

Polyphyllin VI诱导铁死亡抑制结肠癌细胞株 HT-29 和 SW480 增殖机制研究

李斌¹, 易小江^{2*}

1.北京中医药大学深圳医院 普通外科, 广东 深圳 518172

2.广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院) 胃肠肿瘤中心结直肠外科, 广东 广州 510120

【摘要】 目的 探讨重楼皂苷 polyphyllin VI通过诱导铁死亡抑制结肠癌细胞株 HT-29 和 SW480 增殖的相关机制。**方法** 常规培养细胞株 HT-29 和 SW480, 实验分为阴性对照组、二甲基亚砜组、polyphyllin VI组(用浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin VI处理的细胞)和 polyphyllin VI+ferrostatin-1 组(用浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin VI+100 $\mu\text{mol/L}$ 铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 联合处理的细胞)。采用高通量转录组测序分析 polyphyllin VI组的差异表达基因并进行基因富集分析。采用 CCK-8 法检测各组细胞株的增殖活力。采用活性氧、铁浓度、谷胱甘肽浓度检测实验和透射电镜检测分析各组细胞株的铁死亡改变。最后采用蛋白质印迹法和定量聚合酶链反应分别验证铁死亡相关蛋白和基因在 polyphyllin VI组中的表达水平。**结果** 转录组测序和基因富集分析显示 polyphyllin VI可通过铁死亡通路作用于细胞株 HT-29 和 SW480。CCK-8 法结果显示 polyphyllin VI可抑制细胞株 HT-29 和 SW480 的增殖活力。与阴性对照组相比, polyphyllin VI组的活性氧水平增加($P<0.001$)、谷胱甘肽浓度降低($P<0.05$)、铁离子相对浓度增加($P<0.001$), 且透射电镜检测显示 polyphyllin VI组细胞株的线粒体数量减少, 膜密度增高。与 polyphyllin VI组相比, polyphyllin VI+ferrostatin-1 组的细胞株增殖活力增强, 活性氧水平降低($P<0.001$)、谷胱甘肽浓度增加($P<0.01$)、铁离子相对浓度降低($P<0.001$), 且细胞株的线粒体数量上升, 膜密度降低。长链酰基辅酶 A 合酶 4(long-chain acyl-coenzyme A synthase 4, ACSL4) 蛋白和 mRNA 表达水平在 polyphyllin VI组中均上升, 而谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidases, GPX)4 的蛋白表达水平则下调。**结论** Polyphyllin VI可通过诱导铁死亡过程来抑制结肠癌细胞株 HT-29 和 SW480 的增殖能力, 潜在作用路径为 GPX4/ACSL4 通路。

【关键词】 Polyphyllin VI; 结肠癌; 细胞株 HT-29 和 SW480; 铁死亡

Study on the mechanism of polyphyllin VI in inhibiting proliferation of HT -29 and SW480 colon cancer cell lines by inducing ferroptosis

Li Bin¹, Yi Xiaojiang^{2*}

1.Department of General Surgery, Shenzhen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen 518172, Guangdong, China

2.Department of Colorectal Surgery, Gastrointestinal Tumor Center, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510120, Guangdong, China

*Corresponding author: Yi Xiaojiang, E-mail: sysuyixj@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of polyphyllin VI in inhibiting the proliferation of colon cancer cell lines HT-29 and SW480 by inducing ferroptosis. **Method** The HT-29 and SW480 cell lines were cultured routinely and divided into negative control group, dimethyl sulfoxide group, polyphyllin VI group (cells treated with a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin VI), and polyphyllin VI+ferrostatin-1 group

基金项目:广东省中医药管理局科研项目(20231148)

*通信作者:易小江, E-mail: sysuyixj@sina.com

(cells treated with a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ polyphyllin VI+100 $\mu\text{mol/L}$ ferroptosis inhibitor ferrostatin-1). Using high-throughput transcriptome sequencing to analyze differentially expressed genes in the polyphyllin VI group and conducting gene enrichment analysis. Using CCK-8 assay to detect the proliferation activity of cell lines in each group. Reactive oxygen species, iron concentration, glutathione concentration detection experiments and transmission electron microscopy were conducted to analyze the changes in ferroptosis in each group of cell lines. Finally, western blot and quantitative polymerase chain reaction were used to verify the expression levels of ferroptosis related proteins and genes in the polyphyllin VI group, respectively. **Result** The results of transcriptome sequencing and gene enrichment analysis showed that polyphyllin VI can act on cell lines HT-29 and SW480 through the ferroptosis pathway. The results of CCK-8 assay showed that polyphyllin VI could inhibit the proliferation activity of cell lines HT-29 and SW480. Compared with the negative control group, the level of reactive oxygen species increased ($P<0.001$), the concentration of glutathione decreased ($P<0.05$), and the relative concentration of iron ions increased ($P<0.001$) in the polyphyllin VI group. Transmission electron microscopy analysis showed a decrease in mitochondrial count and an increase in membrane density in the cell lines of polyphyllin VI group. Compared with the polyphyllin VI group, the cell lines proliferation activity of the polyphyllin VI+ferrostatin-1 group was enhanced, the level of reactive oxygen species was reduced ($P<0.001$), the concentration of glutathione was increased ($P<0.01$), the relative concentration of iron ions was reduced ($P<0.001$), and the mitochondrial count increased while the membrane density decreased in the cell lines of polyphyllin VI+ferrostatin-1 group. The protein and mRNA expression levels of long-chain acyl-coenzyme A synthase 4 (ACSL4) increased in the polyphyllin VI group, while the protein expression level of glutathione peroxidase (GPX) 4 was downregulated. **Conclusion** Polyphyllin VI can inhibit the proliferation ability of the HT-29 and SW480 colon cancer cell lines by inducing ferroptosis, with a potential GPX4/ACSL4 pathway.

[Key words] Polyphyllin VI; Colon cancer; HT-29 and SW480 cell lines; Ferroptosis

结肠癌是全球死亡率排名第三的肿瘤, 每年有超过 185 万新发病例和 85 万死亡病例。在新发病例中, 20% 的患者合并同时性转移, 另有 25% 的患者出现异时性转移^[1]。目前治疗方法包括手术、化疗、放疗、靶向和免疫治疗等, 其中手术仅限于早中期, 其他治疗方法也有着不同的局限性, 如严重毒副作用和耐药性, 因此需要探索新的替代疗法^[2]。近年来, 铁死亡作为一种新的程序性细胞死亡形式出现, 其特征是铁离子依赖的脂质过氧化, 后续引起细胞膜的氧化损伤^[3]。肿瘤细胞在生长过程中被认为需要一定量的铁离子, 但铁离子过载反过来也会诱导肿瘤细胞的铁死亡^[4-5]。研究表明, 铁死亡可在结直肠癌中消除其他程序性细胞死亡类型产生的耐药性^[6-8], 铁死亡诱导剂也逐渐成为结直肠癌治疗方案研究的新方向。

由于具有独特的化学结构和多样的生物活性, 天然植物提取物已被视为抗肿瘤药物的重要来源, 其优势包括持久的疗效、低毒性、低经济成本以及多靶点作用^[9]。云南重楼作为一种历史悠久的抗癌中药, 其主要活性成分为甾体皂苷^[10-11]。近年来, 甾体皂苷的作用机制备受关注, 并对多种

肿瘤细胞显示出抗癌特性^[10-13]。研究发现重楼皂苷可抑制结直肠癌细胞的增殖和转移, 机制包括调节细胞周期、促进细胞凋亡和自噬^[14-18]。Luo 等^[14]首次表明重楼单体 polyphyllin I 可诱导活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生和下调丝氨酸/苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路促进结肠癌细胞自噬和凋亡。Yu 等^[15]研究也表明 polyphyllin I 通过 ROS 依赖性自噬和诱导 G2/M 阻滞在结直肠癌中发挥抗癌作用。Polyphyllin II 则通过磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/AKT/mTOR 以及信号转导和转录激活因子 (signal transduction and transcription activating factor, STAT) 3 信号通路诱导保护性自噬和凋亡来抑制结直肠癌细胞的增殖^[16]。Song 等^[17]研究结果提示 polyphyllin VII 可显著抑制结直肠癌细胞增殖并诱导细胞周期阻滞和凋亡。Lin 等^[18]研究表明重楼皂苷可抑制结直肠癌 DLD-1 细胞增殖, 通过上调自噬标志物而不触发 p53 和半胱氨酸天冬氨酸水解酶 (cysteine-specific aspartate specific proteinase, Caspase)-3 依赖性细

胞凋亡,而且重楼皂苷还增强了多柔比星的抗肿瘤作用,自重楼皂苷中分离得到的 pennogenin 3-O-beta-chacotrioside 和 polyphyllin VI 并被认为是主要的活性成分。Polyphyllin VI 作为云南重楼的主要生物活性单体之一,越来越多的研究表明 polyphyllin VI 可在包括结直肠癌在内的多种肿瘤中发挥抗癌作用^[18-21]。在非小细胞肺癌中,Teng 等^[19]认为 polyphyllin VI 可通过 ROS/核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)/消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 信号轴诱导 Caspase-1 介导的焦亡。Yuan 等^[20]研究结果表明 polyphyllin VI 可以通过 ROS/c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路的激活诱导凋亡来抑制骨肉瘤细胞 U2OS 的生长。在乳腺癌细胞中, polyphyllin VI 可通过微小 RNA (microRNA, miRNA)-18a 靶向调节 *Rel-2* 基因起着抗肿瘤转移的作用^[21]。

在我们前期的预实验中,通过转录组测序分析提示 polyphyllin VI 可通过铁死亡通路诱导结肠癌细胞株 HT-29 和 SW480 死亡。因此,本研究将通过体外实验初步验证 polyphyllin VI 通过诱导铁死亡抑制结肠癌细胞增殖的机制,为后续抗癌药物的开发提供基础实验证据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

结肠癌细胞株 HT-29 和 SW480 购自广州赛库生物科技公司,细胞株 HT-29 用 10% 胎牛血清 McCoy's 5a 培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养;细胞株 SW480 用 10% 胎牛血清 L-15 培养基在 37℃、100% 空气培养箱中常规培养。

胎牛血清、McCoy's 5a 和 L-15 培养基购自广州赛库生物技术有限公司, polyphyllin VI 购自美国 Selleck 公司, CCK-8 检测试剂盒购自武汉塞维尔生物科技有限公司, ROS 检测试剂盒购自广州硕谱生物科技有限公司, 铁测定试剂盒和还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒购自南京建成生物科技有限公司, 铁死亡拮抗剂 ferrostatin-1 购自美国 APEX BIO 公司, 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidases, GPX) 4 和 MAP1LC3B 抗体购自美国 Proteintech 公司, 长链酰基辅酶 A 合

酶 4 (long-chain acyl-coenzyme A synthase 4, ACSL4)、溶质载体家族 3 成员 2 (solute carrier family 3 member 2, SLC3A2) 和铁质蛋白 1 重链 (ferritin heavy polypeptide 1, FTH1) 抗体购自武汉 ABclone 公司, 兔抗 β -actin 和辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自合肥 Biosharp 公司, TriQuick 试剂购自北京索莱宝科技有限公司, HiScript III RT SuperMix Reagent Kit with gDNA Eraser 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技公司。

1.2 实验分组

阴性对照 (negative control, NC) 组: 采用浓度为 0 的 polyphyllin VI 处理的细胞株 HT-29 和 SW480。

二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 组: 采用浓度为 1% 的 DMSO 溶剂处理的细胞株 HT-29 和 SW480。

polyphyllin VI (polyphyllin VI, PP VI) 组: 采用浓度为 5 μ mol/L polyphyllin VI 处理的细胞株 HT-29 和 SW480。

polyphyllin VI + ferrostatin-1 (polyphyllin VI + ferrostatin-1, PPVI+Fer-1) 组: 采用浓度为 100 μ mol/L ferrostatin-1 预处理细胞株 HT-29 和 SW480 30 min 后, 再采用 5 μ mol/L polyphyllin VI 和 100 μ mol/L ferrostatin-1 联合处理。

以上分组每组均设 3 个复孔。

1.3 高通量转录组测序和基因富集分析

常规培养细胞株 HT-29 和 SW480, 按 1.2 的方法分别处理 NC 组和 PP VI 组细胞 48 h 后收集细胞, 提取样本的总 RNA 后, 将 mRNA 富集, 将富集得到的 mRNA 反转录形成双链 cDNA, 纯化后构建文库并在质检后上机测序。测序采用美国 APEX BIO 公司 Illumina NovaSeq 高通量测序平台; 过滤过程采用 fastp 进行数据质控, 过滤低质量数据; 对比组组装定量分析过程选择 HISAT2 软件, HISAT2 软件采用改进的 BWT 算法, 得到对比参考基因组, 使用 Stringtie 软件进行转录本重构, 得到转录本结果并统计表达量; 组间差异表达采用 DESeq2 进行分析, 显著差异基因分析的筛选标准为 ($\log_2$ FC) > 0.59, P < 0.05; 采用差异基因 $\log_2$ (TPM + 1) 做热图。差异基因向基因本体 (gene ontology, GO) 数据库各条目映射, 并计算每个条目的基因数, 从而得到具有 GO 功能的基因列表及基因数

目统计,再应用超几何检验,找出显著富集的 GO 条目。京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析以 KEGG 通路为单位,应用超几何检验,找出与整个参考转录组比较后在差异表达基因中显著富集的通路。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖活力

将处于对数生长期的细胞株 HT-29 和 SW480,调整细胞浓度至 3×10^4 个/ml,按 100 μ l/孔接种于 96 孔板中。

检测 polyphyllin VI 对细胞增殖活力的影响:各孔中加入 polyphyllin VI [浓度分别为 0(NC 组)、0.25、0.5、1、2、4、8、16 μ mol/L,每个浓度设 3 个复孔],然后每孔再加入 100 μ l 无血清的完全培养基。分别培养 24、48 h 后弃去培养基,加入 10 μ l CCK-8 试剂继续培养 2 h,然后用酶标仪进行检测。

检测 ferrostatin-1 对细胞增殖活力的影响:按 1.2 的方法处理 PPVI+Fer-1 组细胞,分别在培养 24、28、96 h 后弃去培养基,加入 10 μ l CCK-8 试剂继续培养 2 h,然后用酶标仪进行检测。

用酶标仪测定 450 nm 处各孔的光密度(optical density, OD)值,以 OD 值代表细胞增殖活力,绘制其生长曲线并计算半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.5 活性氧、铁浓度、谷胱甘肽浓度检测实验和透射电镜检测

常规培养细胞株 HT-29 和 SW480,按 1.2 的方法进行分组处理 48 h。

ROS 检测实验:吸除处理药物,加入 H₂DCFDA 工作液,37 $^{\circ}$ C 培养箱内避光孵育 30 min,用无血清培养液洗涤细胞 1~2 次,荧光显微镜下选用 FITC 滤光片观察荧光,去除背景后测量平均绿色荧光强度。

GSH 浓度检测实验:按照试剂盒说明书配制试剂备用,将收集好的细胞用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗 1~2 次后,离心收集沉淀细胞,再加 PBS 悬浮细胞,超声破碎细胞后待测。取破碎后的细胞悬液 0.1 ml,加 0.1 ml 备用试剂混匀,3500 r/min 离心 10 min,取上清液再次加入备用试剂混匀,静置 5 min,405 nm 处用酶标仪测定各孔吸光度值,最后计算 GSH 浓度。

铁浓度检测实验:细胞悬液以 1500 r/min 离心 5 min,制备单细胞,计数,每组收集 5×10^5 个细

胞至 1.5 ml EP 管中,预冷的 PBS 洗 2 次,加入铁测定试剂盒提供的细胞裂解液 200 μ l,重悬,按试剂盒所述步骤在 550 nm 处检测铁离子浓度。

透射电镜检测:收集培养细胞以 1500~3000 r/min 离心 5~10 min,弃去上清液收集管底细胞,沿管壁缓慢加入 4 $^{\circ}$ C 预冷固定液,然后放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存 4 h。倒掉固定液,PBS 漂洗样品 3 次,每次 15 min。用 1% 的钨酸溶液固定样品 1~2 h,小心取出钨酸废液,PBS 漂洗样品 3 次,每次 15 min。用梯度浓度(30%、50%、70%、80%、90%和 95%)的乙醇溶液对样品进行脱水处理,每种浓度处理 15 min,再用 100% 的乙醇处理 20 min,最后过渡到纯丙酮处理 20 min。用包埋剂与丙酮的混合液(1:1)处理样品 1 h,再用包埋剂与丙酮的混合液(3:1)处理 3 h,将经过渗透处理的样品包埋起来,70 $^{\circ}$ C 加热过夜,即得到包埋好的样品。样品在 LEICA EM UC7 型超薄切片机中切片,获得 70~90 nm 的切片,切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液各染色 5~10 min,晾干后即可在透射电镜中观察。

1.7 蛋白质印迹法检测铁死亡相关蛋白的表达

常规培养细胞株 HT-29 和 SW480,按 1.2 的方法分别处理 DMSO 组和 PPVI 组细胞 48 h 后收集并裂解细胞,离心 10 min 收集上清液并进行蛋白定量,按 30 μ g/孔进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入抗 β -actin、GPX4、ACSL4、MAP1LC3B、SLC3A2 和 FTH1 抗体稀释液(均按 1:1000 稀释),4 $^{\circ}$ C 处理过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(按 1:5000 稀释)室温处理 3.5 h,ECL 曝光胶片后用 Image J 软件进行分析。

1.8 定量聚合酶链反应检测铁死亡相关 mRNA 的表达

常规培养细胞株 HT-29 和 SW480,按 1.2 的方法分别处理 NC 组和 PPVI 组细胞 24 h,用 TriQuick 试剂提取细胞总 RNA,用 HiScript III RT SuperMix Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒去除基因组 DNA,进行反转录反应,用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测。ACSL4 上游引物为 5'-TGCTGCCTGTCCACTTGTTA-3',下游引物为 5'-AGGTTTGTCTGAAGTGGCT-3';MAP1LC3B 上游引物为 5'-CCGACTTATT

CGAGAGCAGC-3', 下游引物为 5'-ACTCATGTTGACATGGTCAGG-3'; *SLC3A2* 上游引物为 5'-ATGGAGCTACAGCCTCTGA-3', 下游引物为 5'-CGCGCTGAGACCCTGG-3'; *FTH1* 上游引物为 5'-CGCCTCCTACGTTTACCTGT-3', 下游引物为 5'-GAAGATTCCGCCACCTCGTT-3'; β -actin 上游引物为 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游引物为 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'。PCR 反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值为目的基因的相对表达量。

1.9 统计学方法

所有实验均独立重复 3 次。实验数据使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行分析处理, 呈正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 转录组测序和基因富集分析显示 polyphyllin VI 可通过铁死亡通路作用于细胞株 HT-29 和 SW480

韦恩图和热图分析(图 1A 和 1B)结果表明, 经 polyphyllin VI 处理后, 在细胞株 HT-29 和 SW480 中均显著差异表达的基因有 756 个, 与铁死亡相关的差异基因为 *ACSL4*、*MAP1LC3B*、*SLC3A2* 和 *FTH1*。差异基因的 GO 和 KEGG 分析表明, 经 polyphyllin VI 处理后, 细胞株 HT-29 和 SW480 的铁死亡信号通路被激活(图 1C 和 1D)。

2.2 Polyphyllin VI 可抑制细胞株 HT-29 和 SW480 的增殖活力和诱导铁死亡改变

CCK-8 法检测结果显示, 与 NC 组相比, 不同浓度梯度的 polyphyllin VI 可抑制细胞株 HT-29 和 SW480 的增殖活力($P < 0.05$), 细胞株 HT-29 的 24 h 和 48 h IC₅₀ 分别为 5.507 μ mol/L 和 5.197 μ mol/L,

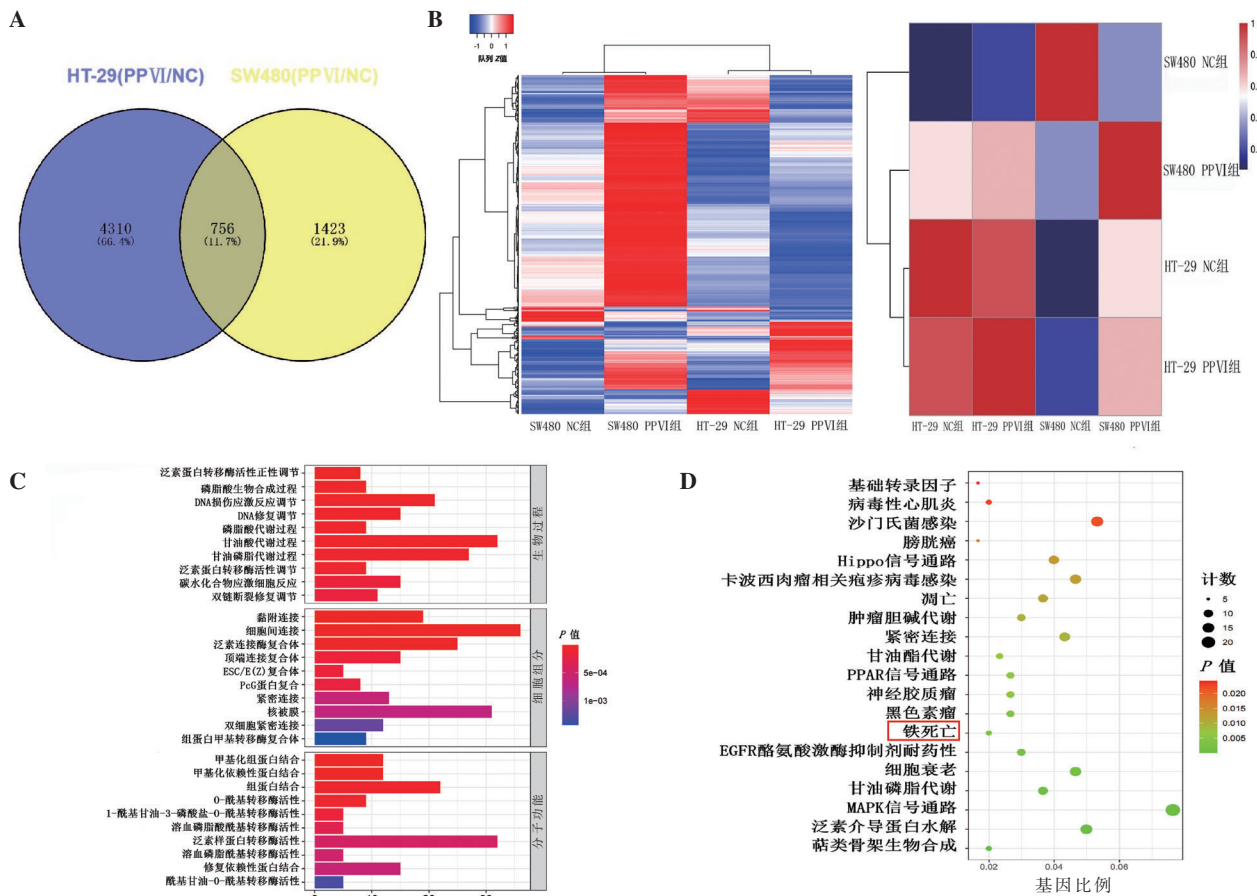


图 1 转录组测序分析 polyphyllin VI 处理细胞株 HT-29 和 SW480 后的差异基因表达情况和基因富集分析

注: A, 显著差异基因的韦恩图; B, 显著差异基因的热图和相关性热图; C, 显著差异基因的基因本体分析; D, 显著差异基因的京都基因与基因组百科全书分析。

细胞株 SW480 分别为 $5.573 \mu\text{mol/L}$ 和 $4.982 \mu\text{mol/L}$ (图 2A)。

ROS 检测实验结果显示, PPVI 组的平均绿色荧光强度较 NC 组增加 ($P<0.001$, 图 2B); GSH 浓度检测实验结果显示, PPVI 组的 GSH 浓度较 NC 组降低 ($P<0.05$, 图 2C); 铁浓度检测实验结果显示, PPVI 组的铁离子相对浓度较 NC 组增加 ($P<0.001$, 图 2D); 透射电镜检测显示, PPVI 组细胞株的线粒体数量减少, 膜密度增高 (图 2E)。上述结果提示 polyphyllin VI 能抑制细胞株 HT-29 和 SW480 的增殖活力, 并可诱导铁死亡改变。

2.3 Ferrostatin-1 可逆转 polyphyllin VI 诱导的细胞株 HT-29 和 SW480 增殖抑制和铁死亡改变

CCK-8 法检测结果显示, PPVI+Fer-1 组的细胞株 HT-29 和 SW480 的增殖活力较 PPVI 组强 ($P<0.0001$, 图 3A), 提示 Ferrostatin-1 可逆转 polyphyllin VI 诱导的细胞增殖抑制作用。

ROS 检测实验结果显示, PPVI+Fer-1 组的平均绿色荧光强度较 PPVI 组降低 ($P<0.001$, 图 3B);

铁浓度检测实验结果显示, PPVI+Fer-1 组的铁离子相对浓度较 PPVI 组降低 ($P<0.001$, 图 3C); GSH 浓度检测实验结果显示, PPVI+Fer-1 组中细胞株 HT-29 的 GSH 浓度较 PPVI 组增加 ($P<0.01$, 图 3D); 透射电镜检测显示, 与 PPVI 组相比, PPVI+Fer-1 组细胞株的线粒体数量上升, 膜密度降低 (图 3E)。上述结果提示 Ferrostatin-1 可逆转 polyphyllin VI 诱导的细胞铁死亡改变作用。

2.4 蛋白质印迹法和定量聚合酶链反应显示 polyphyllin VI 在细胞株 HT-29 和 SW480 中潜在的作用靶点为 GPX4 和 ACSL4

蛋白质印迹法检测结果显示, 与 DMSO 组相比, ACSL4 蛋白在 PPVI 组两种细胞株中的表达量均上升, 而 GPX4 蛋白表达量则下调 (图 4A)。

定量 PCR 检测结果显示, 与 NC 组相比, ACSL4 mRNA 在 PPVI 组两种细胞株中的表达水平平均上升 ($P<0.05$, 图 4B)。上述结果提示 polyphyllin VI 在细胞株 HT-29 和 SW480 中潜在的作用靶点为 GPX4 和 ACSL4。

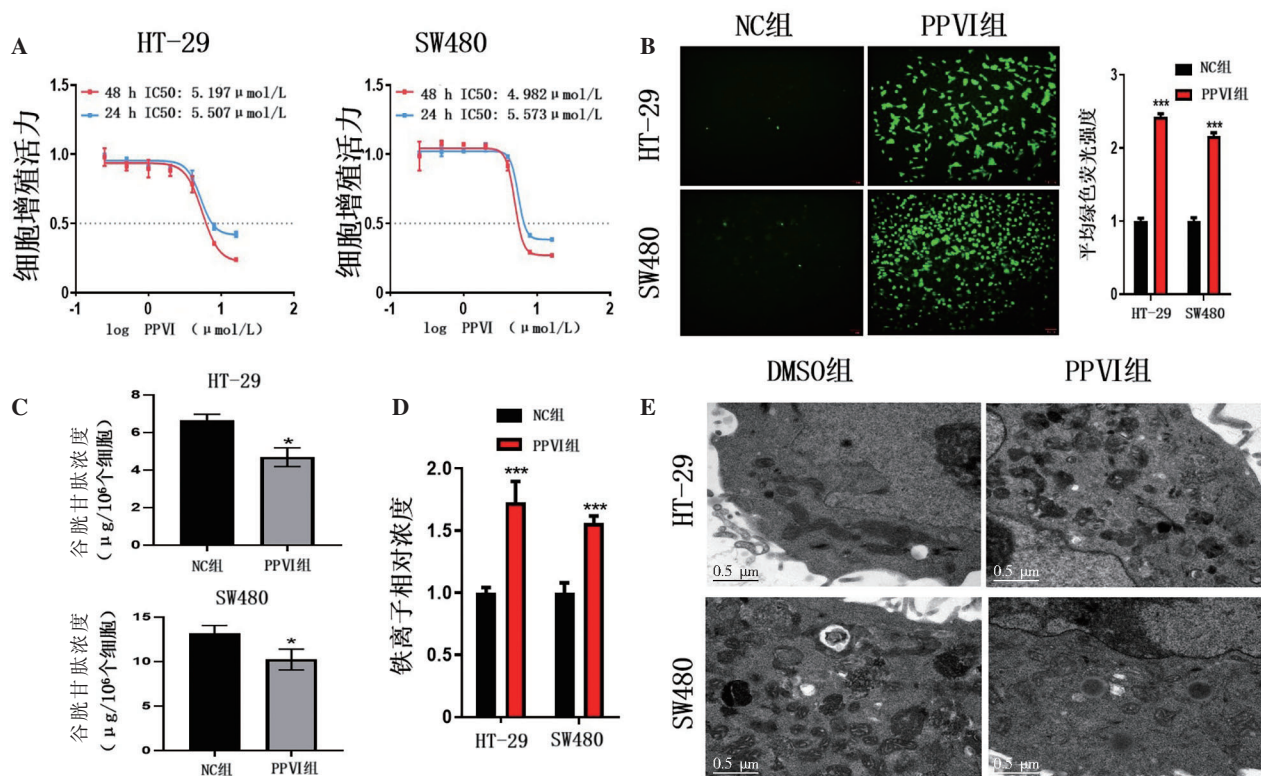


图 2 Polyphyllin VI 对细胞株 HT-29 和 SW480 增殖活力的影响和诱导铁死亡改变情况

注: A, CCK-8 法显示细胞株 HT-29 和 SW480 经不同浓度梯度 polyphyllin VI 处理 24 h 和 48 h 后细胞增殖活力曲线和 IC50 值; B, polyphyllin VI 处理细胞株 HT-29 和 SW480 后的活性氧检测实验结果 ($\times 100$); C, polyphyllin VI 处理细胞株 HT-29 和 SW480 后的谷胱甘肽浓度检测实验结果; D, polyphyllin VI 处理细胞株 HT-29 和 SW480 后的铁浓度检测实验结果; E, polyphyllin VI 处理细胞株 HT-29 和 SW480 后的透射电镜检测。与 NC 组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

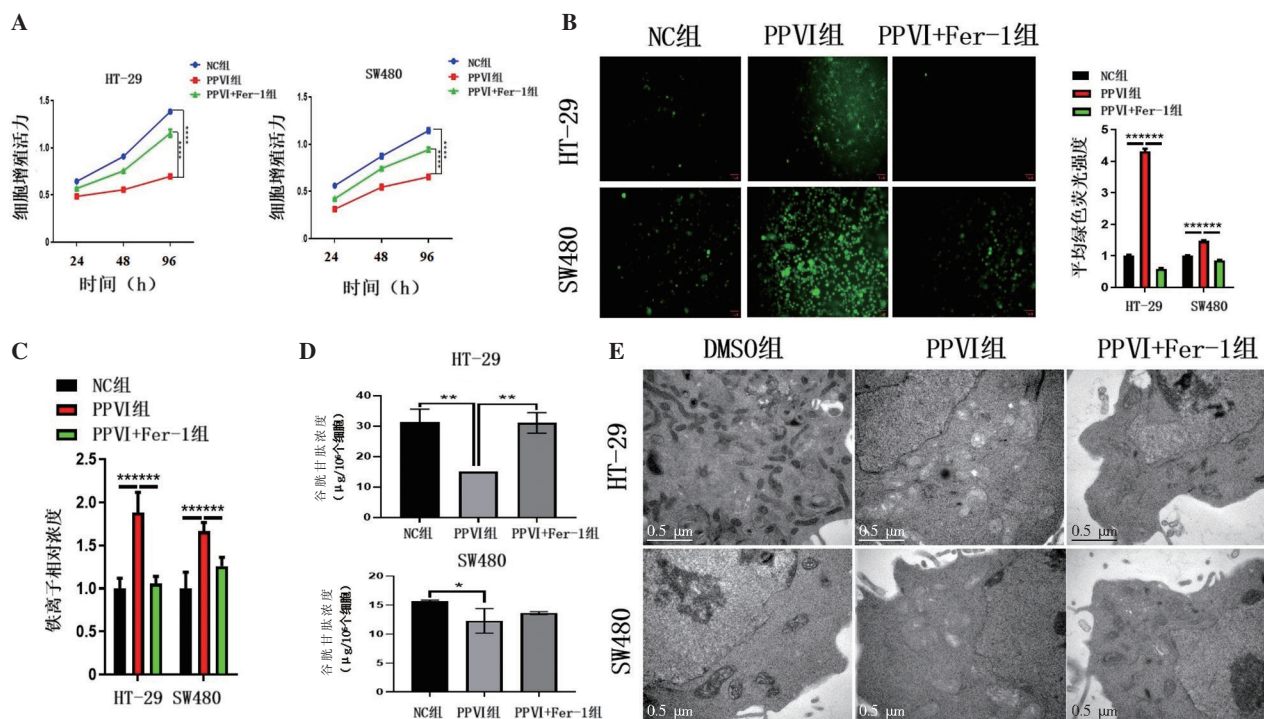


图3 Ferrostatin-1对polyphyllin VI诱导细胞株HT-29和SW480增殖抑制和铁死亡改变的影响情况

注:A,CCK-8法显示不同实验组别的细胞增殖活力曲线;B,不同实验组别的活性氧检测实验结果($\times 100$);C,不同实验组别的铁浓度检测实验结果;D,不同实验组别的谷胱甘肽浓度检测实验结果;E,不同实验组别的透射电镜检测。与PPVI组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。

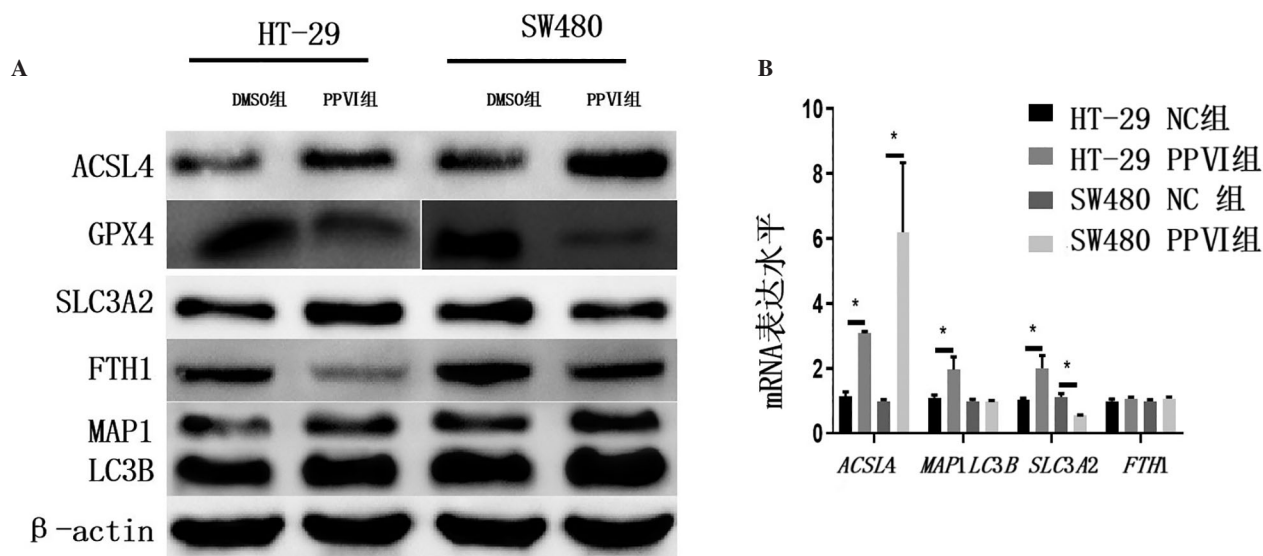


图4 Polyphyllin VI对细胞株HT-29和SW480中铁死亡相关蛋白和mRNA的影响

注:A,蛋白质印迹法检测polyphyllin VI处理细胞株HT-29和SW480后铁死亡相关蛋白的表达;B,定量聚合酶链反应检测polyphyllin VI处理细胞株HT-29和SW480后铁死亡相关mRNA的表达。与DMSO组/NC组相比,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究阐述了polyphyllin VI通过铁死亡抑制结肠癌细胞株HT-29和SW480的增殖生长。铁死亡作为一种新的程序性细胞死亡形式,被发现参

与到许多致病过程中,其分子生物学表现包括铁离子的过多集聚诱导Fenton反应从而产生大量ROS,进而使得细胞发生脂质过氧化和GSH丢失^[22]。诱导铁死亡的发生被认为是肿瘤治疗的一种潜在机制,原因是其可通过上调脂质过氧化来改善药

物的耐药性^[23]。研究显示铁死亡诱导剂 Erastin 和 RSL3 可作为 RAS 突变型肿瘤潜在的抑制剂^[24], 目前关于新的铁死亡诱导剂在肿瘤抑制方面的作用已成为研究热点。

本研究揭示了 polyphyllin VI 在细胞株 HT-29 和 SW480 中潜在的 2 种作用机制, 包括 GSH 相关通路和细胞内铁过载。既往研究表明胱氨酸/谷氨酸转运蛋白 xCT 和 GPX4 是铁死亡重要的调控因子, xCT 的逆向转运蛋白功能通过输出谷氨酸以换取半胱氨酸来调节 GSH 的合成, 从而帮助平衡过量的过氧化氢^[25]。GPX4 是一种抗氧化酶, GSH 作为 GPX4 的主要底物, 在修复氧化脂质中起作用, GSH 减少或耗尽就会无法保护细胞免受脂质过氧化, 从而导致了铁死亡的产生^[26-27]。在本研究中, polyphyllin VI 可下调细胞株 HT-29 和 SW480 内的 GSH 水平, 蛋白质印迹法检测结果也显示 polyphyllin VI 可下调 GPX4 蛋白的表达水平, 揭示其可能通过抑制 GPX4/GSH 通路来诱导铁死亡。细胞内铁过载被认为是驱动铁死亡的另一个关键因素^[28]。本研究也提示 polyphyllin VI 可上调细胞株 HT-29 和 SW480 内铁离子的水平, 铁离子的聚集促发脂质过氧化, 进而诱导铁死亡。ROS 的聚集同样被视为铁死亡的标志, 越来越多的数据显示, 各种 ROS 清除剂和铁死亡抑制剂可以完全抑制细胞内 ROS 的聚集^[29-30]。为了确定 ROS 是否在 polyphyllin VI 诱导的结肠癌细胞株 HT-29 和 SW480 铁死亡中起作用, 本研究检测并对比了 PPVI 组和 NC 组细胞中的 ROS 水平, 结果显示 PPVI 组中反映 ROS 水平的绿色荧光强度显著增加。为了研究铁死亡在体内的潜在作用机制, Dixon 等^[31]发现 Ferrostatin-1 是 Erastin 诱导的铁死亡最有效的抑制剂, 作用机制与其抗氧化能力相关。同样的, 在本研究中, Ferrostatin-1 可逆转 polyphyllin VI 诱导的结肠癌细胞株 HT-29 和 SW480 铁死亡相关的一系列改变。本研究还检验了铁死亡另外一个重要的调控因子 ACSL4 的表达水平, ACSL4 可将辅酶 A 酯化为特定多元不饱和脂肪酸 (如花生四烯酸) 的酶, ACSL4 催化的花生四烯酸辅酶 A 生物合成通过触发磷脂过氧化从而促进铁死亡的发生^[32]。

本实验有着自身的局限性, 所有验证均为体外实验, 缺乏体内动物实验的验证, 相关基因信号通路之间的关系也需进一步阐明清楚。总之, 本研

究结果初步表明 polyphyllin VI 在结肠癌细胞株 HT-29 和 SW480 的作用机制可能与 GPX4/GSH 通路相关, ACSL4 引起的脂质过氧化过程也可能参与其中。这些发现为 polyphyllin VI 促进肿瘤细胞铁死亡的作用机制提供了新的见解, 并验证了其作为肿瘤治疗候选药物的潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李斌, 参与设计实验、实施研究、采集和分析数据以及进行统计分析; 易小江, 参与设计实验、分析解释数据、撰写和修改文章以及获取研究经费。

参考文献

- [1] BILLER LH, SCHRAG D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review [J]. JAMA, 2021, 325(7):669-685.
- [2] 饶佳伟, 陈创奇. 晚期结肠癌免疫治疗现状与挑战 [J/CD]. 消化肿瘤杂志 (电子版), 2024, 16 (3):284-290.
- [3] YANG W, STOCKWELL BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(3):165-176.
- [4] YANG J, ZHOU Y, XIE S, et al. Metformin induces Ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1):206.
- [5] TORTI SV, MANZ DH, PAUL BT, et al. Iron and Cancer [J]. Annu Rev Nutr, 2018, 38:97-125.
- [6] GUO C, LIU P, DENG G, et al. Honokiol induces ferroptosis in colon cancer cells by regulating GPX4 activity [J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(6):3039-3054.
- [7] SUI X, ZHANG R, LIU S, et al. RSL3 Drives Ferroptosis Through GPX4 Inactivation and ROS Production in Colorectal Cancer [J]. Front Pharmacol, 2018, 9:1371.
- [8] CHAUDHARY N, CHOUDHARY BS, SHAH SG, et al. Lipocalin 2 expression promotes tumor progression and therapy resistance by inhibiting ferroptosis in colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2021, 149(7):1495-1511.
- [9] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019 [J]. J Nat Prod, 2020, 83(3):770-803.
- [10] TIAN Y, GONG G, MA L, et al. Anti-cancer effects of Polyphyllin I: An update in 5 years [J]. Chem Biol Interact, 2020, 316:108936.
- [11] 易小江, 欧阳满照. 中药重楼及其提取物单体在结肠肿瘤信号通路中的研究进展 [J/CD]. 消化肿瘤杂

- 志(电子版), 2023, 15(2):171-175.
- [12] YANG C, CAI H, MENG X. Polyphyllin D induces apoptosis and differentiation in K562 human leukemia cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36:17-22.
- [13] ZHANG C, JIA X, WANG K, et al. Polyphyllin VII Induces an Autophagic Cell Death by Activation of the JNK Pathway and Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Pathway in HepG2 Cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147405.
- [14] LUO Q, JIA L, HUANG C, et al. Polyphyllin I Promotes Autophagic Cell Death and Apoptosis of Colon Cancer Cells via the ROS-Inhibited AKT/mTOR Pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16):9368.
- [15] YU S, WANG L, CAO Z, et al. Anticancer effect of Polyphyllin I in colorectal cancer cells through ROS-dependent autophagy and G2/M arrest mechanisms [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(12):1489-1492.
- [16] LI J, SUN H, JIANG X, et al. Polyphyllin II Induces Protective Autophagy and Apoptosis via Inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 Signaling in Colorectal Cancer Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19):11890.
- [17] SONG C, PAN B, YANG X, et al. Polyphyllin VII suppresses cell proliferation, the cell cycle and cell migration in colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1):25.
- [18] LIN L, UEN W, CHOONG C, et al. Paris Polyphylla Inhibits Colorectal Cancer Cells via Inducing Autophagy and Enhancing the Efficacy of Chemotherapeutic Drug Doxorubicin[J]. *Molecules*, 2019, 24(11):2102.
- [19] TENG J, MEI Q, ZHOU X, et al. Polyphyllin VI Induces Caspase-1-Mediated Pyroptosis via the Induction of ROS/NF- κ B/NLRP3/GSDMD Signal Axis in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(1):193.
- [20] YUAN Y, JIANG N, LI Z, et al. Polyphyllin VI induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma cells by modulation of ROS/JNK activation [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13:3091-3103.
- [21] WANG P, YANG Q, DU X, et al. Targeted regulation of Rel2 by microRNA-18a is implicated in the anti-metastatic effect of polyphyllin VI in breast cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 851:161-173.
- [22] HASSANNIA B, VANDENABEELE P, VANDENBENGHE T. Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(6):830-849.
- [23] NIE Z, CHEN M, GAO Y, et al. Ferroptosis and Tumor Drug Resistance: Current Status and Major Challenges [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:879317.
- [24] DLIMA S, LESSNICK SL, HAHN WC, et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(3):285-296.
- [25] YANG W, STOCKWELLBR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells[J]. *Chem Biol*, 2008, 15(3):234-245.
- [26] MAIORINO M, CONRAD M, URSINI F. GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(1):61-74.
- [27] CHEN L, HAMBRIGHT WS, NA R, et al. Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(47):28097-28106.
- [28] YU Y, YAN Y, NIU F, et al. Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1):193.
- [29] CONRAD M, KAGAN VE, BAYIR H, et al. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species [J]. *Genes Dev*, 2018, 32(9-10):602-619.
- [30] SUN Y, ZHENG Y, WANGC, et al. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7):753.
- [31] DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5):1060-1072.
- [32] DING K, LIU C, LI L, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2023, 136(21): 2521-2537.

收稿日期:2024-11-27