

金诺芬对卵巢癌细胞活性的影响及其分子机制

陈艳雅¹, 黄丽珊¹, 招锦兰¹, 袁佩欣², 叶玉锦¹, 李仲均¹

摘要 目的 探讨金诺芬对卵巢癌细胞活性的影响及其可能的分子机制。方法 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法测定金诺芬处理卵巢癌细胞系 SKOV3、Caov3 和 SW626 细胞和永生化的正常人胚肾 HEK-293T 细胞的剂量反应存活率曲线和半抑制剂量 (IC_{50})。流式细胞术测定细胞周期。酶标仪测定细胞内总谷胱甘肽 (GSH)、还原型 GSH 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 的水平、硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 和活性氧自由基 (ROS) 的水平, 并计算还原型 GSH/GSSG 的比值。Western blot 测定细胞内细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 4、CDK6、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 和 P53、p-P53、啮齿类双分蛋白 2 (MDM2) 的表达情况。结果 与 HEK-293T 细胞相比, 卵巢癌 SKOV3、Caov3 和 SW626 细胞的剂量反应存活率曲线和 IC_{50} 值显示卵巢癌细胞对金诺芬的敏感性更高 ($P < 0.05$)。与未处理组相比, 经各自 IC_{50} 浓度金诺芬处理的 SKOV3、Caov3 细胞内总 GSH、还原型 GSH/GSSG 的比值和 TrxR 的活性均降低 ($t = 25.11, 31.18, 14.72, 19.92, 43.30, 10.74, P < 0.05$), ROS 水平均升高 ($t = 23.82, 27.71, P < 0.05$); G_0/G_1 期细胞数量增多, S 期和 G_2 期细胞数量减少 ($P < 0.05$); 且 CDK4、CDK6、Cyclin D1 及 MDM2 的表达水平均下调 ($t = 7.51, 15.59, 17.32, 11.26, 20.78, 20.78, 24.25, 17.32, P < 0.05$), 而 P53 和 p-P53 的表达水平均上调 ($t = 17.32, 24.25, 12.12, 10.39, P < 0.05$)。结论 金诺芬通过抑制 TrxR 的活性引起卵巢癌细胞内氧化应激, 并通过部分降解 MDM2 以稳定并激活 P53, 将癌细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 发挥抗卵巢癌活性。

关键词 卵巢癌; 金诺芬; 硫氧还蛋白还原酶; 细胞周期阻滞
中图分类号 R 737.31; R 96

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0541-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.004

卵巢癌 (ovarian cancer, OC) 是全球女性第七大最常见癌症, 世界范围内 OC 新发病例 23 万/年, 死亡病例 15 万/年^[1]。OC 也是最致命的妇科癌症之

一, 原因是确诊时多数病例已发展至晚期阶段^[2]。晚期阶段 OC 的 5 年的生存率仅为 29%^[3]。对于晚期 OC 患者, 复发的原因主要是对铂类药物耐药, 可采用新辅助化疗策略, 包括初次手术前化疗、间隔手术细胞减灭术和手术后化疗。一线新辅助化疗药物为聚 (ADP-核糖) 聚合酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 抑制剂 (阻断对 DNA 损伤的修复)^[4]。亟需开发新的抗 OC 治疗策略。

金诺芬 (auranofin) 是硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TrxR) 抑制剂, 是一种口服亲脂性含金的有机化合物, 具有良好的安全性。多项研究^[5]表明金诺芬具有良好的抗癌特性, 但其抗癌的分子机制仍然未有深入研究。该研究拟通过体外实验探讨金诺芬对 OC 细胞的杀伤性作用及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

OC 细胞系 SKOV3、Caov3 和 SW626 细胞及永生化的正常人胚肾 HEK-293T 细胞购自武汉普诺赛生物科技有限公司。胎牛血清 (FBS, 货号: 10099141)、DMEM 培养液粉末 (货号: 12100061)、CellROX Green 试剂 (用于氧化应激检测) (货号: C10444)、BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: 23225)、RIPA 裂解和提取缓冲液 (货号: 89901) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 谷胱甘肽 (glutathione, GSH)/氧化型谷胱甘肽 (glutathione disulfide, GSSG)-Glo 检测试剂盒 (货号 V6612) 购自美国 Promega 公司; 硫氧还蛋白还原酶比色测定试剂盒 (货号: EK-M26856) 购自北京博晖生物科技有限公司; RNA 酶 A (RNase A) (货号: R6148)、碘化丙啶 (PI) (货号: P4864) 购自美国 Sigma Aldrich 公司。细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) (货号: BB4202) 购自上海贝博生物科技有限公司; 兔抗细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependent kinases, CDK) 4 单抗 (货号: 23972)、兔抗 CDK6 单抗 (货号: 13331)、兔抗细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 单抗 (货号: 55506)、兔抗 P53 单抗 (货号: 2527)、兔抗 p-P53 单抗 (货号: 82530)、兔抗啮齿类双分蛋白 2 (murine

2023-02-21 接收

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (编号: A2021085); 东莞市
社会科技发展重点项目 (编号: 202050715001215)

作者单位: 南方医科大学附属东莞医院¹ 妇产科、² 康复医学科, 东莞
523000

作者简介: 陈艳雅, 女, 硕士, 副主任医师;

李仲均, 男, 本科, 主任医师, 责任作者, E-mail: zjlidg@
163.com

double minute 2,MDM2) 单抗(货号: 86934)、兔抗 GAPDH 单抗(货号: 5174)、HRP 标记山羊抗兔二抗(货号: 7074) 购自英国 CST 公司。Guava easyCyte 8HT 流式细胞仪购自美国 Merck Millipore 公司; Spark Cyto 酶标仪购自奥地利 Tecan 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 OC 细胞系 SKOV3、Caov3 和 SW626 细胞及永生化的正常人胚肾 HEK-293T 细胞培养于含 10% FBS 的完全 DMEM 培养液中,置于 37 °C 恒温、湿润的 CO₂ 细胞培养箱中维持培养。

1.2.2 CCK-8 细胞存活率和金诺芬半抑制剂量 (IC₅₀) 测定 将 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,培养过夜。待其贴壁后,分别加入不同浓度梯度的金诺芬(溶于 DMSO) 处理细胞 24 h,每组设置 5 个复孔;对照组加入等体积 DMSO。对于 HEK293T 细胞 金诺芬的浓度梯度为: 0、2.0、3.0、3.5、6.0 和 8.0 $\mu\text{mol/L}$; 对于 SKOV3 细胞,金诺芬的浓度梯度为: 0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$; 对于 Caov3 细胞,金诺芬的浓度梯度为: 0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$; 对于 SW626 细胞,金诺芬的浓度梯度为: 0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 。采用 CCK-8 法测定细胞存活率。待金诺芬处理细胞 48 h 后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μl 继续培养 4 h。使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值,计算不同时间、不同浓度的金诺芬对 OC 细胞增殖的抑制率。增殖抑制率 = [(对照组吸光度值 - 实验组吸光度值) / 对照组吸光度值] $\times 100\%$ 。使用 GraphPad prism v8 软件计算金诺芬对该细胞的 IC₅₀。

1.2.3 活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) 水平测定 将细胞分组为未处理组和 IC₅₀ 金诺芬处理组,每组设置 3 个重复。将 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,孵育过夜后,向 IC₅₀ 金诺芬处理组 SKOV3 和 Caov3 细胞培养物中分别加入金诺芬,浓度为 0.82 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.17 $\mu\text{mol/L}$; 向未处理组加入等体积 DMSO 作为对照。处理 48 h 后,将细胞制备成单细胞悬液。使用 3.7% 甲醛溶液在 4 °C 下固定细胞 15 min; 使用 0.5% Triton X-100 透膜化处理,在室温下处理 10 min。然后加入溶解于 DMSO 的 CellROX Green 染色液,使其终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$,并在 37 °C 恒温下孵育 30 min。加入冰预冷的无菌 PBS 洗细胞 3 次,再次制备为单细胞悬液。然后使用激发波长/发射波长(nm) = 485/520 在酶标仪上进行荧光强度值测定。

1.2.4 GSH 水平测定 总 GSH 包含还原型 GSH 和 GSSG。细胞内还原型 GSH 与 GSSG 的比率(还原型 GSH/GSSG) 降低指示胞内存在有过量的 ROS 积累,还原型 GSH/GSSG 的变化是反映细胞内 ROS 水平变化的另一种指标。将细胞分组为未处理组和 IC₅₀ 金诺芬处理组,每组设 3 个重复。根据制造商的说明,使用 GSH/GSSG-Glo 检测试剂盒测定细胞内还原型 GSH 和 GSSG 的浓度。将 1×10^4 个细胞铺板于白色底板的 96 孔细胞培养皿中,按照各分组要求处理细胞。然后丢弃细胞培养上清液,使用 PBS 洗细胞 2 次。建立标准曲线,设置无细胞空白对照孔;向每孔加入 50 μl 总谷胱甘肽裂解试剂或氧化型谷胱甘肽裂解试剂,于室温振荡摇匀 5 min。向每孔加入 50 μl 荧光素生成试剂,于室温孵育 30 min。结束后,向每孔加入 100 μl 荧光素检测试剂,室温孵育 15 min。结束后立即上机 Spark Cyto(Tecan) 酶标仪进行荧光信号检测。根据标准曲线计算出总 GSH 和 GSSG 的浓度,按照以下公式对还原型 GSH/GSSG 进行计算: 还原型 GSH/GSSG = (总 GSH 浓度 - GSSG 浓度 $\times 2$) / GSSG 浓度。

1.2.5 TrxR 活性测定 将细胞分为未处理组和 IC₅₀ 金诺芬处理组,每组设 3 个重复。使用硫氧还蛋白还原酶比色测定试剂盒测定 TrxR 的活性。使用 Spark Cyto(Tecan) 酶标仪在 405 nm 处测定吸光度值。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组细胞样品的蛋白质浓度。操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.6 流式细胞术测定细胞周期 将细胞分组同 1.2.5 项。各分组按要求处理细胞结束后,将细胞制备为单细胞悬液。向 0.5 ml 单细胞悬液中加入 5 ml 冰预冷的 70% 乙醇,于 4 °C 固定过夜。以 800 r/min 离心 15 min 收集固定细胞, PBS 洗细胞 2 次后,加入 0.4 ml PBS 重悬细胞。向单细胞悬液中加入终浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 RNase-A,于 37 °C 消化 30 min。加入终浓度为 65 $\mu\text{g/ml}$ 的 PI,冰浴避光孵育 30 min。然后细胞过 300 目细胞筛后,上机 Guava easyCyte 8HT 流式细胞仪进行检测。

1.2.7 Western blot 实验 将细胞分组同 1.2.5 项。使用 RIPA 裂解和提取缓冲液,于冰上裂解待测细胞样品。采用半干转印法进行转膜(PVDF 膜)。转膜结束后, PVDF 膜用 5% BSA 于室温封闭 1 h。然后 PVDF 膜于 4 °C 与一抗孵育过夜。一抗信息如下: CDK4(工作浓度 1 : 1 000)、CDK6(工作浓度 1 : 1 000)、Cyclin D1(工作浓度 1 : 500)、P53(工作浓度 1 : 2 000)、p-P53(工作浓度 1 : 500)、

MDM2(工作浓度 1:1 000)、GAPDH(工作浓度 1:2 000)。次日 PVDF 膜于室温与 HRP 标记二抗孵育 1 h。使用 ECL 化学发光底物进行条带显影。

1.3 统计学处理 所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。使用 GraphPad Prism v8 软件对计量数据进行统计学分析。两组间差异采用 *t* 检验进行分析;多组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA);多分类变量间的差异采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金诺芬对 OC 细胞增殖的影响 剂量反应存活率曲线显示 相较于永生化的正常人胚肾细胞系 HEK-293T 细胞,OC 细胞 SKOV3、Caov3、SW626 细胞均显示出对金诺芬的敏感性。当金诺芬剂量约为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,SKOV3 细胞存活率接近 0%,明显低于 HEK-293T 细胞在此剂量下的存活率($t = 280.0$, $P < 0.05$);当金诺芬为 4 $\mu\text{mol/L}$ 时,Caov3 细胞存活率接近 0%,明显低于 HEK-293T 细胞在此剂量下的存活率($t = 25.98$, $P < 0.05$);同此剂量下,SW626 细胞存活率也接近 0%,明显低于 HEK-293T 细胞在此剂量下的存活率($t = 284.0$, $P < 0.05$) ,见图 1A。通过计算获得金诺芬对各细胞系 IC_{50} 值:HEK-293T 细胞 IC_{50} 值为 $(11.63 \pm 0.74) \mu\text{mol/L}$,而 SKOV3 细胞 IC_{50} 值为 $(0.82 \pm 0.18) \mu\text{mol/L}$,Caov3 细胞 IC_{50} 值为 $(2.17 \pm 0.25) \mu\text{mol/L}$,SW626 细胞 IC_{50} 值为 $(2.75 \pm 0.16) \mu\text{mol/L}$ 。与 HEK-293T 细胞相比,3 种 OC 细胞的金诺芬 IC_{50} 值较低($F = 434.2$, $P < 0.05$) ,见图 1B。

2.2 金诺芬对 OC 细胞内氧化应激水平的影响 与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 SKOV3 细胞内总 GSH 水平明显降低($t = 25.11$, $P = 0.0016$);与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 Caov3 细胞内总 GSH 水平明显降低($t = 31.18$, $P = 0.0010$) ,见图 2A。与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 SKOV3 细胞内还原型 GSH/GSSG 的比值降低($t = 14.72$, $P = 0.0046$);与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 Caov3 细胞内还原型 GSH/GSSG 的比值也降低($t = 19.92$, $P = 0.0025$) ,见图 2B。与此同时,与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 SKOV3 细胞内 TrxR 的活性降低($t = 43.30$, $P = 0.0005$);与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 Caov3 细胞内 TrxR 的活性降低($t = 10.74$, $P = 0.0086$) ,见图 2C。与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 SKOV3 细胞内 ROS 相对水平变

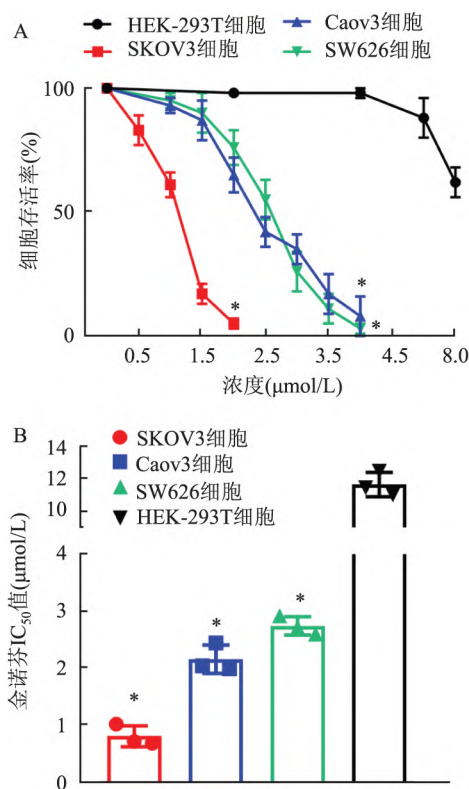


图1 金诺芬处理 OC 细胞的剂量存活曲线和 IC_{50}

A: 金诺芬处理正常人胚肾细胞系 HEK-293T 细胞、OC SKOV3 细胞、Caov3 细胞、SW626 细胞的剂量反应存活率曲线; B: 金诺芬处理 HEK-293T 细胞、SKOV3 细胞、Caov3 细胞、SW626 细胞的 IC_{50} 值; 与 HEK-293T 细胞组比较: * $P < 0.05$

化值升高($t = 23.82$, $P = 0.0018$) ,提示胞内 ROS 的水平升高;与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 Caov3 细胞内 ROS 相对水平变化值升高($t = 27.71$, $P = 0.0013$) 提示胞内 ROS 的水平升高,见图 2D。**2.3 金诺芬对 OC 细胞周期的影响** 与未处理组相比, IC_{50} 金诺芬处理组 OC SKOV3 和 Caov3 细胞 G_0/G_1 期细胞数量占比上调, S 期和 G_2 期细胞数量占比下调,说明 IC_{50} 金诺芬处理组 G_0/G_1 期细胞数量增多, S 期和 G_2 期细胞数量减少($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 金诺芬引起 OC 细胞周期阻滞的分子机制 与未处理组相比,SKOV3 细胞中 IC_{50} 金诺芬处理组 CDK4($t = 7.506$, $P < 0.05$)、CDK6($t = 17.32$, $P < 0.05$)、Cyclin D1($t = 20.78$, $P < 0.05$) 的表达水平均下调,见图 4A、B1。与未处理组相比,Caov3 细胞中 IC_{50} 金诺芬处理组 CDK4($t = 15.59$, $P < 0.05$)、CDK6($t = 11.26$, $P < 0.05$)、Cyclin D1($t = 20.78$, $P < 0.05$) 的表达水平均出现下调,见图 4A、B2。与

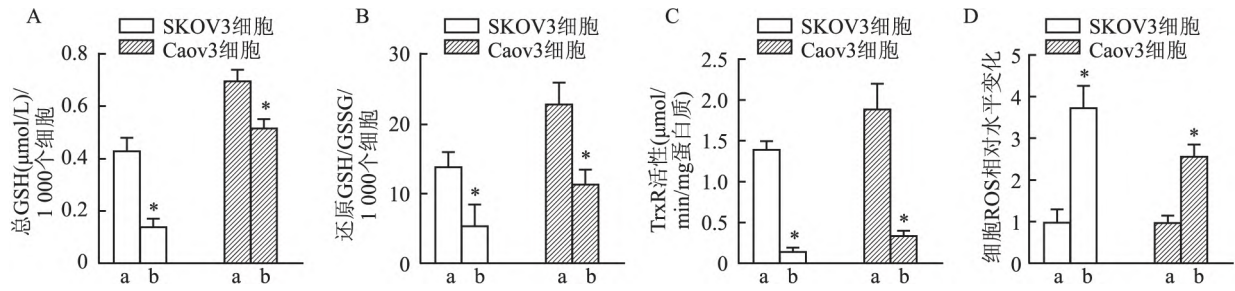


图2 未处理组和 IC₅₀金诺芬处理组 OC 细胞内氧化应激水平测定

A: OC SKOV3 和 Caov3 细胞内总 GSH 水平; B: 1 000 个 OC 细胞内还原型 GSH/GSSG 的比值; C: OC 细胞内 TrxR 活性测定结果; D: OC 细胞内 ROS 相对水平变化; a: 未处理组; b: IC₅₀金诺芬处理组; 与未处理组比较: * $P < 0.05$

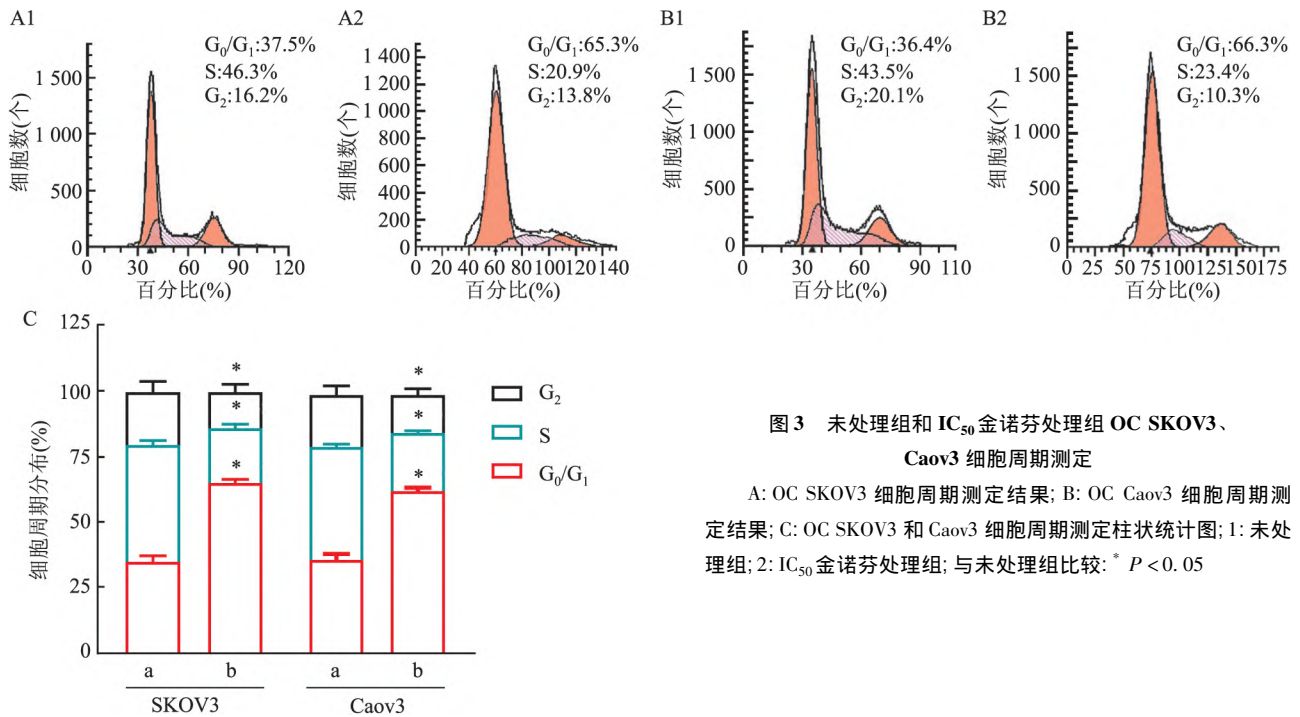


图3 未处理组和 IC₅₀金诺芬处理组 OC SKOV3、Caov3 细胞周期测定

A: OC SKOV3 细胞周期测定结果; B: OC Caov3 细胞周期测定结果; C: OC SKOV3 和 Caov3 细胞周期测定柱状统计图; 1: 未处理组; 2: IC₅₀金诺芬处理组; 与未处理组比较: * $P < 0.05$

未处理组相比,SKOV3 细胞中 IC₅₀ 金诺芬处理组 P53 ($t = 17.32, P < 0.05$) 和 p-P35 (S15) ($t = 12.12, P < 0.05$) 的表达水平均升高,而 MDM2 的表达水平降低($t = 24.25, P < 0.05$),见图 4C、D1。与未处理组相比,Caov3 细胞中 IC₅₀ 金诺芬处理组 P53 ($t = 24.25, P < 0.05$) 和 p-P35 (S15) ($t = 10.39, P < 0.05$) 的表达水平均升高,而 MDM2 的表达水平降低($t = 17.32, P < 0.05$),见图 4C、D2。

3 讨论

所有健康细胞都需要维持氧化还原的稳态,即在生成的 ROS 和被细胞抗氧化系统消除的 ROS 之间保持动态平衡。肿瘤细胞具有高代谢水平和高增殖率,因此其胞内具有较高的 ROS 水平。如果癌细胞无法平衡细胞内氧化还原状态,则将导致氧化应

激,这被认为是癌细胞的“致命弱点”,已逐渐被认为是一种很有希望的抗癌靶标^[6-7]。TrxR/Trx 系统是细胞氧化还原调节网络的核心参与者之一^[8]。Trx 系统的抗氧化功能有利于癌细胞存活,相对于非癌组织,Trx/TrxR 在肿瘤组织中过表达^[9]。上调的 Trx/TrxR 激活了数种通常与细胞生长、细胞存活和血管生成相关的转录因子,包括 P53 和缺氧诱导因子-1 α 等^[10]。许多癌症疗法,如化疗药物或物理照射,都与增加癌细胞内 ROS 有关;而高水平的 Trx/TrxR 将导致癌细胞对此类抗癌治疗耐受,而靶向 TrxR/Trx 的抑制剂可提高抗癌治疗的效力^[8,10]。

金诺芬是一种含有 Au-S 键的线性 Au(I) 配合物,它的抗炎和抗癌活性在许多实验室被证实,然而,其确切的作用机制仍不十分清楚。主要是由于其代谢产物作用的信号通路尚未得到最终全面地阐

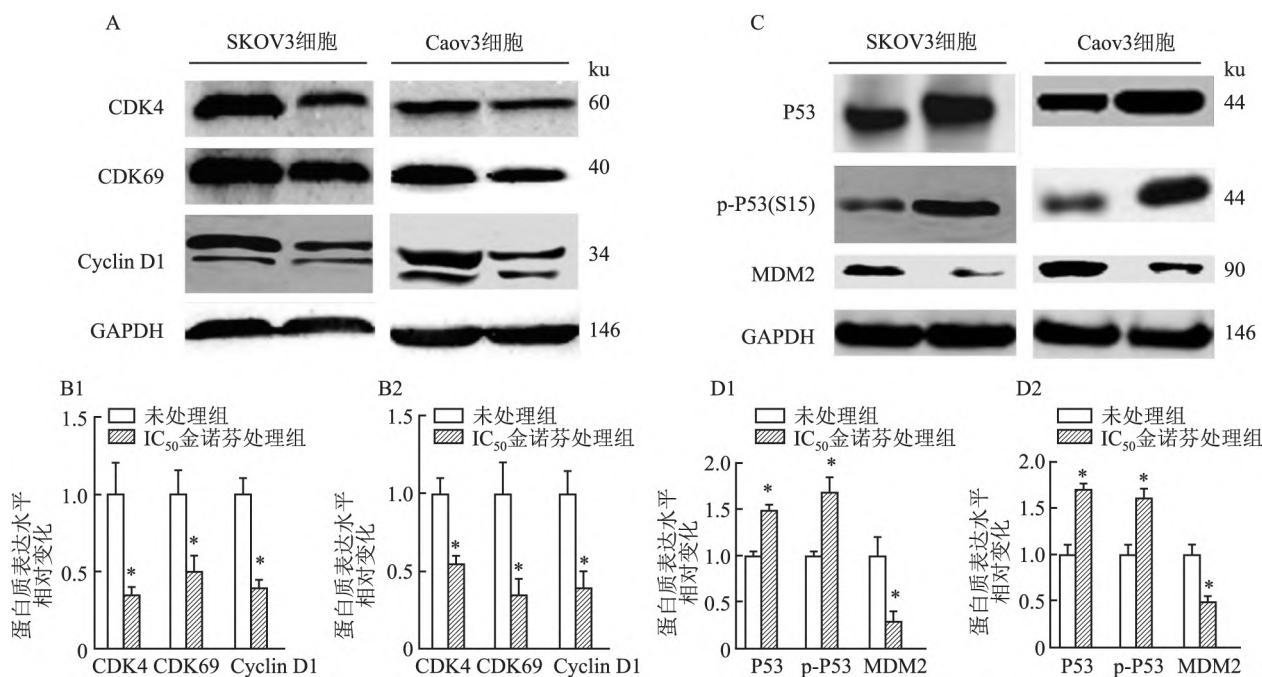


图4 金诺芬处理后 OC 细胞内细胞周期相关蛋白表达水平测定

A: 未处理组和 IC_{50} 金诺芬处理组 SKOV3、Caov3 细胞内 CDK4、CDK6、Cyclin D1 的表达情况结果图; B: 未处理组和 IC_{50} 金诺芬处理组 OC SKOV3 细胞 (B1) 和 Caov3 细胞 (B2) 内 CDK4、CDK6、Cyclin D1 的表达情况柱状统计图; C: 未处理组和 IC_{50} 金诺芬处理组 SKOV3、SKOV3 细胞内 P53、p-P53 和 MDM2 的表达情况结果图; D: 未处理组和 IC_{50} 金诺芬处理组 OC SKOV3 细胞 (D1) 和 Caov3 细胞 (D2) 内 P53、p-P53 和 MDM2 的表达情况柱状统计图; 与未处理组比较: * $P < 0.05$

明。目前研究^[11]表明金诺芬的药理作用主要为抑制胞质内和线粒体内 TrxR1 和 TrxR2 的活性。另外,金诺芬还可抑制多种促炎途径,包括 $NF-\kappa B$ 的信号转导和激活转录因子-3 等。本研究显示,相对于永生化的正常细胞系 HEK-293T 细胞而言,金诺芬能在较低的浓度下显著抑制 OC 细胞内 TrxR 的水平,并使 OC 细胞 G_0/G_1 期细胞数量占比上调, S 期和 G_2 期细胞数量占比下调。这在以往的研究中尚未有报道。

还原型 GSH 是细胞中含量最多的分子之一,也是一种重要的抗氧化剂,在维持氧化还原稳态中发挥重要作用^[12]。还原型 GSH/GSSH 的水平可以反映胞内的氧化还原状态,该比值降低,则 ROS 积累,细胞发生氧化应激。本研究表明,金诺芬能够显著降低 OC 细胞中还原型 GSH/GSSH 的比值,导致细胞发生氧化应激。这说明金诺芬引起 OC 细胞 G_0/G_1 期细胞数量占比上调的原因很可能是显著增加了癌细胞内的氧化应激水平,这可以被认为是金诺芬抗 OC 活性的第一个方面。

P53 是最著名的肿瘤抑制因子之一,它能保护正常细胞免于癌变。P53 响应各种刺激,如氧化应激、DNA 损伤、低氧、癌变刺激等而被激活。一旦其

被激活,P53 会诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞等,并抑制癌细胞增殖和迁移^[13]。MDM2 是 P53 特异性 E3 泛素连接酶,负责负调节 P53 的转换和活性。它的降解能够有效稳定 P53。本研究结果显示,相对于未处理组 OC 细胞, IC_{50} 金诺芬处理组引起 MDM2 部分降解,从而使得 P53 被稳定并被激活,p-P53 水平显著升高。因此,可以认为金诺芬抗 OC 活性还有一个方面,即通过降解 MDM2 促进 P53 稳定和活化,以引起 OC 细胞 G_0/G_1 期细胞数量占比上调。这也是本次研究的重要发现之一。

综上所述,金诺芬通过抑制 TrxR 的活性引起 OC 细胞内氧化应激,并通过部分降解 MDM2 以稳定并激活 P53,将癌细胞阻滞于 G_0/G_1 期,发挥抗 OC 活性。然而金诺芬的作用靶点是不是 P53 信号通路,还有待进行靶向敲低和(或)过表达 P53 的实验策略来进一步验证和探讨。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer 2015, 136(5): E359-86.
- [2] Doherty J A, Peres L C, Wang C, et al. Challenges and opportuni-

- ties in studying the epidemiology of ovarian cancer subtypes [J]. *Curr Epidemiol Rep* 2017 4(3):211–20.
- [3] Gupta K K, Gupta V K, Naumann R W. Ovarian cancer: screening and future directions [J]. *Int J Gynecol Cancer* 2019 29(1):195–200.
- [4] Gaona-Luviano P, Medina-Gaona L A, Magaña-Pérez K. Epidemiology of ovarian cancer [J]. *Chin Clin Oncol* 2020 9(4):47.
- [5] Gamberi T, Chiappetta G, Fiaschi T, et al. Upgrade of an old drug: Auranofin in innovative cancer therapies to overcome drug resistance and to increase drug effectiveness [J]. *Med Res Rev* 2022, 42(3):1111–46.
- [6] Perillo B, Donato M D, Pezone A, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon [J]. *Exp Mol Med* 2020 52(2):192–203.
- [7] 杜敏娟, 李立丰, 刘瑞琦, 等. 敲除 hsa_circRNA_102958 调节胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、氧化应激和线粒体功能 [J]. *安徽医科大学学报* 2021 56(7):1111–6.
- [8] Ghareeb H, Metanis N. The thioredoxin system: a promising target for cancer drug development [J]. *Chemistry* 2020 26(45):10175–84.
- [9] 黄云霞, 时杜娟, 蒙玉娜, 等. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤中 Trx、TrxR-I 及 TXNIP 的表达及临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志* 2022 38(4):443–7.
- [10] Mohammadi F, Soltani A, Ghahremanloo A, et al. The thioredoxin system and cancer therapy: a review [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* 2019 84(5):925–35.
- [11] Abdalbari F H, Telleria C M. The gold complex auranofin: new perspectives for cancer therapy [J]. *Discov Oncol* 2021 12(1):42.
- [12] Bansal A, Simon M C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance [J]. *J Cell Biol* 2018 217(7):2291–8.
- [13] Jung J H, Lee H, Kim J H, et al. P53-dependent apoptotic effect of puromycin *via* binding of ribosomal protein L5 and L11 to MDM2 and its combination effect with RITA or doxorubicin [J]. *Cancers (Basel)* 2019 11(4):582.

Effects of auranofin on the activity of ovarian cancer cells and its molecular mechanisms

Chen Yanya¹, Huang Lishan¹, Zhao Jinlan¹, Yuan Peixin², Ye Yujin¹, Li Zhongjun¹

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, ²Dept of Rehabilitation Medicine, Dongguan Hospital Affiliated to Southern Medical University, Dongguan 523000)

Abstract Objective To explore the activity of auranofin against ovarian cancer cells and its possible molecular mechanism. **Methods** The dose-response survival curve and IC₅₀ of auranofin on ovarian cancer cell lines, SK-OV3, Caov3 and SW626 cells and immortalized normal human embryonic kidney HEK-293T cells were determined by CCK-8 method. Cell cycle was determined by flow cytometry. The levels of total glutathione (GSH), reduced GSH and glutathione disulfide (GSSG), thioredoxin reductase (TrxR) and reactive oxygen species (ROS) in cells were determined by microplate reader, and the reduced GSH/GSSG ratio was calculated. Western blot was used to determine the expression of cyclin dependent kinases (CDK4, CDK6, Cyclin D1, P53, p-P53 and MDM2) in SK-OV3 and Caov3 ovarian cancer cells. **Results** Compared with HEK-293T cells, the dose-response survival curves and IC₅₀ values of SKOV3, Caov3 and SW626 cells showed that ovarian cancer cells were more sensitive to auranofin ($P < 0.05$). After SKOV3 and Caov3 cells were treated with the dose of respective IC₅₀ concentrations of auranofin, compared with the untreated cells group, the Auranofin IC₅₀ group cells' intracellular levels of GSH, the ratio of reduced GSH/GSSG and the activity of TrxR decreased ($t = 25.11/31.18, 14.72/19.92, 43.30/10.74$, all $P < 0.05$), and the levels of ROS increased ($t = 23.82/27.71, P < 0.05$); cells number at G₀/G₁ phases increased, with cells number at S and G₂ phases decreased ($P < 0.05$); and the expression levels of cell cycle-related proteins CDK4, CDK6, Cyclin D1 and the P53-specific E3 ubiquitin ligase MDM2 were down-regulated ($t = 7.51/15.59, 17.32/11.26, 20.78/20.78, 24.25/17.32$, all $P < 0.05$), while the expression levels of P53 and p-P53 were up-regulated ($t = 17.32/24.25, 12.12/10.39$, all $P < 0.05$). **Conclusion** Auranofin causes oxidative stress in ovarian cancer cells by inhibiting TrxR activity, and by partially degrading MDM2 to stabilize and activate P53, so as to block the cancer cells in G₀/G₁ phase, and exert anti-ovarian cancer activities.

Key words ovarian cancer; auranofin; thioredoxin reductase; cell cycle arrest