

木鳖子单体化合物对羟基桂皮醛诱导小鼠黑素瘤 B16 细胞的分化及其机制

赵连梅¹, 耿艺曼¹, 孙士萍¹, 任凤芝², 韩丽娜¹, 单保恩¹ (1. 河北医科大学第四医院 肿瘤研究所 & 科研中心, 河北石家庄 050011; 2. 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 河北石家庄 050018)

[摘要] **目的:**探讨从中药木鳖子中提取的单体化合物对羟基桂皮醛(p-hydroxycinnamaldehyde, PHD)对小鼠黑素瘤 B16 细胞分化的影响及其可能的作用机制。**方法:**以 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 作用 B16 细胞, 设空白对照及福司克林(Forskolin)阳性对照组。磺酰罗丹明(suphrhodamineB, SRB)法检测 PHD 对 B16 细胞生长的抑制率, 平板克隆集落形成实验检测细胞的克隆形成能力, Giemsa 染色观察细胞形态, 比色法检测细胞中黑色素含量和酪氨酸酶(tyrosinase, Tyr)活性, 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力, Western blotting 检测 Tyr、酪氨酸酶相关蛋白 1(tyrosinase protein, Trp1)及 MAPK 信号转导通路中 p-P38、p-JNK 和 p-ERK1/2 的表达。**结果:**PHD 对黑素瘤 B16 细胞具有明显的增殖抑制作用, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 作用 B16 细胞 48 h 后, 其增殖抑制率与对照组相比明显增加[(12.78 \pm 0.87)%、(37.70 \pm 2.28)%、(42.17 \pm 4.18)% vs 0, $P < 0.05$], 20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 组增殖抑制率与 Forskolin 组相比明显增加[(37.70 \pm 2.28)%、(42.17 \pm 4.18)% vs (22.00 \pm 1.13)% , $P < 0.05$]。40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞 24、48、72 h 后, B16 细胞呈典型分化形态, 黑色素含量及 Tyr 活性与对照组相比均明显增加[(0.097 \pm 0.02)、(0.13 \pm 0.04)、(0.15 \pm 0.05) vs (0.085 \pm 0.003)]; (1.11 \pm 0.31)、(1.43 \pm 0.05)、(1.67 \pm 0.49) vs (0.64 \pm 0.10), $P < 0.05$]; 细胞集落形成能力和迁移能力都明显降低(均 $P < 0.05$)。与空白对照组相比, PHD 处理组细胞 Tyr 和 Trp1 的表达明显增加($P < 0.05$), MAPK 信号通路中 p-P38 和 p-JNK 的表达水平也明显增加($P < 0.05$), 而 p-ERK 活性差异则无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**PHD 通过上调 MAPK 信号通路中 p-P38 和 p-JNK 的活性而对小鼠黑素瘤 B16 细胞产生明显的增殖抑制, 并在形态和功能上诱导黑素瘤细胞的分化。

[关键词] 对羟基桂皮醛; 木鳖子; 黑素瘤; B16 细胞; 分化; MAPK 通路

[中图分类号] R739.5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)03-0282-06

Effect and mechanisms of p-hydroxycinnamaldehyde from cochinchina momordica seed on differentiation of mouse melanoma B16 cells *in vitro*

Zhao Lianmei¹, Geng Yiman¹, Sun Shiping¹, Ren Fengzhi², Han Lina, Shan Baoen¹ (1. Cancer Research Institute & Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. New Drug Research and Development Co. Ltd of China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and underlying mechanisms of p-hydroxycinnamaldehyde (PHD) isolated from the cochinchina momordica seed on the differentiation, proliferation and metastasis of mouse melanoma B16 cells *in vitro*. **Methods:** B16 cells were treated with PHD. At the designated time points after treatment, proliferation inhibition was assessed by the Suphrhodamine B assay, colony formation by plate colony assay, morphological changes by Giemsa staining, melanin content and tyrosinase activity by colorimetric analysis, metastasis by wound healing assays, and protein levels of Tyr, Trp1, t-proteins, p-p38, p-JNK and p-ERK1/2 by Western blotting. **Results:** PHD inhibited B16 cell proliferation in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The inhibition rate at 20 $\mu\text{mol/L}$ (37.70 \pm 2.28%), 40 $\mu\text{mol/L}$ (42.17 \pm 4.18%) was even higher as compared with forskelin treatment (22.00 \pm 1.13%, $P < 0.05$). B16 cells treated

[基金项目] 河北省卫生厅医学科学研究重点课题项目基金资助(No. 20120120)。Project supported by the Medical Science Research Project of Hebei Province (No. 20120120)

[作者简介] 赵连梅(1981-),女,内蒙古敖汉旗人,博士生,助理研究员,主要从事抗肿瘤中药的筛选及机制的研究工作。E-mail: lianmeizh@mail@163.com

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

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.008.html>

with PHD at 40 $\mu\text{mol/L}$ for 24, 48, 72 h showed a dendrite-like morphology, indicative of differentiation. PHD (10 to 40 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased melanin amount at 24 h (0.097 ± 0.02), 48 h (0.13 ± 0.04), and 48 h (0.15 ± 0.05) as compared with non-treatment control (0.085 ± 0.003 , $P < 0.05$) and tyrosinase activity at 12 h (1.11 ± 0.31), 24 h (1.43 ± 0.05), and 48 h (1.67 ± 0.49) as compared with control (0.64 ± 0.10 , $P < 0.05$). PHD treatment effectively attenuated metastasis ($P < 0.05$) and remarkably reduced colony-forming capacity ($P < 0.05$) in B16 cells. Moreover, PHD significantly increased the protein content of Tyr, Trp1 and enhanced phosphorylation of P38 and but not ERK. **Conclusion:** P-hydroxycinnamaldehyde may inhibit melanoma growth and metastasis, possibly through activating P38 and JNK signaling pathways.

[**Key words**] p-hydroxycinnamaldehyde (PHD); cochinchina momordica seed; melanoma; B16 cell; differentiation; MAPKS pathway

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 282-287]

恶性黑素瘤是常见的皮肤恶性肿瘤,恶性程度高且广泛耐药,转移早,进展快,病死率高^[1]。目前临床上某些抗黑素瘤疗法疗效差、毒性作用大,因此,急需寻找新的治疗方法。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,作为恶性肿瘤的一种新型治疗方法,为抗肿瘤研究开辟了一条崭新的途径^[2-3]。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。木鳖子为葫芦科植物的干燥成熟种子,最早见于北宋《开宝本草》(公元973年),具有消肿散结、祛毒、治痈肿、疔疮和无名肿毒等功效,历代本草、方书多有记载。本课题组前期研究^[4-6]发现,木鳖子醇提物具有抑制黑素瘤 B16 细胞增殖和诱导其分化的作用。本研究旨在探讨木鳖子中提取的单体化合物对羟基桂皮醛(p-hydroxycinnamaldehyde, PHD)对 B16 细胞的分化、增殖及迁移的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

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学教研室鉴定为正品。PHD 由河北省石家庄市华北制药集团新药研究开发有限责任公司提取并鉴定。磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)试剂盒购自美国 Sigma 公司,瑞-吉(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、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司, p44/42MAPK (ERK1/2)、p-p44/42 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)、p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)和 p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)抗体均购自美国 CST 公司, p38、JNK、tyr、Trp1 和 GAPDH 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养

小鼠黑素瘤 B16 细胞株购自中科院上海细胞库,以含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液(含青霉素 100 U/ml,链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 SRB 法检测 PHD 对 B16 细胞增殖的影响

取对数生长期 B16 细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$,加入 96 孔培养板中,每孔 90 μl ,待细胞贴壁良好后,加入不同浓度 PHD 10 μl (终浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$),以不加药组为对照组,继续培养 48 h,弃上清,固定 1 h,蒸馏水冲洗 4~5 次,4 mg/ml SRB 染液 100 μl 染色 15 min,弃染液,1% 乙酸轻洗 4~5 次,于 490 nm 处测光密度值(D 值)。

1.4 显微镜观察 PHD 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 $1 \times 10^5/\text{ml}$,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 40 $\mu\text{mol/L}$ PHD,继续培养 48 h,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 克隆形成实验检测 PHD 对 B16 细胞克隆形成能力的影响

取对数生长期 B16 细胞,实验组加入 PHD 至终浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$,对照组加入同体积培养基,常规培养 48 h,胰酶消化,收集、重悬细胞,每组加入细胞 2 000 个,混匀,放置培养箱继续培养至 12~14 d,瑞-姬染色法染色,肉眼观察可见细胞集落。

1.6 划痕试验检测 PHD 对 B16 细胞迁移能力的影响

对照组加入完全培养基,实验组加入终浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 PHD,常规培养 48 h,胰酶消化,收集细胞,每组细胞调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,加入 6

孔培养板中,每孔 2 ml,待培养 24 h 后划痕,弃培养液,PBS 冲洗 2 次,加入无血清培养基 2 ml,常规培养,每隔 6、12 和 24 h 观察照相。细胞迁移能力依据细胞对划痕的愈合能力而定。

1.7 B16 细胞黑色素的测定

对数生长期 B16 细胞制成单细胞悬液,以每孔 1×10^5 细胞/ml 接种 1.8 ml 于 6 孔培养板,待贴壁良好后,加入不同浓度 PHD(终浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)或者阳性对照药福司克林,以不加药组作为培养基对照组。将细胞培养 48 h,消化、收集细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,设 3 个平行管,每平行管 1 ml, $1\ 000 \times g$ 离心 5 min,倾去上清液,细胞团溶于 1 mol/L NaOH(含 10% DMSO)200 μl ,80 $^\circ\text{C}$ 水浴保温 2 h 后转移至 96 孔培养板内,475 nm 处检测光 D 值,取 3 个平行样的均数作为结果^[6]。

1.8 B16 细胞酪氨酸酶(Tyrosinase,Tyr)活性的测定

生长期 B16 细胞制成单细胞悬液,待细胞贴壁良好后,加入不同浓度 PHD(终浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)或者阳性对照药福司克林,以不加药组作为培养基对照组,常规培养 48 h,消化、收集细胞,调整细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{ml}$,设 3 个平行管,每管 1 ml, $1\ 000 \times g$ 离心 5 min,弃上清,细胞溶于 0.5% 脱氧胆酸钠 100 μl ,并充分振荡使细胞溶解,0 $^\circ\text{C}$ 放置 15 min,取出测试管,37 $^\circ\text{C}$ 水浴保温 10 min 后加入 1% 左旋多巴(L-levodopa, L-DOPA)孵育 2 h,再转移至 96 孔培养板内,于 475 nm 处测 D 值^[6]。

1.9 Western blotting 检测 PHD 对 Tyr、Trp1 和信号通路蛋白表达的影响

取对数生长期 B16 细胞,加入终浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 PHD,对照组加入等量培养液,置于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养不同时间后,分别提取各组细胞总蛋白,并测定各组蛋白浓度。蛋白样品各取 40 μg ,经 SDS-PAGE 分离,转膜,封闭 2 h 后加入相应抗体,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入二抗(1:20 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,用凝胶图像分析软件分析灰度值。以目的蛋白条带与 GAPDH 条带灰度值比值表示各目的蛋白表达水平。

1.10 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHD 是 5 种木鳖子单体化合物中对 B16 细胞增殖抑制最强的一种

利用高相液相色谱并利用核磁共振技术提取并鉴定了从木鳖子醇提取物中分离的含量较高的五种单体化合物:p-hydroxycinnamaldehyde(PHD), coniferylaldehyde (CFD), p-hydroxybenzaldehyde(PHA), 3-o-Methoxyaniline- p-hydroxybenzaldehyde (MPH) and ligballinol (LBL)。它们对小鼠黑素瘤 B16 细胞均具有一定的抑制作用,但是第一种化合物 PHD 对 B16 细胞的抑制作用最强(图 1)。

10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 作用于 B16 细胞 48 h 后,与对照组相比,细胞增殖抑制率均明显升高 [(12.78 \pm 0.87)%、(37.70 \pm 2.28)%、(42.17 \pm 4.18)% vs 0, $P < 0.05$],其中 20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 对细胞的增殖抑制率明显高于 Forskolin 阳性对照组 [(37.70 \pm 2.28)%、(42.17 \pm 4.18)% vs (22.00 \pm 1.13)% , $P < 0.05$] (图 2)。

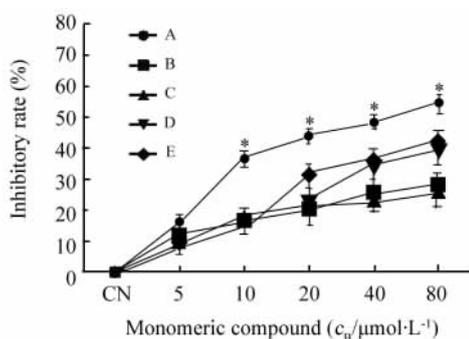


图 1 木鳖子的五种单体化合物对 B16 细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibiting effect of five kinds of monomeric compounds isolated from the cochinchina momordica seed on the proliferation of B16 cells
A: PHD; B: CFD; C: PHA; D: MPH; E: LBL

* $P < 0.05$ vs B, C, D, E

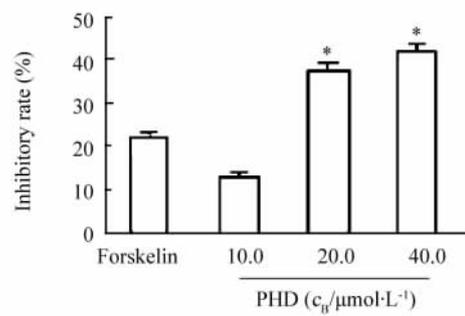


图 2 PHD 对 B16 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of PHD on proliferation of B16 cells

* $P < 0.05$ vs Forskolin

2.2 PHD 对 B16 细胞形态的影响

40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞 24、48 和 72 h

后,细胞体积增大为梭形,排列有序,成纤维状生长,多数细胞出现树突状结构,为典型的细胞分化形态(图3),证明 PHD 可能诱导了黑素瘤 B16 细胞的分化,与前期木鳖子粗提物的研究结果一致。

2.3 不同浓度 PHD 对 B16 细胞黑色素的产生以及 Tyr 活性的影响

20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞 48 h 后,与对照组相比,黑色素明显增加[(0.13 \pm 0.04)、(0.15 \pm 0.05) vs (0.085 \pm 0.003), $P < 0.05$]。10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理组 B16 细胞 Tyr 活性,与对照组相比,差异均有统计学意义[(1.11 \pm 0.31)、(1.43 \pm 0.05)、(1.67 \pm 0.49) vs (0.64 \pm 0.10), 均 $P < 0.05$]。结果证实,PHD 作用可以使 B16 细胞生成黑色素明显增加,也使合成黑色素的关键酶 Tyr 活性明显加强,说明 PHD 诱导黑素瘤细胞向黑色素细胞方向分化(图4)。

2.4 PHD 降低 B16 细胞增殖能力和克隆集落形成能力

40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理 B16 细胞后,细胞的克隆形成数量与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),但其克隆集落的大小明显低于对照组(图5),提示 PHD 能够诱导 B16 细胞的分化。

2.5 PHD 抑制 B16 细胞的迁移能力

划痕实验进一步检测结果(图6)显示,40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 作用于 B16 细胞 12、24 h 后,其迁移能力发生改变,在划痕后 12 h,PHD 组划痕宽度与对照组相比明显增加[(1.78 \pm 0.13) vs (1.16 \pm 0.26) mm, $P < 0.05$];在划痕后 24 h,PHD 组划痕宽度也明显增加[(1.48 \pm 0.24) vs (0.87 \pm 0.12) mm, $P < 0.05$],结果提示,PHD 对 B16 细胞的迁移能力具有抑制作用。

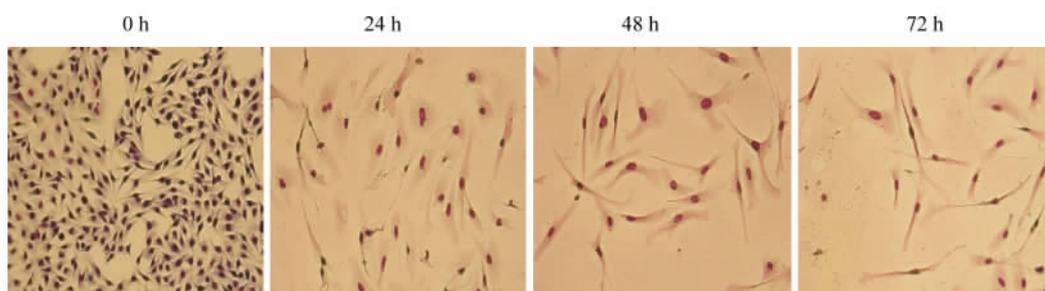


图3 40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 处理后不同时间点 B16 细胞形态的改变($\times 200$)

Fig. 3 Morphological changes of B16 cells treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ PHD at different time points($\times 200$)

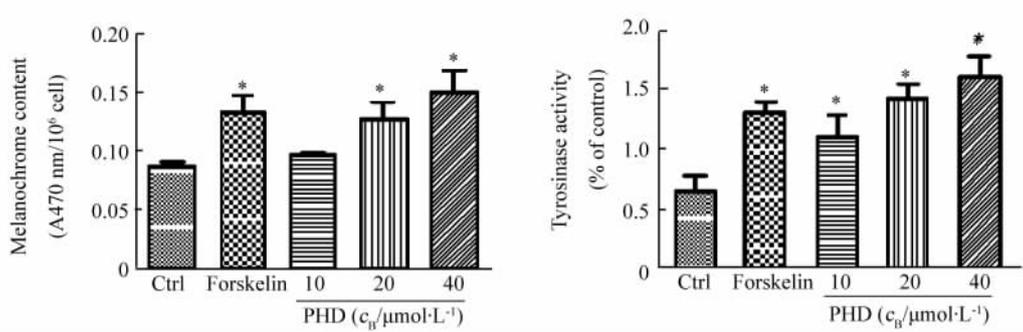


图4 PHD 对 B16 细胞黑色素生成和 Tyr 活性的影响

Fig. 4 Effects of PHD on melanin production and activity of tyrosinase in B16 cells

* $P < 0.05$ vs Ctrl group

2.6 PHD 对 B16 细胞中 Tyr、Trp1 蛋白水平的影响

40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 作用 B16 细胞 24、48、72 h 后, Tyr 蛋白含量均明显升高[(0.51 \pm 0.32)、(0.65 \pm 0.41)、(0.93 \pm 0.21) vs (0.32 \pm 0.05), $P < 0.05$]。

Tyr 相关蛋白 Trp1 的含量也明显升高[(2.54 \pm 0.22)、(2.80 \pm 0.29)、(0.43 \pm 0.51) vs (0.21 \pm 0.05), $P < 0.05$],表明 PHD 通过提高 Tyr 和 Trp1 蛋白的水平促进了黑色素的产生(图7)。

2.7 PHD 对 B16 细胞 p-P38、p-JNK 和 p-ERK1/2 蛋白水平的影响

经 PHD(40 μmol/L)处理 30、60、120 min 后, B16 细胞中 p-P38 蛋白水平与对照组相比明显升高 [(0.59 ± 0.07)、(0.68 ± 0.11)、(0.94 ± 0.13)] vs (0.43 ± 0.03), $P < 0.05$); 经 PHD(40 μmol/L)处理 60、120 min 后, B16 细胞中 p-JNK 蛋白水平与对照组相比也明显升高 [(0.93 ± 0.03)、(1.08 ± 0.13)] vs (0.66 ± 0.07), $P < 0.05$], 而 p-ERK、t-ERK、t-JNK 和 t-p38 蛋白水平则无明显改变 (图 8), 表明 MAPKs 信号通路中的 p38 通路和 JNK 通路可能参与了 PHD 诱导的 B16 细胞分化过程。

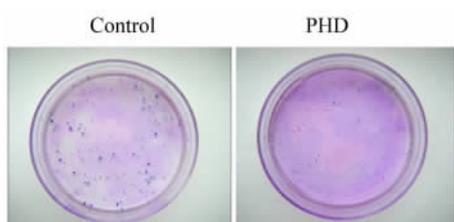


图 5 PHD 对 B16 细胞克隆形成能力的影响

Fig. 5 Effect of PHD on colony formation ability of B16 cells

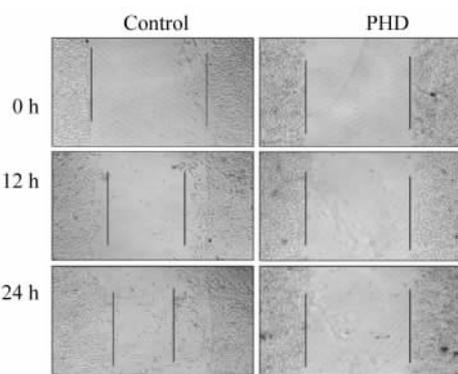


图 6 40 μmol/L PHD 对 B16 细胞划痕愈合的影响 (×200)

Fig. 6 Effect of 40 μmol/L PHD on ability of wound healing in B16 cells (×200)

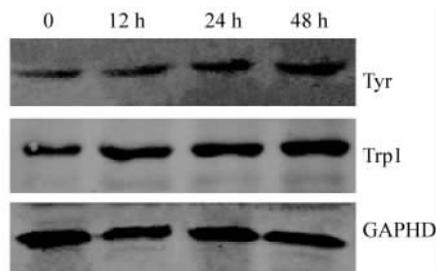


图 7 PHD 对 B16 细胞中 Tyr 和 Trp1 蛋白水平的影响

Fig. 7 Effects of PHD on level of Tyr and Trp1 proteins in B16 cells

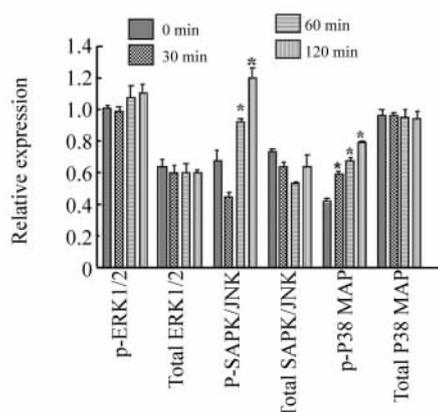
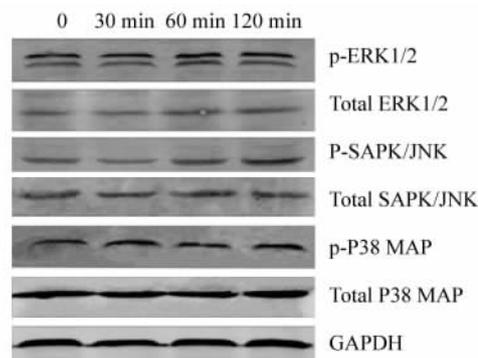


图 8 PHD 对 MAPKs 信号通路蛋白水平的影响

Fig. 8 Effects of PHD on some proteins level in MAPKs signal pathway

* $P < 0.05$ vs 0 min treatment group

3 讨论

近年来, 中药等天然药物抗肿瘤新药开发的品种迅速增多, 发挥的治疗作用也涉及到各个方面。目前研究^[8-10]显示, 熊果酸、莲房花青素、八棱丝瓜蛋白、羽扇豆烷、染料木黄酮等天然药物能够诱导小鼠黑素瘤 B16 细胞的分化, 本课题组前期研究结果^[5]显示, 木鳖子醇提物能够显著抑制 B16 细胞的生长并能够诱导其分化。木鳖子醇提物经高效液相色谱结合核磁共振技术分离得到 5 种单体化合物, 其中的 PHD 对 B16 细胞的作用最强。本研究结果进一步显示, PHD 能明显抑制黑素瘤 B16 细胞的增殖, 并可诱导 B16 细胞出现分化形态, 说明 PHD 可作为潜在的抗肿瘤药物应用于临床, 为治疗恶性黑素瘤开辟新的治疗途径。不同浓度 PHD 分别作用 B16 细胞 24、48、72 h 后, 其增殖明显受到抑制, 且随着药物浓度的增加和作用时间的延长, 细胞分化程度不断增大, 提示 PHD 可能是通过诱导细胞分化而发挥抗肿瘤作用。黑色素含量增加是黑素瘤细胞

功能分化的标志之一^[11],而在黑色素细胞中, Try 控制黑色素的合成,是黑色素合成通路中的关键酶。本研究检测了 Try、Trp1 的表达,结果显示,40 $\mu\text{mol/L}$ PHD 作用于细胞 48 h 后,细胞的黑色素含量以及 Tyr 活性增高,且黑色素合成相关蛋白 Tyr、Trp1 的水平明显升高,因此进一步证实了 PHD 能够诱导黑素瘤细胞向正常黑素方向分化。此外,细胞生长曲线、细胞集落克隆形成试验分别证实了 PHD 对 B16 细胞的增殖和克隆形成能力的显著抑制作用,提示 PHD 不仅在形态和功能上诱导小鼠黑素瘤 B16 细胞的分化,而且能够明显降低已经分化细胞的恶性程度,诱导 B16 细胞分化为正常或接近正常细胞。

MAPKs 为丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶的一个家族,调节细胞的凋亡、增殖及迁移等,在黑色素细胞生物活性中具有重要作用^[14]。MAPKs 超家族中 3 个特征性亚家族为 Erks、JNK 和 p38 MAPKs,最近已有报道^[11,15-16]显示,p38-MAPKs 通路活化与黑色素合成增加有关,p38-MAPKs 的级联反应也参与了由 MSH、UV、Lupeol 诱导的 B16 的黑色素合成。本实验检测了不同浓度 PHD 作用 30、60、120 min 后,B16 细胞 p-P38、p-JNK 以及 p-ERK 的表达情况,Western blotting 结果显示,药物作用后 p-P38 和 p-JNK 的表达水平缓慢升高,而 p-ERK 的蛋白表达水平则无明显变化,说明 PHD 可能通过增强 p-P38 和 p-JNK 的磷酸化水平而激活黑色素合成相关基因,促进小鼠黑素瘤 B16 细胞的分化。

综上,PHD 诱导小鼠黑素瘤 B16 细胞分化的作用,并对其机制进行初步的探讨,为其临床治疗恶性黑素瘤提供理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] Prignano F, Coronello M, Pimpinelli N, et al. Immunophenotypical markers, ultrastructure and chemosensitivity profile of metastatic melanoma cells [J]. *Cancer lett*, 2002, 186(2): 183-192.
- [2] Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, et al. Differentiation therapy of human cancer: Basic science and clinical applications [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2001, 90(3): 105-156.
- [3] Wang N, Wang LW, Gou BD, et al. Realgar-induced differentiation is associated with MAPK pathways in HL-60 cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 32(12): 1497-1505.
- [4] 赵连梅,韩丽娜,商晓辉,等. 木鳖子醇提取物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.
- [5] 赵连梅,韩丽娜,单保恩,等. 木鳖子醇提取物诱导小鼠黑素瘤 B16 细胞分化的作用机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(4): 381-386.
- [6] Zhao LM, Han LN, Ren FZ, et al. An ester extract of cochinchina momordica seeds induces differentiation of melanoma B16F1 cells via MAPKS signaling [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3795-3802.
- [7] Koo HM, VanBrocklin M, McWilliams MJ, et al. Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase [J]. *PNAS*, 2002, 99(5): 3052-3057.
- [8] Estler M, Boskovic G, Denvir J, et al. Global analysis of gene expression changes during retinoic acid-induced growth arrest and differentiation of melanoma: Comparison to differentially expressed genes in melanocytes vs melanoma [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 478.
- [9] Alesiani D, Cicconi R, Mattei M, et al. Inhibition of Mek 1/2 kinase activity and stimulation of melanogenesis by 5,7-dimethoxycoumarin treatment of melanoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(6): 1727-1735.
- [10] Yan Ye, Chou GX, Hui Wang, et al. Effects of sesquiterpenes isolated from largehead atractylodes rhizome on growth, migration, and differentiation of B16 melanoma cells [J]. *Integr Cancer Ther*, 2011, 10(1): 92-100.
- [11] Jiang Z, Xu J, Long M, Tu Z, et al. 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation [J]. *Life Sci*, 2009, 85(9/10): 345-350.
- [12] Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of cubebin in murine B16 melanoma cells [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(14): 4897-4902.
- [13] Lee J, Jung E, Park J, et al. Glycyrrhizin induces melanogenesis by elevating a cAMP level in B16 melanoma cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(2): 405-411.
- [14] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(22): 3525-3544.
- [15] Keishi H, Kyoko I, Kazuyuki H, et al. Differentiation-inducing activity of Lupeol, 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.
- [16] Panich U, Onkoksoong T, Limsaengurai S, et al. UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: The protective effect of gallic acid [J]. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 2012, 108(1): 16-22.

[收稿日期] 2013 - 12 - 25

[修回日期] 2014 - 03 - 16

[本文编辑] 周琳玲,韩丹