

臭椿酮诱导人黑色素瘤 A375 细胞凋亡及其机制研究

陈小宇^{1#}, 陈颖^{1#}, 曲传俊¹, 李德芳¹, 郑秋生^{1,2*}

¹滨州医学院中西医结合学院, 烟台 264000;

²石河子大学药学院 新疆特种植物药资源省部共建重点实验室, 石河子 832000

摘要:为研究臭椿酮(Ailanthone, AIL)诱导人黑色素瘤 A375 细胞凋亡的作用及作用机制,以人黑色素瘤 A375 细胞为研究对象,采用 MTT 法测定 AIL 对人黑色素瘤 A375 细胞生长增殖的抑制作用。用倒置相差显微镜观察 AIL 对 A375 细胞形态的影响,用荧光倒置显微镜观察 Hoechst 33258 染色后 AIL 对 A375 细胞核的影响,用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 AIL 诱导 A375 细胞凋亡的作用,用分光光度法检测 caspase-3 和 caspase-9 的活性,Western blot 检测 p-PI3K β (Ser1070), PI3K β , p-Akt(Ser473) 和 Akt 蛋白表达水平的变化,接着用 PI3K 抑制剂 LY294002 进行干预,进一步验证 AIL 对 PI3K/Akt 信号通路及细胞凋亡的影响。实验结果表明,AIL 能够明显抑制 A375 细胞增殖,使 A375 细胞数目变少、附着力和透光性减弱,AIL 能够诱导 A375 细胞凋亡,使其细胞核染色质发生固缩并呈现高亮,且使 A375 细胞早期及晚期凋亡率均增加,AIL 作用后能够使 caspase-3 和 caspase-9 活性增加,AIL 能够抑制 PI3K 和 Akt 蛋白磷酸化,从而使 PI3K/Akt 信号通路失活。较 AIL 单独作用,AIL 和 LY294002 共同作用后对 PI3K 和 Akt 蛋白磷酸化的抑制作用增强且诱导凋亡作用增加,进一步说明 AIL 通过失活 PI3K/Akt 信号通路来诱导 A375 细胞凋亡。

关键词:臭椿酮;黑色素瘤;A375 细胞;凋亡;PI3K/Akt 信号通路

中图分类号:R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)8-1350-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.8.007

Apoptosis-inducing effect of ailanthone on human melanoma A375 cells and its active mechanism

CHEN Xiao-yu^{1#}, CHEN Ying^{1#}, QU Chuan-jun¹, LI De-fang¹, ZHENG Qiu-sheng^{1,2*}

¹School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Binzhou medical University, Yantai 264000, China;

²Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources of Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

Abstract:To investigate the effect of ailanthone (AIL) on the apoptosis of human melanoma A375 cells and its mechanism, the effect of AIL on proliferation of A375 cells was studied by MTT assay. The morphological change of A375 cells treated by AIL was observed by inverted phase contrast microscope. Hoechst 33258 staining was used to observe nuclear change of A375 cell treated by AIL. The apoptosis of A375 cells induced by AIL was analyzed by flow cytometry. Caspase-3 and caspase-9 activity was detected using commercial kits. The expression level of p-PI3K β (Ser1070), PI3K β , p-Akt (Ser473) and Akt was tested by Western blot. LY294002 was invited to prove the effect of AIL on PI3K/Akt signaling pathway. The result showed that AIL significantly inhibited the proliferation of A375 cells. Decrease of cell number and shrinkage of nuclear could be observed in A375 cells treated by AIL. The apoptosis rate of A375 cells was increased by AIL. The activity of caspase-3 and caspase-9 was elevated by AIL in A375 cells. Protein phosphorylation of PI3K and Akt was inhibited by AIL in A375 cells. PI3K and Akt phosphorylation level decreased and apoptosis rate increased more significantly by AIL co-treated with LY294002. This further noted that AIL induced A375 cells apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway.

Key words:ailanthone; melanoma; A375 cells; apoptosis; PI3K/Akt signaling pathway

收稿日期:2018-11-30 接受日期:2019-04-10

基金项目:国家自然科学基金(31870338)

* 通信作者 E-mail: zqsy@sohu.com

共同第一作者

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是一种极具侵袭性的肿瘤,好发于皮肤表面。皮肤恶性黑色素瘤的死亡率占皮肤相关肿瘤死亡率的

80%^[1],其发生率与死亡率多年来一直高居不下^[2,3]。据资料统计,2012 年全球黑色素瘤新发病例为 232 000 例,死亡 55 000 例,死亡率占新发病例的 23.7%^[4];2011 年我国黑色素瘤新发病例 6 505 例,死亡病例 2 660 例,死亡率占新发病例的 40.9%^[5],黑色素瘤已成为严重危害我国人民健康的疾病之一,因此开发与研究黑色素瘤治疗药物显得尤为重要。

臭椿 *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle,又名椿树和木苍树,属落叶乔木,因叶基部腺点散发臭味而得名,其树皮、根皮、果实均可入药,具有清热燥湿、收涩止带、止泻、止血之功效^[6]。臭椿酮是臭椿树叶中分离的一种苦味素类化合物,具有广谱的生物活性,包括抗炎、抗 HIV、抗疟疾、抗过敏、抗溃疡和抗微生物等^[6]。近几年研究发现,臭椿酮也具有抗肿瘤活性,并在人前庭神经鞘瘤细胞^[7]、人肝癌 Huh7 细胞^[8]、人前列腺癌 C4-2B 细胞^[9]、人胃癌 SGC-7901 细胞^[10]、人非小细胞肺癌 A549, H1299 和 H1975 细胞^[11]、人乳腺癌 MCF-7 细胞^[12]、人早幼粒急性白血病 HL-60 细胞^[13]中得以验证。但是,臭椿酮对黑色素瘤的影响未见报道。因此,本研究以人黑色素瘤 A375 细胞为研究对象,通过多种分子生物及生物化学手段检测了臭椿酮对人黑色素瘤 A375 细胞生长增殖的影响,并探讨了可能的分子机制。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

臭椿酮(Ailanthone, AIL)购于宝鸡辰光生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$ 。DMEM 培养基购于 Hyclone 公司;胎牛血清购于 Gibco 公司;青霉素-链霉素和胰蛋白酶消化液购于索莱宝生物科技有限公司。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒和 Hoechst 33258 细胞凋亡检测试剂盒购自索莱宝生物科技有限公司;caspase-3 和 caspase-9 活性检测试剂盒均购于碧云天生物技术有限公司;p-PI3K β (Ser1070),PI3K β ,p-Akt (Ser473),Akt 和 β -actin 抗体购自 Cell signaling 公司,山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗均购自索莱宝生物科技有限公司,ECL 发光试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司。分析纯化学试剂均购自山东济南汇丰达化工有限公司。

1.2 仪器

二氧化碳培养箱购自 Thermo 公司,超净工作台购自苏州净化设备有限公司,多功能酶标仪购于

Tecan 公司,AXIO OBSERVER A1 倒置荧光显微镜购自 Carl Zeiss AG 公司,BD FACSCalibur 流式细胞仪购自 BD 公司,垂直电泳仪购自 Bio-RAD 公司,UVP 凝胶成像系统购于美国 BioSpectrum 公司。

1.3 细胞及培养

人黑色素瘤 A375 细胞购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,并加入 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,每 2 天传代一次。

2 实验方法

2.1 MTT 法检测药物对细胞活力的影响

取对数生长期的 A375 细胞,以每孔 4×10^3 个接种于 96 孔板,每组设置 6 个复孔。次日,待细胞贴壁后,加入 0、4、8、12 μ M 臭椿酮作用 24 h。待培养结束后,每孔加入 5 g/mL MTT 试剂 20 μ L,继续培养 4 h。孵育结束后,弃去孔内培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,置于微孔振荡器上振荡 10 min,使紫色结晶完全溶解,用多功能酶标仪在 570 nm 处测定吸光度。并依据公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组吸光度}}{\text{对照组吸光度}} \times 100\%$$

2.2 倒置相差显微镜观察细胞形态

取对数生长期的 A375 细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。次日,待细胞融合度达到 70% 时,加入 0、4、8、12 μ M 臭椿酮,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。之后,将培养板从培养箱中取出,置于倒置相差显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.3 Hoechst 33258 染色

取对数生长期的 A375 细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。次日,待细胞融合度达到 70% 时,加入 0、4、8、12 μ M 臭椿酮作用 24 h。待培养结束后,弃去孔内培养基,用 PBS 润洗 2~3 次,用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,之后弃去固定液,用 PBS 润洗 2 次,吸出孔内液体,加入 Hoechst 33258 染色液 500 μ L,室温避光染色 30 min,弃去染色液,用 PBS 润洗 2 次,置于荧光显微镜下观察细胞形态变化并拍照。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的 A375 细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。次日,待细胞融合度达到 70% 时,加入 0、4、8、12 μ M 臭椿酮作用 24 h。待培养结束后,弃去孔内培养基,用 PBS 润洗 2~3 次,按照 Annex-

in V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书上的操作收集细胞并分别加入 Annexin V-FITC 和 PI, 室温避光染色 20 min 后。离心收集细胞, 弃去荧光染液, 用试剂盒中提供的缓冲液润洗细胞 3 次, 最后加入 500 μL 缓冲液, 用流式细胞仪检测。

2.5 Caspase-3 和 caspase-9 的活性检测

取对数生长期的 A375 细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。次日, 待细胞融合度达到 70% 时, 加入 0、4、8、12 μM 臭椿酮作用 24 h。待培养结束后, 弃去孔内培养基, 用 PBS 润洗 2 次, 用胰蛋白酶消化细胞, 600 g 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集细胞沉淀, 加入 200 μL 试剂盒中提供的裂解液, 冰浴裂解 15 min, 取该溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 用 16 000 g 离心 15 min, 将上清转移至新的离心管中备用。取待测溶液 50 μL , 加入 40 μL 检测缓冲液及 10 μL 底物, 于 405 nm 处测定样品吸光度。把试剂盒提供的 pNA (*p*-nitroaniline) (10 mM) 稀释至 0、10、20、50、100 μM , 每个浓度取 100 μL 并设置 3 个复孔用酶标仪在 405 nm 处进行检测, 制作出 pNA 浓度相对于 A405 的标准曲线。用样品的 A405 的数值在标准曲线上比对, 可以得到相应的 pNA 浓度, 用 pNA 浓度大小表示 caspase-3 和 caspase-9 活性的高低。

2.6 Western blot 检测相关蛋白表达

取对数生长期的 A375 细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。次日, 待细胞融合度达到 70% 时, 加入 0、4、8、12 μM 臭椿酮作用 24 h。待培养结束后, 弃去孔内培养基, 用 PBS 润洗 2 次, 用胰蛋白酶消化细胞, 600 g 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集细胞沉淀, 加入 800 μL RIPA 细胞裂解液, 置于冰上裂解 30 min 后, 1 000 g 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 后取上清, 用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 之后取适量蛋白溶液与上样缓冲液按比例混匀, 于沸水中煮 15 min 使蛋白变性, 取 40 μg 蛋白上样, 采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 用湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入相应的一抗 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 之后用 TBST 洗 3 次, 加入相应的二抗于室温在摇床摇 2 h, 用 TBST 润洗 3 次后用 ECL 发光试剂盒显色, 用 UVP 凝胶成像系统记录图像。

2.7 统计学分析

实验数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 用 SPSS 19.0 软件单因素方差 (ANOVA) 进行分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 臭椿酮对 A375 细胞活力的抑制作用

臭椿酮 (0、4、8、12 μM) 作用 A375 细胞 24 h 后, 用 MTT 法检测臭椿酮对人黑色素瘤 A375 细胞活力的影响。如图 1 所示, 臭椿酮 (4、8、12 μM) 作用 A375 细胞 24 h 后, 能够明显抑制 A375 细胞活力且呈现剂量依赖性。其中 12 μM 臭椿酮作用 A375 细胞 24 h 后, 使 A375 细胞活力下降 78.9%。

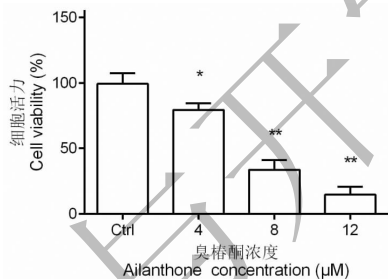


图 1 臭椿酮对人黑色素瘤 A375 细胞活力的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of AIL in human melanoma A375 cells

注: Ctrl 为对照组, * 与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$), ** 与对照组相比具有非常显著差异 ($P < 0.01$)。Note: Ctrl means control group, * significant difference with control group ($P < 0.05$), very significant difference with control group ($P < 0.01$).

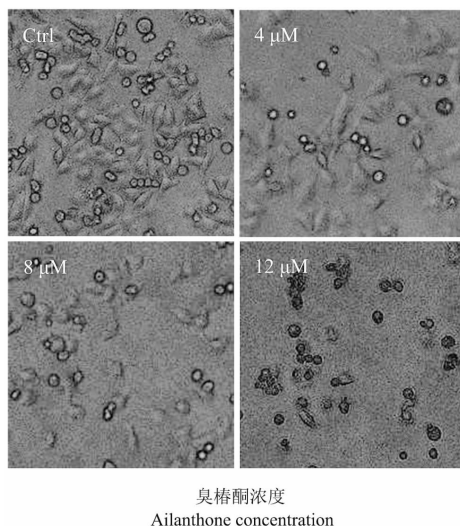


图 2 不同浓度臭椿酮作用 A375 细胞 24 h 后细胞形态的变化

Fig. 2 Morphological change of A375 cells treated with different concentrations of AIL for 24 h
注: Ctrl 为对照组。Note: Ctrl means control group.

3.2 臭椿酮对 A375 细胞形态的影响

臭椿酮 (0、4、8、12 μM) 作用 A375 细胞 24 h 后, 将 6 孔板从培养箱中取出, 置于倒置相差显微镜下观察细胞数目和形态变化。如图 2 所示, 臭椿酮

作用后 A375 细胞的数目明显减少,并呈现剂量依赖性。随着臭椿酮剂量的增加,A375 细胞变的更圆,其中 12 μM 臭椿酮作用 A375 细胞 24 h 后,A375 细胞明显变小、数目变少,并且透光性降低,还使 A375 细胞的附着力变弱,上清液出现许多漂浮的细胞。

3.3 臭椿酮对 A375 细胞核形态的影响

臭椿酮(0、4、8、12 μM)作用 A375 细胞 24 h 后,用 Hoechst 33258 荧光染料对 A375 细胞进行染色来检测 AIL 对 A375 细胞核形态的影响。如图 3 所示,臭椿酮作用后细胞数目相较于正常组明显减少(表现为细胞核数目减少),还可以观察到 A375 细胞染色质出现浓缩进而产生的高亮,而对照组细胞核亮度较低,边缘光滑完整,染色质分布均匀。

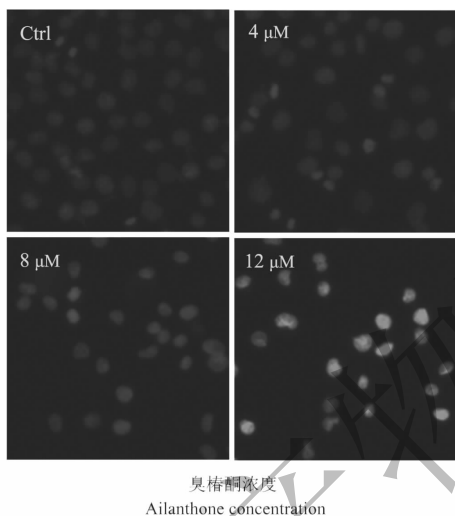


图 3 臭椿酮对 A375 细胞核形态的影响 (200 \times)

Fig. 3 The effect of AIL on cell nuclear feature in A375 cells (200 \times)

注:Ctrl 为对照组。Note:Ctrl means control group.

3.4 臭椿酮对 A375 细胞凋亡的影响

臭椿酮(0、4、8、12 μM)作用 A375 细胞 24 h

后,用 Annexin V-FITC 和 PI 染料进行双染,接着用流式细胞仪进行检测。如图 4 所示,与正常组相比,臭椿酮作用组细胞凋亡率明显增加,表现在 Q4 象限(早期凋亡)和 Q2 象限(晚期凋亡)细胞数均明显增加。

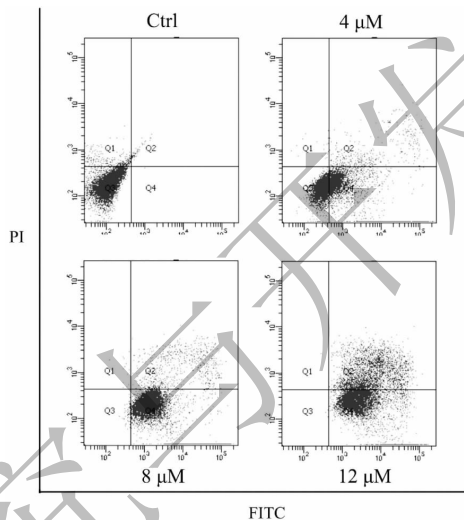


图 4 臭椿酮能够诱导 A375 细胞凋亡

Fig. 4 AIL induced apoptosis of A375 cells

注:Ctrl 为对照组,PI 为碘化丙啶,FITC 为异硫氰酸荧光素。Note:Ctrl means control group,propidine iodide is represented as PI,fluorescein isothiocyanate is represented as FITC.

3.5 臭椿酮对 A375 细胞 caspase-3 和 caspase-9 活性的影响

臭椿酮(0、4、8、12 μM)作用 A375 细胞 24 h 后,与正常组对比,不同浓度臭椿酮作用后 caspase-3 和 caspase-9 的活性增加,其中 8 μM 和 12 μM 臭椿酮作用后,能够使 caspase-3 的活性显著增加,臭椿酮(4、8、12 μM)作用后能够使 caspase-9 的活性显著增加。

3.6 臭椿酮对 A375 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响

臭椿酮(0、4、8、12 μM)作用 A375 细胞 24 h

表 1 臭椿酮对 A375 细胞 caspase-3 和 caspase-9 活性的影响($n = 4, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of AIL on caspase-3 and caspase-9 activities in A375 cells ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (μM)	Caspase-3 活性 Caspase-3 activity	Caspase-9 活性 Caspase-9 activity
正常组 Control group	0	1.24 \pm 0.06	0.86 \pm 0.04
AIL 低剂量组 AIL low dose group	4	1.32 \pm 0.08	1.21 \pm 0.06 *
AIL 中剂量组 AIL medium dose group	8	1.67 \pm 0.04 *	1.42 \pm 0.07 **
AIL 高剂量组 AIL High dose group	12	2.32 \pm 0.09 **	1.93 \pm 0.08 **

注:与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

后,用 Western blot 检测臭椿酮作用后对 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响。如图 5 所示,与对照组相比,不同浓度臭椿酮作用后 p-PI3K 和 p-Akt 表达明显下降,说明臭椿酮能够抑制 PI3K 和 Akt 的磷酸化,而 PI3K 和 Akt 总蛋白并无明显变化。上述结果说明,臭椿酮能够使 PI3K/Akt 信号通路失活。

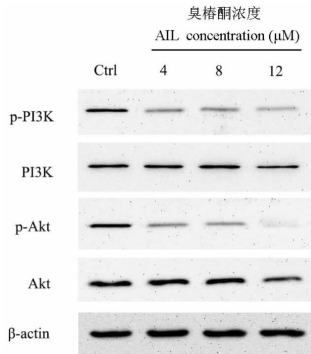


图 5 臭椿酮作用 A375 细胞后对 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of AIL on the expression of PI3K/Akt signaling pathway proteins in A375 cells
注:Ctrl 为对照组。Note:Ctrl means control group.

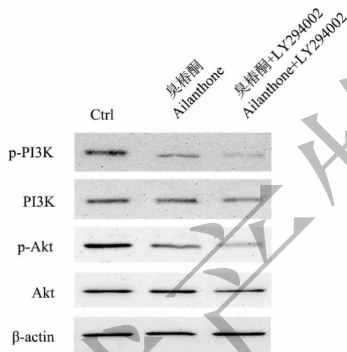


图 6 臭椿酮联合 LY294002 对 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of AIL combined with LY294002 on the expression of PI3K/Akt signaling pathway proteins
注:Ctrl 为对照组。Note:Ctrl means control group.

3.7 臭椿酮使 PI3K/Akt 信号通路失活来诱导 A375 细胞凋亡

LY294002 是 PI3K 特异性抑制剂,用 LY294002 预处理 2 h 后,再加入 0、4、8、12 μM 臭椿酮作用 A375 细胞 24 h,用 Western blot 检测臭椿酮作用后对 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响。如图 6 所示,臭椿酮作用 A375 细胞后对总 PI3K 和 Akt 的表达没有明显影响,但是使磷酸化 PI3K 和 Akt 表达明显下降,当臭椿酮和 PI3K 抑制剂 LY294002 联用

后,使磷酸化 PI3K 和 Akt 表达下降更为明显,进一步说明臭椿酮能够使 PI3K/Akt 信号通路失活。

接着,我们又检测了 LY294002 联合臭椿酮对 A375 细胞凋亡的影响,发现与只臭椿酮处理组相比,臭椿酮与 LY294002 联用后使 A375 细胞凋亡数明显增加,进一步确认了臭椿酮通过使 PI3K/Akt 信号通路失活来诱导 A375 细胞凋亡。

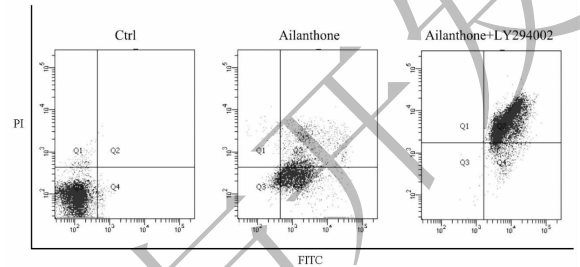


图 7 臭椿酮通过 PI3K/Akt 信号通路诱导 A375 细胞凋亡

Fig. 7 AIL induced apoptosis of A375 cells via PI3K/Akt signaling pathway
注:Ctrl 为对照组,PI 为碘化丙啶,FITC 为异硫氰酸荧光素。Note:Ctrl means control group,propidine iodide is represented as PI, fluorescein isothiocyanate is represented as FITC.

4 结论

黑色素瘤是一种恶性程度相当高的肿瘤,大多原发于皮肤,也可起源于眼、鼻腔等处,早期可发生转移,转移部位多见肺、脑,黑色素瘤的死亡率之高已严重危害我国人民健康。因此,寻找低毒、高效的抗癌药物是黑色素瘤治疗领域的重要方向。

臭椿酮是臭椿中的一种化合物,具有抗炎、抗 HIV、抗疟疾、抗过敏、抗溃疡和抗微生物的生物活性,还能够通过提升自身免疫而发挥多种治疗作用^[6]。Zhuo 等^[8]发现臭椿酮能够通过激活 ATM/ATR 信号转导通路抑制人肝癌 HepG2、Hep3B、Huh7 细胞增殖并导致人肝癌细胞周期阻滞。He 等^[9]发现在难去势的前列腺癌细胞中臭椿酮通过靶向 p23 克服 MDV3100 耐药。Chen 等^[10]发现臭椿酮通过诱导 G2/M 期阻滞和凋亡来抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖。Ni 等^[11]通过 cDNA 基因序列的方法探索了臭椿酮抑制非小细胞肺癌增殖的作用机制,发现臭椿酮作用后会下调 RPA1 进而抑制非小细胞肺癌 DNA 复制。Wang 等^[12]发现臭椿酮能够诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡和周期阻滞。Wei 等^[13]发现臭椿酮通过诱导凋亡和自噬抑制人早幼粒急性白血病 HL-60 细胞增殖。Rosati 等^[14]发现

臭椿酮能够诱导 Jurkat 细胞线粒体膜电势下降并激活 caspase-3,进而诱导 Jurkat 细胞凋亡。目前尚未见有关臭椿酮对黑色素瘤影响的报道。本实验以臭椿酮为研究对象,探讨了臭椿酮对人黑色素瘤 A375 细胞增殖、凋亡的影响及作用机制。

在光学显微镜下观察,凋亡细胞和未凋亡的细胞有着明显的形态变化,凋亡的细胞体积变小,贴壁细胞出现皱缩、变圆、附着力变弱的现象。细胞发生凋亡时,染色质会发生固缩,Hoechst 33258 是一种着色于 DNA 的染料,因此在 Hoechst 33258 染色后,用荧光显微镜观察可以发现凋亡细胞的细胞核会呈现致密浓染或碎块化致密浓染,颜色发白呈现高亮^[15,16]。磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)正常位于细胞膜的内侧,但在细胞凋亡的早期,PS 可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面,暴露在细胞外环境中。Annexin V 是一种分子量为 35~36 KD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,能与 PS 高亲和力特异性结合。碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但对于凋亡中晚期的细胞和坏死的细胞,由于其细胞膜破裂,PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红^[17]。因此,用 Annexin V 和 PI 双染能够标记凋亡细胞和坏死的细胞。Caspase-9 也称为 ICE-LAP6 或 Mch6,是细胞凋亡信号转导过程中比较上游的一个 caspase,线粒体释放细胞色素 C 后,caspase-9 可以和细胞色素 C 和 Apaf1 形成复合物,同时被激活。活化的 caspase-9 可以激活 caspase-3 从而促进后续的细胞凋亡信号^[18,19]。我们的实验结果发现,臭椿酮作用后使 A375 细胞变小、透光性降低,附着力变弱表现为上清液出现许多漂浮的细胞;Hoechst 33258 染色后,用荧光显微镜观察,发现臭椿酮作用后能够使 A375 细胞染色质出现固缩,从而表现为荧光高亮;Annexin V-FITC/PI 双染后,用流式细胞仪检测,发现臭椿酮作用后使 A375 细胞早期凋亡和晚期凋亡的细胞占比均增高;用分光光度法检测 caspase-3 和 caspase-9 的活性,发现臭椿酮作用后与正常组对比,能够使 caspase-3 和 caspase-9 的活性明显升高。以上结果说明臭椿酮能够诱导人黑色素瘤 A375 细胞凋亡。

PI3K/Akt 信号通路通过多种途径参与调控细胞凋亡,其作用机制主要有三个:(1)活化的 Akt 使促凋亡蛋白 Bad 磷酸化,使其与伴侣蛋白结合,从而阻断其与 Bcl-2 形成二聚体,最终导致 Bad 促凋亡

作用丧失;(2)调控细胞周期,从而促进细胞增殖。Akt 磷酸化可以激活其下游分子 mTOR,激活的 mTOR 可以将信号传递给 S6K1 和 4E-BP1,S6K1 和 4E-BP1 活化后会促使细胞由 G0/G1 期进入 S 期,进而促进细胞增殖;(3)在凋亡信号的刺激下,线粒体渗透性转换孔开放,线粒体膜通透性增加,线粒体膜电位下降,细胞色素 C 释放,激活 caspase 级联反应,继而导致细胞凋亡。Akt 激活后能够抑制细胞色素 C 的释放,从而产生抗凋亡的作用^[20]。本研究发现,臭椿酮作用 A375 细胞后,对总 PI3K 和 Akt 的表达没有明显影响,但是使磷酸化 PI3K 和 Akt 表达明显下降,并且当臭椿酮和 PI3K 抑制剂 LY294002 联用后,使磷酸化 PI3K 和 Akt 表达下降更为明显,并且凋亡的细胞数明显增加,进一步说明 PI3K/Akt 信号通路参与臭椿酮诱导的人黑色素瘤 A375 细胞凋亡。

综上所述,臭椿酮对人黑色素瘤 A375 细胞的增殖有明显的抑制作用,并且能够诱导其凋亡,主要通过上调 caspase-3 和 caspase-9 的活性和使 PI3K/Akt 信号通路失活来实现。我们的实验结果表明,臭椿酮具有体外抗黑色素瘤细胞的作用,为开发抗黑色素瘤的药物提供了理论依据。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- 2 Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy [J]. Nature, 2007, 445: 851-857.
- 3 Purdue MP, Freeman LE, Anderson WF, et al. Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults [J]. J Invest Dermatol, 2008, 128: 2905-2908.
- 4 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136: 359-386.
- 5 Kong Y, Si L, Zhu Y, et al. Large-scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17: 1684-1691.
- 6 Okunade AL, Bikoff RE, Casper SJ, et al. Antiplasmodial activity of extracts and quassinoids isolated from seedlings of *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) [J]. Phytother Res, 2003, 17: 675-677.
- 7 Yang P, Sun D, Jiang F. Ailanthone promotes human vestibular schwannoma cell apoptosis and autophagy by downregulation of miR-21 [J]. Oncol Res, 2018, 26: 941-948.
- 8 Zhuo Z, Hu J, Yang X, et al. Ailanthone inhibits huh7 cancer

- cell growth via cell cycle arrest and apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Sci Rep*,2015,5:16185.
- 9 He Y, Peng S, Wang J, et al. Ailanthone targets p23 to overcome MDV3100 resistance in castration-resistant prostate cancer[J]. *Nat Commun*,2016,7:13122.
 - 10 Chen Y, Zhu L, Yang X, et al. Ailanthone induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of SGC-7901 human gastric cancer cells[J]. *Mol Med Rep*,2017,16:6821-6827.
 - 11 Ni Z, Yao C, Zhu X, et al. Ailanthone inhibits non-small cell lung cancer cell growth through repressing DNA replication via downregulating RPA1[J]. *Br J Cancer*,2017,117:1621-1630.
 - 12 Wang R, Lu Y, Li H, et al. Antitumor activity of the *Ailanthus altissima* bark phytochemical ailanthone against breast cancer MCF-7 cells[J]. *Oncol Lett*,2018,15:6022-6028.
 - 13 Wei C, Chen C, Cheng Y, et al. Ailanthone induces autophagic and apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. *Oncol Lett*,2018,16:3569-3576.
 - 14 Rosati A, Quaranta E, Ammirante M, et al. Quassinoids can induce mitochondrial membrane depolarisation and caspase 3 activation in human cells[J]. *Cell Death Differ*,2004,11:216-218.
 - 15 Yuan Y, Zhang Y, Zhao S, et al. Cadmium-induced apoptosis in neuronal cells is mediated by Fas/FasL-mediated mitochondrial apoptotic signaling pathway[J]. *Sci Rep*,2018,8:8837.
 - 16 Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, et al. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry[J/OL]. *Cold Spring Harb Protoc*,2016.
 - 17 Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of imaging flow cytometry with classical annexin V/propidium iodide staining[J]. *J Immunol Methods*,2015,423:99-103.
 - 18 Zhu X, Zhang K, Wang Q, et al. Cisplatin-mediated c-myc overexpression and cytochrome c (cyt c) release result in the up-regulation of the death receptors DR4 and DR5 and the activation of caspase-3 and caspase-9, likely responsible for the TRAIL-sensitizing effect of cisplatin[J]. *Med Oncol*,2015,32:133.
 - 19 Thakor P, Subramanian RB, Thakkar SS, et al. Phytol induces ROS mediated apoptosis by induction of caspase 9 and 3 through activation of TRAIL, FAS and TNF receptors and inhibits tumor progression factor Glucose 6 phosphate dehydrogenase in lung carcinoma cell line (A549)[J]. *Biomed Pharmacother*,2017,92:491-500.
 - 20 Kumar D, Shankar S, Srivastava RK. Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Lett*,2014,343:179-189.
-
- (上接第 1407 页)
- 3 Wang YL, Wu JH. Advances on antifungal treatment through chinese herbal medicine[J]. *World Clin Drugs*(世界临床药物),2018,39(9):69-73.
 - 4 Yao SF, Gao H, Shang SH. Review on plant resources inhibiting postharvest fruit fungal pathogens[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2018,30:2214-2223.
 - 5 Chen HY, Fan ZD. Advances in research on the antibacterial activity of volatile oil from traditional chinese medicine[J]. *China Pharmacy*(中国药房),2016,14:2011-2013.
 - 6 Ríos JL. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos*[J]. *Planta Med*,2011,77:681-691.
 - 7 Wu LF, Wang KF, Mao X. Screening and analysis of the potential bioactive components of *Poria cocos*(Schw.) Wolf by HPLC and HPLC-MSn with the aid of chemometrics[J]. *Molecules*,2016,21:227-245.
 - 8 Xu GC, Zhang D, Dan LI, et al. Overview of pharmaceutical research on the *Poria* with hostwood of traditional Chinese medicine[J]. *Agric Sci Technol*(农业科学与技术英文版),2015,16:2115-2120.
 - 9 Li PQ, Wu Z, Liu T, et al. Biodiversity, phylogeny, and anti-fungal functions of endophytic fungi associated with *zanthoxylum bungeanum*[J]. *Int J Mol Sci*,2016,17:1541-1565.
 - 10 Wu DS, Yang ZQ, Huang YL. Comparative analysis of resin-producing capacity and resin composition of different hybrid pine[J]. *Biomass Chem Eng*,2018,52(5):6-12.
 - 11 Xu S, Jiang WQ, Kuang YM, et al. Research advances on chemical constituents and bioactivities of *Poria cocos*(Schw.) Wolf[J]. *Northwest Pharm J*,2016,31:327-330.