

[文章编号] 1000-4718(2024)02-0282-09

基于 p53/SLC7A11/GPX4 信号轴探讨七叶内酯诱导小鼠乳腺癌 4T1 细胞铁死亡的作用机制*

何丹^{1,4}, 李琳霁², 谭小宁², 郜文辉³, 田雪飞^{4Δ}, 曾普华^{1Δ}¹湖南省中医药研究院, 湖南长沙 410006; ²湖南省中医药研究院附属医院, 湖南长沙 410006;³湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; ⁴湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208)

[摘要] 目的: 探讨七叶内酯对小鼠乳腺癌 4T1 细胞铁死亡的影响及其作用机制。方法: 对七叶内酯与 p53、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 进行分子对接, 并绘制 Kaplan-Meier 和 time ROC 曲线。将 4T1 细胞分为对照组、1/2 IC₅₀ 组、IC₅₀ 组、2 IC₅₀ 组、erastin 组和卡培他滨组。采用 CCK-8 法观察 4T1 细胞活力情况, 筛选药物干预浓度; 电镜观察 4T1 细胞线粒体形态, 评估线粒体损伤情况; 试剂盒检测 4T1 细胞活性氧 (ROS)、Fe²⁺、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 和 GPX4 的水平; 采用划痕和 Transwell 小室实验检测 4T1 细胞侵袭和迁移能力; Western blot 检测 p53、SLC7A11、GPX4 和酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 的表达水平。结果: 与对照组相比, 七叶内酯 1/2 IC₅₀、IC₅₀ 和 2 IC₅₀ 组细胞活力, GSH 和 GPX4 表达水平, 侵袭和迁移能力, 以及 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平均降低, 细胞线粒体变小, 膜密度增高, 减少 ($P < 0.05$), Fe²⁺、ROS 和 MDA 水平及 p53 和 ACSL4 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。结论: 七叶内酯可促进 4T1 细胞铁死亡, 其作用机制可能与 p53/SLC7A11/GPX4 信号通路相关。

[关键词] 乳腺癌; 七叶内酯; 铁死亡; p53/SLC7A11/GPX4 信号通路**[中图分类号]** R737.9; R363.2 **[文献标志码]** A doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2024.02.011

Mechanism of esculetin promoting ferroptosis of mouse breast cancer 4T1 cells based on p53/SLC7A11/GPX4 axis

HE Dan^{1,4}, LI Linpei², TAN Xiaoning², GAO Wenhui³, TIAN Xuefei^{4Δ}, ZENG Puhua^{1Δ}¹Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China; ²The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China; ³Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; ⁴Hunan University of Chinese Medicine, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Changsha 410208, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the mechanism through which esculetin induces ferroptosis of mouse breast cancer 4T1 cells. **METHODS:** Molecular docking of esculetin with p53, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) proteins was performed, and Kaplan-Meier curves and time-dependent receiver operating characteristic curves were drawn. The 4T1 cells were divided into 6 groups, namely the control (CON), 1/2 IC₅₀, IC₅₀, 2 IC₅₀, erastin, and capecitabine groups. The appropriate drug concentration for treating 4T1 cells was screened by CCK-8 assay. The invasion and migration abilities of 4T1 cells following esculetin treatment at the selected drug concentration were analyzed by scratch test and Transwell assay. Mitochondrial morphological change were examined by electron microscopy. The levels of ferroptotic cell death were then quantified by Fe²⁺, reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and GPX4 assays. Western blot was performed to evaluate the protein levels of p53, SLC7A11, GPX4 and acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4). **RESULTS:** Compared with CON group, the esculetin 1/2 IC₅₀, IC₅₀ and 2 IC₅₀ groups showed smaller size, increased membrane density, and decreased

[收稿日期] 2023-10-20 **[修回日期]** 2023-12-08

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 82074425); 国家中医药管理局青年岐黄学者人才项目; 湖南省科技拔尖领军人才项目; 湖南省卫生健康委高层次领军人才项目和中医药神农工程领军人才项目; 湖南省重点研发项目 (No. 2021SK2006); 湖南省自然基金资助项目 (No. 2021JJ30417); 中国博士后科学基金第 73 批面上资助项目 (No. 2023M731069); 湖南省中医药管理局项目 (No. B2023086); 湖南省卫健委项目 (No. 20231748)

Δ 通讯作者 曾普华 E-mail: zph120@126.com; 田雪飞 E-mail: 003640@hnuicm.edu.cn

ridge of mitochondria, as well as decreased levels of GSH and GPX4, reduced cell invasion and migration abilities, and decreased levels of SLC7A11 and GPX4 proteins ($P < 0.05$). Furthermore, these groups exhibited increased levels of Fe^{2+} , ROS, and MDA, as well as elevated p53 and ACSL4 protein abundance ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Esculetin promotes ferroptosis of 4T1 cells through a mechanism involving the p53/SLC7A11/GPX4 regulatory axis.

[**KEY WORDS**] breast cancer; esculetin; ferroptosis; p53/SLC7A11/GPX4 signaling pathway

据 2020 年国际肿瘤研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 数据显示, 乳腺癌在我国女性肿瘤新发病例中位居第一^[1]。约 5% 的患者确诊即为乳腺癌晚期, 失去最佳手术机会, 40% 患者即使进行标准治疗仍会进展为晚期, 且恶性程度高, 治疗手段局限, 导致乳腺癌患者预后较差, 治疗效果不理想^[2]。

近年来, 中医药在乳腺癌综合治疗中的地位越来越重要。透骨草是大戟科地构叶属植物地构叶 [*Phryma leptostachya subsp. asiatica* (Hara) Kitamura] 的全草, 具有祛风除湿、舒筋活血、散瘀消肿和解毒止痛之功效^[3]。现代药理学研究证明, 透骨草在镇痛、抗炎、抗肿瘤等方面具有广泛的药理学作用^[4]。七叶内酯 (esculetin) 是透骨草的主要活性成分之一^[5]。研究发现, 七叶内酯不仅具有抗氧化、抗炎和抗凋亡等药理活性, 在抗肿瘤方面也凸显出重要作用, 但其具体作用机制未明^[6]。

因此, 本研究旨在探讨七叶内酯对小鼠乳腺癌 4T1 细胞的影响及其可能的作用机制, 以期为七叶内酯的抗肿瘤作用提供实验基础及理论支撑。

材 料 和 方 法

1 生信分析

1.1 分子对接 从 PubChem 下载七叶内酯的 3D 化学结构图和 SDF 文件, 使用 Pymol 将其转换为 PDB 格式, 然后使用 AutoDockTools 将 PDB 格式转换为 PDBQT 文件。文件转换后使用 Autodock Vina 进行分子对接, 通过 Pymol 构建分子对接结合位点图。

1.2 生存分析 采用 R 软件 survival、survminer 包, 绘制 Kaplan-Meier 曲线, 根据基因表达的中位数分为高 (high)、低 (low) 两组, 分别评估铁死亡 (ferroptosis) 相关蛋白 p53、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7, member 11, SLC7A11) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 对乳腺癌患者生存状况的影响。采用 R 软件 time-ROC 包, 绘制时间依赖性受试者工作特征 (time-receiver operating characteristic, time-ROC) 曲线, 分别评估铁死亡相关蛋白 p53、SLC7A11 和 GPX4 对乳腺癌患者 1、3 和 5 年的生存预测效能。

2 体外实验

2.1 药品及试剂 七叶内酯 (GC38236) 购于 GLP BIO; 阳性对照药卡培他滨 (capecitabine; 220618KF) 购于江苏恒瑞医药股份有限公司; 铁死亡诱导剂 erastin (B1524) 和铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 (Fer-1; A4371) 购于 APEX BIO; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (YD-20206)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (YD-20344) 和 GPX4 试剂盒 (YD-28280) 购于厦门仑昌硕生物科技有限公司; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒 (E004-1-1) 购于南京建成生物工程研究所; 亚铁离子 (Fe^{2+}) 试剂盒 (TC1015) 购于雷根生物科技有限公司; GPX4 抗体 (sc-166570) 和酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 抗体 (sc-365230) 购自 Santa Cruz; SLC7A11 抗体 (MA5-44922) 购自 Thermo Fisher; p53 抗体 (ab26) 购自 Abcam。

2.2 细胞及细胞培养 小鼠源性乳腺癌 4T1 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 1640 培养基置于二氧化碳培养箱 (37 °C、5% CO_2) 中培养, 隔天观察细胞贴壁情况并换液, 传代时间为 3~4 d。选用对数生长期细胞进行下一步实验。

2.3 分组及干预 实验共设 6 组, 分别为对照 (control) 组、1/2 IC_{50} 组、 IC_{50} 组、2 IC_{50} 组、erastin 组和卡培他滨组, 每组 5 个复孔, 重复 3 次。其中, 对照组不用药物处理, 药物干预组按 CCK-8 实验结果分别用不同剂量七叶内酯 (25、50 和 100 mg/L)、erastin (10 μ g/L)、卡培他滨 (1 mg/L) 干预 24 h。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 CCK-8 细胞活力检测 采用 CCK-8 检测七叶内酯不同浓度对 4T1 细胞毒性和活力的影响, 筛选药物干预浓度。4T1 细胞按每孔 5×10^3 个的密度种于 96 孔板, 过夜后分别用不同浓度七叶内酯处理 24 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液孵育 1 h, 酶标仪在 450 nm 处检测吸光度 (A) 值。实验每组 5 个复孔, 重复 3 次。

2.4.2 电镜观察线粒体形态 4T1 细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板, 药物干预 24 h 后收集细

胞,电镜固定液室温避光固定 30 min,4 °C 过夜,脱水、包埋、切片、染色,并在电镜下观察细胞线粒体形态改变,评估线粒体损伤情况。

2.4.3 荧光探针法检测细胞内 ROS 水平 4T1 细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板,孵育过夜后用相应药物干预 24 h,每孔加入 500 μ L 终浓度为 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 荧光素,入培养箱避光孵育 30 min,PBS 洗去未进入细胞的探针,置于荧光显微镜下观察 DCF 荧光强度。

2.4.4 试剂盒检测 Fe^{2+} 、MDA、GSH 和 GPX4 水平 4T1 细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板,药物干预 24 h 后收集细胞上清,按照相应试剂盒说明书检测 Fe^{2+} 、MDA、GSH 和 GPX4 水平,以反映 4T1 细胞脂质过氧化程度。

2.4.5 划痕实验 通过划痕实验检测细胞迁移能力。用直尺在 6 孔板底部均匀划横线,4T1 细胞以每孔 2×10^5 个的密度种板,过夜后用无菌枪头划痕,用 PBS 洗去不贴壁细胞,更换新鲜培养基,加入相应干预药物。分别于 0 h、12 h 和 24 h 在显微镜下拍照。

2.4.6 Transwell 小室实验 通过 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力。Matrigel 胶稀释后均匀涂抹于上室表面,37 °C 放置 0.5~1 h,使其聚合成凝胶。取对数生长期 4T1 细胞 100 μ L 加入上室,于培养箱中培养 24 h。取出小室,固定、染色、风干后高倍显

微镜下观察细胞。

2.4.7 Western blot 检测 p53、SLC7A11、GPX4 和 ACSL4 蛋白表达水平 4T1 细胞以每孔 7×10^5 个的密度接种于大皿,药物干预 24 h 后收集细胞,用预冷 PBS 清洗 3 遍后进行裂解、蛋白提取,使用 BCA 法进行蛋白定量后制样。配胶、上样、电泳、转膜、封闭、I 抗孵育、洗膜、II 抗孵育、洗膜、曝光后收集蛋白条带,分析灰度值。

3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料若为正态分布,用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)进行统计描述,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两均数比较采用 Tukey 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 生信分析

1.1 分子对接 将 p53、SLC7A11 和 GPX4 与七叶内酯进行分子对接,展示结合位点。结果表明,七叶内酯与 p53、SLC7A11 和 GPX4 具有良好的结合活性,在结合位点紧密相连,其结合能分别为 -7.1、-5.3 和 -7.0,对接结果中结合能(affinity 值)越小,说明七叶内酯与 p53、SLC7A11 和 GPX4 的相互作用越稳定(图 1)。

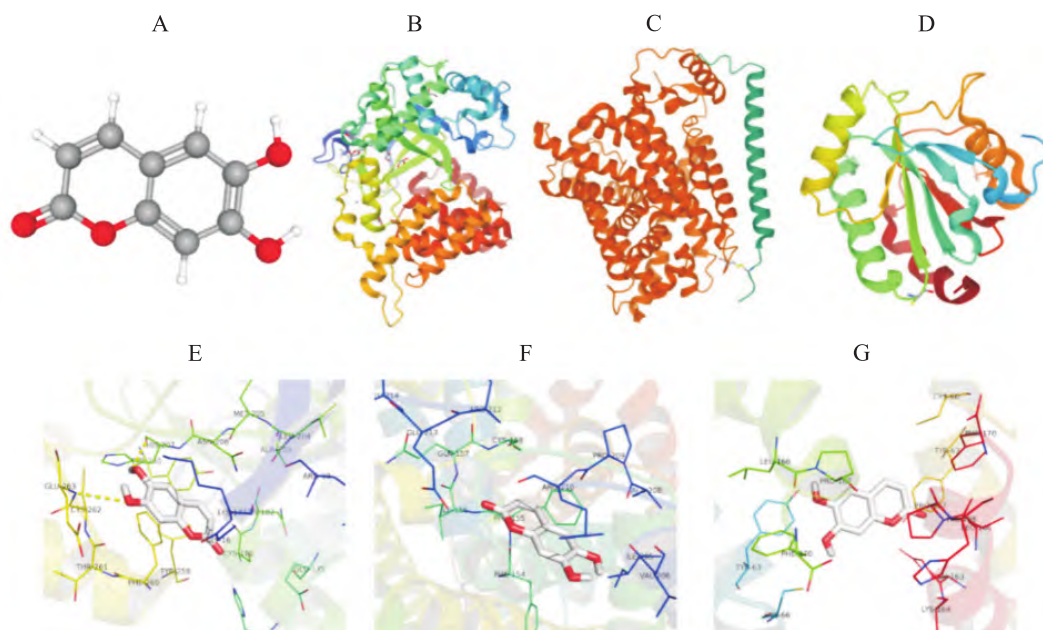


Figure 1. Molecular docking of esculetin with p53, SLC7A11 and GPX4. A: the 3D chemical structure chart of esculetin; B, C and D: the protein structure p53, SLC7A11 and GPX4; E, F and G: the binding site of esculetin with p53, SLC7A11 and GPX4.

图 1 七叶内酯与 p53、SLC7A11 和 GPX4 的分子对接

1.2 生存分析 Kaplan-Meier 和 time-ROC 生存预后分析均提示,在乳腺癌患者中,p53、SLC7A11 和

GPX4 的表达与其生存预后密切相关。Kaplan-Meier 曲线生存状况结果显示:p53、SLC7A11 和 GPX4 的表

达与乳腺癌患者的生存预后相关($P < 0.05$),见图2A~2C。time-ROC生存预测结果显示,p53在1、3和5年生存预后中的预测效能分别为0.502、0.474、0.505,SLC7A1的预测效能分别为0.493、0.597和0.548,GPX4的预测效能分别为0.603、0.468和0.438,见图2D~2F。

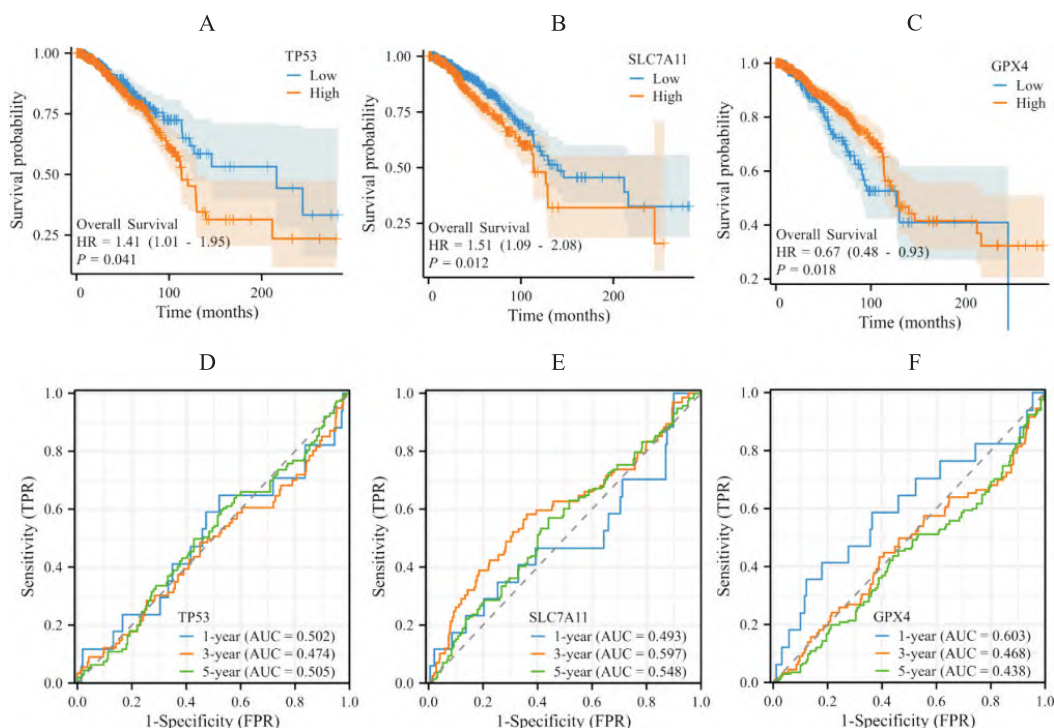


Figure 2. Prognostic analysis of p53, SLC7A11 and GPX4 in breast cancer patients. A, B and C: the Kaplan-Meier curves of p53, SLC7A11 and GPX4; D, E and F: the time-ROC curves of p53, SLC7A11 and GPX4.

图2 乳腺癌患者中p53、SLC7A11和GPX4的预后分析

2 体外实验

2.1 七叶内酯对4T1细胞活力的影响 CCK-8实验结果显示,与空白组比较,当七叶内酯浓度 ≤ 6.25 mg/L时,对4T1细胞活力未见明显抑制作用;当七叶内酯浓度为50 mg/L时,对4T1细胞的抑制率约为50%,即七叶内酯对4T1细胞的 IC_{50} 为50 mg/L;当七叶内酯浓度为100 mg/L时,对4T1细胞的抑制率 $\geq 50\%$ 。因此,后续实验中选取25 mg/L($1/2 IC_{50}$)、50 mg/L(IC_{50})和100 mg/L($2 IC_{50}$)作为七叶内酯的干预剂量(图3)。

2.2 七叶内酯对4T1细胞线粒体形态的影响 线粒体电镜结果显示,对照组细胞线粒体形态正常,结构完整,线粒体嵴的数目及形态正常,细胞核膜结构清晰;与对照组比较,七叶内酯能损伤线粒体形态,使线粒体嵴减少甚至消失,细胞核膜结构不清晰(图4)。

2.3 七叶内酯对4T1细胞ROS水平的影响 如图5所示,与对照组比较,七叶内酯干预能升高4T1细胞中ROS水平,其中七叶内酯 $1/2 IC_{50}$ 、 IC_{50} 和 $2 IC_{50}$ 组分别升高了21.49%、32.06%和45.17%($P < 0.05$);与

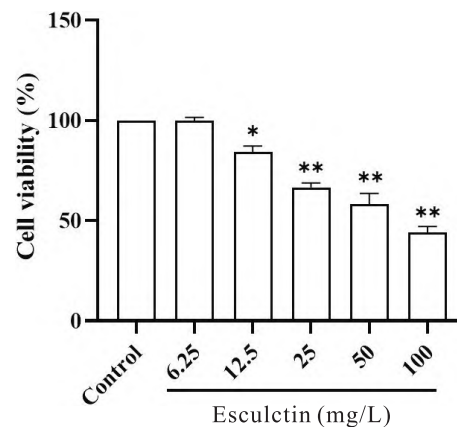


Figure 3. Effect of esculetin on the viability of 4T1 cells. CCK-8 was used to detect the effects of different concentrations of esculetin on the viability of 4T1 cells. Mean \pm SD. $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图3 七叶内酯对4T1细胞活力的影响

七叶内酯 IC_{50} 组比较,erastin和卡培他滨组ROS水平分别升高了15.82%和12.51%。

2.4 七叶内酯对4T1细胞脂质过氧化程度的影响 如图6所示,与对照组比较,七叶内酯干预能升高4T1细胞中 Fe^{2+} 和MDA水平,降低GSH和GPX4水

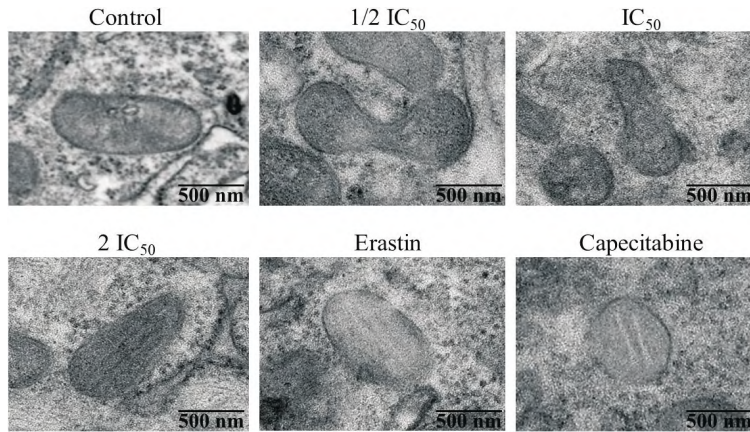


Figure 4. Effect of esculletin on mitochondrial morphology of 4T1 cells. After 24 h of drug intervention, the 4T1 cells were collected, and the morphological changes of mitochondria were observed under electron microscope.

图4 七叶内酯对4T1细胞线粒体形态的影响

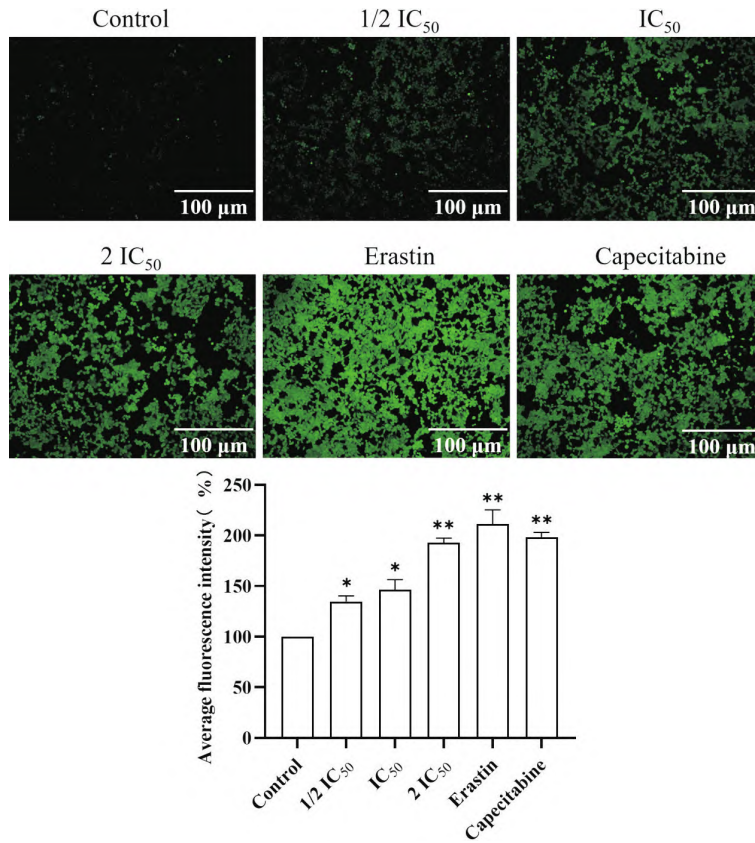


Figure 5. Effect of esculletin on ROS levels in 4T1 cells. The 4T1 cells were treated with DCFH-DA fluorescent probe for 30 min after 24 h of drug intervention, and the fluorescence intensity was observed under fluorescence microscope. Mean±SD. $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图5 七叶内酯对4T1细胞ROS水平的影响

平。其中,七叶内酯 1/2 IC₅₀、IC₅₀ 和 2 IC₅₀ 组 Fe²⁺ 及 MDA 水平分别升高了 1.85 倍、2.17 倍和 2.94 倍,以及 0.4 倍、2.1 倍和 3.82 倍 ($P<0.05$)。七叶内酯 1/2 IC₅₀、IC₅₀ 和 2 IC₅₀ 组 GSH 和 GPX4 水平分别降低了 0.22 倍、0.39 倍和 0.46 倍,以及 0.19 倍、0.38 倍和 0.49 倍 ($P<0.05$)。

2.5 七叶内酯对4T1细胞迁移能力的影响 如图7所示,对照组中4T1细胞生长状态及迁移能力良好,随时间推移划痕逐渐变窄,说明4T1细胞具有较好的迁移能力。与对照组比较,七叶内酯干预能降低4T1细胞的迁移能力 ($P<0.05$)。其中,0 h时各组细胞迁移能力无变化,12 h时可见细胞迁移,24 h时细

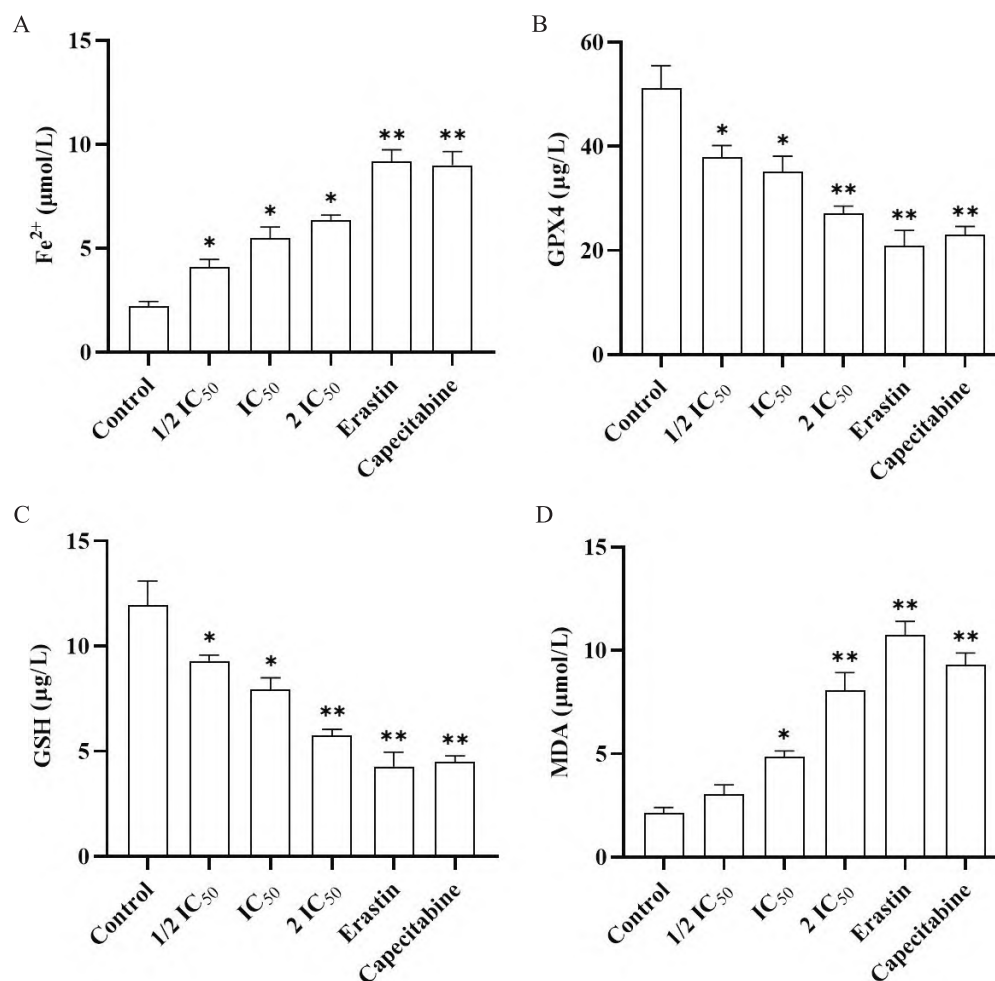


Figure 6. Effect of esculentin on the degree of lipid peroxidation in 4T1 cells. After 24 h of drug intervention, the 4T1 cell supernatant was collected and the levels of Fe²⁺ (A), GPX4 (B), GSH (C) and MDA (D) were detected by kits. Mean±SD. *n*=3. **P*< 0.05, ***P*<0.01 vs control group.

图6 七叶内酯对4T1细胞脂质过氧化程度的影响

胞药物干预组迁移缓慢,划痕较对照组增宽。

2.6 七叶内酯对4T1细胞侵袭能力的影响 如图8所示,对照组中4T1细胞穿膜数为307.60±28.95,七叶内酯1/2 IC₅₀组、IC₅₀组和2 IC₅₀组4T1细胞穿膜数分别为241.60±20.75、173.50±14.94和133.80±12.51,erastin和卡培他滨组4T1细胞穿膜数分别为130.6±11.24和116.2±10.85,显著低于对照组(*P*<0.05),提示七叶内酯、erastin和卡培他滨可抑制4T1细胞侵袭能力,且呈剂量依赖性。

2.7 七叶内酯对4T1细胞p53、SLC7A11、GPX4和ACSL4蛋白表达的影响 如图9所示,与对照组比较,七叶内酯、erastin和卡培他滨干预后的4T1细胞中SLC7A11和GPX4蛋白表达降低,p53和ACSL4蛋白表达升高(*P*<0.05),提示七叶内酯、erastin、卡培他滨可通过调控铁死亡相关的p53、SLC7A11、GPX4和ACSL4蛋白表达诱导4T1细胞铁死亡。

讨 论

七叶内酯是我国传统中药透骨草的重要活性成分。近年来,其抗肿瘤药理学活性在越来越多的研究中得到证实^[7-8]。erastin是一种铁死亡诱导剂,能够诱导非凋亡的细胞死亡,这种诱导效应取决于氧化应激水平和细胞铁的积累^[9]。卡培他滨是一种抗肿瘤药物,具有抑制细胞分裂、干扰蛋白质合成、抑制肿瘤生长等作用^[10]。铁死亡是一种铁依赖性的,不同于凋亡、自噬、坏死的细胞程序性死亡方式,近年来与肿瘤的发生发展密切相关^[11]。因此,本实验探讨了七叶内酯在乳腺癌4T1细胞铁死亡中的作用及其分子机制。

铁死亡的发生机制主要与细胞脂质过氧化以及抗氧化系统失活相关^[12]。在脂质过氧化中,Fe²⁺是铁死亡最直接的促进因素,是铁死亡的典型标志之一^[13]。Fe²⁺的累积会导致细胞膜脂质过氧化反应,甚

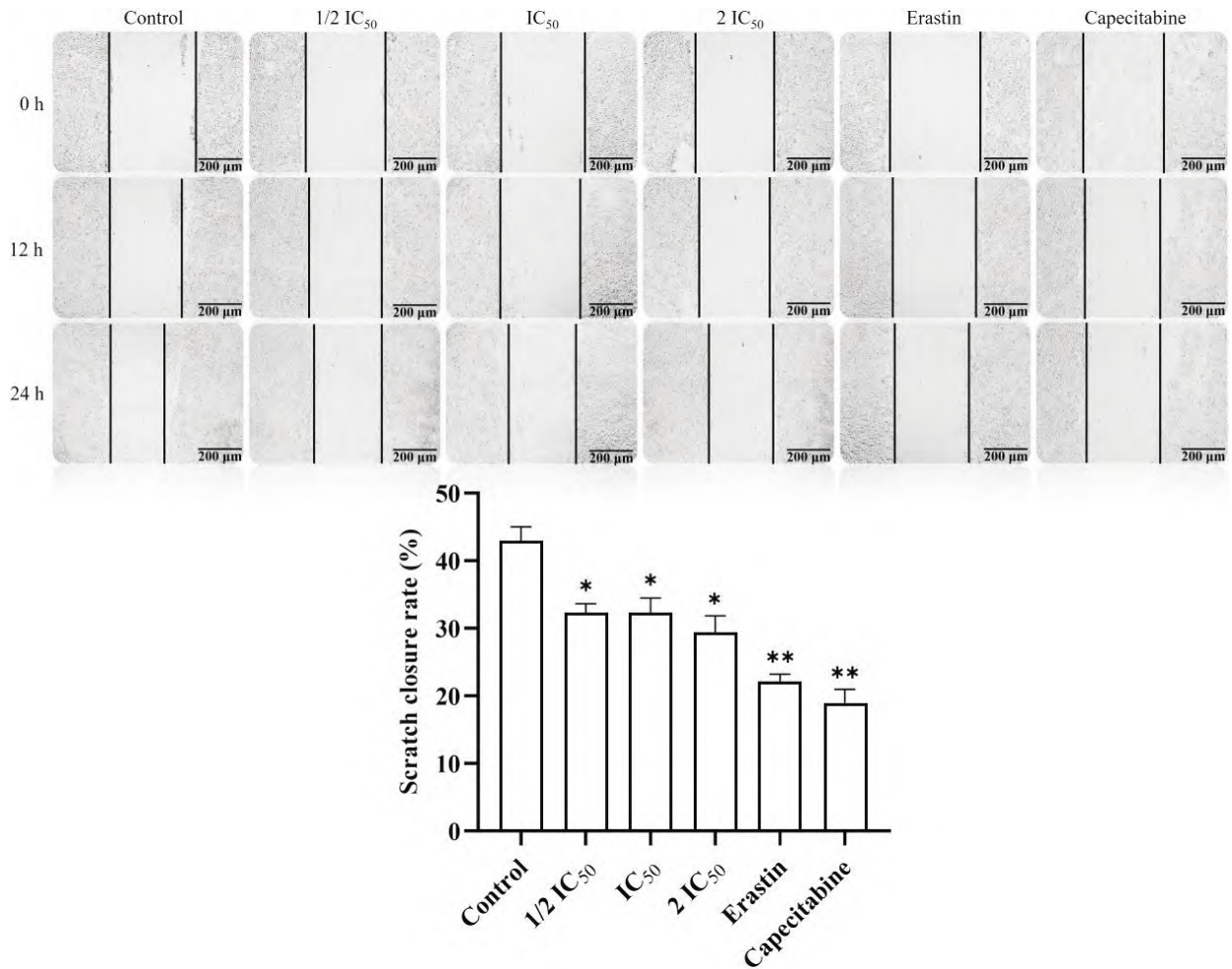


Figure 7. Effect of esculletin on migration ability of 4T1 cells. Scratch healing was observed at 0, 12 and 24 h after drug intervention. Mean±SD. n=3. *P<0.05, **P<0.01 vs control group.

图7 七叶内酯对4T1细胞迁移能力的影响

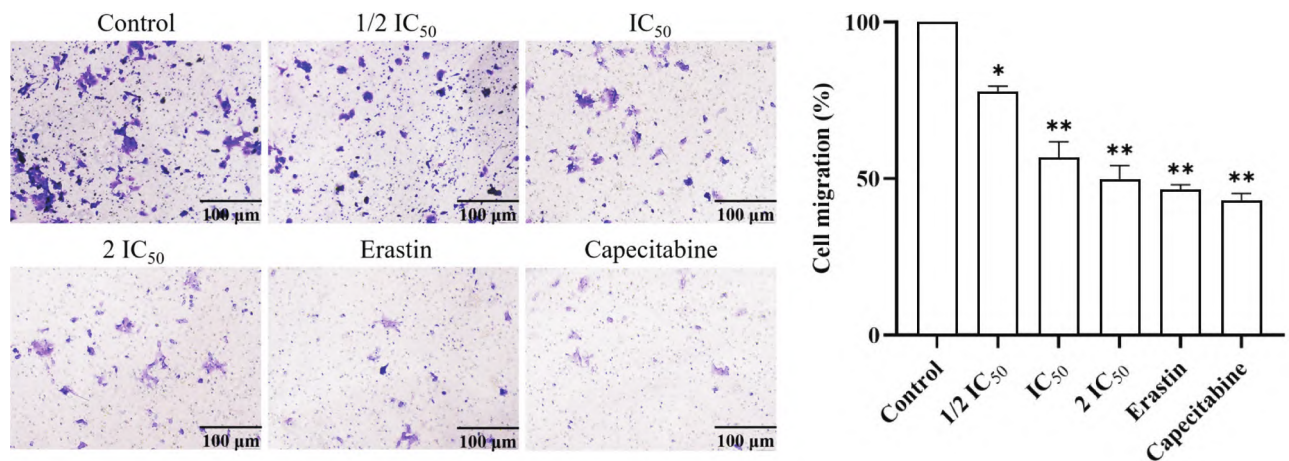


Figure 8. Effect of esculletin on the invasion ability of 4T1 cells. The invasion of 4T1 cells was observed after 24 h of drug intervention in Transwell chamber. Mean±SD. n=3. *P<0.05, **P<0.01 vs control group.

图8 七叶内酯对4T1细胞侵袭能力的影响

至诱导氧化应激,促进ROS和MDA大量累积,引起细胞死亡^[14]。在本实验中,我们以不同浓度(25、50和100 mg/L)的七叶内酯对4T1细胞进行了干预,结

果发现七叶内酯处理可明显降低细胞存活率。在Fe²⁺、ROS和MDA的检测中发现,七叶内酯干预后的4T1细胞中Fe²⁺、ROS和MDA水平升高,提示七叶内

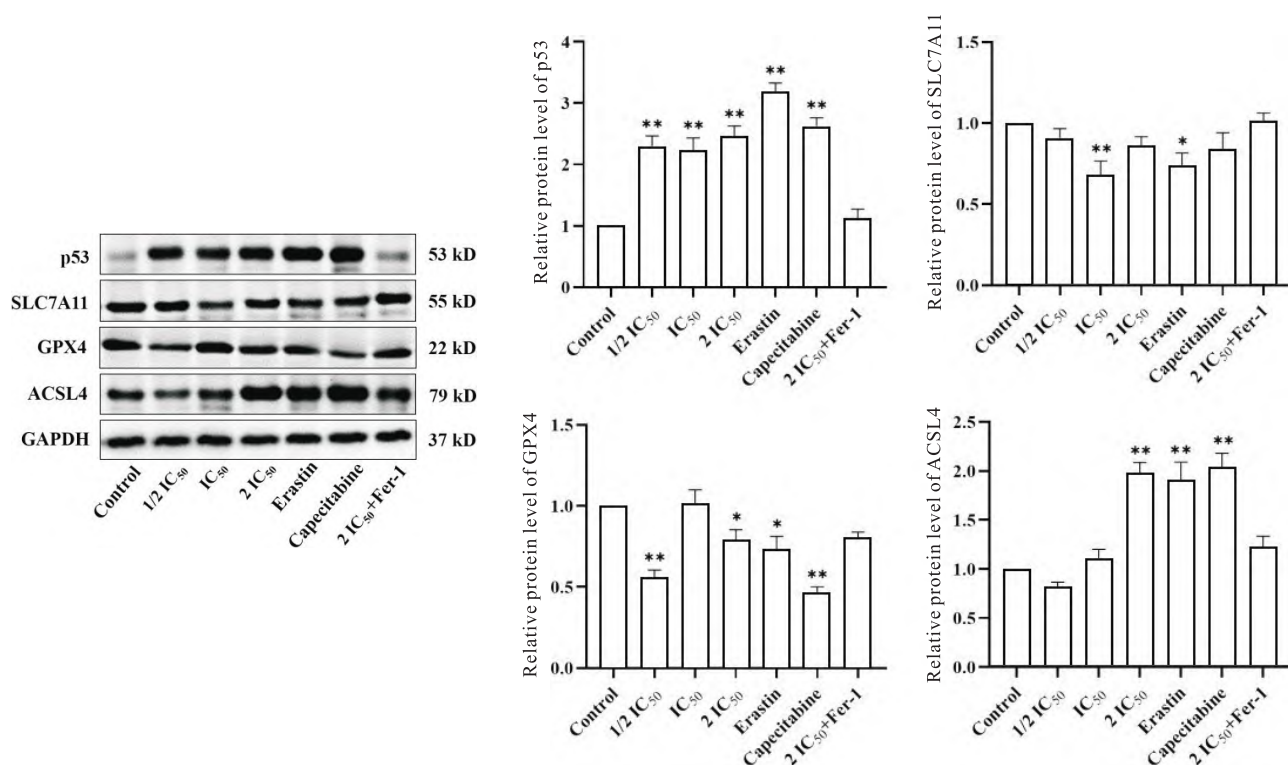


Figure 9. Effect of esculentin on ferroptosis related proteins in 4T1 cells. After 24 h of drug intervention, 4T1 cells were collected and Western blot experiment was performed to observe the protein expression of p53, SLC7A11, GPX4 and ACSL4. Mean \pm SD. $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图9 七叶内酯对4T1细胞铁死亡相关蛋白的影响

酯能促进4T1细胞脂质过氧化反应。

GSH和GPX4在铁死亡的抗氧化系统中起主要作用^[15]。GSH是细胞中的主要抗氧化剂,也是GPX4的首选底物,GSH在GPX4的作用下会减少ROS在细胞中的累积,进而抑制铁死亡^[16]。相反,GSH和GPX4活性的抑制可导致脂质过氧化物积累,同时,ACSL4可激活多不饱和脂肪酸,协同促进脂质过氧化反应,加速铁死亡的发生^[17]。SLC7A11是铁死亡中的关键上游调节因子之一,p53是一种肿瘤抑制基因。研究发现,p53可通过抑制SLC7A11的表达及活性,调节GPX4表达,促进细胞发生铁死亡^[18]。本研究在GSH和GPX4的检测中发现,七叶内酯干预后的4T1细胞中GSH和GPX4水平降低,Western blot结果显示SLC7A11和GPX4蛋白表达水平降低,p53和ACSL4蛋白表达水平升高,提示七叶内酯可通过调控p53、SLC7A11、GPX4和ACSL4蛋白表达诱导4T1细胞铁死亡。为验证七叶内酯是否通过铁死亡促进细胞死亡,本实验采用铁死亡抑制剂Fer-1对4T1细胞进行阻断实验,结果发现,Fer-1干预可逆转七叶内酯诱导的铁死亡。

此外,线粒体在半胱氨酸剥夺诱导的铁死亡中起着关键作用,主要原因是半胱氨酸缺乏会导致线

粒体膜电位超极化和脂质过氧化物积累,进而诱发铁死亡^[19-20]。本实验对4T1细胞线粒体进行了观察,结果发现对照组细胞线粒体形态正常,结构完整,线粒体嵴的数目及形态正常,细胞核膜结构清晰;而七叶内酯处理后的细胞线粒体形态出现损伤,线粒体嵴减少甚至消失,细胞核膜结构不清晰。

肿瘤细胞的迁移和侵袭是导致肿瘤患者预后不良的重要原因,因此,本研究还进行了细胞划痕及Transwell小室实验,以检测七叶内酯对4T1细胞迁移和侵袭能力的影响。实验结果表明,七叶内酯可降低细胞划痕愈合能力及侵袭细胞数量,并伴有浓度依赖性,说明七叶内酯可抑制4T1细胞的迁移和侵袭能力。

综上所述,本研究结果表明,七叶内酯可抑制4T1细胞的增殖、迁移及侵袭能力,并通过调控p53/SLC7A11/GPX4信号通路诱导4T1细胞发生铁死亡,进而抑制乳腺癌的发生发展,为七叶内酯可能成为新型抗肿瘤药物提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1):17-48.
- [2] Zhang L, Chen W, Liu S, et al. Targeting breast cancer

- stem cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(2):552-570.
- [3] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 5卷. 上海: 上海科技出版社, 1999:137-138.
National Administration of Traditional Chinese Medicine (NATCM). *Chinese Materia Medica* [M]. Volume 5. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 137-138.
- [4] 蒋丽, 郭瑞齐, 管仁伟, 等. 透骨草化学成分及药理作用研究进展[J]. *中医药导报*, 2023, 29(2):166-171.
Jiang L, Guo RQ, Guan RW, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Tougucao* (*Tuberculata speranskia* herb)[J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 29(2):166-171.
- [5] 顾媛媛, 陈媚, 王连芝, 等. 凤仙透骨草抗真菌有效部位化学成分的研究[J]. *中成药*, 2022, 44(3): 825-829.
Gu YY, Chen M, Wang LZ, et al. Chemical constituents of active antifungal parts of *Impatiens balsamina*[J]. *Chin Patent Med*, 2022, 44(3):825-829.
- [6] Zhang L, Xie Q, Li X. Esculetin: a review of its pharmacology and pharmacokinetics[J]. *Phytother Res*, 2022, 36(1):279-298.
- [7] Jiang R, Su G, Chen X, et al. Esculetin inhibits endometrial cancer proliferation and promotes apoptosis via hnRNPA1 to downregulate BCLXL and XIAP[J]. *Cancer Lett*, 2021, 521:308-321.
- [8] Garg SS, Gupta J, Sahu D, et al. Pharmacological and therapeutic applications of esculetin[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20):12643.
- [9] 王瑶, 陈士坤, 段晨阳, 等. Sirt6通过调控P53/SLC7A11/GPX4通路抑制骨骼肌细胞铁死亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(2):335-344.
Wang Y, Chen SK, Duan CY, et al. Sirtuin 6 suppresses ferroptosis in skeletal muscle cells by regulating P53/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2019, 39(2):335-344.
- [10] 窦艳, 邱鹏, 马立志, 等. 敲减NOBI基因表达对人结肠癌SW480细胞药物敏感性及侵袭和迁移能力的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(4):614-620.
Dou Y, Qiu P, Ma LZ, et al. Effects of *NOBI* gene silencing on drug sensitivity and invasion and migration abilities of human colon cancer SW480 cells[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2019, 35(4):614-620.
- [11] Lei G, Zhuang L, Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7): 381-396.
- [12] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5):280-296.
- [13] Ouyang S, Li H, Lou L, et al. Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer[J]. *Redox Biol*, 2022, 52:102317.
- [14] Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4):266-282.
- [15] Yang M, Tsui MG, Tsang JKW, et al. Involvement of FSP1-CoQ10-NADH and GSH-GPx-4 pathways in retinal pigment epithelium ferroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5):468.
- [16] Gao Y, Li J, Wu Q, et al. Tetrahydroxy stilbene glycoside ameliorates Alzheimer's disease in APP/PS1 mice via glutathione peroxidase related ferroptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99:108002.
- [17] Liu Y, Niu R, Deng R, et al. Multi-enzyme co-expressed dual-atom nanozymes induce cascade immunogenic ferroptosis via activating interferon- γ and targeting arachidonic acid metabolism[J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145(16): 8965-8978.
- [18] Zeng C, Lin J, Zhang K, et al. SHARPIN promotes cell proliferation of cholangiocarcinoma and inhibits ferroptosis via p53/SLC7A11/GPX4 signaling[J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(11):3766-3775.
- [19] Gao M, Yi J, Zhu J, et al. Role of mitochondria in ferroptosis[J]. *Mol Cell*, 2019, 73(2):354-363. e3.
- [20] Qiu S, Zhong X, Meng X, et al. Mitochondria-localized cGAS suppresses ferroptosis to promote cancer progression [J]. *Cell Res*, 2023, 33(4):299-311.

(责任编辑: 宋廷君, 李淑媛)