

# MT1过表达可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路影响SKOV3细胞的增殖与凋亡

熊姝 张军\*

(重庆医科大学, 基础医学院, 重庆 400016)

**摘要** 卵巢癌是一种常见的威胁女性健康的恶性肿瘤。然而卵巢癌的发生机制尚不清楚。该研究旨在探讨褪黑激素受体MT1在人卵巢癌SKOV3细胞中的作用及其主要机制。采用MT1-pcDNA3.1质粒(MT1组)与空载体pcDNA3.1(对照组)转染SKOV3细胞, 未转染SKOV3细胞作为阴性对照组。转染48 h后, 新鲜培养基培养24 h或48 h, 观察细胞周期、增殖、凋亡情况, 上清液检测褪黑激素表达。此外, 在血清缺乏培养基培养细胞并转48 h后, 更换新鲜培养基并加入4  $\mu\text{mol/L}$  PF-04691502抑制剂孵化24 h。测定AKT蛋白水平、总mTOR蛋白水平和相应磷酸化蛋白水平。结果显示, 与NC组相比, MT1组在细胞周期S期阻滞( $P<0.05$ ), 伴随增殖减少和早期凋亡( $P<0.05$ )。3组细胞上清液检测到褪黑激素分泌均随时间增加( $P<0.05$ )。Western blot分析显示, MT1过表达抑制了PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活。该研究得出, SKOV3细胞有自行分泌褪黑激素的能力。MT1过表达可与内源性褪黑激素结合, 抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活, 最终发挥抗癌作用。

**关键词** 褪黑激素; PI3K/AKT/mTOR信号通路; SKOV3; 自分泌

## MT1 Overexpression Affects the Apoptosis and Proliferation of SKOV3 Cells via PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway

XIONG Shu, ZHANG Jun\*

(School of Basic Medical Sciences, Chong Qing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** Ovarian cancer is a common malignant tumor that severely threatens the health of women. However, the mechanisms of ovarian cancer development remain unclear. This study aimed to investigate the role of the melatonin receptor MT1 in human ovarian cancer SKOV3 cells and explored its primary mechanisms. SKOV3 cells were transfected with the MT1-pcDNA3.1 plasmid (MT1 group) or empty vector pcDNA3.1 (control group), while the untransfected SKOV3 cells were used as the negative control group. After 48 h of transfection, the cells were cultured with fresh medium for 24 h or 48 h, then cell cycle, proliferation and apoptosis were investigated and melatonin expression was measured in the supernatant. Besides, the cells were cultured in serum-depleted medium overnight 48 h after transfection, then replaced with fresh medium containing the PF-04691502 inhibitor (4  $\mu\text{mol/L}$ ) and incubated for 24 hours. The protein level of AKT, as well as the total and phosphorylated mTOR protein levels were measured. The results indicated that compared with the NC group, the MT1 group was arrested in the S phase ( $P<0.05$ ) of cell cycle, concomitant with reduced proliferation and early apoptosis ( $P<0.05$ ). The secretion of melatonin was measured in the supernatant. The results showed that MT1 overexpression inhibited the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. The study concluded that SKOV3 cells have the ability to secrete melatonin. MT1 overexpression can bind to endogenous melatonin, inhibit the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, and finally exert anti-cancer effect.

收稿日期: 2020-02-27 接受日期: 2020-03-16

重庆市卫生计生委中医药科技项目(批准号: ZY201702076)资助的课题

\*通讯作者. Tel: 13608338759, E-mail: 1259404584@qq.com

Received: February 27, 2020 Accepted: March 16, 2020

This work was supported by the Traditional Chinese medicine projects of Chongqing Public Health Bureau (Grant No.ZY201702076)

\*Corresponding authors. Tel: +86-13608338759, E-mail: 1259404584@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5217>

tonin increased with time in all three groups as detected in the supernatant of cells ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis showed that MT1 overexpression inhibited the activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. In conclusion, SKOV3 cells secrete melatonin without any stimulation. The overexpression of MT1 can inhibit PI3K/AKT/mTOR pathway via binding endogenous melatonin, thereby playing an anticancer role.

**Keywords** melatonin; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; SKOV3; autocrine

卵巢癌是一种常见的恶性肿瘤。根据《2018年全球癌症统计》, 2018年全球报告了295 414例卵巢癌新发病例和184 799例死亡病例, 标准化发病率为每10万妇女中6.6例, 标准化死亡率为每10万妇女中3.9例<sup>[1]</sup>。卵巢癌占女性恶性肿瘤比例为2.5%, 其恶性程度高, 且5年生存率较低。卵巢肿瘤包括一组异质性的恶性肿瘤, 90%卵巢癌为上皮性卵巢癌, 其中最常见的是浆液性癌<sup>[2]</sup>。卵巢表面上皮干细胞是卵巢癌发生的关键因素。吸烟、肥胖、遗传、衰老和饮酒是导致卵巢癌的潜在危险因素<sup>[4-8]</sup>。卵巢癌通常在早期并不表现明显体征。因此, 新发病例一经确诊常为晚期<sup>[9]</sup>。

褪黑激素是松果体分泌的一种低分子内源性胺类激素, 可自由通过细胞膜发挥多种生理作用。褪黑激素的分泌与昼夜节律有关, 夜间分泌高峰在凌晨2点到3点之间<sup>[10-12]</sup>。褪黑激素通过与膜受体结合以及抗氧化活性, 对肿瘤细胞有较强的抑制作用<sup>[13-14]</sup>。在卵巢癌中, 褪黑激素可通过细胞内外靶蛋白发挥抗肿瘤作用<sup>[15]</sup>。它可以通过抑制血管生成、细胞存活、迁移和炎症直接根除已建立的肿瘤<sup>[16-17]</sup>。此外, 褪黑激素可作为辅助治疗卵巢肿瘤, 提高化疗药物<sup>[18]</sup>的疗效, 并可有效诱导T细胞的抗肿瘤免疫反应<sup>[19]</sup>。

SKOV3细胞系是一种常见的卵巢癌细胞系模型, 来源于卵巢癌患者腹水和浆液性囊腺癌<sup>[20]</sup>。MT1是广泛表达于SKOV3和OVCAR等卵巢癌细胞系中的G蛋白偶联受体, 能够通过结合褪黑素促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖, 还能够抑制血管生成和转移, 并可诱导表观遗传变化<sup>[15,21]</sup>, 从而发挥抗癌作用。本研究通过转染MT1-pcDNA3.1过表达质粒, 发现MT1在卵巢癌细胞SKOV3中过表达能够产生抑癌作用。而这与SKOV3细胞特异性分泌褪黑激素的能力有关, 提示MT1受体可能是卵巢癌治疗的潜在治疗靶点。

## 1 材料与方

### 1.1 细胞与试剂

SKOV3细胞购自江苏凯基生物科技有限公

司(中国)。细胞培养SKOV3细胞株在37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下, 在含10%胎牛血清5A培养液中培养至80%~90%细胞融合后用不含EDTA的0.1%胰酶消化并传代, 取对数生长期细胞进行实验。收集10<sup>6</sup>个MT1-pcDNA3.1质粒(MT1组)与空载体pcDNA3.1(对照组)转染的SKOV3细胞, 未转染组为阴性对照, 以此为细胞样本进行接下来的实验。Anti-MT1(A13030)购自ABclonal Biotechnology公司(美国)。Anti-p-Akt(4060)购自Cell Signaling Technology公司(美国)。Anti-Akt(ab179463)和anti-mTOR(ab109268)购自Abcam公司(英国)。山羊anti-rabbit IgG-HRP (KGAA35)购自江苏凯基生物科技有限公司(中国)。Lipofectamine 3000(L3000015)和TRIZOL(15596-026)购自Thermo Fisher Scientific公司(美国)。cDNA逆转录试剂盒(RR036B)和One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR kit II(SYBR Green, RR086B)购自TaKaRa公司(日本)。人类褪黑素检测试剂盒来自TSZ公司(美国)。TUNEL检测试剂盒、Western blot检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒、EdU显像检测试剂盒购自江苏凯基生物科技有限公司(中国)。

### 1.2 MT1-pcDNA3.1过表达质粒的构建

根据MT1(NM\_005958.4)的Genebank序列, 全基因合成MT1目的基因并加入Hind III(AAGCTT)与EcoR I(GAATTC)酶切位点, 连接pcDNA3.1载体(Thermo Fisher Scientific公司, 美国), 最终扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。该质粒由中国凯基生物技术有限公司合成, 并由上海生工生物技术有限公司进行测序。1%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 消化片段的电泳带与预期片段大小一致, 插入的基因序列经测序确认(图1)。结果表明成功构建了MT1-pcDNA3.1过表达质粒。

### 1.3 Real-time定量PCR(RT-PCR)

根据MT1(NM\_005958.4)和GADPH(NM\_002046.3)的Genebank序列, 利用primer Premier 6.0设计RT-PCR引物序列(表1)。从细胞中提取总RNA, 根据制造商

的说明(One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR Kit II, SYBR Green;日本TaKaRa RR086B)进行实验, 使用10 μmol/L引物和1 μL cDNA在20 μL反应混合物中反应, 并利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法检测各组MT1 mRNA相对表达量。

#### 1.4 凋亡检测

Annexin-V FITC/PI双染法检测细胞凋亡: 收集 $10^6$ 个细胞样本并制备单细胞悬液, 加入含500 μL的结合缓冲液(binding buffer)悬浮细胞; 并与5 μL Annexin V-FITC混匀后, 又加入5 μL碘化丙啶(propidium iodide), 再混匀; 室温避光反应5~15 min; 用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。

TUNEL检测细胞凋亡,  $10^6$ 个细胞浸入4%的多聚甲醛固定液中30 min或至过夜, PBS浸泡3 min×3。通透: 在样本上加1%的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100), 室温放置15 min。洗涤: PBS浸泡5 min, 清洗3次。封闭液封闭: 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇溶液处理样本15 min。洗涤: PBS浸泡5 min, 清洗3次。蛋白酶K修复: 每个样本滴加配制好的100 μL蛋白酶K, 37 °C孵育30 min。

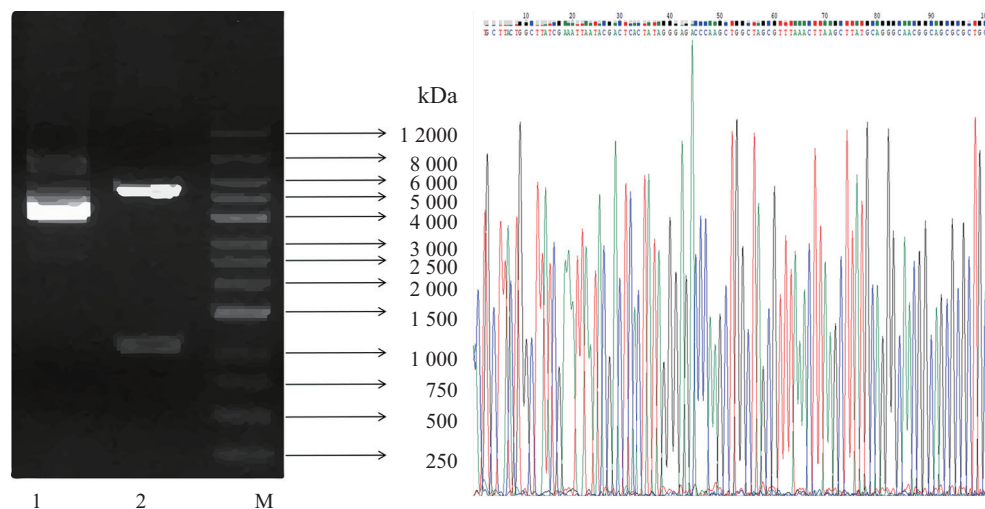
Tunel反应: 每个样本滴加100 μL Streptavidin-TRITC标记工作液, 37 °C避光反应1 h。洗涤: PBS浸泡5 min, 清洗3次。DAPI复染: 每个样本滴加100 μL的DAPI工作液, 避光室温5 min。洗涤: PBS浸泡5 min, 清洗3次。观察: 生物荧光倒置显微镜(日本Olympus BX41)。

#### 1.5 细胞增殖检测

收集MT1过表达的SKOV3细胞 $10^6$ 个于6孔板中, 转染48 h后更换新鲜培养基继续培养, 并于0、12、24、48和72 h利用EdU法检测(Edu成像检测试剂盒; 凯基生物生物技术, 中国)细胞生存能力, 经过细胞固定、染色、脱色、洗涤等标准的程序进行细胞生存能力检测, 并利用高内涵细胞成像系统进行观察(放大倍数200×)。

#### 1.6 细胞周期检测

收集MT1过表达的SKOV3细胞 $10^6$ 个于6孔板中, 转染48 h后更换新鲜培养基并于96孔板中培养于24 h和48 h, 利用PI单染法检测细胞(细胞周期



1: *Hind* III/*Eco*R I双酶切质粒pcDNA3.1, 2: *Hind* III/*Eco*R I双酶切质粒MT1-pcDNA3.1, M: DNA marker。

Lane 1: plasmid digested with *Hind* III/*Eco*R I; Lane 2: plasmid digested with *Hind* III/*Eco*R I; Lane M: DNA marker.

图1 MT1-pcDNA3.1进行基因扩增后的酶切图谱与部分测序片段

Fig.1 Macrorestriction map and sequencing the partial DNA fragments of MT1-pcDNA3.1 after gene expansion

表1 MT1和GAPDH的引物序列

Table 1 Primer sequences of MT1 and GAPDH

基因 Genes	Genebank ID	引物序列 Primer sequences	扩增长度 Length of amplification
MT1	NM_005958.4	Forward: 5'-GCG TCC TCA TCT TCA CCA TCG T-3' Reverse: 5'-CCT GCG TTC CTG AGC TTC TTG T-3'	91 bp
GAPDH	NM_002046.3	Forward: 5'-AGA TCA TCA GCA ATG CCT CCT-3' Reverse: 5'-TGA GTC CTT CCA CGA TAC CAA-3'	90 bp



检测试剂盒, KGA511, 江苏凯基生物科技有限公司(中国), 具体步骤按照说明书进行操作。收集细胞并消化至单个细胞分辨率, 记录激发波长488 nm处的红色荧光强度。

### 1.7 ELISA检测细胞上清液褪黑素水平

收集MT1过表达的SKOV3细胞 $10^6$ 个于6孔板中, 转染48 h后更换新鲜无血清培养基继续培养, 于24 h、48 h后收集细胞上清液, 采用连续稀释法得到蛋白标准液, 并绘制标准曲线。并根据ELISA试剂盒说明书(人类褪黑素检测试剂盒来自美国TSZ公司)进行实验, 在450 nm处用微平板阅读器检测吸光度值。

### 1.8 Western blot

Western blot检测p-AKT、AKT、p-mTOR和mTOR蛋白表达水平: 收集MT1过表达的SKOV3细胞 $10^6$ 个于6孔板中, 转染48 h后更换新鲜培养基并于96孔板中培养于24 h和48 h, 同时运用抑制剂PF-04691502(4  $\mu\text{mol/L}$ )处理转染后的细胞, 并分为处理组与未处理组。配置冷裂解液(lysis buffer)(放置于冰上待用), 对数期细胞经 $1\times$  PBS洗涤之后, 加入配制好的冷裂解液(1 mL冷裂解液加入10  $\mu\text{L}$ 磷酸酶抑制剂、1  $\mu\text{L}$ 蛋白酶抑制剂和5  $\mu\text{L}$  100 mmol/L苯甲基磺酰氟, 混匀), 置于冰摇床15 min。通过BCA定量法绘制标准曲线, 测定蛋白浓度。取等量蛋白20  $\mu\text{g}$ 为上样量。电泳条件: SDS聚丙烯酰胺(PAGE)胶浓度为10%, 电压60 V稳流200 mA, 120 min。电转移至NC膜后用TBST洗膜10 min $\times$ 3次。5%脱脂奶粉封闭后一抗(抗体稀释比例p-Akt 1:2 000、Akt 1:10 000、mTOR: 1:2 000) 4  $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡孵育过夜; 二抗室温孵育2 h, 并曝光显影。

### 1.9 统计分析

采用SSPS 22.0软件进行统计分析。实验结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 并利用方差分析和方差齐性检验进行统计比较, 组间均值比较采用Dunnett *t* 检验。采用Kruskal-Wallis H检验对方差不齐的组进行两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MT1-pcDNA3.1过表达质粒成功转染进入SKOV3细胞系

构建的MT1-pcDNA3.1质粒成功转染进入SKOV3细胞。qRT-PCR结果显示, 转染MT1-pcD-

NA3.1的细胞中MT1的mRNA表达明显高于NC组和空白对照组(图2A,  $P<0.05$ )。而NC组与对照组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。此外, 经过Western blot对MT1蛋白表达水平进行检测并定量分析, 我们发现, 与NC组与空白对照组相比, MT1受体过表达可使SKOV3细胞中的MT1蛋白表达水平分别提高3.25倍与2.89倍(图2B), 进一步证实了MT1-pcDNA3.1过表达质粒可成功转染并表达于SKOV3细胞。

### 2.2 MT1过表达促进细胞早期凋亡

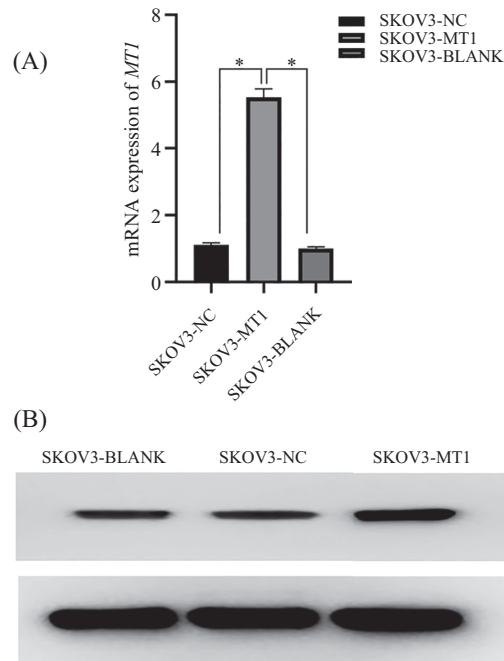
MT1转染进入细胞, 48 h后更换新鲜培养基重新培养24 h、48 h, Annexin V-FITC/PI单染流式细胞术显示, 24 h和48 h后细胞凋亡率是12.4%和19.3%, 显著高于在NC组(分别为7.4%和7.6%)和对照组(分别为3.7%和5.1%)(图3A,  $P<0.01$ )。此外, 流式细胞术分析显示, 转染后48 h MT1组的早期凋亡率为14.1%, 明显高于NC组和对照组(图3A,  $P<0.05$ ), 由此可知, MT1过表达之后增加MT1的早期凋亡比例。Tunel法显示, 转染MT1 24 h和48 h后细胞凋亡指数明显高于NC组和对照组(图3B,  $P<0.05$ )。同时, 荧光倒置显微镜观察到凋亡细胞。

### 2.3 MT1过表达导致SKOV3细胞周期在S期发生阻滞并抑制细胞增殖

EdU显像结果显示, MT1-pcDNA3.1质粒转染SKOV3细胞48 h后, 更换新鲜培养基重新培养。在72 h内由EDU检测细胞增殖率, 与对照组和NC组相比, 细胞增殖率随时间延长而降低(图4A,  $P<0.05$ )。使用流式细胞术检测24 h和48 h后SKOV3细胞的细胞周期。NC组与对照组细胞在细胞周期各阶段的分布无明显差异。与NC组和对照组相比, MT1组在G<sub>1</sub>期细胞百分比较低, 但S期细胞百分比较高(图4B,  $P<0.05$ )。但MT1组与NC组、对照组比较, G<sub>2</sub>期差异无统计学意义( $P>0.05$ )。这说明, SKOV3细胞中MT1过表达可在S期阻滞细胞周期, 进而影响细胞增殖。

### 2.4 MT1过表达抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路

转染48 h后更换新鲜培养基重新培养, 24 h后检测p-Akt、p-mTOR、Akt、mTOR以及GAPDH蛋白表达情况。结果显示, 与对照组和NC组相比, MT1组Akt和mTOR蛋白的磷酸化表达水平明显降低(图5,  $P<0.05$ )。这种降低与PF-04691502抑制剂处理后的结果趋势一致, 加入抑制剂PF-04691502 (4  $\mu\text{mol/L}$ )处理之后, MT1过表达组蛋白磷酸化水平进一步降

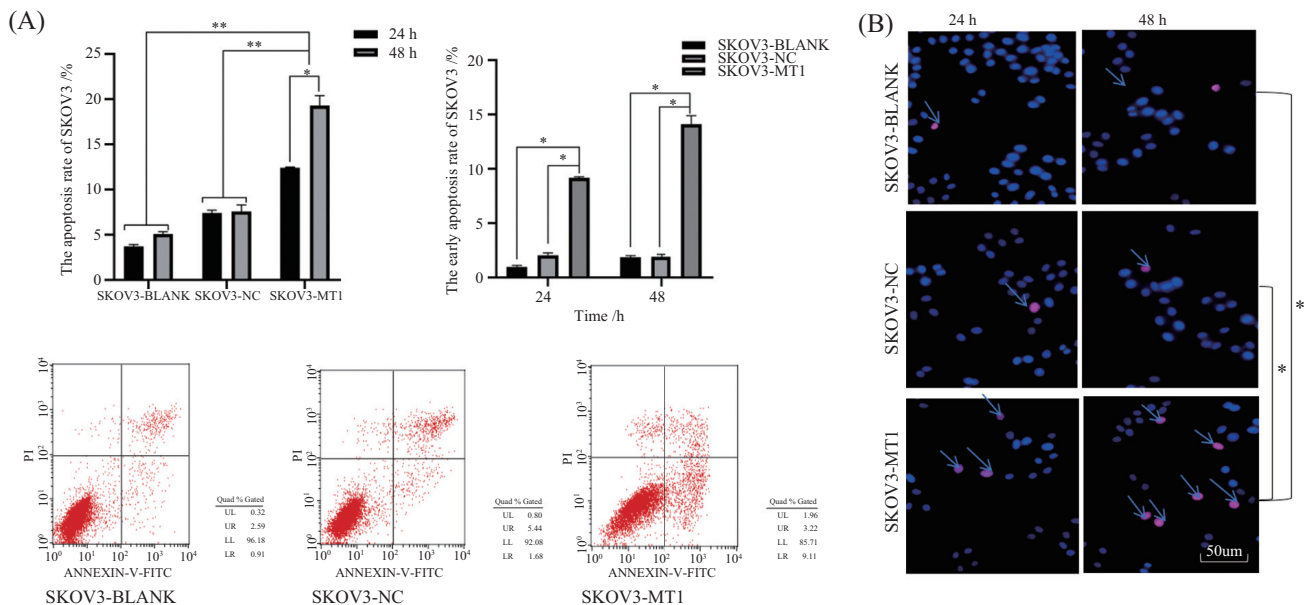


A: qRT-PCR检测各组MT1 mRNA表达水平; B: Western blot检测MT1蛋白表达水平,  $*P < 0.05$ 。

A: MT1 mRNA expression measured by qRT-PCR; B: MT1 protein expression measured by Western blot,  $*P < 0.05$ 。

图2 SKOV3-MT1组中MT1表达显著升高

Fig.2 MT1 significantly overexpressed in SKOV3-MT1 group



A: Annexin V-FITC/PI法检各组SKOV3细胞凋亡水平(24 h与48 h); B: TUNEL染色法检测SKOV3-MT1、SKOV3-BLANK和SKOV3-NC各组(24 h与48 h)凋亡水平, 箭头所指为凋亡细胞;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

A: the apoptosis levels of SKOV3 cells measured by TUNEL staining and Annexin V-FITC/PI staining at 24 and 48 h; B: the apoptosis levels of SKOV3-MT1, SKOV3-BLANK and SKOV3-NC measured by TUNEL staining at 24 and 48 h, arrows represent apoptotic cells;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

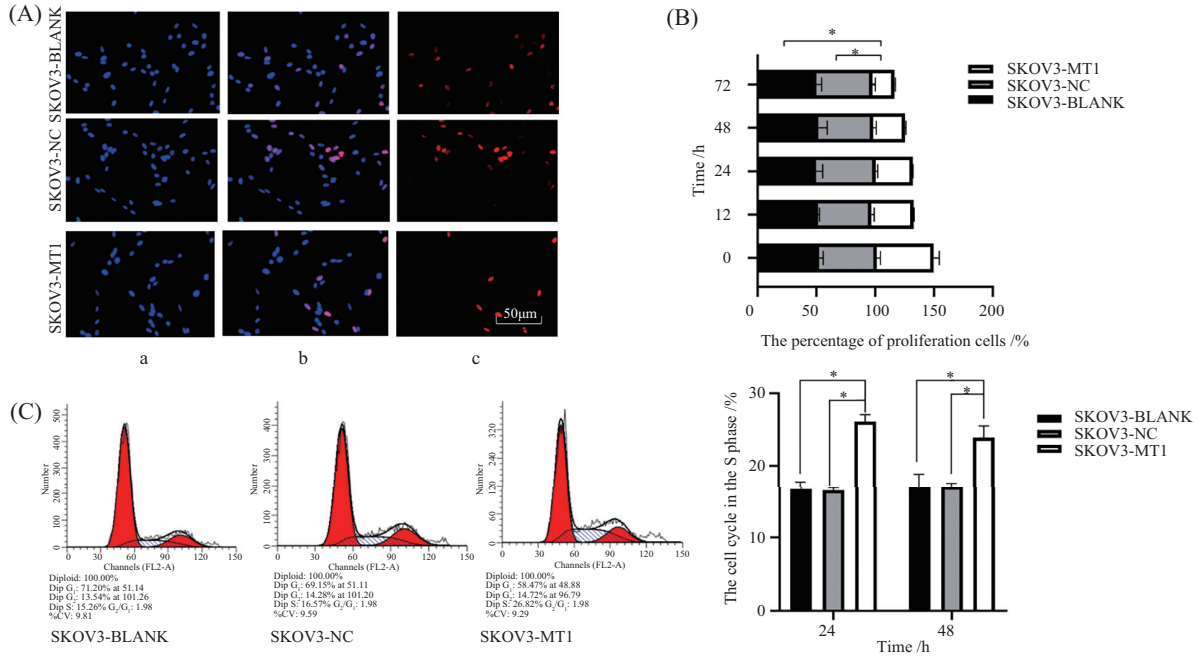
图3 TUNEL染色与Annexin V-FITC/PI单染法检测各组SKOV3细胞凋亡水平

Fig.3 Apoptosis levels of SKOV3 cells measured by TUNEL staining and Annexin V-FITC/PI staining

低, 且显著低于对照组与NC组(图5,  $P < 0.05$ )。这说明, MT1过表达可以导致PI3K/AKT/mTOR信号通路受到抑制(图5)。

## 2.5 SKOV3细胞有分泌褪黑素的能力

转染48 h后更换新鲜无血清培养基重新培养, 24 h、48 h后在SKOV3细胞中检测到褪黑素的表

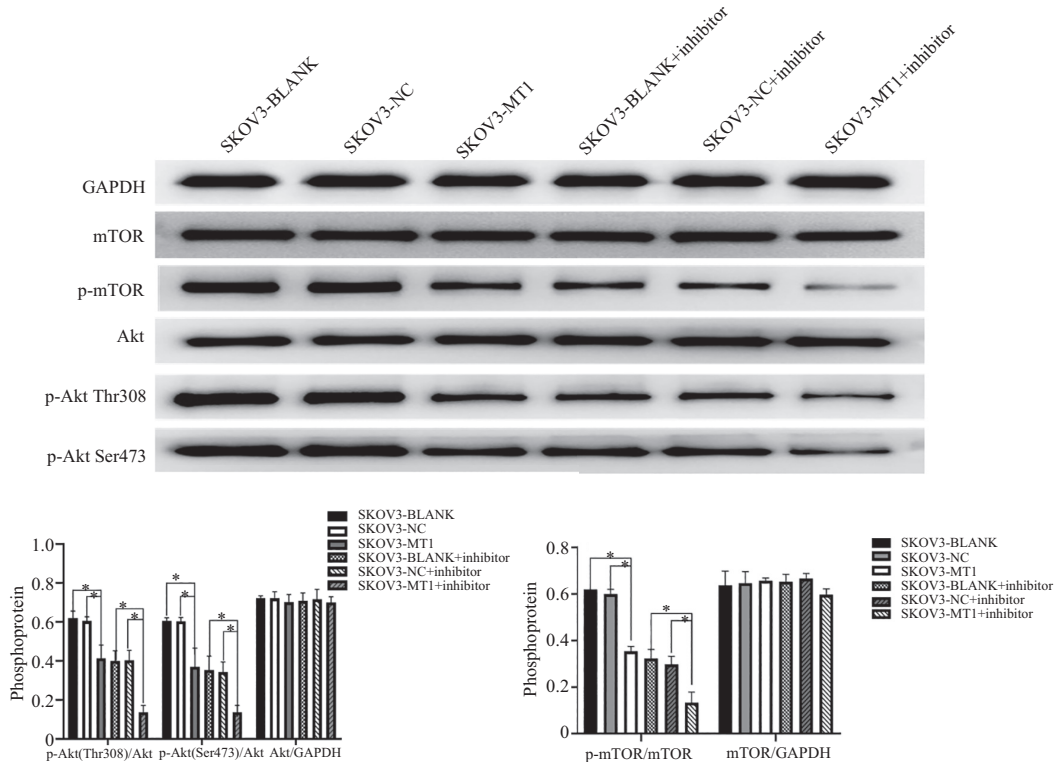


A: EDU染色观察细胞增殖与形态。a: 各组SKOV3细胞用EDU染色荧光细胞结果, b: 单个视野内EDU阳性细胞所占比例, c: 单个视野内EDU阳性细胞数量; B: 流式细胞术测定细胞周期不同点增殖细胞百分比, \* $P < 0.05$ ; C: 流式细胞仪检测细胞周期。\* $P < 0.05$ 。

A: the cell proliferation and morphology measured by EDU staining. a: SKOV3 cells stained with EDU for fluorescent cells in each group, b: the proportion of EDU positive cells in a single field, c: number of EDU positive cells in a single field; B: the percentage of proliferation cells at different points cell cycle measured by Flow cytometry, \* $P < 0.05$ ; C: cell cycle measured by Flow cytometry. \* $P < 0.05$ .

图4 流式细胞术与EDU染色分别检测各组细胞周期与增殖

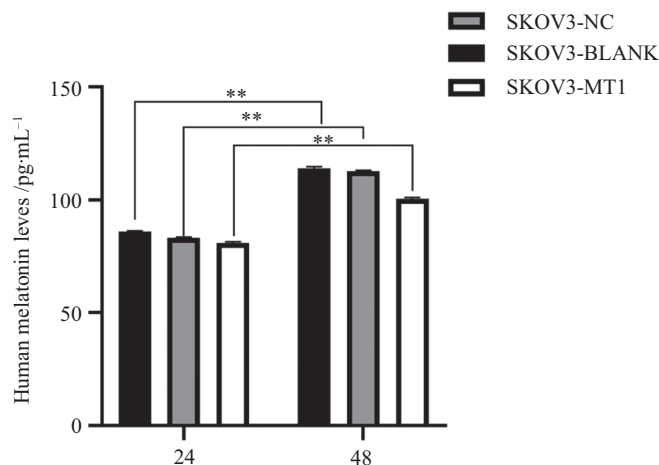
Fig.4 The cell cycle and proliferation measured by Flow cytometry and EDU staining in each group



\* $P < 0.05$ .

图5 Western Blot检测PI3K/AKT/mTOR信号通路磷酸化蛋白激酶与总蛋白表达

Fig.5 The phosphorylation levels of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway-related proteins and total protein measured by Western blot



\*\* $P < 0.01$ .

图6 Elisa试剂盒测定各组SKOV3细胞液上清褪黑素水平

Fig 6 The level of melatonin in the supernatant of SKOV3 cells measured by Elisa

达,并在对照组、NC组和MT1组中随时间增加(图6,  $P < 0.01$ )。但褪黑激素分泌量与MT1表达无关,3组细胞上清液中褪黑激素浓度无统计学差异。

### 3 讨论

褪黑激素是于1958年首次被发现并广泛分布于生物界的胺类激素<sup>[22-24]</sup>。编码褪黑激素生物合成酶的基因已在许多物种中被发现,它们可以催化不同的底物,这些底物进一步定义了褪黑激素不同的生物合成途径<sup>[25-26]</sup>。有证据表明,高等脊椎动物褪黑激素的合成主要由松果体进行,最终通过血液循环到达靶器官<sup>[27]</sup>。然而,上述研究尚存争议。事实上,部分研究人员认为,脊椎动物体内近99%的褪黑激素并不是由松果体合成的,也不会释放到血液中。我们的研究通过对卵巢癌细胞SKOV3体外培养上清液中褪黑激素的测定,进一步支持了这一观点。据我们所知,这是第一次在人类肿瘤细胞中测量褪黑激素的表达,表明SKOV3细胞可以通过自身分泌途径分泌褪黑激素。目前的研究表明,某些物种可以在线粒体基质中合成褪黑激素,通过自身分泌和旁分泌方式发挥生理作用<sup>[28]</sup>。因此,可以合理推论SKOV3分泌褪黑激素的能力可能与线粒体密切相关。但这亟需进一步核查。

大量研究报道了褪黑激素对卵巢肿瘤的抗癌作用。既往研究发现,褪黑激素对不同卵巢肿瘤细胞的生物学作用不一致,有的发挥抑制作用,有的发挥刺激作用<sup>[30-31]</sup>。这可能与卵巢肿瘤<sup>[32]</sup>的高度异质性有关。研究表明,褪黑激素的抗癌作用主要通过

其抗氧化活性和其质膜受体MT1和MT2来实现<sup>[15,33]</sup>,比如,在乳腺癌细胞系中过表达MT1受体,可以增强褪黑激素对人乳腺癌细胞的生长抑制作用,并抑制裸鼠乳腺肿瘤的形成<sup>[40-41]</sup>。

SKOV3细胞系是研究卵巢肿瘤的常用细胞系,来源于卵巢癌和浆液性囊腺癌患者的腹水,它具有MT1受体的表达<sup>[20,34]</sup>。近期研究表明,外源性褪黑激素可协同增强顺铂诱导的SKOV3细胞凋亡<sup>[18]</sup>。也有研究者检测了卵巢癌细胞中MT1的表达,并将其与临床和病理数据联系起来,认为褪黑激素对卵巢癌的作用是有限的,且与质膜受体MT1的表达无关<sup>[34]</sup>。但我们效仿前人研究,利用MT1过表达,通过PI3K/AKT/mTOR信号通路研究内源性褪黑激素对SKOV3细胞的生物学效应<sup>[40]</sup>。我们的研究表明,内源性褪黑激素可以抑制SKOV3细胞的增殖,可以在S期阻滞细胞周期,通过刺激MT1受体的表达,也可以诱导SKOV3细胞的早期凋亡。

PI3K/AKT/mTOR信号通路是卵巢癌一个治疗靶点,在其恶性转化、生长、增殖和转移中起关键作用<sup>[35]</sup>。既往研究表明,磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)是一种脂质激酶,产生磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PI(3,4,5)P3)。PI(3,4,5)P3是Akt向质膜转运的第二信使,Akt是PI3K的下游信号分子,通过其PH域转运至细胞膜并与PI(3,4,5)P3相互作用,在两个残基(Thr308和Ser473)共同磷酸化作用下被完全激活<sup>[36]</sup>。同时,mTOR是p-AKT的直接底物,其在Ser-2448位点的mTOR磷酸化是PI-3激酶通路激活状态以及mTOR激活状态的一个



生物标志物<sup>[37]</sup>。因此, p-AKT(Thr308、Ser473)和p-mTOR(Ser-2448)是激活PI3K/AKT/mTOR信号通路的关键磷酸化位点。我们运用Western blot检测上述磷酸化蛋白的表达水平, 并加入PF-04691502(PI3K/mTOR双向抑制剂, 已经投入I期临床试验)进行相关验证<sup>[38]</sup>。尽管已经有研究表明, 外源性褪黑激素会下调AKT磷酸化和mTOR的表达, 但它们被认为与PI3K表达无关<sup>[39]</sup>。然而我们通过实验证明, SKOV3细胞中MT1受体过表达与PF-04691502产生协同作用, 抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路关键蛋白的磷酸化。

这项研究从理论的角度来看有深远意义, 因为我们首次证明卵巢肿瘤细胞可以通过自身分泌功能分泌褪黑激素。而MT1过表达可与内源性褪黑激素结合, 抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活, 促进肿瘤细胞凋亡, 并抑制其增殖, 从而最终发挥抗癌作用。MT1可能为卵巢癌患者提供一种有效的治疗选择。

### 参考文献 (References)

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] TORRE LA, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018 [J]. *CA*, 2018, 68(4): 284-96.
- [3] XU J, ZHENG T, HONG W, et al. Mechanism for the decision of ovarian surface epithelial stem cells to undergo neo-oogenesis or ovarian tumorigenesis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(1): 214-32.
- [4] LIU Y, METZINGER M N, Lewellen K A, et al. Obesity contributes to ovarian cancer metastatic success through increased lipogenesis, enhanced vascularity, and decreased infiltration of M1 macrophages [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(23): 5046-57.
- [5] ZHANG D, LI N, XI Y, et al. Diabetes mellitus and risk of ovarian cancer. A systematic review and meta-analysis of 15 cohort studies [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 130: 43-52.
- [6] GOODMAN M T, TUNG K H. Alcohol consumption and the risk of borderline and invasive ovarian cancer [J]. *Obstet Gynecol*, 2003, 101(6): 1221-8.
- [7] DOUBENI C A, DOUBENI A R, MYERS A E. Diagnosis and management of ovarian cancer [J]. *Am Fam Physician*, 2016, 93(11): 937-44.
- [8] LICAJ I, JACOBSEN B K, SELEMER R M, et al. Smoking and risk of ovarian cancer by histological subtypes: an analysis among 300 000 Norwegian women [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(2): 270-6.
- [9] ERONDU C O, ALBERG A J, BANDERA E V, et al. The association between body mass index and presenting symptoms in African American women with ovarian cancer [J]. *J Womens Health*, 2016, 25(6): 571-8.
- [10] MATINEZ-CAMPA C, MENENDEZ-MENENDEZ J, ALO-NOSO-GONZALEZ C, et al. What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2003-14.
- [11] NOGURIRA L M, SAMPSON J N, CHU L W, et al. Individual variations in serum melatonin levels through time: implications for epidemiologic studies [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83208.
- [12] DRAGOJEVIE DIKIC S, JOVANOVIĆ AM, DIKIC S, et al. Melatonin: a "Higgs boson" in human reproduction [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31(2): 92-101.
- [13] REITER R J, ROSALES-CORRAL S, TAN D X, et al. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(21): 3863-81.
- [14] LIN Y W, WANG S S, WEN Y C, et al. Genetic variations of melatonin receptor type 1a are associated with the clinicopathologic development of urothelial cell carcinoma [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(11): 1130.
- [15] LI Y, LI S, ZHOU Y, et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 39896.
- [16] PACINI N, BORCIANI F. Oncostatic-cytoprotective effect of melatonin and other bioactive molecules: a common target in mitochondrial respiration [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 17(3): 341.
- [17] PETRANKA J, BALDWIN W, BIERMANN J, et al. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line [J]. *J Pineal Res*, 1999, 26(3): 129-36.
- [18] KIM J H, JEONG S J, KIM B, et al. Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells [J]. *J Pineal Res*, 2012, 52(2): 244-52.
- [19] ONOZAWA Y, FUJITA Y, KUWABARA H, et al. Activation of T cell death-associated gene 8 regulates the cytokine production of T cells and macrophages in vitro [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 683(1/3): 325-31.
- [20] FOGH J, FOGH JM, ORFEO T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1977, 59(1): 221-6.
- [21] KIM H S, KIM T J, YOO Y M. Melatonin combined with endoplasmic reticulum stress induces cell death via the PI3K/Akt/mTOR pathway in B16F10 melanoma cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92627.
- [22] ARNAO M B, HERNANDEZ-RUIZ J. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator [J]? *Trends Plant Sci*, 2019, 24(1): 38-48.
- [23] MENG X, LI Y, LI S, et al. Dietary sources and bioactivities of melatonin [J]. *Nutrients*, 2017, 9(4): 367.
- [24] CLAUSTRAT B, LESTON J. Melatonin: physiological effects in humans [J]. *Neurochirurgie*, 2015, 61(2/3): 77-84.
- [25] BACK K, TAN D X, REITER R J. Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts [J]. *J Pineal Res*, 2016, 61(4): 426-37.
- [26] YE T, YIN X, YU L, et al. Metabolic analysis of the melatonin biosynthesis pathway using chemical labeling coupled with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(1): e12531.
- [27] ZHAO D, YU Y, SHEN Y, et al. Melatonin synthesis and function: evolutionary history in animals and plants [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2019, 10(2019): 249.



- [28] SUOFU Y, LI W, JEAN-ALPHONSE F G, et al. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release [J]. *Proc Nat. Acad Sci*, 2017, 114(38): e7997-8006.
- [29] CHUFFA L G A, REITER R J, Lupi L A. Melatonin as a promising agent to treat ovarian cancer: molecular mechanisms [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(10): 945-52.
- [30] BALDWIN W S, TRAVLOS G S, RISINGER J I, et al. Melatonin does not inhibit estradiol-stimulated proliferation in MCF-7 and BG-1 cells [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19(11): 1895-900.
- [31] BARTSCH H, BUCHBERGER A, FRANZ H, et al. Effect of melatonin and pineal extracts on human ovarian and mammary tumor cells in a chemosensitivity assay [J]. *Life Sci*, 2000, 67(24): 2953-60.
- [32] KROGER JR P T, DRAPKIN R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer [J]. *Curr Opin Obstet Gyn*, 2017, 29(1): 26.
- [33] LIU J, CLOUGH S J, HUTCHINSON A J, et al. MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56: 361-83.
- [34] JABLONSKA K, PULA B, ZEMLA A, et al. Expression of the MT1 melatonin receptor in ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 15(12): 23074-89.
- [35] 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): 173-9.
- [36] OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 667-76.
- [37] CHIANG G G, ABRAHAM R T. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25485-90.
- [38] YUAN J, MEHTA P P, YIN M J, et al. PF-04691502, a potent and selective oral inhibitor of PI3K and mTOR kinases with antitumor activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(11): 2189-99.
- [39] FERREIRA G M, MARTINEZ M, CAMARGO I C C, et al. Melatonin attenuates Her-2, p38 MAPK, p-AKT, and mTOR levels in ovarian carcinoma of ethanol-preferring rats [J]. *J Cancer*, 2014, 5(9): 728.
- [40] YUAN L, COLLINS A R, DAI J, et al. MT1 melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 192(1/2): 147-56.
- [41] COLLINS A, YUAN L, KIEFER T L, et al. Overexpression of the MT1 melatonin receptor in MCF-7 human breast cancer cells inhibits mammary tumor formation in nude mice [J]. *Cancer Lett*, 2003, 189(1): 49-57.