

• 论 著 •

川楝素抑制 AKT/GSK-3 β / β -catenin 通路对恶性黑色素瘤细胞增殖、凋亡和上皮间质转化的影响

皮庆友, 赵 媛, 陈 璐

山东省立第三医院皮肤科, 山东济南 250031

摘要:目的 探讨川楝素(TSN)对恶性黑色素瘤(MM)细胞增殖、凋亡和上皮间质转化(EMT)的影响及其作用机制。方法 将 MM 细胞分为对照(NC)组、TSN 低剂量组(10 μ mol/L)、TSN 中剂量组(20 μ mol/L)、TSN 高剂量组(40 μ mol/L)、SC79 组[TSN+蛋白激酶 B(AKT)激活剂(SC79)]、SC79+CP21R7 组[TSN+SC79+糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)抑制剂(CP21R7)]。采用 CCK-8 法测定细胞活力,流式细胞术检测细胞凋亡,划痕实验及 Transwell 检测迁移和侵袭,蛋白质印迹法(Western blot)检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、酶切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(C-caspase-3)、波形蛋白(Vimentin)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、AKT、磷酸化 AKT(p-AKT) Ser⁴⁷³、GSK-3 β 、磷酸化 GSK-3 β (p-GSK-3 β) Ser⁹、 β -连环蛋白(β -catenin)水平。结果 MM 细胞活力随着 TSN 浓度的升高逐渐降低($P<0.05$)。与 NC 组比较,TSN 低剂量组、TSN 中剂量组、TSN 高剂量组细胞活力、划痕愈合率、侵袭能力及 Bcl-2、N-cadherin、Vimentin、p-AKT Ser⁴⁷³、p-GSK-3 β Ser⁹、 β -catenin 水平降低,凋亡率及 Bax、C-caspase-3、E-cadherin 水平升高($P<0.05$);与 TSN 高剂量组比较,SC79 组细胞活力、划痕愈合率、侵袭能力及 Bcl-2、N-cadherin、Vimentin 水平升高,凋亡率及 Bax、C-caspase-3、E-cadherin 水平降低($P<0.05$)。CP21R7 可降低 SC79 对 TSN 治疗的抑制作用。结论 TSN 能抑制 MM 细胞增殖,促进凋亡,抑制 EMT 发生,其作用机制可能与 TSN 抑制 AKT/GSK-3 β / β -catenin 通路有关。

关键词:恶性黑色素瘤; 凋亡; 上皮间质转化; 川楝素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.11.011

中图法分类号:R739.5

文章编号:1673-4130(2023)11-1334-06

文献标志码:A

Effect of toosendanin on proliferation, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition of malignant melanoma cells by inhibiting AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway

PI Qingyou, ZHAO Yuan, CHEN Lu

Department of Dermatology, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan, Shandong 250031, China

Abstract: Objective To investigate the effects of toosendanin (TSN) on the proliferation, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of malignant melanoma (MM) cells and its mechanism. **Methods** The MM cells were divided into control (NC) group, TSN low dose group (10 μ mol/L), TSN medium dose group (20 μ mol/L), TSN high dose group (40 μ mol/L), SC79 group [TSN 40 μ mol/L+protein kinase B (AKT) activator (SC79) 10 nmol/L], SC79+CP21R7 group [TSN 40 μ mol/L+ SC79 10 nmol/L+ glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) inhibitor (CP21R7) 10 nmol/L]. CCK-8 assay was used to detect cell viability, flow cytometry was used to detect cell apoptosis, scratch test and Transwell were used to detect cell migration and invasion. The expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), enzyme digestion of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (C-caspase-3), Vimentin, E-cadherin, N-cadherin, AKT, phosphorylated AKT (p-AKT) Ser⁴⁷³, GSK-3 β , phosphorylated GSK-3 β (p-GSK-3 β) Ser⁹, β -catenin were detected by Western blot. **Results** The viability of MM cells decreased gradually with the increase of TSN concentration ($P<0.05$). Compared with NC group, the cell viability, scratch healing rate, invasion ability, Bcl-2, N-cadherin, Vimentin, p-AKT Ser⁴⁷³, p-GSK-3 β Ser⁹ and β -catenin levels were decreased, and the apoptosis rate, Bax, C-caspase-3, E-cadherin levels were increased in TSN low dose group, TSN medium dose group and TSN high dose group ($P<0.05$). Compared with the TSN high dose group, the cell viability, scratch healing rate, invasion ability, Bcl-2, N-cadherin and Vimentin levels were significantly increased, and the apoptosis rate, Bax, C-caspase-3, E-cad-

herin levels were decreased in the SC79 group ($P < 0.05$). CP21R7 reduced the inhibitory effect of SC79 on TSN treatment. **Conclusion** TSN can inhibit the proliferation of MM cells, promote apoptosis and reduce the occurrence of EMT. The mechanism may be related to the inhibition of AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway.

Key words: malignant melanoma; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition; toosendanin

恶性黑色素瘤(MM)是一种起源于黑色素细胞且恶性程度极高的肿瘤,已经成为世界上发病率增长最快的恶性肿瘤之一^[1]。MM可发生于皮肤、黏膜、内脏等部位,特别是在易摩擦部位具有更高发病率和致命性^[2]。目前手术切除恶性组织认为是治疗MM的最佳疗法,但其具有较高的复发率和死亡率,因此探寻MM的发病机制以寻求更好的治疗手段迫在眉睫。上皮间质转化(EMT)可使上皮细胞转化为间充质细胞,导致多种恶性肿瘤包括MM的迁移与侵袭^[3]。蛋白激酶B(AKT)可调节EMT过程,糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)是AKT的下游靶基因,受磷酸化AKT(p-AKT)调节,进而影响信号通路分子 β -连环蛋白(β -catenin)参与一系列细胞进程,介导EMT的发生^[4]。已有研究证明,通过抑制AKT/GSK-3 β / β -catenin通路的活化可抑制胃癌细胞EMT过程^[5]。川楝素(TSN)是三萜类化合物,具有镇痛、抗炎、抗肿瘤等作用,其中TSN能通过抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞EMT等多方面发挥抗肿瘤效果^[6]。已有研究表明,TSN通过抑制AKT/GSK-3 β / β -catenin通路来抑制结直肠癌细胞的生长并诱导其凋亡^[7]。然而,关于TSN对MM细胞的作用及其机制的报道较少,因此本研究对此进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人恶性黑色素瘤细胞A375购自美国ACCT细胞库。

1.2 仪器与试剂 TSN(纯度 $\geq 99\%$)购自中国食品药品检定研究院;胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、DMEM培养基购自美国Gibco公司;AKT激活剂(SC79)、GSK-3 β 抑制剂(CP21R7)购自美国Selleck Chemicals公司;CCK-8检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI检测试剂盒购自上海碧云天公司;Transwell小室购自美国Coster公司;TRIzol试剂盒购自沈阳万类生物公司;一抗B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、酶切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(C-caspase-3)、波形蛋白(Vimentin)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、AKT、p-AKT Ser⁴⁷³、GSK-3 β 、磷酸化GSK-3 β (p-GSK-3 β) Ser⁹、 β -catenin和 β -微管蛋白(β -actin)抗体购自美国赛默飞公司;二抗山羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶(HRP)购自美国Santa公司。流式细胞仪购自北京安诺伦公司;光学倒置显微镜购自德国Zeiss公司;蛋白电泳仪购自美国Bio-rad公司;全自动酶标仪购自

上海天能公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞复苏培养 将A375细胞在添加10% PBS的DMEM培养基中培养,并置于37℃、5% CO₂培养箱中,当细胞复苏至80%时,胰蛋白酶消化传代,每2~3天传代一次。

1.3.2 细胞毒性试验 将A375细胞接种于96孔板中,每孔 5×10^3 个细胞,培养24 h后,用不同浓度(0、1、5、10、20、40、60 μ mol/L)的TSN处理细胞,继续培养24 h后,加入10% CCK-8溶液(10 μ L)在37℃孵育2 h,酶标仪于450 nm处测量吸光度,计算细胞活力和半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.3.3 细胞分组与处理 将细胞分为5组,对照(NC)组(正常培养)、TSN低剂量组(10 μ mol/L)、TSN中剂量组(20 μ mol/L)、TSN高剂量组(40 μ mol/L)^[8]、SC79组(TSN 40 μ mol/L + SC79 10 nmol/L)、SC79 + CP21R7组(TSN 40 μ mol/L + SC79 10 nmol/L + CP21R7 10 nmol/L)。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将处理过的各组细胞分别接种于6孔板中,每孔 5×10^5 个细胞,培养24 h, PBS冲洗两遍后,按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒说明书逐步进行染色,用流式细胞仪检测细胞凋亡,确定细胞凋亡率。

1.3.5 划痕实验检测细胞迁移 将处理过的各组细胞分别接种于6孔板中,每孔 5×10^5 个细胞,培养24 h,用200 μ L移液器枪头进行“一”线性划痕,在显微镜下观察0 h和24 h的划痕宽度,记为W₀和W₂₄,迁移率=(W₀-W₂₄)/W₀×100%。

1.3.6 Transwell实验检测细胞侵袭 将基质胶包被在Transwell小室底膜上室,接种处理后的各组细胞(5×10^4 个/毫升),下室加入含有10% FBS的DMEM培养基,在37℃、5% CO₂中培养24 h。取出Transwell小室,弃去上室培养基,擦去上室细胞后, PBS洗涤、多聚甲醛固定、结晶紫染色,在光学倒置显微镜下计数。

1.3.7 蛋白质印迹法(Western blot)检测 将各组细胞破碎后提取总蛋白,用BCA试剂盒进行定量,按步骤将蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,于5%脱脂奶粉中封闭2 h,在4℃下加入一抗Bcl-2、Bax、C-caspase-3、Vimentin、E-cadherin、N-cadherin、AKT、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、 β -catenin(1:2 000)和 β -actin 4℃孵育过夜,清洗,在室温下加入二

抗山羊抗兔 IgG(1 : 1 000), 孵育 2 h。用 ECL 发光显影, 观察并拍照。各条带灰度值用 Image J 软件处理分析。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理和分析, 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, 两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TSN 对 A357 细胞的毒性作用 CCK-8 结果显示, 与无 TSN(0 $\mu\text{mol/L}$) 时比较, A357 细胞活力随着 TSN 浓度的升高而逐渐降低($P < 0.05$), 见表 1。TSN 对 A357 细胞的 IC_{50} 为 43.67 $\mu\text{mol/L}$ 。因此, 选择 10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续 TSN 的实验浓度。

表 1 不同浓度 TSN 对 A357 细胞的毒性作用($\bar{x} \pm s$)		
TSN 浓度($\mu\text{mol/L}$)	<i>n</i>	细胞活力(%)
0	6	100.00 $\pm$ 0.00
5	6	92.47 $\pm$ 9.26
10	6	85.38 $\pm$ 8.61 ^a
20	6	61.42 $\pm$ 6.89 ^a
40	6	52.13 $\pm$ 6.38 ^a
60	6	42.79 $\pm$ 5.28 ^a

注: 与 TSN 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.2 各组细胞凋亡情况 与 NC 组比较, TSN 低剂量组、TSN 中剂量组、TSN 高剂量组细胞凋亡率升高($P < 0.05$); 与 TSN 高剂量组比较, SC79 组细胞凋亡率降低($P < 0.05$); SC79+CP21R7 组与 TSN 高剂量组细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 SC79 组比较, SC79+CP21R7 组细胞凋亡率升高($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组细胞凋亡和 EMT 相关蛋白水平比较 与 NC 组比较, TSN 低剂量组、TSN 中剂量组、TSN 高剂量组 Bcl-2、N-cadherin、Vimentin 水平降低, Bax、C-caspase-3、E-cadherin 水平升高($P < 0.05$); 与 TSN 高剂量组比较, SC79 组 Bcl-2、N-cadherin、Vim-
entin 水平升高, Bax、C-caspase-3、E-cadherin 水平降

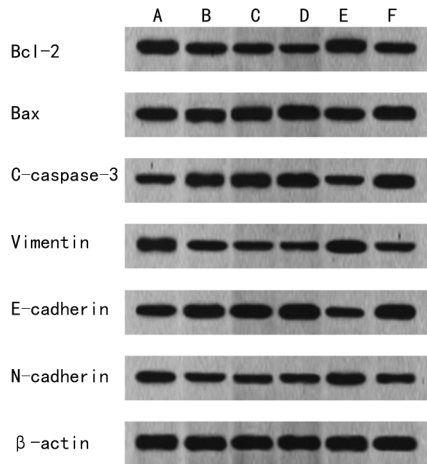
低($P < 0.05$); SC79+CP21R7 组与 TSN 高剂量组各蛋白水平差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 SC79 组比较, SC79+CP21R7 组 Bcl-2、N-cadherin、Vimentin 蛋白水平降低($P < 0.05$), Bax、C-caspase-3、E-cadherin 水平升高($P < 0.05$)。见图 1、表 3。

2.4 各组细胞迁移能力比较 与 NC 组比较, TSN 低剂量组、TSN 中剂量组、TSN 高剂量组细胞划痕愈合率降低($P < 0.05$); 与 TSN 高剂量组比较, SC79 组细胞划痕愈合率升高($P < 0.05$); SC79+CP21R7 组与 TSN 高剂量组划痕愈合率差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 SC79 组比较, SC79+CP21R7 组细胞划痕愈合率降低($P < 0.05$)。见图 2、表 4。

表 2 各组细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	凋亡率
NC 组	6	6.31 $\pm$ 0.93
TSN 低剂量组	6	23.16 $\pm$ 1.25 ^a
TSN 中剂量组	6	35.49 $\pm$ 2.17 ^a
TSN 高剂量组	6	43.68 $\pm$ 6.37 ^a
SC79 组	6	8.28 $\pm$ 1.15 ^b
SC79+CP21R7 组	6	44.39 $\pm$ 6.23 ^c

注: 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 TSN 高剂量组比较, ^b $P < 0.05$; 与 SC79 组比较, ^c $P < 0.05$ 。



注: A 为 NC 组; B 为 TSN 低剂量组; C 为 TSN 中剂量组; D 为 TSN 高剂量组; E 为 SC79 组; F 为 SC79+CP21R7 组。

图 1 各组细胞凋亡和 EMT 相关蛋白水平变化

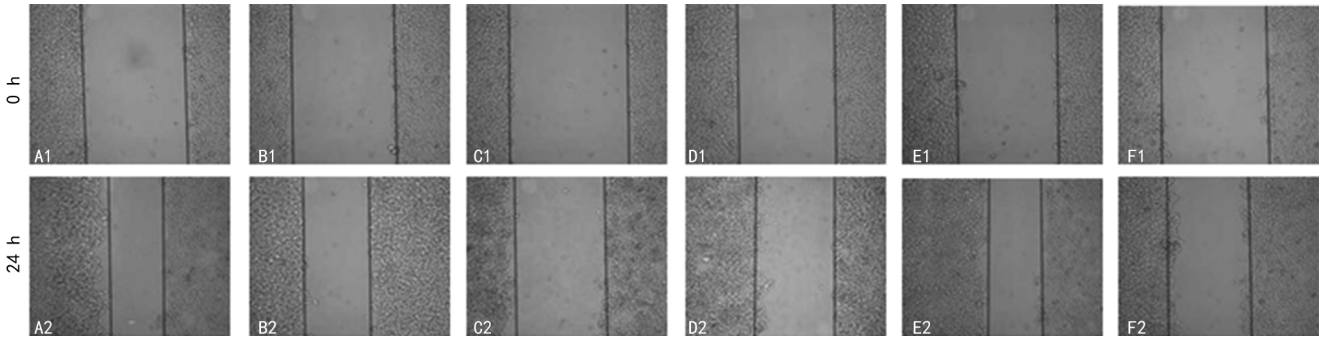
表 3 各组细胞凋亡和 EMT 相关蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Bcl-2	Bax	C-caspase-3	Vimentin	E-cadherin	N-cadherin
NC 组	6	1.08 $\pm$ 0.11	0.62 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.16	0.59 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.13
TSN 低剂量组	6	0.60 $\pm$ 0.09 ^a	0.97 $\pm$ 0.13 ^a	0.87 $\pm$ 0.05 ^a	0.58 $\pm$ 0.13 ^a	1.03 $\pm$ 0.15 ^a	0.42 $\pm$ 0.08 ^a
TSN 中剂量组	6	0.53 $\pm$ 0.07 ^a	1.03 $\pm$ 0.15 ^a	0.97 $\pm$ 0.12 ^a	0.42 $\pm$ 0.10 ^a	1.16 $\pm$ 0.26 ^a	0.38 $\pm$ 0.05 ^a
TSN 高剂量组	6	0.48 $\pm$ 0.08 ^a	1.19 $\pm$ 0.21 ^a	1.13 $\pm$ 0.16 ^a	0.35 $\pm$ 0.08 ^a	1.28 $\pm$ 0.25 ^a	0.32 $\pm$ 0.07 ^a
SC79 组	6	1.05 $\pm$ 0.13 ^b	0.65 $\pm$ 0.07 ^b	0.45 $\pm$ 0.10 ^b	0.91 $\pm$ 0.14 ^b	0.57 $\pm$ 0.08 ^b	0.67 $\pm$ 0.10 ^b
SC79+CP21R7 组	6	0.51 $\pm$ 0.09 ^c	1.13 $\pm$ 0.14 ^c	1.05 $\pm$ 0.16 ^c	0.38 $\pm$ 0.06 ^c	1.20 $\pm$ 0.23 ^c	0.34 $\pm$ 0.03 ^c

注: 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 TSN 高剂量组比较, ^b $P < 0.05$; 与 SC79 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

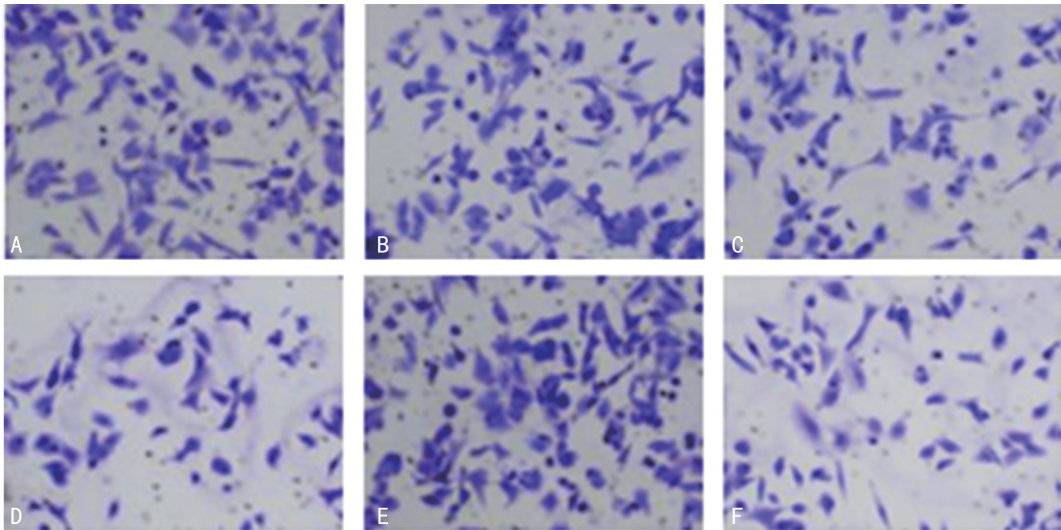
2.5 各组细胞侵袭能力比较 与 NC 组比较,TSN 低剂量组、TSN 中剂量组、TSN 高剂量组细胞侵袭数目减少($P<0.05$);与 TSN 高剂量组比较,SC79 组细胞侵袭数目增加($P<0.05$);SC79+CP21R7 组与

TSN 高剂量组细胞侵袭数目差异无统计学意义($P>0.05$);与 SC79 组比较,SC79+CP21R7 组细胞侵袭数目减少($P<0.05$)。见图 3、表 5。



注:A1、A2 为 NC 组;B1、B2 为 TSN 低剂量组;C1、C2 为 TSN 中剂量组;D1、D2 为 TSN 高剂量组;E1、E2 为 SC79 组;F1、F2 为 SC79+CP21R7 组。

图 2 划痕实验检测各组细胞迁移能力



注:A 为 NC 组;B 为 TSN 低剂量组;C 为 TSN 中剂量组;D 为 TSN 高剂量组;E 为 SC79 组;F 为 SC79+CP21R7 组。

图 3 各组细胞侵袭能力比较(结晶紫染色,×200)

表 4 各组细胞划痕愈合率比较($\bar{x}\pm s, \%$)		
组别	<i>n</i>	划痕愈合率
NC 组	6	50.13±4.02
TSN 低剂量组	6	35.35±3.31 ^a
TSN 中剂量组	6	28.52±2.65 ^a
TSN 高剂量组	6	21.37±2.16 ^a
SC79 组	6	53.12±6.11 ^b
SC79+CP21R7 组	6	23.15±2.16 ^c

注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 TSN 高剂量组比较,^b $P<0.05$;与 SC79 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.6 各组细胞通路蛋白水平比较 与 NC 组比较,TSN 低剂量组、TSN 中剂量组、TSN 高剂量组 p-AKT Ser⁴⁷³、p-GSK-3β Ser⁹、β-catenin 蛋白水平降低($P<0.05$);与 TSN 高剂量组比较,SC79 组 p-AKT

Ser⁴⁷³、p-GSK-3β Ser⁹、β-catenin 蛋白水平升高($P<0.05$);SC79+CP21R7 组与 TSN 高剂量组各蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$);与 SC79 组比较,SC79+CP21R7 组 pAKT Ser⁴⁷³、p-GSK-3β Ser⁹、β-catenin 蛋白水平降低($P<0.05$)。见图 4、表 6。

表 5 各组细胞侵袭能力比较($\bar{x}\pm s, \text{个}$)		
组别	<i>n</i>	侵袭数目
NC 组	6	167.50±18.23
TSN 低剂量组	6	121.68±10.60 ^a
TSN 中剂量组	6	91.35±8.45 ^a
TSN 高剂量组	6	76.49±7.38 ^a
SC79 组	6	172.45±15.09 ^b
SC79+CP21R7 组	6	79.26±6.91 ^c

注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 TSN 高剂量组比较,^b $P<0.05$;与 SC79 组比较,^c $P<0.05$ 。

表 6 各组细胞通路蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AKT	p-AKT Ser ⁴⁷³	GSK-3β	p-GSK-3β Ser ⁹	β-catenin
NC 组	6	0.67±0.12	0.69±0.09	0.72±0.11	0.86±0.15	0.98±0.14
TSN 低剂量组	6	0.68±0.13	0.28±0.03 ^a	0.68±0.13	0.55±0.10 ^a	0.71±0.10 ^a
TSN 中剂量组	6	0.71±0.10	0.25±0.04 ^a	0.70±0.14	0.48±0.07 ^a	0.65±0.08 ^a
TSN 高剂量组	6	0.65±0.09	0.19±0.05 ^a	0.69±0.15	0.35±0.06 ^a	0.53±0.14 ^a
SC79 组	6	0.73±0.17	0.71±0.13 ^b	0.71±0.18	0.83±0.12 ^b	0.95±0.16 ^b
SC79+CP21R7 组	6	0.70±0.11	0.21±0.05 ^c	0.72±0.08	0.37±0.07 ^c	0.58±0.13 ^c

注:与 NC 组比较,^a*P*<0.05;与 TSN 高剂量组比较,^b*P*<0.05;与 SC79 组比较,^c*P*<0.05。

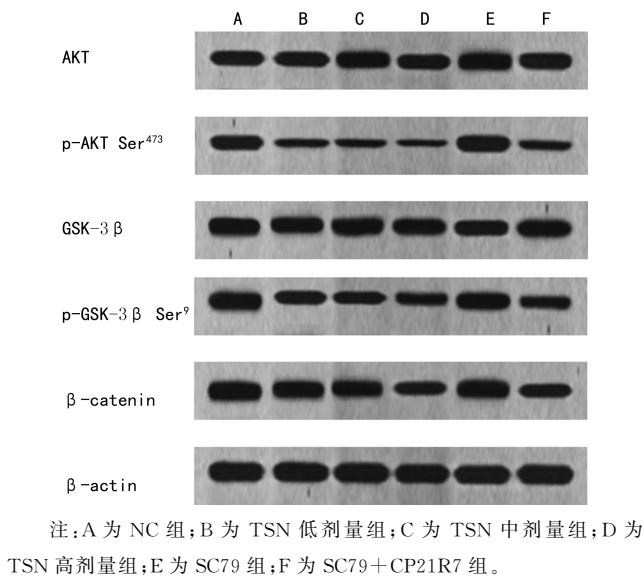


图 4 各组细胞通路蛋白水平比较

3 讨 论

MM 是皮肤癌致死的主要原因,目前 MM 的标准治疗方法主要包括化疗、放疗、免疫治疗和生物治疗,但因其侵袭性强、预后差、对化疗或放疗耐药等特征,治疗效果并不理想,因此应积极探索新的药物和治疗方法^[9]。Bcl-2 与 Bax 是两个凋亡相关的调节蛋白,Bcl-2 作为抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白 Bax 共同作用,决定细胞是否凋亡;caspase-3 是 caspase 家族直接诱导细胞凋亡的蛋白之一,间接影响其他凋亡因子诱导细胞凋亡^[10]。TSN 在诱导细胞周期停滞和凋亡、抑制多种癌症方面具有良好的作用。时俊宇等^[11]发现,TSN 能体外抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭的作用。此外,SHAO 等^[12]发现,TSN 诱导 MKN-45 人胃癌细胞凋亡是通过介导 Bcl-2 的激活来实现的。同时,WANG 等^[13]发现,TSN 还可以抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移,促进细胞凋亡。因此,TSN 是一种疗效显著的抗肿瘤药物,然而其在 MM 治疗中的作用机制尚未阐明。本研究中,TSN 可抑制 MM 细胞活力,促进凋亡,使 Bcl-2 蛋白表达水平降低,Bax、C-caspase-3 水平升高,与上述研究报道一致。

EMT 在肿瘤侵袭和转移过程中起着至关重要的

作用,特别是在早期阶段。在 EMT 过程中,细胞失去上皮特性获得间充质特性,其分子机制与上皮标志物 E-cadherin 的下调和间充质标志物 N-cadherin、Vimentin 的上调有关,细胞间黏附能力降低导致肿瘤细胞迁移和侵袭性增强^[14]。EMT 是一种可逆的生物学过程,可以调节人类 MM 细胞的迁移和侵袭。MM 细胞在未发生侵袭和迁移时,E-cadherin 高表达,细胞间黏附性较强,可阻止 MM 细胞逃逸;当发生侵袭和迁移时,N-cadherin、Vimentin 高表达,E-cadherin 则低表达,MM 细胞向周围转移扩散^[15]。向桂琼等^[16]发现,全反式维甲酸能抑制 MM 细胞的侵袭、转移,其机制与抑制 EMT 现象有关。LI 等^[17]发现,灯盏花乙素可通过抑制 EMT 来抑制 MM 细胞的迁移、侵袭。因此,EMT 有可能成为治疗 MM 的途径。TSN 作为抗肿瘤药物能抑制细胞 EMT 过程,如 TSN 通过抑制 EMT 来抑制人卵巢癌细胞的迁移和侵袭^[18]。在本研究中,TSN 治疗后划痕愈合率、细胞侵袭能力、N-cadherin、Vimentin 蛋白水平降低,E-cadherin 水平升高,表明 TSN 有可能抑制间充质标志物 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达,提高 E-cadherin 蛋白水平,来减少 EMT 发生。

Wnt/β-catenin 通路能影响癌细胞增殖和转移,且在不同肿瘤中诱导 EMT,是 EMT 的关键途径^[19]。GSK-3β 是 Wnt/β-catenin 通路的关键因子,可直接调节 β-catenin 蛋白在细胞质中的稳定性^[20]。AKT 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,参与细胞存活、分化和运动,其中 AKT 通过磷酸化 Ser⁹ 位点使 GSK-3β 的非活性形式激活,影响 β-catenin 的稳定,导致 β-catenin 的积累和易位,从而促进恶性癌细胞 EMT 过程的发展^[21]。已有研究发现,TSN 通过 AKT/GSK-3β/β-catenin 通路影响细胞的增殖和凋亡^[7]。在本研究中,TSN 能同时降低 p-AKT Ser⁴⁷³、p-GSK-3β Ser⁹、β-catenin 蛋白的表达,而 AKT 激动剂 SC79 升高 p-AKT Ser⁴⁷³、p-GSK-3β Ser⁹、β-catenin 蛋白的表达,减弱 TSN 对 MM 细胞增殖的抑制,降低凋亡率,增强侵袭和迁移能力,促进 EMT 进程。GSK-3β 抑制剂

CP21R7 与 TSN、SC79 共同作用,能拮抗 SC79 对 TSN 治疗的抑制作用,促进 MM 细胞凋亡,抑制细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 的发生。

综上所述,TSN 能抑制 MM 细胞增殖,促进凋亡,抑制 EMT 发生,其作用机制可能与抑制 AKT/GSK-3 β / β -catenin 通路激活有关。本研究为治疗 MM 提供了新的方法和思路,但缺少体内和临床试验,后续需继续探索。

参考文献

- [1] TURNER N, WARE O, BOSENBERG M. Genetics of metastasis; melanoma and other cancers [J]. Clin Exp Metastasis, 2018, 35(5/6): 379-391.
- [2] 余波, 刘伟, 胡敏琪, 等. 白皮杉醇抗恶性黑色素瘤的体内外实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2021, 39(4): 413-418.
- [3] CHENG R M, GAO S, HU W, et al. Nuclear factor I/B mediates epithelial-mesenchymal transition in human melanoma cells through ZEB1 [J]. Oncol Lett, 2021, 21(2): 81.
- [4] CHEN Q, YANG D, ZONG H, et al. Growth-induced stress enhances epithelial-mesenchymal transition induced by IL-6 in clear cell renal cell carcinoma via the Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway [J]. Oncogenesis, 2017, 6(8): e375.
- [5] 赵振寰, 王辉明, 王腾, 等. 逆菱康含药血清调控 AKT/GSK-3 β / β -catenin 通路抑制 MC 细胞的上皮间质转化 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(2): 150-155.
- [6] 陈培文, 陶飞燕, 谢永美. 川楝素抗肿瘤活性及作用机制的研究进展 [J]. 中国药房, 2021, 32(24): 3059-3063.
- [7] WANG G, FENG C C, CHU S J, et al. Toosendanin inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells through suppression of AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway [J]. Int J Oncol, 2015, 47(5): 1767-1774.
- [8] GAO T, XIE A, LIU X, et al. Toosendanin induces the apoptosis of human Ewing's sarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(1): 135-140.
- [9] SABIT H, KALIYADAN F, MENEZES R G. Malignant melanoma; underlying epigenetic mechanisms [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2020, 86(5): 475-481.
- [10] JIANG T, MA X, CHEN H, et al. Diazepam ameliorated myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of C-C chemokine receptor type 2/tumor necrosis factor-alpha/interleukins and Bcl-2-associated X protein/C-caspase-3 pathways in experimental rats [J]. J Vet Med Sci, 2021, 83(12): 1965-1976.
- [11] 时俊宇, 徐晓黎, 高红艳, 等. 川楝素对卵巢癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(7): 847-850.
- [12] SHAO S, LI S, LIU C, et al. Toosendanin induces apoptosis of MKN-45 human gastric cancer cells partly through miR-23a-3p-mediated downregulation of BCL2 [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(3): 1793-1802.
- [13] WANG Q, WANG Z, HOU G, et al. Toosendanin suppresses glioma progression property and induces apoptosis by regulating miR-608/notch axis [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 3419-3431.
- [14] TAKI M, ABIKO K, UKITA M, et al. Tumor immune microenvironment during epithelial-mesenchymal transition [J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(17): 4669-4679.
- [15] 许预, 于新华, 兰守夕, 等. 薯蓣皂苷对小鼠恶性黑色素瘤细胞侵袭、迁移及黏附的抑制作用及机制 [J]. 山东医药, 2022, 62(19): 43-47.
- [16] 向桂琼, 樊卓, 党云, 等. 全反式维 A 酸对恶性黑色素瘤 A375 细胞上皮-间质转化相关分子表达的影响 [J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54(1): 50-55.
- [17] LI C Y, WANG Q, WANG X, et al. Scutellarin inhibits the invasive potential of malignant melanoma cells through the suppression epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 858: 172463.
- [18] 李雨颖, 章科娜, 蔡锦威, 等. 川楝素对人卵巢癌细胞侵袭和迁移的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(1): 70-74.
- [19] TIAN S, PENG P, LI J, et al. SERPINH1 regulates EMT and gastric cancer metastasis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(4): 3574-3593.
- [20] 赵萍萍, 李美芳, 袁崇芬, 等. 异橙黄酮通过 AKT/GSK-3 β / β -catenin 信号通路诱导胃癌 AGS 细胞凋亡和周期阻滞研究 [J]. 中国药师, 2022, 25(1): 41-48.
- [21] JAWORSKI T. Control of neuronal excitability by GSK-3 β ; Epilepsy and beyond [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867(9): 118745.

(收稿日期: 2022-09-22 修回日期: 2023-01-29)