

## 抗黑色素瘤天然药物的研究进展

王 雪<sup>1,2</sup>, 黄文华<sup>2\*</sup>, 张 晶<sup>1\*</sup>, 高南南<sup>2</sup>

1. 吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

**摘 要:** 恶性黑色素瘤是一种来源于黑色素细胞的恶性肿瘤, 具有转移早、进展快、预后差、死亡率高的特点。近年来, 人们更加关注从天然植物中寻找预防和治疗黑色素瘤的新途径, 并取得了一定的成果, 对有关中药、天然药物在抗黑色素瘤方面的实验研究进行综述。

**关键词:** 中药; 天然药物; 黑色素瘤; 研究进展

**中图分类号:** R282.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)01-0083-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.023

## Research progress in natural drugs for anti-melanoma

WANG Xue<sup>1,2</sup>, HUANG Wen-hua<sup>2</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, GAO Nan-nan<sup>2</sup>

1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Institute of Medical Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract:** Malignant melanoma is a malignant tumor derived from melanocytes with characteristics of early metastasis, rapid development, poor prognosis, and high mortality. In recent years, researchers have paid more attention to looking for the new ways to obtain some potential drug from natural plants for preventing and treating melanoma and have attained certain achievement. This article reviews the research progress in anti-melanoma of Chinese materia medica and natural products.

**Key words:** Chinese materia medica; natural drugs; melanoma; research progress

黑色素瘤又称恶性黑色素瘤, 源于皮肤、黏膜、眼和中枢神经系统色素沉着区域的黑色素细胞, 是一种高度恶性肿瘤, 主要发生于皮肤, 占皮肤肿瘤死亡病例的极大部分。主要病因有种族和遗传、创伤与刺激、病毒、日光、免疫等。根据临床表现和病理组织学, 常见病理类型有: (1) 浅表扩散型黑色素瘤: 在真皮表皮交界处不规则弥漫分布, 并沿水平方向扩展至周围表皮, 呈 Paget 样细胞, 在真皮呈上皮样细胞或梭形细胞, 形成结节; (2) 结节型黑色素瘤: 局部呈结节状增生, 向下侵袭真皮深层和皮下组织, 向上累及其上表皮, 而邻近表皮则无病变; (3) 恶性雀斑痣样黑色素瘤: 瘤细胞常呈梭形, 如流水状向下侵入真皮, 后形成瘤细胞结节, 瘤细

胞常侵犯毛囊的外根鞘; (4) 肢端雀斑痣样黑色素瘤: 常常同时见瘤细胞在表皮内放射状生长和真皮内垂直侵袭性生长。近年来, 恶性黑色素瘤在所有癌症中发病的增长率最高, 呈逐年上升的趋势, 它转移早、进展快、预后差、死亡率高, 至今没有治疗黑色素瘤较好的药物<sup>[1-2]</sup>。

近年来大量的实验研究表明, 中药具有诱导细胞凋亡的作用, 其主要机制是通过中药的有效成分激活机体抗肿瘤基因, 增加各种不同凋亡基因的表达, 根据不同的通路使肿瘤细胞阻滞于有丝分裂的各个时期内, 最终达到诱导肿瘤细胞死亡的目的。我国有丰富的药用动、植物资源, 如何发挥我国传统医学的优势, 筛选具有抗肿瘤作用的天然药物用

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2009ZX09103-390)

作者简介: 王 雪, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。Tel: 18643178614 E-mail: wx.cc.2010@163.com

\*通信作者 黄文华, 副研究员, 研究方向为中药学。Tel: (010)57833288 E-mail: hwhzh69@sohu.com

张 晶, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0431)84532803 E-mail: zhjing0701@sina.com

于开展黑色素瘤的化学预防, 已逐渐受到医学界的重视。本文对有关中药及天然药物在抗黑色素瘤方面的实验研究工作进行综述。

## 1 药材提取物

### 1.1 狼毒大戟水提物

狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 系大戟科大戟属植物, 文献报道其提取物对小鼠移植性肿瘤 V14、S<sub>180</sub> 和 Heps 有抑制作用<sup>[3]</sup>。王莉平等<sup>[4]</sup>采用 MTT 法检测了 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 mg/mL 狼毒大戟水提物分别作用 24、48、72 h 后对小鼠黑色素瘤 B16 细胞的抑制作用, 结果表明在 0.2~1.6 mg/mL 时随着药物浓度的增加和作用时间的延长, 对 B16 细胞抑制作用更加明显, 并具有良好的时效和量效关系; Hoechst 33258 荧光染色法观察到黑色素瘤 B16 细胞经 0.4、1.2 mg/mL 狼毒大戟水提物作用 24 h 后, 细胞出现典型的凋亡形态学变化: 细胞核固缩、染色质聚集、细胞膜肿胀、边缘化, 产生凋亡小体等; 用 Western blotting 方法分析其凋亡相关蛋白表达的结果表明, 不同浓度的狼毒大戟水提物作用黑色素瘤 B16 细胞 24 h 后均可上调 Bax 蛋白, 同时可下调 Bcl-2 蛋白的表达。Bcl-2/Bax 的比值随用药浓度的增加而明显逐渐降低, 在 0.2~1.2 mg/mL 时呈现剂量相关性, 而质量浓度从 1.2 mg/mL 起对黑色素瘤细胞的凋亡不再有很大作用。

### 1.2 麻疯树叶提取物

麻疯树 *Jatropha curcas* L. 为大戟科麻疯树属植物, 在亚洲、非洲和美洲的热带和亚热带地区广泛分布, 目前在我国川西干热河谷及贵州、云南、广东、广西、福建大量种植。在《中华本草》中有其抗肿瘤的记载, 国外也有同属植物棉叶麻疯树 *J. gossypifolia* Linn.、大根麻疯树 *J. macrorhiza* Benth. 的抗肿瘤活性研究报道。李星等<sup>[5]</sup>采用 MTT 法检测了不同浓度的麻疯树叶提取物对人黑色素瘤 A375 细胞增殖的抑制作用, 结果表明其在 12.5~100 mg/L 时作用 24、48、72 h 后的最高抑制率分别为 38.17%、62.89%、79.81%, 并呈浓度和时间相关性; 倒置显微镜观察到, 随着药物浓度的增加, A375 癌细胞数量明显减少, 更多细胞变成圆形, 细胞表面突起多个小球状凋亡小体; Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测结果表明, 麻疯树叶提取物在 25~100 mg/L 时能够诱导 A375 细胞凋亡, 并呈剂量相关性, 同时与药物作用时间呈正相关, 凋亡率最高可达到 36.64%。

## 2 有效部位

### 2.1 莲原花青素

原花青素广泛存在于植物中, 是一大类酚类聚合物的总称, 具有很强的抗氧化活性, 并对多种肿瘤细胞有抑制作用<sup>[6]</sup>。周密等<sup>[7]</sup>采用 MTT 法检测莲房和莲子壳原花青素对小鼠黑色素瘤 B16 细胞的体外抑制作用, 结果表明它们以时间 (48、72 h) 和质量浓度 (50、100  $\mu\text{g/mL}$ ) 相关的方式抑制 B16 细胞生长, 其中 100  $\mu\text{g/mL}$  莲房原花青素对 B16 细胞的抑制率达 87.4%; 显微镜下观察到处理组 B16 细胞的细胞膜破损, 细胞形态改变; 小鼠体内抑瘤实验表明: 120 mg/kg 莲房和莲子壳原花青素处理组小鼠的瘤体积和瘤质量都显著地缩小和降低, 抑制率分别为 55.3%、46.7%; 莲原花青素处理能显著提高荷瘤小鼠血清中 SOD 的活力, 降低 MDA 水平, 有效地清除小鼠体内的自由基, 推测莲原花青素对黑色素瘤的抑制作用可能与其清除自由基的能力有关, 但具体的作用机制还有待进一步的研究。

### 2.2 佛手挥发油

佛手, 又名佛手柑, 为芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的成熟果实。现代药理学研究表明, 植物挥发油具有广泛的药理活性, 可有效抑制肝癌、宫颈癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌、人白血病细胞、人卵巢癌细胞等多种癌细胞的增殖, 为一类具有开发价值的抗肿瘤中药<sup>[8-10]</sup>。

吕学维等<sup>[11]</sup>利用水蒸气蒸馏法制得佛手挥发油, 运用 MTT 法检测其在 62.5、125、250、500  $\mu\text{g/mL}$  作用 6 h 后对小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖具有抑制作用, 且呈剂量相关性, IC<sub>50</sub> 值为 (138 $\pm$ 0.005)  $\mu\text{g/mL}$ , 最高抑制率达 96.30%; Hoechst 33342/PI 荧光染色观察到低中剂量 (62.5、125、250  $\mu\text{g/mL}$ ) 的佛手挥发油处理 B16 细胞 6 h 后, 细胞核固缩, 核染色质凝聚、边缘化, 出现块状或颗粒状荧光, 高剂量组 (500  $\mu\text{g/mL}$ ) 表现为细胞坏死特征; 倒置显微镜下亦观察到细胞数目逐步减少、成团生长、细胞形态不规则; 彗星电泳检测表明, 随着药物浓度的增加, 彗星头逐渐缩小, 说明 DNA 损伤越来越严重, 细胞已发生凋亡。

### 2.3 白花蛇舌草总黄酮

白花蛇舌草总黄酮是从茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 中提取的有效组分, 具有显著的抗肿瘤、抗炎、抗菌作用。杨娴等<sup>[12]</sup>采用体外 MTT 法检测 6.25~100 mg/L 不同质量浓度白花蛇

舌草总黄酮作用 24、48 h 后分别对黑色素瘤 A375 细胞和 B16 细胞增殖的影响。研究表明, 50、100 mg/L 药物在作用 24 h 后对 A375 细胞增殖产生抑制作用, 并能诱导细胞凋亡, 其抑制率分别为 50.33%、68.83%; 质量浓度大于 25 mg/L 的药物、作用 48 h 后的抑制作用随药物浓度的递增而增强, 并且诱导细胞凋亡作用亦显著增强, 抑制率分别为 32.88%、70.29%、82.93%, 其抑制作用与药物浓度和作用时间存在较好的相关性; 另外, 100 mg/L 白花蛇舌草总黄酮作用 48 h 后对 B16 细胞增殖的抑制率为 52.27%, 抑制作用明显低于 A375 细胞。

## 2.4 赤芍总苷

赤芍总苷为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川芍药 *P. veitchii* Lynch 的干燥根中主要活性成分。王亚珍等<sup>[13]</sup>采用细胞划痕和 Transwell 小室侵袭实验测定了 5、15、20、25 mg/L 赤芍总苷对人黑色素瘤 A375 细胞迁移和侵袭能力的影响, 结果表明赤芍总苷能显著抑制黑色素瘤 A375 细胞的迁移和侵袭; RT-PCR 和 Western blotting 方法检测发现赤芍总苷组 A375 细胞内金属基质蛋白酶-2 (MMP-2)、金属基质蛋白酶-9 (MMP-9) 的 mRNA 和蛋白表达与对照组相比明显下降 ( $P < 0.01$ ), 金属基质蛋白酶组织抑制剂-2 (TIMP-2) 的 mRNA 和蛋白表达显著上升, 表明赤芍总苷是通过调节 MMP/TIMP 平衡, 发挥抑制黑色素瘤细胞迁移和侵袭的作用。

## 2.5 银杏叶多糖

银杏叶多糖是从银杏 *Ginkgo biloba* L. 叶中提取出来的一种活性成分, 具有免疫调节、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用, 其抗肿瘤机制与提高机体免疫、清除自由基、抑制细胞周期依赖性蛋白激酶活性和诱导细胞凋亡相关。张丽娇等<sup>[14]</sup>采用 MTT 法检测 50、100、200  $\mu\text{g/mL}$  银杏叶多糖分别作用 24、48、72 h 后对人恶性黑色素 A375 细胞抑制作用的影响。结果显示, 作用不同时间的最高抑制率分别为 19.79%、29.80%、33.63%, 并呈浓度和时间相关。

## 3 活性成分

### 3.1 生物碱类

**3.1.1 右旋一叶萩碱** 一叶萩碱是大戟科叶底珠属植物一叶萩 *Flueggea suffruticosa* (Pall.) Baill. 的主要生物碱。李朋军等<sup>[15]</sup>报道了其旋光异构体右旋一叶萩碱体外对小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖作用及对细胞周期的影响, 结果显示右旋一叶萩碱以时间

(24、48、72 h) 和浓度 (5、10、20、40、80、160  $\mu\text{mol/L}$ ) 相关的方式抑制 B16 细胞生长, 作用 72 h 的  $\text{IC}_{50}$  为  $(63.34 \pm 7.42) \mu\text{mol/L}$ ; 在药物浓度为 20、40  $\mu\text{mol/L}$  及作用 24 h 时就可以显著减少 S 期、G<sub>2</sub>/M 期细胞, 表明右旋一叶萩碱具有抑制黑色素瘤细胞的增殖作用。

**3.1.2 氧化苦参碱** 氧化苦参碱和苦参碱为传统中药苦参的主要活性生物碱成分。近年来它们的抗肿瘤作用受到较大关注, 苦参碱和氧化苦参碱具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞周期阻滞、促进细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化、抗肿瘤新生血管形成以及抑制肿瘤侵袭和转移等多方面的作用<sup>[16]</sup>。杨丽等<sup>[17]</sup>采用 MTT 法检测 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/mL 氧化苦参碱作用 24 h 后对黑色素瘤 B16 细胞增殖的抑制作用, 结果显示氧化苦参碱质量浓度 8.0 mg/mL 的抑制率为 73.5%, 对黑色素瘤 B16 具有明显的增殖抑制作用, 且具有剂量相关性。采用移植性黑色素瘤 B16 小鼠实体瘤模型, 考察氧化苦参碱对肿瘤生长的影响, 连续 10 d ig 给药 30、60、120 mg/kg 剂量的氧化苦参碱组与对照组比较, 瘤质量明显减轻, 肿瘤生长抑制率分别为 42.2%、51.9%、56.5%, 脾脏指数明显升高 ( $P < 0.05$ ), 高、中剂量组胸腺指数明显升高 ( $P < 0.05$ ), 表明氧化苦参碱能促进细胞免疫机制, 改善免疫功能, 发挥抗肿瘤效应。

**3.1.3 苦参碱** 研究表明苦参碱具有抗乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝癌等多种肿瘤活性。仇萌等<sup>[18]</sup>应用 MTT 法检测到 0.25、0.50、1.00、2.00 g/L 苦参碱作用 24 h 后对人黑色素瘤 A375 细胞增殖具有抑制作用, 当苦参碱质量浓度达到 0.50 g/L 时能显著抑制 A375 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 并且随着质量浓度增加, 1.00、2.00 g/L 组的细胞增殖抑制作用逐渐增强 ( $P < 0.01$ ); 流式细胞检测苦参碱在 2.00 g/L 浓度下对 A375 细胞的凋亡率为  $(49.46 \pm 8.77) \%$ , 同时细胞凋亡率随着苦参碱质量浓度增大而逐渐升高 ( $P < 0.01$ ); 电镜观察到在 1.00 g/L 组细胞中出现了典型的凋亡细胞形态学特征, 核仁减少浓缩, 异染色质增多, 细胞内因脂肪代谢异常出现扩张的滑面内质网和脂肪空泡, 并且其诱导凋亡的作用效果与剂量相关。

### 3.2 内酯类

**3.2.1 穿心莲内酯** 穿心莲内酯是从爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees 中提取

得到的二萜内酯化合物。近年来的体外实验证实穿心莲内酯具有抗肿瘤作用,对乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞均具有抑制作用<sup>[19]</sup>。何晓东等<sup>[20]</sup>采用体内移植性黑色素瘤 B16 小鼠 C57 实体瘤模型,穿心莲内酯滴丸 (0.143 mg/20 g) 和对照药氢化穿心莲内酯滴丸 (0.143 mg/20 g) ig 治疗,结果显示穿心莲内酯滴丸能使黑色素 B16 肿瘤体积明显减小、质量减轻,生存期明显延长。BrdU 增殖实验表明,穿心莲内酯滴丸治疗组黑色素瘤的细胞增殖指数明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ),表明穿心莲内酯能够抑制黑色素瘤细胞的增殖,具有一定的抗肿瘤作用。

**3.2.2 小白菊内酯** 小白菊内酯是从菊科匹菊属植物短舌匹菊 *Pyrethrum parthenium* (Linn.) Sm. 分离得到的一种倍半萜内酯,分子式为  $C_{15}H_{20}O_3$ 。近年来发现小白菊内酯具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的作用,并且对多种瘤株有抑制作用。Lesiak 等<sup>[21]</sup>采用 MTT 法检测小白菊内酯作用 44 h 后对 3 种黑色素瘤细胞株 A375、1205Lu、WM793 抑制作用,  $IC_{50}$  值分别为 4.4、3.9、4.4  $\mu\text{mol/L}$ ; 流式细胞仪检测了细胞质膜完整性、亚二倍体事件、活性氧 (ROS) 的产生、线粒体膜电位的变化以及 Caspase-3 活性,结果表明小白菊内酯诱导黑色素瘤细胞凋亡是通过线粒体膜去极化并且伴随着 Caspase-3 的活化,小白菊内酯的抗癌活性使之成为一个很有潜力的抗癌候选药物。

**3.2.3 异木香烯内酯** 异木香烯内酯是从菊科旋覆花属植物土木香 *Inula helenium* Linn. 的根中分离出来的一种倍半萜内酯。Chen 等<sup>[22]</sup>采用台酚蓝染色法检测 0.63~7.5  $\mu\text{g/mL}$  异木香烯内酯作用 48 h 后对人黑色素瘤 A2058 细胞增殖的抑制作用,  $IC_{50}$  值为 3.2  $\mu\text{g/mL}$ ; DNA 流式细胞检测结果表明异木香烯内酯诱导 A2058 细胞凋亡并显著减少  $G_0/G_1$  期细胞数量,进一步的凋亡机制研究表明异木香烯内酯能使 pro-caspase-8、Bid、pro-caspase-3 和 PARP 等相关凋亡蛋白表达下降, Fas 蛋白表达水平以剂量相关性地显著提高。此外,异木香烯内酯通过调控 Bcl-2 家族蛋白来诱导的线粒体膜电位降低,细胞色素 C 外流到胞液,进而引发 Caspases 级联反应,导致细胞凋亡。实验中未检测到 A2058 细胞内的 ROS 的产生。总之,异木香烯内酯是通过线粒体途径来诱导黑色素瘤 A2058 细胞凋亡。

**3.2.4 Subamolide E** Subamolide E 是从樟科樟属

植物香桂 *Cinnamomum subavenium* Miq. 中分离出来的一种丁内酯类活性成分。Wang 等<sup>[23]</sup>采用 MTT 法检测 0~100  $\mu\text{mol/L}$  subamolide E 对人黑色素瘤 A375.S2 细胞作用 24 h 后具有抑制作用并呈浓度相关性;流式细胞仪检测结果显示 subamolide E 能诱导 A375.S2 细胞凋亡,将细胞阻滞在 Sub- $G_1$  期,呈剂量相关性;Western blotting 检测结果表明 subamolide E 能上调 Caspase-9、7、3、6 和 PARP 等凋亡蛋白的表达,通过 Caspase 途径引起细胞凋亡。另外,subamolide E 能够抑制 A375.S2 细胞的迁移,并对正常人的皮肤角化细胞、黑素细胞和成纤维细胞具有较小的细胞毒性,进一步说明 subamolide E 是治疗黑色素瘤的潜在药物。

### 3.3 黄酮类

**3.3.1 黄芩苷** 黄芩苷是从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 中提取分离的一种黄酮类化合物,是黄芩的主要有效成分之一,具有解热、降压、利胆等药理作用。药理研究表明,黄芩苷能抑制肝癌 SMMC27721 及 BEL27402、卵巢癌、人子宫癌 HeLa 等肿瘤细胞增殖、诱导其分化、促进其凋亡的作用。匡菊香等<sup>[24]</sup>采用 MTT 法检测了 50、10、5、1、0.1  $\mu\text{mol/L}$  黄芩苷分别培养 24、48、72 h 后对人黑色素瘤 A375 细胞生长具有明显的抑制作用,黄芩苷在 50  $\mu\text{mol/L}$  时的抑制率为  $(73.46 \pm 0.78) \%$ ,且呈现剂量和时间相关性;流式检测结果显示:10  $\mu\text{mol/L}$  及以上浓度的黄芩苷可使黑色素瘤 A375 细胞凋亡率增加,50  $\mu\text{mol/L}$  浓度组的凋亡率是空白对照组的 6.4 倍 ( $P < 0.01$ ),说明黄芩苷具有促进 A375 细胞凋亡作用。

**3.3.2 蛇葡萄素** 蛇葡萄素又名双氢杨梅树皮素、二氢杨梅素,系葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W.T.Wang 的嫩茎叶<sup>[25]</sup>总黄酮中主要的单体化合物,其对白血病细胞 HL-60、K562、肝癌细胞 Bel-7404、胃癌细胞 SGC-7901 的增殖均有显著的抑制作用。郑作文等<sup>[26]</sup>采用 MTT 法检测到 100.0、66.7、44.4、29.6、19.8、13.2、8.8  $\mu\text{g/mL}$  蛇葡萄素作用 48 h 后对人黑色素瘤 A375 细胞有明显的抑制作用,其最高抑制率可达 80.2%,  $IC_{50}$  为 18.29  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 3.4 多酚类

**3.4.1 和厚朴酚** 和厚朴酚是我国传统中药厚朴的主要活性成分之一,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗肌肉松弛、降胆固醇、抗血栓和抗氧化等广泛的药

理作用。喻丽红等<sup>[27]</sup>采用 MTT 法检测 5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  和厚朴酚对 B16 细胞增殖作用的影响,结果显示,其对 B16 细胞增殖的抑制作用具有时间和浓度相关性,且作用 12、24、48 h 后的  $\text{IC}_{50}$  分别为 23.4、13.1、11.4  $\mu\text{mol/L}$ ; DAPI 染色法观察到部分细胞胞体缩小,胞质浓缩,细胞核碎裂呈碎片状,可见典型的凋亡小体,因此,低剂量的和厚朴酚可通过诱导 B16 细胞凋亡来有效地抑制细胞增殖; NaOH 裂解法测定和厚朴酚对 B16 细胞内黑色素合成的影响,可发现黑色素合成表现出抑制趋势,但抑制作用不明显。

**3.4.2 白藜芦醇** 白藜芦醇广泛存在于葡萄科、百合科等 70 种植物中。1997 年,美国的科研人员发现白藜芦醇具有抗肿瘤的功​​效,表现为对肿瘤的起始、促进和进展阶段均有抑制作用。刘浩等<sup>[28]</sup>采用 MTT 法检测 10、20、40、80、160  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇分别培养 24、48、72 h 后对人黑色素瘤 Mel-RM、MM200 细胞增殖具有剂量和时间相关性的抑制作用;流式细胞仪检测白藜芦醇在 80~160  $\mu\text{mol/L}$  可将细胞阻滞在 Sub- $\text{G}_1$  期,对 Mel-RM 细胞的凋亡率分别为 30.8%、49.9%,对于 MM200 细胞的凋亡率为 40.2%、67.2%; JC-1 染色检测到 Mel-RM 和 MM200 细胞的线粒体膜电位分别降低 51.0%、68.8%;由于线粒体膜电位下降,通过不同的途径活化 Caspase-3,从而引起细胞凋亡。高桂华等<sup>[29]</sup>采用 MTT 法检测白藜芦醇 (2、4、8、16、32  $\mu\text{g/mL}$ ) 对小鼠黑色素瘤 B16 及人黑色素瘤 A375 细胞的增殖抑制作用,结果显示,作用 48 h 后白藜芦醇对 2 株细胞的杀伤效果大致相当,  $\text{IC}_{50}$  分别为 8.76、9.04  $\mu\text{g/mL}$ ; Western blotting 方法检测到 5  $\mu\text{g/mL}$  白藜芦醇可以明显的抑制 B16 细胞中 Akt 蛋白的磷酸化, 10  $\mu\text{g/mL}$  白藜芦醇则基本上完全抑制了 p-Akt 蛋白的表达;小鼠体内抑瘤实验结果显示白藜芦醇高中低 (50、30、10  $\text{mg/kg}$ ) 剂量组小鼠的肿瘤体积均明显小于生理盐水组 ( $P<0.05$ ),而体质量没有明显的差异,无不良反应。

**3.4.3 姜黄素** 姜黄素是从姜科姜黄属植物姜黄 *Curcuma longa* L.根茎中提取的一种酚类物质,具有抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、降血脂等作用。目前的大量研究证实姜黄素具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡的作用。张亮等<sup>[30]</sup>采用 MTT 法检测 12.5、25、50、100  $\mu\text{g/mL}$  姜黄素对小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞作用 24、48、72 h 后具有抑制

作用,且呈明显的时间及剂量相关性;通过 DCFH-DA 活性氧检测,在激光共聚焦显微镜下可观察到 50  $\mu\text{g/mL}$  姜黄素对 B16-F10 细胞作用 48 h 后,细胞内活性氧自由基水平显著增高 ( $P<0.01$ );采用 TUNEL 染色,荧光显微镜观察姜黄素作用 48 h 后 B16-F10 凋亡细胞增多,并且可以显著上调细胞内 Caspase-4、9 水平。研究结果表明姜黄素可能通过诱导肿瘤细胞产生活性氧自由基、启动线粒体凋亡过程而达到抑制肿瘤的目的。

### 3.5 蛋白类

**3.5.1 天花粉蛋白** 天花粉蛋白 (是一种从葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim.根块内分离纯化的碱性蛋白质,属单链核糖体失活蛋白 (ribosome inactivating protein, RIP),具有多种生物活性。周欣阳等<sup>[31]</sup>研究表明天花粉蛋白具有诱导黑色素瘤 B16 细胞凋亡的作用, 50  $\text{mg/L}$  天花粉蛋白作用 B16 细胞 12 h 后,单细胞电泳结果显示损伤细胞 DNA 产生单链断裂片段向阳极迁移,形成彗星样拖尾现象; Hoechst33258 染核形态观察可见 B16 细胞核固缩、染色质致密、凝集和边集浓染的细胞凋亡现象;应用激光共聚焦扫描显微术结合特异性荧光探针 Fluo-3/AM、H2DCF-DA 和 DAF-FM diacetate 观察到 B16 细胞在天花粉蛋白作用下,单个瘤细胞内钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ )、一氧化氮 (NO) 和 ROS 的生成量明显高于对照组 ( $P<0.01$ ),细胞内 ROS 和 NO 的增加与  $\text{Ca}^{2+}$  的增加密切相关。ROS 作为细胞内第二信使,在细胞内酶的激活、细胞生长和分化及细胞凋亡中起着非常重要的作用,ROS 可以通过不同途径诱导细胞凋亡,天花粉蛋白诱导凋亡可能与细胞内钙、ROS 和 NO 的增加有关。

**3.5.2 相思子蛋白 P2** 相思子蛋白 P2 是从豆科藤本植物相思子 *Abrus precatorius* L.的种子中分离得到的一种单体糖蛋白。秦丹丹等<sup>[32]</sup>采用 MTT 法检测到相思子蛋白 P2 在 0.01、0.1、1、10、100  $\text{ng/mL}$  作用 48 h 后对黑色素瘤 B16 细胞生长具有抑制作用,并呈现质量浓度-效应相关性,其  $\text{IC}_{50}$  值为 4.6  $\text{ng/mL}$ ,最大抑制率达 95.45%;流式细胞仪检测相思子蛋白 P2 在 1~100  $\text{ng/mL}$  可将黑色素瘤 B16 细胞阻滞在 S 期,阻断向  $\text{G}_2/\text{M}$  期发展,达到了抑制肿瘤细胞增殖的作用;利用 JC-1 染色法荧光显微镜观察相思子蛋白 P2 在 1、10、50、100  $\text{ng/mL}$  不同药物组荧光强度均发生改变,能引起黑色素瘤 B16 细胞线粒体膜电位降低;小鼠体内抑瘤实验结果表

明, 相思子蛋白 P2 在 50、75、100  $\mu\text{g/kg}$  剂量下, 连续 ig 给药 10 d 对小鼠 B16 移植性肿瘤生长抑制率分别为 22.13%、40.45%、53.75%, 有明显剂量-效应相关性, 且对胸腺和脾脏质量指数的影响较环磷酸小, 说明对免疫系统毒性作用低于环磷酸。

### 3.6 其他

人参皂苷  $\text{Rg}_3$  是从红参中提取出来的单体皂苷, 属原人参二醇型皂苷, 大量研究表明人参皂苷  $\text{Rg}_3$  有明显的抑制多种肿瘤生长和转移的作用, 其作用与抗肿瘤血管生成密切相关<sup>[33]</sup>。辛颖等<sup>[34]</sup>采用体内肿瘤诱导血管生成实验、免疫细胞化学法 (人参皂苷  $\text{Rg}_3$  5  $\mu\text{g/mL}$ , 培养 24 h)、MTT 法、PCNA 免疫荧光染色以及迁移实验研究了人参皂苷  $\text{Rg}_3$  对黑色素瘤 B16 细胞的影响, 进一步证实人参皂苷  $\text{Rg}_3$  通过下调肿瘤细胞血管内皮生长因子的表达, 抑制血管内皮细胞的增殖和迁移, 抑制肿瘤血管生成, 从而抑制了 B16 黑色素瘤的生长和转移。

### 4 结语

近年来, 国内很多学者已经关注了中药和天然药物在抗黑色素瘤作用的活性筛选和机制研究, 包括在植物提取物、有效部位及单体化合物等方面都有了大量的研究工作。肿瘤的发生是癌基因激活与抑癌基因抑制或失活共同作用的复杂过程, 细胞周期调控异常也是肿瘤发生的重要作用。此外肿瘤的发生、发展可能直接与细胞增殖与死亡的失衡有关。从抑制肿瘤细胞增殖、调控细胞周期、诱导细胞凋亡以及与凋亡相关蛋白的表达的影响等不同层面、不同程度地研究了其抗肿瘤的机制, 这些研究成果给临床用药和新药开发提供了有力依据。

虽然, 近年来还未发现能够较好治疗黑色素瘤的药物和方法, 但是我国有着丰富的药用植物资源, 并在临床应用中积累了丰富的经验, 有利于从中发现大量具有结构新颖、药理活性显著的先导化合物。如果在研究方法和内容上更加深入和明确, 通过对其抗肿瘤作用机制、构效关系等多方面的系统研究, 最终一定能获得高效且安全的药物, 造福于人民。

### 参考文献

- [1] Stone A, Cooper J, Koenig K L. A comparison of survival rates for treatment of melanoma metastatic to the brain [J]. *Cancer Invest*, 2004, 22(4): 492-497.
- [2] Hensin T, Atkins M B, Sober A J. Management of cutaneous melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(10):

998-1012.

- [3] 杜娟, 于继鸣. 瑞香狼毒与狼毒大戟抑制小鼠移植性肿瘤生长作用的比较 [J]. 山东医科大学学报, 2000, 38(4): 4.
- [4] 王莉平, 王义善, 张国营, 等. 狼毒对恶性黑色素瘤细胞生长的影响及其分子作用机制的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1133-1135.
- [5] 李星, 唐琳, 雷蕾, 等. 麻疯树叶提取物对恶性黑色素瘤 A375 细胞增殖抑制及诱导凋亡作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2291-2293.
- [6] 李海涛, 张良, 盛玉青, 等. 松树皮原花青素的抗肿瘤作用研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(1): 43-45.
- [7] 周密, 段玉清, 王文兵, 等. 莲原花青素抗黑色素瘤的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(11): 223-226.
- [8] Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, et al. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia [J]. *South Afr J Bot*, 2010, 76(2): 210-216.
- [9] Lei J C, Yu J Q, Yu H D, et al. Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus* [J]. *Food Chem*, 2008, 107(3): 1205-1209.
- [10] Bezerra D P, Marinho Filho J D, Alves A P, et al. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole [J]. *Chem Biodivers*, 2009, 6(8): 1224-1231.
- [11] 吕学维, 邵邻相, 张均平, 等. 佛手挥发油对 B16 黑色素瘤细胞体外增殖的抑制作用 [J]. 中国粮油学报, 2011, 26(8): 50-54.
- [12] 杨娴, 刘汝青, 杜德荣, 等. 白花蛇舌草总黄酮对黑色素瘤 A375 和 B16 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(10): 844-846.
- [13] 王亚珍, 吕品田, 王凤红, 等. 赤芍总苷对人黑色素瘤 A375 细胞迁移及侵袭活性的影响 [J]. 广东医学, 2012, 33(3): 318-320.
- [14] 张丽娇, 佟巨慧, 高立宏, 等. 银杏叶多糖对人恶性黑色素瘤细胞增殖的影响 [J]. 长春师范学院学报: 自然科学版, 2008, 27(6): 57-58.
- [15] 李朋军, 沈伟哉, 叶文才, 等. 右旋一叶萩碱对小鼠黑色素瘤 B16 增殖及细胞周期的影响 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2011, 32(2): 152-154.
- [16] 鲍娇琳, 陆金健, 陈修平, 等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 369-373.
- [17] 杨丽, 吕品田, 王超. 氧化苦参碱抗 B16 黑色素瘤的实验研究 [J]. 河北中医, 2011, 33(8): 1230-1231.
- [18] 仇萌, 邹先彪. 苦参碱对黑色素瘤 A375 细胞株的诱导凋亡作用 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(5): 676-678.

- [19] Rajagopal S, Kumar R A, Deevi D S, *et al.* Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata* [J]. *J Exp Ther Oncol*, 2003, 3(3): 147-158.
- [20] 何晓东, 龚 萍, 亓翠玲, 等. 穿心莲内酯滴丸抗小鼠黑色素瘤作用的研究 [J]. 广东药学院学报, 2011, 27(2): 163-165.
- [21] Lesiak K, Koprowska K, Zalesna I, *et al.* Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows anticancer activity against human melanoma cells *in vitro* [J]. *Melanoma Res*, 2010, 20(1): 21-34.
- [22] Chen C N, Huang H H, Wu C L, *et al.* Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2007, 246(1): 237-252.
- [23] Wang H M, Chiu C C, Wu P F, *et al.* Subamolide E from *Cinnamomum subavenium* induces sub-G1 cell-cycle arrest and caspase-dependent apoptosis and reduces the migration ability of human melanoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 8187-8192.
- [24] 匡菊香, 雷沛鸿, 石 江. 黄芩苷对人黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11): 2510-2512.
- [25] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(补编) [M]. 第二册. 北京: 科学出版社, 1983: 349-356.
- [26] 郑作文, 谭 为, 周雅君, 等. 藤茶蛇葡萄素对人卵巢癌细胞和人恶性黑色素瘤细胞增殖的抑制作用 [J]. 广西中医药, 2009, 32(1): 46-48.
- [27] 喻丽红, 张 超, 谭 茵. 和厚朴酚对小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖以及黑色素合成的影响 [J]. 广东医学, 2012, 33(4): 439-441.
- [28] 刘 浩, 蒋琛琛, 程 秀, 等. 白藜芦醇对人黑色素瘤细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(7): 998-1002.
- [29] 高桂华, 徐华娥, 李庆平. 白藜芦醇对恶性黑色素瘤生长抑制作用的体外及体内研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29(6): 790-793.
- [30] 张 亮, 万义增. 姜黄素对黑色素瘤 B16-F10 细胞增殖及线粒体凋亡影响的机制研究 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2012, 14(21): 8-9.
- [31] 周欣阳, 张天一, 顾君一, 等. 天花粉蛋白诱导黑色素瘤凋亡机制的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(11): 2258-2261.
- [32] 秦丹丹, 高南南, 季宇彬. 相思子蛋白 P2 对 B16 黑色素瘤的抑制作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6): 22-25.
- [33] 康新梅, 张清媛, 王恕怀, 等. 三苯氧胺联合人参皂苷 Rg3 抑制乳腺癌血管生成的研究 [J]. 肿瘤, 2008, 28(4): 279-281.
- [34] 辛 颖, 姜 新, 崔俊生, 等. 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 抑制 B16 黑色素瘤新生血管生成及其机制的探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(8): 590-593.