

奥拉帕尼对卵巢癌 SKOV3 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

马艳英¹, 袁博², 赵文伯^{3*}, 赵冬梅¹ (1. 郑州大学附属肿瘤医院病理科, 郑州 450003; 2. 郑州大学第二附属医院妇产科, 郑州 450014; 3. 郑州师范学院化学化工学院, 郑州 450044)

摘要:目的 分析奥拉帕尼抑制卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路机制。方法 将生长状态良好的 SKOV3 细胞随机分为 5 组: 对照组、奥拉帕尼低剂量组 (10 mg · L⁻¹)、奥拉帕尼中剂量组 (30 mg · L⁻¹)、奥拉帕尼高剂量组 (90 mg · L⁻¹) 和 PI3K 蛋白抑制剂 LY294002 组 (10 mg · L⁻¹)。除对照组外, 其余各组细胞给予相应剂量的化合物孵育, DAPI 及免疫印迹法分析细胞凋亡蛋白的表达, qPCR、免疫印迹法和免疫细胞化学法测定 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白的表达。结果 奥拉帕尼处理后卵巢癌 SKOV3 细胞增殖明显受到抑制 ($P < 0.05$), SKOV3 细胞内的凋亡小体逐渐增多, 促细胞凋亡蛋白 caspase 3 及 caspase 9 的表达逐步增强 ($P < 0.05$), PI3K、AKT 和 mTOR 表达逐步降低 ($P < 0.05$), 且随着奥拉帕尼水平的升高, 作用越明显 ($P < 0.05$)。结论 奥拉帕尼对卵巢癌 SKOV3 细胞具有剂量依赖性抑制作用, 且可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥作用。

关键词: 奥拉帕尼; PI3K/AKT/mTOR 信号通路; 增殖; 细胞凋亡; 剂量依从性

doi:10.11669/cpj.2019.01.008 中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2019)01-0036-06

Effect of Olaparib on Ovarian Cancer SKOV3 Cell Line Proliferation by Inhibiting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway

MA Yan-ying¹, YUAN Bo², ZHAO Wen-bo^{3*}, ZHAO Dong-mei¹ (1. Department of Pathology, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To analyze the involvement of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway on the inhibiting the proliferation of ovarian cancer SKOV3 cell line by olaparib. **METHODS** The SKOV3 cells were randomly divided into five groups: control group, olaparib low dose group (10 mg · L⁻¹), olaparib medium dose group (30 mg · L⁻¹), olaparib high dose group (90 mg · L⁻¹), and PI3K protein inhibitor LY294002 group (10 mg · L⁻¹). In addition to the control group, the rest of the cells were incubated with the corresponding doses of the compounds. DAPI and Western blotting were used to analyze the expression of apoptotic protein. qPCR, Western blotting and immunocytochemistry were adopted to detect the expression of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway related proteins. **RESULTS** After olaparib treatment, the proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells was significantly inhibited ($P < 0.05$). Apoptotic bodies in SKOV3 cells increased gradually, and the expression of caspase 3 and caspase 9 increased gradually ($P < 0.05$), PI3K, AKT and mTOR expression gradually decreased ($P < 0.05$) after olaparib medication. With the increase of olaparib level, the above effects were more obvious ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Olaparib has an inhibitory effect on ovarian cancer SKOV3 cells, and it may play a role by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

KEY WORDS: olaparib; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; proliferation; cell apoptosis; dose dependent manner

卵巢癌是临床上最常见的女性生殖系统恶性肿瘤, 对妇女生命造成严重的威胁, 且其发病率和死亡率有逐年升高的趋势^[1-2]。卵巢癌的发病原因可能与物理辐射、化学因子、遗传、免疫及内分泌等因素有关, 但是其确切的发病机制尚不明确, 且临床上尚无特效的治疗手段^[3-5]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路是细胞内细胞转导的关键路径, 且参与了多种妇科肿瘤的发生、发展及恶化过程^[6-7]。奥拉帕尼为选择性的 PARP1/2 抑

制剂, 对 BRCA1 和 BRCA2 基因突变有较好的效果^[8-9]。但是目前尚未见到奥拉帕尼对卵巢癌治疗分子机制的研究。本实验分析奥拉帕尼抑制卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞增殖的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路机制, 为相关研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 细胞及分组

卵巢癌 SKOV3 细胞株(中国科学院上海细胞研

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目资助(201702090); 河南省自然科学基金(152300410001)

作者简介: 马艳英, 女, 硕士, 副主任医师 研究方向: 肿瘤的病理诊断 * 通讯作者: 赵文伯, 男, 博士 研究方向: 药物合成
Tel: 18637164536 E-mail: 1319517487@qq.com

究所);新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);RPMI1620培养基(Hyclone公司);LY294002化合物(美国Sigma Aldrich公司,CAS:154447-36-6,纯度98.0%, -20℃储存,有效期至2019年1月);噻唑蓝MTT(美国Sigma Aldrich公司);兔抗mTOR单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);兔抗(Omega公司);兔抗AKT单克隆抗体(R&D公司);HRP标记二抗及DAB显色试剂盒(北京中杉金桥公司)。二氧化碳细胞培养箱(德国美墨尔特公司);倒置显微镜(徕卡公司);ELX800全波长酶标仪(BIO-TEK公司);SDS-PAGE垂直电泳仪(美国Bio Rad公司);96孔细胞培养板(美国Costar公司);半干转膜系统(美国Bio Rad公司);硝酸纤维素膜(Amresco公司)。生长状态良好的SKOV3细胞随机分为5组:对照组、奥拉帕尼(Sigma Aldrich公司,CAS:763113-22-0,纯度98%,Lot20161013,采用二甲亚砜进行配置成不同的使用浓度)低剂量组(10 mg·L⁻¹)、奥拉帕尼中剂量组(30 mg·L⁻¹)、奥拉帕尼高剂量组(90 mg·L⁻¹)和PI3K蛋白抑制剂LY294002组(10 mg·L⁻¹)。除对照组外,其余各组细胞给予对应剂量的化合物孵育后进行相关的分析。

1.2 细胞的增殖抑制分析

将生长状态良好的卵巢癌SKOV3细胞株经0.25%的胰酶消化,用含胎牛血清的RPMI1640培养基进行重悬消除酶活性,分布接种细胞悬液100 μL于细胞培养板中,在5.0% CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中进行培养。待各组细胞恢复生长状态后用相应浓度化合物孵育。培养结束后轻轻弃去培养液,加入200 μL的MTT继续于适宜条件下培养2 h。无菌PSB冲洗3次后在卵巢癌SKOV3细胞中加入DMSO,震荡处理30 min。用酶标仪检测培养后细胞培养板各个培养孔的吸光度,并计算抑制率。细胞增殖试验独立重复4次试验。抑制率=(对照组OD值-试验组OD值)/对照组OD值×100%。

1.3 qPCR法分析细胞凋亡蛋白表达水平

按相关试剂盒说明书制备各组卵巢癌细胞

mRNA及cDNA。qPCR的扩增程序为:95℃ 5 min;94℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 40 s,收集荧光,共33个循环。反应体系为20 μL;其中cDNA 2 μL;Forward引物0.5 μL;Reverse引物0.5 μL;2.5×SYBR Green(TianGen)8 μL;超纯水9 μL。扩增引物序列见表1。

1.4 Western blotting法

提取各组卵巢癌SKOV3细胞总蛋白后考马斯亮蓝法进行定量。各组细胞以等量总蛋白与5×SDS上样缓冲液100℃条件下煮沸10 min,进行垂直SDS-PAGE电泳(初始电压80 V,分离电压100 V)。电泳结束后剥离PAGE胶后进行半干法转膜(320 mA/80 min)。转膜后用5.0%脱脂牛奶20℃封闭1 h,无菌磷酸盐缓冲液冲洗3次。将封闭后的纤维素膜与一抗(1:250)在4℃条件下孵育4 h,无菌PBS漂洗后与HRP标记二抗(1:250)孵育2 h,显色。以β-actin为内参进行相关蛋白表达的定量分析。

1.5 免疫细胞化学法

将灭菌的载玻片放入细胞培养板培养孔中进行细胞爬片并进行相应浓度的化合物共培养。待各组卵巢癌细胞爬片并在盖玻片上生长良好后,无菌磷酸盐缓冲液冲洗3次后用冰丙酮(-20℃冰箱中放置2 h后使用)固定15 min后在100级超净工作台的台面上室温吹干。用1% Triton-100处理增加各组细胞增加细胞膜的通透性,无菌磷酸盐缓冲液漂洗3次;用5.0%的胎牛血清白蛋白溶液封闭,加一抗(1:300)室温孵育4 h,无菌磷酸盐缓冲液漂洗3次。将载玻片与FITC标记二抗避光37℃孵育2 h(1:500),无菌磷酸盐缓冲液漂洗5次后用荧光显微镜拍照。

1.6 统计分析

统计采用SPSS21.0统计软件完成,计量资料用单因素方差分析,计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析,总体比较有差异再采用F检验进行两两比较。组间P<0.05的差异认为具有统计学的显著性差异。

表1 荧光定量PCR引物序列^[10]

Tab.1 Primer name and sequence for qPCR

Primer	Forward	Reverse
β-actin	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3'	5'-CGAACCTCCGACTTTCGTCT-3'
Caspase 3	5'-TTTTTCAGAGGGGATCGTTG-3'	5'-TCAAGCTTCTCGGCATACTG-3'
Caspase 9	5'-CTAGTTTGCCACACCCATG-3'	5'-GCATTAGCGACCCTAAGCAG-3'

2 结果

2.1 奥拉帕尼对细胞增殖的影响

研究发现奥拉帕尼对卵巢癌细胞株 SKOV3 具有明显的抑制作用,且随着作用时间的延长和剂量的增加,奥拉帕尼的抑制效果更显著($P < 0.05$),见图 1。

2.2 奥拉帕尼对细胞凋亡的影响

DAPI 染色发现随着奥拉帕尼作用浓度的升高,SKOV3 细胞内的凋亡小体逐渐增多(图 2),且促细胞凋亡蛋白 caspase 3 及 caspase 9 的表达逐步增强($P < 0.05$,图 3)。

2.3 奥拉帕尼对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响(Western blotting 法)

研究发现奥拉帕尼处理后 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白 PI3K、AKT 和 mTOR 表达逐步降低($P < 0.05$),且随着剂量的增加,上述蛋白表达变化越明显($P < 0.05$),见图 4。

2.4 奥拉帕尼对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响(qPCR 法)

研究发现奥拉帕尼处理后 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白 PI3K、AKT 和 mTOR mRNA 水平逐步降低($P < 0.05$),且随着剂量的增加,上述蛋白表达变化越明显($P < 0.05$),见表 2。

2.5 奥拉帕尼对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响(免疫细胞化学法)

结果见图 5。奥拉帕尼处理后卵巢癌 SKOV3 细胞增殖明显受到抑制,PI3K、AKT 和 mTOR 表达逐步降低,且具有剂量依从性的抑制作用。

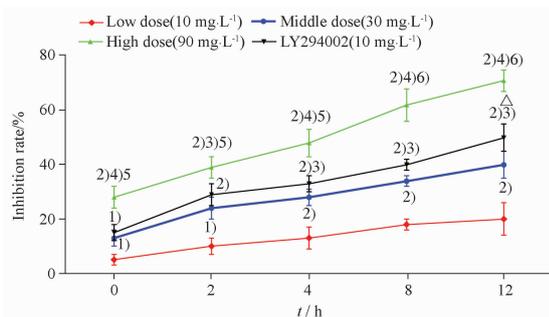


图 1 奥拉帕尼对卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞增殖的影响。 $n = 4, \bar{x} \pm s$

与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与低剂量组相比,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与中剂量组相比,⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$

Fig. 1 Analysis of the effect of olaparib inhibition on cell proliferation. $n = 4, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with the control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compared with the low dose group; ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$, compared with the middle dose group

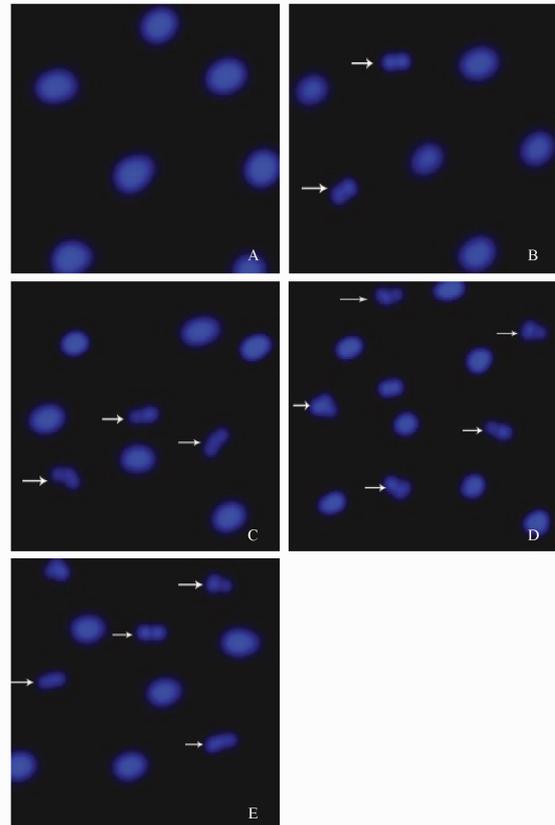


图 2 DAPI 染色分析奥拉帕尼促进 SKOV3 细胞凋亡($\times 100$)
A - 对照组; B - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; C - $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; D - $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; E - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002

Fig. 2 DAPI staining was used to analyze the effect of olaparib on SKOV3 cell apoptosis($\times 100$)

A - control; B - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; C - $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; D - $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; E - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002

3 讨论

卵巢癌是导致女性死亡的最常见的恶性肿瘤之一,目前临床上尚无特效的治疗手段^[11-12]。探索卵巢癌发病的分子机制及相关的治疗手段对改善患者生活质量和生存状态具有重要的现实意义。PI3K/AKT/mTOR 信号通路的异常参与了肿瘤细胞的增殖、分化及转移和凋亡过程,且是多种妇科恶性肿瘤发病的共同表现^[6, 13]。本实验在分析奥拉帕尼抑制卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路机制时发现,奥拉帕尼处理后卵巢癌 SKOV3 细胞增殖明显受到抑制,SKOV3 细胞内的凋亡小体逐渐增多、促细胞凋亡蛋白 caspase 3 及 caspase 9 的表达逐步增强,PI3K、AKT 和 mTOR 表达逐步降低,且随着奥拉帕尼水平的升高,上述作用越明显,表明奥拉帕尼对卵巢癌细胞株 SKOV3 具有剂量依从性的抑制作用,可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥作用。

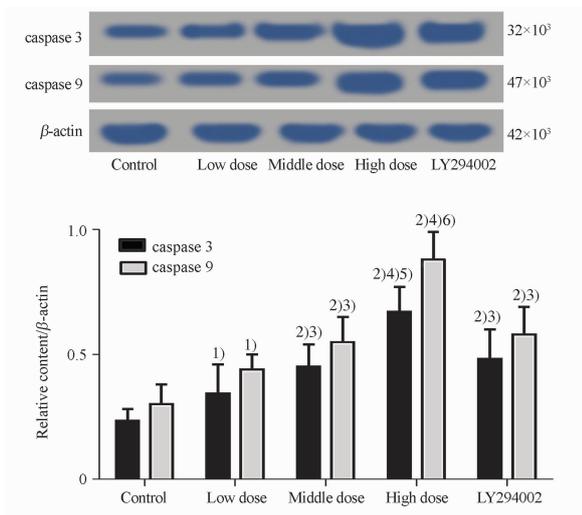


图3 奥拉帕尼对细胞凋亡蛋白 caspase 3 及 caspase 9 蛋白表达的影响。 $n=6, \bar{x} \pm s$

与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与低剂量组相比, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与中剂量组相比, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。奥拉帕尼低剂量组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、奥拉帕尼中剂量组 ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、奥拉帕尼高剂量组 ($90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 PI3K 蛋白抑制剂 LY294002 组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 3 Expression of apoptotic proteins caspase 3 and caspase 9 after olaparib treatment. $n=6, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with the control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compared with the low dose group; ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$, compared with the middle dose group. Olaparib low dose group ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), olaparib medium dose group ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), olaparib high dose group ($90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and PI3K protein inhibitor LY294002 group ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

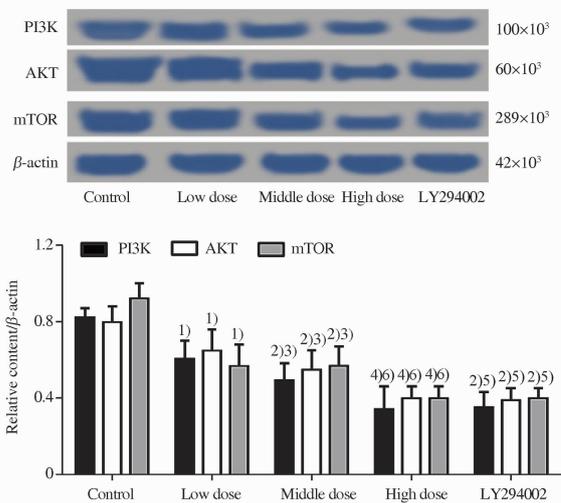


图4 奥拉帕尼对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响。 $n=6, \bar{x} \pm s$

与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与低剂量组相比, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与中剂量组相比, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。奥拉帕尼低剂量组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、奥拉帕尼中剂量组 ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、奥拉帕尼高剂量组 ($90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 PI3K 蛋白抑制剂 LY294002 组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 4 Effect of olaparib treatment on protein expression analysis of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. $n=6, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with the control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compared with the low dose group; ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$, compared with the middle dose group. Olaparib low dose group ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), olaparib medium dose group ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), olaparib high dose group ($90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and PI3K protein inhibitor LY294002 group ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

表2 奥拉帕尼处理后 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的 qPCR 法分析。 $n=6, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 qPCR expression analysis of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway after olaparib treatment. $n=6, \bar{x} \pm s$

Group	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	PI3K/ β -actin	AKT/ β -actin	mTOR/ β -actin
Control		0.61 \pm 0.10	0.64 \pm 0.11	0.70 \pm 0.15
Olaparib	10	0.57 \pm 0.14 ¹⁾	0.58 \pm 0.14 ¹⁾	0.64 \pm 0.13 ¹⁾
	30	0.49 \pm 0.09 ²⁾³⁾	0.51 \pm 0.09 ¹⁾³⁾	0.57 \pm 0.16 ²⁾³⁾
	90	0.41 \pm 0.07 ²⁾⁴⁾⁵⁾	0.43 \pm 0.06 ²⁾⁴⁾⁵⁾	0.41 \pm 0.14 ²⁾⁴⁾⁵⁾
LY294002	10	0.42 \pm 0.09 ²⁾⁴⁾⁶⁾	0.49 \pm 0.10 ²⁾³⁾⁶⁾	0.49 \pm 0.10 ²⁾⁴⁾⁶⁾

注:与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与低剂量组相比, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与中剂量组相比, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with the control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compared with the low dose group; ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$, compared with the middle dose group

PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活会导致肿瘤细胞的恶变,而随着对 PI3K/Akt/mTOR 通路的分子生物学机制的深入研究,靶向此通路的抑制剂在恶性肿瘤治疗中发挥的作用越来越明显,且对提高患者生活质量、改善患者预后具有重要的价值^[6,13-15]。以往的研究发现,银杏酚酸能够通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活抑制肿瘤细胞的侵袭和转移过程,进而发挥抑制肿瘤恶化的作用^[16]。Blanco 等^[17]的研究也发现紫杉醇和西罗莫司能协

同性作用于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,并为个体化医疗治疗肿瘤提供思路。在分析 PI3K/AKT/mTOR 信号通路与乳腺癌 A2780 细胞株侵袭和转移的关系时发现该信号通路是肿瘤细胞侵袭和转移的潜在指标蛋白,且抑制该信号通路可以明显促进细胞的凋亡^[18]。同时,抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可对肿瘤细胞的药物增敏发挥作用:通过抑制该信号通路的激活状态可能明显促进 SKOV3/DDP 乳腺癌细胞对顺铂的药物敏感性,且可以诱导细胞

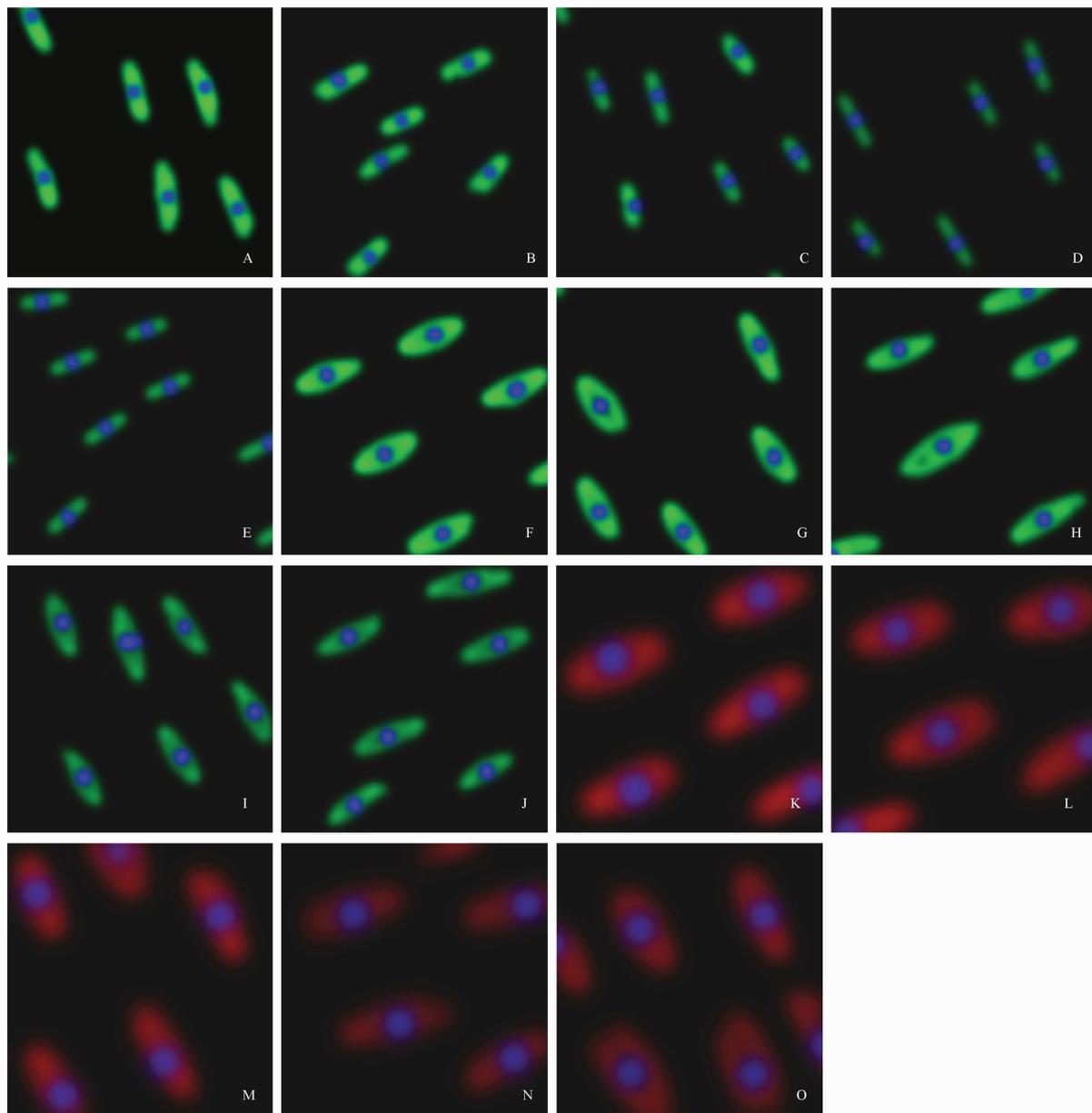


图5 奥拉帕尼对 PI3K(A~E)、AKT(F~J)、mTOR(K~O)信号通路蛋白表达的影响($\times 100$)

A - 对照组; B - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; C - $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; D - $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; E - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002; F - 对照组; G - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; H - $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; I - $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; J - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002; K - 对照组; L - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; M - $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; N - $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥拉帕尼; O - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002

Fig. 5 Effect of olaparib treatment on protein expression of PI3K(A), AKT(B) and mTOR (C) signaling pathway ($\times 100$)

A - control; B - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; C - $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; D - $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; E - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002; F - control; G - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; H - $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; I - $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; J - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002; K - control; L - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; M - $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; N - $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ olaparib; O - $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002

周期的停滞和细胞凋亡的加剧^[19]。本实验也证实 PI3K 抑制剂能够有效抑制菌落的增殖过程,但尚未进行对 AKT 和 mTOR 抑制剂对细胞增殖的作用进行研究。在以后的工作中将分析抑制上述蛋白对 SKOV3 细胞增殖的影响,进一步探讨 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在乳腺癌发病中的参与机制。奥拉

帕尼维持疗法能够改善复发性浆液性卵巢癌患者的无进展生存期,但是否延长总生存期尚需进一步开展大规模、高质量的临床研究进行证实^[20-21]。奥拉帕尼联合紫杉醇使用时能显著增敏紫杉醇的抗肿瘤作用,并降低肿瘤组织的 PAR 水平,且没有明显增加化疗药物的毒性,提示奥拉帕尼为代表的 PARP

抑制剂可以在小鼠乳腺癌4T1 异位模型上增敏化疗药物紫杉醇的作用^[20,22]。本实验也发现奥拉帕尼处理后卵巢癌细胞株 SKOV3 增殖明显受到抑制, SKOV3 细胞内的凋亡小体逐渐增多、促细胞凋亡蛋白 caspase 3 及 caspase 9 的表达逐步增强、PI3K、AKT 和 mTOR 表达逐步降低,且随着奥拉帕尼水平的升高,上述异常越明显,表明奥拉帕尼对卵巢癌 SKOV3 细胞株具有剂量依从性的抑制作用,且其可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥作用。

因此,奥拉帕尼对卵巢癌 SKOV3 细胞株具有剂量依从性的抑制作用,且此过程可能与其抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。在以后的研究中课题组将进一步采用 AKT 和 mTOR 蛋白的抑制剂对该通路的参与性进行分析,进一步阐明奥拉帕尼抑制卵巢癌 SKOV3 细胞株增殖的具体分子机制。

REFERENCES

[1] COPUR M S, GAUCHAN D, RAMAEKERS R, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy or primary debulking surgery for stage iiiic ovarian cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(7):802-803.

[2] HUANG L, JIN Y, FENG S, *et al.* Role of wnt/beta-catenin, wnt/c-jun n-terminal kinase and wnt/Ca²⁺ pathways in cisplatin-induced chemoresistance in ovarian cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6):3851-3858.

[3] HUANG R Y, ANTONY J, TAN T Z, *et al.* Targeting the axl signaling pathway in ovarian cancer[J]. *Mol Cell Oncol*, 2017, 4(2):e1263716.

[4] LIU X, FENG M, ZHENG G, *et al.* Terp1 expression is associated with platinum sensitivity in human lung and ovarian cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3):1398-1405.

[5] LU J, XU Y, WEI X, *et al.* Emodin inhibits the epithelial to mesenchymal transition of epithelial ovarian cancer cells via ilk/gsk-3beta/slug signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 20166253280.

[6] CHEAIB B, AUGUSTE A, LEARY A. The pi3k/akt/mTOR pathway in ovarian cancer; therapeutic opportunities and challenges [J]. *Chin J Cancer(癌症)*, 2015, 34(1):4-16.

[7] YU P, YE L, WANG H, *et al.* Nsk-01105 inhibits proliferation and induces apoptosis of prostate cancer cells by blocking the raf/mek/erk and pi3k/akt/mTOR signal pathways [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3):2143-2153.

[8] PUJADE-LAURAIN E, COMBE P. Olaparib in ovarian cancer with brca mutation [J]. *Bull Cancer*, 2015, 102(6 suppl 1):S82-84.

[9] TEWARI K S, ESKANDER R N, MONK B J. Development of

olaparib for brca-deficient recurrent epithelial ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(17):3829-3835.

[10] JIANG C M H Z, YANG Q. Effect of apoptosis inducing of ginsenoside compound k on chronic myelocytic leukemia k562 cells and its mechanism[J]. *J Chin Oncol(肿瘤学杂志)*, 2014, 20(2):122-126.

[11] VAN DER STEEN S C, RAAVE R, LANGERAK S, *et al.* Targeting the extracellular matrix of ovarian cancer using functionalized, drug loaded lyophilisomes[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 113229-239.

[12] ZHANG S, NG M K. Gene-miRNA network module analysis for ovarian cancer[J]. *BMC Syst Biol*, 2016, 10(suppl 4):117.

[13] BAI X, MA Y, ZHANG G. Butein suppresses cervical cancer growth through the pi3k/akt/mTOR pathway [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6):3085-3092.

[14] CHENG H, SHCHERBA M, PENDURTI G, *et al.* Targeting the pi3k/akt/mTOR pathway: potential for lung cancer treatment[J]. *Lung Cancer Manag*, 2014, 3(1):67-75.

[15] PENG Y, LI L, HUANG M, *et al.* Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating pi3k/akt/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12):2782-2792.

[16] BAEK S H, KO J H, LEE J H, *et al.* Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and tgf-beta-induced emt of lung cancer cells through pi3k/akt/mTOR inactivation [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(2):346-354.

[17] BLANCO E, SANGAI T, WU S, *et al.* Colocalized delivery of rapamycin and paclitaxel to tumors enhances synergistic targeting of the pi3k/akt/mTOR pathway[J]. *Mol Ther*, 2014, 22(7):1310-1319.

[18] BAI H, LI H, LI W, *et al.* The pi3k/akt/mTOR pathway is a potential predictor of distinct invasive and migratory capacities in human ovarian cancer cell lines[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28):25520-25532.

[19] CAI Y, TAN X, LIU J, *et al.* Inhibition of pi3k/akt/mTOR signaling pathway enhances the sensitivity of the skov3/ddp ovarian cancer cell line to cisplatin *in vitro*[J]. *Chin J Cancer Res(中国癌症研究)*, 2014, 26(5):564-572.

[20] BANG Y J, IM S A, LEE K W, *et al.* Randomized, double-blind phase ii trial with prospective classification by atm protein level to evaluate the efficacy and tolerability of olaparib plus paclitaxel in patients with recurrent or metastatic gastric cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(33):3858-3865.

[21] CHEDGY E C, BLACK P C. Moving beyond the androgen receptor in advanced prostate cancer commentary on: DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer [J]. *Urology*, 2016, 8910-11.

[22] VAN DER NOLL R, MARCHETTI S, STEEGHS N, *et al.* Long-term safety and anti-tumour activity of olaparib monotherapy after combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced breast, ovarian or fallopian tube cancer[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(3):396-402.

(收稿日期:2018-04-01)