

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.003

· 基础研究 ·

橙花叔醇通过 Wnt- β -catenin 通路调控黑色素瘤细胞的恶性生物学行为

刘翌, 王建澍, 薛金旭, 朱彦奇, 李晶(甘肃省肿瘤医院 骨与软组织肿瘤二科, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] **目的:** 探讨橙花叔醇通过 Wnt- β -catenin 通路抑制黑色素瘤 A-375 和 WM-115 细胞恶性生物学行为的分子机制。**方法:** 体外培养黑色素瘤细胞 A-375 和 WM-115, 用不同浓度的橙花叔醇处理, 采用 SRB 法和克隆形成实验、FCM 术、Transwell 实验和细胞划痕实验、DCFH-DA 染色法、qPCR 和 WB 法分别检测橙花叔醇对 A-375 和 WM-115 细胞的增殖能力、细胞周期和凋亡、迁移能力、活性氧(ROS)水平和 Wnt- β -catenin 通路及其下游相关基因和相关蛋白表达的影响。利用 ULCAN 和 GEPIA2 数据库分析黑色素瘤中 Wnt- β -catenin 通路的激活与患者预后的关系。**结果:** 与对照组比较, 橙花叔醇处理组 A-375 和 WM-115 细胞的增殖能力受明显抑制(均 $P < 0.01$)、细胞周期阻滞于 G2/M 期($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、细胞凋亡率增加(均 $P < 0.01$)、迁移能力降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、ROS 水平升高(均 $P < 0.01$)、Wnt- β -catenin 通路被抑制而其下游基因和蛋白表达明显上调(均 $P < 0.01$)。数据库数据分析显示, WNT1 基因高表达患者 OS 低于低表达患者($P < 0.01$)。**结论:** 橙花叔醇通过上调 A-375 和 WM-115 细胞中 ROS 水平影响 Wnt- β -catenin 通路, 从而抑制其恶性生物学行为; Wnt- β -catenin 通路可能是黑色素瘤治疗的潜在靶点。

[关键词] 橙花叔醇; 黑色素瘤; A-375 细胞; WM-115 细胞; Wnt- β -catenin 通路; 活性氧

[中图分类号] R739.5; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)03-0204-07

Nerolidol inhibits malignant biological behaviors of melanoma cells by regulating the Wnt- β -catenin pathway

LIU Zhao, WANG Jianshu, XUE Jinxu, ZHU Yanqi, LI Jing (Second Department of Bone and Soft Tissue Oncology, Gansu Provincial Cancer Hospital, Lanzhou 730050, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular mechanism by which nerolidol inhibits the malignant biological behavior of melanoma A-375 and WM-115 cells through the Wnt- β -catenin pathway. **Methods:** Melanoma A-375 and WM-115 cells were cultured *in vitro* and then treated with different concentrations of nerolidol. The effects of nerolidol on the proliferation, cell cycle and apoptosis, and migration of A-375 and WM-115 cells were analyzed by SRB and clonogenic assays, FCM, Transwell, and cell scratch assays, respectively. The levels of reactive oxygen species (ROS) in the cells were examined with DCFH-DA staining. The Wnt- β -catenin pathway and the expression levels of its related downstream genes were determined by qPCR and WB. The relationship between patient prognosis and the activation of Wnt- β -catenin pathway in melanoma was analyzed using the ULCAN and GEPIA2 databases. **Results:** Compared with the control group, the proliferation, migration, and cell cycle of A-375 and WM-115 cells in the nerolidol-treated group were significantly inhibited (all $P < 0.01$), while the apoptosis was significantly increased (all $P < 0.01$); the ROS level was increased ($P < 0.01$), and the Wnt- β -catenin pathway was inhibited, while its downstream gene expression was significantly up-regulated ($P < 0.01$ or $P < 0.01$). Analysis of database data showed that OS was lower in patients with high WNT1 gene expression than in patients with low expression ($P < 0.01$). **Conclusions:** Nerolidol affects the Wnt- β -catenin pathway by upregulating ROS levels in A-375 and WM-115 cells, thereby inhibiting their malignant biological behaviors. The Wnt- β -catenin pathway may be a potential target for the treatment of melanoma.

[Key words] nerolidol; melanoma; A-375 cell; WM-115 cell; Wnt- β -catenin pathway; reactive oxygen species (ROS)

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(3): 204-210. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.003]

黑色素瘤是一种恶性程度极高的肿瘤, 其主要原因在于黑色素细胞的恶性转化^[1]。根据其组织病理学特征, 黑色素瘤主要分为浅表扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、恶性黑色素瘤和肢端雀斑样黑色素瘤^[1-2]。据统计, 黑色素瘤已成为世界范围内致死率最高的恶性肿瘤之一, 全球约有 22 万人患黑色素

瘤, 超过 5.8 万患者死于黑色素瘤的恶性进展^[3]。有研究^[4]报道, 对化疗和免疫治疗的耐药性是导致晚期

[基金项目] 甘肃省卫生行业科研项目(No. GSWSKY-2019-30)

[作者简介] 刘翌(1985—), 女, 硕士生, 主治医师, 主要从事黑色素瘤基础与临床的研究, E-mail: edgar998@163.com

[通信作者] 李晶, E-mail: blingbling888@yeah.net

黑色素瘤患者预后不良的重要原因。因此,研究黑色素瘤发生发展的分子机制,探索克服黑色素瘤发生发展的新靶点,从而开发全新的抗肿瘤药物迫在眉睫。有研究报道,橙花叔醇(nerolidol)能够显著抑制肿瘤细胞的恶性进展。RYABCHENKO 等^[5-6]的研究表明,橙花叔醇显著抑制乳腺癌细胞和 HeLa 细胞的增殖活性,可能与其阻滞细胞周期相关。还有研究^[7]发现,橙花醇抑制啉啉甲烷诱导的结肠癌,喂食橙花叔醇的大鼠其结肠癌的发病率从 82% 降低到 33%。然而,橙花叔醇在黑色素瘤中的抗肿瘤作用鲜有报道,其发挥抗肿瘤作用的分子机制也仍需进一步探究。因此,本课题系统探讨了橙花叔醇对于黑色素瘤的抑制作用,进一步研究其抗肿瘤活性是否与上调细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平和抑制 Wnt- β -catenin 通路相关。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人黑色素瘤细胞 A-375 购自武汉普诺赛生命科技有限公司,人黑色素瘤细胞 WM-115 购自宁波明舟生物科技有限公司。DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)均购自 HyClone 公司,橙花叔醇(纯度为 97%)购自上海阿拉丁公司,二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝公司,磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)购自默克公司,细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、抗体稀释液、超敏 ECL 化学显色剂均购自江苏碧云天公司,ROS 检测所需的 2',7'-二氯荧光素二乙酸(DCFH-DA)购自中国 MCE 公司。小鼠抗人 c-caspase-3、Bcl2、BAX、GAPDH、p- β -catenin、 β -catenin、p-GSK 及 GSK 等单克隆抗体均购自 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 购自武汉普美克生物有限公司。MYC、CCND1、BIRC5、MMP7 和 GAPDH 的 PCR 引物均购自上海生工公司,Transwell 小室购自 Millipore 公司。

1.2 细胞培养

A-375 和 WM-115 细胞均置于含 10%FBS、1%青霉素和 1%链霉素的 DMEM 高糖完全培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内进行培养,待其汇合度达 80%~95%时,按照标准流程进行细胞传代操作。

1.3 SRB 染色法检测橙花叔醇对 A-375、WM-115 细胞增殖的影响

橙花叔醇配制方法:称取 33.4 mg 的橙花叔醇粉末,溶于 1 mL DMSO 中,配制浓度为 150 mmol/L 的储备液。使用时用完全培养基按比例进行稀释,配制 25、50、75、100、125、150 μ mol/L 的工作液,对照组为

含 0.1% DMSO 完全培养基。将对数生长期的 A-375 细胞和 WM-115 细胞胰蛋白酶消化后计数,以每孔 1×10^3 个接种于 96 孔板中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁后,加入不同浓度的橙花叔醇(终浓度为 25、50、75、100、125、150 μ mol/L; 本文每项实验中橙花叔醇浓度均为终浓度)处理,溶剂对照组中加入同等体积的终体积分数为 0.1% 的 DMSO。培养 72 h 后弃去培养液,并于 4 °C 下用三氯乙酸固定细胞 30 min,双蒸水洗涤 3 次,室温下 SRB 染色 30 min,用 1% 的冰醋酸洗涤 3 次,晾干后加入 100 μ L 的 Tris-base 溶液,用酶标仪测定 540 nm 波长处光密度(D)值,细胞增殖百分率计算公式:细胞增殖率=(处理组 D_{540} /对照组 D_{540}) \times 100%。

1.4 细胞克隆形成实验检测橙花叔醇对 A-375、WM-115 细胞克隆形成的影响

将对数生长期的 A-375 细胞和 WM-115 细胞胰蛋白酶消化后计数,以每孔 2×10^3 个细胞接种于 6 孔板中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁后,加入橙花叔醇(75 或 125 μ mol/L)处理,对照组同 1.3 中要求。培养 10 d 后,弃去培养液,4 °C 下三氯乙酸固定细胞 30 min,双蒸水洗涤 3 次,室温下 SRB 染色 30 min,弃去染液,1%冰醋酸洗涤 3 次,晾干后拍照、计数。

1.5 FCM 术检测橙花叔醇对 A-375、WM-115 细胞周期和凋亡的影响

将对数生长期的 A-375 细胞和 WM-115 细胞 (2×10^4 个/孔)接种在 6 孔板中,待细胞贴壁后,加入橙花叔醇(75 或 125 μ mol/L)处理 48 h,对照组处理同 1.3 中要求。弃去培养液,PBS 洗 3 次,胰酶消化,离心收集细胞。细胞周期检测:加入 500 μ L 的结合缓冲液将细胞重悬,再加入 5 μ L PI 进行染色,室温条件下处理 20 min,在 FCM 中测定细胞周期。细胞凋亡检测:按 Annexin-V/PI 试剂盒说明书操作,加入 500 μ L 的结合缓冲液将细胞重悬,加入各 5 μ L 的 Annexin-V/PI,室温条件下处理 20 min 后,FCM 检测细胞的凋亡情况。

1.6 Transwell 和细胞划痕实验检测橙花叔醇对 A-375、WM-115 细胞迁移的影响

将对数生长期的 A-375 细胞和 WM-115 细胞接种在 Transwell 小室中。加入橙花叔醇(75 或 125 μ mol/L)处理,对照组处理同 1.3 中要求。处理 48 h 后,将迁移到下室的细胞进行固定、染色、拍照和计数。

将 A-375 细胞和 WM-115 细胞在 6 孔板中培养,待细胞汇合度约为 100% 时,用 100 μ L 的无菌移液器吸头划痕,用 PBS 清洗 3 次,加入橙花叔醇(75 或 125 μ mol/L)处理,对照组处理同 1.3 要求。在处理 0、24、48 h,用学显微镜拍照,并计算划痕愈

合率。划痕愈合率=(1-24或48 h划痕宽度/0 h划痕宽度)×100%。

1.7 DCFH-DA 法检测橙花叔醇对 A-375、WM-115 细胞中 ROS 水平的影响

将对数生长期的 A-375 细胞和 WM-115 细胞 (2×10^4 个/孔) 接种在 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入橙花叔醇 (75 或 125 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h, 对照组处理同 1.3 中要求, 弃去培养液, PBS 洗 3 次, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 室温下染色 30 min, 荧光显微镜下拍摄不同组别细胞的染色情况, 并用 Image J 软件定量分析不同组别细胞中的 ROS 水平。

1.8 WB 法检测橙花叔醇对 A-37 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

将对数生长期的 A-375 细胞 (2×10^4 个/孔) 接种在 6 孔板中。待细胞贴壁后, 分为对照组 (同 1.3 中处理), 橙花叔醇低剂量组 (75 $\mu\text{mol/L}$)、橙花叔醇高剂量组 (125 $\mu\text{mol/L}$)、橙花叔醇 (125 $\mu\text{mol/L}$) 联合 TMX67 组 (3.2 nmol/L)、橙花叔醇 (125 $\mu\text{mol/L}$) 联合 NAC 组 (10 $\mu\text{mol/L}$)。经 48 h 处理后, 用 RIPA 裂解液裂解后提取各组细胞的总蛋白质, 用 BCA 法测定蛋白浓度。每孔上样 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE, 用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 10% 的脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 c-caspase-3 (1:1 000)、Bcl2 (1:1 000)、BAX (1:1 000)、GAPDH (1:1 000)、p- β -catenin (1:1 000)、 β -catenin (1:1 000)、p-GSK (1:1 000) 及 GSK (1:1 000) 的一抗, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下处理过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入 1:5 000 稀释的二抗, 室温下处理 2 h, PBS 洗涤 3 次后, 滴加 ECL 并于化学成像仪中显影, 以 Image J 软件进行灰度分析。

1.9 qPCR 法检测橙花叔醇对 A-375 细胞中 MYC、CCND1、BIRC5 和 MMP7 mRNA 表达的影响

将对数生长期的 A-375 细胞 (2×10^4 个/孔) 接种在 6 孔板中。待细胞贴壁后进行与 1.8 中相同的分组。经 48 h 处理后, 用 TRIzol 提取各组细胞的总 RNA, 检测其 RNA 浓度和纯度, 按反转录试剂盒说明书将其反转录成 cDNA, 产物于 -80°C 保存。取 2.5 ng cDNA 进行 qPCR 反应, 采用 TB Green Premix Ex Taq™ 进行 qPCR。qPCR 采用两步法, 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共计 40 个循环。以 β -actin 作为内参照基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算目的基因相对表达量。

1.10 数据库分析黑色素瘤组织中 WNT1 基因表达与患者 OS 率的相关性

在 GEPIA2 数据库中 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) 依据 Wnt 通路的重要基因 WNT1 基因表达的中位数 (0.23) 将黑色素瘤患者分为高表达组和低表

达组, 并分析两组患者的生存期差异; 在 UALCAN 数据库中 (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 分析 WNT1 基因在原发性黑色素瘤和转移灶黑色素瘤组织中的表达情况。

1.11 统计学处理

以上所有实验均独立重复 3 次。用 Graphpad Prism8 统计软件进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用最小显著性差异法 (LSD 法) 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 橙花叔醇抑制 A-375、WM-115 细胞的增殖并将细胞周期阻滞于 G2/M 期

SRB 法检测结果 (图 1A) 显示, 与对照组相比, 橙花叔醇处理组 A-375、WM-115 细胞的增殖能力均明显降低 (均 $P < 0.01$), 其对 A-375、WM-115 细胞的 IC_{50} 分别为 45.08 $\mu\text{mol/L}$ 和 112.5 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞克隆形成实验结果 (图 1B~C) 显示, 与对照组相比, 橙花叔醇处理组 A-375、WM-115 细胞的克隆形成能力也均显著下降 (均 $P < 0.01$), 且具有药物浓度依赖性 (均 $P < 0.01$)。FCM 检测结果 (图 1D~E) 显示, 与对照组相比, 橙花叔醇处理组 A-375、WM-115 细胞的 G0/G1 期细胞比例无显著变化, 而 S 期细胞比例显著降低, G2/M 期显著升高 (均 $P < 0.05$)。实验结果说明, 橙花叔醇可能通过阻滞细胞周期于 G2/M 期而抑制细胞增殖, 且具有药物浓度依赖性。

2.2 橙花叔醇抑制 A-375、WM-115 细胞的迁移

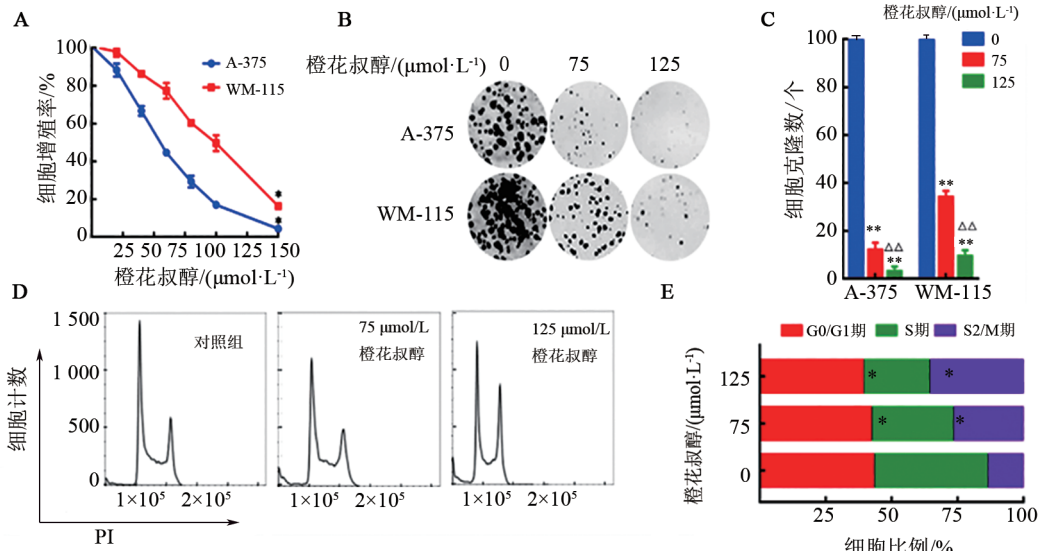
Transwell 实验结果 (图 2A) 显示, 与对照组比较, 橙花叔醇处理组 A-375、WM-115 细胞的迁移能力均明显降低 (均 $P < 0.01$), 且具有药物浓度依赖性 ($P < 0.01$)。细胞划痕实验结果 (图 2B) 显示, 与对照组相比, 橙花叔醇处理 24 和 48 h 后的 A-375、WM-115 细胞的迁移能力均明显降低 (均 $P < 0.01$), 也具有药物浓度依赖性 (均 $P < 0.05$)。

2.3 橙花叔醇通过上调 A-375、WM-115 细胞内的 ROS 水平促进其凋亡

FCM 术检测结果 (图 3A) 显示, 与对照组相比, 橙花叔醇处理组 A-375 和 WM-115 细胞的凋亡率明显增加 (均 $P < 0.01$), 且呈浓度依赖性 (均 $P < 0.01$)。DCFH-DA 染色结果 (图 3B) 显示, 与对照组相比, 橙花叔醇处理组 A-375 和 WM-115 细胞中 ROS 水平明显增加 (均 $P < 0.01$), 也呈浓度依赖性 (均 $P < 0.01$)。WB 法检测结果 (图 3C) 显示, 与对照组相比, 橙花叔醇处理组 A-375 和 WM-115 细胞中凋亡相关蛋白 c-caspase3 和 BAX 的表达明显上调 (均 $P < 0.05$),

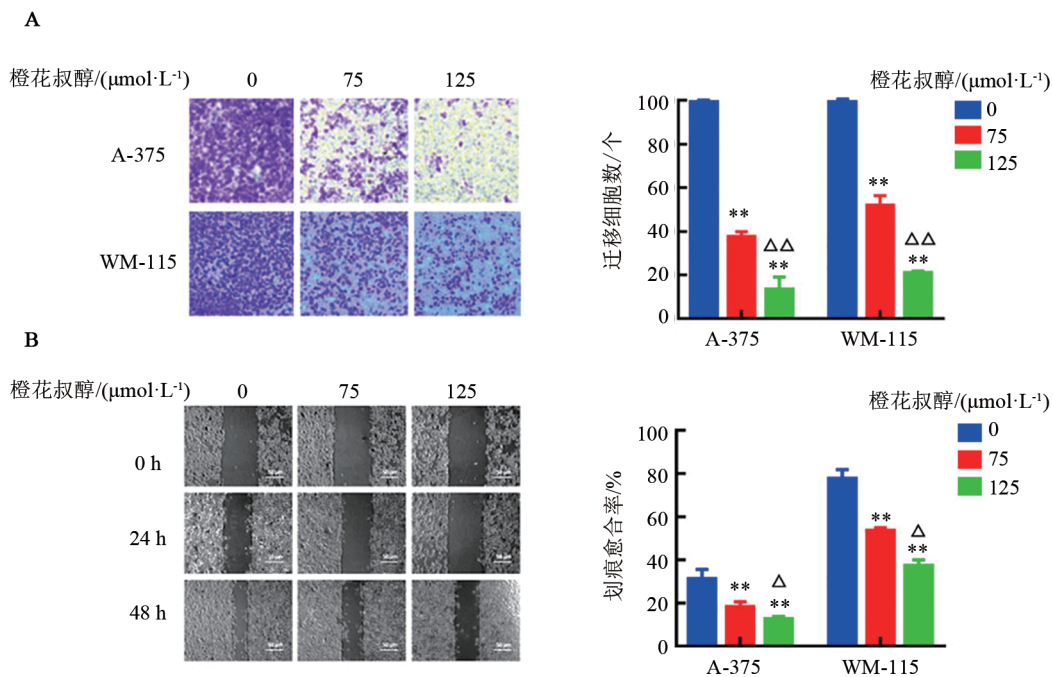
而 Bcl2 的表达明显降低 ($P < 0.05$)。ROS 抑制剂非布司他 (febuxostat, TMX67) 和 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 可明显抑制橙花叔醇对 A-375 和 WM-115 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响 (均

$P < 0.01$)。这些结果说明, 橙花叔醇通过上调细胞内的 ROS 水平呈浓度依赖性地诱导了 A-375 和 WM-115 细胞的凋亡。



与对照 (0 μmol/L) 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 75 μmol/L 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 1 SRB 法(A)、细胞克隆实验(B-C)和 FCM 术(D-E)检测橙花叔醇对 A-375、WM-115 细胞增殖、克隆形成和周期的影响



与对照 (0 μmol/L) 组比较, ** $P < 0.01$; 与 75 μmol/L 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 2 Transwell 实验(A, $\times 200$)和划痕实验(B, $\times 50$)检测橙花叔醇对 A-375、WM-115 细胞迁移能力的影响

2.4 橙花叔醇在 A-375 细胞中通过上调 ROS 水平抑制 Wnt-β-catenin 通路的活化

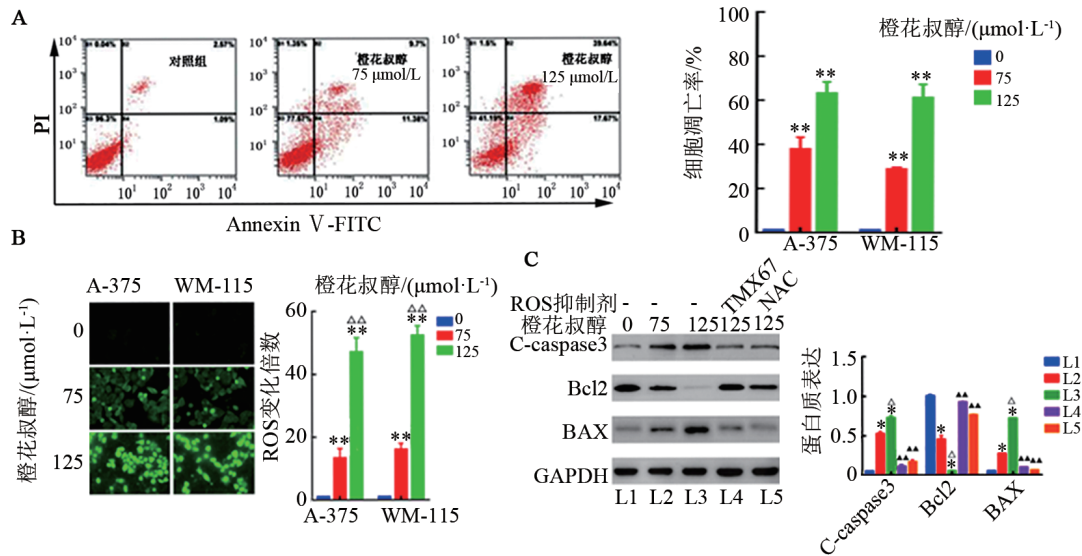
WB 法检测结果 (图 4A) 显示, 与对照组比较, 橙花叔醇处理组 A-375 细胞中具有活性的 β-catenin 蛋白表达明显下调 ($P < 0.01$), 而非活性的 p-GSK 和

p-β-catenin 蛋白表达均显著上调 (均 $P < 0.01$)。ROS 抑制剂 TMX67 和 NAC 可部分逆转橙花叔醇对 Wnt-β-catenin 通路的抑制作用 (均 $P < 0.01$)。qPCR 检测结果 (图 4B) 显示, 与对照组比较, 橙花叔醇处理组 A-375 细胞中 Wnt-β-catenin 通路下游基因的表达明

显下调($P<0.01$), ROS 抑制剂 TMX67 和 NAC 可部分逆转橙花叔醇对 A-375 细胞中 Wnt- β -catenin 通路下游基因表达的抑制作用(均 $P<0.01$)。这些结果说明, 橙花叔醇可能是通过上调 ROS 表达水平抑制 A-375 细胞内 Wnt- β -catenin 通路的异常激活。

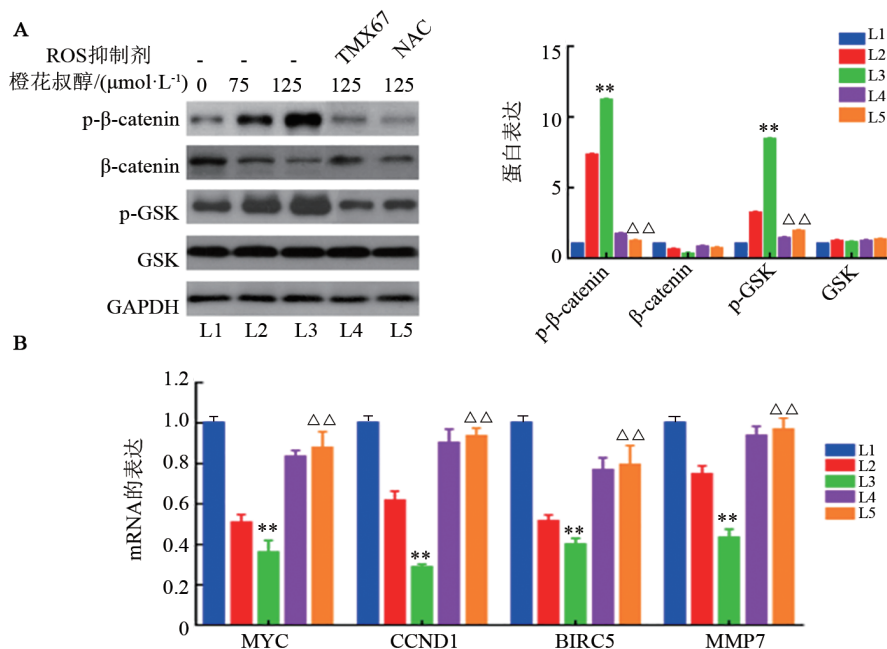
2.5 UCLAN 数据库显示 WNT1 的表达与黑色素瘤患者的预后相关

ULCAN 数据库数据分析显示, Wnt- β -catenin 通路的重要基因 WNT1 在转移性黑色素瘤中的表达显著高于原发性黑色素瘤(图 5A, $P<0.01$)。GEPIA2 数据库分析结果显示, 在黑色素瘤中, WNT1 mRNA 高表达组患者 OS 率显著短于低表达组患者(图 5B, $P<0.01$)。结果说明, Wnt- β -catenin 通路可能与黑色素瘤的发生发展相关。



与对照(0 $\mu\text{mol/L}$)组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 75 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与 75 $\mu\text{mol/L}$ 组或 125 $\mu\text{mol/L}$ 比较, $\Delta\Delta P<0.01$

图3 FCM术(A)、DCFH-DA 染色法(B)和WB法(C)检测橙花叔醇处理后对 A-375 和 WM-115 细胞中凋亡(A)、ROS 水平(B)和凋亡相关蛋白(C)表达的影响



与对照(0 $\mu\text{mol/L}$)组相比, ** $P<0.01$; 与 75 $\mu\text{mol/L}$ 组或 125 $\mu\text{mol/L}$ 比较, $\Delta\Delta P<0.01$

图4 WB法(A)和qPCR法(B)检测橙花叔醇对 A-375 细胞中 Wnt- β -catenin 通路相关蛋白(A)和基因(B)表达的影响

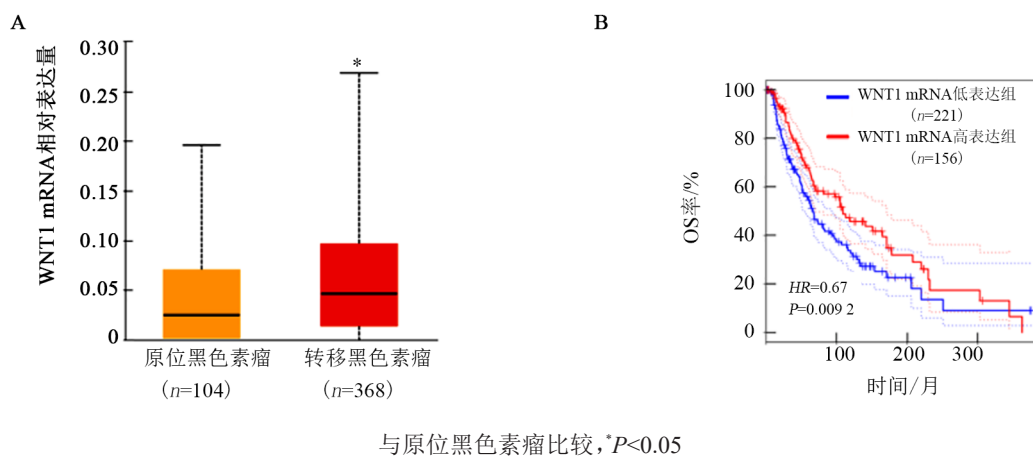


图5 UCLAN 数据库数据分析显示转移性黑色素瘤组织中 WNT1 mRNA 呈高表达(A)且与患者预后不良相关联(B)

3 讨论

从天然植物提取物中鉴定出具有良好抗肿瘤活性且毒性作用小的天然化合物分子是开发抗肿瘤药物的重要思路,已成为当下肿瘤学研究的热门领域之一^[8]。随着白麻黄碱、藜芦醇、黄酮类、姜黄素等潜在抗肿瘤活性分子的不断发现,传统药物为新型抗肿瘤药物的研发开辟出一片新的天地。橙花叔醇是一种倍半萜烯醇,其广泛存在于各种植物中并用于香精的制作。研究^[7,9]表明,橙花叔醇具有强效而广泛的药理作用和生物活性,其不仅发挥抗炎、抗真菌等作用,而且还显示出强效的抗肿瘤作用。有研究^[7]报道,利用橙花叔醇喂养雄性大鼠可显著抑制其由氧化偶氮甲烷所诱导的胃肠道肿瘤发生过程;显著抑制宫颈癌和乳腺癌细胞增殖和恶性进展^[9]。本研究应用多种技术手段也证明了橙花叔醇能抑制 A-375 和 WM-115 细胞的增殖、迁移、细胞周期,并促进其凋亡。

Wnt- β -catenin 细胞通路是细胞内重要的信号通路,在细胞的增殖、功能发育和肿瘤的发生发展中起重要的作用^[10]。Wnt- β -catenin 通路的信号转导主要包括四个部分^[11-13]:细胞外信号、细胞膜部分、细胞质部分和细胞核部分。细胞外信号主要由 Wnt 蛋白所介导,包括 Wnt3a、Wnt1 和 Wnt5a 等;细胞膜部分主要包含 Wnt 蛋白的受体 Frizzled 和 LRP5/6;细胞质部分主要包括 β -catenin、DVL、GSK、AXIN、APC 和 CK1;细胞核部分主要包括易位至细胞核的 β -catenin 及其下游靶基因,如 MMP 和 c-Myc^[14]。目前认为,Wnt 信号通路是一个极其复杂的蛋白质作用网络,其功能最常见于胚胎发育和癌症,但也参与成年动物的正常生理过程。在穿膜受体 FZD 蛋白家族接收 Wnt 信号后,可通过下游蛋白激酶的磷酸化作用抑制 β -catenin 的降解活性,随后胞质中稳定积累的

β -catenin 进入细胞核后结合 TCF/LEF 转录因子家族,启动下游靶基因的转录。在细胞正常情况下,细胞质中的 p-GSK 将 β -catenin 磷酸化,从而促进 β -catenin 的泛素化和快速降解^[15];在 Wnt- β -catenin 异常激活的情况下, β -catenin 的磷酸化水平降低,并转移进细胞核,促进肿瘤相关基因的表达,促进癌症的发生发展过程^[16-17]。本研究的数据分析结果显示,WNT1 在转移性黑色素瘤中的表达量显著上调,并与黑色素瘤患者的不良预后显著关联。

本研究采用 DCFH-DA 染色技术证明橙花叔醇能够显著诱导细胞内 ROS 的水平上调,ROS 的抑制剂 TMX67 和 NAC 抑制 ROS 的上调后可以部分逆转橙花叔醇诱导的 A-375 和 WM-115 细胞凋亡。WB 法和 qPCR 法证明橙花叔醇能够显著抑制活性 β -catenin 的上调,并促进非活性 p- β -catenin 的上调,从而抑制下游基因的表达。近年来,ROS 被证实为 Wnt- β -catenin 通路的抑制因子^[18-24],本实验结果与此一致。

综上所述,本研究证明橙花叔醇可通过上调 A-375 和 WM-115 细胞内 ROS 的水平而抑制 Wnt- β -catenin 通路的异常激活,从而抑制黑色素瘤 A-375 和 WM-115 细胞的恶性生物学行为,实验结果为寻找临床黑色素瘤治疗的新靶点提供了有益的实验依据。

[参考文献]

- [1] GUO W N, WANG H N, LI C Y. Signal pathways of melanoma and targeted therapy[J/OL]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 424[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34924562/>. DOI: 10.1038/s41392-021-00827-6.
- [2] ELDER D E, BASTIAN B C, CREE I A, et al. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway[J]. Arch Pathol Lab Med, 2020, 144(4): 500-

522. DOI: 10.5858/arpa.2019-0561-RA.
- [3] TEIXIDO C, CASTILLO P, MARTINEZ-VILA C, *et al.* Molecular markers and targets in melanoma[J/OL]. *Cells*, 2021, 10(9): 2320 [2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34571969/>. DOI: 10.3390/cells10092320.
- [4] EDDY K, CHEN S. Overcoming immune evasion in melanoma[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): E8984[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33256089/>. DOI: 10.3390/ijms21238984.
- [5] RYABCHENKO B, TULUPOVA E, SCHMIDT E, *et al.* Investigation of anticancer and antiviral properties of selected aroma samples[J/OL]. *Nat Prod Commun*, 2008, 3(7): 1934578X0800300[2022-11-10]. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X0800300710>. DOI: 10.1177/1934578x0800300710.
- [6] TATMAN D, MO H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells[J]. *Cancer Lett*, 2002, 175(2): 129-139. DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00723-6.
- [7] WATTENBERG L W. Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3, 7, 11-trimethyl-1, 6, 10-dodecatriene (nerolidol)[J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12(1): 151-152. DOI: 10.1093/carcin/12.1.151.
- [8] O'SULLIVAN C C, LOPRINZI C L, HADDAD T C. Updates in the evaluation and management of breast cancer[J]. *Mayo Clin Proc*, 2018, 93(6): 794-807. DOI: 10.1016/j.mayocp.2018.03.025.
- [9] CHAN W K, TAN L T H, CHAN K G, *et al.* Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities[J/OL]. *Molecules*, 2016, 21(5): 529[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27136520/>. DOI: 10.3390/molecules21050529.
- [10] HE Y D, XU W D, XIAO Y T, *et al.* Targeting signaling pathways in prostate cancer: mechanisms and clinical trials[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 198[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35750683/>. DOI: 10.1038/s41392-022-01042-7.
- [11] HEO A J, JI C H, KWON Y T. The Cys/N-degron pathway in the ubiquitin-proteasome system and autophagy[J/OL]. *Trends Cell Biol*, 2022[2022-11-10]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892422001751?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.tcb.2022.07.005.
- [12] KONG P, CUI Z Y, HUANG X F, *et al.* Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention [J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 131[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35459215/>. DOI:10.1038/s41392-022-00955-7.
- [13] LI X D, ZHAO Z N, ZHANG M Y, *et al.* Research progress of microneedles in the treatment of melanoma[J]. *J Control Release*, 2022, 348: 631-647. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.06.021.
- [14] RIM E Y, CLEVERS H, NUSSE R. The Wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators[J/OL]. *Annu Rev Biochem*, 2022, 91: 571-598[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35303793/>. DOI:10.1146/annurev-biochem-040320-103615.
- [15] SHI H, CHENG Z. MC1R and melanin-based molecular probes for theranostic of melanoma and beyond[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(12): 3034-3044. DOI: 10.1038/s41401-022-00970-y.
- [16] STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications[J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401-2421. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.003.
- [17] ZHAO H, MING T Q, TANG S, *et al.* Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 144[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35836256/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01616-7.
- [18] SUN N Y, TIAN Y Z, CHEN Y H, *et al.* Metabolic rewiring directs melanoma immunology[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 909580 [2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36003368/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.909580.
- [19] XUE C, LI G L, ZHENG Q X, *et al.* The functional roles of the circRNA/Wnt axis in cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 108 [2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35513849/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01582-0.
- [20] ZHAO C Y, DENG H Z, CHEN X Y. Harnessing immune response using reactive oxygen Species-Generating/Eliminating inorganic biomaterials for disease treatment[J/OL]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114456[2022-11-10]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X22003465?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114456.
- [21] LEE S Y, JEONG E K, JU M K, *et al.* Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation[J/OL]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 10 [2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28137309/>. DOI: 10.1186/s12943-016-0577-4.
- [22] MYANT K B, CAMMARERI P, MCGHEE E J. ROS production and NF- κ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(6): 761-773. DOI: 10.1016/j.stem.2013.04.006.
- [23] CHEUNG E C, LEE P, CETECI F, *et al.* Opposing effects of TIGAR- and RAC1-derived ROS on Wnt-driven proliferation in the mouse intestine[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(1): 52-63. DOI: 10.1101/gad.271130.115.
- [24] RHARASS T, LANTOW M, GBANKOTO A, *et al.* Ascorbic acid alters cell fate commitment of human neural progenitors in a WNT/ β -catenin/ROS signaling dependent manner[J/OL]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 78[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29037191/>. DOI: 10.1186/s12929-017-0385-1.

[收稿日期] 2022-12-10

[修回日期] 2023-02-15

[本文编辑] 向正华,沈志超