DOI:10.16016/j.2097-0927.202206064

天然小分子 HEP-14 抗黑色素瘤细胞 SK-Mel-103 的作用研究

刘 芳[1,2],钟 沁[1,2],王 贤[1,2],韦睿然[3],桂黎明[1,2] 550004 贵阳,贵州医科大学:基础医学院免疫学教研室[1],组织工程与干细胞实验中心[2];230031 合肥,安徽医科大学临床医学院基础医学部[3]

[摘要] **目的** 初步探讨天然小分子 HEP-14 对黑色素瘤 SK-Mel-103 细胞的抑制作用及相关机制。**方法** 用不同浓度的 HEP-14(2.5~40 μmol/L)处理黑色素瘤 SK-Mel-103 细胞后,CCK-8 和平板克隆形成实验检测细胞的存活率和克隆的形成,流式细胞术检测细胞周期变化和细胞凋亡,Transwell 实验检测细胞迁移能力,RT-qPCR 检测 CD271 和 STAT3 基因水平的表达,Western blot 检测 CD271、STAT3、p-STAT3 蛋白水平的表达,细胞免疫荧光检测进一步证实 CD271 在细胞内的表达。**结果** 与对照组比较,天然小分子 HEP-14 能有效抑制 SK-Mel-103 细胞的生长和克隆的形成($P<0.05$),诱导细胞 G_2/M 期阻滞($P<0.05$),促进细胞凋亡($P<0.05$)和抑制细胞的迁移。HEP-14 显著抑制 SK-Mel-103、SK-Mel-147 和 SK-Mel-28 细胞 STAT3 的磷酸化($P<0.05$),下调 CD271 的表达($P<0.05$)。**结论** 天然小分子 HEP-14 能有效抑制黑色素瘤细胞生长并诱导其凋亡;可能通过抑制 STAT3 的激活下调 CD271 的表达,从而抑制黑色素瘤细胞的迁移。

[关键词] 天然小分子 HEP-14;黑色素瘤;SK-Mel-103 细胞;信号转导和转录活化因子 3;神经生长因子受体

[中图法分类号] R285.5; R73-361; R739.5 [文献标志码] A

Anti-melanoma SK-Mel-103 cells effect of a natural small molecule, HEP-14

LIU Fang[1,2], ZHONG Qin[1,2], WANG Xian[1,2], WEI Ruiran[3], GUI Liming[1,2] [1]Department of Immunology, School of Basic Medicine, [2]Tissue Engineering and Stem Cell Experimental Center, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550004; 3Department of Basic Medical Sciences, Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province, 230031, China

[**Abstract**] Objective To investigate the inhibitory effect of a natural small molecule, HEP-14, on melanoma SK-Mel-103 cells and its underlying mechanism. Methods SK-Mel-103 cells were treated with HEP-14 at different concentrations (2.5~40 μmol/L). The untreated cells were used as a control. Cell viability and colony formation were respectively assessed using CCK-8 assay and colony formation assay. Flow cytometry was applied to examine cell cycle and apoptosis. Transwell assay was used to evaluate cellular mobility. Real-time RT-qPCR was used to measure the mRNA expression of CD271 and STAT3, and Western blotting was employed to detect the protein levels of CD271, STAT3 and p-STAT3. Immunofluorescence assay was perform to confirm the expression of CD271. Results HEP-14 significantly inhibited the growth and colony formation of SK-Mel-103 cells ($P<0.05$), induced cell arrest at G2/M phase ($P<0.05$), promoted cell apoptosis ($P<0.05$) and suppressed cell mobility in comparison with the untreated cells. In addition, HEP-14 treatment suppressed the phosphorylation of STAT3 ($P<0.05$) and down-regulated the expression of CD271 ($P<0.05$) in the melanoma cell lines SK-Mel-103, SK-Mel-147 and SK-Mel-28. Conclusion Natural small molecule HEP-14 effectively inhibits the proliferation and induces the apoptosis of melanoma

[基金项目] 国家自然科学基金委员会-贵州省人民政府联合基金项目(U812403-4);贵州省科技厅社会发展科技支撑计划项目(黔科合支撑[2019]2789 号)

[通信作者] 桂黎明,E-mail:guiliming@gmc.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

SK-Mel-103 cells, and it suppresses the cell migration by inhibiting activation of STAT to down-regulate CD271 expression.

[**Key words**] natural small molecule; melanoma; SK-Mel-103 cells; STAT3; nerve growth factor receptor

Supported by the Joint Program of National Natural Science Foundation of China and Guizhou Provincial Government (U812403-4) and the Social Development Science and Technology Support Program of Guizhou Provincial Department of Science and Technology ([2019]2789). Corresponding author: GUI Liming, E-mail: guiliming@gmc.edu.cn

人类恶性黑色素瘤是一种具有高度侵袭性的癌症。由于肿瘤异质性,其中包含致瘤性不断增强的癌细胞亚群,使其成为难治的耐药性肿瘤之一。同时,伴随对黑色素瘤发展的分子机制和遗传分析的深入研究,黑色素瘤也是其他转移性癌症诊治的理想研究模型[1]。早期手术切除黑色素瘤后的根治率较高,但残余或晚期黑色素瘤仍具有较高的恶性转移能力和侵袭性,靶向治疗(如 BRAF 抑制剂、MEK 抑制剂等)[2]、免疫治疗(如单抗 PD-1 抗体或与抗 CTLT-4 抗体联合使用)的发展[3],已使晚期黑色素瘤患者的临床治疗显著改善,总体生存率提高,但这些药物治疗成果也仅限于某类黑色素瘤患者,而且在治疗过程中可能伴随致癌信号通路的再激活、脱靶效应及耐药基因的出现,导致治疗后复发和再次转移[4-5]。因此,需要开发新的药物来克服目前治疗药物的局限性。黑色素瘤中不同亚型之间存在特异或差异性基因的表达(如 PENT、NRAS、TP53、CDKN2A、MITF)[6],基因表达的差异决定了黑色素瘤的组织病理特征、远处转移部位和速度、药物治疗效果,也因此区别不同的黑色素瘤亚型[7-8]。可见恶性黑色素瘤的药物开发,是基于可靠的分子筛查靶点。

CD271 是一种低亲和力神经生长因子(low-affinity nerve growth factor, NGF)受体或 p75 神经营养因子受体,是肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族成员,在多种癌组织中表达并发挥重要作用。10 个黑色素瘤中有 9 个呈现异质性表达 CD271[9]。CD271 作为黑色素瘤起始细胞(MICs,又称黑色素瘤干细胞)亚群的重要标志物[10-11],与肿瘤细胞形成、迁移和复发密切相关[12]。无论 CD271 是否作为黑色素瘤干细胞亚群的标记物[11],它在黑色素瘤中的作用已被充分证实,抑制 CD271 的表达能降低肿瘤形成能力和体外细胞迁移能力[13-15]。STAT3 在癌症中发挥着重要作用[16-17],在高表达 CD271 的黑色素瘤转移病灶中,同时检测到被高度激活的 STAT3[15-16,18],其依赖的信号通路在介导黑色素瘤细胞向肺部、大脑转移的过程中同样起到关键的调控作用[19];提示黑色素瘤中 CD271 的表达可能与 STAT3 依赖的信号通路调控相关。

天然小分子作为治疗药物具有较高的组织和肿瘤渗透率,可以相对容易地穿过细胞膜和其他生物屏障,进入细胞内靶点[20-21]。HEP-14 (5β-O-angelate-20-deoxyingenol)是从天然植物南欧大戟中提取的天然小分子,是一种类似于吲哚或吲哚甲丁酸酯的化合物。研究显示 HEP-14 家族化合物能调控子宫颈癌 HeLa 细胞、神经母细胞瘤和肝癌细胞的溶酶体生物发生,且 HEP-14 可显著减少阿尔茨海默疾病模型小鼠脑部淀粉样蛋白沉积斑块的累积,是溶酶体相关疾病的可行治疗选择[22]。本课题组在前期用黑色素瘤细胞对 HEP-14 做活性筛查时发现天然小分子 HEP-14 对黑色素瘤细胞的表型和生长有较强抑制作用,但其在黑色素瘤中的抗肿瘤机制尚不清除。因此本研究旨在运用天然小分子 HEP-14 作用于黑色素瘤细胞 SK-MEL-103,观察其对黑色素瘤的影响及初步探讨其可能的机制,为后期深入研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

天然小分子 HEP-14 由中国科学院昆明植物所郝小江院士组提取和赠送[22]。用 DMSO 配制成 10 mmol/L 储存液,保存在-20℃冰箱备用。DMEM 细胞培养基(货号 C1995500BT)、0.25% 胰酶(货号 25200-056)、双抗(货号 15140122)购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(货号 SE100-B)购自北京宏岭隆成科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO,货号 D8371)、ANNEXIN V-Alexa Fluor 647/PI Kit 凋亡检测试剂盒(货号 CA1050)、高效 RIPA 组织/细胞裂解液(货号 R0010)、细胞周期试剂盒(货号 CA1510)购自 Solarbio 公司;细胞增殖与毒性检测试剂(CCK8,货号 GK10001)购自 GLPBIO 公司;BCA 蛋白定量/浓度测定试剂盒(货号 ES6002)、RNA-Quick purification Kit (货号 RN001)、2X Super SYBR qPCR Master MIX(货号 QP002)、快速逆转录试剂盒(货号 RT001)购自上海奕杉生物科技有限公司;5×蛋白加样缓冲液(货号 GF1811)购自 Genefist 公司;Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP(货号 S0001)、β-actin(货号 AF7018)、CD271(货号 AF0360)、STAT3(货号 AF6294)、

p-STAT3(Tyr705,货号 AF3293)购自 Affinity 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞培养 人黑色素瘤 SK-Mel-103、SK-Mel-147、SK-Mel-28 细胞株由 María S. Soengas 博士(西班牙国家癌症研究中心)赠送。SK-Mel-103 细胞复苏后,接种于含 10%的胎牛血清及 1%双抗的 DMEM 高糖培养基,置于 5%CO_2、37 ℃恒温培养箱中培养。2~3 d 传代 1 次,取对数期细胞进行实验,分别用不同浓度 HEP-14 处理细胞,每个浓度组至少 3 个重复。

1.2.2 CCK8 实验测定细胞活力与增殖 取对数生长期的细胞按每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板,细胞贴壁后,用 HEP-14(2.5,5,10,20,40 μmol/L)处理后继续培养 24~72 h,每个浓度组设置 4 个复孔。培养结束时,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,避光培养 2 h,酶标仪测定 450 nm 处的光密度值,计算细胞存活率,公式为细胞存活率 = [$D(450)_{实验孔} - D(450)_{空白孔}$]/[$D(450)_{对照孔} - D(450)_{空白孔}$] × 100%。用 Graphpad Prism 6.0 软件计算药物半数抑制浓度(IC_{50})。

1.2.3 平板克隆形成实验检测细胞增殖能力 药物处理 72 h 后,每个浓度组取 2 mL 细胞悬液(约 5×10^2 个细胞)接种到 12 孔板中,置于培养箱继续培养 2 周,每 3 天更换培养基,当有肉眼可见的克隆出现时终止培养,弃去培养基,甲醇固定后结晶紫染色,计数细胞克隆数,大于 50 个细胞的集落记为有效克隆,实验重复 3 次。

1.2.4 细胞形态观察 将细胞以 2×10^5/孔接种于 6 孔板,待细胞贴壁后更换含 HEP-14(5, 10, 20 μmol/L)的培养基继续培养 24~72 h。待培养结束时,用倒置显微镜观察并拍摄每个浓度组细胞形态变化。

1.2.5 Transwell 迁移实验检测各浓度组细胞纵向迁移情况 取对数生长期细胞接种于 12 孔板内,分别为空白组和 HEP-14 组,每组 3 个复孔。孵育 24 h,HEP-14 作用 48 h 后的细胞用含 0.1% BSA 的 DMEM 培养基分别配成 2.5×10^5/mL 细胞悬液,将小室放入 24 孔板内,下室加入含 20% FBS 的培养基 750 μL,上室加入细胞悬液 200 μL,孵育箱内培养 24 h。移去培养基,PBS 润洗 2 次,去除上室未迁移细胞,4%多聚甲醛固定 5 min,移去甲醛,PBS 润洗 2 次,1%结晶紫染液避光染色 30 min,PBS 润洗 2 次,棉签擦干上室内未迁移细胞,倒置显微镜下拍照。

1.2.6 细胞周期 胰酶消化各组细胞后,用预冷的 70%乙醇固定细胞,4 ℃ 过夜,第 2 天用 PBS 洗涤细胞 2 次,收集沉淀。将 RNase A∶PI 按 1∶9 体积配制成染色工作液,500 μL PI/RNase A 染色工作液重悬细胞,避光孵育 30 min 后,流式细胞仪记录在 488 nm 激发波长处红色荧光,检测细胞周期。

1.2.7 细胞凋亡检测 用 HEP-14(5,10,20 μmol/L)处理细胞 72 h,待培养结束时,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,PBS 洗涤,1×结合缓冲液重悬细胞,调节细胞浓度为(1~6)×10^6/mL,取 100 μL 细胞悬液于流式管中,加入 5 μL Annexin V-Alexa Fluor 647 混匀后室温避光 5min,加入 10 μL 20 μg/mL 的溴化丙啶溶液(PI),加 400 μL PBS,利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.8 RT-qPCR 分析 mRNA 表达 HEP-14(5,10,20 μmol/L)处理 SK-Mel-103 细胞 72 h,收集各组细胞,提取总 RNA,逆转录为 cDNA,进行定量 PCR 扩增反应,每组设 3 个复孔,重复至少 3 次。扩增条件为:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,共进行 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达量,所使用基因及引物序列如下:*β-actin* 上游引物 5′-GTGCTATCCCTGTACGCCTC-3′,下游引物 5′-CGGACTCGTCATACTCCTGC-3′;*STAT3* 上游引物 5′-CAGCAGCTTGACACACGGTA-3′,下游引物 5′-AAACACCAAAGTGGCATGTGA-3′;*CD271* 上游引物 5′-CCGTTGGATTACACGGTCCAC-3′,下游引物 5′-TGAAGGCTATGTAGGCCACAA-3′。

1.2.9 Western blot 检测蛋白表达 将对数生长期的细胞,以 2.5×10^5/mL 接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,分别将终浓度为 5,10,20 μmol/L 的 HEP-14 处理 72 h。用 RIPA(含 PMSF 蛋白酶抑制剂)裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白变性。蛋白样品每孔 20 μg 经 PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,4 ℃ 孵育一抗过夜(1∶1 000),1×TBST 洗涤 3 次,二抗(1∶3 000)室温孵育 1.5 h,采用 ECL 显影液显色,凝胶成像系统拍照,Image J 软件分析。

1.2.10 细胞免疫荧光染色分析 不同浓度 HEP-14 处理后的细胞接种于盖玻片上,4%多聚甲醛固定 30 min,0.1% Triton X-100 通透 15 min,室温下 5% 牛血清白蛋白中封闭 30 min,4 ℃ 湿盒孵育一抗过夜,PBS 洗涤细胞,室温下羊抗兔 IgG(H+L)-Fluor 594 孵育 1 h,用 4′,6- 二脒基 -2- 苯基吲哚 (DAPI)核染 15 min,PBS 洗涤 3 次,防淬灭剂封片后荧光显微镜下观察。

1.2.11 生物信息学分析黑色素瘤 STAT3 和 CD271 相关性 使用 GEPIA(http://gepia.caner-pku.cn/)在线网站进行生物信息学分析。登录 GEPIA 网站,点击“Correlation”基因相关性分析模块,Gene A 与 Gene B 分别输入 STAT3 与 CD271 的基因名称,即 STAT3 与 NGFR,相关系数选择默认的 Pearson 相关系数,数据集选择 TCGA Tumor 数据库中 SKCM Tumor 数据集,点

击“Plot”,生成相关性分析图表[23]。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 24.0 进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析,实验均重复 3 次,$P<0.05$ 表明差异具有统计学意义。

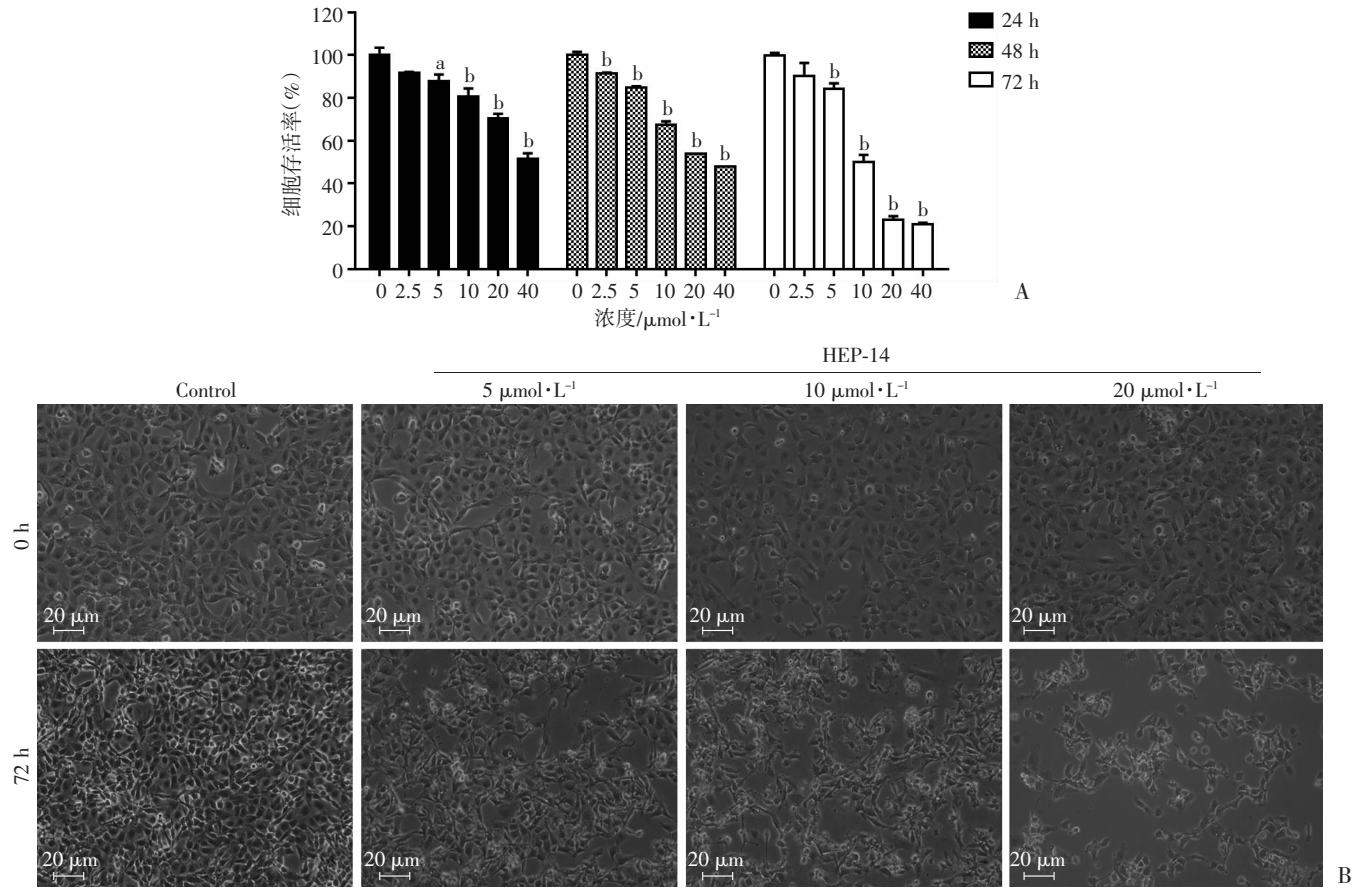
2　结果

2.1　HEP-14 有效抑制 SK-Mel-103 细胞生长

检测天然小分子 HEP-14 对高恶性黑色素瘤细胞 SK-Mel-103 的细胞毒作用,用不同浓度的 HEP-14 分别与 SK-Mel-103 细胞作用 24、48、72 h,CCK-8 结果显示与未处理组细胞相比,HEP-14 降低了 SK-Mel-103 的细胞活性($P<0.05$,$P<0.01$),24、48、72h IC_{50} 值分别为 37.81、21.9、11.06,且 HEP-14 作用的细胞毒性呈时间、剂量依赖性(图 1A)。显微镜下形态学观察显示,随着 HEP-14 作用浓度和时间的增加,细胞数量和大小也明显减少,10 μmol/L HEP-14 作用时间 72 h,出现明显细胞碎片、不定形细胞(图 1B),说明天然小分子 HEP-14 能有效抑制黑色素瘤 SK-Mel-103 细胞的生长。

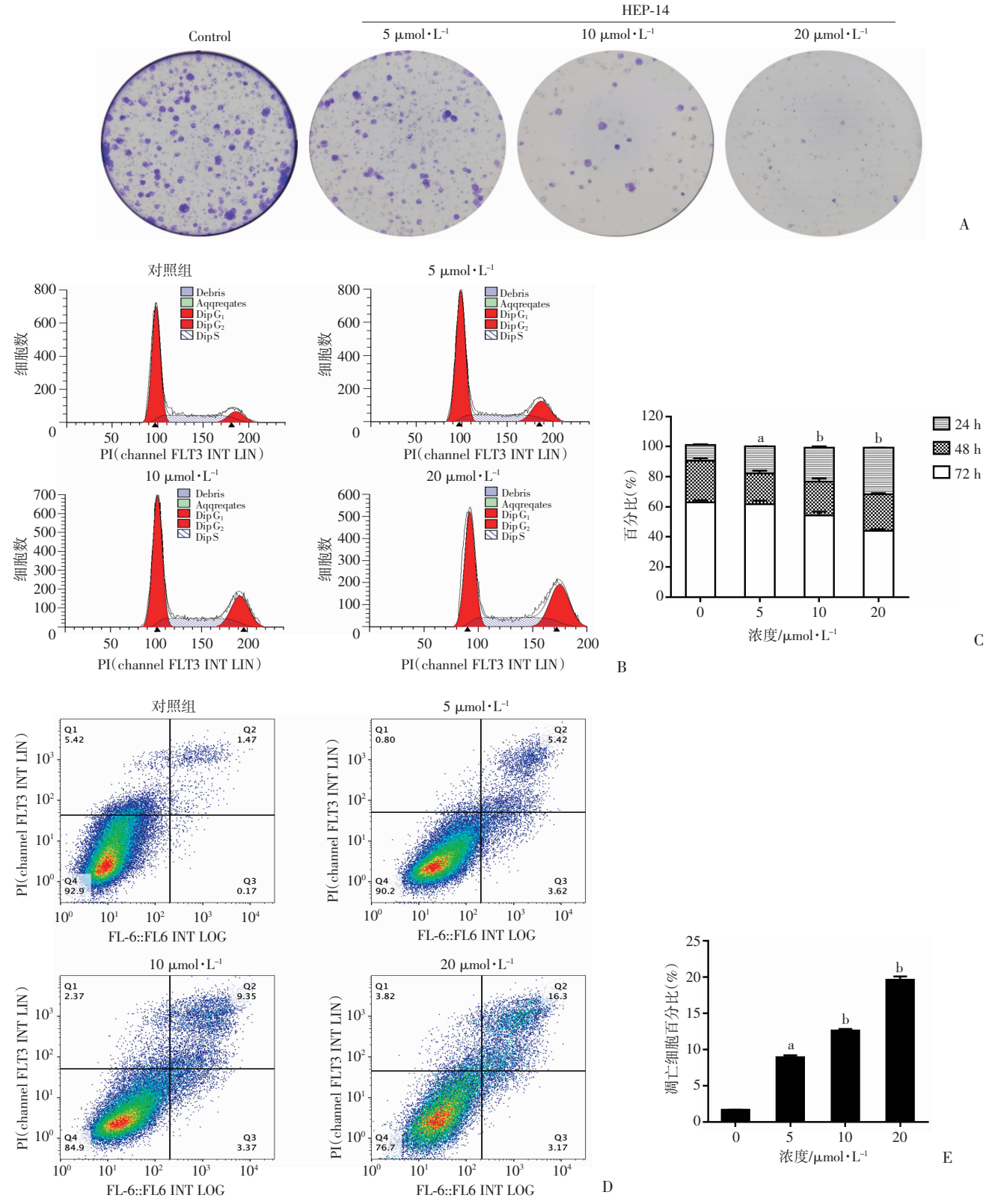
2.2　HEP-14 抑制 SK-Mel-103 细胞增殖,促进细胞凋亡

通过克隆形成实验探讨 HEP-14 对 SK-Mel-103 细胞克隆集落形成的影响,如图 2A 所示,与空白对照组相比,5、10、20 μmol/L HEP-14 组 SK-Mel-103 细胞的克隆数减少($P<0.05$),提示 HEP-14 对 SK-Mel-103 细胞具有抑制作用,且抑制具有显著的浓度依赖性。流式细胞术分析天然小分子 HEP-14 对细胞周期的影响(图 2B、C),与 0 μmol/L HEP-14 组相比,5、10、20 μmol/L HEP-14 组细胞以浓度依赖的方式出现 G_2/M 期阻滞($P<0.05$,$P<0.01$),表明天然小分子 HEP-14 可能通过诱导 SK-Mel-103 细胞 G_2/M 的周期阻滞,抑制细胞增殖。为了进一步研究 HEP-14 对 SK-Mel-103 细胞的诱导凋亡作用,采用 Annexin V/PI 染色进行流式细胞术分析(图 2D、E),结果表明 HEP-14 作用细胞 72 h,与 0 μmol/L HEP-14 组相比,随着 HEP-14 作用浓度的增加,细胞早期凋亡、晚期凋亡比例随之增加($P<0.05$,$P<0.01$),说明 HEP-14 能诱导黑色素瘤细胞 SK-Mel-103 的凋亡。



A:CCK8 检测不同浓度 HEP-14 对黑色素瘤细胞 SK-MEL-103 生长的影响;B:不同浓度 HEP-14 处理黑色素瘤细胞 SK-MEL-103 形态观察　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组(0 μmol /L)比较

图 1 HEP-14 对 SK-MEL-103 细胞生长和细胞形态的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)



A:不同浓度 HEP-14 对 SK-MEL-103 细胞克隆形成的影响;B:不同浓度 HEP-14 对黑色素瘤细胞 SK-MEL-103 周期的影响;C:不同浓度 HEP-14 处理后黑色素瘤细胞 SK-MEL-103 各周期比例;D:流式细胞仪检测不同浓度 HEP-14 对黑色素瘤细胞 SK-MEL-103 凋亡的影响;E:不同浓度 HEP-14 处理后黑色素瘤细胞 SK-MEL-103 凋亡细胞比例 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组(0 μmol/L)比较

图 2 HEP-14 对 SK-MEL-103 细胞克隆形成、周期、凋亡的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

2.3　生物信息学分析黑色素瘤组织中 STAT3 mRNA 与标记物 CD271 mRNA 的表达水平

利用 GEPIA 数据库分析黑色素瘤组织 STAT3 mRNA 与标志物 CD271 mRNA 表达的相关性,结果显示 CD271 mRNA 与 STAT3 mRNA 的表达呈正相关(r=0.14,P<0.01,图 3),提示 CD271 的表达可能与 STAT3 有关。

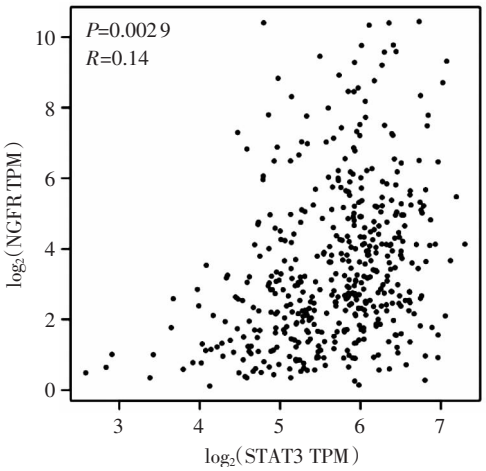
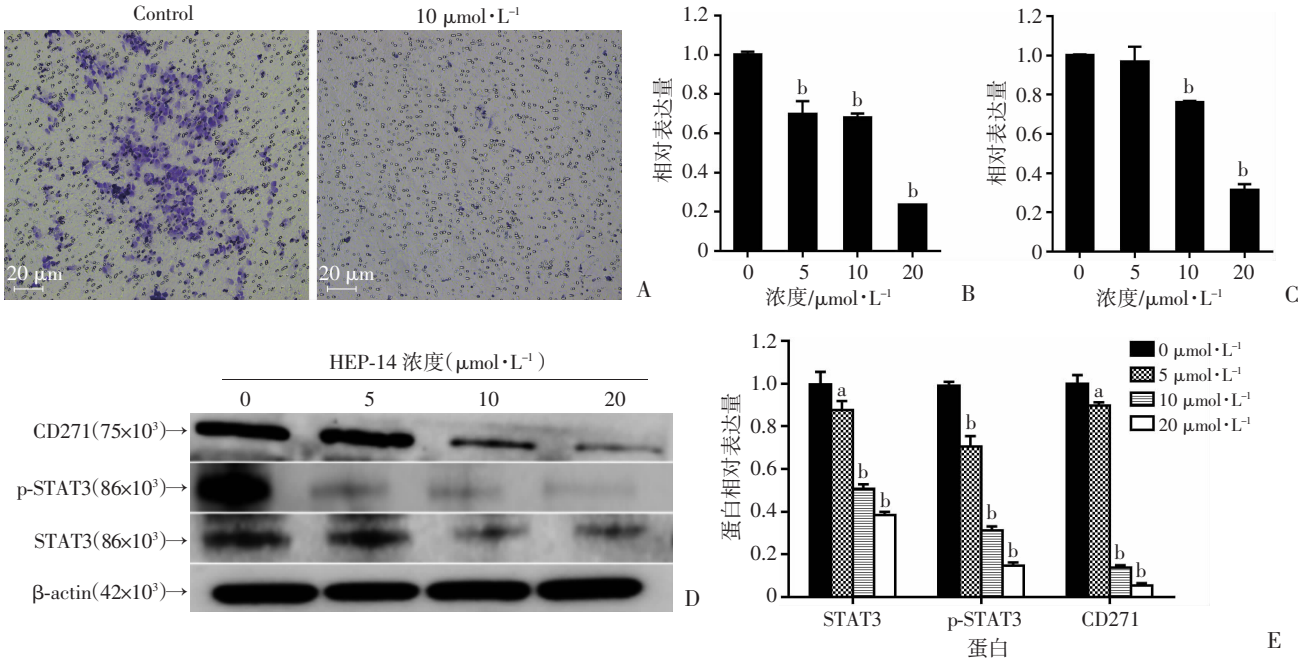


图 3　GEPIA 数据库分析黑色素瘤组织中 STAT3 mRNA 与 NGFR mRNA 表达的相关性

2.4　HEP-14 抑制 STAT3 磷酸化,下调 CD271 表达和阻止 SK-Mel-103 细胞迁移

采用 Transwell 迁移实验研究 HEP-14 对 SK-Mel-103 细胞迁移能力的影响(图 4A),结果表明 HEP-14 显著抑制了细胞迁移(P<0.05)。为了探讨 HEP-14 对黑色素瘤细胞 SK-Mel-103 的迁移抑制作用是否与下调 CD271 表达相关,通过 RT-qPCR、Western blot 验证后(图 4B~E)发现 HEP-14 处理 SK-Mel-103 细胞 72h 能显著抑制 CD271 的表达,同时,用细胞免疫荧光染色分析 HEP-14 处理后 CD271 在 SK-Mel-103 细胞内的表达(图 5),结果显示,与对照组相比,10 μmol/L HEP-14 组 CD271 的荧光信号明显减弱(P<0.05);为进一步探讨 HEP-14 对 CD271 的抑制作用是否依赖 STAT3 信号通路的调控,RT-qPCR、Western blot 结果显示,HEP-14 能显著抑制 STAT3 磷酸化,并且成一定的浓度依赖性(P<0.05,P<0.01);这一结果在其他黑色素瘤细胞株 SK-MEL-147 和 SK-MEL-28 也得到了验证(图 6)。上述结果表明,天然小分子 HEP-14 可能通过 STAT3 依赖的信号通路调控黑色素瘤细胞的 CD271 表达,抑制黑色素瘤细胞的转移。



A:Transwell 检测 10 μmol/L HEP-14 对黑色素瘤细胞 SK-MEL-103 迁移的影响;B、C:CD271 和 STAT3 的 mRNA 相对表达;D、E:CD271、p-STAT3、STAT3 的蛋白相对表达　a:P<0.05,b:P<0.01,与空白对照组(0 μmol /L)组比较

图 4　HEP-14 对 SK-MEL-103 细胞迁移以及 CD271、STAT3、p-STAT3 表达的影响($\bar{x}\pm s$,n=3)

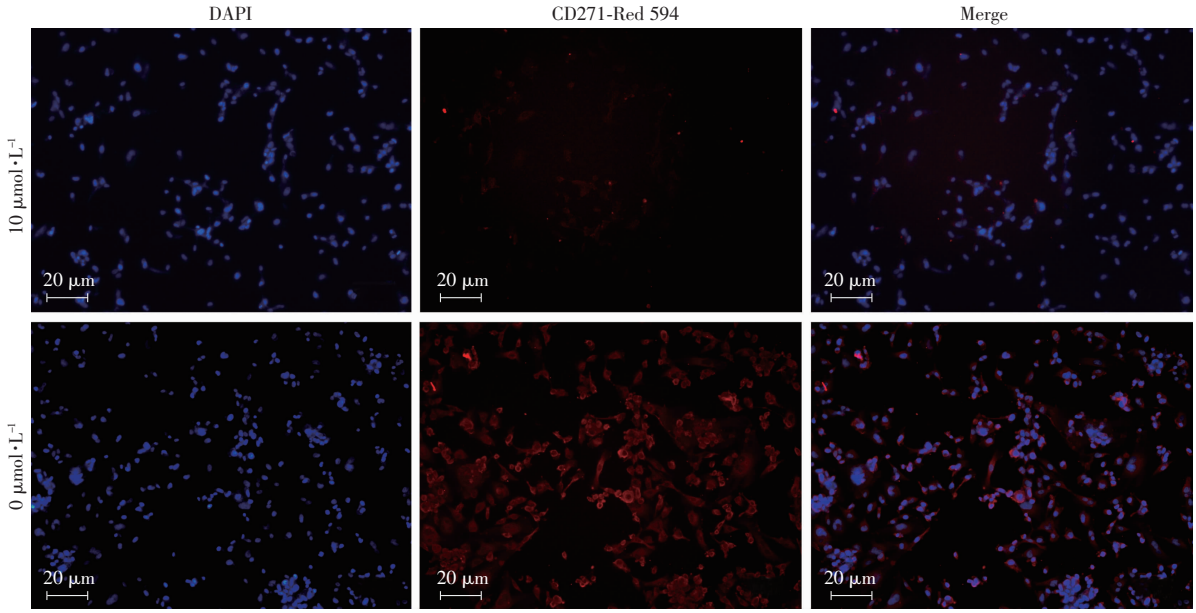
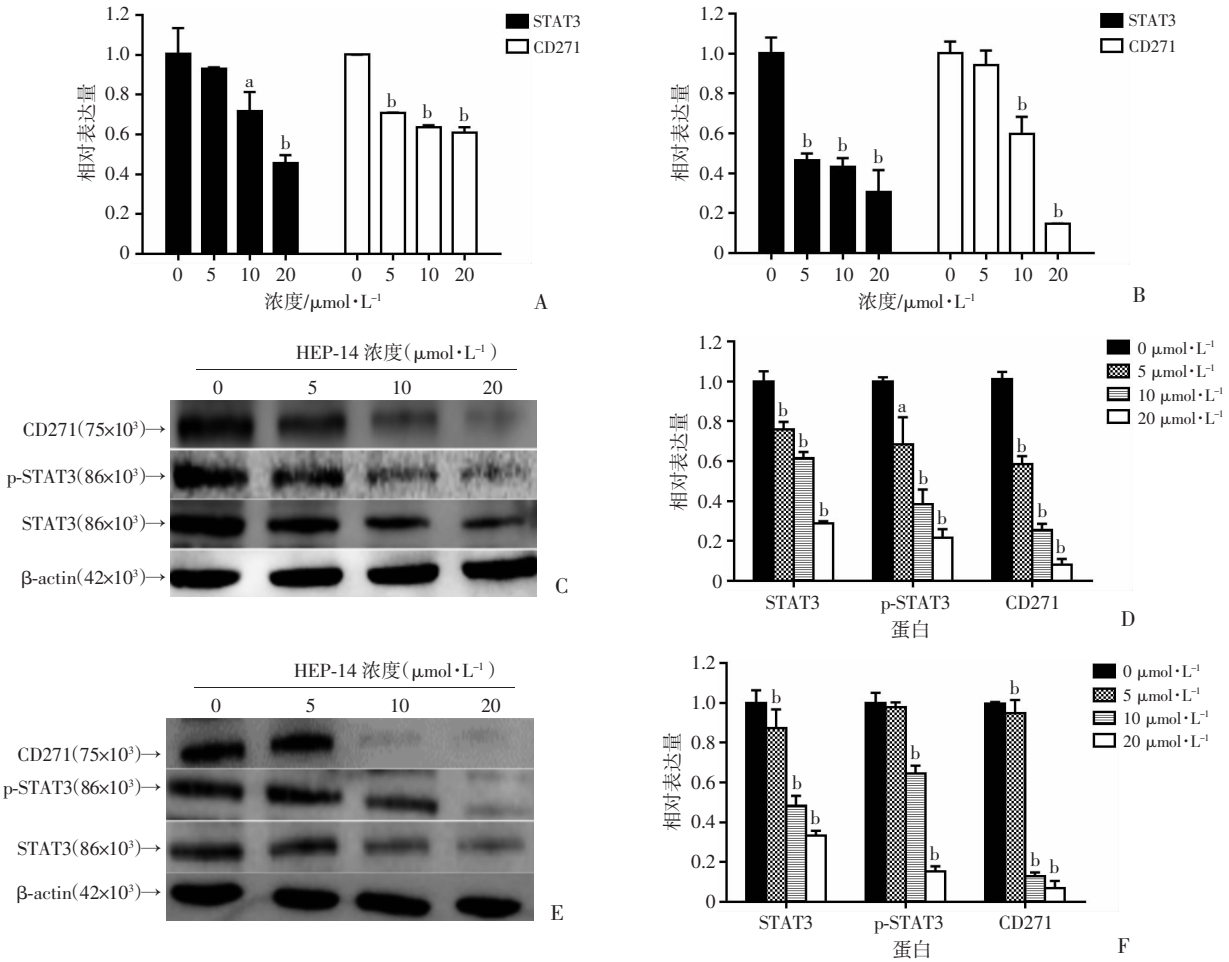


图 5　免疫荧光检测 10 μmol/L HEP-14 对黑色素瘤中 CD271 表达的影响



A、B:分别为 HEP-14 处理后 SK-MEL-147、SK-MEL-28 中 STAT3 和 CD271 的 mRNA 相对表达量;C、D:HEP-14 处理后 SK-Mel-147 细胞 CD271、p-STAT3、STAT3 蛋白的相对表达;E、F:HEP-14 处理后 SK-Mel-28 细胞 CD271、p-STAT3、STAT3 蛋白的相对表达　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组(0 μmol /L) 组比较

图 6　HEP-14 对 SK-MEL-147 和 SK-MEL-28 细胞中 CD271、STAT3、p-STAT3 mRNA 和蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

3 讨论

黑色素瘤是由正常黑色素细胞异常转化引起的恶性肿瘤,具有高度侵袭性和转移性,其发病率在全球范围内逐年攀升。黑色素瘤细胞的异质性及治疗过程中癌基因和信号通路再次激活,已成为阻碍恶性黑色素瘤药物治疗的主要障碍,也使黑色素瘤的药物研发面临新的挑战。天然小分子已成为多种癌症治疗的手段之一,本研究探讨了天然小分子 HEP-14 对高恶性黑色素瘤 SK-Mel-103 细胞的抑制作用。本研究发现,HEP-14 能显著降低黑色素瘤 SK-Mel-103 细胞活力、集落形成能力,增加细胞凋亡率,且表现出明显的浓度依赖性,表明 HEP-14 对黑色素瘤 SK-Mel-103 细胞的生长有明显的抑制作用。

STAT3 是一种重要的转录因子,主要通过 Tyr-705 位点的磷酸化而被激活,具有促进肿瘤的特性。在大多数人类癌症组织中存在持续的 STAT3 过度表达和/或 STAT3 的过度活化[24-25]。本研究结果表明,HEP-14 可以抑制黑色素瘤细胞株包括 SK-Mel-103、SK-MEL-147 和 SK-MEL-28 的 STAT3 总蛋白的表达和磷酸化 STAT3(Tyr-705)蛋白水平,说明 HEP-14 可能通过抑制 STAT3 信号发挥抗黑色素瘤作用。

CD271 是黑色素瘤起始细胞标记物和重要的神经营养因子,调控黑色素瘤的成瘤性和迁移能力,是黑色素瘤发展进程中的重要调控因子。本研究通过 GEPIA 数据库对 STAT3 基因与 CD271 基因(NGFR)进行相关性分析,发现在黑色素瘤组织中 CD271 与 STAT3 在转录组水平上的表达呈正相关。有研究报道在高表达 CD271 的黑色素瘤转移病灶中,同时检测到被高度激活的 STAT3[15-16,18],其依赖的信号通路在介导黑色素瘤细胞向肺部、大脑转移的过程中同样起到关键的调控作用[19];提示黑色素瘤中 CD271 的表达可能与 STAT3 依赖的信号通路调控相关。在进一步研究中发现 HEP-14 在抑制 STAT3 磷酸化的同时也抑制 CD271 的表达,提示 HEP-14 可能是通过调控 STAT3 通路活化抑制 CD271 的表达,从而抑制 SK-Mel-103 细胞的迁移。无论 HEP-14 是否直接抑制黑色素瘤起始细胞亚群,本研究结果提示 HEP-14 可能成为 STAT3 抑制剂或作为 CD271 上下游基因的调控剂。天然小分子 HEP-14 对黑色素瘤的抑制作用具有潜在的研究意义,将为恶性黑色素瘤寻找新的治疗途径提供思路。

综上所述,天然小分子 HEP-14 能有效抑制黑色素瘤细胞生长和诱导其凋亡;可能通过抑制 STAT3 的激活下调 CD271 的表达,从而抑制黑色素瘤细胞的迁移。但诱导细胞死亡存在多种途径,也可能同时受到多条信号通路的调控,HEP-14 抑制黑色素瘤细胞生长的明确机制还需要进一步的研究。CD271 作为重要的神经营养因子参与了细胞的增殖、迁移、细胞粘附等多种细胞生物学行为,因此也受到多种信号通路的调控。CD271 是受到 STAT3 通路的直接调控,还是通过多条信号通路的交叉调控而发挥作用,仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] VIDWANS S J, FLAHERTY K T, FISHER D E, *et al*. A melanoma molecular disease model[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18257. DOI:10.1371/journal.pone.0018257.

[2] BROMAN K K, DOSSETT L A, SUN J, *et al*. Update on BRAF and MEK inhibition for treatment of melanoma in metastatic, unresectable, and adjuvant settings[J]. Expert Opin Drug Saf, 2019, 18(5): 381-392. DOI:10.1080/14740338.2019.1607289.

[3] LEONARDI G C, CANDIDO S, FALZONE L, *et al*. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (review)[J]. Int J Oncol, 2020, 57(3): 609-618. DOI:10.3892/ijo.2020.5088.

[4] KEMPER K, KRIJGSMAN O, CORNELISSEN-STEIJGER P, *et al*. Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts[J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(9): 1104-1118. DOI:10.15252/emmm.201404914.

[5] SMITH M P, SANCHEZ-LAORDEN B, O'BRIEN K, *et al*. The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFα[J]. Cancer Discov, 2014, 4(10): 1214-1229. DOI:10.1158/2159-8290.CD-13-1007.

[6] FATTORE L, MANCINI R, CILIBERTO G. Cancer stem cells and the slow cycling phenotype: how to cut the gordian knot driving resistance to therapy in melanoma[J]. Cancers, 2020, 12(11): 3368. DOI:10.3390/cancers12113368.

[7] SHAIN A H, JOSEPH N M, YU R, *et al*. Genomic and transcriptomic analysis reveals incremental disruption of key signaling pathways during melanoma evolution[J]. Cancer Cell, 2018, 34(1): 45-55. e4. DOI:10.1016/j.ccell.2018.06.005.

[8] SHAIN A H, YEH I, KOVALYSHYN I, *et al*. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions[J]. N Engl J Med, 2015, 373(20): 1926-1936. DOI:10.1056/NEJMoa1502583.

[9] BOIKO A D, RAZORENOVA O V, VAN DE RIJN M, *et al*. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve

growth factor receptor CD271 [J]. Nature, 2010, 466 (7302): 133-137. DOI:10.1038/nature09161.

[10] CHANDRASEKARAN S, DELOUISE L A. Enriching and characterizing cancer stem cell sub-populations in the WM115 melanoma cell line [J]. Biomaterials, 2011, 32 (35): 9316-9327. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.056.

[11] CHELI Y, BONNAZI V F, JACQUEL A, *et al*. CD271 is an imperfect marker for melanoma initiating cells [J]. Oncotarget, 2014, 5(14): 5272-5283. DOI: 10.18632/oncotarget.1967.

[12] DU Y, SHAO H W, MOLLER M, *et al*. Intracellular Notch1 signaling in cancer-associated fibroblasts dictates the plasticity and stemness of melanoma stem/initiating cells [J]. Stem Cells, 2019, 37(7): 865-875. DOI:10.1002/stem.3013.

[13] VIDAL A, REDMER T. Decoding the role of CD271 in melanoma[J]. Cancers, 2020, 12(9): 2460. DOI: 10.3390/cancers12092460.

[14] TRUZZI F, MARCONI A, LOTTI R, *et al*. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(8): 2031-2040. DOI:10.1038/jid.2008.21.

[15] RADKE J, ROßNER F, REDMER T. CD271 determines migratory properties of melanoma cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9834. DOI:10.1038/s41598-017-10129-z.

[16] RAUTH M, FREUND P, ORLOVA A, *et al*. Cell metabolism control through O-GlcNAcylation of STAT5: a full or empty fuel tank makes a big difference for cancer cell growth and survival [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5): 1028. DOI:10.3390/ijms20051028.

[17] SWOBODA A, SOUKUP R, ECKEL O, *et al*. STAT3 promotes melanoma metastasis by CEBP-induced repression of the MITF pathway[J]. Oncogene, 2021, 40(6): 1091-1105. DOI:10.1038/s41388-020-01584-6.

[18] REDMER T. Deciphering mechanisms of brain metastasis in melanoma - the gist of the matter[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 106. DOI:10.1186/s12943-018-0854-5.

[19] BENHASSINE M, LE-BEL G, GUÉRIN S L. Contribution of the STAT family of transcription factors to the expression of the serotonin 2B (HTR2B) receptor in human uveal melanoma[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1564. DOI: 10.3390/ijms23031564.

[20] GOH E T H, LIN Z, AHN B Y, *et al*. A small molecule targeting the transmembrane domain of death receptor p75 NTR induces melanoma cell death and reduces tumor growth [J]. Cell Chem Biol, 2018, 25(12): 1485-1494. e5. DOI:10.1016/j.chembiol.2018.09.007.

[21] HWANG S G, PARK J, PARK J Y, *et al*. Anti-cancer activity of a novel small molecule compound that simultaneously activates p53 and inhibits NF-κB signaling [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44259. DOI: 10.1371/journal.pone.0044259.

[22] LI Y, XU M, DING X, *et al*. Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1[J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(10): 1065-1077. DOI: 10.1038/ncb3407.

[23] 郑博文, 王保林, 路遥, 等. Ezrin 调控肝癌细胞侵袭性伪足的形成促进肝细胞癌侵袭转移[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(4): 346-355. DOI:10.16016/j.2097-0927.202111088.
ZHENG B W, WANG B L, LU Y, *et al*. Ezrin promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating invadopodia formation [J]. J Army Med Univ, 2022, 44(4): 346-355. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202111088.

[24] MANDAL T, BHOWMIK A, CHATTERJEE A, *et al*. Reduced phosphorylation of Stat3 at *Ser*-727 mediated by casein kinase 2 - protein phosphatase 2A enhances Stat3 Tyr-705 induced tumorigenic potential of glioma cells[J]. Cell Signal, 2014, 26(8): 1725-1734. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.04.003.

[25] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(4): 234-248. DOI: 10.1038/nrclinonc.2018.8.

(**收稿**:2022-06-10;**修回**:2022-08-12)

(编辑 张 维)