

田璐,陈莹,张阳. 扶正抗癌汤含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖、凋亡与周期进程的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 78-84.

Tian L, Chen Y, Zhang Y. Effects of serum containing Fuzheng kangai decoction on proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 78-84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.010

扶正抗癌汤含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖、凋亡与周期进程的影响

田璐,陈莹,张阳*

(辽宁中医药大学附属医院,沈阳 110032)

【摘要】 目的 探讨扶正抗癌汤(Fuzheng kangai decoction,FZKAD)含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖、凋亡与周期进程的影响。**方法** SD 大鼠 40 只随机分为对照组及 FZKAD 低(4.725 g/kg)、中(9.45 g/kg)、高(18.9 g/kg)剂量组,灌胃给药 7 d 后制备含药血清,用于 HO-8910PM 细胞的培养。分别采用噻唑蓝(MTT)实验检测细胞增殖能力,平板克隆形成实验检测克隆形成能力,膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(FITC/PI)双染法流式细胞术检测细胞凋亡,PI 单染法流式细胞术检测细胞周期进程,Western blot 法检测蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,除低、中剂量组处理 24 h 后的细胞存活率无显著性降低外($P>0.05$),其余各组处理 24、48 及 72 h 后的细胞存活率均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且各剂量组细胞克隆形成能力也显著降低($P<0.01$);与对照组比较,低、中、高剂量组的细胞凋亡率及 P53、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达水平增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白表达水平降低($P<0.01$);与对照组比较,低、中、高剂量组 G₀/G₁ 期细胞百分比增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 S 期、G₂/M 期细胞百分比及细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)、CDK6 蛋白表达水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞的增殖具有抑制作用,该作用与诱导凋亡及周期进程阻滞有关。

【关键词】 扶正抗癌汤;卵巢癌;增殖;凋亡;周期进程

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0078-07

Effects of serum containing Fuzheng kangai decoction on proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells

TIAN Lu, CHEN Ying, ZHANG Yang*

(Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of serum containing Fuzheng Kangai Decoction (FZKAD) on the proliferation, apoptosis, and cell cycle progression in human ovarian carcinoma HO-8910PM cells. **Methods** Forty Sprague-Dawley rats were divided randomly into control and low-dose (4.725 g/kg), medium-dose (9.45 g/kg), and high-dose (18.9 g/kg) FZKAD groups. After 7 days of intragastric administration, serum containing FZKAD was prepared and used for the culture of HO-8910PM cells. Cell proliferation was detected by MTT assay, colony-formation ability was detected by clone formation assay, apoptosis was detected by flow cytometry using Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide double-staining, cell cycle progression was detected by flow cytometry using propidium iodide single-

[基金项目] 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L201909)。

[作者简介] 田璐(1982—),女,博士,主任医师,研究方向:妇科肿瘤的诊断与治疗。E-mail:ingrid_114@163.com

[通信作者] 张阳(1973—),男,博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:妇科肿瘤的诊断与治疗。E-mail:zy172888@126.com

staining, and protein expression levels were detected by Western blot. **Results** There was no significant difference in cell survival rates among the low-dose, medium-dose, and control groups after 24 h ($P>0.05$). However, cell survival rates in the other groups were significantly decreased after 24, 48 and 72 h ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the colony-formation abilities were also significantly decreased in each dosage group ($P<0.01$). Compared with the control group, the apoptosis rates and protein expression levels of P53 and Bax were significantly increased in the low-dose, medium-dose, and high-dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the protein expression level of Bcl-2 was decreased ($P<0.01$). The percentage of cells in G_0/G_1 stage was significantly increased in the low-dose, medium-dose, and high-dose groups compared with the control group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the percentages of cells in S and G_2/M stages and protein expression levels of cyclin D1 and cyclin-dependent kinases 4 and 6 were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusions** Serum containing FZKAD can inhibit the proliferation of human ovarian cancer HO-8910PM cells, related to the induction of apoptosis and cell cycle arrest.

[Keywords] Fuzheng kangai decoction; ovarian carcinoma; proliferation; apoptosis; cell cycle progression

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

卵巢癌为我国三大常见的妇科肿瘤之一,其死亡率居高居妇科肿瘤的首位^[1]。卵巢癌发病隐匿,早期诊断较困难,75%的患者确诊时即为晚期^[2]。手术治疗联合化疗是卵巢癌的标准治疗手段,但卵巢癌晚期患者 5 年生存率目前仍低于 30%^[3]。化疗药物除可以清除癌细胞外,对增殖较快的骨髓细胞等同样具有清除作用,毒副作用严重,且长时间使用容易产生耐药性^[4]。免疫治疗及生物治疗在卵巢癌的治疗领域具有良好的应用前景,但其价格昂贵,且广泛的使用及疗效的确认仍需时日^[5]。

目前,中医药治疗中晚期卵巢癌疗效确切,应用广泛,正逐渐得到更多人的认可^[6-7]。扶正抗癌汤(Fuzheng kangai decoction, FZKAD)为辽宁中医药大学附属医院院内制剂,本团队的前期研究工作已证实,FZKAD 可以有效抑制大鼠卵巢癌移植瘤的生长,调节免疫功能是 FZKAD 发挥抗卵巢癌作用的潜在机制^[8]。进一步的研究发现,FZKAD 含药血清可以阻碍转移生长因子 $\beta 1$ /Smad 同源物蛋白 3 信号通路的激活,调节上皮间质转化进程,进而抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞的转移及侵袭^[9]。

大量研究表明,细胞凋亡受到抑制及周期进程受阻是肿瘤发生、发展的重要因素^[10-11]。因此,本研究以人卵巢癌 HO-8910PM 细胞为研究对象,在观察 FZKAD 含药血清抑制 HO-8910PM 细胞增殖作用的基础上,着重探讨其对凋亡及周期进程的影响,进一步阐明 FZKAD 治疗卵巢癌的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠,清洁级,40 只,6~8 周龄,体重

200~220 g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供[SCXK(辽)2020-0002];实验动物在辽宁中医药大学实验动物中心饲养[SYXK(辽)2019-0004],饲养室湿度为 50%~60%,温度为 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$,自由饮水和进食,12 h 光照和 12 h 黑暗交替循环。本研究经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(21000092018069),实验期间按照 3R 原则给予实验动物人道关怀。

1.1.2 细胞

人卵巢癌 HO-8910PM 细胞株,由上海美轩生物科技公司提供,并在本实验室长期传代保存。

1.2 主要试剂与仪器

扶正抗癌汤由白花蛇舌草 50 g、红人参 25 g、茯苓 20 g、竹茹 20 g、陈皮 15 g、浙贝母 15 g、枳壳 15 g、半夏 15 g、半枝莲 10 g、甘草 10 g、白术 10 g 及生姜 5 g 组成;水煎 2 次后,将药液合并,蒸发水分至其浓度为 2 g/mL,过滤去除残余药渣,分装灭菌后待用。胰蛋白酶(批号:T8802)、DMEM(批号:D0822)及胎牛血清(批号:12103C),购于美国 Mediatech 公司;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测试剂盒(批号:M1020)及结晶紫染液(批号:G1072),购于北京索莱宝科技有限公司;膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒(批号:KGA107)及细胞周期检测试剂盒(批号:KGA512),购于江苏凯基生物科技发展有限公司;P53(批号:10442-1-AP)、B 淋巴瘤细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 批号:12789-1-AP)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax, 批号:50599-2-AP)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1, 批号:26939-1-AP)、周期蛋白依赖性激酶 4

(cyclin dependent kinases 4, CDK4, 批号: 11026-1-AP)、CDK6 (批号: 4052-1-AP)、 β -肌动蛋白 (β -actin, 批号: 20536-1-AP) 多克隆抗体及对应的二抗 (批号: SA00001-2), 均购于武汉三鹰生物技术有限公司。

DFC259 型倒置相差显微镜, 德国 Leica 公司; 3111 型 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; ELX808 型多功能酶标仪, 美国 BioTek 公司; CytoFLEX 型流式细胞仪, 美国 Beckman 公司; DYCZ-24EN 型蛋白电泳仪, 北京六一仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清的制备

参考文献^[9]中的方法及给药剂量制备含药血清, SD 大鼠 40 只随机分为对照组及 FZKAD 低 (4.725 g/kg)、中 (9.45 g/kg)、高 (18.9 g/kg) 剂量组, 每组 10 只; 灌胃给药, 体积均为 1 mL/100 g, 频率为每天 1 次, 共 7 d。末次给药结束后 2 h, 乙醚麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 分离血清。经 56℃ 灭活补体, 再用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后, 存放于低温冰箱中备用。

1.3.2 MTT 实验检测细胞增殖能力

HO-8910PM 细胞在 5% CO₂、37℃ 条件下, 用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养, 0.25% 胰蛋白酶消化及传代, 当培养至对数生长期时用于实验。通过 MTT 实验检测细胞增殖能力, 将对数生长期的 HO-8910PM 细胞调整至密度为 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔细胞板中, 用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养 24 h 后弃掉培养基。更换为分别含 10% 对照组及 10% FZKAD 低、中、高剂量组含药血清的 DMEM 培养基, 继续培养 24、48 及 72 h。在额定时间, 每孔加入 20 μ L 稀释好的 MTT 溶液 (5 mg/mL), 原条件再培养 4 h, 弃去培养液。加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min 后, 在 490 nm 处用酶标仪测吸光度 A, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = $A_{\text{药物组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.3.3 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

HO-8910PM 细胞加入 6 孔细胞培养版中 (1×10^3 /孔), 用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养 24 h, 细胞贴壁后, 弃掉培养基。加入 DMEM 培养基 (分别含 10% 对照组及 10% FZKAD 低、中、高剂量组含药血清), 继续培养 14 d, 甲醛固定后用结晶紫染液染色, 计数细胞克隆形成数量。细胞克隆形成能力 (%) = 药物组细胞克隆形成数量/对照组细

胞克隆形成数量 $\times 100\%$ 。

1.3.4 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡

人卵巢癌 HO-8910PM 细胞在 6 孔细胞板中培养, 先用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养 24 h 后, 再更换分别含 10% 对照组及 10% FZKAD 低、中、高剂量组含药血清的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h。收集细胞 (1×10^6 个), PBS 洗涤后, 用孵育缓冲液重悬, 避光静置 15 min; 再用孵育缓冲液重悬, 分别加入终浓度均为 1 μ g/mL 的 FITC-Annexin V 和 PI, 在 4℃ 下避光孵育 15 min。用流式细胞仪检测 FZKAD 含药血清对细胞凋亡的影响。

1.3.5 PI 单染法流式细胞术检测细胞周期进程

分组及处理方法同“1.3.4”, 制备单细胞悬液, 缓慢滴入 70% 冰乙醇中, 在 4℃ 下固定过夜。离心 (4500 r/min, 10 min), 用 PBS 漂洗去除残留乙醇, 收集细胞 (1×10^6) 于 EP 管中, 加入 200 μ L PI 溶液, 重悬细胞, 在 4℃ 下避光孵育 30 min。用流式细胞仪检测 FZKAD 含药血清对细胞周期进程的影响。

1.3.6 Western blot 检测蛋白表达水平

分组及处理方法同“1.3.4”, 收集细胞后, 加入适量的 RIPA 细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 在 4℃ 下放置 30 min, 充分裂解。离心 (12 000 r/min, 10 min), 取上清液, 二辛可酸法测蛋白含量。计算 50~70 μ g 样品的体积, 与适量上样缓冲液混合后, 煮沸变性 10 min。采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 跑胶结束后将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 (1:2000) 并在 4℃ 下孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次后, 加入二抗 (1:5000) 并在常温下孵育 1 h。TBST 再次洗膜 3 次后, ECL 发光液显色后曝光, 扫描仪扫描目的条带并用 GraphPad 软件进行灰度值分析。

1.4 统计学方法

所得数据用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 通过 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。SNK-*q* 法用于两组数据比较, 单因素方差分析用于多组数据比较, $P < 0.05$ 提示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖的影响

2.1.1 各组细胞存活率比较

细胞过度增殖是肿瘤形成的重要原因, 本研究

通过 MTT 实验检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 24、48 及 72 h 后的存活率。结果发现,与对照组比较,除低、中剂量组处理 24 h 后的细胞存活率无显著性降低外($P>0.05$),其余各组处理 24、48 及 72 h 后的细胞存活率均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

2. 1. 2 各组细胞克隆形成能力比较

本研究进一步通过平板克隆形成实验检测了 HO-8910PM 细胞经不同剂量的 FZKAD 含药血清处理 14 d 后的克隆形成能力。结果发现,对照组及 FZKAD 低、中、高剂量组的细胞克隆形成能力分别为 100.00%、(59.12±8.63)%、(39.89±6.58)% 和

(26.95±4.24)%,各剂量组与对照组比较均显著降低($P<0.01$)。结果见图 1。

2. 2 FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞凋亡的影响

2. 2. 1 各组细胞凋亡率比较

细胞凋亡受到抑制可以导致异常增殖,本研究通过 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 48 h 的凋亡率。图 2 结果发现,对照组及 FZKAD 低、中、高剂量组的细胞凋亡率分别为(4.37±0.55)%、(17.56±2.48)%、(25.23±4.34)% 和 (41.79±5.16)%,各剂量组与对照组比较均显著增加($P<0.01$)。

表 1 各组细胞存活率比较($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Comparison of cell survival rate in each group

组别 Groups	细胞存活率(%) Cell survival rate		
	24 h	48 h	72 h
对照组 Control group	100.00	100.00	100.00
FZKAD 低剂量组 Low-dose FZKAD group	97.01±3.56	89.57±4.74 *	83.19±5.66 **
FZKAD 中剂量组 Medium-dose FZKAD group	95.69±4.13	77.08±5.82 **	60.82±7.38 **
FZKAD 高剂量组 High-dose FZKAD group	87.93±6.37 *	62.54±3.29 **	44.76±4.70 **

注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

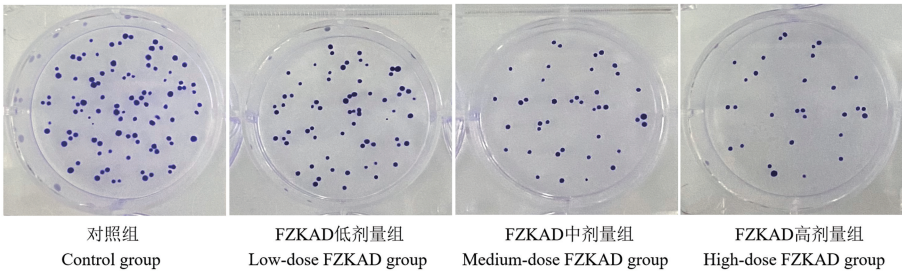


图 1 平板克隆形成实验检测各组细胞克隆形成能力

Figure 1 Cell clone formation ability of each group detected by plane clone formation experiment

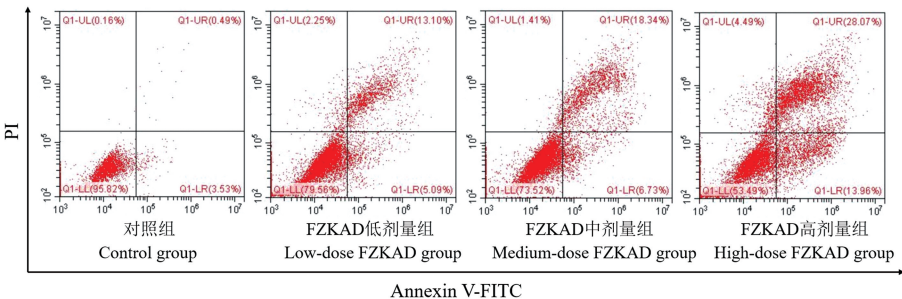


图 2 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Figure 2 Cell apoptosis rate determined by flow cytometry using Annexin V-FITC/PI double staining

2.2.2 各组细胞凋亡相关蛋白表达水平比较

P53 蛋白及 Bcl-2 家族蛋白是决定细胞凋亡的经典分子,本研究通过 Western blot 法检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 48 h 后 P53、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平。结果发现, FZKAD 低、中、高剂量组 P53 及 Bax 蛋白表达水平增加,而 Bcl-2 蛋白表达水平降低,与对照组比较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 3 及表 2。

2.3 FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞周期进程的影响

2.3.1 各组细胞周期进程比较

细胞周期进程受阻可以影响凋亡,进而导致细胞异常增殖,本研究通过 PI 单染法流式细胞术检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 48 h 后的周期进程。结果发现,与对照组比较, FZKAD 低、中、高剂量组 G_0/G_1 期细胞百分比增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 S 期及 G_2/M 期细胞百分比降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表现出明显的 G_0/G_1 期阻滞作用。结果见图 4 及表 3。

2.3.2 各组细胞周期进程相关蛋白表达水平比较

通过 Western blot 法检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 48 h 后细胞周期进程相关蛋白表达水平。结果发现,与对照组比较, FZKAD 低、中、高剂量组细胞周期进程相关蛋白 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 表达水平均显著降低 ($P<0.01$),且该作用具有明显的剂量依赖性。结果见图 5 及表 4。

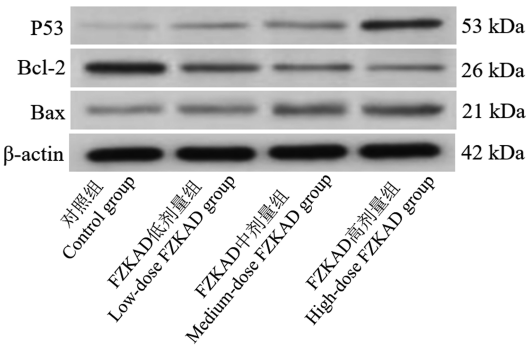


图 3 Western blot 法检测各组细胞 P53、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平

Figure 3 Protein expression levels of P53, Bcl-2 and Bax in each group detected by Western blot

表 2 各组细胞 P53、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Comparison of P53, Bcl-2 and Bax protein expression levels in each group

组别 Groups	P53/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin
对照组 Control group	0.08±0.01	0.63±0.04	0.23±0.02
FZKAD 低剂量组 Low-dose FZKAD group	0.15±0.02 **	0.36±0.04 **	0.26±0.03 *
FZKAD 中剂量组 Medium-dose FZKAD group	0.27±0.02 **	0.30±0.03 **	0.41±0.03 **
FZKAD 高剂量组 High-dose FZKAD group	0.44±0.05 **	0.25±0.02 **	0.52±0.06 **

注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

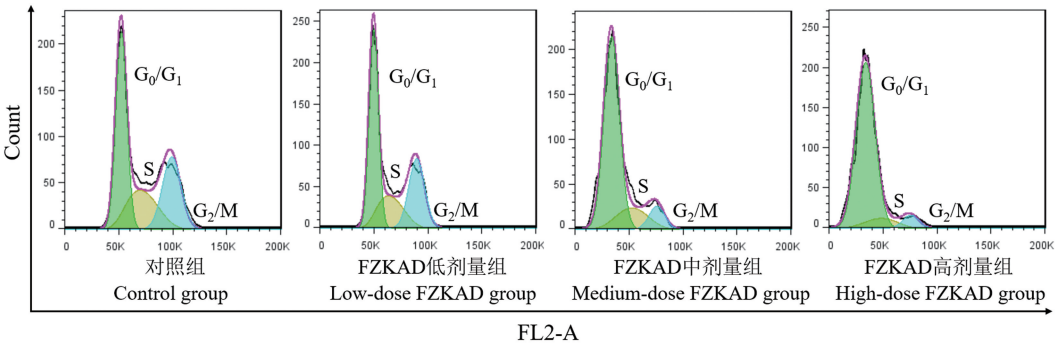


图 4 PI 单染法流式细胞术检测各组细胞周期进程

Figure 4 Cell cycle process determined by flow cytometry using PI single staining

表 3 各组细胞 G₀/G₁ 期、S 期及 G₂/M 期百分比($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Cell percentage of G₀/G₁, S and G₂/M stages in each group

组别 Groups	G ₀ /G ₁ 期 G ₀ /G ₁ stage	S 期 S stage	G ₂ /M 期 G ₂ /M stage
对照组 Control group	43.26±3.24	23.19±3.13	33.25±4.53
FZKAD 低剂量组 Low-dose FZKAD group	49.51±6.41 *	20.87±2.71 *	28.08±2.26 **
FZKAD 中剂量组 Medium-dose FZKAD group	67.78±8.75 **	16.22±1.94 **	14.86±2.11 **
FZKAD 高剂量组 High-dose FZKAD group	82.17±7.10 **	9.47±1.46 **	7.72±0.97 **

注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 4 各组细胞 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Comparison of Cyclin D1, CDK4 and CDK6 protein expression levels in each group

组别 Groups	Cyclin D1/β-actin	CDK4/β-actin	CDK6/β-actin
对照组 Control group	0.78±0.08	0.64±0.05	0.92±0.08
FZKAD 低剂量组 Low-dose FZKAD group	0.59±0.06 **	0.48±0.04 **	0.71±0.08 **
FZKAD 中剂量组 Medium-dose FZKAD group	0.25±0.02 **	0.36±0.03 **	0.27±0.03 **
FZKAD 高剂量组 High-dose FZKAD group	0.10±0.02 **	0.29±0.03 **	0.09±0.01 **

注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

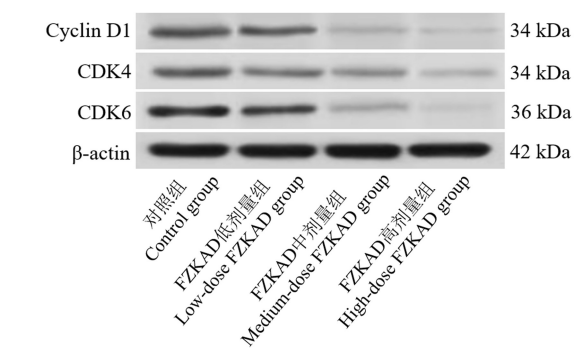


图 5 Western blot 法检测各组细胞 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 蛋白表达水平
Figure 5 Protein expression levels of Cyclin D1, CDK4 and CDK6 in each group detected by Western blot

3 讨论

FZKAD 为历代使用的中医抗癌验方,是治疗各种恶性肿瘤的有效基础方。FZKAD 具有扶正祛邪、解毒消肿、化痰散结、调补气血的功效,可以补正气以驱邪,尤其适用于正气亏损的患者,能改善抗癌效果,不良反应少,现代中医药理学研究表明扶正抗癌汤能明显提高患者的免疫力,减轻放、化疗的毒副作用,并且可以明显改善恶性肿瘤术后患者的生存质量^[8-9]。FZKAD 现已广泛应用于联合放、化疗治疗各系统恶性肿瘤的患者,临床疗效显著^[12]。本研究用 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞后发现,与对照组比较,除低、中剂量组处理 24 h 后的细胞存活率无显著性降低外,其余各组处理 24、48 及 72 h 后的细胞存活率均显著性降低,且各剂量组细胞克隆形成能力也显著降低,表明 FZKAD 含药血

清对 HO-8910PM 细胞的增殖具有抑制作用。
细胞凋亡是基因调控下的一种自发性有序性死亡过程,对机体各组织器官发育及内环境稳定起着十分重要的作用;同时,细胞凋亡与肿瘤的发生、发展密切相关,促进肿瘤细胞发生凋亡是抗肿瘤药物发挥作用的主要机制^[13-14]。P53 是重要的抑癌基因,可以使受损的 DNA 得以修复,避免细胞凋亡,进而影响肿瘤的发生和进展^[15]。细胞色素 C 从线粒体转移至细胞浆是内源性线粒体凋亡途径中的关键步骤,该步骤首先需要线粒体膜透化,而 Bcl-2 主要抵御线粒体膜的透化作用,进而限制细胞凋亡的发生^[16]。在凋亡刺激因子作用于肿瘤细胞后,使 Bax 活化后并与线粒体外膜连接,促进线粒体膜透化及细胞色素 C 进入细胞浆,激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶凋亡途径,最终诱导细胞凋亡的发生^[17]。P53 蛋白也能够特异的促进 Bax 的表达,降低 Bcl-2 的表达,从而影响肿瘤细胞凋亡^[18]。本研究分别通过 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术及 Western blot 法检测了 FZKAD 含药血清对 HO-8910PM 细胞凋亡率及 P53、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响,发现与对照组比较,FZKAD 低、中、高剂量组的细胞凋亡率及 P53、Bax 蛋白表达水平增加,而 Bcl-2 蛋白表达水平降低,从细胞及分子水平上证实了 FZKAD 含药血清具有诱导 HO-8910PM 细胞凋亡的作用。

细胞周期主要分为 DNA 合成前期(G₁ 期)、DNA 合成期(S 期)、DNA 合成后期(G₂ 期)及有丝分裂期(M 期),而 G₀ 期是停止分裂的一个阶段,G₀/G₁ 期、S 期及 G₂/M 期是细胞周期进程中的三个关键阶段^[19]。肿瘤是在遗传因素和环境因素共同

作用下引起的细胞失控性生长及细胞周期紊乱的一类疾病,其分子机制除与细胞凋亡过少有关外,细胞周期紊乱也是导致细胞增殖过多的主要原因^[20]。本研究通过 PI 单染法流式细胞术检测发现,与对照组比较,FZKAD 低、中、高剂量组 G_0/G_1 期细胞百分比增加,而 S 期及 G_2/M 期细胞百分比降低,表现出明显的 G_0/G_1 期阻滞作用。细胞周期进程的精密运作依赖于各级细胞因子的调控,调控因子主要包括细胞周期蛋白(Cyclin)及周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)两类^[21]。本研究通过 Western blot 法检测了 FZKAD 含药血清对细胞周期进程相关蛋白 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 表达水平的影响,发现与对照组比较,FZKAD 低、中、高剂量组 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 蛋白表达水平均显著降低,进一步明确了 FZKAD 含药血清具有诱导 HO-8910PM 细胞周期进程阻滞作用。

综上,FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞的增殖具有抑制作用,该作用与诱导凋亡及周期进程阻滞有关,但深入的机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 沈丽娜,臧荣余. 卵巢癌一级预防研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2023, 50(3): 224-228.

[2] Srivastava A, Gupta A, Patidar S. Review of biomarker systems as an alternative for early diagnosis of ovarian carcinoma [J]. Clin Transl Oncol, 2021, 23(10): 1967-1978.

[3] Voutsadakis IA. Low-grade serous ovarian carcinoma: an evolution toward targeted therapy [J]. Int J Gynecol Cancer, 2020, 30(10): 1619-1626.

[4] Li X, Ouyang Z, Li H, et al. Dendrimer-decorated nanogels: efficient nanocarriers for biodistribution *in vivo* and chemotherapy of ovarian carcinoma [J]. Bioact Mater, 2021, 6(10): 3244-3253.

[5] Lavoué V, Foucher F, Henno S, et al. Immunotherapy in epithelial ovarian carcinoma: hope and reality [J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod, 2014, 43(3): 198-210.

[6] 王淦,杨春娇,温真鹏,等. 基于网络药理学研究蟾毒灵治疗卵巢癌的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(5): 667-674.

[7] 张建丽,崔伟. 自拟益气抗癌方联合 TP 方案治疗上皮性卵巢癌疗效及对免疫指标影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(12): 876-880.

[8] 田璐,张新,张阳. 扶正抗癌汤免疫调节及抑制大鼠卵巢癌移植瘤生长的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 38-43.

[9] 田璐. 扶正抗癌汤含药血清调节 EMT 进程抑制人卵巢癌

HO-8910PM 细胞转移及侵袭作用的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 43-49.

- [10] Lee JS, Sul JY, Park JB, et al. Honokiol induces apoptosis and suppresses migration and invasion of ovarian carcinoma cells via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2019, 43(5): 1969-1978.
- [11] Shi JY, Huang ZR, Gao HY, et al. Anticancer effects of juglone in OVCAR-3 human ovarian carcinoma are facilitated through programmed cell death, endogenous ROS production, inhibition of cell migration and invasion and cell cycle arrest [J]. J BUON, 2021, 26(3): 1188.
- [12] 吴姗姗,王柏山,严峰,等. 服用扶正抗癌方前后非小细胞肺癌患者 CD8⁺T 细胞表达 NKG2D 与其细胞毒活性的相关性分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(5): 549-554.
- [13] 王迅,王李桃,张波. 土木香内酯对 C6 脑胶质瘤细胞迁移侵袭及凋亡的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 317-322.
- [14] Oliveira RC, Abrantes AM, Tralhão JG, et al. The role of mouse models in colorectal cancer research-The need and the importance of the orthotopic models [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(1): 1-8.
- [15] Chen D, Shen Z, Cheng X, et al. Homeobox A5 activates p53 pathway to inhibit proliferation and promote apoptosis of adrenocortical carcinoma cells by inducing Aldo-Keto reductase family 1 member B10 expression [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 1964-1975.
- [16] 辛国松,张晶,李吉业,等. 石蒜碱诱导 H₂₂ 荷瘤小鼠体内肿瘤细胞凋亡的活性及机制研究 [J]. 中国药房, 2021, 32(5): 571-577.
- [17] 马永超,杜晓鹏,李海龙,等. 白细胞介素-6 对胰腺癌荷瘤小鼠移植瘤生长及 Caspase-3/Bax/Bcl-2 信号通路的影响 [J]. 解剖学报, 2020, 51(2): 216-219.
- [18] Yenmis G, Besli N, Yaprak Saraç E, et al. Metformin promotes apoptosis in primary breast cancer cells by downregulation of cyclin D1 and upregulation of P53 through an AMPK-alpha independent mechanism [J]. Turk J Med Sci, 2021, 51(2): 826-834.
- [19] Stefanowicz-Hajduk J, Gucwa M, Moniuszko-Szajwaj B, et al. Bersaldeenin-1, 3, 5-orthoacetate induces caspase-independent cell death, DNA damage and cell cycle arrest in human cervical cancer HeLa cells [J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 54-65.
- [20] Mohiuddin M, Kasahara K. Pemetrexed disodium heptahydrate induces apoptosis and cell-cycle arrest in non-small-cell lung cancer carrying an EGFR exon 19 deletion [J]. Anticancer Res, 2021, 41(6): 2963-2977.
- [21] 杨涛,祁烁,张雅月,等. 基于网络药理学探索芪甲扶正方治疗非小细胞肺癌的分子机制 [J]. 中医学报, 2019, 34(11): 2417-2424.