

舒芬太尼调节cAMP/PKA/CREB信号通路 对卵巢癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

甄磊¹ 张懿兰^{1*} 王晓娜¹ 焦颖²

(¹保定市第二医院麻醉科, 保定 071000; ²保定市第二医院妇科, 保定 071000)

摘要 该文旨在探究舒芬太尼(SFTN)调节环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)信号通路对卵巢癌(OC)细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。用浓度为2.5~160 ng/mL的舒芬太尼处理人OC细胞(SKOV-3), CCK-8法检测细胞活性, 筛选最佳药物浓度。将SKOV-3细胞分为对照组(Control组), 舒芬太尼低、中、高浓度组(SFTN-L组、SFTN-M组、SFTN-H组), 舒芬太尼高浓度+PKA激活剂组(SFTN-H+8-溴-cAMP组), 平板克隆法检测细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡; 划痕实验检测细胞迁移; Transwell实验检测细胞侵袭; ELISA法检测环磷酸腺苷(cAMP)水平; Western blot法检测细胞核增殖抗原标记物(Ki67)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、蛋白激酶A(PKA)、磷酸化蛋白激酶A(p-PKA)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)、磷酸化环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(p-CREB)蛋白表达情况; 裸鼠移植瘤实验检测舒芬太尼对OC移植瘤生长的影响。选择舒芬太尼浓度为20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL进行后续实验。与Control组比较, SFTN-L、SFTN-M、SFTN-H组的集落形成数、细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量及Ki67、Cyclin D1、MMP-2、MMP-9、cAMP、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB表达水平降低, 细胞凋亡率及Caspase-3、Bax表达水平显著升高, 且呈浓度依赖性($P<0.05$); 与SFTN-H组相比, SFTN-H+8-溴-cAMP组的集落形成数、划痕愈合率、细胞侵袭数量及Ki67、Cyclin D1、MMP-2、MMP-9、cAMP、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB表达水平升高, 细胞凋亡率及Caspase-3、Bax表达水平显著降低($P<0.05$)。移植瘤实验显示, SFTN组小鼠移植瘤比Control组生长缓慢, 移植瘤质量、体积均减小, cAMP、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB表达水平降低($P<0.05$)。舒芬太尼通过抑制cAMP/PKA/CREB信号通路从而抑制OC细胞增殖和侵袭, 促进细胞凋亡。

关键词 卵巢癌; 舒芬太尼; 环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)信号通路; 增殖; 凋亡; 侵袭

Effects of Sufentanil on Proliferation, Apoptosis, and Invasion of Ovarian Cancer Cells by Regulating the cAMP/PKA/CREB Signaling Pathway

ZHEN Lei¹, ZHANG Yilan^{1*}, WANG Xiaona¹, JIAO Ying²

(¹Department of Anesthesiology, the No.2 Hospital of Baoding, Baoding 071000, China;

²Department of Gynaecology, the No.2 Hospital of Baoding, Baoding 071000, China)

Abstract This aim of this article was to investigate the effects of SFTN (sufentanil) modulating cAMP (cyclic adenosine monophosphate)/PKA (protein kinase B)/CREB (cAMP-response element binding protein) sig-

收稿日期: 2024-01-02 接受日期: 2024-02-17

保定市科技计划(批准号: 2041ZF206)资助的课题

*通信作者。Tel: 15175733629, E-mail: 337061934@qq.com

Received: January 2, 2024

Accepted: February 17, 2024

This work was supported by the Baoding Science and Technology Plan (Grant No.2041ZF206)

*Corresponding author. Tel: +86-15175733629, E-mail: 337061934@qq.com

naling pathway on the proliferation, apoptosis and invasion of OC (ovarian cancer) cells. Human SKOV-3 (OC cells) were treated with sufentanil at concentrations ranging from 2.5 to 160 ng/mL, and cell activity was detected by the CCK-8 assay to screen for optimal drug concentration. SKOV-3 cells were divided into Control group, sufentanil low, medium, and high concentration groups (SFTN-L group, SFTN-M group, SFTN-H group), and sufentanil high concentration+PKA activator group (SFTN-H+8-bromo-cAMP group); and the plate cloning assay was used to detect cell proliferation; the apoptosis was detected by flow cytometry; the migration was detected by the scratch assay; the invasion was detected by the Transwell assay. ELISA method was applied to detect cAMP level. Western blot method was applied to detect Ki67 (nuclear proliferative antigen markers), cyclin D1, Caspase-3, Bax (B-cell lymphoma associated X-protein), MMP-2 (matrix metalloproteinase-2), MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), PKA (protein kinase B), p-PKA (phosphorylated protein kinase B), CREB, p-CREB (phosphorylated-CREB) protein expression. Nude mice transplantation tumor assay to detect the effect of sufentanil on the growth of OC transplantation tumor. The effect of sufentanil on the growth of OC transplanted tumors was detected in nude mice transplantation tumor assay. The concentrations of sufentanil were selected as 20 ng/mL, 40 ng/mL, and 80 ng/mL for subsequent experiments. Compared with the Control group, the number of colony formation, cell scratch healing rate, number of cell invasion and the expression levels of Ki67, Cyclin D1, MMP-2, MMP-9, cAMP, p-PKA/PKA, and p-CREB/CREB were decreased in the SFTN-L, SFTN-M, and SFTN-H groups, and the apoptosis rate and the Caspase-3, Bax expression levels were significantly increased in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$); compared with the SFTN-H group, the number of colony formation, the scratch healing rate, the number of cell invasion and the expression of Ki67, CyclinD1, MMP-2, MMP-9, cAMP, p-PKA/PKA, p-CREB/CREB in the SFTN-H+8-bromo-cAMP group were elevated, and the apoptosis rate and Caspase-3 and Bax expression levels were significantly reduced ($P < 0.05$). The transplantation tumor experiment showed that the transplantation tumors of mice in the SFTN group grew more slowly than those in the Control group, the mass and volume of the transplantation tumors were reduced, and the expression levels of cAMP, p-PKA/PKA, and p-CREB/CREB were decreased ($P < 0.05$). Inhibition of cAMP/PKA/CREB signaling pathway by sufentanil inhibited OC cell proliferation and invasion and promoted apoptosis.

Keywords ovarian cancer; sufentanil; cAMP (cyclic adenosine monophosphate)/PKA (protein kinase B)/CREB (cAMP-response element binding protein) signaling pathway; proliferation; apoptosis; invasion

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是最致命的妇科癌症,约70% OC患者由于缺乏典型症状和可靠的早期检测方法,在晚期才被确诊,并且OC患者的5年总生存率低于35%,近20年无明显改善。亟需提供改善OC患者预后的新疗法^[1-2]。因此,亟需寻找安全有效的药物和治疗方法从而改善OC患者预后。GUAN等^[3]研究发现,舒芬太尼可以通过调节Wnt/ β -catenin信号通路来抑制肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),说明舒芬太尼有抑癌作用。cAMP依赖性通路是健康和OC细胞中最重要的信号级联反应之一,通过其效应蛋白PKA发挥调节基因表达和细胞功能的作用,PKA可促进介导基因转录、细胞迁移、细胞增殖和死亡的cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)的磷酸化,OC

的生长和代谢很大程度上取决于cAMP/PKA/CREB轴信号处理的变化,通常与肿瘤转化、转移、增殖和细胞凋亡抑制有关^[4]。然而舒芬太尼能否通过调控cAMP/PKA/CREB信号通路对OC细胞增殖、凋亡和侵袭产生影响尚不清楚,本文主要研究舒芬太尼通过调节cAMP/PKA/CREB信号通路对OC细胞增殖、凋亡和侵袭的影响,以期为卵巢癌的治疗提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人OC细胞(SKOV-3)购于中国科学院上海细胞库;舒芬太尼[枸橼酸舒芬太尼注射液(国药准字H20054171)]购于宜昌人福药业有限公司。Transwell小室(3422)购于美国Corning Costar公

司。兔抗Cyclin D1(ab16663)、Ki67(ab16667)、Caspase-3(ab32351)、Bax(ab32503)、MMP-2(ab181286)、MMP-9(ab283575)、PKA(ab32514)、CREB(ab32515)抗体采购于Abcam公司。兔抗p-PKA(AF1942)、p-CREB(AG1680)抗体购于上海碧云天生物技术有限公司。cAMP ELISA试剂盒(JL13253-96T)购于上海将来实业股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 OC SKOV-3细胞培养 OC SKOV-3细胞接种至10%牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中,放置于37 °C、5% CO₂的培养箱中进行培养。

1.2.2 细胞处理及分组 将处于对数生长期的SKOV-3细胞,以密度为 2×10^4 个/孔接种至96孔板,分别使用浓度为0、2.5、5、10、20、40、80、160 ng/mL的舒芬太尼处理24 h, CCK-8法检测细胞活性,室温孵育2 h后于450 nm波长处检测吸光度(*D*)值,绘制SKOV-3细胞生长曲线,计算舒芬太尼对SKOV-3细胞的半数抑制浓度IC₅₀,筛选最佳药物浓度。

将SKOV-3细胞接种于6孔板中,并分为Control组,舒芬太尼低、中、高浓度组(SFTN-L组、SFTN-M组、SFTN-H组),舒芬太尼高浓度+PKA激活剂组(SFTN-H+8-溴-cAMP组)^[6],其中舒芬太尼低、中、高浓度分别使用20 ng/mL、40 ng/mL、80.0 ng/mL的舒芬太尼处理SKOV-3细胞24 h, SFTN-H+8-溴-cAMP组使用80 ng/mL的舒芬太尼和100 μmol/L的8-溴-cAMP共处理SKOV-3细胞24 h。

1.2.3 平板克隆检测SKOV-3细胞增殖 将各组处理的SKOV-3细胞接种在6孔板中,每3天更换相应浓度新鲜的培养液,连续培养14天后,弃培养液,每孔加入4%多聚甲醛放置室温固定15 min,接着用0.5%结晶紫室温染色细胞30 min,染色结束后用清水漂洗,孔板倒扣晾干,用ImageJ软件对克隆斑点计数。

1.2.4 细胞凋亡实验 将SKOV-3细胞用消化液消化,4 °C条件下以1 000 r/min转速离心5 min,弃上清,调整细胞浓度约为 5×10^5 个/mL,加入膜联蛋白V-FITC缓冲液重悬细胞,然后加入碘化丙啶(propidium iodide, PI),室温避光孵育30 min,流式细胞仪检测细胞凋亡。重复3次实验,计算凋亡率。

1.2.5 划痕愈合实验检测卵巢癌SKOV-3细胞迁移情况 将浓度约为 5×10^5 个/mL的SKOV-3细胞接种于6孔板内。用200 μL无菌移液器吸头垂直于单层细胞沿直线轻轻划伤并用PBS清洗,每孔加入无血

清培养基进行培养。24 h后显微镜观察并拍照,用Image Pro Plus软件计算划痕愈合率(%)。

1.2.6 细胞侵袭实验 将基质胶涂在Transwell小腔室内,干燥后将SKOV-3细胞用不含血清的培养基进行重悬,调整细胞浓度约为 5×10^5 个/mL,取细胞液接种至Transwell上室,下腔室加入10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)培养基,37 °C培养24 h,用多聚甲醛室温固定,结晶紫染色。显微镜下观察统计各视野下侵袭细胞数。

1.2.7 cAMP水平检测 使用ELISA试剂盒检测各组SKOV-3细胞培养上清液中的cAMP水平;将细胞培养液于室温下以1 000 r/min离心20 min,取上清液,样本中添加终浓度至0.1 mol/L的盐酸,混匀后静置15 min,加Tris溶液中和,再加入酶标板检测cAMP水平。

1.2.8 Western blot检测蛋白表达 收集各组SKOV-3细胞,加入裂解液裂解后提取总蛋白,用BCA试剂盒检测蛋白浓度,取制备的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳、转膜、室温封闭2 h,加入Cyclin D1、Ki67、Bax、Caspase-3、MMP-9、MMP-2、PKA、p-PKA、CREB、p-CREB一抗(1:1 000)4 °C孵育过夜,加入HRP标记的二抗(1:5 000)放置室温孵育2 h,加ECL显色,ImageJ软件分析每个蛋白表达情况。

1.2.9 裸鼠移植瘤实验 4周龄BALB/C裸鼠购买于湖北省实验动物研究中心[许可证号:SCXK(鄂)2020-0018],将裸鼠饲养1周,待SKOV-3细胞生长至对数期制成 1×10^7 个/mL细胞悬液,将10 μL SKOV-3细胞悬液皮下注射于小鼠右前肢腋下,肿瘤体积约为30 mm³时,将裸鼠分为对照组和SFTN组,6只/组。SFTN组每2天尾静脉注射5 μg/kg舒芬太尼^[6];对照组注射与SFTN组等量的生理盐水。每天观察裸鼠的生存状态,每7天测量1次肿瘤体积,35天后,处死裸鼠,测量肿瘤质量并检测通路相关蛋白表达。本研究已通过保定市第二医院动物伦理委员会批准(批号:230714451)。

1.3 统计学方法

用SPSS 25.0进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)进行表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,采用SNK-*q*检验进行组间两两比较。*P*<0.05表示差异显著。

2 结果

2.1 舒芬太尼浓度筛选

经舒芬太尼诱导的SKOV-3细胞存活率显著降

低; SKOV-3细胞经舒芬太尼(2.5~160 ng/mL)处理后,当浓度在20 ng/mL以上时, SKOV-3细胞增殖活性显著降低, 计算 IC_{50} 为76.78 ng/mL, 因此选择舒芬太尼浓度为20、40、80 ng/mL进行后续实验, 见图1、表1。

2.2 舒芬太尼对SKOV-3细胞增殖及增殖相关蛋白的影响

与Control组比较, SFTN-L、SFTN-M、SFTN-H组集落形成数, Ki67、Cyclin D1表达水平降低($P<0.05$); 与SFTN-H组相比, SFTN-H+8-溴-cAMP组集落形成数, Ki67、Cyclin D1表达水平升高($P<0.05$), 见图2、图3、表2。

2.3 舒芬太尼对SKOV-3细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响

与Control组比较, SFTN-L、SFTN-M、SFTN-H组细胞凋亡率, Caspase-3、Bax表达水平升高($P<0.05$); 与SFTN-H组相比, SFTN-H+8-溴-cAMP组细胞凋亡率, Caspase-3、Bax表达水平降低($P<0.05$),

见图4、图5、表3。

2.4 舒芬太尼对SKOV-3细胞迁移与侵袭的影响

与Control组比较, SFTN-L、SFTN-M、SFTN-H组 SKOV-3细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量、MMP-2和MMP-9表达水平降低($P<0.05$); 与SFTN-H组比较, SFTN-H+8-溴-cAMP组 SKOV-3细胞划痕愈合率、侵袭数量、MMP-2和MMP-9表达水平升高($P<0.05$), 见图6、图7、图8、表4。

2.5 舒芬太尼对cAMP/PKA/CREB信号通路蛋白表达的影响

与Control组比较, SFTN-L、SFTN-M、SFTN-H组 cAMP、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB表达水平逐渐降低($P<0.05$); 与SFTN-H组比较, SFTN-H+8-溴-cAMP组 cAMP、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB表达水平升高($P<0.05$), 见图9、表5。

2.6 舒芬太尼对裸鼠移植瘤的影响

与Control组比较, SFTN组小鼠移植瘤生长缓

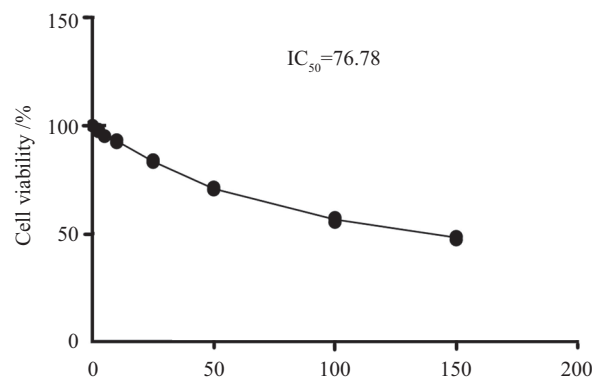


图1 不同浓度的舒芬太尼对SKOV-3细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of sufentanil on the proliferation of SKOV-3 cells

表1 舒芬太尼对SKOV-3细胞存活率的影响

Table 1 Effect of sufentanil on the survival rate of SKOV-3 cells

组别 Group	细胞存活率/% Cell viability /%
Control	100.00±0.00
SFTN 2.5 ng/mL	97.92±9.86
SFTN 5 ng/mL	95.13±9.62
SFTN 10 ng/mL	93.32±9.55
SFTN 20 ng/mL	83.76±8.37 ^a
SFTN 40 ng/mL	70.88±7.24 ^a
SFTN 80 ng/mL	56.65±5.81 ^a
SFTN 160 ng/mL	48.36±4.95 ^a

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with the Control group.

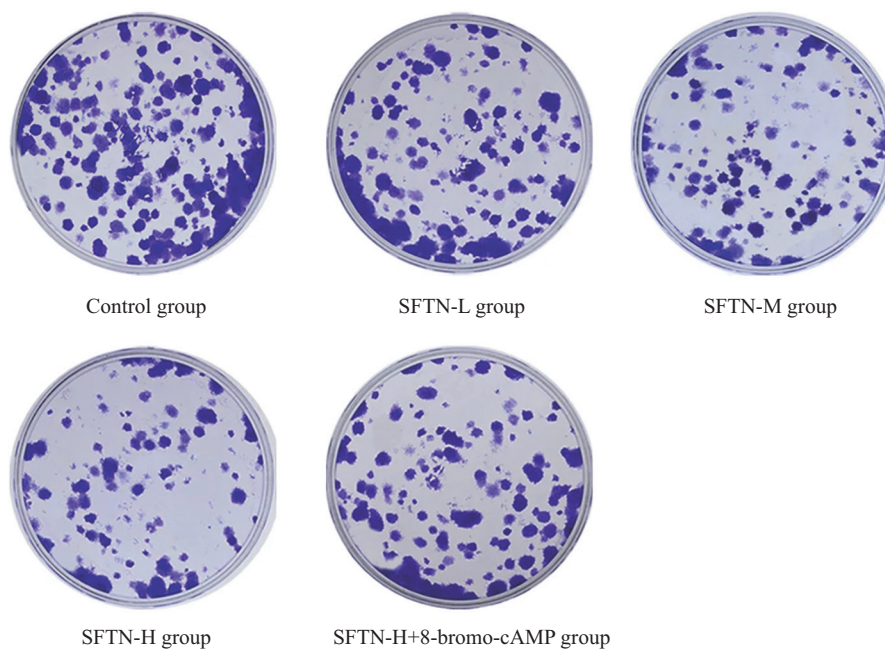
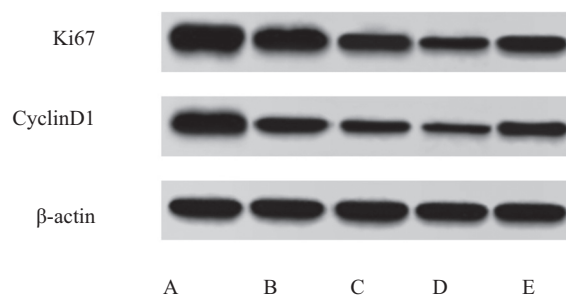


图2 不同浓度舒芬太尼对SKOV-3细胞增殖的影响

Fig.2 The effect of different concentrations of sufentanil on the proliferation of SKOV-3 cells



A: Control组; B: SFTN-L组; C: SFTN-M组; D: SFTN-H组; E: SFTN-H+8-溴-cAMP组。

A: Control group; B: SFTN-L group; C: SFTN-M group; D: SFTN-H group; E: SFTN-H+8-bromo-cAMP group.

图3 增殖相关蛋白表达情况

Fig.3 Expression of proliferation-related proteins

表2 舒芬太尼对SKOV-3细胞增殖及增殖相关蛋白的影响

Table 2 Effects of sufentanil on SKOV-3 cells proliferation and proliferation-related proteins

组别 Group	集落形成数 Number of colony formation	Ki67	Cyclin D1
Control	152.73±14.28	1.42±0.26	1.25±0.23
SFTN-L	116.55±9.76 ^a	1.14±0.20 ^a	0.86±0.08 ^a
SFTN-M	88.62±7.18 ^{ab}	0.83±0.16 ^{ab}	0.61±0.06 ^{ab}
SFTN-H	62.24±4.37 ^{abc}	0.52±0.08 ^{abc}	0.38±0.04 ^{abc}
SFTN-H+8-bromo-cAMP group	109.56±8.05 ^d	0.92±0.09 ^d	0.72±0.07 ^d
<i>F</i>	78.078	23.151	45.229
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与SFTN-L组比较; ^c $P<0.05$, 与SFTN-M组比较; ^d $P<0.05$, 与SFTN-H组比较。 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with Control group; ^b $P<0.05$ compared with SFTN-L group; ^c $P<0.05$ compared with SFTN-M group; ^d $P<0.05$ compared with SFTN-H group.

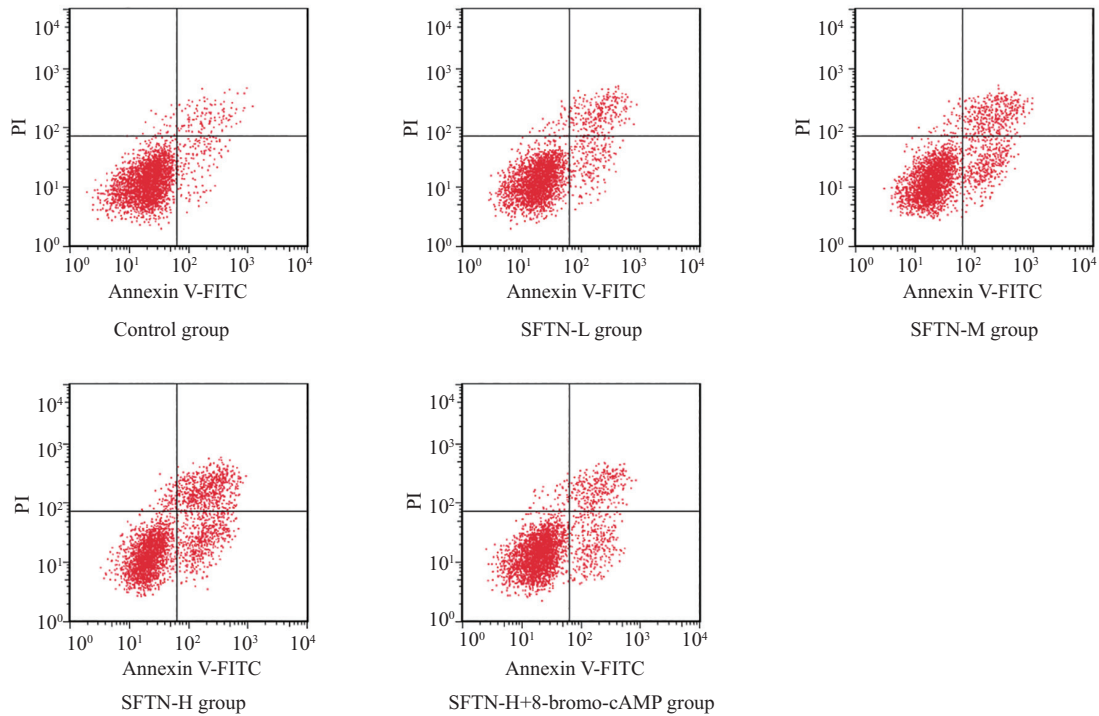
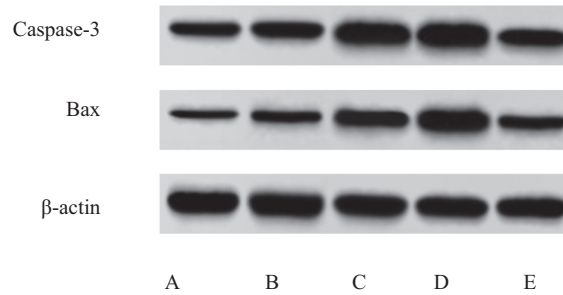


图4 各组SKOV-3细胞凋亡情况
Fig.4 Apoptosis of SKOV-3 cells in each group



A: Control组; B: SFTN-L组; C: SFTN-M组; D: SFTN-H组; E: SFTN-H+8-溴-cAMP组。
A: Control group; B: SFTN-L group; C: SFTN-M group; D: SFTN-H group; E: SFTN-H+8-bromo-cAMP group.

图5 凋亡相关蛋白表达情况
Fig.5 Expression of apoptosis-related proteins

表3 舒芬太尼对SKOV-3细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响

Table 3 Effects of sufentanil on SKOV-3 cells apoptosis and apoptosis-related proteins

组别 Group	凋亡率/% Apoptosis rate /%	Caspase-3	Bax
Control	2.16±0.23	0.56±0.06	0.37±0.04
SFTN-L	17.37±1.81 ^a	0.81±0.12 ^a	0.56±0.05 ^a
SFTN-M	26.52±2.74 ^{ab}	1.05±0.16 ^{ab}	0.78±0.08 ^{ab}
SFTN-H	38.15±4.03 ^{abc}	1.34±0.21 ^{abc}	1.15±0.21 ^{abc}
SFTN-H+8-bromo-cAMP group	20.21±2.11 ^d	0.87±0.09 ^d	0.64±0.07 ^d
F	164.909	26.408	42.983
P	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x} \pm s$; n=6; ^aP<0.05, 与Control组比较; ^bP<0.05, 与SFTN-L组比较; ^cP<0.05, 与SFTN-M组比较; ^dP<0.05, 与SFTN-H组比较。

$\bar{x} \pm s$; n=6; ^aP<0.05 compared with Control group; ^bP<0.05 compared with SFTN-L group; ^cP<0.05 compared with SFTN-M group; ^dP<0.05 compared with SFTN-H group.

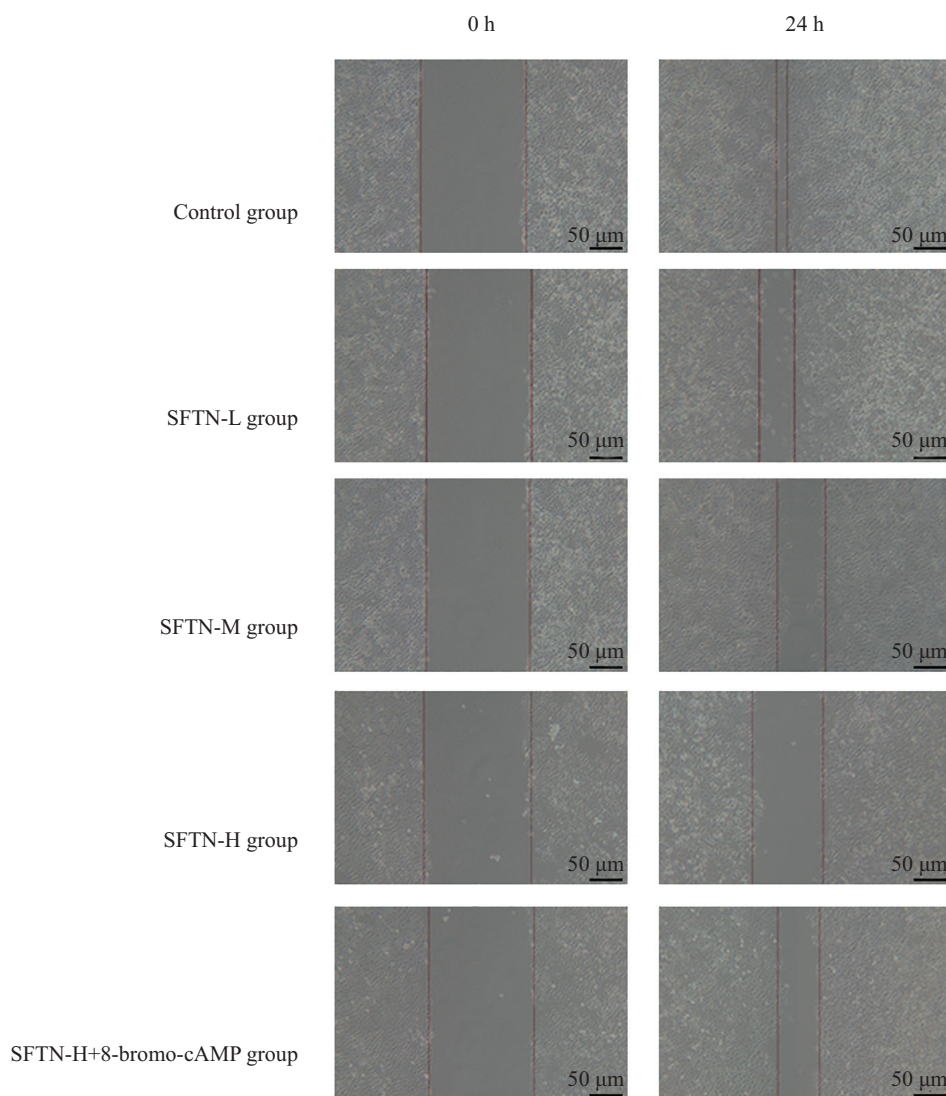


图6 各组SKOV-3细胞迁移情况
Fig 6 Migration of SKOV-3 cells in each group

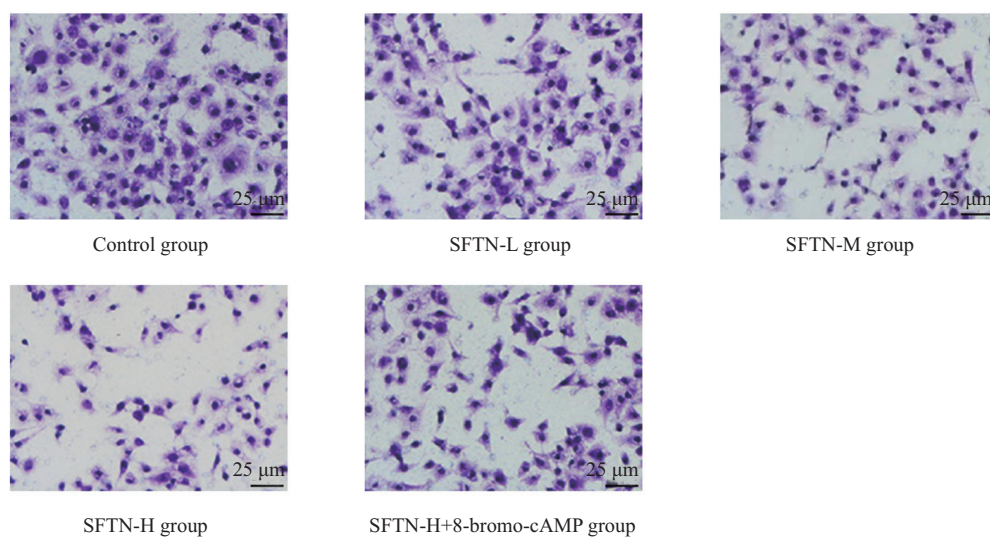
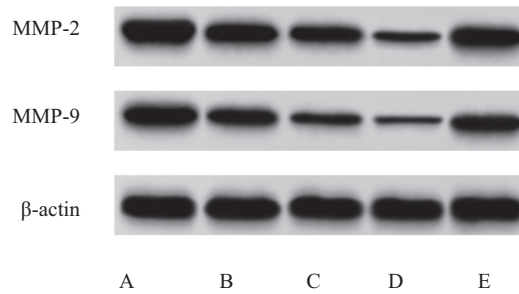


图7 各组SKOV-3细胞侵袭情况
Fig.7 Invasion of SKOV-3 cells in each group



A: Control组; B: SFTN-L组; C: SFTN-M组; D: SFTN-H组; E: SFTN-H+8-溴-cAMP组。

A: Control group; B: SFTN-L group; C: SFTN-M group; D: SFTN-H group; E: SFTN-H+8-bromo-cAMP group.

图8 MMP-2、MMP-9蛋白表达情况

Fig.8 MMP-2, MMP-9 protein expression

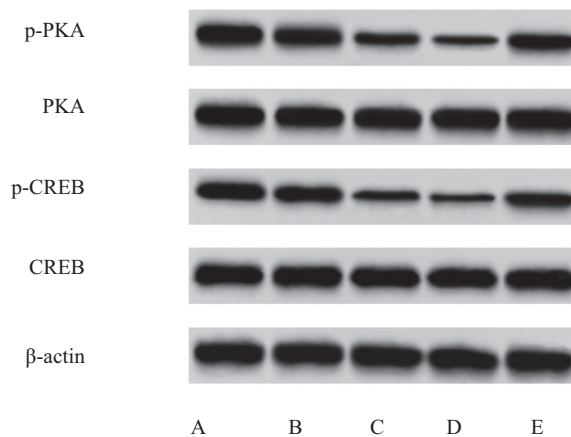
表4 舒芬太尼对SKOV-3细胞迁移与侵袭的影响

Table 4 Effects of sufentanil on migration and invasion of SKOV-3 cells

组别 Group	划痕愈合率/% Scratch healing rate /%	细胞侵袭数量 Number of cell invasion	MMP-2	MMP-9
Control	90.02±9.13	154.22±16.08	1.26±0.25	0.90±0.09
SFTN-L	71.42±7.29 ^a	137.94±14.36 ^a	0.92±0.15 ^a	0.68±0.06 ^a
SFTN-M	55.56±5.67 ^{ab}	115.62±11.79 ^{ab}	0.64±0.07 ^{ab}	0.44±0.05 ^{ab}
SFTN-H	33.36±3.44 ^{abc}	72.83±7.49 ^{abc}	0.36±0.04 ^{abc}	0.21±0.03 ^{abc}
SFTN-H+8-bromo-cAMP group	60.18±6.25 ^d	120.17±13.15 ^d	0.74±0.07 ^d	0.60±0.07 ^d
<i>F</i>	59.401	32.472	34.817	100.620
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与SFTN-L组比较; ^c $P<0.05$, 与SFTN-M组比较; ^d $P<0.05$, 与SFTN-H组比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with Control group; ^b $P<0.05$ compared with SFTN-L group; ^c $P<0.05$ compared with SFTN-M group; ^d $P<0.05$ compared with SFTN-H group.



A: Control组; B: SFTN-L组; C: SFTN-M组; D: SFTN-H组; E: SFTN-H+8-溴-cAMP组。

A: Control group; B: SFTN-L group; C: SFTN-M group; D: SFTN-H group; E: SFTN-H+8-bromo-cAMP group.

图9 p-PKA、PKA、p-CREB、CREB蛋白表达情况

Fig.9 Protein expression of p-PKA, PKA, p-CREB and CREB

慢, 移植瘤质量和体积显著减小, cAMP表达水平、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达降低($P<0.05$); 见图10、图11、表6。

3 讨论

OC是最致命的妇科恶性肿瘤。几十年来, 化疗和放疗一直是治疗OC的主要方法。尽管大多数患者

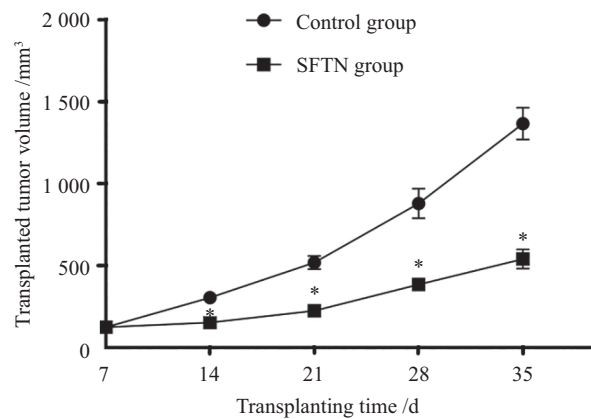
表5 舒芬太尼对cAMP/PKA/CREB信号通路蛋白表达的影响

Table 5 Effects of sufentanil on protein expression of cAMP/PKA/CREB signaling pathway

组别 Group	cAMP /ng·mL ⁻¹	p-PKA/PKA	p-CREB/CREB
Control	8.89±0.91	0.93±0.06	0.86±0.09
SFTN-L	7.21±0.71 ^a	0.73±0.07 ^a	0.65±0.07 ^a
SFTN-M	6.04±0.65 ^{ab}	0.55±0.06 ^{ab}	0.42±0.05 ^{ab}
SFTN-H	4.72±0.53 ^{abc}	0.36±0.04 ^{abc}	0.21±0.03 ^{abc}
SFTN-H+8-bromo-cAMP group	6.63±0.69 ^d	0.68±0.06 ^d	0.55±0.05 ^d
<i>F</i>	28.120	77.948	94.397
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与SFTN-L组比较; ^c $P<0.05$, 与SFTN-M组比较; ^d $P<0.05$, 与SFTN-H组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with Control group; ^b $P<0.05$ compared with SFTN-L group; ^c $P<0.05$ compared with SFTN-M group; ^d $P<0.05$ compared with SFTN-H group.

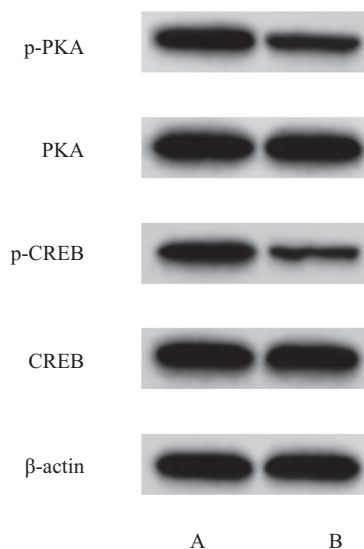


* $P<0.05$, 与Control组比较。

* $P<0.05$ compared with the Control group.

图10 舒芬太尼对移植瘤体积的影响

Fig.10 Effect of sufentanil on the volume of transplanted tumor



A: Control组; B: SFTN组。

A: Control group; B: SFTN group.

图11 各组移植瘤p-PKA、PKA、p-CREB、CREB蛋白表达情况

Fig.11 The expression of p-PKA, PKA, p-CREB and CREB protein in transplanted tumors of each group

表6 舒芬太尼对裸鼠移植瘤生长的影响

Table 6 Effect of sufentanil on the growth of transplanted tumor in nude mice

组别 Group	瘤质量/g Tumor mass /g	瘤体积/mm ³ Tumor volume /mm ³	cAMP /ng·mL ⁻¹	p-PKA/PKA	p-CREB/CREB
Control	0.83±0.08	852.09±86.75	8.92±0.93	0.81±0.08	0.73±0.07
SFTN	0.32±0.03	453.67±49.94	5.42±0.58	0.34±0.03	0.25±0.02
<i>t</i>	14.621	9.750	7.822	13.474	16.150
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=6$.

最初对铂类化疗有反应,但患者经常在初始治疗后数年内产生对化疗药物的耐药性并且出现复发^[7-8]。寻找新的治疗OC的药物有重要意义。

舒芬太尼是芬太尼的合成类似物,是一种高度亲脂性阿片类药物,起效快,半衰期短,效力是芬太尼的10倍,血流动力学稳定,有较高的治疗指数,且价格低。舒芬太尼有快速分布和高清除率的临床优势,可防止长期给药时蓄积^[9]。TANG等^[10]研究表明,舒芬太尼通过作用于NF- κ B和Snail信号通路可抑制食管癌细胞的增殖和转移,从而抑制食管癌的EMT。据报道,舒芬太尼可通过抑制p38/ERK/JNK/NF- κ B-p65/COX2通路,下调HIF-1 α 、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等炎症因子水平,从而减少对肝细胞的损伤^[11]。还有研究指出,舒芬太尼在体内通过NF- κ B通路减缓乳腺癌(breast cancer, BC)肿瘤生长速度和细胞炎症反应,促进细胞凋亡,舒芬太尼可用于BC治疗^[12]。本研究用2.5~160 ng/mL的舒芬太尼处理SKOV-3细胞,发现SKOV-3细胞存活率降低,说明舒芬太尼可抑制SKOV-3细胞增殖。本研究选用不同浓度的舒芬太尼处理SKOV-3细胞,结果发现Ki67、Cyclin D1、MMP-2、MMP-9蛋白表达水平降低,同时SKOV-3细胞集落形成数、细胞愈合率及细胞侵袭数量降低;舒芬太尼还能提高SKOV-3细胞凋亡率,上调Caspase-3、Bax蛋白表达水平,提示舒芬太尼可抑制OC细胞增殖、迁移与侵袭,促进细胞凋亡,说明舒芬太尼在OC中发挥抗肿瘤作用。但舒芬太尼在OC中抗肿瘤机制尚不明确。

经典的cAMP细胞信号通路可参与调控多种细胞分化、增殖、凋亡过程^[13]。cAMP在细胞中广泛表达,可直接调节细胞的各种生物学行为或过程,包括细胞代谢、基因表达、细胞生长、分化和凋亡。PKA是cAMP的主要靶点,当cAMP的水平增加时,cAMP结合PKA底物将其磷酸化。CREB是PKA的底物,CREB磷酸化介导并启动基因转录,调节细胞增殖和凋亡^[14]。研究发现,薯蓣皂苷元(dios-

genin, DSG)以剂量和时间依赖性方式抑制结直肠癌(colorectal cancer, CRC)细胞的增殖,通过抑制CRC细胞中cAMP/PKA/CREB通路诱导细胞凋亡,抑制MMP-9迁移和侵袭^[15]。WANG等^[16]研究报道,姜黄素通过阻断cAMP/PKA/CREB信号通路抑制小鼠恶性肿瘤质相关的脂肪消耗。ZHANG等^[17]研究表明靶向cAMP/PKA/CREB/ATF1轴可提高阿司匹林对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)治疗效果。本研究显示,舒芬太尼可下调cAMP、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达,猜测舒芬太尼通过抑制cAMP/PKA/CREB信号通路抑制OC细胞增殖、迁移与侵袭,促进癌细胞凋亡。为了进行验证,本研究在舒芬太尼处理OC细胞的基础上进行8-溴-cAMP处理,分析发现,8-溴-cAMP可逆转舒芬太尼对OC细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用,说明舒芬太尼可以通过抑制cAMP/PKA/CREB信号通路抑制OC细胞的增殖、迁移与侵袭。裸鼠移植瘤实验显示,SFTN组OC移植瘤生长缓慢且体积减小,并且cAMP、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达水平显著降低。进一步证实了舒芬太尼可以通过抑制cAMP/PKA/CREB信号通路从而抑制OC肿瘤的生长。

综上,舒芬太尼通过抑制cAMP/PKA/CREB信号通路从而抑制OC细胞增殖、凋亡和侵袭,但舒芬太尼在OC中的作用仍需结合相关动物实验进行深入研究。

参考文献 (References)

- [1] SUN T, BI F, LIU Z, et al. TMEM119 facilitates ovarian cancer cell proliferation, invasion, and migration via the PDGFRB/PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 111.
- [2] LI Z, TAN Y, LI X, et al. DHRS2 inhibits cell growth and metastasis in ovarian cancer by downregulation of CHK α to disrupt choline metabolism [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(10): 845.
- [3] GUAN M, HUANG Y, LIN X. Sufentanil inhibits the proliferation and epithelial mesenchymal transition of lung cancer cells

- through Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10857-65.
- [4] KILANOWSKA A, ZIOLKOWSKA A, STASIAK P, et al. cAMP-dependent signaling and ovarian cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3835.
- [5] HU S, WANG L, ZHANG X, et al. Autophagy induces transforming growth factor- β -dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocarcinoma cells through cAMP response element binding signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(11): 5518-32.
- [6] 杨雅婷, 顾希垚, 苏殿三, 等. 不同阿片类药物对荷瘤小鼠细胞免疫的影响 [J]. *上海医学* (YANG Y T, GU X Y, SU D S, et al. Effects of different opioids on cellular immune function in mice suffering from colon cancer [J]. *Shanghai Medical Journal*, 2019, 42(3): 178-84.
- [7] LHEUREUX S, BRAUNSTEIN M, OZA A M. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(4): 280-304.
- [8] YANG C, XIA B R, ZHANG Z C, et al. Immunotherapy for ovarian cancer: adjuvant, combination, and neoadjuvant [J]. *Front Immunol*, 2020, 11(1): 577869.
- [9] DIAS S, TROVISO S, NEVES I, et al. Efficacy and safety of sufentanil infusion for postoperative analgesia in cancer surgery: a retrospective cohort study [J]. *Cureus*, 2023, 15(5): e38993.
- [10] TANG H, LI C, WANG Y, et al. Sufentanil inhibits the proliferation and metastasis of esophageal cancer by inhibiting the NF- κ B and snail signaling pathways [J]. *J Oncol*, 2021, 2021(1): 7586100.
- [11] LIAN Y H, FANG J, ZHOU H D, et al. Sufentanil preconditioning protects against hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing inflammation [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 2265-73.
- [12] LI M, GU K, KONG Q, et al. Sufentanil inhibits the metastasis and immune response of breast cancer via mediating the NF- κ B pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2023, 6(1): 1-9.
- [13] 侯甜, 秦雅芝, 张妍, 等. 特立帕肽通过cAMP/PKA/CREB信号通路调控高糖微环境下的成骨细胞分化 [J]. *南方医科大学学报* (HOU T, QIN Y Z, ZHANG Y, et al. Teriparatide regulates osteoblast differentiation in high-glucose microenvironment through the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2023, 43(1): 39-45.
- [14] WU J, GAN Y, LUO H, et al. β -patchoulene ameliorates water transport and the mucus barrier in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis RSFTN via the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12(1): 689491.
- [15] LI S Y, SHANG J, MAO X M, et al. Diosgenin exerts anti-tumor effects through inactivation of cAMP/PKA/CREB signaling pathway in colorectal cancer [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 908(1): 174370.
- [16] WANG R, WEI L, WAZIR J, et al. Curcumin treatment suppresses cachexia-associated adipose wasting in mice by blocking the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109(1): 154563.
- [17] ZHANG H, YANG S, WANG J, et al. Blockade of AMPK-mediated cAMP-PKA-CREB/ATF1 signaling synergizes with aspirin to inhibit hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers*, 2021, 13(7): 1738.