

黄芩苷通过 p53 介导的 SLC7A11 下调诱导胃癌细胞铁死亡

苑小龙¹, 魏征², 张俊萍², 郑芮¹, 晁瑞¹, 蔡小平^{2*}

(1. 河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450000;

2. 河南省中医药研究院, 郑州 450000)

[摘要] **目的:**以人胃癌 SGC-7901 细胞为研究对象,通过在培养液中添加不同浓度黄芩苷(0、100、200、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),探讨黄芩苷对胃癌细胞增殖的抑制作用及可能的作用机制。**方法:**黄芩苷处理 SGC-7901 细胞后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测黄芩苷对胃癌细胞的抑制作用;同时通过添加 3-氨基-4-环己基氨基苯甲酸乙酯(Fer-1)来观察细胞在黄芩苷处理后细胞的存活;使用实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测铁死亡相关基因的表达;MTT 比色法和酶联免疫吸附法分别检测丙二醛(MDA)含量和谷胱甘肽(GSH)水平;分别运用过表达和小干扰核糖核酸(siRNA)的方式来观察肿瘤蛋白 53(p53)/溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)通路在铁死亡调控中的作用。**结果:**与空白组比较,黄芩苷处理后 SGC-7901 细胞活性明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),具有浓度和时间依赖性。与黄芩苷组比较, Fer-1 干预显著缓解了黄芩苷引起的 SGC-7901 细胞活性降低($P<0.01$)。与黄芩苷组比较, Fer-1+黄芩苷组细胞中 MDA 含量及前列腺素内过氧化物合成酶 2(PTGS2)mRNA 和蛋白水平显著降低($P<0.01$), GSH 活性、谷胱甘肽过氧化酶 4(GPX4)mRNA 和蛋白水平均显著升高($P<0.01$)。与空白组比较,黄芩苷组细胞中 SLC7A11 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),具有浓度依赖性。与黄芩苷组比较, SLC7A11 过表达细胞在黄芩苷处理后细胞中活性氧(ROS)水平和 MDA 含量显著降低($P<0.01$), GSH 活性显著升高($P<0.01$)。与空白组比较,黄芩苷组细胞中 p53 荧光强度显著升高($P<0.01$)。与黄芩苷组比较, 转染 p53 siRNA 的细胞在黄芩苷处理后细胞中 p53 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), SLC7A11 表达水平显著升高($P<0.01$)。**结论:**黄芩苷能够有效抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖,其机制可能与其调控 p53/SLC7A11 介导的细胞铁死亡有关。

[关键词] 黄芩苷; 胃癌细胞; 铁死亡; 肿瘤蛋白 53; 溶质载体家族 7 成员 11

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)06-0071-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.202202122

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220901.1819.009.html>

[网络出版日期] 2022-09-02 10:18:12

Baicalin Induces Ferroptosis in Gastric Cancer Cells via p53-mediated SLC7A11 Down-regulation

YUAN Xiaolong¹, WEI Zheng², ZHANG Junping², ZHENG Rui¹, CHAO Rui¹, CAI Xiaoping^{2*}

(1. *The Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;* 2. *Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibitory effect of different concentration of baicalin (0, 100, 200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells and the underlying mechanism. **Method:** SGC-7901 cells were treated with baicalin. Then methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was employed to examine the inhibitory effect of baicalin on the cells. At the same time, ferrostatin-1 (Fer-1) was added to observe the viability of cells after baicalin treatment. The expression of ferroptosis-related genes was

[收稿日期] 2022-04-28

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873290);河南省中医药科学研究专项(2019ZBJ28);河南省中医管理局拔尖人才项目(豫卫中医 2021-15)

[第一作者] 苑小龙,在读硕士,从事中医药防治恶性肿瘤的临床与基础研究, E-mail: 18300698533@163.com

[通信作者] * 蔡小平,主任医师,研究生导师,从事中医药防治恶性肿瘤的临床与基础研究, E-mail: ccxpfan@126.com

detected by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. The content of malondialdehyde (MDA) and the level of glutathione (GSH) were detected respectively by MTT assay and enzyme-linked immunosorbent assay. The role of tumor protein 53 (p53)/solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) pathway in the regulation of ferroptosis was investigated respectively via overexpression and small interfering RNA (siRNA) methods. **Result:** Compared with the blank group, baicalin decreased the viability of SGC-7901 ($P<0.05$, $P<0.01$) in a dose- and time-dependent manner. The intervention of Fer-1 significantly alleviated the decrease of SGC-7901 cell viability caused by baicalin ($P<0.01$). In addition, compared with the baicalin group, Fer-1+baicalin group showed decrease in MDA content and the mRNA and protein levels of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) in the cells ($P<0.01$), and increase in GSH activity and mRNA and protein levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4) ($P<0.01$). The protein level of SLC7A11 in the baicalin group was decreased compared with that in the blank group ($P<0.05$, $P<0.01$) in a dose-dependent manner. Compared with the baicalin group, the reactive oxygen species (ROS) level and MDA content in SLC7A11-overexpressing cells were significantly decreased after baicalin treatment ($P<0.01$), and the GSH activity was significantly increased ($P<0.01$). The fluorescence intensity of p53 in the cells of the baicalin group was increased compared with that of the blank group ($P<0.01$). Compared with the baicalin group, the expression level of p53 protein in the cells transfected with p53 siRNA was significantly decreased after baicalin treatment ($P<0.01$), and the expression level of SLC7A11 was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** Baicalin can effectively inhibit the proliferation of SGC-7901 cells by regulating p53/SLC7A11-mediated ferroptosis.

[Keywords] baicalin; gastric cancer cells; ferroptosis; tumor protein 53; solute carrier family 7 member 11

胃癌是我国第二大常见恶性肿瘤,发病率29.31%,其中男性的发病率高达39.95%,也是第三大常见恶性肿瘤死亡原因,而我国胃癌的发病和死亡率约占全球的一半^[1]。随着社会进程的发展,人口老龄化的加快,不健康生活方式等因素的累加,该数额仍在呈不断上升趋势。消化系统疾病中,肠胃疾病最为复杂,临床治疗困难;此外,胃肠道疾病的途径复杂,常相互影响。因此,迫切需要新的治疗方法。现阶段,有关胃癌的治疗主要使用内镜切除或手术治疗,晚期序贯化疗,这些治疗方式对患者身体损伤较大^[2]。随着中医药的现代化进程,中医药的抗肿瘤研究已成为热点,不仅能够有效抑制肿瘤细胞的增殖和转移,且不良反应较小,不易产生耐药性。胃癌在中医学中属“胃脘痛”“噎膈”“反胃”等,多由六淫侵袭、饮食失常、情志内伤及机体本身的脏腑阴阳失调、湿邪热毒日久积聚而发病,治疗多采用清热燥湿、泻火解毒之法。黄芩功能清热燥湿、止血、泻火解毒,是唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根,性寒味苦,归脾、大肠、小肠、肺、胆经,临床主要用于治疗湿热中阻之痞满泻痢,可清气分实热及少阳胆火,治疗痈疮肿毒。药理学研究表明黄芩中主要含有黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、汉黄芩苷及黄芩新素等黄酮类化合

物,具有生物活性好和不良反应少的特性,在抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗抑郁、保护神经及治疗心血管疾病上均有良好效果^[3-4]。研究表明黄芩苷能够诱导包括胃癌细胞在内多种肿瘤细胞的凋亡和周期阻滞,抑制肿瘤的侵袭和转移^[5]。此外,黄芩苷还抑制肿瘤血管生成,调控相关炎性微环境及氧化应激,肿瘤的发生和发展能够被明显抑制。铁死亡是新发现的一种依赖性铁离子的细胞死亡方式,区别于细胞凋亡和坏死。近期研究表明,铁死亡受到肿瘤蛋白53(p53)的调控。活化后的p53可以结合到溶质载体家族7成员11(SLC7A11)基因的启动子区,从而抑制了SLC7A11基因的转录活性,影响谷胱甘肽(GSH)的合成^[6]。前期研究发现,黄芩苷对胃癌细胞的抑制作用与诱导p53蛋白表达上调有关^[7]。黄芩苷抑制胃癌细胞生长是否与其诱导铁死亡有关,以及p53蛋白上调在黄芩苷致胃癌细胞死亡中的具体作用机制尚不清楚。因此,本研究以SGC-7901胃癌细胞为研究对象,从体外角度探讨黄芩苷对细胞铁死亡的影响及其潜在的调控机制。

1 材料

1.1 细胞株 人胃上皮细胞GES-1,编号HDCL-052,购自于北京癌症研究所;人胃癌细胞SGC-7901,编号ZQ0062,购自于中国科学院上海生命

科学院细胞库,细胞均传至6~9代。

1.2 药物及试剂 黄芩苷(四川恒诚致远生物科技有限公司,纯度90%~99%,批号N1364);胎牛血清(美国Gibco公司,批号10100-147);1640培养基(美国Hyclone公司,批号SH30809.01);二甲基亚砜(DMSO)、胱天蛋白酶抑制剂I(Z-VAD-FMK,纯度≥98%)、坏死抑制素-1(Necrostatin-1,纯度≥98%)、铁抑制剂-1(Fer-1,纯度≥95%),购自于美国Sigma公司,批号分别为D5879、V116、N9037、SML0583;Lipo 3000转染试剂(美国Invitrogen公司,批号L3000075);p53、前列腺素内环氧化物合成酶2(PTGS2)、硒蛋白谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)重组蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为48818、11282T、52455S、12691S、5174);青-链霉素溶液、二脒基苯基吲哚(DAPI)、生物素标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、生物素标记山羊抗小鼠IgG、噻唑蓝(MTT)试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒、免疫染色所用的通透液、山羊抗小鼠IgG(H+L)-Alexa Fluor 488标记(中国上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0222、C1002、A0277、A0286、C0009S、S0131S、S0033S、P0096、A0428);p53 siRNA(广州锐博生物公司,批号siB14625183006-1-5);蛋白浓度测定试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒、逆转录试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司,批号分别为20201ES76、13086ES60、11119ES60);RNA提取试剂盒(德国Qiagen公司,批号74204);GSH酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物技术有限公司,批号ml038257)。

1.3 仪器 RCO-3000-5型细胞培养箱(美国REVCO公司);BX41型荧光显微镜(日本Olympus公司);ABI7300型Real-time PCR仪(美国Applied Biosystem公司);SilverUVIpro型凝胶数字成像分析仪(英国UVItec公司);Mini-PROTEIN型蛋白电泳系统、Mini Trans-Blot型蛋白转印系统(美国Bio-Rid公司);Spectra MaxM3型酶标仪(德国Molecular Devices公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 使用含10%胎牛血清,1%青-链霉素的1640培养基来培养GES-1和SGC-7901细胞,于含有5% CO₂的培养箱(37℃)中进行培养,使用

对数生长期的细胞进行实验。

2.2 MTT比色法检测细胞活力 将GES-1及SGC-7901细胞分别以5×10³个/孔接种到96孔板中,待细胞贴壁后加入不同浓度的黄芩苷(100、200、400 μmol·L⁻¹),培养24、48 h后吸去上清,加入新鲜培养液及MTT溶液进行孵育,4 h后丢弃上清,在培养皿中加入DMSO混合均匀(摇床低速震荡10 min),用酶标仪检测在波长490 nm处的吸光度A,每组重复进行3次。细胞活性=A_{加样组}/A_{空白组}×100%。

2.3 不同抑制剂对细胞活性的影响 选对数生长期的SGC-7901细胞,分别在10 μmol·L⁻¹ Z-VAD-FMK、25 μmol·L⁻¹ Necrostatin-1和20 μmol·L⁻¹ Fer-1作用下,用黄芩苷处理24 h,采用MTT比色法检测细胞的活性。

2.4 Real-time PCR检测PTGS2和GPX4在mRNA水平表达 选对数生长期的SGC-7901细胞,分为空白组、黄芩苷组、Fer-1组、Fer-1+黄芩苷组,RNA提取试剂盒来收集RNA。通过逆转录试剂盒来合成cDNA,逆转录所需条件:25℃反应5 min,42℃反应30 min,最后85℃反应5 min。依据NCBI Genebank搜索基因序列,使用NCBI Primer BLAST软件对所筛选的基因引物片段进行比对,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物的合成工作,引物序列见表1。使用2^{-ΔΔC_t}的算法推导基因表达量,得出所选基因的标准曲线及扩增效率。总反应体系为30 μL。扩增条件:95℃预变性10 min,95℃变性10 s,60℃退火30 s,72℃延伸20 s,35个循环。采用2^{-ΔΔC_t}计算相关结果。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
PTGS2	上游5'-CTGGCGCTCAGCCATACAG-3'	94
	下游5'-CGCACTTATACTGGTCAAATCCC-3'	
GPX4	上游5'-GAGGCAAGACCGAAGTAACTAC-3'	100
	下游5'-CCGAAGTGGTTACACGGGAA-3'	
GAPDH	上游5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3'	101
	下游5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'	

2.5 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达 分为以下4个部分,①为研究黄芩苷对铁死亡标志基因PTGS2和GPX4蛋白表达的影响,分为空白组、黄芩苷组(400 μmol·L⁻¹)、Fer-1组(25 μmol·L⁻¹)、Fer-1+

黄芩苷组;②为研究不同浓度黄芩苷对SLC7A11蛋白表达影响,将细胞分为空白组、黄芩苷组(100、200、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);③为研究过表达SLC7A11对SLC7A11蛋白表达的影响,通过Lip 3000转染SLC7A11过表达(SLC7A11-OV)质粒,将细胞分为空白组、黄芩苷组(400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),SLC7A11-OV组,SLC7A11-OV+黄芩苷组(黄芩苷400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);④为研究抑制p53对于SLC7A11蛋白表达的影响,转染p53 siRNA,将细胞分为空白组、p53 siRNA组、黄芩苷组、p53 siRNA+黄芩苷组,黄芩苷浓度为400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。处理结束后分别收集各组细胞,无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,于冰上加入RIPA裂解液裂解,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心(离心半径5 cm),收集上清液。参照蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。蛋白样品与缓冲液(5 \times)按4:1于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内变性10 min。经过电泳和转膜后将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。膜用含有5%脱脂奶粉的封闭液在室温下封闭2 h,加入抗体SLC7A11、PTGS2、GPX4、p53(1:1 000),GAPDH(1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗涤3次(TBST)后,加入相应的二抗室温摇床孵育2 h,于PVDF膜上添加ECL化学发光剂,凝胶成像仪进行曝光。图片通过Image软件对所得各个条带进行灰度值分析,以GAPDH作为内参条带,通过各目的蛋白条带与内参蛋白条带的灰度比值来计算蛋白的相对表达。

2.6 MDA含量的检测 选对数生长期SGC-7901细胞,分组同2.5项下中①和③,于冰上裂解后离心提取上清(4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,离心半径5 cm),根据MDA试剂盒说明书进行操作,每个样品做3个复孔,随后用酶标仪在532 nm测定A。

2.7 GSH水平的检测 选对数生长期的SGC-7901细胞,分组同2.5项,根据GSH试剂盒说明书进行操作。每组设3个复孔,使用酶标仪在405 nm处测量A,实验重复3次。根据标准曲线计算样品GSH和

GSSG含量,GSH=总谷胱甘肽-GSSG \times 2。

2.8 SLC7A11过表达细胞构建 将购自于上海吉玛有限公司的SLC7A11过表达质粒通过Lip 3000转染到细胞中,转染48 h后,收集细胞并使用免疫印迹法测定转染效率,并用于后续研究。

2.9 活性氧的检测 选对数生长期的SGC-7901细胞,分为空白组、黄芩苷组、SLC7A11-OV组、SLC7A11-OV+黄芩苷组。无血清培养液稀释DCFH-DA探针(1:1 000),加入稀释好的探针工作液(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),于CO₂培养箱中孵育20 min,每隔5 min震荡1次,洗涤后使用荧光显微镜进行拍照,并用Image J软件统计荧光强度。

2.10 细胞免疫荧光 将培养板中的细胞用4%多聚甲醛固定15 min,洗涤,加入免疫染色用通透液和BSA封闭液,之后加入一抗(p53,1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBST洗涤后滴加荧光二抗(1:500),孵育2 h(避光,37 $^{\circ}\text{C}$),PBST洗涤。滴加DAPI孵育5 min(避光),PBST洗涤,加入抗荧光猝灭剂,荧光显微镜下采集图像,并用Image J软件统计荧光强度。

2.11 siRNA干扰 使用对数生长期的细胞,将接种于6孔板培养皿,放入培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂)培养,待细胞生长至60%时按照说明书转染相应的p53 siRNA,待转染24 h后进行后续实验。

2.12 统计学分析 数据统计分析采用SPSS 21.0软件进行,所得结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。对于两组数据之间的比较采用t检验的方法,而对于多组数据间的比较采用单因素方差分析来进行,以P<0.05为具有差异统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩苷对SGC-7901胃癌细胞活性的影响 同时间空白组比较,SGC-7901细胞的活性随着黄芩苷处理浓度升高和处理时间延长而明显降低,差异有统计学意义(P<0.05,P<0.01);黄芩苷并不能明显抑制GES-1细胞的活性,与空白组比较差异无统计学意义。见表2。

表2 黄芩苷对GES-1和SGC-7901细胞活性的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

Table 2 Effect of baicalin on cell viability of GES-1 and SGC-7901 cells ($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	GES-1细胞活性		SGC-7901细胞活性	
		24 h	48 h	24 h	48 h
黄芩苷组	100	99.12 \pm 0.59	98.43 \pm 0.71	86.14 \pm 1.32 ¹⁾	81.61 \pm 0.95 ²⁾
	200	96.49 \pm 1.06	93.33 \pm 1.42	62.49 \pm 1.59 ²⁾	60.35 \pm 1.48 ²⁾
	400	91.89 \pm 1.53	89.89 \pm 1.49	44.89 \pm 1.27 ²⁾	31.58 \pm 1.36 ²⁾

注:设空白组细胞活性均为100%;与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表7同)

3.2 Fer-1和黄芩苷对SGC-7901细胞活性的影响

Z-VAD-FMK和Necrostatin-1并不能够阻止黄芩苷对细胞活性的抑制作用,与黄芩苷组比较差异无统计学意义;Fer-1+黄芩苷组中的细胞活性较黄芩苷组显著升高($P<0.01$)。见表3。

表3 不同抑制剂处理后对SGC-7901细胞活性($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of different inhibitors on cell viability of SGC-7901 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞24 h活性/%
空白组		100.00 \pm 0.00
黄芩苷组	400	45.39 \pm 1.22
Z-VAD-FMK+黄芩苷组	10+400	47.12 \pm 1.39
Necrostatin-1+黄芩苷组	25+400	45.10 \pm 1.04
Fer-1+黄芩苷组	20+400	76.45 \pm 1.78 ¹⁾

注:与黄芩苷组比较¹⁾ $P<0.01$

3.3 黄芩苷对SGC-7901细胞PTGS2和GPX4 mRNA表达的影响

与空白组比较,黄芩苷组细胞GPX4 mRNA水平表达显著降低($P<0.01$),PTGS2 mRNA水平表达显著升高($P<0.01$);与黄芩苷组比较,Fer-1+黄芩苷组细胞GPX4 mRNA水平表达显著升高($P<0.01$),PTGS2 mRNA水平表达显著降低($P<0.01$)。见表4。

表4 黄芩苷对SGC-7901细胞中PTGS2、GPX4 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of baicalin on mRNA levels of PTGS2 and GPX4 in SGC-7901 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PTGS2	GPX4
黄芩苷组	400	3.49 \pm 0.35 ¹⁾	0.37 \pm 0.04 ¹⁾
Fer-1组	20	0.97 \pm 0.08	0.98 \pm 0.10
Fer-1+黄芩苷组	20+400	1.54 \pm 0.16 ²⁾	0.75 \pm 0.12 ²⁾

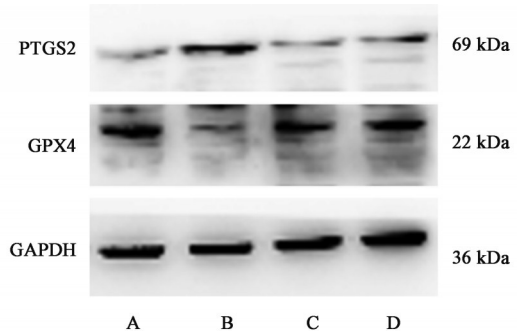
注:设空白组PTGS2、GPX4 mRNA相对表达为1;与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与黄芩苷组比较²⁾ $P<0.01$ (表5、表6、表8、表9、表11同)

3.4 黄芩苷对SGC-7901细胞PTGS2和GPX4蛋白表达的影响

与空白组比较,黄芩苷组细胞GPX4蛋白表达显著降低($P<0.01$),PTGS2蛋白表达显著升高($P<0.01$);与黄芩苷组比较,Fer-1+黄芩苷处理组细胞中GPX4蛋白显著升高($P<0.01$),PTGS2蛋白表达显著降低($P<0.01$)。见图1和表5。

3.5 黄芩苷对SGC-7901细胞MDA含量和GSH活性的影响

与空白组比较,黄芩苷组细胞的MDA含量显著升高($P<0.01$),细胞中GSH活性显著降低($P<0.01$);与黄芩苷组比较,Fer-1+黄芩苷组细胞的MDA含量显著降低($P<0.01$),细胞GSH活性显著



注:A.空白组;B.黄芩苷组;C.Fer-1组;D.Fer-1+黄芩苷组

图1 黄芩苷处理SGC-7901细胞PTGS2和GPX4蛋白电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PTGS2 and GPX4 proteins in SGC-7901 cells treated with baicalin

表5 黄芩苷对铁死亡标志基因在蛋白水平表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of baicalin on expression of ferroptosis marker genes at protein levels ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PTGS2/GAPDH	GPX4/GAPDH
空白组		0.09 \pm 0.01	0.42 \pm 0.04
黄芩苷组	400	0.38 \pm 0.04 ¹⁾	0.13 \pm 0.01 ¹⁾
Fer-1组	20	0.10 \pm 0.02	0.40 \pm 0.03
Fer-1+黄芩苷组	20+400	0.17 \pm 0.03 ²⁾	0.31 \pm 0.03 ²⁾

升高($P<0.01$)。见表6。

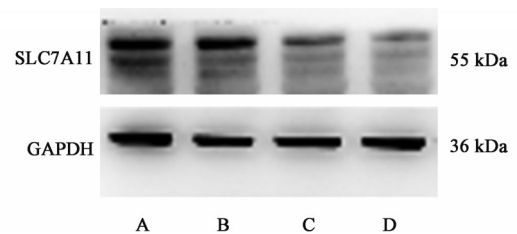
表6 黄芩苷对SGC-7901细胞MDA含量和GSH活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of baicalin on MDA content and GSH activity in SGC-7901 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$	GSH/%
空白组		6.13 \pm 0.51	100 \pm 0.00
黄芩苷组	400	13.76 \pm 1.03 ¹⁾	50.43 \pm 4.01 ¹⁾
Fer-1组	20	6.28 \pm 0.54	99.17 \pm 3.73
Fer-1+黄芩苷组	20+400	8.12 \pm 0.63 ²⁾	78.26 \pm 4.63 ²⁾

3.6 黄芩苷对SLC7A11蛋白表达的影响

与空白组比较,黄芩苷组细胞中SLC7A11的蛋白表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见图2和表7。



注:A.空白组;B~D.黄芩苷组(100、200、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

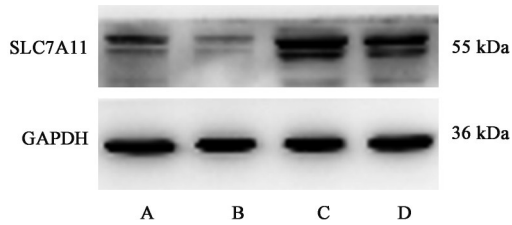
图2 黄芩苷处理SGC-7901细胞SLC7A11蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of SLC7A11 protein in SGC-7901 cells treated with baicalin

表7 黄芩苷对SGC-7901细胞SLC7A11蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 7 Effect of baicalin on SLC7A11 protein expression in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SLC7A11/GAPDH
空白组		0.41±0.03
黄芩苷组	100	0.33±0.02 ¹⁾
	200	0.13±0.02 ²⁾
	400	0.06±0.01 ²⁾

3.7 过表达SLC7A11对黄芩苷处理细胞SLC7A11蛋白的影响 与空白组比较,SLC7A11-OV组细胞中SLC7A11表达显著增加($P<0.01$);与黄芩苷组比较,SLC7A11-OV+黄芩苷组中SLC7A11蛋白表达显著升高($P<0.01$)。见图3和表8。



注:A.空白组;B.黄芩苷组;C.SLC7A11-OV组;D.SLC7A11-OV+黄芩苷组(图4同)

图3 过表达SLC7A11后各组细胞中SLC7A11蛋白电泳
Fig. 3 Electrophoresis of SLC7A11 protein in cells from each group

表8 过表达SLC7A11阻止了黄芩苷引起的SLC7A11表达降低 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Overexpression of SLC7A11 prevented reduction of SLC7A11 expression caused by baicalin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SLC7A11/GAPDH
空白组		0.37±0.02
黄芩苷组	400	0.05±0.01 ¹⁾
SLC7A11-OV组		0.75±0.06 ¹⁾
SLC7A11-OV+黄芩苷组	400	0.42±0.03 ²⁾

3.8 过表达SLC7A11对黄芩苷处理细胞中ROS水平、MDA含量和GSH活性的影响 与黄芩苷组比较,黄芩苷+SLC7A11-OV组细胞中ROS水平和MDA含量均显著降低($P<0.01$),GSH活性则显著升高($P<0.01$)。见表9、图4。

3.9 黄芩苷对SGC-7901细胞p53表达的影响 与空白组比较,黄芩苷组细胞中p53荧光强度显著升高($P<0.01$)。见表10、图5。

3.10 抑制p53表达对黄芩苷处理细胞中SLC7A11蛋白水平的影响 与空白组比较,p53 siRNA能够显著降低黄芩苷引起p53表达水平升高($P<0.01$);

表9 过表达SLC7A11对黄芩苷处理细胞中ROS水平,MDA含量和GSH活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of SLC7A11 overexpression on ROS level, MDA content, and GSH activity in baicalin-treated cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ROS相对荧光强度	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$	GSH/%
空白组		1	5.95±0.46	100
黄芩苷组	400	3.65±0.39 ¹⁾	13.42±1.27 ¹⁾	49.30±3.88 ¹⁾
SLC7A11-OV组		1.05±0.13	5.89±0.61	98.43±4.12
SLC7A11-OV+黄芩苷组	400	1.64±0.20 ²⁾	8.94±0.55 ²⁾	70.07±3.29 ²⁾

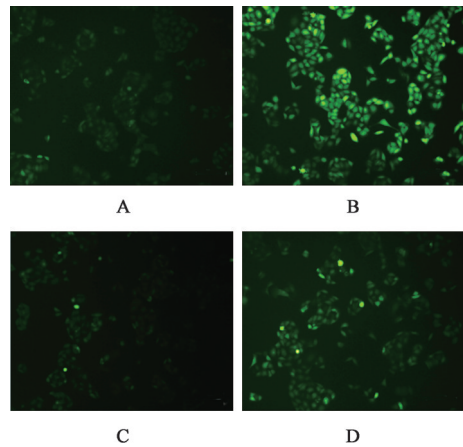


图4 过表达SLC7A11对各组细胞ROS水平的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 4 Effect of SLC7A11 overexpression on ROS levels in each group(IF, ×100)

表10 黄芩苷对SGC-7901细胞p53表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of baicalin on expression of p53 in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

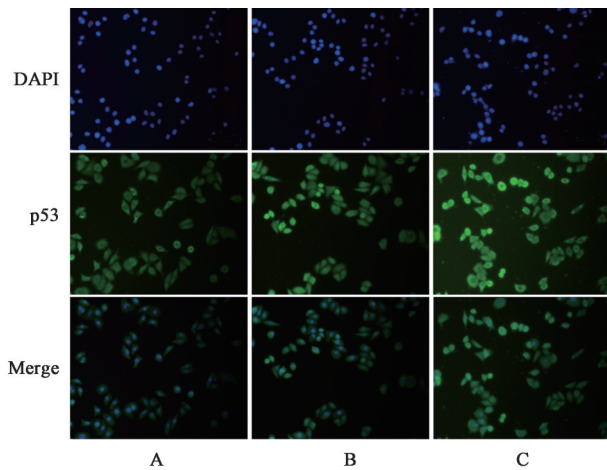
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p53相对荧光强度
空白组		1
黄芩苷组	200	2.44±0.20 ¹⁾
	400	3.17±0.36 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$

与黄芩苷组比较,p53 siRNA+黄芩苷组SLC7A11蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。见图6、表11。

4 讨论

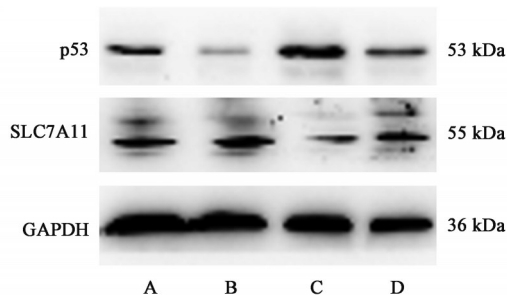
目前,由于针对胃癌治疗的手术、放疗和化疗等方式仍存在治愈率低,预后较差和不良反应等问题,因而迫切的需要寻找新的天然抗肿瘤药物。黄芩苷作为一种从唇形科植物黄芩中所分离与提纯的天然药物,近年来由于其具有良好的抗肿瘤效果而受到越来越多的关注。黄芩为肿瘤治疗的临床常用药之一,累计使用频次位居第4,对临床多种疾病的治疗都有明显效果。本研究以SGC-7901人



注:A.空白组;B、C.黄芩苷组(200、400 μmol·L⁻¹)

图5 黄芩苷对各组细胞p53表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 5 Effect of baicalin on p53 expression in cells from each group(IF, ×200)



注:A.空白组;B.p53 siRNA组;C.黄芩苷组;D.p53 siRNA+黄芩苷组

图6 p53 siRNA转染后细胞中SLC7A11蛋白电泳

Fig. 6 Electrophoresis of SLC7A11 protein after cells transfected with p53 siRNA

表11 p53 siRNA对SGC-7901细胞SLC7A11表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 Effect of p53 siRNA on expression of SLC7A11 in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 /μmol·L ⁻¹	p53 /GAPDH	SLC7A11 /GAPDH
空白组		0.32±0.03	0.35±0.02
p53 siRNA组		0.07±0.01 ¹⁾	0.33±0.02 ¹⁾
黄芩苷组	400	0.84±0.04	0.08±0.01
p53 siRNA+黄芩苷组	400	0.36±0.03 ²⁾	0.25±0.03 ²⁾

胃癌细胞为研究对象,进一步从体外角度证实了黄芩苷对胃癌细胞的增殖具有抑制作用。

相关研究发现黄芩苷通过抑制PCNA蛋白来对胃癌SGC7901细胞的增殖起抑制作用^[8]。黄芩苷处理引起SGC7901细胞凋亡抑制蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)表达水平明显降低,凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达上调^[9]。另有研究通过凋亡抗

亡通路,表明黄芩苷能激活死亡受体相关凋亡通路诱导SGC7901细胞凋亡^[10]。本研究发现,黄芩苷能引起SGC-7901细胞死亡,凋亡抑制剂Z-VAD-FMK和坏死抑制剂Necrostatin-1的使用却不能缓解黄芩苷引起的胃癌细胞死亡。提示黄芩苷可能是通过其他的细胞死亡方式来对胃癌细胞造成抑制作用。

铁死亡是近年来新发现的一种死亡方式,不同于典型的坏死性死亡和凋亡性的细胞死亡。其中铁离子依赖的脂质过氧化是引起铁死亡的关键因素^[11-12]。ROS在脂质过氧化中起关键作用,细胞内ROS水平的改变因素可诱发细胞铁死亡的发生^[13]。GSH是维持氧化还原稳态的重要抗氧化剂,任何增加GSH消耗或扰乱GSH合成的因素都会导致细胞内ROS水平的升高^[14]。越来越多的证据指出,在包括阿尔兹海默、帕金森、脑卒中、缺血再灌注和肿瘤等多种疾病的发生与发展过程中都有铁死亡的参与^[15-19]。针对于铁死亡相关抑制剂与诱导剂的临床应用也为这些疾病的诊治提供了新的靶点与对策。本研究发现,铁死亡抑制剂Fer-1的使用则能够缓解黄芩苷引起的SGC-7901细胞死亡,提示铁死亡可能参与了黄芩苷引起的胃癌细胞死亡。细胞中ROS水平和脂质过氧化标志物MDA含量升高,铁死亡标志基因PTGS2表达水平上调,GPX4表达的下调及GSH水平降低。而Fer-1则能够显著降低黄芩苷引起的MDA含量和PTGS2水平升高,细胞中GSH和GPX4水平则明显升高,细胞存活率有明显增加。结果表明,黄芩苷诱导胃癌细胞铁死亡。

半胱氨酸是GSH的限速前体,多数的癌细胞需要通过胱氨酸转运蛋白系统来从细胞外部获得胱氨酸,进而在胞质中通过还原反应转化为半胱氨酸,最终被用于GSH的合成。SLC7A11在这个过程中起着重要的作用。SLC7A11通过介导胱氨酸的摄取,从而在维持细胞氧化应激条件下的存活中起关键性的作用^[20]。研究发现,SLC7A11的过表达在一定程度上是通过抑制细胞铁死亡的发生来最终促进肿瘤细胞生长^[21]。因此,靶向抑制SLC7A11的表达成为癌症治疗的关键。本研究发现,黄芩苷能够抑制SLC7A11的表达,过表达SLC7A11则显著降低了黄芩苷引起的脂质过氧化水平升高。

p53信号在调控SLC7A11的转录过程中起着重要的作用。活化后的p53蛋白能够结合到SLC7A11基因的启动子区,从而抑制SLC7A11基因的表达,降低胱氨酸的摄取,最终限制了细胞中主要抗氧化

剂GSH的生存。因此,ROS诱导的铁死亡敏感性在p53激活的细胞中显著增高^[22]。且越来越多的研究指出,黄芩苷可以引起包括胃癌细胞在内多种肿瘤细胞p53表达水平的升高^[23-25]。p53的活化在黄芩苷致胃癌细胞铁死亡中的作用仍不清楚。本研究发现,黄芩苷能够引起SGC-7901细胞p53蛋白表达水平的升高,p53 siRNA的使用则有效缓解黄芩苷对SLC7A11表达的抑制作用。这些结果表明,p53的激活在黄芩苷抑制SLC7A11表达中发挥关键作用。SLC7A11表达受到ATF4和NRF2调控。

综上所述,铁死亡是黄芩苷诱导SGC-7901胃癌细胞死亡的重要途径,黄芩苷通过p53介导的SLC7A11下调引起胃癌细胞铁死亡的发生。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.

[2] 陈俊良,王风华. 2021版CSCO胃癌诊疗指南转移性胃癌更新解读[J]. 中国肿瘤临床, 2022, 49(7): 325-330.

[3] 吴缠婷,周良良,邹婉清,等. 黄芩苷的药理特性及其作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 63-67.

[4] XU W F, LIU F, MA Y C, et al. Baicalin regulates proliferation, apoptosis, migration, and invasion in mesothelioma [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 8172-8180.

[5] MA W, LIU X, DU W. Baicalin induces apoptosis in SW480 cells through downregulation of the SP1 transcription factor [J]. *Anticancer Drugs*, 2019, 30(2): 153-158.

[6] JIANG L, KON N, LI T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62.

[7] 林方德,黄勃. 黄芩苷对人胃癌MGC-803细胞凋亡及相关凋亡基因表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(12): 1278-1280.

[8] 李梁杰,井虹苏, NARAYAN B S, 等. 黄芩苷联合紫杉醇抑制胃癌细胞增殖的研究[J]. 化工时刊, 2022, 36(3): 4-6.

[9] 李峰,王根旺,钱彬彬,等. 黄芩苷对人胃癌SGC-7901细胞增殖抑制作用及其机制研究[J]. 中国药物警戒, 2015, 12(5): 257-260.

[10] 李海龙,陈凤琴,王晶,等. 抗体芯片筛选黄芩苷诱导胃癌SGC-7901细胞凋亡的作用靶点[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 540-545.

[11] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.

[12] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: Process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369-379.

[13] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: Past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88-101.

[14] YANG G, CHEN C, ZHU Y, et al. GSH-activatable NIR nanoplatfrom with mitochondria targeting for enhancing tumor-specific therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(48): 44961-44969.

[15] 郑合昇,吴玉梅. 铁死亡在中医药治疗帕金森病中的机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 20-27.

[16] 谢吐秀,吕菁君,张新奇,等. 铁死亡在脑缺血-再灌注损伤过程中的研究进展 [J]. 中国急救医学, 2022, 42(4): 358-363.

[17] 刘静,刘文天. 铁死亡在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2022, 38(3): 331-333.

[18] 万文龙,吴维松,依日夏提江·阿米尔,等. 铁死亡在肾结石形成中的研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(4): 814-816.

[19] 方学贤,蔡昭贤,王浩,等. 铁过载及铁死亡在心脏疾病中的研究进展[J]. 科学通报, 2019, 64(28): 2974-2987.

[20] FANG X, CAI Z, WANG H, et al. Loss of cardiac ferritin H facilitates cardiomyopathy via Slc7a11-mediated ferroptosis [J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): 486-501.

[21] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: Ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620

[22] BLANCHET A, BOURGMAYER A, KURTZ J E, et al. Isoforms of the p53 family and gastric cancer: A ménage à trois for an unfinished affair [J]. *Cancers*, 2021, 13(4): 916-928.

[23] 王继军. 黄芩苷干预小鼠B细胞淋巴瘤中肿瘤干细胞的机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.

[24] 林方德,黄勃. 黄芩苷对人胃癌MGC-803细胞凋亡及相关凋亡基因表达的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(12): 1278-1280.

[25] NIITSU N. Current treatment strategy of diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Int J Hematol*, 2010, 92(2): 231-237.

[责任编辑 张丰丰]