

米托蒽醌脂质体对卵巢癌细胞增殖、迁移及干性的影响^Δ

王冬^{1,2*}, 张悦³, 储百旺², 孙华^{3#}(1. 天津医科大学肿瘤医院药学部/国家恶性肿瘤临床医学研究中心/天津市肿瘤防治重点实验室/天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060; 2. 天津市肿瘤医院空港医院药学部, 天津 300308; 3. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)01-0042-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.01.08



摘要 目的 探讨米托蒽醌脂质体(Lipo-MIT)对卵巢癌细胞增殖、迁移及癌症干细胞(CSCs)干性的影响,并基于磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)通路探讨其作用机制。方法 通过体外实验考察Lipo-MIT对细胞增殖、迁移和CSCs干性特征的影响。构建裸鼠人卵巢癌细胞A2780异种移植瘤模型,探究2、5 mg/kg Lipo-MIT对荷瘤裸鼠安全性以及体内肿瘤生长、肿瘤组织病理特征的影响,并考察Lipo-MIT对细胞与肿瘤组织中PI3K/AKT通路、上皮-间充质转化、干性相关蛋白表达的调控作用。结果 Lipo-MIT对A2780、SK-OV3和OV-CAR5细胞的半数抑制浓度分别为0.72、5.41、2.77 $\mu\text{mol/L}$;与溶剂对照(0.1%二甲基亚砜)比较,0.5~2.5 $\mu\text{mol/L}$ Lipo-MIT可显著降低细胞克隆形成率、缩短细胞迁移距离、减少迁移细胞数、下调神经钙黏素(N-cadherin)蛋白表达、上调上皮钙黏素(E-cadherin)蛋白表达($P<0.05$),并降低肿瘤球形成率、下调乙醛脱氢酶1A1(ALDH1A1)蛋白表达($P<0.05$);1.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$ Lipo-MIT可显著降低干细胞成球概率和下调细胞中性别决定区Y框蛋白2表达($P<0.05$)。2、5 mg/kg Lipo-MIT对荷瘤裸鼠的体重、饮食量和饮水量及脏器(心、肝、脾、肺、肾)指数均无明显影响($P>0.05$),可显著改善肿瘤组织的病理变化,并可显著抑制肿瘤组织中N-cadherin和CD133、ALDH1A1(仅5 mg/kg Lipo-MIT)蛋白表达($P<0.05$),上调E-cadherin(仅5 mg/kg Lipo-MIT)蛋白表达($P<0.05$)。不同浓度/剂量Lipo-MIT均可显著降低细胞/肿瘤组织中PI3K、AKT蛋白的磷酸化水平($P<0.05$)。结论 Lipo-MIT可通过抑制PI3K/AKT通路活性来抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和干性。

关键词 米托蒽醌脂质体;卵巢癌;癌症干细胞;PI3K/AKT通路

Effects of Mitoxantrone liposomes on the proliferation, migration and stemness in ovarian cancer cells

WANG Dong^{1,2}, ZHANG Yue³, CHU Baiwang², SUN Hua³(1. Dept. of Pharmacy, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital/National Clinical Research Center for Cancer/Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy/Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China; 2. Dept. of Pharmacy, Tianjin Cancer Hospital Airport Hospital, Tianjin 300308, China; 3. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of Mitoxantrone liposomes (Lipo-MIT) on the proliferation, migration and cancer stem cell (CSCs) stemness of ovarian cancer cells, as well as to explore its mechanism of action based on the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway. **METHODS** The effects of Lipo-MIT on cell proliferation, migration and the stemness characteristics of CSCs were investigated through *in vitro* experiments. A human ovarian cancer A2780 cells xenograft tumor model of nude mouse was established to explore the effects of Lipo-MIT at doses of 2 and 5 mg/kg on the safety of tumor-bearing mice, as well as *in vivo* tumor growth and the pathological characteristics of tumor tissues. The influence of Lipo-MIT on the expression levels of PI3K/AKT pathway-related proteins, epithelial-mesenchymal transition related proteins, and stemness related proteins in both cells and tumor tissues was also investigated. **RESULTS** The half maximal inhibitory concentrations of Lipo-MIT against A2780, SK-OV3, and OV-CAR5 cells were 0.72, 5.41, and 2.77 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Compared with solvent control (0.1% dimethyl sulfoxide), 0.5-2.5 $\mu\text{mol/L}$ Lipo-MIT significantly reduced the cell colony formation rate, shortened the cell migration distance, decreased the number of migrated cells, down-regulated the protein expression of N-cadherin, up-regulated the protein expression of E-cadherin ($P<0.05$), and also decreased the stem cell sphere formation frequency and down-regulated the protein expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) ($P<0.05$). Additionally, 1.0 and 2.5 $\mu\text{mol/L}$

^Δ 基金项目 中国医药卫生事业发展基金会医学科研项目(No. HXHY2024KY0001);北京医学奖励基金会课题(No. YXJL-2022-0435-0392);天津市医学重点学科建设项目(No. TJYXZDXK-3-003A)

* 第一作者 副主任药师,硕士生导师,博士。研究方向:抗肿瘤药物新机制。E-mail:lvn1314@126.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:新药发现与作用机制。E-mail:sunhua@tust.edu.cn

Lipo-MIT significantly reduced the stem cell sphere formation probability and down-regulated the protein expression of sex determining region Y box protein 2 in cells ($P<0.05$). *In vivo* experimental results demonstrated that 2, 5 mg/kg Lipo-MIT had no significant effects on the body weight, food intake, water intake, and organ (heart, liver, spleen, lung, and kidney) indices of tumor-bearing nude mice ($P>0.05$), but could significantly improve the pathological changes of tumor tissues and remarkably inhibit the protein expressions of N-cadherin, CD133 and ALDH1A1 (only at 5 mg/kg Lipo-MIT), up-regulate the expression of E-cadherin (only at 5 mg/kg Lipo-MIT) in tumor tissues ($P<0.05$). Lipo-MIT at different concentrations/doses significantly reduced the phosphorylation levels of PI3K and AKT proteins in cells/tumor tissues ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Lipo-MIT can inhibit the proliferation and migration of ovarian cancer cells and the stemness by suppressing the activity of the PI3K/AKT pathway.

KEYWORDS mitoxantrone liposomes; ovarian cancer; cancer stem cells; PI3K/AKT pathway

卵巢癌是妇科常见的恶性疾病,全球每年约有20万女性因卵巢癌死亡^[1-2]。由于卵巢癌早期缺乏典型症状和有效诊断方法,约70%的患者在确诊时已处于晚期^[3]。虽然常规的一线治疗(如手术切除、化疗和靶向治疗等)可使大多数卵巢癌患者的临床症状得到缓解,但70%的患者仍在3年内复发^[4],并且复发后患者对化疗药物的敏感性显著降低,5年生存率仅为29%,传统治疗瓶颈很难突破^[5-6]。因此,亟须挖掘如靶向癌症干细胞(cancer stem cells, CSCs)、调控关键通路等创新治疗策略,为卵巢癌的有效干预开辟新路径。

CSCs是指存在于肿瘤组织中的一小部分具有干细胞特性的细胞,具有自我更新、无限增殖和多向分化的潜力^[7]。近年来,随着研究的深入,CSCs被认为在肿瘤复发、耐药和转移等过程中起着关键作用^[8]。当卵巢癌发生时,磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)通路常处于异常激活状态,而该通路激活后可对细胞凋亡、上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及CSCs的特性产生调节作用^[9-10]。因此,有效地抑制PI3K/AKT通路对卵巢癌的治疗有着重大意义。

米托蒽醌脂质体(mitoxantrone liposome, Lipo-MIT)是米托蒽醌的改良新剂型,现被用于既往至少经过一线标准治疗的复发或难治的外周T细胞淋巴瘤成人患者的临床治疗。Lipo-MIT具有靶向肿瘤特性强、疗效好、安全性高的特点,能够降低血液学毒性、心脏毒性等不良事件的发生率及严重程度^[11-12]。此外,有临床研究已证实,米托蒽醌单体对卵巢癌患者具有一定治疗效果^[13],这为Lipo-MIT拓展至卵巢癌领域的研究提供了重要的临床基础支撑。基于此,本研究以卵巢癌细胞及其干细胞为研究对象,并从PI3K/AKT通路靶向调控的角度出发,探讨Lipo-MIT体内外干预卵巢癌的药效和作用机制,为突破卵巢癌的传统治疗瓶颈提供新的治疗思路,同时也为拓展Lipo-MIT新的临床适应证提供理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括:DYY-11型蛋白电泳仪、DYCP-40E型转膜仪(北京市六一仪器厂),100TM Thermal Cycler型聚合酶链式反应(PCR)仪、HBS-ScanY型全自动多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Odyssey型红外成像系统(美国LI-COR公司),LX-300型高速离心机(德国Eppendorf公司),HistoCore Arcadia H型石蜡包埋机(德国Leica公司),Ts2R-FL型白光拍照显微镜(日本Nikon公司)等。

1.2 主要药品与试剂

Lipo-MIT注射液(批号H20220001,规格10 mL:10 mg)由石药集团中诺药业(石家庄)有限公司提供;DMEM细胞培养基(批号12491015)、驴抗兔免疫球蛋白G二抗(批号2805765)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;MTT试剂、RIPA裂解液和BCA蛋白定量试剂盒(批号分别为M8180、R0020、PC0020)均购自北京索莱宝科技有限公司;蛋白酶抑制剂、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(批号分别为HY-B0496、HY-P7004、HY-P7067)均购自美国MCE公司;兔源PI3K、磷酸化PI3K(p-PI3K)、AKT、磷酸化AKT(p-AKT)、性别决定区Y框蛋白2(sex determining region Y box protein 2, SOX2)、乙醛脱氢酶1A1(aldehyde dehydrogenase 1A1, ALDH1A1)、神经钙黏素(N-cadherin)、CD133(CSCs干性标志物)、上皮钙黏素(E-cadherin)和 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(批号分别为R381065、341468、R23412、R30004、310021、R22713、680441、252208、340341、R380624)均购自成都正能生物技术有限责任公司。

1.3 细胞

人卵巢癌细胞SK-OV3、OV-CAR5均购自国家实验细胞资源共享平台,A2780细胞购自上海富衡生物科技有限公司。所有细胞均完成短串联重复序列鉴定(结果符合ATCC标准)及支原体检测(结果呈阴性)。

1.4 动物

本研究所用动物为健康SPF级4周龄雌性BALB/c裸鼠,体重15~17 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[动物生产许可证号为SCXK(京)2021-0006]。动物购入后,于天津科技大学动物实验中心饲养,动物房内12 h光/12 h暗交替、相对湿度为40%~60%、温度为20~25 ℃,饲养期间裸鼠自由摄食和饮水。动物的使用与操作均符合天津科技大学生物工程学院学术委员会对实验动物福利伦理的要求,伦理批件号为SWXY-20241019105。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养

取SK-OV3、OV-CAR5、A2780细胞,接种于专用培养基中,于37 ℃、5%CO₂条件(下同)下培养。每2 d更换1次培养基,取对数生长期细胞进行后续实验。

2.1.2 Lipo-MIT对细胞增殖能力的影响

(1)MTT实验:将3种细胞的密度调整为 5×10^4 个/mL后,分别均匀接种于96孔板中。常规培养24 h,待细胞完全贴壁后,将3种细胞分别分为空白组(不加细胞与药物)、对照组(0.1%二甲基亚砜)和Lipo-MIT 38.65、3.865、0.386 5、0.038 65 $\mu\text{mol/L}$ 组(浓度根据前期预实验结果设置),每组设置3个复孔。按0.5 μL /孔向对照组、给药组细胞中加入相应溶剂或者药液,处理48 h后,在避光条件下向各孔中加入MTT溶液,放入培养箱中继续培养。4 h后吸弃MTT溶液,加入100 μL 二甲基亚砜,置于37 ℃培养箱中孵育10 min。采用酶标仪在492 nm波长下检测各孔的光密度(optical density, OD)值,并计算细胞存活率[细胞存活率(%)=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)×100%]以及药物对细胞的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

(2)克隆形成实验:将A2780细胞(根据“2.1.2”项下实验结果确定,下同)密度调整为1 000个/mL后,均匀接种于6孔板中。常规培养24 h,待细胞完全贴壁后,将细胞分为对照组(0.1%二甲基亚砜)和Lipo-MIT 0.1、0.5、1.0、2.0、20 nmol/L组(浓度根据前期预实验结果设置),每组设置3个复孔。按10 μL /孔向对照组、给药组中加入相应培养基或者药液。每2 d将孔板中培养基全部吸弃,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞2遍后,补加完全培养基及药物。10 d后,吸弃培养基,用PBS清洗细胞2遍后向每孔中加入2 mL的4%多聚甲醛固定细胞,30 min后吸弃4%多聚甲醛,用PBS清洗细胞2遍。加入1 mL的0.1%结晶紫染色20 min,染色结束后将结晶紫吸出,用PBS洗净细胞,晾干拍照。按下式计算克隆形成率:克隆形成率(%)=克隆形成数/接种细胞数×100%。实验重复3次。

2.1.3 Lipo-MIT对细胞迁移的影响

(1)划痕实验:将A2780细胞的密度调整为 3×10^5 个/mL后,均匀接种于6孔板中。常规培养24 h,待细胞完全贴壁后,在细胞表面进行划痕。划痕完成后,将细胞分为对照组和0.1、0.5、1.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$ Lipo-MIT组(浓度根据前期预实验结果设置),每组设置3个复孔。以加药完成时为0 h,记录划痕宽度,随后分别在药物处理12、24、48 h时拍照,记录划痕宽度并计算细胞迁移距离。细胞迁移距离=0 h细胞划痕宽度-药物处理不同时间(12、24、48 h)的细胞划痕宽度。实验重复3次。

(2)Transwell小室实验:用无血清培养基将A2780细胞的密度调整为 1×10^5 个/mL后,将其均匀接种于Transwell小室的上室,每个上室加入200 μL 细胞悬液。在Transwell小室的下室中加入600 μL 含有20%胎牛血清的培养基,以此诱导细胞的纵向迁移。待细胞完全贴壁后,按“2.1.3(1)”项下方法进行细胞分组、给药。向每个小室中加入4 μL 溶剂/药液,48 h后,吸除上、下2个小室中的培养基,用4%多聚甲醛固定细胞30 min,分别向上、下2个小室中加入0.1%结晶紫染色20 min。擦除小室上层细胞并将小室边缘擦净,确保只保留迁移到下室膜表面的细胞。晾干后对小室进行拍照并对迁移到下室膜表面的细胞进行计数。实验重复3次。

2.1.4 Lipo-MIT对CSCs干性的影响

(1)干细胞球体形成实验:将A2780细胞的密度调整为 1×10^5 个/mL后,将其接种于6孔板中。常规培养24 h,待细胞完全贴壁后,按“2.1.3(1)”项下方法进行细胞分组、给药。处理48 h后,吸弃培养基,用胰蛋白酶消化孔板中的细胞,使用完全培养基离心,然后使用PBS二次离心,弃上清液,用无血清肿瘤球形成培养基(含bFGF和EGF)重悬细胞。对各组药物处理过的细胞进行计数,按每孔1 000个细胞将其接种于超低吸附24孔板中,使每个孔中的细胞呈现单个分布(不聚团)。培养7~10 d,待对照组形成较多直径>100 μm 的悬浮克隆球后终止实验。显微镜下拍照并记录各组细胞的肿瘤球个数,并计算肿瘤球形成率[肿瘤球形成率(%)=每孔形成肿瘤球的个数/接种细胞总数×100%]。实验重复3次。

(2)极限稀释实验:将A2780细胞的密度调整为 1×10^5 个/mL后,将其接种于6孔板中。常规培养24 h,待细胞完全贴壁后,按“2.1.3(1)”项下方法进行细胞分组、给药。处理48 h后,吸弃培养基,用胰蛋白酶消化孔板中的细胞,使用普通培养基离心后,用PBS二次离心,弃上清,用无血清肿瘤球形成培养基重悬细胞。对各组药物处理后的细胞进行计数和稀释后,将其接种于超低吸附96孔板中。每个样本按细胞数目分为4组,细胞数目呈梯度递减(分别为200、100、50、20个),每组设置3个复孔。将孔板转移到细胞培养箱中培养7~10 d,待对照

组细胞形成多个悬浮克隆球后终止实验。显微镜下观察并记录各组细胞的成球数。通过极限稀释在线分析程序(<https://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>)进行数据处理,计算干细胞成球概率^[14]。

2.1.5 Lipo-MIT对细胞中EMT标志物、干性标志物及PI3K/AKT通路相关蛋白表达的影响

采用Western blot法检测。A2780细胞的培养、分组和药物浓度设置均同“2.1.3(1)”项下。培养48 h后,采用高效RIPA裂解液提取细胞中总蛋白,然后按照BCA试剂盒方法测定上清液中总蛋白浓度。将蛋白高温变性后,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压220 V,电泳时间90 min)分离蛋白样品,并将其转移(电流300 mA,转膜时间100 min)至聚偏二氟乙稀膜,用5%脱脂奶粉封闭1 h。将膜分别与EMT标志物(N-cadherin、E-cadherin)、CSCs干性标志物(ALDH1A1、SOX2)、PI3K/AKT通路相关蛋白(p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT)、内参蛋白(β -actin)一抗(稀释比例均为1:1 000)和驴抗兔免疫球蛋白G二抗孵育(稀释比例为1:5 000),随后对膜进行扫描,采用Image J软件对蛋白条带进行灰度分析。以N-cadherin、E-cadherin、ALDH1A1、SOX2蛋白与 β -actin蛋白条带灰度值的比值表示上述蛋白的表达水平,以p-PI3K与PI3K、p-AKT与AKT蛋白条带的灰度值比值表示PI3K、AKT蛋白的磷酸化水平。实验重复3次。

2.2 动物实验

2.2.1 造模、分组与给药

将A2780细胞按 5×10^7 个/mL皮下注射至裸鼠右侧腋窝处构建异种移植瘤模型,每只裸鼠注射100 μ L细胞悬液。接种完成后,每天观察裸鼠生存状态是否良好,并观察裸鼠接种部位是否有结节生成。接种7 d后,裸鼠肿瘤体积约为100 mm³,表示建模成功^[15]。模型建立成功后,将18只裸鼠按照随机数字表法分为模型组和Lipo-MIT低、高剂量组,每组6只。每2 d监测1次裸鼠的肿瘤体积[肿瘤体积=(长径 \times 短径²)/2]、饮食量、饮水量、体重。Lipo-MIT使用5%葡萄糖注射液稀释后采用尾静脉注射方式给药。根据人和动物体表面积折算的裸鼠的等效剂量为5 mg/kg,据此确定本研究中Lipo-MIT低、高剂量组的给药剂量分别为2、5 mg/kg(单次给药)。

2.2.2 动物取材、处理及脏器指数测定

给药12 d后,采用颈椎脱臼法处死裸鼠。解剖裸鼠,取出瘤块及心、肝、脾、肺和肾,置于生理盐水中冲洗,吸干表面液体后对肿瘤组织及器官进行称重,并计算脏器指数[脏器指数(%)=器官质量/裸鼠体重 \times 100%]。将一部分组织置于4%多聚甲醛中固定,将另一部分组织放入-80℃冰箱中保存。

2.2.3 Lipo-MIT对裸鼠肿瘤组织病理形态学的影响

采用苏木精-伊红(HE)染色法观察。取“2.2.2”项下

4%多聚甲醛固定的肿瘤组织,常规制备石蜡切片(厚度4 μ m)后,行常规HE染色。通过显微镜观察肿瘤组织病理变化并拍照。

2.2.4 Lipo-MIT对裸鼠肿瘤组织中EMT标志物、干性标志物及PI3K/AKT通路相关蛋白表达的影响

取“2.2.2”项下冻存的裸鼠肿瘤组织(每组取3个样本),常规解冻后,采用Western blot法检测肿瘤组织中EMT标志物(N-cadherin、E-cadherin)、干性标志物(CD133、ALDH1A1)及PI3K/AKT通路相关蛋白(PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT)的表达,其中CD133一抗的稀释比例为1:1 000,其余条件均同“2.1.5”项下。

2.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8和SPSS 25.0软件进行作图和数据的统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Levene检验验证方差齐性;若检验结果显示方差齐,采用单因素方差分析结合LSD-*t*检验进行组间比较;若方差不齐,则改用Kruskal-Wallis *H*检验联合Dunnett's *t*法分析。同组间实验前后各指标的比较采用配对*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞实验结果

3.1.1 Lipo-MIT抑制卵巢癌细胞增殖活性

Lipo-MIT对3种卵巢癌细胞的增殖均具有良好的抑制活性,且其对A2780细胞的增殖抑制效果($IC_{50}=0.72 \mu\text{mol/L}$)明显优于SK-OV3细胞($IC_{50}=5.41 \mu\text{mol/L}$)和OV-CAR5细胞($IC_{50}=2.77 \mu\text{mol/L}$)。因此,本研究选取A2780细胞进行后续实验。

3.1.2 Lipo-MIT抑制卵巢癌细胞克隆形成

与对照组[克隆形成率为(31.65 \pm 3.04)%]比较,Lipo-MIT 0.5、1.0、2.0、20 nmol/L组细胞的克隆形成率[分别为(21.70 \pm 2.83)%、(18.95 \pm 4.45)%、(9.90 \pm 1.41)%、(0.60 \pm 0.14)%]均显著降低($P<0.05$),但Lipo-MIT 0.1 nmol/L组细胞的克隆形成率[(29.9 \pm 2.83)%]差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.1.3 Lipo-MIT抑制卵巢癌细胞迁移

与对照组比较,Lipo-MIT 0.5、1.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的迁移距离(药物作用12、24、48 h时)均显著缩短($P<0.05$);迁移细胞数均显著减少($P<0.05$);细胞中E-cadherin蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$),而N-cadherin蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表1(相应图片结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”板块查看附图1)。

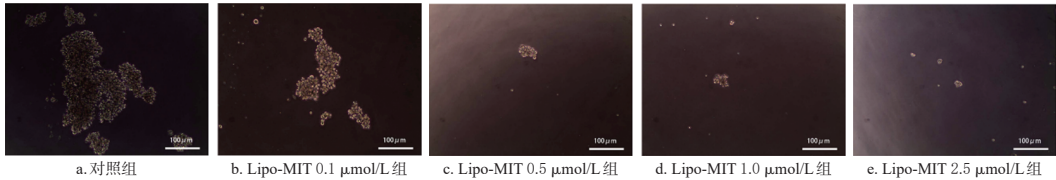
3.1.4 Lipo-MIT抑制CSCs干性特征

与对照组比较,Lipo-MIT 0.5、1.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组肿瘤球形成率、细胞中ALDH1A1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);Lipo-MIT 1.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组干细胞成球概率、细胞中SOX2蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图1、表2。

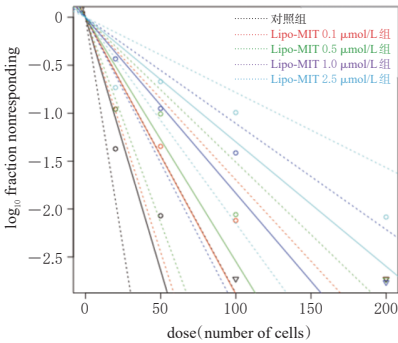
表1 各组细胞的迁移距离、迁移细胞数及EMT标志物表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞迁移距离/ μm			迁移细胞数/个	EMT标志物	
	12 h	24 h	48 h		N-cadherin/ β -actin	E-cadherin/ β -actin
对照组	97.68 \pm 29.11	160.03 \pm 69.33	278.35 \pm 45.04	580.50 \pm 102.53	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
Lipo-MIT 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组	87.35 \pm 26.36	150.39 \pm 12.52	252.03 \pm 12.68	420.50 \pm 38.89	0.96 \pm 0.01	1.29 \pm 0.33
Lipo-MIT 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	47.36 \pm 9.47 ^a	105.16 \pm 11.41 ^a	164.50 \pm 19.84 ^a	304.50 \pm 27.58 ^a	0.84 \pm 0.01 ^a	1.72 \pm 0.32 ^a
Lipo-MIT 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	35.47 \pm 1.66 ^a	87.08 \pm 11.17 ^a	126.25 \pm 20.13 ^a	133.00 \pm 35.36 ^a	0.75 \pm 0.10 ^a	2.22 \pm 0.34 ^a
Lipo-MIT 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	29.26 \pm 6.79 ^a	69.76 \pm 4.46 ^a	116.49 \pm 19.96 ^a	78.50 \pm 20.51 ^a	0.67 \pm 0.03 ^a	2.83 \pm 0.52 ^a

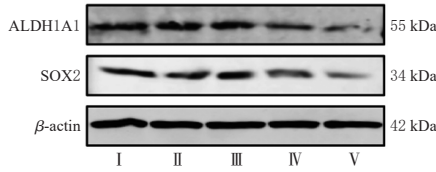
a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。



A. 干细胞球体形成实验图



B. 极限稀释实验图



C. 干性相关蛋白的电泳图

I : 对照组; II : Lipo-MIT 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组; III : Lipo-MIT 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; IV : Lipo-MIT 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; V : Lipo-MIT 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组。

图1 各组细胞的干性考察实验图及干性相关蛋白的电泳图

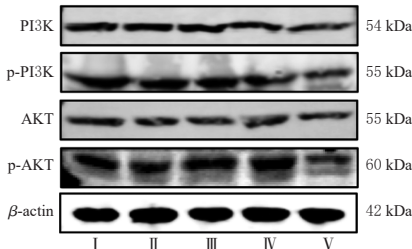
表2 各组细胞的干性相关指标比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	肿瘤形成率/%	干细胞成球概率 [95%置信区间]	干性相关蛋白	
			SOX2/ β -actin	ALDH1A1/ β -actin
对照组	3.23 \pm 0.40	1/19[1/34.8, 1/10.5]	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
Lipo-MIT 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.70 \pm 0.40	1/34.7[1/59.0, 1/20.4]	0.95 \pm 0.01	0.95 \pm 0.04
Lipo-MIT 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.93 \pm 0.68 ^a	1/39.3[1/66.2, 1/23.4]	0.90 \pm 0.03	0.86 \pm 0.02 ^a
Lipo-MIT 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.50 \pm 0.26 ^a	1/54.5[1/90.3, 1/33.0] ^a	0.59 \pm 0.11 ^a	0.80 \pm 0.04 ^a
Lipo-MIT 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.63 \pm 0.25 ^a	1/77[1/127.5, 1/47.5] ^a	0.48 \pm 0.06 ^a	0.70 \pm 0.03 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3.1.5 Lipo-MIT抑制卵巢癌细胞PI3K/AKT通路活性

与对照组比较, Lipo-MIT 0.5、1.0、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中PI3K、AKT蛋白的磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$), 且具有一定的浓度依赖性趋势。结果见图2、表3。



I : 对照组; II : Lipo-MIT 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组; III : Lipo-MIT 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; IV : Lipo-MIT 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; V : Lipo-MIT 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组。

图2 各组细胞中PI3K/AKT通路相关蛋白的电泳图

表3 各组细胞中PI3K、AKT蛋白的磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
Lipo-MIT 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.95 \pm 0.04	0.90 \pm 0.05
Lipo-MIT 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.80 \pm 0.06 ^a	0.73 \pm 0.16 ^a
Lipo-MIT 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.67 \pm 0.06 ^a	0.64 \pm 0.04 ^a
Lipo-MIT 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.60 \pm 0.06 ^a	0.56 \pm 0.06 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3.2 动物实验结果

3.2.1 Lipo-MIT对裸鼠体重、饮食量、饮水量、脏器指数无明显影响

与模型组比较, Lipo-MIT低、高剂量组裸鼠的体重、饮食量、饮水量及脏器(心、肝、脾、肺、肾)指数差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图3、表4。

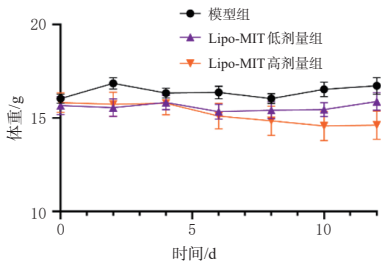


图3 Lipo-MIT对裸鼠体重的影响($n=6$)

表4 各组裸鼠的脏器指数、饮水量、饮水量比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	心脏指数/%	肝脏指数/%	脾脏指数/%	肺脏指数/%	肾脏指数/%	饮水量/g	饮水量/mL
模型组	0.64±0.07	5.36±0.08	0.29±0.17	0.76±0.05	1.65±0.15	6.41±1.01	7.66±1.13
Lipo-MIT低剂量组	0.61±0.07	5.30±0.53	0.25±0.14	0.78±0.10	1.60±0.08	6.32±0.35	7.79±0.62
Lipo-MIT高剂量组	0.70±0.05	5.04±0.71	0.29±0.16	0.81±0.08	1.81±0.19	6.12±0.46	6.97±0.90

3.2.2 Lipo-MIT抑制裸鼠肿瘤生长

与模型组比较,Lipo-MIT低、高剂量组裸鼠的肿瘤体积和肿瘤质量均显著减小/降低($P<0.05$)。结果见表5。

表5 各组裸鼠的肿瘤体积和肿瘤质量比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	肿瘤体积/mm ³	肿瘤质量/g
模型组	2 569.75±529.47	2.39±0.36
Lipo-MIT低剂量组	1 489.60±230.02 ^a	1.39±0.35 ^a
Lipo-MIT高剂量组	1 070.45±279.23 ^a	1.11±0.21 ^a

a:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2.3 Lipo-MIT改善裸鼠肿瘤组织病理特征

模型组裸鼠肿瘤组织细胞形态较为规则,细胞间排列紧密、轮廓清晰。给药组裸鼠肿瘤组织细胞排列松散、无序,细胞核出现了明显的皱缩现象,肿瘤组织呈现出不同程度的改善,坏死区域清晰可见。结果见图4。

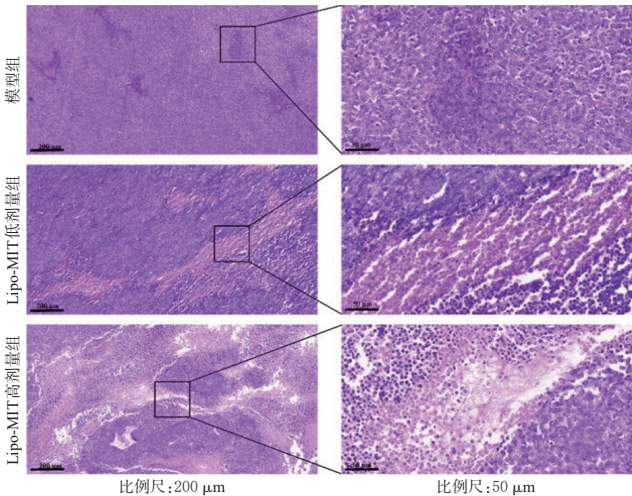


图4 各组裸鼠肿瘤组织病理观察显微图(HE染色)

3.2.4 Lipo-MIT抑制裸鼠肿瘤组织中EMT标志物、干性标志物表达

与模型组比较,Lipo-MIT低、高剂量组裸鼠肿瘤组织中N-cadherin和CD133蛋白表达水平以及Lipo-MIT高剂量组裸鼠肿瘤组织中ALDH1A1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),Lipo-MIT高剂量组裸鼠肿瘤组织中E-cadherin蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。结果见图5、表6。

3.2.5 Lipo-MIT抑制裸鼠肿瘤组织中PI3K/AKT通路活性

与模型组比较,Lipo-MIT低、高剂量组裸鼠肿瘤组织中PI3K蛋白的磷酸化水平及Lipo-MIT高剂量组裸鼠肿瘤组织中AKT蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表6、图6。

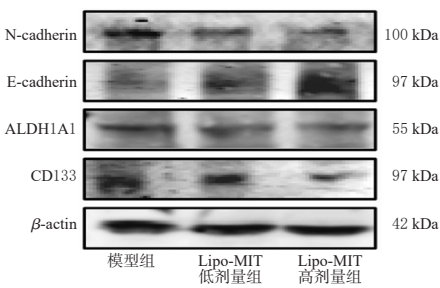


图5 各组裸鼠肿瘤组织中EMT标志物、干性标志物的电泳图

表6 各组裸鼠肿瘤组织中EMT标志物、干性标志物表达水平及PI3K、AKT蛋白磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	N-cadherin/ β-actin	E-cadherin/ β-actin	ALDH1A1/ β-actin	CD133/ β-actin	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
模型组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Lipo-MIT低剂量组	0.80±0.05 ^a	1.15±0.13	0.94±0.05	0.84±0.02 ^a	0.64±0.04 ^a	0.79±0.04
Lipo-MIT高剂量组	0.72±0.03 ^a	1.44±0.20 ^a	0.81±0.15 ^a	0.65±0.01 ^a	0.41±0.09 ^a	0.61±0.20 ^a

a:与模型组比较, $P<0.05$ 。

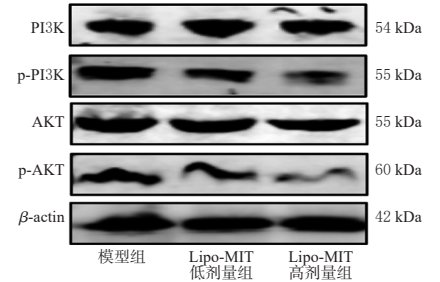


图6 各组裸鼠肿瘤组织中PI3K/AKT通路相关蛋白的电泳图

4 讨论

卵巢癌在临床治疗中面临高复发率、耐药性和转移倾向,传统治疗方法可以缩小肿瘤体积,但无法根除具有自我更新能力的CSCs,导致肿瘤再生和耐药;且CSCs可通过EMT增强侵袭能力,导致卵巢癌转移^[16]。因此,寻找高效靶向CSCs的治疗药物可能是突破卵巢癌传统治疗瓶颈的有效策略^[17]。米托蒽醌作为细胞周期非特异性药物,抗肿瘤谱较广,其脂质体剂型具有靶向肿瘤、改善循环等优势。本研究结果显示,在3种人卵巢癌细胞中,Lipo-MIT对A2780细胞的抑制活性最好;同时,Lipo-MIT能抑制A2780细胞的克隆形成,表明Lipo-MIT对人卵巢癌A2780细胞的增殖具有抑制作用。

临床研究表明,EMT标志物(N-cadherin、E-cadherin)可作为预测晚期卵巢癌患者化疗不良反应的生物标志物^[18]。本研究首先通过划痕实验与Transwell小室实验发现,与对照组相比,Lipo-MIT不同浓度组卵巢癌细胞的迁移均受到了不同程度抑制;Western blot检测结果进一步证实,Lipo-MIT可下调N-cadherin表达、上调E-cadherin表达。已有研究证实,EMT是增强CSCs侵袭、转移能力的核心机制^[19]。在CSCs调控方面,干细

胞球体形成实验与极限稀释实验结果显示,相较于对照组,Lipo-MIT各浓度组的肿瘤球形成率、成球概率均不同程度降低;Western blot检测结果表明,Lipo-MIT可下调CSCs干性标志物SOX2和ALDH1A1的表达,且该抑制效应随药物浓度升高而增强。这一结果不仅证实了Lipo-MIT对卵巢癌CSCs具有直接抑制作用,也为解决卵巢癌患者的耐药性提供了重要的实验依据。

在动物实验中,本研究通过向裸鼠接种A2780细胞构建荷瘤模型。结果显示,Lipo-MIT能有效抑制荷瘤裸鼠肿瘤体积增长与肿瘤质量增加。安全性评估方面,Lipo-MIT低、高剂量组与模型组裸鼠的体重、饮食状态及脏器指数差异均无统计学意义,提示其体内应用的安全性良好。为进一步验证Lipo-MIT在体内对EMT及CSCs的抑制作用,本研究采用Western blot法检测了肿瘤组织中相关标志物表达。结果显示,与模型组相比,Lipo-MIT高剂量组裸鼠肿瘤组织中N-cadherin、CD133、ALDH1A1的表达显著下调,E-cadherin的表达显著上调。这一结果不仅证实了Lipo-MIT在体内具有显著的抗卵巢癌作用,也为其后续用于改善卵巢癌患者耐药性提供了重要的实验依据。

PI3K/AKT通路在EMT进程和CSCs的干性维持中发挥重要作用^[17]。本研究采用Western blot法分析了Lipo-MIT在体内外对PI3K/AKT通路的影响。结果显示,Lipo-MIT均可显著降低细胞/肿瘤组织中PI3K、AKT蛋白的磷酸化水平。

综上所述,Lipo-MIT可通过抑制PI3K/AKT通路活性,下调EMT标志物和CSCs干性标志物表达,进而抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和干性。但本研究仅从细胞、动物实验层面初步阐明了Lipo-MIT抗卵巢癌的作用及部分机制,后续还需结合临床样本验证其应用潜力,同时利用转录组学技术进一步解析其下游靶基因网络,为其转化应用提供更充分的实验依据。

参考文献

- [1] PENNY S M. Ovarian cancer: an overview[J]. Radiol Technol, 2020, 91(6): 561-575.
- [2] AMIN N, CHAABOUNI N, GEORGE A. Genetic testing for epithelial ovarian cancer[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2020, 65: 125-138.
- [3] LI N, LIU Q, TIAN Y, et al. Overview of fuzuloparib in the treatment of ovarian cancer: background and future perspective[J]. J Gynecol Oncol, 2022, 33(6): e86.
- [4] GIORNELLI G H. Management of relapsed ovarian cancer: a review[J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 1197.
- [5] GULERIA S, JENSEN A, TOENDER A, et al. Risk of epithelial ovarian cancer among women with benign ovarian tumors: a follow-up study[J]. Cancer Causes Control, 2020, 31(1): 25-31.
- [6] LHEUREUX S, GOURLEY C, VERGOTE I, et al. Epithelial ovarian cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10177): 1240-1253.

- [7] BAPAT S A. Human ovarian cancer stem cells[J]. Reproduction, 2010, 140(1): 33-41.
- [8] WANG H, GONG P, CHEN T, et al. Colorectal cancer stem cell states uncovered by simultaneous single-cell analysis of transcriptome and telomeres[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(8): 2004320.
- [9] MABUCHI S, KURODA H, TAKAHASHI R, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2015, 137(1): 173-179.
- [10] LIANG S H, GUO H R, MA K, et al. A PLCB1-PI3K-AKT signaling axis activates EMT to promote cholangiocarcinoma progression[J]. Cancer Res, 2021, 81(23): 5889-5903.
- [11] WANG L P, CAO J, LI C L, et al. Efficacy and safety of mitoxantrone hydrochloride liposome injection in Chinese patients with advanced breast cancer: a randomized, open-label, active-controlled, single-center, phase II clinical trial[J]. Investig New Drugs, 2022, 40(2): 330-339.
- [12] YANG J L, SHI Y K, LI C L, et al. Phase I clinical trial of pegylated liposomal mitoxantrone plm60-s: pharmacokinetics, toxicity and preliminary efficacy[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2014, 74(3): 637-646.
- [13] MARKMAN M, HAKES T, REICHMAN B, et al. Salvage intraperitoneal mitoxantrone therapy of ovarian cancer: influence of increasing the volume of treatment[J]. Gynecol Oncol, 1993, 49(2): 185-189.
- [14] HU Y F, SMYTH G K. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays[J]. J Immunol Methods, 2009, 347(1/2): 70-78.
- [15] WANG X, TIAN W D, WANG N, et al. Transcriptome analysis reveals the anticancer effects of fenbendazole on ovarian cancer: an *in vitro* and *in vivo* study[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 1593.
- [16] PRADELLA D, NARO C, SETTE C, et al. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 8.
- [17] DENG J L, WANG L, CHEN H M, et al. Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(34): 55771-55788.
- [18] WANG H, ZHANG G, ZHANG H, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 723: 156-166.
- [19] DAVIDSON B, HOLTH A, HELLESYLT E, et al. The clinical role of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions[J]. Hum Pathol, 2015, 46(1): 1-8.

(收稿日期:2025-07-29 修回日期:2025-12-13)

(编辑:林 静)