

芍药苷对人恶性黑色素瘤细胞 A375 增殖的体外抑制作用及其机制研究

林春玲¹, 赵延明^{2*}

1. 武警后勤学院附属医院 皮肤科, 天津 300162

2. 黑龙江省皮肤病防治研究所 皮肤科, 黑龙江 哈尔滨 150001

摘要: 目的 探讨芍药苷对人恶性黑色素瘤细胞 A375 增殖的体外抑制作用及其作用机制。方法 不同浓度芍药苷(3、10、30 $\mu\text{mol/L}$)作用于黑色素瘤细胞 A375, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞周期情况, Western blotting 法检测 NF κ B p65 信号通路激活情况及下游靶分子 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin E 的表达。结果 与对照组比较, 随着给药浓度的增加, 芍药苷对黑色素瘤细胞 A375 抑制作用逐渐增强, 30 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 时抑制作用最高, 并使 A375 细胞周期阻滞在 G1 期; 芍药苷显著抑制 NF κ B p65、I κ B α 的磷酸化, 下调 Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin E 的表达, 上调 Bax 表达, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 芍药苷能抑制人黑色素瘤细胞 A375 体外增殖, 可能是通过 NF- κ B 信号通路发挥作用的。

关键词: 芍药苷; 人恶性黑色素瘤细胞 A375; 增殖; NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)05-0509-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.05.007

Inhibition of paeoniflorin on proliferation of human malignant melanoma cell A375 *in vitro* and its mechanismLIN Chun-ling¹, ZHAO Yan-ming²

1. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Armed Police Logistics College, Tianjin 300162, China

2. Department of Dermatology, Heilongjiang Province Institute of Dermatology, Harbin 150001, China

Abstract: Objective To study inhibitory action of paeoniflorin on human malignant melanoma cell A375 *in vitro* and explored its mechanism. **Methods** A375 cells were treated with paeoniflorin (3, 10, and 30 $\mu\text{mol/L}$). The viability of the cell was detected by MTT assay. Cell cycle change was detected by flow cytometry. The activation of NF κ B p65 signaling pathway and expression of Bax, Bcl-2, Cyclin D1, and Cyclin E were assessed by Western blotting method. **Results** Compared with control group, paeoniflorin (3, 10, and 30 $\mu\text{mol/L}$) could reduce cell viability, the inhibitory effect was highest in 48 h at concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$. Moreover, paeoniflorin could make A375 cell arrest in G1 phase. Western blotting assays presented paeoniflorin could suppress the phosphorylation of NF κ B p65 and I κ B α , down-regulate the expression of Bcl-2, and up-regulate the expression of Bax, Cyclin D1, and Cyclin E with significant differences ($P < 0.01$). **Conclusion** Paeoniflorin has inhibitory action on the proliferation of human malignant melanoma cell A375 *in vitro*, which may be related to NF- κ B signal pathway.

Key words: paeoniflorin; human malignant melanoma cell A375; proliferation; NF- κ B signal pathway

恶性黑色素瘤是一种来源于黑素细胞、高度恶性的肿瘤,多发生于皮肤,发病率呈逐年上升趋势^[1]。由于黑素瘤本身的高增殖性和微环境血供丰富等特点,有利于该肿瘤的生长、浸润,对放化疗不敏感,易产生治疗耐受,预后差^[2]。干扰素 $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$)、白细胞介素-2 (IL-2) 等黑色素瘤辅助治疗药物的

毒副作用较大,价格昂贵,并且很难与其他方法联合治疗,临床化疗效果很差,因此寻求有效的新型化疗药物,为临床治疗黑色素瘤提供实验依据具有重大意义。赤芍总苷是从毛茛科植物芍药 *Paeonia Lactiflora* Pall. 中提取的有效成分,单独或联合用药可诱导人黑色素瘤细胞凋亡,与促进 Bcl-2 表达、

收稿日期: 2015-02-06

作者简介: 林春玲 (1975—), 女, 黑龙江庆安人, 硕士, 主治医师、讲师, 主要从事皮肤性病学的研究。

Tel: (022)60578698 E-mail: linchunling9578@163.com

*通信作者 赵延明, 男, 工作于黑龙江省皮肤病防治研究所皮肤科。E-mail: zhaoyanming1280@126.com

抑制 Bax 表达有关^[3]。芍药苷是赤芍总苷中分离出来的主要活性成分之一,具有抗胃癌^[4]、肝癌^[5-6]、黑色素瘤^[7]等多种肿瘤细胞活性。芍药苷对于黑色素瘤的抑制作用与 NFκB p65 mRNA 表达有关^[7],因此本实验在此基础上从蛋白水平研究芍药苷是否可通过 NFκB 信号通路对人恶性黑色素瘤细胞 A375 体外增殖具有抑制作用。

1 材料

人恶性黑色素瘤细胞 A375 购于中国科学院细胞库,培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中。芍药苷购自中国食品药品检定研究院,质量分数>98%。

四唑盐试剂 (MTT) 购于 Sigma 公司; β-actin、BCA 法蛋白定量试剂盒、细胞周期检测试剂盒均购于碧云天生物技术研究所;兔抗 NFκB p65、Bax、Bcl-2 抗体购自 Epitomics 公司;兔抗 IkBα、p-IkBα、Cyclin D1、Cyclin E 抗体均购自 Abcam 公司;胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶购于 Gbico 公司。

2 方法

2.1 MTT 实验

将 80%左右融合的细胞 A375 消化,浓度调整为 $4 \times 10^3/\text{mL}$,接种, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入含 5%胎牛血清的 DMEM 培养基,加入芍药苷使终浓度分别为 3、10、30 $\mu\text{mol/L}$,继续培养 48 h,加 MTT (5 mg/mL) 20 μL ,培养 4 h 后,弃上清,加 DMSO 150 μL ,待结晶充分溶解后,570 nm 处测定吸光度 (A) 值,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = A_{\text{药物}} / A_{\text{空白}}$$

2.2 细胞周期检测

将处于对数生长期的人恶性黑色素瘤细胞 A375 消化,浓度调整为 $8 \times 10^3/\text{mL}$,接种, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入含 5%胎牛血清的 DMEM 培养基,加入芍药苷使终浓度分别为 3、10、30 $\mu\text{mol/L}$,继续培养 48 h,收集细胞。按细胞周期检测试剂盒说明书进行检测。

2.3 Western blotting

收集细胞,裂解并收获蛋白。根据 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白样品上样,跑 SDS 凝胶电泳,湿法转膜。一抗孵育, 4°C 过夜;二抗室温孵育 1~2 h。漂洗,滴加 ECL 曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用 Quantity one 软件对各抗体条带灰度值进行统计。

2.4 数据分析

所有数据至少重复 3 次,并用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两

组之间经 t 检验显著性差异,所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析。

3 结果

3.1 对人恶性黑色素瘤细胞 A375 活力的抑制作用

随着给药浓度的增加,芍药苷对黑色素瘤细胞 A375 抑制作用逐渐增强,在 30 $\mu\text{mol/L}$ 时,抑制率最大;随着 24、48、72 h 给药时间增加,芍药苷对黑色素瘤细胞 A375 抑制作用也逐渐增强,其中 48、72 h 作用强度一致,所以在后续实验中选取 48 h 作为给药时间。结果见表 1。

表 1 芍药苷对人恶性黑色素瘤细胞 A375 活力的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Inhibition of paeoniflorin on activity of human malignant melanoma cell A375 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	0	0.10±0.02	3.01±0.32	3.12±0.54
芍药苷	3	3.50±0.30*	34.54±3.12**	34.31±2.93**
	10	16.50±0.95**	53.78±4.31**	53.83±6.14**
	30	30.70±2.10**	65.37±5.64**	65.24±5.32**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

3.2 对人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞周期影响

给药 48 h,随着芍药苷给药浓度的增加,G1 期的细胞明显增多,从 (53.19 ± 5.07)% 增加到 (73.15 ± 7.36)%,差异具有统计学意义 ($P<0.01$);随着给药浓度的增加,S 期的细胞明显减少,从 (35.34 ± 4.39)% 降低到 (20.96 ± 2.67)%,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。提示芍药苷使人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞周期停滞在 G1 期。结果见表 2。

表 2 芍药苷对人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞周期影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of paeoniflorin on cell cycle in human malignant melanoma cell A375 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	给药浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G1/%	S/%	G2/%
对照	0	53.19±5.07	35.34±4.39	11.38±2.12
芍药苷	50	56.73±5.23*	26.40±3.12*	16.87±1.13**
	100	64.89±7.68**	22.63±2.14*	12.48±1.63**
	200	73.15±7.36**	20.96±2.67*	5.89±1.01**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

3.3 对人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞 NFκB p65 信号通路的影响

与对照组比较,随着给药浓度的增加,芍药苷能显著抑制 NFκB p65 和 IκBα 的磷酸化(磷酸化后的相应蛋白分别为 p-NFκB p65、p-IκBα),差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。不管给药与否,皆不影响 NFκB p65 和 IκBα 自身的表达。结果见图 1。

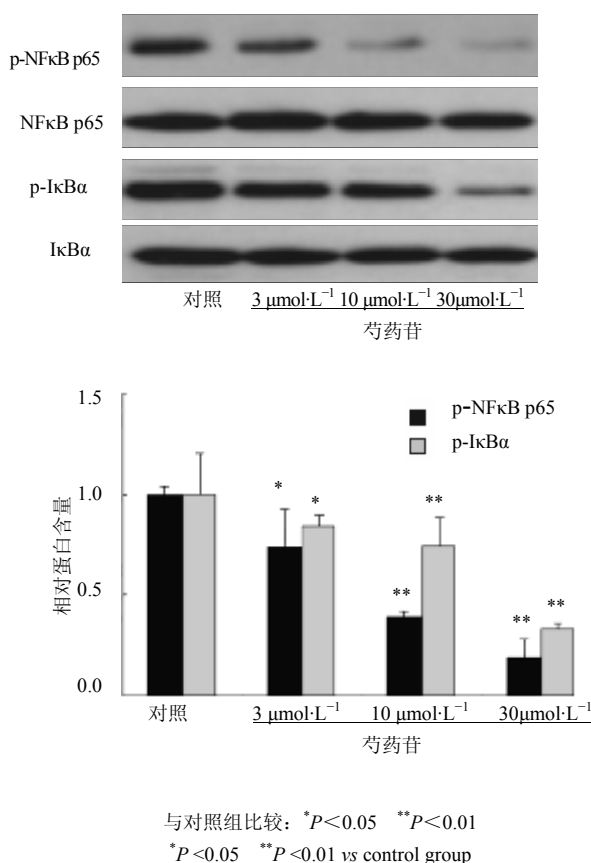


图 1 芍药苷对人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞 NFκB p65 信号通路的影响

Fig. 1 Effect of paeoniflorin on NFκB p65 signal pathway in human malignant melanoma cell A375

3.4 对人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞凋亡蛋白的影响

与对照组比较,随着给药浓度的增加,芍药苷能显著抑制 Bcl-2 表达,促进 Bax 蛋白的表达,差异均具有统计学意义 ($P<0.01$)。结果见图 2。

3.5 对人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞周期蛋白的影响

与对照组比较,3、10、30 μmol/L 芍药苷均能显著抑制 Cyclin D1 和 Cyclin E 表达,差异均具有统计学意义 ($P<0.01$)。结果见图 3。

4 讨论

黑色素瘤是死亡率最高的一种皮肤恶性肿瘤,80%的皮肤肿瘤死亡都是恶性黑色素瘤,5 年生存

率不足 20%。芍药苷具有高效低毒的特点,有抗肝癌、肺癌活性^[3-5]。本实验通过芍药苷作用人恶性黑色素瘤细胞 A375 48 h 后,发现 3、10、30 μmol/L 芍药苷可显著抑制 A375 细胞活力,与芍药苷对其他肿瘤细胞抑制作用浓度有稍许差别^[4-5],这可能是各种肿瘤细胞抵抗外环境不同所造成的,对各种药物敏感程度不一样所致的。

恶性黑色素瘤是一类以细胞过度生长和无限增殖为主要特征的疾病,发生的主要原因是细胞周期调节机制的破坏和促凋亡能力的减弱,此过程受多种信号通路的调节,NFκB 信号通路就是其中之一^[8]。静息状态下,NF-κB 与其抑制因子 IκB 结合成复合物存在于细胞浆中,没有生物活性,在肿瘤细胞或其他应激条件刺激下,NF-κB 被激活转移到细胞核内,结合在靶基因启动子的 NF-κB 反应元件处,启动 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin E 等相关靶基因的转录,参与细胞凋亡和细胞周期调控等病理生理过程^[9-10]。NFκB 在肝癌^[11]、胃癌^[12]、乳腺癌^[13]中都被激活,过表达。在黑色素瘤中 NFκB 持续被激

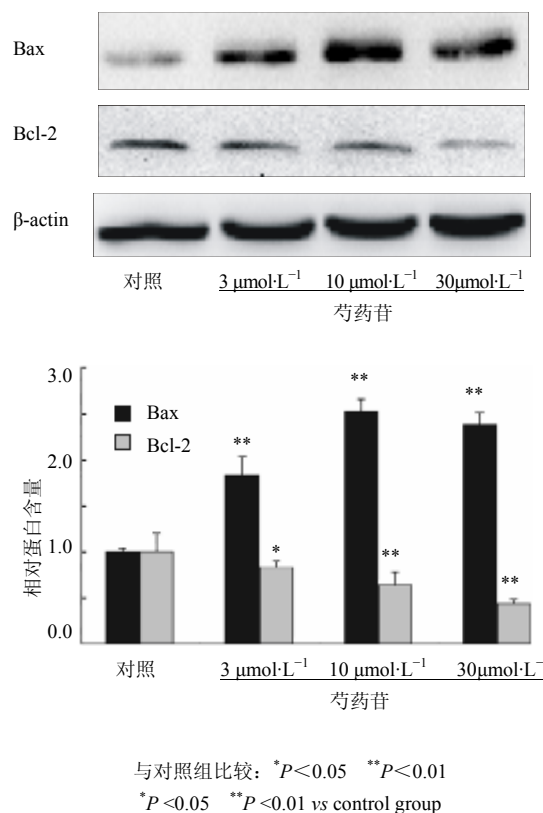


图 2 芍药苷对人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞凋亡蛋白的影响

Fig. 2 Effect of paeoniflorin on expression of cell apoptotic protein in human malignant melanoma cell A375

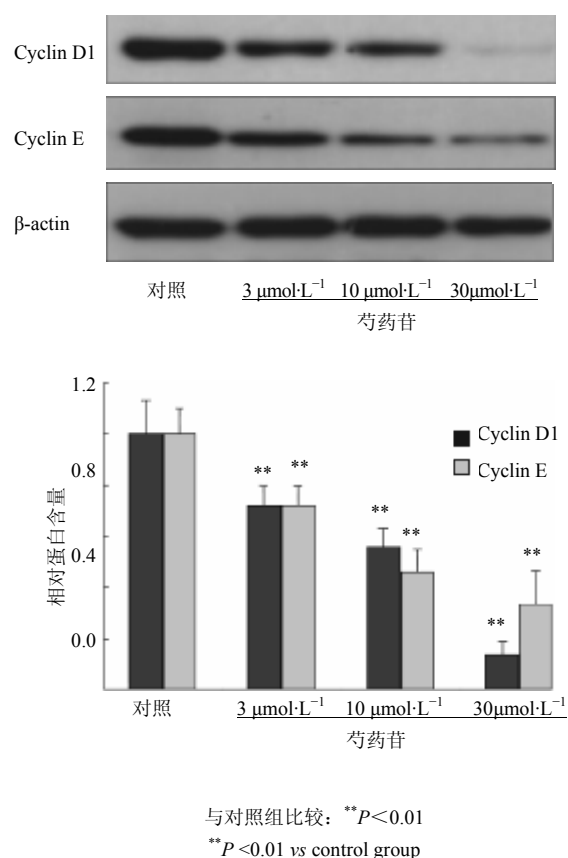


图3 芍药苷对人恶性黑色素瘤细胞 A375 细胞周期蛋白的影响
Fig. 3 Effect of paeoniflorin on expression of cell cycle protein in human malignant melanoma cell A375

活,与恶性肿瘤的发生、发展及预后不良有密切相关^[14]。裸鼠的高转移性黑素瘤的微血管密度检查研究发现,对 NFκB 的抑制可使血管生成减少^[15]。NFκB 抑制剂 PDTC 可抑制 NFκB 活性,抑制肿瘤细胞增殖^[16]。本实验也发现在黑色素瘤细胞 A375 细胞中,NFκB p65、IκBα 磷酸化程度较高,随着芍药苷作用浓度的增加,能逐渐抑制 NFκB p65、IκBα 的磷酸化。相关研究也证实芍药对于 A375 的生长抑制作用可能是通过抑制 NFκB p65 mRNA 表达来实现的^[7]。因此推测芍药苷具有抑制人恶性黑色素瘤细胞 A375 体外增殖作用,与 NFκB 信号通路有关。

细胞凋亡也称细胞程序化死亡,是一种在基因调控下的自主性细胞死亡方式。凋亡对于肿瘤的治疗具有重要意义,大多数药物都可通过诱导细胞凋亡发挥抗癌作用。其中 Bax 是典型的促凋亡蛋白,Bcl-2 有拮抗促凋亡蛋白的功能,受上游信号刺激,可发生多聚化,进一步发出凋亡信号,引起细胞凋亡。Bax 低表达、Bcl-2 过表达与黑色素瘤的发生发

展密切相关,也是预后不良的标志^[17]。赤芍总苷^[3]、槐耳水提取物^[18]、狼毒提取物^[19]可上调 Bax 表达,下调 Bcl-2 表达,促进黑色素瘤细胞凋亡。本实验研究发现,与对照组比较,芍药苷可剂量相关性地促进 Bax 表达,抑制 Bcl-2 表达,从而诱导黑色素瘤细胞凋亡。

大多数抗肿瘤药物可以使细胞周期停滞于 G1 期或 G2/M 期^[20-21]。目前认为,细胞周期进程调控紊乱是导致肿瘤发生和发展的直接原因。恶性黑色素瘤细胞的发生常伴随着细胞周期蛋白过度活化,导致细胞周期失控,细胞不可控制增殖^[22-23]。G1 期相关的最主要的细胞周期素是 Cyclin D1,与肿瘤细胞的增殖有关系。人肺动脉平滑肌细胞敲除 Cyclin D1 基因后,细胞阻滞在 G1/S 期,细胞增殖程度明显下降^[24]。王晓丽^[25]等发现 Cyclin D1 反义寡核苷酸能显著增加人恶性黑色素瘤细胞 G1 期细胞数目,降低 S 期细胞数目。Wang^[26]等发现,阻滞黑色素瘤细胞的 NFκB 通路下调 Cyclin D1 从而使细胞周期发生阻滞。Cyclin E 也是细胞周期 G1/S 期转换的关键调节因子,Cyclin E 过表达能缩短 G1 期,使细胞提前进入 S 期,造成细胞无限增殖,肿瘤形成,其在包括葡萄膜黑色素细胞瘤中都是过表达的^[27-28]。因此抑制 Cyclin E 的过表达,能显著抑制肿瘤细胞增殖。本实验研究发现,与对照组比较,芍药苷可剂量相关性抑制 Cyclin D1、Cyclin E 表达,从而抑制 A375 细胞体外增殖。

综上所述,芍药苷可显著抑制热恶性黑色素瘤细胞 A375 体外增殖能力,是通过上调 Bax 表达,下调 Bcl-2、Cyclin D1、Cyclin E,并使细胞周期阻滞在 G1 期来实现的,与 NFκB 信号通路有关。

参考文献

- [1] Reed J A, Medrano E E. Recent advances in melanoma research [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 3003-3013.
- [2] Rastrelli M, Tropea S, Rossi C R, et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification [J]. *In Vivo*, 2014, 28(6): 1005-1011.
- [3] 王亚珍,吕品田,王凤红,等.赤芍总苷对人黑色素瘤细胞株凋亡诱导的作用机制[J].*中国老年学杂志*, 2011, 31(23): 4606-4608.
- [4] 晏雪生,李瀚旻,彭亚琴,等.芍药苷对人肝癌细胞 HepG-2 凋亡及其调控基因的影响[J].*中华中医药学刊*, 2007, 25(7): 1346-1347.
- [5] 方申存,戴伟,吴昊,等.芍药苷对人胃癌 SGC7901/VCR 细胞增殖抑制作用及其机制研究[J].

- 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 30(5): 636-640.
- [6] Fang S, Zhu W, Zhang Y, *et al.* Paeoniflorin modulates multidrug resistance of a human gastric cancer cell line via the inhibition of NF- κ B activation [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(2): 351-356.
- [7] 张建青. 芍药苷对黑色素瘤 A375 增殖及 NF- κ -B 影响的研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2011.
- [8] Watanabe M, Umezawa K, Higashihara M, *et al.* Combined inhibition of NF- κ B and Bcl-2 triggers synergistic reduction of viability and induces apoptosis in melanoma cells [J]. *Oncol Res*, 2013, 21(4): 173-180.
- [9] Nihal M, Roelke C T, Wood G S. Anti-melanoma effects of vorinostat in combination with polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) [J]. *Pharm Res*, 2010, 27(6): 1103-1114.
- [10] Thu Y M, Su Y, Yang J, *et al.* NF- κ B inducing kinase (NIK) modulates melanoma tumorigenesis by regulating expression of pro-survival factors through the β -catenin pathway [J]. *Oncogene*, 2012, 31(20): 2580-2592.
- [11] Huang X, Qin J, Lu S. Kanglaite stimulates anticancer immune responses and inhibits HepG2 cell transplantation-induced tumor growth [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4): 2153-2159.
- [12] Cheng C Y, Hu C C, Yang H J, *et al.* Inhibitory effects of scutellarein on proliferation of human lung cancer A549 cells through ERK and NF κ B mediated by the EGFR pathway [J]. *Chin J Physiol*, 2014, 57(4): 182-187.
- [13] Zeng L, Zhen Y, Chen Y, *et al.* Naringin inhibits growth and induces apoptosis by a mechanism dependent on reduced activation of NF- κ B/COX-2-caspase-1 pathway in HeLa cervical cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(5): 1929-1936.
- [14] Hu S, Luo Q, Cun B, *et al.* The pharmacological NF- κ B inhibitor BAY11-7082 induces cell apoptosis and inhibits the migration of human uveal melanoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 15653-15667.
- [15] 房东亮. IL-23 对小鼠黑色素瘤血管生成的影响 [D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- [16] Madonna G, Ullman C D, Gentilcore G, *et al.* NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma [J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 53.
- [17] Zhang H, Rosdahl I. Expression of oncogenes, tumour suppressor, mismatch repair and apoptosis-related genes in primary and metastatic melanoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(6): 1149-1153.
- [18] Zhang F, Zhang Z, Liu Z. Effects of Huaier aqueous extract on proliferation and apoptosis in the melanoma cell line A875 [J]. *Acta Histochem*, 2013, 115(7): 705-711.
- [19] Wang L, Duan H, Wang Y, *et al.* Inhibitory effects of Lang-du extract on the *in vitro* and *in vivo* growth of melanoma cells and its molecular mechanisms of action [J]. *Cytotechnology*, 2010, 62(4): 357-366.
- [20] Orabi K Y, Abaza M S, El Sayed K A, *et al.* Selective growth inhibition of human malignant melanoma cells by syringic acid-derived proteasome inhibitors [J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 82.
- [21] Bedolla D E, Kenig S, Mitri E, *et al.* Determination of cell cycle phases in live B16 melanoma cells using IRMS [J]. *Analyst*, 2013, 138(14): 4015-4021.
- [22] Lee B, Sandhu S, Mcarthur G. Cell cycle control as a promising target in melanoma [J]. *Curr Opin Oncol*, 2015, 27(2): 141-150.
- [23] Tang H C, Chen C Y. Drug design of cyclin-dependent kinase 2 inhibitor for melanoma from traditional Chinese medicine [J]. *Biomed Res Int*, 2014: 798742.
- [24] Xiang M, Xu Y J, Liu X S, *et al.* Cigarette smoke extract promotes human pulmonary artery smooth muscle cells proliferation through protein kinase C α -dependent induction of cyclin D1 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(24): 3663-3670.
- [25] 王晓丽, 田美丽, 王 梅, 等. Cyclin D₁ 反义寡核苷酸对人黑色素瘤细胞周期的影响及对细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2002, 23(4): 342-343.
- [26] Wang J J, Zhang W, Sanderson B J. Altered mRNA expression related to the apoptotic effect of three xanthenes on human melanoma SK-MEL-28 cell line [J]. *Biomed Res Int*, 2013: 715603.
- [27] 张桂珍. CyclinE、p27、p53 在皮肤鳞状细胞癌中的表达及相关性 [J]. 中国现代医生, 2011, 49(28): 112-113.
- [28] Alekseenko A, Wojas-Pelc A, Lis G J, *et al.* Expression of cyclins A and E in melanocytic skin lesions and its correlation with some clinicopathologic features [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2012, 50(2): 263-269.