

木鳖子对羟基桂皮醛对黑素瘤 B16 细胞分化的影响及其机制

耿艺曼¹, 赵连梅¹, 朱秀丽¹, 任凤芝², 韩丽娜¹, 高海祥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. 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 河北 石家庄 050011

3. 河北省人民医院, 河北 石家庄 050011

摘要:目的 探讨木鳖子 *Momrodica cochinchinensis* 中单体化合物, 尤其是对羟基桂皮醛诱导黑素瘤 B16 细胞分化的作用。方法 以对羟基桂皮醛、松柏醛、对羟基苯甲醛、3-甲氧基对羟基苯甲醛和 ligballinol 处理 B16 细胞 48 h 后, 磺酰罗丹明 B (SRB) 法检测细胞生长抑制率。以对羟基桂皮醛处理 B16 细胞 24、48、72 h 后, 倒置相差显微镜和经瑞氏-吉姆萨染色法观察细胞形态; 比色法检测给药后 48 h B16 细胞中黑色素量和酪氨酸酶活性; RT-PCR 法检测酪氨酸酶基因表达。结果 5 个单体化合物对 B16 细胞生长均具有抑制作用, 其中对羟基桂皮醛对细胞生长的抑制作用最为明显, 且具有浓度和时间相关性。对羟基桂皮醛处理 B16 细胞 48 h 后, 经染色观察到细胞呈树突样生长, 表现为典型的细胞分化形态特征, 黑色素的量显著增加, 酪氨酸酶活性显著增强, 上述作用与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。以对羟基桂皮醛处理 B16 细胞 6、12、24 h 后, 酪氨酸酶、酪氨酸相关蛋白-1 和酪氨酸相关蛋白-2 的基因表达明显上调 ($P < 0.01$), 且呈时间相关性。结论 对羟基桂皮醛能够抑制黑素瘤 B16 细胞增殖, 其机制与诱导 B16 细胞分化相关。

关键词: 木鳖子; 对羟基桂皮醛; 黑素瘤 B16 细胞; 细胞分化; 机制

中图分类号: R282.710.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1951-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.016

Effect of *p*-hydroxylcinnamaldehyde on differentiation of melanoma cells and its mechanism

GENG Yi-man¹, ZHAO Lian-mei¹, ZHU Xiu-li¹, REN Feng-zhi², HAN Li-na¹, GAO Hai-xiang³, SHAN Bao-en¹

1. Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

2. Pharmaceutical Group of New Drug Research and Development Limited Liability Company, Shijiazhuang 050011, China

3. Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: **Objective** To explore the monomer compounds in the seeds of *Momrodica cochinchinensis* and to study the differentiation of mouse melanoma B16 cells induced by *p*-hydroxylcinnamaldehyde (PHC). **Methods** After being treated by five kinds of compounds [PHC, coniferylaldehyde, *p*-hydroxylbenzaldehyde (PHB), 3-*O*-methoxyaniline-*p*-hydroxylbenzaldehyde, and ligballinol] for 48 h, the inhibitory rate of B16 cell growth was measured by sulforhadamine B (SRB); Morphological changes of B16 cells induced by PHC for 24, 48, and 72 h were observed by Giemsa staining and phase contrast microscope; Melanin content and the activity of tyrosinase in B16 cells 48 h after the administration were assessed by colorimeter. The expression of tyrosinase mRNA was detected by RT-PCR. **Results** All the five compounds had the inhibitory effect on the B16 cells. Among them, PHC showed the strongest effect in the dose- and time-dependent manner; PHC could induce B16 cells dendritic growth 48 h after the treatment, and the morphological changes were typically differentiated; PHC also increased the melanin production and the activity of tyrosinase. There was a significant difference compared to the control group ($P < 0.05$). After treated by PHC for 6, 12, and 24 h, the expression levels of tyrosinase mRNA, tyrosinase 1 mRNA, and tyrosinase 2 mRNA were significantly increased ($P < 0.01$) in a time-dependent manner. **Conclusion** PHC could inhibit the proliferation of B16 cells and the mechanism is related to the differentiation of B16 cells. **Key words:** *Momrodica cochinchinensis* seeds; *p*-hydroxylcinnamaldehyde; melanoma B16 cells; cell differentiation; mechanism

收稿日期: 2012-09-17

基金项目: 河北省卫生厅医学科学研究重要课题计划 (20120120)

作者简介: 耿艺曼 (1985—), 医学硕士, 主要从事中草药抗肿瘤研究。Tel: 13930113908 E-mail: g.ym19851025@163.com

*通信作者 单保恩 E-mail: shanbaoen@163.com

诱导恶性肿瘤细胞向正常或近正常的细胞方向分化逆转,是治疗恶性肿瘤的一种新方法^[1-2]。因而从天然药物中寻找肿瘤细胞分化诱导剂是当前的研究热点之一^[3]。前期研究表明,木鳖子醇提物能抑制黑素瘤 B16 细胞的增殖,诱导 B16 细胞分化^[4]。对木鳖子醇提物进一步提取、分离,得到 5 个单体化合物,分别是对羟基桂皮醛 (*p*-hydroxycinnamaldehyde, PHC)、松柏醛 (coniferylaldehyde)、对羟基苯甲醛 (*p*-hydroxybenzaldehyde, PHB)、3-甲氧基对羟基苯甲醛 (3-*O*-methoxyaniline-*p*-hydroxybenzaldehyde) 和 ligballinol^[5]。本实验评价木鳖子中上述 5 个化合物对小鼠黑素瘤 B16 细胞生长的抑制作用,并探讨对羟基桂皮醛对 B16 细胞的分化诱导作用及其机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

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葫芦科植物木鳖 *Momrodica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. 干燥成熟种子正品。对羟基桂皮醛、松柏醛、对羟基苯甲醛、3-甲氧基对羟基苯甲醛、ligballinol, 质量分数均 >95%, 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; 磺酰罗丹明 B (SRB) 试剂盒, 美国 Sigma 公司; 瑞氏-吉姆萨染液, Baso 公司; 胎牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶, 美国 GIBCO 公司; 经典细胞分化诱导剂福司克林, Santa Cruz 公司。qPCR 染料, Transgene 公司。二甲基亚砜 (DMSO), 北京北化精细化学品公司。

1.2 细胞培养

小鼠黑素瘤 B16 细胞, 购自中国科学院上海细胞库。

1.3 仪器

台式离心机, 德国 Heraeus 公司; LH50A 型倒置相差显微镜, 日本 Olympus 公司; 无菌滤器, 日本 Millipore 公司; JA5003 电子分析天平, 上海精科天平厂; 全自动高压蒸汽消毒器, 日本三洋公司; SCR20B 型低温高速离心机, 日本日立公司; HT2 型酶标仪, 奥地利 Anthos 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

B16 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液 (含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/mL), 于 37 $^{\circ}$ 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。

2.2 SRB 法检测 B16 细胞生长

2.2.1 木鳖子 5 个单体化合物对细胞生长的影响 取对数生长期 B16 细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 加入 96 孔培养板中, 每孔 90 μ L, 待细胞贴壁良好后加入不同质量浓度的对羟基桂皮醛、松柏醛、对羟基苯甲醛、3-甲氧基对羟基苯甲醛、ligballinol 10 μ L (使终质量浓度分别为 2、4、6、8 μ g/mL), 每一质量浓度 3 个复孔, 以只加培养液作为对照组, 以只有培养液无细胞作为空白对照组, 培养 48 h, 弃上清, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 1 次, 4 $^{\circ}$ C 下用 10% 三氯乙酸固定 1 h, 蒸馏水冲洗 4~5 遍, 室温晾干, 4 mg/mL SRB 染液 100 μ L 染色 15 min, 弃染液, 1% 乙酸轻洗 4~5 遍, 滴加 10 mmol Trisbase 100 μ L 摇床上摇 15 min, 酶标仪检测 490 nm 处吸光度 (*A*) 值, 计算细胞生长抑制率 (IR)。

$$IR = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.2 对羟基桂皮醛对细胞生长的影响 细胞加药前处理同“2.2.1”项。待细胞贴壁良好后加入不同质量浓度 (使终质量浓度分别为 2、4、6、8 μ g/mL) 对羟基桂皮醛 10 μ L 或阳性对照药福司克林 (终浓度为 5 μ mol/mL), 以只加培养液作为对照组, 以只有培养液无细胞作为空白对照组, 培养 72 h 后弃上清, PBS 洗 1 次, 用 10% 三氯乙酸于 4 $^{\circ}$ C 固定 1 h, 蒸馏水冲洗 4~5 遍, 室温晾干, 4 mg/mL SRB 染液 100 μ L 染色 15 min, 弃染液, 1% 乙酸轻洗 4~5 遍, 滴加 10 mmol Trisbase 100 μ L 于摇床上摇 15 min, 酶标仪检测 490 nm 处 *A* 值, 每一质量浓度设立 3 个复孔。IR 计算同“2.2.1”项。

2.3 显微镜和瑞氏-吉姆萨染色法观察对羟基桂皮醛对 B16 细胞形态的影响

细胞加药前处理同“2.2.1”项。待细胞贴壁良好后, 加入对羟基桂皮醛 10 μ L, 使终质量浓度为 6 μ g/mL, 以只加培养液作为对照组, 分别培养 24、48、72 h 后, 倒置相差显微镜下 ($\times 200$) 观察细胞形态。弃上清, PBS 洗 1 次, 晾干, 70% 乙醇固定 20 min, 晾干, 滴加瑞氏-吉姆萨染液染色 1 min, 蒸馏水冲洗 2~3 遍, 再加入瑞氏-吉姆萨染液 (原液与蒸馏水比例 1:2) 染液, 静置 13~15 min, 用清水冲洗干净后立即吹干, 普通光学显微镜下 ($\times 200$) 观察结果。

2.4 比色法检测对羟基桂皮醛对 B16 细胞黑色素的量和酪氨酸酶活性

2.4.1 B16 细胞黑色素量的检测^[6] 将对数生长期 B16 细胞制成单细胞悬液, 以每孔 1×10^5 /mL 接种

于6孔培养板,每孔1.8 mL。待细胞贴壁良好后,加入不同质量浓度的对羟基桂皮醛(使终质量浓度分别为2、4、6 $\mu\text{g/mL}$)或阳性对照药福司克林(终浓度为5 $\mu\text{mol/mL}$),以只加培养液作为对照组。将细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养48 h,倾去培养液,用生理盐水洗2次,0.25%胰酶消化,收集细胞,调整每组细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,每个质量浓度设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溶液(含10% DMSO)200 μL 中,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温2 h后转移至96孔培养板内,测475 nm处A值。

2.4.2 B16 细胞酪氨酸酶活性检测^[7-9] 细胞加药前处理同“2.4.1”项。待细胞贴壁良好后加入不同质量浓度对羟基桂皮醛(使终质量浓度为2、4、6 $\mu\text{g/mL}$)或者阳性对照药福司克林(终浓度为5 $\mu\text{mol/mL}$),以只加培养液作为对照组。细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养48 h,倾去培养液,用生理盐水洗2次,0.25%胰酶消化,收集细胞,调整每组细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,设3个平行

管,每管1 mL,1 000 $\times g$ 离心5 min,倾去上清液,细胞团溶于0.5%脱氧胆酸钠溶液100 μL 中,充分振荡使细胞溶解,0 $^{\circ}\text{C}$ 放置15 min,试管37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温10 min后加入1%左旋多巴继续孵育2 h,再转移至96孔培养板内,测475 nm处A值。

2.5 RT-PCR 法检测对羟基桂皮醛对酪氨酸酶基因表达的影响

取对数生长期 B16 细胞,加入质量浓度为6 $\mu\text{g/mL}$ 的对羟基桂皮醛,以只加培养液作为空白对照组,每组3个复孔,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养6、12、24 h,用预冷的PBS洗2遍,用核酸提取试剂盒提取总RNA,用反转录试剂盒反转录为cDNA;以反转录出的cDNA为模板,加入相对应目的基因的上下游引物和qPCR染料,用RT-PCR仪进行检测。目的基因引物序列和片段长度见表1。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸25 s,40个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,终止反应。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行半定量分析^[9]。

表1 目的基因引物序列及产物片段长度

Table 1 Primer sequences of target genes and length of product segments

基因	引物序列	产物长度 / bp
酪氨酸酶	正向引物: 5'-GGAACACCTGAGGGACCACTATTAC-3'	426
	反向引物: 5'-GAGCGGTATGAAAGGAACCATGTA-3'	
酪氨酸酶相关蛋白-1	正向引物: 5'-ATCAGGTTTGGGCTCAGTTTCC-3'	283
	反向引物: 5'-CGGCAAGTCCCACAGTTGTGT-3'	
酪氨酸酶相关蛋白-2	正向引物: 5'-ATTGCCTGTCTCTCCAGAAGTTTG-3'	457
	反向引物: 5'-CCCAGGATTCCAATGACCACT-3'	
GAPDH	正向引物: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'	247
	反向引物: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

2.6 统计学处理

采用SPSS13.0统计软件进行统计学处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD检验,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 B16 细胞生长的影响

3.1.1 木鳖子5个单体化合物对B16细胞生长的影响 与对照组相比,化合物质量浓度为2、4、6、8 $\mu\text{g/mL}$ 且作用于B16细胞48 h后,细胞数明显减少并呈质量浓度相关性,其中对羟基桂皮醛、3-甲氧基对羟基苯甲醛在8 $\mu\text{g/mL}$ 时对B16细胞生长的抑制率分别为 $(58.7 \pm 1.3)\%$ 、 $(50.8 \pm 3.9)\%$ (图1)。

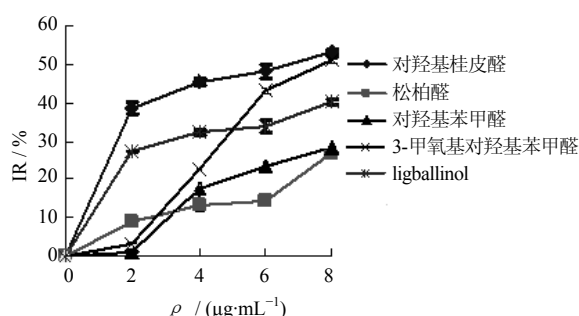


图1 木鳖子中5个单体化合物对B16细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effects of five monomer compounds in seeds of *M. cochinchinensis* on growth of B16 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

因此选择对细胞生长抑制作用较强的对羟基桂皮醛进行 B16 细胞分化等实验。

3.1.2 对羟基桂皮醛对 B16 细胞生长的影响 以对羟基桂皮醛 2、4、6 $\mu\text{g/mL}$ 及福司克林处理 B16 细胞 72 h 后, 对 B16 细胞生长的抑制率分别为 $(14.6 \pm 8.6)\%$ 、 $(66.8 \pm 1.4)\%$ 、 $(79.5 \pm 7.3)\%$ 、 $(40.3 \pm 4.6)\%$, 且呈质量浓度相关性。结果见图 2。

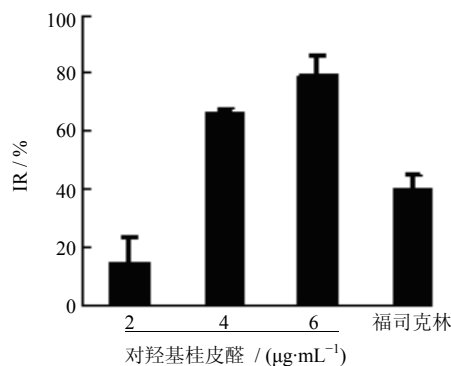


图2 对羟基桂皮醛对 B16 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of PHC on growth of B16 cells
($\bar{x} \pm s, n=3$)

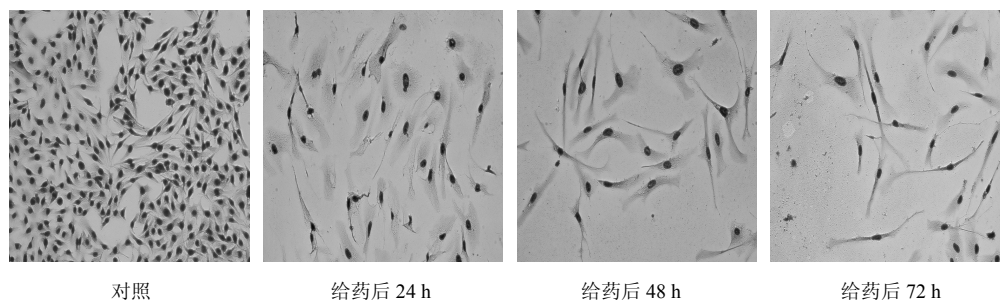
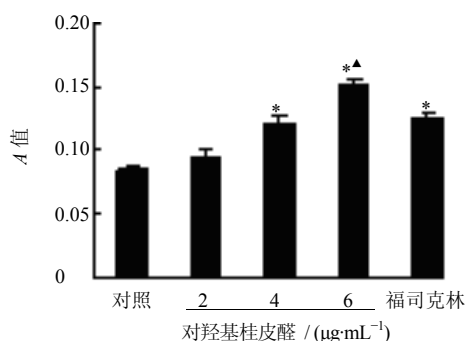


图3 对羟基桂皮醛给药后不同时间黑素瘤 B16 细胞形态观察

Fig. 3 Morphological changes of B16 cells treated with PHC for different time periods



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与福司克林组比较: ▲ $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ vs forskelin group, same as below

图4 对羟基桂皮醛对 B16 细胞黑色素量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of PHC on melanin amount of B16 cells
($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 对 B16 细胞形态的影响

以对羟基桂皮醛 6 $\mu\text{g/mL}$ 处理 B16 细胞 24、48、72 h 后, 细胞体积增大、变成梭形, 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。表明对羟基桂皮醛能够诱导黑素瘤 B16 细胞分化, 与前期研究结果相符^[5]。结果见图 3。

3.3 对 B16 细胞黑色素量的影响

对照组 B16 细胞黑色素 A 值为 0.081 ± 0.010 , 对羟基桂皮醛 2、4、6 $\mu\text{g/mL}$ 组 B16 细胞黑色素 A 值分别为 0.094 ± 0.006 、 0.121 ± 0.006 、 0.151 ± 0.005 ($P < 0.05$), 福司克林组为 0.124 ± 0.005 。由于正常黑素细胞产生黑色素的能力强于黑素瘤细胞^[10-12], 因此该结果证实对羟基桂皮醛能够诱导黑素瘤细胞向正常黑素细胞方向分化, 且 6 $\mu\text{g/mL}$ 组的作用强于福司克林。结果见图 4。

3.4 对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响

对照组 B16 细胞酪氨酸酶 A 值为 0.686 ± 0.047 , 对羟基桂皮醛 2、4、6 $\mu\text{g/mL}$ 组 B16 细胞酪氨酸酶 A 值分别为 1.212 ± 0.014 、 1.353 ± 0.047 、 1.406 ± 0.063 , 与

对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 福司克林组为 1.256 ± 0.007 , 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。表明对羟基桂皮醛能够增强 B16 细胞酪氨酸酶活性, 且 6 $\mu\text{g/mL}$ 组的作用强于福司克林。结果见图 5。

3.5 对 B16 细胞酪氨酸酶基因表达的影响

对照组 B16 细胞酪氨酸酶基因荧光时循环的平均数 ($C_{t\text{mean}}$) 为 12.155; 对羟基桂皮醛 6 $\mu\text{g/mL}$ 处理 B16 细胞 6、12、24 h 后, 酪氨酸酶基因 $C_{t\text{mean}}$ 值分别为 12.110、10.650、12.545, 通过计算 power 值, 3 组酪氨酸酶基因的表达水平分别是对照组的 1.055、1.906、3.233 倍。对羟基桂皮醛 6 $\mu\text{g/mL}$ 处理 B16 细胞 6、12、24 h 后, 酪氨酸相关蛋白-1 基因 $C_{t\text{mean}}$ 值分别为 12.407、12.241、11.498, 通过

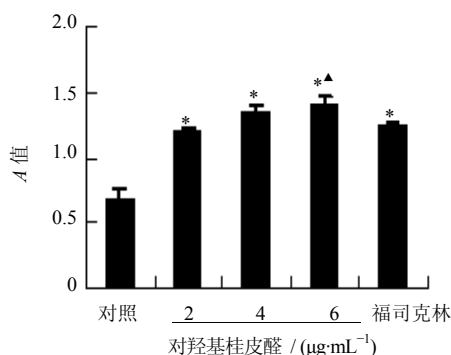


图5 对羟基桂皮醛对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of PHC on tyrosinase activity of B16 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

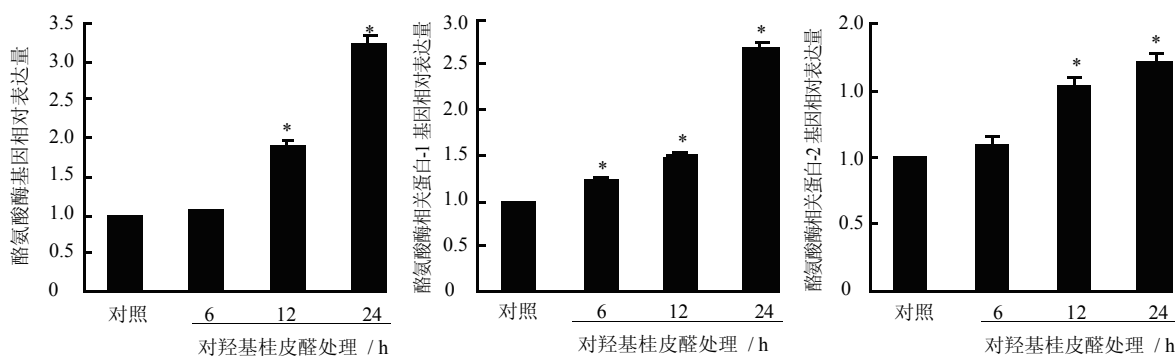


图6 对羟基桂皮醛对 B16 细胞酪氨酸酶基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of PHC on expression of tyrosinase mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表型, 有的恢复了正常细胞的某些功能^[13-15], 这对“一旦成为癌细胞, 永远是癌细胞”的观念提出挑战, 也为抗肿瘤药物研究开辟了一条新的途径。因此探寻新的高效、低毒的细胞诱导分化剂, 或以联合用药方式提高细胞分化效应, 对肿瘤的临床治疗具有积极的现实意义。

木鳖子是传统中药, 主要功效为消肿散结、解毒、追风止痛, 用于治疗痈肿、疔疮、无名肿毒等症。在前期研究中发现, 木鳖子醇提物可以诱导 B16 细胞分化^[5], 但木鳖子中的对羟基桂皮醛是否对 B16 细胞具有分化诱导作用尚不得知。本实验结果表明, 对羟基桂皮醛对 B16 细胞生长具有抑制作用, 可以促进 B16 细胞向正常细胞转化; 还可以使 B16 细胞黑色素的量增加, 酪氨酸酶活性增强 (酪氨酸酶是合成黑色素的关键酶), 且在较高质量浓度时的作用强于福司克林; 结果还显示, 对羟基桂皮醛可以上调酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1 及酪氨酸酶相关蛋白-2 基因表达水平, 说明对羟基桂皮醛不仅对 B16 细胞形态, 而且在细胞功能及基因水平方面

计算 power 值, 3 组酪氨酸相关蛋白-1 基因的表达水平分别是对照组的 1.22、1.478、2.688 倍。对羟基桂皮醛 6 $\mu\text{g/mL}$ 处理 B16 细胞 6、12、24 h 后, 酪氨酸相关蛋白-2 $C_{t_{\text{mean}}}$ 值分别为 12.763、12.565、11.893, 通过计算 power 值, 3 组酪氨酸相关蛋白-2 基因的表达水平分别是对照组的 1.079、1.539、1.717 倍。结果见图 6。表明对羟基桂皮醛能够上调酪氨酸酶、酪氨酸相关蛋白-1、酪氨酸相关蛋白-2 的基因表达水平。

4 讨论

大量研究表明, 在一些细胞分化诱导剂作用下, 肿瘤细胞可发生分化, 有的出现类似于正常细胞的

可以协同诱导 B16 细胞的分化。对羟基桂皮醛具有开发为黑素瘤细胞分化诱导剂的潜力, 但其诱导 B16 细胞分化的机制尚不清楚, 有待进一步的研究。

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(3): 105-156.
- [2] Wang N, Wang L W, Gou B D, *et al.* Realgar-induced differentiation is associated with MAPK pathways in HL-60 cells [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(12): 1497-1505.
- [3] 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.
- [4] 赵连梅, 韩丽娜, 商晓辉, 等. 木鳖子醇提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] Oikawa A, Nakayasu M. Quantitative measurement of melanin as tyrosine equivalents and as weight of purified melanin [J]. *Yale J Biol Med*, 1973, 46(5): 500-507.
- [6] Noriko H, Shunsuke N, Kenji O, *et al.* Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in

- murine B16 melanoma cells [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(14): 4897-4902.
- [7] Koo H M, VanBrocklin M, McWilliams M J, *et al.* Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 3052-3057.
- [8] Katya N, Aline C L, Lucelia D, *et al.* Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK1/2 pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 173(2): 122-128.
- [9] Keishi H, Kyoko I, Kazuyuki H, *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.
- [10] Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the K-melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells [J]. *FEBS Lett*, 2000, 476(3): 198-202.
- [11] Kikumi O, Keishi H. Melanoma cell differentiation induced by lupeol separates into two stages: morphological and functional changes [J]. *J Nat Med*, 2009, 63(3): 323-326.
- [12] Zequn J, Jimin X, Minghai L, *et al.* 2, 3, 5, 4'-tetra-hydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation [J]. *Life Sci*, 2009, 85(8/9): 345-350.
- [13] Ren K K, Wang H Z, Xie L P, *et al.* The effects of oridonin on cell growth, cell cycle, cell migration and differentiation in melanoma cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103(2): 176-180.
- [14] Keishi H, Toshiyuki M, Noriyuki T, *et al.* Differentiation-inducing activity of lupane triterpenes on a mouse melanoma cell line [J]. *Cytotechnology*, 2006, 52(3): 151-158.
- [15] Eliezer F. Jasmonates in cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2007, 245(1/2): 1-10.