shanbaoen@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120727.1048.002.html>

CMSEE.

[**Key words**] ethanol extract of cochinchina momordica seed(CMSEE); melanoma; B16; differentiation; p38 pathway; ERK pathway

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 381-386]

诱导分化是指恶性肿瘤细胞在体内外分化诱导剂作用下,向正常或接近正常细胞方向分化逆转的现象。其作为恶性肿瘤的一种新型治疗方法,为肿瘤治疗开辟了一条崭新的途径^[1-2],从天然药物中寻找肿瘤细胞的诱导分化剂是当前的研究热点之一^[3]。本课题组的前期研究^[4]发现,木鳖子醇提物(ethanol extract of cochinchina momordica seed, CMSEE)对多种组织来源的肿瘤细胞系均具有较强的增殖抑制作用,对黑色素瘤 B16 细胞的增殖抑制作用尤为显著。进一步研究^[5]发现,一定浓度范围的 CMSEE 能够诱导黑色素瘤 B16 细胞的分化,抑制其侵袭和转移,但具体的作用机制尚不清楚。本研究探讨了 CMSEE 诱导 B16 细胞分化的机制,为 CMSEE 作为分化诱导剂用于临床治疗黑色素瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

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教研室鉴定为正品。MTT 试剂盒购自美国 Sigma 公司;瑞氏(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; α -黑色素细胞刺激素(α -MSH)、MAPK 通路特异性抑制剂 SB203580、PD98059 购自 Sigma 公司;p44/42MAPK(ERK1/2)、pho-p44/42ERK1/2(Thr202/Tyr204)、pho-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司。p38、JNK 和 GAPDH 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。无水乙醇为国产分析纯。

1.2 CMSEE 的制备和细胞培养

CMSEE 的制备参见文献^[5]。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,提取上清液过滤,旋转冷冻蒸发器减压蒸发成粉状物,所得干粉视为 CMSEE。使用醇提物时经乙醇溶解,保存于 -20 °C 冰箱,使用时用无血清 RPMI 1640 培养基稀释,并使乙醇终浓度 <0.1%。

小鼠黑色素瘤 B16 细胞株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 μ g/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 细胞计数法检测 CMSEE 对肿瘤细胞增殖的影响

取对数生长期 B16 细胞,调整细胞密度为 1×10^5 /ml,均匀接种于 96 孔培养板,每孔 90 μ l,实验组各孔加入不同浓度的 CMSEE 和(或)SB203580、PD98059 各 10 μ l,对照孔加入完全培养基,每组均设 4 个复孔,置于饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,以 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,离心后将各培养孔的细胞悬浮于 1 ml 培养基,细胞计数板下计数每组细胞的数量。计算各培养组细胞平均数。

1.4 CMSEE 对 B16 细胞形态的影响

取对数生长期的 B16 细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,加入 6 孔培养板中(孔内预先放置灭菌盖玻片),每孔 2 ml,待细胞在盖玻片上贴壁良好后,加入不同浓度 CMSEE 1 ml(终浓度为 40、20、10 μ g/ml)或者 SB203580,继续培养 48 h,倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化;取出玻璃片,生理盐水冲洗 3 次,晾干,滴加瑞氏染料染色 1 min,加入 3 倍体积的蒸馏水,吹匀后静置 15 min,用清水冲洗干净,普通光学显微镜下观察结果。

1.5 B16 细胞黑色素含量的测定^[6]

对数生长期 B16 细胞制成单细胞悬液,以每孔 0.5×10^5 /ml 接种于 6 孔培养板,待细胞贴壁良好后,加入不同浓度 CMSEE 和 SB203580(终浓度为 10 μ g/ml),以不加中药 CMSEE 作为对照。将细胞在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 48 h,弃去培养液,用生理盐水洗 2 次,0.25% 胰酶消化,收集细胞,1 200 \times g 离心 5 min,倾去上清液,细胞团溶于 1 mol/L NaOH(含 10% DMSO)100 μ l,转移至 96 孔培养板内,在 37 °C 水浴保温 1 h 后于 475 nm 处测光密度值(D),每一浓度设立 3 个复孔,结果取平均值。

1.6 Western blotting 法检测 p-p38 和 p-ERK 蛋白表达的变化

取对数期 B16 细胞,加入不同浓度 CMSEE,或者预先加入 SB203580 或 PD98059 处理 15 min,然

后加入不同浓度 CMSEE, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养不同时间后, 用预冷的 PBS 洗 3 遍, 刮下细胞, 蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 加入一定量的 4 × 上样缓冲液, 沸水浴中煮沸 5 min。用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 分离的蛋白电转移至 PVDF 膜后, 用脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗 p-p38、p-ERK 4 °C 孵育过夜, PBST 洗膜 20 min × 3 次, 加入红外线标记的二抗 (IRD 800-LI-COR, Odyssey), 37 °C 反应 2 h, PBST 洗膜 20 min × 3 次, 用 Odyssey 双色红外荧光扫描系统进行检测。

1.7 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验。P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CMSEE 对 B16 细胞形态的影响

未经处理的 B16 细胞呈菱形或多边形, 形态饱满, 呈重叠生长; 10 ~ 40 μg/ml 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 (图 1)。10 ~ 40 μg/ml CMSEE 作用于 B16 细胞 48 h 后, 与对照组相比, 细胞数量明显减少, 并呈浓度依赖性 (P < 0.05 或 P < 0.01, 图 2)。由此证实, 10 ~ 40 μg/ml CMSEE 可能诱导了黑素瘤 B16 细胞的分化。

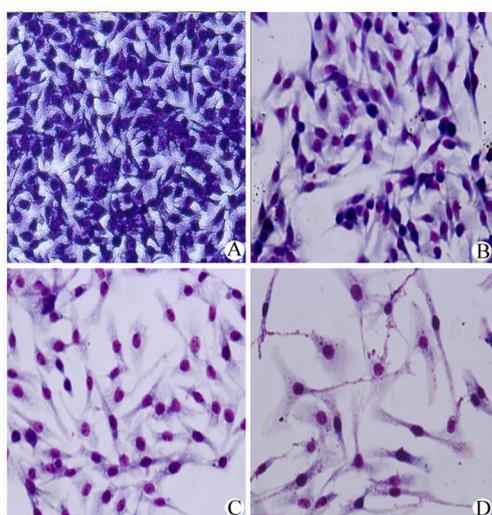


图 1 CMSEE 对 B16 细胞形态变化的影响 (×200)

Fig. 1 Morphological changes of B16 cells treated with CMSEE (×200)

A: Control; B: 10 μg/ml; C: 20 μg/ml; D: 40 μg/ml

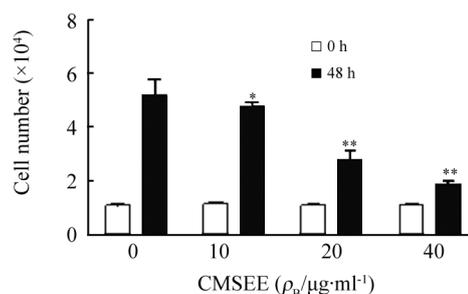


图 2 CMSEE 处理 B16 细胞 48 h 后的细胞数

Fig. 2 Number of B16 cells after treatment with CMSEE for 48 h

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs 0 μg/ml group

2.2 CMSEE 对 B16 细胞黑素产生的影响

对照组 B16 细胞黑素的 D₄₇₅ 值为 (0.037 ± 0.002), 10、20、40 μg/ml CMSEE 处理组 B16 细胞黑素的 D₄₇₅ 分别为 (0.057 ± 0.01)、(0.173 ± 0.005) 和 (0.249 ± 0.002), 明显高于对照组 (P < 0.01), 且 20、40 μg/ml CMSEE 处理组 B16 细胞黑素含量高于黑素生成刺激激素 α-MSH 对 B16 细胞黑素生成的刺激作用。由于正常黑素细胞产生黑素能力高于黑素瘤细胞^[7], 因此本实验结果证实了 CMSEE 能够诱导黑素瘤 B16 细胞的分化 (图 3)。

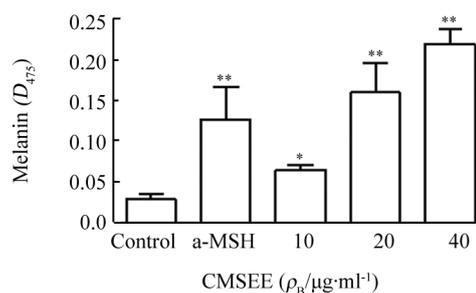


图 3 CMSEE 对 B16 细胞黑素产生的影响

Fig. 3 Effect of CMSEE on melanin production of B16 cells

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group

2.3 CMSEE 对 B16 细胞 MAPK 通路中 ERK 和 p38 蛋白活化的影响

有研究^[6-7]表明, MAPK 通路在 B16 细胞的分化过程中发挥重要的作用。本实验检测了 CMSEE 对 MAPK 通路的关键蛋白 p-ERK、p-p38 的表达, 结果 (图 4) 显示, CMSEE 处理细胞 0、30、60、120、240 min 后, p-p38 蛋白的相对表达量分别为 0.24 ± 0.02、0.38 ± 0.05、0.98 ± 0.06、0.67 ± 0.10、0.59 ±

0.05, 明显升高 ($P < 0.01$); p-ERK 蛋白的相对表达量分别为 1.14 ± 0.03 、 0.38 ± 0.05 、 0.98 ± 0.15 、 0.67 ± 0.08 、 0.59 ± 0.04 , 明显降低 ($P < 0.01$); 且均在 60 min 时表达差异最大, 而总的 p38 和 ERK1/2 蛋白表达水平没有发生明显的变化。

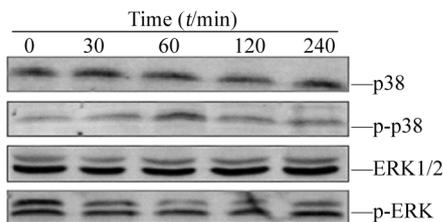


图4 CMSEE 对 B16 细胞 p38 和 ERK 活化的影响
Fig. 4 Effect of CMSEE on activation of p38 and ERK in B16 cells

2.4 MAPK 通路抑制剂与 CMSEE 联用对 B16 细胞生长和分化的影响

MAPK 通路抑制剂处理 B16 细胞, 结果显示, 对照组细胞相对数为 (1 ± 0.01), CMSEE ($20 \mu\text{g/ml}$) 处理组 B16 细胞相对数目为 (0.61 ± 0.03); SB203580 ($10 \mu\text{mol/L}$) 处理组细胞相对数为 (0.98 ± 0.12), SB203580 与 CMSEE 联合处理组 B16 细胞相对数为 (0.79 ± 0.10); PD98059 ($10 \mu\text{mol/L}$) 处理组细胞相对数为 (0.59 ± 0.09), PD98059 与 CMSEE 联合处理组细胞相对数为 (0.38 ± 0.05) (图 5)。可见, SB203580 单独作用对 B16 细胞的生长和分化没有影响, 但可部分阻断 CMSEE 对 B16 细胞的生长抑制和诱导分化作用。MEK 通路抑制剂 PD98059 可明显抑制 B16 细胞的生长, 增强 CMSEE 对 B16 细胞的分化诱导作用。

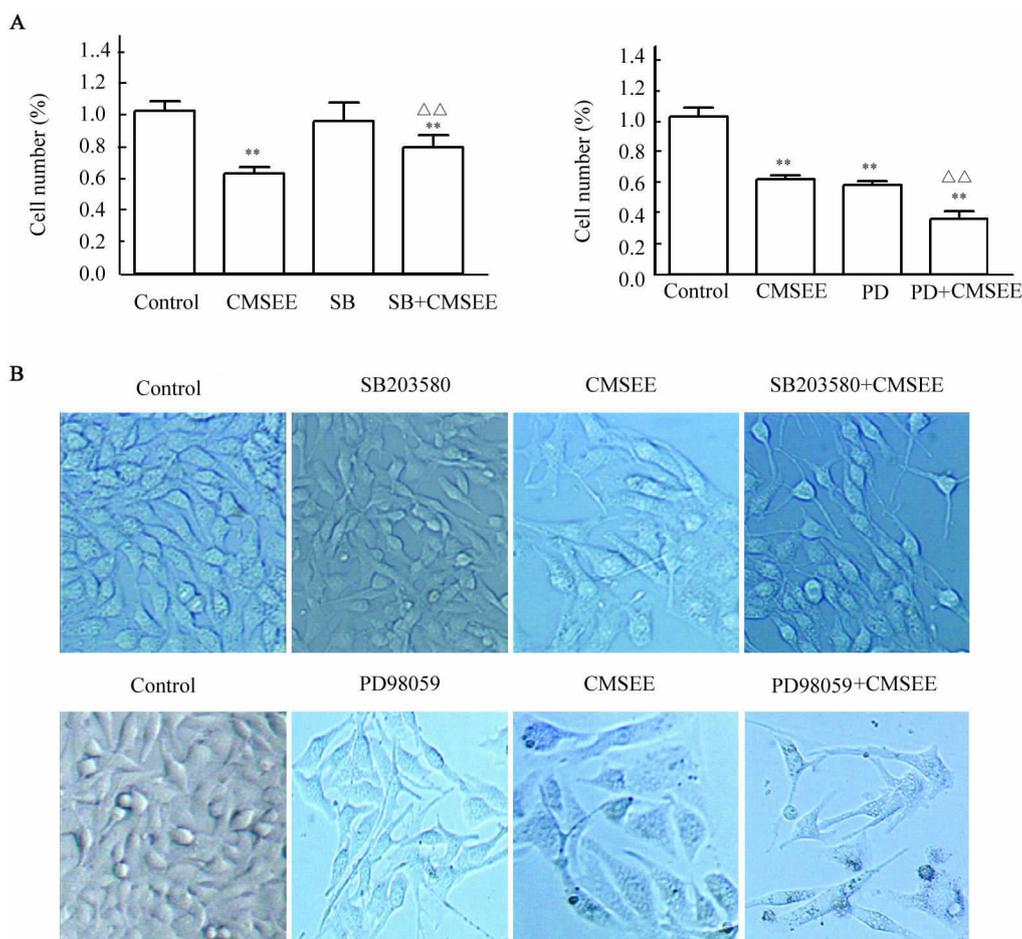


图5 CMSEE 与 SB203580 (SB) 和 PD98059 (PD) 联用对 B16 细胞增殖 (A) 和分化 (B, $\times 200$) 的影响

Fig. 5 Effect of CMSEE in combination with SB203580 (SB) or PD98059 (PD) on proliferation (A) and differentiation (B, $\times 200$) of B16 cells

** $P < 0.01$ vs control group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CMSEE group

2.4 MAPK 通路抑制剂与 CMSEE 联用对磷酸化 p38 和 ERK 表达的影响

p38 通路抑制剂 SB203580 和 ERK 通路抑制剂 PD98059 分别处理 B16 细胞 15 min 后加入 CMSEE, 继续处理细胞 48 h 后发现, SB203580 部分阻断了 CMSEE 对磷酸化 p38 蛋白表达的升高作用 ($P < 0.01$), 对照组 p-p38 蛋白相对表达量为 (0.56 ± 0.04), SB203580 处理组蛋白相对表达量为 (0.21 ± 0.02), CMSEE 处理组细胞 p-p38 蛋白相对表达量为 (0.93 ± 0.12), 而 CMSEE 和 SB203580 联合处理组的蛋白相对表达量为 (0.40 ± 0.08)。PD98059 增强了 CMSEE 对磷酸化 ERK 蛋白表达的抑制作用。对照组 p-ERK 蛋白相对表达量为 (0.46 ± 0.03), PD98059 处理组蛋白相对表达量为 (0.32 ± 0.04), CMSEE 处理组细胞 ERK 蛋白相对表达量为 (0.33 ± 0.09), 而 CMSEE 和 PD98059 联合处理组的蛋白相对表达量为 (0.26 ± 0.05) (图 6)。由此提示, p38 通路活性的升高和 ERK 通路活性的降低参与了 CMSEE 对 B16 细胞的分化诱导作用。

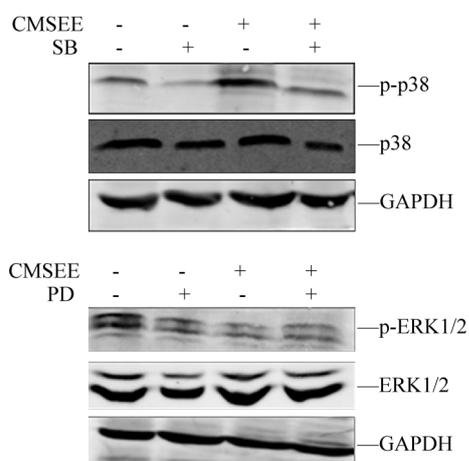


图 6 CMSEE 与 SB203580 (SB) 和 PD98059 (PD)

联用对 B16 细胞 p38、ERK 活化的影响

Fig. 6 Effect of CMSEE in combination with SB203580 (SB) or PD98059 (PD) on activation of p38 and ERK in B16 cells

3 讨论

丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路在真核细胞中高度保守, 它的持续激活促进人类各种肿瘤的形成, 因此已成为癌症治疗的候选靶点。Mas 等^[8] 研究报道, 多种黑素瘤细胞对 MEK 通路抑制剂 PD98059 或 U0126 的刺激敏感, 发生凋亡, 但正常黑素细胞却产生了凋亡

抵抗, 提示 MAPK 通路的活性在黑素瘤细胞和正常黑素细胞中有差异, 可作为药物治疗的靶点。近年也有大量研究^[9-11] 报道, MAPK 信号通路在黑素瘤 B16 细胞的分化过程中发挥着重要作用。Kataya 等^[12] 研究证明, 鸟嘌呤核苷 (guanosine) 通过 PKC-ERK1/2 通路诱导黑素瘤 B16F10 细胞分化, Keishi 等^[13] 研究报道, p38 作为 PKA 的下游效应通路调控了植物来源的化合物羽扇豆醇酯 (lupeol) 对 B16 黑素瘤 2F2 细胞的分化。Smalley 等^[41] 研究发现, 黑素生成刺激激素 (α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH) 诱导 B16 细胞分化时, 能使 p-p38 的表达呈时间依赖性升高, 而与 p38 通路抑制剂 SB203580 联合应用后能够阻断其对 B16 细胞的分化诱导作用, 但尚有通过其他机制诱导黑素瘤细胞分化的研究报道。Serini 等^[15] 的研究结果显示, DHA (n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid) 通过抑制黑素瘤细胞中 β -catenin 通路, 降低 COX-2 和 HuR 的表达, 进而抑制黑素瘤细胞的增殖和促进其分化。

随着人们对天然化合物的抗肿瘤作用的关注, 关于天然化合物诱导肿瘤细胞分化作用的研究报道开始增多。Tabolacci 等^[16] 研究表明, 从天然植物中提取的芦荟素 (aloin) 能够增强顺铂的抗肿瘤细胞活性, 以及转谷氨酰胺酶 (transglutaminase) 诱导的黑素瘤细胞的分化。本课题组的前期研究及本实验研究结果均证实, CMSEE 能够诱导黑素瘤 B16 细胞发生分化, 可作为肿瘤细胞分化诱导剂, 但具体机制尚不清楚。本实验研究结果发现, CMSEE 能够抑制黑素瘤细胞的增殖并增强黑素的生成。尽管近期有研究^[17] 表明, 黑素的生成可作为细胞外基质介导 E-cadherin 的活性, 从而促进黑素瘤的侵袭和生长, 但是黑素的生成在黑素瘤发生、发展过程中的作用尚未全面阐明。

CMSEE 处理 B16 细胞 30 min 时能明显提高 p-p38 蛋白的表达水平, 降低 p-ERK 蛋白表达水平, 且均在 60 min 时达到峰值。进一步实验结果发现, p38 特异性通路抑制剂 SB203580 抑制了 CMSEE 对 B16 细胞的分化诱导作用, 抑制 CMSEE 对磷酸化 p38 蛋白表达的升高作用; 而 ERK 通路抑制剂 PD98059 能够增强 CMSEE 对 B16F1 细胞的分化诱导作用, 增强 CMSEE 对磷酸化 ERK 蛋白表达的升高作用, 提示 p38 通路活性的增强和 ERK 通路活性的降低参与了 CMSEE 对 B16 细胞的分化诱导作用, 但其下游核内转录因子转录活性及上游蛋白活性的改变需要进行进一步的研究探讨。本实验研究结果提示, CMSEE 对黑素瘤 B16 细胞具有分化诱导

作用,且其机制可能与 CMSEE 调节 MAPK 通路中 ERK 和 p38 通路活性的平衡有关,有作为黑素瘤分化诱导剂的潜力。但是,CMSEE 仍然是一个粗提物,后继研究对粗提物的具体活性成分发现,CMSEE 中的醛类化合物可能参与了 CMSEE 对黑素瘤 B16 细胞的分化诱导作用(未发表的结果),但是具体作用效果和如何对 B16 细胞的生长分化发挥作用尚待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, et al. Differentiation therapy of human cancer: Basic science and clinical applications [J]. Pharmacol Ther, 2001, 90(2/3): 105-156.

[2] Wang N, Wang LW, Gou BD, et al. Realgar-induced differentiation is associated with MAPK pathways in HL-60 cells [J]. Cell Biology International, 2008, 32 (12): 1497-1505,

[3] 赵春红, 侯明. 天然药物诱导分化研究现状 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2006, 15(1): 69-71.

[4] 赵连梅, 韩丽娜, 单保恩, 等. 木鳖子提取物抗肿瘤活性研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22(1): 19-23.

[5] 赵连梅, 韩丽娜, 商晓辉, 等. CMSEE 对黑素瘤细胞增殖的抑制作用及其可能机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1): 13-18.

[6] Oikawa A, Nakayasu M. Quantitative measurement of melanin as tyrosine equivalents and as weight of purified melanin [J]. Yale J Biol Med, 1973, 46: 500- 507.

[7] Koo HM, Van Brocklin M, Mc Williams MJ. Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(5): 3052-3057.

[8] Sanchez Mas J, Martijez-Esparza M, Bastida CM, et al. Regulation of ornithine decarboxylase in B16 mouse melanoma cells: Synergistic activation of melanogenesis by (alpha) MSH and ornithine decarboxylase inhibition [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1542 (2): 57-65.

[9] Aouadi M, Binetruy B, Caron L, et al. Role of MAPKs in development and differentiation: Lessons from knockout mice [J]. Biochem, 2006, 88(9): 1091-1098.

[10] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65 (22): 3525-3544.

[11] Mantha M, Jumarie MM. Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation [J]. J Cell Physiol, 2010, 224(1): 250-261.

[12] Naliwaiko K, Luvizon AC, Donatti L, et al. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK1/2 Pathway [J]. Chem Biol Interact, 2008, 173(2): 122-128.

[13] Hata K, Ishikawa K, Hori K, et al. Differentiation-inducing activity of lupnae, a lupane-type triterpene from Chinese dandelion root (Hokouei-kon), on a mouse melanoma cell line [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(8): 962-967.

[14] Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the K-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells [J]. FEBS Letters, 2000, 476(3): 198-202.

[15] Serini S, Fasano E, Piccioni E, et al. DHA induces apoptosis and differentiation in human melanoma cells *in vitro*: Involvement of HuR-mediated COX-2 mRNA stabilization and beta-catenin nuclear translocation [J]. Carcinogenesis, 2012, 33 (1): 164-173.

[16] Tabolacci C, Rossi S, Lentini A, et al. Aloin enhances cisplatin antineoplastic activity in B16-F10 melanoma cells by transglutaminase-induced differentiation [J]. Amino Acids, 2011. [Epub ahead of print]

[17] Kuphal S, Bosserhoff AK. E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 524(1): 43-47.

[收稿日期] 2012 - 03 - 11 [修回日期] 2012 - 05 - 22
 [本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X,也不用 Mean 或 M;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)