

基于 Wnt/ β -catenin 通路探究对叶百部碱抗卵巢癌的作用机制

何石燕^{1,2,3}, 英菲雨^{1,2,3}, 夏星¹, 高红伟¹, 王孝勋^{1,2,3*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200
2. 广西壮瑶药重点实验室, 广西 南宁 530200
3. 壮瑶药协同创新中心, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 探讨对叶百部碱抗卵巢癌的作用机制。**方法** 以人卵巢癌 SKOV3 细胞为研究对象, 设置对照组、顺铂 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和对叶百部碱 (50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组。采用 MTT 法检测对叶百部碱对细胞活力的影响; 光学显微镜观察药物干预后细胞形态; EdU 实验检测对叶百部碱对细胞增殖活性的影响; 克隆形成实验检测细胞克隆能力; 划痕实验和 Transwell 实验观察细胞迁移和侵袭能力; Hoechst 33258 核染色观察细胞凋亡形态; 流式细胞术检测细胞凋亡和周期分布情况; Western blotting 检测 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、骨髓细胞瘤病毒癌基因 (cellular-myelocytomatosis viral oncogene, c-myc) 蛋白、 β -连环蛋白 (β -catenin)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 表达。**结果** 与对照组比较, 对叶百部碱对 SKOV3 细胞具有显著的增殖抑制作用 ($P < 0.01$); 对叶百部碱能改变细胞形态, 细胞出现凋亡迹象; 对叶百部碱显著抑制细胞克隆形成及迁移、侵袭能力 ($P < 0.01$); 对叶百部碱组细胞荧光强度增强, 细胞核固缩破裂, 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), G₀/G₁ 期和 G₂/M 期细胞比例显著降低 ($P < 0.01$), S 期细胞比例显著升高 ($P < 0.01$); 对叶百部碱组 Bax/Bcl-2、E-cadherin 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$), Cyclin D1、c-myc、 β -catenin、N-cadherin 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 对叶百部碱通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路及上调 Bax/Bcl-2 的表达, 促进 SKOV3 细胞凋亡, 抑制其增殖、迁移与侵袭, 并将细胞阻滞在 S 期, 进而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 对叶百部碱; 卵巢癌; SKOV3 细胞; Wnt/ β -catenin 信号通路; 增殖; 侵袭; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-5887-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.015

Mechanism of tuberostemonine against ovarian cancer based on Wnt/ β -catenin signaling pathway

HE Shiyan^{1,2,3}, YING Feiyu^{1,2,3}, XIA Xing¹, GAO Hongwei¹, WANG Xiaoxun^{1,2,3}

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China
2. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning 530200, China
3. Collaborative Innovation Center of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of tuberostemonine against ovarian cancer. **Methods** Human ovarian cancer SKOV3 cells were used as the research object, and control group, cisplatin (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group, tuberostemonine (50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) groups were set up. MTT method was used to detect the effect of tuberostemonine on cell viability; Cell morphology after drug intervention was observed using optical microscope; EdU experiment was used to detect the effect of tuberostemonine on cell proliferation activity; Cell cloning ability was detected through clone formation experiment; Scratch and Transwell experiments were used to observe cell migration and invasion abilities; Hoechst 33258 nuclear staining was used to observe the morphology of cell apoptosis; Cell apoptosis and cycle distribution were detected by flow cytometry; Western blotting was used to detect the expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), Cyclin D1, cellular-myelocytomatosis viral oncogene (c-myc), β -

收稿日期: 2024-05-08

基金项目: 广西壮瑶药重点实验室 (桂科基字[2014]32 号); 壮瑶药协同创新中心 (桂教科研[2013]20 号); 广西一流学科中药学 (民族药学) (桂教科研[2018]12 号)

作者简介: 何石燕 (1998—), 硕士研究生, 主要从事中药品种、质量及资源开发研究。E-mail: 2812256568@qq.com

*通信作者: 王孝勋 (1973—), 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药品种、质量及资源开发研究。E-mail: 407977122@qq.com

catenin, E-cadherin and N-cadherin. **Results** Compared with control group, tuberostemonine had a significant inhibitory effect on the proliferation of SKOV3 cells ($P < 0.01$); Tuberostemonine could change cell morphology and cells were shown signs of apoptosis; Tuberostemonine could significantly inhibit cell clone formation, migration and invasion abilities ($P < 0.01$); The fluorescence intensity of cells in tuberostemonine group was enhanced, the cell nucleus was pyknotic and ruptured, and the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.01$), the proportions of G₀/G₁ and G₂/M phase cells were significantly reduced ($P < 0.01$), while the proportion of S phase cells was significantly increased ($P < 0.01$); The expressions of Bax/Bcl-2 and E-cadherin proteins were significantly up-regulated ($P < 0.01$), while the expressions of Cyclin D1, c-myc, β -catenin and N-cadherin proteins were significantly down-regulated ($P < 0.05, 0.01$) in tuberostemonine group. **Conclusion** Tuberostemonine promotes SKOV3 cells apoptosis, inhibits its proliferation, migration and invasion, and blocks cells in the S phase by down-regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway and up-regulating the expression of Bax/Bcl-2, thereby exerting anti-tumor effect.

Key words: tuberostemonine; ovarian cancer; SKOV3 cells; Wnt/ β -catenin signaling pathway; proliferation; invasion; apoptosis

卵巢癌是世界上七大常见的恶性肿瘤之一，其致死率在妇女恶性肿瘤中位居第 2，仅次于宫颈癌^[1]。因卵巢癌早期无明显症状，故确诊时多为晚期，造成卵巢癌高死亡率，目前，对于晚期卵巢癌的治疗主要是通过初次或多次肿瘤细胞减灭手术以及结合铂类药物，其中以顺铂及其类似物作为一线药物^[2]。而顺铂耐药患者预后性较差，易复发，并对其他化疗药不敏感，是导致卵巢癌高死亡率的重要原因^[3]。近年来卵巢癌的治疗取得了很大的进步，但其预后并没有显著的提高，此外，耐药、复发、转移等因素仍然是制约卵巢癌治疗的重要因素^[4]。在中医理论中，卵巢癌属于“癥瘕”的范畴，医典中指出“癥瘕”多有月经不调、腹胀、腹满、腹痛或腹部有结块等证候^[5]。从“癥瘕”这一范畴来看，中医普遍认为卵巢癌的发生源于肾阳虚衰、阴阳失衡^[6-9]。

百部为百部科植物直立百部 *Stemona sessilifolia* (Miq.) Miq.、蔓生百部 *S. japonica* (Blume) Miq. 或对叶百部 *S. tuberosa* Lour. 的干燥块根，有温肺下气止咳、杀虫灭虱等功效，常用于治疗新久咳嗽、肺癆咳嗽、顿咳、头虱、体虱、蛲虫病、阴痒等^[10]。百部常应用于各类疾病的治疗，在妇科带下病的治疗中亦具明显疗效。百部乙醇提取物、水提取物或百部与其他中药制成的混合制剂对阴道炎有显著的治疗效果，包括滴虫性、白色念珠菌感染引起的霉菌性阴道炎、非特异性阴道炎及肝经湿热型阴道炎所致的带下量增多、阴痒等^[11-13]。中医学认为，带下病、阴痒的发病机制主要是肝、脾、肾功能失调，肾阳不足^[14-15]。此外，现代医学常将生殖系统炎症及严重卵巢炎、希恩综合征等疾病与带下病相关联，将它们列入了带下异常的诊断范畴中，并认为妇科肿瘤的出现常伴随着阴道分泌物异常病理状况的发生，而中医认为癥瘕多由脾气虚弱、气

血瘀阻引起，在临床上也会出现白带增多的症状，也可以参考脾虚湿盛的带下病来进行治疗^[16-18]。对叶百部碱是百部的主要活性成分之一，现代药理学研究表明，百部生物碱有止咳^[19]、平喘、抗菌^[20-22]、杀虫^[23]、抗氧化^[24]、抗肿瘤^[25-26]等作用。目前，百部在妇科的应用较为广泛，但其主要活性成分对叶百部碱对人卵巢癌 SKOV3 细胞的作用及相关机制尚未见相关研究报道。

Wnt 信号途径是一条重要的生物信号途径，参与调控细胞的增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭等多种重要的生理功能^[27]。已有研究表明，Wnt 信号通路中多个蛋白成员均与卵巢癌的发生、发展密切相关^[28]。Ricken 等^[29]研究 Wnt 信号通路的组成部分在未成熟大鼠卵巢及 5 种人卵巢癌细胞系中 Wnt 转录物 (Wnt-2b、Wnt-5a、Wnt-11) 的表达，发现 Wnt 的异常表达可能与卵巢癌的发生及发展有关。戴颖青等^[30]研究发现， β -连环蛋白 (β -catenin)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 在浆液性卵巢癌中高表达，且与患者的预后密切相关，提示 β -catenin、Cyclin D1 在浆液性卵巢癌中起着重要的调控作用，二者的高表达预示着患者的不良预后。Doo 等^[31]通过研究卵巢癌肿瘤小鼠，发现抑制 Wnt/ β -catenin 通路在卵巢癌的治疗中具有较弱的免疫调节作用。此外，沈影等^[32]发现卵巢癌的病因病机符合阳虚阴盛的肿瘤形成机制，卵巢肿瘤的发生是“阴成形”与“阳化气”交互作用的病理过程，而 Wnt/ β -catenin 通路中存在着“阳闭阴开”的作用机制。卵巢癌患者体内的肾阳虚衰、阴阳平衡和 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活与否有着内在的联系。因此，结合卵巢癌的病因病机，基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨卵巢癌，符合当代中医学发展中西医结合道路的原则，同时也对提高卵巢癌患者预后具有十分重要的意义。本

研究将基于 Wnt/ β -catenin 信号通路初步探讨对叶百部碱抗 SKOV3 细胞的作用机制,为对叶百部碱在卵巢癌治疗中的应用价值提供一定的依据。

1 材料

1.1 细胞株

SKOV3 细胞(编号 KG201)购自江苏凯基生物技术股份有限公司,人正常卵巢上皮 IOSE-80 细胞(批号 20230413)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

对叶百部碱(批号 CYR-D0085220125,质量分数为 99.86%)购自宝鸡市翊瑞生物科技有限公司,用细胞级别二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解,配制成 70 g/L 母液,于 -20°C 冰箱避光保存,使用前溶解并用完全培养液稀释到相应浓度;顺铂(批号 115583)购自美国 MedChemExpress 公司,使用 N,N -二甲基甲酰胺(N,N -dimethylformamide, DMF)溶解,配制成 7 g/L 备用液,于 4°C 冰箱保存,使用前用 McCoy's 5A 完全培养液稀释到相应浓度;胎牛血清(批号 23060704)购自浙江天杭生物科技股份有限公司;McCoy's 5A 培养液(批号 WH0123A018)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DMSO(批号 829R031)、MTT(批号 5221107001)、Hoechst 33258 染色液(批号 A20230211)、结晶紫染色液(批号 602W041)购自北京索莱宝科技有限公司;DMF(批号 I2229027)购自上海阿拉丁生化科技有限公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 295906-000)、PI/RNase Staining Solution 试剂盒(批号 2663846)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 C31460100)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;EDU-488 细胞增殖检测试剂盒(批号 032723230622)购自碧云天生物技术有限公司; β -actin 抗体(批号 20536-1-AP)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 26593-1-AP)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 50599-2-Ig)、Cyclin D1 抗体(批号 26939-1-AP)、骨髓细胞瘤病毒癌基因蛋白(cellular-myelocytomatosis viral oncogene, c-myc)抗体(批号 10828-1-AP)、 β -catenin 抗体(批号 51067-2-AP)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体(批号 20874-1-AP)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)抗体(批号 22018-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

C170 型 CO_2 培养箱(德国 Binder 公司);JIMBIO-FIL 型流式图像细胞计数仪(江苏卓微生物科技有限公司);Epoch 2 型全波长酶标仪(美国 Bio Tek 公司);DMi8 型倒置荧光生物显微镜(德国徕卡公司);NovoCyte 2060R 型流式细胞仪(艾森生物杭州有限公司);Direct Q-5UV 型纯水仪(美国默克密理博公司);MiniPROTEAN Tetra Cell 型垂直电泳仪、Mini Trans Blot Cell 型蛋白转印模块(美国 Bio-Rad 公司);UVP Chem Studio 815 型多功能分子成像系统(德国耶拿公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

SKOV3、IOSE-80 细胞用含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 McCoy's 5A 完全培养液或 RPMI 1640 完全培养液,于 37°C 、饱和湿度、5% CO_2 的培养箱中常规培养。细胞株于广西壮瑶药重点实验室冻存、培养、传代,实验用 SKOV3 细胞已传至 6 代,IOSE-80 细胞已传至 4 代。

2.2 MTT 法检测细胞活力

SKOV3 细胞以 8×10^4 个/mL 接种于 96 孔板,100 μL /孔,培养 24 h 待细胞贴壁后,吸弃培养基,每孔分别加入 200 μL 不同质量浓度(50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的对叶百部碱溶液,另设置对照组加入不含药物的培养基,每组 6 个复孔,分别孵育 24、48、72 h,加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL ,继续孵育 4 h。吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,采用酶标仪测定 490 nm 处各孔的吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

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

IOSE-80 细胞以 8×10^4 个/mL 接种于 96 孔板,100 μL /孔,培养 24 h 待细胞贴壁后,吸弃培养基,每孔分别加入 200 μL 不同质量浓度(10、50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的对叶百部碱溶液,另设置对照组加入不含药物的培养基,每组 6 个复孔,分别孵育 24、48 h,加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL ,继续孵育 4 h。吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,采用酶标仪测定 490 nm 处各孔的 A 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 细胞形态学观察

取对数生长期的 SKOV3 细胞以 2.5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,每孔 1 mL,置培养箱中培养 24 h。设置对照组、顺铂(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组和对叶百部碱(50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组,给予相应药物处理 48 h,对照组

加入不含药物的培养基。于倒置显微镜下观察细胞形态的变化，拍照记录。

2.4 EDU 染色检测细胞增殖活力

取对数生长期的 SKOV3 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，每孔 1 mL，培养箱中培养 24 h。按“2.3”项下方法分组并给药，处理 48 h，每孔加入 10 mmol/L EDU 工作液 1 mL，继续孵育 2 h 后，弃去培养液，加入 4%多聚甲醛固定 20 min，封闭液清洗 3 次，通透液孵育 15 min；封闭液清洗 3 次后，每孔加入 0.5 mL Click 反应液，避光孵育 30 min，封闭液清洗 3 次。按照试剂盒说明书，使用 Hoechst 33342 反应液进行细胞核染色。采用荧光显微镜于 100 倍镜下随机拍摄 3 个视野，计算 EDU 阳性细胞率。

EDU 阳性细胞率 = (EDU + Hoechst 阳性细胞数) / Hoechst 阳性细胞数

2.5 细胞克隆形成实验检测细胞克隆能力

取对数生长期的 SKOV3 细胞以 1.0×10^3 个/孔接种于 6 孔板中，培养 24 h。按“2.3”项下方法分组并给药，处理 48 h，PBS 清洗细胞，每孔加入完全培养液 1 mL，持续培养 14 d。期间每隔 3 d 在倒置显微镜下观察细胞情况，并对细胞进行换液。培养 14 d 后，PBS 清洗细胞，每孔加入 800 μ L 4%多聚甲醛溶液固定细胞 25 min，吸弃溶液；PBS 清洗 3 次后，每孔加入 600 μ L 结晶紫染色液染色 15 min，PBS 清洗 4 次，室温晾干，拍照记录，观察细胞形成群落大小及数量，计算克隆形成率。

克隆形成率 = 细胞集落数 / 初始接种细胞数

2.6 划痕实验检测细胞迁移能力

取对数生长期的 SKOV3 细胞，以 3×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中，每孔 1 mL，培养 24 h。于倒置显微镜下观察到细胞融合度达到 70%时，用 200 μ L 灭菌枪头借助直尺垂直划痕，PBS 轻缓清洗细胞 3 次，按“2.3”项下分组加入相应的含药无血清培养基 1 mL，对照组加入不含药物的无血清培养基。在倒置显微镜下拍摄 0 h 细胞划痕照片后，继续置于细胞培养箱中培养，48 h 后取出拍摄。拍摄过程中每组细胞在 0、48 h 选择 3 个视野取样拍照记录。用 Image J 软件测量各组细胞在不同时间点划痕愈合的相对面积，计算细胞迁移率。

细胞迁移率 = 48 h 划痕面积 / 0 h 划痕面积

2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

基质胶与不含血清的培养基按 1 : 10 的比例进

行稀释，每个 Transwell 小室中加入 80 μ L 基质胶进行铺胶，培养箱中孵育过夜，次日对已铺胶小室进行基底膜水化 30 min。用无血清培养基重悬 SKOV3 细胞，调整细胞密度至 2.5×10^5 个/mL，取细胞悬液 200 μ L 加入 Transwell 小室，取 600 μ L 含 20%胎牛血清的培养基加入 24 孔板下室。按“2.3”项下分组给药，37 $^{\circ}$ C 培养 48 h，取出 Transwell 小室，用 4%甲醛固定 20 min，PBS 清洗 3 次，结晶紫染色 15 min，清洗 3 次后用棉签将上室细胞擦除，于显微镜下观察穿过 Transwell 膜细胞数量，随机选取 3 个视野进行拍照，采用 Image J 软件计数。

2.8 Hoechst 33258 染色观察细胞核凋亡形态

SKOV3 细胞以 3.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，培养 24 h。按“2.3”项下方法分组并给药，处理 48 h，弃去培养基，PBS 洗涤 3 次，4%多聚甲醛固定 20 min，PBS 清洗 3 次，每孔加入 Hoechst 33258 染色液 800 μ L，避光染色 15 min，PBS 洗涤 3 次，于倒置荧光显微镜下观察细胞核凋亡形态并拍照。

2.9 流式细胞术检测细胞凋亡率

将 SKOV3 细胞以 2.5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中，每孔 1 mL，培养 24 h。按“2.3”项下方法分组并给药，处理 48 h，弃去培养基，PBS 清洗 3 次，消化并收集细胞，800 r/min 离心 5 min，弃去上清液，用预冷的 PBS 重悬清洗细胞 2 次，收集细胞，参照凋亡试剂盒说明书加入结合缓冲液 195 μ L 重悬细胞，再分别加入 Annexin V-FITC 5 μ L 和碘化丙啶 (PI) 染色液 10 μ L 轻缓混匀，常温避光孵育 15 min，0.5 h 内采用流式细胞仪进行检测。

2.10 流式细胞术检测细胞周期

SKOV3 细胞以 2.5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中，每孔 1 mL，培养 24 h。按“2.3”项下方法分组并给药，处理 48 h，收集上清液，PBS 清洗 3 次，消化并收集细胞，1 000 r/min 离心 5 min，重悬于 4 $^{\circ}$ C 预冷的 200 μ L PBS 缓冲液中，缓慢加入预冷的 70%乙醇 600 μ L，悬浮固定细胞，4 $^{\circ}$ C 过夜。次日，1 000 r/min 离心 5 min，弃去上清，PBS 清洗 2 次，加入 0.5 mL PI/RNase 溶液，轻吹混匀细胞，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。1 h 内采用流式细胞仪进行检测。

2.11 Western blotting 检测凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达

取对数生长期的 SKOV3 细胞，以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，培养 24 h。按“2.3”项下方法分组并给药，处理 48 h，收集细胞，加入裂解液于

冰上裂解，离心后取上清，BCA 法测定蛋白浓度，加入适量 5×上样缓冲液，沸水浴使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，用 5%脱脂牛奶封闭 2 h，分别加入 β-actin (1 : 3 000)、Bax (1 : 4 000)、Bcl-2 (1 : 3 000)、c-myc (1 : 10 000)、β-catenin (1 : 20 000)、Cyclin D1 (1 : 30 000)、N-cadherin (1 : 10 000)、E-cadherin (1 : 60 000) 一抗，4 °C 孵育过夜；加入二抗 (1 : 10 000)，室温孵育 2 h，显影，采用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.12 统计学分析

数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对叶百部碱对 SKOV3 和 IOSE-80 细胞活力的影响

如表 1 所示，与对照组比较，50、75、100 μg/mL 对叶百部碱分别干预 SKOV3 细胞 24、48、72 h 后，细胞增殖抑制率均显著升高 ($P < 0.01$)，并呈现一定的剂量和时间相关性。如表 2 所示，10、50、100、150 μg/mL 对叶百部碱干预 IOSE-80 细胞 24、48 h 后，细胞存活率均不低于 90%，因此后续实验中对叶百部碱的剂量与干预时间在此质量浓度梯度及时间范围内。

3.2 对叶百部碱对 SKOV3 细胞形态的影响

如图 1 所示，对照组细胞贴壁状态良好、抱团

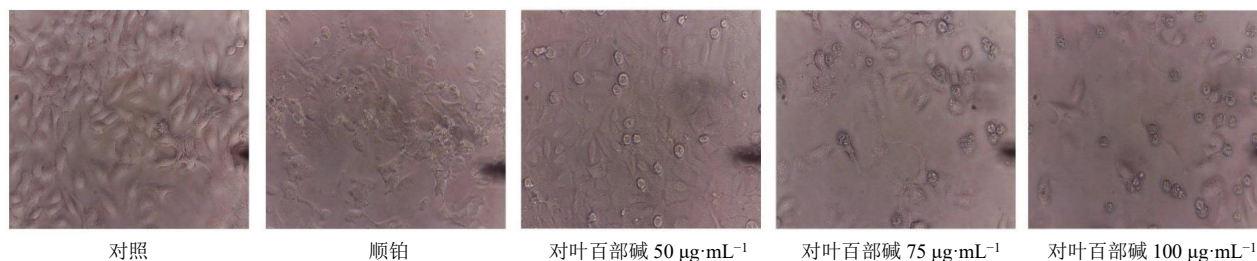


图 1 光学显微镜观察各组细胞形态 (×200)

Fig. 1 Morphology of cells in each group under light microscope (× 200)

3.3 对叶百部碱对 SKOV3 细胞增殖的影响

如图 2 和表 3 所示，与对照组比较，各给药组 EDU 阳性细胞率均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)，且呈剂量相关性。表明对叶百部碱能够抑制 SKOV3 细胞的增殖。

3.4 对叶百部碱对 SKOV3 细胞克隆能力的影响

如图 3 和表 4 所示，与对照组比较，各给药组

表 1 对叶百部碱对 SKOV3 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of tuberostemone on proliferation inhibition rate of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
对叶百部碱	50	28.48±5.55**	41.98±2.54**	54.23±5.30**
	75	49.12±7.31**	76.40±2.34**	82.68±1.77**
	100	57.85±4.32**	84.37±4.30**	88.87±2.97**

与同时时间点对照组比较：** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group at same time point.

表 2 对叶百部碱对 IOSE-80 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of tuberostemone on viability of IOSE-80 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%	
		24 h	48 h
对照	—	100.00±0.00	100.00±0.00
对叶百部碱	10	104.71±14.32	100.28±17.58
	50	108.05±12.10	97.40±16.36
	100	102.45±11.78	103.67±14.18
	150	109.38±16.58	103.49±16.47

生长，细胞形态正常完整、呈长梭形；50、75、100 μg/mL 对叶百部碱处理 48 h 后，细胞逐渐出现皱缩，失去原有细胞形态，数量减少，凋亡现象明显；顺铂干预处理 48 h 后，变形细胞数量增加，细胞边界模糊不清，细胞显示出较差的生长特点。

细胞克隆形成率均显著降低 ($P < 0.01$)，且呈剂量相关性。表明对叶百部碱能够通过抑制 SKOV3 细胞的克隆形成，进而抑制细胞增殖。

3.5 对叶百部碱对 SKOV3 细胞迁移能力的影响

如图 4 和表 5 所示，与对照组比较，对叶百部碱 (75、100 μg/mL) 组细胞迁移率显著降低 ($P < 0.01$)，且呈剂量相关性。

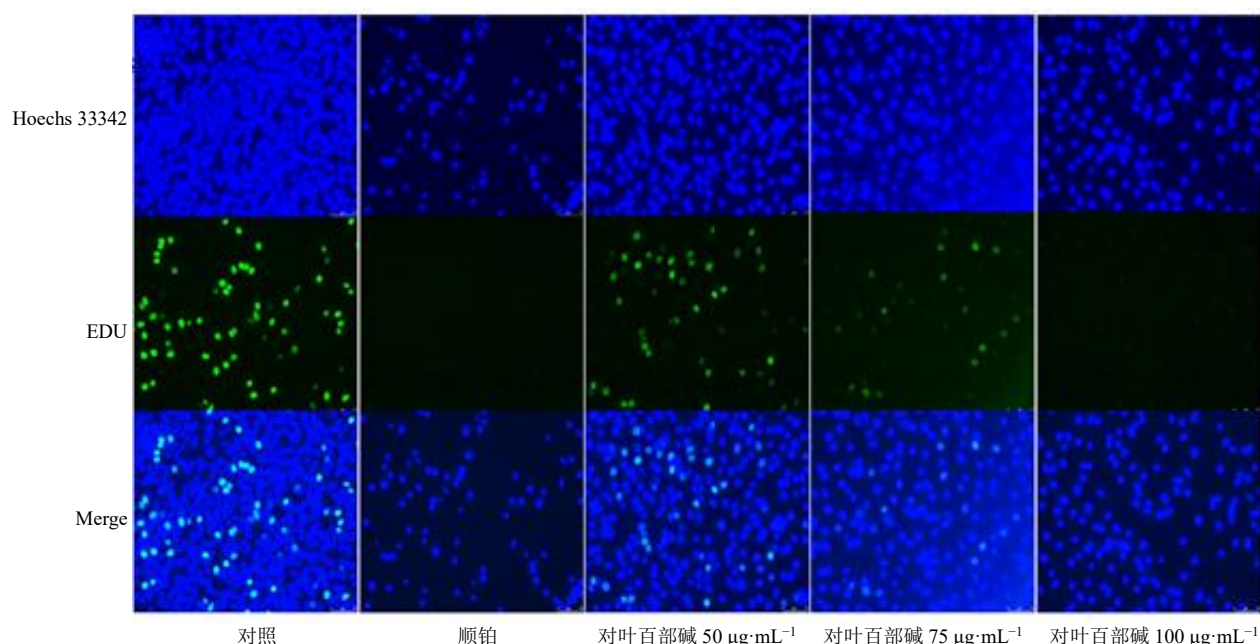


图2 对叶百部碱对 SKOV3 细胞增殖的影响 (×100)

Fig. 2 Effect of tuberostemonine on proliferation of SKOV3 cells (× 100)

表3 对叶百部碱对 SKOV3 细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of tuberostemonine on proliferation of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	EDU 阳性细胞率/%
对照	—	10.96 ± 1.37
顺铂	15	0.00 ± 0.00**
对叶百部碱	50	9.19 ± 0.36*▲▲
	75	3.21 ± 1.10**▲▲
	100	0.00 ± 0.00**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$, 下表同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs cisplatin group, same as below tables.

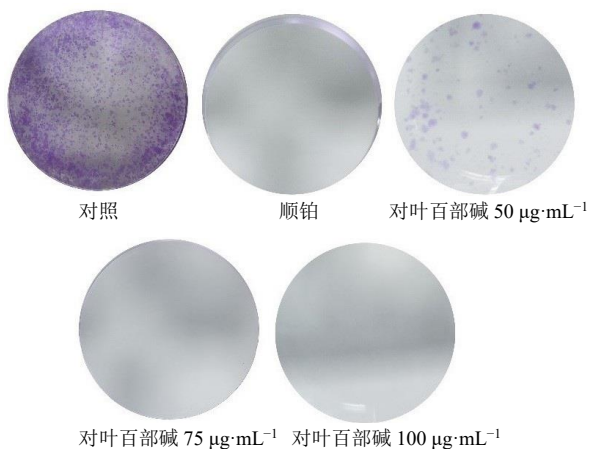


图3 对叶百部碱对 SKOV3 细胞克隆形成数的影响

Fig. 3 Effect of tuberostemonine on clone formation number of SKOV3 cells

表4 对叶百部碱对 SKOV3 细胞克隆形成率的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of tuberostemonine on clone formation rate of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	克隆形成率/%
对照	—	85.30 ± 5.22
顺铂	15	0.00 ± 0.00**
对叶百部碱	50	5.10 ± 0.53**▲
	75	0.00 ± 0.00**
	100	0.00 ± 0.00**

3.6 对叶百部碱对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响

如图5和表6所示,与对照组比较,各给药组侵袭细胞数均显著减少($P < 0.01$),且呈剂量相关性,表明对叶百部碱能够抑制 SKOV3 细胞的侵袭能力。

3.7 对叶百部碱对 SKOV3 细胞凋亡形态的影响

如图6所示,对照组细胞荧光较弱,细胞核形态正常且分布均匀。与对照组比较,顺铂组出现较明显的细胞核固缩和致密浓染的凋亡形态变化特征;对叶百部碱干预后,SKOV3 细胞的细胞核不同程度地出现固缩和破裂,荧光强度和细胞核形态改变的细胞数量与给药剂量呈正相关,随着给药剂量的提高,细胞凋亡数目逐渐增多,表明对叶百部碱抑制 SKOV3 细胞增殖与诱导其凋亡有关。

3.8 对叶百部碱对 SKOV3 细胞凋亡的影响

如图7和表7所示,与对照组比较,各给药组

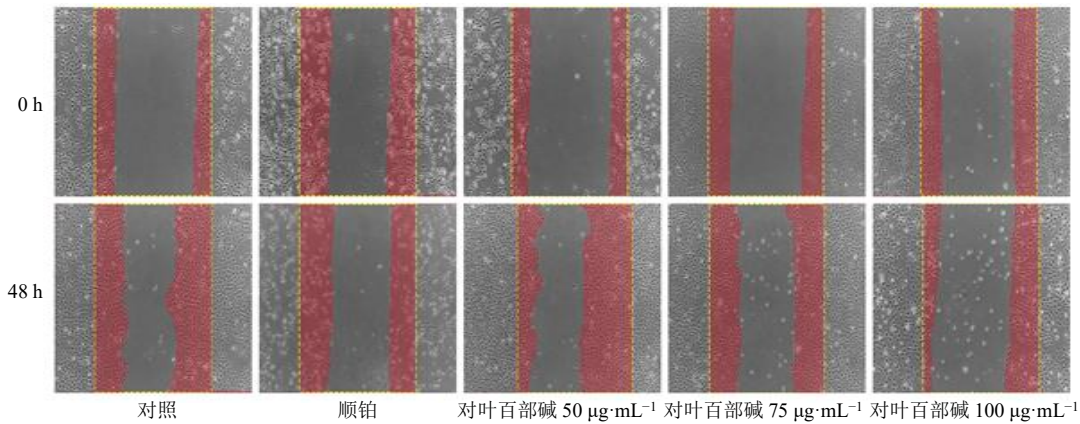


图4 对叶百部碱 SKOV3 细胞迁移能力的影响 (×100)

Fig. 4 Effect of tuberostemonine on migration ability of SKOV3 cells (× 100)

表5 对叶百部碱对 SKOV3 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of tuberostemonine on migration of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞迁移率/%
对照	—	35.71 ± 5.40
顺铂	15	3.75 ± 4.61**
对叶百部碱	50	36.85 ± 4.62 ^{▲▲}
	75	17.79 ± 5.26 ^{***▲}
	100	2.10 ± 1.69**

表6 对叶百部碱对 SKOV3 细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of tuberostemonine on invasion of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	侵袭细胞数/个
对照	—	2 676.00 ± 235.80
顺铂	15	1 282.00 ± 61.10**
对叶百部碱	50	2 110.00 ± 105.50 ^{***▲▲}
	75	1 702.00 ± 96.81 ^{***▲▲}
	100	622.00 ± 93.11 ^{***▲▲}

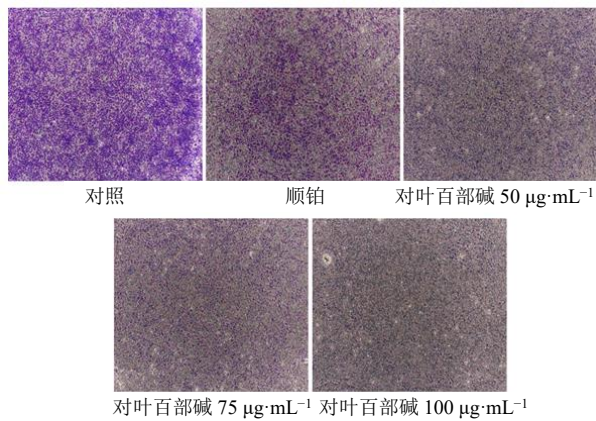


图5 对叶百部碱对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响 (×40)

Fig. 5 Effect of tuberostemonine on invasion ability of SKOV3 cells (× 40)

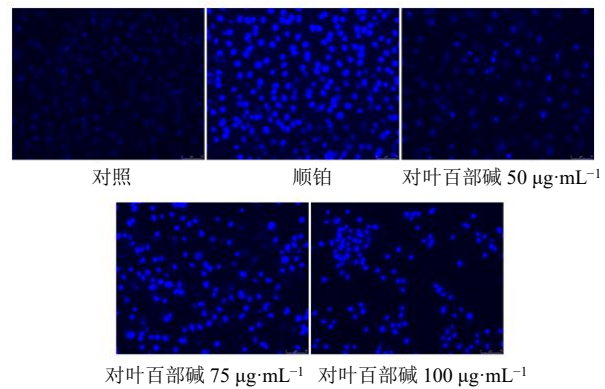


图6 对叶百部碱对 SKOV3 细胞凋亡形态的影响 (免疫荧光, ×100)

Fig. 6 Effect of tuberostemonine on apoptotic morphology of SKOV3 cells (immunofluorescence, × 100)

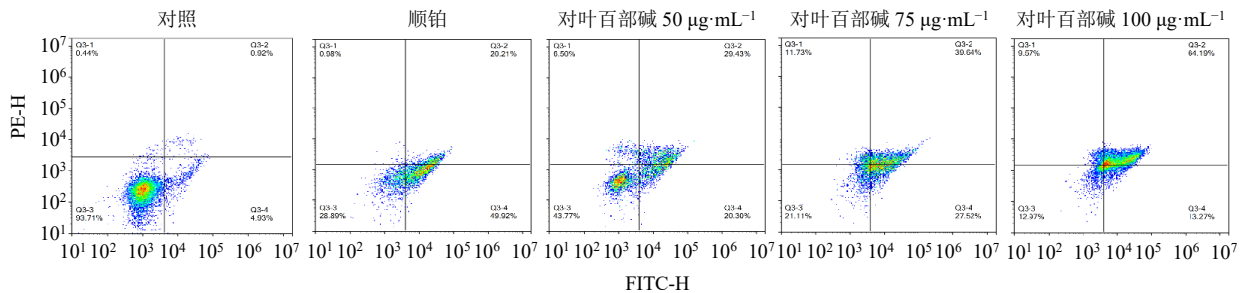


图7 对叶百部碱对 SKOV3 细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effect of tuberostemonine on apoptosis of SKOV3 cells

表7 对叶百部碱对 SKOV3 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of tuberostemone on apoptotic rate of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞凋亡率/%
对照	—	5.66 ± 0.73
顺铂	15	69.20 ± 2.68**
对叶百部碱	50	54.82 ± 4.43**▲▲
	75	64.92 ± 3.79**
	100	73.82 ± 3.84**

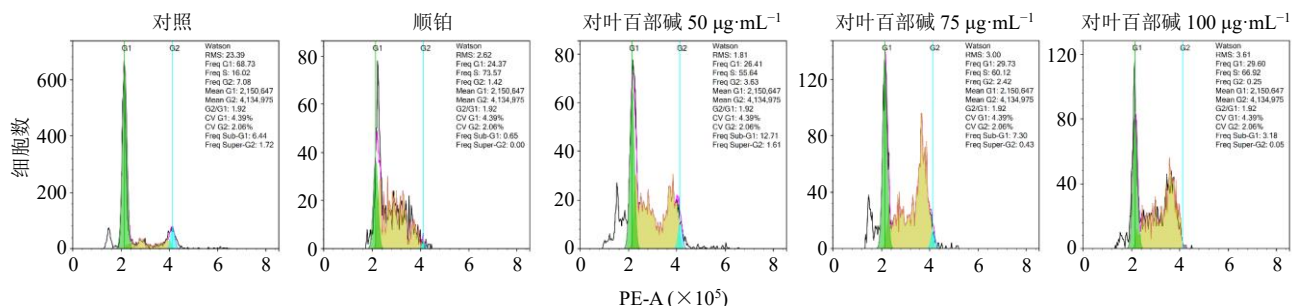


图8 对叶百部碱对 SKOV3 细胞周期分布的影响

Fig. 8 Effect of tuberostemone on cycle distribution of SKOV3 cells

表8 对叶百部碱对 SKOV3 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of tuberostemone on cycle distribution of SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞周期分布/%		
		G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
对照	—	66.47 ± 3.85	16.35 ± 0.88	7.80 ± 0.87
顺铂	15	31.56 ± 6.66**	63.75 ± 8.70**	1.16 ± 0.23**
对叶百部碱	50	28.46 ± 3.63**	54.97 ± 0.76**▲	3.74 ± 0.11**▲▲
	75	28.74 ± 1.72**	58.82 ± 2.02**	2.29 ± 0.24**▲
	100	31.06 ± 1.51**	62.81 ± 4.80**	0.72 ± 0.41**

3.10 对叶百部碱对 SKOV3 细胞凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 9、10 和表 9、10 所示，与对照组比较，各给药组 Bax/Bcl-2、Bax、E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，Bcl-2、c-myc、Cyclin D1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)；对叶百部碱 (75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组 β -catenin、N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)；顺铂组

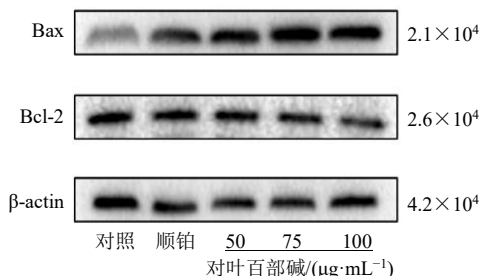


图9 对叶百部碱对 SKOV3 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 9 Effect of tuberostemone on expressions of apoptosis-related proteins in SKOV3 cells

细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.01$)，且呈剂量相关性，表明对叶百部碱能够诱导 SKOV3 细胞凋亡。

3.9 对叶百部碱对 SKOV3 细胞周期分布的影响

如图 8 和表 8 所示，与对照组比较，各给药组 G₀/G₁期和 G₂/M 期细胞比例均显著降低 ($P < 0.01$)，S 期细胞比例显著升高 ($P < 0.01$)，表明对叶百部碱能将 SKOV3 细胞阻滞在 S 期。

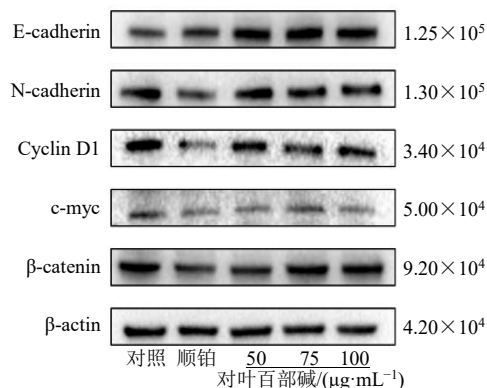


图10 对叶百部碱对 SKOV3 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 10 Effect of tuberostemone on expressions of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins in SKOV3 cells

N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。表明对叶百部碱诱导 SKOV3 细胞凋亡可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路及阻断上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 有关。

表 9 对叶百部碱对 SKOV3 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of tuberostemonine on expressions of apoptosis-related proteins in SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Bax/Bcl-2
对照	—	0.55 ± 0.05	0.69 ± 0.08	0.79 ± 0.07
顺铂	15	0.71 ± 0.07*	0.63 ± 0.03*	1.13 ± 0.07**
对叶百部碱	50	0.84 ± 0.08*** \blacktriangle	0.64 ± 0.05*	1.31 ± 0.11*** \blacktriangle
	75	1.09 ± 0.05*** $\blacktriangle\blacktriangle$	0.56 ± 0.04*** \blacktriangle	1.95 ± 0.11*** $\blacktriangle\blacktriangle$
	100	1.18 ± 0.07*** $\blacktriangle\blacktriangle$	0.49 ± 0.07*** $\blacktriangle\blacktriangle$	2.40 ± 0.06*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$

表 10 对叶百部碱对 SKOV3 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of tuberostemonine on expressions of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins in SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	β -catenin/ β -actin	c-myc/ β -actin	Cyclin D1/ β -actin	N-cadherin/ β -actin	E-cadherin/ β -actin
对照	—	0.60 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.92 ± 0.04	0.75 ± 0.06
顺铂	15	0.40 ± 0.04	0.17 ± 0.01**	0.27 ± 0.06**	0.64 ± 0.03**	1.13 ± 0.13**
对叶百部碱	50	0.52 ± 0.02*** \blacktriangle	0.17 ± 0.04**	0.46 ± 0.02*** $\blacktriangle\blacktriangle$	0.93 ± 0.06*** \blacktriangle	1.51 ± 0.06*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$
	75	0.58 ± 0.03*** $\blacktriangle\blacktriangle$	0.20 ± 0.05*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.44 ± 0.02*** $\blacktriangle\blacktriangle$	0.81 ± 0.03*** $\blacktriangle\blacktriangle$	1.60 ± 0.06*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$
	100	0.56 ± 0.01*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.17 ± 0.01**	0.38 ± 0.05*** $\blacktriangle\blacktriangle$	0.76 ± 0.02*** $\blacktriangle\blacktriangle$	1.72 ± 0.11*** $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$

4 讨论

现代卵巢癌的治疗主要利用外科手术切除结合化学疗法^[33], 但其在治疗过程中容易引起肿瘤细胞的耐药, 给新药开发带来了新的挑战。百部于历代本草均有记载, 随着医学的发展, 百部的有效成分被逐渐发现和证实, 其主要活性成分百部生物碱亦被发现能够逆转肿瘤多药耐药抵抗^[34-35]、抗肿瘤^[36]、抗花叶病毒^[37], 且具有毒蕈碱型 M5 受体和 Sigma 受体结合活性^[38]等, 因此对叶百部碱作为百部生物碱的主要成分有着一定的开发潜力。我国中医药具有丰富的抗癌资源, 对延长患者的生命周期、提高患者的生活质量具有明显的优势。许多中药复方、中成药和注射液在癌症的临床治疗中有着较好的疗效。中药单体是传统药物的研究基础, 具有结构多样、作用靶点广、经济实用、疗效确切、不良反应少等特点。因此, 中药单体应用于卵巢癌治疗的开发与机制研究意义重大^[39]。王秀霞在中医药理论研究基础上, 结合多年临床实践, 提出肾虚阳衰、血瘀于胞是卵巢癌发病的重要病机^[40]。王玮玉等^[41]从阴阳平衡的角度, 探索炎症微环境中各因素变化在卵巢癌发生、发展中的作用, 针对卵巢癌提出了阴阳调和的预防和治疗原则。在临床上, 卵巢癌患者的体质也是以阳虚、气虚、有血瘀为主^[42]。我国有着深厚的中医药底蕴与中药资源, 结合疾病的病因病机, 中医理论基础和现代医学联合对卵巢癌进行研究治疗, 是推动中医学发展的一种重要方式。因此, 本研究基于 Wnt/ β -catenin 信号通路阳虚阴盛的卵巢癌形成机制探究对叶百部碱抗 SKOV3 细胞

的作用机制。

细胞凋亡是一种周期性的细胞死亡模式, 通过半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (cystein-aspartate protease-9, Caspase-9)、凋亡蛋白酶活化因子及细胞色素 C 等构成的凋亡复合物, 在维持细胞生成与死亡的动态平衡中起着重要作用。在细胞凋亡的调节过程中, Bcl-2 蛋白家族是主要调控因子, 包含促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 等, 细胞凋亡是癌症发生、发展和治疗的重要环节, 因此诱导细胞凋亡是一种有效的癌症治疗手段^[43]。本研究结果显示, 不同质量浓度的对叶百部碱处理 SKOV3 细胞后, 细胞增殖抑制率均明显升高, 细胞增殖活性均明显降低, 细胞克隆形成率显著降低, 细胞凋亡率显著升高, SKOV3 细胞的细胞核不同程度地出现固缩和破裂, 蓝色荧光强度增强, 细胞凋亡数目逐渐增加, 促凋亡蛋白 Bax 的表达升高以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达降低, Bax/Bcl-2 上调, 表明对叶百部碱能够诱导 SKOV3 细胞发生凋亡。

肿瘤发生转移是导致肿瘤复发、治疗效果差、生存率低的重要原因。EMT 是肿瘤发生、生长、侵袭、迁移、定植和耐药的重要环节^[44]。E-cadherin 下调或 N-cadherin 上调能促进 EMT 和肿瘤转移、侵袭, 两者是 EMT 的标志蛋白^[45]。Wnt/ β -catenin 信号通路的活化可促进肿瘤细胞的转移和增殖^[46]。Wnt/ β -catenin 信号通路是调节细胞生长、增殖和分化的重要途径, 在卵巢癌化疗耐药中发挥重要作用, 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路可作为卵巢癌化疗增敏的靶点^[47]。Wnt 信号通路作为一条重要的信号传导

途径, 可调控细胞的增殖、分化、迁移等功能, 从而影响细胞的正常生长发育, Wnt 信号通路的活化在多种癌症的发生、发展中发挥着重要作用^[48]。β-catenin 蛋白是一种转录因子, 其功能涉及许多癌症基因的表达, 在 Wnt/β-catenin 信号通路中起到关键作用, β-catenin 蛋白的稳定性也是 Wnt/β-catenin 信号通路的一个重要标志^[47]。Wnt 配体触发 Wnt/β-catenin 信号通路的中枢是 β-catenin, 它可以激活下游蛋白 Cyclin D1、c-myc 的表达, 进而调控细胞周期及细胞的增殖、存活, 其中 c-myc 和 Cyclin D1 分别调节细胞周期 S 期和 G₁ 期^[49-50]。此外, c-myc 是一种核相关蛋白, 对胚胎发育和诱导多能干细胞形成起着关键的调控作用^[51], 原癌基因 c-myc 在转录、翻译过程中对肿瘤细胞的侵袭和转移发挥促进作用^[52]。Cyclin D1 是一个与细胞周期有关的致癌基因, Cyclin D1 蛋白通过与细胞周期依赖的激酶相互作用, 促使细胞由 G₁ 期向 S 期转变, 从而促进细胞的分裂和增殖, 对细胞的生长发育具有重要的调控作用, Cyclin D1 的高表达会使细胞周期失调, 使过量的细胞进入增殖期, 从而使其失去控制的增殖能力, 甚至恶性转化^[46]。划痕实验和侵袭实验结果显示, 对叶百部碱干预后, SKOV3 细胞的划痕愈合能力及迁移率明显降低, 细胞侵袭数量显著减少, E-cadherin 蛋白表达显著上调, N-cadherin 蛋白表达显著下调, 表明对叶百部碱能阻断 SKOV3 细胞的 EMT 进程, 进而抑制 SKOV3 细胞的转移。采用 Western blotting 对 Wnt/β-catenin 信号通路中相关蛋白表达进行检测, 结果显示, 与对照组比较, 对叶百部碱给药组中枢蛋白 β-catenin 及下游蛋白 c-myc 和 Cyclin D1 表达均显著下调; 结合流式细胞术检测 SKOV3 细胞周期的结果, 对叶百部碱能将 SKOV3 细胞阻滞在 S 期, 表明对叶百部碱可能通过调节 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白的表达, 进而调控 SKOV3 细胞的凋亡和转移。

综上, 对叶百部碱能阻断 SKOV3 细胞的 EMT 进程, 抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并将细胞周期阻滞在 S 期, 诱导 SKOV3 细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制 Wnt/β-catenin 信号通路的激活及上调 Bax/Bcl-2 有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

- [2] Lheureux S, Gourley C, Vergote I, et al. Epithelial ovarian cancer [J]. *Lancet*, 2019, 393(10177): 1240-1253.
- [3] Liu Y X, Zhu K Y, Guan X L, et al. TTK is a potential therapeutic target for cisplatin-resistant ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 128.
- [4] 李一帆, 李宁. 中国卵巢上皮癌靶向治疗现状及进展 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2023, 24(4): 337-341.
- [5] 马宝璋, 齐聪. 中医妇科学 [M]. 第 9 版. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 235-238.
- [6] 付译漫, 李凯, 韩凤娟, 等. 基于“肾虚虚衰, 血瘀于胞”探讨卵巢癌发病机制 [J]. *中医药学报*, 2014, 42(1): 4-6.
- [7] 王惠兰. 桂枝茯苓丸加味治疗卵巢囊肿临床观察 [J]. *中医杂志*, 1994, 35(6): 355-356.
- [8] 刘丹丹, 曹阳, 陈歌. 从阳虚致瘀探讨卵巢癌的中医证治 [J]. *现代中医临床*, 2020, 27(2): 54-56.
- [9] 方莹, 邢伟, 王武亮. 温阳益气健脾汤剂结合化疗对晚期卵巢癌患者免疫功能及血清 HE4、CA125 水平的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(6): 2819-2822.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 138-139.
- [11] 李淑敏. 带净止痒栓治疗带下病 250 例 [J]. *陕西中医*, 2002, 23(9): 817-818.
- [12] 翟凤霞, 李淑敏. 带净止痒栓治疗阴道炎 250 例 [J]. *陕西中医*, 2002, 23(11): 978-979.
- [13] 李爽. 百部洗剂的制备及临床疗效观察 [J]. *中成药*, 2003, 25(2): 2-3.
- [14] 钱旭武, 蒋婴. 国医大师段富津教授治疗带下病经验 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(6): 222-224.
- [15] 杨瑜. 王慎轩治疗带下病经验 [J]. *中医研究*, 2015, 28(10): 53-54.
- [16] 马宝璋, 杜惠兰. 中医妇科学 [M]. 第 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2018: 49-50.
- [17] Sherrard J, Wilson J, Donders G, et al. 2018 European (IUSTI/WHO) International Union against sexually transmitted infections (IUSTI) World Health Organisation (WHO) guideline on the management of vaginal discharge [J]. *Int J STD AIDS*, 2018, 29(13): 1258-1272.
- [18] 褚策, 杨新鸣, 袁雨露, 等. 带下病诊疗特点探讨 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(12): 1997-2000.
- [19] 杨丹丹, 许立拔, 夏星, 等. 对叶百部总生物碱对辣椒素致豚鼠咳嗽的影响 [J]. *中成药*, 2020, 42(10): 2764-2767.
- [20] Chung H S, Hon P M, Lin G, et al. Antitussive activity of *Stemona* alkaloids from *Stemona tuberosa* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(10): 914-920.
- [21] Lee K, Jeong E, Sung S, et al. *Stemona* alkaloids isolated from *Stemona tuberosa* roots and their inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production [J]. *Rec Nat Prod*, 2016, 10: 109-112.
- [22] But P P H, Shaw P C, Lin G E, et al. Authentication and

- quality assessment of the antitussive herb Baibu (*Radix Stemonae*) [A] // *Advances in Botanical Research* [M]. Amsterdam: Elsevier, 2012: 1-33.
- [23] Chalom S, Panyakaew J, Phaya M, et al. Cytotoxic and larvicidal activities of *Stemona* alkaloids from the aerial parts and roots of *Stemona curtisii* Hook. f [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(22): 4311-4316.
- [24] 韦卫宁, 许立拔, 王孝勋, 等. 对叶百部总生物碱保护 H₂O₂ 诱导 V79 细胞损伤的作用及机制研究 [J]. 陕西科技大学学报, 2022, 40(4): 74-80.
- [25] 张梦晨. 百部生物碱化合物 3 抗结肠癌活性及作用机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [26] 杨雅钧, 许立拔, 王孝勋, 等. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨对叶百部总生物碱对人结肠癌 HT-29 细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 广西医学, 2023, 45(11): 1305-1309.
- [27] 周婉楨, 滕银成. 非经典 Wnt 通路在卵巢癌中的作用与潜在治疗意义研究进展 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2023, 43(8): 1056-1063.
- [28] 朱利利, 熊正文, 李永申. Wnt 信号转导通路与女性常见肿瘤的关系 [J]. 解放军医药杂志, 2013, 25(6): 94-96.
- [29] Ricken A, Lochhead P, Kontogianna M, et al. Wnt signaling in the ovary: Identification and compartmentalized expression of *wnt-2*, *wnt-2b*, and *fizzled-4* mRNAs [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(7): 2741-2749.
- [30] 戴颖青, 章琼, 马恒辉, 等. Wnt 信号通路成分 β -catenin、cyclinD1 在卵巢浆液性腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(19): 5650-5655.
- [31] Doo D W, Meza-Perez S, Londoño A I, et al. Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway enhances antitumor immunity in ovarian cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920913798.
- [32] 沈影, 韩凤娟. 基于“阳化气, 阴成形”理论探讨 Wnt/ β -catenin 信号通路“阳闭阴开”的卵巢癌形成机制与温阳治法 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(9): 58-61.
- [33] 徐艳艳, 郭小红, 姚敏, 等. 奥拉帕利在肿瘤专科医院卵巢癌患者中的合理性和安全性研究 [J]. 实用药物与临床, 2023, 26(1): 21-25.
- [34] Chanmahasathien W, Ohnuma S, Ambudkar S V, et al. Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein by stemofoline [J]. *Planta Med*, 2011, 77(18): 1990-1995.
- [35] Wang Y J, Zhao H D, Zhu C F, et al. Tuberosstemonine reverses multidrug resistance in chronic myelogenous leukemia cells K562/ADR [J]. *J Cancer*, 2017, 8(6): 1103-1112.
- [36] Li Y Y, Wang Y Y, Taniguchi T, et al. Identification of stemonamide synthetic intermediates as a novel potent anticancer drug with an apoptosis-inducing ability [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(2): 474-484.
- [37] Hu Z X, Tang H Y, Guo J, et al. Alkaloids from the roots of *Stemona tuberosa* and their anti-tobacco mosaic virus activities [J]. *Tetrahedron*, 2019, 75(12): 1711-1716.
- [38] Frankowski K J, Setola V, Evans J M, et al. Synthesis and receptor profiling of *Stemona* alkaloid analogues reveal a potent class of sigma ligands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 6727-6732.
- [39] 徐佳越, 郭滢, 李佳, 等. 中药单体对卵巢癌信号通路的调控作用 [J]. 肿瘤药学, 2022, 12(1): 12-22.
- [40] 陈皇珍, 姚美玉, 吴效科. 王秀霞治疗妇科肿瘤经验介绍 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(1): 25-27.
- [41] 王玮玉, 郭滢, 沈影, 等. 从“阴阳平衡观”探讨对卵巢癌炎性微环境的中医认识 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 237-244.
- [42] 沈影, 韩凤娟. 中医体质可调控应用于卵巢癌防治的探索性研究: 基于 34 例卵巢癌患者体质类型与糖类抗原 CA199、CA125 的相关性分析 [J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(3): 286-293.
- [43] 朱晓敏, 钟颖, 黄娜娜, 等. 基于 Akt/mTOR 通路研究地榆皂苷 II 诱导肝癌细胞凋亡和自噬作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3726-3734.
- [44] Brabletz T, Kalluri R, Nieto M A, et al. EMT in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2): 128-134.
- [45] 罗刚, 谢敏慧, 杨娟, 等. REGy 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响胃癌细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(21): 5285-5289.
- [46] 赵晓娟, 胡律江, 郭晓秋, 等. 基于 wnt/ β -catenin 通路探讨雷公藤内酯醇调控人卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移机制 [J]. 今日药学, 2023, 33(12): 906-910.
- [47] 王郑林, 常卫才, 刘心语, 等. 肿瘤坏死因子- α 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对胆囊癌细胞增殖的作用 [J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(19): 40-45.
- [48] Liu J Q, Xiao Q, Xiao J N, et al. Wnt/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.
- [49] 徐芳娣, 高军. Wnt/ β -catenin 在卵巢癌发展机制中的研究 [J]. 医学信息, 2021, 34(23): 22-24.
- [50] Lecarpentier Y, Schussler O, Hébert J L, et al. Multiple targets of the canonical WNT/ β -catenin signaling in cancers [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1248.
- [51] 项丽, 王申, 田海山, 等. 小鼠 *c-Myc* 基因的克隆表达及其纯化 [J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(2): 20-25.
- [52] 郭晨明, 王星, 赵磊, 等. 蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 参与泌尿系统肿瘤发病的机制及其相关治疗研究进展 [J]. 山东医药, 2022, 62(32): 109-112.

[责任编辑 李亚楠]