

中药对恶性黑色素瘤细胞体内外作用的研究进展

张石琳 邹征云

[中图分类号] R739.5

[文献标识码] A

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)简称恶黑,是一种恶性程度极高的肿瘤,是由黑色素细胞异常增生产生的,该细胞能产生黑色素,色素合成和酪氨酸代谢异常可致恶黑的形成,故其大多原发于皮肤,也可起源于眼、鼻腔等其他器官。恶黑浸润和转移能力强,扩散迅速,早期即可发生转移,转移部位多见于肺、脑^[1]。近几年其发病率和病死率都急剧上升,并呈年轻化趋势,患者可在诊断数月内死亡^[2]。恶黑的预后受年龄、性别、发生部位、肿瘤 Breslow 厚度及 Clark 浸润深度等因素影响。手术是本病早期的重要治疗手段,一旦确诊应尽快手术切除,但易复发。后期主要化学治疗,多药联合化疗疗效稍高于单药化疗,放射治疗在手术切除不彻底、拒绝手术及不能手术者中有一定的疗效,此外还有的治疗手段包括免疫治疗、基因治疗、生物化疗,均是目前临床应用较常见的手段,但疗效不太理想。细胞间缝隙连接(gap junction intercellular communication, GJIC)是细胞间传递、交换物质的重要的直接信息通道,是细胞间通讯的主要形式,肿瘤组织细胞间正因为该缝隙连接(GJ)数量减少,物质交流通道的缺乏,导致化疗药物难以扩散到肿瘤组织而达到预期的有效浓度,抗肿瘤作用因此被削弱^[3]。

一、恶性黑色素瘤中医概况

中医并无“恶性黑色素瘤”病名,属黑疔、恶疮、失荣等范畴。先天不足,卫外失固,脏腑虚损,毒邪乘虚而入,与血气相搏,邪留肌肤,致黑疔、恶疮。对于该病的中医治疗,强调辨证论治,扶正祛邪为宗旨,贯穿肿瘤发生、发展全过程。故郁仁存教授^[4]在肿瘤治疗中提出了“内虚学说”“平衡学说”,以五脏辨证为主,尤重视肺脾肾三脏,整个疗程分3个时期,即化

疗前,补益脾肾、祛邪解毒为主,以增强抗肿瘤作用;化疗时,和胃降逆、醒脾调中为主,以减轻化疗毒不良反应;化疗后,补益气血、温肾化瘀为主,并加用现代药理研究证实确有抗肿瘤作用的中草药,辅助协助抗肿瘤。中医治疗是我国的特色治疗方法,中药乃我国的特色资源宝库,其种类繁多,在抗肿瘤治疗方面具有其独特的优势,从中药中寻找具有抗肿瘤作用的药物具有广阔的前景。

二、中药对恶性黑色素瘤的体内外作用机制

1. 抑制恶黑细胞增殖,促进细胞凋亡:中药姜黄素是从草本植物姜黄的根茎中提取出来的一种酚类色素,是姜黄的主要有效成分,其抗肿瘤作用研究较多。姜黄素以 12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/ml}$ 4 个浓度梯度作用于黑色素瘤 B16 - F10 细胞,分别培养 24、48、72h,可显著抑制细胞的增殖,促进其凋亡,并呈时间和剂量的依赖性^[5]。研究发现白藜芦醇抑制小鼠 B16 黑色素瘤细胞及 A375 人恶性黑色素瘤细胞增殖,与抑制 p - Akt 蛋白的表达,降低细胞线粒体膜电位及激活 caspase - 3 有密切关系^[6]。

细胞凋亡是细胞死亡的两种方式之一,其发生与基因调节有关,也被称为程序性细胞死亡,关系到肿瘤的发生、发展和消退。邱实等^[7]研究发现姜黄素作用于 A375 人恶黑细胞 12h 即可观察到细胞凋亡,在一定剂量范围内呈时间 - 剂量依赖性,同时发现在凋亡过程中 c - myc 基因表达水平降低, caspase - 3 的表达显著升高,说明 c - myc 表达的减少和 caspase - 3 表达的增加可能与姜黄素诱导 A375 细胞凋亡有着密切的关系。陆雪芬^[8]采用系统溶剂萃取法提取中药白及各部位成分,发现白及的氯仿层和乙酸乙酯层均可诱导 B16 小鼠恶黑细胞凋亡,氯仿层效果更明显,可能为抑制细胞增殖的作用机制之一。

2. 抑制恶黑细胞黏附、侵袭和转移:恶性肿瘤最主要的特点是具有局部浸润和远处转移的能力,也是致死的主要原因。肿瘤的转移、侵袭是癌细胞与宿主

作者单位:210008 南京中医药大学中西医结合鼓楼临床医学院(张石琳);210008 南京大学医学院附属鼓楼医院(邹征云)

通讯作者:邹征云,硕士生导师,电子信箱:zouzhengyun@medmail.com.cn

细胞及基质相互作用的结果,黏附性是肿瘤细胞重要的功能之一,为肿瘤的生长提供了一个舒适的微环境,所以寻找破坏该黏附作用的药物也是抗肿瘤的一大突破。白藜芦醇是近年来研究较多的一味抗肿瘤中药单体,通过实验,采用细胞染色、慢速聚集法,发现其对 B16BL6、A375、M14、MV13 恶黑细胞与基质黏附均有抑制作用($P < 0.05$),同时抑制了细胞聚集,为其抗肿瘤作用提供了依据^[9,10]。袁华兵等^[11]利用 Transwell 小室研究开口箭皂苷,体外发现其对 B16 - BL6 黑色素瘤细胞的转移和侵袭有抑制作用,体内试验通过对小鼠右后爪种植恶黑细胞,发现黑色素瘤向肺、脾、胸腺转移,其中肺转移较多,用开口箭皂苷药物组肺转移结节数明显减少。研究发现女贞子多糖抑制了黑色素瘤细胞的黏附能力,可能与抑制黑色素瘤黏附分子 E - cadherin 的表达有关,打破了肿瘤细胞之间的黏附能力,破坏了肿瘤细胞的整体性,故发挥了其抗肿瘤的作用^[12]。乙酰肝素酶(heparanase, HPA)是一种特异性的内切酶,在恶性肿瘤细胞中普遍存在,参与肿瘤血管生成和侵袭转移,降低其表达水平可能抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡^[13]。郭勇等^[14]通过体外培养人恶性黑色素瘤 A375 细胞,不同浓度苦参碱对其作用,发现 HPA mRNA 的表达、细胞黏附能力和侵袭能力均明显抑制,差异有统计学意义,并且这种抑制作用随苦参碱浓度的增加而增强,提示苦参碱可能通过下调肿瘤细胞 HPA 表达水平而抑制细胞浸润和远处转移,从而达到抗肿瘤的目的。这也为抗肿瘤提供了一个新的依据。

3. 诱导细胞分化:恶性肿瘤的发生是细胞分化异常的结果,这一过程是可逆的。诱导分化是指在分化诱导剂的作用下使恶性肿瘤细胞逆转,向正常或接近正常细胞分化的现象。所以寻找分化诱导剂是非常有意义的。有对熊果酸(ursolic acid, UA)的研究发现其对 B16 鼠恶黑细胞有较强的分化诱导作用,体外实验中,实验组经 UA 作用后,细胞形态发生明显变化,细胞核变小、规则,核质比减少,线粒体、粗面内质网等细胞器变丰富,说明细胞在正常化。体内实验中, B16 细胞体内成瘤的能力显著下降。结果说明 UA 能明显抑制 B16 细胞增殖并呈时间和剂量依赖性,且形态向正常上皮细胞变化,恶性程度降低。赵连梅等^[15]通过体外实验,利用木鳖子醇提物(ethanol extract of cochinchina momordica seed, CMSEE)对小鼠黑色素瘤 B16 细胞作用,由原来的菱形或多边形,经药物处理后成梭形,并出现树突状结构,成典型的细胞

分化状态,并且这种诱导分化作用在低剂量时明显,高剂量浓度的药物作用后表现出细胞凋亡的状态。说明 CMSEE 诱导了黑色素瘤细胞分化,可能为其抗肿瘤机制之一。

4. 抑制肿瘤血管生成:恶性肿瘤的生长与转移必须依靠新生血管提供足够的营养才能实现。肿瘤属于中医积、癌等范畴,肿瘤患者的血液常处于一种高凝状态,所谓血瘀则血行不畅,肿瘤的无限生长浸润和转移依赖于血液的滋润,丰富的血管网便是通道。肿瘤新生血管形成是血管中的内皮细胞在肿瘤细胞分泌的多种正负调节生长因子的共同调控作用下,增生、延伸而生成新的血管的过程,这些生长因子最重要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。其诱导血管生成作用最强、特异性最高。也有与促血管生成素 - 2(angiotensin - 2, Ang - 2)相关的^[16]。肿瘤新生血管为肿瘤细胞向继发部位、远处转移提供了一条便捷的通道,增加了肿瘤细胞进入微循环的机会。因此,抑制和破坏肿瘤新生血管,阻断肿瘤血供,使肿瘤细胞坏死及阻断转移,已成为肿瘤治疗中一个有效的新策略。有研究者从 120 多种中草药中筛选出两种抗黑色素瘤效果比较好的中草药石蒜和黄连,实验对这两者的单体成分盐酸石蒜碱(LH)和盐酸药根碱(JH)进行抗黑色素瘤血管形成作用研究,发现两者对人高转移黑色素瘤 C8161 细胞主导的新生血管形成具有很好的抑制作用,其机制可能与下调血管形成的关键基因 VE - cadherin 在 C8161 细胞的表达,及抑制 VE - cadherin 启动子的活性有关。人参皂苷 Rg3 可明显抑制 B16 黑色素瘤细胞的血管生成,可能通过下调 VEGF 表达有关,实现抑制肿瘤新生血管形成的作用,进而抑制 B16 黑色素瘤细胞的生长和转移^[17]。

5. 增强免疫:机体的免疫监视体系在防止肿瘤发生上起重要作用,肿瘤的发生是免疫监视功能丧失的结果。肿瘤可通过多种途径逃避机体免疫系统的监视和攻击。机体免疫力低下时对肿瘤细胞的免疫监视功能减弱,免疫功能低下的肿瘤患者预后也差。因此,阻断肿瘤的免疫逃逸,对肿瘤的治疗尤为重要,其中中药多糖的发现无疑为这一领域提供了可靠的依据。Lin 等^[18]通过近 5 年来对多糖的研究发现,有些多糖对肿瘤细胞无直接抑制作用,而是通过增强机体的免疫功能来发挥抗肿瘤作用,多糖的免疫调节作用是目前公认的抗肿瘤作用的主要机制之一。有研究者在体外实验中,利用高转移性的小鼠黑色素瘤

B16F10 细胞培养上清作用于同基因小鼠脾淋巴细胞,发现肿瘤细胞培养上清对同基因小鼠淋巴细胞有明显抑制作用,实验进一步用不同浓度的灵芝多糖(ganoderma lucidum polysaccharides, Gl-PS)对共培养系统作用,实验结果提示灵芝多糖可在不同程度上拮抗肿瘤细胞培养上清对淋巴细胞的抑制作用,并且这种抑制作用具有剂量依赖性。

6. 抑制酪氨酸酶活性和黑色素合成:酪氨酸酶(tyrosinase)又称为多酚氧化酶(polyphenol oxidase),是黑色素生物合成的主要限速酶,其活性的大小直接决定黑色素的合成,它不仅决定黑色素合成的速率,还是黑色素细胞成熟的特征性标志。抑制酪氨酸酶的活性可阻止黑色素的合成。该酶催化 L-酪氨酸羟基化成 L-多巴,再氧化形成多巴醌,再经过一系列的氧化作用最后形成黑色素。红景天、三叶青提取物等,在一定浓度范围内对恶黑细胞增殖有抑制作用,同时酪氨酸酶活性降低,黑色素生成减少,这可能是抑制黑色素瘤细胞生长的机制之一^[19,20]。研究发现驱虫斑鸠菊提取物质量浓度 < 10mg/L 范围内,对酪氨酸酶活性和黑色素合成抑制有增加的趋势,并随浓度增加可抑制人恶性黑色素瘤 A375 细胞的增殖, > 20mg/L 时,显示一定的细胞毒性作用。杏仁油对小鼠黑色素瘤细胞 B16 酪氨酸酶活性和黑色素生成有较强的剂量相关性抑制作用,这也为杏仁油在治疗色素沉着性皮肤病的应用提供了理论基础。

7. 下调抗凋亡基因、促进凋亡蛋白表达:中药藤黄一直以来是人们研究的热点,有效成分藤黄酸作为抗肿瘤一类新药在 2004 年确定为国家“863”计划第 3 批新立项项目。藤黄酸对 A375 细胞的生长抑制作用具有明显的时间-剂量依赖性,同时下调 Bcl-2 蛋白表达, Bax 表达增高,两者比率 Bcl-2/Bax 下降则抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。Bcl-2 蛋白为抗凋亡蛋白, Bax 蛋白为凋亡蛋白, Bcl-2 蛋白具有抑制 Bax 的功能。Bcl-2/Bax 比例升高,则抑制细胞凋亡,反之,则促进细胞凋亡。这也为抗肿瘤机制提供了一个新的研发点。

恶性黑色素瘤在我国发病率呈逐年上升趋势,应引起足够的重视。在临床上,对恶性黑色素瘤的诊断、治疗理应做到早发现、早治疗,以减少肿瘤转移的机会,在运用传统的治疗方案基础上,开发研究新型药物显得更为重要,中药作为我国特色的资源产物,对恶黑细胞有一定的抑制作用,将其开发应用于临床具有重要的意义。

参考文献

- 1 王尔兵,王肇炎. 恶性黑色素瘤的分子靶向药物治疗研究进展[J]. 医药导报, 2012, 31(10): 1333-1336
- 2 McLoughlin JM, Zager JS, Sondak VK, *et al.* Treatment options for limited or symptomatic metastatic melanoma[J]. Cancer Control, 2008, 15(3): 239-247
- 3 Chen W, Yan C, Hou J, *et al.* ATRA enhances bystander effect of suicide gene therapy in the treatment of prostate cancer[J]. Urol Oncol, 2008, 26(4): 397-405
- 4 程培育,李辰慧,张青. 郁仁存治疗恶性黑色素瘤经验[J]. 北京中医药, 2013, 32(7): 515-517
- 5 张亮,万义增. 姜黄素对黑色素瘤 B16-F10 细胞增殖及线粒体凋亡影响的机制研究[J]. 中国社区医师:医学专业, 2012, 14(21): 8-9
- 6 刘浩,蒋琛琛,程秀,等. 白藜芦醇对人黑色素瘤细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(7): 998-1002
- 7 邱实,谭升顺. 姜黄素对人黑色素瘤 A375 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(11): 706-707
- 8 陆雪芬. 白及提取物对小鼠黑色素瘤 B16 细胞诱导凋亡作用的研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1619-1621
- 9 Lee SJ, Kim MM. Resveratrol with antioxidant activity inhibits matrix metalloproteinase via modulation of SIRT1 in human fibrosarcoma cells[J]. Life Sci, 2011, 88(11-12): 465-472
- 10 顾煜琛. 白藜芦醇对黑色素瘤细胞黏附生物学行为的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(1): 92-94
- 11 袁华兵,林平发,陶晓军. 开口箭皂苷抗黑色素瘤侵袭与转移作用研究[J]. 医药导报, 2013, 32(8): 1018-1020
- 12 Li L, Qiu R, Cheng G, *et al.* The adhesion effect of ligustrum lucidum A it polysaccharide on melanoma B16BL6 in vitro[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009, 25(10): 1367-1369
- 13 Barash U, Cohen-kaplan V, Dowek I, *et al.* Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis[J]. FEBS J, 2010, 277(19): 3890-3903
- 14 郭勇,秦建岭,方勇,等. 复方藤梨根制剂下调乙酰肝素酶表达抑制胃癌细胞转移[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(3): 461-463
- 15 赵连梅,韩丽娜,耿艺曼. 木鳖子醇提物诱导小鼠黑色素瘤 B16 细胞分化的作用机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(4): 381-386
- 16 郑振茹,王亚珍,吕品田,等. 赤芍总苷对人黑色素瘤细胞 A375 血管生成因子 VEGF 和 Ang-2 的影响[J]. 医学动物防制, 2012, 27(12): 1095-1097
- 17 辛颖,姜新,崔俊生,等. 人参皂苷 Rg3 抑制 B16 黑色素瘤新生血管生成及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(8): 590-593
- 18 Lin J, Ping L, Chen KS, *et al.* Advance in studies on anti-tumor activity of polysaccharides in latest five years[J]. Zhongguo Zhong Yao Zazhi, 2013, 38(8): 1116-1125
- 19 Chiang HM, Chien YC, Wu CH, *et al.* Hydroalcoholic extract of Rhodiola rosea L. (Crassulaceae) and its hydrolysate inhibit melanogenesis in B16F0 cells by regulating the CREB/MITF/tyrosinase pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 65: 129-139
- 20 吕雯婷,顾书畅,丁丽,等. 三叶青提取物对 A375 细胞增殖酪氨酸酶活性及黑色素合成的影响[J]. 今日药学, 2011, 21(10): 624-626

(收稿日期:2014-02-18)

(修回日期:2014-03-11)