

# 异甘草素通过拮抗Rac1信号通路 抑制卵巢癌细胞转移

朱辉丽<sup>1</sup> 张梦蝶<sup>2</sup> 郁成舒<sup>1</sup> 林美燃<sup>1</sup> 房冬冬<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203; <sup>2</sup>上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

**摘要** 该文探讨了异甘草素(isoliquiritigenin, ISL)抑制卵巢癌细胞转移的分子机制。采用GLISA实验检测了非毒性浓度下的异甘草素对卵巢癌间质样细胞SKOV3、OVCAR5的Rac1活性的影响及其对Rac1蛋白表达的影响; 构建了Rac1持续激活的OVCAR3的卵巢癌细胞: OVCAR3/Rac1G12V; 采用MTT实验检测了异甘草素对OVCAR3/Rac1G12V细胞生长的影响; 显微镜观察了异甘草素处理后OVCAR3/Rac1G12V的形态变化; 利用划痕和Transwell实验检测了异甘草素对OVCAR3/Rac1G12V细胞迁移和侵袭的影响; Western blot实验检测了上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志蛋白的表达情况; qRT-PCR实验检测了*Vimentin*、*E-cadherin*及*ZEB1*的mRNA水平。结果显示非毒性浓度的10 μmol/L异甘草素能抑制卵巢癌细胞中Rac1活性且并不影响Rac1总蛋白表达; 异甘草素逆转Rac1诱导的OVCAR3细胞形态变化, 抑制Rac1诱导的OVCAR3细胞迁移和侵袭; 异甘草素可逆转Rac1诱导的OVCAR3细胞中EMT相关标志蛋白及mRNA水平的异常表达; 10 μmol/L异甘草素可逆转Rac1诱导的OVCAR3细胞中p-Src和p-Erk1/2表达上调。总之, 异甘草素可以通过拮抗Rac1-MEK/Src信号通路来逆转Rac1诱导的上皮-间质转化过程, 从而抑制卵巢癌细胞的转移。

**关键词** 异甘草素; 卵巢癌; 转移; EMT; Rac1

## Isoliquiritigenin Inhibits Ovarian Cancer Cell Metastasis by Antagonizing the Rac1 Signaling Pathway

ZHU Huili<sup>1</sup>, ZHANG Mengdie<sup>2</sup>, YU Chengshu<sup>1</sup>, LIN Meiran<sup>1</sup>, FANG Dongdong<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; <sup>2</sup>School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract** This study investigates the molecular mechanism by which ISL (isoliquiritigenin) inhibits ovarian cancer cell metastasis. GLISA assays were employed to assess the effects of ISL at non-toxic concentration on Rac1 activity in ovarian cancer stromal-like cells SKOV3 and OVCAR5. Establishing an OVCAR3 ovarian cancer cell line with constitutively active Rac1: OVCAR3/Rac1G12V. MTT assays evaluated ISL's impact on OVCAR3/Rac1G12V cell viability; morphological changes in ISL-treated OVCAR3/Rac1G12V cells; Scratch wound healing assays and Transwell assays assessed ISL's effects on cell migration and invasion in OVCAR3/Rac1G12V cells; Western blot experiments measured expression of key EMT (epithelial-mesenchymal transition)-related marker proteins; qRT-PCR was used to measure mRNA levels of *Vimentin*, *E-cadherin* and *ZEB1*. Results showed that non-toxic concen-

收稿日期: 2025-09-24 接受日期: 2026-03-05

国家自然科学基金(批准号: 82274157、81703543)资助的课题

\*通信作者。Tel: 021-51323081, E-mail: wldxk\_zj@163.com

Received: September 24, 2025

Accepted: March 5, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82274157, 81703543)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-51323081, E-mail: wldxk\_zj@163.com

tration of 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL inhibits Rac1 activity in ovarian cancer cells without affecting total Rac1 protein expression; ISL reversed Rac1-induced morphological changes in OVCAR3 cells, as well as Rac1-induced migration and invasion capabilities. And reversed Rac1-induced expression of EMT marker proteins and their mRNA levels in OVCAR3 cells. Additionally, 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL reversed Rac1-induced expression of p-Src and p-Erk1/2 in OVCAR3 cells. In summary, ISL inhibits ovarian cancer cell metastasis through reversing Rac1-induced epithelial-mesenchymal transition via the Rac1-MEK/Src signaling pathway.

**Keywords** isoliquiritigenin; ovarian cancer; metastasis; EMT; Rac1

卵巢癌(ovarian cancer)是世界上最常见的高死亡率妇科恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。每年有超过30万名女性被诊断出患有卵巢癌,导致约152 000人死于卵巢癌<sup>[2]</sup>。近年来,我国卵巢癌的死亡率呈现迅速上升的趋势<sup>[3]</sup>,严重危及女性生命健康。卵巢癌被认为是最具侵袭性的女性生殖道疾病<sup>[4]</sup>,尤其是上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)肿瘤亚型的卵巢癌具有转移的高倾向性和特殊的转移模式,是卵巢癌死亡的重要原因<sup>[5]</sup>,五年的生存率不足50%。因此,抑制卵巢癌转移和侵袭对治疗卵巢癌以及改善卵巢癌患者的生存与预后具有重要意义。

Ras相关C3肉毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)是一种信号转导分子,其在调控增殖、分化与凋亡、细胞黏附和运动还有转录因子上充当着“分子开关”的角色,是细胞内不可或缺的信号转导分子<sup>[6]</sup>。有研究报道发现,Rac1促进多种肿瘤相关的生物学过程<sup>[7-8]</sup>,如卵巢癌细胞的转移和侵袭<sup>[9]</sup>。有临床研究表明,Rac1过表达可能作为评价卵巢癌肿瘤恶性程度与预测肿瘤侵袭转移的标志<sup>[10-11]</sup>。在我们课题组前期的工作中发现Rac1持续激活能诱导上皮样卵巢癌发生EMT过程并促进其转移<sup>[12]</sup>。因此,抑制Rac1活性可能是抑制卵巢癌转移的潜在作用机制之一。

异甘草素(isoliquiritigenin, ISL)是一种天然黄酮类化合物,具有丰富的药理学活性,如抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗纤维化等<sup>[13]</sup>。课题组前期研究结果已证明,异甘草素能够抑制卵巢癌EMT过程从而抑制卵巢癌的转移<sup>[14]</sup>,但是异甘草素的具体作用分子机制未深入探讨。基于前期的工作基础,因此我们提出假说:ISL可能通过抑制Rac1活性来逆转卵巢癌细胞的EMT过程从而抑制卵巢癌的转移。在本研究中,我们采用高转移的卵巢癌细胞并构建了Rac1持续激活的卵巢癌细胞株OVCAR3,进一步探讨了异甘草素逆转卵巢癌细胞EMT过程及转移的分子机

制,旨在为卵巢癌治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 高转移卵巢癌细胞系SKOV3、OVCAR5来源于美国佛罗里达大学黄爽教授实验室,卵巢癌细胞株(人)OVCAR3购自上海胜富生物有限公司。

1.1.2 药物与主要试剂 ISL购自上海同田生化技术有限公司;胎牛血清、DMEM高糖培养基、嘌呤霉素(puromycin)均购自Gibco公司;RPMI 1640培养基、Transwell小室(直径8  $\mu\text{m}$ )均购自Corning公司;基质胶(matrigel)购自BD公司;噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT)和结晶紫均购自Sigma公司;Trizol试剂购自Ambion公司;SYBR Green购自Applied Biosystems公司;RevertAid第一链cDNA合成试剂盒购自ThermoFisher Scientific公司;GLISA Rac1活化分析试剂盒购自Cytoskeleton公司;牛血清白蛋白V购自北京索莱宝科技有限公司;NC膜购自Pall公司;4%多聚甲醛、Western blot及IP细胞裂解液均购自上海威奥生物科技有限公司;SDS粉末、 $\beta$ -巯基乙醇、DMSO均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;胰酶细胞消化液、极超敏ECL化学发光试剂盒、Western blot转膜液(粉剂)、脱脂奶粉、DEPC水、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容性)、SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly, 10 $\times$ )、TBST(10 $\times$ )、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 $\times$ )、蛋白标准(BSA, P0006C-2)、Tris-HCl(pH6.8)、Tris-HCl(pH8.8)均购自上海碧云天生物技术有限公司;PCR引物购自nvtrogen公司;抗体E-cadherin(mAb, 1:1 000, 货号: 3195)、Vimentin(mAb, 1:1 000, 货号: 5741S)、p-Erk1/2(mAb, 1:1 000, 货号: 14227)、Erk1/2(mAb, 1:1 000, 货号: 4695)、Myc-tag(mAb, 1:1 000, 货号: 2278)、Src(mAb, 1:1 000, 货号: 2109)、p-Src(mAb, 1:1 000, 货号: 6943)、 $\beta$ -actin(mAb, 1:1 000, 货号: 3700)均购

自Cell Signaling Technology公司; 兔二抗(1:5 000, 货号: 20002)购自Absin公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 卵巢癌细胞SKOV3、OVCAR5用含10%胎牛血清(fetal bovineserum, FBS)的DEME完全培养基培养, OVCAR3、OVCAR3/Rac1G12V细胞用含10% FBS的RPMI 1640完全培养基培养。当细胞密度达80%~90%时,用胰蛋白酶室温消化(1~2 min)以1:2传代,然后置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养。

**1.2.2 OVCAR3/Rac1G12V细胞株的构建** 以慢病毒为载体的外源性基因导入表达。OVCAR3/Rac1G12V的细胞构建及验证:将构建的Rac1G12V活性质粒采用慢病毒的方法包装病毒,将收集的病毒悬液感染非侵袭性且上皮样卵巢癌细胞OVCAR3,以Pcdh-puro的慢病毒感染细胞为对照,用嘌呤霉素筛选感染的细胞。采用Western blot法证明导入的Rac1G12V质粒具有Rac1的活性。

**1.2.3 细胞MTT实验** 将对数生长期的细胞用胰蛋白酶室温消化(1~2 min),按照5 000/孔细胞密度接种于96孔板中,待细胞贴壁后更换含药培养基,给药72 h后加入20 μL MTT溶液,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中避光孵育4 h后,在酶联免疫检测仪570 nm处读取各孔吸光度(D)值。

**1.2.4 细胞迁移实验** 将Transwell小室(直径8 μm)置于已灭菌的24孔板中,在Transwell小室下室加入600 μL含10% FBS的完全培养基,取200 μL细胞悬液(细胞密度10<sup>5</sup>/小室,无血清培养基,10 μmol/L ISL)滴加到小室的上室里面,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中孵育24 h后将小室取出,吸去上室液体,接着用4%多聚甲醛室温固定20 min后,PBS清洗2次,然后用结晶紫室温染色15~20 min,用清水清洗2次,用棉签擦去上层未穿过细胞,小室干燥后置于显微镜下观察及拍照计数。

**1.2.5 细胞侵袭实验** 将已包被好基质胶的小室(直径8 μm)置于无菌的24孔板中,放置于37 °C培养箱培养1~2 h,在Transwell小室下室加入500 μL含10% FBS的完全培养基,100 μL细胞悬液(细胞密度10<sup>5</sup>/小室,无血清培养基,10 μmol/L ISL)滴加到小室的上室里面,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中孵育24 h后将小室取出,吸去上室液体,接着用4%多聚甲醛室温固定20 min,PBS清洗2次,然后用结晶紫室温染色15~20 min,用水清洗小室2次,用棉签擦去上层未穿过细胞,小室干燥后置于显微镜下观察及拍照计数。

**1.2.6 显微镜下细胞形态拍照** 用10 μmol/L ISL作用于OVCAR3/Rac1G12V细胞72 h后,在显微镜下对细胞形态进行观察并拍照记录。

**1.2.7 总RNA提取及qRT-PCR检测** 总RNA提取:Trizol法提取含或不含10 μmol/L ISL培养基培养72 h的OVCAR3/Rac1G12V细胞及不含药培养基培养72 h的OVCAR3/Pcdh-puro细胞总RNA。RNA逆转录为cDNA:根据表1加入对应试剂后37 °C水浴30 min以去除基因组DNA,随后加入1 μL的50 nmol/L EDTA终止反应。再加入随机引物(random hexamer primer)65 °C水浴5 min。根据表2加入相应试剂后25 °C水浴5 min,42 °C水浴60 min完成逆转录,再70 °C水浴5 min灭活。逆转录后cDNA在-80 °C超低温冰箱储存备用。

逆转录完的cDNA用qRT-PCR检测*Vimentin*、*E-cadherin*的mRNA水平,引物序列见表3,反应体系见表4。

**1.2.8 Western blot法检测E-cadherin、Vimentin等蛋白的表达情况** 收集含或不含10 μmol/L ISL培养基培养72 h的OVCAR3/Rac1细胞及不含药培养基培养72 h的OVCAR3/puro细胞总蛋白,Bradford法检测蛋白浓度,30 μg总蛋白经10%的SDS-PAGE分离,然后在300 mA的恒流条件下进行湿转,转膜90 min。随后以5%脱脂牛奶室温封闭1 h,封闭完成后加入一抗(稀释比1:1 000)4 °C过夜孵育;用TBST洗涤去除未结合抗体后,再加入HRP标记的二抗(稀释比1:5 000)室温孵育1 h;孵育结束后再次以TBST充分洗涤,采用ECL化学发光液进行显影。使用ImageJ软件对蛋白条带灰度值进行定量分析。

**1.2.9 Rac1活性检测实验** 依据GLISA Rac1活化分析试剂盒使用说明,提取给药处理后SKOV3、OVCAR5、OVCAR3/Rac1G12V细胞蛋白,使用试剂盒的蛋白定量试剂进行蛋白定量,按照试剂盒说明书步骤4 °C摇床一抗孵育过夜、室温摇床二抗孵育1~4 h,加入HRP检测试剂,终止反应,酶联免疫检测仪450 nm处读取各孔吸光度值。

**1.2.10 细胞创伤划痕愈合实验** 将对数生长期的OVCAR3/Rac1G12V、OVCAR3/puro细胞胰酶室温消化(1~2 min)并以转速1 000 r/min室温离心2 min后,使用完全培养基将其重悬成单细胞悬液,按5×10<sup>5</sup>/孔密度接种于6孔板,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养至细胞长至90%融合时,用20 μL移液管尖端在纵向轴线方向上于孔的中心划出一条创伤区域。

表1 去除基因组DNA试剂表  
Table 1 Genomic DNA removal reagent list

试剂 Reagent	剂量 Amount
RNA	1 $\mu\text{g}$
10 $\times$ reaction buffer with $\text{MgCl}_2$	1 $\mu\text{L}$
DNase I, RNase-free (#EN5021#)	1 $\mu\text{L}$ (1 U/ $\mu\text{L}$ )
Water, nuclease-free	Supplement to 10 $\mu\text{L}$

表2 逆转录试剂表  
Table 2 Reverse transcription reagent list

试剂 Reagent	体积/ $\mu\text{L}$ Volume / $\mu\text{L}$
5 $\times$ reaction buffer	4
RiboLock RNase inhibitor (20 U/ $\mu\text{L}$ )	1
10 mmol/L dNTP Mix	2
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ $\mu\text{L}$ )	1
Total volume	20

表3 引物序列表  
Table 3 Primer sequence list

基因 Gene name	引物序列 Primer sequences
<i>Vimentin</i>	F: 5'- AAT GAC CGC TTC GCC AAC T-3' R: 5'- ATC TTA TTC TGC TGC TCC AGG AA-3'
<i>E-cadherin</i>	F: 5'- ACA GCC CCG CCT TAT GAT T-3' R: 5'- TCG GAA CCG CTT CCT TCA-3'
<i>ZEB1</i>	F: 5'-CAC CAT CCC CAT CAC CTC TAA-3' R: 5'-GCA CCCT CAG CTG TGT ACA AGT-3'

表4 PCR反应体系  
Table 4 PCR reaction system

试剂 Reagent	体积/ $\mu\text{L}$ Volume / $\mu\text{L}$
SYBR <sup>®</sup> Green (2 $\times$ )	5
Primer F (10 $\mu\text{mol/L}$ )	1
Primer R (10 $\mu\text{mol/L}$ )	1
cDNA	1
ddH <sub>2</sub> O	2
Total volume	10

PBS洗涤2次以洗去刮后的漂浮细胞, 加入无血清培养基(含或不含10  $\mu\text{mol/L}$  ISL), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养24 h, 在倒置显微镜下于0 h、24 h观察并拍照。

1.2.11 数据统计与分析 各实验均独立重复3次, 用GraphPad Prism 10.0进行统计学分析, 计量数据采用单因素方差分析进行多组间比较, 并用LSD进行

两两比较, 结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示;  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

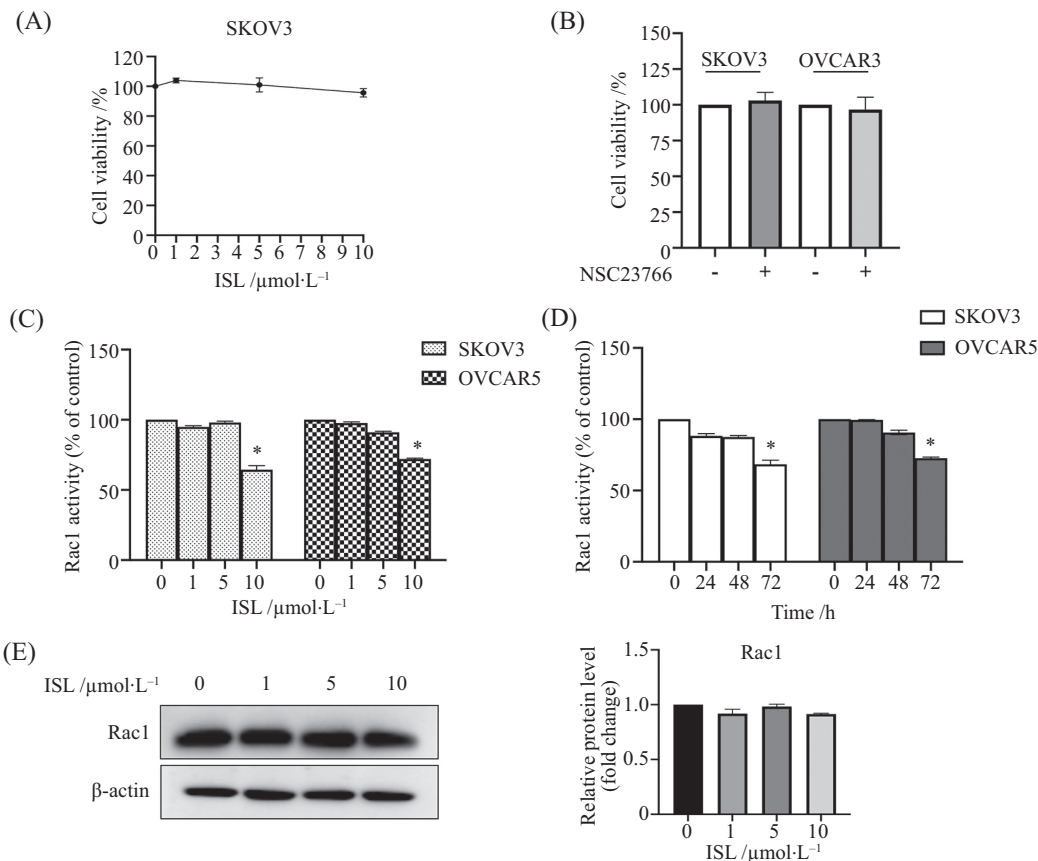
2.1 非毒性浓度下的ISL抑制卵巢癌细胞Rac1活性 前期我们课题组已经证明了非毒性浓度下的

ISL能抑制卵巢癌细胞SKOV3和OVCAR5迁移及侵袭<sup>[14]</sup>。因此,我们采用非毒性浓度下的ISL(1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )处理高转移的卵巢癌细胞SKOV3 72 h, MTT实验进一步证实1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL对细胞没有杀伤作用(图1A)。而在前期研究基础上,为了探讨ISL是否通过抑制Rac1活性从而抑制卵巢癌细胞转移的作用机制,我们首先评估了Rac1抑制剂(NSC23766)对卵巢癌细胞生长的作用。实验结果表明,5  $\mu\text{mol/L}$ 的NSC23766作用72 h并不抑制卵巢癌细胞生长(图1B),这也表明在该条件下抑制Rac1活性并不影响卵巢癌细胞生长。接着将不同浓度的ISL处理SKOV3和OVCAR5细胞,提取不同时间点的细胞蛋白,用GLISA实验检测ISL对Rac1活性的影响。

结果如图1C和图1D, 10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL作用72 h后,同时抑制了SKOV3和OVCAR5细胞的Rac1活性,且具有统计学意义。同时Western blot实验结果表明,ISL并不影响Rac1总蛋白的表达(图1E)。这初步表明,非毒性浓度下的异甘草素可能通过抑制卵巢癌细胞Rac1活性从而发挥抗卵巢癌转移作用。

## 2.2 非毒性浓度的ISL逆转OVCAR3/Rac1G12V细胞形态

在我们前期研究工作<sup>[12]</sup>中已经构建了Rac1持续性激活的卵巢癌细胞系OVCAR3/Rac1G12V,并且证明了外源性导入Rac1G12V使得OVCAR3发生EMT过程,同时OVCAR3/Rac1G12V细胞具有间质样特征及侵袭能力。为了进一步研究ISL是否通过



A: 1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL处理SKOV3细胞72 h后,用MTT实验检测细胞活力。B: 5  $\mu\text{mol/L}$ 的NSC23766处理SKOV3、OVCAR3细胞72 h后,用MTT实验检测细胞活力。C: 1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL处理SKOV3、OVCAR5细胞72 h后,用GLISA实验检测其Rac1活性。 $*P<0.05$ ,与0  $\mu\text{mol/L}$  ISL组比较。D: 10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL处理SKOV3、OVCAR5细胞24、48、72 h后,用GLISA实验检测其Rac1活性。 $*P<0.05$ ,与0 h组比较。E: 1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL处理SKOV3细胞72 h后,用Western blot实验检测Rac1的蛋白表达情况。

A: cell viability assessed via MTT assay following 72 h treatment of SKOV3 cells with 1, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL. B: cell viability assessed via MTT assay following 72 h treatment of SKOV3 and OVCAR3 cells with 5  $\mu\text{mol/L}$  NSC23766. C: Rac1 activity in SKOV3 and OVCAR5 cells treated with 1, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL for 72 h, assessed by GLISA assay.  $*P<0.05$  compared with the 0  $\mu\text{mol/L}$  ISL group. D: Rac1 activity in SKOV3 and OVCAR5 cells treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL for 24, 48, and 72 h, assessed by GLISA assay.  $*P<0.05$  compared with the 0 h group. E: Rac1 protein expression was assessed by Western blot analysis in SKOV3 cells treated with 1, 5, or 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL for 72 h.

图1 非毒性浓度的ISL抑制卵巢癌细胞Rac1活性

Fig.1 ISL inhibits Rac1 activity in ovarian cancer cells at non-toxic concentration

抑制 Rac1 活性从而影响卵巢癌细胞 EMT 过程, 我们用非毒性浓度的 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL 处理 OVCAR3/Rac1G12V 72 h 后, 在显微镜下观察细胞形态, 并用 MTT 检测了细胞活力。结果如图 2A 所示, 10  $\mu\text{mol/L}$  异甘草素不影响 OVCAR3/Rac1G12V 的细胞生长能力; 如图 2B 所示, 与对照 OVCAR3/puro 细胞形态相比, 持续激活 Rac1, 使细胞从卵形变为长梭形, 细胞间隙变大; 而用异甘草素处理过的 OVCAR3/Rac1G12V 细胞形态呈卵形, 细胞出现粘连。这初步表明, 异甘草素能逆转 Rac1 激活诱导的上皮-间质转化过程。

### 2.3 非毒性浓度的 ISL 抑制 OVCAR3/Rac1G12V 细胞迁移和侵袭

在 ISL 能逆转 Rac1 诱导的 EMT 过程基础上, 接着我们检测了 ISL 对 OVCAR3/Rac1G12V 细胞的迁移和侵袭能力的影响。划痕实验结果如图 3A 所示, 持续激活 Rac1 促进 OVCAR3 细胞的迁移, 而 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL 干预后, OVCAR3/Rac1G12V 细胞的迁移能力减弱; ISL 对 OVCAR3/puro 细胞并没有相同作用, 排除了 ISL 对 OVCAR3 细胞迁移的非特异性抑制作用。迁移和侵袭实验进一步证明, 10  $\mu\text{mol/L}$  异甘草素干预后, OVCAR3/Rac1G12V 细胞迁移数量和穿过基质胶的细胞明显减少, 但仍大于 OVCAR3/puro 的细胞的迁移和穿过基质胶的细胞数量(图 3B 和图 3C)。这表明, 异甘草素可以抑制 Rac1 活性诱导的 OVCAR3 细胞迁移和侵袭。

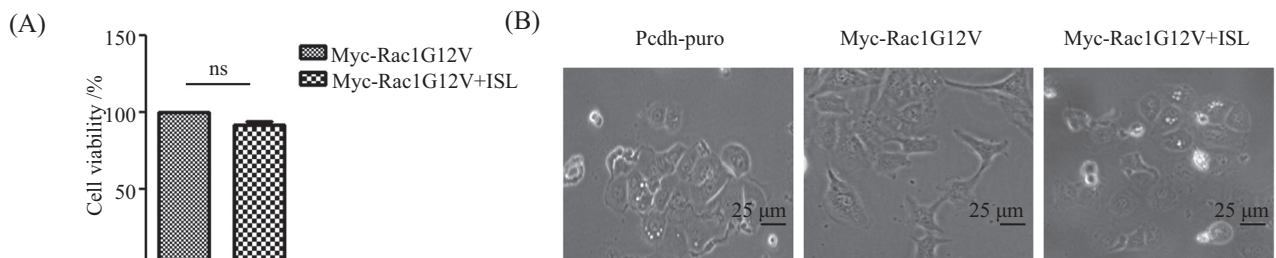
### 2.4 非毒性浓度的 ISL 逆转 OVCAR3/Rac1G12V 细胞 EMT 过程

EMT 是驱动卵巢癌细胞迁移和侵袭的核心机制之一<sup>[15]</sup>。前面我们证明了 ISL 能逆转 Rac1 活性诱

导的 OVCAR3 细胞形态变化及抑制 Rac1 活性诱导的 OVCAR3 细胞迁移和侵袭。因此我们推测 ISL 是否通过逆转 Rac1 活性诱导的 EMT 过程从而抑制卵巢癌细胞的迁移和侵袭? 我们检测了异甘草素干预 OVCAR3/Rac1G12V 细胞后对外源性 Rac1 活性影响及 EMT 标志相关蛋白的表达的影响。GLISA 实验证明, ISL 确实能降低 Rac1 活性(图 4A)。Western blot 结果如图 4B 和图 4C 所示, Rac1 持续激活上调了 OVCAR3 细胞中间质样标志蛋白 Vimentin 的表达, 下调了上皮样标志蛋白 E-cadherin 的表达; 而 10  $\mu\text{mol/L}$  的异甘草素处理 72 h 后, 逆转了 Rac1 持续性激活诱导的 EMT 标志蛋白变化。qRT-PCR 实验结果(图 4D)也进一步证实, Rac1 持续性激活上调了 Vimentin 及转录因子 ZEB1 的 mRNA 水平, 下调了 E-cadherin 的 mRNA 水平, 而异甘草素则部分逆转了 EMT 这一过程。以上结果表明, 异甘草素可通过抑制 Rac1 活性逆转 Rac1 激活诱导的 EMT 过程, 从而抑制卵巢癌细胞的迁移与侵袭。

### 2.5 ISL 对 Rac1 诱导的 Erk1/2 和 Src 蛋白的影响

在图 1 结果中我们已经证明异甘草素能够抑制卵巢癌 SKOV3 和 OVCAR5 细胞的 Rac1 活性, 并且在课题组前期工作中也已经证明了 Rac1-MEK/Src 信号通路诱导上皮样卵巢癌细胞 EMT 过程<sup>[12]</sup>, 而 Erk1/2 是 MEK 的关键下游信号分子。因此我们检测了 ISL 对 OVCAR3/Rac1G12V 细胞中的 Erk1/2 和 Src 的蛋白水平变化的影响。实验结果如图 5 所示, Rac1 持续激活后, OVCAR3 细胞的 p-Src 和 p-Erk1/2 表达水平都明显增加; 而 10  $\mu\text{mol/L}$  的异甘草素处理 72 h 后, 与未给予异甘草素处理相比, 异甘草素显著降低

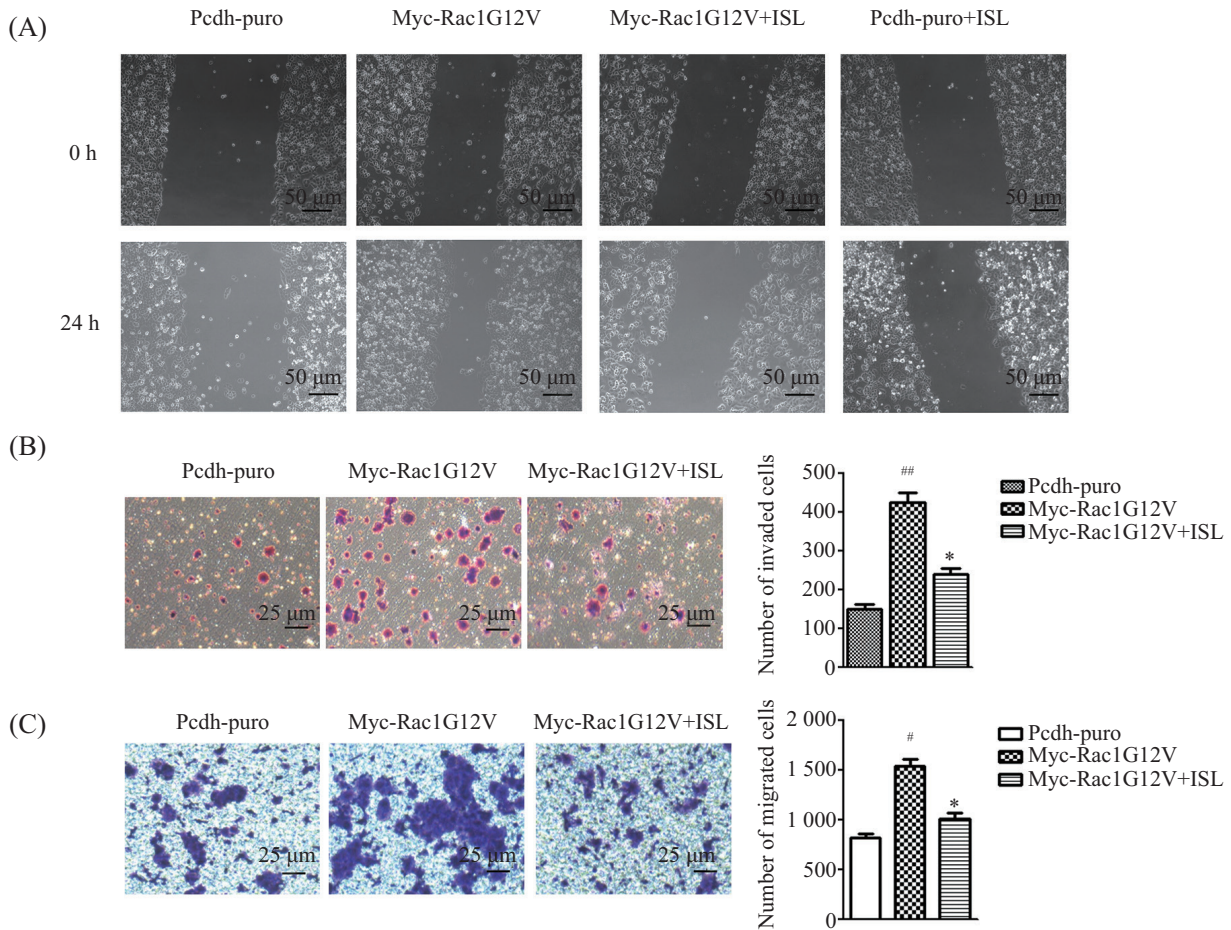


A: 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL 处理 OVCAR3/Rac1G12V 细胞 72 h 后, 用 MTT 实验检测细胞活力。ns: 无显著差异。B: 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL 处理 OVCAR3/Rac1G12V 细胞 72 h, 不含药培养基培养 OVCAR3/Rac1G12V 细胞及 OVCAR3/puro 细胞 72 h 后, 在显微镜下观察细胞形态并拍照。

A: cell viability was assessed via MTT assay after treating OVCAR3/Rac1G12V cells with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL for 72 h. ns: no significance. B: following 72 h treatment of OVCAR3/Rac1G12V cells with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL, and after 72 h culture of OVCAR3/Rac1G12V cells and OVCAR3/puro cells in drug-free medium, cell morphology was observed under a microscope and photographed.

图2 非毒性浓度的 ISL 逆转 OVCAR3/Rac1G12V 细胞形态

Fig.2 ISL alters the morphology of OVCAR3/Rac1G12V cells at non-toxic concentration



A: 10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL或不含药培养基处理OVCAR3/Rac1G12V、OVCAR3/puro细胞24 h, 在0 h、24 h的代表性划痕图片。B、C: 10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL或不含药培养基处理OVCAR3/Rac1G12V细胞24 h, Transwell实验检测细胞迁移和侵袭情况, \* $P<0.05$ , 与Myc-Rac1G12V组相比; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , 与Pcdh-puro组相比。

A: treatment of OVCAR3/Rac1G12V and OVCAR3/puro cells with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL or vehicle medium for 24 h; representative scratch images at 0 and 24 h. B,C: treatment of OVCAR3/Rac1G12V cells with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL or vehicle medium for 24 h, Transwell assays assessed cell migration and invasion. \* $P<0.05$  compared with the Myc-Rac1G12V group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  compared with the Pcdh-puro group.

图3 非毒性浓度的ISL抑制OVCAR3/Rac1G12V细胞迁移和侵袭

Fig.3 ISL inhibits OVCAR3/Rac1G12V cell migration and invasion at non-toxic concentration

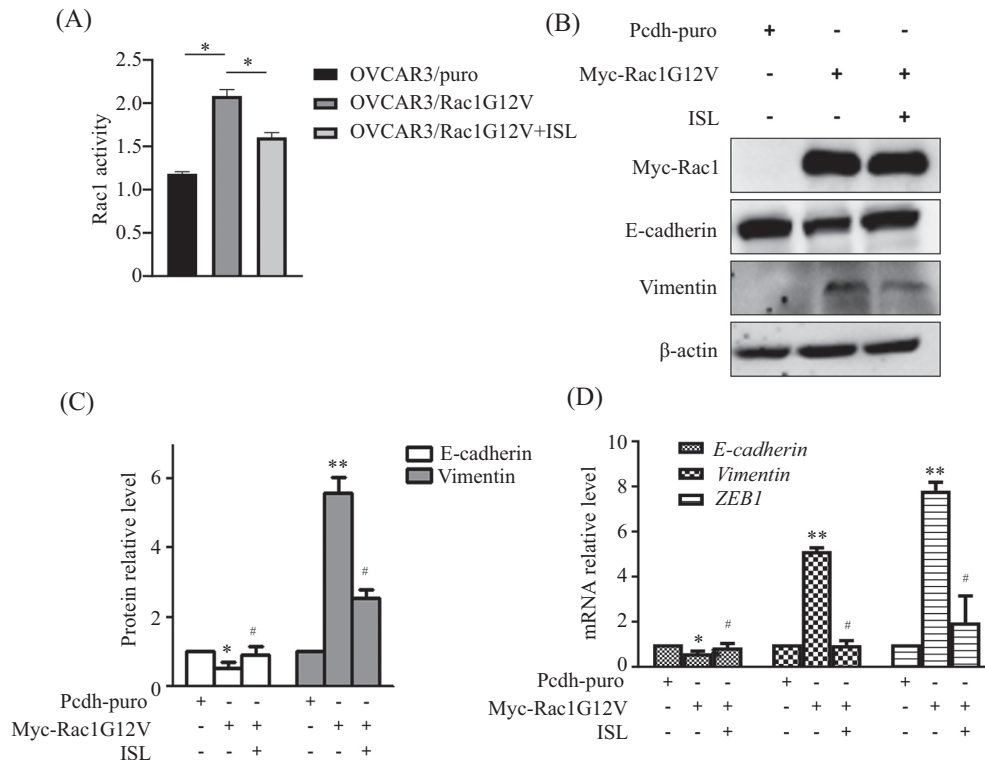
OVCAR3/Rac1G12V细胞中p-Src和p-Erk1/2蛋白表达水平, 但对Src和Erk1/2蛋白表达并无明显影响。这表明, 异甘草素可以通过Rac1-MEK/Src信号通路来影响卵巢癌EMT过程及抑制卵巢癌转移。

### 3 讨论

卵巢癌高死亡率的重要原因之一是其具有转移的高倾向性和特殊的种植转移模式<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞转移会经历EMT、定向侵袭等过程<sup>[16]</sup>。EMT过程是上皮细胞上皮样特征减少并获得间质样细胞特性的生理过程<sup>[17]</sup>。在肿瘤发生和肿瘤细胞得以转移的过程中, EMT通过一系列分子机制使上皮细胞失去细胞极性和黏附能力, 改变细胞表型, 获得间充质细

胞特性, 从而获得迁移和侵袭能力<sup>[18]</sup>。因此, 抑制卵巢癌的EMT过程进而抑制卵巢癌的转移, 有望成为治疗卵巢癌的潜在有效方式。

异甘草素是一种具有丰富药理活性的黄酮类天然活性分子。研究报道异甘草素具有丰富的药理学作用, 如抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗纤维化等<sup>[13]</sup>。我们课题组在前期工作中发现ISL能够逆转卵巢癌的EMT过程从而抑制卵巢癌的转移<sup>[14]</sup>, 但具体的分子机制还未明确。而我们前期也已经证明持续激活Rac1能通过MEK/Src信号通路来诱导卵巢癌EMT过程<sup>[12]</sup>。因此我们推测ISL有可能通过拮抗Rac1-MEK/Src信号通路来逆转EMT过程, 从而发挥抗卵巢癌转移的作用。



A: 10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL或不含药培养基处理OVCAR3/Rac1G12V细胞72 h, GLISA实验检测其Rac1活性,  $*P<0.05$ 。B: 10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL或不含药培养基处理OVCAR3/Rac1G12V细胞72 h, Western blot实验检测EMT相关标志蛋白的表达情况。C: OVCAR3/Rac1G12V和OVCAR3/puro细胞EMT相关标志蛋白统计图。  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , 与Myc-Rac1G12V组相比;  $\#P<0.05$ , 与Pcdh-puro组相比。D: 10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL或不含药培养基处理OVCAR3/Rac1G12V细胞72 h, qRT-PCR实验检测EMT相关标志mRNA的表达,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , 与Myc-Rac1G12V组相比;  $\#P<0.05$ , 与Pcdh-puro组相比。

A: OVCAR3/Rac1G12V cells treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL or vehicle medium for 72 h, Rac1 activity assessed by GLISA assay.  $*P<0.05$ . B: OVCAR3/Rac1G12V cells treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL or vehicle medium for 72 h. Western blot analysis of EMT-related marker protein expression. The top figure is representative Western blot image, the bottom figure is statistical chart of expression of EMT-associated marker proteins.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  compared with the Myc-Rac1G2V group.  $\#P<0.05$  compared with the Pcdh-puro group. C: statistical chart of EMT-associated proteins in OVCAR3/Rac1G12V and OVCAR3/puro cells.  $P<0.05$ ,  $**P<0.01$  compared with the Myc-Rac1G12V group;  $\#P<0.05$  compared with the Pcdh-puro group. D: OVCAR3/Rac1G12V cells treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL or vehicle medium for 72 h. qRT-PCR assayed EMT-related marker mRNA expression.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  compared with the Myc-Rac1G12V group;  $\#P<0.05$  compared with the Pcdh-puro group.

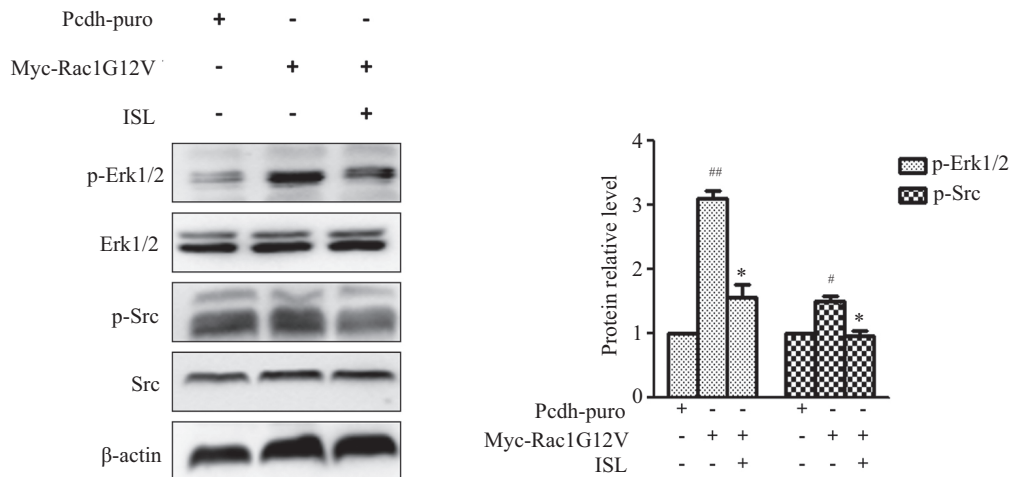
图4 非毒性浓度的ISL对OVCAR3/Rac1G12V细胞EMT的影响

Fig.4 The effect of ISL on EMT in OVCAR3/Rac1G12V cells at non-toxic concentration

首先我们检测了非毒性浓度的ISL对具有高转移特征的卵巢癌细胞株SKOV3、OVCAR5的Rac1活性的影响, 结果显示10  $\mu\text{mol/L}$  ISL对这两株细胞的Rac1活性有显著的抑制效果, 并且10  $\mu\text{mol/L}$  ISL时间依赖性地抑制Rac1活性, 72 h的抑制效果最佳。同时也证明了非毒性浓度的ISL对SKOV3细胞的Rac1总蛋白表达并没有作用。

为进一步探索Rac1活性是否介导了ISL抑制卵巢癌细胞迁移和侵袭的过程, 在本研究中, 我们构建了Rac1持续性激活的卵巢癌细胞株OVCAR3/Rac1G12V。MTT实验结果显示, 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL对OVCAR3/Rac1G12V细胞生长无抑制作用。在EMT过程中, 上皮细胞逐渐失去其细胞黏性, 转化获得间充质细胞表

型, 细胞形态由卵圆形转化为纺锤形或梭形<sup>[19]</sup>。结果发现Rac1持续性激活后细胞形态从卵形变为长梭形, 细胞间隙变大, 表明Rac1持续激活能促进EMT; 而用10  $\mu\text{mol/L}$  ISL处理后, 细胞形态则部分恢复到Rac1激活前状态, 细胞形态呈卵形, 细胞间出现粘连。这表明Rac1持续性激活促进EMT过程, ISL可部分逆转该过程。采用划痕、Transwell小室和侵袭实验进一步研究ISL对OVCAR3/Rac1G12V细胞迁移和侵袭能力的影响。实验结果显示Rac1持续性激活促进了OVCAR3细胞迁移和侵袭, ISL处理抑制了OVCAR3/Rac1G12V细胞的迁移和侵袭, 同时发现ISL对OVCAR3/puro细胞并无相同的作用。这表明10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL能明显抑制Rac1诱导的卵巢癌细胞



用10  $\mu\text{mol/L}$ 的ISL或不含药培养基处理OVCAR3/Rac1G12V细胞72 h, Western blot实验检测相关标志蛋白的表达情况, \* $P < 0.05$ , 与Myc-Rac1G12V组相比; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与Pcdh-puro组相比。

OVCAR3/Rac1G12V cells were treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  ISL or control medium for 72 h, while OVCAR3/puro cells were treated with control medium for 72 h. Western blot analysis was performed to detect the expression of relevant marker proteins. \* $P < 0.05$  compared with the Myc-Rac1G12V group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  compared with the Pcdh-puro group.

图5 ISL对Rac1诱导的Erk1/2和Src蛋白的影响

Fig.5 Effects of ISL on Rac1-induced Erk1/2 and Src proteins

迁移和侵袭。同时表明ISL可能特异性作用于Rac1高活性卵巢癌细胞,当然这也需要一定的实验来支撑。如在高转移SKOV3细胞中将Rac1失活,验证ISL是否还有抑制卵巢癌转移的作用。

在EMT过程中伴随着钙依赖性细胞黏附分子的表达变化,上皮标志蛋白E-cadherin表达量显著减少<sup>[20]</sup>,间质标志蛋白Vimentin及转录因子ZEB1明显上调。前期我们研究工作<sup>[14]</sup>证明转录因子ZEB1在ISL逆转卵巢癌EMT过程中扮演着重要作用,因此在OVCAR3/Rac1G12V细胞模型中也检测了ISL对ZEB1的影响。实验结果表明:Rac1持续激活下调OVCAR3细胞上皮标志蛋白E-cadherin的表达、明显上调间质标志蛋白Vimentin及转录因子及ZEB1的表达;而10  $\mu\text{mol/L}$  ISL上调OVCAR3/Rac1G12V细胞E-cadherin的表达、明显下调Vimentin及ZEB1的表达。这表明ISL可以逆转Rac1激活诱导的EMT过程。

Src家族激酶是细胞内非受体酪氨酸激酶,与细胞黏附、细胞迁移关系密切<sup>[21]</sup>。Src可能通过作用于纤维整合素诱导的信号链中某些环节来影响细胞的黏附结构,使细胞骨架肌动蛋白重排,并且可能通过影响信号转导的不同阶段来影响细胞的迁移,促进细胞外基质降解,增强肿瘤细胞的迁移、侵袭能力<sup>[22]</sup>。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一种细胞内激酶,能被不同的细胞外刺激激活,并且能作用于整合素诱导的细胞迁移过程。其下游中的Erk是抗肿瘤药物的重要靶点<sup>[23]</sup>,其中Erk/MAPK通路中的上游分子MEK能激活Erk<sup>[24]</sup>,激活的Erk1/2即p-Erk1/2可通过激活或抑制其他蛋白激酶底物,从而调节蛋白合成,影响细胞增殖与迁移等过程<sup>[25]</sup>。课题组前期发表文章也已证明,持续激活Rac1活性能通过MEK/Src信号通路诱导卵巢癌细胞EMT过程,因此我们进一步检测了ISL对Src和Erk1/2蛋白的影响。结果证明:Rac1持续激活后,OVCAR3细胞的p-Src和p-Erk1/2蛋白水平增高,Src和Erk1/2蛋白表达无变化;10  $\mu\text{mol/L}$  ISL下调OVCAR3/Rac1细胞p-Src、p-Erk1/2蛋白的表达。因此,我们认为ISL可能通过拮抗MEK/Src信号通路来逆转Rac1诱导的OVCAR3细胞上皮-间质转化过程,从而抑制卵巢癌细胞的转移。

当然本研究也有一定的局限性。如我们仅在细胞模型中证明ISL通过降低Rac1活性逆转Rac1持续性激活诱导的EMT。未来将在动物体内展开进一步的评估,如采用腹腔注射将OVCAR3/Rac1G12V细胞接种到裸鼠体内再评估异甘草素的抗卵巢癌转移作用。还有在本研究中我们主要是围绕前期研究基础Rac1-MEK/Src信号通路而展开的,并且证明了

ISL能逆转Rac1诱导的p-ERK1/2及p-Src蛋白的异常高表达。因此,在本文中未对Rac1下游效应分子的PAK1、LIMK、cofilin等磷酸化水平进行检测,在未来研究中可以检测ISL是否对这些下游效应分子的磷酸化水平也有影响,以便更好地阐明ISL抑制卵巢癌转移的分子机制。

Rac1的活性主要由鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)和GTP酶激活蛋白(GTPase activating proteins, GAPs)调节。其中GEFs通过将Rac1-GDP转换为Rac1-GTP来激活Rac1,而GAPs则通过将Rac1-GTP水解为Rac1-GDP而使Rac1失活<sup>[26]</sup>。在本研究中,ISL能够降低Rac1 G12V突变体细胞的Rac1活性(GTP-Rac1水平)。鉴于G12V突变体对GAP蛋白的失活作用不敏感,这一结果强烈暗示ISL并非直接作用于Rac1蛋白本身,而是可能通过影响其鸟嘌呤核苷酸交换因子GEFs(如Tiam1、Vav1、Trio、Dock2~Dock6和kalirin等)、亚细胞定位或参与GTP结合的辅助蛋白来间接调节的。因此在后续研究中,我们将着重开展ISL是如何调控Rac1活性来发挥抗卵巢癌作用的,这有助于阐明ISL具体的分子靶点。

综上所述,在卵巢癌中Rac1持续性激活诱导EMT进而促进卵巢癌的转移,而ISL通过拮抗Rac1信号通路逆转EMT过程,从而抑制卵巢癌的转移。本文阐明了ISL抑制卵巢癌细胞EMT和转移的分子作用机制:靶向Rac1-MEK/Src信号轴。不同于ISL非特异性地抑制激酶活性或广谱干扰细胞信号网络如PI3K/AKT信号通路<sup>[27]</sup>。本研究为ISL抗卵巢癌转移的作用提供了新的分子机制见解,为其进一步的转化研究奠定了理论基础。

### 参考文献 (References)

- [1] MCMULLEN M, KARAKASIS K, ROTTAPPEL R, et al. Advances in ovarian cancer, from biology to treatment [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(1): 6-8.
- [2] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-63.
- [3] WANG Y, WANG Z, ZHANG Z, et al. Burden of ovarian cancer in China from 1990 to 2030: a systematic analysis and comparison with the global level [J]. *Front Public Health*, 2023, 11: 1136596.
- [4] PHUONG D J, PIRTZ M G, RALSTON C Q, et al. Aggressive serous carcinomas of the female reproductive tract: cancer-prone cell states and genetic drivers [J]. *Cancers*, 2025, 17(4): 604-18.
- [5] CHOE S, JEON M, YOON H. Advanced therapeutic approaches for metastatic ovarian cancer [J]. *Cancers*, 2025, 17(5): 788.
- [6] SAHAI E, MARSHALL C J. RHO-GTPases and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(2): 133-42.
- [7] LI Q, QIN T, BI Z, et al. Rac1 activates non-oxidative pentose phosphate pathway to induce chemoresistance of breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1456.
- [8] LIU J, ZHANG C, ZHANG T, et al. Metabolic enzyme LDHA activates Rac1 GTPase as a noncanonical mechanism to promote cancer [J]. *Nat Metab*, 2022, 4(12): 1830-46.
- [9] GONZALEZ-VILLASANA V, FUENTES-MATTEI E, IVAN C, et al. Rac1/Pak1/p38/MMP-2 axis regulates angiogenesis in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(9): 2127-37.
- [10] ZHOU Y, LIAO Q, HAN Y, et al. Rac1 overexpression is correlated with epithelial mesenchymal transition and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *J Cancer*, 2016, 7(14): 2100-9.
- [11] RIVERA M, TOLEDO-JACOBO L, ROMERO E, et al. Agent-based modeling predicts RAC1 is critical for ovarian cancer metastasis [J]. *Mol Biol Cell*, 2022, 33(14): ar138.
- [12] FANG D, CHEN H, ZHU J Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells is sustained by Rac1 through simultaneous activation of MEK1/2 and Src signaling pathways [J]. *Oncogene*, 2017, 36(11): 1546-58.
- [13] WANG K L, YU Y C, HSIA S M. Perspectives on the role of isoliquiritigenin in cancer [J]. *Cancers*, 2021, 13(1): 115.
- [14] CHEN C, HUANG S, CHEN C L, et al. Isoliquiritigenin inhibits ovarian cancer metastasis by reversing epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Molecules*, 2019, 24(20): 3275.
- [15] LORET N, DENYS H, TUMMERS P, et al. The role of epithelial-to-mesenchymal plasticity in ovarian cancer progression and therapy resistance [J]. *Cancers*, 2019, 11(6): 838.
- [16] LI Y, LIU F, CAI Q, et al. Invasion and metastasis in cancer: molecular insights and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 57.
- [17] KALLURI R, WEINBERG R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-8.
- [18] HEERY R, FINN S P, CUFFE S, et al. Long non-coding RNAs: key regulators of epithelial-mesenchymal transition, tumour drug resistance and cancer stem cells [J]. *Cancers*, 2017, 9(4): 38.
- [19] NURMAGAMBETOVA A, MUSTYATSA V, SAIDOVA A, et al. Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 22164.
- [20] ZHU X, WANG X, GONG Y, et al. E-cadherin on epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 695.
- [21] PELAZ S G, TABERNERO A. Src: coordinating metabolism in cancer [J]. *Oncogene*, 2022, 41(45): 4917-28.
- [22] ROSEWEIR A K, POWELL A, HORSTMAN S L, et al. Src family kinases, HCK and FGR, associate with local inflammation and tumour progression in colorectal cancer [J]. *Cell Signal*, 2019, 56: 15-22.
- [23] CHEN Y, BA L, HUANG W, et al. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling path-

- ways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 796: 90-100.
- [24] BA L, GAO J, CHEN Y, et al. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152765.
- [25] WANG S, WANG X, GAO Y, et al. RN181 is a tumour suppressor in gastric cancer by regulation of the ERK/MAPK-cyclin D1/CDK4 pathway [J]. *J Pathol*, 2019, 248(2): 204-16.
- [26] 刘雨欣, 张兴莉, 房冬冬. Rac1在肿瘤耐药中的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报* (LIU Y X, ZHANG X L, FANG D D. *Advances in the research of Rac1 in tumor drug resistance* [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2023, 45(10): 1575-84.
- [27] GANESAN K, XU C, DU B, et al. Isoliquiritigenin: a natural compound with a promising role in inhibiting breast cancer lung metastasis [J]. *J Tradit Complement Med*, 2025, 15(7): 702-13.