

麦冬乙醇提取物调控铁死亡抑制肺腺癌 A549 细胞活性*

范修琦¹,高稳东²,陈玉龙²,韩懿存²,孟伟²,樊李妍²,高启龙¹

1. 郑州大学附属肿瘤医院,河南 郑州 450008; 2. 河南中医药大学,河南 郑州 450046

摘要:目的:研究麦冬乙醇提取物对肺腺癌 A549 细胞活性的影响及其作用机制。方法:实验选择人肺腺癌 A549 细胞株,给予不同浓度的麦冬乙醇提取物干预后,MTT 法检测细胞活力;流式细胞术检测 A549 细胞凋亡;微量法检测 A549 细胞中还原性谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)的含量;Western Blot 及 RT-PCR 法检测铁蛋白重链(ferritin heavy chain,FHC)、环氧合酶 2(cyclooxygenase 2,COX2)、长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(Long-chain-fatty-acid-CoA synthetase 4,ACSL4,又名 FACLA)、核转录因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2,Nrf2)及 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1(Kelch-like ech-associated protein 1,Keap1)蛋白及 mRNA 的表达水平。结果:麦冬乙醇提取物能浓度依赖性抑制 A549 细胞活性,显著提高 A549 细胞凋亡水平,显著降低 GSH 水平,显著上调 FHC 蛋白和 mRNA 及 COX2 mRNA 的表达水平,显著抑制 Keap1、Nrf2 蛋白和 mRNA 的表达水平,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:麦冬乙醇提取物可通过抑制 A549 细胞中 GSH 水平调控铁死亡进程,促进细胞凋亡,从而抑制 A549 细胞活性,该机制可能与其抑制 Keap1/Nrf2 途径有关。

关键词:麦冬乙醇提取物;铁死亡;肺腺癌;细胞凋亡;GSH;Keap1/Nrf2

DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2023.01.025

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1674-8999(2023)01-0138-07

Maidong Ethanol Extract Inhibiting Lung Adenocarcinoma A549 Cell Activity by Regulating Ferroptosis

FAN Xiuqi¹,GAO Wendong²,CHEN Yulong²,HAN Yicun²,MENG Wei²,FAN Liyan²,GAO Qilong¹

1. Cancer Hospital of Zhengzhou University,Zhengzhou Henan China 450008; 2. Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou Henan China 450046

Abstract: Objective: To investigate the effect of Maidong ethanol extract on the activity and mechanism of lung adenocarcinoma A549 cells. Methods: Human lung adenocarcinoma A549 cell line was selected and different concentrations of mespartol extract were given to detect cell viability by MTT. Flow cytometry to detect apoptosis in A549 cells; Microdetection of reduced glutathione (GSH) content in A549 cells; Western Blot and RT-PCR detect ferritin heavy chain (FHC), cyclooxygenase 2 (COX2), long-chain-fatty-acid-CoA synthetase 4 (ACSL4, aka FACLA), nuclear transcription factor E2 related factor 2 (nuclear). Expression levels of factor E2-related factor 2 (Nrf2) and Kelch-like ech-associated protein 1 (Keap1 protein and mRNA). Results: The energy concentration-dependent inhibition of aspartol extract inhibited the activity of A549 cells, significantly increased the apoptosis level of A549 cells, significantly reduced the level of GSH, significantly upregulated the expression levels of FHC protein and mRNA and COX2 mRNA, and significantly inhibited the expression level of Keap1, Nrf2 protein and mRNA, all of which were statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion: Aspartol extract can regulate the process of ferroptosis and promote apoptosis by inhibiting the GSH level of A549 cells, thereby inhibiting the activity of A549 cells, which may be related to its inhibition of Keap1/Nrf2 pathway.

Key words: Maidong ethanol extract; ferroptosis; Lung Adenocarcinoma; apoptosis; GSH; Keap1/Nrf2

* 基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(212102310340)

肺癌是当今世界上最常见的恶性肿瘤之一,2020年全球肺癌发生率和死亡率分别占全部恶性肿瘤的11.4%和18.0%^[1]。随着免疫疗法的发展,肺癌的治疗手段已经非常多样化,但其死亡率仍然很高。因此,探究肺癌的发生机制,寻求新的治疗靶点,对于肺癌的治疗非常重要。铁死亡(ferroptosis)是近年发现的一种铁离子依赖性的非凋亡性细胞死亡形式,主要由细胞中脂质过氧化物(lipid reactive oxygen species, lipid ROS)积累引起^[2]。铁死亡作为非凋亡性细胞死亡形式,已逐渐成为清除抵抗凋亡肿瘤细胞的新策略。肿瘤细胞的生长和分裂需要大量能量,而产能过程中伴随着氧化应激和活性氧的积累,此外,肿瘤细胞中存在着应对氧化应激的基因突变,赋予肿瘤细胞生长优势,使其对铁死亡的抵抗力增强^[3]。

中医药在癌症的辅助治疗中发挥着重要作用,铁死亡这一新型的死亡方式为中医药抗肿瘤的研究提供了新的靶点。麦冬是一味传统中药,归心、肺、胃经,具有养阴润肺、益胃生津、清心除烦的功效。多项研究证实,麦冬及其有效成分可通过促进细胞自噬、凋亡,抑制肿瘤细胞侵袭、迁移等途径发挥抗肿瘤作用^[4-5]。此外,麦冬皂苷D(ophiopogonin D, OP-D)能通过调节脂肪酸代谢对抗心肌细胞氧化作用^[6],并能通过干预内质网应激和铁死亡途径降低麦冬皂苷D的心脏毒性^[7]。本课题组前期通过水煎提取、醇浸提取、水提醇沉等多种提取工艺提取麦冬的有效成分,发现麦冬水提物及水提醇沉物对A549细胞没有明显的细胞毒作用,而麦冬乙醇提取物能抑制A549细胞活性,具有明显的细胞毒性。研究发现,麦冬水提及水提醇沉法所得到的多糖成分居多^[8],而经醇提所得的化合物则以皂苷类为主^[9]。麦冬乙醇提取物能抑制A549细胞活性,但具体分子机制并不明确,对于其是否能调控细胞铁死亡尚未有研究。本文将通过考察麦冬乙醇提取物对A549细胞的毒性作用,研究其抑制A549细胞活性与铁死亡的关系,进一步探讨麦冬乙醇提取物抗肿瘤的分子机制。

1 材料

1.1 细胞 人肺腺癌A549细胞株由河南中医药大学方证信号转导实验室馈赠。

1.2 药物与试剂 麦冬[中国北京同仁堂(集团)有限公司,批号:20101004]。无水乙醇(分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司,批号:21061223);DMEM高糖培养基、PBS缓冲液(pH7.2~7.4)、胰

蛋白酶-EDTA消化液、MTT、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量检测试剂盒、ECL Plus超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,货号:12100、P1020、T1320、M1020、D8370、BC1175、PE0010);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,上海双泐生物科技有限公司,货号:S711-001S);BCA蛋白浓度测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,货号:AR0146),蛋白Marker(美国Thermo Fisher Scientific公司,货号:26616);Anti-Keap1抗体、Anti-Nrf2抗体、Anti-NOX1抗体、Anti-COX2抗体、Anti-FHC、Anti-FACL4抗体(英国abcam公司,货号:ab139729、ab62352、ab131088、ab179800、ab75972、ab155282);GAPDH抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(美国CST公司,货号:2118S、7074S);ReverTra Ace qPCR RT Kit[东洋纺(上海)生物科技有限公司,货号:FSQ-101];2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:RM21203)。

1.3 仪器 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号:37997);CO₂培养箱(德国Eppendorf公司,型号:170R);倒置显微镜(德国LEICA公司,型号:DFC450C);电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司,型号:XB120A);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂,型号:RE-52AA);真空泵(河南巩义市英峪华中仪器厂,型号:SHZ-D);冷冻干燥机(北京四环起航科技有限公司,型号:LGJ-12A);流式细胞仪(美国BD公司,型号:FACSCalibur);酶标仪(美国BIO-TEK公司,型号:ELx-800);凝胶成像扫描仪(美国BIO-RAD公司,型号:ChemiDoc XRS+);实时荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号:QuantStudio 6)。

2 方法

2.1 药物制备 称量麦冬50g并粉碎,按质量体积比1:10的比例加入70%乙醇500mL,避光冷浸1周,每天搅拌1次,1周后过滤,3000r·min⁻¹离心10min,收集上清,旋转蒸发,回收乙醇,浓缩并干燥成膏状,称量收集药物的质量,计算出膏率。出膏率=提取物质量/生药质量×100%=0.0908g/50g=0.1816%。使用时先用DMSO配置药物母液250g·L⁻¹,再用培养基配置成浓度为50g·L⁻¹的中间工作液,给药时用培养基分别配置成浓度为400mg·L⁻¹、200mg·L⁻¹、100mg·L⁻¹、50mg·L⁻¹的溶液。

2.2 细胞培养 10% FBS与90% DMEM高糖培养基混匀,配制完全培养基,在37℃、5% CO₂浓度及饱和湿度下培养 A549 细胞,每3~4 d传代一次,取处于对数生长期的细胞用于实验。

2.3 MTT 检测麦冬乙醇提取物对 A549 细胞活性的影响 调整 A549 细胞密度至 4.0 × 10⁴ mL⁻¹,接种于 96 孔板中,每孔 200 μL,培养 24 h 后,分别加入浓度为 400 mg · L⁻¹、200 mg · L⁻¹、100 mg · L⁻¹、50 mg · L⁻¹ 的含药培养基,对照组加入完全培养基,每组设 5 个复孔,周围用 PBS 封边,设为空白孔;培养 48 h 后,每孔加入 100 μL 含 10% MTT (5 g · L⁻¹) 的 DMEM 培养基,培养 4 h 后每孔加入 150 μL DMSO,震荡混匀,孔内甲臞结晶完全溶解后,测定 570 nm 波长处光吸收值。

$$\text{细胞活性} = \frac{(OD_{\text{给药孔}} - OD_{\text{空白孔}})}{(OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{空白孔}})} \times 100\%$$

2.4 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡 调整 A549 细胞密度至 1.5 × 10⁵ mL⁻¹,接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,培养 24 h 后分别加入浓度 200 mg · L⁻¹、100 mg · L⁻¹、0 mg · L⁻¹ 的含药培养基,培养 48 h 后,收集培养基上清,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞并收集,PBS 清洗并收集孔内残留细胞,做好标记,1 500 r · min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,PBS 清洗两遍后加入稀释好的 1 × Buffer,于避光处每管加入 10 μL Annexin V 和 5 μL PI 染色液染色,轻微震荡混匀后,避光孵育 10 min,上机检测。

2.5 A549 细胞中 GSH 含量变化检测 调整 A549 细胞密度至 1.25 × 10⁵ mL⁻¹,接种于培养皿中,每皿 8 mL,培养 24 h 后分别加入浓度为 200 mg · L⁻¹、100 mg · L⁻¹、0 mg · L⁻¹ 的含药培养基,培养 48 h 后,用胰酶消化细胞并收集,600 × g 离心 10 min,弃上清,用 PBS 清洗两遍后,加入 3 倍细胞沉淀体积的试剂重悬细胞,于液氮中速冻,并用 37℃ 水浴溶解,反复冻融 3 次后,8 000 × g 离心 10 min,收集上清。按照试剂盒说明书操作配置标准曲线并测量 GSH 的含量,实验重复 3 次。

2.6 Western Blot 检测 A549 细胞 FHC、COX2、FACLA、Keap1、Nrf2 蛋白表达水平 调整 A549 细胞密度至 1.25 × 10⁵ mL⁻¹,接种于培养皿中,每皿 8 mL,培养 24 h 后分别加入浓度为 200 mg · L⁻¹、100 mg · L⁻¹、0 mg · L⁻¹ 的含药培养基,培养 48 h 后,BSA 提取细胞总蛋白后采用 BCA 法检测蛋白浓度,然后进行蛋白变性,配胶,电泳,转膜,封闭,一抗采用 5% 脱脂牛奶稀释 (GAPDH、Keap1、Nrf2、FHC

按照 1 : 1 000 的比例稀释,COX2 稀释比例为 1 : 2 000,FACLA 稀释比例为 1 : 20 000),孵育 2 h,二抗采用 5% 脱脂牛奶稀释(稀释比例为 1 : 1 000),孵育 1 h,ECL 超敏发光液显色。用 BIO - RAD 全能型凝胶成像分析系统显影,目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白表达量/内参表达量,分析目标条带的光密度值。实验重复 3 次。

2.7 RT - PCR 法检测 A549 细胞 FHC、COX2、FACLA、Keap1 及 Nrf2 的 mRNA 表达水平 调整 A549 细胞密度至 1.5 × 10⁵ mL⁻¹,接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,培养 24 h 后分别加入浓度为 200 mg · L⁻¹、100 mg · L⁻¹、0 mg · L⁻¹ 的含药培养基,培养 48 h 后,使用 Trizol 试剂提取总 RNA,检测 RNA 浓度,将 RNA 在 65℃ 条件下进行 5 min 的预变性,再按照如下反应体系(表 1),在 37℃ 条件下进行 15 min 的逆转录反应,在 98℃ 条件下进行 5 min 的酶失活反应,将 RNA 逆转录为 cDNA 后冰上配置如下 PCR 反应体系,添加完毕后小心震荡混匀并瞬时离心,将配好的反应体系(表 1)转移至 PCR 板内,光学密封薄膜密封,PCR 板 2 500 r · min⁻¹ 离心 60 s,上机进行 RT - PCR 反应,扩增条件:95℃ 预变性 3 min,1 个循环,循环反应 95℃ 5 s、65℃ 30 s,40 个循环。数据采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行相对定量分析,考察相关基因 mRNA 表达水平。引物由河南点晴生物科技有限公司合成,引物序列见表 2。

表 1 逆转录体系及 PCR 扩增体系

逆转录体系		PCR 扩增体系	
RNA	1 μg	2 × universal SYBR Green Fast qPCR Mix	5 μL
5 × RT Buffer	2 μL	稀释后的 DNA 模板	4.6 μL
RT Rnzyme Mix	0.5 μL	正向引物	0.2 μL
Primer Mix	0.5 μL	反向引物	0.2 μL
Nuclease - free Water	10 μL		
Total volume	10 μL		

表 2 引物序列

引物名称	引物序列(5' - 3')
FHC	Forward: CCCCATTGTGTGACTTCAT Reverse: GCCCGAGGCTTAGCTTTCATT
COX2	Forward: CCGTCTGAACATATCCTGCC Reverse: GAGGATCGTTGACCTCGTC
FACLA	Forward: CATCCCTGGAGCAGATACTCT Reverse: TCACTTAGGATTTCCCTGGTCC
GAPDH	Forward: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT Reverse: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
Keap1	Forward: GTGTCCATTGAGGGTATCCACC Reverse: GCTCAGCGAAGTTGGCGAT
Nrf2	Forward: TACTCCAGGTTGCCACA Reverse: CATCTACAAACGGGAA

2.8 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行正态性分析和方差齐性检验,若符合正态分布且方差齐,用单因素方差分析,组间比较选用 *LSD* 检验;若符合正态分布但方差不齐,用 *DunnnettT3* 检验;若不符合正态分布,用非参数检验。结果采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,取 $\alpha = 0.05$ 作为差异性描述显著水准,绘制统计图表。

3 结果

3.1 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞活性的影响 采用 MTT 法检测麦冬乙醇提取物对 A549 细胞活性的影响,结果显示:麦冬乙醇提取物能明显抑制 A549 细胞活性,且抑制作用与浓度成正比。利用 SPSS 25.0 统计软件计算出麦冬乙醇提取物对 A549 细胞的 IC_{30} 为 $93.666 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IC_{50} 为 $208.853 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为方

便计算,分别选取 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 代表 IC_{30} 和 IC_{50} 进行后续试验。见图 1。

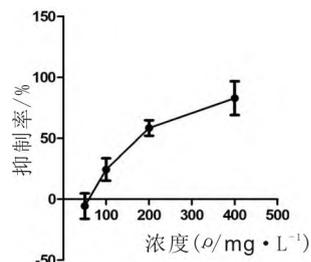
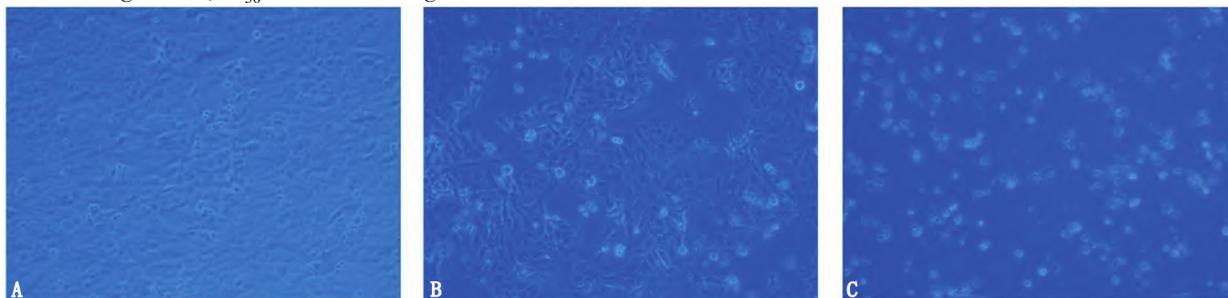


图 1 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞活性的影响 ($n = 5$)

3.2 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞形态变化的影响 显微镜下观察显示, $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 A549 细胞呈梭形;麦冬乙醇提取物作用后, A549 细胞数量明显减少,且 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 A549 细胞体积明显缩小,胞质固缩。见图 2。



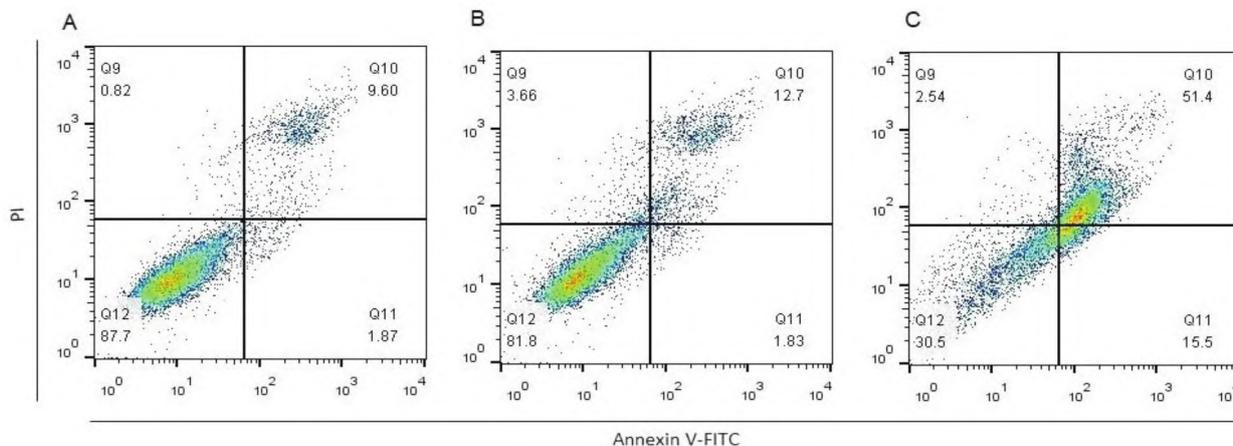
注:A: $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;B: $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C: $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 2 A549 细胞形态改变 ($\times 200$)

3.3 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞凋亡的影响 采用流式细胞术检测麦冬乙醇提取物对 A549 细胞凋亡的影响,结果显示:与 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比,麦冬乙醇提取物能显著提高 A549 细胞凋亡水平 ($P < 0.01$),且 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率显著高于

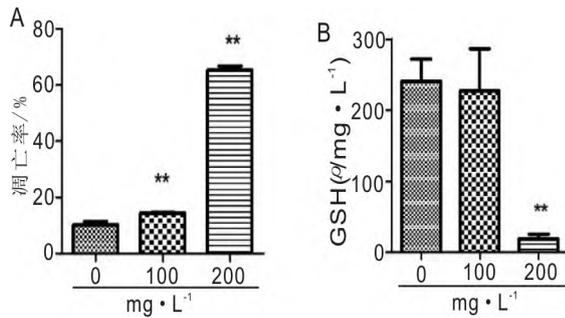
$100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 ($P < 0.001$)。见图 3 及图 4A。

3.4 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞 GSH 水平的影响 GSH 是细胞内重要的抗氧化剂,与铁死亡呈负相关。结果显示,与 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比,麦冬乙醇提取物能显著降低 GSH 水平 ($P < 0.01$)。见图 4B。



注:A: $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组流式图;B: $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组流式图;C: $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组流式图

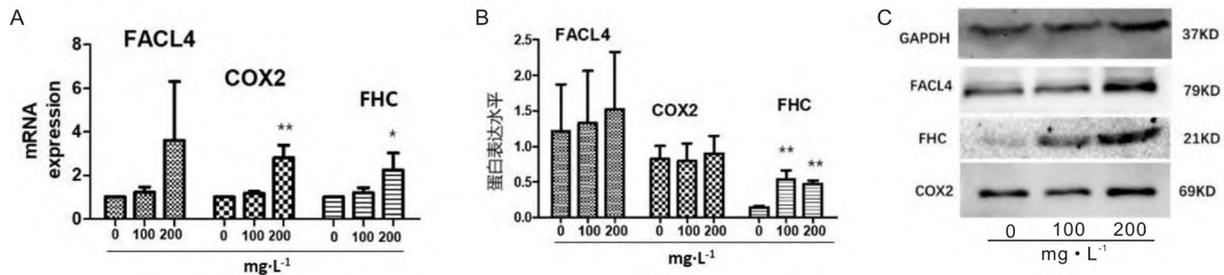
图 3 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞凋亡的影响 ($n = 5$)



注:0 mg·L⁻¹组比较, ** P<0.01; A:麦冬乙醇提取物诱导 A549 细胞凋亡; B:A549 细胞中 GSH 含量变化
图 4 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞的影响 (n=5)

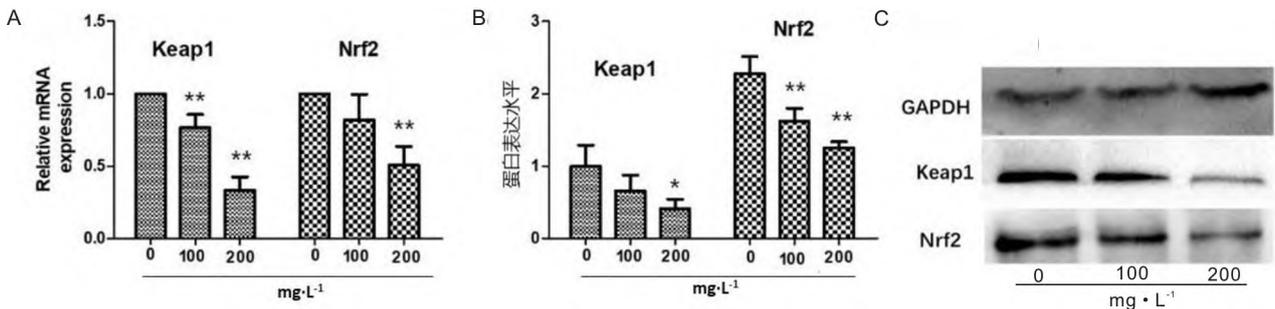
3.5 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞 FHC、COX2、FACL4 蛋白和基因表达的影响 为了探究麦冬乙醇提取物对 A549 细胞的抑制作用与铁死亡的关系,检测了铁死亡相关因子 FHC、COX2、FACL4 蛋白和基因的表达。结果显示:与 0 mg·L⁻¹组相比,麦冬乙醇提取物能显著上调 FHC 蛋白和 mRNA 及 COX2 mRNA 的表达水平(P<0.05)。见图 5。

3.6 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞 Keap1、Nrf2 蛋白和基因表达的影响 与 0 mg·L⁻¹组相比,麦冬乙醇提取物能显著降低 Keap1 和 Nrf2 蛋白及基因的表达水平(P<0.05)。见图 6。



注:A:FACL4、COX2、FHC mRNA 表达水平比较;B:FACL4、COX2、FHC 蛋白表达水平比较;C:FACL4、COX2、FHC 蛋白条带图;与 0 mg·L⁻¹组比较, * P<0.05, ** P<0.01

图 5 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞 FACL4、COX2、FHC 蛋白和基因表达的影响 (n=3)



注:A:Keap1、Nrf2 mRNA 表达水平比较;B:Keap1、Nrf2 蛋白表达水平比较;C:Keap1、Nrf2 蛋白条带图片;与 0 mg·L⁻¹组比较, * P<0.05, ** P<0.01

图 6 麦冬乙醇提取物对 A549 细胞 Keap1、Nrf2 蛋白和基因表达的影响 (n=3)

4 讨论

肺癌恶性程度高,治疗效果有限,预后较差,因此寻找新的治疗肺癌的途径至关重要。铁死亡是一种有别于凋亡、坏死、自噬等方式的新型细胞程序性死亡,细胞中游离铁经 Fenton 反应产生活性氧自由基,或通过参与酶促反应诱导膜脂多不饱和脂肪酸氧化^[10]。同时,细胞中存在清除脂质过氧化物的谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、辅酶 Q 氧化还原酶 (CoQ oxidoreductase, FSP1) 等抵抗脂质过氧化损伤的保护性机制,使细胞内 ROS 处于动态平衡状态。而当细胞中 ROS 积累过多,GPX4 等保护性通路失活时,细胞膜的通透

性和稳定性被 ROS 破坏,最终诱发铁死亡^[11]。肺癌组织普遍有着更高的活性氧和脂质氧化标志物水平,肺癌组织中普遍高表达铁蛋白,并使血清铁蛋白水平升高^[12],此外,铁死亡诱导能够增强放疗及化疗的敏感性^[13-16],也进一步说明铁死亡与肺癌关系密切。

麦冬具有滋阴润肺、养阴生津的功效,以麦冬为主药的抗癌方剂如沙参麦冬汤、麦门冬汤等在肺癌的临床治疗中发挥着重要作用,能提高患者免疫水平,提高放化疗的敏感性,降低放化疗的副作用^[17-19]。麦冬也是一味抗癌中药,通过多种途径发挥抗癌作用,麦冬中的皂苷 D、黄酮类化合物可抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活,导致 A549 细胞自

噬^[20-21]。

GSH是细胞内重要的抗氧化剂,是GPX4重要的合成底物,GPX4通过减少铁依赖的脂质过氧化物转变为高活性的脂质自由基,减少ROS的积累而抑制铁死亡^[22]。GSH与铁死亡呈负相关,常用来衡量铁死亡的水平。本研究中,麦冬乙醇提取物显著抑制GSH的水平,提示麦冬乙醇提取物可能促进A549细胞铁死亡。

为了探究麦冬乙醇提取物对A549细胞活性的抑制作用与铁死亡的相关性,本文检测了铁死亡相关因子COX2、FACLA、FTH1的表达。COX2是一种铁死亡敏感蛋白,在铁死亡发生时被显著上调。本研究发现,在麦冬乙醇提取物作用下,COX2表达增多。FACLA是脂肪酸代谢的第一步,在体内催化合成脂酰CoA,将长链多不饱和脂肪酸活化,以参加膜磷脂的合成,但是这些膜上的长链不饱和脂肪酸常被氧化,从而诱发铁死亡^[23]。FACLA表达与细胞铁死亡敏感性正相关^[24],可通过增加多不饱和脂肪酸比例,降低脂质氧化耐受性,易化铁死亡^[25]。在本研究中,麦冬乙醇提取物作用下,FACLA表达增多。铁蛋白是位于细胞质、细胞核和线粒体中的主要细胞内储铁蛋白,在铁代谢中起主要作用^[26]。铁蛋白是一种24个亚基的球形和空心蛋白质复合物,细胞质铁蛋白由两种不同类型的亚基组成:19 kDa碱性FLC亚基和21 kDa酸性FHC亚基。FHC具有亚铁氧化酶活性,可特异性地将二价铁(Fe²⁺)氧化为三价铁(Fe³⁺)^[27-28]。发生铁死亡的细胞中,铁蛋白重链FHC表达升高^[29]。在本研究中,麦冬乙醇提取物能够促进A549细胞FHC、COX2、FACLA蛋白和基因表达,促进A549细胞铁死亡。

不仅是铁死亡,脂质过氧化在细胞凋亡中同样起着重要作用。脂质过氧化产物与膜受体和转录因子相互作用可以刺激内在和外在外在的凋亡信号通路,从而诱导细胞凋亡^[30]。细胞内GSH浓度降低是线粒体凋亡信号传导、氧化应激等诱导的凋亡级联反应的早期事件^[31],GSH耗竭是由包括细胞毒性药物刺激、压力及环境因素等引发的凋亡性细胞死亡的共同特征^[32]。本研究中,麦冬乙醇提取物能明显增加A549细胞的凋亡程度,可能与抑制GSH相关。

此外,为了研究麦冬乙醇提取物促进A549细胞铁死亡的具体机制,本研究检测了Keap1、Nrf2分子的表达。Nrf2主要调节细胞抗氧化反应、氧化还原稳态和代谢平衡,是重要的氧化还原敏感性转录因子,Nrf2泛素化后易位至细胞核,通过与sMAF蛋白的异二聚化作用结合到靶基因的ARE/EpRE(抗氧化反应元件/亲电响应元件),诱导一系列细胞保护性基因表达,如NQO1、GST、HMOX1、GCL、GSH,抑

制细胞铁摄取、限制ROS产生,是铁死亡的重要抑制剂^[33]。Keap1是Nrf2上游的重要的负调节因子^[34],有研究证实,P62能够通过Keap1促进Nrf2的激活,从而抑制肝癌细胞HCC铁死亡^[35]。在本研究中可以观察到,麦冬乙醇提取物能显著抑制A549细胞活性,抑制强度与药物浓度成正比,同时,麦冬乙醇提取物能显著提高A549细胞凋亡水平。进一步研究发现,麦冬乙醇提取物能够在基因和蛋白水平抑制A549细胞Keap1、Nrf2的表达,两者作为铁死亡的通路抑制分子,能抑制铁死亡,提示麦冬乙醇提取物促进细胞铁死亡作用可能与Keap1/Nrf2通路相关。

综上所述,麦冬乙醇提取物可通过抑制A549细胞GSH水平,促进A549细胞铁死亡相关分子的表达,促进细胞凋亡,从而抑制A549细胞活性,其作用机制可能与抑制Keap1/Nrf2途径有关。后期我们将运用铁死亡抑制剂及Nrf2抑制剂进一步实验,以求它们之间的相关性;同时在体内进行验证对比麦冬乙醇提取物的疗效;最后,将通过物质谱分析进一步筛选麦冬乙醇提取物中发挥主要作用的有效成分并进行验证,为肺癌的中医药治疗提供了新的靶点和理论依据,为其临床应用提供理论支持。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209 - 249.
- [2] STOCKWELL B R, ANGELI J P F, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death Nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171 (2): 273 - 285.
- [3] MOU Y H, WANG J, WU J C, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer [J]. J Hematol Oncol, 2019, 12 (1): 34.
- [4] 何冰倩, 周小杰, 史冬玲, 等. 麦冬皂苷 B 抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (12): 2911 - 2914.
HE B Q, ZHOU X J, SHI D L, et al. Progress on anti-tumor effects and mechanisms of ophiopogonin B [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36 (12): 2911 - 2914.
- [5] 岳珊珊, 苏颖. 麦冬抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 海峡药学, 2014, 26 (1): 11 - 13.
YUE S S, SU Y. Research progress on the anti-tumor effect of Maidong [J]. Strait Pharm J, 2014, 26 (1): 11 - 13.
- [6] 汤响林, 林毅, 王宇光, 等. 麦冬皂苷 D 对心肌细胞脂肪酸代谢酶的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (14): 3672 - 3677.
TANG X L, LIN Y, WANG Y G, et al. Effects of ophiopogonin D on fatty acid metabolic enzymes in cardiomyocytes [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46 (14): 3672 - 3677.
- [7] 林毅, 杨春启, 连雨, 等. 麦冬皂苷 D 通过铁死亡途径减轻麦冬皂苷 D'所致心肌细胞损伤 [J]. 药学报, 2021, 56 (8): 2241 - 2247.
LIN Y, YANG C Q, LIAN W Y, et al. Ophiopogonin D interferes with

- ferroptosis to reduce the damage of cardiomyocytes induced by ophiopogonin D' [J]. *Acta Pharm Sin*, 2021, 56(8): 2241 - 2247.
- [8] 周彬, 张雪元, 李清安, 等. 麦冬多糖提取与纯化工艺研究 [J]. *海峡药学*, 2021, 33(3): 42 - 45.
ZHOU B, ZHANG X Y, LI Q G, et al. Study on extraction and purification technology of ophiopogonis Radix polysaccharides [J]. *Strait Pharm J*, 2021, 33(3): 42 - 45.
- [9] 吴兆宇, 白燕, 李晓玉, 等. 麦冬总皂苷提取工艺研究进展 [C]. 南宁: 2013 年中国药学会大会暨第十三届中国药师周论文集, 2013: 3306 - 3309.
WU Z Y, BAI Y, LI X Y, et al. Research Progress of Maidong Saponin Extraction Process [C]. Nanning: Proceedings of the 2013 Chinese Pharmaceutical Conference and the 13th Chinese Pharmacists Week, 2013: 3306 - 3309.
- [10] KAJARABILLE N, LATUNDE - DADA G O. Programmed cell - death by ferroptosis: antioxidants as mitigators [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4968.
- [11] HADIAN K, STOCKWELL B R. SnapShot: ferroptosis [J]. *Cell*, 2020, 181(5): 1188 - 1188. e1.
- [12] KUKULJ S, JAGANJAC M, BORANIC M, et al. Altered iron metabolism, inflammation, transferrin receptors, and ferritin expression in non - small - cell lung cancer [J]. *Med Oncol*, 2010, 27(2): 268 - 277.
- [13] SATO M, KUSUMI R, HAMASHIMA S, et al. The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc - and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 968.
- [14] GUO J P, XU B F, HAN Q, et al. Ferroptosis: a novel anti - tumor action for cisplatin [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(2): 445 - 460.
- [15] SU Y W, ZHAO B, ZHOU L F, et al. Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti - cancer drugs [J]. *Cancer Lett*, 2020, 483: 127 - 136.
- [16] LANG X T, GREEN M D, WANG W M, et al. Radiotherapy and immunotherapy promote tumoral lipid oxidation and ferroptosis via synergistic repression of SLC7A11 [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(12): 1673 - 1685.
- [17] 夏克春, 曾永蕾, 郝毓蓉, 等. 麦门冬汤联合 EP 方案治疗中晚期非小细胞肺癌临床研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(9): 1705 - 1707.
XIA K C, ZENG Y L, HAO W R, et al. Clinic study of Maimendong Decoction combining with EP regimen in treatment for patients with advanced non - small cell lung cancer [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2015, 42(9): 1705 - 1707.
- [18] 刘俊德, 全建峰, 沈睿, 等. 沙参麦冬汤对放射性食管损伤患者血清炎症因子及免疫相关性指标的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(2): 363 - 365.
LIU J D, QUAN J F, SHEN R, et al. Effects of sand ginseng wheat decoction on serum inflammatory factors and immune - related indexes in patients with radioactive esophageal injury [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2020, 31(2): 363 - 365.
- [19] 王莹, 杨斯洋, 潘一诺, 等. 沙参麦冬汤含药血清联合顺铂对 A549 细胞 E - cadherin 和 Snail 的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(8): 62 - 65, 265.
WANG Y, YANG S Y, PAN Y N, et al. Effect of medicinal serum combined with cisplatin on A549 cells E - cadherin and Snail [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39(8): 62 - 65, 265.
- [20] CHEN J, YUAN J R, ZHOU L Q, et al. Regulation of different components from Ophiopogon japonicus on autophagy in human lung adenocarcinoma A549 Cells through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87: 118 - 126.
- [21] ZHANG Y Y, MENG C, ZHANG X M, et al. Ophiopogonin D attenuates doxorubicin - induced autophagic cell death by relieving mitochondrial damage in vitro and in vivo [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 352(1): 166 - 174.
- [22] 李瑶琪, 杨敏, 李晓天. 铁死亡的生化过程及对肿瘤的影响 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(8): 838 - 843.
LI Y Q, YANG M, LI X T. Biochemical processes of ferroptosis and its roles in tumors [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2018, 34(8): 838 - 843.
- [23] CHEN J M, YANG L, GENG L X, et al. Inhibition of acyl - CoA synthetase long - chain family member 4 facilitates neurological recovery after stroke by regulation ferroptosis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 632354.
- [24] YUAN H, LI X M, ZHANG X Y, et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(3): 1338 - 1343.
- [25] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91 - 98.
- [26] DI SANZO M, QUARESIMA B, BIAMONTE F, et al. FTH1 Pseudogenes in cancer and cell metabolism [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2554.
- [27] AROSIO P, LEVI S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(4): 457 - 463.
- [28] THEIL E C. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism [J]. *J Nutr*, 2003, 133(5 Suppl 1): 1549S - 1553S.
- [29] CONRAD M, PRATT D A. The chemical basis of ferroptosis [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(12): 1137 - 1147.
- [30] SU L J, ZHANG J H, GOMEZ H, et al. Reactive oxygen species - induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5080843.
- [31] KALININA E V, GAVRILUK L A. Glutathione synthesis in cancer cells [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2020, 85(8): 895 - 907.
- [32] FRANCO R, CIDLOWSKI J A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(10): 1303 - 1314.
- [33] DODSON M, CASTRO - PORTUGUEZ R, ZHANG D D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2019, 23: 101107.
- [34] ROH J L, KIM E H, JANG H, et al. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin - resistant head and neck cancer cells to artesunate - induced ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 254 - 262.
- [35] SUN X F, OU Z H, CHEN R C, et al. Activation of the p62 - Keap1 - NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2016, 63(1): 173 - 184.

收稿日期: 2022 - 08 - 14

作者简介: 范修琦 (1995 -), 女, 河南新乡人, 医学硕士, 主要从事中西医结合防治肺癌的研究。

通信作者: 高启龙, 医学博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 中西医结合治疗恶性肿瘤。Email: 648583676@qq.com

编辑: 孙亚萍