

## 研究论文

# 花青素单一成分矢车菊-3-O-葡萄糖苷抑制B16-F10细胞增殖和迁移的机理

王丽\*, 程鹏, 曲晨菲, 李秀艳

青岛滨海学院医学院, 青岛 266555

**摘要:** 本研究旨在探讨花青素单一成分矢车菊-3-O-葡萄糖苷(cyanidin-3-O-glucoside, Cy-3-glu)对小鼠黑色素瘤细胞B16-F10增殖和迁移的影响, 并阐明相关机理。用不同浓度Cy-3-glu处理B16-F10细胞, 采用CCK-8法检测细胞存活率, 划痕法检测细胞迁移情况, 流式细胞仪检测细胞周期, real-time PCR检测细胞周期相关基因的mRNA表达水平, Western blot检测p-AKT、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(vimentin)的相对表达水平, 并用小动物活体成像仪检测B16-F10细胞在C57BL/6J小鼠体内的生长和迁移情况。结果显示, Cy-3-glu能明显抑制体外B16-F10细胞的生长( $P < 0.001$ )和迁移( $P < 0.01$ ), 使细胞周期阻滞在S期。Cy-3-glu作用后p-AKT ( $P < 0.05$ )、N-cadherin和vimentin ( $P < 0.001$ )表达水平显著下降, E-cadherin表达水平升高( $P < 0.05$ )。饲喂Cy-3-glu饲料的肿瘤模型C57BL/6J小鼠肿瘤大小和重量显著减小( $P < 0.05$ ), 肿瘤的转移水平也明显降低。以上结果提示, Cy-3-glu通过抑制PI3K/AKT信号、调节细胞黏附和迁移信号使B16-F10细胞周期停滞在S期, 最终抑制其在体内和体外的增殖和迁移。

**关键词:** 矢车菊-3-O-葡萄糖苷; 小鼠黑色素瘤B16-F10细胞; 增殖; 迁移

**中图分类号:** R739.5

## Mechanism of the anthocyanin single component cyanidin-3-O-glucoside inhibiting proliferation and migration of B16-F10 cells

WANG Li\*, CHENG Peng, QU Chen-Fei, LI Xiu-Yan

Department of Medicine, Qingdao Binhai University, Qingdao 266555, China

**Abstract:** To study the effects of the anthocyanin single component cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-glu) on the proliferation and migration of mouse melanoma cells and to elucidate the underlying mechanisms, B16-F10 cells were treated with different concentrations of Cy-3-glu. Cell viability was analyzed by a CCK-8 method. Cell migration was determined by the callus scratching technique. Cell cycle was measured by the flow cytometry. The expression levels of genes involved in cell cycle regulation were detected by real-time PCR. Protein expression levels of p-AKT, E-cadherin, N-cadherin and vimentin were analyzed by Western blot. The growth and migration of B16-F10 cells in C57BL/6J mice were monitored by the cryogenically cooled IVIS-imaging system. The results showed that Cy-3-glu significantly inhibited the growth ( $P < 0.001$ ) and migration ( $P < 0.01$ ) of B16-F10 cells, and arrested the cell cycle in the S phase. After Cy-3-glu treatment, the expression levels of p-AKT ( $P < 0.05$ ), N-cadherin and vimentin ( $P < 0.001$ ) were decreased significantly, and the expression level of E-cadherin was dramatically increased ( $P < 0.05$ ). The size and weight of tumors and tumor metastasis in mice fed with a diet containing Cy-3-glu were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). In conclusion, Cy-3-glu inhibits proliferation and migration of B16-F10 cells by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway, cell adhesion and migration signals.

**Key words:** cyanidin-3-O-glucoside; mouse melanoma B16-F10 cells; proliferation; migration

Received 2019-03-26 Accepted 2019-09-18

This work was supported by Science and Technology Development Project of Shandong Provincial Department of Education, China (No. J18KA158).

\*Corresponding author. Tel: +532-86704823; E-mail: wanglibeijing2010@163.com

黑色素瘤又称恶性黑色素瘤，是起源于胚胎期神经嵴的恶性肿瘤，近年来已经成为发病率增长最快的肿瘤之一<sup>[1]</sup>。在我国，约 50% 的黑色素瘤分布于四肢末端的皮肤，如足、手和甲下等位置，还有另外约 22.6% 是分布在直肠、肛门、外阴、眼、口和鼻咽等处的黏膜型黑色素瘤，两者约占 75%<sup>[2]</sup>。尤其是黏膜型黑色素瘤，早期没有症状，这种黑色素瘤往往恶性程度更高，预后更差，而且患者很快会出现局部淋巴结或远处器官转移<sup>[1]</sup>。一旦进入晚期，5 年生存率仅有 4.6%<sup>[4]</sup>。据报道，大约 35% 的癌症死亡率与其生活方式紧密相关<sup>[5]</sup>。例如：多摄入水果和蔬菜的饮食习惯与癌症的发生有着明显的负相关性<sup>[6]</sup>。

花青素 (anthocyanin) 是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素，它属于黄酮类化合物。在食品中常见的有 6 大类：矢车菊素，飞燕草素，天竺葵素，芍药素，牵牛素和锦葵素。花青素界在自然界很不稳定，常常与一个或多个糖苷形成稳定的花色苷<sup>[7]</sup>。矢车菊-3-O-葡萄糖苷 (cyanidin-3-O-glucoside, Cy-3-glu) 是矢车菊素与葡萄糖苷形成的小分子化合物，其结构如图 1 所示，是最常见、广谱存在的花青素衍生物，在超过 82% 的果实中都可以检测到<sup>[8]</sup>。有研究报道 Cy-3-glu 可以影响黑色素瘤细胞的增殖和分化<sup>[9]</sup>，但揭示其作用机理的研究很少，而且关于 Cy-3-glu 抑制黑色素瘤细胞迁移机制研究更少。本文旨在研究 Cy-3-glu 抑制黑色素瘤细胞增殖和迁移的机理，为从日常饮食中寻找辅助治疗黑色素瘤的方法提供新途径。

E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 与 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 都属于钙黏蛋白 (cadherin)。它们是一类细胞表面的跨膜糖蛋白，对细胞间的黏附功能有着重要影响。E-cadherin 参与调控上皮的形成、维持内稳态，

其首要功能是形成黏附性连接<sup>[10, 11]</sup>。对肿瘤细胞来说，E-cadherin 下调造成细胞间黏附性连接减少、极性减弱，肿瘤细胞侵袭力增强，促进转移的发生。N-cadherin 的功能与 E-cadherin 正好相反<sup>[12]</sup>。上皮细胞向间充质细胞转变 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞通过一系列生物过程获得间充质细胞的表型，常常与癌症的转移密切相关<sup>[13]</sup>。抑制 EMT 过程，增强细胞膜极性和细胞间相互联系，可抑制癌细胞的远处转移。本文检测了 Cy-3-glu 作用后小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 中 E-cadherin、N-cadherin 和波形蛋白 (vimentin) 的表达变化，以揭示 Cy-3-glu 抑制黑色素瘤细胞增殖和转移的机理。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 小鼠黑色素瘤细胞系 B16-F10 购自中国科学院细胞库，稳定表达荧光素酶细胞 B16-F10-luc 购自冷泉港生物科技股份有限公司。

**1.2 实验动物** 5 周龄健康雄性 C57BL/6J 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心。光照周期为 12 h 光照 / 12 h 黑暗，自由采食与饮水。动物实验均经过伦理委员会审批后进行。

**1.3 主要药物与试剂** Cy-3-glu (Polyphenols 公司，挪威)，DMEM 培养基粉剂、碘化丙啶 (PI)、lightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master、L-DOPA (Sigma 公司，美国)、戊巴比妥钠 (Sigma 公司，美国)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素、链霉素、胰蛋白酶 (GibcoBRL 公司，美国)，Trizol (Promega 公司，美国)，CCK-8 试剂盒 (中国碧云天生物公司)， $\beta$ -actin 抗体 (Santa Cruz 公司，美国)，p-AKT、t-AKT、E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 抗体 (Cell Signaling 公司，美国)，ECL 显色系统

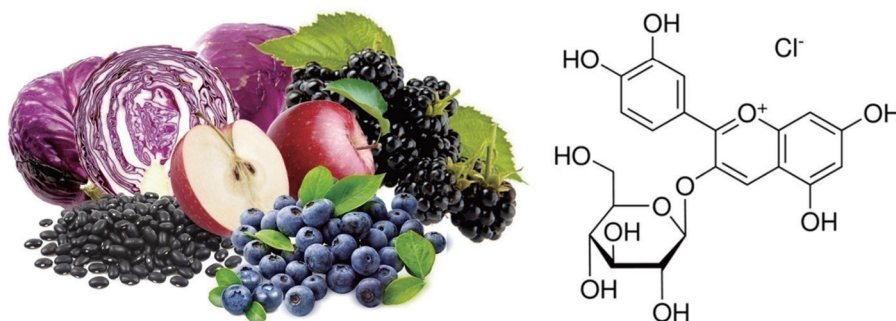


图 1. 富含花青素的水果及矢车菊-3-O-葡萄糖苷的分子结构

Fig. 1. Anthocyanin-rich fruit and molecular structure of cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-glu).

(Amersco 公司, 美国)。

**1.4 主要设备** CO<sub>2</sub> 培养箱 (Sanyo 公司, 日本), 离心机 (Eppendorf 公司, 德国), 倒置显微镜 (Olympus 公司, 日本), 超洁净工作台 (苏州净化设备公司, 中国), real-time PCR 仪 (Roche 公司, 瑞士), 流式细胞仪 (Beckman 公司, 美国), 小动物活体成像仪 (IVIS)(Calipers 公司, 美国), 酶标仪 (BioTek 公司, 美国)。

**1.5 B16-F10 细胞培养** B16-F10 细胞以 DMEM 高糖培养基于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞长满培养皿的 90% 以上的底面积时, 用 0.25% 的胰蛋白酶 (PBS 配制) 消化细胞, 最后加入适量的完全培养液将细胞吹打混匀后, 便可根据不同密度传代, 进行下一步实验。

**1.6 小鼠原代黑色素细胞分离及培养** 将出生 3 天内的健康野生型 C57BL/6J 小鼠断颈法处死后去四肢, 将背部皮肤剥下, 放入 PBS 中冲洗干净, 并在 75% 酒精中浸泡 2 s, 之后在 PBS 中用眼科剪和眼科镊将皮肤表面杂物及皮下结缔组织去除干净, 放入 0.25% Dispase II 酶 4 °C 消化过夜。将表皮和真皮剥离, 用眼科剪把表皮剪碎, 加入 0.25% 胰蛋白酶于 37 °C 消化 10 min 后加入等量终止液终止消化作用, 用 200 目滤网过滤。收集滤液, 1 000 r/min 4 °C 离心 10 min 后弃上清, 加入 DMEM 培养基重悬细胞计数, 将细胞放入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**1.7 小鼠原代黑色素细胞 L-DOPA 染色法** 小鼠原代黑色素细胞去除培养基后, 在 PBS 中冲洗两次, 在固定液 (乙醇: 氯仿: 乙酸 = 6:3:1) 中固定 20 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 然后在 37 °C 下用 10 mmol/L L-DOPA 在黑暗中孵育 18 h, 孵育后, 用蒸馏水冲洗黑色素细胞, 脱水并封片。通过光学显微镜观察黑色素细胞。

**1.8 小鼠原代黑色素细胞 Cy-3-glu 处理** 原代细胞以 DMEM 高糖培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 分别用不同浓度 Cy-3-glu (50 μmol/L 和 100 μmol/L) 处理 24 h, 观察细胞生长情况。

**1.9 CCK-8 法检测细胞增殖** 将 B16-F10 细胞传代接种至 96 孔板, 待细胞长到适宜密度, 用不同浓度 Cy-3-glu 处理 24 h, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 2 h, 用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度。

**1.10 Real-time qPCR** 从 B16-F10 细胞提取总 RNA, 将总 RNA 反转录成 cDNA, 按照 lightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master 试剂盒说明书, real-time PCR 仪进行 PCR 反应。每个样品设 3 个重复, 每个实验重复 3 次。Real-time PCR 引物序列见表 1。

**1.11 Western blot** 恒压 200 V, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 待 2 × SDS 上样缓冲液蓝带跑出胶外即可; 蛋白转移, 安装转移装置, 其排列依次为海绵、纸、胶、膜、纸、海绵, 将蛋白转移至 PVDF 膜, 恒流 150 mA 3 h; PVDF 膜使用无水甲醇活化 1 min,

表 1. Real-time PCR 引物序列表  
Table 1. Primer sequence for real-time PCR

Gene name	Sequence of primer (5'-3')	Amplified product (bp)
GAPDH	F: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	149
	R: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	
Cyclin D2	F: AAGCCTGCCAGGAGCAAA	77
	R: ATCCGGCGTTATGCTGCTCT	
Cyclin B1	F: TGGCCTCACAAAGCACATGA	77
	R: GCTGTGCCAGCGTGCTAATC	
Cyclin E2	F: TGCTGCCGCCTTATGTCATT	78
	R: TCCGAGATGTCATCCCATTCC	
CDK2	F: CTGCCATTCTACCGTGTCC	79
	R: AGCTTGATGGACCCCTCTGC	
CDK4	F: GGCCTTTGAACATCCCAAT	78
	R: TCAGTTCGGGAAGTAGCACAG	
CDK6	F: TGCGAGTGCAGACCAGTGG	150
	R: AGGTCTCCAGGTGCCTCAGC	

F: forward; R: reverse; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; CDK2: cyclin-dependent kinase 2; CDK4: cyclin-dependent kinase 4; CDK6: cyclin-dependent kinase 6.

自然晾干 10 min, 再次活化 30 s; TBS-T (pH 7.6 含 0.1% Tween-20) 漂洗 5 min; 特异抗体 1:1 000 稀释后进行杂交, 杂交溶液中加入 5% 脱脂奶粉以封闭非特异性杂交信号; TBS-T 漂洗 1 次 15 min, 然后漂洗 3 次, 每次 5 min; 辣根过氧化物酶标记的二抗杂交 20~45 min, 杂交液中含 5% 脱脂奶粉; TBS-T 漂洗 15 min, 然后漂洗 5 次, 每次 5 min; 利用 ECL 显色系统进行显色; X-ray 胶片 (Kodak) 记录显色结果。

**1.12 流式细胞仪检测细胞周期** 待检测细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化、收集于 1.5 mL 离心管中, 调整密度为  $1 \times 10^6$  个/mL; 用预冷的 PBS 洗涤 2 遍, 2 500 r/min 离心 5 min, 保留沉淀; 迅速加入预冷的 70% 乙醇吹打混匀, 4 °C 固定过夜; 2 500 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 用 1 mL 预冷 PBS 洗涤细胞 3 次以去除残留的乙醇; 加入含有 0.2% Triton X-100 和 100  $\mu$ g/mL RNase 的 PBS 500  $\mu$ L 悬浮细胞, 每管加入 5  $\mu$ L PI; 尽快上流式细胞仪检测 (上机前 200 目筛过滤)。

**1.13 愈伤划痕法检测迁移** 将细胞传代接种至 6 孔板, 待细胞长到适宜密度, 用移液枪尖在每孔底部中间划一窄线, 培养基清洗几次后加入 100  $\mu$ mol/L Cy-3-glu, 每组 3 个复孔, 对照组加入等体积的完全培养基, 培养 12 h、24 h 或 48 h 后置细胞培养板于倒置显微镜下观察拍照。

**1.14 C57BL/6J 小鼠肿瘤模型建立及活体成像实时观测** 5 周龄 C57BL/6J 雄鼠分为 3 组, 每组 10 只, 分别为对照组 (正常小鼠饲喂加 200 mg/kg Cy-3-glu 的普通饲料)、肿瘤模型组 (肿瘤模型小鼠饲喂普通饲料) 和 Cy-3-glu 处理组 (肿瘤模型小鼠饲喂添加 200 mg/kg Cy-3-glu 的普通饲料), 处理 6 周。

肿瘤模型建立: 用稳定表达荧光素酶细胞 B16-F10-luc ( $2 \times 10^6$ ) 与 Matrigel 胶 1:1 混合共 100  $\mu$ L 接种于 C57BL/6J 雄鼠腋下皮下组织, 对照接种等体积的培养基与 Matrigel 胶 1:1 混合物。

活体成像实时观测: 用无菌的 PBS (w/o  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ ) 配制 D- 荧光素钠盐工作液 (15 mg/mL), 0.2  $\mu$ m 滤膜过滤除菌。一旦使用, 保持冰冷且避光; 按小鼠体重腹腔注射 1% 戊巴比妥钠, 使之处于麻醉状态; 按小鼠体重腹腔注射 10  $\mu$ L/g 的 15 mg/mL 荧光素工作液, 注射入体内 5~10 min 后, 进行成像分析。

**1.15 数据处理** Western blot 和 PCR 实验结果定

量分析由 ImageJ 完成。统计学分析采用 SPSS 18.0 数据处理软件 (SPSS Inc., 美国) 进行单因素方差分析, 用 LSD 法进行两两比较, 两组间均数比较采用 *t* 检验。数据用 mean  $\pm$  SEM 表示,  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) 和  $P < 0.001$  (\*\*\*) 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 Cy-3-glu抑制B16-F10细胞的生长和迁移

如图 2A、2B 所示, 用不同浓度 Cy-3-glu (50  $\mu$ mol/L 和 100  $\mu$ mol/L) 处理 B16-F10 细胞 24 h, 结果显示 100  $\mu$ mol/L Cy-3-glu 显著抑制 B16-F10 的生长。为了进一步验证, 我们分离了小鼠原代黑色素细胞, 并用 L-DOPA 染色法鉴定小鼠黑色素细胞, 可见分离的小鼠黑色素细胞大, 细胞核呈棕黑色, 胞浆内有黑色素颗粒 (图 2C)。随后, 用同样的处理方法处理小鼠原代黑色素细胞, 结果显示 Cy-3-glu 处理 24 h 后细胞生长无显著变化 (图 2C、2D)。另外, 用 100  $\mu$ mol/L Cy-3-glu 处理 B16-F10 细胞显著抑制细胞的迁移运动 (图 2E、2F)。

### 2.2 Cy-3-glu抑制B16-F10的细胞周期进程

用细胞流式仪检测细胞周期, 100  $\mu$ mol/L Cy-3-glu 处理 B16-F10 细胞 24 h 后, G0/G1 期比例下降, S 期比例由 39.1% 增加到 64.4%, 使细胞最终阻滞在 S 期 (图 3A)。经 Cy-3-glu 处理后, 细胞周期调控蛋白 cyclin B1、cyclin D2、cyclin E2、CDK2、CDK6 的 mRNA 表达水平明显下调, CDK4 变化不明显 (图 3B)。以上结果都说明 Cy-3-glu 抑制 B16-F10 细胞周期进程, 使其阻滞在 S 期, 使 DNA 复制受阻, 细胞有丝分裂进程减缓, 最终抑制 B16-F10 细胞增殖。

### 2.3 Cy-3-glu通过PI3K/AKT调节E-cadherin、N-cadherin和vimentin的表达水平

通过 Western blot 检测上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 和间充质细胞标志蛋白 N-cadherin 和 vimentin 表达, 结果显示 Cy-3-glu 促进 B16-F10 细胞 E-cadherin 的表达, 同时抑制 N-cadherin 和 vimentin 的表达 (图 4A、4B)。Cy-3-glu 处理后促生长和迁移的 p-AKT 水平 (相对于 t-AKT 的相对值) 被抑制。利用 PI3K 信号的抑制剂 LY294002 处理 B16-F10 细胞, 观察到 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达水平与 Cy-3-glu 处理后趋势一致 (图 4A、4B)。这些结果说明 Cy-3-glu 确实是通过 PI3K/AKT 通路, 经过调节 E-cadherin 和 N-cadherin, 进而抑制 B16-F10 细胞迁移。

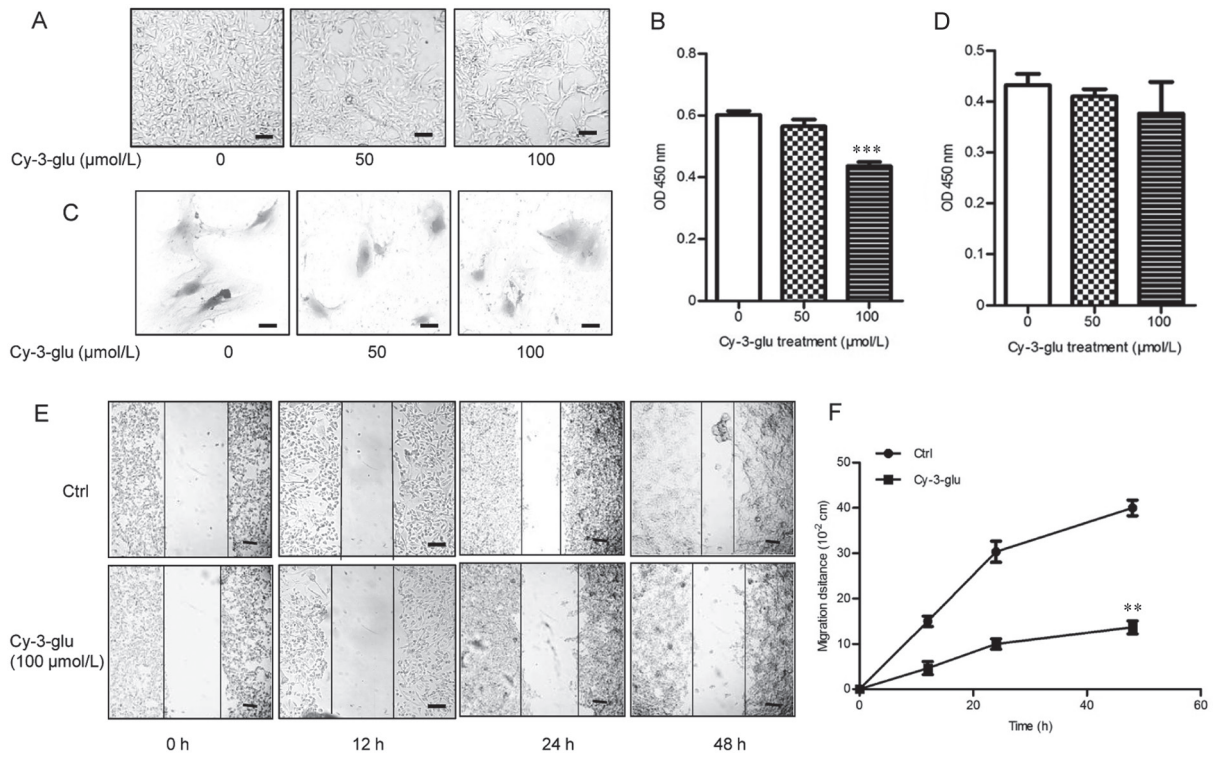


图 2. 倒置显微镜观察Cy-3-glu抑制B16-F10细胞增殖和迁移的作用

Fig. 2. The inhibitory effect of Cy-3-glu on proliferation and migration of B16-F10 cells observed by converted microscope. *A*: Inhibition of growth of B16-F10 cells by different concentrations of Cy-3-glu. *B*: CCK-8 result of B16-F10 cells. *C*: The effect of different concentrations of Cy-3-glu on primary cultured mouse melanocytes identified by L-DOPA staining. *D*: CCK-8 result of mouse melanocytes. *E*: 100 μmol/L Cy-3-glu inhibited B16-F10 cell migration. *F*: Statistical result of *E*. Scale bar, 100 μm. Means ± SEM, *n* = 8. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs Ctrl.

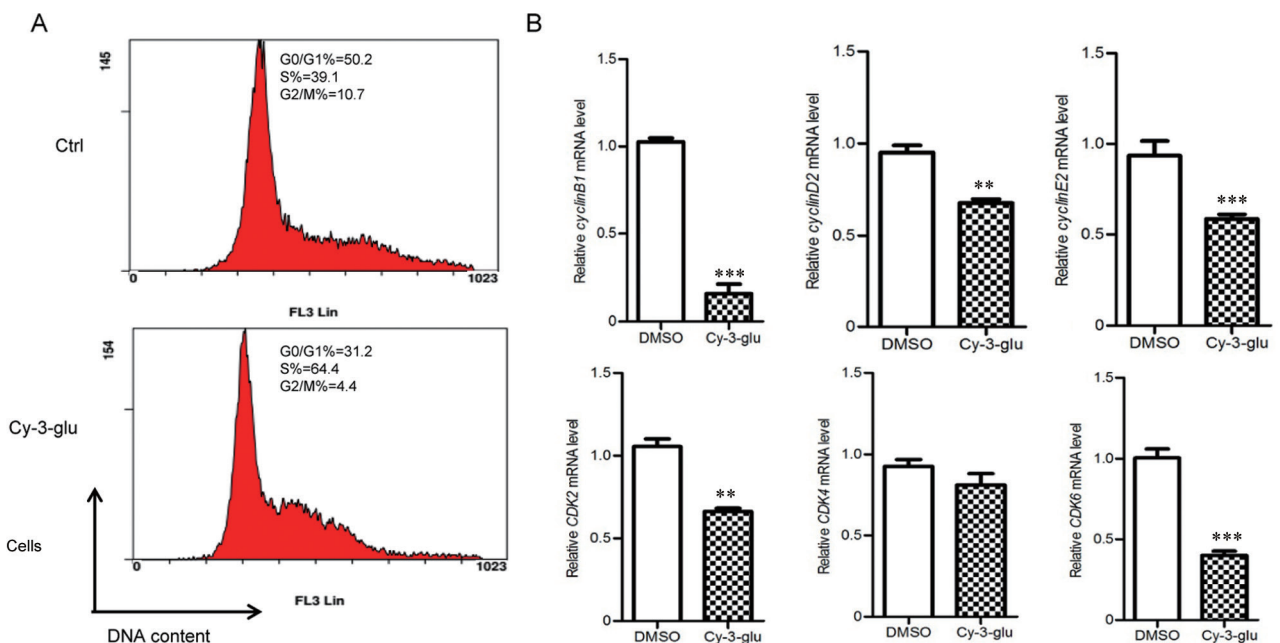


图 3. Cy-3-glu对B16-F10细胞周期的阻滞作用

Fig. 3. Blocking effect of Cy-3-glu on B16-F10 cell cycle. *A*: Flow cytometry analysis showed that Cy-3-glu blocked B16-F10 cell cycle in the S phase. *B*: mRNA expression levels of cyclin B1, cyclin D2, cyclin E2, CDK2, CDK4 and CDK6. Means ± SEM, *n* = 8. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs DMSO group.

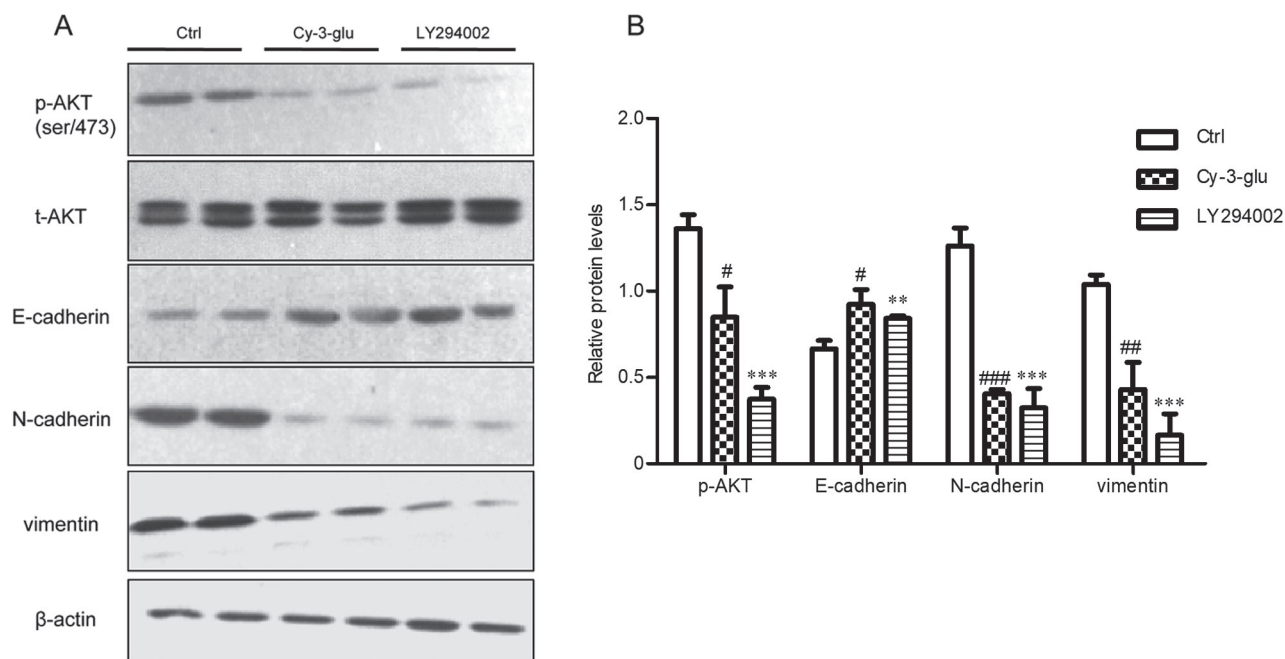


图 4. Cy-3-glu作用B16-F10细胞后p-AKT、E-cadherin、N-cadherin和vimentin蛋白的表达水平

Fig. 4. The relative protein levels of p-AKT, E-cadherin, N-cadherin and vimentin after Cy-3-glu treatment in B16-F10 cells. *A*: The relative protein levels of p-AKT, E-cadherin, N-cadherin and vimentin. *B*: *A* statistical result. Means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ .  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs Ctrl group;  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$  vs Ctrl group.

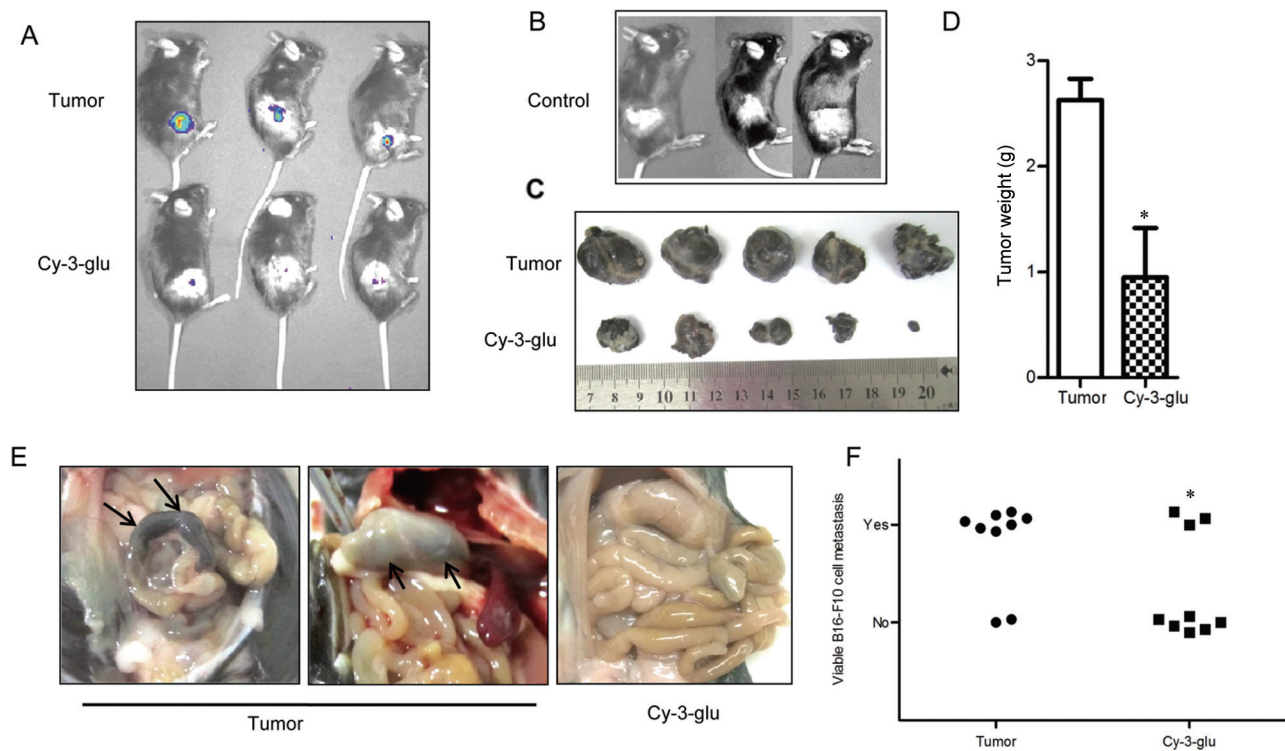


图 5. Cy-3-glu抑制B16-F10细胞在小鼠体内的生长和转移

Fig. 5. Cy-3-glu inhibits the growth and metastasis of B16-F10 cells in mice. *A*: The growth of melanoma cells B16-F10 were monitored in real time after 3 weeks of Cy-3-glu treatment by bioluminescent imaging of luciferase activity in live mice using the cryogenically cooled IVIS-imaging system. *B*: The control group fed with Cy-3-glu for 3 weeks. *C*: Tumor growth after 6 weeks of Cy-3-glu treatment. *D*: Tumor weight after 6 weeks of Cy-3-glu treatment. *E*: Tumor metastasis after 6 weeks of Cy-3-glu treatment. *F*: Statistical result of *E*. Means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ .  $^*P < 0.05$  vs Tumor group.

## 2.4 Cy-3-glu抑制B16-F10细胞小鼠体内生长和转移

通过使用小动物活体成像仪实时观测肿瘤生长(图5A),相比肿瘤模型组,Cy-3-glu处理组3周后肿瘤开始减小,肿瘤生长速度减慢,对照组小鼠无体重减轻,也无肿瘤发生(图5B)。Cy-3-glu处理组6周后肿瘤大小和重量与肿瘤模型组的小鼠相比明显减小(图5C和5D)。解剖时发现肿瘤模型组小鼠都有明显的B16-F10肿瘤细胞胃和肠转移现象,而Cy-3-glu处理组的小鼠肿瘤转移情况明显减少(图5E和5F)。这些结果表明Cy-3-glu在体内对小鼠黑色素瘤有同样抑制生长和转移的作用。

## 3 讨论

本研究结果显示,Cy-3-glu通过抑制PI3K/AKT通路,从而调节其下游细胞周期蛋白(cyclins)和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的转录水平,使细胞周期阻滞在S期。Serafino等报道Cy-3-glu通过升高cAMP和酪氨酸酶的表达式和活性,使细胞周期阻滞在S期,抑制黑色素瘤细胞增殖<sup>[9]</sup>。这些结果说明不同的黑色素瘤细胞中,Cy-3-glu可能通过不同的信号途径抑制细胞增殖,因此探究Cy-3-glu对其他黑色素瘤细胞的抑制效果以及相关信号通路,并寻找彼此之间的联系是下一步的工作重心。

有研究表明,桑葚花青素提取物通过Ras/PI3K信号通路降低与细胞迁移有关的MMP-2和MMP-9酶的活性,抑制黑色素瘤细胞生长和迁移<sup>[2]</sup>。这表明花青素提取物在黑色素瘤的生长和迁移方面是有防治作用的。但是,粗提物是花青素的混合物,那么究竟是哪种单一成分起主要作用?随着现代医学的精细化发展,精准医疗的“精准”越来越被认可,成为未来发展的方向。

众所周知,PI3K/AKT信号通路参与细胞多个生物过程,包括细胞增殖、凋亡、生存和转移<sup>[14,15]</sup>。PI3K/AKT异常激活在癌症中经常发生,在黑色素瘤中亦是如此。越来越多的证据表明抑制PI3K/AKT可以提高药物抗肿瘤活性和改善细胞对顺铂和替莫唑胺药物的敏感性<sup>[16-18]</sup>,所以抑制PI3K/AKT通路是一种治疗黑色素瘤的新策略。特别是在EMT过程中,AKT的激活已成为EMT最核心特征之一<sup>[19]</sup>。此外,越来越多的证据表明AKT通过EMT在癌细胞的迁移中发挥重要作用。激活AKT信号通路会促进EMT<sup>[20]</sup>,相反,抑制AKT信号通路会抑制

EMT进程<sup>[21-23]</sup>。当癌细胞在经历EMT时,它的上皮样表型会慢慢地失去,获得间充质样的表型<sup>[24]</sup>。其中,E-cadherin在细胞之间黏附起了重要作用,它能够抑制癌细胞的浸润和转移<sup>[25]</sup>。Vimentin被认为是间充质样细胞的重要标志。本研究结果显示花青素的单一成分Cy-3-glu抑制黑色素瘤B16-F10细胞增殖和转移,并首次阐明Cy-3-glu通过抑制PI3K/AKT信号、抑制N-cadherin和vimentin蛋白表达,并促进E-cadherin蛋白表达,使细胞维持或进一步加强上皮细胞的特征,保持细胞膜极性,增强细胞间联系,从而抑制B16-F10细胞转移和迁移。同时,Cy-3-glu通过抑制PI3K/AKT及其下游cyclin B1、cyclin D2和cyclin E2以及CDK2和CDK6转录水平的表达,从而阻滞黑色素瘤B16-F10细胞周期进程,最终抑制其在体内和体外的增殖和迁移。

## 参考文献

- 1 Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(4): 271-289.
- 2 Bai X, Kong Y, Chi Z, Sheng X, Cui C, Wang X, Mao L, Tang B, Li S, Lian B, Yan X, Zhou L, Dai J, Guo J, Si L. MAPK pathway and tert promoter gene mutation pattern and its prognostic value in melanoma patients: A retrospective study of 2,793 cases. *Clin Cancer Res* 2017; 23(20): 6120-6127.
- 3 Damsky WE, Theodosakis N, Bosenberg M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene* 2014; 33(19): 2413-2422.
- 4 Castet F, Garcia-Mulero S, Sanz-Pamplona R, Cuellar A, Casanovas O, Caminal JM, Piulats JM. Uveal melanoma, angiogenesis and immunotherapy, is there any hope? *Cancers (Basel)* 2019; 11(6). pii: E834. doi: 10.3390/cancers11060834.
- 5 Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66(6): 1191-1308.
- 6 Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10): 768-780.
- 7 Perrone A, Masullo M, Plaza A, Hamed A, Piacente S. Flavone and flavonol glycosides from *Astragalus eremophilus* and *Astragalus vogelii*. *Nat Prod Commun* 2009; 4(1): 77-82.
- 8 Olivas-Aguirre FJ, Rodrigo-Garcia J, Martinez-Ruiz ND, Cardenas-Robles AI, Mendoza-Diaz SO, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA, de la Rosa LA, Ramos-Jimenez A, Wall-Medrano A. Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-chemistry,

- foodomics and health effects. *Molecules* 2016; 21(9). pii: E1264.
- 9 Serafino A, Sinibaldi-Vallebona P, Lazzarino G, Tavazzi B, Rasi G, Pierimarchi P, Andreola F, Moroni G, Galvano G, Galvano F, Garaci E. Differentiation of human melanoma cells induced by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *FASEB J* 2004; 18(15): 1940–1942.
  - 10 Li X, Wu J, Zhang X, Chen W. Glutathione reductase-mediated thiol oxidative stress suppresses metastasis of murine melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 2018; 129: 256–267.
  - 11 Bhatt T, Rizvi A, Batta SP, Kataria S, Jamora C. Signaling and mechanical roles of E-cadherin. *Cell Commun Adhes* 2013; 20(6): 189–199.
  - 12 Liu JF, Lai KC, Peng SF, Maraming P, Huang YP, Huang AC, Chueh FS, Huang WW, Chung JG. Berberine inhibits human melanoma A375.S2 cell migration and invasion via affecting the FAK, uPA, and NF-kappaB signaling pathways and inhibits PLX4032 resistant A375.S2 cell migration *in vitro*. *Molecules* 2018; 23(8). pii: E2019. doi: 10.3390/molecules23082019.
  - 13 Liang L, Liu X, He J, Shao Y, Liu J, Wang Z, Xia L, Han T, Wu P. Cyanidin-3-glucoside induces mesenchymal to epithelial transition via activating Sirt1 expression in triple negative breast cancer cells. *Biochimie* 2019; 162: 107–115.
  - 14 Kwong LN, Davies MA. Navigating the therapeutic complexity of PI3K pathway inhibition in melanoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19(19): 5310–5319.
  - 15 Lassen A, Atefi M, Robert L, Wong DJ, Cerniglia M, Comin-Anduix B, Ribas A. Effects of AKT inhibitor therapy in response and resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Mol Cancer* 2014; 13: 83.
  - 16 Niessner H, Schmitz J, Tabatabai G, Schmid AM, Calaminus C, Sinnberg T, Weide B, Eigentler TK, Garbe C, Schitteck B, Quintanilla-Fend L, Bender B, Mai M, Praetorius C, Beissert S, Schackert G, Muders MH, Meinhardt M, Baretton GB, Dummer R, Flaherty K, Pichler BJ, Kulms D, Westphal D, Meier F. PI3K pathway inhibition achieves potent antitumor activity in melanoma brain metastases *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2016; 22(23): 5818–5828.
  - 17 Aziz SA, Jilaveanu LB, Zito C, Camp RL, Rimm DL, Conrad P, Kluger HM. Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway as a strategy for treating melanoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16(24): 6029–6039.
  - 18 Sinnberg T, Lasithiotakis K, Niessner H, Schitteck B, Flaherty KT, Kulms D, Maczey E, Campos M, Gogel J, Garbe C, Meier F. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide. *J Invest Dermatol* 2009; 129(6): 1500–1515.
  - 19 Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005; 24(50): 7443–7454.
  - 20 Ma YS, Wu ZJ, Bai RZ, Dong H, Xie BX, Wu XH, Hang XS, Liu AN, Jiang XH, Wang GR, Jiang JJ, Xu WH, Chen XP, Tan GH, Fu D, Liu JB, Liu Q. DRR1 promotes glioblastoma cell invasion and epithelial-mesenchymal transition via regulating AKT activation. *Cancer Lett* 2018; 423: 86–94.
  - 21 Dang N, Meng X, Ma S, Zhang Q, Sun X, Wei J, Huang S. MDA-19 suppresses progression of melanoma via inhibiting the PI3K/Akt pathway. *Open Med (Wars)* 2018; 13: 416–424.
  - 22 Yan SP, Chu DX, Qiu HF, Xie Y, Wang CF, Zhang JY, Li WC, Guo RX. LncRNA LINC01305 silencing inhibits cell epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer by inhibiting TNXB-mediated PI3K/Akt signalling pathway. *J Cell Mol Med* 2019; 23(4): 2656–2666.
  - 23 Gao Y, Shi L, Cao Z, Zhu X, Li F, Wang R, Xu J, Zhong J, Zhang B, Lu S. Telocinobufagin inhibits the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/extracellular signal-regulated kinase/Snail signaling pathway. *Oncol Lett* 2018; 15(5): 7837–7845.
  - 24 Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1–2): 15–33.
  - 25 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139(5): 871–890.