

甘草次酸通过 Wnt/ β -catenin 通路抑制黑色素瘤恶性生物学行为的机制研究

李媛¹, 马冲², 马蕾¹, 王静¹, 舒春梅¹, 胡海友¹, 李娜¹

摘要 目的 探讨甘草次酸通过 Wnt/ β -连环素(β -catenin)通路抑制黑色素瘤恶性生物学行为的可能机制。方法 以黑色素瘤细胞 B16-F10 为研究对象, MTT 法进行浓度梯度试验选择 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 为细胞处理浓度, 并以顺铂 0.01 mmol/L 干预为阳性对照。采用 Transwell 小室法检测细胞侵袭及迁移能力; 免疫印迹试验(Western blot) 实验检测 B16-F10 细胞中 Wnt/ β -catenin 通路蛋白和侵袭迁移相关蛋白基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 表达水平。构建裸鼠移植瘤模型, 实验分为对照组(无药物处理)、甘草次酸组(40 mg/kg), 观察移植瘤小鼠的肿瘤组织生长情况及肿瘤组织中 Wnt/ β -catenin 通路蛋白和侵袭迁移相关蛋白表达水平。结果 MTT 结果显示, 甘草次酸以浓度依赖性方式抑制 B16-F10 细胞增殖, 当甘草次酸浓度 $\geq 2 \mu\text{mol/L}$ 时, 其对 B16-F10 细胞的增殖具有明显的抑制作用($P < 0.05$); Transwell 小室实验结果显示, 与对照组相比, 甘草次酸 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理后, B16-F10 细胞的侵袭、迁移能力明显下降($P < 0.05$); WB 实验结果显示, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 甘草次酸处理相比, 甘草次酸 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理后 B16-F10 细胞中的 MMP-9、MMP-2、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$); 荷瘤实验结果显示, 与对照组相比, 甘草次酸组小鼠肿瘤重量、体积明显下降, 瘤体组织中的 Wnt1、 β -catenin、MMP-9、MMP-2 蛋白及表达水平也明显下降($P < 0.05$)。结论 甘草次酸能够显著抑制黑色素瘤的体内外恶性生物学行为, 其机制可能是抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活来发挥作用。

关键词 甘草次酸; 黑色素瘤; 侵袭能力; 迁移能力; Wnt/ β -连环素

中图分类号 R 739.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0392-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.008

黑色素瘤是一种恶性程度较高的肿瘤, 好发于皮肤, 也可见于胃肠道等器官组织中^[1]。近年来,

中国的黑色素瘤发病率呈增加的态势, 据统计其平均年发病率增长在 3%~5%^[2]。该病极易发生早期转移、侵袭, 一旦进入快速生长期, 患者的预后极差^[3]。目前临床针对黑色素瘤的治疗方法以外科手术切除为主, 但多数患者确诊时已处于中晚期, 手术治疗效果不佳, 而术后辅助放化疗对预后的改善效果也不理想^[4]。甘草次酸是一种齐墩果烷型五环三萜化合物, 其主要从甘草中提取, 有报道指出其对肝癌^[5]、结直肠癌^[6]、乳腺癌^[7]等多种肿瘤细胞增殖具有抑制作用, 且对正常细胞的毒性较低。目前, 中国尚未见甘草次酸在治疗黑色素瘤方面的相关研究, 故该研究初步探讨了甘草次酸对黑色素瘤细胞体内外侵袭和迁移能力的影响及其可能机制, 以期为临床治疗黑色素瘤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞 黑色素瘤细胞 B16-F10 购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 实验动物 20 只鼠龄 4~5 周的 BALB/C 雌性裸鼠, 体质量 17~22 g, 购自山东大学实验动物中心[许可证号: SCXK(鲁)2019 0001]。实验过程遵循 3R 原则, 经滨州医学院附属医院科研伦理委员会批准(批号: 2019-008-20)。

1.1.3 试剂 甘草次酸购自江苏永健医药科技有限公司(CAS 号: 471-53-4; 纯度 98%; 产品编号 200459-3); 细胞培养用 10% FBS、RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; Transwell 小室及细胞培养皿购自美国 BD 公司; PVDF 膜、ECL 发光液购自美国 Millipore 公司; 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9、MMP-2、Wnt1、 β -连环蛋白(β -catenin)及 β -actin 一抗均购自英国 Abcam 公司或美国 Affinity 公司; 辣根酶标记羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥公司。

1.2 细胞培养 将黑色素瘤细胞 B16-F10 培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青/链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的加湿培养箱中

2022-11-04

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(编号: 2019WS326)

作者单位: 滨州医学院附属医院¹ 皮肤性病科、² 结直肠肛门、疝与腹壁外科 滨州 256600

作者简介: 李媛, 女, 博士研究生;

李娜, 女, 硕士, 主治医师, 责任作者, E-mail: a413041858@163.com

培养至对数期, 0.25% 胰蛋白酶消化, 每 2~3 d 换液传代。

1.3 MTT 实验 取处于对数生长期的 B16-F10 细胞接种于 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 中培养过夜, 使细胞单层铺满孔底。次日将培养好的 B16-F10 细胞分为 8 组, 实验组分别加入不同浓度甘草次酸溶液 (0、0.25、0.5、1、2、4、8、16 μmol/L)^[8], 空白对照组加入等量生理盐水, 每组设 6 个复孔, 同时以顺铂 0.01 mmol/L 作为阳性对照组。作用 24 h 后, 参考 MTT 试剂盒操作说明, 使用酶标仪检测 570 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值, 重复测定 3 次取平均值, 记录数据并计算增殖抑制率。增殖抑制率 = $1 - \text{OD}_{\text{药物组}} / \text{OD}_{\text{空白组}}$ 。

1.4 Transwell 小室法检测细胞侵袭及迁移 取 Matrigel 稀释液用移液器均匀涂抹在小室底部, 待其均匀凝固, 将对数生长期的各组细胞制成单细胞悬液, 于小室内每孔加入 1×10^5 个细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 中培养, 24 h 后取出小室, PBS 洗涤, 10% 中性甲醛溶液固定, 结晶紫染色, 在显微镜下随机选择 10 个高倍 (×200) 视野, 统计侵袭过膜的细胞数目。迁移实验则无需包被 Matrigel 胶, 小室内接种细胞, 培养 8 h 后进行染色、计数。

1.5 Western blot 实验检测蛋白表达水平 提取各组细胞培养 48 h 后的总蛋白, Bradford 调节蛋白浓度。经 SDS-PAGE 凝胶电泳、电转膜至 PVDF 膜, 密封 2 h, 分别添加 MMP-9、MMP-2、Wnt1、β-catenin 及 β-actin 一抗, 4 °C 孵育过夜, 加入 HRP 标记的二抗, 继续孵育 1 h, TBST 漂洗, ECL 发光液显色, 暗室曝光。

1.6 裸鼠移植瘤模型构建及分组给药 取处于对数生长期的 B16-F10 细胞, 生理盐水调整细胞悬液浓度至 2×10^6 /ml。将适应性饲养 1 周后的 BALB/C 裸鼠常规消毒腹部皮肤, 经其左侧上腹部皮下注入细胞悬液 100 μl。接种 1 周后, 将 20 只小鼠随机分为对照组和甘草次酸组, 10 只/组。甘草次酸组小鼠每天灌胃给予 100 μl 甘草次酸溶液, 给药剂量 40 mg/kg^[9]; 对照组予同体积生理盐水。饲养期间动态观察肿瘤生长情况, 每 5 d 用游标卡尺测量皮下移植瘤的最大长径 (a)、横径 (b), 肿瘤体积计算公式: $V = 1/2ab^2$, 绘制肿瘤生长曲线。饲养 30 d 后将所有裸鼠处死, 剥离肿瘤, 称量质量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组间比较

采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘草次酸对黑色素瘤细胞活力的影响 MTT 结果 (图 1) 显示: 用不同浓度的甘草次酸 (0.25、0.5、1、2、4、8、16 μmol/L) 处理黑色素瘤细胞 B16-F10 后, 当甘草次酸浓度 ≥ 2 μmol/L 时, 其对 B16-F10 细胞的增殖具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 见图 1。经计算, IC₅₀ 值 = 2.592, 表明根据甘草次酸以剂量依赖性方式抑制 B16-F10 细胞增殖, 后续选取 0、1、2、4 μmol/L 作为试验处理浓度。

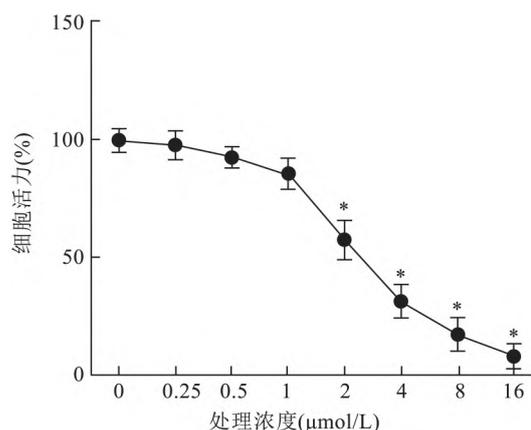


图 1 甘草次酸对黑色素瘤细胞活力的影响
与 0 μmol/L 比较: * $P < 0.05$

2.2 甘草次酸对黑色素瘤细胞侵袭的影响 Transwell 小室侵袭实验结果 (图 2) 显示: 2、4 μmol/L 甘草次酸与顺铂处理组 B16-F10 细胞的侵袭细胞数 (82.39 ± 4.24) 个/视野、(38.33 ± 3.46) 个/视野、(34.26 ± 2.09) 个/视野均明显低于 0 μmol/L 甘草次酸的 (154.68 ± 9.68) 个/视野 ($F = 816.010$, $P < 0.05$)。表明甘草次酸干预后能够抑制黑色素瘤细胞的侵袭能力。

2.3 甘草次酸对黑色素瘤细胞迁移的影响 Transwell 小室迁移实验结果 (图 3) 显示 2、4 μmol/L 甘草次酸与顺铂处理组 B16-F10 细胞的迁移细胞数 (92.00 ± 8.06) %、(59.00 ± 5.75) %、(46.00 ± 5.42) % 均明显低于 0 μmol/L 甘草次酸组 (195.00 ± 11.26) % ($F = 726.954$, $P < 0.05$)。表明甘草次酸干预后能够抑制黑色素瘤细胞的迁移能力。

2.4 甘草次酸对侵袭迁移相关蛋白表达的影响 Western blot 实验结果 (图 4) 显示: 与 0 μmol/L 相比 2、4 μmol/L 甘草次酸与顺铂处理组 B16-F10 细胞中的侵袭迁移相关蛋白 MMP-9、MMP-2 蛋白表达

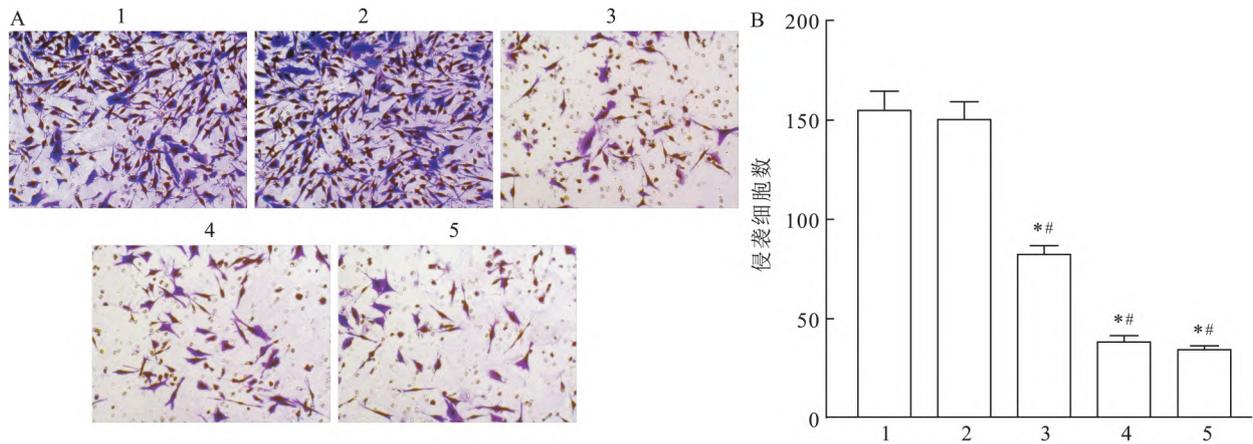


图2 甘草次酸对黑色素瘤细胞侵袭能力的影响

A: Transwell 检测黑色素瘤细胞侵袭数量 ×200; B: 黑色素瘤细胞侵袭数量统计; 1: 0 μmol/L 甘草次酸处理; 2: 1 μmol/L 甘草次酸处理; 3: 2 μmol/L 甘草次酸处理; 4: 4 μmol/L 甘草次酸处理; 5: 顺铂处理。与 0 μmol/L 甘草次酸比较: * P < 0.05; 与顺铂组比较: # P < 0.05

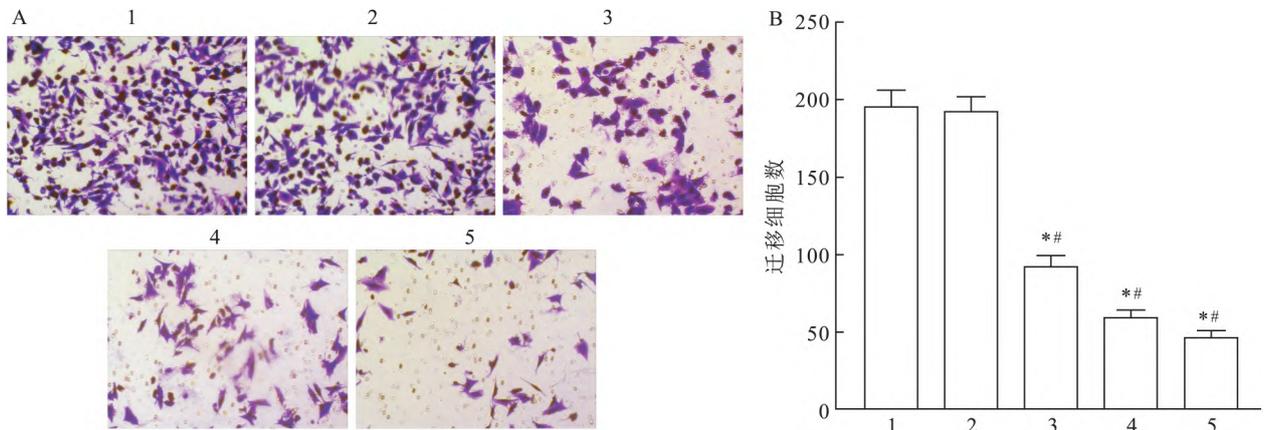


图3 甘草次酸对黑色素瘤细胞迁移能力的影响

A: Transwell 检测黑色素瘤细胞迁移数量(×200); B: 黑色素瘤细胞迁移数量统计; 1: 0 μmol/L 甘草次酸处理; 2: 1 μmol/L 甘草次酸处理; 3: 2 μmol/L 甘草次酸处理; 4: 4 μmol/L 甘草次酸处理; 5: 顺铂处理; 与 0 μmol/L 甘草次酸比较: * P < 0.05; 与顺铂组比较: # P < 0.05

水平明显下降 ($F = 320.737, 311.940, P < 0.05$)。表明甘草次酸干预后可能通过抑制侵袭迁移相关蛋白表达进而抑制黑色素瘤细胞侵袭迁移能力。

2.5 甘草次酸对 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达的影响 Western blot 实验结果(图5)显示:与 0 μmol/L 相比, 2、4 μmol/L 甘草次酸与顺铂处理组 B16-F10 细胞中的 Wnt/ β -catenin 通路蛋白 Wnt1、 β -catenin 蛋白表达水平明显下降 ($F = 116.136, 39.976, P < 0.05$)。表明甘草次酸干预可能通过抑制黑色素瘤细胞中 Wnt1、 β -catenin 蛋白表达而抑制肿瘤恶性生物学行为。

2.6 甘草次酸抑制荷瘤小鼠肿瘤生长 荷瘤实验结果(图6)显示:与对照组相比,甘草次酸组小鼠的

肿瘤重量、体积明显下降,瘤体组织中的 Wnt1、 β -catenin、MMP-9、MMP-2 蛋白及表达水平也明显下降 ($t = 17.897, 29.304, 13.347, 10.525, 25.194, 18.407, P < 0.05$)。表明甘草次酸能够在体内抑制异位移植瘤的恶性生物学行为。

3 讨论

甘草次酸是甘草的重要提取成分之一,由甘草酸水解脱去糖酸链所形成。近些年体外实验研究显示,甘草次酸细胞毒性较低,且具有抗肿瘤转移的功效^[10]。本研究将甘草次酸应用于小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 中,MTT 实验结果显示,用不同浓度的甘草次酸处理 B16-F10 细胞后,均能抑制细胞增殖

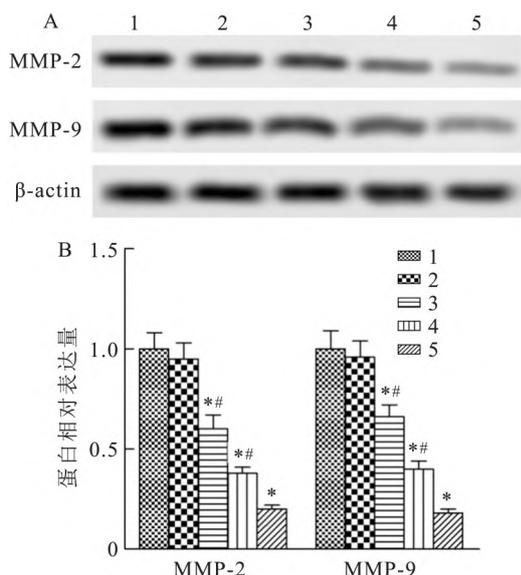


图4 甘草次酸对黑色素瘤细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

A: 甘草次酸干预后黑色素瘤细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平; B: 各组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达统计; 1: 0 μmol/L 甘草次酸处理; 2: 1 μmol/L 甘草次酸处理; 3: 2 μmol/L 甘草次酸处理; 4: 4 μmol/L 甘草次酸处理; 5: 顺铂处理; 与 0 μmol/L 甘草次酸比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$

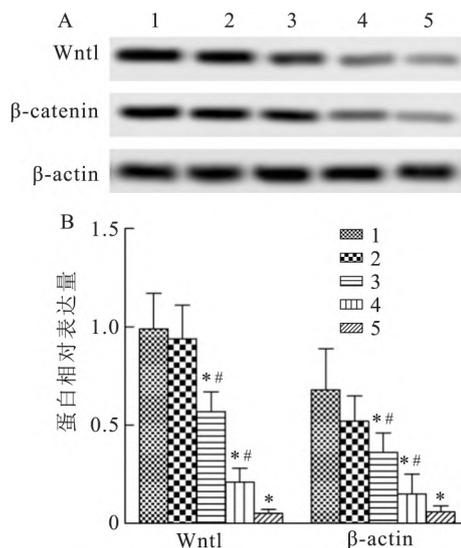


图5 甘草次酸对黑色素瘤细胞中 Wnt1、β-catenin 蛋白表达的影响

A: 甘草次酸干预后黑色素瘤细胞中 Wnt1、β-catenin 蛋白表达水平; B: 各组 Wnt1、β-catenin 蛋白表达统计; 1: 0 μmol/L 甘草次酸处理; 2: 1 μmol/L 甘草次酸处理; 3: 2 μmol/L 甘草次酸处理; 4: 4 μmol/L 甘草次酸处理; 5: 顺铂处理; 与 0 μmol/L 甘草次酸比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$

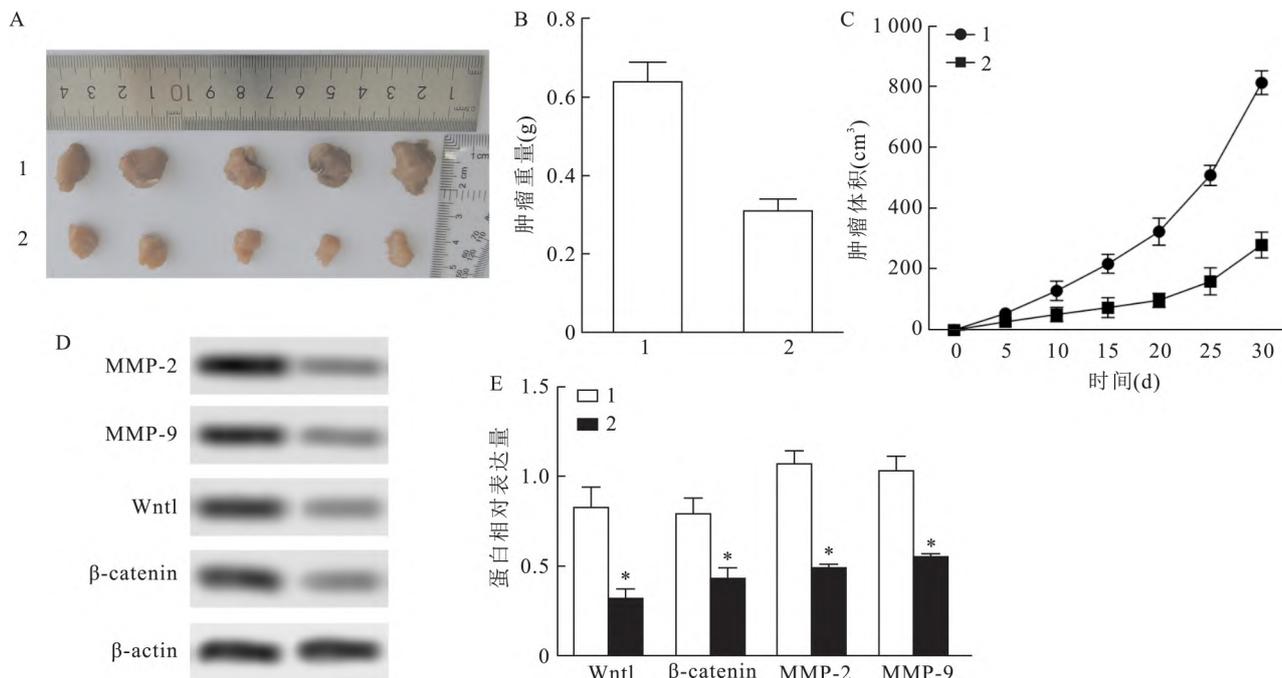


图6 甘草次酸对裸鼠移植瘤生长及 Wnt1、β-catenin、MMP-9、MMP-2 蛋白水平的影响

A: 裸鼠移植瘤; B: 甘草次酸干预后裸鼠移植瘤重量的统计; C: 甘草次酸干预后裸鼠移植瘤体积的统计; D: 各组 MMP-2、MMP-9、Wnt1、β-catenin 蛋白表达分析; E: 各组 MMP-2、MMP-9、Wnt1、β-catenin 蛋白表达统计; 1: 对照组; 2: 甘草次酸组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

活性,且随着甘草次酸浓度的增高,其增殖抑制效果差异显著,证实了甘草次酸对小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 的增殖活性具有抑制作用,提示甘草次酸

在黑色素瘤细胞中也具有抗肿瘤细胞增殖的特性,孙伟等^[11]以大肠癌 Lovo 细胞进行了不同剂量甘草次酸干预,结果与本研究一致,表明甘草次酸能够呈

浓度依赖的抑制肿瘤细胞增殖活性。基于 MTT 结果,本研究进一步选择了 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度甘草次酸进行后续体外实验。

浸润、转移至其他组织并增殖形成新的侵袭转移瘤是恶性肿瘤的一个生物学特征。为观察甘草次酸对黑色素瘤细胞体外侵袭和迁移能力的影响,本研究采用 Transwell 小室实验进行检测,结果显示,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 甘草次酸相比,2、4 $\mu\text{mol/L}$ 甘草次酸处理和顺铂处理 B16-F10 细胞的侵袭过膜的细胞数目和迁移率明显下降,提示一定浓度的甘草次酸能有效抑制细胞侵袭、迁移能力;Western blot 实验检测侵袭转移相关蛋白表达发现,经 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 甘草次酸处理后, B16-F10 细胞的 MMP-9、MMP-2 蛋白表达水平明显下降。细胞外基质和基底膜能为肿瘤细胞的恶性增殖提供微环境,而二者的降解是肿瘤侵袭、转移的关键环节。基质金属蛋白酶是现阶段已知的能降解细胞外基质的唯一酶类,其中, MMP-2 和 MMP-9 是到目前被发现唯一能够降解 IV 型胶原的 MMPs,其与破坏肿瘤细胞侵袭、转移的组织学屏障关系密切,并能促进新血管生成^[12]。MMP-2 与肿瘤细胞黏附、分离关系紧密,细胞对组织培养板的黏附能力在加入 MMP-2 抗体后得到增强。上述结果进一步证实甘草次酸能调控细胞侵袭转移相关蛋白 MMP-9、MMP-2 表达,降低小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 的体外侵袭、迁移能力。

Wnt/ β -catenin 信号通路是目前公认的一条与肿瘤密切相关的信号通路,其与肿瘤的侵袭、转移等生物学行为关系紧密^[13]。Wnt 信号通路广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中,其在成熟器官的细胞更新、组织稳态中起重要作用,而在自身免疫性疾病、骨关节病、结直肠癌等多种疾病的病理过程中, Wnt 信号通路也可能被抑制或激活,进而参与疾病的发生、发展过程^[14]。目前研究^[15]显示, Wnt/ β -catenin 信号通路在影响成黑色素细胞的发展、加速黑色素瘤的形成方面具有重要作用。本研究结果显示,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 甘草次酸相比,2、4 $\mu\text{mol/L}$ 甘草次酸和顺铂处理 B16-F10 细胞中的 Wnt/ β -catenin 通路蛋白 Wnt1、 β -catenin 蛋白表达水平明显下降,且加入 Wnt/ β -catenin 通路蛋白激活剂 LiCl 后,细胞的 Wnt1、 β -catenin 蛋白表达水平明显上升。此外,本研究还进一步构建了裸鼠移植瘤模型,观察了甘草次酸对黑色素瘤细胞体内侵袭和迁移能力的影响,发现与对照组相比,甘草次酸组小鼠的肿瘤重量、体积明显下降,瘤体组织中的 Wnt1、 β -catenin、

MMP-9、MMP-2 蛋白及表达水平也明显下降,进一步证实了甘草次酸在体内也具有抑制肿瘤侵袭和迁移的作用。上述结果提示甘草次酸可能是通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活来实现抑制黑色素瘤细胞体内外侵袭、迁移的作用。

综上所述,甘草次酸对黑色素瘤细胞体内外侵袭、迁移具有抑制作用,其机制可能是抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活来发挥作用,有助于了解甘草次酸对黑色素瘤的作用机制。然而肿瘤的生物学行为机制十分复杂,是否存在其他通路实现甘草次酸的抗肿瘤侵袭、迁移能力仍有待进一步探索。

参考文献

- [1] Eddy K, Chen S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma [J]. *Int J Mol Sci* 2020, 21(23): 8984.
- [2] 高子熙,王璐,邓心怡等. CD73 在黑色素瘤中的作用及分子机制研究 [J]. *中华整形外科杂志*, 2021, 37(8): 884-93.
- [3] Rusňák Š, Hecová L, Kasl Z, et al. Therapy of uveal melanoma: A Review. *Terapie uveálního melanomu přehled* [J]. *Cesk Slov Oftalmol* 2020, 77(1): 1-13.
- [4] Ahmed B, Qadir M I, Ghafoor S. Malignant melanoma: skin cancer-diagnosis, prevention, and treatment [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2020, 30(4): 291-7.
- [5] Wu F, Li X, Jiang B, et al. Glycyrrhetic acid functionalized nanoparticles for drug delivery to liver cancer [J]. *J Biomed Nanotechnol* 2018, 14(11): 1837-52.
- [6] Doan N Q H, Truong T N, Nguyen P T V. Molecular docking studies of glycyrrhetic acid derivatives as anti-colorectal cancer agents [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*. 2021, 17(3): 429-44.
- [7] Tang M, Yang M, He K, et al. Glycyrrhetic acid remodels the tumor microenvironment and synergizes with doxorubicin for breast cancer treatment in a murine model [J]. *Nanotechnology*, 2021, 32(18): 185702.
- [8] 梁婵婵,裴小娜,孔芳. 盐酸小檗碱对人黑色素瘤 A375-S2 细胞增殖、凋亡的影响及其机制研究 [J]. *中国药师*, 2021, 24(1): 70-4 80.
- [9] Wang X F, Zhou Q M, Lu Y Y, et al. Glycyrrhetic acid potentially suppresses breast cancer invasion and metastasis by impairing the p38 MAPK-AP1 signaling axis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(5): 577-87.
- [10] Hussain H, Green I R, Shamraiz U, et al. Therapeutic potential of glycyrrhetic acids: a patent review (2010-2017) [J]. *Expert Opin Ther Pat*. 2018, 28(5): 383-98.
- [11] 孙伟,白剑,李凤岩,等. 甘草次酸对大肠癌 LoVo 细胞增殖和侵袭的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2022, 38(1): 37-40.
- [12] Kwon Y, Park S J, Nguyen B T, et al. Multi-layered proteomic analysis unravels cancer metastasis directed by MMP-2 and focal adhesion kinase signaling [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):

- 17130.
- [13] 王天雪, 孙强, 李佳. 沉默环状 RNA PIP5K1A 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来降低口腔鳞癌细胞生长与转移[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(8): 1251-7.
- [14] Wei C Y, Zhu M X, Yang Y W, et al. Downregulation of RNF128 activates Wnt/ β -catenin signaling to induce cellular EMT and stemness via CD44 and CTTN ubiquitination in melanoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 21.
- [15] Chen H, Gao X, Sun Z, et al. REG γ accelerates melanoma formation by regulating Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *Exp Dermatol*, 2017, 26(11): 1118-24.

Mechanism of glycyrrhetic acid on inhibiting malignant biological behaviors of melanoma by Wnt/ β – catenin pathways

Li Yuan¹, Ma Chong², Ma Lei¹, Wang Jing¹, Shu Chunmei¹, Hu Haiyou¹, Li Na¹

(¹Dept of Dermatology and Venereology, ²Dept of Colorectal Anus,

Hernia and Abdominal Wall Surgery, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256600)

Abstract *Objective* To explore the possible mechanism of glycyrrhetic acid on inhibiting malignant biological behaviors of melanoma by Wnt/ β -catenin pathways. *Methods* The melanoma cells B16-F10 were selected as the research objects. The concentration gradient tests (0, 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$) were conducted by MTT. The cells given cisplatin intervention was enrolled as positive controls. The cells invasion and migration were detected by Transwell chamber assay. The expression levels of Wnt/ β -catenin pathway proteins, invasion and migration related proteins (MMP-2, MMP-9) in B16-F10 cells were detected by Western blot. The xenograft models of nude mice were constructed, and they were divided into control group (without drugs treatment) and glycyrrhetic acid group (40 mg/kg). The growth of tumor tissues, and expression levels of Wnt/ β -catenin pathway proteins, invasion and migration related proteins were observed. *Results* MTT results showed that glycyrrhetic acid could inhibit the proliferation of B16-F10 cells in a concentration-dependent manner. The inhibition effect of glycyrrhetic acid ($\geq 2 \mu\text{mol/L}$) was significant on the proliferation of B16-F10 cells ($P < 0.05$). The results of Transwell chamber assay showed that compared with control group, invasion and migration abilities of B16-F10 cells were significantly reduced after treatment with glycyrrhetic acid (2, 4 $\mu\text{mol/L}$) ($P < 0.05$). Western blot results showed that compared with those without glycyrrhetic acid treatment, expression levels of MMP-9, MMP-2, Wnt1 and β -catenin protein in B16-F10 cells significantly decreased after treatment with glycyrrhetic acid (2, 4 $\mu\text{mol/L}$) ($P < 0.05$). The results of tumor-bearing assay showed that compared with control group, weight and volume of tumors significantly decreased in glycyrrhetic acid group, and expression levels of Wnt1, β -catenin, MMP-9 and MMP-2 proteins also significantly decreased ($P < 0.05$). *Conclusion* Glycyrrhetic acid can significantly inhibit the malignant biological behaviors of melanoma *in vitro* and *in vivo*. And its mechanism may be related to inhibiting the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathways.

Key words glycyrrhetic acid; melanoma; invasion ability; migration ability; Wnt/ β -catenin