

鸦胆子苦醇通过Nrf2/HO-1通路诱导细胞铁死亡 抑制胃癌细胞HGC-27增殖

高薇, 曾海荣, 乐佳敏*

(海军军医大学长海医院, 上海 200433)

[摘要] 目的: 观察鸦胆子苦醇对人胃癌HGC-27细胞增殖的影响及其作用机制。方法: 采用细胞增殖与活性检测法(CCK-8)检测不同浓度鸦胆子苦醇对HGC-27细胞增殖的影响; 鸦胆子苦醇(7.5、15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于HGC-27细胞24 h, 分析细胞克隆形成情况; 活性氧荧光探针(DCFH-DA)检测细胞内活性氧(ROS)水平, 脂质过氧化荧光探针(C11-BODIPY)检测细胞内脂质过氧化水平, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族40成员1(SLC40A1)、转铁蛋白(TRF)、核因子 E_2 相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1) mRNA水平和蛋白表达情况。结果: 与空白组比较, 随鸦胆子苦醇药物浓度增大, HGC-27细胞存活率逐渐降低, 其半数抑制浓度(IC_{50})为15.34 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 鸦胆子苦醇组(7.5、15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞克隆形成明显减少($P<0.05$, $P<0.01$), 呈现浓度依赖性。与空白组比较, 鸦胆子苦醇组(7.5、15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞内ROS, 脂质过氧化水平, 细胞内铁离子浓度及细胞乳酸脱氢酶(LDH)泄漏均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), 呈现浓度依赖性。与空白组比较, 鸦胆子苦醇组(15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)SLC7A11、GPX4、SLC40A1的mRNA水平和蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), TRF mRNA水平及蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), 且呈浓度依赖性。与空白组比较, 鸦胆子苦醇组(15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)Nrf2和HO-1 mRNA水平和蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 且呈浓度依赖性。结论: 鸦胆子苦醇可能通过抑制Nrf2/HO-1通路诱导铁死亡抑制HGC-27细胞增殖。

[关键词] 鸦胆子苦醇; 胃癌; 铁死亡; 活性氧; 脂质过氧化

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0081-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221628

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220620.1710.006.html>

[网络出版日期] 2022-06-22 9:05

Brusatol Suppresses Proliferation of Human Gastric Cancer HGC-27 Cells Through Inducing Ferroptosis via Nrf2/HO-1 Pathway

GAO Wei, ZENG Hairong, LE Jiamin*

(Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of brusatol (BR) on proliferation of human gastric cancer HGC-27 cells and its mechanism. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the survival rate of HGC-27 cells at different concentrations of BR. HGC-27 cells were treated with BR (7.5, 15, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, and then the cell clone formation was analyzed. 2, 7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe and lipid peroxidation sensor (C11-BODIPY) were employed to detect the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation, respectively. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were performed to detect the messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein expressions of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4),

[收稿日期] 2022-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703880);上海市药学会项目(2019-YY-09)

[第一作者] 高薇, 药师, 从事医院药学研究, E-mail: m13818770574@163.com

[通信作者] * 乐佳敏, 药师, 从事医院药学研究, E-mail: 772996014@qq.com

solute carrier family 40 member 1 (SLC40A1), transferrin, nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1), respectively. **Result:** The survival rate of HGC-27 cells was decreased with the increase of BR concentration, and the IC₅₀ was 15.34 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the conditions in blank group, the cell clone formation of BR (7.5, 15, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups was inhibited in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$), while the levels of intracellular ROS and lipid peroxidation, iron concentration, and lactic dehydrogenase (LDH) leakage were increased in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the blank group, the BR (15, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups lowered the mRNA and protein expressions of SLC7A11, GPX4, SLC40A1, Nrf2 and HO-1, while elevated the mRNA and protein expression of TRF in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** BR suppressed the proliferation of HGC-27 cells through inducing ferroptosis via inhibiting Nrf2/HO-1 pathway.

[Keywords] brusatol; gastric cancer; ferroptosis; reactive oxygen species; lipid peroxidation

胃癌是全球第五大常见恶性肿瘤,也是第三大常见恶性肿瘤死亡原因,据报道胃癌的死亡率高达75%,占癌症死亡总人数的8.8%^[1]。在我国,胃癌的发病率和死亡率分别位列所有肿瘤的第2位和第3位,居高不下的发病率和死亡率已严重威胁人民健康^[2]。目前,胃癌的治疗主要依靠手术切除,放疗,化疗等药物治疗为主,但是化疗药物耐药性的产生及严重的不良反应,严重影响抗肿瘤药物的临床运用^[3]。因此,迫切需要寻找安全、有效的治疗药物或者辅助治疗药物。鸦胆子苦醇(BR)是从传统中药鸦胆子中分离的苦木内酯类活性成分^[4-5]。据报道,鸦胆子苦醇具有多种药理活性,GUO等^[6]研究发现,BR可通过蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR)途径抑制鼻咽癌细胞生长并促进细胞凋亡,发挥抗鼻咽癌作用。XIANG等^[7]研究发现,BR通过应激活化蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶/核转录因子- κ B/信号转导和转录激活因子3/B细胞淋巴瘤-2(JNK/p38 MAPK/NF- κ B/STAT3/Bcl-2)信号通路抑制胰腺癌生长并诱导细胞凋亡,发挥抗胰腺癌作用。WANG等^[8]研究发现,BR可通过调节10号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PTEN/PI3K/Akt)信号通路抑制肾癌细胞生长,发挥抗肾癌作用。LIU等^[9]研究发现,BR为Nrf2抑制剂,可通过诱导核因子E₂相关因子2/血红素加氧酶-1(Nrf2/HO-1)途径来抑制由 β -淀粉样蛋白(A β)引起的神经损伤。崔玲娣等^[10]研究发现,BR通过诱发内质网应激,抑制Nrf2蛋白表达核转移,破坏抗氧化系统,诱导MCF-7细胞凋亡。但是,BR对胃癌细胞的增殖及作用机制尚不明确,本研究以胃癌细胞HGC-27为研究对象,探索BR对胃癌细胞的增殖作用及机制。

1 材料

1.1 细胞 人胃癌细胞株HGC-27(中科院细胞库,目录号TCHu 22)。传至第6代开始实验。

1.2 药品与试剂 BR(上海陶术生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号150107),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、DCFH-DA荧光探针、1640培养基(大连美仑生物,批号分别为MA0218-2、MB4682-1、PWL047);胎牛血清(FBS,美国HyClone公司,批号SV30087.02),ECL发光液、BCA蛋白定量试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司,批号分别为SQ021、ZJ101L),C11-BODIPY荧光探针(美国Thermo公司,批号D3861),结晶紫染色液(上海碧云天公司,批号C0121),RNA提取试剂盒(上海翌胜公司,批号10606ES60),逆转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本Takara公司,批号分别为EE047A、RR820A),溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、溶质载体家族40成员1(SLC40A1),转铁蛋白(Transferrin)、血红素加氧酶-1(HO-1)抗体(Abcam公司,批号分别为ab37185、ab125066、ab239583、ab214039、ab214039),Nrf2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体和二抗(CST公司,批号分别为12721、5174、14708)。

1.3 仪器 1300 SERIES A2型CO₂培养箱、FORMA STERI-CYCLE型超净工作台(美国Thermo公司);Leica SP8型共聚焦显微镜(德国徕卡公司);Centrifuge 5810R型离心机(德国Eppendorf公司);SpectraMax[®]iD3型多功能酶标仪(美国Bio Tek公司);Mini-PROTEAN Tetra System型电泳和转膜仪、ChemiDoc MP Imaging System型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司),QuantStudio 5型PCR仪(美国ABI公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与分组 人胃癌细胞 HGC-27 培养于 1640 培养基(10% FBS, 1% 青-链霉素)中,细胞于 5%CO₂, 37 °C 的饱和湿度培养箱中培养,细胞生长迅速,2~3 d 可传代培养。BR 药物处理细胞时,根据药物的半数抑制浓度(IC₅₀)结果,BR 分别分为低、中、高浓度组(1/2 倍 IC₅₀、1 倍 IC₅₀、2 倍 IC₅₀)。

2.2 CCK-8 检测细胞活率 取对数期生长良好的 HGC-27 细胞,以 5×10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板中,于培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后,分为溶剂组(无细胞,只含培养基)、空白组(含细胞及 BR 溶剂)、BR 组,BR 组分别以终浓度(1.86、3.75、7.5、15、30、60、120、240 μmol·L⁻¹)的 BR 处理细胞 24 h(3 个复孔)。每孔加入 CCK-8 溶液(10 μL)继续培养 2 h。使用酶标仪测定吸光度 A,计算细胞存活率,计算药物 IC₅₀。细胞存活率=(A_{BR 组}-A_{空白组})/(A_{溶剂组}-A_{空白组})×100%。

2.3 细胞克隆形成检测 取对数期生长良好的 HGC-27 细胞,将细胞消化成单细胞悬液,以每孔 1 000 个细胞接种于 12 孔板中,细胞于培养箱培养 2 d,将细胞分为空白组(BR 溶剂)和 BR 组(7.5、15、30 μmol·L⁻¹)处理 24 h,于培养箱继续培养 11 d。然后用 PBS 洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗 1 遍,1% 结晶紫溶液染色 10 min,PBS 洗 3 遍,室温晾干,显微镜观察 3 个视野中的细胞克隆数量。

2.4 细胞内活性氧(ROS)检测 取对数期生长良好的 HGC-27 细胞,细胞以 1×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中,待细胞过夜贴壁后,将细胞分为空白组(BR 溶剂)和 BR 组(7.5、15、30 μmol·L⁻¹)处理 24 h,ROS 清除剂组使用活性氧清除剂 NAC(5 mmol·L⁻¹)预孵育 2 h,再加 BR 30 μmol·L⁻¹ 处理 24 h。然后每孔加入 DCF-DA 探针溶液(工作液 200 μL),于培养箱中继续孵育 1 h(避光),荧光显微镜拍照,Image J 软件计算相对荧光强度。

2.5 细胞内脂质过氧化水平检测 取对数期生长良好的 HGC-27 细胞,细胞以 1×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中,待细胞过夜贴壁后,将细胞分为空白组(BR 溶剂)和 BR 组(7.5、15、30 μmol·L⁻¹)处理 24 h,铁死亡抑制剂组使用 Fer-1(10 μmol·L⁻¹)预孵育 2 h,然后再加 BR 30 μmol·L⁻¹ 处理 24 h。然后每孔加入 C11-BODIPY 荧光探针(10 μmol·L⁻¹)继续孵育 30 min,收集细胞,PBS 洗 2 遍,然后流式细胞仪检测荧光强度。

2.6 细胞内铁含量,乳酸脱氢酶(LDH)泄漏检测

取对数期生长良好的 HGC-27 细胞,细胞以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞过夜贴壁后,将细胞分为空白组(BR 溶剂)和 BR 组(7.5、15、30 μmol·L⁻¹)处理 24 h,铁死亡抑制剂组使用 Fer-1(10 μmol·L⁻¹)预孵育 2 h,然后再加 BR 30 μmol·L⁻¹ 处理 24 h。收集细胞裂解液,铁含量,LDH 泄漏分别用相应试剂盒按照说明书测量。

2.7 Real-time PCR 检测相关 mRNA 表达 取对数期生长良好的 HGC-27 细胞,细胞以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞过夜贴壁后,将细胞分为空白组(BR 溶剂)和 BR 组(7.5、15、30 μmol·L⁻¹)处理 24 h,铁死亡抑制剂组使用 Fer-1(10 μmol·L⁻¹)预孵育 2 h,然后再加 BR 30 μmol·L⁻¹ 处理 24 h。收集细胞,总 RNA 根据试剂盒提取,使用 PrimeScript™ RT Master 和 TB Green™ Premix Ex Taq™ 进行逆转录反应和实时 PCR,逆转录条件在 37 °C,15 min; 85 °C,5 s,4 °C 保存。PCR 扩增条件在 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 3 s; 60 °C 退火 30 s; 40 个循环。GAPDH 作为内参,mRNA 相对表达量根据 2^{-ΔΔC_t} 方法计算,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Nrf2	上游 AACACAAGAGCCCTGTGTGGC	112
	下游 TGCCCTGAGATGGTGACAA	
HO-1	上游 GGCCTCCCTGTACCACATCT	184
	下游 CTGCATGGCTGGTGTGTAGG	
SLC7A11	上游 TCCTGCTTTGGCTCCATGAACG	122
	下游 AGAGGAGTGTGCTTGCGGACA	
GPX4	上游 ACAAGAACGGCTGCGTGGTGAA	100
	下游 GCCACACACTTGTGGAGCTAGA	
Transferrin	上游 AACTCAGCAAAGTCTGGCGT	137
	下游 ATACGCCACATAACCCCCAG	
SLC40A1	上游 GAGACAAGTCTGAATCTGTGCC	117
	下游 TTCTTGACGCAACTGTGTACAG	
GAPDH	上游 GGTTGTCTCCTGCGACT TCA	103
	下游 TGGTCCAGGTTTCTTACTCC	

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 取对数期 HGC-27 细胞,细胞以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞过夜贴壁后,分为空白组(BR 溶剂)和 BR 组(7.5、15、30 μmol·L⁻¹)处理 24 h,

铁死亡抑制剂组使用 Fer-1 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预孵育 2 h, 然后再加 BR $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 24 h。将细胞样品用 RIPA (含 PMSF 蛋白酶抑制剂) 裂解液冰上裂解 15~30 min, 提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白变性。蛋白样品经 PAGE 凝胶电泳, 转至 PVDF 膜。然后 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 洗涤 3 次。孵育相应一抗 (1:1 000) 4°C 冰箱过夜, 洗涤。辣根过氧化物酶 (HRP)-二抗 (1:4 000) 室温孵育 2 h, 洗涤。采用 ECL 显影液显色, 凝胶成像系统拍照, Image J 软件分析。

2.9 统计学分析 数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BR 对 HGC-27 细胞增殖的影响 与空白组比较, 随 BR 药物浓度增大, HGC-27 细胞存活率逐渐降低, 其 IC_{50} 为 $15.34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 见表 2。选择 $1/2$ 倍 IC_{50} ($7.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1 倍 IC_{50} ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、2 倍 IC_{50} ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 分别作为 BR 低、中、高浓度进行后续实验。细胞克隆形成显示, 与空白组比较, BR (7.5 、 15 、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组细胞克隆形成明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 呈现浓度依赖性。见表 3、图 1。

3.2 BR 对 HGC-27 细胞内活性氧 (ROS) 水平的影响 与空白组比较, BR 组 (7.5 、 15 、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相对荧光强度逐渐增强, 显示 ROS 产生增多 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 呈现浓度依赖性; 活性氧清除剂 NAC ($5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 明显清除细胞内 ROS ($P < 0.05$)。见图 2、表 4。

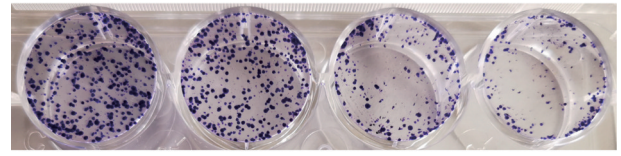
3.3 BR 对 HGC-27 细胞铁死亡的影响 细胞脂质过氧化水平升高, 细胞内铁积累, LDH 的泄漏是细胞铁死亡的关键因素。与空白组比较, BR (7.5 、 15 、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 细胞内脂质过氧化水平明显升高 ($P < 0.05$,

表 2 BR 对 HGC-27 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of different concentrations of BR on survival rate in HGC-27 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		100.00 \pm 5.89
BR 组	1.86	91.50 \pm 6.79
	3.75	83.13 \pm 4.32
	7.5	64.17 \pm 5.35 ¹⁾
	15	51.73 \pm 7.28 ¹⁾
	30	33.90 \pm 7.83 ¹⁾
	60	25.57 \pm 6.09 ²⁾
	120	19.70 \pm 4.25 ²⁾
	240	14.47 \pm 3.65 ²⁾

注: 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3、表 8、表 9 同)



注: A. 空白组; B~D. BR 组 (7.5 、 15 、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 4 同)

图 1 BR 对 HGC-27 细胞克隆形成的影响 (结晶紫)

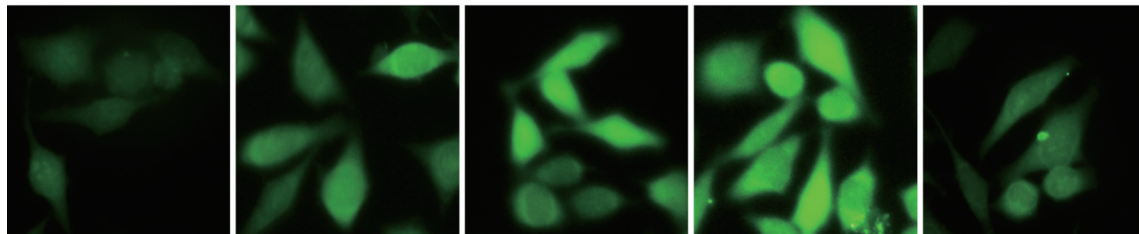
Fig. 1 Effect of BR on colony formation in HGC-27 cells (crystal violet)

表 3 BR 对 HGC-27 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of BR on colony formation in HGC-27 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞克隆形成数目/个
空白组		687.50 \pm 13.50
BR 组	7.5	480.00 \pm 11.00 ¹⁾
	15	234.50 \pm 9.50 ¹⁾
	30	131.50 \pm 6.50 ²⁾

$P < 0.01$); 细胞内铁含量明显增多 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 细胞 LDH 泄漏明显增多 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 均呈现浓度依赖性。且铁死亡抑制剂 Fer-1 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 明显抑制 BR 导致的细胞死亡; 明显



注: A. 空白组; B~D. BR 组 (7.5 、 15 、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); E. BR+NAC 组 ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

图 2 BR 对 HGC-27 细胞内 ROS 水平的影响 (DCFH-DA, $\times 20$)

Fig. 2 Fluorescent image of BR on intracellular ROS levels in HGC-27 cells (DCFH-DA, $\times 20$)

表4 BR对HGC-27细胞内ROS水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of BR on intracellular ROS levels in HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	相对荧光强度
空白组		38.50±4.52
BR组	7.5	76.50±4.25 ¹⁾
	15	105.50±7.51 ¹⁾
	30	148.50±9.50 ²⁾
BR+NAC组	30+5 000	78.50±95.50 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与BR组(30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表5-表7同)

抑制BR引起的细胞内脂质过氧化水平;明显降低细胞内铁含量;明显抑制细胞LDH的泄漏($P<0.05$, $P<0.01$)。表明BR引起细胞铁死亡。见表5。

表5 BR对HGC-27细胞铁死亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of BR on ferroptosis in HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	脂质过氧化相对水平	细胞铁相对含量	LDH泄漏相对量
空白组		100.00±3.90	1.00±0.05	1.00±0.08	100.00±7.00
BR组	7.5	72.95±3.55 ¹⁾	1.37±0.06 ¹⁾	1.49±0.07 ¹⁾	152.00±6.00 ¹⁾
	15	50.70±3.40 ¹⁾	1.85±0.09 ¹⁾	2.32±0.15 ¹⁾	255.50±8.50 ²⁾
	30	36.20±2.70 ²⁾	2.38±0.09 ²⁾	3.10±0.12 ²⁾	367.50±10.50 ²⁾
BR+Fer-1组	30+10	85.85±3.55 ³⁾	1.16±0.08 ⁴⁾	1.29±0.07 ⁴⁾	155.50±7.50 ⁴⁾

表6 BR对HGC-27细胞铁死亡相关基因mRNA水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of BR on mRNA levels of ferroptosis-related mRNA in HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SLC7A11/GAPDH	GPX4/GAPDH	Transferrin/GAPDH	SLC40A1/GAPDH
空白组		1.00±0.06	1.00±0.05	1.00±0.07	1.00±0.05
BR组	7.5	0.80±0.07	0.78±0.05	1.24±0.11	0.76±0.03
	15	0.62±0.03 ¹⁾	0.49±0.05 ¹⁾	1.63±0.11 ¹⁾	0.61±0.06 ¹⁾
	30	0.42±0.03 ¹⁾	0.31±0.07 ¹⁾	2.86±0.07 ²⁾	0.44±0.05 ¹⁾
BR+Fer-1组	30+10	0.86±0.04 ³⁾	0.82±0.06 ³⁾	1.35±0.09 ⁴⁾	0.79±0.05 ³⁾

表7 BR对HGC-27细胞铁死亡相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of BR on ferroptosis-related protein expression in HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

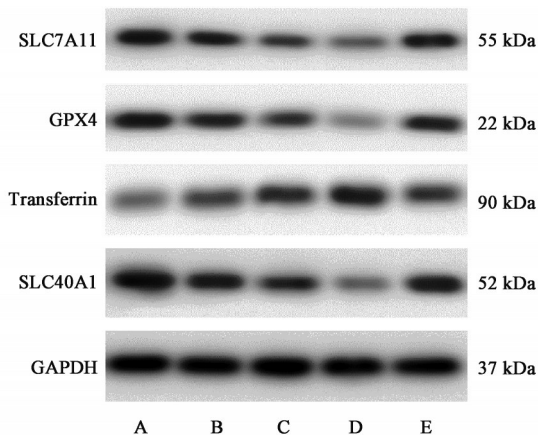
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SLC7A11/GAPDH	GPX4/GAPDH	Transferrin/GAPDH	SLC40A1/GAPDH
空白组		1.00±0.06	1.00±0.08	1.00±0.10	1.00±0.05
BR组	7.5	0.71±0.04 ¹⁾	0.77±0.05	1.22±0.06	0.73±0.05
	15	0.47±0.05 ¹⁾	0.59±0.05 ¹⁾	1.88±0.10 ²⁾	0.52±0.06 ¹⁾
	30	0.31±0.06 ²⁾	0.39±0.07 ¹⁾	2.45±0.13 ²⁾	0.28±0.04 ¹⁾
BR+Fer-1组	30+10	0.75±0.04 ⁴⁾	0.82±0.03 ³⁾	1.47±0.06 ⁴⁾	0.75±0.04 ³⁾

3.5 BR对HGC-27细胞Nrf2/HO-1通路的影响
与空白组比较, BR组(15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)Nrf2、HO-1 mRNA水平明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 呈浓度依赖性。见表8。BR组(30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

3.4 BR对HGC-27细胞铁死亡相关蛋白的影响

与空白组比较, BR(15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组铁死亡相关基因SLC7A11、GPX4、SLC40A1 mRNA水平明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 铁死亡相关基因Transferrin mRNA水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), 呈浓度依赖性。与空白组比较, BR(15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组铁死亡相关蛋白SLC7A11、GPX4、SLC40A1表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 铁死亡相关蛋白Transferrin的表达显著增加($P<0.01$), 呈现浓度依赖性。且铁死亡抑制剂Fer-1(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)明显抑制由BR引起的SLC7A11、GPX4、SLC40A1蛋白表达降低, 明显抑制由BR引起的Transferrin蛋白表达明显增多($P<0.05$, $P<0.01$)。见表6、表7、图3。

Nrf2和HO-1的蛋白表达明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 呈浓度依赖性。BR抑制Nrf2/HO-1通路, 细胞的抗氧化系统遭到破坏。见图4、表9。



注: A. 空白组; B~D. BR组(7.5、15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); E. BR+Fer-1组[(30+10) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]

图3 BR作用HGC-27细胞铁死亡相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of BR on ferroptosis-related proteins in HGC-27 cells

表8 BR对HGC-27细胞Nrf2/HO-1通路相关基因mRNA水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of BR on mRNA levels of Nrf2/HO-1 pathway-related genes in HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Nrf2	HO-1
空白组		1.00±0.06	1.00±0.08
BR组	7.5	0.78±0.03	0.73±0.08
	15	0.53±0.06 ¹⁾	0.50±0.07 ¹⁾
	30	0.30±0.05 ¹⁾	0.32±0.06 ¹⁾

表9 BR对HGC-27细胞Nrf2/HO-1通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of BR on Nrf2/HO-1 pathway-related protein expression in HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH
空白组		1.00±0.04	1.00±0.07
BR组	7.5	0.83±0.05 ¹⁾	0.80±0.08
	15	0.50±0.08 ¹⁾	0.57±0.04 ²⁾
	30	0.29±0.03 ²⁾	0.44±0.05 ¹⁾

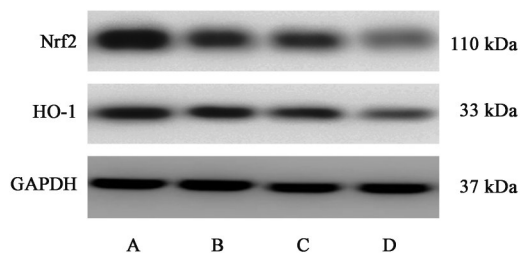


图4 BR作用HGC-27细胞Nrf2/HO-1通路蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Brusatol on Nrf2/HO-1 signaling pathway in HGC-27 cells

4 讨论

胃癌是第五大常见的恶性肿瘤,也是癌症死亡的第三大原因,至今仍是公共卫生面临的医学挑战^[11]。胃癌的临床治疗包括手术切除、化疗等,但由于化疗药物的不良反应,有限的治疗策略,特别是明确的临床应用药物,亟需开发治疗胃癌新药。许多天然产物及其膳食成分,因其有效的抗肿瘤特性和较低的毒性越来越引起人们的关注。

铁死亡一种非凋亡形式的细胞死亡模式,是由铁依赖的脂质过氧化引起的细胞死亡形式,铁死亡的核心机制是细胞脂质过氧化和铁积累引起,通常是通过抑制 SLC7A11 和 GPX4 而引起的^[12]。SLC7A11 是胱氨酸-谷氨酸反转运蛋白。SLC7A11 表达的减少导致胱氨酸消耗,谷胱甘肽(GSH)短缺,并随之增加脂质过氧化,脂质氧化的关键抑制剂 GPX4 将谷胱甘肽氧化成谷胱甘肽二硫(GSSG),抑制 GPX4 降低了通过 GSH 中和脂质氧化的能力^[13]。Transferrin 和 SLC40A1 对维持细胞内铁浓度至关重要,转铁蛋白将铁导入细胞,而 SLC40A1 将铁输出细胞^[14],因此,转铁蛋白的增加和 SLC40A1 的减少可能导致细胞内铁的积累。在本研究中,BR 引起 SLC7A11 和 GPX4 表达降低,引起细胞脂质过氧化水平增多,BR 使 Transferrin 表达增多,SLC40A1 表达降低,使细胞内铁含量增多,引起细胞铁死亡。

Nrf2 是抗氧化和解毒的主要调控因子,它通过与下游的抗氧化反应元件(ARE)基因结合来促进铁死亡,其中 HO-1 启动子区 ARE 位点最为丰富,抑制 HO-1 可通过其多种功能促进铁死亡^[15]。Nrf2/HO-1 轴是细胞抗氧化反应的中心调节因子,最近的研究表明,Nrf2/HO-1 轴的异常激活经常发生在癌细胞和肿瘤组织中。Nrf2 和 HO-1 水平在许多不同类型的人类恶性肿瘤中升高^[16],因此,抑制 Nrf2/HO-1 通路可能有助于促进铁死亡。与这一观点相一致的是,在 BR 处理的细胞中降低了 Nrf2 的表达,减弱了 HO-1 的表达。这些结果表明,BR 抑制了 Nrf2/HO-1 的激活,进而增加了脂质过氧化水平和 ROS 的形成,从而进一步促进了胃癌细胞的铁死亡和氧化还原稳态的破坏。

综上所述,BR 可抑制胃癌细胞 HGC-27 细胞增殖,其机制可能是抑制 Nrf2/HO-1 通路,引起细胞内 ROS 增多,脂质过氧化水平升高,细胞内铁含量增多,诱导细胞铁死亡有关。本研究可为胃癌药物开发提供一定的基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] FERLA J, COLOMBET M, BRAY F, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [2] 左婷婷, 郑荣寿, 陈万青, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(1): 52-58.
- [3] XUAN Y, WANG Y N. Hypoxia/IL-1 α axis promotes gastric cancer progression and drug resistance [J]. *J Dig Dis*, 2017, 18(9): 511-520.
- [4] 卢睿瑾, 杜玉梅, 李静, 等. 鸦胆子苦醇通过RhoA/ROCK1信号通路抑制人结直肠癌细胞HCT-116的侵袭和迁移[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(10): 1360-1365.
- [5] 严国俊, 韩露, 毛春芹, 等. 鸦胆子饮片及药渣的抗肿瘤活性比较及其鸦胆子苦醇和鸦胆子苦素A的含量测定[J]. *南京中医药大学学报*, 2019, 35(6): 714-718.
- [6] GUO S, ZHANG J, ZHANG Z, et al. Anticancer effects of brusatol in nasopharyngeal carcinoma through suppression of the Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 85(6): 1097-1108.
- [7] XIANG Y, YE W, ZHOU M, et al. Brusatol inhibits growth and induces apoptosis in pancreatic cancer cells via JNK/p38 MAPK/NF- κ B/STAT3/Bcl-2 signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(4): 820-826.
- [8] WANG T, CHEN Z, LIU X, et al. Brusatol inhibits the growth of renal cell carcinoma by regulating the PTEN/PI3K/Akt pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 288: 115020.
- [9] LIU X, XU H, GAO W, et al. Brusatol inhibits amyloid- β -induced neurotoxicity in U-251 cells via regulating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10556-10563.
- [10] 崔玲娣, 刘凯. 鸦胆子苦醇对人乳腺癌MCF-7细胞凋亡的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(5): 44-48.
- [11] LEE J, KIM K, NOH S, et al. Current management and future strategies of gastric cancer[J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(2): 248-257.
- [12] HIRSCHHORN T, STOCKWELL B R. The development of the concept of ferroptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 130-143.
- [13] KOPPULA P, ZHANG Y, GAN B, et al. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependence of cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1): 12.
- [14] MOU Y, WANG J, LI B, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: Opportunities and challenges in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34.
- [15] LOBODA A, DAMULEWICZ M, DULAK J, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 73(17): 3221-3247.
- [16] DENG Y, WU Y, WANG C, et al. The Nrf2/HO-1 axis can be a prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 1221-1230.

[责任编辑 张丰丰]