

- 促进大鼠骨髓间充质干细胞向软骨分化的分析[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(27): 2198-2202.
- [20] 欧阳家耀, 张海严, 方航, 等. 小鼠软骨前体细胞 ATDC5 中沉默骨膜蛋白基因能延缓软骨退变[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(1): 15-18.
- [21] PARK SJ, CHEON EJ, LEE MH, et al. MicroRNA-127-5p regulates matrix metalloproteinase 13 expression and interleukin-1 β -induced catabolic effects in human chondrocytes [J]. Arthritis & Rheumatism, 2013, 65(12): 3141-3152.
- [22] DING QH, YE CY, CHEN EM, et al. Emodin ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling, in-vitro, and, in-vivo [J]. International Immunopharmacology, 2018, 61: 222-230.
- [23] 杨林, 汪晓平, 李红艳, 等. 瘦素人类含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 4 与类风湿关节炎骨破坏相关性研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2018, 22(6): 401-404.
- [24] TORTORELLA MD, MALFAIT AM, Deccico C, et al. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation [J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2001, 9(6): 539-552.
- [25] MAJUMDAR MK, ASKEW R, SCHELLING S, et al. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(11): 3670-3674.
- [26] RYAN D, ACOSTA A. GLP-1 receptor agonists: Nonglycemic clinical effects in weight loss and beyond [J]. Obesity (Silver Spring), 2015, 23(6): 1119-1129.

(收稿日期: 2020-01-06, 修回日期: 2020-02-25)

引用本文: 智炎伟. 小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 增殖、凋亡的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(2): 230-234. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.02.005.

◇ 药学研究 ◇



小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 增殖、凋亡的影响

智炎伟

作者单位: 郑州大学附属洛阳中心医院药学部, 河南 洛阳 471000

摘要: **目的** 研究小白菊内酯是否通过调控核因子- κ B(NF- κ B)信号通路影响葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖和凋亡。**方法** 用终浓度为 0、5、10、20 μ g/mL 的小白菊内酯处理葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B; 用吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)、佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)处理 MUM2B 细胞, 记为 PDTC 组、PMA 组, 未经任何处理的 MUM2B 细胞作对照组; 10 μ g/mL 的小白菊内酯和 PMA 共同作用于 MUM2B 细胞, 记为 10 μ g/mL+PMA 组。MTT 法检测各组细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡; 蛋白质印迹法(Western Blotting)检测蛋白表达。**结果** 0、5、10、20 μ g/mL 小白菊内酯组 MUM2B 细胞凋亡率分别为 (5.54 $\pm$ 0.56)%、(13.19 $\pm$ 1.65)%、(28.49 $\pm$ 3.90)%、(49.36 $\pm$ 4.27)%, Bcl-2 相关 X(Bax)表达水平分别为 (0.21 $\pm$ 0.03)、(0.36 $\pm$ 0.05)、(0.58 $\pm$ 0.07)、(0.85 $\pm$ 0.08), B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)表达水平分别为 (0.91 $\pm$ 0.09)、(0.53 $\pm$ 0.07)、(0.35 $\pm$ 0.04)、(0.20 $\pm$ 0.03), 与小白菊内酯 0 μ g/mL 组相比, 不同浓度的小白菊内酯组 MUM2B 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); Bax 表达水平显著升高, Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 不同浓度的小白菊内酯可抑制黑色素瘤细胞 MUM2B 的增殖, 促进其凋亡; 抑制 Bcl-2 蛋白的表达, 促进 Bax 蛋白的表达; 抑制 NF- κ B 信号通路的激活。抑制 NF- κ B 信号通路可抑制葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 增殖, 促进细胞凋亡; 激活 NF- κ B 信号通路可以逆转小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 的增殖抑制和凋亡促进的作用。**结论** 小白菊内酯可抑制葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 的增殖, 促进其凋亡, 其机制可能与 NF- κ B 信号通路相关, 将可为黑色素瘤的治疗提供新思路和新靶点。

关键词: 倍半萜类; 小白菊内酯; 核因子- κ B; 葡萄膜黑色素瘤; 增殖; 凋亡

Effect of parthenolide on the proliferation and apoptosis of uveal melanoma cells MUM2B

ZHI Yanwei

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang, Henan 471000, China

Abstract: **Objective** To investigate whether parthenolide can affect the proliferation and apoptosis of uveal melanoma cells by regulating NF- κ B signaling pathway. **Methods** The uveal melanoma cells MUM2B were treated with parthenolide at a final concentration of 0, 5, 10, 20 μ g/mL; MUM2B cells were treated with PDTC, PMA, and recorded as PDTC group, PMA groups, MUM2B cells without any treatment were used as control group; 10 μ g/mL of parthenolide and PMA acted on MUM2B cells, which were recorded as 10 μ g/mL+PMA group. Cell proliferation was detected by MTT assay; apoptosis was detected by flow cytometry; protein expression was detect-

ed by Western Blotting. **Results** The apoptosis rates of melanoma cell line MUM2B with 0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ were $(5.54 \pm 0.56)\%$, $(13.19 \pm 1.65)\%$, $(28.49 \pm 3.90)\%$, and $(49.36 \pm 4.27)\%$, respectively, the expression of Bcl-2 related X (Bax) was (0.21 ± 0.03) , (0.36 ± 0.05) , (0.58 ± 0.07) , and (0.85 ± 0.08) , respectively, and the expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein was (0.91 ± 0.09) , (0.53 ± 0.07) , (0.35 ± 0.04) and (0.20 ± 0.03) , respectively. Compared with the parthenolide 0 $\mu\text{g/mL}$ group, the different concentrations of parthenolide inhibited the proliferation of melanoma cells MUM2B, promoted the apoptosis of MUM2B, inhibited the expression of Bcl-2 protein, promoted the expression of Bax protein, and inhibited the activation of NF- κB signaling pathway. Inhibition of NF- κB signaling pathway could inhibit the proliferation of uveal melanoma cell line MUM2B and promote apoptosis. Activation of NF- κB signaling pathway could reverse the proliferation inhibition and apoptosis-promoting effect of parthenolide on uveal melanoma cell line MUM2B. **Conclusion** Parthenolide can inhibit the proliferation of uveal melanoma cell line MUM2B and promote its apoptosis. The mechanism may be related to NF- κB signaling pathway, which will provide new ideas and targets for the treatment of melanoma.

Key words: Sesquiterpenes; Parthenolide; NF- κB ; Uveal melanoma; Proliferation; Apoptosis

葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)是原发性眼内恶性肿瘤,易转移,预后差且易致死,目前生存率虽有一定改善但还很低^[1]。寻找有效的治疗药物具有重要的临床意义。小白菊内酯(parthenolide, PTL)是从菊科植物中提取出来的倍半萜类化合物,具有抗肿瘤的生物活性,PTL可以抑制胰腺癌 Panc-1 细胞的增殖并促进其凋亡,同时也影响肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[2]。研究发现 PTL 能显著抑制肾癌 786-O 细胞增殖,诱导 786-O 细胞发生凋亡^[3];PTL 通过阻滞 G1 期并调节线粒体途径抑制 UM 细胞增殖并诱导其凋亡^[4]。但小白菊内酯是否通过核因子- κB (Nuclear factor κB , NF- κB)信号通路影响葡萄膜黑色素瘤细胞的发生发展还尚未清楚,本研究自 2019 年 3—10 月研究小白菊内酯是否通过 NF- κB 调控葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖和凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料 葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 购自中国科学院上海细胞库;小白菊内酯(分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$, 纯度 $>98\%$, 货号 X-028)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;胎牛血清(货号 12003C-500 mL)、RPMI-1640 培养基(货号 R1145-500 mL)、胰蛋白酶(货号 T8802)购自美国 Sigma 公司;MTT 试剂盒(货号 C0009)、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙啶(PI)试剂盒(货号 C1065L)、BCA 试剂盒(货号 P0012S)、RIPA 蛋白裂解液(货号 P0013B)、SDS-PAGE 试剂盒(货号 P0012AC)购自上海碧云天生物技术有限公司;吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(Pyrrolidine dithiocarbamate, PDTTC)(货号 5108-96-3)、佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(phorbol 12-myristate-13-acetate, PMA)(货号 P1585)购自美国 Sigma 公司。Bcl-2 相关 X (Bax)(货号 orb146710)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)(货号 orb99415)、IkBa(货号 abx104016)、NF- κB (货号 AOB1331a)一抗均购自上海焯翎生物科技有限公司;p-IkBa(货号 bs-18129R-1)抗体购自上海恒斐生物科技有限公司;山羊抗兔

IgG-辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)(货号 ANR02-1)购自上海子起生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳饱和湿度条件下培养,隔天换液一次,待细胞融合至 70% 左右时,加入胰蛋白酶进行消化传代,选取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞分组 取对数生长期细胞,将其接种至 96 孔板中,并用不同浓度的小白菊内酯(0、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$)处理 MUM2B 细胞,记为 0 $\mu\text{g/mL}$ 组、5 $\mu\text{g/mL}$ 组、10 $\mu\text{g/mL}$ 组、20 $\mu\text{g/mL}$ 组;用 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 PMA 作用于 WM239 细胞培养 24 h,记为 PMA 组;用 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 PMA 作用于 MUM2B 细胞培养 1 h 后再加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PDTTC 培养 24 h,记为 PDTTC 组;未经任何处理的 MUM2B 细胞作对照组。10 $\mu\text{g/mL}$ 的小白菊内酯和 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 PMA 共同作用于 MUM2B 细胞,记为 10 $\mu\text{g/mL}$ +PMA 组。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖 在以上各组细胞培养至 24、48、72、96 h 时分别加入 20 μL (5 g/L) 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h;弃去多余培养基并加入 150 μL DMSO 振荡反应 10 min,酶标仪检测 490 nm 处吸光度(OD)值。细胞增殖活性(%)=实验组 OD 值/空白对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。每组重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 用不含 EDTA 的胰酶消化各组细胞,离心收集, PBS 漂洗 2 次,加结合缓冲液重悬细胞。依据试剂盒说明书,先后加入 Annexin V-FITC 和 PI 避光孵育。流式细胞仪检测激发波长 488 nm 和发射波长 530 nm 处的荧光强度。实验重复 3 次。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blotting)检测蛋白表达 提取各组细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h。分别加入一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜;加入二抗

(1:2 000)室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 后在暗室中曝光显影, 再浸入定影, 最后洗去残液晾干, 将胶片用 Quantity One 凝胶分析软件处理, 测定各组蛋白条带的吸光度, 以目的条带和 β -actin 条带的比值作为蛋白表达水平。每个蛋白样品重复 3 次。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.00 进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较行 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 SNK- q 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 增殖的影响 与小白菊内酯 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, 不同浓度小白菊内酯处理后分别在 24、48、72、96 h 时检测细胞活性, 结果显示 MUM2B 细胞活性显著降低 ($P < 0.05$)。可见, 小白菊内酯抑制 MUM2B 细胞的增殖。见表 1。

表 1 小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

小白菊内酯水平	重复次数	细胞活性 (OD=490 nm)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
0 $\mu\text{g/mL}$	9	0.54 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.08	1.12 $\pm$ 0.09
5 $\mu\text{g/mL}$	9	0.49 $\pm$ 0.05 ^①	0.56 $\pm$ 0.09 ^①	0.73 $\pm$ 0.09 ^①	0.85 $\pm$ 0.08 ^①
10 $\mu\text{g/mL}$	9	0.41 $\pm$ 0.06 ^①	0.43 $\pm$ 0.04 ^①	0.46 $\pm$ 0.05 ^①	0.47 $\pm$ 0.03 ^①
20 $\mu\text{g/mL}$	9	0.35 $\pm$ 0.04 ^①	0.30 $\pm$ 0.07 ^①	0.25 $\pm$ 0.04 ^①	0.21 $\pm$ 0.03 ^①
F 值		25.03	71.06	172.72	213.29
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 凋亡的影响 与小白菊内酯 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, 不同浓度小白菊内酯组 MUM2B 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); Bax 表达水平显著升高, Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。可见, 小白菊内酯促进葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 凋亡。见图 1、2 和表 2。

2.3 小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 的 NF- κ B 信号通路的影响 与小白菊内酯 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, 小白菊内酯 10 $\mu\text{g/mL}$ 组 p-I κ B α 、NF- κ B p65 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$); I κ B α 的表达水平差异无统计学意义。可见, 小白菊内酯抑制葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 的 NF- κ B 信号通路。见表 3, 图 3。

2.4 NF- κ B 信号通路对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 增殖、凋亡的影响 与 Control 组相比, PDTc 组 Bax 表达水平显著升高, Bcl-2 表达水平显著降低, 细胞活性显著降低, 凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); PMA 组 Bax 表达水平显著降低, Bcl-2 的表达

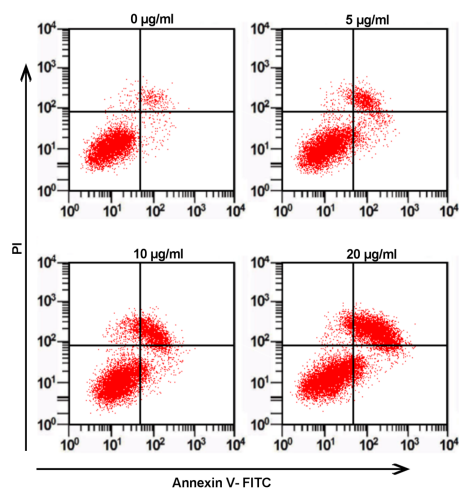
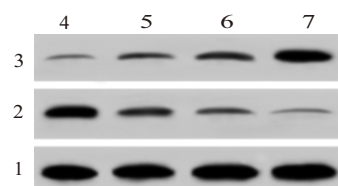


图 1 小白菊内酯对 MUM2B 细胞凋亡的影响



注: 1— β -肌动蛋白 (β -actin); 2—B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2); 3—Bcl-2 相关 X (Bax); 4—0 $\mu\text{g/mL}$ 组; 5—5 $\mu\text{g/mL}$ 组; 6—10 $\mu\text{g/mL}$ 组; 7—20 $\mu\text{g/mL}$ 组。

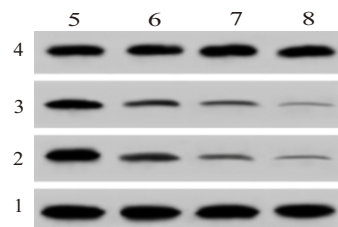
图 2 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测小白菊内酯对 MUM2B 细胞凋亡相关蛋白表达量的影响

表 2 小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞 MUM2B 凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

小白菊内酯水平	重复次数	凋亡率/%	凋亡相关蛋白表达	
			Bax	Bcl-2
0 $\mu\text{g/mL}$	9	5.54 $\pm$ 0.56	0.21 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.09
5 $\mu\text{g/mL}$	9	13.19 $\pm$ 1.65 ^①	0.36 $\pm$ 0.05 ^①	0.53 $\pm$ 0.07 ^①
10 $\mu\text{g/mL}$	9	28.49 $\pm$ 3.90 ^①	0.58 $\pm$ 0.07 ^①	0.35 $\pm$ 0.04 ^①
20 $\mu\text{g/mL}$	9	49.36 $\pm$ 4.27 ^①	0.85 $\pm$ 0.08 ^①	0.20 $\pm$ 0.03 ^①
F 值		368.71	189.88	217.92
P 值		0.000	0.000	0.000

注: Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2; Bax 为 Bcl-2 相关 X。

①与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, $P < 0.05$ 。



注: 1— β -肌动蛋白 (β -actin); 2—核因子- κ B (NF- κ B) p65; 3—p-I κ B α ; 4—I κ B α ; 5—0 $\mu\text{g/mL}$ 组; 6—5 $\mu\text{g/mL}$ 组; 7—10 $\mu\text{g/mL}$ 组; 8—20 $\mu\text{g/mL}$ 组。

图 3 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测小白菊内酯对 MUM2B 细胞的核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路的影响

表3 蛋白质印迹法检测小白菊内酯对MUM2B细胞的核因子- κ B(NF- κ B)信号通路的影响/ $\bar{x} \pm s$

小白菊内酯水平	重复次数	I κ B α	p-I κ B α	NF- κ B p65
0 μ g/mL	9	0.97 $\pm$ 0.09	0.81 $\pm$ 0.11	0.93 $\pm$ 0.12
5 μ g/mL	9	0.96 $\pm$ 0.14	0.48 $\pm$ 0.06 ^①	0.70 $\pm$ 0.08 ^①
10 μ g/mL	9	0.95 $\pm$ 0.12	0.29 $\pm$ 0.03 ^①	0.33 $\pm$ 0.04 ^①
20 μ g/mL	9	0.98 $\pm$ 0.10	0.17 $\pm$ 0.02 ^①	0.21 $\pm$ 0.03 ^①
F值		0.12	165.09	170.31
P值		0.951	0.000	0.000

注:①与0 μ g/mL组比较, $P < 0.05$ 。

水平显著升高,细胞活性显著升高,凋亡率显著降低($P < 0.05$)。可见,抑制NF- κ B信号通路可抑制葡萄膜黑色素瘤细胞MUM2B增殖,促进细胞凋亡;而NF- κ B信号通路激活MUM2B细胞增殖增加,凋亡减少。见表4,图4。

2.5 小白菊内酯通过NF- κ B信号通路影响葡萄膜黑色素瘤细胞MUM2B的增殖和凋亡 与0 μ g/mL组相比,10 μ g/mL小白菊内酯组Bax表达水平显著升高,Bcl-2表达水平显著降低,细胞活性显著降低,凋亡率显著升高($P < 0.05$);与10 μ g/mL组相比,10 μ g/mL+PMA组Bax表达水平显著降低,Bcl-2表达水平显著升高,细胞活性显著升高,凋亡率显著降低($P < 0.05$)。

可见,NF- κ B信号通路激活能够逆转小白菊内酯对葡萄膜黑色素瘤细胞MUM2B的增殖抑制和凋亡促进的作用。见表5,图5。

表4 NF- κ B信号通路对MUM2B细胞增殖、凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	细胞活性(OD=490 nm)				凋亡率/%	凋亡相关蛋白表达	
		24 h	48 h	72 h	96 h		Bax	Bcl-2
对照组	9	0.51 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.07	0.94 $\pm$ 0.12	1.09 $\pm$ 0.09	5.16 $\pm$ 0.56	0.23 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.09
PDTC	9	0.40 $\pm$ 0.04 ^①	0.49 $\pm$ 0.06 ^①	0.56 $\pm$ 0.08 ^①	0.61 $\pm$ 0.08 ^①	17.18 $\pm$ 1.65 ^①	0.57 $\pm$ 0.07 ^①	0.31 $\pm$ 0.03 ^①
PMA	9	0.63 $\pm$ 0.09 ^①	0.91 $\pm$ 0.07 ^①	1.21 $\pm$ 0.13 ^①	1.42 $\pm$ 0.11 ^①	2.53 $\pm$ 0.31 ^①	0.12 $\pm$ 0.03 ^①	1.52 $\pm$ 0.12 ^①
F值		29.29	88.93	76.37	81.55	525.86	145.10	94.68
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

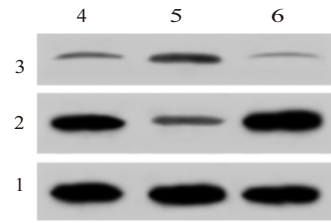
注:PDTC为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯,PMA为佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯,Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2,Bax为Bcl-2相关X。与对照组比较,① $P < 0.05$ 。

表5 小白菊内酯通过NF- κ B信号通路对MUM2B细胞增殖、凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

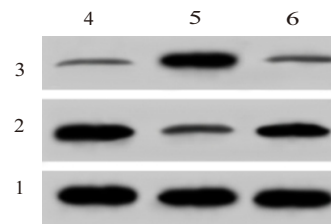
小白菊内酯水平	重复次数	细胞活性(OD=490 nm)				凋亡率/%	凋亡相关蛋白表达	
		24 h	48 h	72 h	96 h		Bax	Bcl-2
0 μ g/mL	9	0.52 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.12	1.08 $\pm$ 0.09	5.31 $\pm$ 0.52	0.21 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.09
10 μ g/mL	9	0.39 $\pm$ 0.07 ^①	0.42 $\pm$ 0.06 ^①	0.45 $\pm$ 0.08 ^①	0.46 $\pm$ 0.08 ^①	26.13 $\pm$ 3.18 ^①	0.97 $\pm$ 0.12 ^①	0.40 $\pm$ 0.05 ^①
10 μ g/mL+PMA	9	0.47 $\pm$ 0.09 ^②	0.63 $\pm$ 0.07 ^②	0.81 $\pm$ 0.13 ^②	0.94 $\pm$ 0.10 ^②	9.53 $\pm$ 1.21 ^②	0.30 $\pm$ 0.40 ^②	0.85 $\pm$ 0.08 ^②
F值		8.77	73.81	83.36	97.28	276.09	123.24	99.56
P值		0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:PMA为佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯,Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2,Bax为Bcl-2相关X。

与0 μ g/mL组比较,① $P < 0.05$ 。②与10 μ g/mL组相比, $P < 0.05$ 。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2);3—Bcl-2相关X(Bax);4—对照组;5—吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)组;6—佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)组。

图4 蛋白质印迹法检测NF- κ B信号通路对MUM2B细胞的凋亡相关蛋白表达量的影响

注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2);3—Bcl-2相关X(Bax);4—0 μ g/mL组;5—10 μ g/mL组;6—10 μ g/mL+PMA组。

图5 蛋白质印迹法检测MUM2B细胞中凋亡相关蛋白的表达

3 讨论

葡萄膜黑色素瘤具有高度的侵袭性和转移性,对人类健康危害极大^[5]。近年来发现部分中药也可抗黑色素瘤,且不良反应轻微^[6]。研究发现PTL可诱导细胞凋亡,抑制非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭^[7]。PTL通过抑制Bcl-2,NF- κ B的表达能抑制宫颈癌Hela细胞株生长与迁移能力^[8];PTL还能抑制

人肝癌、前列腺癌细胞的增殖,诱导细胞凋亡^[9-10]。本实验研究结果发现,小白菊内酯可抑制 Bcl-2 蛋白的表达,促进 Bax 蛋白的表达;抑制黑色素瘤细胞 MUM2B 的增殖,促进其凋亡。

NF- κ B 是真核细胞转录因子家族,该信号通路的激活常与肿瘤的发生密切相关^[11]。研究发现 NF- κ B 信号通路的激活与葡萄膜黑色素瘤的不良预后有关^[12]。抑制 NF- κ B 活性可抑制胃癌细胞增殖、侵袭,促进细胞凋亡^[13]。PMA 是蛋白激酶 C 的激动剂,活化蛋白激酶 C 时可使 I κ B α 磷酸化,与 NF- κ B 分离,激活 NF- κ B 信号通路;PDTC 是一种抗氧化剂,能阻止 I κ B α 磷酸化,阻止 NF- κ B 活化进入细胞核,从而抑制 NF- κ B 信号通路^[14]。本研究用 PMA 和 PDTC 处理黑色素瘤细胞 MUM2B,发现 PMA 作用后细胞活性升高,细胞凋亡减少;PDTC 作用后细胞活性降低,细胞凋亡增多。说明抑制 NF- κ B 信号通路抑制 MUM2B 细胞增殖,促进细胞凋亡;而激活 NF- κ B 信号通路促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。此外,研究发现 PTL 可抑制缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 信号传导和缺氧诱导的大肠癌上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[15]。PTL 可通过下调雷帕霉素/磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (mammalian target of rapamycin/phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B, mTOR/PI3K/AKT) 信号通路来激活自噬和凋亡,从而抑制 MDA-T32 乳头状甲状腺癌细胞^[16]。本实验结果表明,PTL 能抑制 NF- κ B 信号通路的激活,而激活 NF- κ B 信号通路可逆转 PTL 对 MUM2B 细胞的增殖抑制和凋亡促进作用。提示 PTL 可能通过 NF- κ B 信号通路影响葡萄膜黑色素瘤的进展。

综上所述,小白菊内酯抑制黑色素瘤细胞 MUM2B 的增殖,促进其凋亡,可能与 NF- κ B 信号通路相关,将可为黑色素瘤的治疗提供新思路和新靶点。

参考文献

- [1] 郑磊,温佳敏,张国明.葡萄膜黑色素瘤的药物治疗研究现状[J].眼科新进展,2018,38(2):188-192.
- [2] 刘军伟,姚伟锋,沈国樑,等.小白菊内酯对胰腺癌 Panc-1 细胞的作用研究[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(6):640-644.
- [3] 董莉,石玮,孙延庆,等.小白菊内酯抑制肾癌 786-O 细胞增殖及对细胞周期表达的影响[J].国际泌尿系统杂志,2018,38(6):937-940.
- [4] CHE ST, BIE L, LI X, et al. Parthenolide inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human uveal melanoma cells[J]. Int J Ophthalmol, 2019, 12(10):1531-1538.
- [5] 唐飞,甘露,何为民.葡萄膜恶性黑色素瘤治疗新进展[J].国际眼科杂志,2017,17(2):254-258.
- [6] 茅婧怡,周洁,张明,等.恶性黑色素瘤的中医药治疗及研究进展[J].世界临床药物,2017,38(6):428-434.
- [7] LIN M, BI H, YAN Y, et al. Parthenolide suppresses non-small cell lung cancer GLC-82 cells growth via B-Raf/MAPK/Erk pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(14):23436-23447.
- [8] 杨万山,陈升宏,孙抒,等.小白菊内酯对人宫颈癌 Hela 细胞株生长与迁移的影响及其相关分子机制的研究[J].国际老年医学杂志,2017,38(6):241-245.
- [9] 韩琨景,乔艳荣,孙抒,等.小白菊内酯对人肝癌细胞 HepG-2 增殖、凋亡、迁移的影响及机制探讨[J].山东医药,2014,54(19):15-18.
- [10] 艾俊.小白菊内酯对人前列腺癌细胞 PC-3 凋亡作用的机制探讨[J].四川生理科学杂志,2015,37(4):171-174.
- [11] 于锦超,于敏,莫炜. NF- κ B 信号通路在肿瘤发生和炎症反应中的作用[J].药物生物技术,2016,23(1):82-85.
- [12] SINGH MK, SINGH L, PUSHKER N, et al. Identification of canonical NF κ B (C-NF κ B) pathway in uveal melanoma and their relation with patient outcome[J]. Clin Exp Metastasis, 2019, 36(3):271-290.
- [13] 杨舒,张雷. NF- κ B 信号通路胃癌的研究进展[J].医学研究与教育,2017,34(1):33-38.
- [14] 朱鹏博,黄梓雄,陈兵,等. PMA 和 PDTC 干预 NF- κ B 信号通路对划痕损伤后脑微血管内皮细胞增殖的影响[J].广东医学院学报,2015,33(1):52-55.
- [15] KIM SL, PARK YR, LEE ST, et al. Parthenolide suppresses hypoxia-inducible factor-1 α signaling and hypoxia induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2017, 51(6):1809-1820.
- [16] LI C, ZHOU Y, CAI Y, et al. Parthenolide inhibits the proliferation of MDA-T32 papillary thyroid carcinoma cells in vitro and in mouse tumor xenografts and activates autophagy and apoptosis by downregulation of the mammalian target of rapamycin (mTOR)/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Med Sci Monit, 2019, 25(1):5054-5061.

(收稿日期:2019-12-27,修回日期:2020-02-09)