

# 二氢杨梅素通过 SIRT1/JNK 途径提高耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂的敏感性

黄晔<sup>1</sup>, 游淑梅<sup>1</sup>, 沈杨炳<sup>2</sup> (1.浙江省皮肤病防治研究所药剂科, 浙江 湖州 313000; 2.浙江中医药大学, 杭州 310000)

**摘要:** 目的 探讨二氢杨梅素对卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞的增敏作用并研究其机制。方法 MTT 法检测卡铂耐药 A375 细胞(A375-R)在卡铂和二氢杨梅素处理下的细胞活力。Western blot 法检测卡铂和二氢杨梅素对 A375-R 细胞 SIRT1 表达水平, caspase-9、caspase-3 活化水平及 JNK 蛋白磷酸化水平的影响。流式细胞术检测 A375-R 细胞在卡铂和二氢杨梅素联合处理下的细胞凋亡率。结果 MTT 实验结果显示, 卡铂对 A375-R 细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)显著高于 A375 细胞, 二氢杨梅素辅助治疗能明显降低卡铂对 A375-R 的 IC<sub>50</sub>。Western blot 实验结果显示 A375-R 中 SIRT1 的表达水平显著高于 A375 细胞, 二氢杨梅素处理能显著抑制 A375-R 细胞 SIRT1 的表达。二氢杨梅素能明显促进卡铂对 A375-R 细胞 JNK 的磷酸化, 转染 SIRT1 质粒或用 JNK 特异性抑制剂(SP600125)处理后, 二氢杨梅素联合卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性、凋亡诱导活性和 JNK、caspase-9 及 caspase-3 的活化均受到明显抑制。结论 二氢杨梅素通过 SIRT1/JNK 途径提高耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂的敏感性。

**关键词:** 恶性黑色素瘤; 二氢杨梅素; SIRT1; 卡铂; 卡铂耐药 A375; JNK

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)12-1689-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.010

引用本文: 黄晔, 游淑梅, 沈杨炳. 二氢杨梅素通过 SIRT1/JNK 途径提高耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂的敏感性[J]. 中国现代应用药学, 34(12): 1689-1694.

## Dihydromyricetin Sensitizes Drug-resistant Melanoma Cells to Carboplatin Through the SIRT1/JNK Pathway

HUANG Ye<sup>1</sup>, YOU Shumei<sup>1</sup>, SHEN Yangbing<sup>2</sup> (1.Department of Pharmacy, Zhejiang Skin Disease Prevention and Treatment Center, Huzhou 313000, China; 2.Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect and mechanisms of dihydromyricetin treatment on sensitizing carboplatin-resistant melanoma to carboplatin treatment. **METHODS** MTT assay was performed to evaluate the effect of dihydromyricetin and carboplatin on inhibiting the viability of carboplatin-resistant A375 (A375-R) cells. Western blot analysis was performed to detect the expression of SIRT1, activation of caspase-9 and caspase-3, and phosphorylation of JNK in the A375-R cells treated with dihydromyricetin and carboplatin. Flow cytometry analysis was performed to measure the cell apoptosis of A375-R cells treated with dihydromyricetin and carboplatin. **RESULTS** Results of MTT assays showed that IC<sub>50</sub> of carboplatin to A375-R was significantly higher than the A375 cells. Dihydromyricetin treatment was able to decrease the IC<sub>50</sub> of carboplatin to A375-R. Results of Western blot analysis showed that expression level of SIRT1 in A375-R cells was significantly higher than that in the A375 cells. Dihydromyricetin decreased the expression of SIRT1 in A375-R. Dihydromyricetin promoted phosphorylation of JNK in A375-R cells treated with carboplatin. After transfection with SIRT1 plasmid or pretreatment with JNK specific inhibitor SP600125, dihydromyricetin plus carboplatin-induced cytotoxicity, apoptosis, activation of JNK, caspase-9 and caspase-3 was significantly suppressed. **CONCLUSION** Dihydromyricetin sensitizes drug-resistant melanoma cells to carboplatin through the SIRT1/JNK pathway.

**KEY WORDS:** melanoma; dihydromyricetin; SIRT1; carboplatin; carboplatin-resistant A375; JNK

恶性黑色素瘤是恶性程度和致死率都非常高的皮肤组织恶性肿瘤。由于恶性黑色素瘤的转移能力很强, 很多患者在确诊时已发生肿瘤的转移和扩散, 因此患者的 5 年生存率很低<sup>[1-2]</sup>。在恶性黑色素瘤的治疗中, 化疗是不可替代的重要方法。然而随着化疗药物的反复使用, 肿瘤细胞对化疗的敏感性往往会逐渐降低, 而且大剂量的化疗药物对

患者有很大的不良反应<sup>[3-4]</sup>, 因此采用一些辅助治疗手段降低化疗药物的剂量并提高肿瘤细胞对化疗的敏感性具有十分重要的意义。

卡铂是一种广谱抗肿瘤药物, 在恶性黑色素瘤的化疗中具有重要的作用, 它能与肿瘤细胞中的 DNA 发生结合, 从而抑制 DNA 的合成、复制和转录, 并诱导肿瘤细胞发生凋亡<sup>[5-6]</sup>。然而卡铂的

作者简介: 黄晔, 女, 主管药师 Tel: 13967273081 E-mail: myxxxx@163.com

长期使用对患者的不良反应也较大,而且随着卡铂的持续使用,肿瘤细胞会逐渐产生对卡铂的耐药性,影响卡铂的治疗效果<sup>[7-8]</sup>。降低耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂的抵抗性是提高化疗效果的有效方法。

二氢杨梅素又名蛇葡萄素,是一种具有很强药理活性的黄酮类化合物,具有解除醇中毒,抑制细胞癌变的作用,文献报道二氢杨梅素还有一定的抗肿瘤效应<sup>[9-10]</sup>,然而其是否能对卡铂的获得性耐药有抑制作用至今仍很少报道。SIRT1 是一种组蛋白去乙酰化酶,研究表明 SIRT1 在多种肿瘤中发生过表达并能减弱肿瘤细胞对化疗的敏感性<sup>[11]</sup>,因此 SIRT1 可能是肿瘤辅助治疗的潜在靶点。本研究的目的在于探讨二氢杨梅素对卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞的增敏作用,并研究其机制是否和 SIRT1 的抑制有关。

## 1 材料

### 1.1 细胞培养

人恶性黑色素瘤细胞系 A375 购于美国模式培养物保存中心(ATCC)。卡铂耐药 A375(A375-R)细胞用卡铂梯度处理法进行诱导构建,简要步骤如下:首先将常规 A375 细胞用含  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡铂的培养基培养 3 个月,之后每 3 周将卡铂浓度提高  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,最终使 A375-R 细胞稳定培养在含  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡铂的培养基中。A375 和 A375-R 细胞培养在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,在  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养并通入 5%  $\text{CO}_2$ 。

### 1.2 试剂

卡铂(批号:BP711)、二氢杨梅素(批号:SML0295)、噻唑蓝(MTT,批号:M2128)、SP600125(批号:S5567)和凋亡检测试剂盒(批号:APOAF)购于美国 Sigma-Aldrich; RPMI-1640 培养基(美国 Gibco);蛋白提取液(批号:#9806)、SIRT1(批号:#9475)、磷酸化 JNK(p-JNK,批号:#4668)、活化 caspase-9(批号:#20750)、活化 caspase-3(批号:#9661)和 GAPDH 抗体(批号:#5174)购于美国 Cell Signaling; ECL 试剂盒(美国 Pierce,批号:32106); pcDNA3.1、Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen。

## 2 方法

### 2.1 卡铂半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )的测定

将 A375 及 A375-R 细胞按每孔  $5 \times 10^3$  接种在 96 孔板上孵育过夜,用( $0 \sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )卡铂及

$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  二氢杨梅素处理肿瘤细胞 48 h,之后加入  $20 \mu\text{L}$  MTT ( $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养 4 h,移除孔内培养基,加入  $100 \mu\text{L}$  二甲亚砜,  $570 \text{ nm}$  波长下测定 OD 值。细胞活力结果用卡铂处理组与对照组的 OD 值比值表示。绘制细胞活力-卡铂浓度曲线,根据曲线计算卡铂对 A375 细胞的  $\text{IC}_{50}$ 。

### 2.2 SIRT1 重组质粒构建和转染

人 SIRT1 基因的开放阅读框架序列经 PCR 扩增后以分子克隆的方法与 pcDNA3.1 连接后构建 SIRT1 重组过表达质粒。SIRT1 过表达质粒用脂质体 2000 按试剂操作说明书步骤进行转染,简要步骤如下:将  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  空质粒或 SIRT1 质粒用脂质体 2000 进行包裹后,加入到无血清培养基进行混合。将贴壁的 A375 细胞置于该无血清培养基孵育 6 h,之后弃去无血清培养基并加入新鲜的含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 24 h。

### 2.3 二氢杨梅素联合卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性

空质粒或 SIRT1 质粒转染的 A375 细胞按每孔  $5 \times 10^3$  接种在 96 孔板上孵育过夜,之后加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡铂,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  二氢杨梅素,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SP600125 处理细胞 48 h,之后加入  $20 \mu\text{L}$  MTT ( $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养 4 h,移除孔内培养基,加入  $100 \mu\text{L}$  二甲亚砜,  $570 \text{ nm}$  波长下测定 OD 值。细胞活力结果用药物处理组与对照组的 OD 值比值表示。

### 2.4 Western blot 试验

空质粒或 SIRT1 质粒转染的 A375 细胞加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡铂,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  二氢杨梅素,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SP600125 处理细胞 48 h。之后用蛋白提取液提取 A375 细胞中的总蛋白质。将等量的总蛋白质用 12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离。分离完毕后通过电转方法将蛋白质从分离胶上转到 PVDF 膜上,用 SIRT1、p-JNK、活化 caspase-9、活化 caspase-3 和 GAPDH 抗体孵育过夜,之后再带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h,蛋白条带用 ECL 试剂盒显色发光。

### 2.5 细胞凋亡试验

在空质粒或 SIRT1 质粒转染的 A375 细胞中加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡铂,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  二氢杨梅素,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SP600125 处理细胞 48 h。之后按照凋亡试剂盒说明书步骤将 PI 和 Annexin-V 加入细胞

中孵育 20 min, 采用流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡, Annexin-V 阳性细胞即为凋亡细胞。

## 2.6 统计学处理

所有实验重复 3 次, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 并用 SPSS 15.0 统计分析软件进行处理, 统计学方法采用单因素方差分析(one-way ANOVA) 进行处理,  $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 3 结果

### 3.1 二氢杨梅素增强卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂的敏感性

MTT 实验结果显示, A375-R 细胞对卡铂有显著的耐药性, 卡铂对 A375-R 细胞的  $IC_{50}$  显著高于 A375 细胞, 见图 1A。然而, 将 A375-R 细胞用  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  二氢杨梅素进行联合处理后, 卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性明显增强。实验结果显示, 二氢杨梅素辅助治疗能显著降低卡铂对 A375-R 细胞的  $IC_{50}$ , 见图 1B, 表明二氢杨梅素能增强卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂的敏感性。

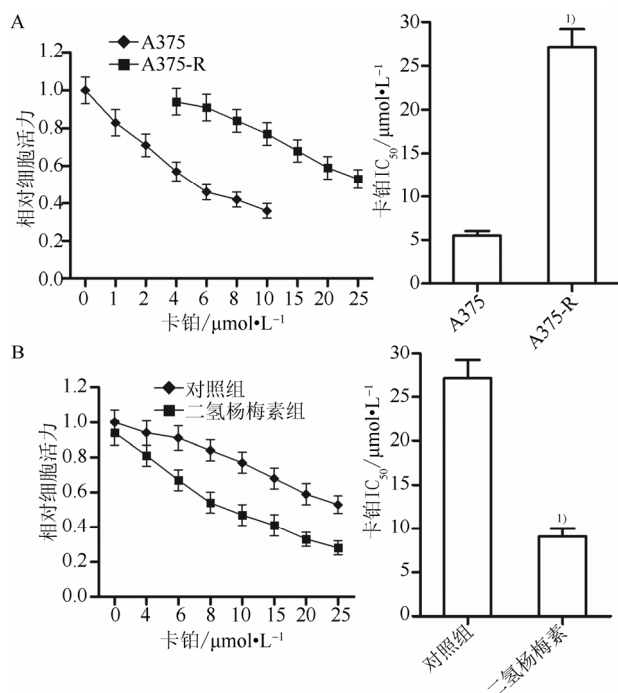


图 1 二氢杨梅素增强卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂的敏感性( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

A-卡铂对 A375-R 细胞的  $IC_{50}$  显著高于 A375 细胞; 与 A375 细胞相比,  $^{1)}P < 0.05$ ; B-二氢杨梅素降低卡铂对 A375-R 细胞的  $IC_{50}$ ; 与对照组相比,  $^{1)}P < 0.05$ 。

Fig. 1 Dihydromyricetin increased the sensitivity of carboplatin-resistant melanoma cells to carboplatin( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

A-A375-R exhibited higher  $IC_{50}$  of carboplatin than the A375 cells; Compared with A375 cells,  $^{1)}P < 0.05$ ; B-dihydromyricetin decreased the  $IC_{50}$  of carboplatin to A375-R cells. Compared with control group,  $^{1)}P < 0.05$ .

### 3.2 二氢杨梅素通过下调 SIRT1 的表达增强卡铂对耐药恶性黑色素瘤细胞的杀伤活性

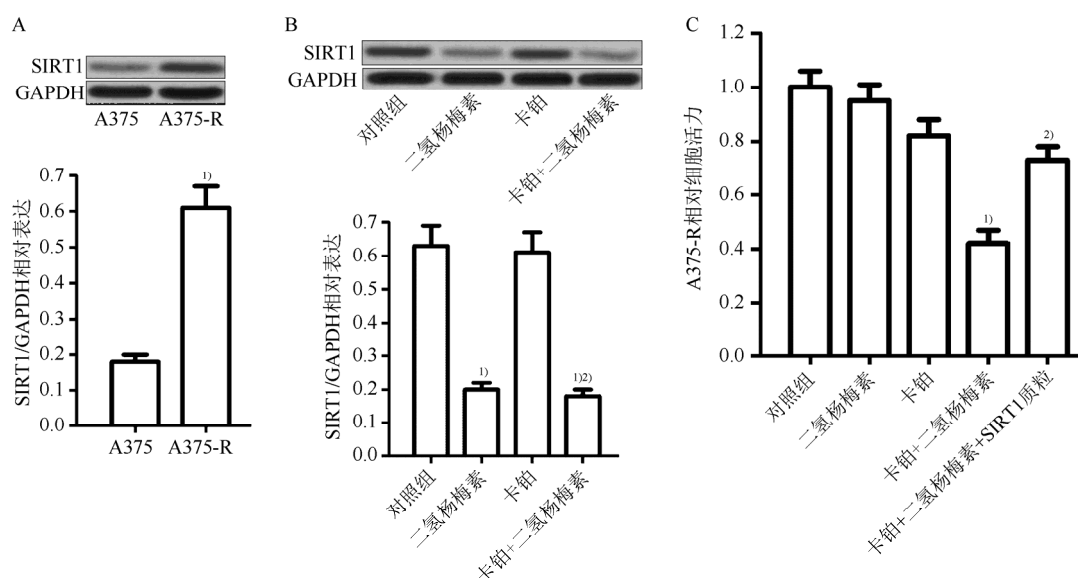
Western blot 试验结果显示, A375-R 细胞中 SIRT1 的表达水平显著高于 A375 细胞, 提示 SIRT1 蛋白的高表达可能和恶性黑色素瘤细胞的卡铂耐药有关。将 A375-R 细胞用二氢杨梅素处理后, 细胞中 SIRT1 的表达受到明显抑制, 提示二氢杨梅素可能通过下调 SIRT1 的表达增强卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性。为了证实这一推测, 笔者用 SIRT1 重组质粒转染 A375-R 细胞中, 使其强制表达 SIRT1 蛋白。结果发现转染 SIRT1 质粒后, 二氢杨梅素联合卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性受到明显抑制, 表明二氢杨梅素是通过抑制 SIRT1 蛋白的表达从而增强卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂治疗敏感性。结果见图 2。

### 3.3 二氢杨梅素联合卡铂通过 SIRT1/JNK 通路诱导卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞发生凋亡

Western blot 实验结果显示, 二氢杨梅素联合卡铂能显著诱导 A375-R 细胞发生 JNK 蛋白的磷酸化, 而 SIRT1 质粒及 JNK 特异性抑制剂 SP600125<sup>[12]</sup> 均能抑制 JNK 的磷酸化。表明二氢杨梅素能促进卡铂对 A375-R 细胞 JNK 的磷酸化, 而且二氢杨梅素联合卡铂诱导的 JNK 的活化和 SIRT1 蛋白的下调有关。MTT 实验结果显示 SIRT1 质粒及 SP600125 均能抑制二氢杨梅素联合卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性, 表明二氢杨梅素联合卡铂通过 SIRT1/JNK 途径诱导 A375-R 细胞发生死亡。另外, 实验结果显示, 二氢杨梅素联合卡铂能显著诱导 A375-R 细胞发生 caspase-9 和 caspase-3 的活化, 并诱导其发生凋亡, 而 SIRT1 质粒及 SP600125 均能抑制 A375-R 细胞 caspases 的活化水平和凋亡水平, 表明二氢杨梅素联合卡铂能通过 SIRT1/JNK 通路诱导卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞发生 caspases 依赖的凋亡。结果见图 3。

## 4 讨论

二氢杨梅素提取自葡萄科蛇葡萄属的木质藤本植物, 是一种天然黄酮类有效成分, 具有抗氧化、抗血栓和抗炎作用。近期的研究发现二氢杨梅素还具有一定的抗肿瘤活性, 能促进恶性黑色素瘤和卵巢癌等恶性肿瘤细胞的凋亡和自噬<sup>[13-14]</sup>, 卡铂是治疗恶性黑色素瘤的重要化疗药物, 研究表明卡铂能通过诱导细胞中氧化代谢产物的产生诱导肿瘤细胞发生线粒体途径的凋亡<sup>[15]</sup>。然而卡铂



**图2** 二氢杨梅素通过下调 SIRT1 的表达增强卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

A—A375-R 细胞中 SIRT1 的表达水平显著高于 A375 细胞; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; B—二氢杨梅素抑制 A375-R 细胞中 SIRT1 蛋白的表达水平; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; C—转染 SIRT1 质粒显著抑制二氢杨梅素联合卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性; 与卡铂组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂+二氢杨梅素组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

**Fig. 2** Dihydromyricetin enhanced the cytotoxicity of carboplatin to A375-R cells through suppressing the expression of SIRT1( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

A—Expression of SIRT1 in A375-R cells was significantly higher than that in the A375 cells; compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; B—dihydromyricetin suppressed the expression of SIRT1 in A375-R cells; compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; C—transfection with SIRT1 plasmid significantly suppressed the cell death of A375-R cells co-treated with dihydromyricetin and carboplatin; compared with carboplatin group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin+dihydromyricetin group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

的长期使用容易使肿瘤细胞发生耐药性, 降低其疗效。在本研究中, 将 A375 恶性黑色素瘤细胞长期暴露于卡铂进行诱导培养, 从而构建了卡铂耐药 A375 细胞系。实验结果发现该卡铂耐药 A375 细胞相比于常规 A375 细胞显示出明显的卡铂抵抗性, 然而, 将卡铂耐药 A375 细胞用二氢杨梅素进行处理后, 其对卡铂的耐药性明显降低, 表明二氢杨梅素对耐药恶性黑色素瘤细胞的卡铂化疗有显著的增敏作用。

SIRT1 是一种组蛋白去乙酰化酶, 能调节细胞中一些氧化酶类的表达。研究表明 SIRT1 在多种肿瘤中发生过表达并且能促进肿瘤细胞的增殖和转移<sup>[16-18]</sup>。有文献数据显示肿瘤患者的 SIRT1 水平越高, 其预后往往越差, 两者存在一定的反比关系<sup>[19]</sup>。更为重要的是, 也有文献报道肿瘤细胞中 SIRT1 的表达水平和其对化疗的敏感性有关, 肿瘤细胞中 SIRT1 的高表达往往能诱导其发生化疗药物的获得性抵抗, 在一些肿瘤细胞中对 SIRT1 进行基因沉默能明显增强其对化疗的敏感性<sup>[20-21]</sup>, 这些研究表明 SIRT1 可能是逆转肿瘤化疗耐药的重要靶点。SIRT1 在肿瘤细胞中发挥抗氧化

作用, 过表达的 SIRT1 能明显增加超氧歧化酶等抗氧化酶类的表达, 从而清除肿瘤细胞中的氧化代谢产物, 使细胞逃避线粒体途径的凋亡<sup>[22-23]</sup>。JNK 是激活细胞凋亡的重要信号分子, 其活化水平受细胞中氧化代谢产物的调控, 细胞中氧化代谢产物水平越高, 则 JNK 的磷酸化程度越高<sup>[24]</sup>。文献报道 JNK 的活化能增加肿瘤细胞中促凋亡蛋白的表达并抑制 Bcl-2 抗凋亡蛋白的功能, 从而使细胞进入凋亡程序<sup>[25]</sup>。这些研究提示了 SIRT1 的高表达能通过清除肿瘤细胞中的氧化代谢产物从而抑制 JNK 通路使肿瘤细胞对凋亡信号产生抵抗性。

在本研究中, 实验结果发现卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞的 SIRT1 表达水平显著上升, 并且二氢杨梅素能明显抑制 SIRT1 的表达, 因此推测二氢杨梅素抑制恶性黑色素瘤细胞的卡铂耐药性的机制可能和 SIRT1 的下调有关。为了证明这个观点, 在卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞中转染 SIRT1 重组表达质粒对抗二氢杨梅素对 SIRT1 的抑制作用, 结果发现 SIRT1 的强制表达能明显抑制卡铂联合二氢杨梅素对卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞的杀伤活性, 证实了二氢杨梅素降低恶性黑色素瘤细胞卡铂

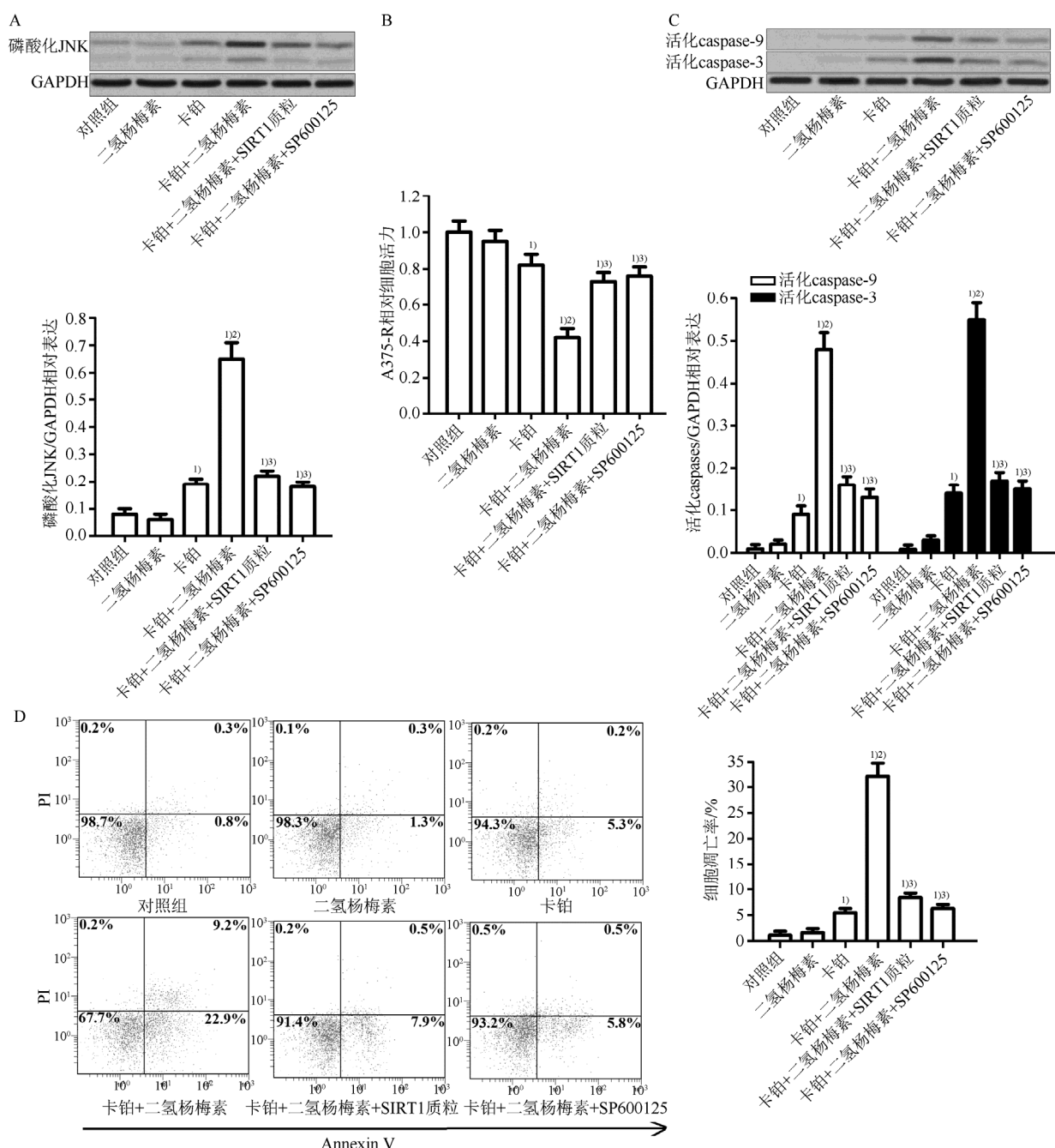


图3 二氢杨梅素联合卡铂通过 SIRT1/JNK 通路诱导 A375-R 细胞发生凋亡( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

A-二氢杨梅素联合卡铂诱导的 JNK 的磷酸化受 SIRT1 质粒及 SP600125 的抑制; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂+二氢杨梅素组相比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; B-二氢杨梅素联合卡铂对 A375-R 细胞的杀伤活性受 SIRT1 质粒及 SP600125 的抑制; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂+二氢杨梅素组相比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; C-二氢杨梅素联合卡铂诱导的 caspase-9 和 caspase-3 的活化受 SIRT1 质粒及 SP600125 的抑制; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂+二氢杨梅素组相比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; D-二氢杨梅素联合卡铂诱导的 A375-R 细胞的凋亡受 SIRT1 质粒及 SP600125 的抑制; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与卡铂+二氢杨梅素组相比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 3 Combination with dihydromyricetin and carboplatin induced apoptosis of A375-R cells through the SIRT1/JNK pathway( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

A-phosphorylation of JNK induced by co-treatment with dihydromyricetin and carboplatin was inhibited by SIRT1 plasmid and SP600125; compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin + dihydromyricetin group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; B-cell death of A375-R cells induced by co-treatment with dihydromyricetin and carboplatin was inhibited by SIRT1 plasmid and SP600125; compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin + dihydromyricetin group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; C-activation of caspase-9 and caspase-3 induced by co-treatment with dihydromyricetin and carboplatin was inhibited by SIRT1 plasmid and SP600125; compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin + dihydromyricetin group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; D-apoptosis of A375-R cells induced by co-treatment with dihydromyricetin and carboplatin was inhibited by SIRT1 plasmid and SP600125; compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with carboplatin + dihydromyricetin group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

耐药性的机制是其能抑制 SIRT1 的表达。另外, SIRT1 的强制表达能明显抑制卡铂联合二氢杨梅素诱导的 JNK 的磷酸化,表明 JNK 是 SIRT1 的下游信号分子。二氢杨梅素通过抑制卡铂耐药恶性黑色素瘤细胞中 SIRT1 的表达,促进卡铂对 JNK 的活化,最后使肿瘤细胞发生 caspases 依赖的凋亡。

综上所述,本研究证明了二氢杨梅素能通过 SIRT1/JNK 途径提高耐药恶性黑色素瘤细胞对卡铂的敏感性。这些研究为提高恶性黑色素瘤的化疗疗效提供了新的策略和思路。

## REFERENCES

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] HE J, TIAN N, WANG J, et al. miR-185 enhances the inhibition of proliferation and migration induced by ionizing radiation in melanoma [J]. Oncol Lett, 2017, 13(4): 2442-2448.
- [3] LIM S Y, MENZIES A M, RIZOS H. Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma [J]. Cancer, 2017, 123(S11): 2118-2129.
- [4] WILLMES C, KUMAR R, UGUREL S, et al. SERPINB1 expression is predictive for sensitivity and outcome of cisplatin-based chemotherapy in melanoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 10117-10132.
- [5] SATO Y, UHARA H, OKUYAMA R, et al. Combination chemotherapy of carboplatin and paclitaxel for metastatic melanoma [J]. J Dermatol, 2013, 40(12): 1050-1051.
- [6] LEE C K, JUNG M, SHIN S J, et al. Results of a phase II study to evaluate the efficacy of docetaxel and carboplatin in metastatic malignant melanoma patients who failed first-line therapy containing dacarbazine [J]. Cancer Res Treat, 2015, 47(4): 781-789.
- [7] BARGHOUT S H, ZEPEDA N, FU Y, et al. RUNX3 contributes to carboplatin resistance in epithelial ovarian cancer cells [J]. Gynecol Oncol, 2015, 138(3): 647-655.
- [8] LUM E, VIGLIOTTI M, LUCITO R, et al. Loss of DOK2 induces carboplatin resistance in ovarian cancer via suppression of apoptosis [J]. Gynecol Oncol, 2013, 130(2): 369-376.
- [9] WANG J L, YAN X Y, LI C Y. Formula study on gastric-retention tablets of dihydromyricetin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(2): 182-186.
- [10] WANG Z, SUN X, LI Q, et al. Dihydromyricetin reverses MRP2-mediated MDR and enhances anticancer activity induced by oxaliplatin in colorectal cancer cells [J]. Anticancer Drugs, 2017, 28(3): 281-288.
- [11] ZHANG J G, HONG D F, ZHAO G, et al. Sirtuin 1 facilitates chemoresistance of pancreatic cancer cells by regulating adaptive response to chemotherapy-induced stress [J]. Cancer Sci, 2014, 105(4): 445-454.
- [12] LI H Y, ZHANG J, YE Z M, et al. Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1604.
- [13] ZHOU D Z, SUN H Y, ZHONG Z J, et al. Dihydromyricetin induces apoptosis and cytoprotective autophagy through ROS-NF- $\kappa$ B signalling in human melanoma cells [J]. Free Radic Res, 2017, 51(5): 517-528.
- [14] XU Y, WANG S, CHEN M, et al. Dihydromyricetin induces apoptosis and reverses drug resistance in ovarian cancer cells by p53-mediated downregulation of survivin [J]. Sci Rep, 2017(7): 46060.
- [15] HWANG H, BISWAS R, AHN J C, et al. Modulation of EGFR and ROS induced cytochrome c release by combination of photodynamic therapy and carboplatin in human cultured head and neck cancer cells and tumor xenograft in nude mice [J]. J Photochem Photobiol B, 2013(128): 70-77.
- [16] YE Z, FANG B, CAO Z, et al. miR-138 suppresses the proliferation, metastasis and autophagy of non-small cell lung cancer by targeting Sirt1 [J]. Oncol Rep, 2017, 37(6): 3244-3252.
- [17] JIN J, CHU Z, YANG Y, et al. SIRT1 promotes the proliferation and metastasis of human pancreatic cancer cells [J]. Tumour Biol, 2017, 39(3): 1010428317691180.
- [18] TIAN S, GUO X, JIANG J, et al. miR-138-5p suppresses autophagy in pancreatic cancer by targeting SIRT1 [J]. Oncotarget, 2017, 8(7): 11071-11082.
- [19] ZHANG S, HUANG S, ZOU X, et al. Co-ordinated overexpression of SIRT1 and STAT3 is associated with poor survival outcome in gastric cancer patients [J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 18848-18860.
- [20] SHUANG T, WANG M, SHI C, et al. Over-expression of Sirt1 contributes to chemoresistance and indicates poor prognosis in serous epithelial ovarian cancer (EOC) [J]. Med Oncol, 2015, 32(12): 260. Doi: 10.1007/s12032-015-0706-8.
- [21] ZHANG T, RONG N, ZHANG W, et al. SIRT1 expression is associated with the chemotherapy response and prognosis of patients with advanced NSCLC [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79162.
- [22] CHENG Y, TAKEUCHI H, SUZUMURA A, et al. Sirtuin 1 attenuates oxidative stress via upregulation of superoxide dismutase 2 and catalase in astrocytes [J]. J Neuroimmunol, 2014, 269(1/2): 38-43.
- [23] JIAN K L, ZHANG C, KONG L Y, et al. Eucalrobosone C suppresses cell proliferation and induces ROS-dependent mitochondrial apoptosis via the p38 MAPK pathway in hepatocellular carcinoma cells [J]. Phytomedicine, 2017(25): 71-82.
- [24] ZHANG L, FANG Y, JIN D Y, et al. Moscatilin induces apoptosis of pancreatic cancer cells via reactive oxygen species and the JNK/SAPK pathway [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(3): 1195-1203.
- [25] XIANG Y, YE W, ZHOU M, et al. Brusatol inhibits growth and induces apoptosis in pancreatic cancer cells via JNK/p38 MAPK/NF- $\kappa$ B/Stat3/Bcl-2 signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 487(4): 820-826.

收稿日期: 2017-06-15

(本文责编: 曹粤锋)