

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20241107006

基于 PI3K/Akt 信号通路探讨补益消癥方抑制卵巢癌细胞增殖和迁移的作用机制

罗涔昕¹, 丁 灵², 茹 丹², 来 益², 张 旭², 李 鹤²

1. 上海中医药大学(上海 201203); 2. 上海交通大学附属仁济医院(上海 200127)

【摘要】 目的 探讨补益消癥方(BYXZ)对人卵巢癌细胞增殖和迁移的影响及其作用机制。**方法** 采用不同浓度 BYXZ 干预卵巢癌细胞 SKOV3、A2780 和 OVCAR8, 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测细胞的增殖能力; 集落形成实验检测细胞克隆增殖能力; 细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力; Western blot 法检测细胞中磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)蛋白的表达。**结果** CCK-8 结果显示, BYXZ 可以抑制卵巢癌细胞 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 的增殖能力, 其半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 4.099 g/L、6.202 g/L 和 6.421 g/L。集落形成实验结果显示, 0.25 g/L、0.5 g/L、1 g/L 的 BYXZ 呈浓度依赖性抑制卵巢癌细胞 A2780 和 OVCAR8 的增殖能力($P<0.01$, $P<0.001$), 0.5 g/L、1 g/L 的 BYXZ 呈浓度依赖性抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖能力($P<0.05$, $P<0.001$)。细胞划痕实验显示, 5 g/L BYXZ 可明显抑制卵巢癌细胞 SKOV3、A2780 的迁移能力($P<0.05$, $P<0.01$), 10 g/L BYXZ 可明显抑制卵巢癌细胞 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 的迁移能力($P<0.05$, $P<0.01$)。Transwell 实验结果显示, 2 g/L、5 g/L、10 g/L 的 BYXZ 可明显抑制卵巢癌细胞 A2780 和 OVCAR8 的迁移能力($P<0.001$), 5 g/L、10 g/L 的 BYXZ 可明显抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的迁移能力($P<0.001$)。Western blot 实验结果显示, BYXZ 能抑制卵巢癌细胞 A2780 和 OVCAR8 中 PI3K、Akt、p-Akt 蛋白的表达($P<0.001$), 且能抑制卵巢癌细胞 SKOV3 中 PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达($P<0.001$); 在 SKOV3 细胞中, BYXZ 可以通过降低 Akt 磷酸化水平(p-Akt/Akt)来抑制 PI3K/Akt 信号通路($P<0.05$), 从而抑制肿瘤细胞增殖和迁移。**结论** BYXZ 通过降低 Akt 磷酸化水平来抑制 PI3K/Akt 信号通路, 从而抑制卵巢癌细胞增殖和迁移。

【关键词】 卵巢癌; 补益消癥方; 增殖; 迁移; 信号通路; 中药研究

Mechanism of Buyi Xiaozheng Formula in inhibiting proliferation and migration of ovarian cancer cells based on PI3K/Akt signaling pathway

LUO Cenxin¹, DING Ling², RU Dan², LAI Yi², ZHANG Xu², LI He²

1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of Buyi Xiaozheng Formula (BYXZ) on the proliferation and migration of human ovarian cancer cells. **Methods** Ovarian cancer cell lines SKOV3, A2780, and OVCAR8 were treated with different concentrations of BYXZ. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the cell proliferation ability, colony formation assay was conducted to assess clonal proliferation capacity, scratch wound healing assay and Transwell migration assay were performed to evaluate cell migration ability. Western blot was used to detect the protein expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), phosphorylated protein kinase B (p-Akt). **Results** CCK-8 results showed that, BYXZ could inhibit the proliferation of ovarian cancer cells SKOV3, A2780, and OVCAR8, with IC₅₀ of 4.099 g/L, 6.202 g/L, and

6.421 g/L, respectively. The results of colony formation assay showed that 0.25 g/L, 0.5 g/L and 1 g/L BYXZ inhibited the proliferation of ovarian cancer cells A2780 and OVCAR8 in a concentration-dependent manner ($P<0.01$, $P<0.001$), and 0.5 g/L and 1 g/L BYXZ significantly inhibited the proliferation of SKOV3 cells in a concentration-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.001$). Wound healing assay results revealed that 5 g/L BYXZ significantly inhibited the migration of SKOV3 and A2780 cells ($P<0.05$, $P<0.01$), and 10 g/L BYXZ significantly inhibited the migration of SKOV3, A2780

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174135); 上海市卫健委卫生行业临床科研项目(20234Y0089); 上海交通大学医工交叉项目(YG2023QNB08)

[作者简介] 罗涔昕, 女, 硕士研究生, 主要从事卵巢癌的中西医结合治疗与研究工作

[通信作者] 李鹤, 主任医师, 教授, 博士研究生导师; E-mail: Lihel972@hotmail.com

and OVCAR8 cells ($P<0.05$, $P<0.01$). Transwell assay results showed that BYXZ at concentrations of 2 g/L, 5 g/L, and 10 g/L significantly inhibited the migration of A2780 and OVCAR8 cells ($P<0.001$), while 5 g/L and 10 g/L BYXZ exerted significantly inhibited the migration of SKOV3 cells ($P<0.001$). Western blot results indicated that BYXZ could down-regulate the expression of PI3K, Akt, and p-Akt proteins in A2780 and OVCAR8 cells ($P<0.001$), and inhibit PI3K and p-Akt expression in SKOV3 cells ($P<0.001$); BYXZ could inhibit the PI3K/Akt signaling pathway by reducing the phosphorylation level of Akt (p-Akt/Akt) in SKOV3 cells ($P<0.05$). **Conclusions** BYXZ inhibits the PI3K/Akt signaling pathway by reducing the phosphorylation level of Akt, so as to inhibit the proliferation and migration of ovarian cancer cells.

Keywords: ovarian cancer; Buyi Xiaozheng Formula; proliferation; migration; signaling pathway; Chinese materia medica research

卵巢癌(ovarian cancer)被称为“妇癌之王”,在妇科恶性肿瘤中病死率位居首位^[1]。虽然普通女性一生中罹患卵巢癌的概率仅为 1.2%,但由于早期缺乏明显症状,超过 70% 的患者在确诊时已进入晚期,通常伴有肿瘤广泛扩散和远处转移。尽管化学疗法(简称“化疗”)是卵巢癌治疗的主要手段,但复发和远处转移的风险仍然较高,导致患者 5 年生存率较低,仅为 25%~30%,近年来,卵巢癌的发病率不断攀升,全球每年新增病例超过 22 万例^[1-2]。由于早期卵巢癌通常没有明显症状,常被称为“沉默的杀手”。当患者出现腹部不适、消瘦等症状时,往往已经发展到中晚期,预后较差,对女性健康构成严重威胁^[1]。近年来,中医药在肿瘤的维持治疗中发挥了越来越重要的作用,尤其是在缓解骨髓抑制、提升生活质量和减少治疗副作用方面表现出显著优势。因此,深入研究卵巢癌的发病机制及寻找更有效的治疗方法具有重要的临床意义。

卵巢癌属中医“癥瘕”“肠覃”“血瘀”等范畴。中医认为,卵巢癌的发生与正气亏虚、痰瘀互结、毒邪内蕴密切相关。在疾病早期,患者往往气血失调,肝脾功能紊乱,导致痰湿、血瘀阻滞,进而形成肿块。随着疾病的发展,正气进一步虚弱,癌毒入侵脏腑,损伤气血,使得肿瘤扩散和转移更加迅速。癌毒通过经络、气血的传导,可以扩散至腹膜、腹腔、盆腔等部位,类似于现代医学中的肿瘤转移机制^[3-4]。因此,遏制癌毒扩散和扶正祛邪成为卵巢癌中医治疗的核心原则。

中医药在维持治疗妇科肿瘤临床中应用广泛,中西医结合治疗通过互补优势,已显示出在提高抗肿瘤药物疗效和降低副作用方面的潜力^[5]。中药复方的研究也逐渐成为热点,多个复方被验证在调节免疫功能、抑制肿瘤生长方面有良好的临床效果。

补益消癥方(BYXZ)是源自名老中医秦亮甫的临床经验方,其药物组成包括党参、黄芪、白术、白芍、半枝莲和紫草。这些中药具有广泛的抗肿瘤作用。党参通过其多糖成分调节免疫系统,激活巨噬细胞、T 淋巴细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞),增强免疫系统对肿瘤的识别和清除能力^[6]。黄芪的主要活性成分为黄芪多糖和黄芪皂苷,二者均具有良好的抗肿瘤潜力^[7]。白术

通过调节肿瘤微环境的免疫反应发挥作用,抑制肿瘤相关巨噬细胞的极化,减少促肿瘤因子的分泌,从而降低肿瘤的侵袭性^[8]。白芍通过抑制活性氧(ROS)生成抑制肿瘤细胞生长,并且通过抑制基质金属蛋白酶(MMPs)和上皮-间质转化(EMT),减少肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[9]。半枝莲通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)信号通路诱导肿瘤细胞凋亡,并且阻止肿瘤的新生血管形成和肿瘤细胞的侵袭^[10]。紫草可以诱导肿瘤细胞的凋亡,同时通过抑制细胞周期相关蛋白的表达,减少肿瘤细胞增殖^[11-12]。

磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路在多种肿瘤的发生和发展中扮演着重要角色。该通路通过调控细胞代谢、增殖、迁移和存活,在肿瘤细胞中高度活跃^[13]。相关研究^[14]显示,PI3K/Akt 通路在卵巢癌复发组中显著富集,提示其在肿瘤进展和耐药性中发挥重要作用。Akt 的激活能够磷酸化促凋亡蛋白 Bcl-2-相关死亡促进因子(BAD),并通过磷酸化半胱天冬酶原-9(Procaspase-9)抑制其激活为胱天蛋白酶-9(Caspase-9),从而阻断凋亡信号传导,增强肿瘤细胞的存活能力。通过靶向 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路,可以有效抑制卵巢癌细胞(如顺铂耐药型人卵巢癌细胞系 A2780 和 SKOV3)的增殖和迁移^[15]。Song 等^[16]的研究表明,Akt 的过度表达与卵巢癌的进展密切相关,抑制 Akt 磷酸化能够显著减少卵巢癌细胞的增殖和迁移,进一步证明了该通路在卵巢癌中的重要性。此外,抑制 Akt 磷酸化能够显著抑制卵巢癌细胞的增殖和迁移^[17-18]。因此,阻断 PI3K/Akt 信号通路已被证明是抑制肿瘤生长的有效策略,并在多种抗肿瘤药物的开发中起到关键作用^[19]。

本研究着重探讨 BYXZ 在卵巢癌治疗中的作用机制,尤其是其对 PI3K/Akt 信号通路的调控作用。鉴于 PI3K/Akt 信号通路在卵巢癌细胞的增殖、存活和迁移中起关键作用,其异常激活与肿瘤细胞的不受控生长以及转移能力增强密切相关。因此,本研究拟通过体外实验,系统评估 BYXZ 对 PI3K/Akt 信号通路关键节点分子的调控作用,从而解释其在抑制肿瘤细胞增殖和迁移中的分子机制,为中医药在卵巢癌治疗中的应用

提供更有力的实验支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人卵巢癌细胞株 SKOV3、A2780 以及 OVCAR8 均购于中国科学院细胞库。

1.1.2 药物与试剂 BYXZ 水煎液由上海交通大学附属仁济医院中药房提供。药物组成:党参 10 g, 黄芪 18 g, 白芍 10 g, 白术 10 g, 半枝莲 15 g, 紫草 30 g。BYXZ 水煎液根据文献^[20]制备:上述中药饮片加 10 倍量水浸泡 0.5 h, 煎煮 1 h, 过滤, 滤渣再加 8 倍量水, 煎煮 1 h, 过滤, 合并 2 次过滤, 浓缩至生药量为 15 g/mL, 置于 4 °C 冰箱中保存备用。

胎牛血清(FBS)、DMEM 高糖培养基(批号分别为 SV30208.02、AJ30750638), 美国 Cytiva 公司; 抗生素-抗真菌剂(批号:15240062), 美国 Gibco 公司; 胰酶(批号:GNM25200-1), 浙江吉诺赛百尔生物科技有限公司; 细胞计数试剂盒(CCK-8)(批号:KA3332981), 上海陶术生物科技股份有限公司; 5×电泳液、10×转膜液、细胞裂解液(批号分别为 BL603B、BL609L、BL504A), 安徽白鲨生物科技有限公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号:HRP-66009), 美国 Proteintech 公司; PI3K 抗体、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)抗体、Akt 抗体(批号分别为 cst19591、cst4060、cst4691), 美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.3 主要仪器 超净工作台、CO₂培养箱、酶标仪(型号分别为 Protect-2FD-S、34111FO、Varioskan LUX), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 倒置显微镜(型号:DMIL LED), 德国 Leica 公司; 低温高速离心机(型号:5702R), 德国 Eppendorf 公司。

1.2 细胞培养 SKOV3、A2780、OVCAR8 卵巢癌细胞均培养于含 10% FBS 和 1% 抗生素-抗真菌剂的 DMEM 高糖培养基中。在无菌条件下, 将细胞置于体积分数为 5% 的 CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养, 确保细胞在最佳环境下生长。当细胞生长达到约 70% 融合状态时, 使用体积分数为 0.25% 胰蛋白酶消化并传代, 定期观察细胞的形态和生长状态, 根据实验需求调整传代周期和细胞密度, 确保试验材料的均一性和实验结果的可重复性。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 CCK-8 法检测细胞增殖活性 为了评估 BYXZ 对卵巢癌细胞增殖的抑制作用, 采用 CCK-8 试剂盒进行细胞活性检测。将 SKOV3、A2780、OVCAR8 细胞分别接种于 96 孔板中。在 15 g/mL 的 BYXZ 水煎液加入无菌水, 稀释至浓度为 15 g/L, 即为 BYXZ 母液, 使用时将 BYXZ 母液稀释至实验所需浓度。待贴壁后加入不

同浓度的 BYXZ 溶液(0、0.15 g/L、0.3 g/L、0.6 g/L、1.2 g/L、2.4 g/L、4.8 g/L、7.5 g/L、9.6 g/L、15 g/L)。培养 48 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 在 37 °C 条件下孵育 2 h。孵育结束后, 使用酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度(OD)值, 计算细胞的增殖活性。为了确定 BYXZ 对不同细胞系的半数抑制浓度(IC₅₀), 计算各个浓度下细胞的增殖抑制率。将抑制率与药物浓度进行拟合, 计算各细胞系的 IC₅₀ 值。

1.3.2 集落形成实验检测细胞增殖能力 为了评估 BYXZ 对卵巢癌细胞增殖能力的影响, 采用集落形成实验。将预先培养好的 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 细胞接种于 24 孔板中, 每孔接种适量细胞, 确保单个细胞能够形成集落。加入不同浓度的 BYXZ 溶液(0.25 g/L、0.5 g/L、1 g/L), 并根据细胞生长情况定期更换新鲜培养基。实验持续培养 10~14 d, 直至可见明显集落形成。

在实验结束时, 使用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min, 以 1% 结晶紫染色细胞集落, 染色后用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗掉多余染色剂。待细胞自然风干后, 拍照记录集落形成情况并计算集落数目。集落数目作为细胞增殖能力的定量指标, 通过不同浓度处理组与对照组(PBS)进行比较, 分析 BYXZ 对细胞增殖的抑制效果。

1.3.3 细胞划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移能力

1.3.3.1 细胞划痕实验 在 24 孔板中均匀铺种 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 细胞, 待细胞贴壁并生长至 80%~90% 融合时, 使用 200 μ L 无菌枪头垂直划出一条直线, 形成细胞划痕。划痕后, 清除悬浮的细胞, 加入不同浓度的 BYXZ 溶液(5 g/L、10 g/L)以及含 FBS 的 DMEM 高糖培养基。分别在 0 h 和 24 h 用显微镜拍摄细胞迁移的图像。使用 ImageJ 软件测量细胞划痕的宽度, 计算细胞迁移距离, 并分析不同处理组对细胞迁移能力的影响。

1.3.3.2 Transwell 实验 使用带有 8 μ m 孔径膜的 Transwell 小室进行细胞迁移实验。将经 2 g/L、5 g/L、10 g/L BYXZ 处理的不含 FBS 的细胞悬液加入 Transwell 上室中(每个小室加入一定数量的细胞), 下室中加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 以诱导细胞迁移。培养 24 h 后, 使用 4% 多聚甲醛固定穿过小室膜的细胞, 并以 0.1% 结晶紫染色, 冲洗掉未穿透膜的细胞。最后, 在显微镜下拍摄并计数穿过膜的细胞数目。评估不同浓度的 BYXZ 处理对细胞迁移能力的抑制效果。

1.3.4 Western blot 法检测卵巢癌细胞中蛋白表达 为了评估 BYXZ 对卵巢癌细胞中关键蛋白表达的影响, 采用 Western blot 法检测卵巢癌细胞中 PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达。首先, 在经过不同浓度(2 g/L、5 g/L、10 g/L) BYXZ 处理 48 h 的 SKOV3、A2780、OVCAR8 细胞中, 加

入含有放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液中,置于冰上裂解 5 min,确保细胞充分裂解。随后,4℃、12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液提取细胞总蛋白。使用二辛可酸(BCA)蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。各孔取等量的蛋白,在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中进行蛋白分离(浓缩胶以 80 V 运行 30 min;分离胶以 120 V 运行 60 min),直到目标蛋白有效分离。使用湿转法将分离好的蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上(200 mA,120 min)。转膜完成后,将膜置于快速封闭液中,于摇床上室温封闭 20 min,以减少非特异性结合。用等渗缓冲盐溶液(TBST)洗膜 3 次,每次 5 min。随后分别加入 PI3K 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体、 β -actin 抗体(稀释比例均为 1:1 000),4℃ 孵育过夜,确保抗体与靶蛋白的充分结合。次日再用 TBST 洗膜 3 次,加入兔二抗(稀释比例 1:2 000),室温孵育 1.5 h,二抗孵育后重复 TBST 洗膜 3 次。使用增强型化学发光试剂(ECL)进行显影,检测蛋白条带。使用凝胶成像系统拍照,并用 ImageJ 图像分析软件对蛋白

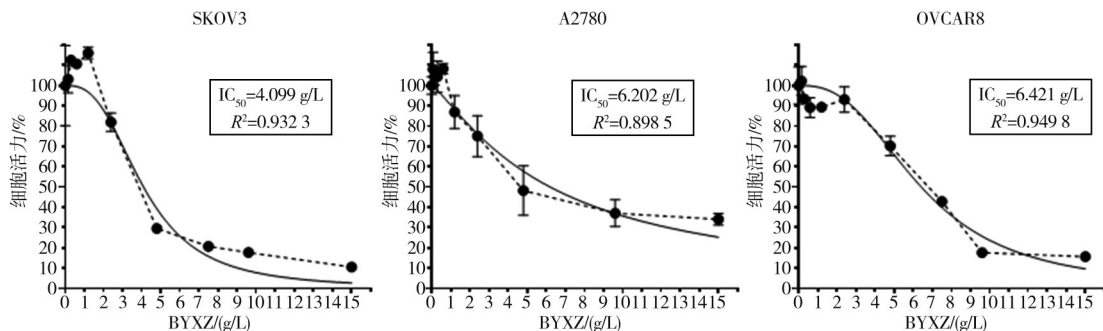
条带的灰度值进行定量分析,比较各实验组蛋白的相对表达水平。

1.4 统计学方法 使用 Graphpad Prism 9.5 和 SPSS 25.0 软件进行数据分析和绘图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。比较两组间差异,当样本符合正态性和方差齐性使用独立样本 t 检验,当变量不符合时,使用非参数检验。比较多组间差异,变量符合正态性时,使用单因素方差分析(ANOVA),当变量不服从正态性,采用多样本秩和检验;计数资料和等级资料使用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 细胞的抑制作用

BYXZ 干预 48 h 后卵巢癌细胞 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 的细胞存活曲线见图 1。通过 GraphPad Prism 软件拟合得出 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 细胞的 IC_{50} 分别为 4.099 g/L、6.202 g/L 和 6.421 g/L。结果表明,BYXZ 能够有效抑制卵巢癌细胞的增殖能力。其中,SKOV3 细胞对 BYXZ 的药物敏感性最高,其次是 A2780 细胞和 OVCAR8 细胞。

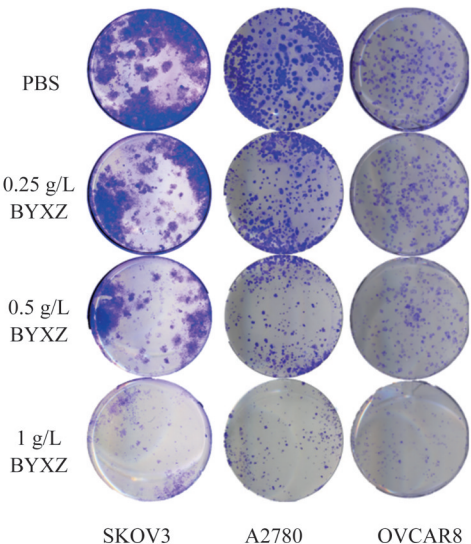


注: IC_{50} 为半数抑制浓度。 $n=4, \bar{x} \pm s$ 。

图1 补益消癥方(BYXZ)干预 48 h 后 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 细胞的存活曲线

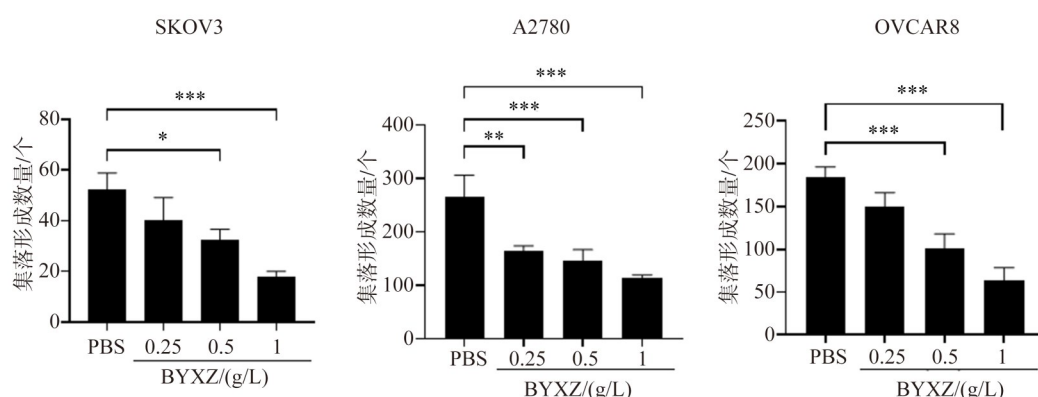
2.2 对卵巢癌细胞集落形成能力的影响 使用低浓度 BYXZ (0.25 g/L、0.5 g/L、1 g/L) 处理 SKOV3、A2780 和 OVCAR8 卵巢癌细胞,集落形成的数量变化见图 2、图 3。与 PBS 组相比,SKOV3 细胞中 0.5 g/L 和 1 g/L 的 BYXZ 可明显抑制细胞集落的形成($P < 0.05$),其中 1 g/L 浓度的 BYXZ 可显著抑制 SKOV3 的细胞增殖能力($P < 0.001$)。但在浓度为 0.25 g/L 时,与 PBS 组相比,对细胞增殖能力的影响无统计学意义($P > 0.05$)。各个浓度 BYXZ 均可减少 A2780 和 OVCAR8 两组卵巢癌细胞集落形成的数量。0.25 g/L 浓度的 BYXZ 对 A2780 和 OVCAR8 细胞的增殖能力有抑制作用($P < 0.01$),BYXZ 在 0.5 g/L 和 1 g/L 浓度时对 A2780 和 OVCAR8 两种卵巢癌细胞均有显著的抑制作用($P < 0.001$)。

2.3 对卵巢癌细胞转移能力的影响 采用细胞划痕实验检测 BYXZ 对卵巢癌细胞转移能力的影响。结果如



注:BYXZ 为补益消癥方,PBS 为磷酸盐缓冲液。

图2 各组卵巢癌细胞集落形成实验图

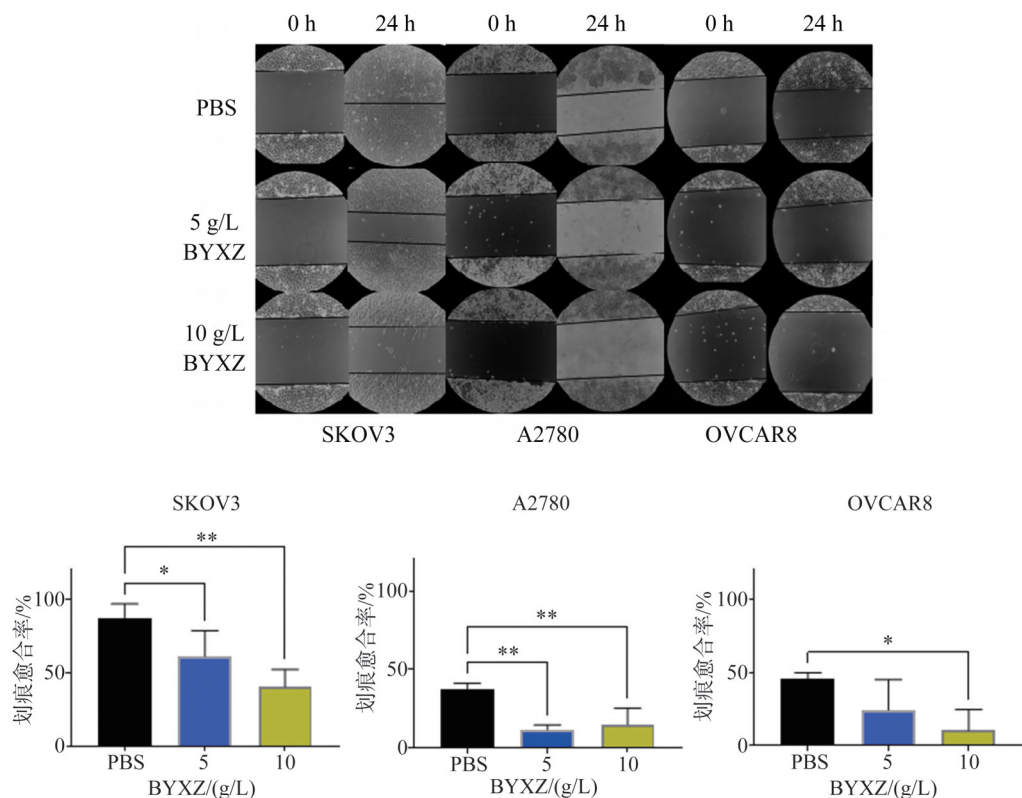


注:BYXZ为补益消癥方。与磷酸盐缓冲液(PBS)组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图3 各组卵巢癌细胞集落形成数量的比较

图4所示,以5 g/L、10 g/L浓度的BYXZ分别干预SKOV3细胞24 h后,与对照组相比,各浓度BYXZ对SKOV3细胞迁移抑制效果显著,其中10 g/L BYXZ效果

最显著($P<0.01$);BYXZ干预A2780细胞24 h,对细胞迁移能力的抑制作用效果明显($P<0.01$);24 h后,10 g/L BYXZ对OVCAR8细胞迁移愈合能力有明显抑制作用($P<0.01$)。



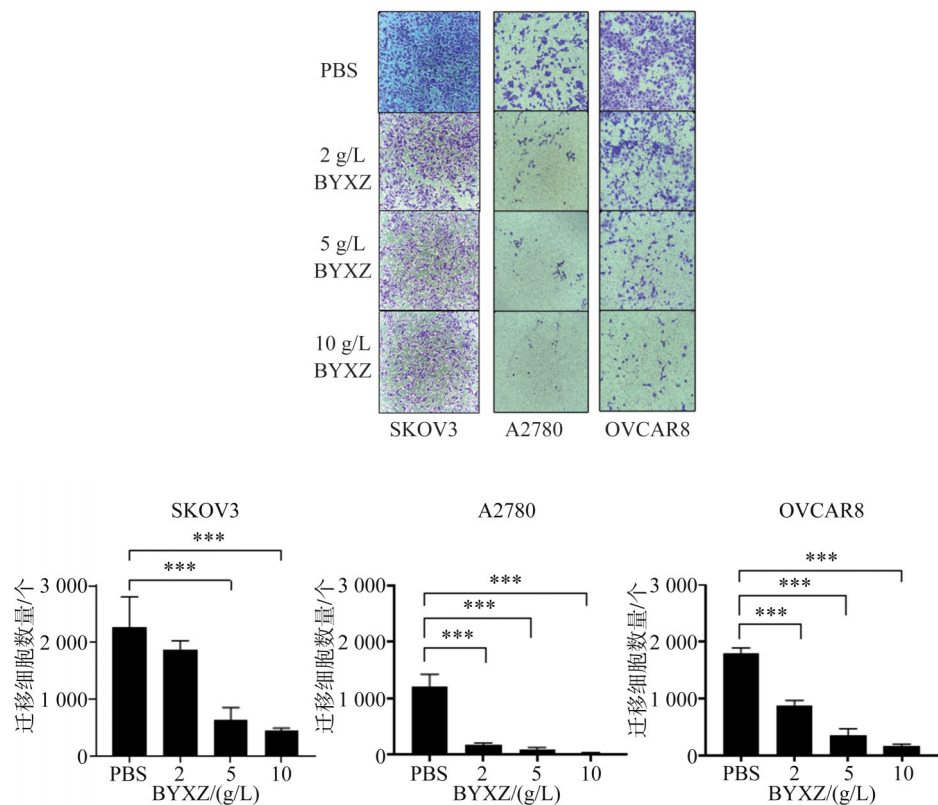
注:BYXZ为补益消癥方。与磷酸盐缓冲液(PBS)组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图4 各组卵巢癌细胞的划痕愈合能力的比较(细胞划痕实验)

2.4 Transwell实验检测BYXZ对卵巢癌细胞迁移能力的影响 采用Transwell实验检测BYXZ对卵巢癌细胞迁移能力的影响。结果如图5所示,与对照组相比,各浓度干预下,细胞的迁移能力均显著下降。其中,在SKOV3细胞中,2 g/L浓度的BYXZ对其迁移能力影响的差异无统计学意义($P>0.05$),5 g/L和10 g/L浓度的BYXZ能显著降低SKOV3细胞的迁移能力($P<0.001$)。在A2780和OVCAR8细胞中,各浓度BYXZ均能显著降

低肿瘤细胞的迁移能力($P<0.001$)。

2.5 对卵巢癌细胞中PI3K、Akt及p-Akt表达的影响 Western blot结果如图6~图8所示,BYXZ在不同浓度下能够不同程度下调3种卵巢癌细胞PI3K和p-Akt蛋白的表达,以及降低Akt蛋白磷酸化水平(p-Akt/Akt)。其中,在SKOV3细胞中,BYXZ下调了PI3K、p-Akt蛋白表达($P<0.001$),在A2780、OVCAR8细胞中,BYXZ下调了PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达($P<0.001$)。在SKOV3细胞



注:BYXZ为补益消癥方。与磷酸盐缓冲液(PBS)组相比,*** $P<0.001$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图5 各组卵巢癌细胞迁移能力的比较(Transwell实验)

中,2 g/L、5 g/L、10 g/L的BYXZ能降低p-Akt/Akt($P<0.05$, $P<0.01$),但BYXZ对A2780和OVCAR8细胞的p-Akt/Akt影响无统计学意义($P>0.05$)。

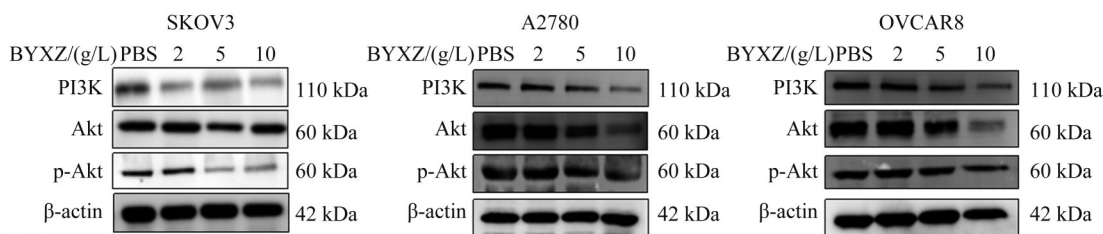
3 讨论

卵巢癌的发病率逐年上升,且呈现年轻化趋势^[21]。铂类药物联合紫杉醇是目前临床卵巢癌患者一线化疗方案,但其同样存在胃肠道反应、骨髓抑制、神经毒性等不良反应。同时,卵巢癌细胞对化疗药物极易产生耐药,术后化疗后复发率高、铂耐药也成为卵巢癌治疗的难点之一。研究^[21]报道显示20%~30%卵巢癌表现为原发耐药,而治疗过程中绝大部分患者出现耐药,化疗后仍多发侵袭和远处转移。因此,中医药在治疗化疗引起的不良反应方面有着其独特的优势,对降低卵巢癌病死率具有重要意义。研究^[22]表明,黄芩苷能通过抑制PI3K/Akt信号通路,对EMT、肿瘤干细胞发挥抑制作用来抑制卵巢癌的转移、复发、耐药等现象。舒美玲等^[23]发现华蟾素可以通过PI3K/Akt信号通路抑制EMT发生来逆转卵巢癌顺铂耐药细胞A2780/DDP的顺铂耐药。胡桃醌可通过减少Akt、ERK、NF- κ B信号通路蛋白的表达,下调波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白及其mRNA表达,从而影响卵巢癌细胞增殖、转移^[24]。由此

可见,PI3K/Akt信号的激活与肿瘤细胞代谢、增殖、迁移和存活密切相关。

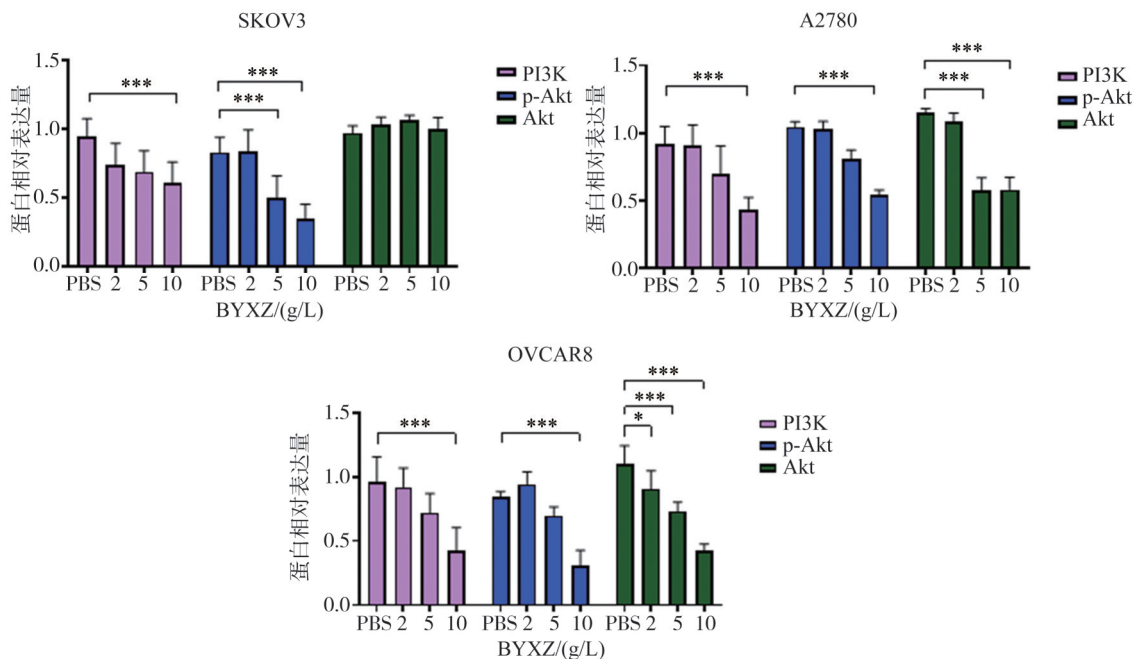
中药单体化学物在临床应用、毒副作用、生物利用率等方面具有明显局限性。中药复方在治疗上具有多环节、多靶点的综合作用,发挥协同治疗效果。中药复方的联合用药体现了疾病发生发展的整体特性,充分体现中医药防治疾病的本质内涵。BYXZ作为秦亮甫教授临床经验方,半枝莲、紫草为君药,黄芪补气益气为臣药。《中华人民共和国药典(2020年版):一部》^[25]中记载,半枝莲辛、苦、寒,归肺、肝、肾经,既清热解毒,又散瘀止血,对肿瘤细胞具有较强抑制作用;紫草甘、咸、寒,归心、肝经,具有清热凉血、活血解毒、透疹消斑的功效,有抗炎、抗菌、解毒等药理作用;黄芪甘温升补,归脾、肺经,生用微温,蜜炙性温,主以扶正气,兼能除水邪,其善补中气、益胃固表;党参、白术、白芍均为“健脾益气”之药,其中党参甘、平,归脾、肺经,在抑制肿瘤生长、增强免疫中发挥作用;白术苦、甘、温,归脾、胃经;白芍为“滋阴养血”之药,苦、酸、微寒,归肝、脾经,有助于增强机体免疫细胞活性而辅助抗肿瘤。本方共奏益气养阴,扶正祛邪之功效。

本研究表明,BYXZ能显著降低卵巢癌细胞中p-Akt水平,提示其可能有效阻断这一关键信号通路,进而抑制卵巢癌细胞的生长和扩散。这种机制验证了



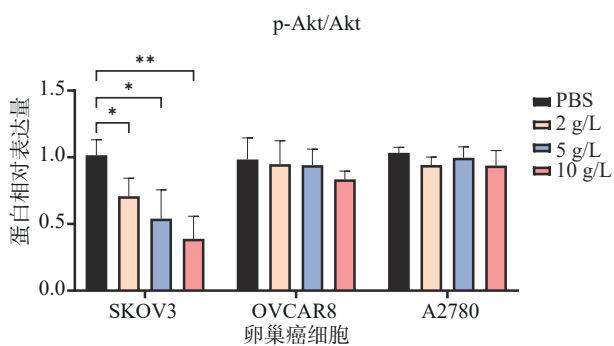
注:BYXZ为补益消癥方,PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,Akt为蛋白激酶B,p-Akt为磷酸化蛋白激酶B,β-actin为β-肌动蛋白,PBS为磷酸盐缓冲液。

图6 各组卵巢癌细胞PI3K/Akt相关蛋白表达(Western blot 实验)



注:BYXZ为补益消癥方,PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,Akt为蛋白激酶B,p-Akt为磷酸化蛋白激酶B,β-actin为β-肌动蛋白。与磷酸盐缓冲液(PBS)组相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;n=3, $\bar{x}\pm s$ 。

图7 各组卵巢癌细胞PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达的灰度值



注:Akt为蛋白激酶B,p-Akt为磷酸化蛋白激酶B。与磷酸盐缓冲液(PBS)组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;n=3, $\bar{x}\pm s$ 。

图8 各组卵巢癌细胞Akt磷酸化(p-Akt/Akt)的灰度值

PI3K/Akt信号通路在卵巢癌中的重要性,也为进一步开发基于中药的靶向治疗提供了新的研究思路。因此,未来的研究应包括动物模型的研究,以验证BYXZ在体内的疗效;并对药物入血成分群及汤剂成分群进行比较分析,避免低估或高估药物实际疗效;分析探究BYXZ中药物配伍的协同作用,并探索其与其他抗肿瘤

药物联合应用的潜力。

本课题组通过前期的临床研究^[26]验证了BYXZ在卵巢癌患者免疫“窗口期”中的应用,进一步证明了其在调控卵巢癌免疫微环境中的积极作用^[27-28]。这些发现不仅揭示了BYXZ对患者的临床获益,还为其在抗肿瘤治疗中的潜力提供了重要证据。本研究使用中药汤剂原液进行实验,可以使其有效成分得以保持,防止不入血但有良好药效的成分被忽视。实验结果显示,BYXZ对SKOV3、A2780和OVCAR8这3种卵巢癌细胞的活性、增殖和迁移能力有显著抑制作用,并能下调PI3K蛋白的表达。同时,各药物组中p-Akt蛋白含量显著下降,尤其是在SKOV3细胞中,与Akt总蛋白相比,BYXZ对p-Akt表达的抑制更为明显。综上,BYXZ可能通过抑制Akt磷酸化来抑制肿瘤细胞的增殖和迁移,本研究进一步阐释了其通过PI3K/Akt信号通路发挥抗肿瘤作用的机制。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 284-296.
- [3] 朱耀东, 张梅, 李平. 卵巢癌中医药干预现状及生存期关系分析[J]. 中医肿瘤学杂志, 2019, 13(1): 56-58.
- [4] 徐林, 张巧丽, 姜欣, 等. 黄金昶治疗卵巢癌的辨证思路及用药经验[J]. 北京中医药, 2018, 37(12): 1149-1151.
- [5] QI F, LI A, INAGAKI Y, et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer [J]. Biosci Trends, 2010, 4(6): 297-307.
- [6] XIN T, ZHANG F, JIANG Q, et al. The inhibitory effect of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula* on tumor growth and metastasis in vitro[J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51(5): 788-793.
- [7] 曾雯, 周胜强, 黄佳, 等. 黄芪免疫调节活性成分及其药理作用进展[J]. 上海中医药杂志, 2025, 59(1): 80-88.
- [8] 杨田义, 孙乐. 白术炮制规格及其化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实用医药, 2024, 19(13): 174-177.
- [9] 邢明泉, 孙晓星, 张司琪, 等. 白芍抗癌及其机制的最新研究进展[J]. 中医临床研究, 2024, 16(36): 48-51.
- [10] ZHANG L, REN B, ZHANG J, et al. Anti-tumor effect of *Scutellaria barbata* D. Don extracts on ovarian cancer and its phytochemicals characterisation[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 206(12): 184-192.
- [11] 林思, 秦慧真, 邓玲玉, 等. 紫草素抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 273-282.
- [12] MARKOWITSCH S D, JUETTER K M, SCHUPP P, et al. Shikonin reduces growth of docetaxel-resistant prostate cancer cells mainly through necroptosis[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(4): 882.
- [13] MANNING B D, TOKER A. AKT/PKB signaling: Navigating the network[J]. Cell, 2017, 169(3): 381-405.
- [14] LAHTINEN A, LAVIKKA K, VIRTANEN A, et al. Evolutionary states and trajectories characterized by distinct pathways stratify patients with ovarian high grade serous carcinoma[J]. Cancer Cell, 2023, 41(6): 1103-1117.
- [15] KIM D, DAN H C, PARK S, et al. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance [J]. Front Biosci, 2005, 10(1): 975-987.
- [16] SONG G, OUYANG G, BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71.
- [17] SHENG F, YANG S, LI M, et al. Research progress on the anti-cancer effects of *Astragalus membranaceus* saponins and their mechanisms of action[J]. Molecules, 2024, 29(14): 3388.
- [18] 刘琴, 吴丹, 胡华, 等. PI3K/Akt信号通路及女性相关恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(6): 738-740.
- [19] FRUMAN D A, CHIU H, HOPKINS B D, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. Cell, 2017, 170(4): 605-635.
- [20] 王容容, 王其美, 田雪飞, 等. 健脾消癌方通过 PI3K/Akt 信号通路抑制结肠癌血管生成的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(2): 502-512.
- [21] WEBB P M, GREEN A C, JORDAN S J. Trends in hormone use and ovarian cancer incidence in US white and Australian women: implications for the future[J]. Cancer Causes Control, 2017, 28(5): 365-370.
- [22] 王熙熙. 黄芩苷对人卵巢癌 SKOV3 细胞的抑制作用及其机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [23] 舒美玲, 吴悦, 叶映泉, 等. 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[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(4): 671-677.
- [24] 孙红亚, 袁爱娟, 李纪鹏. 胡桃醌对人卵巢癌 SKOV3 和 IOSE80 细胞增殖和侵袭的抑制作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(1): 32-37.
- [25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版): 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [26] 丁忱欢, 李瑾, 张旭, 等. 补益消微方对晚期卵巢癌患者化疗法“窗口期”免疫微环境的影响[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(5): 76-79.
- [27] 李丹, 张虹. 卵巢癌发病机制与免疫治疗的临床研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2020, 36(12): 908-911.
- [28] 王雅蕾, 王靖怡, 齐丽莎. 微环境在卵巢癌发生发展中的作用[J]. 天津医科大学学报, 2020, 26(3): 288-291.

编辑: 杨轶舜

收稿日期: 2024-11-07