

网络出版时间:2024-04-10 15:12:08 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1011.016

华蟾素调控 PI3K/AKT 通路逆转 卵巢癌 A2780/DDP 细胞顺铂耐药的作用机制

舒美玲^{1,2}, 吴悦^{1,2}, 叶映泉^{1,2}, 张爽爽^{1,2}, 张梅^{1,2}

摘要 目的 研究华蟾素(CBG)对人卵巢癌细胞顺铂耐药的逆转作用和机制。方法 A2780 细胞株及其顺铂耐药细胞株 A2780/DDP 是临床常见的卵巢癌细胞,故选择这两种细胞株作为研究对象。通过 CCK-8 法检测细胞活力,平板克隆和 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)实验检测细胞的增殖能力,赫斯特染色(Hoechst)法观察细胞凋亡情况,细胞划痕实验和 Transwell 实验评估细胞的迁移和侵袭能力,Western blot 和定量逆转录 PCR(RT-qPCR)法检测磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶(PI3K/AKT)信号通路和上皮-间质转化(EMT)的相关蛋白和 mRNA 的表达差异。结果 与 A2780 细胞相比, A2780/DDP 细胞的耐药指数分别约为 5.636、5.864、5.695,采用 CBG(2、4、6 mg/ml)处理 A2780/DDP 耐药细胞后,逆转耐药指数分别为 1.617、2.570、3.461。CBG 呈浓度依赖性地上调细胞凋亡水平、抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力($P < 0.05$)。Western blot 结果显示:与 A2780 细胞相比,对照组(A2780/DDP)细胞中 P-PI3K/PI3K 和 P-AKT/AKT 的蛋白水平相对比值以及 N 钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、蜗牛蛋白(Snail)的蛋白表达更高,E 钙黏蛋白(E-cadherin)蛋白表达更低($t_{P-PI3K/PI3K} = 8.115$, $t_{P-AKT/AKT} = 17.62$, $t_{N-cadherin} = 6.126$, $t_{Vimentin} = 4.001$, $t_{Snail} = 17.333$, $t_{E-cadherin} = 4.620$, $P < 0.01$);随着 CBG 剂量升高,耐药细胞中的 P-PI3K、P-AKT、N-cadherin、Vimentin、Snail 的蛋白表达水平降低,而 E-cadherin 的蛋白表达量增加($F_{P-PI3K} = 268.5$, $F_{P-AKT} = 190.5$, $F_{N-cadherin} = 24.02$, $F_{Vimentin} = 57.65$, $F_{Snail} = 87.24$, $F_{E-cadherin} = 135.8$, $P < 0.05$)。RT-qPCR 结果显示:随着 CBG 浓度增加,PI3K、AKT、N-cadherin、Vimentin、Snail 的 mRNA 表达水平随之降低,相反 E-cadherin 的 mRNA 表达水平逐渐升高($F_{PI3K} = 101.1$, $F_{AKT} = 558.3$, $F_{N-cadherin} = 86.97$, $F_{Vimentin} = 105.9$, $F_{Snail} = 85.71$, $F_{E-cadherin} = 80.96$, $P < 0.01$)。结论 CBG 具有逆转卵巢癌 A2780/DDP 细胞株顺

铂耐药的作用,其机制可能与 CBG 调控 PI3K/AKT 信号通路和抑制 EMT 发生有关。

关键词 华蟾素;卵巢癌;顺铂耐药;逆转耐药;PI3K/AKT;上皮间质转化;作用机制

中图分类号 R 737.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0671-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.018

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,致死率位居其中首位^[1]。手术和以铂或紫杉醇为基础的化疗是卵巢癌的初始治疗^[2]。但多数患者会发生化疗耐药出现肿瘤复发转移且后续治疗效果不佳,这是导致卵巢癌病死率较高的主要原因之一。华蟾素(cinobufagin, CBG)是从中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍的干燥表皮和腺体分泌物中通过水提醇沉法提取出来的生物活性成分,目前广泛应用于抗恶性肿瘤治疗,在肝癌、肺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中均表现出显著的抑癌效果^[3]。已有研究^[4]显示 CBG 能抑制卵巢癌细胞的增殖和侵袭促进其凋亡。但对于 CBG 能否逆转卵巢癌细胞对顺铂(cisplatin, DDP)的耐药性以及其机制研究的报道较少。现利用 CBG 处理 A2780/DDP 细胞探讨 CBG 对卵巢癌铂耐药的逆转机制,以期 CBG 治疗卵巢癌提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人卵巢癌细胞株 A2780 和人卵巢癌细胞株顺铂耐药株 A2780/DDP 购自中国科学院上海细胞生物所;顺铂注射液(货号:H2001074)购自江苏豪森药业集团有限公司;CBG 注射液(货号:国药准字 Z34020273)由安徽华润金蟾药业股份有限公司提供;PI3K/AKT-IN-2 抑制剂(货号:2684412-41-5)购自美国 MCE 公司;RIPA1640 培养基(货号:C11875500BT)和胎牛血清(货号:A5670701)购自美国 Gibco 公司;ABW 基质胶(货号:0827045)购自上海诺娃医药科技有限公司;EdU 试剂盒(货号:C0071S)和 Hoechst 试剂盒(货号:C0003)均购自碧云天生物技术有限公司;磷酸肌醇

2024-02-27 接收

基金项目:安徽省 2021 年重大疑难疾病(卵巢癌)中西医协同攻关项目(编号:皖中医药发展秘[2022]70 号);安徽省第十三批“115”产业创新团队

作者单位:¹安徽医科大学中西医结合临床医学系,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院中西医结合肿瘤科,合肥 230022

作者简介:舒美玲,女,硕士研究生;

张梅,女,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: zm13856990019@163.com

3-激酶(phosphatidylinositide 3-kinase, PI3K)(货号:R27768)、丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)又名蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)(货号:R23412)、E钙黏蛋白(货号:340341)、N钙黏蛋白(货号:380671)抗体购自成都正能生物技术责任有限公司;逆转录试剂盒(货号:Q111-02)和RT-qPCR试剂盒(货号:R222-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人卵巢癌细胞株的培养 A2780和A2780/DDP细胞贴壁培养于含10%胎牛血清、1%青-链霉素和0.1%支原体清除剂的RIPA1640培养基中,置于含5% CO₂的37℃恒温培养箱中。细胞密度达80%时进行传代。此外,A2780/DDP细胞在传代贴壁后另给予1 μg/ml顺铂以维持耐药性。

1.2.2 CCK-8法检测细胞增殖能力 分别取对数生长期A2780和A2780/DDP细胞,按照 8×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,细胞贴壁后按实验设计分别给药:DDP(2.5、5、10、20、40、80、100、160 μmol/L),CBG(200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 mg/ml)于24、36、48 h后每孔加入CCK-8溶液10 μl,避光孵育1.5 h后读取562 nm处光密度(optical density, OD)值。计算DDP对A2780和A2780/DDP细胞或CBG对A2780/DDP细胞的半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC₅₀),并计算出A2780/DDP的耐药指数(resistance index, RI) = IC₅₀(A2780/DDP)/IC₅₀(A2780)。CBG(0、2、4、6 mg/ml)处理24 h后再加入梯度浓度DDP(2.5、5、10、20、40、80、100、160 μmol/L),24 h后加入CCK-8溶液10 μl,避光孵育1.5 h后读取562 nm处OD值,计算CBG的逆转指数(reversal fold, RF) = IC₅₀(0 mg/ml)/IC₅₀(2、4、6 mg/ml)CBG^[5]。实验独立重复3次,设3个复孔。

1.2.3 实验分组 根据CBG的IC₅₀值和逆转耐药指数设计实验分组:对照组(12.5 μmol/L DDP)、低剂量组(12.5 μmol/L DDP + 2 mg/ml CBG)、中剂量组(12.5 μmol/L DDP + 4 mg/ml CBG)、高剂量组(12.5 μmol/L DDP + 6 mg/ml CBG)、抑制剂组(12.5 μmol/L DDP + 6 mg/ml CBG + 6 μmol/L PI3K/AKT抑制剂)。

1.2.4 平板克隆实验评估细胞的克隆增殖能力 将A2780/DDP细胞按500个/孔的密度接种于6孔板中,待细胞贴壁生长后按分组更换含药培养基。持续培养2周,期间每隔4 d换液。培养结束后,弃

废液,用PBS洗净,每孔加入800 μl 4%多聚甲醛溶液固定细胞。40 min后吸弃多聚甲醛溶液,再每孔加入1 ml结晶紫染色,20 min后用PBS轻缓冲洗至6孔板无染料残留,晾干后拍照。使用ImageJ软件分析计算克隆形成率。每组设3个复孔,实验重复3次。

1.2.5 EdU和Hoechst法评估细胞的增殖和凋亡情况 将A2780/DDP细胞按 1×10^4 /孔接种于铺有14 mm爬片的24孔板中,每孔含有500 μl完全培养基。待细胞贴壁生长后,按分组配制工作液进行换液。48 h后按照EdU试剂盒进行细胞的固定和标记。Hoechst实验前期铺板同EdU实验,48 h后按照Hoechst试剂盒进行细胞的固定和标记。染色后在荧光显微镜下拍照。并采用ImageJ软件统计增殖或凋亡细胞数量。每组设3个复孔,实验重复3次。

1.2.6 细胞划痕实验评估细胞水平迁移能力 将A2780/DDP细胞按 6×10^5 个/孔接种于6孔板,培养24 h后,用200 μl枪头在细胞上划“—”字划痕,PBS洗涤3次,用无血清培养基配制各组培养液,进行换液。在0、24、48 h的时间点分别拍照,ImageJ软件分析24 h和48 h的划痕宽度比,细胞迁移率 = (初始划痕面积 - t时刻划痕面积)/初始划痕面积 × 100%。每组设3个复孔,实验重复3次。

1.2.7 Transwell法检测细胞迁移和侵袭能力 将A2780/DDP细胞悬浮于含2%血清的完全培养基中,按 4×10^5 个/孔接种于含100 μl不同工作液的Transwell小室。细胞贴壁后下室加入含10%血清培养液600 μl,继续培养24 h后取出小室,用甲醛固定30 min,结晶紫染色30 min,PBS洗2次,用棉签轻轻擦拭小室内未穿膜过的细胞,室温晾干。侵袭实验前用基质胶将Transwell小室湿化(不含血清的培养液以1:8比例稀释基质胶,加80 μl/孔稀释好的基质胶在小室中,放培养箱中静置32 h),其余步骤同前法。最后将小室底部用显微镜拍照,采用ImageJ软件统计迁移细胞数量。每组设3个复孔,实验重复3次。

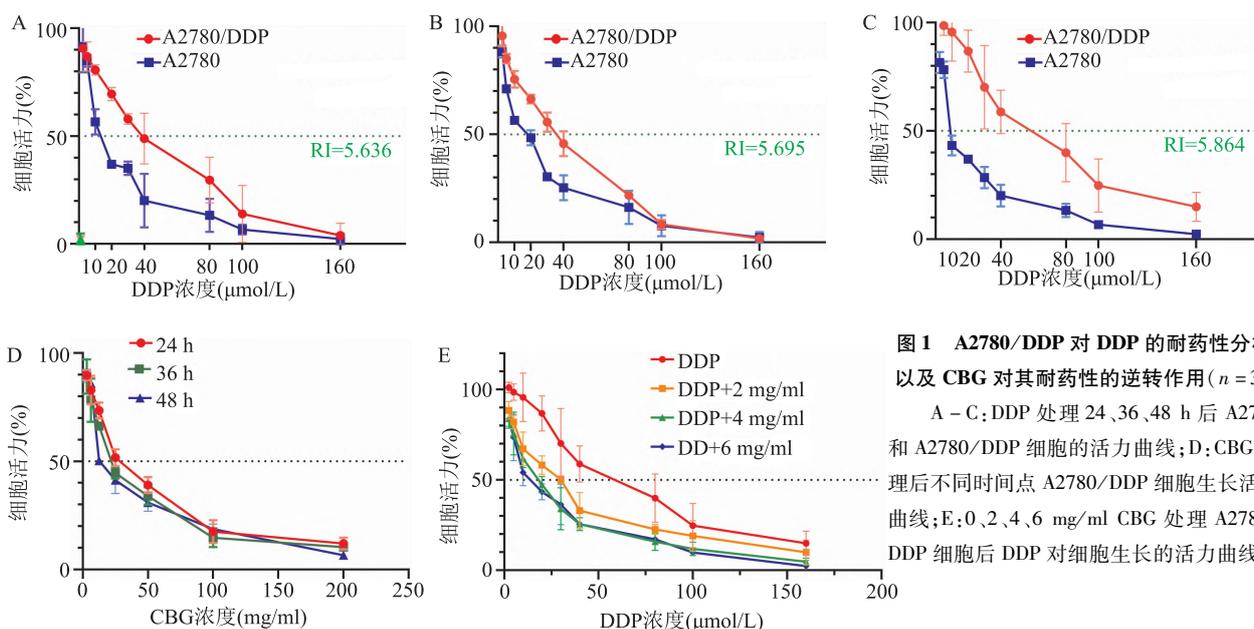
1.2.8 Western blot检测PI3K/AKT信号通路和EMT相关蛋白的表达 在1.2.3项实验分组基础上增加A2780细胞组(12.5 μmol/L DDP),药物处理48 h后收集各组细胞的总蛋白,加入上样缓冲液,100℃、5 min煮沸变性后室温冷却,-20℃保存待用。根据所测蛋白分子量配制相应浓度分离胶,加样,电压65 V 30 min后,转150 V 60 min进行

电泳,恒压 200 mA 120 min 转印至 NC 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 60 min 后与一抗(母液:一抗稀释液 = 1 : 1 000)孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,与二抗(母液:二抗稀释液 = 1 : 10 000)室温孵育 60 min 后,TBST 洗膜 3 次,使用的增强型化学发光试剂显影并拍照。ImageJ 软件分析相对蛋白含量,用各条带灰度值/内参条带的灰度值表示,每组实验重复 3 次。

1.2.9 RT-qPCR 法检测 PI3K/AKT 信号通路和 EMT 相关 mRNA 的表达 使用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,采用 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA,参照 SYBR-Green PCR 试剂盒说明书进行 RT-qPCR 实验。引物序列见表 1,GAPDH 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析目的基因在不同组别之间的表达差异,每组实验重复 3 次。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')
PI3K	正向引物:CCAGACCAGTACGTTCCGAGA
	反向引物:GAAACTGCCTATCCTCCGA
AKT	正向引物:GCCTCTGCTTTGTCATGGAG
	反向引物:AGCATGAGGTTCTCCAGCTT
E-cadherin	正向引物:GCCATCGCTTACACCATCCTCAGD
	反向引物:CTCTCTCGTCCAGCCAGTG
N-cadherin	正向引物:AGGAGTCAGTGAAGGAGTCAGCAG
	反向引物:TTCTGGCAAGTTGATTGGAGGGATG
Vimentin	正向引物:CCTTCGTGAATACCAAGACCTGCTC
	反向引物:AATCTGCTCTCCTCGCCTTCC
Snail	正向引物:CCTCGTCCCAATGCTCATCTG
	反向引物:GCTCTGCCACCCTGGGACTC
GAPDH	正向引物:CAGGAGCATTGCTGATGAT
	反向引物:GAAGCTGGGGCTCATT

图 1 A2780/DDP 对 DDP 的耐药性分析以及 CBG 对其耐药性的逆转作用 ($n=3$)

A-C: DDP 处理 24、36、48 h 后 A2780 和 A2780/DDP 细胞的活力曲线; D: CBG 处理后不同时间点 A2780/DDP 细胞生长活力曲线; E: 0、2、4、6 mg/ml CBG 处理 A2780/DDP 细胞后 DDP 对细胞生长的活力曲线

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;采用配对的 t 检验来分析单因素两组之间的差异,多组间的比较采用单因素方差分析,分析前行方差齐性检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A2780/DDP 细胞耐药性的鉴定及 CBG 对 A2780/DDP 细胞耐药性的影响 如图 1A - 1C 所示,DDP 作用于细胞 24、36、48 h 后,A2780/DDP 的 IC_{50} 值分别为 68.89 ± 0.269 、 62.743 ± 1.071 、 52.433 ± 0.176 ,A2780 的 IC_{50} 值为 12.233 ± 0.059 、 10.7 ± 0.625 、 9.206 ± 0.193 ,在 DDP 的各浓度作用下,A2780/DDP 细胞的细胞活力明显高于 A2780 细胞,差异有统计学意义 ($F = 16, P < 0.05$),RI 值分别为 5.636、5.864、5.695。如图 1D 显示:CBG 作用于细胞 24、36、48 h 后,对 A2780/DDP 的 IC_{50} 分别为 32.337 ± 1.374 、 22.48 ± 0.501 、 9.681 ± 0.101 ,根据 CBG 作用 A2780/DDP 细胞 48 h 的 IC_{50} 值与 24 h 或 36 h 的 IC_{50} 值相比显著降低 ($F = 540.4, P < 0.05$),选择 48 h 为后续实验工作时间,并将 CBG 对 A2780/DDP 细胞作用 48 h 后的 20% (2 mg/ml)、40% (4 mg/ml)、60% (6 mg/ml) 的抑制浓度作为逆转耐药实验的低、中、高剂量。图 1E 显示:处理 48 h 后,低、中、高剂量的 CBG 对 A2780/DDP 耐药的逆转倍数分别为 1.617、2.570、3.461。

2.2 CBG 对 A2780/DDP 克隆形成能力的影响

图2显示:与对照组的细胞克隆数目相比,CBG低剂量、中剂量、高剂量组的细胞克隆数目随CBG药物剂量增加而减少,其中抑制剂组的细胞克隆数目最少,差异有统计学意义($F = 310.2, P < 0.05$)。

2.3 CBG对A2780/DDP细胞迁移和侵袭能力的影响

划痕实验显示(图3A):CBG处理24 h或48 h后,与对照组相比,低、中、高剂量组的CBG呈时间和浓度依赖性地抑制了细胞划痕愈合率,其中抑制剂组的细胞划痕愈合率最低,差异有统计学意义(24 h: $F = 105.9, P < 0.01$, 48 h: $F = 59.2, P < 0.01$)。Transwell实验显示(图3B):与对照组相比,各组细胞处理24 h后,迁移和侵袭细胞数目呈

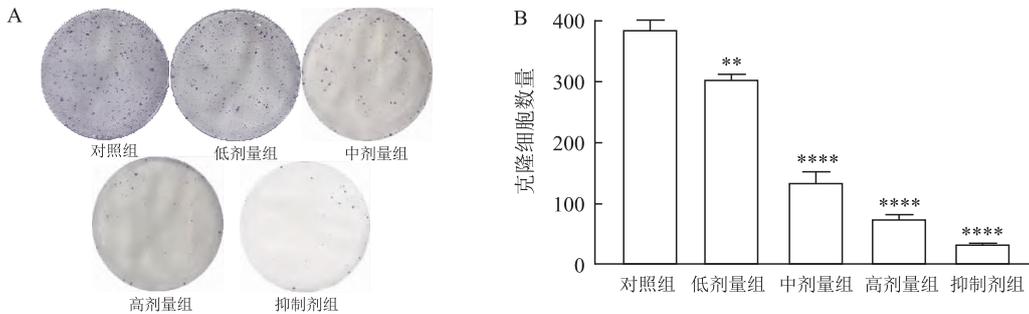


图2 CBG抑制A2780/DDP细胞克隆形成能力($n = 3$)

A:不同处理组A2780/DDP细胞的克隆形成能力的情况;B:直方图分析;与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

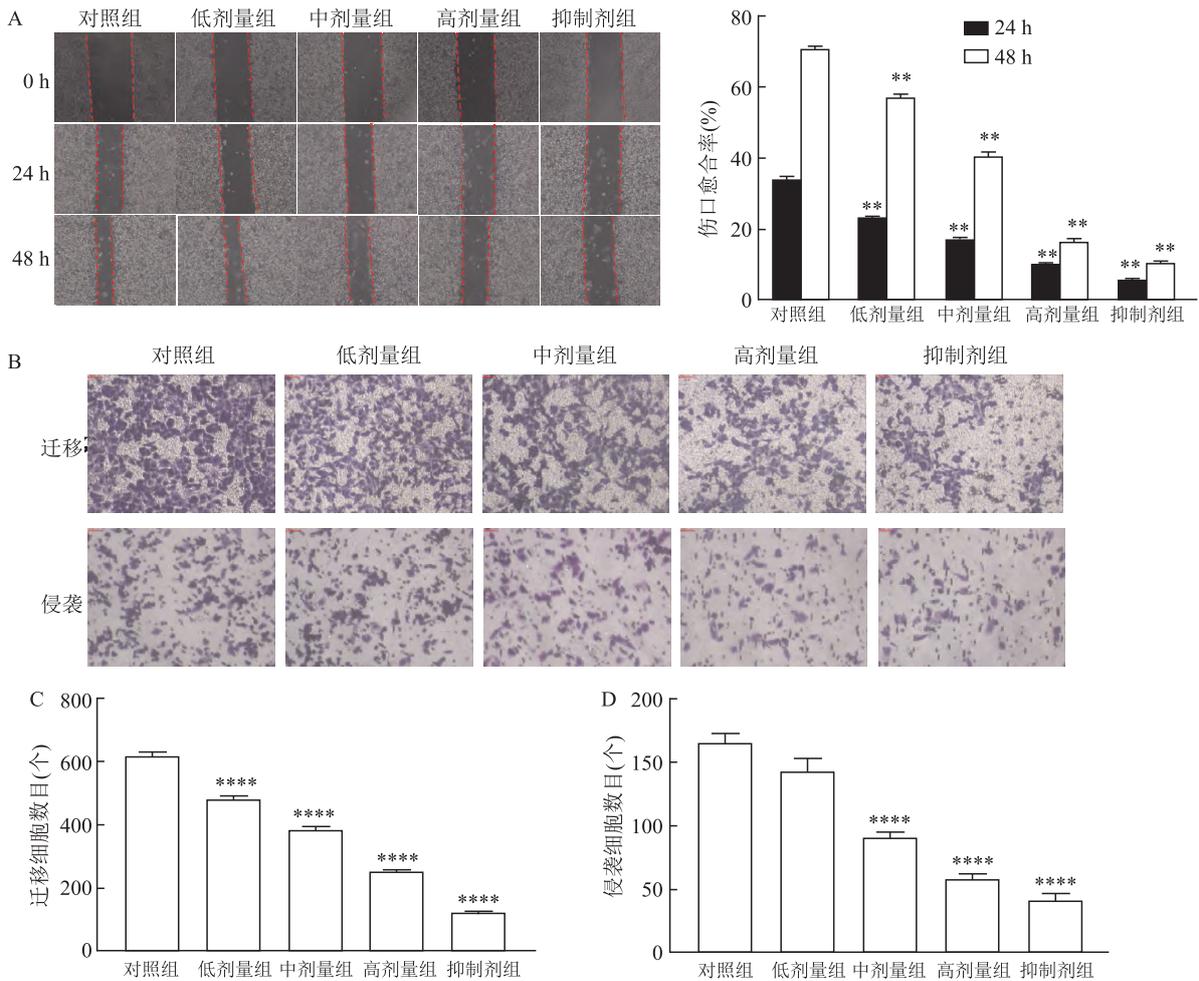


图3 CBG抑制A2780/DDP的迁移和侵袭能力($n = 3$)

A:划痕实验检测不同剂量组药物处理24、48 h后对A2780/DDP细胞的水平迁移能力的影响和直方图分析 $\times 40$;B-D:Transwell法检测各组药物处理后A2780/DDP细胞的垂直迁移和侵袭的影响和直方图分析 $\times 100$;与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

现浓度依赖性的减少,其中抑制剂组细胞的迁移和侵袭能力显著降低,细胞数目最少,差异有统计学意义($P < 0.0001$)。

2.4 CBG 对 A2780/DDP 细胞的凋亡和增殖能力影响 EdU 染色实验结果显示:与对照组相比,随着 CBG 浓度升高,耐药细胞的增殖率随之降低,其中抑制剂组的细胞增殖率最低,差异有统计学意义($F = 190.4, P < 0.01$)。Hoechst 染色实验结果显示:与对照组相比,耐药细胞的凋亡率随着 CBG 浓度增加而上升,其中抑制剂组的细胞凋亡率最高,差异有统计学意义($F = 389.6, P < 0.01$),见图 4。

2.5 CBG 对 A2780/DDP 细胞 PI3K/AKT 信号通路以及 EMT 相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示(图 5):与 A2780 细胞相比,对照组(A2780/DDP)细胞的 P-PI3K/PI3K($t = 8.115, P < 0.01$)和 P-AKT/AKT($t = 17.62, P < 0.01$)的蛋白水平相对比值更高,而 E-cadherin($t = 4.620, P < 0.01$)的蛋白表达水平更低,同时 N-cadherin($t = 6.126, P < 0.01$)、Vimentin($t = 4.001, P < 0.01$)、Snail($t = 17.333, P < 0.01$)的蛋白表达水平更高。此外,CBG 呈浓度依赖性地抑制 PI3K、AKT 的蛋白磷酸化,与对照组相比,P-PI3K($F = 268.5, P < 0.01$)、P-AKT

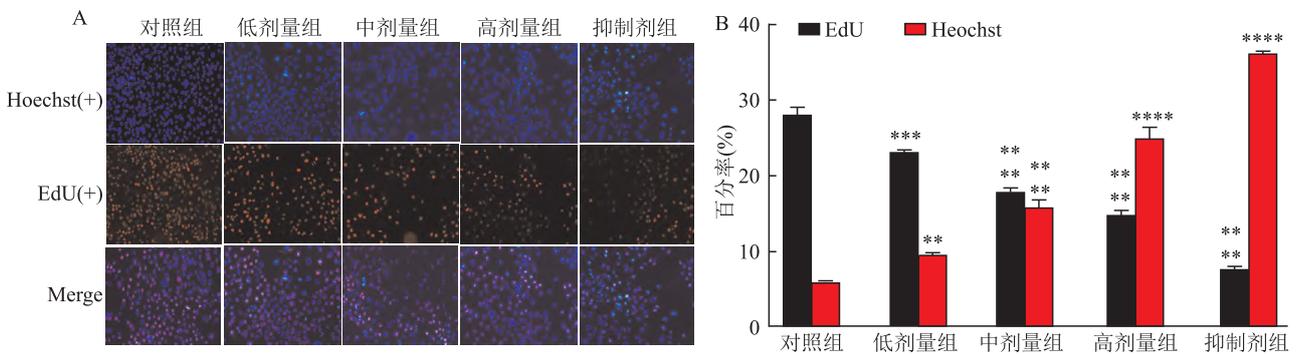


图 4 CBG 抑制 A2780/DDP 细胞增殖促进其凋亡($n = 3$)

A:EdU 法和 Hoechst 法检测 48 h 后不同处理组 A2780/DDP 细胞的增殖和凋亡能力 $\times 10$;B:增殖细胞或凋亡细胞占总细胞的比率直方图分析;与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

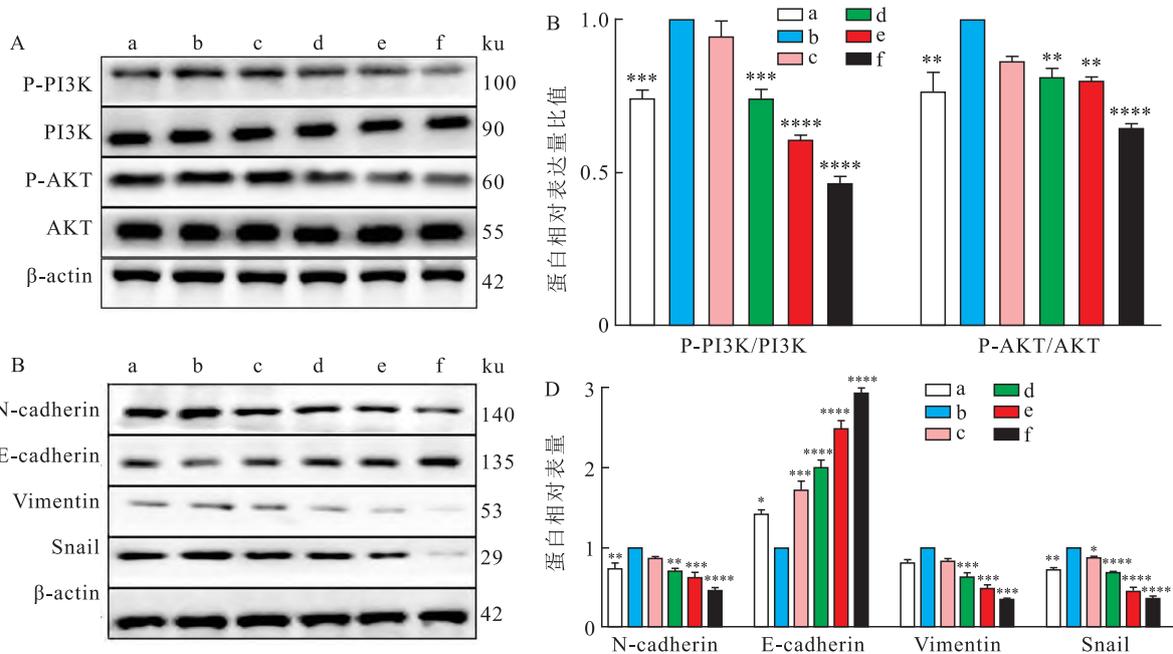


图 5 卵巢癌 A2780/DDP 细胞中 PI3K/AKT 信号通路蛋白和 EMT 相关蛋白的表达水平的影响($n = 3$)

A、B:不同处理组细胞中 PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail 的蛋白表达条带;C、D: P-PI3K/PI3K、P-AKT/AKT、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白与内参 β -actin 的相对表达量的直方图分析;a: A2780 细胞组;b: 对照组;c: 低剂量组;d: 中剂量组;e: 高剂量组;f: 抑制剂组;与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

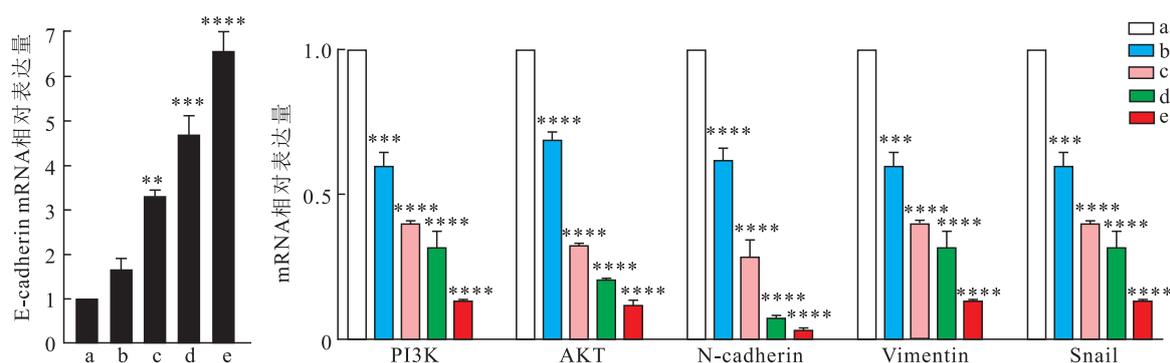


图6 A2780/DDP 细胞中 PI3K/AKT 信号通路和 EMT 相关 mRNA 的表达水平的影响 ($n=3$)

a: 对照组; b: 低剂量组; c: 中剂量组; d: 高剂量组; e: 抑制剂组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

($F = 190.5, P < 0.01$)、N-cadherin ($F = 24.02, P < 0.0001$)、Vimentin ($F = 57.65, P < 0.01$)、Snail ($F = 87.24, P < 0.01$) 的蛋白表达量减少, 其中抑制剂组上述蛋白的表达量最少。但在各浓度组 CBG 处理后 A2780/DDP 细胞中的 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高, 在抑制剂组中表达量最多 ($F = 135.8, P < 0.0001$)。

2.6 CBG 对 A2780/DDP 细胞 PI3K/AKT 信号通路以及 EMT 相关 mRNA 表达的影响 RT-qPCR 实验结果显示 (图 6): CBG 呈浓度依赖性地降低 PI3K ($F = 101.1, P < 0.01$)、AKT ($F = 558.3, P < 0.01$)、N-cadherin ($F = 86.97, P < 0.01$)、Vimentin ($F = 105.9, P < 0.01$)、Snail ($F = 85.71, P < 0.01$), 增加 E-cadherin ($F = 80.96, P < 0.01$) 的 mRNA 表达, 其中抑制剂组的 PI3K、AKT、N-cadherin、Vimentin、Snail 的 mRNA 表达量最少, E-cadherin 的表达水平最高, 差异有统计学意义。

3 讨论

CBG 能抑制 PI3K/AKT 通路或 EMT 发挥抗肿瘤作用, Li et al^[6] 的研究表明 CBG 可显著上调 HepG2、SMC-7721 和 SNU-368 细胞中的 E-cadherin 并下调 N-cadherin、Snail、slug 和 ZEB1 的表达水平, 从而抑制 HepG2 荷瘤小鼠的肺转移。CBG 不仅具有直接抗肿瘤增殖侵袭的作用, 还能逆转肿瘤耐药性, 在联合放疗、化疗治疗过程中发挥增敏作用^[7]。Liu et al^[8] 报道了 CBG 能抑制鼻咽癌中的 MYH9/GSK3 β / β -连环蛋白及下游的肿瘤干细胞特性和 EMT 信号, 从而显著抑制 EBV-miR-BART22 诱导的 DDP 耐药性。Su et al^[9] 研究了 CBG 的有效成分蟾毒灵对卵巢癌耐药的作用, 结果显示蟾毒灵能下调卵巢癌耐药细胞中 EMT 相关蛋白表达, 在体

内抑制卵巢癌细胞的生长、迁移和侵袭, 从而提高卵巢癌患者对 DDP 敏感性。此外, 临床基础研究证实, CBG 进入人体代谢活动, 活化后对人体内存在的癌细胞具有很强的直接杀伤能力, 目前 CBG 广泛应用于多种肿瘤疾病的辅助或联合用药治疗, 并取得较好的临床治疗效果。林梅英等^[10] 的 meta 分析结果显示 CBG 注射液联合疗法能提高中晚期非小细胞肺癌患者近期疗效和生存率、改善生活质量、缓解疼痛、降低不良反应。另一项来自袁福建等^[11] 的研究显示 CBG 能够提高肝癌介入治疗效果, 改善患者的免疫功能、肝功能储备和生存情况。

PI3K/AKT 信号的过度激活与化疗耐药性和癌症转移密切相关, 抑制 PI3K/AKT 信号可恢复卵巢癌细胞对化疗药物的敏感性^[12-13], 故抑制 PI3K/AKT 通路的药物可能成为卵巢癌耐药的逆转剂。通过 PI3K/AKT 信号通路能调控下游 EMT, 而 EMT 的发生在卵巢癌耐药过程中起到了重要的作用。Zhao et al^[14] 研究发现成纤维细胞生长因子受体 3 可促进表皮生长因子受体磷酸化并激活 PI3K/AKT 信号转导, 从而减少细胞凋亡并促进 EMT 过程, 进而导致卵巢癌细胞对顺铂产生耐药性。

本研究显示 CBG 处理后能恢复 A2780/DDP 细胞的顺铂敏感性, 降低 RI, 呈浓度依赖性地抑制耐药细胞增殖、迁移和侵袭能力, 促进其凋亡。平板克隆、Transwell、EdU 实验结果显示 CBG 联合 PI3K/AKT 抑制剂对耐药细胞的抑制作用明显优于单独使用 CBG 组 ($P < 0.05$)。Western blot 和 RT-qPCR 实验结果表明相比于亲本株, A2780/DDP 细胞中的 PI3K/AKT 信号通路和 EMT 相关蛋白以及 mRNA 的表达水平更高 ($P < 0.05$), 提示 A2780/DDP 细胞中存在 PI3K/AKT 信号的过度激活和 EMT 的发生, 通过抑制 PI3K/AKT 信号可降低 A2780/DDP 细胞

的抗药性。此外,与对照组相比,不同浓度 CBG 处理组细胞中的 P-PI3K/PI3K 及 P-AKT/AKT 的蛋白表达比值、N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白和 mRNA 表达水平呈现随着药物浓度升高而下降的趋势,相反 E-cadherin 表达量随 CBG 浓度升高而增加 ($P < 0.05$),表明 CBG 能下调 PI3K/AKT 信号通路和抑制 EMT 过程。抑制 EMT 和 PI3K/AKT 信号通路的激活是逆转卵巢癌顺铂耐药的两个重要作用靶点,而 CBG 能抑制 EMT 和 PI3K/AKT 信号通路,有望成为卵巢癌铂耐药的有效逆转剂。

综上所述,CBG 能诱导人卵巢癌 A2780/DDP 耐药细胞的凋亡,减弱其增殖、迁移和侵袭能力,其潜在的机制可能与调控 PI3K/AKT 信号通路和抑制 EMT 过程有关。本研究有助于阐明 CBG 作为卵巢癌铂耐药逆转药物的可行性,同时为 CBG 逆转卵巢癌铂耐药提供理论依据,以期为卵巢癌临床治疗方案提供新的思路。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1):7-30.
- [2] Armstrong D K, Alvarez R D, Bakkum-Gamez J N, et al. Ovarian cancer, version 2. 2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2021, 19(2):191-226.
- [3] 叶映泉,李庆林,朱耀东,等. 华蟾素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中药药理与临床,2022,38(3):215-21.
- [4] 郭 镜,高 月. 华蟾素通过 wee1 蛋白调控卵巢癌细胞 SK-OV3 的增殖与凋亡[J]. 西安交通大学学报(医学版),2021,42(6):857-61.
- [5] 周欣宇,李京敏,张 婷,等. 木犀草素对白血病 K562/ADR 细胞多药耐药的逆转作用及机制研究[J]. 天津医药,2023,51(10):1621-5.
- [6] Li W, Pei S, Zhang X, et al. Cinobufotalin inhibits the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through down-regulate β -catenin *in vitro* and *in vivo* [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 922:174886.
- [7] 赵秦英,吴 悦,桂仲璇,等. 华蟾素调控 HIF-1 α /VEGF 通路逆转结肠癌 HCT15/5-FU 细胞耐药的体外研究[J]. 安徽医科大学学报,2023,58(6):902-7.
- [8] Liu Y, Jiang Q, Liu X, et al. Cinobufotalin powerfully reversed EBV-miR-BART22-induced cisplatin resistance *via* stimulating MAP2K4 to antagonize non-muscle myosin heavy chain IIA/glycogen synthase 3 β / β -catenin signaling pathway[J]. EBioMedicine, 2019, 48:386-404.
- [9] Su S, Dou H, Wang Z, et al. Bufalin inhibits ovarian carcinoma *via* targeting mTOR/HIF- α pathway [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2021, 128(2):224-33.
- [10] 林梅英,刘益峰,邹奇锋,等. 华蟾素注射液联合疗法治疗中晚期非小细胞肺癌的 meta 分析[J]. 中国医药科学,2022,12(20):58-62.
- [11] 袁福建,赖小强,黄少鹏. 华蟾素胶囊联合介入治疗肝癌临床疗效观察[J]. 实用中西医结合临床,2021,21(16):83-4.
- [12] da Costa A A B A, Baiocchi G. Genomic profiling of platinum-resistant ovarian cancer: The road into druggable targets [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 77:29-41.
- [13] 杨洁真,王 晶,宋永红,等. 脂质体莪术醇逆转卵巢癌顺铂耐药作用的机制[J]. 安徽医科大学学报,2022,57(7):1106-11.
- [14] Zhao J, Tan W, Zhang L, et al. FGFR3 phosphorylates EGFR to promote cisplatin-resistance in ovarian cancer [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 190:114536.

Mechanism of cinobufagin regulating PI3K/AKT signaling pathway to reverse cisplatin resistance in ovarian cancer A2780/DDP cells

Shu Meiling^{1,2}, Wu Yue^{1,2}, Ye Yingquan^{1,2}, Zhang Shuangshuang^{1,2}, Zhang Mei^{1,2}

(¹Dept of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Integrated Chinese and Western Medicine Oncology,

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the reversal effect and mechanism of cinobufagin (CBG) on cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. **Methods** A2780 cell line and its cisplatin-resistant cell line A2780/DDP are common ovarian cancer cells in clinic, so these two cell lines were selected as the research objects. The cell viability was detected by cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay, and the cell proliferation ability was detected by plate cloning and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay. Hoechst staining was used to observe cell apoptosis. Cell scratch test and Transwell test were used to evaluate cell migration and invasion ability. Western blot and quantitative

(下转第 741 页)

- cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2021, 43(5): 1641–51.
- [39] Kanagalingam S, Ul Haq Z, Victory Srinivasan N, et al. Comparing gefitinib and traditional chemotherapy for better survival in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review [J]. *Cureus*, 2023, 15(1): e33691.
- [40] 李 轩,程 浩,方 乐,等. 自噬对PC9/GR细胞吉非替尼敏感性及PD-L1影响的体外研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(10): 1535–40.
- [41] Khalil A, Jameson M J. The EGFR inhibitor gefitinib enhanced the response of human oral squamous cell carcinoma to cisplatin *in vitro* [J]. *Drugs R D*, 2017, 17(4): 545–55.
- [42] Niklander S, Bordagaray M J, Fernández A, et al. Vascular endothelial growth factor: A translational view in oral non-communicable diseases [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 85.
- [43] Goel B, Tiwari A K, Pandey R K, et al. Therapeutic approaches for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma-An update on clinical trials [J]. *Transl Oncol*, 2022, 21: 101426.
- [44] Argiris A, Li S, Savvides P, et al. Phase III randomized trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(34): 3266–74.
- [45] Chen L, Mo D C, Hu M, et al. PD-1/PD-L1 inhibitor monotherapy in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: a meta-analysis [J]. *Am J Otolaryngol*, 2022, 43(2): 103324.
- [46] 宋 霞,鱼丽莉,赵 慧. 临床药师参与1例纳武利尤单抗致棘皮瘤的处置与分析 [J]. *中国药房*, 2023, 34(2): 237–41.
- [47] Kitamura N, Sento S, Yoshizawa Y, et al. Current trends and future prospects of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 240.
- [48] Gillison M L, Blumenschein G, Fayette J, et al. Long-term outcomes with nivolumab as first-line treatment in recurrent or metastatic head and neck cancer: Subgroup analysis of checkmate 141 [J]. *Oncologist*, 2022, 27(2): e194–8.
- [49] 王 男,彭其林,谢丹妮,等. 帕博利珠单抗致免疫性心肌炎的文獻分析 [J]. *实用药物与临床*, 2022, 25(11): 1027–31.
- [50] 姚宇驰,吴 敏. 帕博利珠单抗治疗皮肤恶性黑色素瘤的临床效果 [J]. *中国医药导报*, 2022, 19(35): 106–9, 134.
- [51] Harrington K J, Burtneß B, Greil R, et al. Pembrolizumab with or without chemotherapy in recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma; Updated results of the phase III KEYNOTE-048 study [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(4): 790–802.
- [52] Nishinaga Y, Sato K, Yasui H, et al. Targeted phototherapy for malignant pleural mesothelioma: Near-infrared photoimmunotherapy targeting podoplanin [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 1019.
- [53] Maruoka Y, Furusawa A, Okada R, et al. Interleukin-15 after near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) enhances T cell response against syngeneic mouse tumors [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(9): 2575.
- [54] Cognetti D M, Johnson J M, Curry J M, et al. Phase 1/2a, open-label, multicenter study of RM-1929 photoimmunotherapy in patients with locoregional, recurrent head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2021, 43(12): 3875–87.

(上接第 677 页)

reverse transcription PCR (RT-qPCR) were used to detect the protein and mRNA expressions of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase (PI3K/AKT) signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Results** Compared with A2780 cells, the drug resistance indexes of A2780/DDP cells were 5.636, 5.864, 5.695, respectively. After treatment of A2780/DDP cells with CBG (2, 4, 6 mg/ml), the reversal resistance indexes were 1.617, 2.570, 3.461, respectively. CBG treatment significantly increased the level of apoptosis and inhibited the proliferation, migration and invasion of the cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Western blot results showed that compared with A2780 cells, the relative ratio of P-PI3K/PI3K and P-AKT/AKT protein levels, as well as the protein expression of N-cadherin, Vimentin, and Snail were higher in the control group (A2780/DDP) cells, while the protein expression of E-cadherin was lower ($t_{P-PI3K/PI3K} = 8.115$, $t_{P-AKT/AKT} = 17.62$, $t_{N-cadherin} = 6.126$, $t_{Vimentin} = 4.001$, $t_{Snail} = 17.333$, $t_{E-cadherin} = 4.620$, $P < 0.01$); As the dose of CBG increased, the protein expression levels of P-PI3K, P-AKT, N-cadherin, Vimentin, and Snail in drug-resistant cells decreased, while the protein expression level of E-cadherin increased ($F_{P-PI3K} = 268.5$, $F_{P-AKT} = 190.5$, $F_{N-cadherin} = 24.02$, $F_{Vimentin} = 57.65$, $F_{Snail} = 87.24$, $F_{E-cadherin} = 135.8$, $P < 0.05$). qRT-PCR results showed that with the increase of CBG concentration, the mRNA expression levels of PI3K, AKT, N-cadherin, Vimentin and Snail decreased, while the mRNA expression level of E-cadherin gradually increased ($F_{PI3K} = 101.1$, $F_{AKT} = 558.3$, $F_{N-cadherin} = 86.97$, $F_{Vimentin} = 105.9$, $F_{Snail} = 85.71$, $F_{E-cadherin} = 80.96$, $P < 0.01$). **Conclusion** CBG can reverse cisplatin resistance of ovarian cancer A2780/DDP cell line, and its mechanism may be related to the regulation of PI3K/AKT signaling pathway and inhibition of EMT by CBG.

Key words cinobufagin; ovarian cancer; cisplatin resistance; reversal of drug resistance; PI3K/AKT; EMT; mechanism of action