

- [11]弓娟琴.Fas介导的凋亡与caspase家族[J].国际皮肤性病杂志, 2001,27(5):279-281.
- [12]Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis[J]. Mol Cell, 2002,9(3):459-470.
- [13]Porter A G, Jänicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999,6(2):99-104.
- [14]Odonkor C A, Achilefu S. Modulation of effector caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy[J]. Cancer Invest, 2009,27(4):417-429.
- [15]李世清, 陈福敏, 罗君, 等. 顺铂对结肠癌细胞株Caco-2增殖凋亡和Bcl-2、Caspase3、Caspase9蛋白表达的影响[J].世界华人消化杂志, 2015,23(9):1460-1464.
- [16]Katayama S, Shimoda K, Takenaga Y. Loss of ADAR1 in human iPS cells promotes Caspase-3-mediated apoptotic cell death[J]. Genes Cells, 2015,20(8):675-680.
- [17]Joseph E K, Levine J D. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat[J]. Eur J Neurosci, 2004,20(11):2896-2902.
- [18]Gomita Y, Yamori M, Furuno K, et al. Influences of psychological stress produced by intraspecies emotional communication on nicorandil plasma levels in rats[J]. Pharmacology, 1989,38(6):388-396.
- [19]贾克然, 郭刚, 刘开云, 等. 单纯心理应激小鼠模型的建立及对行为、内分泌免疫功能的影响[J].免疫学杂志, 2009,25(3):329-332.
- [20]Maniam J, Morris MJ. The link between stress and feeding behaviour[J]. Neuropharmacology, 2012, 63(1):97-110.
- [21]Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981,5(2):247-251.
- [22]Li Q, Huang F, Liu J, et al. Psychological stress alters extracellular matrix metabolism in mandibular condylar cartilage[J]. Chin J Dent Res, 2017,20(3):125-135.
- [23]Chen X, Cai C, Liu J, et al. Impact of estrogen-related receptor  $\alpha$  on the biological characteristics of rat mandibular condylar chondrocytes[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1):195-202.
- [24]吴高义, 陈磊, 彭玲燕, 等. 心理应激对大鼠颞下颌关节盘和翼外肌微结构的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志, 2011,20(9):3.

[收稿日期]2024-06-26

本文引用格式: 郑程东, 张媛媛, 张海娟, 等. 心理应激对SD大鼠颞下颌关节髁突软骨细胞凋亡及Caspase-3表达的影响[J].中国美容医学, 2025,34(3):7-13

•论 著•

## 芦荟大黄素抑制人黑素瘤细胞A375增殖和侵袭的作用及机制初探

李妍芯<sup>1</sup>, 赵奥林<sup>1</sup>, 阮英<sup>2</sup>

(1.咸宁市中心医院·湖北科技学院附属第一医院皮肤性病科 湖北 咸宁 437100; 2.湖北科技学院全科医学国家级实验教学示范中心 湖北 咸宁 437100)

**[摘要]**目的: 探讨芦荟大黄素经AKT/mTOR途径抑制人黑素瘤细胞(A375)增殖和侵袭的机制。方法: 设A375细胞组、紫杉醇组( $500 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、芦荟大黄素低剂量组( $500 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、高剂量组( $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 每组设6个平行样, 培养72 h。实验结束后, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定各组细胞增殖水平, 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期, Transwell法测定细胞侵袭水平, 划痕实验检测细胞迁移水平, RT-qPCR及Western blot法检测细胞AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平。结果: 与A375细胞组比较, 紫杉醇组、芦荟大黄素低、高剂量组OD值、存活率、穿膜数、迁移距离、AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ ), 凋亡率、G2/M升高( $P < 0.05$ ); 与紫杉醇组比较, 芦荟大黄素低剂量组OD值、存活率、穿膜数、迁移距离、AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ ), 凋亡率、G2/M降低( $P < 0.05$ ), 而芦荟大黄素高剂量组OD值、存活率、穿膜数、迁移距离、凋亡率、G2/M、AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平无明显变化( $P > 0.05$ ); 与芦荟大黄素低剂量组比较, 芦荟大黄素高剂量组OD值、存活率、穿膜数、迁移距离、AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ ), 凋亡率、G2/M降低( $P < 0.05$ )。结论: 芦荟大黄素对黑素瘤细胞增殖和侵袭具有明显抑制作用, 其机制可能与芦荟大黄素抑制AKT/mTOR通路的激活有关。

**[关键词]** 芦荟大黄素; AKT/mTOR途径; 人黑素瘤; 细胞增殖; 细胞侵袭

**[中图分类号]** R739.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455(2025)03-0013-05

基金项目: 湖北高校省级大学生创新创业训练项目(编号: S202110927030)

通信作者: 阮英, 硕士研究生、副主任医师; 研究方向为皮肤性病防治与皮肤美容。E-mail: 43705870@qq.com。

第一作者: 李妍芯, 主治医师; 研究方向为皮肤性病防治与皮肤美容。E-mail: Liyanxin19870728@163.com

## Inhibitory Effect of Aloe-emodin on Proliferation and Invasion of Human Melanoma Cells A375 Via AKT/mTOR Pathway

LI Yanxin<sup>1</sup>, ZHAO Aolin<sup>1</sup>, RUAN Ying<sup>2</sup>

( 1.Department of Dermatovenereology, Xianning Central Hospital, the First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, Hubei, China; 2.Hubei University of Science and Technology General Practice National Experimental Teaching Demonstration Center, Xianning 437100, Hubei, China )

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of aloe emodin inhibiting proliferation and invasion of human melanoma cells (A375) via AKT/mTOR pathway. **Methods** A375 cell group, paclitaxel group ( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), aloe emodin low-dose group ( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and high-dose group ( $1\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) were set up, and 6 parallel samples were cultured for 72h in each group. After the experiment, the cell proliferation level of each group was measured by tetramethylazolium blue (MTT) method, cell apoptosis rate and cell cycle detected by flow cytometry, cell invasion level determined by Transwell method, and cell migration level was detected by scar assay. The mRNA and protein expression levels of AKT and mTOR were detected by RT-qPCR and Western blot. **Results** Compared with A375 cell group, the OD value, survival rate, membrane penetration number, migration distance, mRNA and protein expression levels of AKT and mTOR in paclitaxel group, aloe emodin low-dose and high-dose groups were decreased ( $P<0.05$ ), while apoptosis rate and G2/M were increased ( $P<0.05$ ). Compared with paclitaxel group, the OD value, survival rate, membrane penetration number, migration distance, mRNA and protein expression levels of AKT and mTOR were increased in aloe emodin low-dose group ( $P<0.05$ ), while apoptosis rate and G2/M were decreased ( $P<0.05$ ). There were no significant changes in OD value, survival rate, membrane penetration number, migration distance, apoptosis rate, G2/M, AKT and mTOR mRNA and protein expression levels in aloe emodin high-dose group ( $P>0.05$ ). Compared with aloe emodin low-dose group, the OD value, survival rate, membrane penetration number, migration distance, mRNA and protein expression levels of AKT and mTOR were decreased in aloe emodin high-dose group ( $P<0.05$ ), and apoptosis rate and G2/M were decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Aloe emodin can significantly inhibit the proliferation and invasion of melanoma cells, and the mechanism may be related to the inhibitory effect of aloe emodin on the activation of AKT/mTOR pathway.

**Key words:** aloe emodin; AKT/mTOR pathway; human melanoma; cell proliferation; cell invasion

恶性黑色素瘤是发病率较高的癌症，黑色素瘤患者的主要死亡原因为淋巴系统和其他器官的转移。在接受传统治疗后转移性黑色素瘤患者的平均生存时间仅为6~12个月，5年生存率始终低于10%<sup>[1]</sup>。因此迫切需要开发可用于黑色素瘤治疗的有效药物。芦荟大黄素为蒽醌类化合物，化学式为C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>，主要来源于蓼科植物掌叶大黄的干燥根和根茎。芦荟大黄素已被证明具有显著的抗炎、抗氧化和抗癌特性<sup>[2]</sup>。研究证明<sup>[3-4]</sup>，芦荟大黄素对多种癌细胞具有抗增殖作用，例如膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌和前列腺癌。细胞增殖和侵袭对于预防癌症进展和肿瘤发生至关重要。细胞外信号调节激酶（ERK）是调节细胞存活、增殖、侵袭的重要信号分子<sup>[5]</sup>。ERK信号转导通路控制各种决定细胞活力的促凋亡和抗凋亡机制。AKT作为抗细胞凋亡信号分子并通过线粒体途径抑制细胞凋亡<sup>[6]</sup>。截止目前为止尚未见芦荟大黄素对人黑色素瘤细胞生物学行为及其机制的相关研究。因此，本研究拟探讨芦荟大黄素对人黑色素瘤细胞活力、迁移和侵袭潜能、细胞凋亡、ERK表达和AKT/mTOR信号通路的影响，以期为人黑色素瘤的治疗提供理论依据。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器：Dulbecco改良的Eagle培养基（DMEM）（美国赛默飞世生物科技有限公司，批号52659）；胎牛血清（FBS，中国碧云天生物科技有限公司，批号：2021568）；芦荟大黄素（大闽生物科技有限公司，批号320214）；紫杉醇（美国MerckKGaA生物科技有限公司，批号DF-51329）；MTT试剂盒（美国Merck Millipore，批号：635987）；MultiskanMK3酶标仪（美国赛默飞世生物科技有限公司）；Matrigel、Transwell腔室系统（澳大利亚BD Biosciences，批号53652、52146）；结晶紫（中国碧云天生物科技，批号：2036695）；DE-8596光学显微镜（奥林巴斯公司）；TRIzol<sup>®</sup>试剂盒（美国Invitrogen，批号：30219）；逆转录试剂盒（中国Trans Gen Biotech Co Ltd，批号：03268）；AceQqPCR SYBR-Green Master Mix试剂盒（美国Bio-Rad Laboratories Inc，批号：54987）；RIPA裂解缓冲液（德国CWBio生物科技，批号：BG-30214）；BCA试剂盒（Beyotime Institute of Biotechnology，批号：418954）；10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶、聚偏二氟乙烯膜（美

国Amersham Bciences Corp, 批号: 20159、63257); 抗AKT (ab92536; 稀释度, 1:1 000, 英国acam)、mTOR (ab76003; 稀释度, 1:1 000, 英国Acam)、GAPDH (ab208938; 稀释度, 1:5 000, 英国acam); 辣根过氧化物酶标记的二抗 (#7074; 1:1 000; Cell Signaling Technology, Inc); ECL试剂 (Research-bio, 批号: DF-74859662); Image-Pro Plus软件 (6.0版; Media Cybernetics, Inc)。

1.2 细胞培养及分组: 购自American Type Culture Collection的人黑素瘤细胞A375在Dulbecco改良的Eagle培养基 (DMEM) 中培养, 在5% CO<sub>2</sub>培养箱中补充10%胎牛血清 (FBS) 常规培养。细胞培养环境为: 37℃、5%CO<sub>2</sub>、2%O<sub>2</sub>、93%N<sub>2</sub>。分组设计具体如下。A375细胞组: 细胞浓度为5×10<sup>6</sup>/ml的人黑素瘤细胞A375液在10%胎牛血清的DMEM中培养; 紫杉醇组: 人黑素瘤细胞A375培养方法同A375细胞组, 加入紫杉醇, 使紫杉醇浓度为500 μmol·ml<sup>-1</sup>; 芦荟大黄素低、高剂量组的人黑素瘤细胞A375培养方法同A375细胞组, 各组分别加入芦荟大黄素 (分子式为C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>), 使芦荟大黄素浓度分别为500 μmol·ml<sup>-1</sup>、1 000 μmol·ml<sup>-1</sup>。以上各组每孔设6个平行样, 培养72 h。

1.3 细胞增殖测定: 细胞培养结束后, 将人黑素瘤细胞以1×10<sup>4</sup>个细胞/孔的200 μl培养基接种到96孔板中。孵育指定72 h后, 将20 μl MTT溶液[磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的5 mg/ml]添加到每个孔中并再孵育4 h。将每个孔中的培养基替换为200 μl DMSO, 以溶解MTT分析中形成的甲臍晶体。在酶标仪上以490 nm的波长读取溶液的吸光度。存活率=(实验组OD-A375细胞组OD)/(实验组OD-蒸馏水空白调零组OD)×100%。

1.4 细胞凋亡率及细胞周期的测定: 根据制造商的说明, 使用流式细胞术分析AnnexinV和碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡试剂盒测定细胞凋亡。将收获的细胞 (1×10<sup>4</sup>个/毫升) 重悬于结合缓冲液中, 与5 ml膜联蛋白-V孵育, 然后与10 ml PI孵育。细胞在室温下在黑暗中保持15 min, 并使用BD FACSCanto流式细胞仪分析细胞凋亡率。将细胞接种在60 mm培养皿中。附着后用100 μM芹菜素或DMSO处理细胞24 h。然后收获细胞并用冰冷的75%乙醇固定。将细胞沉淀重悬于由480 μl PBS、5 μl PI (5 mg/ml)、5 μl RNase (10 mg/ml) 和10 μl Triton X-100 (10%) 组成的结合缓冲液中。在黑暗中室温孵育30 min后, 使用流式细胞仪检查细胞周期相分布。

1.5 细胞侵袭迁移水平测定: 使用带有8 μm孔聚碳酸酯滤芯的Transwell小室进行细胞侵袭试验。每个插入物的上侧涂有10 μl基质胶 (3 mg/ml)。培养结束的细胞 (1×10<sup>6</sup>/ml) 在基质胶包被的Transwell插入物上培养, 下室包含DMEM培养基, 附加有10% FBS作为趋化剂, 孵育72 h后, 将膜下表面的侵入细胞用冷冻的3.7%甲醇固定15 min, 并用0.5%结晶紫染色15 min。使用倒置光学显微镜观察细胞, 并通过在200倍放大倍率下计算五个随机、非重叠视野中出现在聚碳

酸酯膜下表面的细胞数量来确定侵袭性。培养结束的人黑素瘤细胞, 重悬于无血清培养基中, 在6孔板 (5×10<sup>4</sup>) 中孵育24 h (孵育后的细胞第2天用一层培养板覆盖)。在室温下孵育24 h后, 用200 μl无菌移液器吸头刮擦细胞并用PBS洗涤三次。观察细胞的迁移, 并使用光学显微镜 (放大倍数, 100×; 奥林巴斯公司) 在24 h拍摄图像。

1.6 细胞AKT、P-AKT、mTOR mRNA水平测定: 使用TRIzol<sup>®</sup>试剂盒从人黑素瘤细胞中提取总RNA, 并使用逆转录试剂盒将其逆转录成cDNA。AceQqPCRSYBR-GreenMasterMix用于qPCR反应。热循环条件如下: 96℃初始变性4 min; 然后是95℃变性20 s、60℃退火30 s和72℃延伸30 s的40个循环。使用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算AKT、mTOR mRNA的表达水平。

1.7 细胞AKT、P-AKT、mTOR蛋白水平测定: 细胞培养结束后, 收获细胞并在冰上裂解缓冲液中孵育30 min, 然后在4℃下以12 000 g离心10 min澄清裂解物以获得上清液 (总细胞裂解物)。使用考马斯亮蓝 (CBB) 方法测定总蛋白质浓度。对于蛋白质印迹, 25 μg总蛋白通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离并转移到硝酸纤维素膜上。在室温下用5%脱脂奶粉封闭非特异性结合位点2 h后, 将膜与适当浓度的相应AKT、P-AKT、mTOR一抗在4℃下孵育过夜, 清洗膜以去除未结合的一抗后, 将它们与辣根过氧化物酶偶联的抗兔或抗小鼠二抗 (1:5 000) 在室温下孵育1 h。最后用PBS洗涤膜, 并使用ECL试剂盒 (APG BIO, 中国上海) 显影1 min, 通过图像扫描使蛋白质条带可视化, 并在将数据标准化为GAPDH蛋白作为内部对照后, 使用Image Lab软件 (4.0版; Bio-Rad, 美国) 测量每个条带的光密度。

1.8 统计学分析: 以上试验均重复3次, 应用SPSS 22.0软件进行统计分析。所有数据均表示为均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), 使用单因素方差分析及LSD-*t*事后检验比较,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组人黑素瘤细胞A375 OD值、存活率的比较: 与A375细胞组比较, 紫杉醇组、芦荟大黄素低、高剂量组OD值、存活率降低 ( $P < 0.05$ ); 与紫杉醇组比较, 芦荟大黄素低剂量组OD值、存活率升高 ( $P < 0.05$ ), 高剂量组OD值、存活率无明显变化 ( $P > 0.05$ ); 与芦荟大黄素低剂量组比较, 芦荟大黄素高剂量组OD值、存活率降低 ( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 各组人黑素瘤细胞A375OD值、存活率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	复孔数	OD值	存活率/%
A375细胞组	6	0.82±0.05	87.50±3.48
紫杉醇组	6	0.39±0.07 <sup>a</sup>	25.11±3.39 <sup>a</sup>
芦荟大黄素低剂量组	6	0.75±0.05 <sup>ab</sup>	59.48±3.50 <sup>ab</sup>
芦荟大黄素高剂量组	6	0.38±0.06 <sup>ac</sup>	26.67±3.36 <sup>ac</sup>

注: <sup>a</sup>表示与A375细胞组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与紫杉醇组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>表示与芦荟大黄素低剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

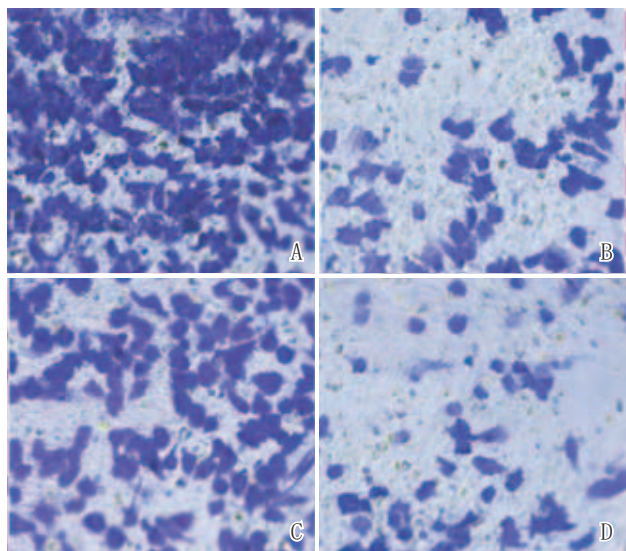


2.2 各组人黑素瘤细胞A375侵袭能力比较:与A375细胞组比较,紫杉醇组、芦荟大黄素低、高剂量组穿膜数降低( $P<0.05$ );与紫杉醇组比较,芦荟大黄素低剂量组穿膜数升高( $P<0.05$ ),高剂量组穿膜数无明显变化( $P>0.05$ );与芦荟大黄素低剂量组比较,芦荟大黄素高剂量组穿膜数降低( $P<0.05$ )。见表2、图1。

表2 各组人黑素瘤细胞A375侵袭能力比较 ( $\bar{x}\pm s$ , 个)

组别	复孔数	穿膜数
A375细胞组	6	2 174.68±456.42
紫杉醇组	6	299.68±63.37 <sup>a</sup>
芦荟大黄素低剂量组	6	654.35±126.78 <sup>b</sup>
芦荟大黄素高剂量组	6	298.45±66.95 <sup>ac</sup>

注: <sup>a</sup>表示与A375细胞组比较,  $P<0.05$ ; <sup>b</sup>表示与紫杉醇组比较,  $P<0.05$ ; <sup>c</sup>表示与芦荟大黄素低剂量组比较,  $P<0.05$ 。



注: A. A375细胞组; B. 紫杉醇组; C. 芦荟大黄素低剂量组; D. 芦荟大黄素高剂量组

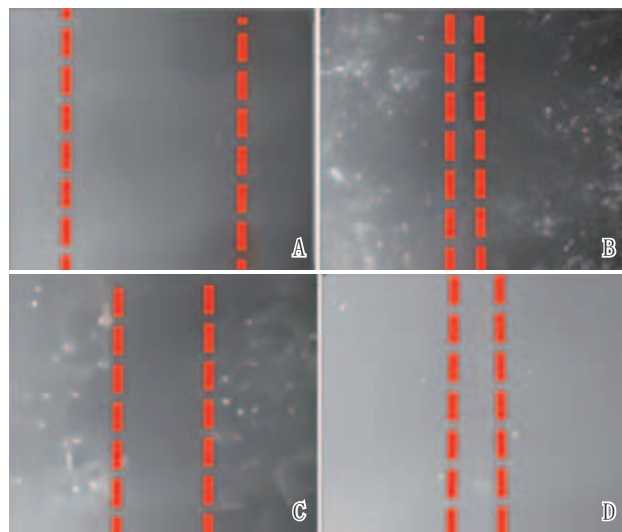
图1 各组人黑素瘤细胞A375穿膜数数目比较(200×)

2.3 各组人黑素瘤细胞A375迁移距离的比较:与A375细胞组比较,紫杉醇组、芦荟大黄素低、高剂量组迁移距离降低( $P<0.05$ );与紫杉醇组比较,芦荟大黄素低剂量组迁移距离升高( $P<0.05$ ),高剂量组迁移距离无明显变化( $P>0.05$ );与芦荟大黄素低剂量组比较,芦荟大黄素高剂量组迁移距离降低( $P<0.05$ )。见表3、图2。

表3 各组人黑素瘤细胞A375迁移距离的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	复孔数	迁移距离/ $\mu\text{m}$
A375细胞组	6	105.63±20.21
紫杉醇组	6	23.65±4.48 <sup>a</sup>
芦荟大黄素低剂量组	6	43.25±9.52 <sup>ab</sup>
芦荟大黄素高剂量组	6	24.21±4.27 <sup>ac</sup>

注: <sup>a</sup>表示与A375细胞组比较,  $P<0.05$ ; <sup>b</sup>表示与紫杉醇组比较,  $P<0.05$ ; <sup>c</sup>表示与芦荟大黄素低剂量组比较,  $P<0.05$ 。



注: A. A375细胞组; B. 紫杉醇组; C. 芦荟大黄素低剂量组; D. 芦荟大黄素高剂量组

图2 各组人黑素瘤细胞A375迁移距离比较

2.4 各组人黑素瘤细胞A375凋亡率、G2/M比较:与A375细胞组比较,紫杉醇组、芦荟大黄素低、高剂量组凋亡率、G2/M升高( $P<0.05$ );与紫杉醇组比较,芦荟大黄素低剂量组凋亡率、G2/M降低( $P<0.05$ ),高剂量组凋亡率、G2/M无明显变化( $P>0.05$ );与芦荟大黄素低剂量组比较,芦荟大黄素高剂量组凋亡率、G2/M升高( $P<0.05$ )。见表4、图3。

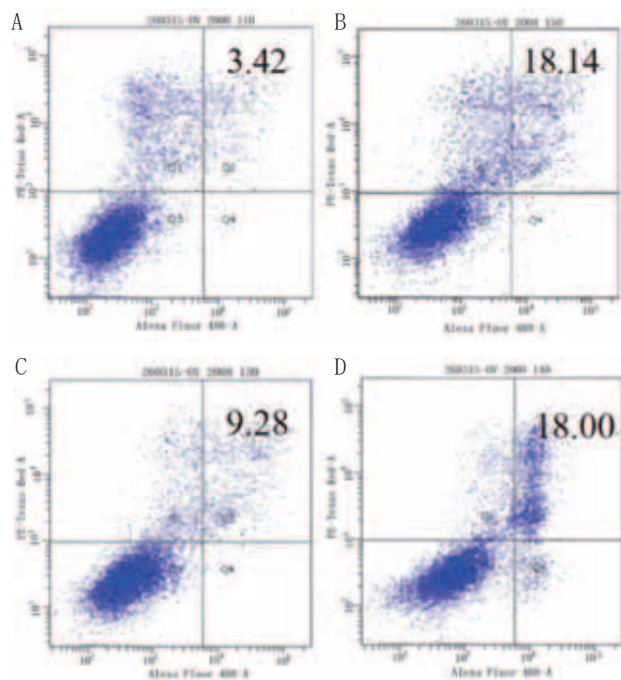
表4 各组人黑素瘤细胞A375凋亡率、G2/M比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	复孔数	凋亡率/%	G2/M
A375细胞组	6	3.42±0.62	35.63±8.56
紫杉醇组	6	18.14±3.64 <sup>a</sup>	69.55±9.64 <sup>a</sup>
芦荟大黄素低剂量组	6	9.28±1.97 <sup>ab</sup>	48.95±8.97 <sup>ab</sup>
芦荟大黄素高剂量组	6	18.00±3.59 <sup>ac</sup>	68.07±9.96 <sup>ac</sup>

注: <sup>a</sup>表示与A375细胞组比较,  $P<0.05$ ; <sup>b</sup>表示与紫杉醇组比较,  $P<0.05$ ; <sup>c</sup>表示与芦荟大黄素低剂量组比较,  $P<0.05$ 。

2.5 各组人黑素瘤细胞A375 AKT、P-AKT、mTOR mRNA表达水平比较:与A375细胞组比较,紫杉醇组、芦荟大黄素低、高剂量组AKT、P-AKT、mTOR mRNA表达水平降低( $P<0.05$ );与紫杉醇组比较,芦荟大黄素低剂量组AKT、P-AKT、mTOR mRNA表达水平升高( $P<0.05$ ),高剂量组AKT、P-AKT、mTOR mRNA表达水平无明显变化( $P>0.05$ );与芦荟大黄素低剂量组比较,芦荟大黄素高剂量组AKT、P-AKT、mTOR mRNA表达水平降低( $P<0.05$ )。见表5。

2.6 各组人黑素瘤细胞A375 P-AKT、AKT、mTOR蛋白表达比较:与A375细胞组比较,紫杉醇组、芦荟大黄素低、高剂量组P-AKT、AKT、mTOR蛋白表达降低( $P<0.05$ );与紫杉醇组比较,芦荟大黄素低剂量组P-AKT、AKT、mTOR蛋白表达升高( $P<0.05$ ),高剂量组P-AKT、AKT、mTOR蛋白表达无



注：A. A375细胞组；B. 紫杉醇组；C. 芦荟大黄素低剂量组；D. 芦荟大黄素高剂量组

图3 各组人黑素瘤细胞A375凋亡率比较

表5 各组人黑素瘤细胞A375 AKT、P-AKT、mTOR mRNA表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	复孔数	AKT mRNA	P-AKT mRNA	mTOR mRNA
A375细胞组	6	6.29 ± 1.20	5.28 ± 0.58	5.20 ± 1.03
紫杉醇组	6	1.95 ± 0.43 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.43 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.46 <sup>a</sup>
芦荟大黄素低剂量组	6	4.04 ± 0.95 <sup>ab</sup>	3.89 ± 0.55 <sup>ab</sup>	4.14 ± 1.03 <sup>ab</sup>
芦荟大黄素高剂量组	6	1.94 ± 0.44 <sup>ac</sup>	1.13 ± 0.49 <sup>ac</sup>	2.28 ± 0.45 <sup>ac</sup>

注：<sup>a</sup>表示与A375细胞组比较， $P < 0.05$ ；<sup>b</sup>表示与紫杉醇组比较， $P < 0.05$ ；<sup>c</sup>表示与芦荟大黄素低剂量组比较， $P < 0.05$ 。

明显变化 ( $P > 0.05$ )；与芦荟大黄素低剂量组比较，芦荟大黄素高剂量组P-AKT、AKT、mTOR蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。见表6、图4。

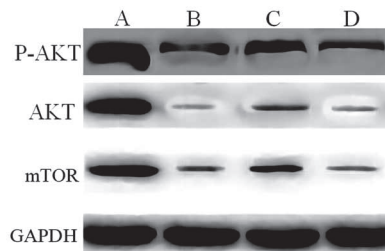
表6 各组人黑素瘤细胞A375 P-AKT、AKT、mTOR蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	复孔数	AKT蛋白 (/GAPDH)	P-AKT蛋白 (/GAPDH)	mTOR蛋白 (/GAPDH)
A375细胞组	6	1.68 ± 0.42	1.59 ± 0.26	1.57 ± 0.39
紫杉醇组	6	0.38 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.09 <sup>a</sup>
芦荟大黄素低剂量组	6	0.72 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.75 ± 0.19 <sup>ab</sup>	0.73 ± 0.19 <sup>ab</sup>
芦荟大黄素高剂量组	6	0.41 ± 0.11 <sup>ac</sup>	0.42 ± 0.19 <sup>ac</sup>	0.36 ± 0.10 <sup>ac</sup>

注：<sup>a</sup>表示与A375细胞组比较， $P < 0.05$ ；<sup>b</sup>表示与紫杉醇组比较， $P < 0.05$ ；<sup>c</sup>表示与芦荟大黄素低剂量组比较， $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

黑素瘤是恶性肿瘤，具有转移倾向。黑素瘤的治疗方法包括冷冻疗法、手术和化学疗法以及一些非手术疗法（辅助疗法），但患者总体预后较差。因此，越来越多的



注：A. A375细胞组；B. 紫杉醇组；C. 芦荟大黄素低剂量组；D. 芦荟大黄素高剂量组

图4 各组人黑素瘤细胞A375 P-AKT、AKT、mTOR蛋白表达印迹图

研究集中于寻找对黑素瘤安全有效的天然植物化学物质。众所周知，来自天然植物的化合物对包括黑素瘤在内的人类癌症具有预防和治疗功效。芦荟大黄素是蒽醌类化合物，存在于各种蔬菜、草药、水果和中药中，并已被证明可抑制肿瘤生长<sup>[7]</sup>。

本研究探讨芦荟大黄素对人类黑素瘤细胞的化疗能力，结果显示芦荟大黄素显著抑制癌细胞的生长。这些数据表明芦荟大黄素具有抗人类黑素瘤的化疗潜力。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡，是正常组织发育所必需的生理过程。在哺乳动物中，有两种主要的细胞凋亡途径：外在途径（死亡受体介导的途径）和内在途径（线粒体介导的途径）。Caspase-3是一个关键的执行者半胱天冬酶，它的激活导致细胞死亡期间PARP的裂解。PARP的裂解被认为是细胞凋亡的核心指标。AKT-mTOR信号通路与细胞生物学功能和癌症恶性肿瘤相关，也在癌症的增殖和凋亡中发挥重要作用。本研究证实芦荟大黄素处理导致细胞的更高凋亡率，以剂量依赖性方式显著增加裂解的caspase-3和裂解的PARP的表达，同时降低AKT、mTOR的表达。芦荟大黄素处理的A375细胞发生的细胞死亡可能是由细胞凋亡引起的，细胞凋亡可能与AKT、mTOR磷酸化有关。用AKT、mTOR抑制剂预处理A375细胞对于揭示芦荟大黄素诱导的细胞凋亡是否依赖于AKT、mTOR活性是必要的，笔者团队将在未来的研究中研究相关机制。研究证明，芦荟大黄素通过外在途径诱导细胞凋亡，增加p53并抑制HER2过表达乳腺癌细胞中的STAT3和NF- $\kappa$ B信号转导<sup>[8-9]</sup>；芦荟大黄素通过靶向前列腺癌中细胞凋亡蛋白抑制剂和Ku70-Bax相互作用来诱导细胞凋亡<sup>[10]</sup>；芦荟大黄素通过选择性作用和线粒体功能障碍诱导A549细胞凋亡<sup>[11]</sup>，表明芦荟大黄素能促进A375细胞内在凋亡途径的激活。但是，本研究并未确定芦荟大黄素是通过内在途径还是外在途径诱导细胞凋亡，这将在未来进行相关研究。此外，蛋白质印迹分析表明，芦荟大黄素处理后AKT、mTOR的表达降低。这表明AKT/mTOR通路在A375细胞中观察到的芦荟大黄素诱导的细胞凋亡中起着至关重要的作用。既往研究证明芦荟大黄素通过PI3K/AKT通路、Bcl-2家族的调节以及caspase-3和PARP的激活诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。这与本研究结果一致。

细胞周期失调是肿瘤发生的标志。细胞周期在多个检查点进行控制。当DNA受损时, G2/M检查点会抑制细胞进入有丝分裂, 从而实现细胞修复。当损伤无法修复时, 可能会激活导致细胞凋亡的途径。G2/M检查点受Cdc2/细胞周期蛋白B及其负调节因子(包括p21Cip1和p27)控制。调节这些G2/M检查点蛋白可能会增强癌细胞对放疗和化疗的敏感性。因此, G2/M检查点是癌症治疗的潜在靶点。据报道<sup>[12-13]</sup>, 芦荟大黄素使人结肠癌HCT116细胞停滞在G2/M期; 它还能抑制细胞周期蛋白B1及其激活伙伴Cdc2和Cdc25c的表达<sup>[14-15]</sup>。此外, 芦荟大黄素处理通过下调人乳头状甲状腺癌BCPAP细胞中的Cdc25c表达, 导致G2/M期细胞大量积累<sup>[16-17]</sup>。本研究发现芦荟大黄素通过诱导细胞周期的G2/M期停滞来抑制人黑素瘤A375细胞的生长。此外, 芦荟大黄素处理降低了mTOR的表达。先前研究表明<sup>[18]</sup>, AKT/mTOR通路可能通过调节G2/M相关蛋白的表达来影响G2向有丝分裂期的进展。AKT活性形式的表达在蛋白质和mRNA水平上增加了Cdk1, 而其主要的负突变通过诱导G2/M停滞抑制细胞增殖。因此, 芦荟大黄素可能通过AKT/mTOR通路阻止细胞周期中的G2/M转换, 从而抑制A375细胞的增殖。

调节肿瘤细胞侵袭的关键信号通路是PI3K/AKT通路。该途径促进多种癌症(包括黑素瘤)对化疗诱导的细胞凋亡产生抗性。AKT具有调节细胞运动的潜力。mTOR和AKT对迁移的影响可能与细胞骨架重组所需的蛋白质合成相关。本研究结果表明, 芦荟大黄素对A375细胞具有抗侵袭作用, 这可能是通过下调AKT、mTOR的表达。

综上所述, 芦荟大黄素对黑素瘤细胞增殖和侵袭具有明显抑制作用, 其机制可能与芦荟大黄素抑制AKT/mTOR通路的激活有关。

#### [参考文献]

- [1]Tímár J, Ladányi A. Molecular pathology of skin melanoma: epidemiology, differential diagnostics, prognosis and therapy prediction[J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(10):5384.
- [2]李荟元. 国外美容医学最新研究与进展(九)——恶性黑素瘤[J]. *中国美容医学*, 2017,26(11):148-149.
- [3]Shen F, Ge C, Yuan P. Aloe-emodin induces autophagy and apoptotic cell death in non-small cell lung cancer cells via Akt/mTOR and MAPK signaling[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 886: 173550.
- [4]成静, 陈栋梁, 江雪琼, 等. 胶原三肽对B16黑素瘤细胞黑素合成的影响[J]. *中国美容医学*, 2011,20(6):939-941.
- [5]Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu I I, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,22(1):173.
- [6]Jiang N, Dai Q, Su X, et al. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior[J]. *Mol Biol Rep*, 2020,47(6):4587-4629.
- [7]Dong X, Zeng Y, Liu Y, et al. Aloe-emodin: a review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics[J]. *Phytother Res*, 2020,34(2):270-281.
- [8]Cheng G, Liu Z, Zheng Z, et al. Cell metabolomics reveals the potential mechanism of aloe emodin and emodin inhibiting breast cancer metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(22):13738.
- [9]Jangra S, Sharma B, Singh S. Aloe-emodin-loaded SBA-15 and its in vitro release properties and cytotoxicity to cervical cancer cells[J]. *Mater Res Innov*, 2021,25(5):264-275.
- [10]Kim H J, Choi J W, Ree J, et al. Aloe emodin 3-O-glucoside inhibits cell growth and migration and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer cells via suppressing MEK/ERK and Akt signalling pathways[J]. *Life Sci*, 2022, 300: 120495.
- [11]Shang H, Hu Y, Li J, et al. The synthesis and biological evaluation of aloe-emodin-coumarin hybrids as potential antitumor agents[J]. *Molecules*, 2022,27(19):6153.
- [12]Nowak-Perlak M, Bromke M A, Ziolkowski P, et al. The comparison of the efficiency of emodin and aloe-emodin in photodynamic therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(11):6276.
- [13]Akev N, Candoken E, Kuruca S E. Comparative study on the anticancer drug potential of a lectin purified from aloe vera and aloe-emodin[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020,21(1):99-106.
- [14]Kumar G D, Siva B, Vadlamudi S, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of pyrazole-linked aloe emodin derivatives as potential anticancer agents[J]. *RSC Med Chem*, 2021,12(5):791-796.
- [15]Dileep Kumar G, Siva B, Ashwini K, et al. Design, synthesis, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of some novel analogues of aloe-emodin isolated from the rhizomes of *Rheum emodi*[J]. *Nat Prod Res*, 2021,13:1-7.
- [16]Jiang D, Ding S, Mao Z, et al. Integrated analysis of potential pathways by which aloe-emodin induces the apoptosis of colon cancer cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2021,21(1):1-12.
- [17]Majumder R, Parida P, Paul S, et al. In vitro and in silico study of Aloe vera leaf extract against human breast cancer[J]. *Nat Prod Res*, 2020,34(16):2363-2366.
- [18]Peng M, Zheng Z, Chen S, et al. Sensitization of non-small cell lung cancer cells to gefitinib and reversal of epithelial-mesenchymal transition by aloe-emodin Via PI3K/Akt/TWIS1 signal blockage[J]. *Front Oncol*, 2022,12:908031.

[收稿日期]2023-10-07

本文引用格式: 李妍芯, 赵奥林, 阮英. 芦荟大黄素抑制人黑素瘤细胞A375增殖和侵袭的作用及机制初探[J]. *中国美容医学*, 2025,34(3):13-18.