鸦胆子苦醇调节SPHK1/S1P/S1PR3信号通路对卵巢癌细胞恶性生物学行为的影响Δ

钟明艳[1*]，杨　帆[2#]，李海珍[3]，占　琪[1]，张　伟[1]（1.九江市妇幼保健院药剂科，江西 九江　332000；2.九江市妇幼保健院妇科，江西 九江　332000；3.九江学院附属医院药剂科，江西 九江　332000）

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）16-1991-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.16.09

摘　要　目的　探讨鸦胆子苦醇调节鞘氨醇激酶1（SPHK1）/鞘氨醇-1-磷酸（S1P）/鞘氨醇-1-磷酸酯受体3（S1PR3）信号通路对卵巢癌细胞恶性生物学行为的影响。**方法**　将体外培养的人卵巢癌细胞株SKOV-3随机分为对照组、鸦胆子苦醇组、SPHK1过表达组、鸦胆子苦醇+空载组、鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组，检测各组细胞活力、克隆形成率、迁移数、侵袭数、凋亡率以及增殖相关蛋白[骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物（C-myc）]、凋亡相关蛋白[B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）]、上皮间质转化（EMT）相关蛋白[上皮钙黏素（E-cadherin）、神经钙黏素（N-cadherin）]及SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量。采用SKOV-3细胞构建裸鼠移植瘤模型，随机分为对照组、鸦胆子苦醇低剂量组、鸦胆子苦醇中剂量组、鸦胆子苦醇高剂量组、SPHK1过表达组、鸦胆子苦醇高剂量+空载组、鸦胆子苦醇高剂量+SPHK1过表达组，检测各组移植瘤生长情况；随机分为对照组、鸦胆子苦醇组、SPHK1过表达组、鸦胆子苦醇+空载组、鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组，检测各组移植瘤组织中增殖、凋亡、EMT及SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达量。**结果**　体外实验显示，与对照组相比，鸦胆子苦醇组细胞活力、克隆形成率、迁移数、侵袭数和C-myc、Bcl-2、N-cadherin、SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），凋亡率和Bax、E-cadherin蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）；过表达SPHK1可减弱鸦胆子苦醇对SKOV-3细胞上述指标的影响。体内实验显示，与对照组相比，鸦胆子苦醇低、中、高剂量组裸鼠干预21 d后的移植瘤体积均显著降低并呈剂量依赖性（$P<0.05$）；高剂量鸦胆子苦醇还可显著降低移植瘤组织中C-myc、Bcl-2、N-cadherin、SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量（$P<0.05$），显著升高Bax、E-cadherin蛋白表达量（$P<0.05$）；过表达SPHK1可减弱鸦胆子苦醇对移植瘤组织上述指标的影响。**结论**　鸦胆子苦醇可通过下调SPHK1/S1P/S1PR3信号通路蛋白表达，进而抑制卵巢癌细胞体外增殖、克隆、EMT、迁移及侵袭并诱导其凋亡，还可抑制卵巢癌细胞在裸鼠体内的生长，最终抑制其恶性生物学行为，对卵巢癌起到显著的抗癌功效。

关键词　鸦胆子苦醇；SPHK1/S1P/S1PR3信号通路；卵巢癌；恶性生物学行为

Effects of brusatol on the malignant biological behavior of ovarian cancer cells by regulating SPHK1/S1P/S1PR3 signaling pathway

ZHONG Mingyan[1], YANG Fan[2], LI Haizhen[3], ZHAN Qi[1], ZHANG Wei[1] (1. Dept. of Pharmacy, Jiujiang Maternal and Child Health Care Hospital, Jiangxi Jiujiang 332000, China; 2. Dept. of Gynaecology, Jiujiang Maternal and Child Health Care Hospital, Jiangxi Jiujiang 332000, China; 3. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiangxi Jiujiang 332000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of brusatol on the malignant biological behavior of ovarian cancer cells by regulating the sphingosine kinase 1 (SPHK1)/sphingosine-1-phosphate (S1P)/sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1PR3) signaling pathway. **METHODS** Human ovarian cancer cell strain SKOV-3 were randomly divided into control group, brusatol group, SPHK1 overexpression group, brusatol+blank load group, brusatol+SPHK1 overexpression group. The cell viability, colony formation rate, the number of migration and invasion, apoptosis rate, the expressions of cell proliferation-related proteins [myelocytomatosis viral oncogene homolog (C-myc)], apoptosis-related proteins [B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax)], epithelial mesenchymal transition (EMT)-related proteins (E-cadherin, N-cadherin) and SPHK1, S1P, S1PR3 proteins were all detected in each group. Transplanted tumor model of nude mice was constructed by using SKOV-3 cells and randomly separated into control group, brusatol low-dose, medium-dose and high-dose groups, SPHK1 overexpression group, high-dose brusatol+blank load group, and high-dose brusatol+SPHK1 overexpression group; the growth of transplanted tumors were detected. The nude mice model of SKOV-3 transplantation tumor was randomly divided into control group, brusatol group, SPHK1 overexpression group, brusatol+blank load group, and brusatol+SPHK1 overexpression group; the proliferation and apoptosis of transplanted tumor tissue, the expressions of EMT-related proteins and SPHK1/S1P/S1PR3 signaling pathway proteins were detected in each group. **RESULTS** Cell experiments *in vitro* had shown that compared with the control group, the cell viability, clone formation rate, migration number, invasion

Δ**基金项目** 江西省中医药管理局科技计划项目（No.2023B0762）

＊**第一作者** 副主任药师。研究方向：药学研究及药理学。E-mail：jsgj2023@126.com

＃**通信作者** 主任医师，硕士。研究方向：妇科及妇科肿瘤学。E-mail：11638199@qq.com

number, protein expressions of C-myc, Bcl-2, N-cadherin, SPHK1, S1P and S1PR3 were decreased significantly in brusatol group ($P<0.05$), while the apoptosis rate, protein expressions of Bax and E-cadherin were increased significantly ($P<0.05$); overexpression of SPHK1 could weaken the effects of brusatol on the above indicators in SKOV-3 cells. Mice experiments *in vivo* had shown that compared with the control group, the transplanted tumor volumes of nude mice in the brusatol low-dose, medium-dose and high-dose groups were decreased significantly in a dose-dependent manner after 21 days of intervention ($P<0.05$). Brusatol of high dose could also significantly reduce the protein expressions of C-myc, Bcl-2, N-cadherin, SPHK1, S1P and S1PR3 in transplanted tumor tissue of nude mice ($P<0.05$), and significantly increase the protein expressions of Bax and E-cadherin ($P<0.05$); overexpression of SPHK1 could weaken the effects of brusatol on the above indicators in transplanted tumor tissue of nude mice. **CONCLUSIONS** Brusatol can inhibit the proliferation, cloning, EMT, migration and invasion of ovarian cancer cells, and induce their apoptosis by down-regulating the expression of SPHK1/S1P/S1PR3 signaling pathway. It can also inhibit the growth of ovarian cancer cells in nude mice, ultimately suppressing their malignant biological behavior and exerting significant anti-cancer effects on ovarian cancer.

KEYWORDS brusatol; SPHK1/S1P/S1PR3 signaling pathway; ovarian cancer; malignant biological behavior

卵巢癌是一种发生于卵巢的恶性肿瘤，易误诊且恶性程度高，预后很差，严重威胁着妇女的健康和生命，且患者的复发率、死亡率也很高[1]。鞘氨醇激酶1（sphingosine kinase 1，SPHK1）一种保守的脂质激酶，可催化鞘氨醇-1-磷酸（sphingosine-1-phosphate，S1P）和鞘氨醇-1-磷酸酯受体3（sphingosine-1-phosphate receptor 3，S1PR3）结合，进而促进肿瘤生长[2]。已有研究发现，抑制SPHK1表达可抑制结肠癌、淋巴管平滑肌瘤、非小细胞肺癌等细胞增殖、生长[3-4]。由此可见，抑制SPHK1/S1P/S1PR3信号通路激活可能是防治卵巢癌的有效手段。

鸦胆子苦醇是来源于鸦胆子的一种三萜内酯化合物，是核转录因子红系2相关因子2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2，Nrf2）信号的特异性抑制剂，在体内外均具有明显的抗肿瘤作用[5]，可逆转脂多糖诱导的人胃癌细胞SGC-7901上皮间质转化（epithelial mesenchymal transition，EMT）并诱导其凋亡[6]，并可通过促进活性氧生成而增强虎杖苷对三阴乳腺癌的抗肿瘤作用[7]，因而推测鸦胆子苦醇可能对卵巢癌也具有抑制作用。本文通过体外培养人卵巢癌细胞株SKOV-3并构建其裸鼠移植瘤模型，研究鸦胆子苦醇调节SPHK1/S1P/S1PR3信号通路对卵巢癌细胞恶性生物学行为的影响。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括WEF-2008型全自动酶标仪[沃尔福（上海）实业有限公司]，XSP-20C型研究级倒置生物显微镜（上海光密仪器有限公司），SureLock Tandem中型转印模块、iBright型凝胶成像系统、SureLock Tandem中型胶电泳槽[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

鸦胆子苦醇标准品（批号B26016，纯度≥98%）购于上海源叶生物科技有限公司；空载质粒、SPHK1过表达质粒（批号分别为CH800007、CH800028）均购于山东维真生物科技有限公司；CCK-8试剂盒（批号ab228554）、结晶紫染色液（批号ab246820）、原位末端标记法（TUNEL）检测试剂盒（批号ab66108）和兔源抗人B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）、骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物（myelocytomatosis viral oncogene homolog，C-myc）、上皮钙黏素（E-cadherin）、S1P、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）、神经钙黏素（N-cadherin）、SPHK1一抗（批号分别为ab182858、ab182734、ab32072、ab227639、ab224618、ab9485、ab76011、ab302714）及辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的山羊抗兔二抗（批号ab6721）均购于英国Abcam公司；兔源抗人S1PR3一抗（批号A67154-020）购于武汉艾美捷科技有限公司。

1.3 细胞与实验动物

人卵巢癌细胞株SKOV-3购于上海博湖生物科技有限公司，在－80 ℃冰箱冻存。BALB/c-Nu裸鼠，SPF级，鼠龄5～6周，雌性，体重16～18 g，购于武汉大学动物实验中心，生产许可证号为SCXK（鄂）2019-0004，在温度23～25 ℃、相对湿度50%～60%且保持屏障环境的动物房中适应性饲养，并符合3R原则。本实验获得九江市妇幼保健院医学伦理委员会审批通过（批件号为2023-0912）。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 鸦胆子苦醇最佳作用浓度筛选

自－80 ℃冰箱中迅速取出SKOV-3细胞并在39.6 ℃温水浴内解冻，室温下以1 000 r/min离心5 min，采用DMEM培养基（于DMEM高糖基础培养基中加入10%胎牛血清、1%青-链霉素混匀而成）洗涤细胞沉淀后进行复苏培养。取传代2次的SKOV-3细胞以1×10^4个/孔的密度在96孔板中接种培养至对数生长期，分别以终浓度为0、2.5、5、10、20、30 μmol/L的鸦胆子苦醇（溶于二甲基亚砜后以培养基稀释到相应浓度，下同）处理[8]，将0 μmol/L鸦胆子苦醇处理的细胞设为对照组，并设置不接种细胞、不加药的培养孔作为空白对照组，每

组6个复孔。24 h后每孔加入CCK-8试剂20 μL继续培养2 h，混匀后在酶标仪中检测各组于450 nm波长处的光密度（optical density，OD），根据下列公式计算细胞活力，细胞活力＝（药物处理组OD－空白对照组OD）/（对照组OD－空白对照组OD）×100%。选择接近半数抑制浓度的鸦胆子苦醇进行后续实验。

2.1.2　细胞分组与处理

取传代2次的SKOV-3细胞以1×10^5个/孔的密度在24孔板中接种培养至对数生长期，随机分为对照组、鸦胆子苦醇组（20 μmol/L，根据“2.1.1”项下实验结果设置）、SPHK1过表达组、鸦胆子苦醇+空载组、鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组，每组6个复孔。对照组细胞不做任何处理；鸦胆子苦醇组细胞以20 μmol/L的鸦胆子苦醇处理24 h；SPHK1过表达组细胞转染SPHK1过表达质粒（用生理盐水溶解质粒，剂量按说明书设定）24 h；鸦胆子苦醇+空载组、鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组细胞分别提前转染空载质粒或SPHK1过表达质粒24 h后再以20 μmol/L的鸦胆子苦醇处理24 h。

2.1.3　细胞增殖、凋亡检测

（1）CCK-8法检测细胞活力。取传代2次的SKOV-3细胞以1×10^4个/孔的密度在96孔板中接种培养至对数生长期，按“2.1.2”项下方法分组处理，按CCK-8法检测各组细胞活力，具体操作如“2.1.1”项下所示。

（2）克隆形成实验检测细胞克隆形成率。取“2.1.2”项下方法分组处理后的细胞，以DMEM培养基洗涤后制成1×10^2个/mL细胞悬液。每组取2.5 mL细胞悬液接种至12孔板中，继续培养2周后以磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤、4%多聚甲醛室温固定、结晶紫染料室温染色、PBS洗涤后，于每个细胞孔内加入1 mL冰醋酸溶解染料，酶标仪检测各组细胞于590 nm波长处的OD，根据下列公式计算克隆形成率，克隆形成率＝实验组OD/对照组OD×100%。

（3）TUNEL实验检测细胞凋亡率。取“2.1.2”项下方法分组处理后的细胞，以PBS漂洗后用4%多聚甲醛固定，按TUNEL检测试剂盒说明书方法进行操作，在显微镜下拍照后量化各组细胞凋亡率，凋亡率＝凋亡细胞数/总细胞数×100%。

2.1.4　细胞迁移和侵袭能力检测

取“2.1.2”项下方法分组处理后的细胞，以不含血清的DMEM培养基洗涤后制成每1 mL含1×10^6个细胞的细胞悬液。每组取1.5 mL细胞悬液接种到24孔Transwell板上室，每组6个复孔，培养3 h后在下室加入含血清的DMEM培养基，继续培养24 h。擦去上室细胞并对下室细胞行结晶紫染色，在显微镜下观察并取5个任意视野拍照，计数每个视野细胞数量取平均值，即迁移数。细胞侵袭数检测时除了24孔Transwell板上室以基质胶提前进行包被外，其他操作与迁移数检测方法相同。

2.1.5　细胞中增殖、凋亡、EMT及SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达检测

取“2.1.2”项下方法分组处理后的细胞，用RIPA试剂进行裂解，于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，提取总蛋白，使用BCA法检测蛋白总浓度后，于100 ℃下变性5 min。每组取30 μg变性后的总蛋白样本，电泳、分离、转印后，室温下用5%脱脂奶粉溶液封闭；加入C-myc、Bcl-2、Bax、E-cadherin、N-cadherin、SPHK1、S1P、S1PR3、GAPDH一抗（稀释度均为1∶2 000），于4 ℃下孵育12 h；用TBST缓冲液充分洗涤后，加入二抗（稀释度为1∶1 000），于室温下孵育2 h；再次充分洗涤后用化学发光法显色，在凝胶成像系统中采集各组蛋白图像，以Image pro软件定量其灰度值后，以内参（GAPDH）为标准对各组目的蛋白表达量进行量化。

2.2　体内实验

2.2.1　造模、分组与处理

取传代2次的SKOV-3细胞，使用PBS制成每1 mL含1×10^7个细胞的细胞悬液，于裸鼠右前腋皮下注射0.2 mL来构建SKOV-3移植瘤裸鼠模型[9]，10 d后发现裸鼠皮下长出硬质肿块表明造膜成功。将造模成功的裸鼠随机分为对照组、鸦胆子苦醇低剂量组、鸦胆子苦醇中剂量组、鸦胆子苦醇高剂量组、SPHK1过表达组、鸦胆子苦醇高剂量+空载组、鸦胆子苦醇高剂量+SPHK1过表达组，每组6只。鸦胆子苦醇低、中、高剂量组裸鼠分别腹腔注射1、2、3 mg/kg的鸦胆子苦醇（溶于二甲基亚砜后以PBS稀释到0.1、0.2、0.3 mg/mL）[7]；SPHK1过表达组裸鼠瘤内注射SPHK1过表达质粒（用生理盐水溶解质粒，剂量按说明书设定）[9]，同时腹腔注射10 mL/kg生理盐水；鸦胆子苦醇高剂量+空载组、鸦胆子苦醇高剂量+SPHK1过表达组裸鼠腹腔注射3 mg/kg的鸦胆子苦醇，同时分别瘤内注射空载质粒、SPHK1过表达质粒；对照组裸鼠腹腔注射等体积生理盐水，同时瘤内注射与鸦胆子苦醇高剂量+SPHK1过表达组中SPHK1过表达质粒等体积的生理盐水。各组裸鼠每周均给药2次（周一和周四给药），连续干预3周（即21 d）。

2.2.2　移植瘤生长检测

裸鼠首次给药前使用标尺测量各组裸鼠皮下肿瘤最长径和最短径，将此时记为0 d，根据下列公式计算移植瘤体积，移植瘤体积＝最长径×最短径^2×0.5。每3 d测量1次，21 d共测量7次。

2.2.3　移植瘤组织中增殖、凋亡、EMT及SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达检测

按“2.2.1”项下方法构建SKOV-3移植瘤裸鼠模型，将造模成功的裸鼠随机分为对照组、鸦胆子苦醇组、SPHK1过表达组、鸦胆子苦醇+空载组、鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组，每组6只。各组裸鼠干预方式按“2.2.1”项下方法操作，其中鸦胆子苦醇的给药浓度均为3 mg/kg。干预21 d后颈椎脱臼处死各组裸鼠，剥离出移

植瘤体，剪下约0.5 g移植瘤组织用RIPA试剂裂解并提取总蛋白，按“2.1.5”项下方法检测各组移植瘤组织中C-myc、Bcl-2、Bax、E-cadherin、N-cadherin、SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量。

2.3 统计学分析

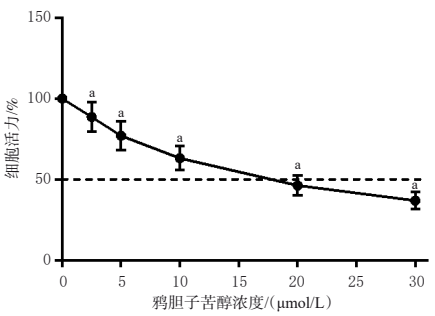
采用Graph Pad Prism 8.0软件进行统计学分析，本实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha<0.05$。

3 结果

3.1 体外实验结果

3.1.1 鸦胆子苦醇对细胞活力的影响

与对照组（0 μmol/L的鸦胆子苦醇）相比，2.5、5、10、20、30 μmol/L的鸦胆子苦醇均可显著降低SKOV-3细胞活力，鸦胆子苦醇的半数抑制浓度约为20 μmol/L。结果见图1。



a：与0 μmol/L的鸦胆子苦醇相比，$P<0.05$。

图1 不同浓度鸦胆子苦醇对SKOV-3细胞活力的影响（$n=6$）

3.1.2 鸦胆子苦醇对细胞增殖、凋亡的影响

与对照组相比，鸦胆子苦醇组、鸦胆子苦醇+空载组细胞活力、克隆形成率均显著降低（$P<0.05$），凋亡率均显著升高（$P<0.05$）；SPHK1过表达组细胞活力、克隆形成率均显著升高（$P<0.05$），凋亡率显著降低（$P<0.05$）。与鸦胆子苦醇组相比，鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组细胞活力、克隆形成率均显著升高（$P<0.05$），凋亡率显著降低（$P<0.05$）；鸦胆子苦醇+空载组细胞活力、克隆形成率、凋亡率均无明显变化（$P>0.05$）。结果见表1、图2、图3。

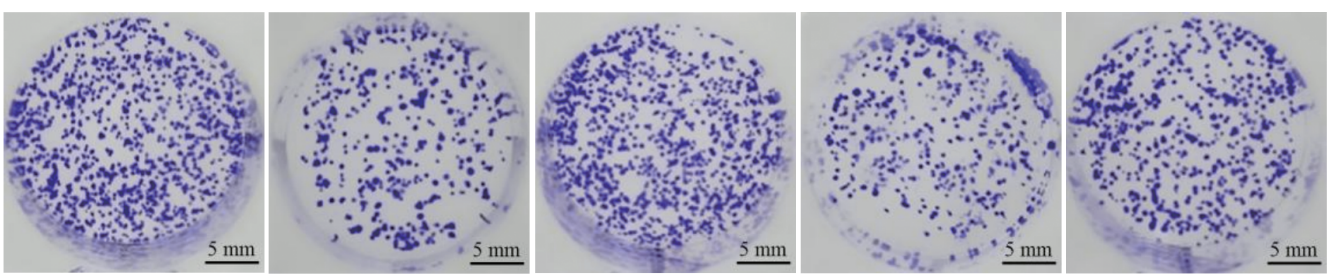
表1 各组细胞活力、克隆形成率、凋亡率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，%）

组别	细胞活力	克隆形成率	凋亡率
对照组	100.00	100.00	5.24±1.73
鸦胆子苦醇组	45.87±8.90[a]	42.69±7.72[a]	60.14±2.56[a]
SPHK1过表达组	213.85±16.49[a]	220.68±15.39[a]	0.65±0.20[a]
鸦胆子苦醇+空载组	47.15±10.16[a]	43.12±6.75[a]	63.73±1.84[a]
鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组	91.94±11.94[b]	92.81±10.63[b]	4.15±1.32[b]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与鸦胆子苦醇组相比，$P<0.05$。

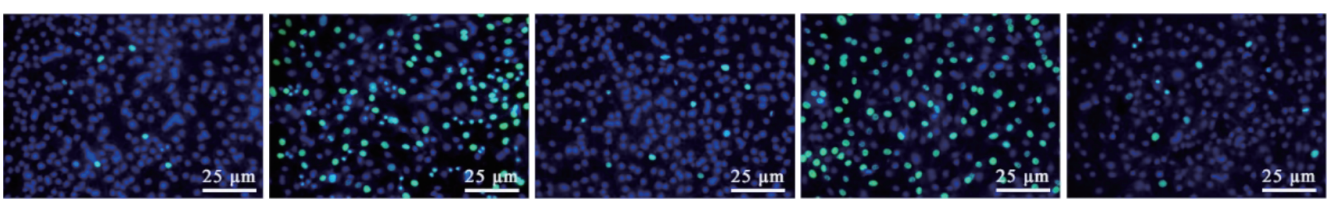
3.1.3 鸦胆子苦醇对细胞迁移与侵袭的影响

与对照组相比，鸦胆子苦醇组、鸦胆子苦醇+空载组细胞迁移数、侵袭数均显著降低（$P<0.05$）；SPHK1过表达组细胞迁移数、侵袭数均显著升高（$P<0.05$）。与鸦胆子苦醇组相比，鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组细胞迁移数、侵袭数均显著升高（$P<0.05$）；鸦胆子苦醇+空载组细胞迁移数、侵袭数均无明显变化（$P>0.05$）。结果见图4、图5、表2。



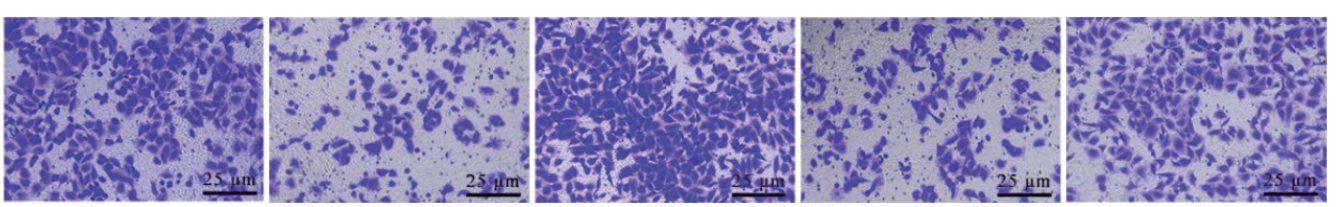
A.对照组　B.鸦胆子苦醇组　C. SPHK1过表达组　D.鸦胆子苦醇+空载组　E.鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组

图2 各组细胞克隆形成实验结果（结晶紫染色）



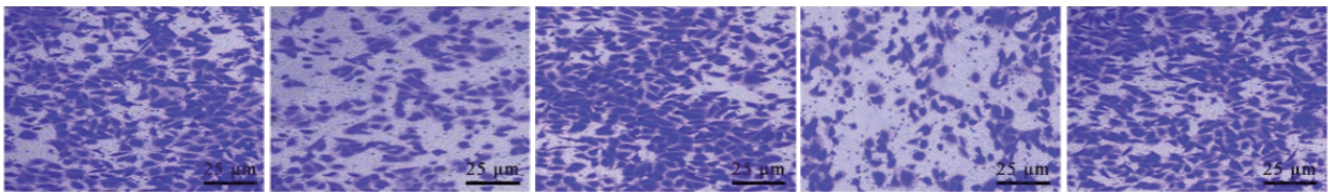
A.对照组　B.鸦胆子苦醇组　C. SPHK1过表达组　D.鸦胆子苦醇+空载组　E.鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组

图3 各组细胞凋亡的显微镜图（TUNEL染色）



A.对照组　B.鸦胆子苦醇组　C. SPHK1过表达组　D.鸦胆子苦醇+空载组　E.鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组

图4 各组细胞迁移的显微镜图（结晶紫染色）



A. 对照组　B. 鸦胆子苦醇组　C. SPHK1过表达组　D. 鸦胆子苦醇+空载组　E. 鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组

图5　各组细胞侵袭的显微镜图（结晶紫染色）

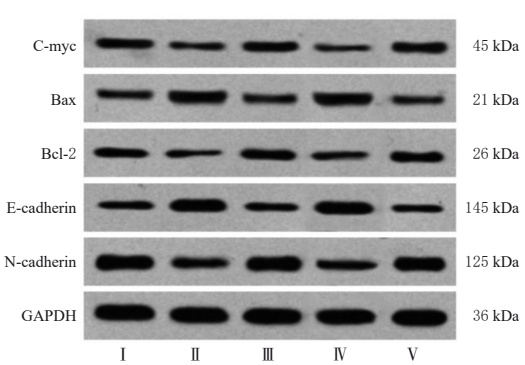
表2　各组细胞迁移数和侵袭数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，个）

组别	细胞迁移数	细胞侵袭数
对照组	276.50±25.24	302.35±28.13
鸦胆子苦醇组	80.95±16.75[a]	92.10±17.82[a]
SPHK1过表达组	460.15±30.37[a]	595.20±31.74[a]
鸦胆子苦醇+空载组	82.78±15.14[a]	95.50±18.32[a]
鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组	252.80±17.10[b]	275.65±25.36[b]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与鸦胆子苦醇组相比，$P<0.05$。

3.1.4　鸦胆子苦醇对细胞增殖、凋亡及EMT相关蛋白表达的影响

与对照组相比，鸦胆子苦醇组、鸦胆子苦醇+空载组细胞中Bax、E-cadherin蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$），C-myc、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$）；SPHK1过表达组细胞中Bax、E-cadherin蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），C-myc、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）。与鸦胆子苦醇组相比，鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组细胞中Bax、E-cadherin蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），C-myc、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）；鸦胆子苦醇+空载组细胞中C-myc、Bax、E-cadherin、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量均无明显变化（$P>0.05$）。结果见图6、表3。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：鸦胆子苦醇组；Ⅲ：SPHK1过表达组；Ⅳ：鸦胆子苦醇+空载组；Ⅴ：鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组。

图6　各组细胞中增殖、凋亡及EMT相关蛋白表达的电泳图

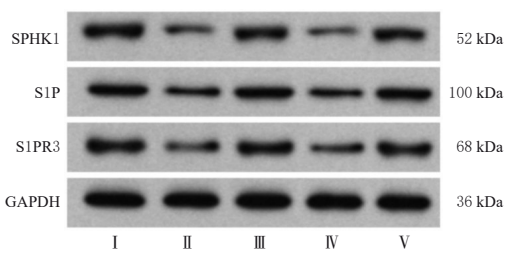
3.1.5　鸦胆子苦醇对细胞中SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比，鸦胆子苦醇组、鸦胆子苦醇+空载组细胞中SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$）；SPHK1过表达组细胞中SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）。与鸦胆子苦醇组相比，鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组细胞中SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）；鸦胆子苦醇+空载组细胞中SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均无明显变化（$P>0.05$）。结果见图7、表4。

表3　各组细胞中增殖、凋亡及EMT相关蛋白表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	C-myc/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	E-cadherin/GAPDH	N-cadherin/GAPDH
对照组	0.67±0.08	0.56±0.05	0.42±0.08	0.40±0.04	0.81±0.12
鸦胆子苦醇组	0.24±0.05[a]	0.14±0.03[a]	0.87±0.11[a]	0.87±0.07[a]	0.37±0.08[a]
SPHK1过表达组	1.18±0.13[a]	0.99±0.10[a]	0.09±0.02[a]	0.08±0.01[a]	1.32±0.17[a]
鸦胆子苦醇+空载组	0.23±0.06[a]	0.13±0.03[a]	0.85±0.10[a]	0.91±0.11[a]	0.36±0.06[a]
鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组	0.63±0.06[b]	0.53±0.04[b]	0.45±0.10[a]	0.32±0.05[b]	0.78±0.09[b]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与鸦胆子苦醇组相比，$P<0.05$。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：鸦胆子苦醇组；Ⅲ：SPHK1过表达组；Ⅳ：鸦胆子苦醇+空载组；Ⅴ：鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组。

图7　各组细胞中SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达的电泳图

表4　各组细胞中SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

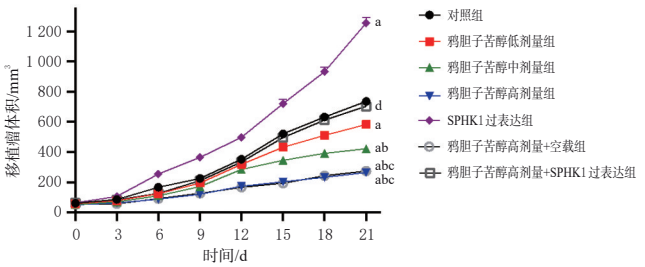
组别	SPHK1/GAPDH	S1P/GAPDH	S1PR3/GAPDH
对照组	0.43±0.06	0.48±0.08	0.60±0.10
鸦胆子苦醇组	0.10±0.03[a]	0.15±0.04[a]	0.22±0.06[a]
SPHK1过表达组	0.83±0.07[a]	0.94±0.09[a]	1.10±0.12[a]
鸦胆子苦醇+空载组	0.09±0.02[a]	0.16±0.03[a]	0.21±0.05[a]
鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组	0.40±0.04[b]	0.45±0.06[b]	0.57±0.08[b]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与鸦胆子苦醇组相比，$P<0.05$。

3.2　体内实验结果

3.2.1　鸦胆子苦醇对裸鼠移植瘤生长的影响

与对照组相比，鸦胆子苦醇低、中、高剂量组和鸦胆子苦醇高剂量+空载组裸鼠干预21 d后的移植瘤体积均显著降低（$P<0.05$），且鸦胆子苦醇各剂量组之间呈剂量依赖性（$P<0.05$）；SPHK1过表达组裸鼠干预21 d后的移植瘤体积显著增加（$P<0.05$）。与鸦胆子苦醇高剂量组相比，鸦胆子苦醇高剂量+SPHK1过表达组裸鼠干预21 d后的移植瘤体积显著增加（$P<0.05$）；鸦胆子苦醇高剂量+空载组裸鼠干预21 d的移植瘤体积无明显变化（$P>0.05$）。结果见图8、图9。



a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与鸦胆子苦醇低剂量组相比，$P<0.05$；c：与鸦胆子苦醇中剂量组相比，$P<0.05$；d：与鸦胆子苦醇高剂量组相比，$P<0.05$。

图8　各组裸鼠移植瘤生长情况比较（$n=6$）

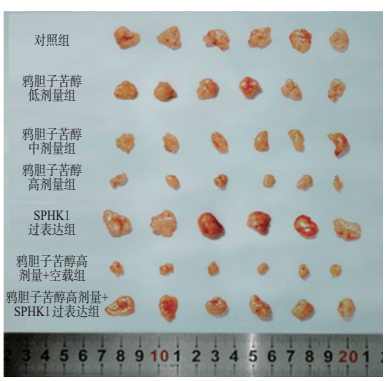


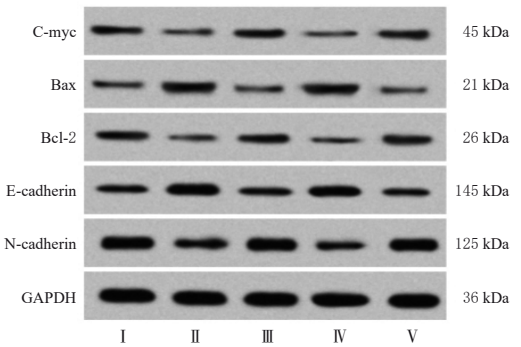
图9　各组裸鼠干预21 d的移植瘤图像

3.2.2　鸦胆子苦醇对移植瘤组织中增殖、凋亡及EMT相关蛋白表达的影响

与对照组相比，鸦胆子苦醇组、鸦胆子苦醇+空载组移植瘤组织中Bax、E-cadherin蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$），C-myc、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$）；SPHK1过表达组移植瘤组织中Bax、E-cadherin蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），C-myc、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）。与鸦胆子苦醇组相比，鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组移植瘤组织中Bax、E-cadherin蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），C-myc、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）；鸦胆子苦醇+空载组移植瘤组织中C-myc、Bax、E-cadherin、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量均无明显变化（$P>0.05$）。结果见图10、表5。

3.2.3　鸦胆子苦醇对移植瘤组织中SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比，鸦胆子苦醇组、鸦胆子苦醇+空载组移植瘤组织中SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$）；SPHK1过表达组移植瘤组织中SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）。与鸦胆子苦醇组相比，鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组移植瘤组织中SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$）；鸦胆子苦醇+空载组移植瘤组织中SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量均无明显变化（$P>0.05$）。结果见图11、表6。



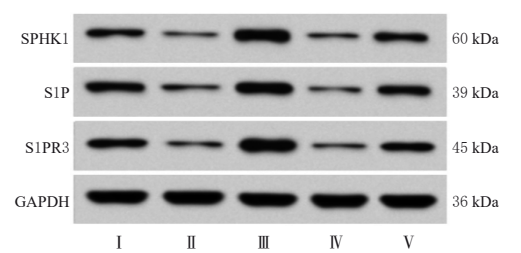
Ⅰ：对照组；Ⅱ：鸦胆子苦醇组；Ⅲ：SPHK1过表达组；Ⅳ：鸦胆子苦醇+空载组；Ⅴ：鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组。

图10　各组移植瘤组织中增殖、凋亡及EMT相关蛋白表达的电泳图

表5　各组移植瘤组织中增殖、凋亡及EMT相关蛋白表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	C-myc/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	E-cadherin/GAPDH	N-cadherin/GAPDH
对照组	0.65±0.06	0.48±0.05	0.59±0.06	0.57±0.05	0.71±0.07
鸦胆子苦醇组	0.20±0.02[a]	0.98±0.10[a]	0.12±0.02[a]	1.08±0.10[a]	0.30±0.03[a]
SPHK1过表达组	1.06±0.14[a]	0.10±0.02[a]	1.09±0.13[a]	0.13±0.03[a]	1.20±0.15[a]
鸦胆子苦醇+空载组	0.21±0.04[a]	0.97±0.09[a]	0.11±0.02[a]	1.07±0.12[a]	0.29±0.04[a]
鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组	0.62±0.05[b]	0.40±0.07[a]	0.56±0.05[b]	0.29±0.02[b]	0.68±0.10[b]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与鸦胆子苦醇组相比，$P<0.05$。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：鸦胆子苦醇组；Ⅲ：SPHK1过表达组；Ⅳ：鸦胆子苦醇+空载组；Ⅴ：鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组。

图11　各组移植瘤组织中SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达的电泳图

表6　各组移植瘤组织中SPHK1/S1P/S1PR3信号通路相关蛋白表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	SPHK1/GAPDH	S1P/GAPDH	S1PR3/GAPDH
对照组	0.41±0.04	0.46±0.05	0.54±0.07
鸦胆子苦醇组	0.07±0.01[a]	0.12±0.02[a]	0.16±0.04[a]
SPHK1过表达组	0.85±0.06[a]	0.90±0.08[a]	0.97±0.10[a]
鸦胆子苦醇+空载组	0.08±0.02[a]	0.11±0.03[a]	0.17±0.03[a]
鸦胆子苦醇+SPHK1过表达组	0.39±0.03[b]	0.44±0.07[b]	0.52±0.06[b]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与鸦胆子苦醇组相比，$P<0.05$。

4　讨论

手术是治疗卵巢癌的常用临床方法，术后辅助化疗以及近年来开发的免疫治疗、分子靶向治疗等新型治疗方法均可有效提升患者的生存率，但由于该病难以根治，患者容易复发，且临床对复发或晚期患者的治疗效果欠佳[10]，因此还需寻找更有效的治疗方法。鸦胆子苦醇是从鸦胆子中分离得到的一种具有明显抗癌作用的天然Nrf2抑制剂，可对子宫内膜癌、结直肠癌、肺癌细胞发挥明显的抗癌作用，在各种癌症的治疗中具有很好的

应用前景[11-12]。本文体外实验结果显示，以20 μmol/L的鸦胆子苦醇处理SKOV-3细胞，可有效降低其细胞活力、克隆形成率、迁移数、侵袭数以及C-myc、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量，并提高其凋亡率和Bax、E-cadherin蛋白表达量，表明鸦胆子苦醇可抑制卵巢癌细胞增殖、克隆、EMT、侵袭及迁移；体内实验结果显示，以不同剂量鸦胆子苦醇处理SKOV-3移植瘤模型裸鼠，可延缓移植瘤生长；以3 mg/kg的鸦胆子苦醇处理模型裸鼠，可降低其移植瘤组织中C-myc、Bcl-2、N-cadherin蛋白表达量，并升高Bax、E-cadherin蛋白表达量，表明鸦胆子苦醇可延缓SKOV-3细胞在裸鼠体内的生长，诱导其凋亡并抑制其EMT过程。

SPHK1/S1P/S1PR3信号通路可调控癌细胞生长、死亡、转移及侵袭等生物学行为，其信号通路蛋白表达在癌细胞中上调，与人类癌症的发生及恶性进展关系密切，在人类淋巴瘤中上调并对肿瘤患者无进展生存率和总生存率产生负面影响，并有助于多种肿瘤细胞的侵袭性生长[13-14]，而抑制SPHK1表达可使脂肪细胞诱导的上皮性卵巢癌转移能力降低[15]，因而SPHK1/S1P/S1PR3信号通路可作为卵巢癌的潜在防治靶点。本文结果显示，以不同剂量鸦胆子苦醇处理SKOV-3细胞，可降低其SPHK1、S1P、S1PR3蛋白表达量，表明SPHK1/S1P/S1PR3信号通路参与介导鸦胆子苦醇对卵巢癌恶性生物学行为的抑制作用；以鸦胆子苦醇和SPHK1过表达质粒联合处理SKOV-3细胞及其裸鼠移植瘤模型，可减弱鸦胆子苦醇单独处理对卵巢癌细胞增殖、克隆、EMT、侵袭及迁移的抑制作用，拮抗其对卵巢癌细胞的促凋亡作用及其对卵巢癌细胞在裸鼠体内生长的延缓作用，削弱其对卵巢癌恶性生物学行为的抑制作用，最终逆转其对卵巢癌的抗癌功效。

综上所述，鸦胆子苦醇可通过下调SPHK1/S1P/S1PR3信号通路蛋白表达，进而抑制卵巢癌细胞体外增殖、克隆、EMT、迁移及侵袭并诱导其凋亡，还可抑制卵巢癌细胞在裸鼠体内的生长，最终抑制其恶性生物学行为，对卵巢癌起到显著的抗癌功效。但本文并没有深入探讨SPHK1调控S1P与S1PR3分子的具体机制，后续需进一步研究。

参考文献

[1] DING H G, ZHANG J, ZHANG F, et al. Nanotechnological approaches for diagnosis and treatment of ovarian cancer: a review of recent trends[J]. Drug Deliv, 2022, 29(1): 3218-3232.

[2] SONG K Q, DAI L, LONG X R, et al. Follicle-stimulating hormone promotes the proliferation of epithelial ovarian cancer cells by activating sphingosine kinase [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 13834.

[3] LONG J T, YAO Z J, SUI Y, et al. SPHK1 promotes cancer progression through activating JAK/STAT pathway and up-regulating S1PR1 expression in colon cancer cells [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(2): 254-260.

[4] LIN Z J, LI Y, HAN X, et al. Targeting SPHK1/PBX1 axis induced cell cycle arrest in non-small cell lung cancer [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21): 12741.

[5] YU X Q, SHANG X Y, HUANG X X, et al. Brusatol: a potential anti-tumor quassinoid from *Brucea javanica*[J]. Chin Herb Med, 2020, 12(4): 359-366.

[6] CHEN H, JIANG T, CHEN H, et al. Brusatol reverses lipopolysaccharide-induced epithelial-mesenchymal transformation and induces apoptosis through PI3K/Akt/NF-κB pathway in human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(4): 394-404.

[7] LI J, ZHANG J C, ZHU Y, et al. Natural compounds, optimal combination of brusatol and polydatin promote antitumor effect in breast cancer by targeting Nrf2 signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 8265.

[8] 高薇，曾海荣，乐佳敏. 鸦胆子苦醇通过Nrf2/HO-1通路诱导细胞铁死亡抑制胃癌细胞HGC-27增殖[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(2)：81-87.
GAO W, ZENG H R, LE J M. Brusatol suppresses proliferation of human gastric cancer HGC-27 cells through inducing ferroptosis via Nrf2/HO-1 pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(2): 81-87.

[9] 黄山鹰，唐国玲，胡海燕，等. PD-1 ScFv溶瘤病毒对卵巢癌裸鼠模型免疫活性、肿瘤生长及存活率的影响[J]. 免疫学杂志，2022，8(10)：854-861.
HUANG S Y, TANG G L, HU H Y, et al. Impacts of PD-1 ScFv oncolytic virus on immune activity, tumor growth and survival in nude mouse model of ovarian cancer[J]. Immunol J, 2022, 8(10): 854-861.

[10] KONSTANTINOPOULOS P A, MATULONIS U A. Clinical and translational advances in ovarian cancer therapy [J]. Nat Cancer, 2023, 4(9): 1239-1257.

[11] HU M Y, SUN D, YU J, et al. Brusatol sensitizes endometrial hyperplasia and cancer to progestin by suppressing NRF2-TET1-AKR1C1-mediated progestin metabolism[J]. Lab Invest, 2022, 102(12): 1335-1345.

[12] SUWATTANASOPHON C, MISTLBERGER-REINER A, ALBERDI-CEDEÑO J, et al. Identification of the *Brucea javanica* constituent brusatol as an EGFR-tyrosine kinase inhibitor in a cell-free assay[J]. ACS Omega, 2023, 8(31): 28543-28552.

[13] WANG X T, GUO W, SHI X J, et al. S1PR1/S1PR3-YAP signaling and S1P-ALOX15 signaling contribute to an aggressive behavior in obesity-lymphoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 3.

[14] HIRATA N, YAMADA S, YANAGIDA S, et al. Transforming growth factor beta promotes the expansion of cancer stem cells via S1PR3 by ligand-independent Notch activation[J]. Biol Pharm Bull, 2022, 45(5): 649-658.

[15] WANG C, YE T Y, WANG W J, et al. Sphingosine kinase 1 contributes to the metastatic potential of epithelial ovarian cancer to the adipocyte-rich niche[J]. Exp Hematol Oncol, 2022, 11(1): 102.

（收稿日期：2024-02-19　修回日期：2024-07-23）
（编辑：邹丽娟）