

本文引文格式:任煜,刘婷婷,祁冰洁,等.蟾毒灵对黑色素瘤 A375 细胞的作用及其机制研究[J].右江民族医学院学报,2021,43(6):719-724.

【论著与临床报道】

## 蟾毒灵对黑色素瘤 A375 细胞的作用及其机制研究

任煜,刘婷婷,祁冰洁,陈玉

(安庆医药高等专科学校,安徽 安庆 246052)

**摘要:**目的 探讨蟾毒灵(Bufoalin)对黑色素瘤 A375 细胞的作用及其机制研究。方法 体外培养黑色素瘤 A375 细胞,采用 CCK-8 法检测不同浓度的蟾毒灵对 A375 细胞增殖的影响;采用 Annexin V-FITC/PI 双染,流式细胞仪检测和细胞周期分布情况;JC-1 法检测蟾毒灵对 A375 细胞对线粒体膜电位的影响;采用分光光度法检测 Caspase-9、Caspase-3 蛋白的活性。结果 不同浓度蟾毒灵(6.25 nmol/L、12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L)作用于 A375 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后,IC<sub>50</sub> 值分别为 107 nmol/L、85.18 nmol/L、41.62 nmol/L,IC<sub>50</sub> 值逐渐下降,实验组与空白对照组比较,随着蟾毒灵浓度的增加和作用时间延长,A375 细胞活力均有显著下降,说明蟾毒灵可明显抑制 A375 细胞增殖,且呈浓度依赖性和时间依赖性;蟾毒灵可显著增加 A375 细胞凋亡率并阻滞细胞周期于 S 期;明显降低 A375 细胞线粒体膜电位;蟾毒灵可明显增加 A375 细胞内 Caspase-9、Caspase-3 蛋白的活性。结论 蟾毒灵可抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖,诱导 A375 细胞凋亡,其作用机制可能与激活 Caspase 家族有关。

**关键词:**黑色素瘤;A375 细胞;蟾毒灵;细胞凋亡

中图分类号:R965;R739.5

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2021)06-0719-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.06.004

### Effect of bufalin on A375 melanoma cells and its mechanism

Ren Yu, Liu Tingting, Qi Bingjie, Chen Yu

(Anqing Medical College, Anqing 246052, Anhui, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of bufalin on A375 melanoma cells and its mechanism.

**Methods** A375 melanoma cells were cultured in vitro, and CCK-8 assay was employed to detect the effect of bufalin at different concentrations on A375 cell proliferation. Annexin V-FITC/PI double staining was performed, and cell-cycle distribution was detected by flow cytometry. JC-1 was used to detect the effect of bufalin on the mitochondrial membrane potential of A375 cells. The protein activity of Caspase-9 and Caspase-3 was detected by spectrophotometry. **Results** A375 cells were treated with bufalin at different concentrations (6.25 nmol/L, 12.5 nmol/L, 25 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, 200 nmol/L, 400 nmol/L) for 24 h, 48 h and 72 h. Their IC<sub>50</sub> values were 107 nmol/L, 85.18 nmol/L and 41.62 nmol/L, respectively. The IC<sub>50</sub> values gradually decreased. Compared with the blank control group, the experiment group had a significant decrease in the viability of A375 cells, with the increase of bufalin concentration and the treatment time. These results indicated that bufalin could significantly inhibit the proliferation of A375 cells in a concentration-dependent and time-dependent manner. Bufalin could significantly increase the apoptosis rate of A375 cells and block the cell cycle in S phase. It could also significantly reduce the mitochondrial membrane potential of A375 cells, as well as increased the activity of proteins Caspase-9 and Caspase-3 in A375 cells. **Conclusion** Bufalin can inhibit the proliferation of A375 melanoma cells and induce their apoptosis. Its mechanism may be related to the activation of Caspase family.

**Key words:** melanoma; A375 cells; bufalin; apoptosis

黑色素瘤是黑色素细胞恶变所产生的,多见于皮肤色素沉着部,是由于皮肤表皮层的神经嵴黑色素细胞异常增殖所形成的<sup>[1]</sup>。具有高度恶化、预后差、易转移、对放疗化疗药物不敏感等特点,易发生血液及淋巴转移,最后转移脑部,高转移性是致死的主要原因,约 80% 的皮肤癌患者死于黑色素瘤,是皮肤癌类型中死亡率最高的<sup>[2]</sup>。我国黑色素瘤的发病率占比较欧美国家要低,占肿瘤患者的 2%<sup>[3]</sup>。但是近年来,我国多种肿瘤的发病增长率开始具有明显的下降,但每年患有黑色素瘤的患者仍在持续增长并且呈年轻化趋势<sup>[4]</sup>。目前常规的方法,像放射、化学药物、靶向药物以及免疫治疗药物等治疗方法,均存在治疗效果差、毒性强、单靶点易产生耐药等诸多问题<sup>[5]</sup>,所以寻找新型、低毒、治疗效果好的天然药物成为了研究的新方向。

蟾毒灵(bufoalin)是从传统中药蟾酥中提取的中药单体,是一种强心类固醇,属于蟾毒甙烯类化合物,是蟾酥中抗肿瘤作用最强蟾毒配基<sup>[6]</sup>。有研究表明,蟾毒灵具有抗炎、镇痛、强心、抗肿瘤等多种临床功效<sup>[7]</sup>,在抗肿瘤方面,蟾毒灵在治疗肝细胞癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌等方面都具有较好的药理活性<sup>[8-9]</sup>,但是在黑色素瘤的治疗上鲜少有人报道。本研究以人黑色素瘤 A375 细胞为研究对象,探究蟾毒灵对人黑色素瘤 A375 细胞的增殖作用,并初步探讨其中的分子机制,为进一步深入研究打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 人黑色素瘤 A375 细胞(购自中国科学院上海细胞库);蟾毒灵(纯度>98%,购自成都曼思特生物科技有限公司,DMSO 溶解);二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司);DMEM 高糖培养基、PBS 磷酸缓冲盐溶液、青霉素及链霉素双抗溶液、胰蛋白酶(均购自上海碧云天科技有限公司);胎牛血清(FBS)、CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、DNA 含量检测试剂盒、Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒、Caspase-3 活性测定试剂盒、Caspase-9 活性测定试剂盒(均购自上海索莱宝生物科技有限公司)。

1.1.2 仪器 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);JW-2019HR 高速冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);SpectraMax iD3 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);CytoFLEX 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 取人黑色素瘤 A375 细胞,将其接种于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,置

于 CO<sub>2</sub> 培养箱(37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度)培养,密切观察细胞状态,每 1~2 天更换培养基,待细胞贴壁铺满培养瓶的 70%~80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养。取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 法测蟾毒灵对 A375 细胞增殖的抑制作用 取对数生长期的 A375 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,将其接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μL 的细胞液,每孔细胞浓度为 1×10<sup>4</sup> 个/毫升细胞浓度,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜生长,使细胞贴壁。实验设空白对照组(细胞中加入新鲜的完全培养基)以及蟾毒灵不同浓度组(6.25 nmol/L、12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L),每组设置 6 个复孔。置于培养箱中分别培养 24 h、48 h、72 h 后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续孵育 1 h 后,用酶标仪于波长 450 nm 处检测各孔的 OD 值,并计算细胞的增殖抑制率。计算公式为:增殖抑制率=[1-(药物组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)]×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测蟾毒灵对 A375 细胞凋亡的影响 取对数生长期的 A375 细胞,将其接种于 6 孔板中,每孔细胞密度为 1×10<sup>5</sup> 个/孔,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜,使细胞贴壁。实验设空白对照组(细胞中加入新鲜的完全培养基)以及蟾毒灵不同浓度组(12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L),每组设置 3 个复孔。置于培养箱中培养 48 h 后,用胰蛋白酶消化收集每组的细胞,PBS 冲洗 3 次,然后加入 1 ml 冷 PBS 洗涤,轻轻震荡使细胞悬浮,1000 r/min,4 °C 离心 5 min,弃上清,再用预冷的 PBS 重悬并洗涤细胞 3 次;将细胞浓度调整为 1×10<sup>6</sup> 个/毫升;每管加入 100 μL 的细胞(1×10<sup>5</sup> 个/毫升),按照 Annexin V-FITC 试剂盒说明书每管加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光反应 10 min;再加入 5 μL PI,轻轻混匀,室温避光反应 15 min,加 400 μL Binding Buffer,于 1 h 内采用流式细胞仪检测并分析细胞凋亡情况。细胞凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。

1.2.4 流式细胞术检测蟾毒灵对 A375 细胞周期的影响 取对数生长期的 A375 细胞,将其接种于 6 孔板中,每孔细胞密度为 1×10<sup>5</sup> 个/孔,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养,使细胞贴壁生长。实验设空白对照组(细胞中加入新鲜的完全培养基)以及蟾毒灵不同浓度组(12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L),每组设置 3 个复孔。置于培养箱培养 48 h 后,用 0.25% 的胰蛋白酶消化收集细胞,将细胞浓度调整为(1~5)×10<sup>6</sup> 个/毫升,取 1 ml

的细胞悬液离心,1000 g,离心 3 min;弃上清,用 70% 预冷酒精混匀,置于 4 °C 固定 24 h。1000 g,离心 3 min,去上清,用 PBS 洗涤 2 次。加入 0.5 ml 碘化丙啶染色液,37 °C,4 °C 各避光孵育 30 min,用流式细胞术检测细胞周期的变化。

1.2.5 流式细胞术检测蟾毒灵对 A375 细胞线粒体膜电位的影响 取对数生长期的人黑色素瘤 A375 细胞,将其接种于 6 孔板中,每孔细胞密度为孔细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/孔,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养,使细胞贴壁生长。实验设空白对照组(细胞中加入新鲜的完全培养基)以及蟾毒灵不同浓度组(12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L),每组设置 3 个复孔。置于培养箱培养 48 h 后,用胰酶消化收集各组细胞,按照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书,将 JC-1 染色工作液加入到 A375 细胞悬液中,37 °C 孵育 20 min,随后用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,用 JC-1 染色缓冲液重悬 A375 细胞,采用流式细胞仪检测 JC-1 线粒体膜电位。

1.2.6 分光光度法检测蟾毒灵对 A375 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响 取对数生长期的人黑色素瘤 A375 细胞,将其接种于 6 孔板中,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养,使细胞贴壁生长。实验设空白对照组(细胞中加入新鲜的完全培养基)以及蟾毒灵不同浓度组(12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L),每组设置 3 个复孔。置于培养箱培养 48 h 后,用胰蛋白酶消化收集各组细胞,将细胞浓度调整为  $(1 \sim 5) \times 10^6$  个/毫升,用 PBS 洗涤 3 次,用 PBS 重悬,加入 Lysis Buffer,在冰上孵育 15 min,10 000g,离心 1 min,通过 Bradford 法定量蛋白质浓度,将样品的蛋白浓度调整为 1.0 mg/ml。每组取 50  $\mu$ l 的样品蛋白,根据 Caspase-3 活性测定试剂盒、Caspase-9 活性测定试剂盒说明书,加入 Caspase-3 或 Caspase-9 Substrate,37 °C 避光孵育 4 h,酶标仪检测 405 nm 的吸光度值。用未加药对照组与药物组的吸光度(OD)值来表示不同浓度药物组 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性。

1.3 统计学方法 用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析处理,用 Graphpad Prism 7 进行做图。计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  来表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

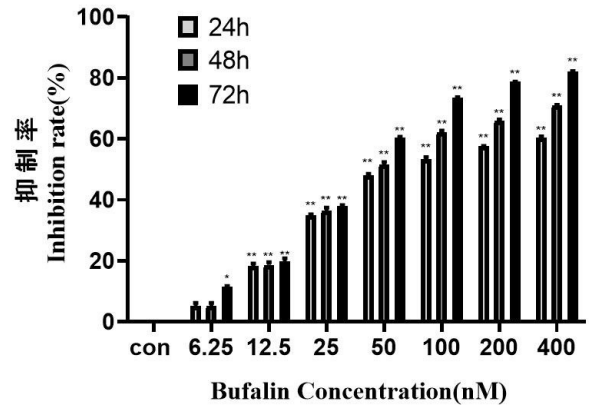
2.1 蟾毒灵对 A375 细胞增殖的影响 CCK-8 实验表明,不同浓度蟾毒灵(6.25 nmol/L、12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L)作用于 A375 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后,IC<sub>50</sub>

值分别为 107 nmol/L、85.18 nmol/L、41.62 nmol/L,IC<sub>50</sub> 值逐渐下降,说明蟾毒灵可明显抑制 A375 细胞的增殖,并且随着蟾毒灵浓度的增加和作用时间延长,A375 细胞活力均有显著下降,呈浓度和时间依赖性,见表 1、图 1。

表 1 不同浓度蟾毒灵对 A375 细胞增殖的抑制率

浓度/ (nmol · L <sup>-1</sup> )	n	时间		
		24 h	48 h	72 h
空白对照	6	1.07 ± 0.47	1.36 ± 0.82	1.62 ± 0.58
6.25	6	5.10 ± 1.06	5.17 ± 1.02	11.44 ± 0.29 <sup>a</sup>
12.5	6	18.25 ± 0.87 <sup>b</sup>	18.64 ± 0.91 <sup>b</sup>	19.80 ± 1.03 <sup>b</sup>
25	6	34.78 ± 0.48 <sup>b</sup>	36.44 ± 0.96 <sup>b</sup>	37.92 ± 0.34 <sup>b</sup>
50	6	48.06 ± 0.50 <sup>b</sup>	51.51 ± 0.90 <sup>b</sup>	60.44 ± 0.26 <sup>b</sup>
100	6	53.33 ± 0.66 <sup>b</sup>	62.14 ± 0.61 <sup>b</sup>	73.50 ± 0.16 <sup>b</sup>
200	6	57.55 ± 0.14 <sup>b</sup>	66.02 ± 0.34 <sup>b</sup>	78.70 ± 0.12 <sup>b</sup>
400	6	60.40 ± 0.42 <sup>b</sup>	70.90 ± 0.29 <sup>b</sup>	82.13 ± 0.13 <sup>b</sup>

注:①表内计量资料数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示;②与空白对照组比,a:  $P < 0.05$ ,b:  $P < 0.01$ 。



与空白对照组比较,\*为  $P < 0.05$ ,\*\*为  $P < 0.01$ 。

图 1 蟾毒灵对 A375 细胞增殖的影响

2.2 蟾毒灵对 A375 细胞凋亡的影响 不同浓度蟾毒灵(12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L)作用于 A375 细胞 48 h 后,流式细胞检测术检测结果显示,蟾毒灵的 12.5 nmol/L 组的 A375 细胞的凋亡率与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L 浓度的蟾毒灵作用于 A375 细胞后的细胞凋亡率显著高于对照组的凋亡率,并且呈浓度依赖性,具有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 2。

2.3 蟾毒灵对 A375 细胞周期的影响 不同浓度蟾毒灵(12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L)作用于 A375 细胞 48 h 后,流式细胞检测术检测 A375 细胞周期,结果显示不同浓度蟾毒灵均可影响 A375 细胞生长周期,与空白对照组相比,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多,但是无统计学差异,S 期细

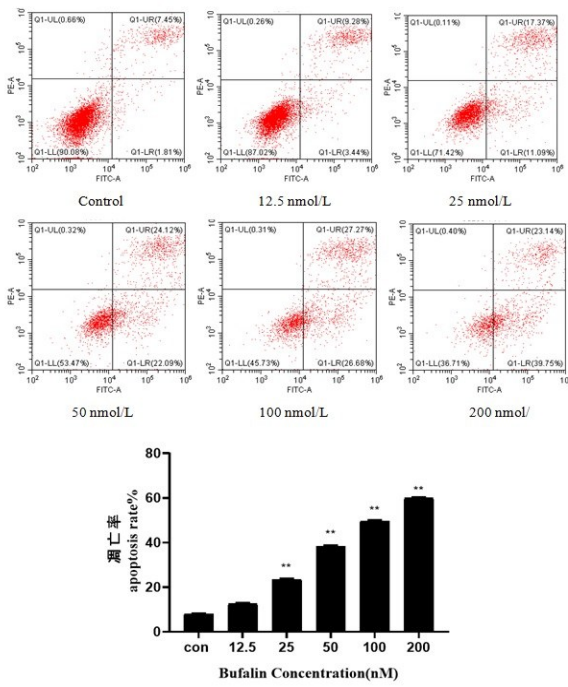
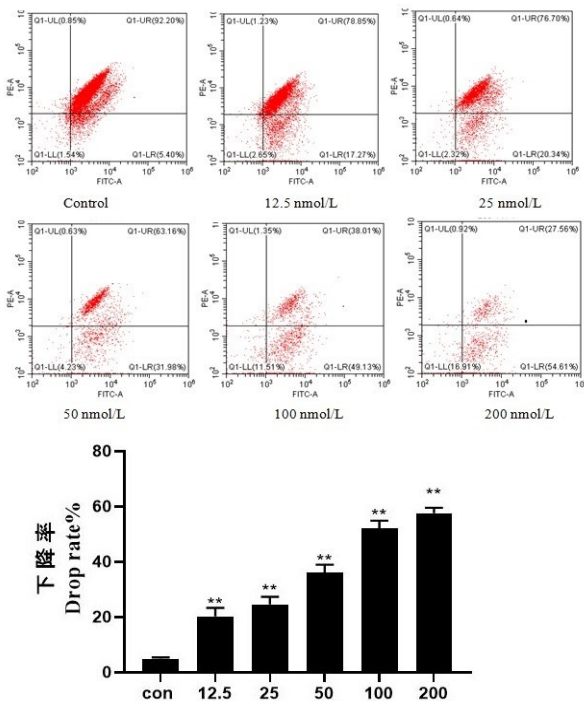


图 2 不同浓度的蟾毒灵对 A375 细胞凋亡的影响

表 2 不同浓度蟾毒灵作用于 A375 细胞细胞周期分布情况

周期	n	蟾毒灵/(nmol·L <sup>-1</sup> )					
		空白对照	12.5	25	50	100	200
G0/G1	3	72.03±0.48	76.27±0.59	77.37±0.37	79.22±0.68	79.72±0.27	79.82±0.64
S	3	3.36±0.22	4.39±0.13	10.60±0.06 <sup>b</sup>	13.31±0.71 <sup>b</sup>	15.42±0.22 <sup>b</sup>	17.57±0.33 <sup>b</sup>
G2/M	3	24.45±0.55	20.18±0.51	11.68±0.24 <sup>a</sup>	7.47±0.23 <sup>b</sup>	3.68±0.01 <sup>b</sup>	2.22±0.12 <sup>b</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示;②与空白对照组比:a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ 。



与空白对照组比,\*为  $P < 0.05$ ,\*\*为  $P < 0.01$ 。

图 3 蟾毒灵对 A375 细胞线粒体膜电位的影响

胞显著增加,具有统计学意义( $P < 0.01$ ),G2/M 期细胞显著减少,表明蟾毒灵诱导 A375 细胞周期阻滞于 S 期,随着蟾毒灵浓度的增加,这种作用越显著,差异具有统计学意义,见表 2。

2.4 蟾毒灵对线粒体膜电位的影响 肿瘤细胞线粒体膜电位的降低是肿瘤细胞早期凋亡的特征之一,不同浓度蟾毒灵(12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L)作用于 A375 细胞 48 h 后,采用 JC-1 染色,流式细胞检测术检测 A375 细胞线粒体膜电位变化,结果显示空白对照组中仅有少量细胞线粒体膜电位下降,而随蟾毒灵浓度的增加,线粒体膜电位下降的细胞数量逐渐增加,且呈剂量依赖性( $P < 0.01$ ),见图 3。

2.5 蟾毒灵对 A375 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响 不同浓度蟾毒灵(12.5 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L)作用于 A375 细胞 48 h 后,用酶标仪检测 Caspase-3、Caspase-9 活性的活性,结果显示 12.5 nmol/L 的蟾毒灵对 A375 细

胞的 Caspase-3、Caspase-9 活性差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),25 nmol/L 的蟾毒灵对 A375 细胞的 Caspase-9 活性差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),25 nmol/L 的蟾毒灵对 A375 细胞的 Caspase-3 活性差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L 浓度的蟾毒灵作用于 A375 细胞后,与 Control 组比较,Caspase-3、Caspase-9 活性均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 3、图 4。

### 3 讨论

黑色素瘤是起源于黑色素细胞恶化转化形成的一种肿瘤,近年来,其发病率及死亡率逐年增加,并呈年轻化趋势<sup>[10]</sup>,发病后转移迅速,恶性程度高,复发率高,预后差<sup>[11]</sup>。黑色素瘤发病人数仅占皮肤恶性肿瘤总数的 5%,但是死亡人数占比很大<sup>[12]</sup>,至今为止,黑色素瘤产生的病因和发病机制尚不完全清楚,日光照射、紫外线、遗传、种族等都有可能导致黑色素瘤的发生<sup>[13]</sup>,临床上治疗黑色素瘤的方法主要包括手术治疗、放射治疗、免疫治疗、化疗等,但是各种治疗手段都

表 3 不同浓度蟾毒灵对 A375 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响

浓度/ (nmol · L <sup>-1</sup> )	n	Caspase-3	Caspase-9
空白对照	3	0.18±0.05	0.17±0.02
12.5	3	0.22±0.04	0.18±0.02
25	3	0.26±0.03 <sup>a</sup>	0.21±0.01
50	3	0.30±0.02 <sup>b</sup>	0.29±0.02 <sup>b</sup>
100	3	0.37±0.02 <sup>b</sup>	0.37±0.02 <sup>b</sup>
200	3	0.45±0.04 <sup>b</sup>	0.49±0.01 <sup>b</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与空白对照组比较,a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ 。

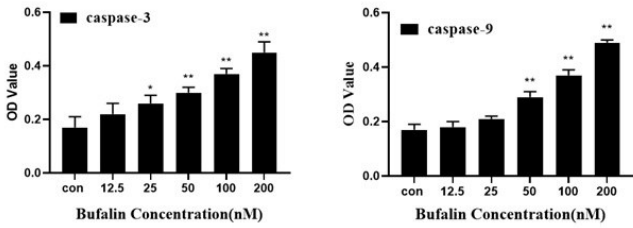


图 4 蟾毒灵对 A375 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响

具有其局限性<sup>[14]</sup>,因此,寻找一些新型安全有效的治疗黑色素瘤的药物成了迫切需求。蟾酥是中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍等的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液,经加工干燥而成,其性味甘辛、温,有毒。蟾酥具有抗肿瘤、强心、镇痛、抗炎等广泛的药理活性<sup>[15]</sup>。蟾毒灵是蟾酥的主要抗肿瘤活性单体,分子式为 C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>,相对分子质量为 386.5,对于多种肿瘤细胞都具有治疗作用,包括胃癌、食管癌、肺癌、肝癌、白血病等<sup>[16-20]</sup>,蟾毒灵抗肿瘤机制可能与抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞分化等有关。

细胞周期阻滞和细胞凋亡是导致细胞死亡的两种机制,G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M 期检查点会严格控制正常细胞的细胞周期进展,改变细胞周期的进展的某个检查点就会导致细胞的异常增殖和肿瘤的发生发展<sup>[21]</sup>,肿瘤细胞的检查点如果出现缺失就会导致无限增殖,许多抗肿瘤药物作用于特定的检测点来阻滞细胞周期,从而诱导细胞凋亡<sup>[22]</sup>。

细胞凋亡是程序性死亡形式之一,涉及一系列基因的激活、表达以及调控。在恶性肿瘤中,细胞凋亡机制是最早调节细胞死亡的机制,在肿瘤发生发展的调控上具有重要的作用<sup>[23]</sup>。凋亡是由多基因严格控制的过程,这些基因在种属之间非常保守,如 Bcl-2 家族、Caspase 家族、癌基因如 C-myc、抑癌基因 P53 等,含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase)可调控细胞凋亡通过切割选择性地切割某些蛋白质<sup>[24]</sup>。Caspase 家族中

Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10 蛋白在细胞凋亡的过程中都有其参与,Caspase-9 前体转变为活化的 Caspase-9,活化的 Caspase-9 可使 Caspase-3 前体转变产生活化的 Caspase-3,引起细胞发生程序性死亡。Caspase-9 作为中间纽带链接凋亡的内外源性途径,级联激活 Caspase 家族因子,扩大凋亡信号,发挥其桥梁功能<sup>[25]</sup>。Caspase-3 是 Caspase 家族中与凋亡有关的关键分子,是细胞凋亡的执行人<sup>[26]</sup>,可以由多种因素活化,被激活后,可以导致蛋白酶多聚(ADP-核糖)及与细胞结构、DNA 核酸复制、细胞周期等相关聚合酶 PARP 失活,从而导致细胞凋亡,所以说 Caspase-3 有“死亡蛋白酶”之称<sup>[27-28]</sup>。线粒体在凋亡中也起着决定性的作用,线粒体丧失电子转移功能并减少能量的产生,跨膜电位的消失都是细胞通过线粒体途径导致细胞凋亡的标志<sup>[29]</sup>。JC-1 是检测线粒体膜电位的理想的荧光探针,JC-1 以多聚体的形式存在在线粒体内,呈红色荧光,表明线粒体膜电位正常,当细胞发生凋亡时,线粒体膜电位去极化,JC-1 会从线粒体内释放到胞浆内,以单体的形式存在,发出绿色荧光<sup>[30]</sup>。

本研究采用 CCK-8 法检测不同浓度的蟾毒灵对人恶性黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响,发现随着浓度和时间的增加,抑制作用增强,呈浓度依赖性和时间依赖性,表明蟾毒灵能够抑制人恶性黑色素瘤 A375 细胞的增殖。采用流式细胞仪检测蟾毒灵对 A375 细胞的凋亡的影响,随着蟾毒灵浓度的增加,A375 细胞的凋亡率也增加,呈浓度依赖性,表明蟾毒灵能够诱导 A375 细胞凋亡。采用流式细胞仪检测蟾毒灵对 A375 细胞周期的影响,蟾毒灵阻滞 A375 细胞细胞周期在 S 期。采用 JC-1 法检测 A375 细胞的线粒体膜电位的变化,发现随着蟾毒灵的浓度的增加,红色荧光逐渐减少,绿色荧光逐渐增加,表明蟾毒灵可显著降低 A375 细胞线粒体膜电位,呈浓度依赖性,进一步说明蟾毒灵能够诱导 A375 细胞凋亡。随着蟾毒灵浓度的增加,Caspase-9、Caspase-3 活性显著增高,表明蟾毒灵能够促进 A375 细胞的 Caspase-9、Caspase-3 活性。由此可以推断,蟾毒灵可能是通过干预 Caspase-3、Caspase-9 的蛋白活性,激活 Caspase 家族,促进 A375 细胞的凋亡。

综上所述,蟾毒灵可有效抑制人黑色素瘤 A375 细胞的增殖,促进 A375 细胞凋亡,且与 Caspase 信号通路的激活相关。表明蟾毒灵在恶性黑色素瘤治疗中具有潜在应用价值。本研究为黑色素瘤的治疗提供了初步的理论基础和实验依据,并为天然药物应用于临床治疗黑色素瘤提供新策略。

- 参考文献:**
- [1] Owens B. Melanoma[J]. Nature, 2014, 515(7527): s109.
  - [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
  - [3] 何英. 恶性黑色素瘤[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2015, 22(15): 16-20.
  - [4] 刘杰, 朱丽萍, 杨旭丽, 等. 2014 年中国皮肤黑色素瘤发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(4): 241-245.
  - [5] 林千里, 张文俊, 汪汇, 等. 皮肤黑色素瘤流行病学及防治研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(3): 28-32.
  - [6] Hong SH, Kim GY, Chang YC, et al. Bufalin prevents the migration and invasion of T24 bladder carcinoma cells through the inactivation of matrix metalloproteinases and modulation of tight junctions[J]. Int J Oncol, 2013, 42(1): 277-286.
  - [7] Ding DW, Zhang YH, Huang XE, et al. Bufalin Induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis in lung adenocarcinoma cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(23): 10495-10500.
  - [8] Li MY, Yu XJ, Guo H, et al. Bufalin exerts antitumor effects by inducing cell cycle arrest and triggering apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. Tumour Biol, 2014, 35(3): 2461-2471.
  - [9] Yan SC, Qu XJ, Xu L, et al. Bufalin enhances TRAIL-induced apoptosis by redistributing death receptors in lipid rafts in breast cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2014, 25(6): 683-689.
  - [10] Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385.
  - [11] 高原, 商冠宁. 皮肤黑色素瘤的外科治疗现状及研究进展[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2020, 12(2): 100-104.
  - [12] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
  - [13] Long GV, Hauschild A, Santinami M, et al. Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III braf-mutated melanoma[J]. N Engl J Med, 2017, 377(19): 1813-1823.
  - [14] Romano E, Michielin O. Successes and limitations of targeted cancer therapy in melanoma[J]. Prog Tumor Res, 2014, 41: 78-88.
  - [15] 朱大诚, 肖威. 蟾酥抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(6): 1441-1444.
  - [16] 孙永浩, 卢言平, 宋庆江, 等. 复方斑蝥抑瘤胶囊配合化疗治疗中晚期胃癌 30 例 [J]. 中医杂志, 2011, 52(16): 1417-1418.
  - [17] Hu F, Han J, Zhai B, et al. Blocking autophagy enhances the apoptosis effect of bufalin on human hepatocellular carcinoma cells through endoplasmic reticulum stress and JNK activation[J]. Apoptosis, 2014, 19(1): 201-213.
  - [18] 徐海平, 吴慧娟, 王福海. 华蟾素注射液在食管癌患者中的应用效果及对血清相关指标的影响[J]. 海南医学院学报, 2014, 20(6): 750-752.
  - [19] 王新民. 蟾酥注射液联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌 34 例[J]. 中外医疗, 2010, 29(31): 39, 41.
  - [20] 肖悦, 薛乾富. 蟾酥对 L<sub>7212</sub> 白血病的疗效和作用机制研究[J]. 中药材, 2014, 37(2): 199-201.
  - [21] Sun JM, Xu HT, Zhao L, et al. Induction of cell-cycle arrest and apoptosis in human cholangiocarcinoma cells by pristimerin[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(7): 12002-12009.
  - [22] Xia LF, Wen H, Han XT, et al. Luteinizing hormone inhibits cisplatin-induced apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells[J]. Oncol Lett, 2016, 11(3): 1943-1947.
  - [23] 俞爱月, 孙小红, 刘学红, 等. 西酞普兰对慢性应激大鼠额叶皮质神经细胞 bax mRNA、bcl-2 mRNA 表达及凋亡的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2015, 31(5): 455-457, 461.
  - [24] 陈泽南, 蒿艳蓉. CSF-1R 过表达对鼻咽癌 6-10B 裸鼠移植瘤生长影响及其机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(13): 917-923, 931.
  - [25] 喻晓静, 邵晓梅, 方剑乔. 细胞凋亡信号传导通路研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(1): 71-72.
  - [26] Pourhassanali N, Roshan-Milani S, Kheradmand F, et al. Zinc attenuates ethanol-induced sertoli cell toxicity and apoptosis through caspase-3 mediated pathways[J]. Reprod Toxicol, 2016, 61(14): 97-103.
  - [27] Mazewski C, Liang K, Mejia EG. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays[J]. Food Chem, 2018, 242: 378-388.
  - [28] Anwar S, Fratantonid D, Ferrari D, et al. Berry anthocyanins reduce proliferation of human colorectal carcinoma cells by inducing caspase-3 activation and p21 upregulation[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(2): 1397-1403.
  - [29] Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(8): 657-663.
  - [30] 黄桔, 李晓文, 蒋艳平, 等. 穿心莲内酯对人胶质瘤细胞 U87-MG 的生长抑制及凋亡诱导作用的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(6): 685-689, 697.

收稿日期: 2021-09-18; 修回日期: 2021-09-28