

疫反应，最终达到改善睡眠、促进卒中患者康复之目的^[8]。

本研究结果显示观察组患者的总有效率为 94.59%，高于对照组的 78.38%，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗后两组患者的 PSQI、HAMD 评分均明显降低，且观察组低于对照组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。睡眠质量随着时间的延长逐渐提高，血清 5-HT 水平较治疗前明显升高，血清 NE 水平含量明显降低，且观察组的 5-HT 高于对照组，NE 低于对照组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。观察组患者的不良反应总发生率为 2.70%，低于对照组的 18.92%，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

综上所述，养心安神汤联合耳穴揸针治疗脑卒中后失眠疗效较好，可有效改善患者的睡眠质量，调节神经递质水平，缓解抑郁情绪，提高生活质量，且安全可靠。

[参考文献]

(1) 刘丹, 李健, 陈薇, 等. 养血清脑颗粒联合米氮平治疗脑

卒中后抑郁伴失眠的临床观察 (J). 湖南中医药大报, 2018, 38(5): 582-585.

(2) 中华医学会精神科分会. 中国精神障碍分类与诊断标准 (CCMD-3) (M). 3 版. 济南: 山东科学技术出版社, 2002: 88.

(3) 周仲瑛. 中医内科学 (M). 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 158.

(4) 路桃影, 李艳, 夏萍, 等. 匹兹堡睡眠质量指数的信度及效度分析 (J). 重庆医学, 2014, 43(3): 260-263.

(5) 段泉泉, 胜利. 焦虑及抑郁自评量表的临床效度 (J). 中国心理卫生杂志, 2012, 26(9): 676-679.

(6) 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 (M). 北京: 中国医药科技出版社, 2002.

(7) 郭宇宙, 于子尧, 刘红爱, 等. 养血清脑颗粒对脑卒中后睡眠障碍患者症状改善及血清 5-HT、BDNF 水平的影响 (J). 疑难病杂志, 2017, 16(5): 457-460.

(8) 刘娜, 张子丽. 耳穴揸针联合西药治疗脑卒中后失眠临床观察 (J). 浙江中医药大学学报, 2017, 41(11): 907-910.

(文章编号) 1007-0893(2022)01-0011-05

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2022.01.004

双硫仑靶向 Wnt 和 AKT 信号通路降低卵巢癌细胞的恶性程度及对顺铂的耐受性

高瑞 唐杰 朱炜 周芸*

(深圳市罗湖区人民医院, 广东 深圳 518005)

[摘要] 目的: 探究双硫仑 (DSF) 对人卵巢癌细胞恶性程度及其对化疗药物敏感性的影响及相关机制。方法: 使用不同浓度 DSF ($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理卵巢癌细胞 SK-OV-3 和 A278, 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法 (MTT) 测定细胞活性。选取 DSF 有效浓度 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理细胞, 通过软琼脂糖克隆形成实验、微球形成实验检测干细胞特性, Transwell 实验检测细胞迁移, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 检测 Wnt 靶基因的信使核糖核酸 (mRNA) 表达, 双荧光素酶法检测 Wnt 通路的转录活性, 免疫印迹实验检测 PI3K/AKT/mTOR 和 RAF/MEK/ERK 的激活情况。采用 DSF ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和顺铂联合处理 SK-OV-3 和 A2780 细胞, 并使用 MTT 实验、软琼脂糖克隆形成实验和微球形成实验检测 DSF 对顺铂药物敏感性的影响。结果: 与对照组相比, DSF 处理能够显著降低卵巢癌细胞的增殖能力 ($P < 0.01$), 降低软琼脂糖中癌细胞克隆形成能力 ($P < 0.01$), 抑制卵巢癌细胞在悬浮培养下的微球形成 ($P < 0.01$) 以及细胞的迁移能力 ($P < 0.01$), 从而降低卵巢癌细胞的恶性程度。在与顺铂药物联合使用情况下, DSF 联合用药显著增强卵巢癌细胞对顺铂药物的敏感性 ($P < 0.01$)。机制方面的研究表明 DSF 处理显著降低卵巢癌细胞中 Wnt 信号通路活性, 同时显著抑制卵巢癌细胞中 RAF/MEK/ERK 和 PI3K/AKT/mTOR 通路的激活。结论: DSF 处理可显著降低卵巢癌细胞的恶性程度, 同时增强其对传统化疗药物顺铂的敏感性。DSF 抑癌作用可能是通过抑制 Wnt、RAF/MEK/ERK 和 PI3K/AKT/mTOR 等癌症促进信号通路的活性来实现的。

[关键词] 卵巢癌; 双硫仑; 顺铂; Wnt; PI3K/AKT/mTOR

[中图分类号] R 737.31 [文献标识码] A

[收稿日期] 2021-10-23

[基金项目] 深圳市罗湖区软科学研究计划项目 (201813)

[作者简介] 高瑞, 女, 主治医师, 主要从事妇产科工作。

[*通信作者] 周芸 (E-mail: ZY07070823@163.com)

Dissulfiram Targets Wnt and AKT Signaling Pathways to Reduce the Malignancy and Cisplatin Tolerance of Ovarian Cancer Cells

GAO Rui, TANG Jie, ZHU Wei, ZHOU Yun*

(Shenzhen Luohu District People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518005)

(Abstract) **Objective** To investigate the effect of disthiolam (DSF) on the malignant degree of human ovarian cancer cells and its sensitivity to chemotherapy drugs and related mechanisms. **Methods** Ovarian cancer cell lines SK-OV-3 and A2780 were treated with different concentrations of DSF ($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-triazolium bromide (MTT) assay was used to determine cell viability. The effective concentration of DSF ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was selected to treat the cells, and the characteristics of stem cells were detected by soft agarose formation assay and microspheres formation assay, cell migration was detected by Transwell assay, and messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of Wnt target gene was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The transcriptional activity of Wnt pathway was detected by dual luciferase assay, and the activation of PI3K/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK was detected by Western blot assay. SK-OV-3 and A2780 cells were treated with DSF ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and cisplatin, and the effects of DSF on the sensitivity of Cisplatin were detected by MTT assay, soft agron clonogenesis assay and microspheres formation assay. **Results** Compared with the control group, DSF treatment significantly reduced the proliferation ability of ovarian cancer cells ($P < 0.01$), decreased the cloning ability of cancer cells in soft agarose ($P < 0.01$), inhibited the formation of microspheres in suspension culture ($P < 0.01$) and migration ability of ovarian cancer cells ($P < 0.01$), so as to reduce the malignancy of ovarian cancer cells. DSF combined with cisplatin significantly increased the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin ($P < 0.01$). Studies on mechanism showed that DSF treatment significantly reduced the activity of Wnt signaling pathway in ovarian cancer cells, and significantly inhibited the activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in ovarian cancer cells. **Conclusion** DSF treatment can significantly reduce the degree of malignancy of ovarian cancer cells and enhance their sensitivity to traditional chemotherapy drug cisplatin. The anticancer effect of DSF may be realized by inhibiting the activity of cancer-promoting signaling pathways such as Wnt, RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR.

(Keywords) Ovarian cancer; Disulfiram; Cisplatin; Wnt; PI3K/AKT/mTOR

在女性相关癌症中, 卵巢癌是致死率最高的, 作为“沉默杀手”, 卵巢癌的相关症状在前期发生发展过程中并不明显, 约有 70% 的患者直到病情发展到 3 期或 4 期才被诊断出卵巢癌, 5 年生存率约为 47.2%。目前卵巢癌的治疗主要包括手术治疗与系统性治疗, 即手术与辅助性化疗结合的治疗方法^[1]。传统化疗药物铂类药物对早期卵巢癌患者效果显著, 但对晚期患者和恶性卵巢癌患者治疗效果不佳。因此, 扩展卵巢癌患者用药选择范围, 提高传统化疗药的治疗效果对卵巢癌患者具有重要的临床意义。

双硫仑 (disulfiram, DSF) 在 1951 年通过美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认证用于治疗酗酒, 因此也被称为“戒酒硫”, 至今已有 70 年临床使用历史。在早期的临床研究中, 研究人员发现服用 DSF 的癌症患者出现较好的癌症预后, 并以此为基础揭示了 DSF 用于癌症治疗的潜力^[2]。近期研究表明, 除其治疗酗酒的作用, DSF 还可靶向 p97、ROS、ALDH 等癌症相关蛋白从而对癌症发生发展的作用^[2-4], 并且在联合治疗的相关研究中 DSF 也被证明具有良好的降低化疗耐药性的作用^[5]。但目前关于 DSF 在卵巢癌中的作用及其降低癌细胞恶性程度的分子机制的研究还有所欠缺, 因此更深入了解 DSF 对癌细胞的影响及作用机制将

对有效治疗卵巢癌、提高卵巢癌对传统化疗药物的敏感性起到推动作用。本研究以卵巢癌细胞为实验对象, 通过系统实验解析 DSF 对卵巢癌恶性程度的影响, 并检测促进卵巢癌恶性程度的相关信号通路的激活情况, 为后续寻找 DSF 靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

A2780 细胞系用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基进行培养, SK-OV-3 细胞系用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 McCoy's 5A 培养基进行培养, 在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中培养 293T 细胞。所有细胞系均在含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱培养。细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞培养试剂购自 Gibco 公司, DSF 购自 Selleck 公司。

1.2 细胞增殖实验

将处于对数生长期的细胞消化计数后, 按 1000 个·孔⁻¹接种于 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔。在指定时间点培养基中加入 5 μL MTS (Promega) 溶液, 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱孵育 2 h, 测定 490 nm 波长的吸光值作为细

胞数目的指示。分别在 0 d、3 d 和 5 d 进行测定，以获取的吸光值绘制癌细胞的增殖曲线。

1.3 软琼脂克隆形成实验

在细胞计数之前，先将 4% 低熔点 Soft agar (Invitrogen) 在 70 °C 温水中融化，用 RPMI 1640 稀释至 0.8% 后取 1.5 mL 铺于 6 孔板中，冷凝后备用。将细胞对数生长期的细胞消化计数后，按照 1000 个 · mL⁻¹ 的比例加入到 RPMI 1640 稀释的液态的 0.4% Soft agar 中，之后加入到 0.8% Soft agar 包被好的 6 孔板中，凝固后加入 2 mL RPMI 1640 培养基，之后置于培养箱中培养 3 周，期间定时添加新鲜 RPMI 1640 完全培养基。克隆形成之后，用 0.01% 结晶紫染色 6 h，之后使用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 多次漂洗脱色，拍照后记录直径大于 0.1 mm 的克隆数目。

1.4 癌细胞微球形成实验

将细胞消化计数后，用微球形成培养基将细胞浓度调整至 1000 个 · mL⁻¹，将 100 μL 制备好的细胞悬液加至低吸附 96 孔板中，静置培养 2 周，前 5 d 尽量不要动，5 d 后定时添加新鲜培养基以补充营养。2 周后显微镜下拍照并计数。

1.5 细胞迁移实验

将处于对数生长期的细胞消化并计数，用不含血清的培养基将细胞悬液密度调整至 5 × 10⁵ 个 · mL⁻¹ 备用。向 24 孔板每孔中加入 600 μL 完全培养基，并将 Trans-well 小室 (BD Biosciences) 置放于孔内培养基上方，向小室内加入 200 μL 制备好的细胞悬液。根据细胞倍增时间调整在小室中的培养时间，一般是 12 ~ 24 h，12 ~ 24 h 后，取出小室，4% 多聚甲醛室温固定 10 min 后，0.1% 结晶紫染色 10 min。染色结束后，用 PBS 漂洗 3 次，然后用棉棒小心擦除小室内壁细胞。倒置显微镜观察细胞的迁移情况，拍照并计数。

1.6 双荧光素酶实验

将 293T 细胞铺于 24 孔板中，第 2 天将 TOP flash 报告质粒和内参报告质粒 Renilla-Reporter 转入 293T 细胞中。质粒表达 24 h 后，DSF 处理细胞 12 h 后，PBS 洗一遍细胞，每孔使用 100 μL 1 × Passive Lysis Buffer 裂解细胞，室温摇床 10 min，吸取上清 10 μL 至管中，加入 10 μL Luciferase Assay Buffer 检测荧光素酶的转录活性，随后加入 10 μL Stop Buffer (with Substrate) 检测内参的表达水平，记录相关数值用于计算 Wnt 信号通路的活性。

1.7 RNA 提取以及实时荧光定量聚合酶链式反应

核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 的抽提采用 TRIzol 法，步骤如下：TRIzol (Invitrogen) 裂解细胞后加入 20% 氯仿充分震荡，室温静置至 TRIzol 和氯仿分层。4 °C，12000 r · min⁻¹ 离心 15 min。将上清转移至新

的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中，加入等量体积的异丙醇，震荡混匀。4 °C，12000 r · min⁻¹ 离心 10 min。吸去上清，加入 1 mL 的焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水配制的 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀后，4 °C，12000 r · min⁻¹ 离心 5 min。吸去上清，空气中干燥 5 min 后，加入 50 ~ 100 μL DEPC 水充分溶解，使用 NanoDrop 分光光度计测定 RNA 的浓度，-80 °C 保存。在定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 分析前先利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为互补脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)，然后使用 SYBR Green 进行实时荧光定量 PCR。实时荧光 PCR 中用到的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列
LEF1	
Forward	TGCCAAATATGAATAACGACCCA
Reverse	GAGAAAAGTGCTCGTCACTGT
AXIN2	
Forward	TACTACTCCTTATTGGGCGATCA
Reverse	TTGGCTACTCGTAAAGTTTTGGT
CCND1	
Forward	GCTGCGAAGTGGAAACCATC
Reverse	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA
DKK1	
Forward	CCTTGAAGTCTGGTCTCAATTCC
Reverse	CAATGGTCTGGTACTTATCCCG
FZD7	
Forward	GTGCCAACGGCCTGATGTA
Reverse	AGGTGAGAACGGTAAAGAGCG
NKD1	
Forward	GGGAACTTCACTCCAAGCC
Reverse	CTCCCGATCCACTCCTCGAT

1.8 免疫印迹

将制备好的蛋白样品按需要的顺序上样，开始电泳。条带位于浓缩胶时使用 80 V 电压进行电泳，条带移到分离胶后调节电压至 120 V。电泳结束后，将蛋白转到 NC 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，裁剪膜并使用相应一抗 4 °C 孵育过夜。去掉抗体后，使用 TBST 洗涤 3 次，每次 5 min，并加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h，之后 TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。用 ECL 化学发光液 (Millipore) 显影记录。本研究中用到的抗体如下：RAF (Abcam, ab200653, 稀释比例 1:1000)，P-RAFS299 (Abcam, ab112053, 稀释比例 1:1000)，ERK1/2 (CST, 4695, 稀释比例 1:1000)，P-ERK1T202/2Y204 (CST, 9101, 稀释比例 1:1000)，AKT (CST, 2967S, 稀释比例 1:2000)，P-AKTT308 (CST, 2965S, 稀释比例 1:2000)，m-TOR (CST, 2983, 稀释比例 1:2000)，P-m-TORS2448 (CST, 2976S, 稀释比例 1:2000)，

S6K1 (Abcam, ab32529, 稀释比例 1:1000), P-S6K1S424 (Abcam, ab131436, 稀释比例 1:1000), β -actin (Abcam, ab8227, 使用浓度 1:3000)。

1.9 统计学方法

本研究涉及到的实验均重复 3 次。软琼脂克隆形成实验、癌细胞微球形成实验以及细胞迁移实验的实验结果拍照后利用 Image J 软件进行计数。采用 Graph Pad Prism 7.0 进行数据分析及作图, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 DSF 对卵巢癌细胞增殖的影响

使用不同浓度的 DSF ($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理卵巢癌细胞系 SK-OV-3 和 A2780 并绘制相关增殖曲线。结果表明, 在低浓度即 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, DSF 对 SK-OV-3 细胞增殖的影响有限, 但浓度提高至 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后 SK-OV-3 细胞的增殖受到显著抑制 (插页 1 图 1A), 而在 A2780 细胞系中也发现了 DSF 对卵巢癌细胞的生长抑制作用 (插页 1 图 1B)。

2.2 DSF 抑制卵巢癌细胞的增殖成瘤能力

在软琼脂克隆形成实验中, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理能够明显抑制 SK-OV-3 和 A2780 细胞系在软琼脂中的成瘤能力。对照组 SK-OV-3 细胞系在软琼脂中生长 2 周后能够形成约 320 个克隆, 而在经过 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理后仅能形成 100 个左右的克隆, 成瘤能力下调约 60%。同样地, A2780 在经过 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理后成瘤能力也有约 60% 的下调 (插页 1 图 2A)。

在癌细胞微球形成实验中, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理能够使 SK-OV-3 和 A2780 细胞系微球形成能力明显下降。对照组 SK-OV-3 细胞系在悬浮培养基中生长 3 周后能获得约 16 个克隆, 而在 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理下的癌细胞仅能获得 7 个左右克隆。同样地, A2780 在 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理下微球形成率也下调 50% 左右 (插页 1 图 2B)。

2.3 DSF 抑制卵巢癌细胞的迁移能力

在细胞迁移实验中, 对照组 SK-OV-3 约有 300 个细胞可以从小室的上层迁移到有血清的另一侧情况, 而 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理后的细胞仅有约 90 个细胞能从小室的上层迁移到另一侧 (插页 2 图 3A), 而在 A2780 细胞系中也可以观察到一致的结果 (插页 2 图 3B)。

2.4 DSF 降低卵巢癌细胞中 Wnt 信号通路活性

在对照组和 DSF 处理的卵巢癌细胞系 SK-OV-3 和 A2780 中检测 Wnt 信号通路主要靶基因 LEF1、AXIN2、CCND1、DKK1、FZD7、NKD1 的转录水平表达情况, 结果显示, DSF 处理 12 h 之后, 在两个细胞系中 Wnt 信

号通路靶基因的表达显著下调 (插页 2 图 4A)。在 293T 细胞中转染 TOP flash 和 Renilla 质粒后再使用 DSF 或 vehicle 处理 12 h, 检测对照组和 DSF 处理组中荧光素酶活性, 结果显示 DSF 处理后荧光素酶活性显著低于对照组 (插页 2 图 4B)。

2.5 DSF 减弱卵巢癌细胞中 RAF/MEK/ERK 和 PI3K/AKT/mTOR 信号转导

$5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理 SK-OV-3 和 A2780 细胞 24 h 后通过免疫印迹的方法检测 RAF/MEK/ERK 和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活情况。结果显示, 在 SK-OV-3 和 A2780 细胞中 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DSF 处理 24 h 后 P-RAF 有明显下调, 并且 RAF 下游 ERK1/2 的磷酸化水平也出现相应地下调 (插页 2 图 5A)。而在 AKT 相关信号通路中 DSF 处理后虽未影响 AKT 的磷酸化, 但 AKT 下游的 m-TOR 及相关下游分子的磷酸化却出现显著下调 (插页 2 图 5B)。

2.6 DSF 增强卵巢癌细胞对顺铂 (Cisplatin) 的化疗敏感性

分别用 DSF、Cisplatin、DSF 结合 Cisplatin 处理卵巢癌细胞 SK-OV-3 和 A2780, 并利用细胞增殖实验检测不同处理条件下两种细胞系的增殖速率。结果显示, 虽然 DSF 和 Cisplatin 均可以有效抑制 SK-OV-3 和 A2780 生长, 但 DSF 联合 Cisplatin 可以更高效地抑制卵巢癌细胞增殖, 抑制效率可达 80% (封三图 6A)。软琼脂克隆形成实验和微球形成实验的结果与 MTT 结果一致, DSF 联合 Cisplatin 用药可以更有效的降低卵巢癌细胞在软琼脂中以及悬浮条件下的克隆形成能力 (封三图 6B)。

3 讨论

老药新用在疾病治疗尤其是癌症治疗中有着极其重要的意义, 一方面药物安全性得到充分验证, 相关副作用也被医疗人员所熟知, 能够降低对患者的用药风险, 另一方面, 药物不在专利期, 且生产条件成熟, 能够极大的降低疾病治疗的经济成本。DSF 作为 FDA 批准的临床用药, 使用时间已经有 70 年。近年来 DSF 在阿尔兹海默症、Menkes 综合征和 LYME 病的治疗中都有应用, 其在癌症中的作用也受到越来越多的关注^[2]。

在已有研究报道中 DSF 可以有效抑制多种癌细胞的恶性程度, 包括乳腺癌、黑色素瘤、胰腺癌、结直肠癌以及前列腺癌等, 且研究人员对相关机制也进行了研究, 主要集中于活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB)、分离酶 VCP 等相关通路^[2-3]。但在卵巢癌中 DSF 是否能够发挥抑癌作用需要更多的实验进行证明, DSF 抑制卵巢癌的机制需要进一步研究。在本研究中, 笔者使用不同浓

度 DSF 即 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理卵巢癌细胞系 SK-OV-3 和 A2780, 发现 DSF 处理可以有效抑制卵巢癌细胞系的增殖, 并具有一定的浓度效应。随后笔者进一步在 SK-OV-3 和 A2780 细胞中进行软琼脂克隆形成实验, 证明 DSF 可以抑制 SK-OV-3 和 A2780 的克隆形成能力, 同时利用微球形成实验证明 DSF 可以降低卵巢癌细胞的干性。细胞迁移能力增强是癌细胞恶性的另一表现形式^[6], 为了研究 DSF 能否影响卵巢癌细胞的迁移能力, 笔者利用 SK-OV-3 和 A2780 在 DSF 处理与否的情况下进行了 Transwell 实验, 结果表明 DSF 可以降低 SK-OV-3 和 A2780 的迁移能力。通过以上多方面的实验进一步明确了 DSF 降低卵巢癌细胞的恶性程度, 与其在其他癌症中的抑癌作用一致。

Wnt/ β -catenin 信号通路的异常活化是癌症发生的重要因素, 越来越多的研究发现虽然在卵巢癌中 Wnt/ β -catenin 信号通路突变较少, 但是其异常激活在卵巢癌的发生发展中发挥着重要促进作用^[7]。因此, 在探索 DSF 抑制卵巢癌生长和迁移的机制时, 首先检测了 DSF 对卵巢癌细胞系中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。通过实时荧光定量 PCR 以及双荧光素酶实验笔者证明了 DSF 处理显著降低了卵巢癌细胞中 Wnt 信号通路的活性。

在卵巢癌患者中, 约有 70% 的患者存在 AKT 信号通路过度激活的现象, 引起过度激活的原因包括 PIK3CA 的突变或扩增以及 PTEN 的缺失或突变^[8]。由此可见 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在调控卵巢癌发生发展过程中发挥重要作用, 并且 PI3K/AKT/mTOR 可以调控癌细胞的转移能力。因此, 笔者检测了 DSF 处理对卵巢癌细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响。笔者发现 DSF 处理无法直接影响 AKT 的磷酸化, 但可以抑制 mTOR 及 mTOR 下游分子的磷酸化。因此笔者认为 DSF 可以通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路影响卵巢癌细胞的恶性程度。越来越多的研究表明 RAF/MEK/ERK 信号通路在卵巢癌发生发展过程中发挥重要作用^[9-10], 在本研究中笔者也检测了 DSF 对 RAF/MEK/ERK 信号通路的影响, 实验结果表明 DSF 处理可以显著降低 RAF 及其下游分子的磷酸化。综上笔者认为 DSF 处理能够通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 和 RAF/MEK/ERK 信号通路活性降低卵巢癌细胞的恶性程度。

临床治疗中, 早期卵巢癌一般选择手术治疗, 二期到四期卵巢癌通常为手术治疗结合以铂类药物为基础的化疗^[11]。尽管手术治疗结合化疗可以有效治疗部分卵巢癌患者, 但是对于晚期以及恶性卵巢癌患者来说癌细胞耐药性产生是影响预后的一个重要原因^[1]。为了探讨 DSF 在癌细胞耐药方面的作用同时更契合临床优化用药的需求, 笔者对 DSF 能否促进 Cisplatin 对卵巢癌的治疗

效果进行了初步探索, 结果显示 DSF 联合 Cisplatin 用药能够更有效的降低卵巢癌细胞的恶性程度。因此笔者认为 DSF 具有潜在的治疗卵巢癌的潜力, DSF 联合用药可以提高卵巢癌患者对铂类化疗药物的敏感性。

综上所述, DSF 可以抑制 Wnt/ β -catenin、PI3K/AKT/mTOR 和 RAF/MEK/ERK 信号通路的激活, 降低卵巢癌细胞恶性程度, 同时增强卵巢癌细胞对 Cisplatin 的敏感性, 有望成为临床联合用药治疗卵巢癌的更经济有效的选择。

[参考文献]

- (1) Stephanie L, Charlie G, Ignace V, et al. Epithelial ovarian cancer (J). *Lancet*, 2019, 393(10177): 1240-1253.
- (2) Lu C, Li X, Ren Y, et al. Disulfiram: a novel repurposed drug for cancer therapy (J). *Cancer Chemother Pharmacol*, 2021, 87(2): 159-172.
- (3) Skrott Z, Mistrik M, Andersen KK, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4 (J). *Nature*, 2017, 552(7684): 194-199.
- (4) Xu B, Wang S, Li R, et al. Disulfiram/copper selectively eradicates AML leukemia stem cells in vitro and in vivo by simultaneous induction of ROS-JNK and inhibition of NF- κ B and Nrf2 (J). *Cell Death & Disease*, 2017, 8(5): e2797.
- (5) Wang NN, Wang LH, Li Y, et al. Targeting ALDH2 with disulfiram/copper reverses the resistance of cancer cells to microtubule inhibitors (J). *Exp Cell Res*, 2018, 362(1): 72-82.
- (6) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation (J). *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- (7) Kotrbová A, Ovesná P, Gybel T, et al. WNT signaling inducing activity in ascites predicts poor outcome in ovarian cancer (J). *Theranostics*, 2020, 10(2): 537-552.
- (8) Deng J, Bai X, Feng X, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression (J). *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 618.
- (9) Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors (J). *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2014, 11(7): 385-400.
- (10) Ning Y, Fu YL, Zhang QH, et al. Inhibition of in vitro and in vivo ovarian cancer cell growth by pinorexinol occurs by way of inducing autophagy, inhibition of cell invasion, loss of mitochondrial membrane potential and inhibition Ras/MEK/ERK signalling pathway (J). *J Buon*, 2019, 24(2): 709-714.
- (11) Orr B, Edwards RP. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer (J). *Hematol Oncol Clin North Am*, 2018, 32(6): 943-964.