

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.004

蟾毒灵通过 NLRP3/CASP1/GSDMD 信号通路诱导卵巢癌细胞焦亡并增强其对顺铂的敏感性

李婕^{1,2}, 奚玲^{1,2}, 赵璨³ (1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 妇产科, 湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 肿瘤侵袭与转移教育部重点实验室, 湖北 武汉 430030; 3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 病理研究所, 湖北 武汉 430030)

[摘要] **目的:** 探究蟾毒灵(Buf)对卵巢癌细胞A2780和SKOV3的毒性作用及其机制, 评估其与顺铂(DDP)联合应用的协同毒性。**方法:** 常规培养A2780和SKOV3细胞。用CCK-8法、克隆形成实验检测Buf对A2780和SKOV3细胞增殖的影响及半数抑制浓度(IC₅₀)。用不同浓度的Buf处理细胞, 显微镜下观察细胞形态变化, 比色法检测乳酸脱氢酶(LDH)释放水平, 流式细胞术分析检测Annexin V⁺PI⁺细胞比例, qPCR和WB法检测细胞焦亡相关分子mRNA及蛋白表达水平, 通过小干扰RNA敲减A2780和SKOV3细胞中的GSDMD并进行后续功能实验进行验证。通过SynergyFinder分析Buf与DDP对于杀伤A2780和SKOV3细胞的协同效应, 并通过流式细胞术、qPCR、WB进行机制探索, 进一步利用流式细胞术检测Buf与DDP联用对DDP耐药A2780和SKOV3细胞的影响。**结果:** 与对照组相比, Buf显著抑制卵巢癌细胞增殖及迁移能力(均 $P < 0.05$), 诱导LDH释放和细胞焦亡(均 $P < 0.05$), 上调核苷酸结合寡聚化结构样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(CASP1)、gasdermin家族成员D(GSDMD)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及IL-18的mRNA及蛋白的表达(均 $P < 0.05$), Buf与DDP联用具有协同抑制A2780和SKOV3细胞增殖的作用, 并可进一步增强DDP耐药的A2780和SKOV3细胞对DDP的敏感性($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。**结论:** Buf可通过激活NLRP3/CASP1/GSDMD信号通路诱导A2780和SKOV3细胞焦亡, 并增强A2780和SKOV3细胞及DDP耐药A2780和SKOV3细胞对DDP的敏感性。

[关键词] 卵巢癌; 细胞焦亡; 蟾毒灵; NLRP3/CASP1/GSDMD信号通路

[中图分类号] R733.71; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 03-0252-10

Bufalin induces pyroptosis in ovarian cancer cells via the NLRP3/CASP1/GSDMD signaling pathway and enhances their sensitivity to cisplatin

LI Jie^{1,2}, XI Ling^{1,2}, ZHAO Can³ (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China; 2. Key Laboratory of Tumor Invasion and Metastasis, Ministry of Education, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China; 3. Institute of Pathology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

[Abstract] Objective: To investigate the cytotoxic effects and underlying mechanisms of Bufalin (Buf) on ovarian cancer cells (A2780 and SKOV3) and to evaluate its synergistic cytotoxicity with cisplatin (DDP). **Methods:** A2780 and SKOV3 cells were routinely cultured. The effect of Buf on cell proliferation and its half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) were determined using CCK-8 assay and colony formation assay. Following treatments with various concentrations of Buf, morphological changes of tumor cells were observed under a microscope, lactate dehydrogenase (LDH) release was measured using colorimetric assay, and the proportion of Annexin V⁺PI⁺ cells was analyzed using flow cytometry. The mRNA and protein expression levels of pyroptosis-related molecules were detected using qPCR and WB, respectively. Small interfering RNA was used to knock down gasdermin D (GSDMD) in A2780 and SKOV3 cells to validate its functional role. The synergistic cytotoxic effects of Buf and DDP against A2780 and SKOV3 cells were analyzed using the SynergyFinder platform, and the underlying mechanisms were further explored using flow cytometry, qPCR, and WB. Additionally, the synergistic effect of Buf and DDP on DDP-resistant A2780 and SKOV3 cells was evaluated using flow cytometry. **Results:** Compared with the control group, Buf significantly inhibited proliferation and migration of ovarian cancer cells

[基金项目] 国家自然科学基金(82172717)

[作者简介] 李婕, 硕士生, 医师

[通信作者] 赵璨(扫码获取作者通信方式)



(both $P < 0.05$), induced LDH release and cell pyroptosis (both $P < 0.05$), and upregulated the mRNA and protein expression levels of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3), cysteine-aspartic acid protease 1 (CASP1), gasdermin D (GSDMD), interleukin(IL)-1 β , and IL-18 (all $P < 0.05$). The combination of Buf and DDP synergistically inhibited the proliferation of A2780 and SKOV3 cells and further enhanced the sensitivity of DDP-resistant A2780 and SKOV3 cells to DDP. **Conclusion:** Buf induces pyroptosis in A2780 and SKOV3 cells by activating the NLRP3/CASP1/GSDMD signaling pathway and enhances the sensitivity of DDP-resistant A2780 and SKOV3 cells to DDP.

[Key words] ovarian cancer; pyroptosis; bufalin (Buf); NLRP3/CASP1/GSDMD signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(3): 252-261. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.004]

卵巢癌是一种致死率极高的妇科恶性肿瘤,尽管当前临床上普遍以减瘤手术联合铂类化疗作为标准治疗方案,但大多数患者仍在治疗后面临复发及耐药问题,严重影响其长期预后^[1-2]。因此,亟需探索新的治疗策略,以提高患者对现有治疗手段的敏感性并改善预后。细胞焦亡是一种以炎症反应为特征的程序性细胞死亡方式,其经典通路依赖于核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3 (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3) 炎性小体的激活,继而启动半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 1 (cysteine-dependent aspartate-specific protease 1, CASP1) 介导的 gasdermin 家族成员 D (GSDMD) 裂解,导致细胞膜穿孔及促炎因子的释放^[3]。近年来,研究^[4]发现,细胞焦亡不仅可诱导肿瘤细胞死亡,还能增强肿瘤免疫原性,在抗肿瘤治疗中展现出独特的应用潜力。然而,细胞焦亡在卵巢癌中的具体作用机制尚不明确,尤其是可诱导细胞焦亡的天然药物仍缺乏系统性研究。蟾毒灵 (bufalin, Buf) 是来源于中药蟾酥的甾体类活性成分,具有广泛的抗肿瘤活性^[5]。有研究^[6-7]表明,Buf 可通过多种信号通路抑制多种实体瘤的增殖、转移和代谢,但其是否通过诱导卵巢癌细胞焦亡发挥作用尚未有明确报道;此外,Buf 是否能与顺铂 (cisplatin, DDP) 联合作用以增强抗肿瘤疗效并逆转耐药性,也仍有待深入研究。本研究旨在探究 Buf 诱导卵巢癌细胞焦亡的作用机制,并验证其与顺铂联合应用时的协同抑瘤效果,从而为 Buf 作为潜在天然抗癌药物的开发提供理论依据,并为卵巢癌联合治疗策略的优化提供新的实验支持。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器

人卵巢癌细胞 SKOV3 与 A2780 均购自 ATCC 细胞库,对 DDP 耐药的 SKOV3/DDP 与 A2780/DDP 细胞为在 SKOV3 与 A2780 亲本基础上,通过逐渐增加 DDP 浓度诱导建立。SKOV3、SKOV3/DDP 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, A2780 与

A2780/DDP 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。

胎牛血清 (货号 10100147C)、DMEM (货号 11995065)、RPMI 1640 (货号 11875093) 培养基、Opti-MEM (货号 31985070) 及胰酶消化液 (货号 25300054) 购自美国 Gibco 公司。Buf (货号 HY-N0877)、DDP (货号 HY-17394)、Necrostatin-1 (Nec-1) (货号 HY-15760)、MCC950 (货号 HY-12815)、disulfiram (DSF) (货号 HY-B0240)、Z-VAD-FMK (货号 HY-16658B)、Z-DEVD-FMK (货号 HY-12466) 购自美国 MedChemExpress 公司。CCK-8 试剂 (货号 KTA1020) 购自武汉亚科因生物技术有限公司,乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒 (货号 C0017) 购自上海碧云天生物技术有限公司,细胞凋亡检测试剂盒 (货号 556547) 购自美国 BD 公司, FastPure 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒 (货号 RC101-01)、逆转录试剂盒 (货号 RC112) 及 qPCR 试剂盒 (货号 R423-01) 购自中国南京诺维赞生物技术有限公司, CASP3 (货号 A11319)、NLRP3 (货号 A12694)、IL-18 (货号 A23076)、 β -actin (货号 AC026) 一抗购自中国武汉爱博泰克生物科技有限公司, CASP1 一抗 (货号 sc-392736) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,活化型 CASP9 (cleaved CASP9, C-CASP9) 一抗 (货号 ab202068)、GSDMD (货号 Ab210070)、BAX (货号 Ab32503)、BCL2 (货号 Ab182858) 一抗均购自美国 Abcam 公司, C-CASP3 (货号 9664) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 一抗 (货号 12242) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。RIPA 裂解液 (货号 G2002)、蛋白酶抑制剂 (货号 G2006)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG (货号 GB23303)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (货号 GB23301) 及苏木素染液 (货号 G1004) 均购自武汉赛维尔生物技术有限公司。Lipofectamine 3000 试剂 (货号 L3000001) 购自美国赛默飞世尔科技公司。GSDMD 的 siRNA 和阴性对照 (NC) siRNA 购自上海典君生物科技有限公司。

CO₂ 恒温培养箱 (CI-192IR 型)、超净工作台 (SW-CJ-2F 型) 均购自苏州捷美有限公司, 显微成像系统 (Bx40-32 型)、体视显微镜 (SZ27 型) 均购自日本奥林

巴斯公司, PCR 仪(S1000 型)、荧光定量 PCR 仪(CFX96 型)、垂直电泳槽(Mini-PROTEAN Tetra 型)、转印槽(Mini Trans-Blot Cell 型)、基础电泳仪电源(PowerPac Basic Power Supply 型)、ChemiDoc 化学发光凝胶成像系统(12003153)均购自美国 Bio-Rad 公司,超低温冰箱(MDF-53V 型)购自日本三洋公司,高速冷冻离心机(Microfuge 22R 型)、流式细胞仪(CytoFLEX S 型)均购自美国贝克曼公司,多功能酶标仪(SpectraMax Paradigm 型)购自美国分子仪器公司。

1.2 CCK-8 法和克隆形成实验检测 Buf 对 SKOV3、A2780 细胞增殖能力的影响

CCK-8 法:将 SKOV3、A2780 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,每组设 4 个复孔,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱内过夜后加入不同浓度 Buf(1 000、800、400、200、100、50 nmol/L)处理,24 h 或 48 h 后取出,弃上清液,每孔加入含 10% CCK-8 试剂的培养液 200 μL,继续培养 2 h,用酶标仪在 450 nm 处检测每孔的光密度值,绘制细胞增殖曲线,计算 Buf 的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

克隆形成实验:将 SKOV3、A2780 细胞以 5×10^2 个/孔接种于 6 孔板中,过夜后加入浓度为 100 nmol/L 的 Buf 处理,每 3 d 更换培养基,2 周后用 4% 多聚甲醛固定 20 min,0.5% 结晶紫染色 5 min,弃染液后冲洗,室温晾干后拍照,使用 ImageJ 软件进行后续数据分析。

1.3 划痕愈合实验检测 Buf 对 SKOV3、A2780 细胞的迁移能力的影响

将 SKOV3、A2780 细胞经胰酶消化后接种于 6 孔板中,当细胞汇合度达 90% 时,用 200 μL 无菌吸头划痕,PBS 洗涤 3 次,置于含 100 nmol/L 的 Buf 的无血清培养基中培养,划痕后 0 和 48 h 在显微镜下采集细胞图像,用 ImageJ 软件计算划痕愈合率。

1.4 流式细胞术检测 Buf 对 SKOV3、A2780 细胞凋亡的影响

Buf 单药处理:将 SKOV3、A2780 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,过夜后加入 0、10、50、100 和 200 nmol/L 的 Buf 进行处理,48 h 后收集细胞及上清液。MCC950、DSF、Z-VAD-FMK、Z-DEVD-FMK、Nec-1 预处理后 Buf 处理:将 SKOV3、A2780 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,过夜后加入 10 μmol/L MCC950、10 μmol/L DSF、20 μmol/L Z-VAD-FMK、20 μmol/L Z-DEVD-FMK、20 μmol/L Nec-1 预处理 SKOV3、A2780 细胞 2 h,随后加入 100 nmol/L 的 Buf 进行处理,48 h 后收集细胞及上清液。DDP 与 Buf 联合处理:将 SKOV3、A2780、SKOV3/DDP、A2780/DDP 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,过夜后加 10 μmol/L DDP 与 100 nmol/L 的 Buf 进行处理,48 h 后收集细胞及上清液。将上述细胞样品 $300 \times g$ 离心 5 min,PBS 洗涤 1 次,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,取 100 μL 细胞悬液,依次加入 5 μL Annexin V-FITC、5 μL PI 和 400 μL 结合缓冲液,轻柔混匀后室温避光孵育 15 min,1 h 内用流式细胞仪进行分析。

1.5 qPCR 法检测 Buf 对 SKOV3、A2780 细胞中基因表达的影响

Buf 单药处理:将 SKOV3、A2780 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,过夜后加入 100 nmol/L 的 Buf 进行处理。DDP 与 Buf 联合处理:将 SKOV3、A2780 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,过夜后加入 10 μmol/L DDP 与 100 nmol/L 的 Buf 进行处理。各组处理 48 h 后使用 FastPure 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒提取总细胞 RNA,用逆转录试剂将其逆转录为 cDNA。qPCR 法进行扩增。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 45 个循环。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列(5'-3')

基因名称	正向引物	反向引物
NLRP3	GATCTTCGCTGCGATCAACAG	CGTGCATTATCTGAACCCAC
CASP1	TTTCCGCAAGGTTTCGATTTTCA	GGCATCTGCGCTCTACCATC
IL1B	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
IL18	TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG	TCCGGGGTGCATTATCTCTAC
GSDMD	GTGTGTCAACCTGTCTATCAAGG	CATGGCATCGTAGAAGTGGAAAG
BAX	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
BCL2	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	CGGTTTCAGGTAAGTCTCAGTCATCC
CASP3	CATGGAAGCGAATCAATGGACT	CTGTACCAGACCGAGATGTCA
CASP9	CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC	GCATTTCCCCTCAAACCTCTCAA
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

1.6 LDH释放法检测Buf对SKOV3、A2780细胞的毒性作用

取对数生长期的SKOV3、A2780细胞,以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中,加入10、50、100、200 nmol/L的Buf处理细胞,培养48 h后,在样品最大酶活性对照孔中加入20 μ L的LDH释放试剂,放回至培养箱,1 h后取出,将细胞培养板用孔板离心机 $400 \times g$ 离心5 min,取各孔上清液120 μ L,加入新96孔板中,每孔加入60 μ L的LDH检测工作液,混匀后室温避光孵育30 min,在490 nm处检测各孔的光密度值,计算LDH释放率。

1.7 WB法检测Buf对SKOV3、A2780细胞中焦亡相关蛋白表达的影响

Buf单药处理:将SKOV3、A2780细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,过夜后加入100 nmol/L的Buf进行处理。DDP与Buf联合处理:将SKOV3、A2780细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,过夜后加入10 μ mol/L DDP与100 nmol/L的Buf进行处理。各组处理48 h,使用RIPA裂解液(含工作浓度的蛋白酶抑制剂)冰上裂解30 min后超声10 s,用低温高速离心机 $13\ 400 \times g$ 离心20 min,取上清液,使用考马斯亮蓝方法进行蛋白定量,100 $^{\circ}$ C变性10 min。根据蛋白定量结果以每孔20 μ g上样,用SDS-PAGE分离,湿转法转至PVDF膜,用5% BSA室温封闭1 h,一抗孵育过夜(稀释浓度均为1:1 000),TBST洗膜3次,加入HRP标记二抗室温孵育1 h,洗膜3次,用ECL显影液显色,ChemiDoc化学发光凝胶成像系统检测蛋白条带灰度值,以 β -actin为内参计算目的蛋白的相对表达水平。

1.8 siRNA转染

将SKOV3、A2780细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,过夜后去除完全培养基,加入1 mL Opti-MEM,随后将5 μ L si-NC或si-GSDMD溶液加入到500 μ L Opti-MEM培养基中,轻柔混合后静置5 min;同时将5 μ L Lipofectamine3000加入500 μ L Opti-MEM培养基中,轻柔混合后静置5 min。上述两者混合后静置20 min,将混合液缓慢加入6孔板中,24 h后换为完全培养基,继续培养至72 h时收集细胞进行WB验证敲减效果。用于功能学实验的细胞于转染后培养至72 h,加入含有100 nmol/L Buf的完全培养基,继续培养48 h后,收集细胞用于流式细胞术和LDH毒性检测。GSDMD的siRNA序列:正义链为5'-GCACCUCAAUGAAUGUGUATT-3',反义链为5'-UACACA UUCAUUGAGGUGCTT-3'。

1.9 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次以上。用

GraphPad Prism10进行数据分析及作图。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用Shapiro-Wilk检验来检验其正态性,两组间分析采用非配对 t 检验比较非配对组之间的差异,多组间分析采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Buf显著抑制卵巢癌细胞的增殖与迁移能力

作为蟾蜍毒素的主要活性成分之一,Buf具有显著的抗肿瘤作用,其化学结构如图1A所示。CCK-8法检测结果(图1B)显示,Buf处理24 h时,A2780和SKOV3的 IC_{50} 分别为189.88 nmol/L和230.60 nmol/L,处理48 h时,A2780和SKOV3的 IC_{50} 分别为89.27 nmol/L和91.95 nmol/L。克隆形成实验检测结果(图1C)显示,与对照组相比,Buf处理组A2780和SKOV3细胞克隆形成数明显减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。划痕愈合实验检测结果(图1D)显示,与对照组相比,用100 nmol/L Buf处理48 h的细胞迁移率均明显降低(均 $P < 0.001$)。

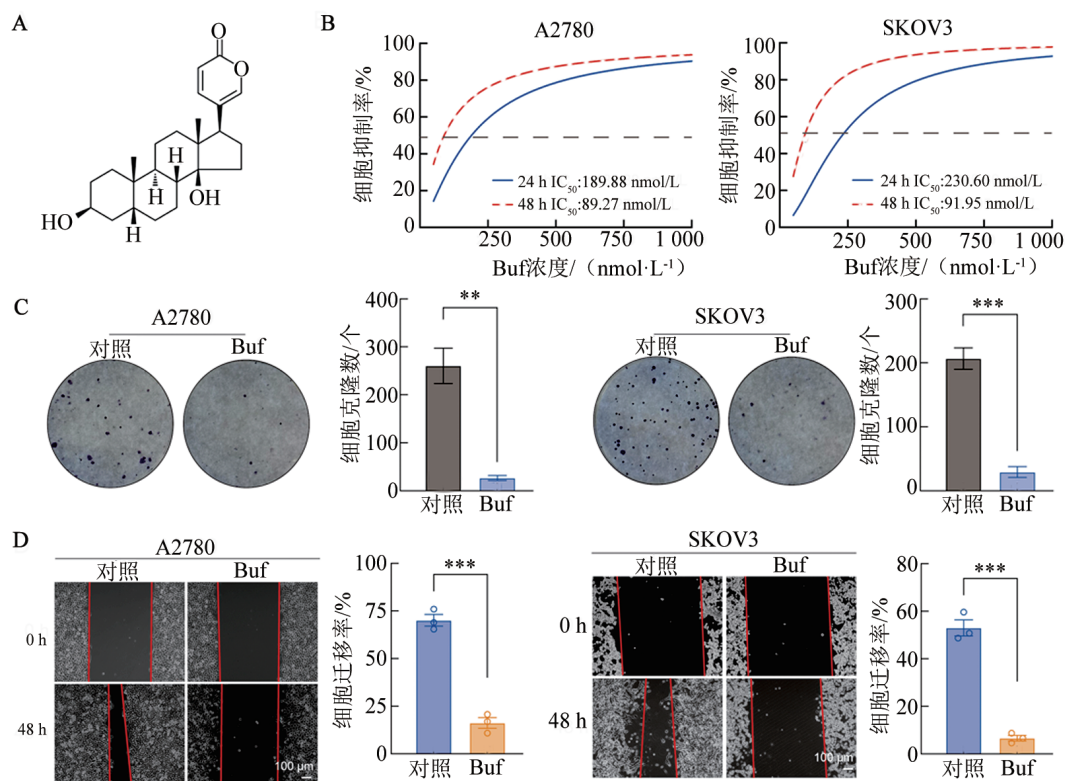
2.2 Buf诱导A2780和SKOV3细胞焦亡

用100 nmol/L Buf处理6 h后,显微镜下可观察到A2780和SKOV3细胞呈现胀大、破裂等焦亡特征(图2A)。用Buf处理24 h或48 h后,与对照组相比,A2780和SKOV3细胞LDH释放率明显升高(均 $P < 0.001$)(图2B)。细胞焦亡是一种程序性细胞死亡,其特点之一为细胞膜发生破裂,发生焦亡的细胞Annexin V和PI染色均表现为阳性,因此用流式细胞术进一步检测Buf处理后A2780和SKOV3细胞中的Annexin V⁺PI⁺细胞比例。流式细胞术检测结果(图2C)显示,Buf处理48 h后,A2780和SKOV3细胞中Annexin V⁺PI⁺细胞比例明显增多(均 $P < 0.001$)。为明确Buf诱导卵巢癌细胞死亡的机制,使用NLRP3抑制剂(MCC950)、细胞焦亡抑制剂(DSF)、泛CASP抑制剂(Z-VAD-FMK)、CASP3抑制剂(Z-DEVD-FMK)、细胞坏死性凋亡抑制剂(Nec-1)对A2780、SKOV3细胞进行预处理,再加入100 nmol/L Buf处理48 h,流式细胞术检测Annexin V⁺PI⁺细胞比例。结果(图2D)显示,与对照组相比,各抑制剂单独预处理对Annexin V⁺PI⁺细胞比例无显著影响;与Buf单药处理组相比,MCC950、DSF、Z-VAD-FMK预处理后加入Buf处理可以显著抑制Buf引起的细胞焦亡,即Annexin V⁺PI⁺细胞比例未发生明显变化(均 $P > 0.05$);与Buf单药处理组相比,Z-DEVD-FMK、Nec-1预处理后加入Buf处理无显著抑制作用,其Annexin V⁺PI⁺细胞比例显著升高(均 $P < 0.01$)。

2.3 Buf通过激活NLRP3/CASP1/GSDMD通路诱导A2780和SKOV3细胞焦亡

qPCR和WB法检测结果(图3A、B)显示,与对照组比较,Buf处理A2780和SKOV3细胞48 h后,其NLRP3、CASP1、GSDMD、IL-1 β 和IL-18的mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。用siRNA技术对A2780和SKOV3细胞中GSDMD进行敲减来验证Buf诱导细胞发生焦

亡的信号通路,WB法检测结果显示,GSDMD蛋白表达明显降低,表明在A2780和SKOV3细胞中成功地敲减了GSDMD表达(图3C)。LDH释放实验和流式细胞术检测结果(图3D、E)显示,使用100 nmol/L Buf处理敲减GSDMD表达的A2780和SKOV3细胞48 h后,其LDH释放率与Annexin V⁺PI⁺细胞比例均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.0001$)。



A:Buf的分子结构;B:CCK-8法检测Buf对A2780和SKOV3细胞增殖活性的影响;C:克隆形成实验检测Buf对A2780和SKOV3细胞克隆形成能力的影响;D:划痕愈合实验检测Buf对A2780和SKOV3细胞迁移能力的影响。
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图1 Buf对A2780和SKOV3细胞增殖和迁移的影响

2.4 Buf与DDP杀伤卵巢癌细胞具有协同效应

为探索Buf治疗卵巢癌的临床潜力,本研究进一步评估了其与传统化疗药物DDP的协同效应。首先,采用不同浓度Buf与DDP处理A2780和SKOV3细胞,SynergyFinder分析结果(图4A)显示,Buf与DDP在两种细胞中的协同性评价分数[最高单药模型(highest single agent, HSA)]分别为8.02和9.05(均 $P < 0.0001$)。流式细胞术检测结果(图4B)显示,与DDP单药处理相比,Buf和DDP联合处理A2780和SKOV3细胞,其细胞凋亡比例均明显增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。此外,流式细胞术检测结果(图4C)显示,在DDP耐药细胞A2780/DDP和SKOV3/DDP中,与对照处理或DDP单药处理相比,Buf和DDP联合

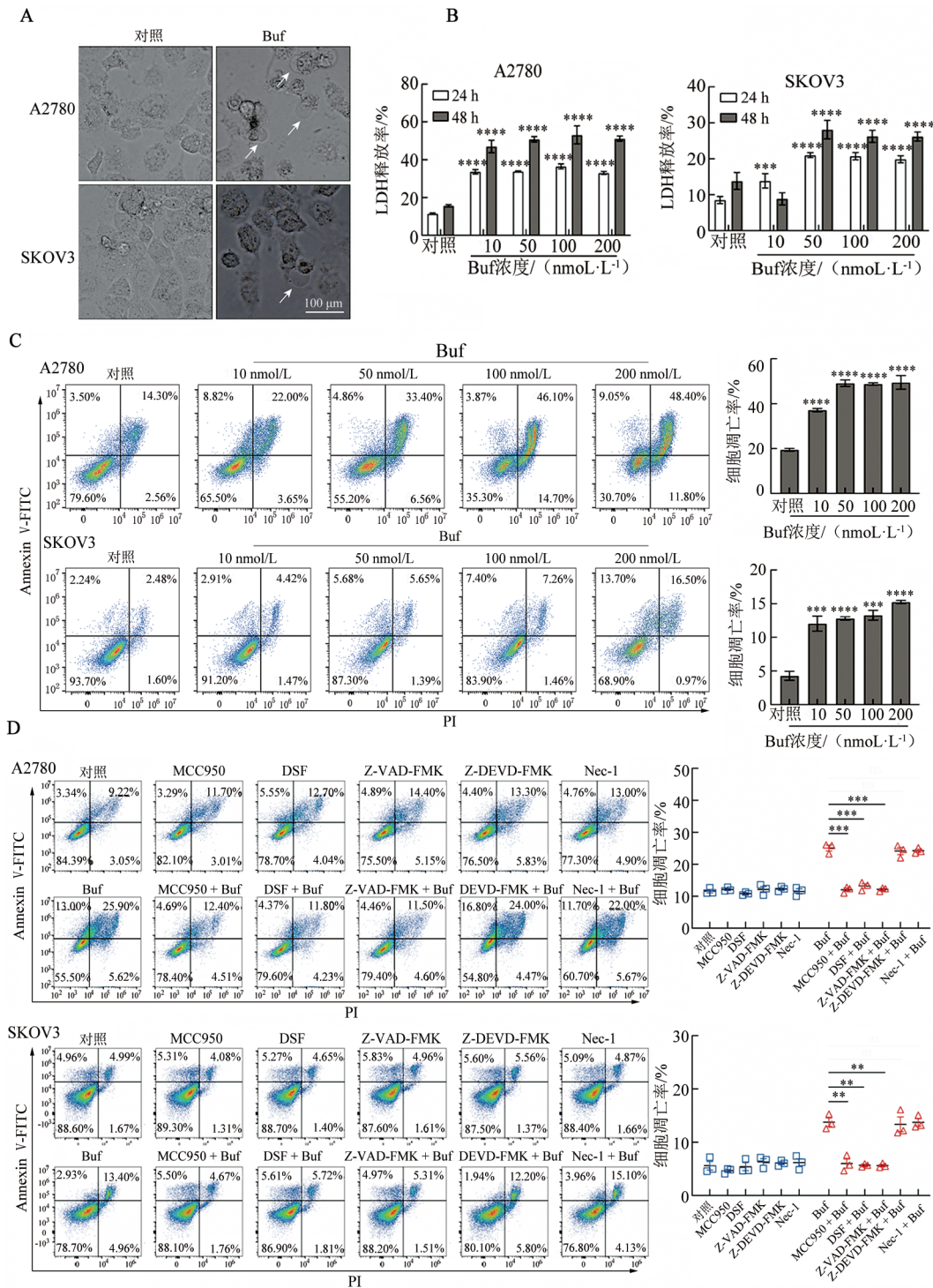
处理同样可以显著诱导细胞凋亡($P < 0.001$)。

qPCR和WB法检测结果(图5A、B)显示,在A2780和SKOV3细胞中,Buf和DDP联合处理显著上调了促凋亡分子BAX、CASP3、CASP9的mRNA和蛋白表达水平(均 $P < 0.001$),同时下调了抗凋亡分子BCL2的mRNA和蛋白表达水平(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

卵巢癌具有发病隐匿、进展迅速和预后较差等特点,以DDP为代表的传统化疗药物对其治疗效果不佳,传统中医药物有望为卵巢癌患者提供新的治疗思路^[8-9]。本研究证实了Buf对卵巢癌细胞的杀伤效应。Buf通过激活NLRP3/CASP1/GSDMD通路诱

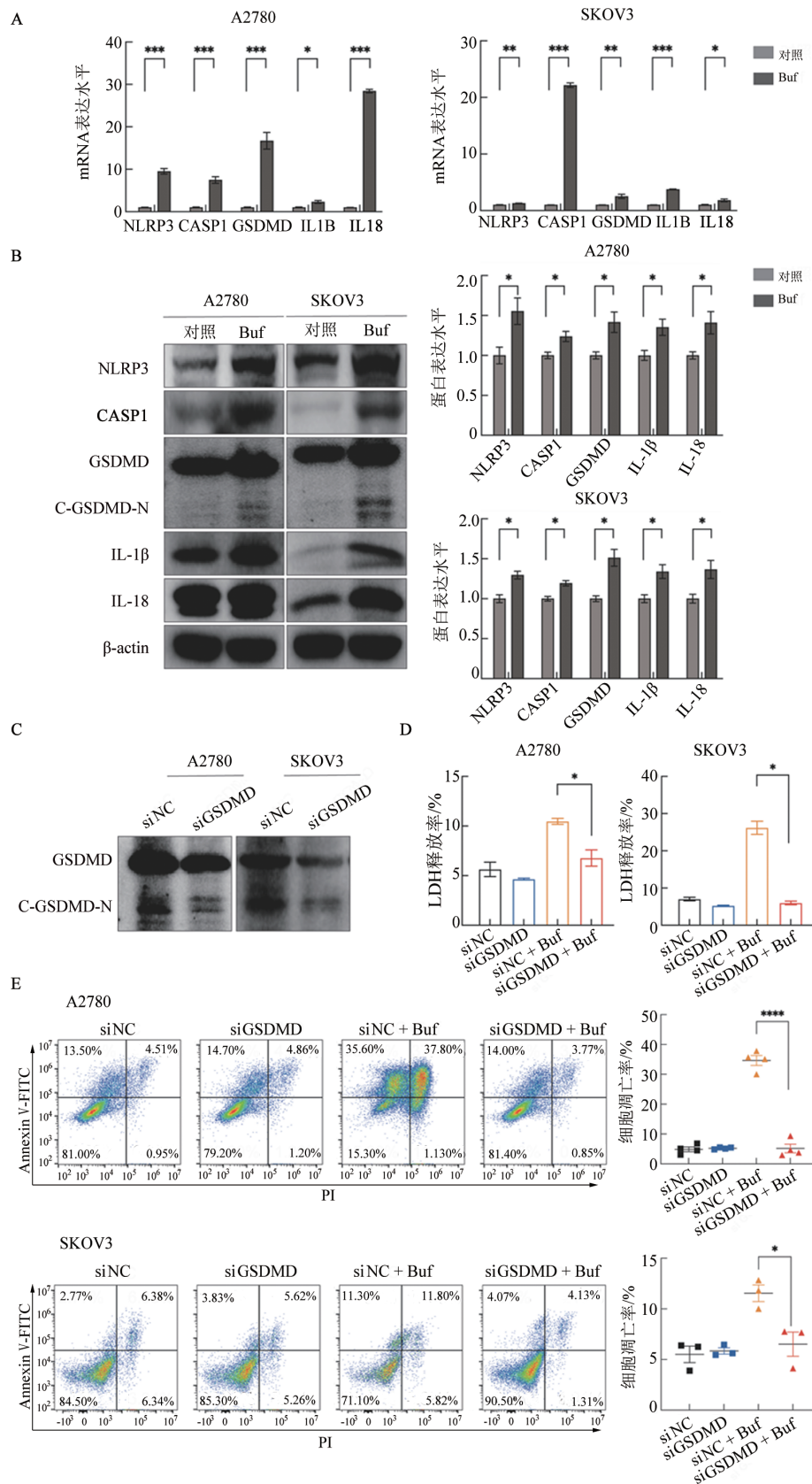
导卵巢癌细胞发生焦亡, 而且 Buf 与 DDP 联合应用 巢癌细胞凋亡。
在体外显著抑制卵巢癌细胞增殖, 促进 DDP 耐药卵



A: Buf 处理后 A2780 和 SKOV3 细胞的形态变化; B: LDH 释放实验检测 Buf 对 A2780 和 SKOV3 细胞释放 LDH 的影响; C: 流式细胞术检测 Buf 处理后 A2780 和 SKOV3 细胞中 Annexin V⁺PI⁺ 细胞比例; D: 流式细胞术检测 MCC950、DSF、Z-VAD-FMK、Z-DEVD-FMK、Nec-1 预处理 A2780 和 SKOV3 细胞, 再加入 Buf 处理后 Annexin V⁺PI⁺ 细胞的比例。

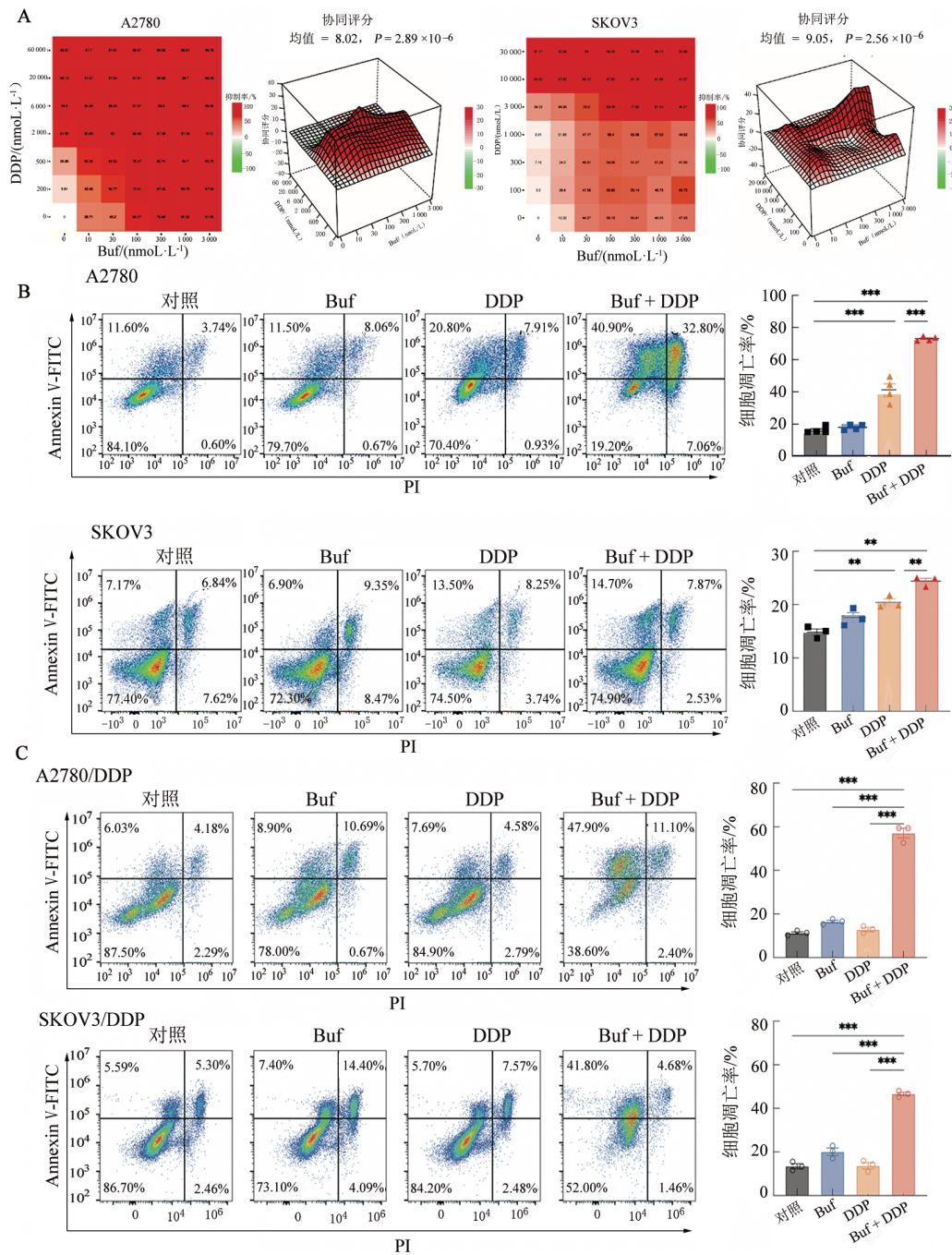
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图2 Buf 诱导 A2780 和 SKOV3 细胞焦亡



A: qPCR法检测Buf处理后A2780和SKOV3细胞中NLRP3、CASP1、GSDMD、IL1B和IL18的mRNA表达; B: WB法检测Buf处理后A2780和SKOV3细胞中NLRP3、CASP1、GSDMD、IL-1β和IL-18的蛋白表达; C: WB法验证siRNA转染后A2780和SKOV3细胞中GSDMD的表达; D: LDH释放实验检测Buf对敲减GSDMD表达的A2780和SKOV3细胞LDH释放的影响; E: 流式细胞术检测Buf对敲减GSDMD表达的A2780和SKOV3细胞中Annexin V⁺PI⁺细胞比例的影响。**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.000 1。

图3 Buf对A2780和SKOV3细胞NLRP3/CASP1/GSDMD信号通路的影响

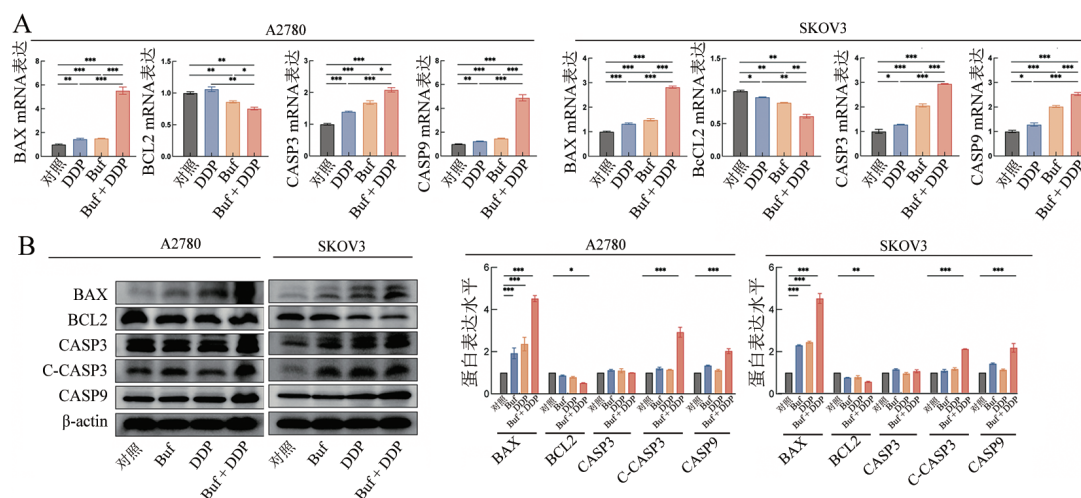


A: SynergyFinder分析Buf与DDP对A2780和SKOV3细胞的协同作用; B: 流式细胞术检测Buf与DDP处理后A2780和SKOV3细胞凋亡情况; C: 流式细胞术检测Buf与DDP处理后A2780/DDP和SKOV3/DDP细胞凋亡情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图4 Buf与DDP处理A2780和SKOV3细胞的体外协同效应

已有研究^[7, 10-11]表明, Buf可以通过诱导肿瘤细胞坏死和凋亡杀伤三阴性乳腺癌细胞、多发性骨髓瘤细胞以及肝癌细胞。研究^[12-13]表明, Buf可通过下调表皮生长因子受体通路来抑制卵巢癌细胞增殖; 通过抑制整合素 $\beta 2$ /焦点黏附激酶信号通路来抑制卵巢癌细胞糖酵解过程, 从而抑制卵巢癌细胞增殖。本研究表明, Buf能够显著抑制卵巢癌细胞增殖, 并诱导其发生焦亡。细胞焦亡属于程序性细胞死亡, 其

核心机制是通过炎性小体激活CASP1, 从而裂解GSDMD形成膜孔, 导致细胞破裂, 以及IL-1 β 、IL-18的释放^[14-15]。本研究表明, Buf处理卵巢癌细胞后呈现经典细胞焦亡相关细胞形态学改变, 且其NLRP3、CASP1、GSDMD的mRNA及蛋白表达水平显著上调, 同时伴随LDH的释放用细胞焦亡抑制剂或者敲减GSDMD表达可以显著抑制Buf对卵巢癌细胞的抑制作用。



A: qPCR法检测Buf与DDP处理后A2780和SKOV3细胞中BAX、BCL2、CASP3、CASP9的mRNA表达水平; B: WB法检测Buf与DDP处理后A2780和SKOV3细胞中BAX、BCL-2、pro-CASP3、CASP3、CASP9的蛋白表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图5 Buf与DDP处理A2780和SKOV3细胞的凋亡相关分子表达

值得关注的是,细胞焦亡不仅可以引起细胞死亡,还可通过IL-1 β 与IL-18的释放进一步重塑肿瘤免疫微环境,增强T细胞与NK细胞对肿瘤的杀伤能力^[16-17]。有研究^[18-19]表明,在肝细胞癌中,Buf可以通过诱导肿瘤免疫微环境中M2型巨噬细胞向M1型极化,增强抗肿瘤免疫反应,且提升PD-1抑制剂的疗效。因此推测,Buf也可能改善卵巢癌肿瘤免疫微环境,为改善免疫检查点抑制剂在卵巢癌中疗效不佳的现状提供了潜在的解决方案。

另一方面,DDP作为卵巢癌治疗的一线药物,尽管在初始治疗中疗效良好,但耐药问题普遍存在。Buf与DDP联合处理卵巢癌细胞具有协同效应。DDP通过诱导卵巢癌细胞发生细胞凋亡发挥细胞毒性,本研究提示Buf与DDP联合应用可以上调卵巢癌细胞中促凋亡相关基因表达,抑制抗凋亡相关基因表达,促进DDP耐药卵巢癌细胞发生凋亡,这一点与既往研究^[20]中关于Buf可以逆转结直肠癌细胞DDP耐药的结论一致。

尽管本研究为Buf的抗卵巢癌作用机制提供了新的见解,但仍存有一定的局限性。首先,所有研究数据均来自体外实验,缺乏动物模型对Buf治疗效果及安全性评估,后续需要通过体内实验进行疗效验证及毒理学研究;其次,Buf诱导细胞焦亡后的免疫因子释放以及其对于肿瘤免疫微环境的影响尚未深入研究;最后,Buf与DDP联合治疗顺铂耐药性卵巢癌的疗效及其依赖的机制需要进一步验证。

综上所述,本研究结果表明,Buf可以通过NLRP3/CASP1/GSDMD通路诱导卵巢癌细胞焦亡,且与DDP联合应用展现出良好的协同作用。这一发现拓宽了Buf作为天然药物在卵巢癌治疗中的应用

前景,为卵巢癌的多元联合治疗策略提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] SONG M D, CUI M X, LIU K H. Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. Eur J Med Chem, 2022, 232: 114205. DOI:10.1016/j.ejmech.2022.114205.
- [2] YANG L, XIE H J, LI Y Y, et al. Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer[J]. Oncol Rep, 2022, 47(4): 82. DOI:10.3892/or.2022.8293.
- [3] WANG A H, WANG Y, DU C X, et al. Pyroptosis and the tumor immune microenvironment: a new battlefield in ovarian cancer treatment[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2024, 1879(2): 189058. DOI:10.1016/j.bbcan.2023.189058.
- [4] RAO Z P, ZHU Y T, YANG P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer[J]. Theranostics, 2022, 12(9): 4310-4329. DOI: 10.7150/thno.71086.
- [5] SOUMOY L, GHANEM G E, SAUSSEZ S, et al. Bufalin for an innovative therapeutic approach against cancer[J]. Pharmacol Res, 2022, 184: 106442. DOI:10.1016/j.phrs.2022.106442.
- [6] LI B, TAN S, YU X, et al. Bufalin: a promising therapeutic drug against the cisplatin-resistance of ovarian cancer by targeting the USP36/c-Myc axis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 733: 150440. DOI:10.1016/j.bbrc.2024.150440.
- [7] CHEN G, ZHANG H H, SUN H X, et al. Bufalin targeting BFAR inhibits the occurrence and metastasis of gastric cancer through PI3K/AKT/mTOR signal pathway[J]. Apoptosis, 2023, 28(9/10): 1390-1405. DOI:10.1007/s10495-023-01855-z.
- [8] DUAN M R, LENG S G, MAO P. Cisplatin in the era of PARP inhibitors and immunotherapy[J]. Pharmacol Ther, 2024, 258: 108642. DOI:10.1016/j.pharmthera.2024.108642.
- [9] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49. DOI:10.3322/caac.21820.
- [10] LIU X D, SONG C Y, KONG C C, et al. Bufalin induces programmed necroptosis in triple-negative breast cancer drug-resistant cell lines

- through RIP1/ROS-mediated pathway[J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28(10): 900-908. DOI:10.1007/s11655-021-3458-7.
- [11] GU C Y, WANG Y J, ZHANG L L, et al. AHS1 is a promising therapeutic target for cellular proliferation and proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 11. DOI:10.1186/s13046-021-02220-1.
- [12] DOU L, ZOU D, SONG F R, et al. Bufalin suppresses ovarian cancer cell proliferation *via* EGFR pathway[J]. *Chin Med J*, 2022, 135(4): 456-461. DOI:10.1097/cm9.0000000000001879.
- [13] LI H R, HU S, PANG Y Y, et al. Bufalin inhibits glycolysis-induced cell growth and proliferation through the suppression of Integrin β 2/FAK signaling pathway in ovarian cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(7): 1288-1296.
- [14] ZHANG D Y, CHEN Y X, SUN Y, et al. Gambogic acid induces GSDME dependent pyroptotic signaling pathway *via* ROS/P53/mitochondria/caspase-3 in ovarian cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2025, 232: 116695. DOI:10.1016/j.bcp.2024.116695.
- [15] XU H J, ZHANG D Y, WEI R, et al. Gambogic acid induces pyroptosis of colorectal cancer cells through the GSDME-dependent pathway and elicits an antitumor immune response[J]. *Cancers*, 2022, 14(22): 5505. DOI:10.3390/cancers14225505.
- [16] LU F, ZHAO Y N, PANG Y H, et al. NLRP3 inflammasome upregulates PD-L1 expression and contributes to immune suppression in lymphoma[J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 178-189. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.10.024.
- [17] PAN W J, JIA Z Y, DU J T, et al. NLRP3 inflammasome upregulates PD-L1 in ovarian cancer and contributes to an immunosuppressive microenvironment[J]. *Immunotargets Ther*, 2024, 13: 775-788. DOI:10.2147/ITT.S495564.
- [18] YU Z, LI Y Y, LI Y, et al. Bufalin stimulates antitumor immune response by driving tumor-infiltrating macrophage toward M1 phenotype in hepatocellular carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(5): e004297. DOI:10.1136/jitc-2021-004297.
- [19] CHEN J B, WANG H J, JIA L L, et al. Bufalin targets the SRC-3/MIF pathway in chemoresistant cells to regulate M2 macrophage polarization in colorectal cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 513: 63-74. DOI:10.1016/j.canlet.2021.05.008.
- [20] SUN J, XU K, QIU Y Y, et al. Bufalin reverses acquired drug resistance by inhibiting stemness in colorectal cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1420-1430. DOI:10.3892/or.2017.5826.

[收稿日期] 2025-11-06

[修回日期] 2026-01-15

[本文编辑] 向正华