

千金藤素对黑色素瘤干性的影响及机制研究

叶玉洁, 曹东升*

安徽医科大学第二附属医院整形与创面修复外科, 安徽 合肥

收稿日期: 2024年3月25日; 录用日期: 2024年4月19日; 发布日期: 2024年4月26日

摘要

探讨药物千金藤素对人皮肤黑色素瘤细胞的作用及机制。使用CCK8实验检测人皮肤黑色素瘤细胞系A375对千金藤素的剂量毒性效应, 将加入等体积DMSO的A375细胞定义为对照组, A375细胞以梯度浓度和时间的千金藤素处理组设为实验组。成球实验检测肿瘤细胞干细胞成球能力; EdU实验与克隆形成实验检测细胞增殖; 蛋白免疫印记实验检测干细胞标记物, 以及下游的信号转导机制。结果显示A375细胞随着千金藤素处理剂量与时间的增多增殖受到明显抑制, 干性降低, 表现为千金藤素处理组EdU标记新生细胞比例降低, 肿瘤球形成能力下降, 蛋白印迹显示干性标记物表达水平降低。通过对信号转导研究发现, 实验组中JAK2/STAT3信号轴被抑制, 表明千金藤素可能通过靶向JAK2/STAT3信号轴在人皮肤黑色素瘤中发挥抗癌作用。

关键词

千金藤素, 黑色素瘤, A375干性, JAK2/STAT3

The Mechanism Research on Cell Stemness Induced by Cepharanthine in Melanoma

Yujie Ye, Dongsheng Cao*

Department of Plastic and Wound Repair Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: Mar. 25th, 2024; accepted: Apr. 19th, 2024; published: Apr. 26th, 2024

Abstract

To investigate the effect of Cepharanthine on human melanoma cells, CCK8 assay was used to detect the dose toxicity of Cepharanthine in human melanoma cell line A375. A375 cells treated

*通讯作者。

with equal volume of DMSO were defined as the control group, and A375 cells treated with gradient concentration and time of Cepharranthine were set as the experimental group. Tumor sphere formation assay was used to detect the sphere formation ability of tumor cells. EdU assay and colony formation assay were used to detect cell proliferation. Western blot was used to detect stem cell markers and downstream signal transduction mechanisms. The results showed that the proliferation of A375 cells was significantly inhibited and the stemness of A375 cells was decreased with the increase of the dose and time of Cepharranthine treatment. The proportion of EdU-labeled cells and the ability of tumor sphere formation were decreased in the Cepharranthine treatment group. Signal transduction studies showed that the JAK2/STAT3 signaling axis was inhibited in the experimental group, indicating that Cepharranthine may play an anti-cancer role in melanoma by targeting the JAK2/STAT3 signaling axis.

Keywords

Cepharranthine, Melanoma, A375 Stemness, JAK2/STAT3

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黑色素瘤是一种由皮肤黑色素细胞发展而来的恶性肿瘤, 发病率近年来持续增长[1] [2]。黑色素瘤在皮肤癌症中占比不高, 但它是皮肤癌症中致死性最高的癌症, 转移性黑色素瘤的 5 年生存率仅为 27%, 全球每年有 55,500 人致死[3]。黑色素瘤的常用疗法包括免疫检查点抑制剂治疗、靶向治疗、白介素治疗、溶瘤治疗等多种治疗方式[4], 由于黑色素瘤的高致死率与普遍存在的耐药问题, 探索黑色素瘤的治疗与寻找新的靶点非常重要[4] [5]。千金藤素是临床上已经使用了 40 多年的白细胞增生药物, 用于肿瘤治疗引起的白细胞减少症, 被发现在治疗新冠病毒上具备卓越表现, 26 项的比较性临床研究中, 千金藤素被认证为细胞水平抗新冠病毒最有效的药物[6] [7]。千金藤素在黑色素瘤中的应用尚不明确, 本研究旨在细胞水平探究千金藤素对黑色素瘤的作用, 探究千金藤素对黑色素瘤细胞系 A375 干性的影响及机制。

2. 材料与方法

2.1. 材料

人黑色素瘤细胞系 A375 细胞系购买自上海中乔新舟生物科技有限公司; 二甲基亚砜, 千金藤素购买自美国赛莱克生物公司; 青链双抗, CCK8 试剂购买自武汉赛维尔生物公司; BCA 试剂盒, EdU 检测试剂购买自上海碧云天生物公司; 细胞培养基和胎牛血清购买自赛默飞生物公司; SOX2, CD133, CD44, JAK2, STAT3, p-JAK2, p-STAT3 抗体购买自埃博抗生物公司。

2.2. 方法

2.2.1. A375 细胞培养

人黑色素瘤细胞系 A375 细胞系使用 DMEM 高糖培养基, 含 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素双抗在 37°C, 5% 二氧化碳及饱和湿度的培养箱中培养, 使用超净台进行无菌操作。每 2 天时间在细胞密度 80% 左右时进行传代, 传代比例 1:3。

2.2.2. CCK8 检测药物千金藤素时间剂量效应

剂量梯度: 细胞计数后, 使用 96 孔板, 以每孔 5000 个细胞进行铺板, 在 12 小时后更换含不同浓度(参见数据)千金藤素, 孵育 24 小时。

时间梯度: 细胞计数后, 使用 96 孔板, 以每孔 5000 个细胞进行铺板, 在 12 小时后更换 IC₅₀ 浓度的千金藤素, 按照不同时间梯度处理(参见数据)。

以无血清 DMEM 高糖培养基比 CCK8 原液 9 比 1 的比例配置混合液, 每孔加入 100 微升, 在 37°C, 5% 二氧化碳及饱和湿度的培养箱中孵育 1 小时。在 450 nm 波长下检测 OD 值, 进行数据分析。

2.2.3. EdU 实验检测细胞增殖

采用 EdU 成像试剂盒检测细胞的增殖情况, 96 孔板以每孔 1×10^4 个细胞的密度铺片, 按照实验方案进行药物处理。EdU 按推荐浓度 2 μ M 孵育 2 小时, Hoechst 33342 标记细胞核并拍照计数。

2.2.4. 克隆形成实验

将细胞以每孔 500 个细胞的密度置于 6 孔板中, 在 37°C、5% CO₂ 的湿化气氛中孵育 14 天。去除培养基, 用预热的 PBS 洗涤两次, 然后用 4% 多聚甲醛固定 15 分钟。去除多聚甲醛后, 用 PBS 再次洗涤培养基, 用结晶紫染料溶液孵育 15 min。去除结晶紫染料后进行数据收集, 显微镜下计数含有 ≥ 20 个细胞。

2.2.5. 蛋白免疫印记实验

提取总蛋白/核质分离蛋白, BCA 测定蛋白浓度后定容至标准。洗干净预制胶, 拔出胶板, 上样后电泳条件 170 V, 恒压 45 分钟。PVDF 膜依次浸入甲醇、1 \times 膜平衡液各 3 分钟进行活化后转膜。膜浸入快速封闭液摇床上封闭 10 分钟, 浸泡在一抗中 4°C 过夜。条带室温复温 1 小时后 TBST 在摇床上以 60 转的速度清洗 3 次, 每次 5 分钟。浸入二抗, 室温孵育 1 小时, 同样条件 TBST 清洗后显影。

2.2.6. 肿瘤干细胞球形形成实验

细胞在低吸附 6 孔板(美国康宁公司)中以每孔 5000 个细胞的密度培养, 在特定培养基中培养, 该培养基由 DMEM/F12 培养基中添加 1 倍 B27 补充剂, 0.4% 牛血清白蛋白, 20 ng/ml 表皮生长因子和 10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子组成。细胞在 37°C、5% CO₂ 的环境中孵育, 一周后收集数据。

2.2.7. 数据分析

实验组与对照组间各独立样本的统计学意义采用非配对双侧 t 检验。使用 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) 进行数据分析, 定量数据以均数 \pm 标准差表示。

3. 结果

3.1. CCK8 实验检测千金藤素对 A375 细胞的作用

如图 1 所示, 每组设置 3 个副孔, 千金藤素按照的 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 μ M 的梯度给药, 处理 24 小时, 根据测得 OD 值计算存活率, 千金藤素对 A375 细胞的 IC₅₀ 约为 10 μ M (见图 1(a))。

按照 IC₅₀ 剂量给药, 设置时间梯度为 24, 36, 48, 60, 72 h, 根据测得 OD 值计算存活率。结果可见, 千金藤素抑制 A375 细胞增殖, 效果与时间剂量成正比(见图 1(b))。

3.2. 千金藤素抑制 A375 细胞的增殖能力

如图所示, 克隆形成实验和 EdU 实验表明千金藤素抑制了 A375 细胞的克隆形成能力和增殖能力(见图 2), 该分子化合物具备抗肿瘤潜能。

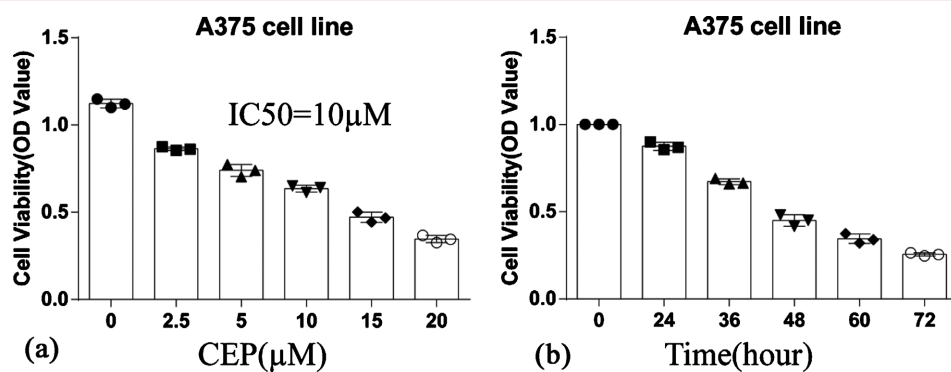


Figure 1. CCK8 experiment. (a) Cell viability after 24 hours of CEP gradient treatment; (b) Cell viability after CEP time gradient treatment

图 1. CCK8 实验。(a) CEP 梯度处理 24 小时后细胞活性; (b) CEP 时间梯度处理后细胞活性

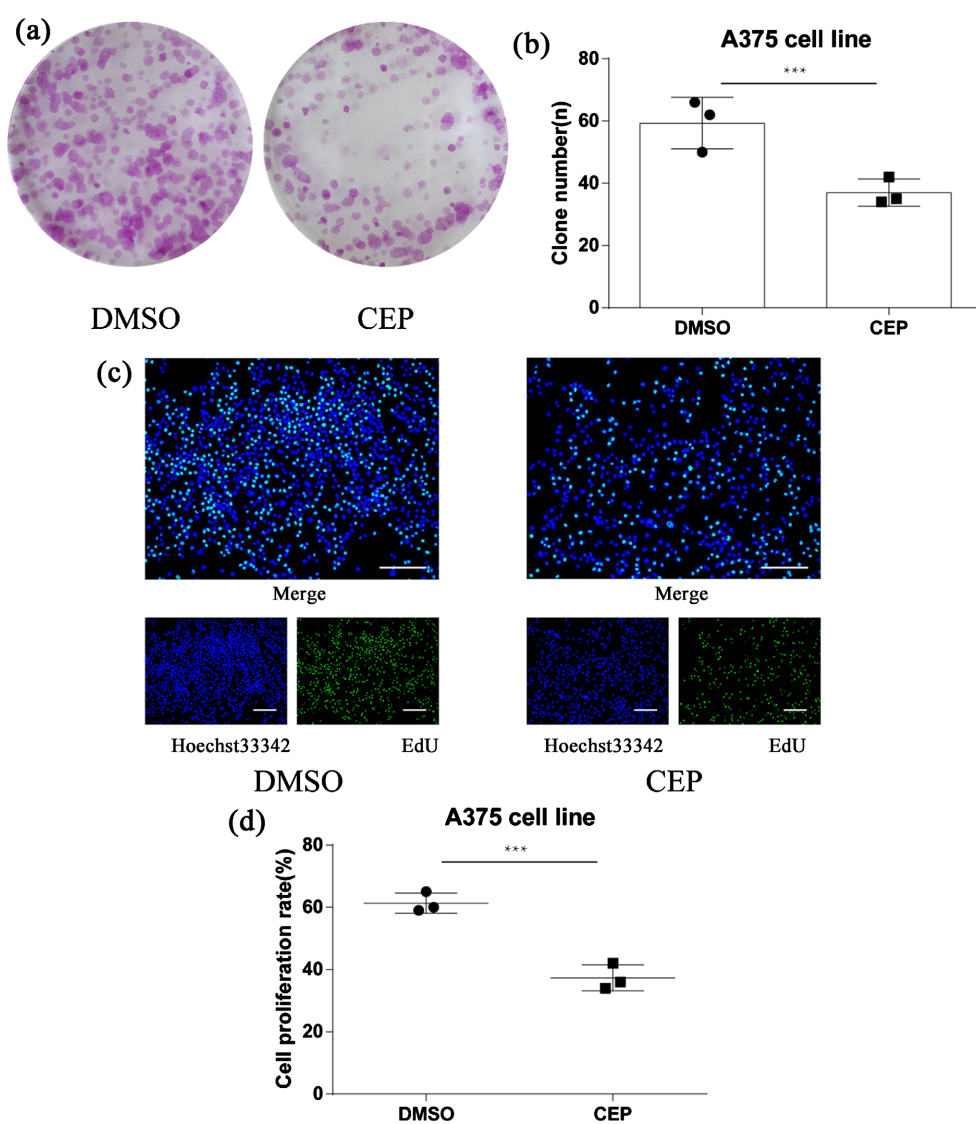


Figure 2. Cepharanthine inhibited the proliferation of A375 cells. (a) (b) Colony formation experiment and quantification, (c) (d) EdU experiment and quantification

图 2. 千金藤素抑制 A375 细胞的增殖能力。(a) (b) 克隆形成实验及量化; (c) (d) EdU 实验及量化

3.3. 千金藤素抑制 A375 细胞的干性

如图, 成球实验千金藤素处理组肿瘤球较小, 且蛋白印迹显示干性指标均下降(见图 3)。

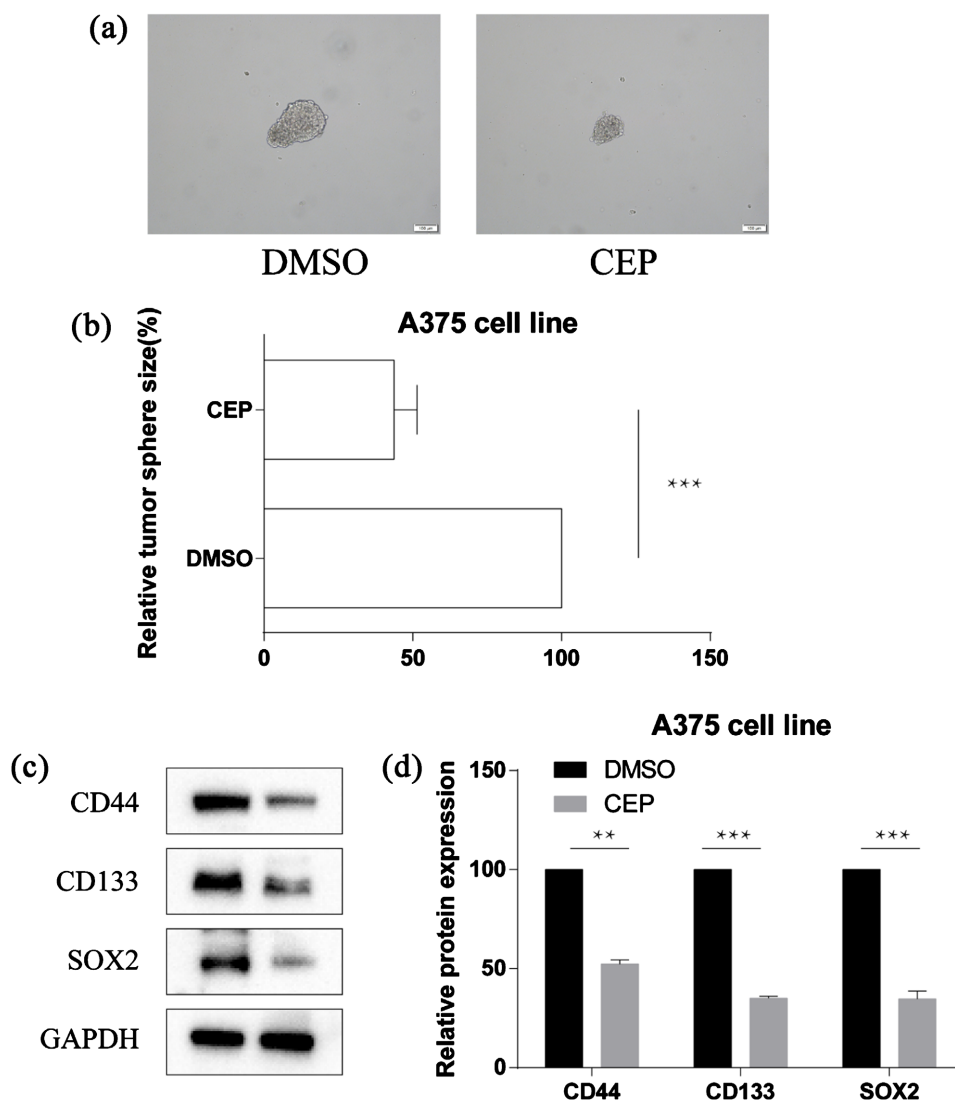


Figure 3. The cell stemness of A375 cells was decreased after cepharanthine treatment. (a) (b) Experiment and quantification of tumor ball formation; (c) (d) Detection of stemness index CD44, CD133, SOX2 and quantification

图 3. 千金藤素处理后 A375 细胞的干性减弱。(a) (b) 瘤球形成实验及量化; (c) (d) 检测干性指标 CD44, CD133, SOX2 及量化

3.4. 千金藤素抑制 JAK2/STAT3 发挥作用

如图, 千金藤素处理后 JAK2/STAT3 的磷酸化减弱, JAK2/STAT3 被抑制(见图 4)。

4. 讨论

黑色素瘤在皮肤癌中发病率仅次于基底细胞癌和鳞状细胞癌, 是第三大常见的皮肤恶性肿瘤[8] [9]。尽管其占皮肤癌总数仅 5%, 但黑色素瘤占皮肤癌总相关死亡率的 65% [10]。黑色素瘤的治疗在过去十年中一直在变化, 早期黑色素瘤的治疗以手术为主, 能够获得很好的治疗效果。而转移性黑色素瘤的预后

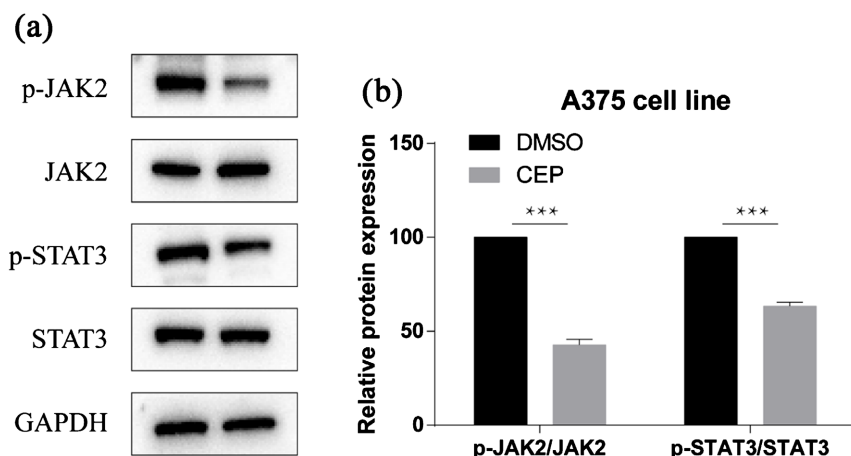


Figure 4. Expression of JAK2/STAT3 after cepharanthine treatment. (a) (b) WB detects JAK2/STAT3 and its phosphorylation. (b) shows quantification

图 4. 千金藤素处理后 JAK2/STAT3 的表达。(a) (b) WB 检测 JAK2/STAT3 及其磷酸化, (b) 图为量化

不佳, 虽然免疫检查点抑制剂的应用极大改善了这一境况, 但许多时候仍然见效极差[11] [12]。目前在临床上, 至少已有 4 种免疫疗法和 3 种靶向疗法可以提高黑色素瘤患者的总生存率, 抗 CTLA-4 抗体药物 ipilimumab, nivolumab 和 PD-1 以及 PD-L1 单抗的应用有效提升了晚期黑色素瘤患者的患癌率。此外, 黑色素瘤是突变负荷最高的实体瘤之一, 基因突变和表达谱分析在黑色素瘤治疗中逐渐成为常规, 分子机制的探索对黑色素瘤的治疗方式具备深远的意义[13]。

目前我国传统药物的抗肿瘤作用越来越受到重视, 从传统药物中提取的抗肿瘤活性成分表现出良好的疗效和最小的不良反应。千金藤素是从防己科植物千金藤中提取的生物碱, 最早在 1933 年被日本科学家提取, 是一种低毒有效的升白细胞药物, 应用于临床至今已经 40 多年。它可单独或与其他治疗药物联合调节多条信号通路, 抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡、调节自噬、抑制血管生成, 从而抑制肿瘤进展, 如调控 Nrf2/Keap1 诱导胃癌细胞氧化应激, 诱导乳腺癌细胞自噬与凋亡, 也通过 Wnt/Hedgehog 通路发挥作用[14] [15] [16] [17]。

在本研究中, 我们首先使用不同剂量的千金藤素对黑色素瘤细胞系 A375 进行处理, 筛选出 IC₅₀ 剂量, 用 IC₅₀ 剂量测试千金藤素的时间杀伤效应, 数据表明, 千金藤素能够有效抑制黑色素瘤细胞系 A375 的增殖。紧接着, 我们通过 EdU 实验和克隆形成实验检测了千金藤素对黑色素瘤细胞系 A375 的增殖与克隆形成能力, 实验结果验证了千金藤素的抑瘤作用。紧接着, 我们通过肿瘤球形成实验和检测干性相关蛋白表达来探究千金藤素对黑色素瘤细胞系 A375 干性的作用, 结果表明千金藤素能够明显抑制黑色素瘤细胞系 A375 的干性。最后, 千金藤素有效抑制了 JAK2/STAT3 信号, 表明千金藤素可能通过调节 JAK2/STAT3 信号抑制干性, 从而发挥抑制肿瘤的效应。

综上所述, 我们的研究证明了千金藤素可能通过靶向 JAK2/STAT3 信号轴抑制干性, 在人皮肤黑色素瘤中发挥抗癌作用。我们仅研究了千金藤素在黑色素瘤细胞系 A375 中的作用, 具备一定的局限性, 尚需要更广泛系统的研究。

参考文献

- [1] Long, G.V., Swetter, S.M., Menzies, A.M., Gershenwald, J.E. and Scolyer, R.A. (2023) Cutaneous Melanoma. *Lancet*, **402**, 485-502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00821-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00821-8)
- [2] Siegel, R.L., Miller, K.D., Wagle, N.S. and Jemal, A. (2023) Cancer Statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **73**, 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>

- [3] Eddy, K., Shah, R. and Chen, S. (2020) Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *Frontiers in Oncology*, **10**, Article No. 626129. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.626129>
- [4] Patton, E.E., Mueller, K.L., Adams, D.J., Anandasabapathy, N., Aplin, A.E., Bertolotto, C., *et al.* (2021) Melanoma Models for the Next Generation of Therapies. *Cancer Cell*, **39**, 610-631. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.011>
- [5] Randic, T., Kozar, I., Margue, C., Utikal, J. and Kreis, S. (2021) NRAS Mutant Melanoma: Towards Better Therapies. *Cancer Treatment Reviews*, **99**, Article No. 102238. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102238>
- [6] Liu, K., Hong, B., Wang, S., Lou, F., You, Y., Hu, R., *et al.* (2023) Pharmacological Activity of Cepharanthine. *Molecules*, **28**. <https://doi.org/10.3390/molecules28135019>
- [7] Rogosnitzky, M., Okediji, P. and Koman, I. (2020) Cepharanthine: A Review of the Antiviral Potential of a Japanese-Approved Alopecia Drug in COVID-19. *Pharmacological Reports*, **72**, 1509-1516. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00132-z>
- [8] Miller, A.J. and Mihm Jr., M.C. (2006) Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **355**, 51-65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>
- [9] Sboner, A., Eccher, C., Blanzieri, E., Bauer, P., Cristofolini, M., Zumiani, G., *et al.* (2003) A Multiple Classifier System for Early Melanoma Diagnosis. *Artificial Intelligence in Medicine*, **27**, 29-44. [https://doi.org/10.1016/S0933-3657\(02\)00087-8](https://doi.org/10.1016/S0933-3657(02)00087-8)
- [10] Dzwierzynski, W.W. (2013) Managing Malignant Melanoma. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **132**, 446e-460e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31829ad411>
- [11] Eggermont, A.M.M., Blank, C.U., Mandala, M., Long, G.V., Atkinson, V., Dalle, S., *et al.* (2018) Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **378**, 1789-1801. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802357>
- [12] Robert, C., Grob, J.J., Stroyakovskiy, D., Karaszewska, B., Hauschild, A., Levchenko, E., *et al.* (2019) Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **381**, 626-636. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904059>
- [13] Jiang, J., Ding, Y., Wu, M., Chen, Y., Lyu, X., Lu, J., *et al.* (2020) Integrated Genomic Analysis Identifies a Genetic Mutation Model Predicting Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma. *Cancer Medicine*, **9**, 8498-8518. <https://doi.org/10.1002/cam4.3481>
- [14] Shen, L.W., Jiang, X.X., Li, Z.Q., Li, J., Wang, M., Jia, G.F., *et al.* (2022) Cepharanthine Sensitizes Human Triple Negative Breast Cancer Cells to Chemotherapeutic Agent Epirubicin via Inducing Cofilin Oxidation-Mediated Mitochondrial Fission and Apoptosis. *Acta Pharmacologica Sinica*, **43**, 177-193. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00715-3>
- [15] Yang, Z.Y., Li, L.G., Xiong, Y.L., Chen, N.N., Yu, T.T., Li, H.T., *et al.* (2023) Cepharanthine Synergizes with Photodynamic Therapy for Boosting ROS-Driven DNA Damage and Suppressing MTH1 as a Potential Anti-Cancer Strategy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **45**, Article No. 103917. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103917>
- [16] Su, G.F., Huang, Z.X., Huang, D.L., Chen, P.X., Wang, Y. and Wang, Y.F. (2022) Cepharanthine Hydrochloride Inhibits the Wnt/Beta-Catenin/Hedgehog Signaling Axis in Liver Cancer. *Oncology Reports*, **47**. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8294>
- [17] Lu, Y.Y., Zhu, C.Y., Ding, Y.X., Wang, B., Zhao, S.F., Lv, J., *et al.* (2023) Cepharanthine, a Regulator of Keap1-Nrf2, Inhibits Gastric Cancer Growth through Oxidative Stress and Energy Metabolism Pathway. *Cell Death Discovery*, **9**, 450. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01752-z>