

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.006

· 基础研究 ·

木鳖子提取物对羟基桂皮醛对小鼠黑色素瘤移植瘤生长和转移的影响及其作用机制

韩丽娜^a, 张琰^b, 魏思思^b, 柴叶静^c, 颜晰^d, 马鸣^d, 赵连梅^b (河北医科大学 第四医院 a. 输血科; b. 科研中心; c. 期刊社; d. 检验科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 体内外实验探讨木鳖子单体化合物对羟基桂皮醛 [*Momordica cochinchinensis*(Lour.) Spreng. p-hydroxycinnamaldehyde, CMSP] 对小鼠黑色素瘤移植瘤生长和转移的影响及其作用机制。**方法:** 建立荷瘤小鼠动物模型, 并将 18 只 C57BL/6 小鼠随机分成 3 组 (每组 6 只): 对照组 (腹腔注射 0.1 ml 生理盐水)、CMSP 治疗组 (分别腹腔注射 0.1 ml 1、2 mg/ml CMSP), 给药的第 5 天开始, 每次给药前用卡尺分别测量和计算小鼠移植瘤的体积, 实验结束后称量移植瘤的质量; H-E 染色后光镜观察肝组织的病理学变化; 免疫组织化学 SP 法观察移植瘤组织 E-cadherin 和 vimentin 蛋白的表达。采用细胞划痕和 Transwell 实验分别检测 CMSP 实验组 (10、20 μ g/ml) 黑色素瘤 B16 细胞 24、48 h 的迁移能力, qPCR 法检测 CMSP 处理 24 h 后 B16 细胞 EMT 相关 mRNA 表达, WB 法检测 CMSP 处理 B16 细胞 48 h 后 β -catenin、p- β -catenin (Ser675)、vimentin 和 E-cadherin 蛋白的表达水平。**结果:** CMSP 治疗组小鼠移植瘤平均体积和肿瘤质量明显降低 (均 $P < 0.05$); 对照组小鼠肝脏中转移灶的数量明显多于 CMSP (1、2 mg/kg) 治疗组 (均 $P < 0.05$), CMSP (2 mg/kg) 处理组小鼠的肝组织内未发现明显转移灶。CMSP 治疗组 (1、2 mg/kg) 移植瘤组织中 E-cadherin 蛋白表达水平明显高于对照组 (均 $P < 0.05$), 而 vimentin 蛋白表达显著低于对照组 (均 $P < 0.01$)。体外实验中, CMSP 实验组 (10、20 μ g/ml) B16 细胞 24、48 h 后划痕愈合率较对照组均明显降低 (均 $P < 0.05$)。20 μ g/ml CMSP 处理 B16 细胞 24、48 h 后穿过 Transwell 小室的细胞数较对照组则显著下降 (均 $P < 0.01$)。CMSP (10、20 μ g/ml) 处理 B16 细胞后 β -catenin mRNA 表达水平较对照组明显降低 (均 $P < 0.01$), E-cadherin mRNA 表达水平则明显升高 (均 $P < 0.05$), 而 vimentin mRNA 表达水平在 10 μ g/ml 处理组与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 20 μ g/ml 处理组则明显降低 ($P < 0.01$)。与对照组相比, CMSP 实验组 (10、20 μ g/ml) 处理 B16 细胞后 β -catenin、p- β -catenin 和 vimentin 蛋白表达均显著降低 (均 $P < 0.01$), 而 E-cadherin 蛋白表达则明显升高 (均 $P < 0.01$)。**结论:** CMSP 能够抑制小鼠黑色素瘤移植瘤的生长和转移, 其作用机制可能与抑制 wnt/ β -catenin 通路的活性相关。

[关键词] 木鳖子; 对羟基桂皮醛; 黑色素瘤; 移植瘤; 肿瘤生长; 转移

[中图分类号] R739.5; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)06-0590-08

Effects of p-hydroxycinnamaldehyde extract from the *Cochinchina momordica* seeds on growth and metastasis of melanoma transplanted tumors in mice and its mechanism

HAN Lina^a, ZHANG Cong^b, WEI Sisi^b, CHAI Yejing^c, YAN Xi^d, MA Ming^d, ZHAO Lianmei^b (a. Department of Blood Transfusion; b. Scientific Research Center; c. Periodical Press; d. Department of Laboratory, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of p-hydroxycinnamaldehyde (CMSP) monomer compounds extract from the *Cochinchina momordica* seeds on the growth and metastasis of melanoma transplanted tumors in mice with *in vivo* and *in vitro* experiments. **Methods:** A tumor-bearing mouse model was established, and 18 C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups (6 mice in each group): a control group (intraperitoneal injection of 0.1 ml normal saline) and two CMSP treatment groups (intraperitoneal injection of 1 and 2 mg/ml CMSP of 0.1 ml). From the 5th day of drug administration, the transplanted tumor in mice was measured with calipers and the volume was calculated before each administration. At the end of the experiment, the mass of transplanted tumor was

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No.81973520)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81973520)

[作者简介] 韩丽娜 (1983—), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事输血治疗及中药抗肿瘤方面的研究, E-mail: 18531115950@163.com

[通信作者] 赵连梅 (ZHAO Lianmei, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫学、基因诊断、抗肿瘤中药及肿瘤生物治疗的基础与临床研究, E-mail: lianmeizhmail@163.com

weighed. The pathological changes of liver tissues were observed under light microscope after H-E staining. The expressions of E-cadherin and vimentin in the transplanted tumor tissues were detected by SP immunohistochemical method. The metastatic ability of melanoma B16 cells in the CMSP group (10, 20 $\mu\text{g/ml}$) was detected by cell scratch test and Transwell test after treatment for 24 and 48 h. The expressions of EMT-related mRNAs in B16 cells after treatment with CMSP for 24 h were detected by qPCR. The protein expression levels of β -catenin, p- β -catenin (Ser675), vimentin and E-cadherin in B16 cells treated with CMSP for 48 h were detected by Western blotting(WB). **Results:** The mean tumor volume and tumor mass of the mice in CMSP treatment group were significantly decreased (all $P<0.05$). The number of liver metastases in the control group was significantly higher than that in the CMSP (1 and 2 mg/kg) groups (all $P<0.05$); moreover, no obvious metastases were found in the liver tissues of the 2 mg/kg CMSP treatment group. The expression level of E-cadherin protein in CMSP group (1 and 2 mg/kg) was significantly higher than that in the control group (all $P<0.05$), while the expression level of vimentin protein was significantly lower than that in the control group (all $P<0.01$). For the *in vitro* experiments, the scratch healing rate of B16 cells in CMSP groups (10, 20 $\mu\text{g/ml}$) after treatment for 24 and 48 h was significantly lower than that in control group (all $P<0.05$). The number of B16 cells passing through Transwell compartment in the 20 $\mu\text{g/ml}$ CMSP treatment group was significantly decreased as compared with the control group (all $P<0.01$). The mRNA expression level of β -catenin in B16 cells treated with CMSP (10, 20 $\mu\text{g/ml}$) was significantly lower than that in control group (all $P<0.01$), while the mRNA expression level of E-cadherin was significantly increased (all $P<0.05$); However, the mRNA expression level of vimentin in the 10 $\mu\text{g/ml}$ treatment group was not significantly different from that in the control group ($P>0.05$), but it was significantly decreased in the 20 $\mu\text{g/ml}$ treatment group ($P<0.01$). Compared with the control group, the protein expressions of β -catenin, p- β -catenin and vimentin in B16 cells of CMSP groups (10 and 20 $\mu\text{g/ml}$) were significantly decreased (all $P<0.01$), while the protein expression of E-cadherin was significantly increased (all $P<0.01$). **Conclusion:** CMSP can inhibit the growth and metastasis of melanoma transplanted tumors in mice, and its mechanism may be related to the activity of wnt/ β -catenin pathway.

[Key words] *Cochinchina momordica*; p-hydroxycinnamaldehyde; melanoma; transplantation tumor; tumor growth; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(6): 590-597. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.006]

恶性黑色素瘤是一种由黑色素细胞恶化形成的肿瘤,其发病率虽然较低,但是恶性程度较高,表现为增长速度快,易发生转移、预后极差^[1-2]。世界范围内,每年约有20%~25%的黑色素瘤患者死于转移性疾病^[3]。目前,能有效抑制黑色素瘤转移的药物十分有限。因此,寻找新的抑制肿瘤生长和转移的药物并探讨其作用机制已成为广大学者研究的热点之一。

中药由于对多种肿瘤有确切的疗效,且毒副作用较小,越来越受到研究者的关注。木鳖子为葫芦科苦瓜属植物木鳖[*Momordica cochinchinensis*(Lour.) Spreng.]的干燥成熟种子,作为一种有效的中药,木鳖子在我国一直被用作治疗外痈、溃疡和多种肿瘤的传统药物^[4]。本课题组前期研究^[5]发现,木鳖子的醇提物具有抑制黑色素瘤B16细胞增殖和转移的作用;并在木鳖子的乙酸乙酯提取物中分离得到8种有效成分,其中,对羟基桂皮醛(p-hydroxycinnamaldehyde, PHD)是抑瘤作用最强的成分^[6]。本研究通过一系列体内、外的实验,探讨木鳖子提取的PHD(CMSP)抑制小鼠黑色素瘤生长和转移的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、细胞株与实验动物

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。CMSP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鉴定。Transwell小室购自Coster公司,TRIzol试剂盒购自Invitrogen公司,qPCR试剂盒购自Promega公司,cDNA逆转录试剂盒购自MBI Fermentas公司;引物由辉瑞公司设计,兔抗鼠vimentin、E-cadherin、GADPH抗体均购自武汉三鹰公司,兔抗鼠 β -catenin、p- β -catenin (Ser675)抗体均购自CST公司。

细胞株及其培养:小鼠黑色素瘤B16细胞为本实验室保存,用含5%胎牛血清的RPMI 1640培养液(同时含青霉素100 U/ml和链霉素100 $\mu\text{g/ml}$)于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,以0.25%胰蛋白酶消化细胞并传代,取对数生长期的细胞用于后续实验。体外细胞实验分组:Control组(用无胎牛血清的培养基培养),实验组(分别用含10、20 $\mu\text{g/ml}$ CMSP的无胎牛血清培养基培养)。

实验动物:C57BL/6小鼠18只,均为雄性,5~6周龄,体质量为(19.5 $\pm$ 0.3)g,购自河北省实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2013-0051],饲养于河北医科大学第四医院动物实验中心(动物饲养合格证编号:1305090);本研究设计获得河北医科大学第四医院伦理委员会批准。

1.2 CMSP制备

将CMSP的膏状物以1 mg/ml的浓度溶解到DMSO中保存。进行体外细胞实验时用无胎牛血清培养基将其配成适合浓度,进行体内动物实验时用

生理盐水将其稀释至所需浓度。

1.3 荷瘤小鼠模型的建立

模型制备、分组及给药:小鼠右肩胛背部皮下注射处于对数生长期的B16细胞 1×10^6 个/100 μ l,接种第10天,在接种部位皮下可见到成形的瘤块,移植成功率为100%。将荷瘤小鼠按照随机数字表法随机分成3组(每组6只):对照组(腹腔注射0.1 ml生理盐水)、CMSP治疗组(分别腹腔注射0.1 ml 1、2 mg/ml的CMSP)。隔天给药1次,共12次(22 d);在给药的第5天开始,每次给药前用卡尺分别测量和计算小鼠移植瘤体积。所有小鼠在第23天处死。解剖分离出移植瘤、肝和脾,置于4%甲醛溶液中保存。应用H-E染色观察其肿瘤和肝组织的形态变化。

1.4 免疫组化SP法检测移植瘤组织中E-cadherin和vimentin蛋白的表达

取经过固定的移植瘤组织标本,按免疫组织化学SP法常规包埋、制片、脱蜡与水化后,用3% H_2O_2 去离子水阻断内源性过氧化物酶活性15 min,1%山羊血清抗体封闭后分别滴加E-cadherin和vimentin一抗,37℃放置3 h,再分别滴加生物素标记二抗和链霉亲和素-生物素-辣根过氧化物酶复合物。选取5个高倍视野,每个视野计数500个细胞,根据阳性细胞百分比和染色强度观察和评分: $\leq 10\%$ 为0分, $>10\%$ 且 $\leq 50\%$ 为1分, $>50\%$ 且 $\leq 75\%$ 为2分, $>75\%$ 为3分;无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。上述2项评分相加:0分为“-”,1~2分为“+”,3~4分为“++”,5~6分为“+++”。将“-”和“+”定义为阴性表达,“++”和“+++”定义为阳性表达。

1.5 细胞划痕实验

取对数生长期的B16细胞,调整细胞密度为 2×10^5 个/ml,接种于6孔板内,每孔1.8 ml。待细胞贴壁完全后,用移液器枪头在每个孔内划一道痕,然后PBS轻轻洗涤3次,除掉脱落细胞。实验组各孔加入不同浓度CMSP(10、20 μ g/ml),Control组加入同体积的无胎牛血清的培养液。每组均设2个复孔,置于37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,分别在培养24、48 h后观察细胞划痕情况,并照相。

1.6 细胞迁移能力测定

取处于对数生长期的B16细胞,实验组各孔加入不同浓度CMSP(10、20 μ g/ml),Control组加入同体积的无胎牛血清培养液,分别培养24、48 h后,将细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml。于Transwell小室的上室中加入200 μ l的细胞悬液,下室加入20%胎牛血清的RPMI 1640培养液600 μ l,每组设2个复孔,于培养箱中孵育24 h。取出Transwell小室,用PBS洗2次,棉拭子擦去膜上面未迁移的细胞,然后用4%多聚甲醛

溶液和PBS固定10 min,结晶紫染色,以Olympus相差显微镜观察迁移细胞数量并拍照。每个样孔随机取4个视野计数,计算平均值。按下列公式计算细胞迁移抑制率,迁移抑制率($\%$)= $(1 - \text{实验组迁移细胞数}) / \text{Control组迁移细胞数} \times 100\%$ 。

1.7 qPCR法检测黑色素瘤B16细胞中E-cadherin、vimentin和 β -catenin mRNA表达

用TRIzol试剂提取B16细胞中的总RNA,用分光光度法检测RNA浓度,琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量。取2 μ g总RNA用逆转录试剂盒反转录获得cDNA,进行qPCR扩增。qPCR反应条件:95℃ 5 min,94℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共35个循环。以 β -actin为内参,引物序列分别为E-cadherin:上游5'-GTGTCA TCCAACGGGAATGC-3',下游5'-TGCGCGCATTGT AGGTGTTC-3'; vimentin:上游5'-ATGACCGCTTCG CCAACTAC-3',下游5'-CGGGCTTTGTCTGTTGGT TAG-3'; β -catenin:上游5'-GAGCCGTCAGTGCAG GAG-3',下游5'-CGGGCTTTGTCTGTTGGTTAG-3'; β -actin:上游5'-TGAGACCTTCAACACCCCAG-3',下游5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离。对每个靶基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 统计法进行计算, $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组靶基因Ct值} - \text{实验组}\beta\text{-actin Ct值}) - (\text{Control组靶基因Ct值} - \text{Control组}\beta\text{-actin Ct值})$ 。

1.8 WB法检测B16细胞中相关蛋白的表达

收集处理后的各组细胞,应用RIPA裂解液提取各组细胞的总蛋白。BCA法进行蛋白质定量。取50 μ g/孔进行10% SDS-PAGE分离蛋白,分离后的蛋白经电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,用脱脂牛奶室温封闭1 h,加入兔抗 β -catenin(1:1 000)和p- β -catenin(Ser675)(1:1 000)、E-cadherin(1:1 000)、vimentin(1:1 000),以GAPDH(1:5 000)为内参,于4℃孵育过夜,PBST洗膜10 min $\times$ 3次,加入红外线标记的相应二抗(稀释比例为1:20 000),37℃反应2 h,PBST洗膜10 min $\times$ 3次,用双色红外荧光扫描系统(IRDye800-LI-COR,Odyssey)检测各目的蛋白的表达情况。

1.9 统计学处理

应用SPSS13.0统计学软件进行分析,相关实验均独立重复3次。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数间比较采用 t 检验,多重比较时采用LSD- t 检验;多个样本均数间比较先行方差齐性检验,再行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示有统计学差异。

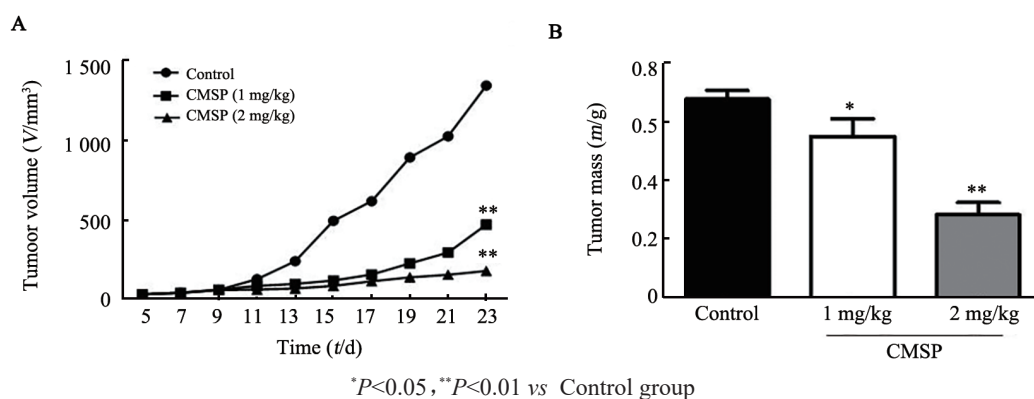
2 结果

2.1 CMSP显著抑制小鼠体内移植瘤的生长

荷瘤小鼠模型实验显示,B16细胞接种于小鼠背

部右肩胛处第10天,可在接种部位皮下见到成形的瘤块,移植成功率为100%。对照组小鼠肿瘤体积增长较快,而CMSP治疗组小鼠的肿瘤体积增长较慢。与对照组相比,在治疗第17天CMSP(10 $\mu\text{g/ml}$)处理组肿瘤体积出现明显缩小($P<0.05$) (见图1A),而

CMSP(20 $\mu\text{g/ml}$)处理组在治疗第13天肿瘤体积则已显著缩小($P<0.01$)。治疗结束后,与对照组相比,CMSP(10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理组较对照组小鼠肿瘤体积和肿瘤质量均明显缩小(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$)见图1B。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control group

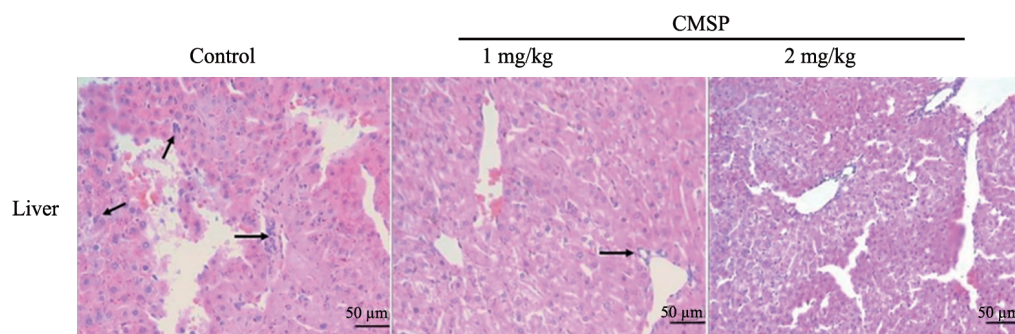
图1 CMSP对小鼠移植瘤的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of CMSP on transplanted tumor

2.2 CMSP治疗对移植瘤小鼠肝脏转移灶的影响

H-E染色光镜观察(图2)显示,对照组小鼠肝脏中转移灶的数量明显多于CMSP(1、2 mg/kg)处理组

(均 $P<0.05$),且CMSP(2 mg/kg)处理组小鼠的肝组织内未发现明显转移灶。实验结果说明,CMSP能在一定程度上抑制小鼠移植瘤的转移。



The arrow points to the metastasis

图2 CMSP治疗对小鼠黑色素移植瘤肝结构的影响(×200)

Fig.2 Effect of CMSP on liver structure of melanoma transplanted tumors in mice(×200)

2.3 CMSP对小鼠移植瘤组织E-cadherin和vimentin蛋白表达的影响

免疫组织化学法检测结果(图3)显示,对照组移植瘤组织E-cadherin蛋白表达率为33%(2/6),CMSP(1 mg/kg)治疗组移植瘤组织E-cadherin蛋白表达率为67%(4/6),CMSP(2 mg/kg)治疗组移植瘤组织E-cadherin蛋白表达率为100%(6/6),CMSP(1、2 mg/kg)2个不同剂量治疗组肿瘤组织E-cadherin蛋白的表达均明显高于对照组(均 $P<0.05$)。对照组移植瘤组织vimentin蛋白表达率为100%(6/6),CMSP(1 mg/kg)治疗组移植瘤组织vimentin蛋白表达率为50%(3/6),CMSP

(2 mg/kg)治疗组移植瘤组织vimentin蛋白表达率为17%(1/6),CMSP(1、2 mg/kg)治疗组肿瘤组织vimentin蛋白的表达均明显低于对照组($P<0.01$)。实验结果说明,CMSP能增强小鼠移植瘤组织中E-cadherin蛋白的表达,同时也能降低vimentin蛋白的表达。

2.4 CMSP处理能使B16细胞的划痕愈合率明显下降

细胞划痕实验结果(图4)显示,与Control组相比,体外实验组不同剂量CMSP(10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理B16细胞24、48 h后,其划痕愈合率明显下降[24 h: (37.00±4.36)%、(18.60±5.51)% vs (54.67±7.02)%,均 $P<0.01$; 48 h: (47.67±5.04)%、(23.33±4.04)% vs

(71.67±11.52)%, 均 $P<0.01$ 。

2.5 CMSP对B16细胞迁移能力的影响

体外细胞迁移实验结果(图5)显示, 10 $\mu\text{g/ml}$ CMSP处理B16细胞24、48 h后, 穿过 Transwell 小

室基底膜的细胞数与 Control 组相比差异无统计学意义(均 $P>0.05$); 20 $\mu\text{g/ml}$ CMSP处理B16细胞24、48 h后, 穿过 Transwell 小室基底膜的细胞数均明显少于 Control 组(均 $P<0.01$)。

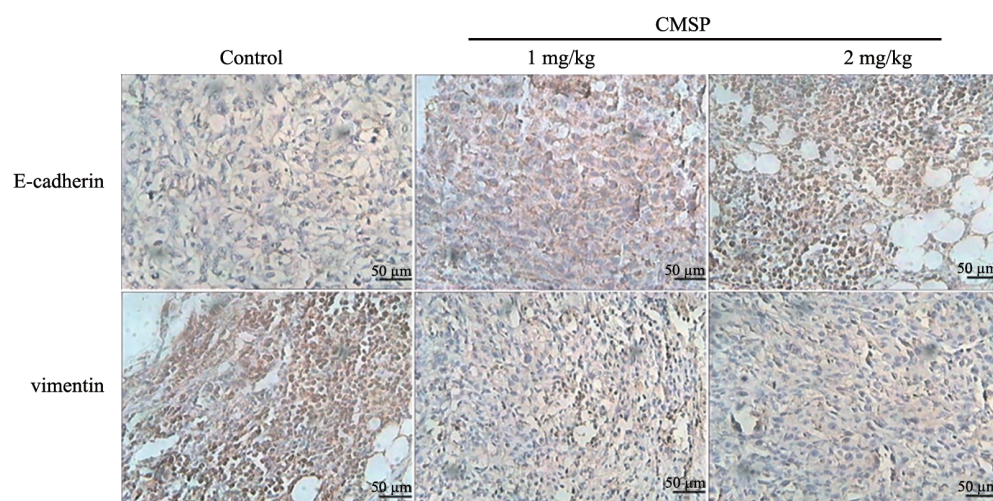
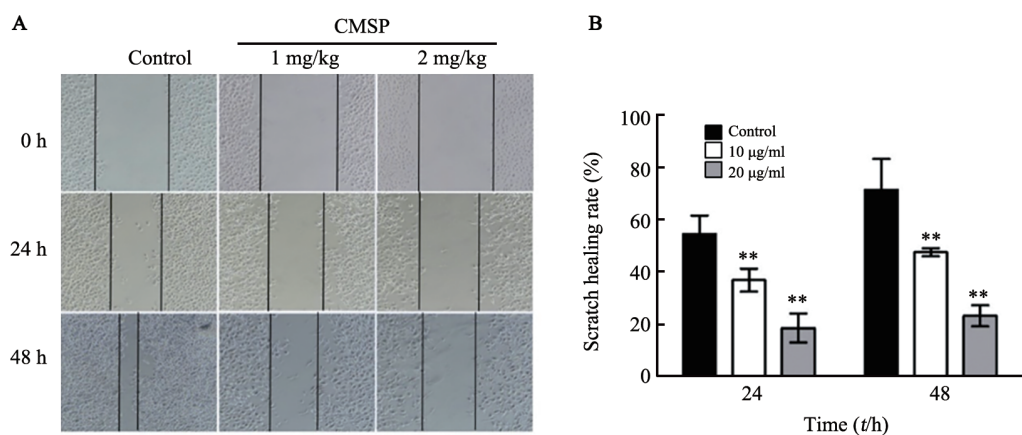


图3 CMSP对小鼠移植瘤E-cadherin和vimentin蛋白表达的影响($\times 200$)

Fig.3 Effect of CMSP on protein expressions of E-cadherin and vimentin in melanoma transplanted tumors in mice ($\times 200$)



** $P<0.01$ vs Control group

图4 CMSP对B16细胞划痕愈合能力的影响($\times 200$)

Fig.4 Effect of CMSP on wound closure ability of B16 cells ($\times 200$)

2.6 CMSP对B16细胞EMT相关标志物mRNA表达的影响

qPCR法检测结果(图6)显示, 与Control组相比, CMSP(10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理B16细胞后, β -catenin mRNA表达水平显著降低(均 $P<0.01$), E-cadherin mRNA表达水平明显上升(均 $P<0.05$); vimentin mRNA表达水平在10 $\mu\text{g/ml}$ CMSP处理组与Control组相比差异无统计学意义($P>0.05$), 而20 $\mu\text{g/ml}$ CMSP处理组则明显降低($P<0.01$)。

2.7 CMSP对B16细胞相关蛋白表达的影响

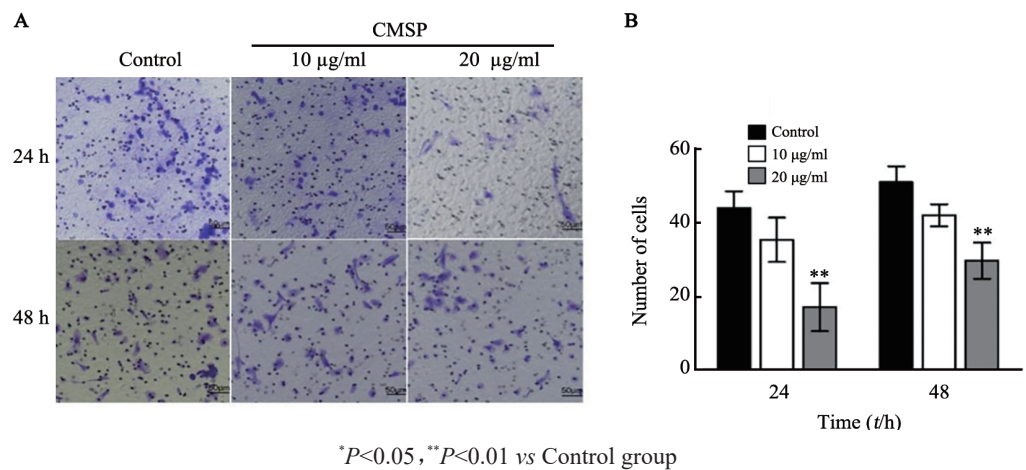
WB法检测结果(图7)显示, 经不同浓度的CMSP(10、20 $\mu\text{g/ml}$)处理后, B16细胞中 β -catenin、p- β -catenin

和vimentin蛋白的表达水平较Control组明显下降(均 $P<0.01$), 而E-cadherin蛋白表达水平则明显升高(均 $P<0.01$)。实验结果说明, 一定浓度的CMSP能增强B16细胞中E-cadherin的表达, 而降低 β -catenin、p- β -catenin和vimentin蛋白的表达水平。

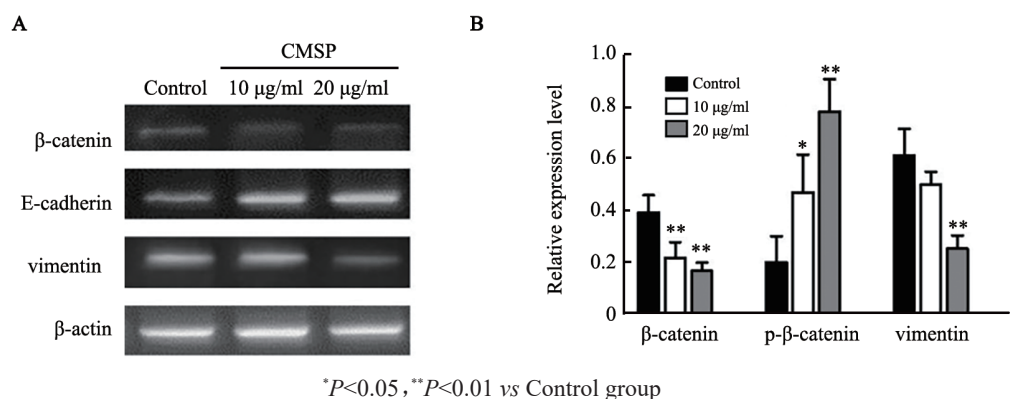
3 讨论

黑色素瘤是一种侵袭性强、容易转移、病死率极高的皮肤癌, 一旦转移, 患者5年生存率不到5%^[7]。转移能成为大多数癌症死亡的原因, 不仅因为肿瘤入侵到重要的组织, 还因为用于治疗癌症的化疗药物的毒副作用。若能发现一种药物, 在抑制黑色素

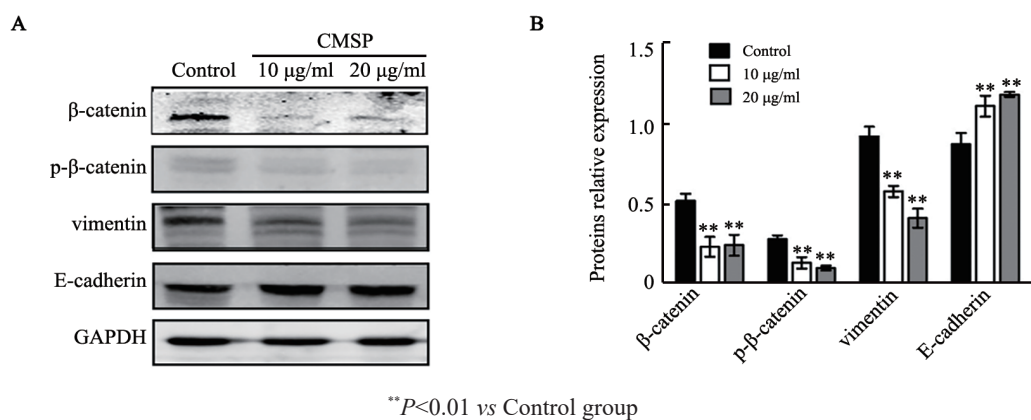
瘤转移的同时,不对其他组织器官带来大的伤害,就能在很大程度上控制肿瘤的进展,提高黑色素瘤患者的生存率和生存质量。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control group
图5 CMSP对B16细胞迁移能力的影响($\times 200$)
Fig.5 Effect of CMSP on migration ability of B16 cells ($\times 200$)



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control group
图6 CMSP对B16细胞mRNA的影响
Fig.6 Effect of CMSP on mRNA expressions in B16 cells



** $P<0.01$ vs Control group
图7 CMSP对B16细胞蛋白的影响
Fig.7 Effect of CMSP on proteins levels in B16 cells

本课题组在前期研究^[8-9]中发现,木鳖子的醇提取物在体内、外均有明显抑制小鼠B16细胞侵袭转移的能力,后续还发现木鳖子的乙酸乙酯相提取物CMSP能够通过MAPK通路诱导B16细胞分化且对小鼠体内黑色素瘤移植瘤有明显的抑制作用。本研究在前期实验的基础上,主要探索了CMSP对小鼠移植瘤生长和转移的抑制作用。通过划痕实验和Transwell实验发现,CMSP能抑制B16细胞的转移行为,并且随

着药物浓度的增大,抑制作用逐渐增强,与前期研究结果一致^[5]。细胞迁移可以分为两种方式,一种为单细胞迁移,即单个细胞的分离迁移。如白细胞在免疫应答过程中的迁移或成纤维细胞挤过结缔组织时发生的迁移;另一种是集体迁移,即细胞作为多细胞簇或片的一部分的迁移。如发育、伤口愈合等时发生的迁移。大多数肿瘤细胞两种迁移方式均存在^[10]。本研究在 Transwell 实验中发现,10 $\mu\text{g/ml}$ 的 CMSP 处理 B16 细胞 24 h 与对照组相比其细胞穿膜数差异无统计学意义($P>0.05$),而同浓度的划痕实验与对照组相比,其划痕愈合率明显下降($P<0.01$),证明 CMSP 抑制 B16 细胞集体迁移的作用更为显著。

肿瘤转移的第一步是肿瘤细胞通过 EMT 从原发瘤灶扩散,癌细胞通过这种转换获得迁移和侵袭能力。因此,本实验主要对 CMSP 作用 B16 细胞后 EMT 相关蛋白表达情况进行了研究。Wnt/ β -catenin 信号通路是肿瘤 EMT 过程最重要的途径之一^[11-12]。该途径的关键成分 β -catenin 与 T 细胞因子/淋巴样增强因子(TCF/LEF)相互作用,可以激活与转移有关的多个靶基因的转录^[13],包括各种标识蛋白如 E-cadherin、vimentin 等^[14-15]。Wnt 信号通路中的 β -catenin 可与 E-cadherin 结合,形成细胞膜上的黏附复合物,维持细胞黏附作用。E-cadherin 编码一种钙依赖的穿膜糖蛋白,参与细胞的黏附,同时影响细胞的骨架动力学。E-cadherin 表达的减少或缺失是 EMT 重要的标志性变化^[16]。WU 等^[17]的研究显示,与癌旁组织相比,癌组织中 E-cadherin 的表达下降,在 B16、A375 和 A2058 细胞中进行研究发现,E-cadherin 可以抑制肿瘤的生长和转移。也有研究^[18]表明,在黑色素瘤中 miR-30a 通过增加上皮标志物 E-cadherin 的表达,抑制了体内的转移。vimentin 是一种高度动态结构的纤维丝,对改变细胞运动性和调节细胞信号传导至关重要,此外,vimentin 在间充质细胞获得从后到前的极性中起着非常重要的作用,使其成为 EMT 的标志^[19]。在黑色素瘤细胞中,可以通过抑制 vimentin 蛋白的表达从而抑制黑色素瘤的运动性和体内转移^[20]。本研究发现,经 CMSP 处理后,B16 细胞表达 vimentin 的水平降低,而 E-cadherin 的表达升高;同样的,CMSP 处理组的小鼠移植瘤的免疫组化结果发现 vimentin 表达的水平降低,而 E-cadherin 的表达水平升高;在对照组小鼠肝脏中发现了很明显的黑色素瘤转移灶,在 CMSP 治疗组转移灶不明显。表明 CMSP 能在体内、外抑制肿瘤的生长和转移。

β -catenin 是 Wnt 信号通路中的关键分子,其能促进转移相关基因的表达,促进 EMT,导致癌症转移,p- β -catenin (Ser675)能促进 β -catenin 与转录因子结

合^[21-22]。为了进一步明确 CMSP 抑制黑色素瘤转移的机制,本研究检测了 β -catenin 和 p- β -catenin (Ser675)的表达水平,结果显示,B16 细胞经过 CMSP 处理后表达 β -catenin 及 p- β -catenin 的水平减弱,表明 CMSP 可能通过影响 β -catenin 的水平及与转录因子结合的水平而抑制了 Wnt 通路的活性从而抑制 B16 细胞的转移。

综上,Wnt/ β -catenin 途径可能是 CMSP 抑制黑色素瘤迁移能力的重要机制之一。本研究为进一步探究 CMSP 抑制黑色素瘤的生长和转移提供了实验依据,但是 CMSP 是否还可通过其他途径抑制黑色素瘤的转移仍有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 张利平,李莎,龚大洁.重离子¹²C⁶⁺放射治疗黏膜恶性黑色素瘤的临床研究进展[J].临床肿瘤学杂志,2020,25(2):172-175. DOI:10.3969/j.issn.1009-0460.2020.02.014.
- [2] ZHAO L M, SUN G G, HAN L N, et al. p-hydroxycinnamaldehyde induces B16-F1 melanoma cell differentiation via the RhoA-MAPK signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(6): 2247-2260. DOI: 10.1159/000445580.
- [3] GOKCE O, TURACLI I D, ONEN H I, et al. Flavopiridol induces apoptosis via mitochondrial pathway in B16F10 murine melanoma cells and a subcutaneous melanoma tumor model[J]. Acta Dermatovenerol Croat, 2016, 24(1): 2-12.
- [4] 艾征东,陈立.木鳖子抗肿瘤的研究现状[J].中国临床药理学杂志,2018,34(4):482-485. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.04.025.
- [5] 韩丽娜,赵连梅,胡彩霞,等.木鳖子醇提物抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞体内外侵袭转移的实验研究[J].肿瘤,2010,30(12):1015-1021. DOI:10.3781/j.issn.1000-7431.2010.12.005.
- [6] ZHAO L M, HAN L N, REN F Z, et al. An ester extract of Cochinchina Momordica seeds induces differentiation of melanoma B16 F1 cells via MAPKs signaling[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3795-3802. DOI:10.7314/apjcp.2012.13.8.3795.
- [7] BUSSE B, LUPO J, SANCEY L, et al. Plasma circulating tumor DNA levels for the monitoring of melanoma patients: landscape of available technologies and clinical applications[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 5986129. DOI:10.1155/2017/5986129.
- [8] 赵连梅,耿艺曼,孙士萍,等.木鳖子单体化合物对羟基桂皮醛诱导小鼠黑色素瘤 B16 细胞的分化及其机制[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2014,21(3):282-287. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.008.
- [9] MA M, ZHANG C, XIANG X H, et al. p-Hydroxycinnamaldehyde from cochinchinamomordica seed reverses resistance to TRAIL in human oesophageal squamous cell carcinoma via the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109611. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109611.
- [10] THEVENEAU E, MAYOR R. Neural crest migration: interplay between chemorepellents, chemoattractants, contact inhibition, epithelial-mesenchymal transition, and collective cell migration[J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2012, 1(3): 435-445. DOI:10.1002/wdev.28.
- [11] TEEUWSEN M, FODDE R. Wnt signaling in ovarian cancer

- stemness, EMT, and therapy resistance[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(10): 1658. DOI:10.3390/jcm8101658.
- [12] GURZU S, KOBORI L, FODOR D, et al. Epithelial mesenchymal and endothelial mesenchymal transitions in hepatocellular carcinoma: a review[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2962580. DOI:10.1155/2019/2962580.
- [13] ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(11): 1461-1473. DOI:10.1038/onc.2016.304.
- [14] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196. DOI:10.1038/nrm3758.
- [15] 戴素丽, 白函瑜, 王耀杰, 等. 非小细胞肺癌组织中高表达的miR-1269对肺癌细胞A549生物学行为的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(12): 1282-1289. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.012.
- [16] WIJNHOFEN B P, DINJENS W N, PIGNATELLI M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer[J]. *Br J Surg*, 2000, 87(8): 992-1005. DOI:10.1046/j.1365-2168.2000.01513.x.
- [17] WU L, ZHU L, LI Y, et al. LncRNA MEG3 promotes melanoma growth, metastasis and formation through modulating miR-21/E-cadherin axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 12. DOI: 10.1186/s12935-019-1087-4.
- [18] NOORI J, SHARIFI M, HAGHJOY JAVANMARD S. miR-30a inhibits melanoma tumor metastasis by targeting the E-cadherin and zinc finger E-box binding homeobox 2[J]. *Adv Biomed Res*, 2018, 7: 143. DOI:10.4103/abr.abr_146_18.
- [19] RATMAYAKE W S, APOSTOLATOS C A, APOSTOLATOS A H, et al. Oncogenic PKC- ϵ activates vimentin during epithelial-mesenchymal transition in melanoma; a study based on PKC- ϵ and PKC- ζ specific inhibitors[J]. *Cell Adh Migr*, 2018, 12(5): 447-463. DOI: 10.1080/19336918.2018.1471323.
- [20] PARK S H, YOON S J, CHOI S, et al. Bacterial type III effector protein HopQ inhibits melanoma motility through autophagic degradation of vimentin[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 231. DOI: 10.1038/s41419-020-2427-y.
- [21] ZHAO X, MA L, DAI L, et al. TNF- α promotes the malignant transformation of intestinal stem cells through the NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(2): 577-588. DOI: 10.3892/or.2020.7631.
- [22] HAN L, DAI S, LI Z, et al. Combination of the natural compound Periplocin and TRAIL induce esophageal squamous cell carcinoma apoptosis in vitro and in vivo: Implication in anticancer therapy[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 501. DOI: 10.1186/s13046-019-1498-z.

[收稿日期] 2021-02-06

[修回日期] 2021-05-20

[本文编辑] 阮芳铭