

基于 PI3K/Akt/FoxO4 信号通路探究美洲大蠊提取物 CII-3 诱导卵巢癌 SKOV3 细胞衰老的作用机制

田露^{1,2}, 刘衡³, 张成桂³, 周玥^{1,2*}, 毕子莹^{1,2}, 吴婷^{1,2}

1. 大理大学 组织学与胚胎学教研室, 云南 大理 671000
2. 云南省教育厅衰老与疾病研究重点实验室, 云南 大理 671000
3. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000

摘要: **目的** 探讨美洲大蠊提取物 CII-3 对卵巢癌 SKOV3 细胞的抗肿瘤作用及其潜在作用机制。**方法** 体外培养 SKOV3 细胞, 分为对照组和 CII-3 组, 通过 CCK-8 法和细胞集落形成实验测定 SKOV3 细胞增殖能力; 流式细胞术检测 SKOV3 细胞线粒体膜电位和细胞周期的改变; 衰老相关-β-半乳糖苷酶 (SA-β-Gal) 染色法检测 SKOV3 细胞衰老阳性细胞率; 荧光定量 PCR 检测 SKOV3 细胞端粒酶逆转录酶 (*TERT*) 和磷脂酰肌醇-3-激酶 (*PI3K*)、蛋白激酶 B (*Akt*)、叉头盒蛋白 O4 (*FoxO4*) mRNA 表达情况; Western blotting 检测 p-PI3K、p-Akt、p-FoxO4 蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较, 美洲大蠊提取物 CII-3 可有效抑制 SKOV3 细胞增殖, 细胞集落形成能力明显下降, 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 线粒体膜电位下降, SA-β-Gal 细胞衰老阳性率增加, *TERT* 活性降低, *PI3K*、*Akt* mRNA 和 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达上调, *FoxO4* mRNA 和 p-FoxO4 蛋白表达均下调。**结论** 美洲大蠊提取物 CII-3 通过调控 PI3K/Akt/FoxO4 信号通路诱导 SKOV3 细胞衰老。

关键词: 美洲大蠊; 卵巢癌; 细胞衰老; PI3K/Akt/FoxO4 信号通路; 磷脂酰肌醇-3-激酶

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)09-2204-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.09.002

Exploring effect and mechanism of *Periplaneta americana* extract CII-3 to induce senescence of ovarian cancer SKOV3 cells based on the PI3K/Akt/FoxO4 signaling pathway

TIAN Lu^{1,2}, LIU Heng³, ZHANG Chenggui³, ZHOU Yue^{1,2}, BI Ziyang^{1,2}, WU Ting^{1,2}

1. Department of Histology and Embryology, Dali University, Dali 671000, China
2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Aging and Disease Research, Dali 671000, China
3. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali 671000, China

Abstract: Objective To investigate the anti-tumour effects and potential mechanisms of the *Periplaneta americana* extract CII-3 on ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods** *In vitro*, SKOV3 cells were cultured and divided into control group and CII-3 group, and the proliferative capacity of SKOV3 cells was determined by the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and the cell colony formation assay. Flow cytometry was used to detect the changes in the cell cycle and mitochondrial membrane potential of SKOV3 cells. Positive senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-Gal) staining assay to detect senescence in SKOV3 cells. q-PCR was utilized to assess the modification of telomerase reverse transcriptase (*TERT*), and *PI3K*, *Akt*, *FoxO4* mRNA in SKOV3 cells. Western blotting assays were conducted to determine the expression of p-PI3K, p-Akt, p-FoxO4 protein in cells. **Results** Compared with the control group, *Periplaneta americana* extract CII-3 exhibited a significant inhibitory effect on the proliferation of SKOV3 cells, accompanied by a notable reduction in colony-forming ability, an increase in the proportion of cells arrested in the G₀/G₁ phase. The mitochondrial membrane potential decreased, the positive rate of senescence of SA-β-Gal cells increased, the activity of *TERT* decreased, the expression of *PI3K*, *Akt* mRNA and p-PI3K, p-Akt protein

收稿日期: 2024-07-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860038, 81660731)

作者简介: 田露, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究。E-mail: tl072022@163.com

*通信作者: 周玥, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: zhouyue_120@sina.com

expression were up-regulated, and both *FoxO4* mRNA and p-FoxO4 protein expression were down-regulated. **Conclusion** *Periplaneta americana* extract CII-3 induced cellular senescence in SKOV3 cells by regulating the PI3K/Akt/FoxO4 signaling pathway.

Key words: *Periplaneta americana*; ovarian cancer; cellular senescence; PI3K/Akt/FoxO4 signaling pathway; PI3K

卵巢癌是全球妇科癌症死亡的主要原因^[1], 具有高度隐匿性、侵袭性和化疗耐药的特征^[2]。由于其发病隐匿, 缺乏有效的早期诊断方法, 大多数患者在发现时已处于疾病晚期, 约 80% 的患者在初始肿瘤细胞减灭术和以铂类为基础的化疗后仍然出现复发、转移和耐药等问题^[3]。因此科学地探索卵巢癌的发病机制, 寻找更优的抗肿瘤药物, 应对治疗卵巢癌的难题非常必要。

中药具有易获取、不良反应少和价格低廉等天然优势, 以多层次、多环节、多靶点为特征的中药治疗越来越受到关注^[4]。美洲大蠊 *Periplaneta americana* L., 俗称“蟑螂”, 是一种珍贵的天然中药, 其入药始载于《神农本草经》^[5]。现代研究表明, 美洲大蠊主要含有蛋白质、多肽、氨基酸和核苷类等成分, 并具有多种生物学和药理学特性, 主要包括组织修复、抗炎、抗氧化、抗纤维化、抗肿瘤和免疫调节等作用^[6-7]。美洲大蠊提取物 CII-3 为小分子肽类物质, 是一种抗肿瘤有效活性成分^[8-9]。据报道, 美洲大蠊提取物对多种妇科疾病有不同程度的改善作用, 可以改善 H₂O₂ 诱导卵巢颗粒细胞的凋亡^[10], 抑制子宫内膜癌^[4]、三阴性乳腺癌^[11]、卵巢癌 HO-8910PM 细胞^[12]等增殖, 但美洲大蠊提取物 CII-3 对人卵巢癌 SKOV3 细胞的影响及其相关机制目前尚未见报道。

在肿瘤研究中, 通过诱导肿瘤细胞衰老来实现抗肿瘤的策略备受关注。磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路广泛参与细胞的多种生理活动, 与恶性肿瘤的增殖和转移密不可分^[13]。多项研究表明, PI3K/Akt 通路在卵巢癌的发生发展中起着关键作用^[14-16]。PI3K/Akt 信号通路可以上调长寿相关转录因子叉头盒蛋白 O (FoxO) 家族中 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 的表达, 与机体的代谢、衰老和肿瘤有关^[17-18]。PI3K/Akt/FoxO4 通路是否是美洲大蠊提取物 CII-3 治疗卵巢癌的潜在靶点尚未可知。因此, 本研究基于 PI3K/Akt/FoxO4 信号通路探讨美洲大蠊提取物 CII-3 诱导卵巢癌 SKOV3 细胞衰老的具体机制, 旨在为卵巢癌的治疗提供新策略。

1 材料

1.1 细胞和药物

人卵巢癌 SKOV3 细胞, 货号 CL-0215, 购于武

汉普诺赛生物科技有限公司, STR 鉴定正确。美洲大蠊提取物 CII-3 由大理大学药学院昆虫生物医药研发重点实验室提供, 由粉碎或未粉碎的美洲大蠊虫体通过大孔吸附树脂法提取制备, 结合体内外实验筛选出以小分子肽类为主的活性成分^[19-20]。

1.2 材料与试剂

McCoy's 5A 基础培养基 (批号 PM150710) 购自武汉普诺赛生物科技有限公司; 结晶紫染色液 (1%) (批号 G1062)、衰老相关-β-半乳糖苷酶染色试剂盒 (批号 G1580)、蛋白裂解液 (批号 R0010); 均购自北京索莱宝科技有限公司; 胰蛋白酶 (货号 MA0234)、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒 (批号 MA0218) 均购自大连美仑生物技术有限公司; JC-1 线粒体膜电位检测盒 (批号 C2006)、ECL 化学发光试剂盒 (批号 P0018S) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 细胞周期检测试剂盒 (批号 KGA512) 购自 Key GEN Bio TECH 公司; p-PI3K 兔来源抗体 (批号 10003336) 购自 Proteintech 公司; p-Akt、p-FoxO4 兔来源抗体 (批号 ET1609-51、ET1701-67) 均购自华安生物; β-actin 兔来源抗体 (批号 4970)、羊抗兔抗体 (批号 6990) 均购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 主要仪器

AE31 倒置显微镜 (Motic 公司); iMARK 多功能酶标仪 (Bio-Rad 公司); SC-3610 低速台式离心机 (中科中佳公司); BSC-1301 II A2 生物安全柜 (安泰空气技术公司); 371 CO₂ 培养箱 (赛默飞); 凝胶成像仪 GDS8000 (UVP 公司); TC20 自动细胞计数仪 (Bio-Rad 公司); 4376598 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司); 1658033 垂直电泳转印系统 (BIO-RAD 公司); ZHWY-100H 多振幅轨道摇床 (上海智诚公司); 1704150 蛋白转膜系统 (Bio-Rad 公司); YXQ-50S1 蒸汽压力灭菌器 (上海博迅公司); Cyto FLEX 流式细胞仪 (Beckman 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 SKOV3 细胞接种于含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 McCoy's 5A 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 倒置显微镜下观察细胞密度

达到 80%~90% 时, 按 1:3 传代培养。

2.2 CCK-8 法检测细胞增殖能力

将 SKOV3 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 1×10^3 个细胞, 分为对照组和 CII-3 组, 每组均设置 3 个复孔。对照组即常规培养的 SKOV3 细胞, 加入与 CII-3 等量的 PBS, CII-3 组分别在常规培养的 SKOV3 细胞加入质量浓度为 10、20、40、80、120、140、160 $\mu\text{g/mL}$ 的 CII-3, 另设空白组 (不含细胞)。在 24、48、72 h 时间点, 按照 CCK-8 试剂盒要求检测吸光度 (A) 值, 并计算细胞增殖抑制率。以此实验结果为依据, 确定最佳作用浓度和时间进行后续实验。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{CII-3}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 细胞集落形成实验检测细胞集落形成能力

将 SKOV3 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 1×10^5 个细胞, 分为对照组和 CII-3 组 (CII-3 质量浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$, 作用 48 h), 培养 48 h 后换专用培养基培养, 然后每天换液 1 次。显微镜下观察单个细胞团中细胞数 > 50 个时, 进行结晶紫染色, 计算细胞集落形成率。

$$\text{细胞集落形成率} = \text{细胞平均集落数} / \text{每孔加入的细胞数}$$

2.4 流式细胞术分析细胞周期

前期处理同 2.3 (每孔 1×10^5 个细胞), 收集对照组和 CII-3 组 SKOV3 细胞, 制成单细胞悬液, 加入 75% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 洗涤细胞, 用碘化丙啶染色, 全程在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、避光条件下温浴 30 min, 检测其在 488 nm 波长处的荧光强度。

2.5 SA- β -Gal 衰老染色检测衰老细胞阳性率

前期处理同 2.3, 将 SKOV3 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 1×10^6 个细胞, 分为对照组和 CII-3 组, 按照试剂盒要求处理后加入染色工作液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、避光条件下孵育过夜, 倒置显微镜下观察并拍照, 呈现为蓝色的细胞被认定为衰老阳性细胞, 未着色的细胞被认定为衰老阴性细胞, 随机选取 3 个不同视野, 计数衰老阳性细胞数后取平均值, 计算衰老细胞阳性率。

$$\text{衰老细胞阳性率} = \text{衰老阳性细胞数} / \text{视野内细胞总数}$$

2.6 流式细胞术检测线粒体膜电位

前期处理同 2.3 (每孔 1×10^5 个细胞), 收集对照组和 CII-3 组 SKOV3 细胞, 培养基重悬于细胞并加入 JC-1 染色工作液, 充分混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1500 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清。加入 JC-1 染色缓冲液 (1 \times) 重悬细胞, 在上述条件下重复离心 2 次, 每次 3 min, 弃上清, 加入 JC-

1 染色缓冲液 (1 \times) 重悬, 采用流式细胞仪检测。

2.7 荧光定量 PCR 检测 SKOV3 细胞 TERT、PI3K、Akt、FoxO4 mRNA 表达

收集对照组和 CII-3 组 SKOV3 细胞, 按步骤依次加入 RNAiso 和氯仿进行裂解, 提取总 RNA, 用超微量分光光度计测定 RNA 的质量和浓度。配制 gDNA 消化混合液, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 的反应条件下逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 以 GAPDH 为内参, 引物序列见表 1。将反应体系加入至 PCR 8 连管, 每组设置 3 个复孔, 离心后收集管底的液体, 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 40 个循环, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40 个循环的条件下进行反应, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组 TERT、PI3K、Akt、FoxO4 mRNA 的相对表达水平。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	核酸序列 (5'-3')	产物长度/bp
TERT	正向: GGAGAACAAGCTGTTGCGG	140
	反向: AGCCATACTCAGGGACACCT	
PI3K	正向: CGACTTTGTGACCTTCGGCT	109
	反向: GCATGCCGATAGCAAACCAAT	
Akt	正向: GGACAAGGACGGGCACATTA	192
	反向: CGACCGCACATCATCTCGTA	
FoxO4	正向: CCGGAATGCCTGGGGAAATCA	179
	反向: TGTGGCGGATCGAGTTCCTCC	
GAPDH	正向: AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG	130
	反向: GGCAGAGATGATGACCCTTTT	

2.8 Western blotting 检测 p-PI3K、p-Akt 和 p-FoxO4 蛋白表达

收集对照组和 CII-3 组 SKOV3 细胞, 加入裂解液提取总蛋白, 测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳、转膜后进行封闭, 加入 p-PI3K、p-Akt、p-FoxO4 一抗 (1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 加入二抗 (1:1000), 孵育 1 h 后, TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 覆盖 ECL 曝光液, 应用凝胶成像系统成像, Image J 软件分析蛋白质条带。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析, GraphPad Prism 9.5 软件进行绘图, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均值差异分析采用单因素方差分析, 两组间比

较采用独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 CII-3 抑制 SKOV3 细胞增殖

如表 2 所示,与对照组比较,不同质量浓度 CII-3 作用于 SKOV3 细胞后,细胞增殖能力明显下降 ($P < 0.05$),当 CII-3 质量浓度为 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$,作用时间为 48 h 时,CII-3 对 SKOV3 细胞的抑制作用最佳

($P < 0.05$)。因此,本研究选择 CII-3 质量浓度为 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$,作用时间为 48 h 进行后续实验。

3.2 CII-3 降低 SKOV3 细胞集落形成能力

如图 1A 所示,与对照组比较,CII-3 组细胞集落形成数量明显减少;如图 1B 所示,与对照组比较,CII-3 组细胞集落形成率显著降低 ($P < 0.001$),提示 CII-3 作用后,SKOV3 细胞增殖能力下降。

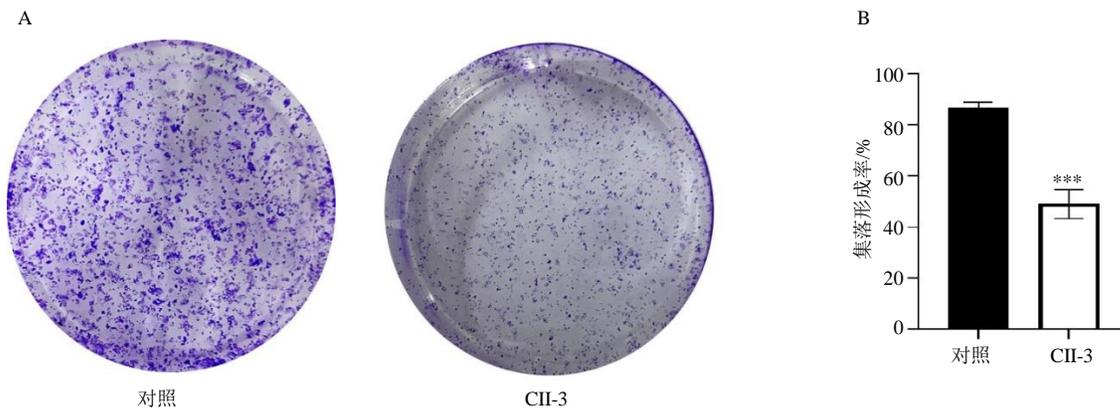
表 2 CII-3 对 SKOV3 细胞增殖能力的影响

Table 2 Effects of CII-3 on proliferation of SKOV3 cells

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	—	—	—
CII-3	10	$30.551 \pm 3.183^*$	$35.469 \pm 6.793^*$	$23.590 \pm 0.785^{*\Delta}$
	20	$31.938 \pm 3.452^*$	$38.952 \pm 7.211^*$	$35.448 \pm 7.354^*$
	40	$34.249 \pm 3.674^*$	$42.229 \pm 7.141^*$	$41.596 \pm 1.778^*$
	80	$48.209 \pm 1.279^{*\Delta}$	$59.382 \pm 1.577^{*\Delta\#}$	$48.302 \pm 5.076^*$
	120	$28.135 \pm 3.864^*$	$39.821 \pm 7.893^*$	$35.543 \pm 0.987^*$
	140	$30.743 \pm 3.389^*$	$28.708 \pm 9.402^*$	$32.953 \pm 0.959^*$
	160	$27.485 \pm 2.948^*$	$28.501 \pm 8.910^*$	$30.767 \pm 0.800^*$

与对照组比较: $*P < 0.05$; 与相同时间 CII-3 组比较: $\Delta P < 0.05$; 与相同浓度 CII-3 组比较: $\#P < 0.05$ 。

$*P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs the same time CII-3 group; $\#P < 0.05$ vs the same concentration CII-3 group.



A-SKOV3 细胞集落形成结果图; B-SKOV3 细胞集落形成实验结果统计图 ($\bar{x} \pm s, n=3$); 与对照组比较: $***P < 0.001$ 。

A-SKOV3 cell colony formation results; B-Statistical chart of SKOV3 cell colony formation experiment ($\bar{x} \pm s, n=3$); $***P < 0.001$ vs control group.

图 1 CII-3 对 SKOV3 细胞集落形成能力的影响

Fig. 1 Effects of CII-3 on colony forming ability of SKOV3 cells

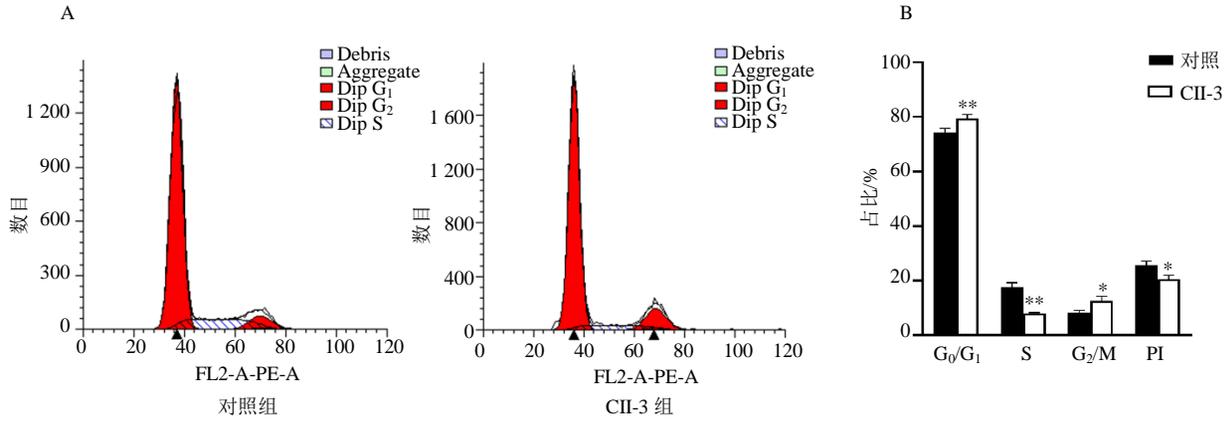
3.3 CII-3 阻滞 SKOV3 细胞周期于 G_0/G_1 期

如图 2A 所示,与对照组比较,CII-3 组细胞 G_0/G_1 期比例升高 ($P < 0.01$),S 期比例降低 ($P < 0.01$), G_2/M 期比例升高 ($P < 0.05$),但 S 期和 G_2/M 期整体比例减少,即细胞增殖指数(PI)下降($P < 0.05$) (图 2B),提示 CII-3 作用后,SKOV3 细胞阻滞于

G_0/G_1 期,细胞增殖能力下降。

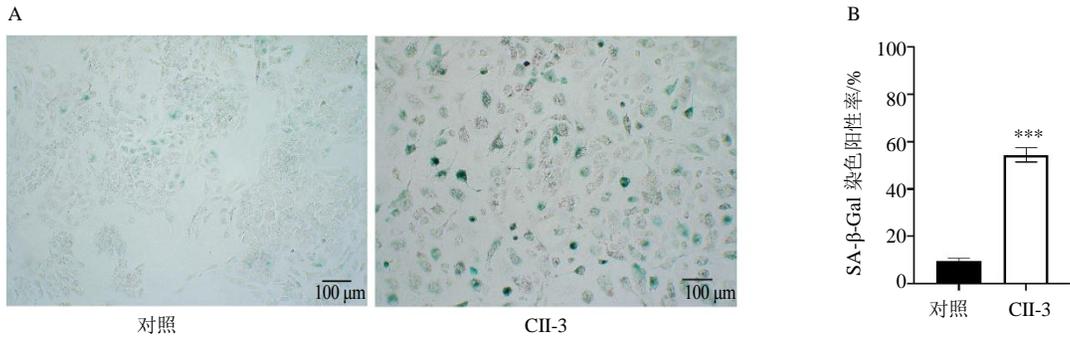
3.4 CII-3 增加 SKOV3 细胞衰老阳性细胞率

如图 3 所示,与对照组比较,CII-3 组细胞体积变大,形态扁平,SA- β -Gal 染色阳性率增加 ($P < 0.001$),提示 CII-3 作用后,SKOV3 细胞出现衰老生物学改变。



A-流式细胞术检测 SKOV3 细胞周期结果图; B-SKOV3 细胞周期结果统计图 ($\bar{x} \pm s, n=3$); 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
A-Flow cytometry detection of SKOV3 cell cycle results; B-SKOV3 cell cycle results statistical chart ($\bar{x} \pm s, n=3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图 2 CII-3 对 SKOV3 细胞周期的影响
Fig. 2 Effect of CII-3 on SKOV3 cell cycle



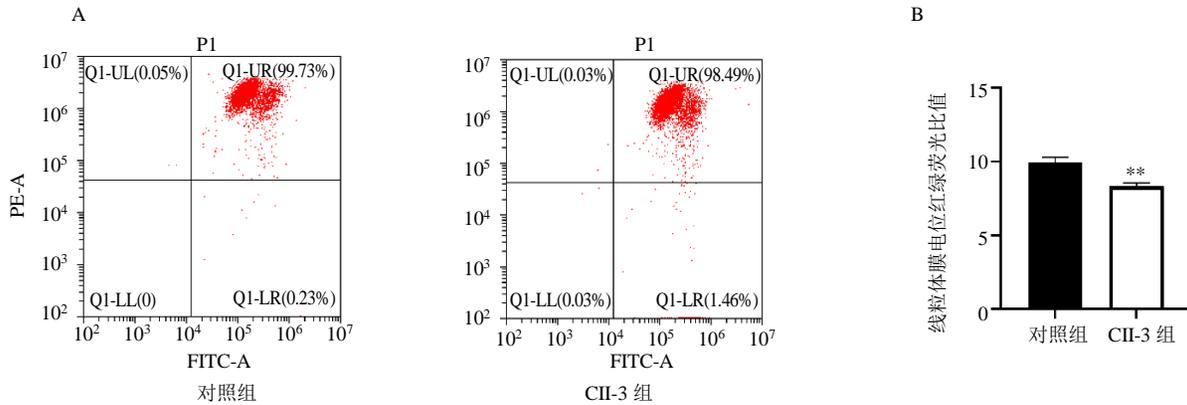
A-SKOV3 细胞 SA-β-Gal 染色结果图 ($\times 100$); B-SKOV3 细胞 SA-β-Gal 染色结果统计图 ($\bar{x} \pm s, n=3$); 与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。
A.SA-β-Gal staining results of SKOV3 cells ($\times 100$); B-Statistical chart of SA-β-Gal staining results of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$); *** $P < 0.001$ vs control group.

图 3 CII-3 对 SKOV3 细胞衰老阳性率的影响
Fig. 3 Effect of CII-3 on the senescence positive rate of SKOV3 cells

3.5 CII-3 降低 SKOV3 细胞线粒体膜电位

如图 4 所示, 与对照组比较, CII-3 组 SKOV3 细

胞比值降低 ($P < 0.01$), 提示 CII-3 作用后, SKOV3 细胞线粒体膜电位下降, 出现线粒体功能障碍。



A-SKOV3 细胞线粒体膜电位红绿荧光比值结果图; B-SKOV3 细胞线粒体膜电位红绿荧光比值统计图 ($\bar{x} \pm s, n=3$); 与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。
A-Results of red-green fluorescence ratio of mitochondrial membrane potential in SKOV3 cells; B-Statistical diagram of red-green fluorescence ratio of SKOV3 cytosteen membrane potential ($\bar{x} \pm s, n=3$); ** $P < 0.01$ vs control group.

图 4 CII-3 对 SKOV3 细胞线粒体膜电位的影响
Fig. 4 Effect of CII-3 on mitochondrial membrane potential of SKOV3 cells

3.6 CII-3 降低 SKOV3 细胞 TERT 活性

如图 5 所示,与对照组比较,CII-3 组 SKOV3 细胞 *TERT* mRNA 表达水平低于对照组 ($P < 0.001$),提示 CII-3 作用后,SKOV3 细胞端粒酶活性下降。

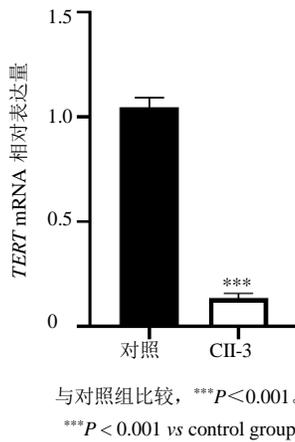
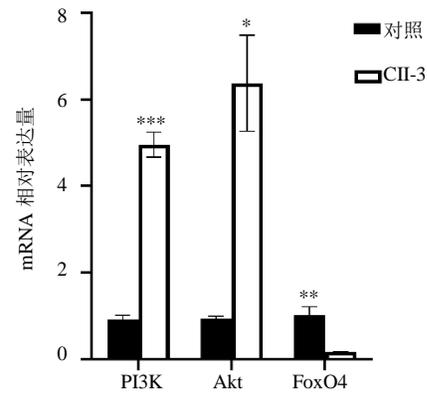


图 5 CII-3 对 SKOV3 细胞端粒酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of CII-3 on telomerase activity of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 CII-3 调节 SKOV3 细胞 *PI3K*、*Akt* 和 *FoxO4* mRNA 表达

如图 6 所示,与对照组比较,CII-3 组 SKOV3 细胞 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$ 、



与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

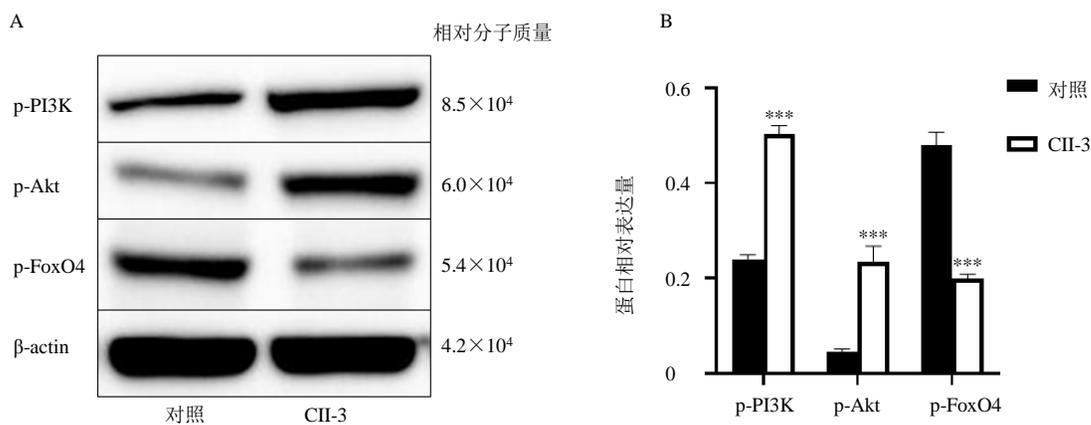
图 6 CII-3 对 SKOV3 细胞 *PI3K*、*Akt* 和 *FoxO4* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of CII-3 on *PI3K*, *Akt* and *FoxO4* mRNA expression in SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.001), *FoxO4* mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$)。

3.8 CII-3 调节 SKOV3 细胞 p-*PI3K*、p-*Akt* 和 p-*FoxO4* 蛋白表达

如图 7 所示,与对照组比较,CII-3 组 SKOV3 细胞 p-*PI3K*、p-*Akt* 蛋白表达明显升高 ($P < 0.001$), p-*FoxO4* 蛋白表达明显下降 ($P < 0.001$)。



A-Western blotting 检测 p-*PI3K*、p-*Akt*、p-*FoxO4* 蛋白表达结果图; B-SKOV3 细胞 p-*PI3K*、p-*Akt*、p-*FoxO4* 相对蛋白表达水平统计图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$); 与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

A-Western blotting detection of p-*PI3K*, p-*Akt*, p-*FoxO4* protein expression results; B-Relative protein expression levels of p-*PI3K*, p-*Akt* and p-*FoxO4* in SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$); *** $P < 0.001$ vs control group.

图 7 CII-3 对 SKOV3 细胞 p-*PI3K*、p-*Akt* 和 p-*FoxO4* 蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of CII-3 on p-*PI3K*, p-*Akt* and p-*FoxO4* protein expression in SKOV3 cells

4 讨论

近年来,美洲大蠊的抗肿瘤活性得到了广泛关注^[9]。研究表明,美洲大蠊提取物对肝癌 HepG2 细

胞^[21-22]、三阴性乳腺癌细胞^[11]、卵巢癌 HO-8910PM 细胞^[12]等均有不同程度的抑制作用。已有研究表明美洲大蠊提取物 CII-3 能够抑制肝癌耐药细胞自噬

和侵袭转移^[23]、调控 p53 蛋白和沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路诱导白血病 K562 细胞衰老^[24-26]。本课题组前期研究表明, CII-3 通过调控 p16^{INK4a} 蛋白表达从而诱导 SKOV3 细胞衰老^[27]。本研究证明了美洲大蠊提取物 CII-3 对 SKOV3 细胞的增殖抑制作用, 并且从细胞周期、线粒体膜电位、SA- β -Gal 和端粒酶逆转录酶活性等方面证实了 CII-3 诱导 SKOV3 细胞的衰老作用。同时, 本研究发现了 CII-3 对 PI3K 和 Akt 的激活作用以及对 FoxO4 的抑制作用。因此, 本研究猜测 CII-3 诱导 SKOV3 细胞的衰老作用机制可能与 PI3K/Akt/FoxO4 信号通路有关。

细胞衰老是一种细胞周期停滞的永久性状态^[28]。细胞衰老作为一种肿瘤抑制机制, 通过作为无限增殖的屏障来防止肿瘤进展, 成为防止肿瘤发生的保障^[29]。据报道, 血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 抑制剂帕唑帕尼可以靶向核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 刺激肾癌细胞衰老^[30]。另有研究指出抑癌基因 PTEN 通过增加 TRIM39 蛋白的表达来抑制 p21 的降解, 促进细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期和细胞衰老, 进而抑制卵巢癌的发生和发展^[31]。因此, 细胞衰老疗法可能是治疗卵巢癌的一种手段。本研究显示 CII-3 能够抑制 SKOV3 细胞增殖, 并且当 CII-3 质量浓度为 80 μ g/mL, 作用时间为 48 h 时, 增殖抑制率最高, CII-3 作用于 SKOV3 细胞后, SKOV3 细胞集落形成能力下降, 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, SA- β -Gal 染色阳性细胞率增加, 线粒体膜电位下降, TERT 活性降低, 提示 CII-3 作用后 SKOV3 细胞出现衰老生物学改变。以上多项检测指标证明美洲大蠊提取物 CII-3 可以诱导 SKOV3 细胞衰老。

PI3K 作为一种脂质激酶, 被细胞外配体激活后, 形成磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸 (PIP3), 产生的 PIP3 触发下游蛋白质 Akt, 进而激活细胞增殖和分化^[14]。FoxO4 作为一种肿瘤抑制因子^[32], 是 PI3K/Akt 途径的下游成员^[33], 参与调节 DNA 损伤反应、氧化应激反应、细胞分化、细胞周期进程和细胞死亡等过程^[18]。PI3K/Akt 通路在各种癌症中失调, 如卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌和肾癌等, 并且能够靶向 FoxO4 以发挥其抗癌功能^[34-35]。PI3K/Akt/FoxO4 途径在实体瘤中发挥关键作用, 本研究证明美洲大蠊提取物 CII-3 作用于 SKOV3 细胞后 PI3K、Akt mRNA 和 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达均明显升高, FoxO4 mRNA 和 p-FoxO4 蛋白表达均明显下降, 提

示 CII-3 可能通过调控 PI3K/Akt/FoxO4 信号通路诱导卵巢癌 SKOV3 细胞衰老。

综上所述, 美洲大蠊提取物 CII-3 能够诱导 SKOV3 细胞衰老, 并且诱导的衰老作用可能与调控 PI3K/Akt/FoxO4 信号通路有关。因此, 本研究为 CII-3 在卵巢癌治疗上的应用提供了实验依据和理论基础, 也为 CII-3 的临床应用提供新思路, 但其具体机制还需进一步深入体内研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yu M J, Wu Y M, Li Q F, *et al.* Colony-stimulating factor-1 receptor inhibition combined with paclitaxel exerts effective antitumor effects in the treatment of ovarian cancer [J]. *Genes Dis*, 2024, 11(3): 100989.
- [2] Wang X J, Sun J D, Liu Y, *et al.* Trps1 predicts poor prognosis in advanced high grade serous ovarian carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2024, 154(9): 1639-1651.
- [3] Huang T T, Chiang C Y, Nair J R, *et al.* AKT1 interacts with DHX9 to mitigate R loop-induced replication stress in ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(6): 887-904.
- [4] Zhao Y N, Yang A L, Tu P F, *et al.* Anti-tumor effects of the American cockroach, *Periplaneta americana* [J]. *Chin Med*, 2017, 12: 26.
- [5] Nguyen T T, Deng Z, Guo R Y, *et al.* *Periplaneta americana* extract ameliorates LPS-induced acute lung injury via reducing inflammation and oxidative stress [J]. *Curr Med Sci*, 2023, 43(3): 445-455.
- [6] Zhou X, Yang M, Jin J, *et al.* *Periplaneta americana* (Insecta: Blattodea) and organ fibrosis: A mini review [J]. *Medicine*, 2022, 101(51): e32039.
- [7] 林喆, 李全学, 徐静, 等. 美洲大蠊化学成分和生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3645-3649.
- [8] 王钦, 刘克娜, 孔彩华, 等. 美洲大蠊有效成分的提取及药理活性研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(8): 108-111.
- [9] Xu J L, Che Y H, Liu X Y, *et al.* The regulating effect of CII-3 and its active components from *Periplaneta americana* on M1/M2 macrophage polarization [J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4416.
- [10] Fu R, Kong C H, Wang Q, *et al.* Small peptides from *Periplaneta americana* inhibits oxidative stress-induced KGN cell apoptosis by regulating mitochondrial function through Bcl2L13 [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(2): 473-486.
- [11] Bai H F, Zhang S Y, Yan Y M, *et al.* N-containing phenolic compounds from *Periplaneta americana* with triple negative breast cancer inhibitory activity [J].

- Phytochemistry*, 2024, 218: 113936.
- [12] 齐奇. 美洲大蠊提取物对高转移性卵巢癌细胞株 HO-8910PM 的作用研究 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2018.
- [13] Jia W Y, Lin X, Chen X Z, *et al.* Rujifang inhibits triple-negative breast cancer growth via the PI3K/Akt pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 327: 118011.
- [14] Sabbah D A, Hajjo R, Bardaweel S K, *et al.* Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in anticancer research: A recent update on inhibitor design and clinical trials (2020-2023) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2024, 34(3): 141-158.
- [15] Zhu J, Zhu H, Zhu Q, *et al.* The roles of autophagy, ferroptosis and pyroptosis in the anti-ovarian cancer mechanism of harmine and their crosstalk [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 6504.
- [16] Fang F, Zhang X Y, Fang Y. Diosgenin inhibits proliferation and migration of ovarian cancer cells and induce apoptosis via upregulation of PTEN [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2024, 103(3): e14459.
- [17] Xu B, Wang G Y, Zhang J Q, *et al.* Resveratrol decreases FoXO protein expression through PI3K-Akt-dependent pathway inhibition in H₂O₂-treated synoviocytes [J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32(12): 1305-1315.
- [18] Zhang F, Virshup D M, Cheong J K. Oncogenic RAS-induced CK1 α drives nuclear FOXO proteolysis [J]. *Oncogene*, 2018, 37(3): 363-376.
- [19] 刘光明, 何正春, 王晓雨, 等. 大孔吸附树脂制备的美洲大蠊抗肿瘤有效部位及用途: CN101214262B [P]. 2012-09-05.
- [20] 周姣姣, 张成桂, 刘玉雨, 等. 美洲大蠊提取物 CII-3 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 大理大学学报, 2019, 4(2): 27-32.
- [21] 马璟婷, 周杰, 李彩琳, 等. 美洲大蠊提取物体外对肝癌耐药细胞 BEL-7402/5-FU 自噬和侵袭转移的影响 [J]. 中医药信息, 2023, 40(12): 23-28.
- [22] 陈莉, 齐焯迪, 李智, 等. 美洲大蠊多肽和顺铂联用对 HepG2 细胞凋亡及自噬的影响 8 [J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2023, 44(4): 69-74.
- [23] Ma H Y, Li X, Che J, *et al.* The inhibitory effect of *Periplaneta americana* L. on hepatocellular carcinoma: Explore the anti-hepatocellular carcinoma active site and its mechanism of action [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 291: 114884.
- [24] 何思悦, 唐紫云, 刘衡, 等. 美洲大蠊提取物 CII-3 调控 p53 蛋白抑制 K562 细胞增殖 [J]. 大理大学学报, 2023, 8(2): 19-23.
- [25] 何思悦, 张成桂, 刘衡, 等. 美洲大蠊提取物 CII-3 调控 SIRT1/mTOR 信号通路诱导白血病 K562 细胞衰老 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(11): 3039-3045.
- [26] 何思悦. 美洲大蠊提取物 CII-3 调控 SIRT1/mTOR 信号通路诱导白血病细胞 K562 细胞衰老 [D]. 大理: 大理大学, 2023.
- [27] 毕子莹, 周玥, 张成桂, 等. 美洲大蠊提取物 CII-3 调控 p16INK4a 诱导 SKOV3 细胞衰老 [J]. 医学研究与教育, 2024, 41(1): 1-8.
- [28] Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of cellular senescence [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(6): 436-453.
- [29] Gilson E, Soubeyran P, Solary E. Targeting senescence for next-generation cancer treatments [J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(4): 635-638.
- [30] Wang X Y, Yang J, Li D C, *et al.* Pazopanib stimulates senescence of renal carcinoma cells through targeting nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, 38(4): e23689.
- [31] Ke X P, Li L, Li J W, *et al.* Anti-oncogenic PTEN induces ovarian cancer cell senescence by targeting P21 [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(1): 118-128.
- [32] Gong C W, Ai J Y, Fan Y, *et al.* NCAPG promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma through PI3K/Akt signaling [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 8537-8552.
- [33] Liu H, Wang L, Weng X D, *et al.* Inhibition of Brd4 alleviates renal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress by blocking FoxO4-mediated oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101195.
- [34] Xie G E, Li J L, Chen J S, *et al.* Knockdown of flotillin-2 impairs the proliferation of breast cancer cells through modulation of Akt/FOXO signaling [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(5): 2285-2290.
- [35] Yuan L, Wang J, Xiao H F, *et al.* Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 265(1): 83-92.

[责任编辑 金玉洁]