论著

文章编号:1000-5404(2012)07-0602-03

肉桂醛对恶性黑素瘤A375细胞增殖和分泌VEGF的影响

周 凌,鲁元刚,杨桂红,杨 涛,伍津津 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科)

[摘要] **目的** 研究肉桂醛对体外培养的人恶性黑素瘤细胞株A375增殖和分泌血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响。**方法** A375细胞在体外培养扩增后,在培养基中分别加入10、20、40 μmol/L肉桂醛,分别在培养24、48、72 h MTT法检测细胞活性。同时收集各个浓度肉桂醛处理不同时相的培养液样本,双抗体夹心ELISA法测定其中VEGF分泌量。**结果** 10 μmol/L肉桂醛作用24 h即能抑制A375细胞增殖,10、20、40 μmol/L肉桂醛间的抑制强度具有统计学意义($P<0.01$)。40 μmol/L的肉桂醛作用72 h后细胞增殖抑制率最高,达(88.91±4.5)%。随肉桂醛作用时间延长,A375细胞分泌VEGF的量逐渐减少,72 h后各浓度间的抑制作用具有统计学意义($P<0.01$)。40 μmol/L肉桂醛作用72 h后A375细胞分泌的VEGF含量最低,为9.55 pg/ml。**结论** 肉桂醛能抑制人黑素瘤细胞增殖和VEGF的分泌,其抑制强度与药物浓度和作用时间成正比。

[关键词] 肉桂醛;黑素瘤细胞;血管内皮细胞生长因子;增殖
[中图法分类号] R730.23; R739.5; R914.4 [文献标志码] A

Cinnamic aldehyde suppresses proliferation and VEGF secretion in human melanoma A375 cells

Zhou Ling, Lu Yuangang, Yang Guihong, Yang Tao, Wu Jinjin (Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of cinnamic aldehyde on the proliferation and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) in A375 cells. **Methods** A375 cells were co-cultured with cinnamic aldehyde at the concentrations of 0, 10, 20 and 40 μmol/L for 24, 48 and 72 h respectively. The proliferation of A375 cells was tested by MTT assay. VEGF level in the supernatant was detected by ELISA. **Results** Cinnamic aldehyde at 10 μmol/L inhibited A375 cells proliferation after 24 hours' treatment, Cinnamic aldehyde at 10, 20 and 40 μmol/L affected the cell proliferation significantly ($P<0.01$). The proliferation of A375 cells was most remarkably inhibited after co-culture of 40 μmol/L cinnamic aldehyde for 72 h, with the highest inhibitory rate of (88.91±4.5)%. VEGF level in the supernatant was reduced gradually with the elapse of time. After the treatment of 72 h, cinnamic aldehyde at all above concentrations resulted in a significant reduction of VEGF secretion ($P<0.01$). The lowest level of VEGF in the A375 cells was 9.55 pg/ml after co-culture of 40 μmol/L cinnamic aldehyde for 72 h. **Conclusion** Cinnamic aldehyde inhibits the proliferation and decreases VEGF secretion in human melanoma cells in a time- and dose-dependent manner.

[**Key words**] cinnamic aldehyde; melanoma cells; vascular endothelial growth factor; proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172211). Corresponding author: Wu Jinjin, Tel: 86-23-68757591, E-mail: wjjjj@163.com

恶性黑素瘤(malignant melanoma, MM),是一种高度恶性的肿瘤,是皮肤肿瘤中侵袭性、致死性最强的疾病,致死率高,严重威胁人类健康。MM侵袭性生长是决定其临床预后的关键因素。恶性黑素瘤中含有大量血管,为肿瘤的生长和侵袭提供营养支持。VEGF是促血管生成中最重要的一种细胞因子[1],不仅与肿瘤血管发生和增殖有关,还与肿瘤转移直接相关,对肿瘤新生血管形成和侵袭转移有重要的促进作用。肉桂醛是一种醛类有机化合物,除了作为食品添加剂外,也具有抗真菌、抗病毒和抗癌等医药效应[2-3]。本研究初步探讨了肉桂醛对体外培养的人恶性黑素瘤细胞株A375细胞增殖和分泌VEGF的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和试剂 A375细胞(中国科学院上海细胞库);人VEGF ELISA试剂盒(晶美公司进口分装);高糖DMEM培养基(Hyclone公司);肉桂醛(Sigma公司);胎牛血清(Hyclone公司);MTT粉(Sigma公司)。

1.1.2 主要仪器 超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),二氧化碳孵箱TC2323型(SHEL LAB公司),酶标仪(Bio-tek ELx800);细胞计数仪(HK97CASY-TT)。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172211)
[通信作者] 伍津津,电话:(023)68757591,E-mail:wjjjj@163.com

1.1.3 完全培养基　90% 高糖 DMEM 培养液,10% 优级胎牛血清,2 mmol/L L-谷氨酰胺,50 U/ml 青霉素,50 mg/ml 链霉素。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与扩增　A375 细胞贴壁生长融合后,在倒置显微镜观察成多角形铺路石样排列,倒掉培养基,无菌 PBS 洗涤 3 次后,加入 0.25% 胰酶室温消化 2 ~ 5 min,终止消化后按 1∶4 ~ 1∶8 传代扩增。细胞 - 196 ℃冻存备用,冻存液为含 7% DMSO 的完全培养基。

1.2.2 肉桂醛溶液的配制　在超净工作台上用移液枪吸取肉桂醛 10 μl,加入完全培养基稀释至 100 ml,避光振荡 5 min,0.22 μm 滤膜过滤,4 ℃保存备用。

1.2.3 MTT 法测定 A375 细胞增殖　取对数期生长的 A375 细胞,倾倒培养基,无菌 PBS 洗涤 3 次后 0.25% 胰酶消化,倒置显微镜下观察到细胞收缩变圆后终止消化,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入完全培养基重悬,细胞计数仪计数,按 4 × 10^3 个细胞/ 100 μl 接种于 96 孔板,每孔 100 μl,置入 37 ℃,5% CO_2 孵箱培养。待细胞贴壁后分别加入肉桂醛 0、10、20、40 μmol/L(对应配制好的肉桂醛溶液加入量分别为 0.0、12.5、25.0、50.0 μl)。每组 5 复孔,置入孵箱继续培养。分别在培养 24、48 和 72 h 后每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μl,继续培养 4 h,每孔加入二甲基亚砜 150 μl,避光振荡 10 min,酶标仪 490 nm 处测量光密度值[D(490)]。

1.2.4 ELISA 法测定 VEGF 含量　A375 细胞按 10^4/孔接种于 24 孔板,每孔 1 ml 完全培养基,待细胞贴壁后更换无血清培养基,继续培养 24 h 后分别加入肉桂醛 0、10、20、40 μmol/L,每组 5 复孔,分别在培养 24、48 和 72 h 后取培养基入 1.5 ml 离心管中,吸取上清液置于新的 1.5 ml 离心管中,-20 ℃保存。酶标仪测量前解冻上清液样本至室温,按 ELISA 说明书步骤倍比稀释标准品,含 7.81 ~ 2 000 pg/ ml 共 9 个浓度梯度。反应后 450 nm 处测定光密度值[D(450)]。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行回归分析、方差分析等。

2 结果

2.1 肉桂醛对 A375 细胞增殖的作用

10 μmol/L 肉桂醛作用 24 h 即对 A375 细胞的增殖产生明显抑制作用,20 μmol/L 和 40 μmol/L 的肉桂醛抑制强度更大,各浓度之间以及各浓度与对照组之间的抑制强度均具有统计学意义(P < 0.01)。随肉桂醛作用时间延长,A375 细胞增殖活性持续降低,40 μmol/L 的肉桂醛作用 72 h 后细胞增殖抑制率最高(表 1)。

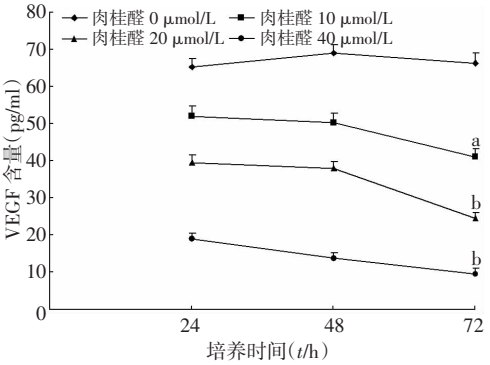
表 1　不同浓度肉桂醛作用不同时间对 A375 细胞增殖的抑制率(%, $\bar{x} \pm s$)

浓度(μmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
10	20.35 ± 2.3[a]	27.76 ± 3.5[a]	38.52 ± 5.1[a]
20	36.31 ± 3.2[ab]	45.50 ± 5.5[ab]	63.30 ± 3.7[ab]
40	60.10 ± 4.2[abc]	81.98 ± 4.7[abc]	88.91 ± 4.5[abc]

a:P < 0.01,与 0 μmol/L 比较;b:P < 0.01,与 10 μmol/L 比较;c:P < 0.01,与 20 μmol/L 比较

2.2 肉桂醛作用后 A375 细胞分泌 VEGF 的时相变化

对照组(肉桂醛 0 μmol/L)在培养 72 h 内 VEGF 分泌量相对稳定,实验组在培养 24 h 后,肉桂醛对 A375 细胞分泌 VEGF 产生抑制作用,随肉桂醛作用时间延长,A375 细胞分泌 VEGF 的量逐渐减少,肉桂醛浓度越高,抑制作用越强(图 1)。

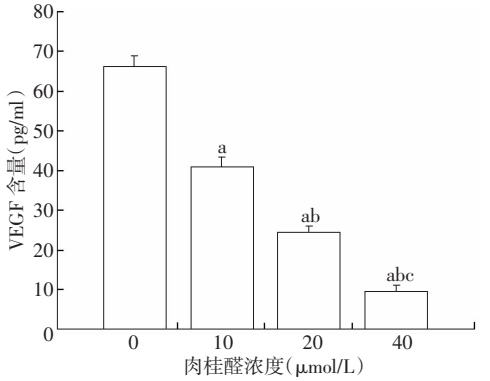


a:P < 0.05,b:P < 0.01,与同浓度组 24 h 比较

图 1　肉桂醛作用下 A375 细胞分泌 VEGF 的时相变化

2.3 各浓度肉桂醛作用 72 h 后抑制 A375 细胞分泌 VEGF 比较

A375 细胞与 10、20 和 40 μmol/L 肉桂醛共培养 72 h 后,分泌 VEGF 的含量均减少(图 2),经 SPSS 11.0 方差分析,各浓度之间以及各浓度与对照组之间的 VEGF 含量均具有统计学意义(P < 0.01)。40 μmol/L 肉桂醛作用后 A375 细胞分泌的 VEGF 含量最低。



a:P < 0.01,与 0 μmol/L 比较,b:P < 0.01,与 10 μmol/L 比较,c:P < 0.01,与 20 μmol/L 比较

图 2　不同浓度肉桂醛作用 72 h 后 A375 细胞分泌 VEGF 的含量变化

3 讨论

黑素瘤是一种高度恶性肿瘤,易转移至全身脏器,5 年存活率低。肿瘤的快速增长需要肿瘤细胞恶性增殖和充分的血液供应,肿瘤新生血管形成是肿瘤发生、发展和侵袭转移的必要条件。抗肿瘤新生血管形成已成为肿瘤治疗中的新热点。

VEGF 是肿瘤血管发生中重要的细胞因子和主要的调节因素。VEGF 在肿瘤形成中不仅促进血管内皮细胞增殖和血管形成,而且通过增加血管通透性促使血浆纤维蛋白原外渗,纤维蛋白沉积,形成肿瘤迁移的基质。多种肿瘤细胞都可自行分泌 VEGF,恶性黑素瘤细胞也具有自分泌 VEGF 的能力[4]。VEGF 高表达是决定肿瘤细胞高侵袭性特征的因素之一,VEGF 在

不典型增生的色素痣以及恶性黑素瘤中的表达强度明显高于良性黑素痣[5-6]，垂直侵袭性生长的黑素瘤中VEGF的表达也明显高于水平扩散的黑素瘤[7]。研究表明，自行高表达或外界刺激诱发高表达VEGF的黑素瘤具有更强的侵袭性[8-9]，而抑制VEGF的表达则可以减少黑素瘤的新生血管生成[10]，抑制其增殖和侵袭。

肉桂醛是肉桂的主要成分，可从肉桂油和桂皮油中分离而得。自然界中天然存在的肉桂醛和商用合成的肉桂醛均为反式结构。在医药方面，肉桂醛可以杀菌、消毒、防腐，也可以抗辐射和抗诱变，抑制肿瘤的发生。肉桂醛中具有抗癌作用的成分主要是2′-羟基氧肉桂醛和2′-苯甲酰氧肉桂醛。本研究观察了肉桂醛对体外培养的人恶性黑素瘤细胞株A375细胞的作用，发现极其微量的肉桂醛在24 h内即可大幅度抑制A375细胞的增殖，抑制强度与肉桂醛浓度和作用时间成正比。机制可能与肉桂醛抑制A375细胞中NF-κB的表达有关。据报道肉桂醛可以抑制多种细胞中NF-κB的表达[11]，NF-κB活化后其下游基因可刺激细胞的生长和增殖，抑制其表达则可促进肿瘤细胞包括A375细胞的凋亡[12-13]，而活化NF-κB的药物则可以对抗A375细胞的凋亡[14]。

同时，微量的肉桂醛也能抑制A375细胞分泌VEGF，抑制作用随药物浓度增高和作用时间延长而增强。说明肉桂醛在体外不仅能通过抑制黑素瘤细胞增殖来减缓肿瘤形成，还能通过降低VEGF的分泌抑制肿瘤新生血管形成和侵袭转移。其作用机制尚待进一步研究，推测也可能与肉桂醛抑制A375细胞中NF-κB的表达有关。NF-κB与肿瘤的发生、发展和血管生成密切相关。NF-κB活化是促血管生成的关键步骤，NF-κB抑制剂几乎等同于抗血管生成因子[15]。NF-κB活性受抑，可显著下调VEGF的表达，减少肿瘤血管形成，限制肿瘤的生长和转移[16-17]。所以肉桂醛可能通过抑制A375细胞NF-κB的表达，影响下游传导通路和基因表达，最终抑制A375细胞增殖和VEGF的分泌。其具体机制尚待进一步研究证明。

VEGF通过促进新生血管形成加速恶性黑素瘤细胞的增殖和扩散，因此应用药物抑制VEGF的分泌有利于抑制恶性黑素瘤的生长和扩散。肉桂醛是FDA批准的唯一可用于食品的α，β-非饱和醛类化合物，安全性高。本研究证明微量的肉桂醛在体外即具有抑制黑素瘤细胞增殖和分泌VEGF的能力，使得肉桂醛有可能成为一种新型的安全的化学抗癌剂，为恶性黑素瘤的治疗提供了新的实验依据。

参考文献：

[1] Pinney E, Liu K, Sheeman B, *et al*. Human three-dimensional fibroblast cultures express angiogenic activity[J]. J Cell Physiol, 2000, 183(1): 74-82.

[2] 许颖，西玉立，杨景云，等. 肉桂醛对根管内白色念珠菌生物膜作用的体外研究[J]. 中国微生态学杂志，2011，23(4)：335-336，339.

[3] 任争，康玉华，石贞玉，等. 肉桂醛氧氟沙星酰腙诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡的作用[J]. 药学学报，2010，45(9)：1109-1115.

[4] Mehnert J M, McCarthy M M, Jilaveanu L, *et al*. Quantitative expression of VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3 in melanoma tissue microarrays[J]. Hum Pathol, 2010, 41(3): 375-384.

[5] Einspahr J G, Thomas T L, Saboda K, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression[J]. Cancer, 2007, 110(11): 2519-2527.

[6] 方木平，刘汉忠，刘永桥. VEGF-C及其受体在皮肤恶性黑素瘤中的表达及其临床意义[J]. 中国麻风皮肤病杂志，2007，23(5)：379-381.

[7] Erhard H, Rietveld F J, van-Altena M C, *et al*. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis[J]. Melanoma Res, 1997, 7(Suppl 2): S19-S26.

[8] Crosby M B, Yang H, Gao W, *et al*. Serum vascular endothelial growth factor(VEGF) levels correlate with number and location of micrometastases in a murine model of uveal melanoma[J]. Br J Ophthalmol, 2011, 95(1): 112-117.

[9] Yang E V, Kim S J, Donovan E L, *et al*. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression[J]. Brain Behav Immun, 2009, 23(2): 267-275.

[10] Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, *et al*. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture[J]. Angiogenesis, 2010, 13(4): 305-315.

[11] Liao B C, Hsieh C W, Liu Y C, *et al*. Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor-alpha-induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF-kappaB activation: effects upon IkappaB and Nrf2[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 229(2): 161-171.

[12] Ismail H A, Lessard L, Mes-Masson A M, *et al*. Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases[J]. Prostate, 2004, 58(3): 308-313.

[13] Bhui K, Tyagi S, Srivastava A K, *et al*. Bromelain inhibits nuclear factor kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G(2)/M arrest to apoptosis[J]. Mol Carcinog, 2012, 51(3): 231-243.

[14] Jiang Y Y, Yang R, Wang H J, *et al*. Mechanism of autophagy induction and role of autophagy in antagonizing mitomycin C-induced cell apoptosis in silibinin treated human melanoma A375-S2 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 659(1): 7-14.

[15] Morais C, Gobe G, Johnson D W, *et al*. Anti-angiogenic actions of pyrrolidine dithiocarbamate, a nuclear factor kappa B inhibitor[J]. Angiogenesis, 2009, 12(4): 365-379.

[16] Xiong H Q, Abbruzzese J L, Lin E, *et al*. NF-kappaB activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells[J]. Int J Cancer, 2004, 108(2): 181-188.

[17] Moon D O, Choi Y H, Moon S K, *et al*. Butein suppresses the expression of nuclear factor-kappa B-mediated matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in prostate cancer cells[J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24(7): 1927-1934.

（收稿：2011-11-16；修回：2011-12-18）

（编辑　邓强庭）