

十种苯丙氨酸衍生物对小鼠黑色素瘤细胞系B16的作用研究

陈冉^{1,2} 闫春玲^{1,2} 王彬彬^{1,2} 闫文娟^{1,2} 王书佩^{1,2} 徐存拴^{1,2*}

(¹河南师范大学生命科学学院, 新乡453007;

²河南省-科技部共建细胞分化调控国家重点实验室培育基地, 新乡453007)

摘要 该文研究了十种苯丙氨酸(Phe)的对位衍生物Fp、Clp、Bp、Ip、Ap、Np、Sp、Mp、Pp、Cp对小鼠黑色素瘤细胞系B16的细胞毒性、诱导细胞凋亡作用和抑制细胞成集落作用。结果表明, 它们的细胞毒性大小依次为Pp、Fp、Mp、Ip、Sp、Ap、Bp。其中Mp和Ip的毒性相近, Sp和Ap的毒性相近。它们诱导细胞凋亡的作用强弱依次为Fp、Mp、Ip。其中Mp和Ip的作用相近。它们抑制细胞成集落的作用大小依次为Pp、Fp、Ip、Mp、Sp、Bp、Np、Ap。其中Pp、Fp、Ip、Mp的作用相近, Sp、Bp、Np的作用相近。初步的细胞毒理分析表明, Fp、Mp、Ip能够诱导B16细胞凋亡和抑制B16细胞形成集落。

关键词 苯丙氨酸衍生物; 小鼠黑色素瘤细胞系B16; 细胞毒性(IC₅₀); 细胞凋亡; 细胞成集落

氨基酸及其衍生物有重要的生理作用, 在抗菌、抗肿瘤、食品、农业、化妆品等领域得到广泛的应用^[1-4]。其中, L-苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)是人体的必需氨基酸, 是动物营养补充剂、氨基酸输液、高强度甜味剂等的主要成分, 是合成抗癌、抗病毒药物等的原料^[5]。正常情况下, 机体摄入的50% Phe被苯丙氨酸羟化酶催化形成酪氨酸, 进一步被酪氨酸羟化酶催化形成多巴, 被酪氨酸羟化酶与多巴脱羧酶催化形成多巴胺, 被多巴胺β-羟化酶催化形成去甲肾上腺素、被苯乙胺-N-甲基转移酶催化形成肾上腺素及黑色素等。Eagle^[6]发现, 恶性肿瘤细胞需要的苯丙氨酸量是正常细胞的3~3.5倍。从肿瘤细胞Macnor-256的培养液中去掉L-苯丙氨酸时, 细胞生长受到严重抑制, 说明L-苯丙氨酸对正常细胞和肿瘤细胞生长均极其重要。Mishra等^[7]的研究表明, L-苯丙氨酸的磷酸衍生物L-4-磷酸基-苯丙氨酸(L-4-phosphoric acid-phenylalanine, Pp)是许多酪氨酸磷酸酶的底物, 能使癌细胞生长停止在细胞周期的S期。L-4-氟苯丙氨酸(L-4-fluoro-phenylalanine, Fp)是人体一些羟化酶的抑制剂, 具有抗肿瘤作用^[8-10]。苯丙氨酸还有许多其他衍生物, 如: L-4-溴、碘、氨基、硝基、磺酸基、甲氧基、氰基-苯丙氨酸等的生物学作用如何, 值得深入研究。为此, 在对苯丙氨酸的L-4-氟、氯、溴、碘、氨基、硝基、磺酸基、

甲氧基、氰基、磷酸基-苯丙氨酸等十种衍生物的IC₅₀研究工作的基础上^[11-12], 进一步以小鼠黑色素瘤细胞系B16为靶细胞, 检测了上述十种苯丙氨酸衍生物的B16细胞毒性、毒理和成集落抑制作用, 现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养

小鼠黑色素瘤细胞系B16从北京协和细胞资源中心购买。将细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中, 置于37℃、饱和湿度、5% CO₂的培养箱中培养, 培养基为含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基。取刚汇合生长的细胞进行传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2 试剂及药品

L-4-溴苯丙氨酸(Bp)、L-4-碘苯丙氨酸(Ip)、L-4-磷酸基-苯丙氨酸(Pp)、L-4-氨基-苯丙氨酸(Ap)、L-4-硝基-苯丙氨酸(Np)、L-4-磺酸基-苯丙氨酸(Sp)等由本实验室合成, 纯度99%。L-4-氟苯丙氨酸(Fp)、L-4-氯苯丙氨酸(Cl p)、L-4-甲氧基-苯丙氨酸(Mp)、L-4-氰基-苯丙氨酸(Cp)购自上海瀚鸿化工科技有限公司。

收稿日期: 2012-02-09 接受日期: 2012-03-09

国家973项目前期研究专项(No.2010CB534905)资助项目

*通讯作者。Tel: 0373-3326001, E-mail: xucs@x263.net

1.3 十种苯丙氨酸衍生物的配制

按表1称量达到IC50^[11-12]量的药品, 溶于培养

基中, 调pH(7.3±0.1), 0.22 μm滤器过滤除菌, 保存于4 °C备用。

表1 配制苯丙氨酸的十种衍生物IC50浓度表
Table 1 The IC50 concentration of ten kinds of phenylalanine derivatives

药品 Drug	分子量(kDa) Molecular weight(kDa)	浓度(mmol/L) Concentration (mmol/L)	配量(mL) Volume(mL)	加药品量(g) Quality(g)	pH (7.3±0.1)
Fp	183	0.9	50	0.008	7.25
Clp	200	0.85	50	0.009	7.22
Bp	244	3	50	0.037	7.31
Ip	291	4.7	50	0.068	7.28
Ap	180	16	50	0.144	7.25
Np	210	3.8	50	0.04	7.24
Sp	195	24	50	0.234	7.22
Mp	245	70	50	0.858	7.19
Cp	190	4	50	0.038	7.26
Pp	261	43	50	0.561	7.23

1.4 细胞活性检测

用0.25%胰蛋白酶消化处于对数生长期的B16细胞, 将细胞稀释至4×10⁴/mL, 接种于96孔培养板中, 每孔100 μL, 置37 °C、饱和湿度、5% CO₂中培养24 h。然后吸去培养基, 分别加入200 μL含0.9, 0.85, 3, 4.7, 16, 3.8, 24, 70, 4, 43 mmol/L的Fp、Clp、Bp、Ip、Ap、Np、Sp、Mp、Cp、Pp的培养基, 每个实验重复3次。同时, 设置不加药物的对照组和不接种细胞的调零组。经药物处理24, 48, 72, 96, 120 h时, 加入MTT使其最终浓度达0.5 mg/mL, 置37 °C、饱和湿度、5% CO₂的培养箱中继续培养4 h。彻底弃去各培养孔中液体后, 每孔加入100 μL DMSO, 轻轻震荡, 使沉淀充分溶解。用波长490 nm的酶标仪测定每孔吸光度^[13]。

1.5 细胞凋亡检测

在24孔板中每孔放置一个圆盖玻片。取对数生长期的细胞, 每孔1×10⁴细胞, 于37 °C、饱和湿度、5% CO₂的培养箱中培养24 h。然后, 吸去培养基, 换上1 mL分别含上述1.3的十种苯丙氨酸衍生物的培养基, 每个实验重复3次。同时, 设置不加药物的对照组。于药物处理24, 48, 72, 96, 120 h时, 取出盖玻片, 固定液固定10 min, Hoechst33258染色5 min, PBS洗涤5次。封片后, 于荧光显微镜下观察、计数凋亡细胞数。

1.6 细胞成集落实验

取4 g甲基纤维素溶于100 mL双蒸水中, 108 °C

高压20 min, 然后加入等体积的2×DMEM高糖培养基, 4 °C搅拌过夜, 配制成2%的甲基纤维素半固体培养基。将1.5 mL该溶液和1.5 mL含300细胞/mL、上述1.3的十种苯丙氨酸衍生物、20%胎牛血清的培养基混合, 加入直径3 cm的培养皿中, 3 mL/培养皿, 每个实验重复3次。同时, 设置不加药物的对照组。于37 °C、饱和湿度、5% CO₂中培养10 d, 于显微镜下观察、计数克隆^[14-16]。

1.7 统计学分析

将上述数据输入Excel表里, 用Excel软件作图、作表和求平均值, 用DPS统计软件对实验组和对照组资料进行t检验, P<0.05时, 表明有显著差异, P<0.01时, 表明有极显著差异。

2 结果

2.1 十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞活性的影响

用十种苯丙氨酸衍生物处理B16细胞发现, 在IC50浓度下, L-4-磷酸基-苯丙氨酸(Pp)处理48 h时细胞全部死亡, L-4-氟苯丙氨酸(Fp)处理72 h时细胞全部死亡, L-4-溴苯丙氨酸(Bp)、L-4-碘苯丙氨酸(Ip)、L-4-磺酸基-苯丙氨酸(Sp)、L-4-甲氧基-苯丙氨酸(Mp)处理48 h时细胞生长受到抑制, L-4-氨基-苯丙氨酸(Ap) 处理96 h时细胞活性才与对照有差异。在L-4-氯苯丙氨酸(Cl p)、L-4-氰基-苯丙氨酸(Cp)、L-4-硝基-苯丙氨酸(Np)等处理的任何时间内, 细胞活性与对照未显示差异(表2)。

表2 十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞活性的影响(D)
Table 2 The B16 vitality effected by ten kinds of phenylalanine derivatives(D)

药品名称 Drug	处理时间 Time				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Control	0.192±0.016	0.372±0.003	0.552±0.008	0.761±0.011	0.737±0.014
Fp	0.181±0.011	0.214±0.026	0.057±0.003	0.107±0.005	0.070±0.004
Clp	0.208±0.022	0.397±0.014	0.535±0.016	0.799±0.016	0.715±0.002
Bp	0.223±0.031	0.324±0.013	0.443±0.012	0.543±0.012	0.675±0.002
Ip	0.216±0.016	0.340±0.006	0.448±0.017	0.541±0.014	0.391±0.045
Ap	0.202±0.011	0.314±0.015	0.496±0.018	0.613±0.014	0.467±0.014
Np	0.221±0.003	0.410±0.004	0.602±0.024	0.709±0.032	0.783±0.017
Sp	0.199±0.002	0.267±0.008	0.363±0.007	0.438±0.003	0.468±0.009
Mp	0.194±0.029	0.243±0.003	0.301±0.009	0.320±0.014	0.389±0.013
Pp	0.147±0.009	0.073±0.005	0.062±0.011	0.117±0.007	0.136±0.003
Cp	0.234±0.006	0.438±0.005	0.676±0.021	0.799±0.011	0.718±0.028

2.2 十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞凋亡的诱导作用

用Hoechst染色方法检测十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞凋亡的诱导作用表明, Fp、Ip、Mp处理B16细胞24 h后, 细胞密度明显低于对照, 染色质明显浓染、边缘化, 有凋亡小体出现, 细胞有明显的凋亡特征。Pp处理细胞24 h后, 细胞尚未有明显的凋亡特征, 到48 h时, 细胞即全部死亡。在Bp、Sp、Ap处理的24~120 h范围内, 细胞的密度均低于对照, 表明Bp、Sp、Ap抑制细胞生长, 但并不引起细胞凋亡。Clp、Cp、Np等处理的任何时间内, 细胞形态与对照没有明显差异(表3和图1)。

表3 十种苯丙氨酸衍生物诱导B16细胞的凋亡率(%)
Table 3 The B16 apoptosis rate induced by 10 kinds of phenylalanine derivatives(%)

药品名称 Drug	处理时间 Time				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Control	3	3	2	1	3
Fp	42	55	60	75	100
Clp	20	5	5	4	3
Bp	25	20	10	8	6
Ip	50	33	34	60	70
Ap	18	10	7	6	3
Np	13	9	8	4	4
Sp	15	10	23	14	10
Mp	33	20	26	30	45
Pp	100	100	100	100	100
Cp	13	8	4	4	3

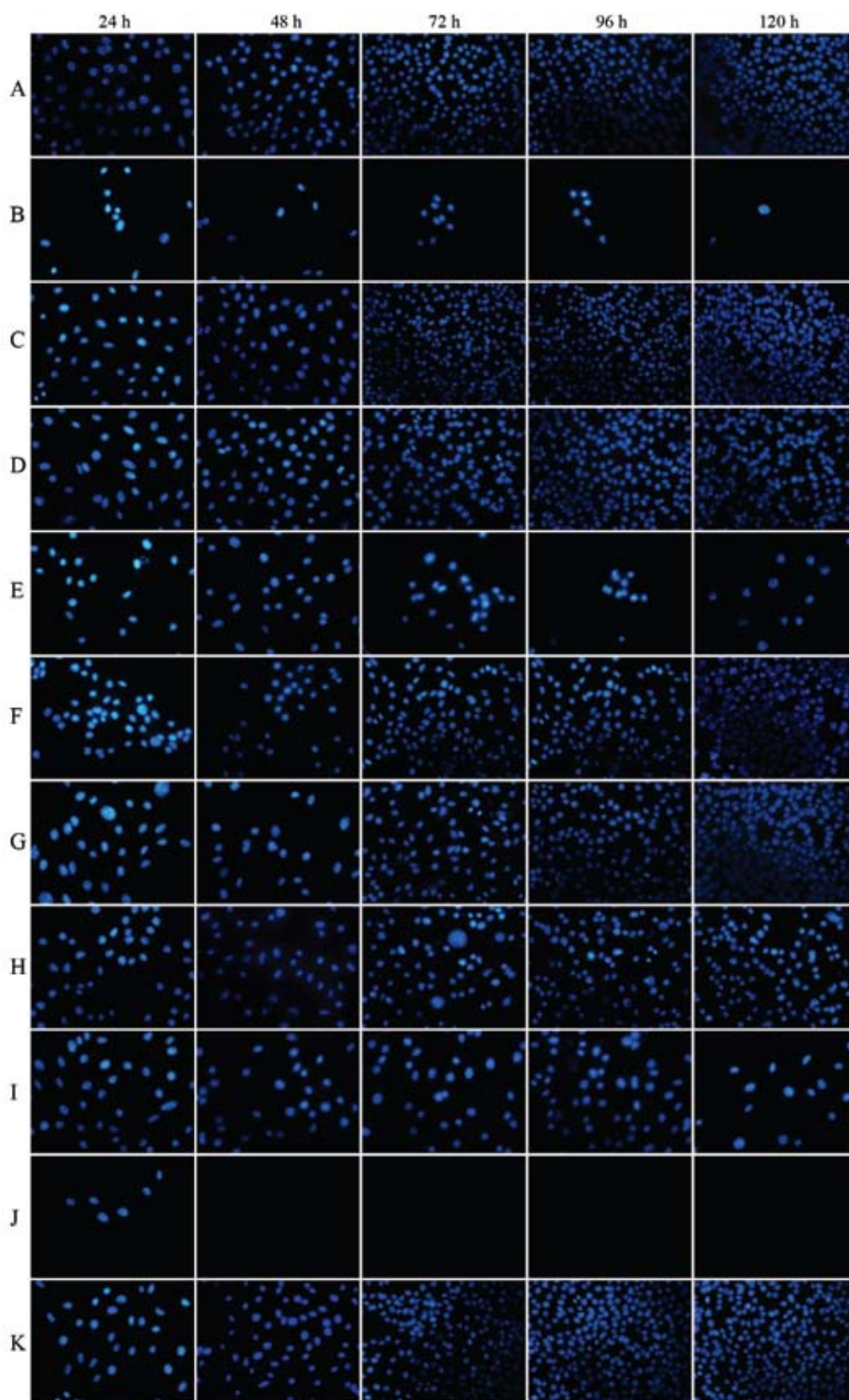
2.3 十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞成集落率的影响

用细胞集落形成方法检测十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞成集落的影响表明, 药物处理11 d时, 对照组细胞折光性强, 成团生长, 成集落率为11.2%克隆。Clp处理后, 细胞成集落率与对照相似。Cp和Ap处理后, 细胞的成集落率分别为10%和6.6%。Bp、Sp、Np处理后, 细胞形成的集落小, 成集落率低, 约为3.6%。而Ip、Pp、Fp、Mp处理后, 未见有集落形成(图2)。

3 讨论

研究表明, 苯丙氨酸(Phe)及其衍生物, 如L-4-磷酸基-苯丙氨酸(Pp)、L-4-氟苯丙氨酸(Fp)、L-4-氯苯丙氨酸(Cl p)等有重要的生物学作用。本文在检测了苯丙氨酸的L-4-溴、碘、氨基、硝基、磺酸基、甲氧基、氰基等十种衍生物的IC50^[11-12]基础上, 进一步以小鼠黑色素瘤细胞系B16为靶细胞, 检测了上述十种苯丙氨酸衍生物的毒性、毒理和对细胞成集落的抑制作用。

其中, L-4-磷酸基-苯丙氨酸(Pp)处理B16细胞48 h时, 细胞全部死亡。L-4-氟苯丙氨酸(Fp)处理细胞72 h时, 细胞才全部死亡, 说明细胞毒性Pp>Fp。L-4-溴苯丙氨酸(Bp)、L-4-磺酸基-苯丙氨酸(Sp)、L-4-氨基-苯丙氨酸(Ap)、L-4-碘苯丙氨酸(Ip)、L-4-甲氧基-苯丙氨酸(Mp)处理细胞120 h时, 细胞活性分别为对照的91.59%、63.50%、63.36%、53.05%和

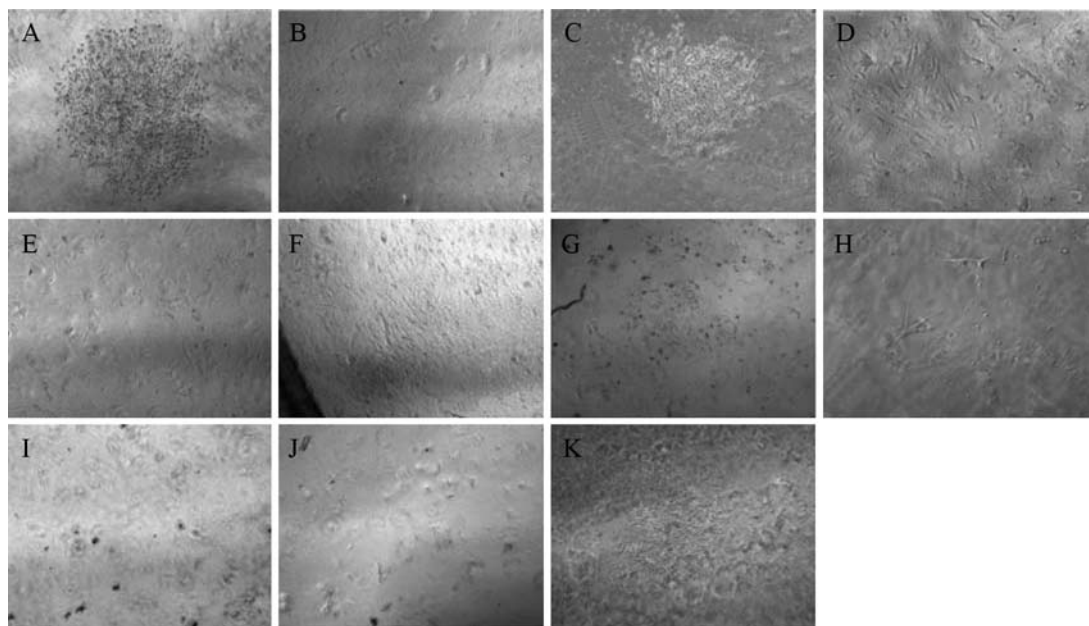


A: 对照; B: Fp; C: Clp; D: Bp; E: Ip; F: Ap; G: Np; H: Sp; I: Mp; J: Pp; K: Cp。

A: control; B: Fp; C: Clp; D: Bp; E: Ip; F: Ap; G: Np; H: Sp; I: Mp; J: Pp; K: Cp.

图1 十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞凋亡的影响(400×)

Fig.1 The B16 apoptosis effected by ten kinds of phenylalanine derivatives(400×)



A: 对照; B: Fp; C: Clp; D: Bp; E: Ip; F: Ap; G: Np; H: Sp; I: Mp; J: Pp; K: Cp. D、G、H的放大倍数为100倍, 其余为40倍。

A: control; B: Fp; C: Clp; D: Bp; E: Ip; F: Ap; G: Np; H: Sp; I: Mp; J: Pp; K: Cp. D, G, H: 100-fold amplification; A, B, C, E, F, I, J, K: 40-fold amplification.

图2 十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞成集落率的影响

Fig.2 The rate of B16 colony formation of cells effected by ten kinds of phenylalanine derivatives

52.78%。L-4-氯苯丙氨酸(Clp)、L-4-氰基-苯丙氨酸(Cp)、L-4-硝基-苯丙氨酸(Np)处理120 h时细胞活性与对照无差异。上述结果表明, 它们的细胞毒性大小依次为Pp、Fp、Mp、Ip、Sp、Ap、Bp。其中Mp和Ip的毒性相近, Sp和Ap的毒性相近。研究表明, Pp是许多酪氨酸磷酸酶的抑制剂, 能有效抑制细胞生存^[7]。而Sp和Np虽然也属于酪氨酸酯, 但不一定能像酪氨酸磷酸酯那样抑制磷酸酶活性, 因而, 它们的细胞毒性小于Pp。氨基是许多生物分子的活性基团, 而硝基则次之, 这可能是造成Ap的细胞毒性大于Np的原因。Fp是酪氨酸羟基的卤代物, 有抑制一些羟化酶的作用, 也能有效抑制细胞生存^[8-10]。Ip、Bp和Clp虽然也属于卤族元素, 但它们的电负性远小于氟, 因而它们的细胞毒性小于Fp。研究表明, Ip是甲状腺素类似物, 具有抑制甲状腺素的作用。Clp是促黄体激素释放激素(LHRH)的拮抗物^[17], 能抑制促黄体激素释放激素释放。甲状腺素为细胞生存所必需, 但B16细胞培养中不一定涉及LHRH的作用。这可能是造成Ip的细胞毒性大于Bp和Clp、Bp大于Clp的原因。相比之下, Fp的细胞毒性高于Mp可能与前者的极性大于后者有关。Cp的细胞毒性较低可能与以氰基作活性基团的生物分子较少有关。

用Hoechst染色方法检测上述十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞凋亡的诱导作用表明, 在IC₅₀浓度下^[11-12], 用Pp处理细胞48 h细胞全部死亡, 不过未表现出凋亡特征。分别用Fp、Ip、Mp处理细胞24 h, 细胞表现出凋亡特征, 到120 h大部分细胞凋亡。分别用Bp、Ap、Sp处理细胞120 h时, 细胞密度低于对照, 但未出现凋亡迹象。分别用Clp、Np、Cp处理细胞120 h时, 处理细胞与对照细胞无明显差异。上述结果表明, 它们诱导细胞凋亡的作用强弱依次为Fp、Mp、Ip。其中Mp和Ip的作用相近。比较十种苯丙氨酸衍生物的B16毒性和诱导细胞凋亡作用发现, 细胞毒性大小依次为Pp、Fp、Mp、Ip, 其中Mp和Ip的毒性相近, 诱导细胞凋亡作用Fp、Mp、Ip, 说明Fp、Mp、Ip的细胞毒性是通过诱导细胞凋亡实现的, 而Pp的细胞毒性不是通过诱导细胞凋亡实现。由于Hoechst染色方法主要检测细胞核凋亡途径^[18], 因此, Fp、Mp、Ip可能通过细胞核途径诱导细胞凋亡。Clp、Cp和Np三者既未表现出细胞毒性又未显示诱导细胞凋亡作用。

用细胞集落形成方法检测上述十种苯丙氨酸衍生物对B16细胞成集落率的影响表明, 在IC₅₀浓度下^[11-12], Clp处理组的细胞成集落率与对照(11.2%)

相似。Cp和Ap处理组的细胞成集落率分别为10%和6.6%。Bp、Sp、Np处理后,细胞形成的集落小,成集落率低,约为3.6%。而Ip、Pp、Fp、Mp处理组未见有集落形成。上述结果表明,抑制细胞成集落的作用大小依次为Pp、Fp、Ip、Mp、Sp、Bp、Np、Ap。其中Pp、Fp、Ip、Mp的作用相近,Sp、Bp、Np的作用相近。比较十种苯丙氨酸衍生物的B16细胞毒性、诱导细胞凋亡和抑制细胞成集落作用发现,Fp、Mp、Ip的B16毒性、诱导细胞凋亡和抑制细胞成集落作用一致,说明上述三者可能通过影响细胞表面成分诱导细胞凋亡^[19]。Clp和Cp二者既未表现出细胞毒性又未显示诱导细胞凋亡作用和抑制细胞成集落作用。相反,Ap、Bp和Np在细胞毒性、诱导细胞凋亡作用和抑制细胞成集落作用三方面显示出了差异,其本质有待进一步研究。

综上所述,上述十种苯丙氨酸衍生物的B16细胞毒性大小依次为Pp、Fp、Mp、Ip、Sp、Ap、Bp。其中Mp和Ip的毒性相近,Sp和Ap的毒性相近。它们诱导细胞凋亡的作用强弱依次为Fp、Mp、Ip。其中Mp和Ip的作用相近。它们抑制细胞成集落的作用大小依次为Pp、Fp、Ip、Mp、Sp、Bp、Np、Ap。其中Pp、Fp、Ip、Mp的作用相近,Sp、Bp、Np的作用相近。Fp、Mp、Ip可能通过细胞核途径诱导细胞凋亡进而抑制B16细胞形成集落。Ap、Bp和Np在细胞毒性、诱导细胞凋亡和抑制细胞成集落等方面的作用不同,Clp和Cp的作用与对照没区别。

参考文献 (References)

- 1 史应武, 娄 恺, 李 春. ϵ -聚赖氨酸的生物合成与降解及其应用研究进展. 中国农业科学(Shi Yingwu, Lou Kai, Li Chun. Advance in research on ϵ -polylysine biosynthesis and its degradation and application. Scientia Agricultura Sinica) 2009; 42(3): 1009-15.
- 2 姜凤超, 刘剑敏, 成冲云, 葛燕丽. β -锗代 α -氨基酸衍生物的合成、抗肿瘤活性及构效关系研究. 中南药学(Jiang Fengchao, Liu Jianmin, Cheng Chongyun, Ge Yanli. Synthesis, antitumor activity and QSAR of β -germanyl- α -amino acid sesquioxide derivatives. Central South Pharmacy) 2006; 4(1): 3-11.
- 3 廖 兰, 赵谋明, 崔 春. 肽与氨基酸对食品滋味贡献的研究进展. 食品与发酵工业(Liao Lan, Zhao Mouming, Cui Chun. Review on the taste of peptides and amino acids to foodstuffs. Food and Fermentation Industries) 2009; 35(12): 107-13.
- 4 Aslam M, Travis RL, Rains DW. Differential effect of amino acids on nitrate uptake and reduction systems in barley roots. Plant Science 2001; 160(2): 219-28.
- 5 杨顺楷. L-苯丙氨酸酶法生产新工艺. 精细与专用化学品(Yang Shunkai. A novel enzymatic process for L-phenylalanine. Fine and Specialty Chemicals) 2001; 9(2): 18-9.
- 6 Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 1955; 122(3168): 501-14.
- 7 Mishra S, Hamburger AW. O-phospho-L-tyrosine inhibits cellular growth by activating protein tyrosine phosphatases. Cancer Res 1993; 53(3): 557-63.
- 8 于文胜, 梁远军, 刘克良, 赵玉芬. 卤代苯丙氨酸衍生物的合成与拆分. 高等学校化学学报(Yu Wensheng, Liang Yuanjun, Liu Kelian, Zhao Yufen. Synthesis and resolution of phenylalanine analogues substituted by halogen. Chemical Journal of Chinese Universities) 2002; 23(7): 1314-7.
- 9 Maier P, Tornieporth IC. Antitumor activity of titanocene amino acid complexes. Biometals 1996; 9(3): 267-71.
- 10 Minecra K, Shioya H, Kowada M, Uemura K. Tumor extent of slowly progressive oligodendroglioma determined by 18F-fluorophenylalanine positron emission tomography. Eur J Radiol 1997; 25(1): 30-5.
- 11 张春艳. L-4-氟苯丙氨酸等6种氨基酸衍生物的生物学作用研究. 河南: 河南师范大学(Zhang Chunyan. The biological effects of L-4-fluorophenyl alanine and other 5 kinds of amino acid derivatives. Henan: Henan Normal University), 2011.
- 12 杨 莹. L-硝基-4-苯丙氨酸等四种氨基酸衍生物的生物学活性检测. 河南: 河南师范大学(Yang Ying. The biological active detection of 4-nitro-L-phenylalanine and other four amino acid derivatives. Henan: Henan Normal University), 2011.
- 13 张 春, 赵学梅, 周 丽, 牛英才, 刘吉成. MTT法测定低分子姬松茸多糖体外抗肿瘤活性. 齐齐哈尔医学院学报(Zhang Chun, Zhao Xuemei, Zhou Li, Niu Yingcai, Liu Jicheng. Detecting the anticancer effects of LMPAB by MTT technique *in vitro*. Journal of Qiqihar Medical College) 2009; 30(1): 1-2.
- 14 谢 斌, 左 莉, 江志奎, 徐大林, 朱华庆, 周 青, 等. 全反式维甲酸诱导HepG2细胞分化和降低软琼脂克隆形成. 安徽医科大学学报(Xie Bin, Zuo Li, Jang Zhikui, Xu Dalin, Zhu Huaqing, Zhou Qing, *et al.* Differentiation induced and colony formation breakdown in HepG2 cells treated with all-trans-retinoic acid. Acta Universitatis Medicinalis Anhui) 2007; 42(2): 143-6.
- 15 Dou J, Pan M, Wen P, Li Y, Tang Q, Chu L, *et al.* Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines. Cell Mol Immunol 2009; 4(6): 467-72.
- 16 Zhu BH, Yao ZX, Luo SJ, Jiang LM, Xiao JW, Liu SC, *et al.* Effects of antisense oligonucleotides of PKC- α on proliferation and apoptosis of HepG2 *in vitro*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2005; 4(1): 75-9.
- 17 Csaikl F, Reimer G, Csaikl U. Aminoacylase-1 isoenzymes: A comparative study. Heredity 1986; 56(2): 157-60.
- 18 Wang S, Zhong Y, Guan Z, Wang W, Liao S. Continual and quantitative analysis of cellular apoptosis by electron and fluorescence microscope. J Peking Univ (Health Sci) 2003; 35(1): 91-3.
- 19 刘芳莉, 于 畅, 傅松滨. 三种不同生物学特性细胞在软琼脂中的生长表型分析. 中国肺癌杂志(Liu Fangli, Yu Yang, Fu Songbin. The morphous analyses of three different characteristics cells growing in soft agar. Chinese Journal of Lung Cancer) 2008; 1(11): 51-4.

The Effects of Ten Kinds of Phenylalanine Derivatives on Mouse Melanoma Cell Line B16

Chen Ran^{1,2}, Yan Chunling^{1,2}, Wang Binbin^{1,2}, Yan Wenjuan^{1,2}, Wang Shupe^{1,2}, Xu Cunshuan^{1,2*}

(¹College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; ²Key Laboratory for Cell Differentiation Regulation, Xinxiang 453007, China)

Abstract We studied the effects of 10 kinds of phenylalanine-bit derivatives on mouse melanoma cell line B16, which included cytotoxicity, induction of apoptosis and inhibition of cells into the colony. The 10 kinds of phenylalanine derivatives included Fp, Clp, Bp, Ip, Np, Sp, Pp, Ap, Mp, Cp. The results showed that the cytotoxicity of above phenylalanine derivatives to the B16 cell line was in sequence as follows: Pp, Fp, Mp, Ip, Sp, Ap, Bp. The cytotoxicity of Mp and Ip was similar, and the cytotoxicity of Sp and Bp was similar. The apoptosis-inducing activity for them were in sequence: Fp, Mp, Ip, while, the role of Mp and Ip was similar. The inhibition of cloney-forming unit arranged in a sequence: Pp, Fp, Ip, Mp, Sp, Bp, Np, Ap. The inhibition roles of Pp, Fp, Mp and Ip were similar, and that of Sp, Bp and Np were similar. Preliminarily cytotoxicity analysis showed that Fp, Mp, Ip induced B16 cell line apoptosis by cell nuclear and inhibited colony formation of cells.

Key words phenylalanine derivatives; mouse melanoma cell line B16; cytotoxicity(IC50); apoptosis; cloney-forming unit

Received: February 9, 2012 Accepted: March 9, 2012

This work was supported by the National 973 Pre-research Program of China (No.2010CB534905)

*Corresponding author. Tel: 86-373-3326001, E-mail: xucs@x263.net